

Cours d'Enzymologie

Filière : DUT Agro-Industrie_S2

Enseignant: Khalid BOUTOIAL



Objectifs du cours

- Définir les termes utilisés en enzymologie : enzyme, substrat, produit, coenzyme, activateur, inhibiteur, réaction enzymatique,
- Classer les enzymes
- Etude de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du temps, de la concentration de l'enzyme, de la concentration du substrat.
- Démonstration de l'équation de Michaelis et Menten,
- Détermination graphique des constantes de l'équation de Michalis
- Etude des effets des inhibiteurs d'une réaction enzymatique.
- Etude des enzymes allostériques
- Etude de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du pH ou de la température.

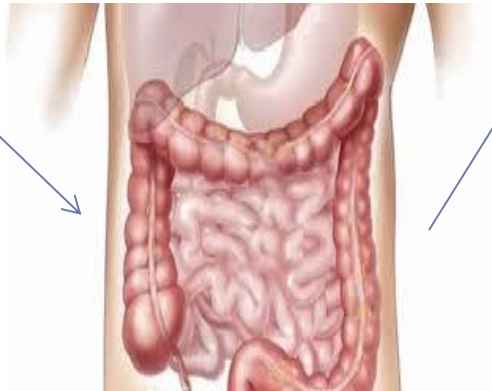
Définitions

➤ Enzyme

- Des catalyseurs biologiques de nature protidique.
- Interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possibles.
- Efficace que les catalyseurs chimiques.
- Accélèrent les réactions par facteur qui peut atteindre 10^{11} fois.



Réaction très lente (années)
avec libération de chaleur inutilisable



Réaction en quelques secondes
(La présence des saccharase et les enzymes de la
voie de glycolyse)

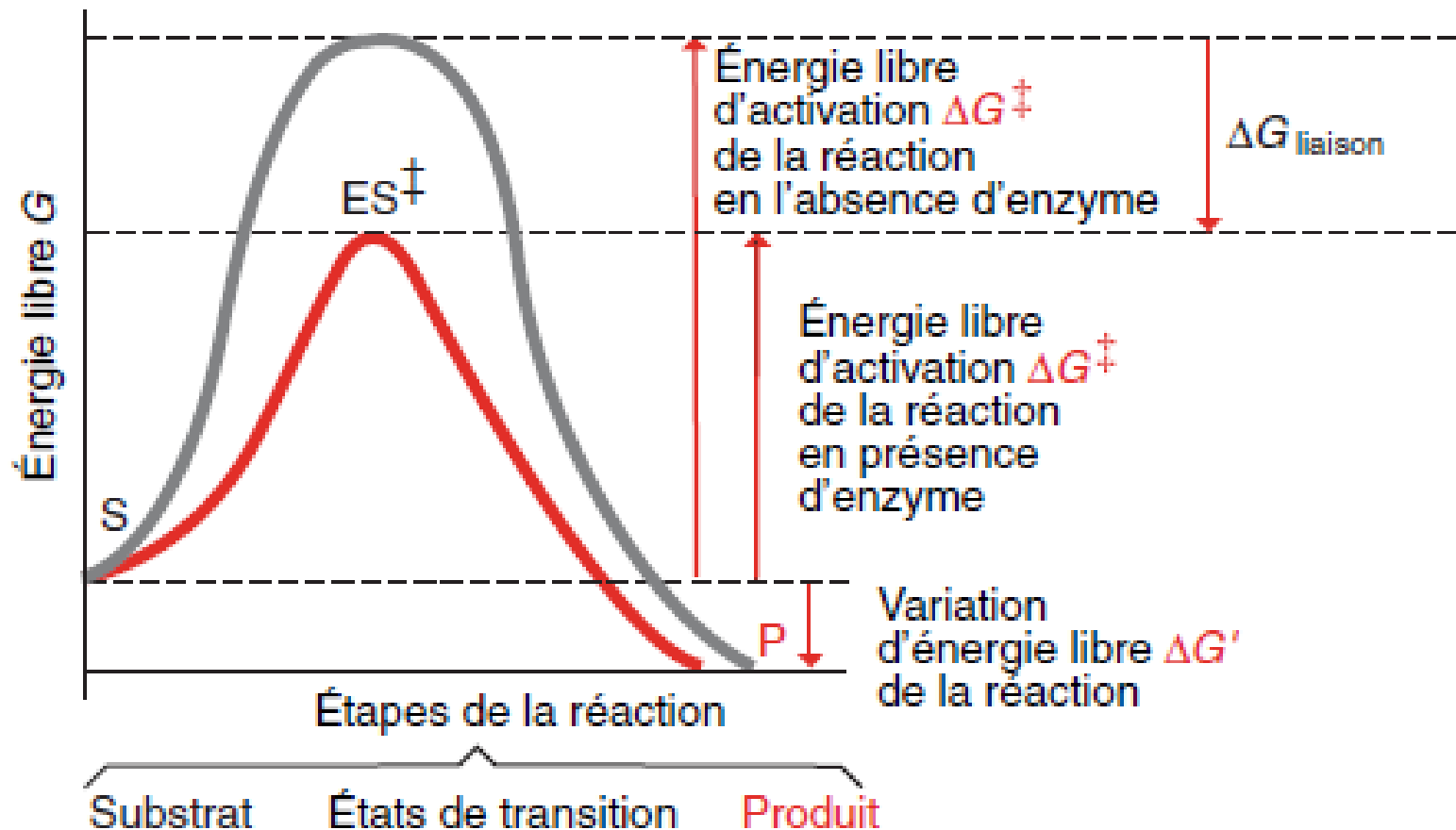
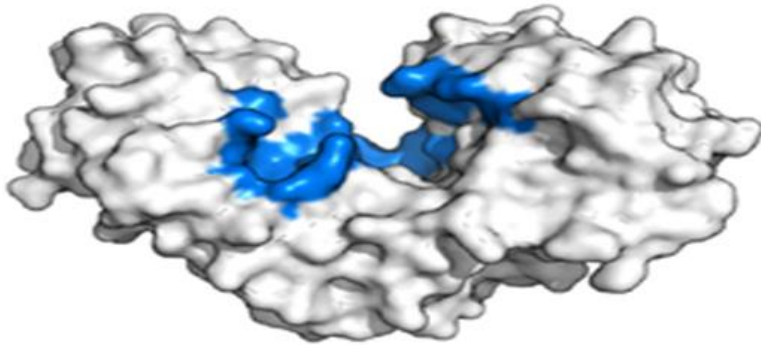
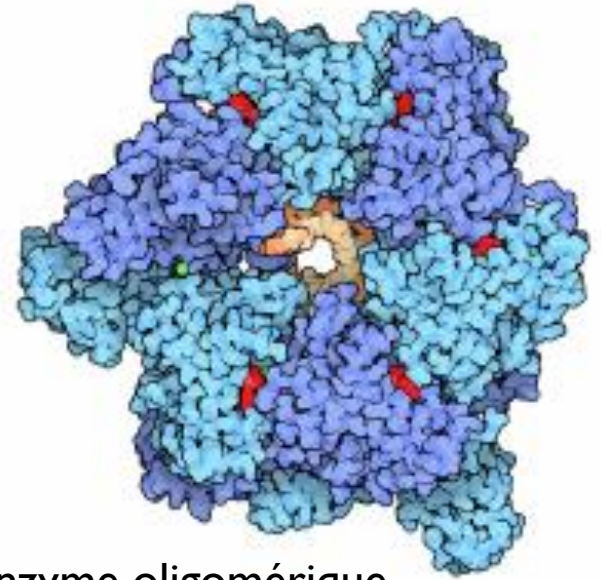


Diagramme d'une réaction catalysée montrant l'énergie E requise à différentes étapes suivant l'axe du temps t .

- Une structure monomérique ou oligomérique
- Des molécules bien plus grandes que leurs substrats.



Enzyme monomérique



Enzyme oligomérique

-
- Leur taille varie de 62 résidus pour le monomère de 4-oxalocrotonate tautomérase à plus de 2000 résidus pour l'acide gras synthase animale.
 - La structure des enzymes est altérée (dénaturée) lorsqu'elles sont chauffées ou mises en contact avec des dénaturants chimiques, ce qui a généralement pour effet de les inactiver.

Histoire d'enzymologie scientifique

- ▶ **En 1883** Payen a découvert la diastase (est une glycoside hydrolase qui catalyse l'hydrolyse de l'amidon essentiellement en maltose).
 - ▶ **En 1849** Claude Bernard a découvert la lipase pancréatique
- Une révolution de la biotechnologie au monde (utilisation des substances biochimiques au lieu d'utilisé les microorganismes dans la fermentation)



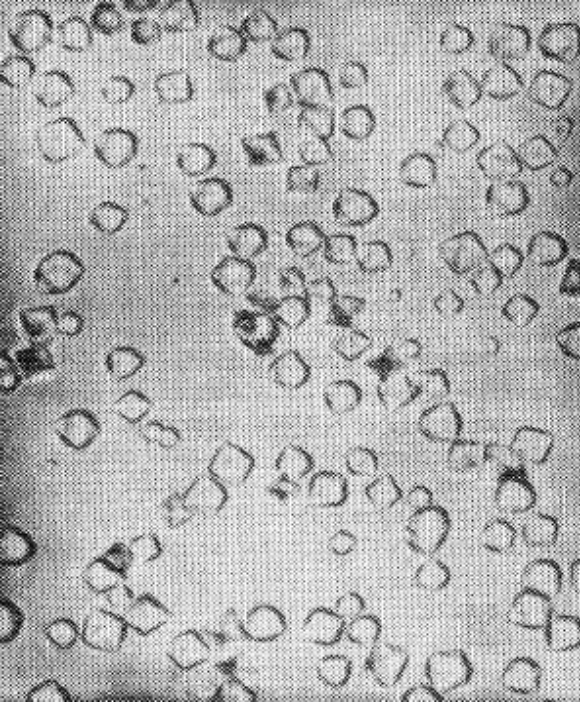
Leonor Michaelis
1875–1949



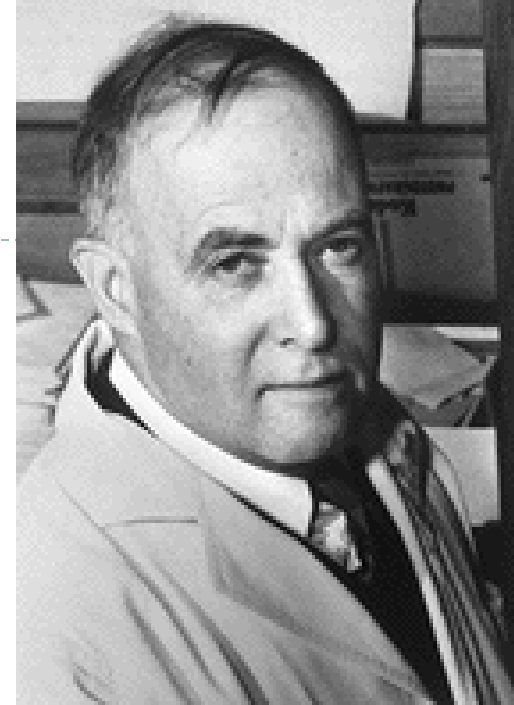
Maud Menten
1879–1960

En 1913,
L'équation de
Michaelis-Menten a prise sa
forme
mathématique
donne à la
cinétique
enzymatique

$$V = V_m \frac{[S]}{K_M + [S]}$$



James Batcheller Sumner (1926)



- La première activité enzymatique à être suffisamment purifiée pour être cristallisée fut celle de l'uréase, par James Sumner en 1926.
- Sumner ayant établi que ses cristaux d'uréase consistaient de protéines
- La nature biochimique des enzymes : des protéines
- Une démonstration ultérieure de la nature protéique de la trypsine et de la chymotrypsine.

Utilisation industrielle des enzymes

Les enzymes peuvent participées:

- En agroalimentaire:** production des AA, de glucose, fructose avec l'utilisation des isomérases, amélioration des procédés de panification, fromages, clarification des boissons alcooliques ...
- Chimie industrielle: production des acides, modification des structures des antibiotiques.
- En biotechnologie:** techniques analytiques de séparation par inclusion dans un gel, l'adsorption sur un solide...

Dénomination et classement des enzymes

- ▶ Avant l'apparition de la nomenclature officielle.
 - Les enzymes ont des appellations traditionnelles:
 - Enzymes qui hydrolysent les lipides: lipases
 - Enzymes qui hydrolysent les protéines: protéases
 - Enzymes qui hydrolysent les a. nucléiques: nucléases
 - Enzymes qui hydrolyse l'amidon: amylases

→ Actuellement les enzymes sont classés:

- selon la réaction qu'ils catalysent.
- Ils sont désignés par un numéro de classification (**EC « Enzyme Commission »** $n_1.n_2.n_3.n_4$).
- Ce numéro, qui est spécifique pour chaque enzyme.

EC $n_1.n_2.n_3.n_4$

n_1 : le type de réaction (classe); n_1 : $1 \rightarrow 6$

EC $n_1.n_2.n_3.n_4$

n_2 : le type de fonction du substrat métabolisé (sous-classe).

EC $n_1.n_2.n_3.n_4$

n_3 : le type de l'accepteur

EC $n_1.n_2.n_3.n_4$

n_4 : Le numéro d'ordre (dans la sous-sous-classe).

Classes des enzyme

Les enzymes sont classées en six principaux groupes, en fonction du type de réaction qu'elles catalysent :

Groupe	Code	Type de réaction
Oxydoréductases	EC 1	Réaction d'oxydoréduction
Transférases	EC 2	Transfert de groupes fonctionnels d'un substrat à un autre
Hydrolases	EC 3	Hydrolyses
Lyases	EC 4	Rupture de différentes liaisons chimiques par des moyens autres que l'hydrolyse ou l'oxydation
Isomérases	EC 5	Isomérisations
Ligases ou synthétases	EC 6	Formations de liaisons covalentes couplée à l'hydrolyse d'un nucléoside triphosphate (généralement l'ATP)

Classe 1: oxydoréductases

- Catalysent les réactions d'oxydo-réduction.
 - Connus sous le nom de deshydrogénases, oxydases, peroxydases, oxygénases ou réductases.
- Une oxydation est une perte d'électrons :
- $$\text{Zn} \rightarrow \text{Zn}^{2+} + 2 \text{e}^{-}$$
- Une réduction est un gain d'électrons :
- $\text{Cu}^{2+} + 2 \text{e}^{-} \rightarrow \text{Cu}$

Classe 2: Les transférases

- Catalysent les réactions de transfert de groupes moléculaires d'une molécule à une autre.
- **exemple**: Transfert d'un groupement NH_2 d'une molécule sur un céto-acide, en position α .
- EC 2.1 qui regroupe les enzymes transférant un groupe à un carbone (méthyltransférase)
- EC 2.2 qui regroupe les enzymes transférant un groupe carbonyle (aldéhyde ou cétone)
- EC 2.3 qui regroupe les acyltransférases
- EC 2.4 qui regroupe les glycosyltransférases

- EC 2.5 qui regroupe les enzymes transférant un groupe alkyle aryle autre que méthyle
- EC 2.6 qui regroupe les enzymes transférant un groupe azoté (transaminase)
- EC 2.7 qui regroupe les enzymes transférant un groupe phosphoré (phosphotransférase, mais aussi polymérase et kinase)
- EC 2.8 qui regroupe les enzymes transférant un groupe sulfuré (sulfurtransférase et sulfotransférase)
- EC 2.9 qui regroupe les enzymes transférant un groupe contenant du sélénium.

Classe 3: Les hydrolases

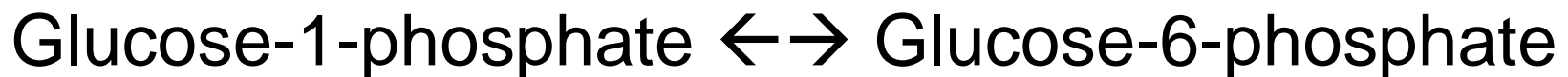
- Catalysent les clivages hydrolytiques.
 - β -D-glucane 4-glucanohydrolase = cellulase
Glucose (n) \rightarrow Glucose (n-1) + D-glucose.
 - les estérases, qui hydrolysent les esters (R-CO-O~R'),
 - les peptidases, qui hydrolysent les liaisons peptidiques (aa1-CO~NH-aa),
 - les glycosidases, qui hydrolysent les oligo- ou polysaccharides (sucre1-O~sucre2),
 - les phosphatases, qui hydrolysent les produits phosphorés (exemple : $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_i$).

Classe 4: Les lyases

- Catalysent la coupure d'une liaison entre deux atomes sans l'intervention d'une molécule d'eau (contrairement aux hydrolases) ou d'un oxydant.
- Les décarboxylases font partie de cette classe d'enzymes.
- Exemple : l'histidine décarboxylase,
- E.C.4.1.1.22 :
 - L-Histidine \rightarrow D Histamine + CO₂

Classe 5: Les isomérases

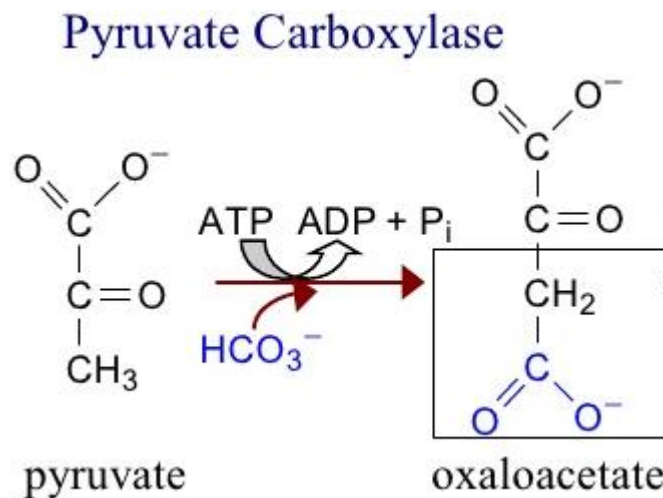
- Modifient l'arrangement des atomes dans une même molécule.
- Le substrat et le produit auront la même formule brute, mais se distingueront l'un de l'autre par leur formule développée.
- Par exemple, la phosphoglucomutase, E.C.5.4.2.2: transfère réversiblement le groupe phosphate du glucose-1-phosphate sur la fonction alcool en 6 :



Classe 6: Les ligases

- Les ligases sont aussi dénommées synthétases.
- Les ligases catalysent la réunion de deux molécules par une liaison covalente

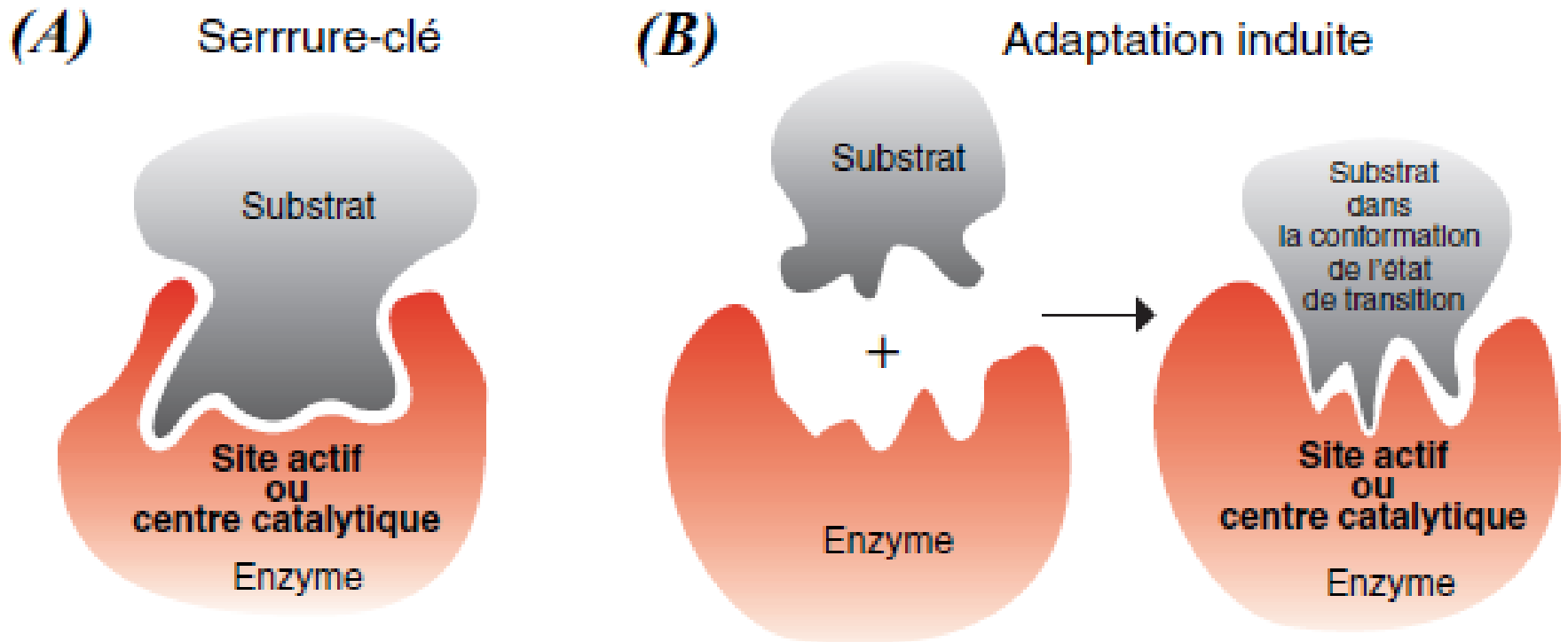
La pyruvate carboxylase, E.C. 6.4.1.1, utilise le bicarbonate (HCO_3^-) comme deuxième substrat :



Mécanisme d'action des enzymes

Les premières études sur les enzymes ont montré qu'une enzyme ne catalysant qu'un seul type de réaction et même n'agissant que sur un seul substrat.

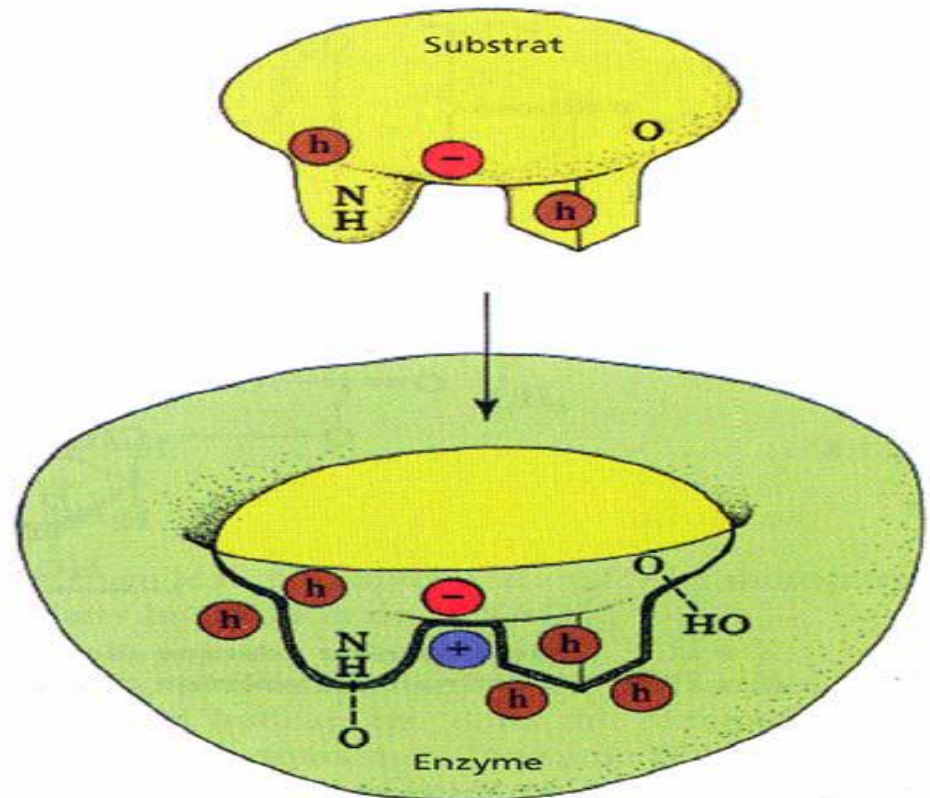
Les études cinétiques ont conduit au concept du complexe transitoire enzyme-substrat ES évoluant vers la formation d'un produit P et la libération de l'enzyme S inchangé à la fin de la réaction.



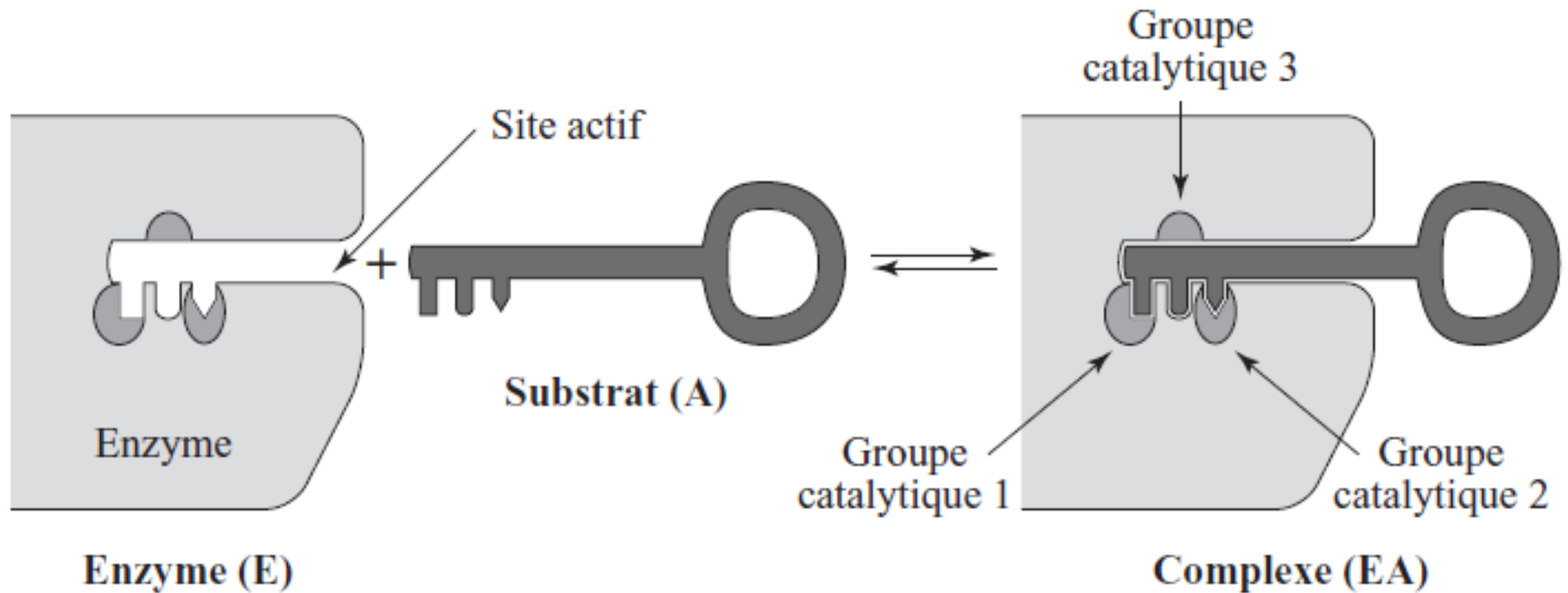
Interaction enzyme-substrat

Modèle de clé-serrure

- Afin d'expliquer la spécificité des enzymes dans la sélection des réactions chimiques qu'elles sont susceptibles de catalyser



-
- ▶ Le chimiste allemand **Emil Fischer** proposa en 1894 que l'enzyme et le substrat d'une réaction possèdent une géométrie complémentaire permettant au substrat de s'emboîter exactement dans l'enzyme.
 - ▶ Cette représentation est souvent appelée **«modèle de clé- serrure»**.
 - ▶ Ce modèle ne permet pas d'expliquer comment les enzymes parviennent à stabiliser l'état de transition au cours des réactions.

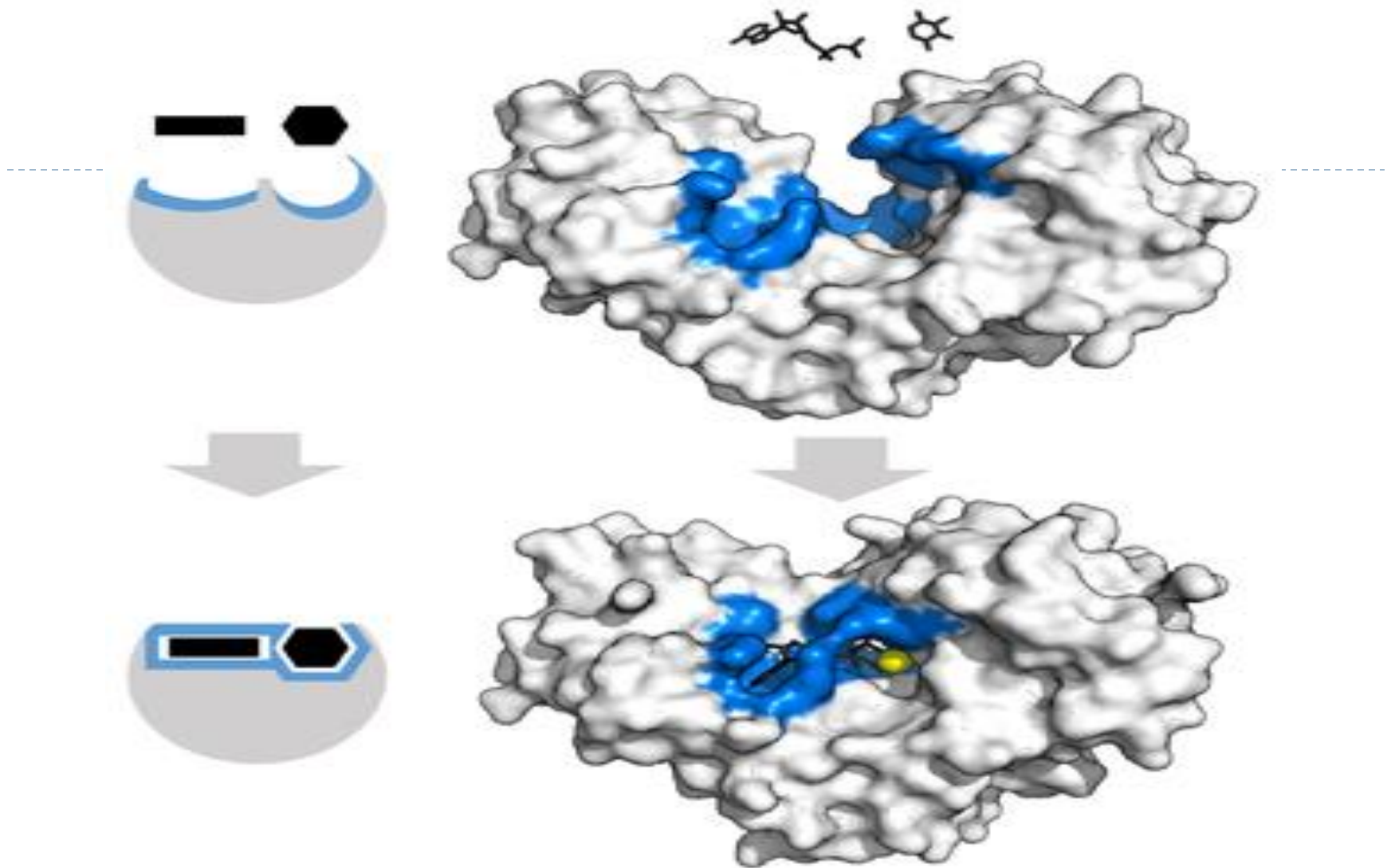


Le concept clé-serrure proposé par Emil FISCHER pour expliquer la spécificité d'action des enzymes suggérerait l'existence d'un complexe enzyme-substrat

Modèle de l'ajustement

- ▶ Le biochimiste Américain **Daniel Koshland** proposa en 1958 le modèle dit de **l'ajustement induit** (induced fit en anglais) comme adaptation du modèle de la serrure et de la clef.
- les enzymes sont des molécules flexibles: mais pour un substrat dans une enzyme rigide,
- Koshland considérait que l'interaction entre le substrat et l'enzyme remodelait en permanence le site actif, et ce tout au long de l'établissement de la liaison.

-
- ▶ Dans certains cas, comme les glycosides hydrolases, le substrat lui-même change légèrement de forme lorsqu'il se lie au site actif de l'enzyme.
 - ▶ Le site actif continue de changer sa configuration jusqu'à ce que le substrat soit entièrement lié, et ce n'est qu'alors que la distribution des charges et la géométrie finale peuvent être déterminées.



- Schéma de mode de liaison entre enzyme- substrat

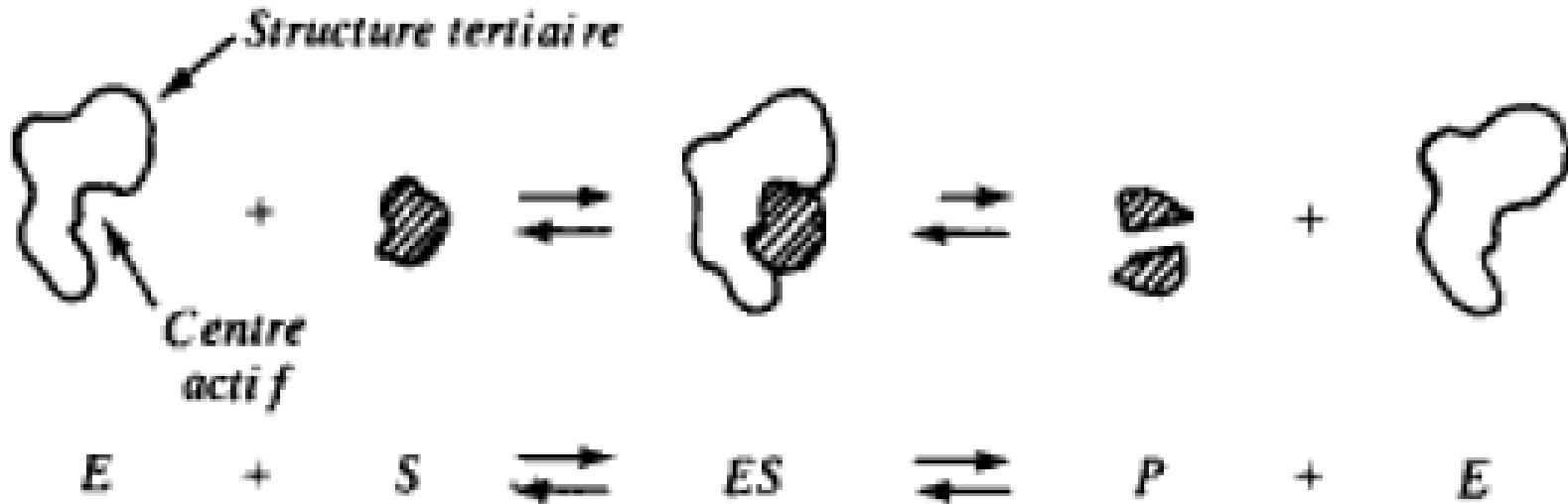
Le déroulement d'une réaction enzymatique

- **La première** consiste en formation d'un complexe stéréospécifique entre l'enzyme et son substrat.

Ce complexe a deux fonctions : le choix exclusif du substrat, déterminé par la structure stérique de ce dernier, et la présentation du substrat selon une orientation précise par rapport à l'enzyme.

- **La seconde** est l'activation catalytique de la réaction au sein du complexe.

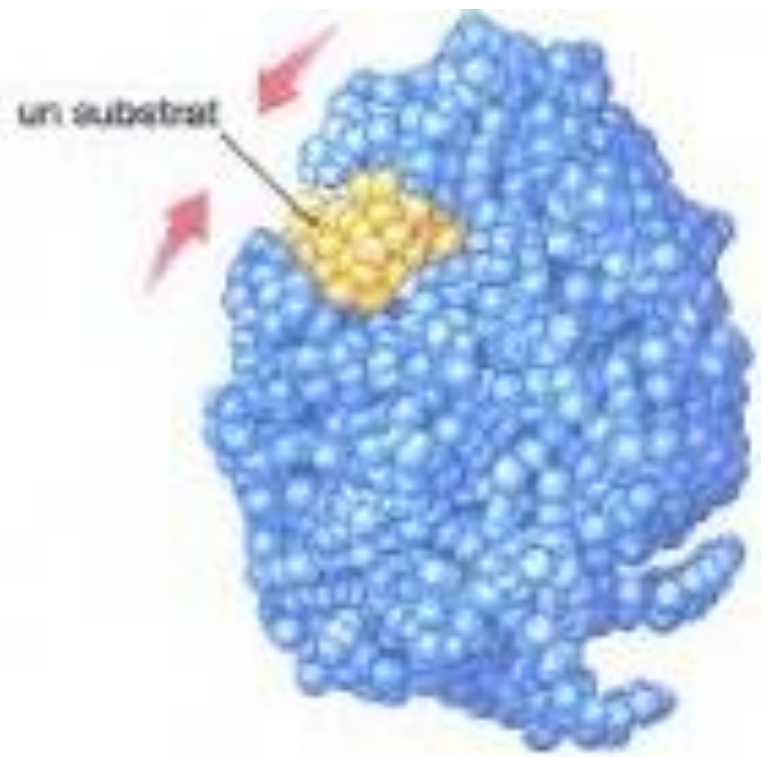
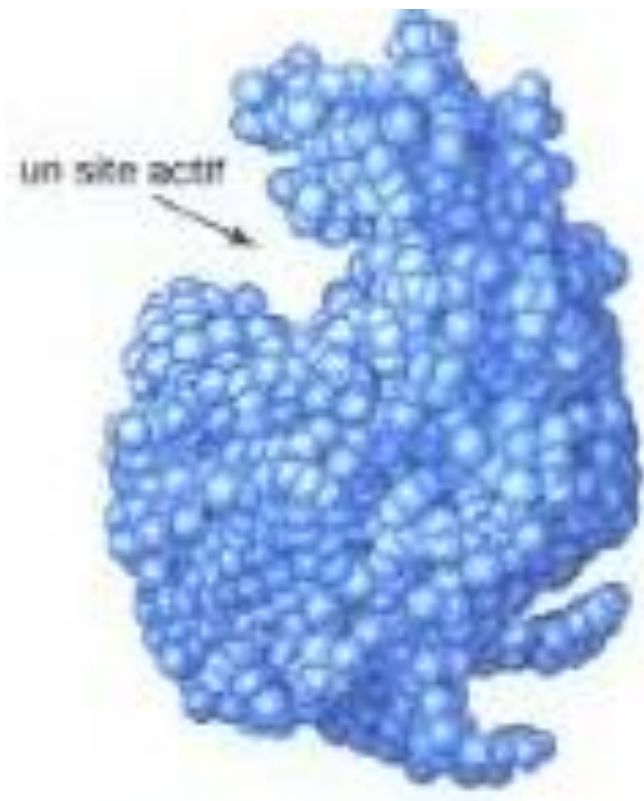
✓ Cette réaction est orientée et spécifiée par la structure du complexe et conduit à la transformation du **substrat** en **produit**.



Représentation des étapes de déroulement d'une réaction enzymatiques

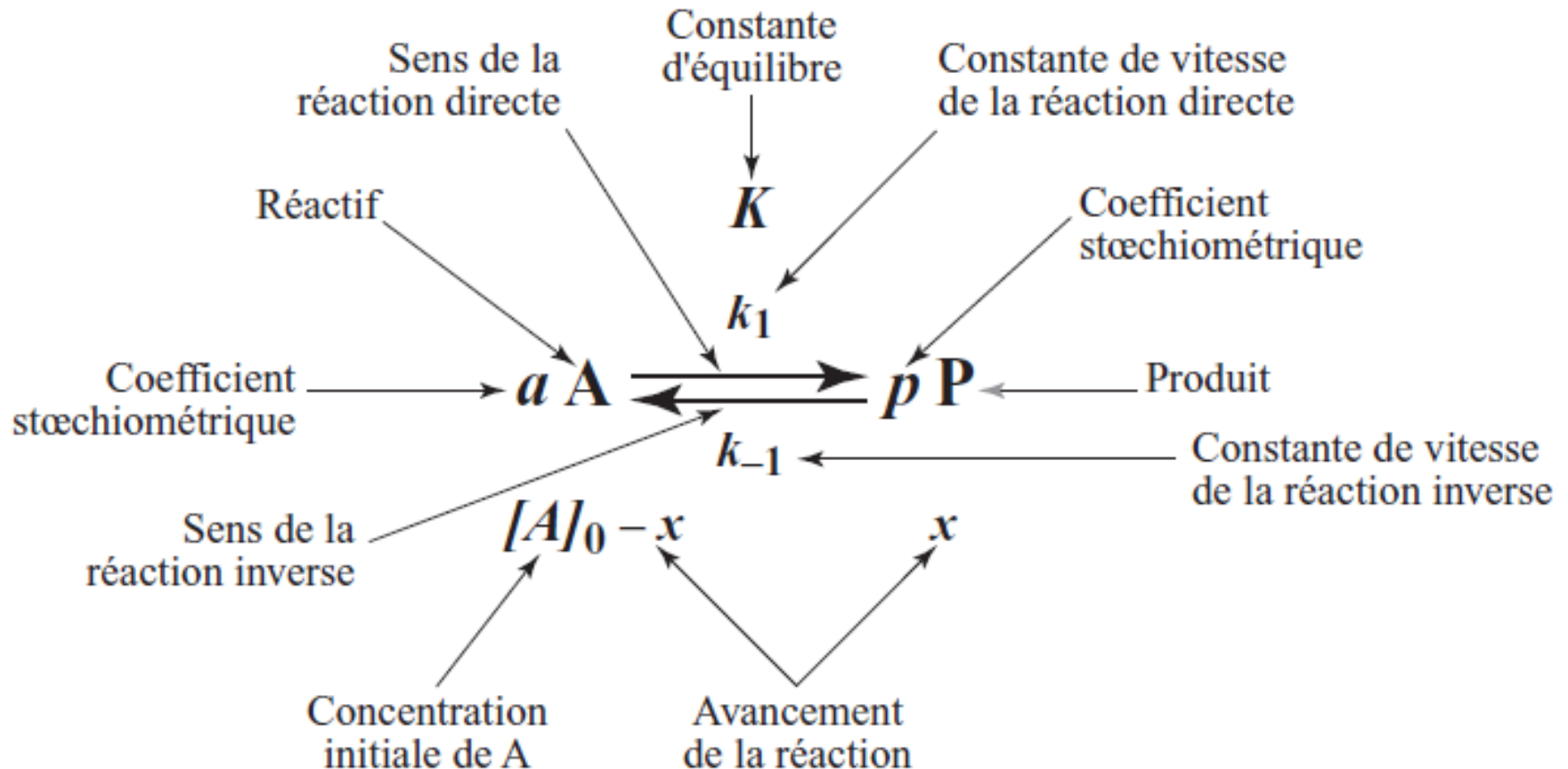
Notion de site actif

- ▶ L'activité catalytique d'une enzyme est limitée à une région définie de sa structure tertiaire: zone centre ou site actif.
- ▶ La géométrie du centre actif a une importance dans la stéréospécificité du complexe ES.
- ▶ Le site actif assure 2 fonctions: la fixation et la transformation du substrat.
- ▶ Pour une enzyme oligomère un site actif se retrouve sur chaque unité monomérique.



Représentation su site actif d'enzyme

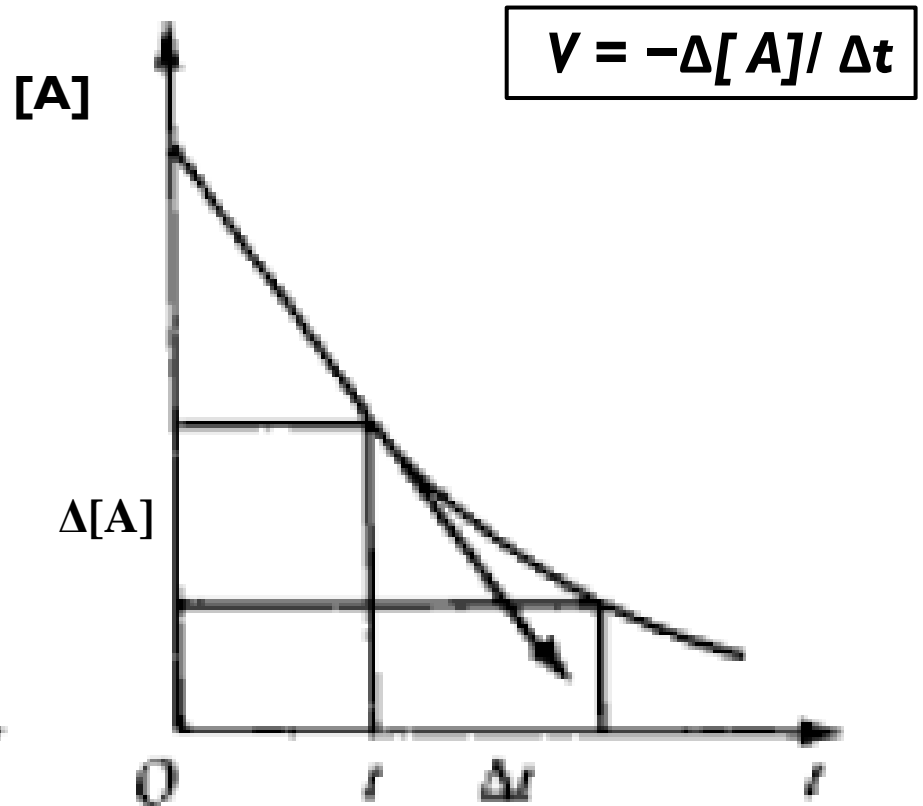
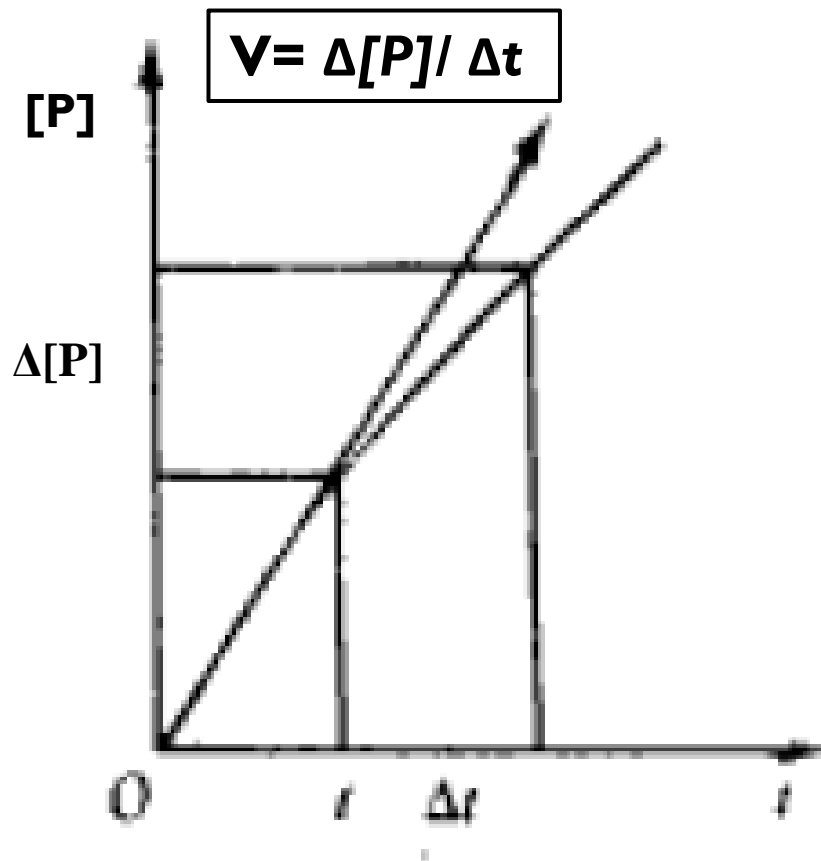
La catalyse chimique



Représentation schématique d'une réaction chimique et conventions d'écriture

Vitesse de réaction et équation de vitesse

- ▶ La vitesse d'une réaction chimique: une mesure de la rapidité avec laquelle la concentration des réactifs et des produits change au cours du temps.
- ▶ La vitesse de la réaction peut être définie à partir de la disparition des réactifs ou à partir de l'apparition du produit.



Représentation graphique de la réaction de vitesse

-
- ▶ Si la concentration d'un réactif, représentée par $\Delta[A]$, varie d'une quantité $[A]$ pendant l'intervalle de temps Δt , la vitesse est donnée par:
 - ▶ En d'autres termes, la vitesse est la variation par unité de temps de la concentration de l'une des substances initiales ou finales.

$$\begin{aligned} V &= -\Delta[A] / \Delta t \\ &= \Delta[P] / \Delta t \end{aligned}$$

Loi de van't Hoff

► Soit la réaction : $2A + B \rightarrow P$

➤ l'équation de vitesse est donnée par:

$$v = k[A]^2 [B]$$

où k est un coefficient de proportionnalité appelé constante de vitesse de la réaction.

- La loi d'action des masses peut se vérifier simplement en mesurant l'effet sur la vitesse de la réaction de la variation de la concentration d'un des réactifs.

$$V = -d[A]/dt = k[A]^x [B]^y \quad (\text{Loi de van't Hoff})$$

où

- k est la constante de vitesse pour la réaction considérée
- x et y sont les ordres partiels de la réaction par rapport à A et B respectivement.

Ordre et molécularité d'une réaction

- ▶ Une réaction chimique peut être classée selon sa molécularité ou selon son ordre.
- ▶ La **molécularité** fait référence au **nombre de molécules altérées** au cours de la réaction.
 - Une réaction de type **$A \rightarrow P$: Unimoléculaire**
 - **$A + B \rightarrow P$: Biomoléculaire.**
 - **$A + B + C \rightarrow P$: Trimoléculaire.**

-
- ▶ **L'ordre:** la cinétique de la réaction qui découle directement de la loi d'action des masses
 - ▶ il définit le nombre de termes de concentration qui doivent être multipliés pour obtenir l'équation de vitesse de la réaction.
 - ▶ Ainsi, dans une réaction de premier ordre, la vitesse est proportionnelle à la concentration d'un seul réactif, dans une réaction de second ordre, elle est proportionnelle au produit de deux concentrations ou au carré de la concentration d'un seul réactif, et ainsi de suite.

-
- ▶ Les expressions de la loi de vitesse pour différents ordres sont alors :
 - ▶ **Premier Ordre : $A \rightarrow B$**
 - ▶ **$v = k[A] = k[B]$**
 - ▶ **Deuxième ordre global : $A + B \rightarrow P$**
 - ▶ **$v = k[A].[B]$ ou $V = k[A]^2 = k[B]^2$**

-
- ▶ **Troisième ordre global : $A+B+C \rightarrow P$**
 - ▶ **vitesse = $k[A].[B].[C]$ ou $k[A]^2[B]$.**
 - ▶ **Ordre zéro :**
 - ▶ **$V = -d[A]/dt = k ;$**
 - ▶ **$d[A] = -kdt$**

► **Pour une réaction du premier ordre :**

► $V = -d[A]/dt = k[A] ;$

► $d[A]/[A] = -kdt$

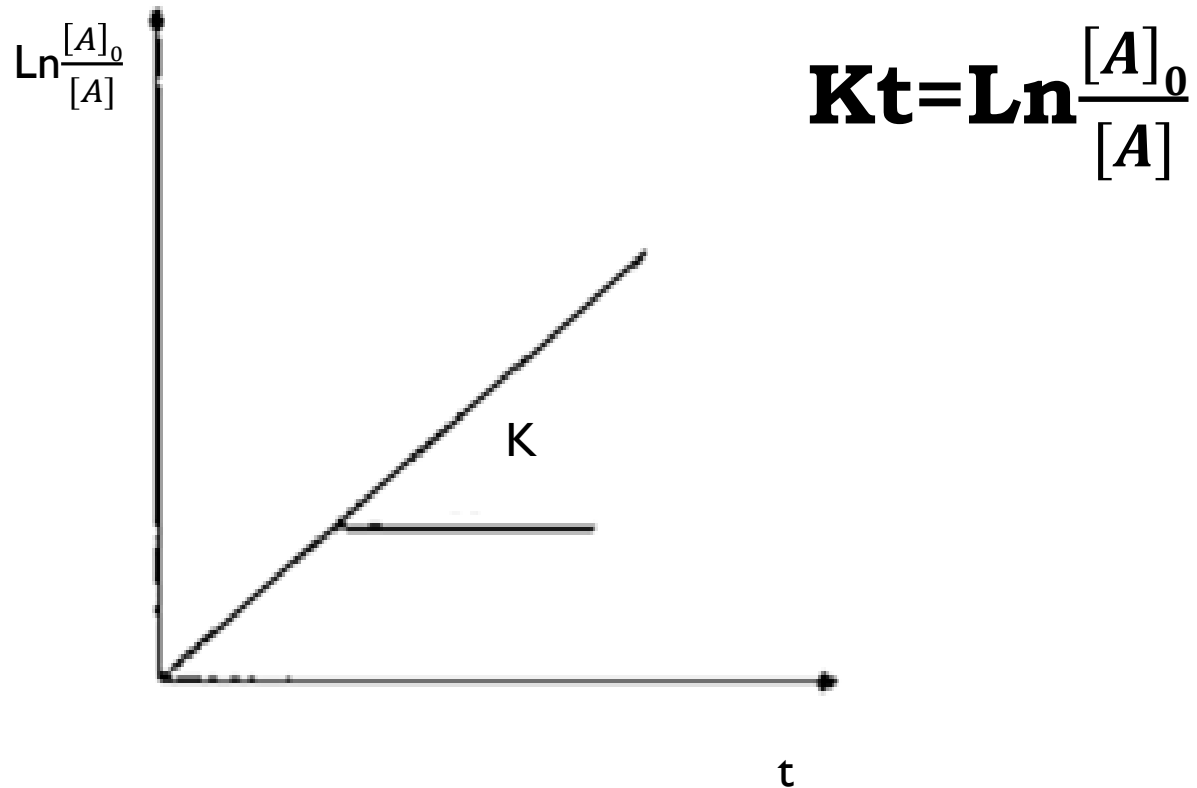
► L'intégration donne :

► $\int_{A_0}^{A_1} \frac{d[A]}{[A]} = -\int_0^t K dt$

► $\ln [A]_t - \ln [A]_0 = -kt \rightarrow \mathbf{\ln \frac{[A]_0}{[A]} = Kt}$

► Ainsi une réaction de premier ordre est caractérisée par une dépendance linéaire de $\ln[A]$ en fonction du temps.

► La constante k est mesurée en $[s^{-1}]$.



Représentation de l'équation de vitesse d'une réaction de premier ordre



$$\text{à } t_0 \quad [A]_0 = a$$

à un temps quelconque $[A] = a - x$

on a

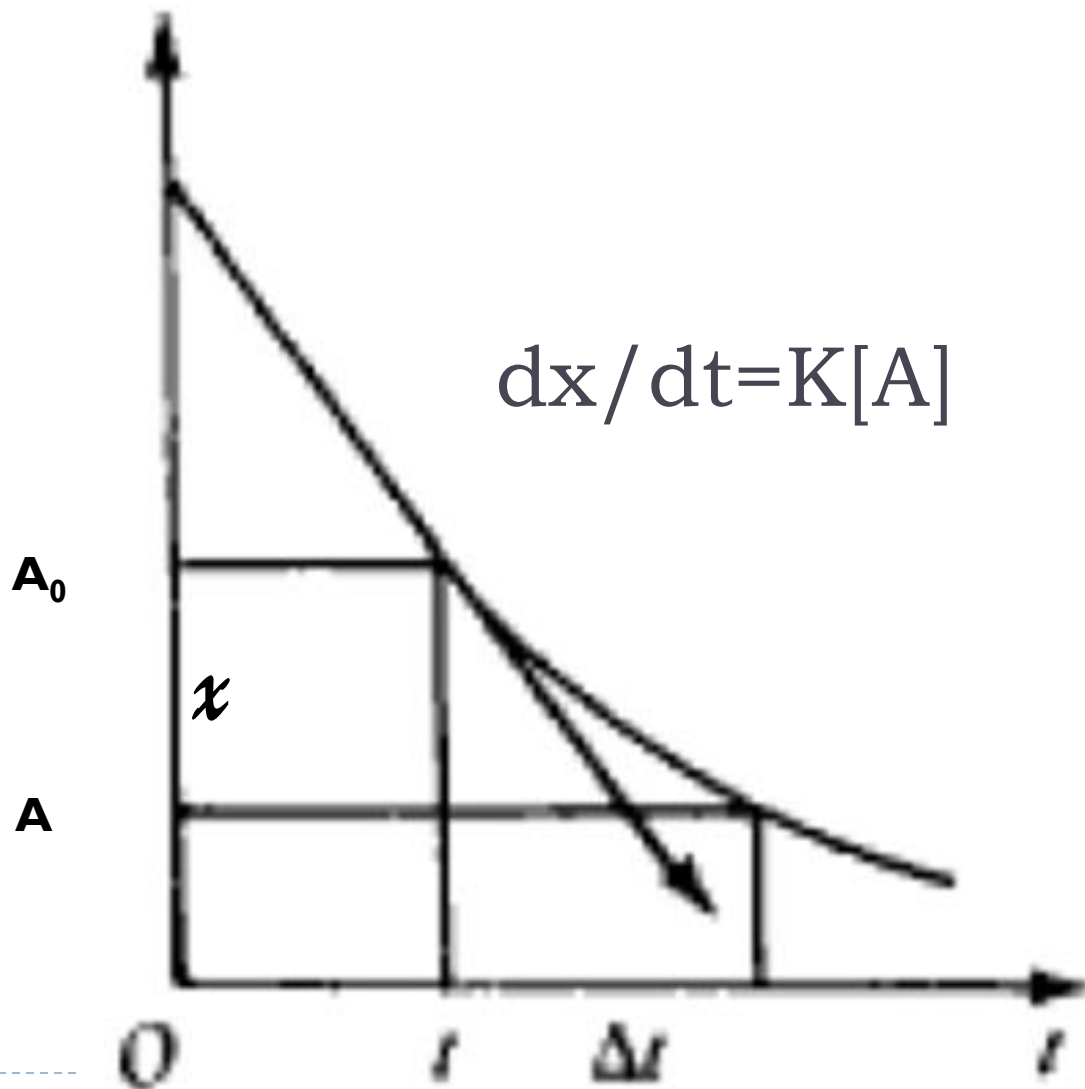
$$V = dx/dt = K[A] = K(a - x)$$

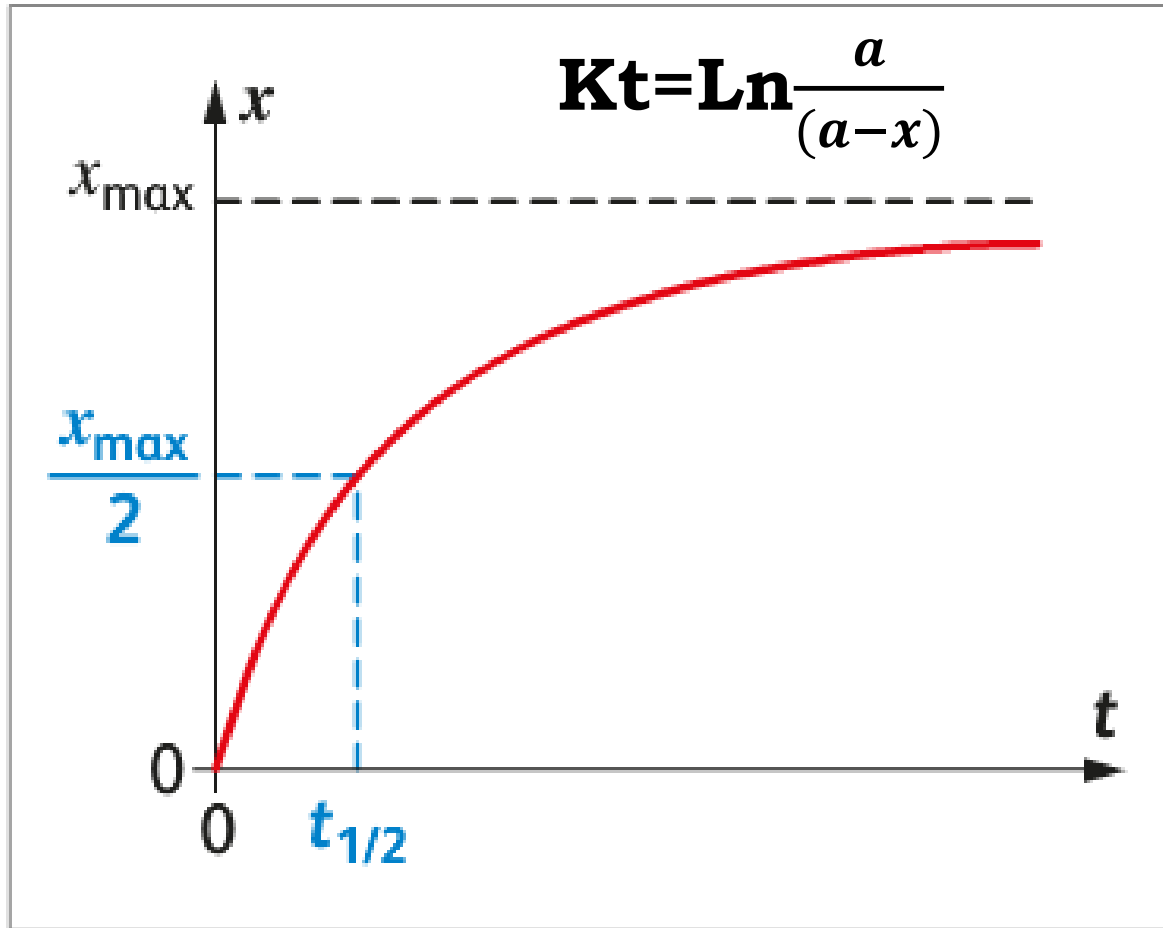
$$\mathbf{Kdt = dx / a - x}$$

$$\int_0^t K dt = \int_0^x \frac{dx}{(a - x)}$$

$$\mathbf{Kt = -Ln(a - x) + cste}$$

$$\text{à } t=0 \quad x=0 \quad \rightarrow \quad \text{Ln}(a) = cste$$

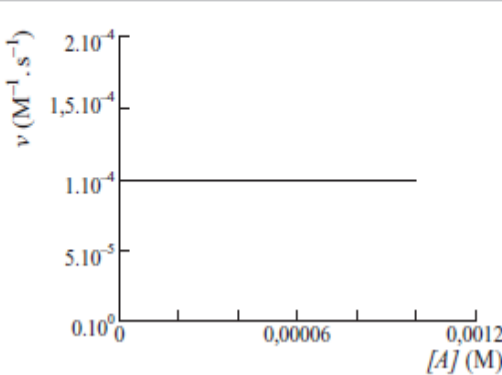
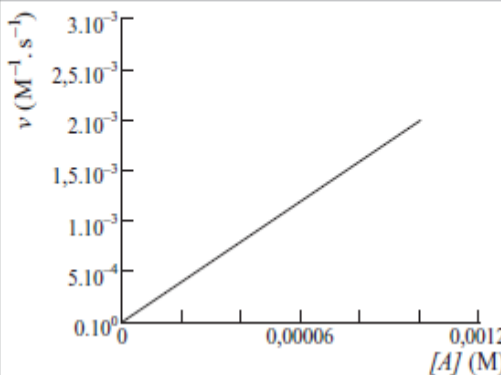
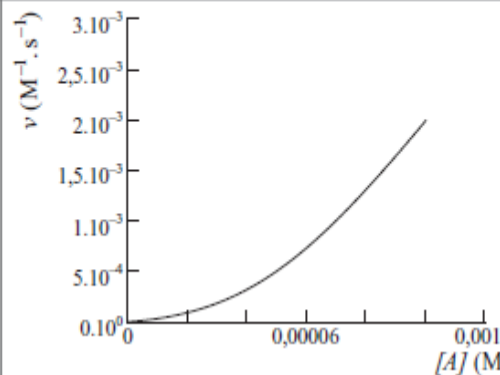
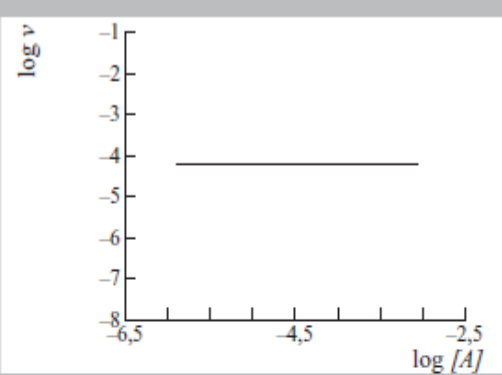
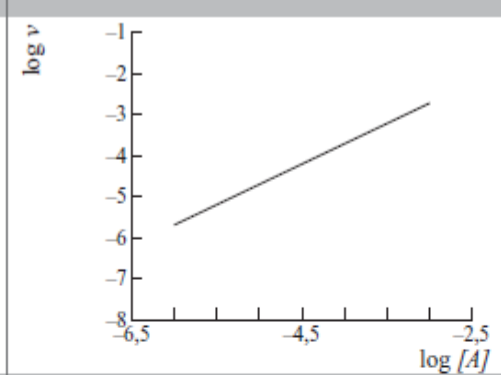
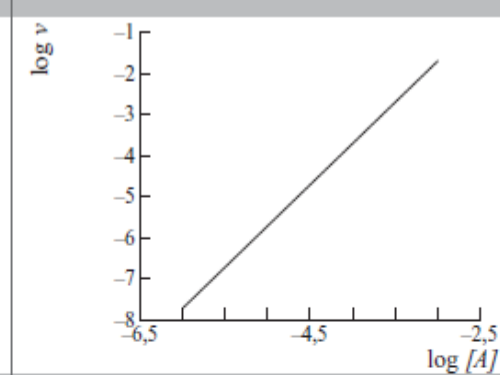
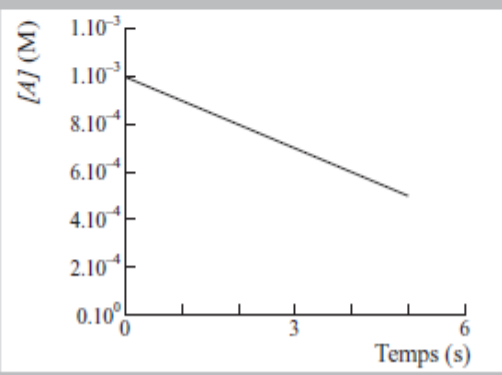
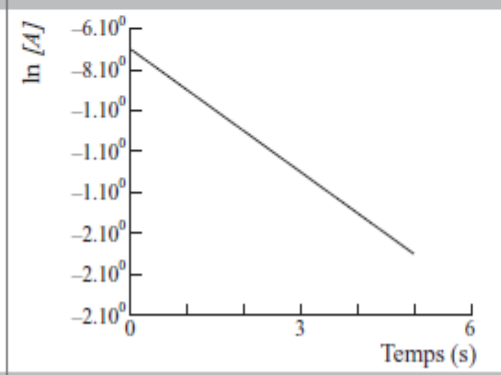
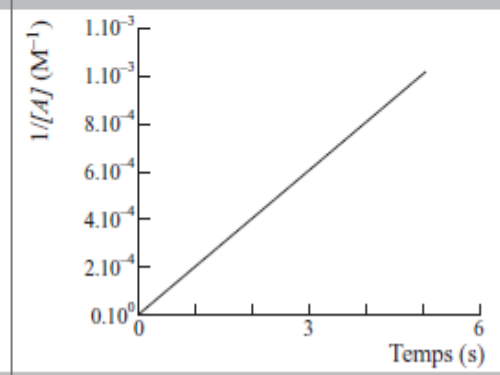




Représentation de l'équation de vitesse d'une réaction de premier ordre

à $t_{1/2}$ $[A] = \frac{[A]_0}{2}$ $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$

Pour les réactions d'ordre 1 le $t_{1/2}$ est Independent de la concentration en réactif; par contre pour les réactions de l'ordre 0 et 2 le $t_{1/2}$ est dépendent de la concentration en réactifs

	Ordre 0	Ordre 1	Ordre 2
Equation de vitesse	$v_0 = k$	$v_0 = k.[A]$	$v_0 = k.[A]^2$
Graphique v en fonction de $[A]$			
Détermination de l'ordre de la réaction	$\log v_0 = \log k$	$\log v_0 = 1.\log [A] + \log k$	$\log v_0 = 2.\log [A] + \log k$
Graphique $\log v$ en fonction de $\log [A]$			
Détermination de la constante de vitesse	$[A]_t = [A]_0 - k.t$	$\ln [A]_t = \ln [A]_0 - k.t$	$1/[A]_t = 1/[A]_0 + k.t$
Linéarisation du graphique $[A]$ en fonction du temps			
Unité de la constante de vitesse	$M.s^{-1}$	s^{-1}	$M^{-1}.s^{-1}$

Systèmes, principes et fonctions thermodynamiques

▶ **LE PREMIER PRINCIPE ET L'ÉNERGIE**

- ▶ On définit la variation d'énergie interne ΔU :

$$\Delta U = q + w$$

- ▶ où q : quantités de chaleur
- ▶ W : le travail échangés entre le système et l'extérieur
- ▶ q et w , exprimés en Joules, sont comptés négativement s'ils sont produits par le système, et positivement dans le cas inverse.

-
- ▶ L'énergie interne U : fonction d'état
 - ▶ Les réactions chimiques se déroulent à pression constante, généralement à la pression atmosphérique.
 - ▶ Pour tenir compte du travail mécanique consécutif à d'éventuelles variations de volume, on définit une nouvelle fonction d'état, l'**enthalpie**, H :

$$H = U + PV$$

et sa variation à pression constante :

$$\Delta H = \Delta U + P\Delta V$$

-
- ▶ ΔH : la variation d'enthalpie correspond à l'échange de chaleur entre le système et l'extérieur au cours de la réaction lorsqu'elle se déroule à pression constante.
 - ▶ Les réactions caractérisées par ΔU ou $\Delta H < 0$ produisent de la chaleur ; on les qualifie de réactions exothermiques.
 - ▶ À l'inverse, les réactions caractérisées par ΔU ou $\Delta H > 0$ sont qualifiées de réactions endothermiques.

LE DEUXIÈME PRINCIPE ET L'ENTROPIE

- ▶ Introduite par Rudolf Clausius en 1865, l'entropie, S , trouve son origine dans les travaux de Carnot sur le rendement des machines thermiques.
- ▶ La variation d'entropie d'un système au cours d'une transformation réversible est égale au quotient de la quantité de chaleur échangée q par la **température absolue** T ; sous la forme différentielle :

$$dS = dq/T \rightarrow S = q/T$$

$$\Delta S_{\text{tot}} = \Delta S_{\text{sys}} + \Delta S_{\text{env}} > 0$$

- Une réaction est donc spontanée si la somme des variations d'entropie du système et de son environnement soit positive.

ÉNERGIE LIBRE DE GIBBS OU ENTHALPIE LIBRE

- L'enthalpie libre G (en référence à Josiah Willard Gibbs) est une fonction d'état qui prend en compte le premier et le deuxième principe.

-
- L'énergie totale contenue dans un composé organique ou biochimique, brûlé entièrement dans un calorimètre, est 'appelé l'ENTHALPIE TOTALE (H).
 - La partie de cette énergie susceptible de fournir du travail est l'ENTHALPIE LIBRE ou ENERGIE LIBRE (G).
 - La différence entre H et G représente l'ENERGIE ENTROPIQUE (TS).
 - La relation fondamentale qui lie ces différentes énergies a été établie par Willard GIBBS (relation de GIBBS) :

$$H = G + T.S$$

-
- ▶ En biochimie la mesure des énergies totales n'a aucun intérêt.
 - ▶ Il est plus utile de suivre la variation de l'énergie qui renseigne sur l'évolution d'un système.
 - ▶ Ce qui est obtenu est alors

$$\Delta H = \Delta G + T.\Delta S$$

- ▶ Les énergies ou les variations d'énergie : H , ΔH , G , ΔG , TS , $T.\Delta S$ sont exprimées en calorie.mol^{-1} ou en joule.mol^{-1} .

1 calorie = 4,184 joule.

- ▶ En chimie ou en biochimie seule l'enthalpie libre nous intéresse.
- ▶ Elle seule peut informer sur le sens d'évolution d'un système réactionnel.
- ▶ Elle est définie par :

$$\Delta G = \Delta H - T.\Delta S$$

- ▶ Soit un système composé de deux sous-systèmes A et B, représenté par la réaction suivante :
- ▶ $A \rightarrow B$ dont on a déterminé ΔG après réalisation

-
- **Si $\Delta G < 0$** , une réaction spontanée
 - **si $\Delta G = 0$** , la réaction est à l'équilibre.
 - **Si $\Delta G > 0$** , une réaction non spontanée.
 - L'enthalpie libre G est une fonction d'état ; la variation d'enthalpie libre ΔG ne dépend que de l'état initial et de l'état final.

-
- ▶ **si $\Delta G < 0$** $\Delta G_B < \Delta G_A$, la réaction est dite **exergonique** ou spontanée; elle peut se faire spontanément de gauche vers la droite
 - ▶ **si $\Delta G > 0$** $\Delta G_B > \Delta G_A$, la réaction est **endergonique**. Elle ne peut se faire vers la droite que si l'on fournit de l'énergie extérieure au système.
 - ▶ **si $\Delta G = 0$** la réaction se fait sans consommation d'énergie.

CALCUL DE LA VARIATION D'ENTHALPIE LIBRE

Calcul de ΔG

Soit la réaction :



On peut définir à l'instant initial ou à n'importe quel moment de l'évolution de la réaction la constante de réaction K dite constante de Gibbs.

Soit :

$$K = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

- ▶ Il existe une relation entre la variation d'enthalpie libre ΔG et K, dite **relation de Gibbs** :
- ▶ $\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K$
- ▶ ΔG = variation de l'enthalpie (énergie) libre du système réactionnel,
- ▶ ΔG° = variation de l'enthalpie libre standard définie comme ci-dessus.
- ▶ R = constante des gaz parfaits, **1,987** cal/mol/degré ou **8,314** J/mol/degré
- ▶ T = la température Kelvin ($t\text{ }^\circ\text{C} + 273$).
- ▶ K = constante de Gibbs

Conditions standard et Calcul de ΔG°

- ▶ Les conditions standard sont définies quand
- ▶ La concentration de chaque réactif = 1 M ou 1 mol/l
- ▶ La température T est égale à 298°K
- ▶ La concentration des protons est égale à 1 M soit
 $\text{pH} = 0$

-
- ▶ Dans ces conditions la constante $K = 1$ et $\ln K = 0$ dans la relation de Gibbs.
 - ▶ On en déduit que $\Delta G = \Delta G^\circ$.
 - ▶ Mais ΔG° peut être calculée d'une autre manière.
 - ▶ En effet lorsqu'un système évolue vers l'équilibre l'enthalpie libre ΔG diminue et s'annule à l'équilibre pendant que la constante de réaction K tend vers la constante d'équilibre K_e .

-
- ▶ En reportant ces valeurs dans la relation de Gibbs on en déduit
 - ▶ **$\Delta G^\circ = - RT \ln K_e$**

Conditions biochimiques et calcul de $\Delta G'$ et de ΔG°

- ▶ En biologie, les réactions se déroulent à pH 7.
- ▶ La variation d'enthalpie libre mesurée dans les conditions générales est $\Delta G'$.
- ▶ C'est elle qui renseigne sur le sens de l'évolution d'une réaction cellulaire

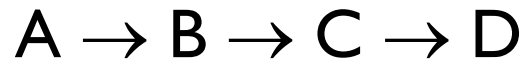
-
- ▶ L'enthalpie libre à pH 7 notée $\Delta G'$ est définie comme suit par la relation de Gibbs :
 - ▶ **$\Delta G' = \Delta G^\circ + RT \ln K$**
 - ▶ On définit alors les conditions standard biologiques à savoir :
 - ▶ Concentration de chacun des réactants dissous égale à 1 M
 - ▶ Température : 25 °C ou 298 °K
 - ▶ Concentration des protons égale à 10^{-7} M ou pH 7.

-
- ▶ Comme précédemment, avec le même raisonnement, on déduit une relation pour le calcul de $\Delta G^{\circ'}$ dans les conditions standard :
 - ▶ **$\Delta G^{\circ'} = - RT \ln K_e$**
 - ▶ Exemple d'application
 - ▶
 - ▶ a) La phosphoglucosomérase catalyse la réaction :
Glucose-6-Phosphate \longleftrightarrow Fructose-6-Phosphate
 - ▶ Avec $K_e = 2$ On en déduit que :

NATURE ADDITIVE DE LA VARIATION DE ΔG

- ▶ Dans la cellule aucune réaction n'est isolée.
- ▶ Elle est impliquée dans une séquence de réactions ou dans une suite de réactions.
- ▶ Dans ces conditions le substrat d'une enzyme conduit à un produit qui lui-même devient substrat d'une deuxième enzyme et ainsi de suite.

-
- ▶ On peut donc écrire comme une séquence de réactions comme suit :



- ▶ Pour chaque étape on peut écrire



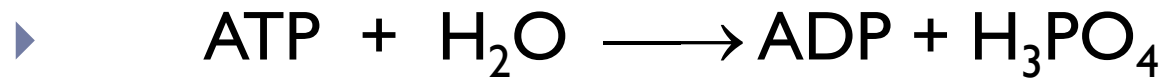
- ▶ La réaction globale est :



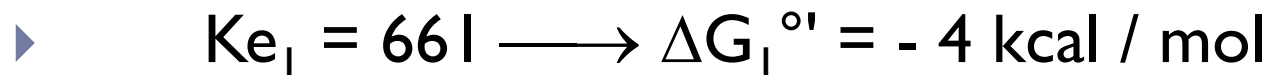
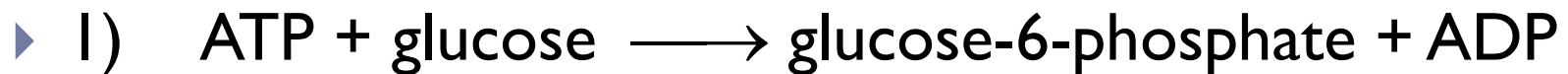
- ▶ On démontre que :

- ▶ $\Delta G'_{AD} = \Delta G'_{AB} + \Delta G'_{BC} + \Delta G'_{CD}$

-
- ▶ Exemple d'application : Enthalpie libre standard de l'hydrolyse de l'ATP.



- ▶ On a recours à cette loi car on ne sait à quel moment la réaction est en équilibre dans la cellule, mais on connaît deux autres réactions où intervient l'ATP.



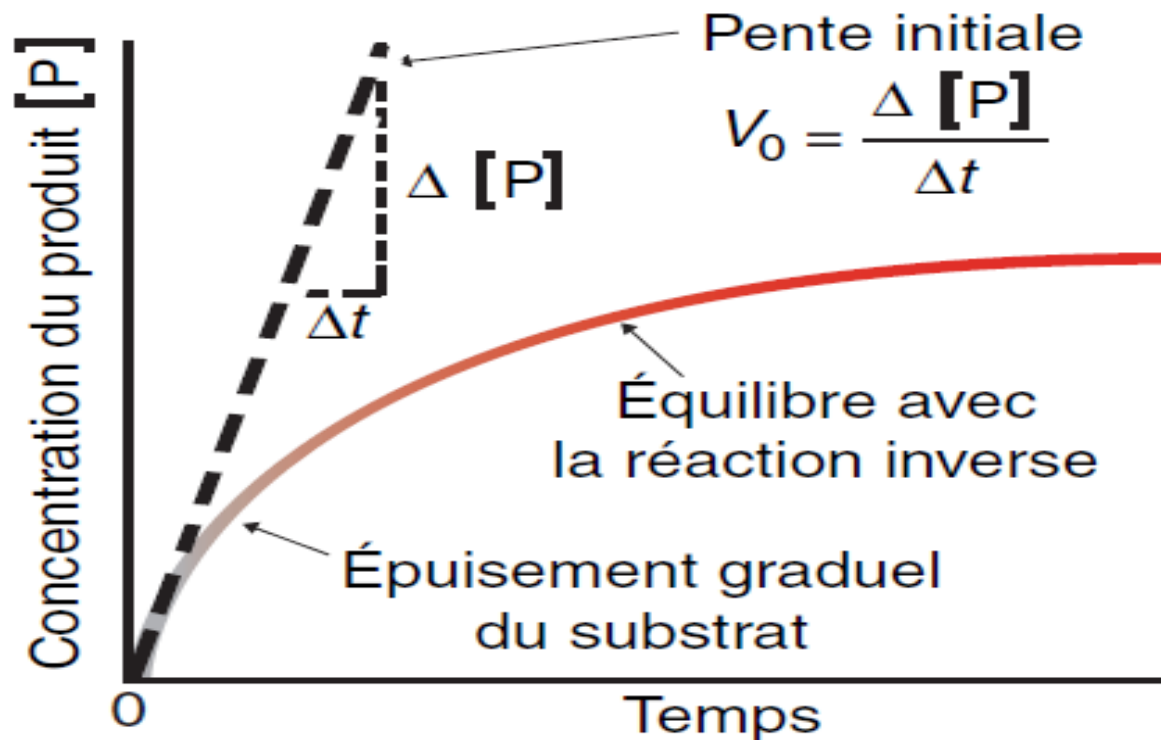
-
- ▶ 2) Glucose-6-phosphate + H₂O \longrightarrow glucose + H₃PO₄
 - ▶ $K_{e_2} = 171 \longrightarrow \Delta G_2^{\circ'} = - 3.30 \text{ kcal /mol}$

Cinétique enzymatique

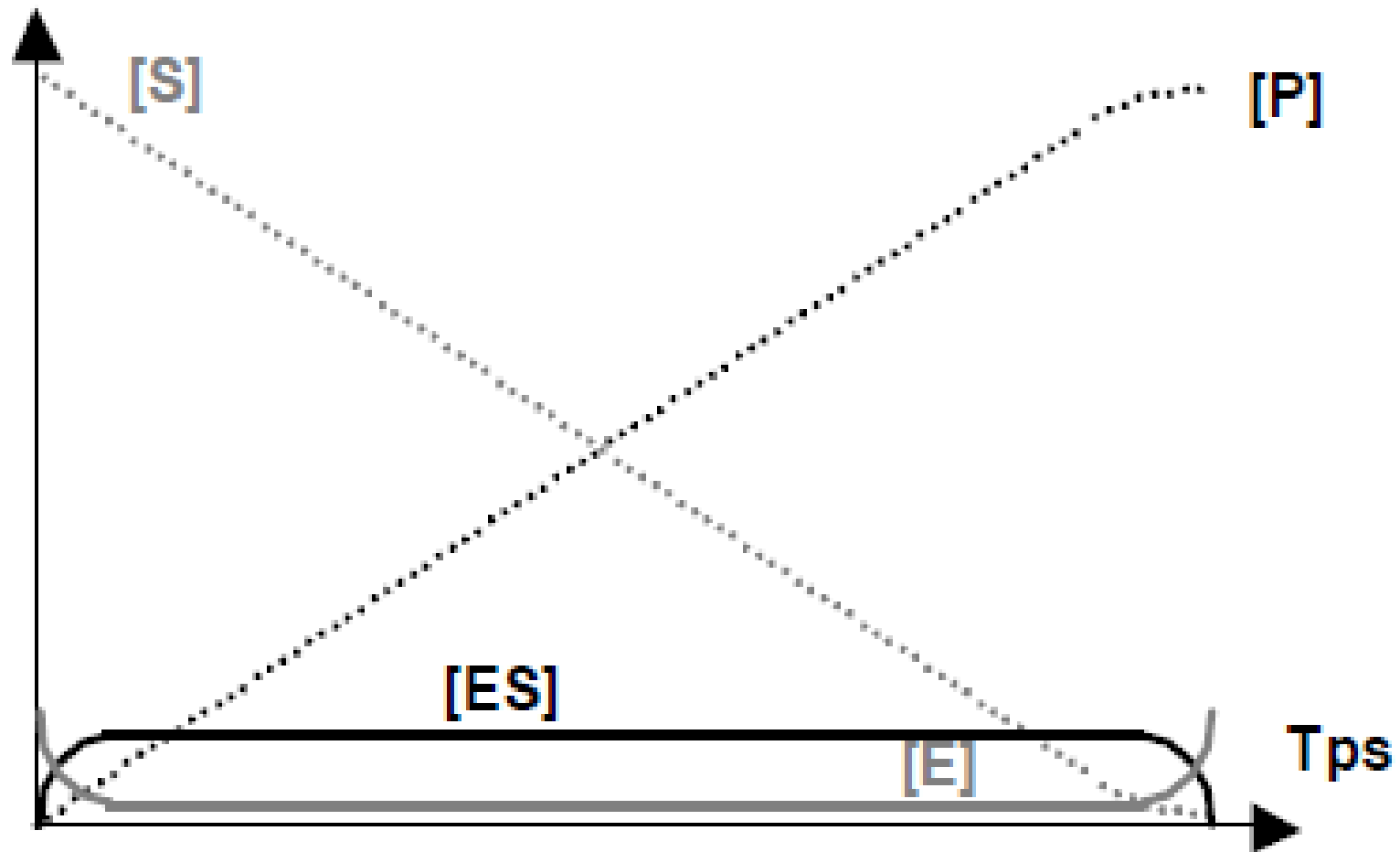
- ▶ Les expériences de cinétique enzymatique donnent des relations entre la vitesse de réaction V , c'est-à-dire la quantité de substrat S disparu ou la quantité de produit P formé par unité de temps au cours d'une réaction

$$V = -\Delta[S]/\Delta t = -\frac{d[S]}{dt}$$

$$V = \Delta[P]/\Delta t = \frac{d[P]}{dt}$$

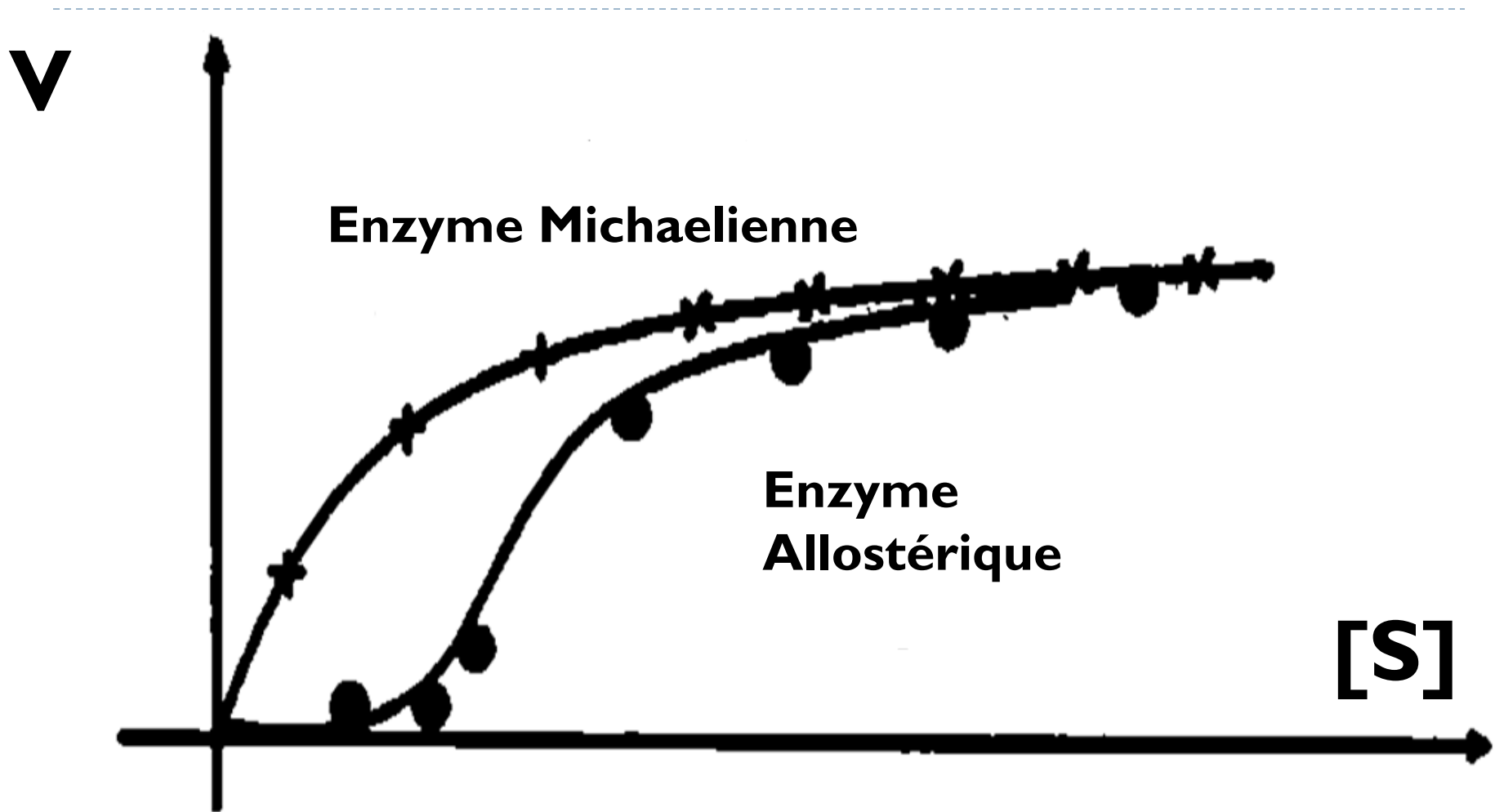


Suivi de la production du produit et consommation du substrat en fonction du temps



▶ **Les enzymes Michaeliennes**

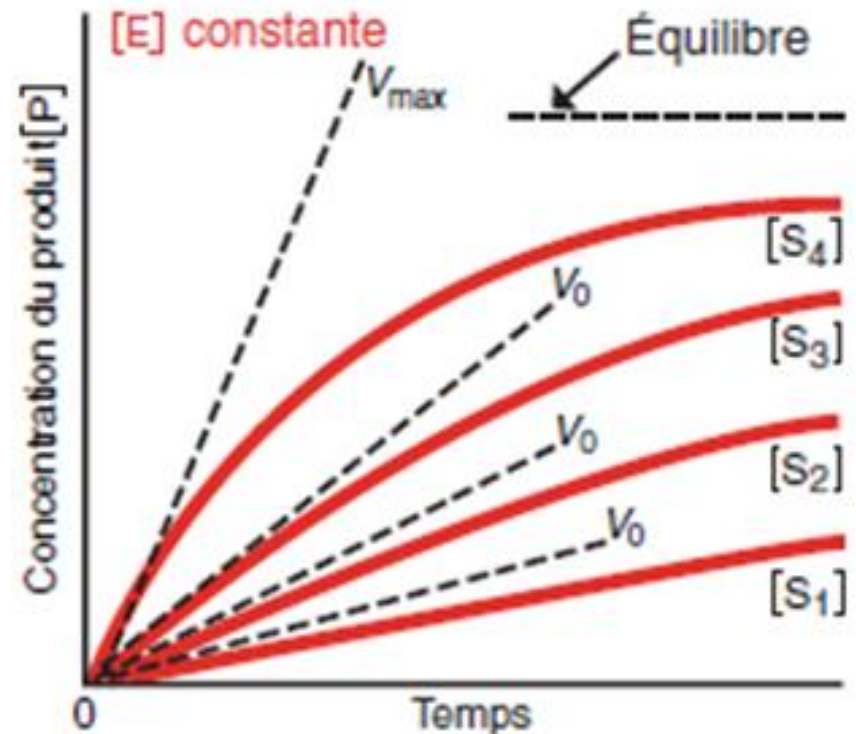
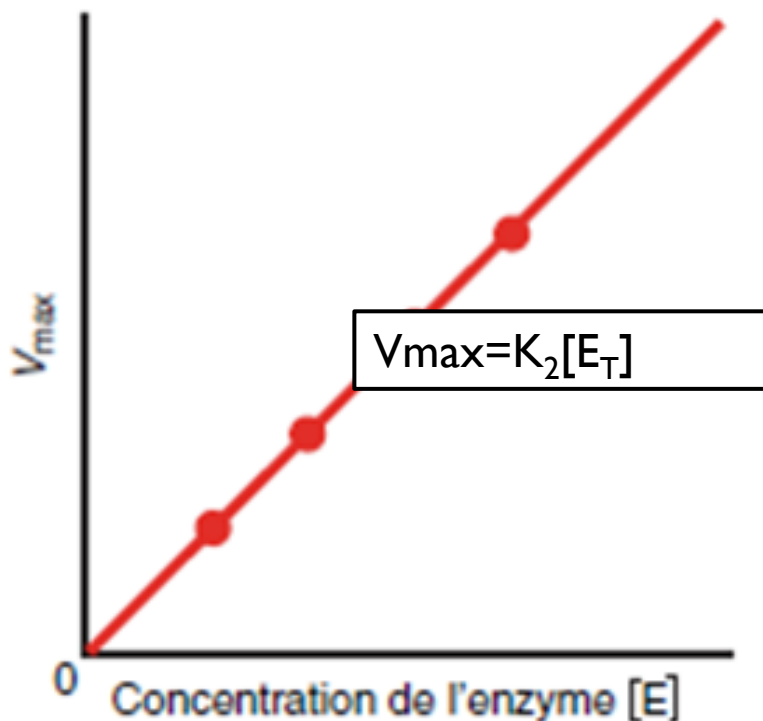
- ▶ Les enzymes dites michaeliennes fonctionnent selon le mode suivant :
 - ➔ un substrat S se lie avec une enzyme E pour donner un intermédiaire ES
 - ➔ $ES \rightarrow$ un produit P avec régénération de l'enzyme E.
 - ➔ un site actif par molécule



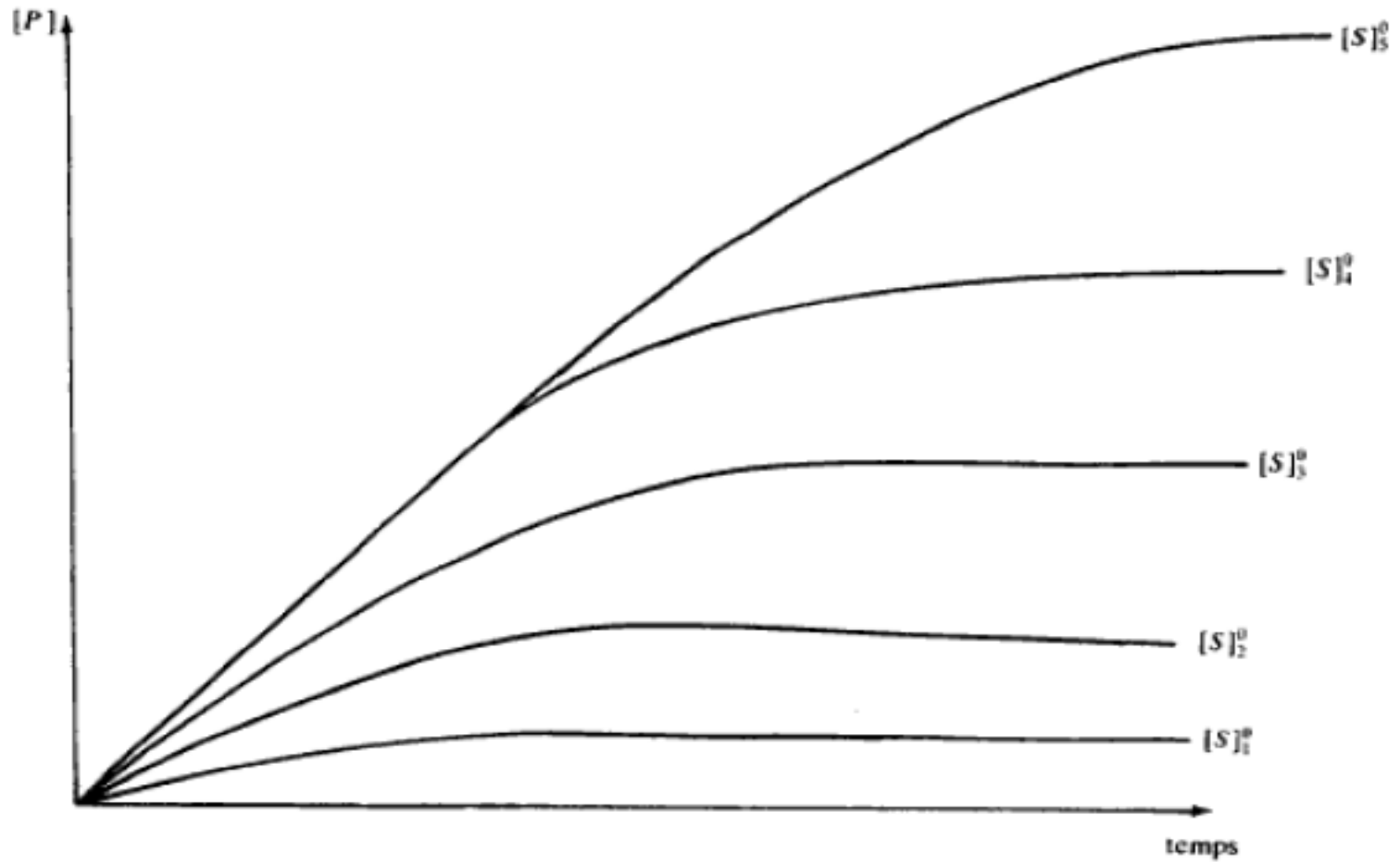
Variation de la vitesse initiale d'une réaction

En fonction en concentration en enzyme

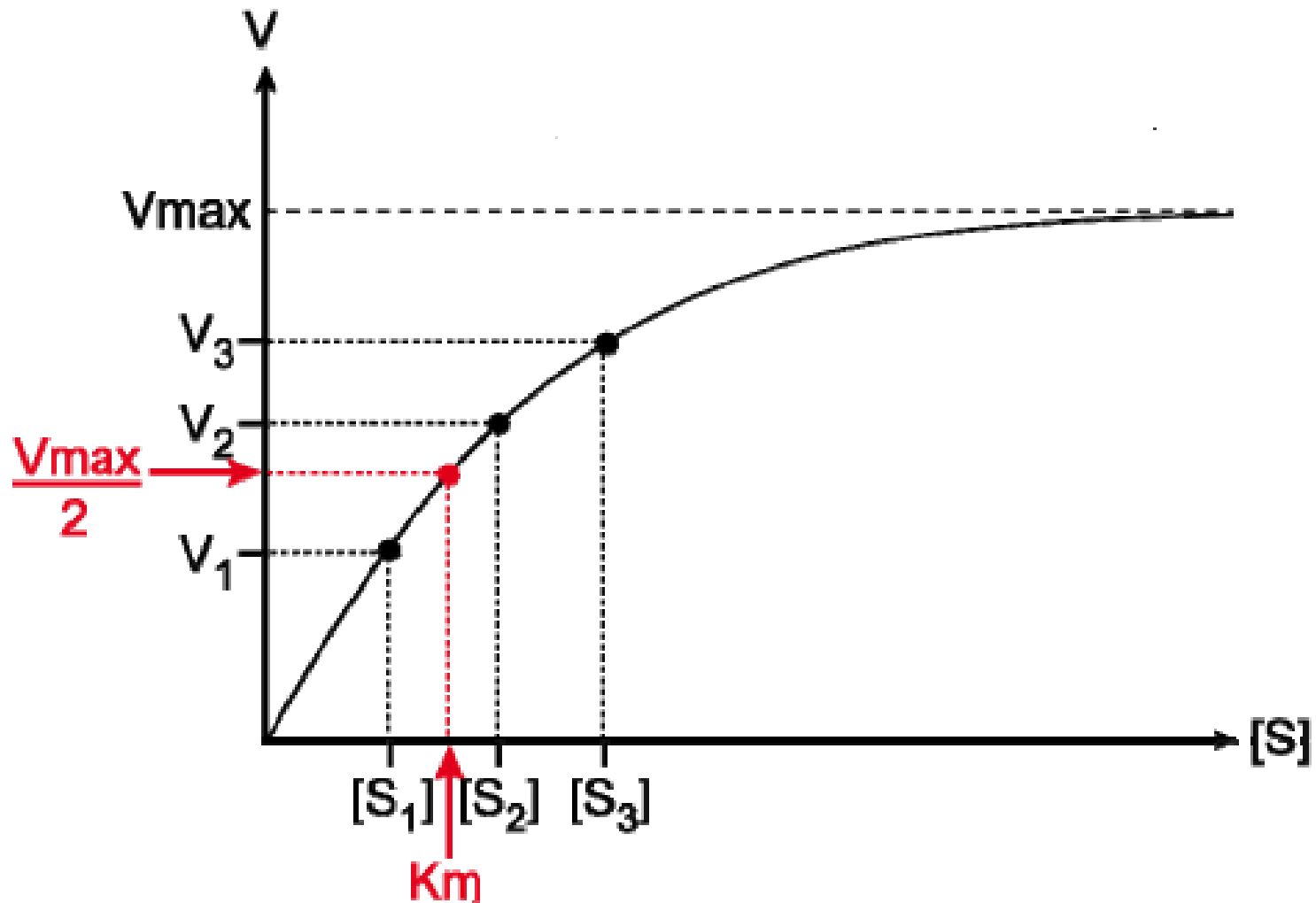
- ▶ Si on réalise même expérience avec des concentrations des enzymes croissantes on obtient:



-
- ▶ **En fonction de la concentration en substrat**
 - ▶ On ajoute à des concentrations initiales variables en substrat S_0 la même dose d'enzymes, et on détermine la vitesse initiale à partir des courbes $[P]=f(t)$



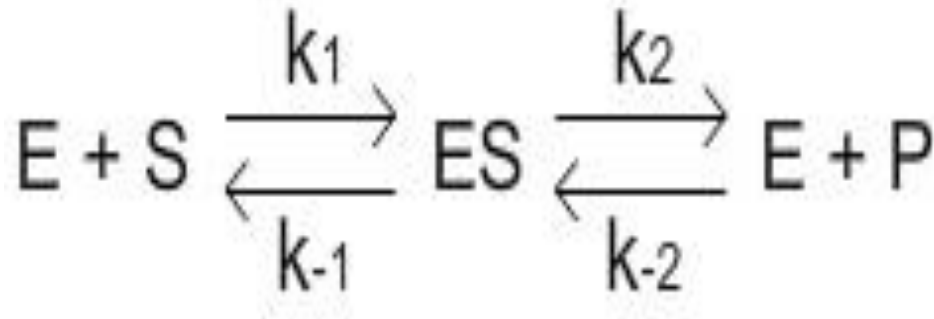
Variation de la vitesse initiale en fonction de $[S_0]$



Variation de la vitesse initiale en fonction de $[S_0]$

La cinétique des enzymes Michaeliennes et l'équation de Michaelis-Menten

- L'étude mathématique de la cinétique enzymatique découle du schéma réactionnel de Henri Michaelis et Menten selon lequel l'activité catalytique est liée à la formation d'un complexe ES spécifique et transitoire
- Dans le cas on suppose que la réaction ne met en jeu qu'une seule molécule de substrat par molécule d'enzyme pour former un seul complexe au niveau d'un centre actif.



k_1 = constante d'association de $E + S$

**k_{-1} = constante de dissociation du complexe
 ES**

k_2 = constante de réaction de ES en $E + P$

k_{-2} = constate d'association de $E + P$

-
- et que la réaction se déroule en une seule étape sans produits intermédiaires
 - Comme seule vitesse initiale est prise en considération
 - La concentration molaire de P est très faible et la réaction correspondant à K_{-2} est négligée en première approximation

L'équation de Michaelis-Menten

- ▶ L'équation de Michaelis-Menten cherche à établir:
 - ➔ une expression de la vitesse de réaction initiale V_0 en fonction de grandeurs connues.

Les conditions initiales d'une réaction

- ✓ concentration en substrat $[S]$ très largement supérieure à la concentration totale en enzyme $[E]_T$ et absence ou quasi-absence de produit P.
- ✓ La première condition est obtenue en choisissant des quantités adaptées d'enzyme et de substrat à introduire dans le milieu réactionnel, la seconde en réalisant les mesures suffisamment rapidement pour que la quantité de substrat transformé en produit soit faible.

→ La concentration en produit $[P]$ étant nulle ou faible, la vitesse d'apparition du complexe ES par association de E et de P est négligeable.

→ On estime que l'équilibre des concentrations entre $[E]$, $[S]$ et $[ES]$ se met en place très rapidement.

→ Or, une fois à cet équilibre atteint, la concentration en complexe $[ES]$ reste constante tant que $[P]$ reste négligeable .

→ En terme cinétique cela se traduit par $[S]_0$ étant très grande par rapport à $[E]_T$, la concentration maximale en complexe $[ES]_{\max}$ est limitée par $[E]_T$ et sera donc toujours négligeable comparé à $[S]_0$, même à saturation de tous les sites actifs.

→ Or $[S] = [S]_0 - [ES]$, donc si $[ES]$ est négligeable face à $[S]_0$, il en découle l'approximation suivante : $[S] = [S]_0$.

-
- ▶ Le point de départ → la vitesse de réaction initiale V_i , donnée par $V_i = K_2[ES]$
 - ▶ Rappelons qu'à tout instant

$$v = \frac{d[P]}{dt}$$

$$= K_2[ES] - K_{-2}[E][P]$$

- ▶ en conditions initiales on peut négliger le terme $K_{-2}[E][P]$

En effet $V_i = K_2[ES]$

► or $[ES]$ ne peut dépasser $[E]_T$ (il ne peut pas y avoir plus de complexe que de molécules d'enzymes)

→ donc lorsque $[ES] = [E]_T$, c'est à dire lorsque tous les sites actifs sont saturés,

→ la vitesse de réaction ne peut être supérieure pour cette concentration en enzyme, donc $V = V_{\max}$.

-
- ▶ La V_{max} est donc la vitesse maximale de catalyse pour une concentration donnée d'enzyme.
 - ▶ Elle est obtenue à saturation de l'enzyme, autrement dit lorsque tous les sites actifs de toutes les molécules d'enzyme sont occupés.

-
- La vitesse de formation du complexe ES est égale à $k_1[E][S]$



- La vitesse de dissociation du complexe ES est $= k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES]$



k_{-1}

k_2

-
- ▶ Par ailleurs on sait que cette variation est nulle en conditions initiales.
 - ▶ On a donc

Vitesse initiale de la réaction = vitesse d'association de ES - V de dissociation de ES

$$\frac{d[ES]}{dt} = K_1[E][S] - (K_{-1} + K_2)[ES] = 0$$

► D'où

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$$

► Pour simplifier, on pose

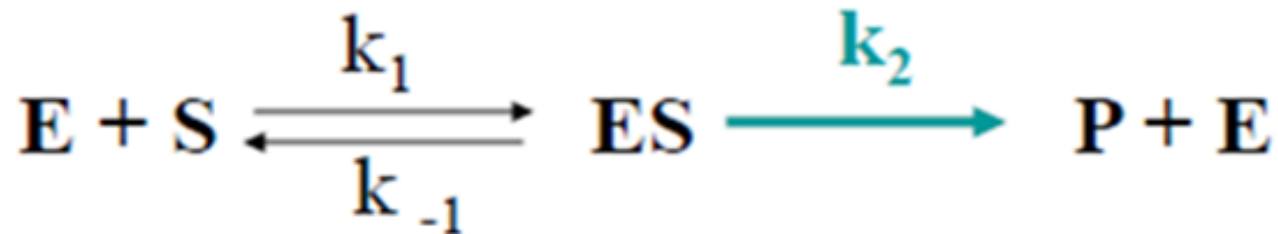
$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$$

► K_m est appelée "constante de Michaelis".

► Donc $K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$

$$\rightarrow [ES] = \frac{[E][S]}{K_m}$$

Démonstration de l'équation de Michaelis-Menten



On a :

$$V_i = k_2[\text{ES}] \text{ et}$$

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_m}$$

Comme $[E]$ est difficile à déterminer expérimentalement, on cherche à s'en affranchir à l'aide d'une autre équation.

La concentration en enzyme libre $[E]$ est donné par la relation de la conservation de la quantité d'enzyme $[E]=[E_T]-[ES]$ avec $[E_T]$ la concentration totale en enzyme

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES]) \times [S]}{K_M}$$

→ Soit $[ES]K_M + [ES][S] = [E_T][S]$

→ Ce qui donne

$$[ES](K_M + [S]) = [E_T][S]$$

► D'où

$$[ES] = \frac{[ET][S]}{K_M + [S]} \quad (\text{éq.1})$$

$V = K_2[ES]$ on remplace $[ES]$ par éq.1

$$= K_2 \frac{[ET][S]}{K_M + [S]} \quad (\text{éq.2})$$

à V_{\max} $[ES] = [E_T]$

$$V_{\max} = K_2[E_T] \rightarrow [E_T] = V_{\max}/K_2 \quad (\text{éq.3})$$

On remplace [ET] en éq.2 par sa valeur en éq. 3

$$\rightarrow Vi = K_2 \frac{V_{\max}}{K_2} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$\rightarrow Vi = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$Vi = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Équation de Michaelis-Menten})$$

Détermination des constantes

- Il existe plusieurs méthodes pour déterminer les paramètres de Michaelis-Menten d'une enzyme.
- Il s'agit de changements de variables qui transforment l'équation initiale en équation linéaire, qu'il est alors possible d'ajuster graphiquement ou par régression linéaire.

➔ Parmi ces linéarisations classiques, on peut citer la représentation de Lineweaver-Burk, celle de Hanes – Woolf, Eadie-Hofstee ou celle de Schwarzenbach.

Représentation de Lineweaver-Burk

→ Dans cette approche, on détermine les constantes de l'enzyme K_M et V_{max} par la représentation des inverses (représentation de Lineweaver et Burk) qui est une droite d'équation :

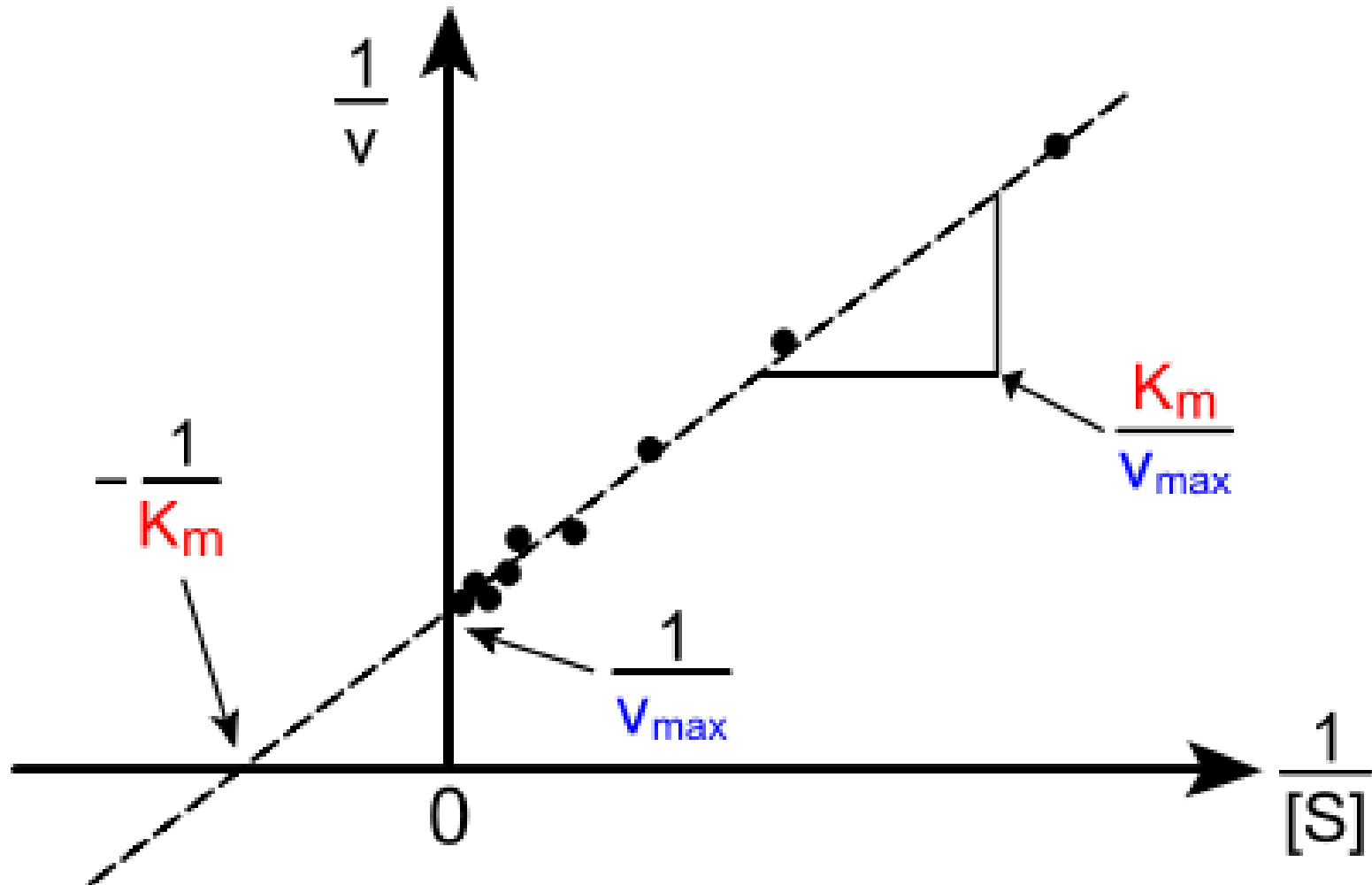
On a : $V_i = V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$ on met les inverses →

$$\frac{1}{V_i} = \left(\frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}}$$

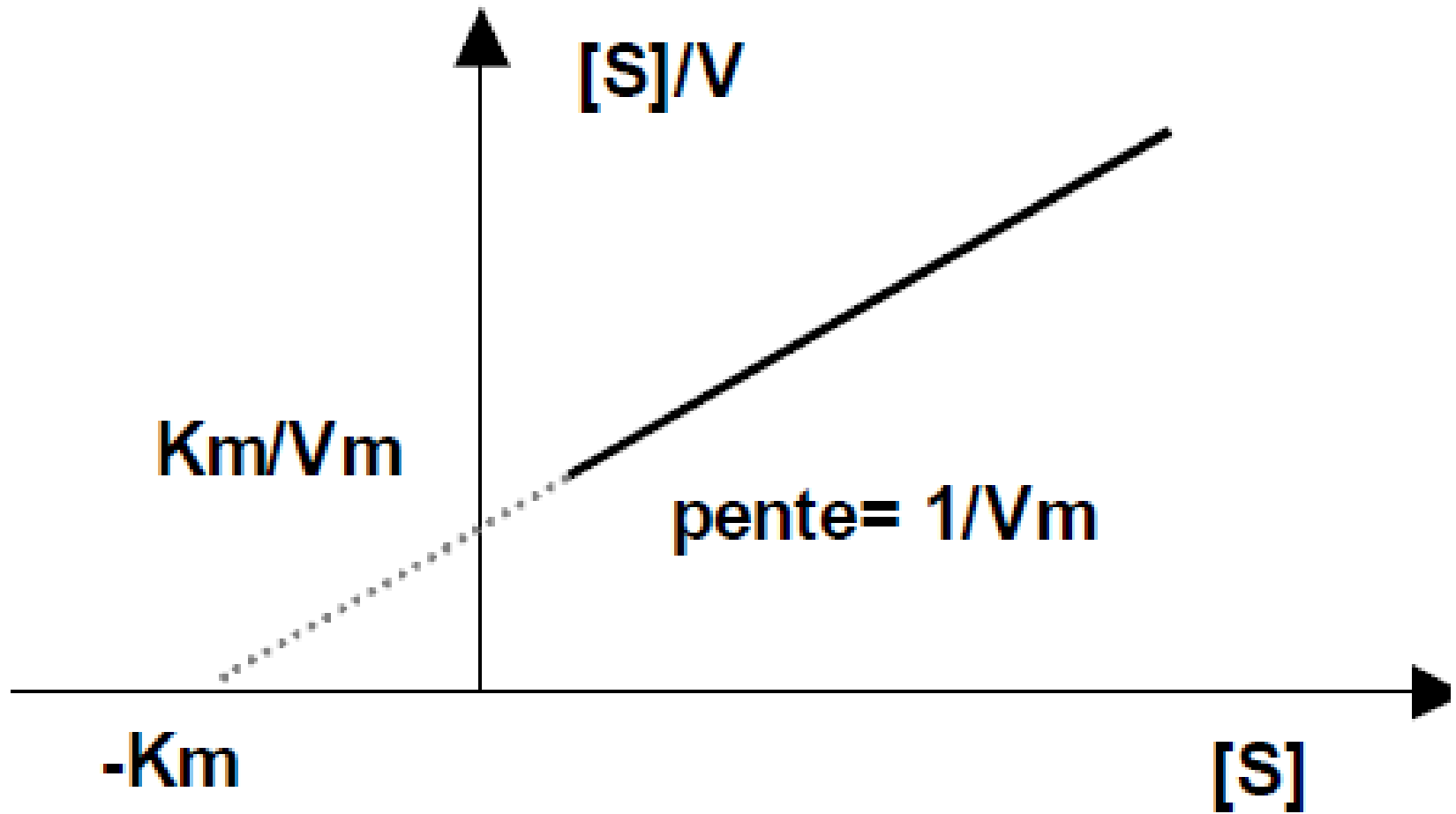
► Pour un graphique de $\frac{1}{v_i}$ en fonction de $\frac{1}{[S]}$, la pente est $\frac{K_M}{V_{max}}$ et l'ordonnée à l'origine est $\frac{1}{V_{max}}$,
d'où

$$V_{max} = \frac{1}{\text{ordonnée}} \text{ et } K_M = \frac{\text{pente}}{\text{ordonnée}}$$

Représentation de Lineweaver & Burk



Représentation de *Hanes – Woolf*

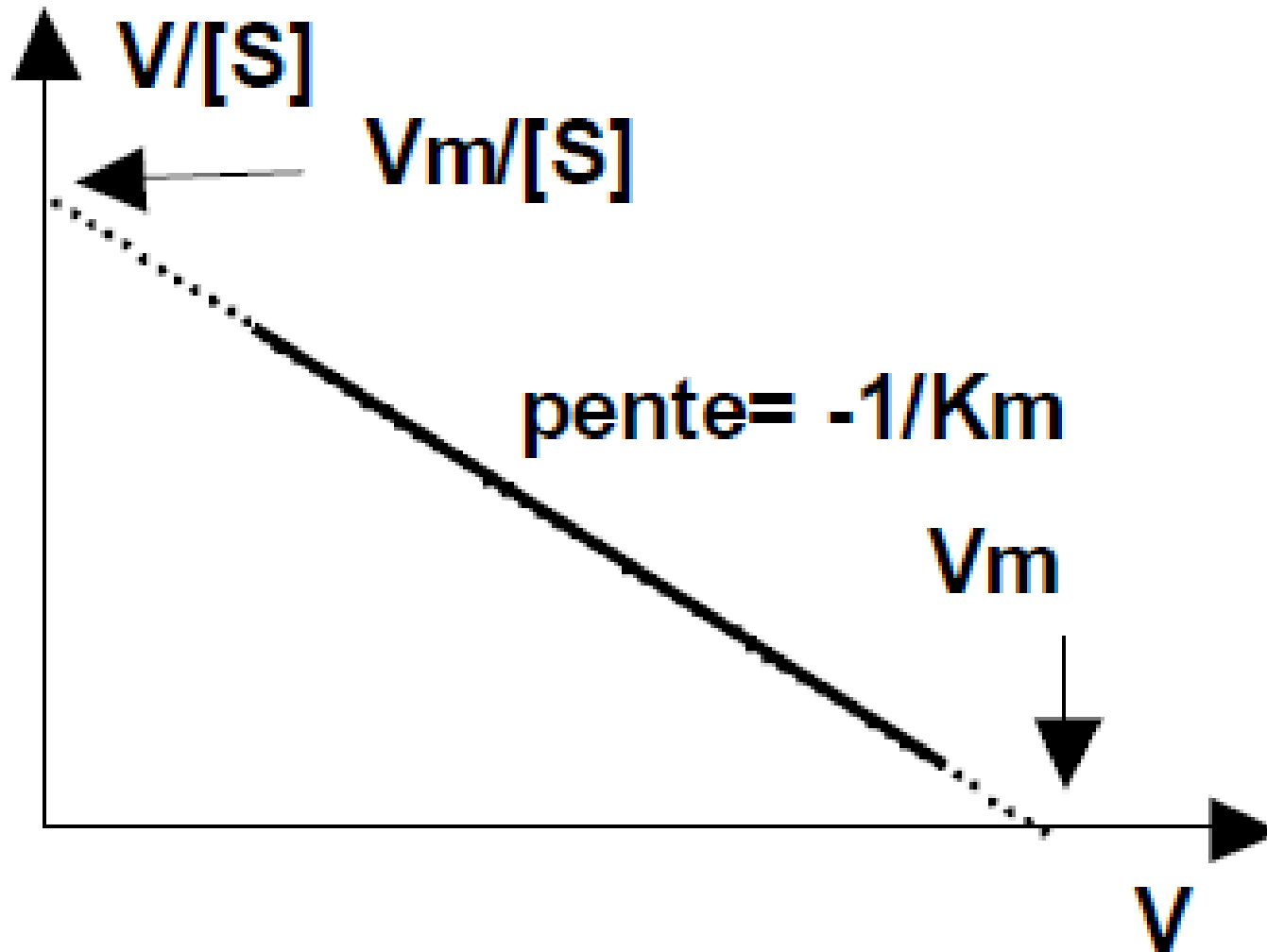


$$V = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \Leftrightarrow \frac{V}{[S]} = \frac{V_m}{K_m + [S]}, \text{ soit : } \frac{[S]}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_m}$$

, On utilise alors la relation : $\frac{[S]}{V} = \frac{1}{V_m}[S] + \frac{K_m}{V_m}$

- La droite a une pente de $1/V_m$, dont l'extrapolation donne $-K_m$ à l'intersection avec l'axe des abscisses

Représentation d'Eadie – Hofstee



$$V = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \Leftrightarrow V(K_m + [S]) = V_m[S] \Leftrightarrow VK_m + V[S] = V_m[S]$$

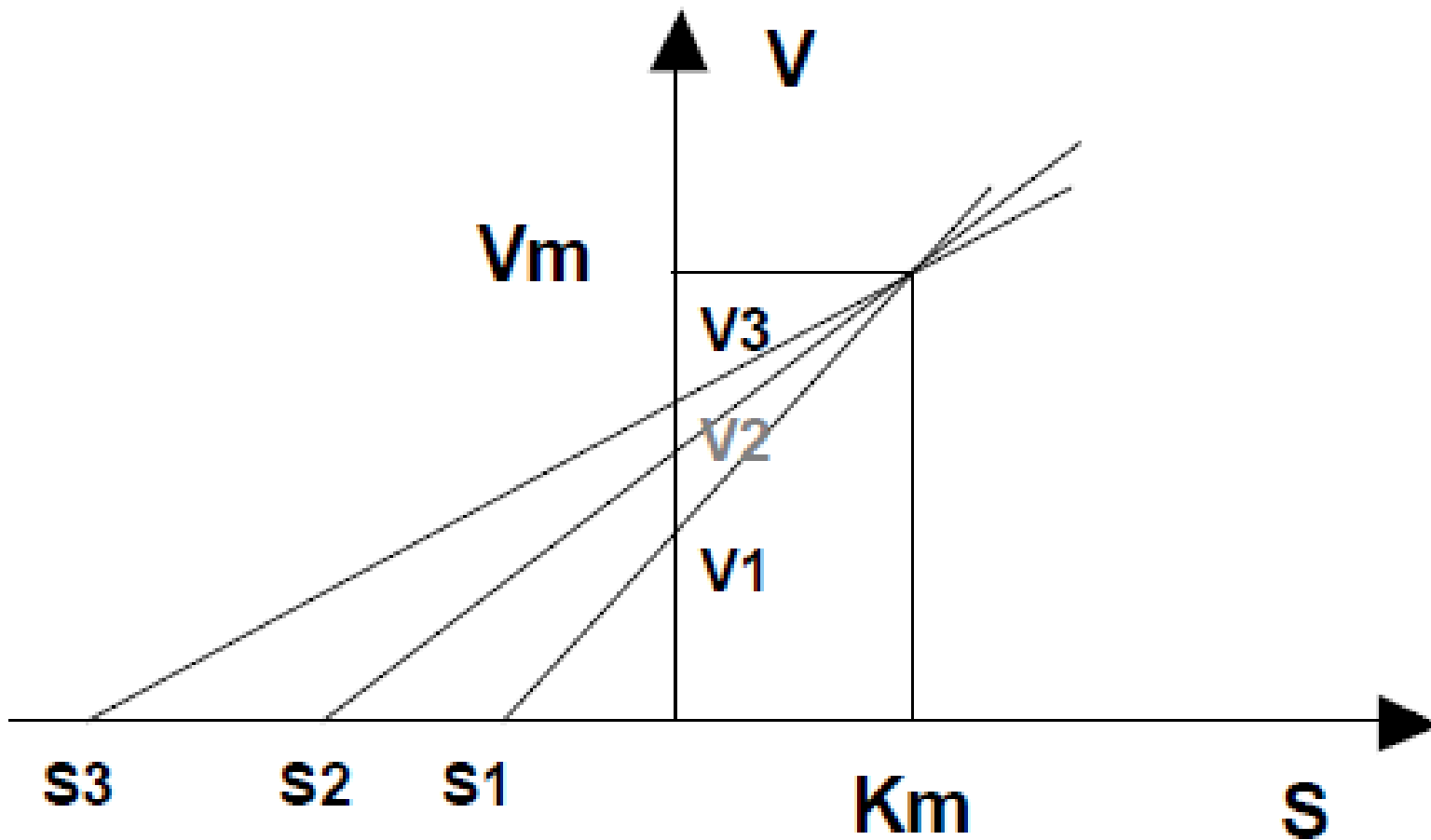
$$\frac{V}{[S]}K_m + V = V_m \Leftrightarrow \frac{V}{[S]} = \frac{V_m}{K_m} - \frac{V}{K_m}$$

La pente est $-1/K_m$, les intersections avec les axes donnent $V_m/[S]$ et V_m .

► Représentation de Schwarzenbach

- Méthode purement graphique : on reporte sur l'axe des abscisses les valeurs de $-[S]$ et sur celui des ordonnées celles de V (pour des couples $S(i)/V(i)$ de résultats expérimentaux, et les droites se coupent en un point d'abscisse K_m et d'ordonnée V_m).

Représentation de Schwarzenbach



Facteurs influençant la vitesse enzymatique

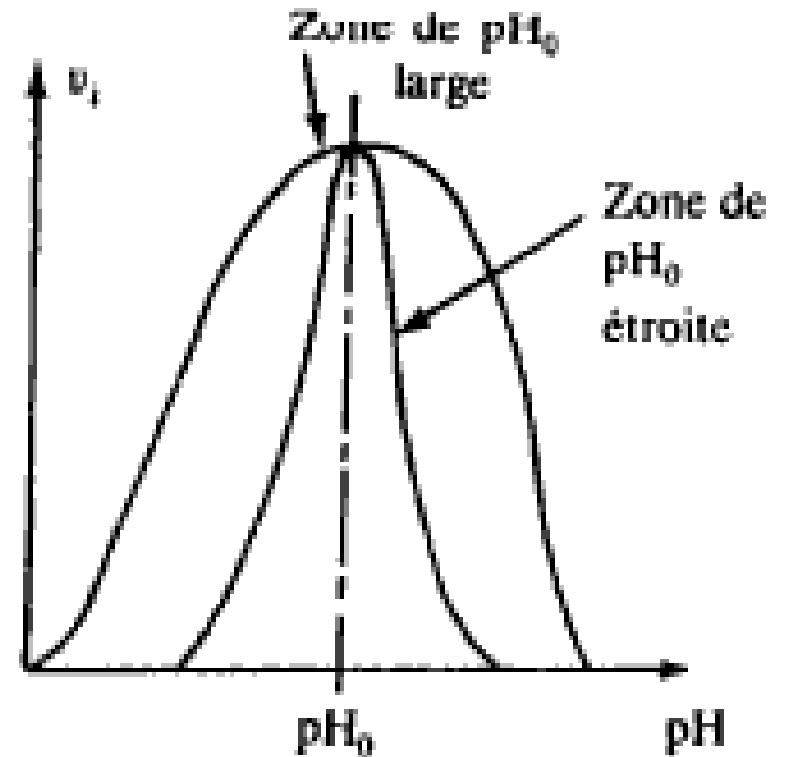
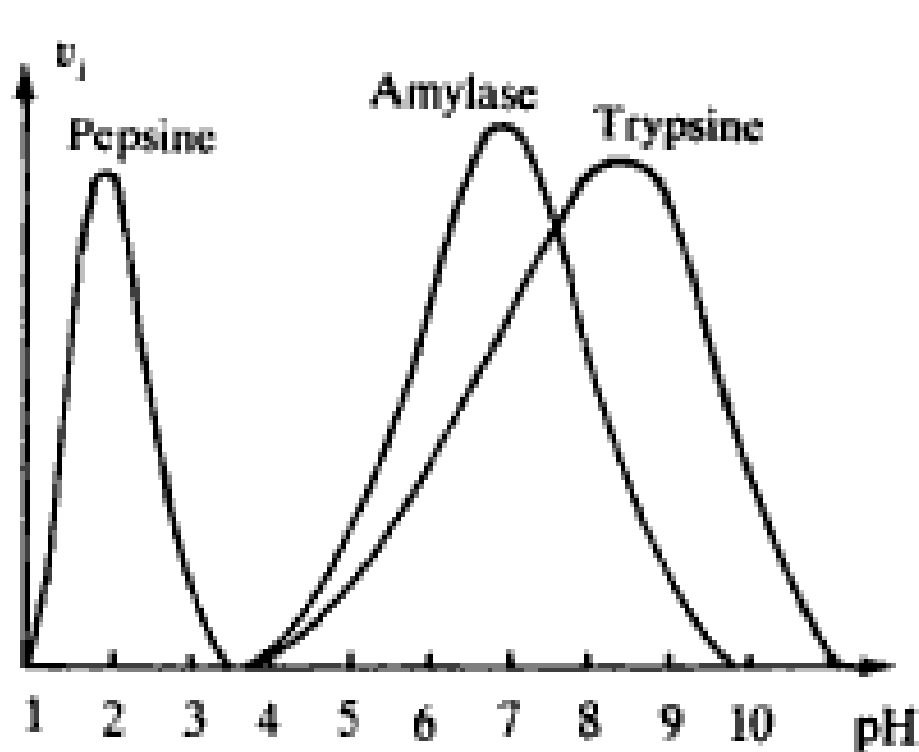
- ▶ Le pH (et la force ionique)
- ▶ La température

1) pH et force ionique

- ▶ L'activité de chaque enzyme dépend de la concentration en ions H^+ du milieu
- ▶ Chaque enzyme a un pH optimum pour lequel l'activité est maximum
- ▶ Le pH optimum peut être soit très acide (pepsine entre 1,5 et 2,5) ou basique (trypsine : entre 8 et 10) soit voisin de neutralité (entre 6 et 8).

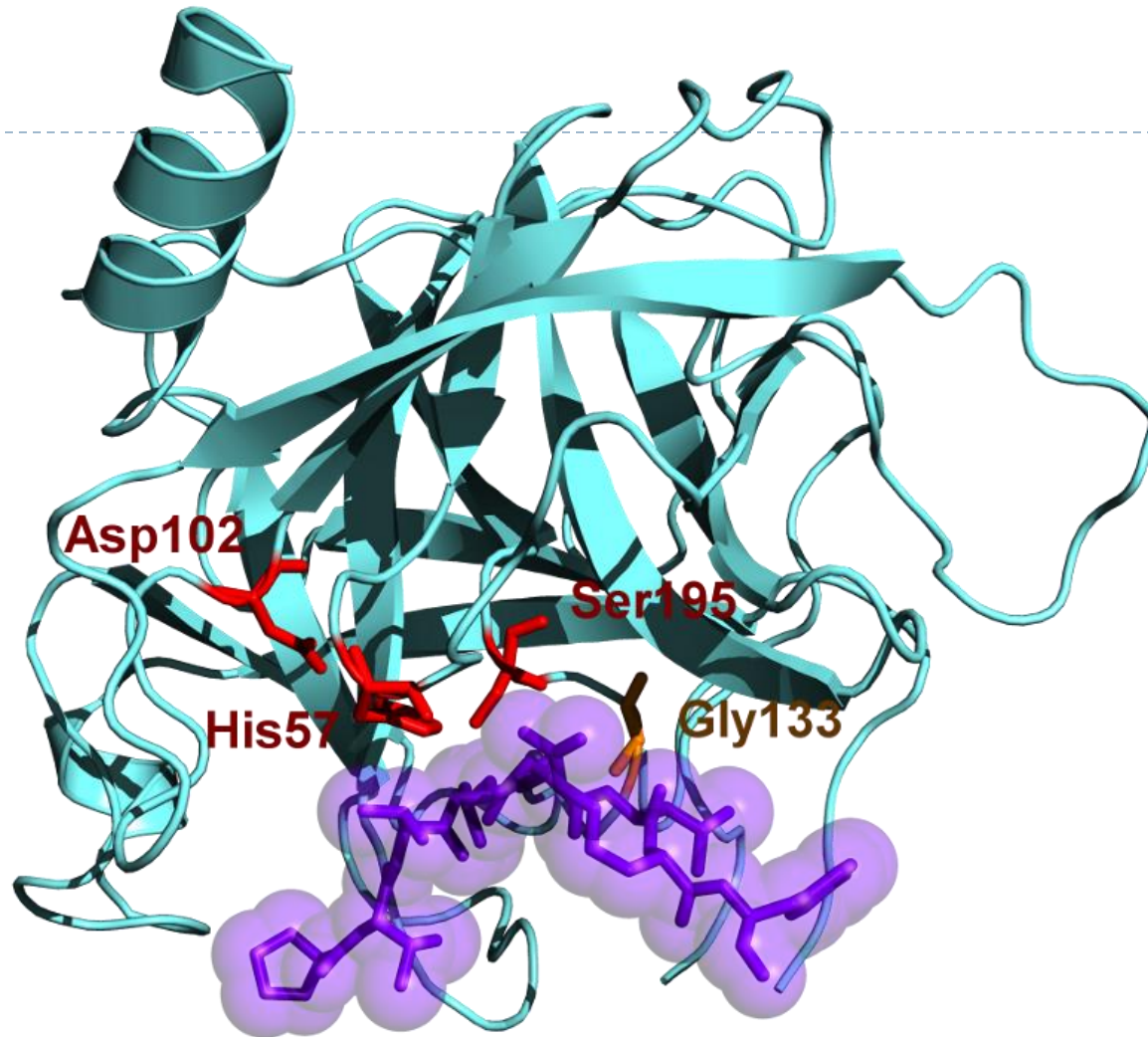
- Fixation du substrat entraîne la mise en jeu d'acides aminés polaires :
- centre catalytique excluant l'eau
- pKa varie dans la protéine, influence du pH sur la réaction enzymatique

Acide aminé	Groupe réactionnel	Charge(pH 7)	Fonctions
aspartate	-COO ⁻	-1	fixation de cations, transfert protons
glutamate	-COO ⁻	-1	fixation de cations, transfert protons
histidine	imidazole	(0)	transfert protons
cystéine	-S ⁻	(0)	liaison covalente de groupes acyle
Tyrosine	-OH	0	liaison H avec ligands
Lysine	-NH ₃ ⁺	+1	fixation d'anions
arginine	guanidinium	+1	fixation d'anions
Sérine	-CH ₂ OH	(0)	liaison covalente de groupes acyle

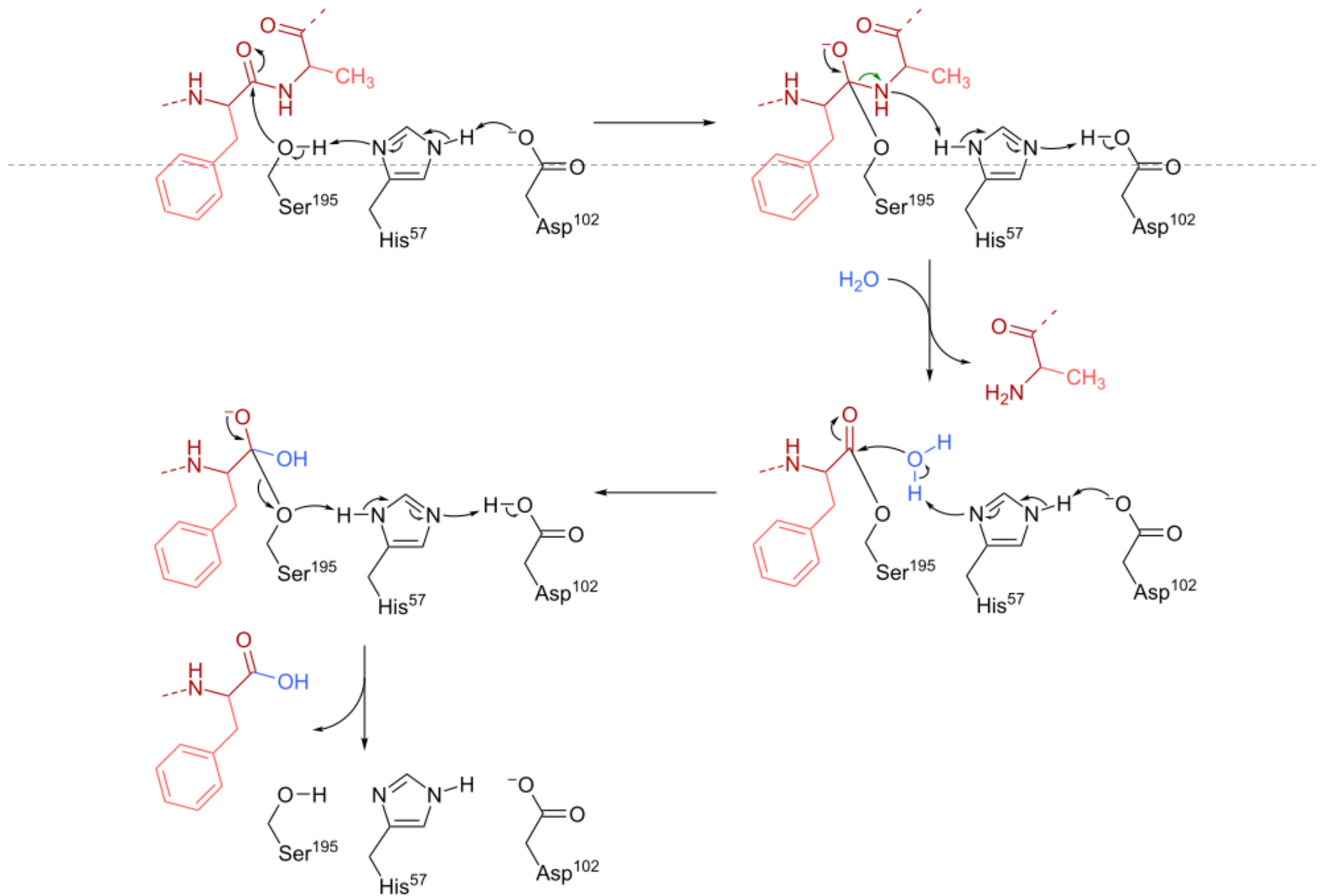


pH optimum de quelques enzymes

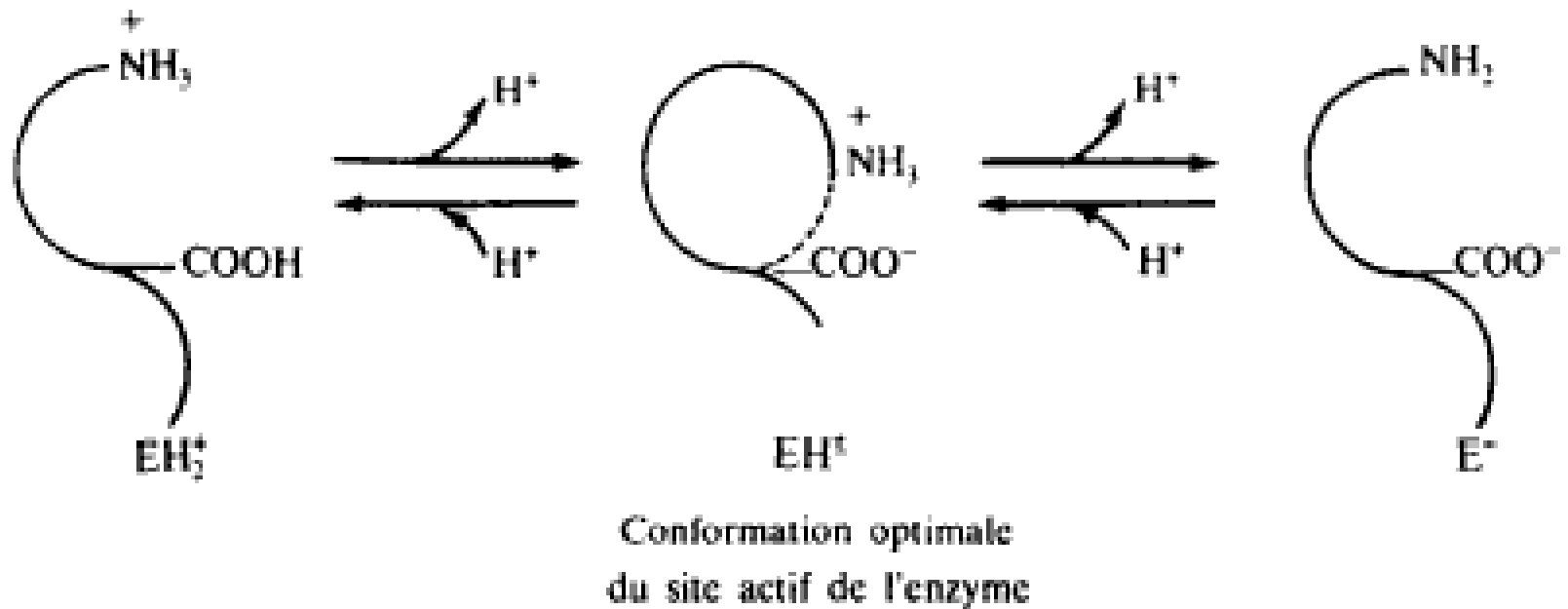
-
- ▶ L'influence de pH est liée à l'état d'ionisation d'un certain nombre de groupements dissociables participant à la formation et à l'activité du complexe ES.
 - ▶ Modification de la conformation de l'enzyme de deux façons:
 - ▶ Aux pH extrêmes les enzymes peuvent être dénaturées irréversiblement
 - ▶ Aux voisinage du pH_i de faibles modifications de pH induisent des changements de conformation réversibles
 - ▶ Influence sur le phénomène catalytique



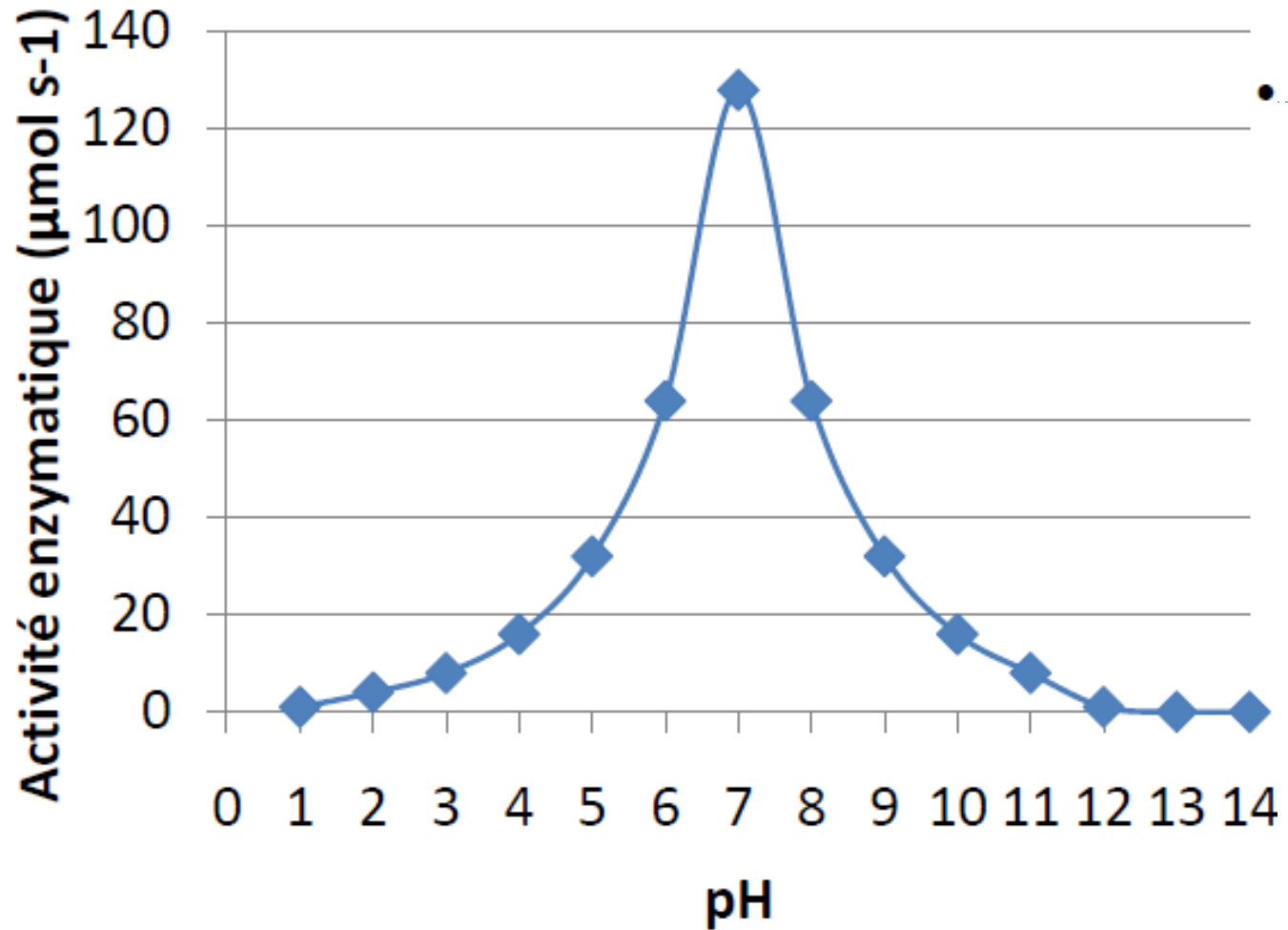
Structure de Chymotrypsine (EC 3.4.21.1) avec son site actif



Mécanisme d'action de chymotrypsine

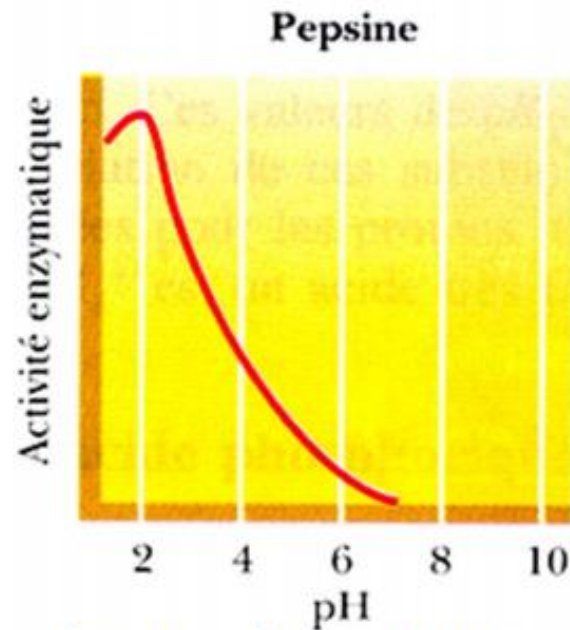


Effet de pH sur l'ionisation des enzymes

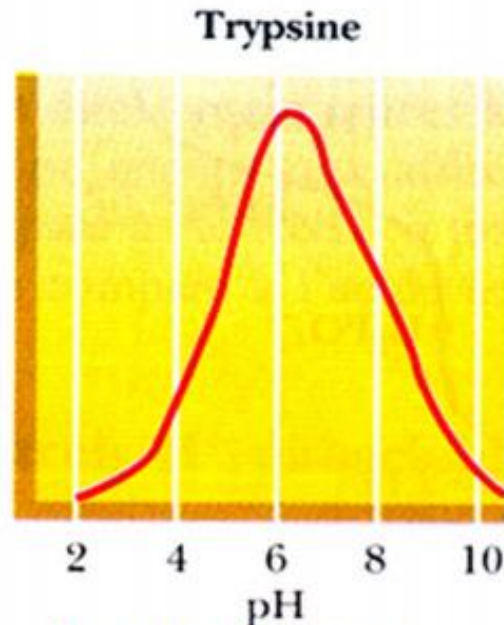


Courbe d'effet de pH sur l'activité enzymatique

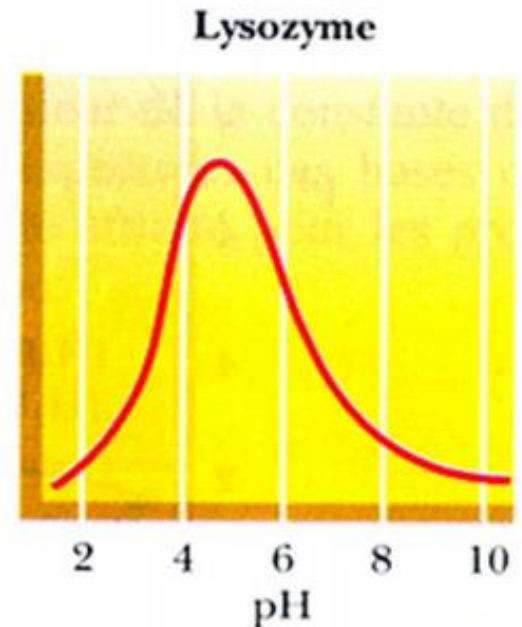
- ▶ pH optimum pour chaque enzyme
- ▶ Le pH optimum d'un enzyme est l'une de ses plus importantes caractéristiques.



La pepsine est un enzyme de la digestion des protéines, elle est active dans le suc gastrique.



La trypsine est également un enzyme protéolytique mais elle agit dans le milieu plus alcalin de l'intestin grêle.



Le lysozyme digère les parois bactériennes; il est présent dans les larmes.

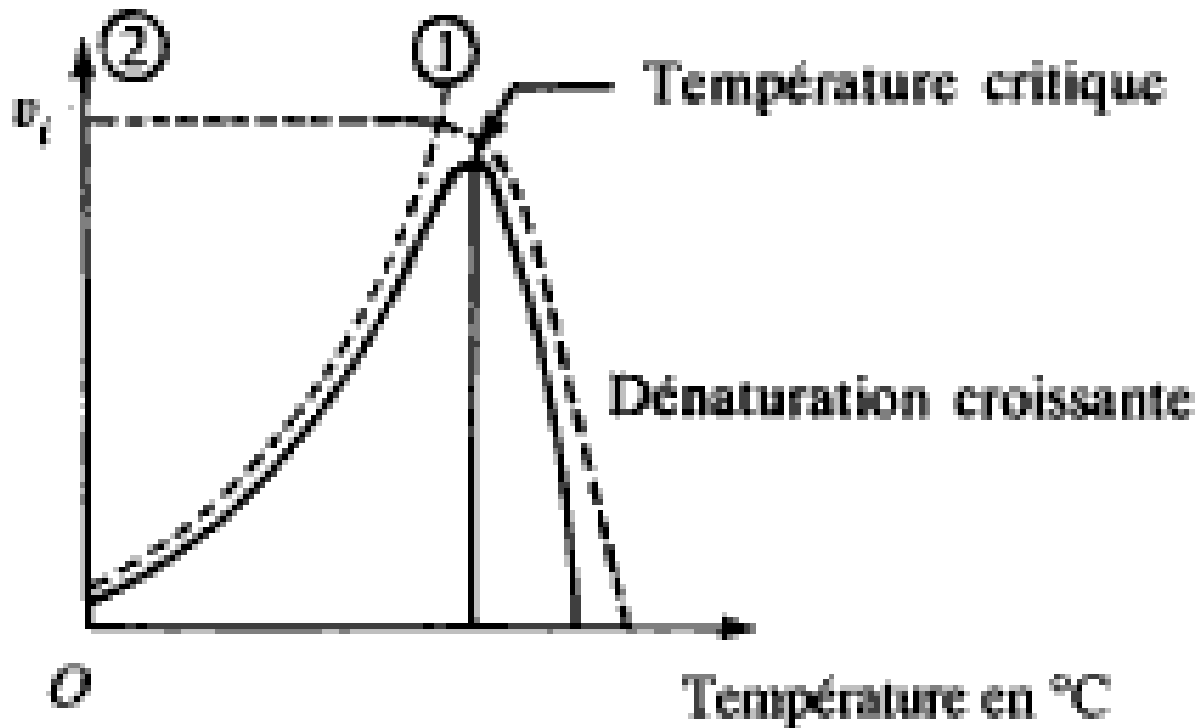
-
- ▶ Un changement de pH intracellulaire ou extracellulaire perturberait très sérieusement le métabolisme.
 - ▶ Les organismes disposent d'une grande variété de mécanismes pour maintenir constant le pH des fluides intra- et extra- cellulaires, mais la protection primaire est assurée par des systèmes tampons.
 - ▶ Les systèmes biologiques tampons sélectionnés proviennent de la nécessité d'une valeur du pKa, voisin de 7 et de la compatibilité des composants du tampon avec le métabolisme cellulaire.

-
- ▶ Deux systèmes tampons contribuent au maintien du pH intracellulaire pratiquement constant (le système phosphate ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$) et le système histidine.
 - ▶ Le pH des fluides extracellulaires qui baignent les cellules et les tissus des animaux est maintenu stable par le système bicarbonate/acide carbonique ($\text{HCO}_3^- / \text{H}_2\text{CO}_3$) en lien avec la respiration.

2) Température

- ▶ Agit de 2 manières
 - Augmentation de la vitesse de réaction
 - Déstabilisation de la structure de l'enzyme
- Comme pour le pH il y a un optimum de température, en général c'est 37°C
- Mécanismes de maintien de la température corporelle sophistiqués

-
- ▶ L'élévation de température qui accroît l'agitation moléculaire provoque une dénaturation des protéines, entraîne une inactivation le plus souvent irréversible
 - ▶ La vitesse d'inactivation est pratiquement nulle à certaines températures



Influence de la température sur l'activité enzymatique

- ▶ Activité max à 37 °C, majorité dénaturées à 60 °C; à basse t, le mouvement moléculaire est réduit et l'activité enzymatique est plus lente.
- ▶ L'activité enzymatique double généralement à chaque 10°C

Les effecteurs

— Les **effecteurs** sont des substances chimiques qui modifient l'activité enzymatique. Ils sont répartis en deux groupes : les **inhibiteurs** qui diminuent cette activité et les **activateurs** qui l'augmentent. Si la plupart des effecteurs peuvent être répartis dans l'une ou l'autre de ces catégories, certains d'entre eux (cations en particulier) peuvent se comporter comme inhibiteurs ou activateurs selon les conditions de l'essai.

Les inhibiteurs réversibles

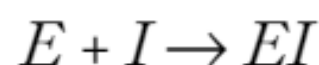
- ▶ Les inhibiteurs réversibles s'associent aux enzymes par des liaisons non covalentes comme des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et des liaisons ioniques.
- ▶ Contrairement aux substrats et aux inhibiteurs irréversibles, les inhibiteurs réversibles ne subissent pas de réaction chimique lorsqu'ils se lient à l'enzyme et peuvent être facilement éliminés par dilution ou par dialyse.

1. Inhibitions compétitives

On parle d'inhibition compétitive quand une molécule (l'inhibiteur: I), se lie sur le même site que celui du substrat de l'enzyme (E). Il se forme alors un complexe EI , inactif. Ainsi la réaction catalysée par l'enzyme:



est en compétition avec la réaction de liaison de l'enzyme avec l'inhibiteur compétitif:

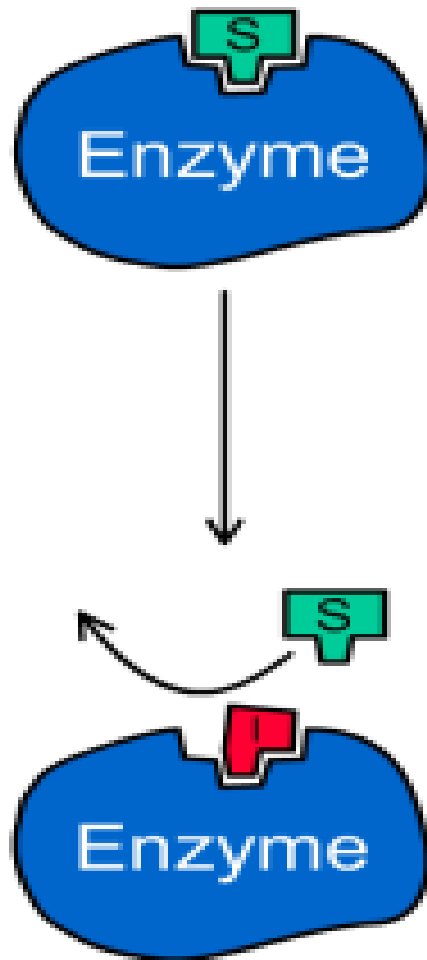


On définit K_I comme la constante de dissociation du complexe EI :

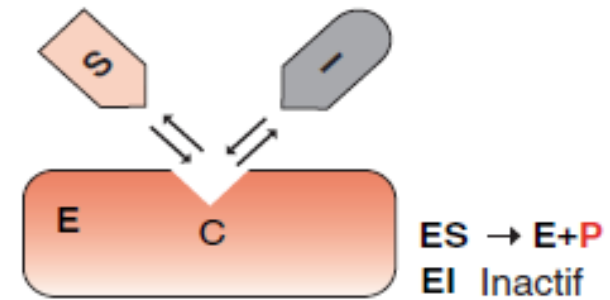
$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

En présence de l'inhibiteur la vitesse maximale reste inchangée mais la constante de Michaelis apparente est augmentée:

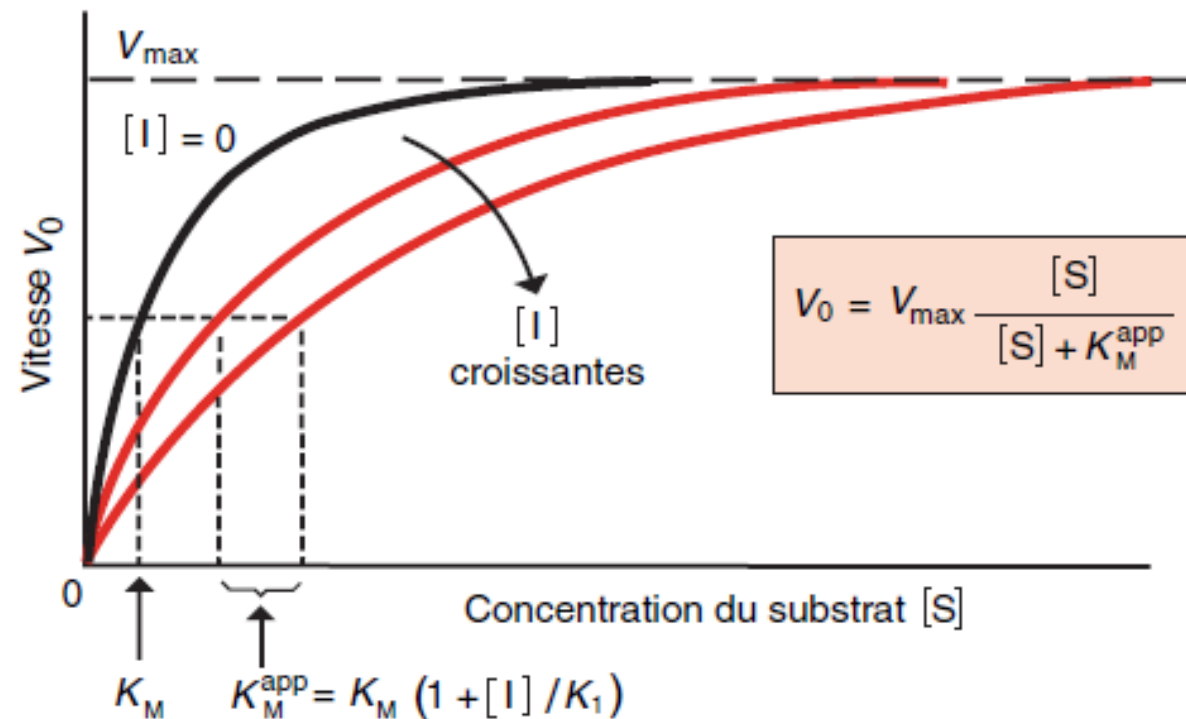
$$K_M^{\text{app}} = K_M (1 + [I]/K_I)$$



(A)

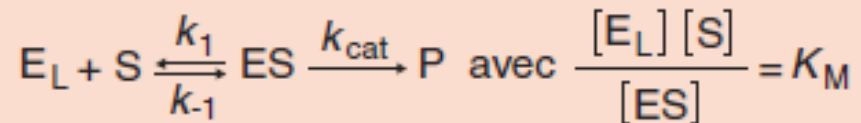


(B)

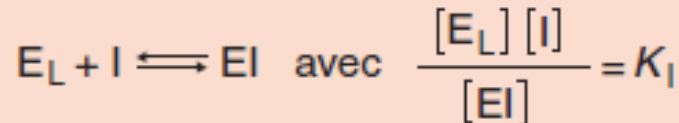


- ▶ Le complexe EI est inactif et ne peut pas donner un composé qui résulterait de la transformation de I.
- ▶ Il ne s'établit donc que deux équilibres entre l'enzyme libre EL, le substrat S, l'inhibiteur I, le complexe enzyme-substrat ES et le complexe enzyme-inhibiteur EI.

1)



2)



où K_I est la constante de dissociation du complexe EI

L'équation de vitesse s'écrit :

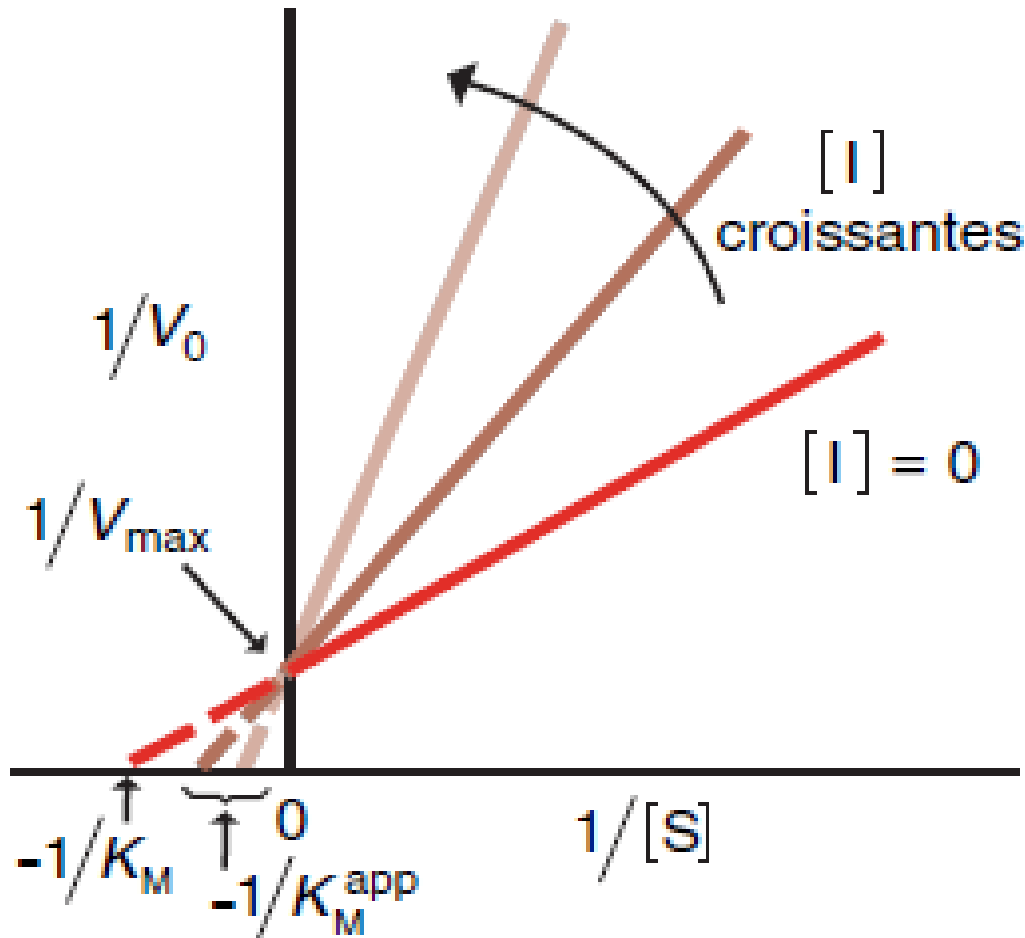
$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M^{app}} = k_{cat} [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M^{app}} \quad \text{où } K_M^{app} = K_M (1 + [I] / K_I)$$

- ▶ Ces équations sont identiques à celles de Michaelis-Menten, où K_M est remplacé par un K_M^{app} de valeur $K_M(1 + [I]/K_I)$.
- ▶ L'augmentation de la concentration d'un inhibiteur compétitif $[I]$ se traduit par une augmentation du K_M^{app} .
- ▶ Par contre, la vitesse maximum V_{max} est inchangée.
- ▶ Aux concentrations élevées de substrat $[S]$, la vitesse de la réaction s'approche de cette vitesse maximum V_{max} , comme s'il n'y avait pas d'inhibiteur.

- ▶ Pour une concentration donnée de I, selon la représentation de Lineweaver-Burk, la variation de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$ est linéaire.
- ▶ Pour des concentrations croissantes de I, les droites obtenues coupent toutes l'axe des ordonnées au même point $1/V_{\max}$, ce qui confirme que l'augmentation de la concentration du substrat vient à annuler l'effet de l'inhibiteur.
- ▶ Par contre, elles coupent l'axe des abscisses en des points $-1/KM^{\text{app}}$ dont les valeurs absolues décroissent lorsque la concentration de I augmente.

- ▶ La présence d'un inhibiteur dans un système compétitif → se traduit par une variation apparente de la constante de Michaelis K_M , sans effet sur la vitesse maximum V_{max} .

Représentation de L-Burk en présence d'inhibiteur compétitive

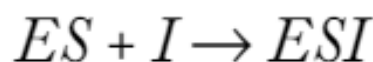


2. Inhibitions non compétitives

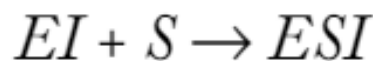
On parle d'inhibition non compétitive quand l'enzyme peut lier l'inhibiteur sur un autre site de liaison que celui du substrat. Plusieurs réactions sont possibles, la réaction catalysée par l'enzyme :



Mais une fois le complexe enzyme substrat formé, il peut aussi former un complexe inactif :

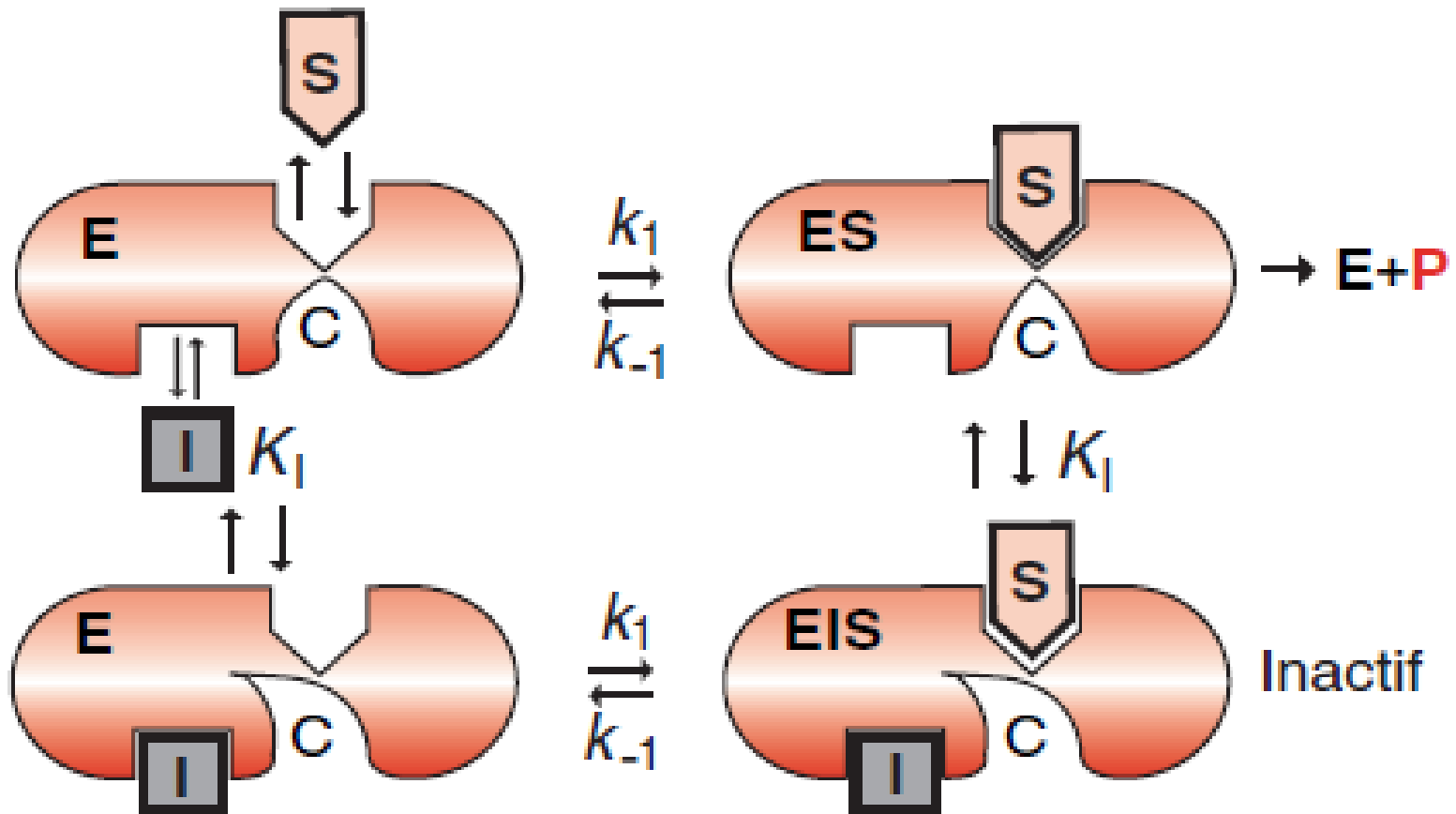


L'enzyme seul peut aussi se lier à l'inhibiteur et former un deuxième type de complexe inactif : $E + I \rightarrow EI$ qui peut à son tour lier le substrat :

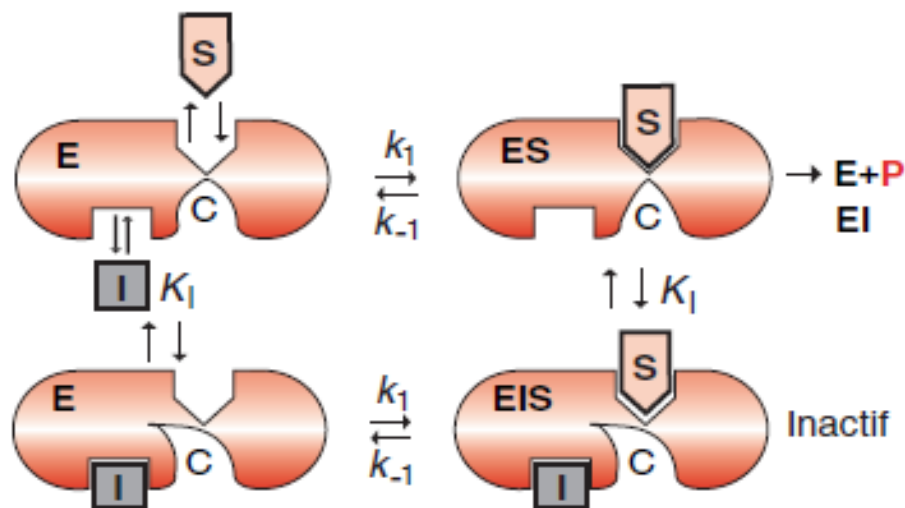


En présence de l'inhibiteur la vitesse maximale apparente diminue, et donc la valeur de k_{cat} . On peut calculer la valeur apparente de k_{cat} en fonction de la concentration en inhibiteur et du K_I .

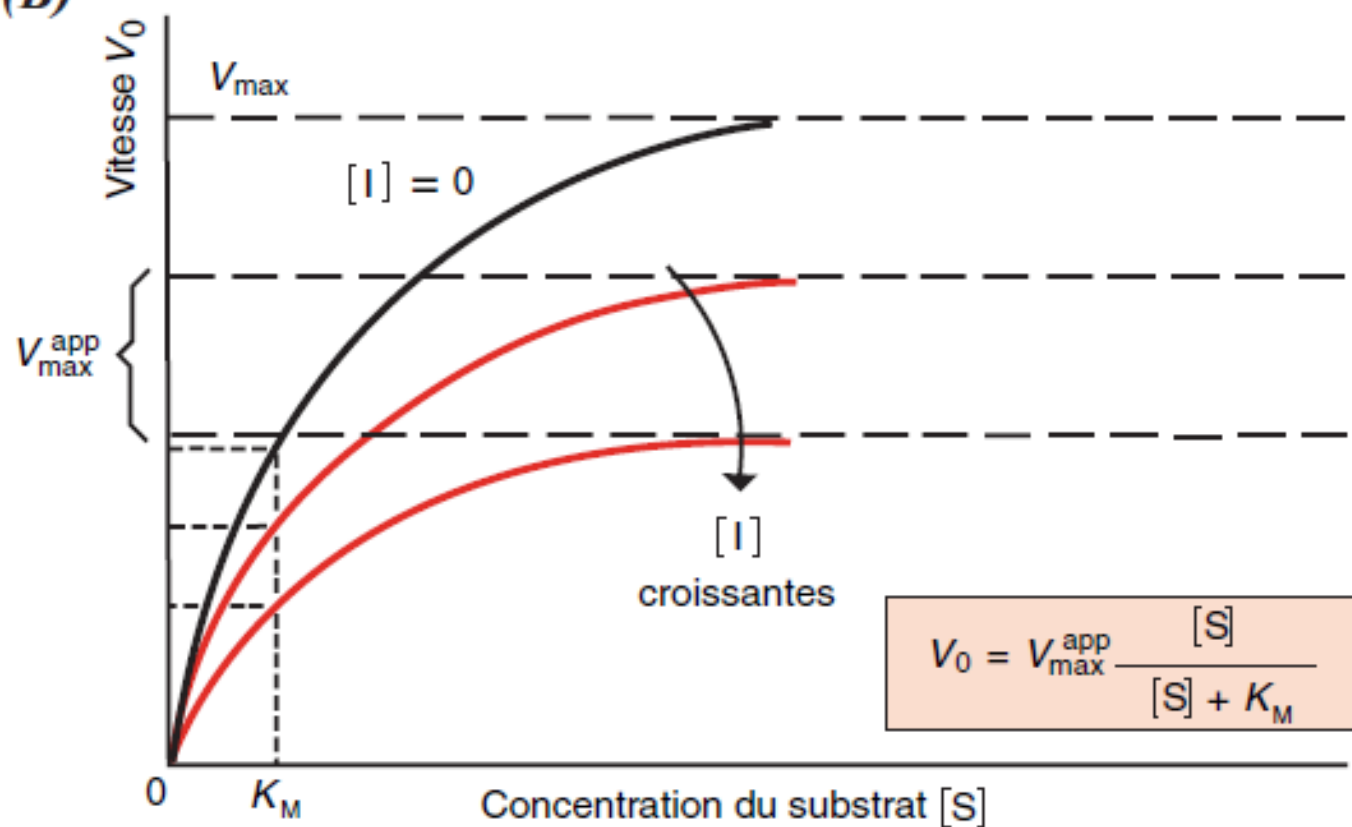
Inhibition non compétitive



(A)



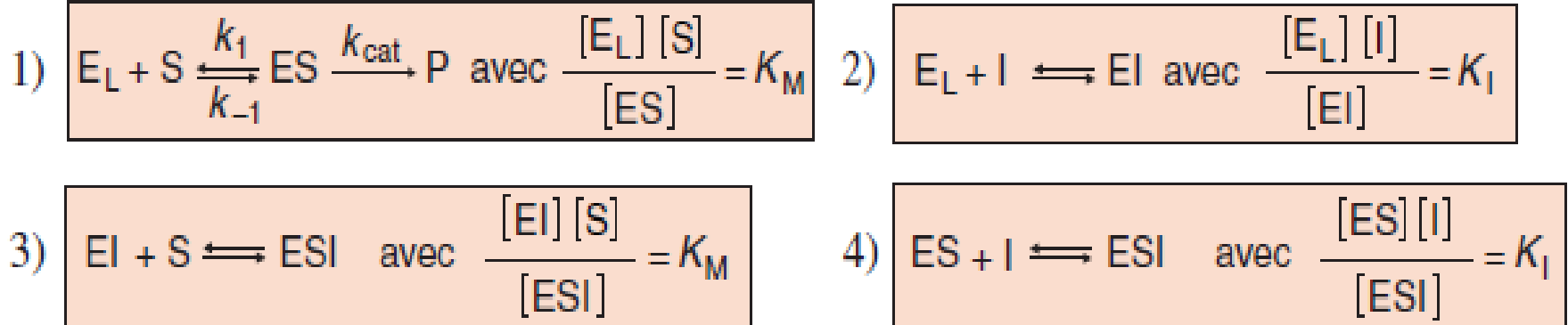
(B)



- ▶ Dans un système où un enzyme peut se combiner de façon réversible, indépendamment, avec son substrat S, au niveau de son centre catalytique, ou avec un inhibiteur I, au niveau d'un autre site, sans que la fixation de ce dernier modifie l'affinité de l'enzyme pour le substrat, l'effet est une inhibition dite non compétitive, car elle n'est pas levée par l'addition de substrat.
- ▶ Dans un tel système, seul le complexe ES évolue vers la formation d'un produit P.
- ▶ Les deux complexes EI et EIS sont inactifs.

- ▶ EIS ne peut pas conduire au produit P car la fixation de l'inhibiteur I sur l'enzyme empêche toute activité catalytique de ce dernier, en modifiant la conformation de son site actif.
- ▶ Il s'établit quatre équilibres entre l'enzyme libre EL, le substrat S, l'inhibiteur I, le complexe enzyme-substrat ES, le complexe enzyme-inhibiteur EI et le complexe enzyme-substrat-inhibiteur ESI.

nn



où K_I est la constante de dissociation du complexe EI.

L'équation de vitesse s'écrit :

$$V_0 = V_{\max}^{\text{app}} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} = k_{\text{cat}}^{\text{app}} [E_T] \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

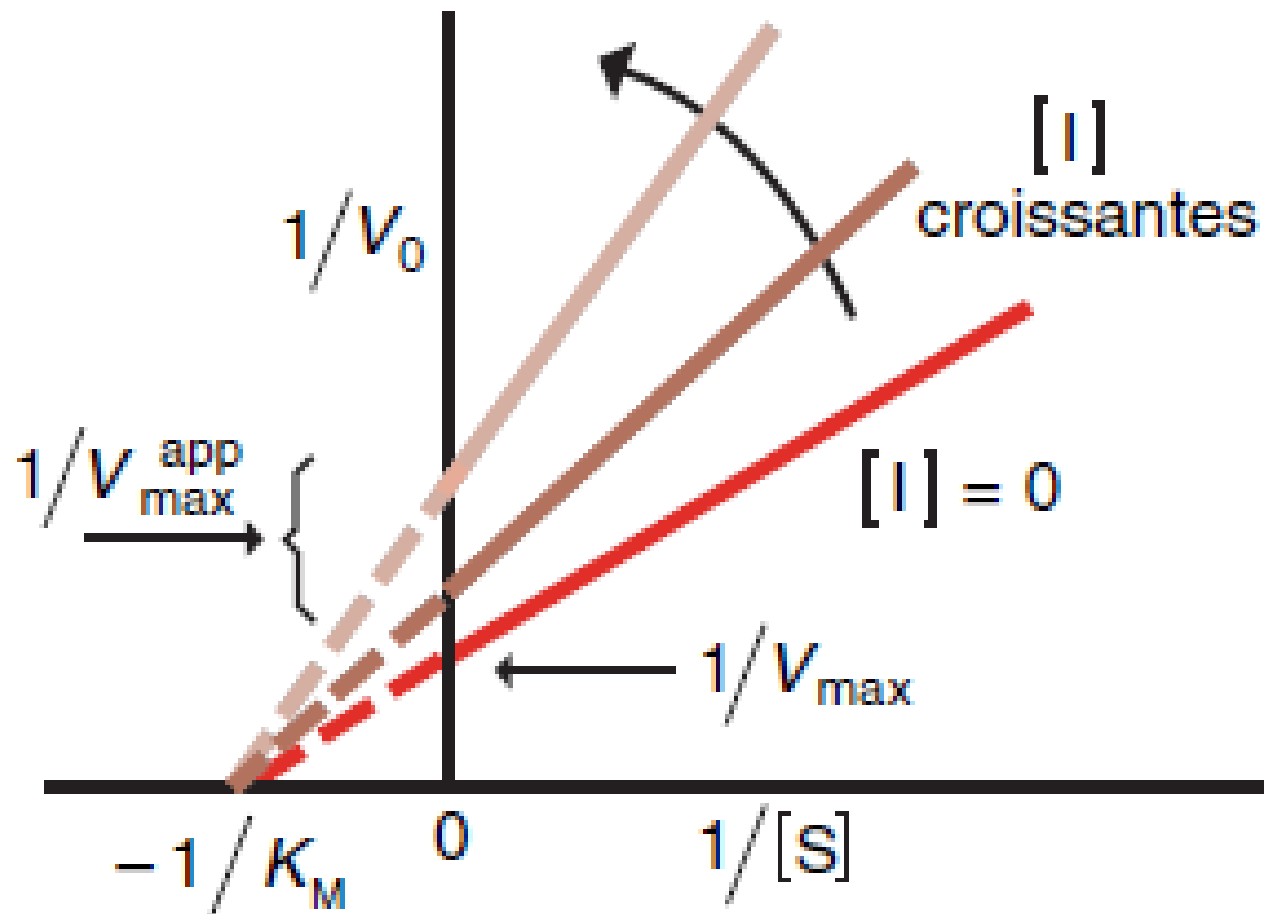
où

$$V_{\max}^{\text{app}} = k_{\text{cat}}^{\text{app}} [E_T] \quad \text{et} \quad k_{\text{cat}}^{\text{app}} = k_{\text{cat}} / (1 + [I] K_I)$$

- ▶ Ces équations sont identiques aux équations de Michaelis-Menten, où V_{\max} est remplacé par un V_{\max}^{app} et k_{cat} par un de valeur
- ▶ $VM^{\text{app}} = VM(1 + [I]/KI)$.
- ▶ L'augmentation de la concentration d'un inhibiteur non compétitif $[I]$ se traduit par une diminution du $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ et donc de V_{\max}^{app} .
- ▶ Par contre, la constante de Michaelis K_M est inchangée.
- ▶ Pour une concentration donnée de I , selon la représentation de Lineweaver-Burk, la variation de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$ est linéaire.

- ▶ Pour des concentrations croissantes de I , les droites obtenues coupent l'axe des ordonnées en des points $1/V_{\max}^{\text{app}}$ dont les valeurs croissent lorsque la concentration de I augmente.
- ▶ Par contre, elles coupent toutes l'axe des abscisses au même point $-1/K_M$.
- ▶ Un système non compétitif \rightarrow la présence de l'inhibiteur se traduit par une variation apparente de la vitesse maximum V_{\max} , sans effet sur la constante de Michaelis K_M .
- ▶ L'inhibition non compétitive pure est rarement rencontrée.

Représentation de L-Burk en présence d'Inhibiteur non compétitive

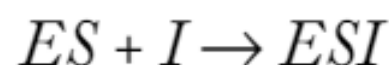


3. Inhibitions incompétitives

On parle d'inhibition incompétitive quand l'inhibiteur ne peut se lier qu'au complexe Enzyme Substrat pour former un complexe $E S I$ inactif. Plusieurs réactions sont possibles, la réaction catalysée par l'enzyme :

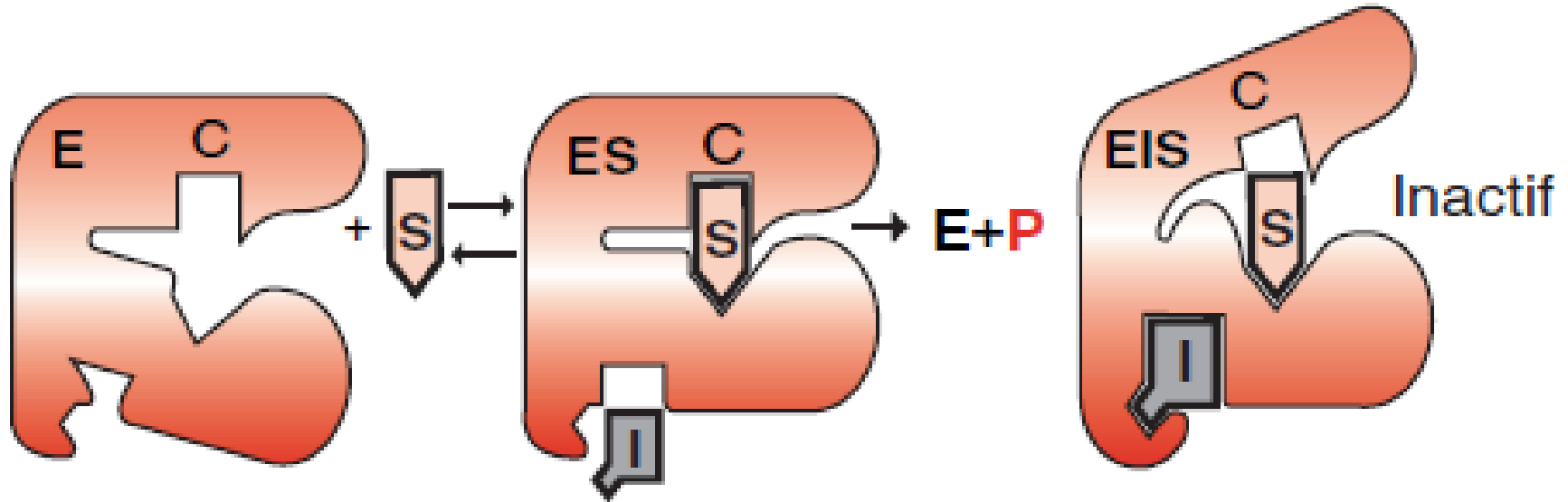


Mais une fois le complexe enzyme substrat formé, il peut aussi former un complexe inactif :



Dans ce dernier cas, en présence de l'inhibiteur la vitesse maximale apparente diminue mais la constante de Michaelis apparente diminue aussi. En effet la formation du complexe ESI , favorise la formation de nouveau complexe ES .

Modèle d'inhibition incompétitive

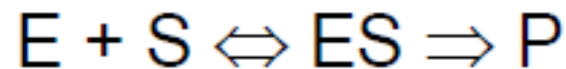
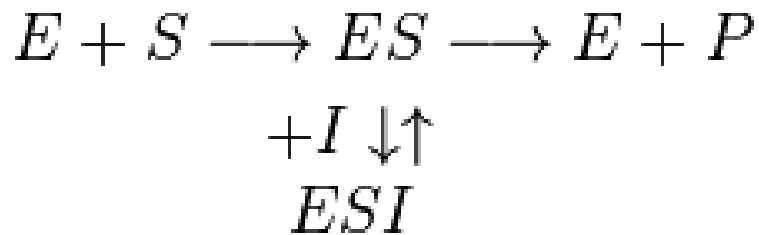


L'équation de vitesse s'écrit :

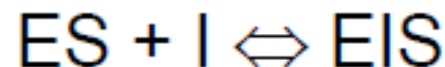
$$V_o = k_{\text{cat}} [E_T] \frac{[S]}{[S] (1 + [I] / K_I) + K_M}$$

- ▶ L'augmentation de la concentration d'un inhibiteur incompétitif [I], qui déplace l'équilibre pour la formation de ES et de ESI inactif en faveur de ce dernier, se traduit par une diminution de K_M et de k_{cat} , et donc de V_{max} .
- ▶ Pour une concentration donnée de I, selon la représentation de Lineweaver-Burk, la variation de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$ est linéaire.
- ▶ Pour des concentrations croissantes de I, les droites obtenues sont parallèles, ce qui indique des décroissances proportionnelles de K_M et de V_{max} .
- ▶ L'inhibition incompétitive est rare dans les systèmes qui n'impliquent qu'un seul substrat. Elle est plus fréquente dans les systèmes à substrats multiples.

- Schéma et équation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition incompétitive :



$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \Leftrightarrow [ES] = [E] \frac{[S]}{K_m}$$



$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \Leftrightarrow [ESI] = \frac{[ES][I]}{K_i} = \frac{[E][S][I]}{K_m \cdot K_i}$$

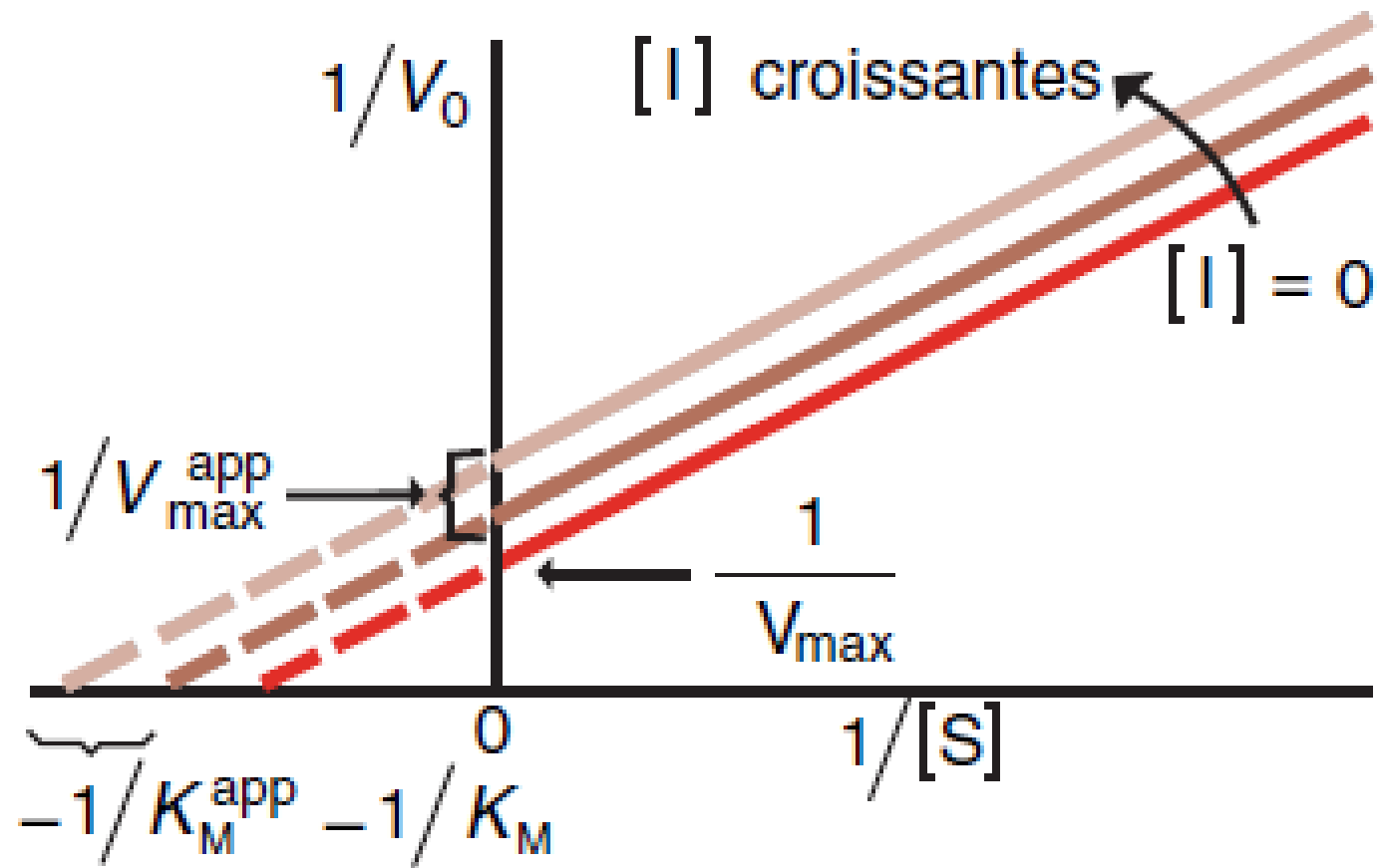
$[Et] = [EL] + [ES] + [EIS]$, on remplace par les valeurs correspondantes :

$$V_i = \frac{[S] \frac{V_{\max}}{(1 + \frac{[I]}{K_i})}}{[S] + \frac{K_m}{(1 + \frac{[I]}{K_i})}}$$

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

En présence d'un inhibiteur incompétitif, le substrat a une affinité apparente supérieure. Ici, V_{\max} et K_m changent.

$$V'_{\max} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \text{ et } K'_m = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$



Représentation de L-B pour une inhibition incompétitive

4. Inhibition par excès de substrat

► Soit la réaction $E + S \rightarrow ES \rightarrow P$.

► On a :

$K_m = [S][EL]/[ES]$, soit encore $[EL] = [ES]K_m/[S]$

Supposons qu'une deuxième molécule de substrat puisse se fixer sur le complexe

ES et le rendre inactif : cette molécule se fixe sur un site différent du premier, et nous l'appellerons site inhibiteur. Cette molécule se comporte comme un inhibiteur :

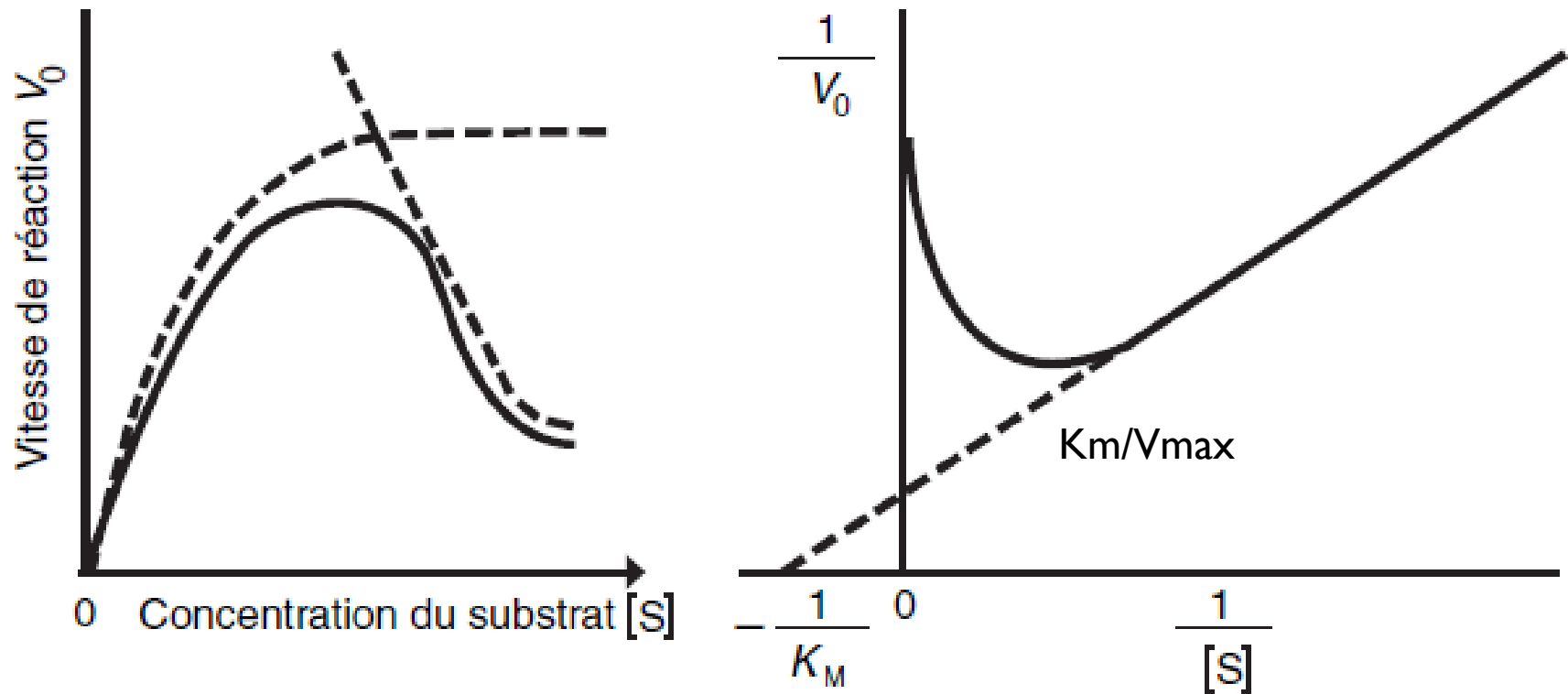
$$ES + S \rightleftharpoons ESS \Rightarrow K_i = \frac{[ES][S]}{[ESS]}$$

soit encore $[ESS] = [ES] \frac{[S]}{K_i}$

$$\frac{v_i}{V_{\max}} = \frac{[ES]}{[E_t]} \Leftrightarrow v_i = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i}} \quad \frac{1}{v_i} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i} \right)$$

Si $[S]$ est grand, $\frac{[S]}{K_m} \rightarrow \infty$

$$\left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i} \right) \rightarrow \infty \text{ soit } \frac{1}{v_i} \rightarrow \infty \Leftrightarrow v \rightarrow 0$$

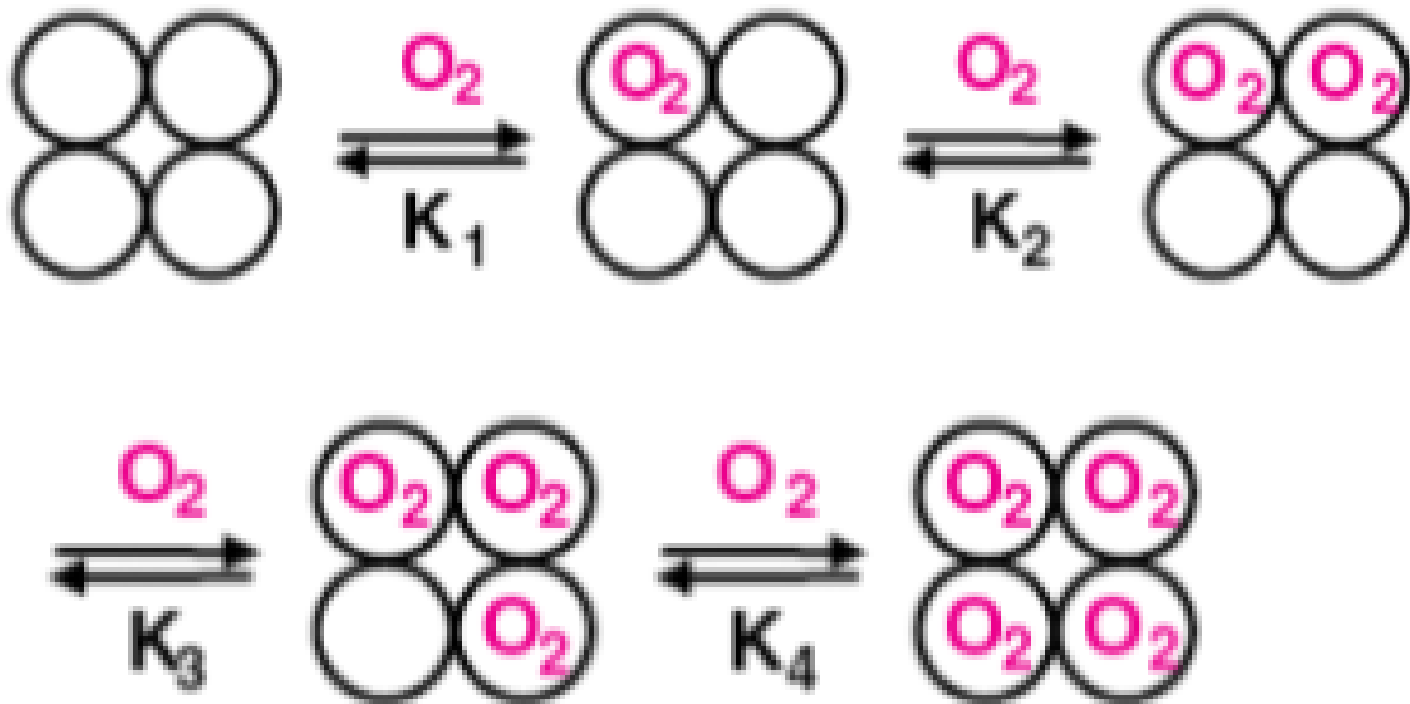


**Représentation de L-B pour une inhibition
par excès de substrat**

- ▶ Quand on porte I/V_i en fonction de $I/[S]$, on obtient une hyperbole dont l'asymptote oblique, de pente K_m/V_{\max} , coupe l'axe en un point $-I/K_m$.
- ▶ Quand on porte I/V_i en fonction de $[S]$, on obtient une hyperbole dont l'asymptote oblique, de pente $I/V_{\max} \cdot K_m$ coupe l'axe des $[S]$ en un point d'abscisse $-K_i$.
- ▶ Dans les deux cas, V_i passe par un maximum pour $[S] = \sqrt{K_m \cdot K_i}$

Enzymes allostériques; modélisation

- ▶ Une enzyme allostérique est un oligomère constitué de protomères : un protomère peut fixer une molécule de chacun des substrats et une molécule de chacun des effecteurs.
- ▶ L'allostérie désigne une variation de conformation de protéines sous l'effet de la fixation d'un substrat ou d'une molécule effectrice, d'où l'acquisition de propriétés particulières (changement d'activité.)
- ▶ Selon les enzymes, un protomère peut comporter une ou plusieurs chaînes polypeptidiques différentes.



Avec les K_1, K_2, K_3 et K_4 constantes de dissociations des quatre complexes successives formés par l'hémoglobine et O_2 avec $K_1 > K_2 > K_3 > K_4$

Propriétés d'une molécule allostérique

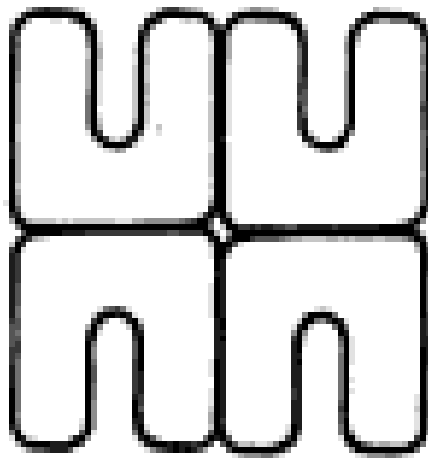
- ▶ Il existe une structure quaternaire (en pratique, entre un dimère et un tétramère)
- ▶ La variation de conformation de la structure dépend du taux d'occupation des sites de liaison.
- ▶ Pour toutes les enzymes allostériques, la cinétique n'est pas michaelienne.
- ▶ Ces molécules jouent des rôles clef dans la régulation du métabolisme.

Modèles

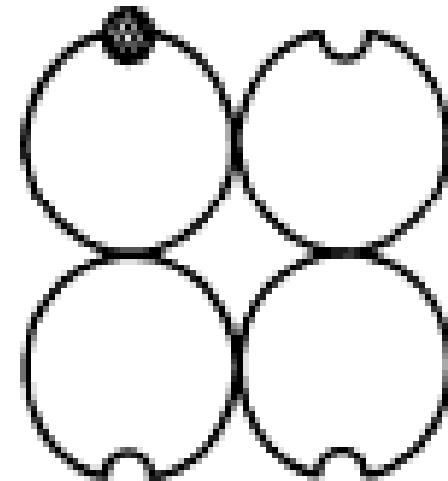
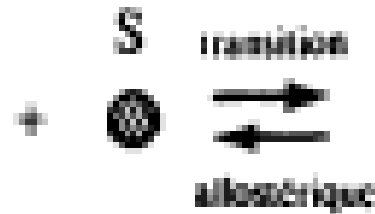
- ▶ Différentes modèles expliquent le phénomène d'allostérie ont été énoncés
- ▶ La protéine allostérique : protéine a structure quaternaire constituée de protomères
- ▶ Chaque protomère existe sous deux conformations proches en énergie:
 - Conformation relâchée R et une conformation tendue T
 - La forme R est plus apte à la fonction de la protéine que la forme T

Modèle de la transition concertée

- ▶ Dans ce modèle Monod, Wyman et changeux (1965), l'enzyme existe sous deux conformations en équilibre, T et R, dans lesquelles les protomères sont équivalents.
- ▶ Dans la conformation T, les protomères ont une faible affinité pour le substrat (S) et l'effecteur positif (+), et une forte affinité pour l'effecteur négatif (–).
- ▶ À l'inverse, la conformation R possède une affinité élevée pour le substrat et l'effecteur positif, et une faible affinité pour l'effecteur négatif.

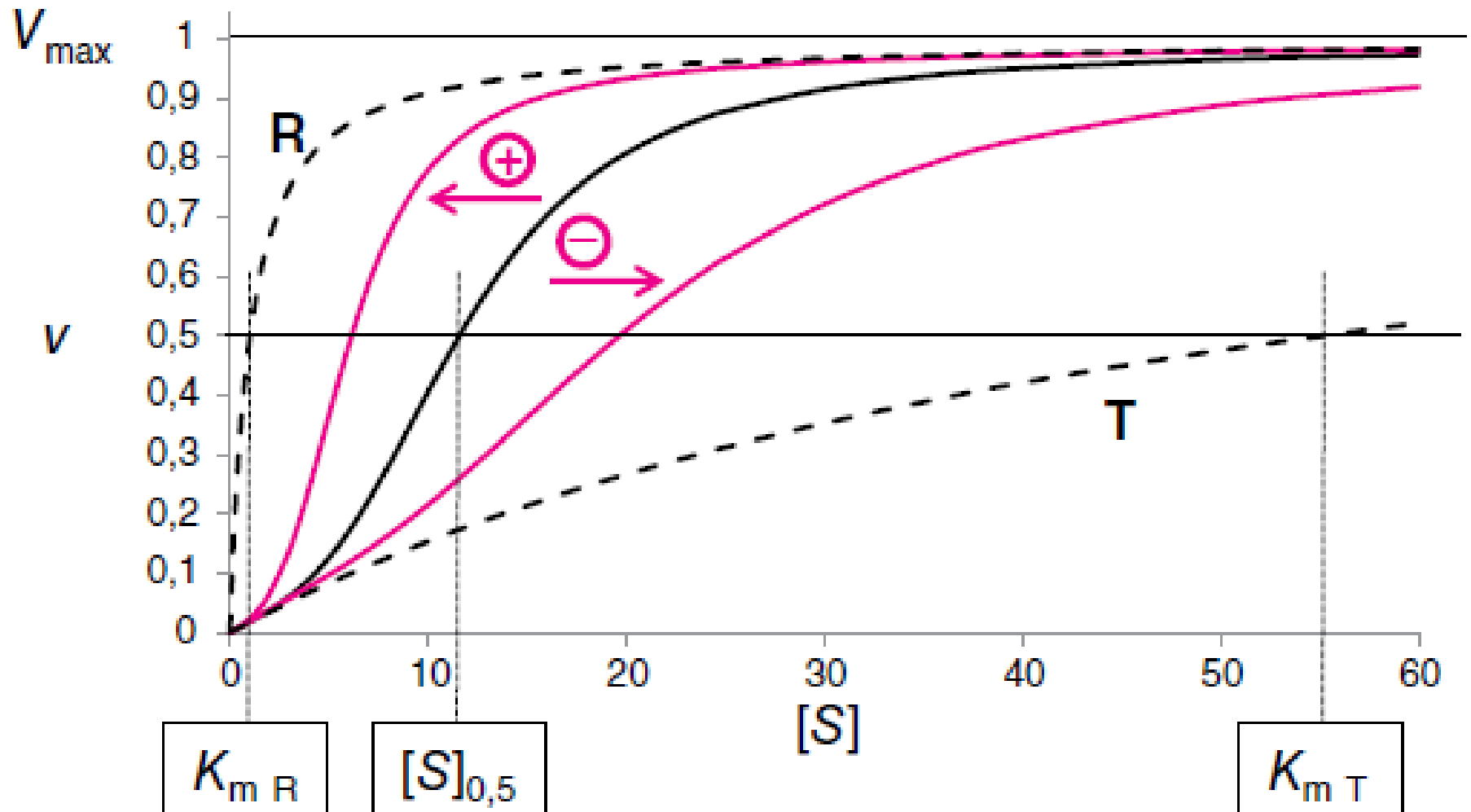


Enzyme allostérique
dans l'état conforma-
tionnel défavorable (T)



Enzyme allostérique
dans l'état conforma-
tionnel favorable (R)

Modèle Monod, Wyman et changeux

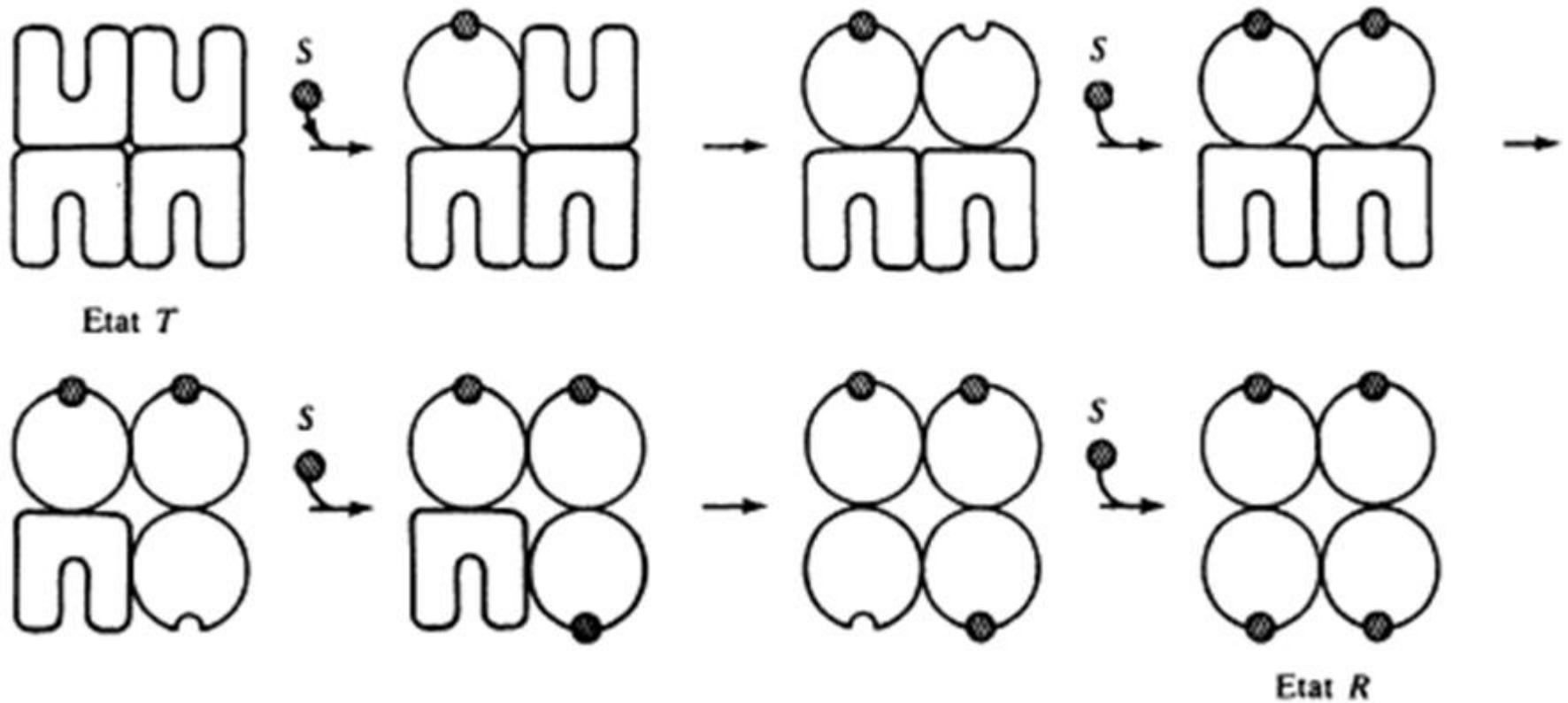


Courbes cinétiques de modèle de transition concertée

- ▶ On suppose qu'en absence de substrat et d'effecteurs, l'équilibre est en faveur de la forme T.
- ▶ Le substrat se fixe préférentiellement sur la forme R ; l'équilibre se déplace vers cette forme R à mesure que l'on augmente la concentration de substrat.
- ▶ C'est ainsi que se réalise la transition allostérique $T \rightarrow R$.
- ▶ Comme la fixation d'une molécule de substrat favorise la fixation de nouvelles molécules de substrat sur l'enzyme (sur la forme R), on parle de **fixation coopérative**, ou aussi de **coopérativité positive**.

Modèle de l'ajustement induit

- ▶ Ce modèle est proposé par Koshland, Nemethy et Filmer
- ▶ Suppose que la structure quaternaire de la protéine n'est pas forcément symétrique,
- ▶ La conformation d'un protomère influence l'affinité des autres protomères pour leurs ligands
- ▶ La transition T vers R ou R vers T se fait progressivement à l'échelle de la molécule, protomère par protomère
- ▶ La transformation d'un protomère T en R est induite par la fixation du ligand principal ou d'un activateur
- ▶ La fixation d'un inhibiteur entraîne la conversion d'un protomère R en T



Modèle de l'ajustement induit (Koshland, Nemethy et Filmer)

Effecteurs allostériques

- ▶ Effecteurs d'enzymes allostériques, c'est-à-dire d'enzymes à structure oligomériques caractérisée par:
 - l'existence de sous unités (SU) en nombre pair : chaque sous unité a un site pour le substrat et/ou pour l'effecteur:
 - Une cinétique souvent sigmoïde (en forme de S).



► Équation de Hill

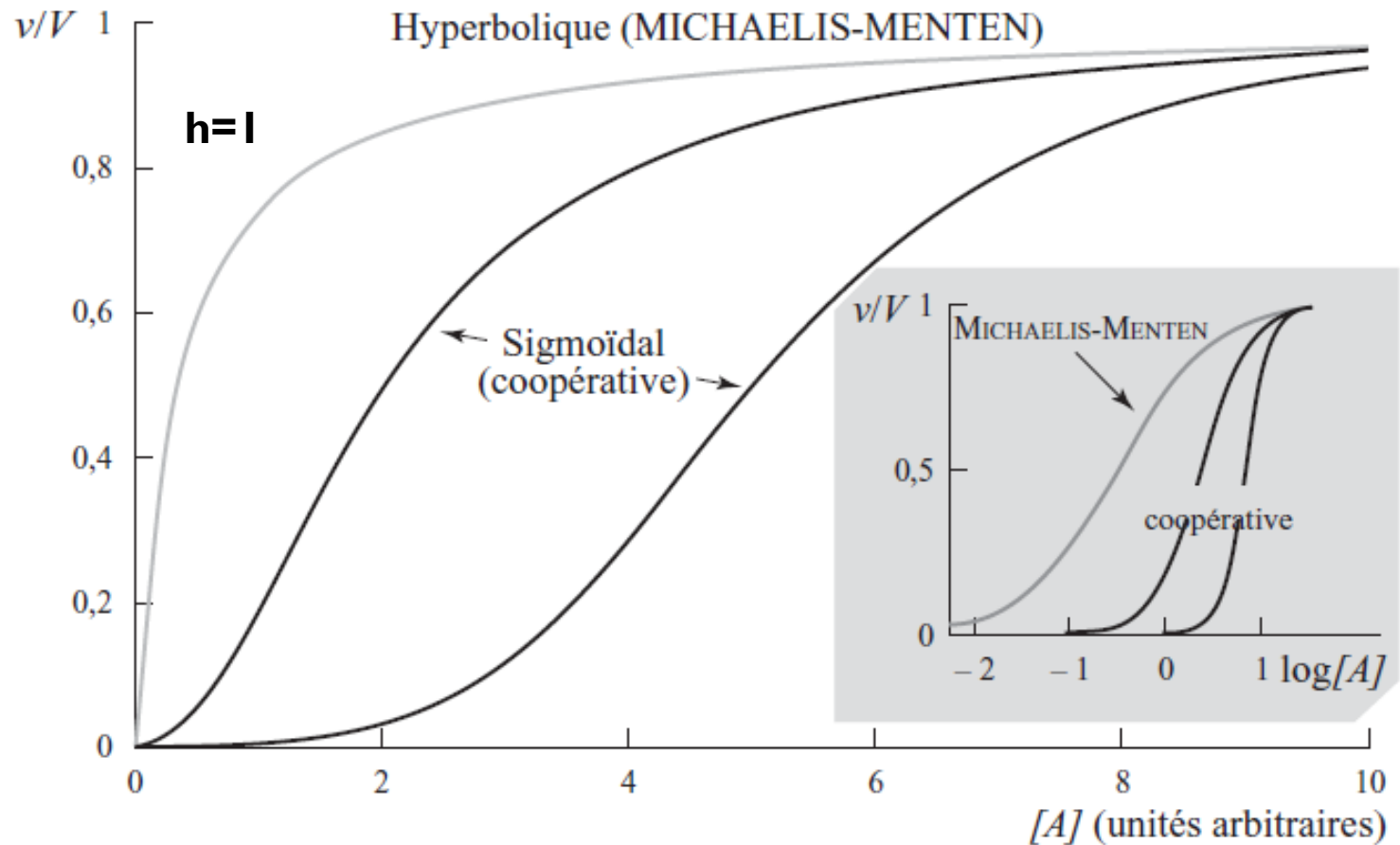
$$v_i = \frac{V_{\max} \cdot [S]^h}{K + [s]^h}$$

Avec $1 < h < n$,

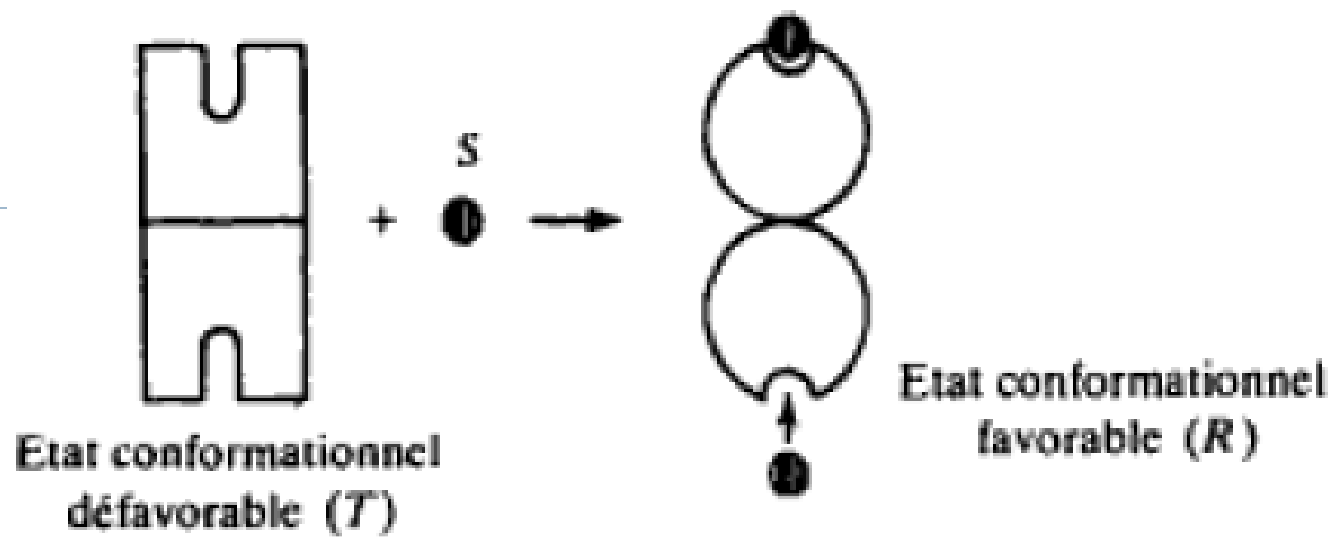
n : nombre des sous unités de l'oligomère

Si $h=1$; l'interaction entre les sous unités est nulle: la cinétique est michaelienne

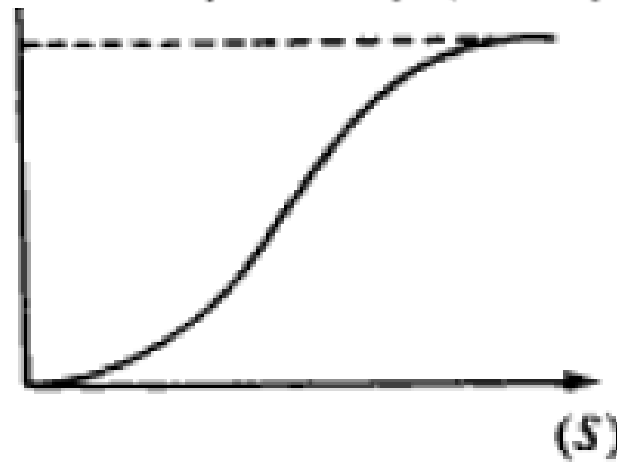
Plus de h tend vers n : l'effet de coopérativité est important



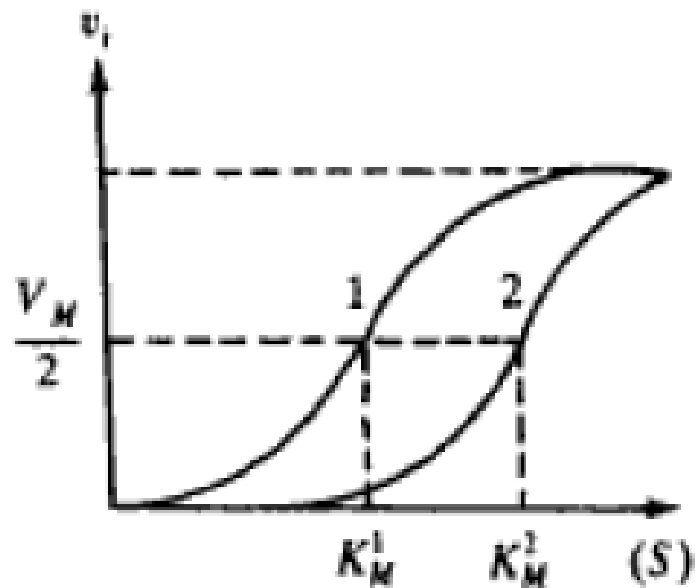
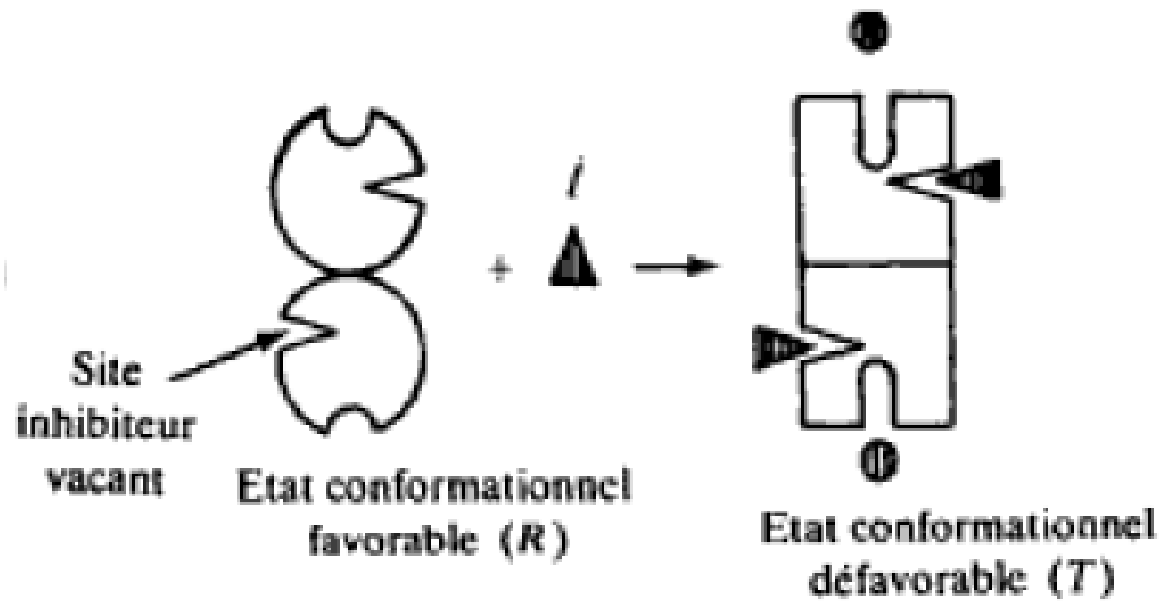
Représentation de la cinétique des enzymes allostériques



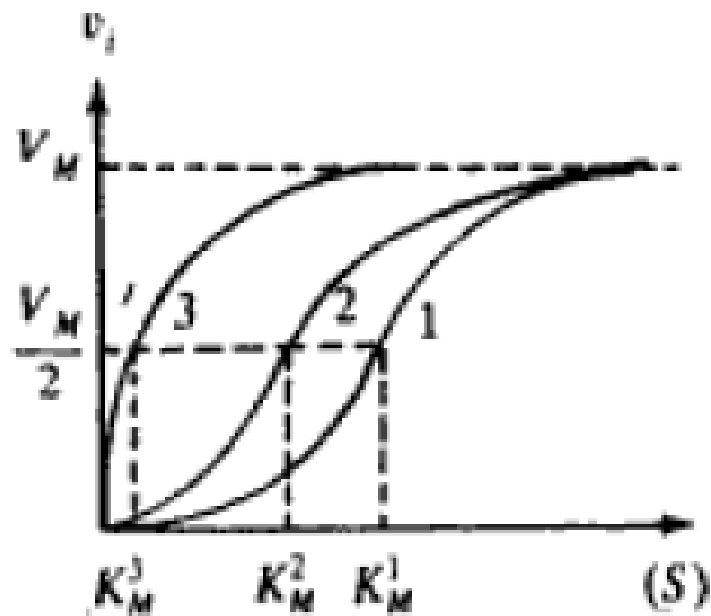
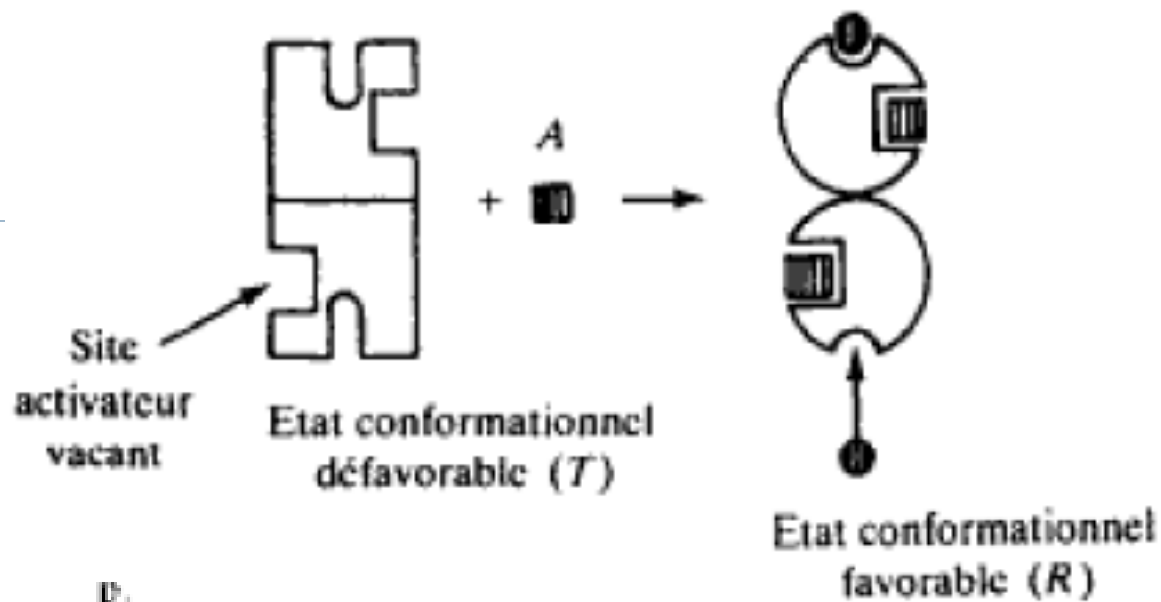
A. Effet allostérique homotrope (effet coopératif).



Effet allostérique homotrope (effet coopératif)



Effet allostérique hétérotrope ; courbe 1 sans inhibiteur, courbe 2 avec inhibiteur



Effet allostérique hétérotrope: courbe 1 sans activateur; courbe 2 avec activateur, avec activateur à saturation

Extraction, purification des enzymes

- ▶ Extraction
- ▶ Mise en solution d'une enzyme expérimentée dans une structure biologique
- ▶ Obtention d'un extrait brut après séparation liquide solide

L'activité d'une enzyme:

- ▶ représente la quantité d'enzyme permettant la transformation d'une micromole de substrat par min;
- ✓ les katal (kat): 1 kat, représente la quantité d'enzyme transformant une mole de substrat par seconde
- ✓ On peut le ramené à l'unité de volume de la solution enzymatique (concentration d'activité catalytique ou **CAC**) encore appelée concentration d'activité enzymatique ou CAE, en UI par unité de volume ou kat par unité de volume

▶ **Activité spécifique: $AS = CAC/C_p$**

▶ **Activité totale: $AT = CAC * VE$**

▶ **Enrichissement : $E = AS_2/AS_1$**

▶ **Rendement : $R = (AT_2/AT_1) \cdot 100$**

▶ **Enrichissement (E) ou degré de purification:**

▶ Rapport de l'activité spécifique après purification AS2 à l'activité spécifique avant purification AS1.

▶ $E = AS2/AS1$

▶ Le taux d'enrichissement ou taux de purification est supérieur à 1.



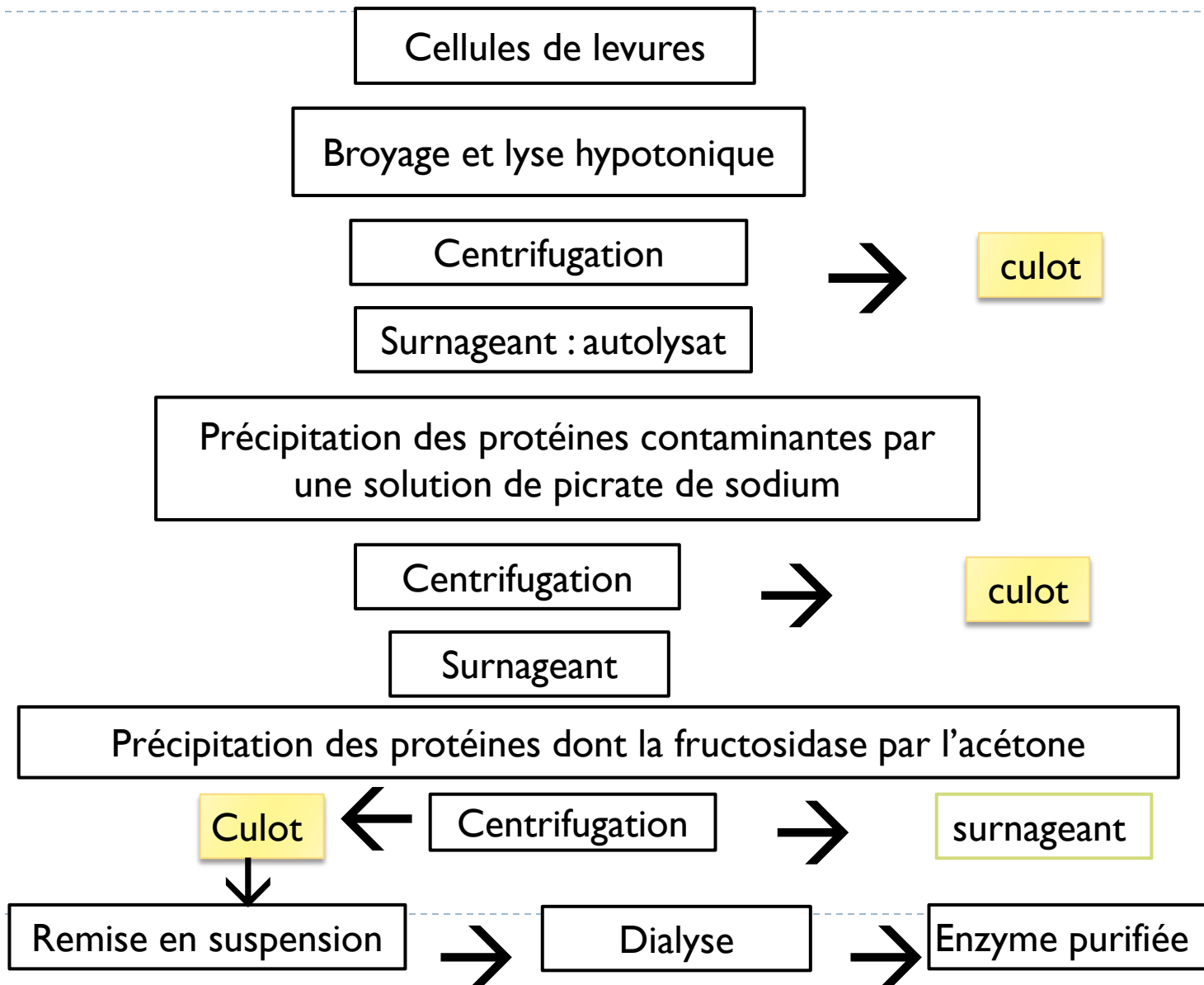
• **Rendement (R) ou pourcentage de récupération :**

• Rapport de l'activité totale après purification AT2 à l'activité totale avant purification AT1

• $R = (AT2/AT1) \cdot 100$

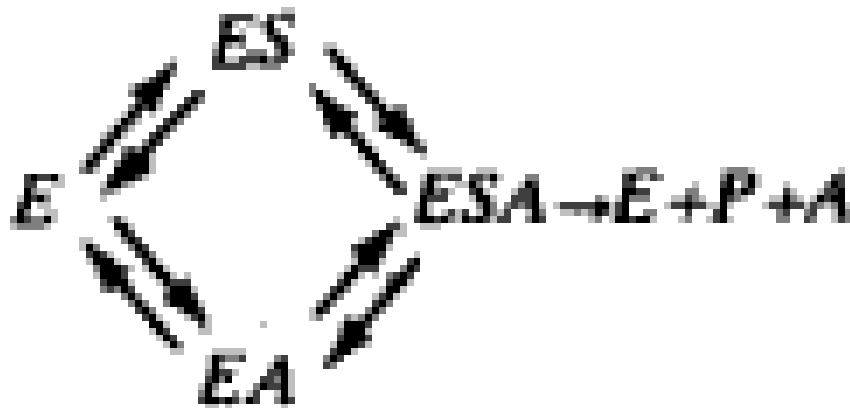
• Le taux de rendement ou pourcentage de récupération est inférieur à 100%

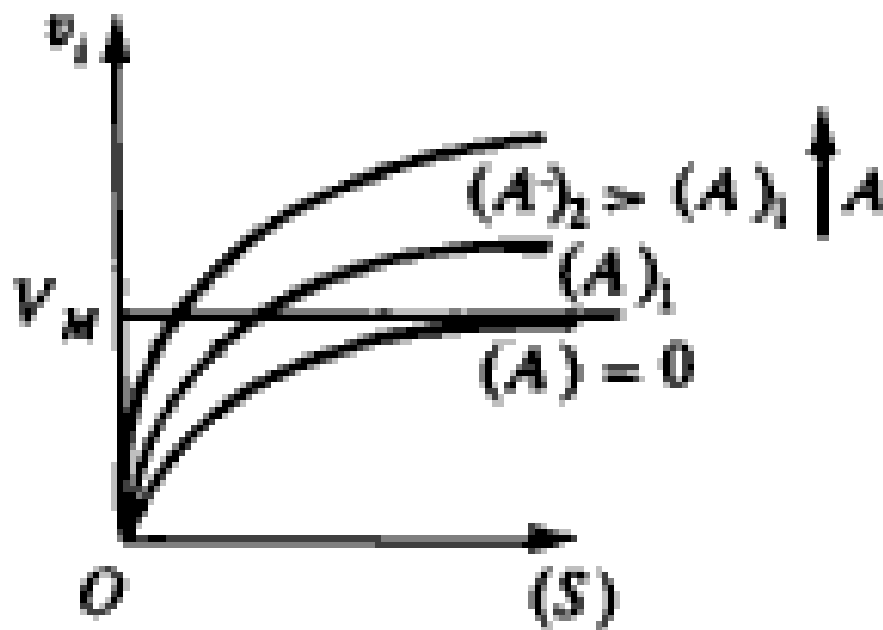
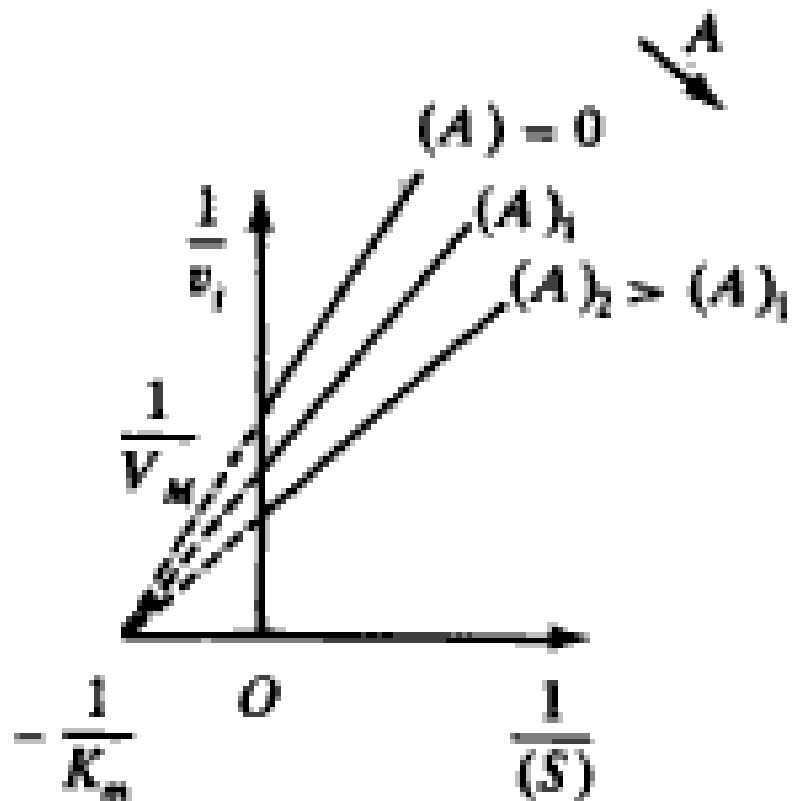
Exemple: Diagramme d'extraction et purification de β -Fructosidases de levures boulangères



Les activateurs

- ▶ Des molécules ou des ions qui associent à l'enzyme ou au complexe ES
- ▶ Ont un effet d'augmenter la vitesse des réactions enzymatiques
- ▶ La majorité sont des ions cations





Activation par combinaison indépendante

Principaux cofacteurs enzymatiques

cofacteur

Enzyme

Coenzyme

Thiamine pyrophosphate

Flavin adenine nucleotide

Nicotinamide adenine dinucleotide

Pyridoxal phosphate

Coenzyme A (CoA)

Biotin

5'-Deoxyadenosyl cobalamin

Tetrahydrofolate

Pyruvate dehydrogenase

Monoamine oxidase

Lactate dehydrogenase

Glycogen phosphorylase

Acetyl CoA carboxylase

Pyruvate carboxylase

Methylmalonyl mutase

Thymidylate synthase

Metal

Zn²⁺

Zn²⁺

Mg²⁺

Mg²⁺

Ni²⁺

Mo

Se

Mn

K⁺

Carbonic anhydrase

Carboxypeptidase

EcoRV

Hexokinase

Urease

Nitrate reductase

Glutathione peroxidase

Superoxide dismutase

Propionyl CoA carboxylase

Quelques définitions des mots utilisés en enzymologie

1- Substrat

- ▶ Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme.
- ▶ Toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement modifiées sont appelées substrats.
- ▶ Théoriquement, une seule réaction possible, sur un seul substrat.

► En réalité, il existe une relation structure-activité :

il faut que la bonne liaison soit placée au bon endroit

- il est fréquent qu'une enzyme intervienne non sur une molécule unique, mais sur une classe de substrats.

► Exemple : le galactose c'est épimère en C4 du glucose, non pris en charge par les enzymes de la glycolyse.

2- Produit

- ▶ Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme.
- ▶ La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation est appelée produit.

Cofacteurs

- ▶ Les cofacteurs sont des substances chimiques non protéiques qui interviennent dans la réaction enzymatique, mais ne sont pas transformés définitivement à la fin de cette réaction.
- ▶ Ils interviennent:
 - pour transporter ou compléter un substrat.
 - pour accepter un produit
 - comme participant à la structure de l'enzyme.

Classification:

- ▶ Les cofacteurs peuvent être classés en deux catégories :
 - Cofacteurs métalliques.
 - Les coenzymes.

Cofacteurs métalliques:

- ▶ Représentés par des ions métalliques (Mg^{++} , Ca^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Cu^{++})
- ▶ Peuvent jouer deux rôles possibles:
 - Fixation de substrat et formation d'un complexe organométallique.
 - Peuvent servir de centre actif.
 - Exemple: Le fer indispensable pour l'activité de la catalase. Toutes les kinases sont activées par le Mg^{2+} .
 - Le Zinc pour l'activité de l'anhydrase carbonique.
 - l'absence de ces cofacteurs métalliques peut provoquer l'inactivation totale ou partielle de l'enzyme

Les coenzymes

- ▶ Sont des entités qui vont aider au
- ▶ Fonctionnement de l'enzyme et qui lui sont faiblement liées par des liaisons type Van Der Waals.
- ▶ De nature non protéique, on peut parler de groupement prosthétique à leur rencontre.
- ▶ Leur nature est très diverse, mais on peut distinguer que la plupart des coenzymes sont des dérivés de vitamines (ce qui explique la nécessité de ces vitamines dans l'alimentation).
- ▶ On peut distinguer deux grands modes d'action de ces coenzymes:
 - Le coenzyme reste lié à son enzyme et participe ainsi directement au mécanisme catalytique; dans ce cas, le coenzyme fait partie du site actif de l'enzyme, et se retrouve inchangé à la fin de la réaction.

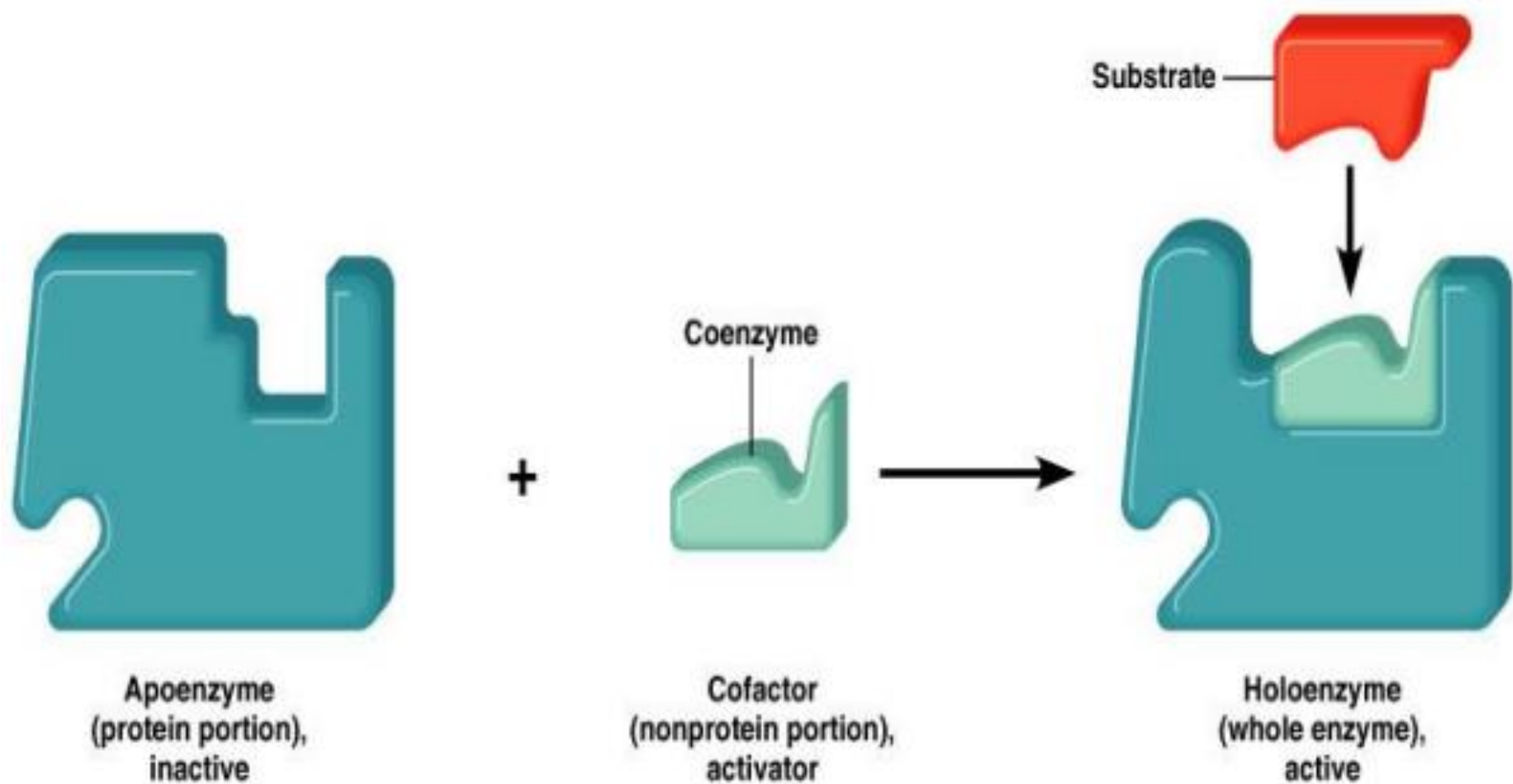
- Le coenzyme fixe certains substrats et les transporte d'une enzyme à une autre.
- Il faut donc que les deux enzymes disposent d'un site de fixation pour ce coenzyme qui peut alors être appelé un cosubstrat.
- On trouvera notamment dans cette catégorie les coenzymes des oxydoréductions cellulaires qui fournissent l'énergie de l'organisme.
- Les coenzymes sont pas de nature protéique
- Présentent une structure conjuguée riche en énergie
- La majorité sont d'origine vitaminiques (vitamine B)
- On distingue: **les coenzymes de transfert et Les coenzymes d'oxydoréduction**

Enzymes contiennent :

- ▶ Une partie protéique = Apoenzyme
- ▶ Une partie non protéique = Cofacteur

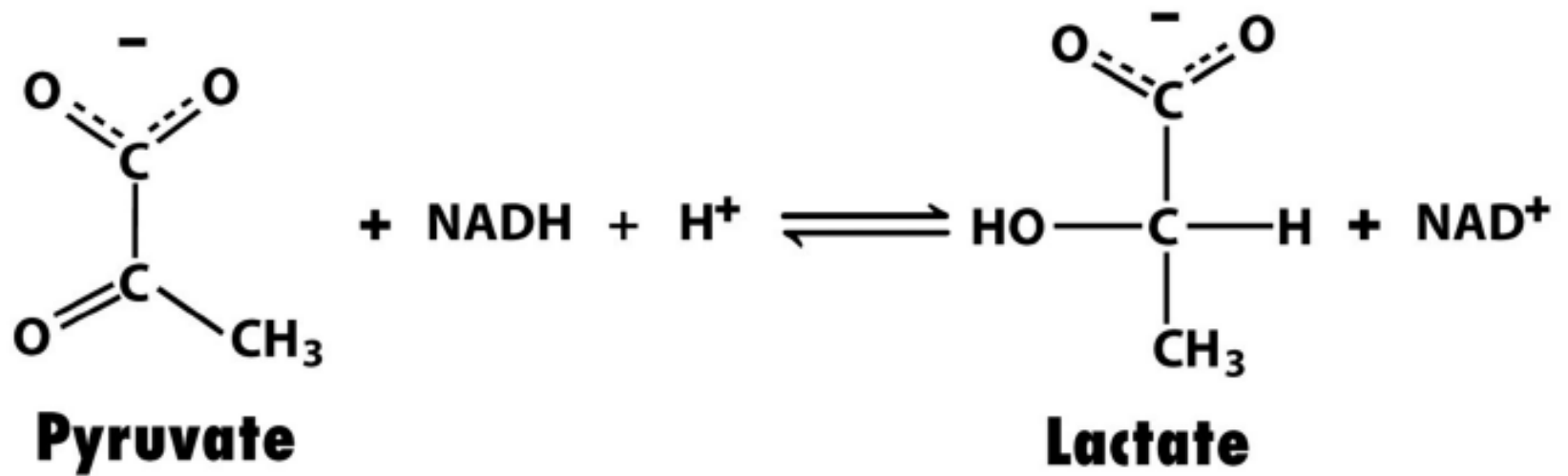
*Cofacteurs métalliques: ions de Fe, Zn, Mg, Ca

*Coenzymes: petites molécules organiques non protéique associées à l'apoenzyme, indispensables à son activité biologique

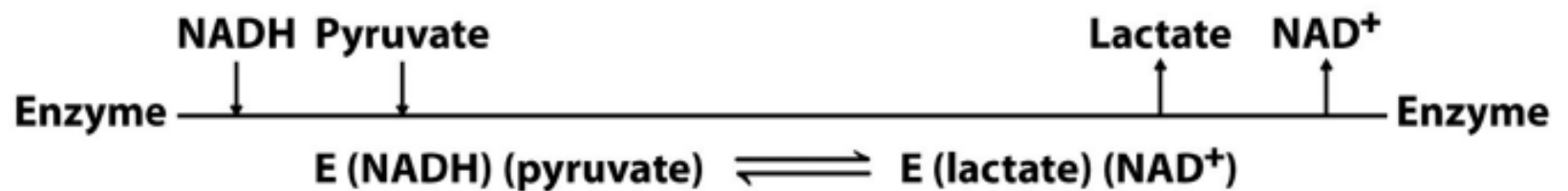


Enzyme à coenzyme dépendante

Apoenzyme + Cofacteur = Holoenzyme
Enzyme complète et fonctionnelle



Enzyme : lactate déhydrogénase



Exemple de réaction enzymatique dépendante de coenzyme

Exemples de vitamines B à l'origine de coenzymes

Vitamines		Coenzymes	Types de réaction
B1	Thiamine	TPP	Décarboxylation
B2	Riboflavine	FAD, FMN	Oxydoréduction
B3, PP	Acide nicotinique	NAD^+ , NADP^+	Oxydoréduction
B5	Acide pantothénique	Coenzyme A	Acylation
B6	Pyridoxine	Pyridoxal-phosphate (PLP)	Synthèse des acides aminés
B8, H	Biotine	Biotine	Carboxylation
B12	Cobalamine	Cobamide coenzyme	Réarrangements intramoléculaires
B9	Acide folique	Acide tétrahydrofolique	Groupements monocarbonés

a- Les coenzymes de transfert

Thiamine pyrophosphate (B1)

Structure

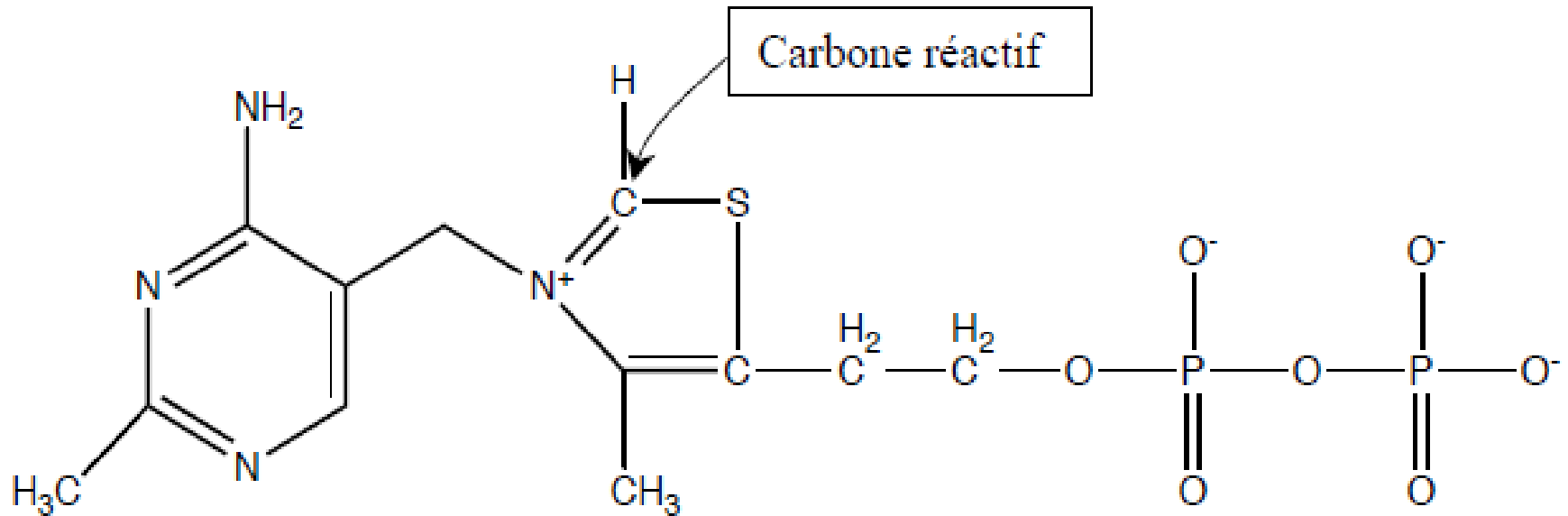


Figure : structure de la thiamine pyrophosphate (TPP)

Fonctions

- condensation : transcétolisation (voie des hexoses-P)
- décarboxylations de α -cétoacides
- oxydo-réductions

Enzymes à TPP

- Pyruvate Déshydrogénase
- α -cétoglutarate Déshydrogénase

La biotine (B8 ou H)

Structure

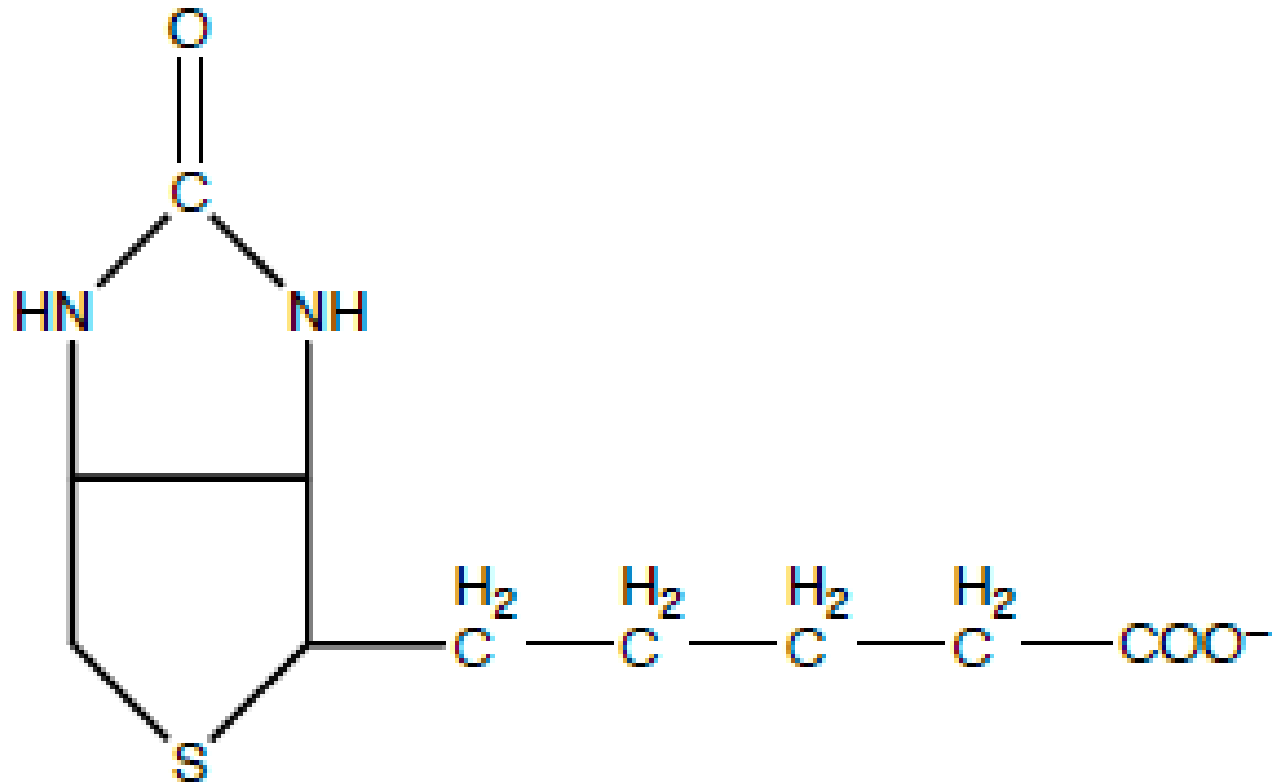


Figure : structure de la biotine

Fonctions

- ▶ Carboxylation (fixation de CO₂)

Enzymes à biotine

- ▶ Groupement prosthétique lié à une lysine.
- ▶ **Exemples des enzymes à Biotine**
 - AcétylCoA carboxylase
 - Pyruvate carboxylase

- ▶ **Phosphate de pyridoxal (PLP) (dérivé de la vitamine B6)**
- ▶ Le PLP intervient dans des réactions de transfert de groupement aminé dans la synthèse des acides aminés.

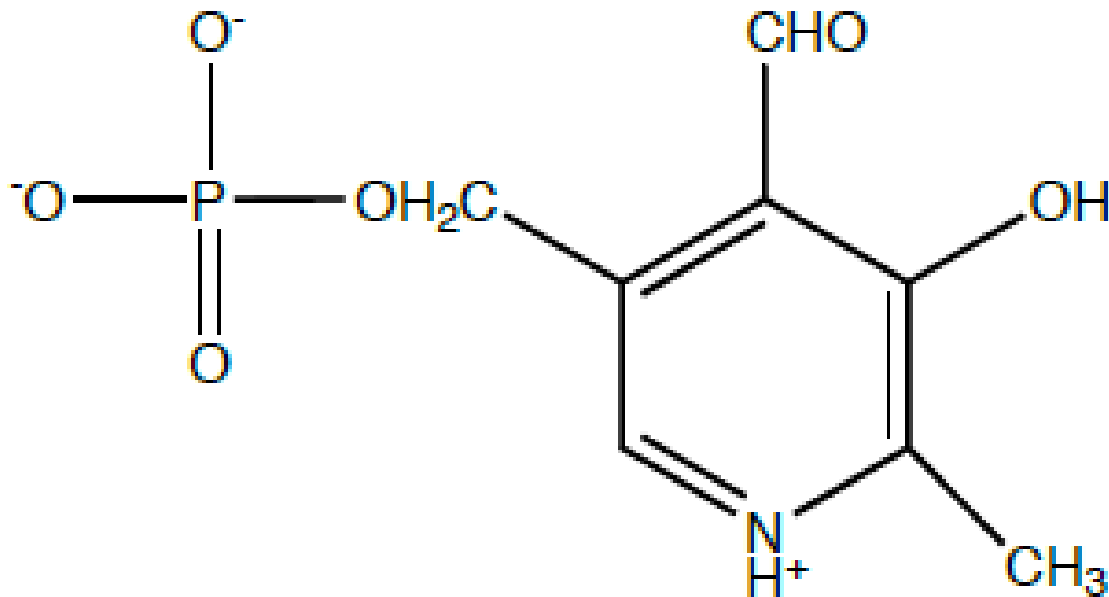
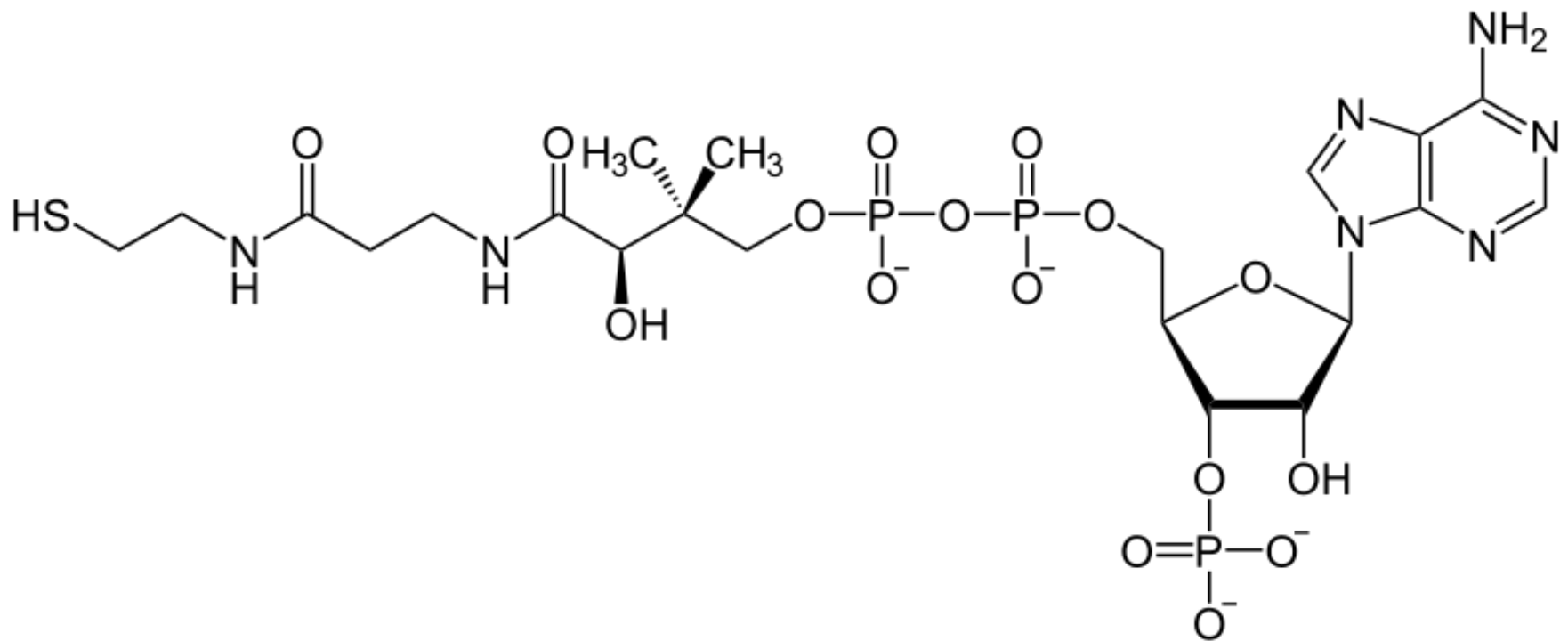


Figure : structure du phosphate de pyridoxal

► Le coenzyme A ou CoASH (dérivé de la vitamine B5)

Structure



Structure de coenzyme A

-
- ▶ La coenzyme A (CoA) est une coenzyme de transfert de groupements acyle intervenant dans de très nombreuses voies du métabolisme (cycle de Krebs, bêta-oxydation).
 - ▶ La coenzyme A est composée de différents éléments : un nucléotide: l'adénosine diphosphate (ADP), une vitamine: la vitamine B5 (acide pantothénique) et un acide aminé: la cystéine légèrement modifié et liés entre eux.

Rôles

- Activation des groupements carboxyliques
- Activation du H en α des groupements carboxyliques
- Acylation (transfert de $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-(\text{CO})-$)

Réactions à CoA

- ▶ Allongement des chaînes d'acides gras
- ▶ β -oxydation des AG
- biosynthèse des AA
- formation de l'acétylcholine
- formation du squalène (biosynthèse des stéroïdes).

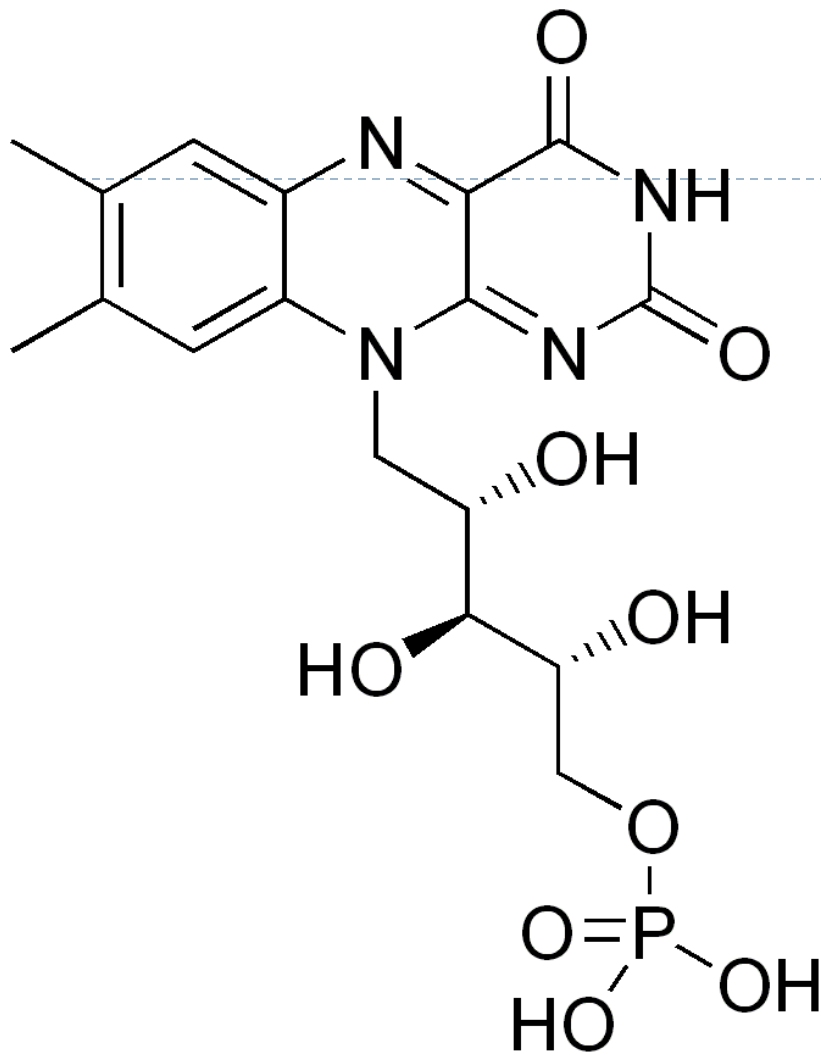
b- Les coenzymes d'oxydo-réduction

Transport de H^+ et d' e^-

- Comme: NAD^+ , $NADP^+$, FAD, FMN : co-substrat
- Comme hème des cytochromes : groupement prosthétique

FMN, FAD (dérivés de la vitamine B2)

- ▶ FMN : Flavine MonoNucléotide
- ▶ FAD: La Flavine Adénine Dinucléotide

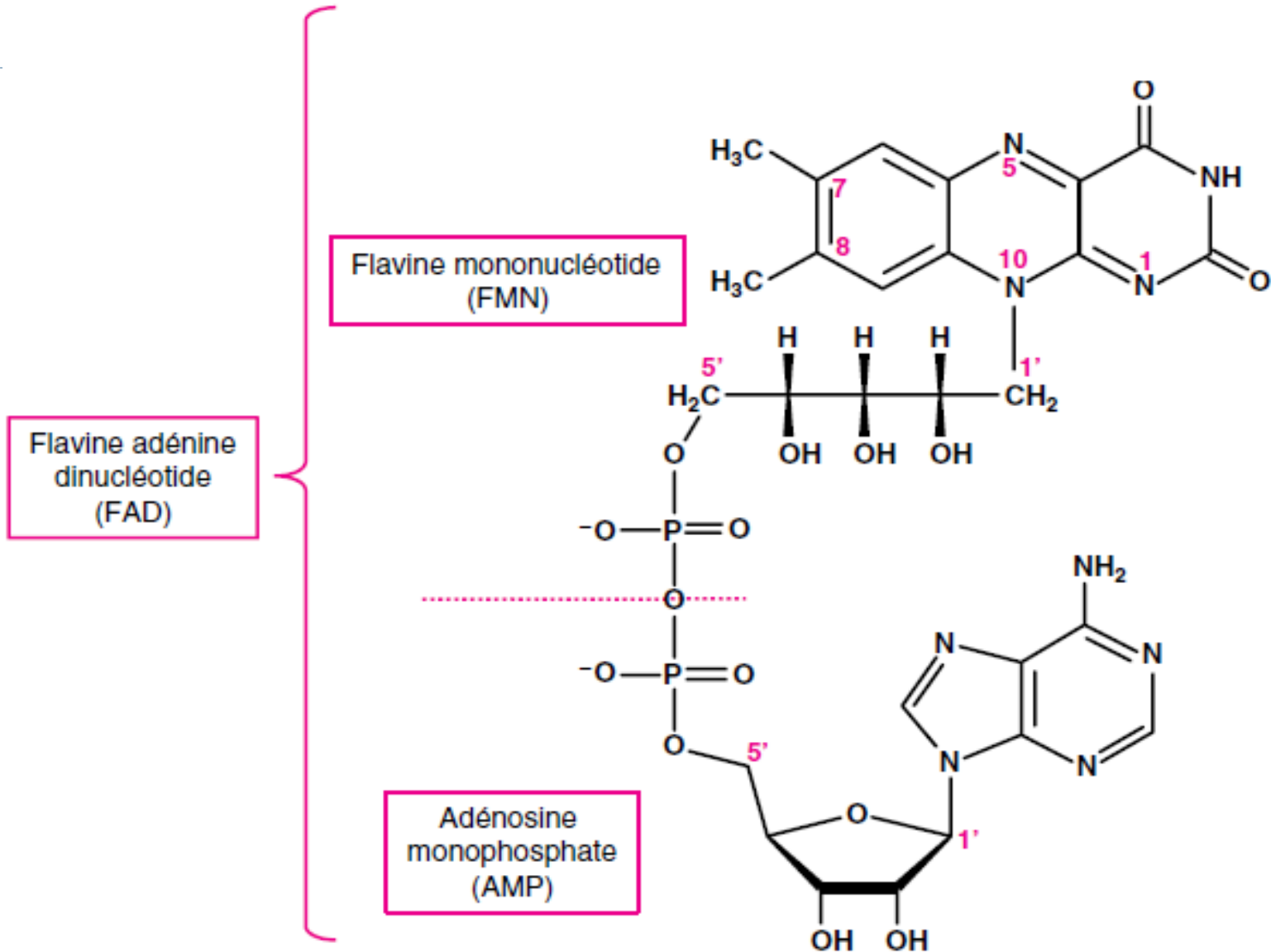


b.1. La flavine mononucléotide (FMN)

- La flavine mononucléotide (FMN), ou riboflavine-5'-phosphate, est une biomolécule produite à partir de la riboflavine (vitamine B2) par l'enzyme riboflavine kinase
- agit comme groupement prosthétique de diverses oxydo-réductases,
- La FMN est un agent oxydant plus fort que le NAD

Figure: structure de FMN

b.2. La Flavine adénine dinucléotide (FAD)



- La Flavine adénine dinucléotide (FAD) : un cofacteur d'oxydo-réduction dérivant de la riboflavine (vitamine B2).
- Associé aux enzymes de la classe des oxydo-réductases auxquelles il est lié par une liaison covalente
- Utilisé par les flavoprotéines du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale :
 - Glycérol 3-P déshydrogénase, AcylCoA déshydrogénase, Succinate déshydrogénase.
 - Au niveau de cette chaîne respiratoire mitochondriale, le FAD permet la formation de 2ATP grâce au pompage de 6 protons dans l'espace inter-membranaire.

Le couple rédox est le suivant : $\text{FAD} \leftrightarrow \text{FADH}_2$

b.3. : Le nicotinamide adénine dinucléotide NAD^+

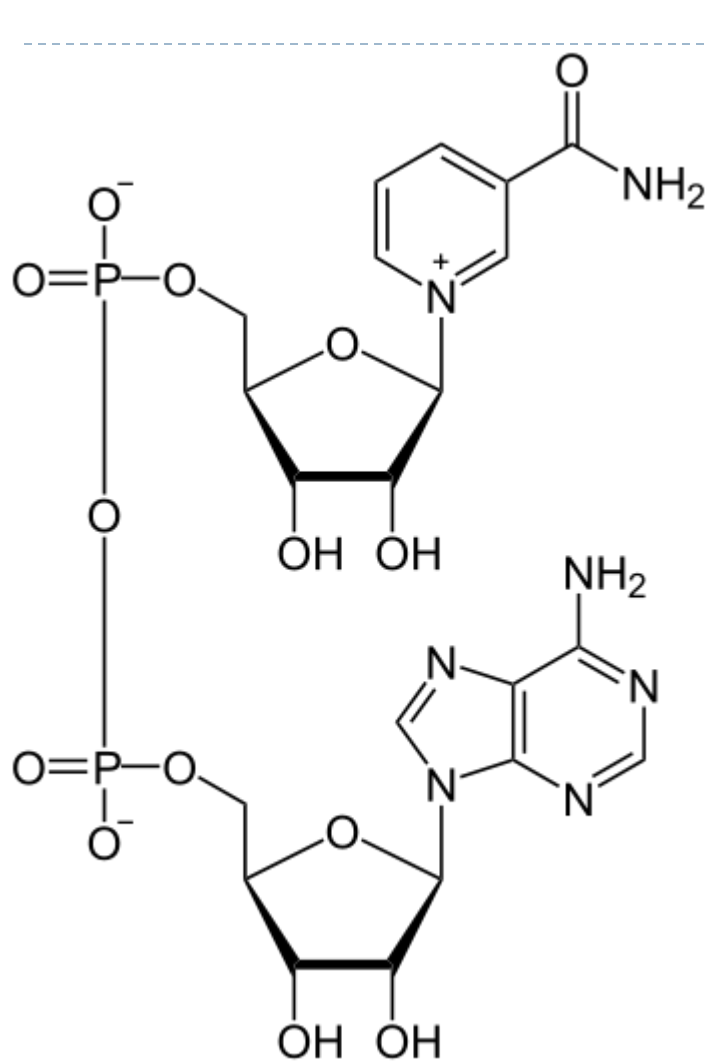


Figure : structure du NAD^+

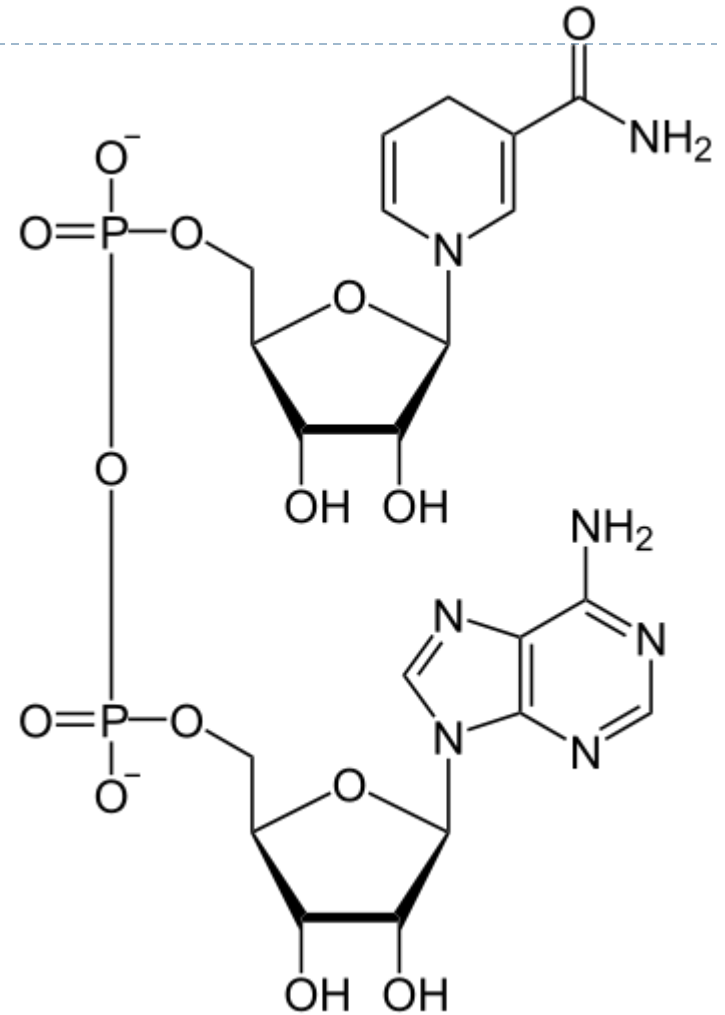
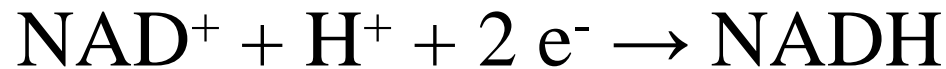
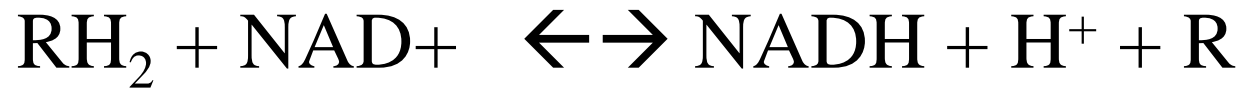


Figure : structure du NADH

Le NAD intervient dans les réactions d'oxydoréduction comme accepteur d'électrons (NAD⁺, oxydant) ou donneur d'électrons (NADH, réducteur) :



b.4. Le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺)

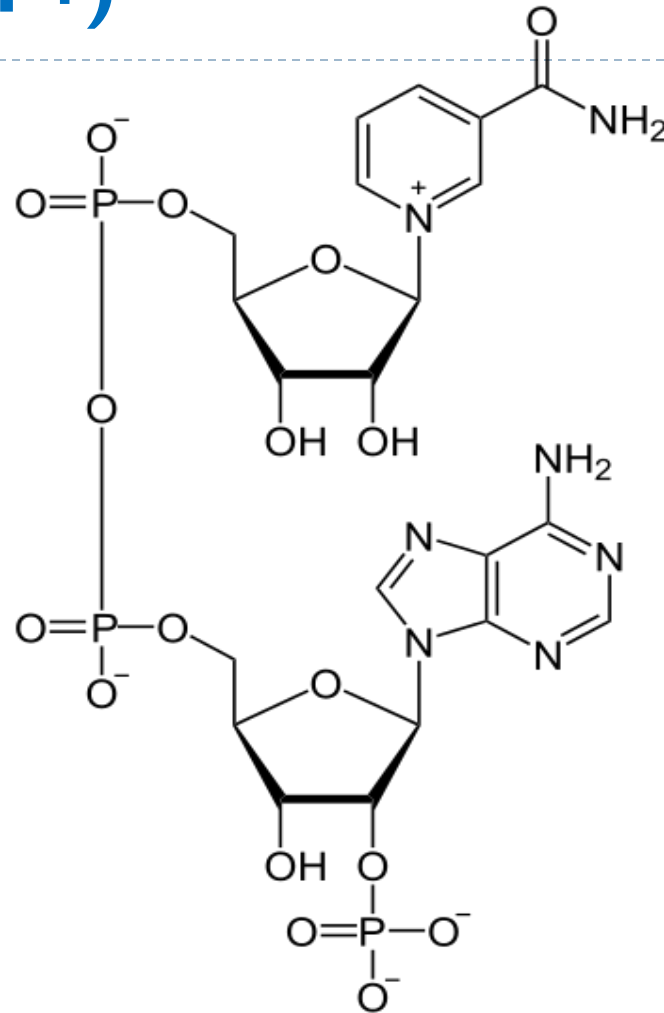


Figure: structure de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP)

est un coenzyme d'oxydoréduction.

→ Il est très proche du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), dont il diffère par la présence d'un groupement phosphate sur le second carbone du β -D-ribofurannose du résidu adénosine.

→ Sa forme réduite est désignée par NADPH ou NADPH₂ ou encore NADPH+H⁺.