



Faculté de médecine d'Alger
Département de médecine dentaire
Année universitaire 2022/2023

FACULTE DE MEDECINE

D'ALGER



Enzymologie

Cours de 1 ère année médecine dentaire

3^{ème} partie

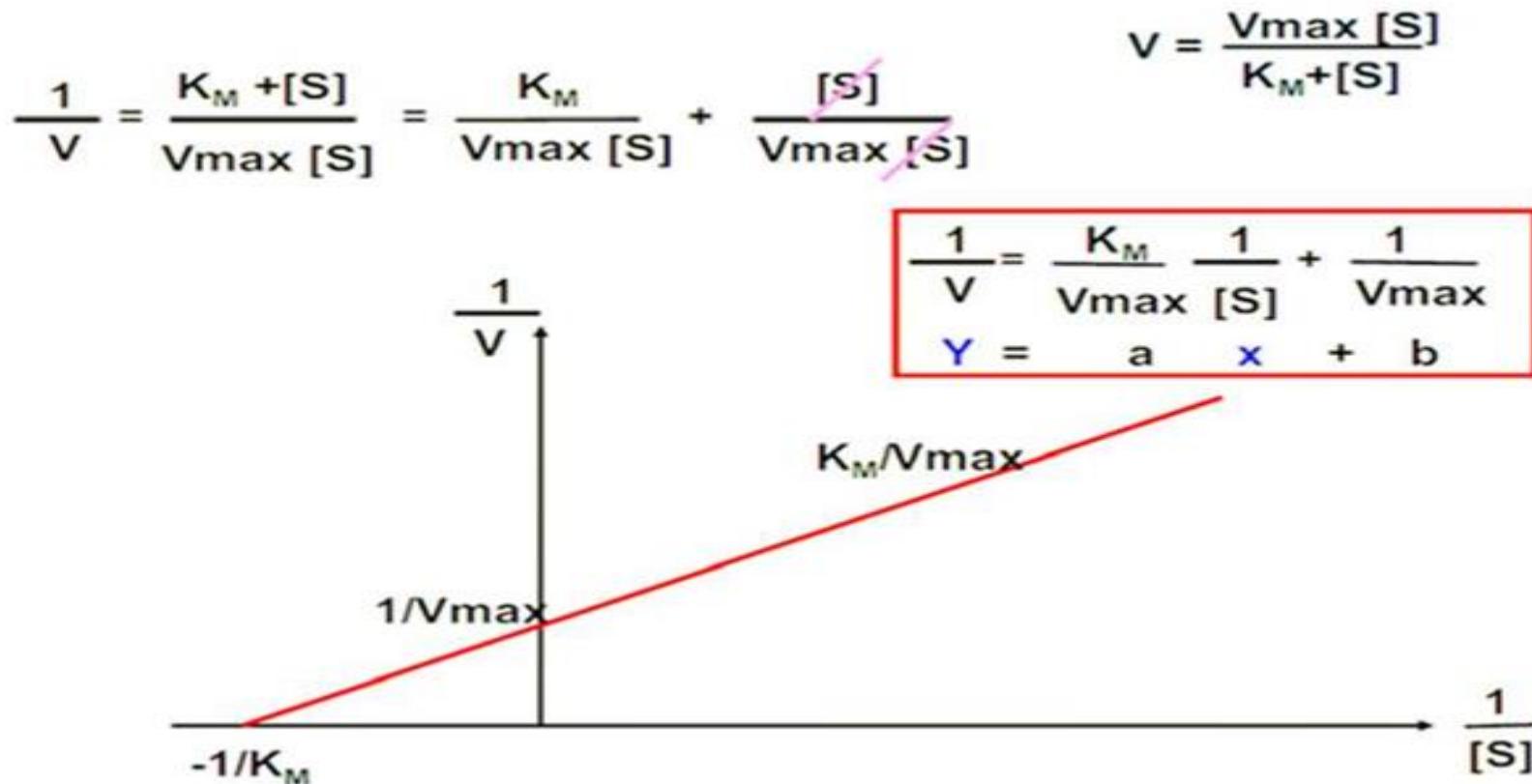
4. Détermination graphique des paramètres cinétiques Vmax et Km:

- L'utilisation de l'hyperbole ne permet pas la détermination précise de V_m et de K_m
→ Linéariser pour plus de facilité et de précision.
- Il y a quatre méthodes graphiques pour établir les valeurs de K_m et V_{max} dans des conditions expérimentales données: **Lineweaver-Burk, Eadie Hofstee, Hanes et Cornish-Bowden-Eisenthal.** (le but est la linéarisation)

1. La représentation de Lineweaver-Burk (double inverse)

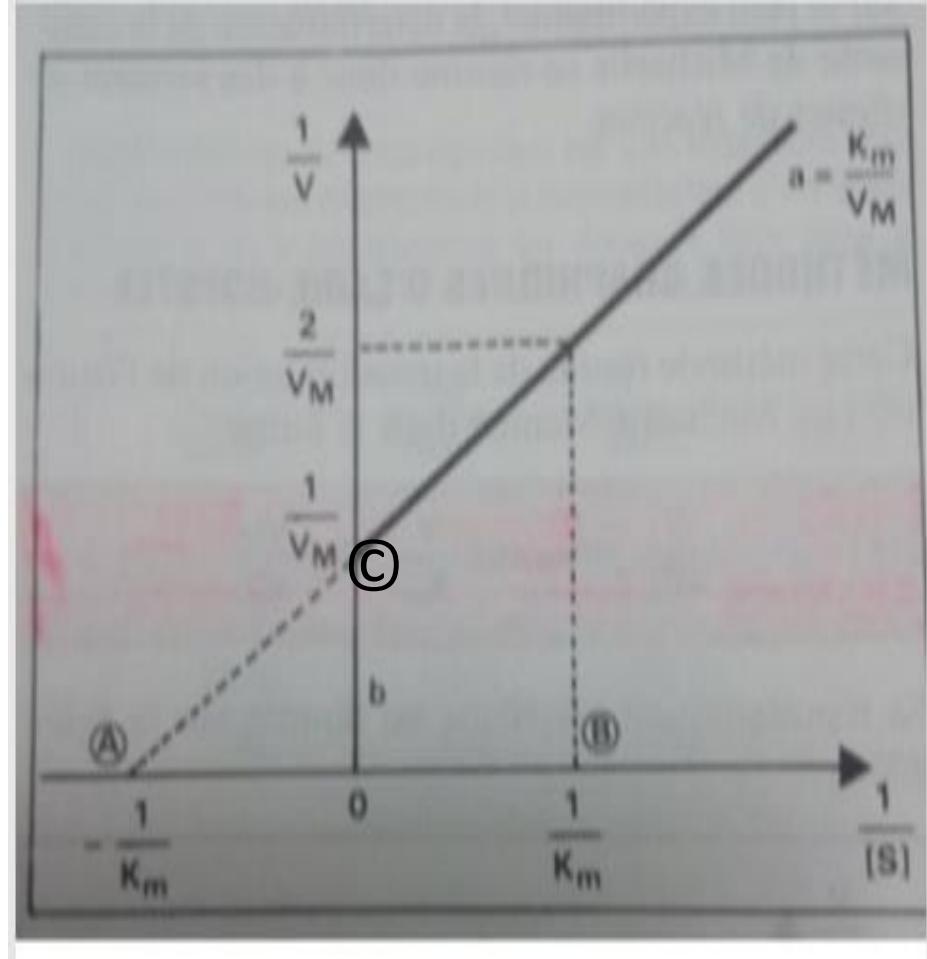
La réciproque de l'équation de Michaelis-Menten

$$1/V = f(1/S)$$



$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_M} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_M}$$

- l'équation $1/V = f(1/[S])$ d'une droite sous forme :
 $y = ax + b$ avec $a = K_m/V_{max}$ et $b = 1/V_{max}$



Pour $1/[S] = 0$

Pour $1/V = 0$

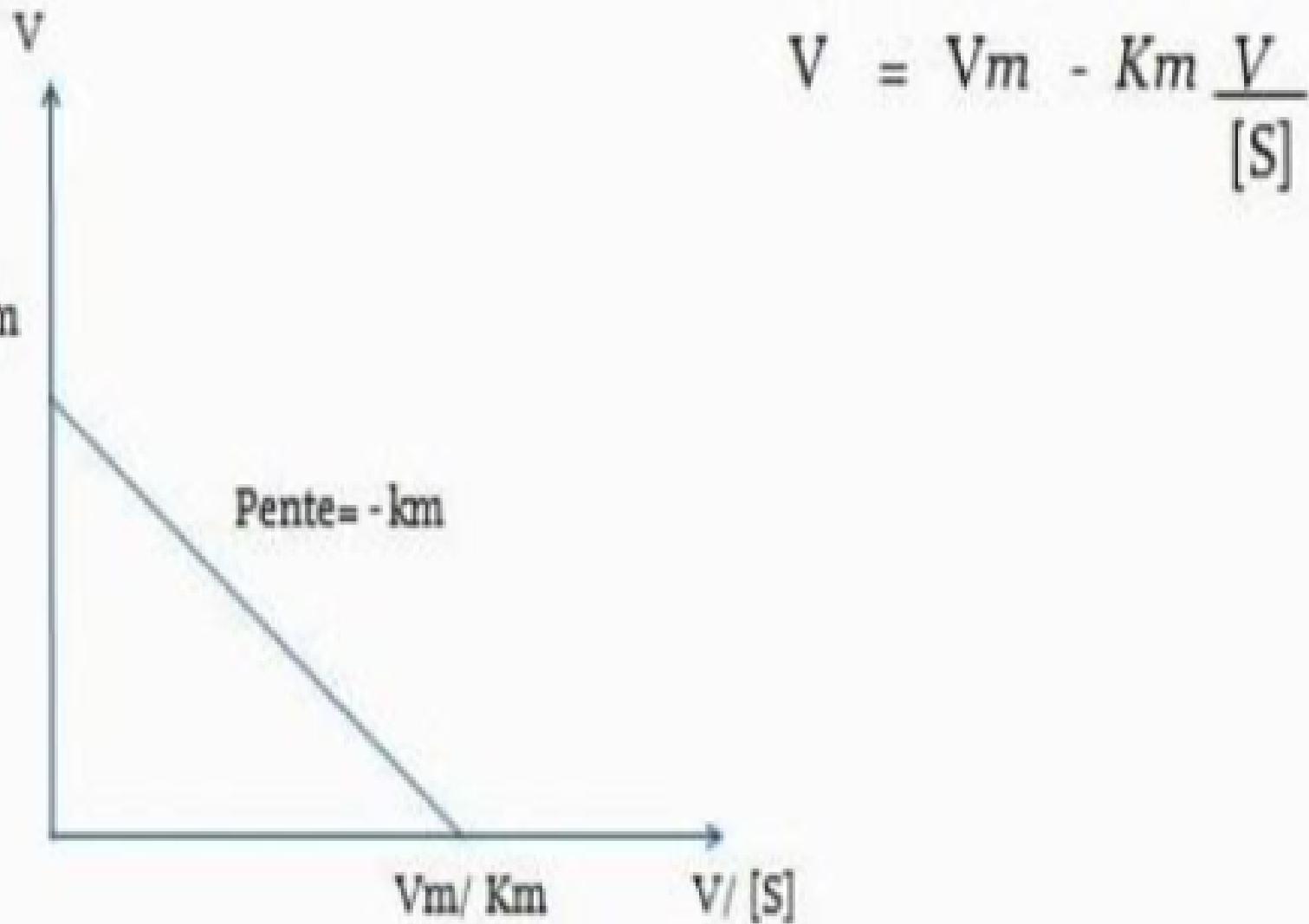
Pour $1/V = 2/V_{max}$

$\rightarrow 1/V = 1/V_{max}$. (point C)

$\rightarrow 1/[S] = -1/K_m$. (point A)

$\rightarrow 1/[S] = 1/K_m$. (point B)

2.La représentation d'Eadie Hofstee:



B. Cinétique enzymatique à deux substrats :

- L'étude des mécanismes à 2 substrats, se fait par la généralisation des notions établies pour les réactions à 1 substrat.
- Les enzymes adoptant ce modèle cinétique catalysent généralement un transfert de groupement G



- GA : 1^{er} substrat
- B: 2^e substrat
- A: 1^{er} produit
- GB : 2^e produit

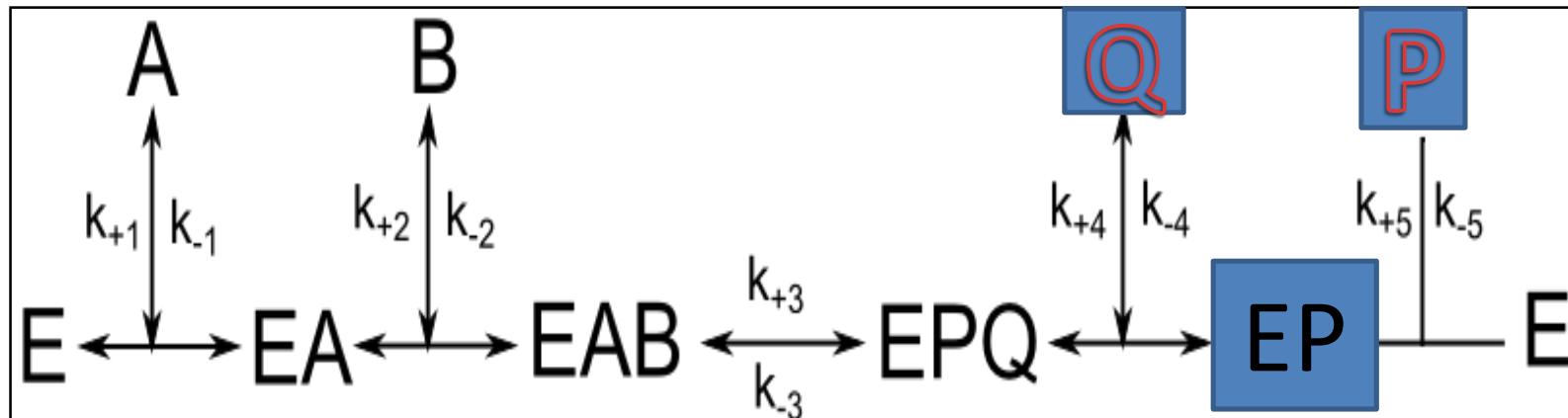
- Cette cinétique à 2 substrats implique différents mécanismes, qui peuvent être:
 - Séquentiels :
 - Ordonnés
 - Aléatoires
 - Ping-pong.

1. Mécanisme séquentiel (à complexe ternaire/ à transfert simple)

- Appellation due à la formation d'un **complexe ternaire**: **[Enzyme-1^{er} Substrat -2^{eme} Substrat] (E-A-B)**
- La réaction est dite à **transfert simple**, car le groupement passe du **substrat donneur (GA)** au **substrat accepteur (B)**.
- Dans ces réactions **tous les substrats doivent se fixer sur l'enzyme**, avant qu'aucun produit ne soit libéré.
- Selon l'existence d'un **ordre précis** de fixation des substrats, ou de libération des produits, on distingue 2 mécanismes:
 - Bi-Bi ordonné.
 - Bi-Bi aléatoire.

1.1. Bi-Bi ordonné

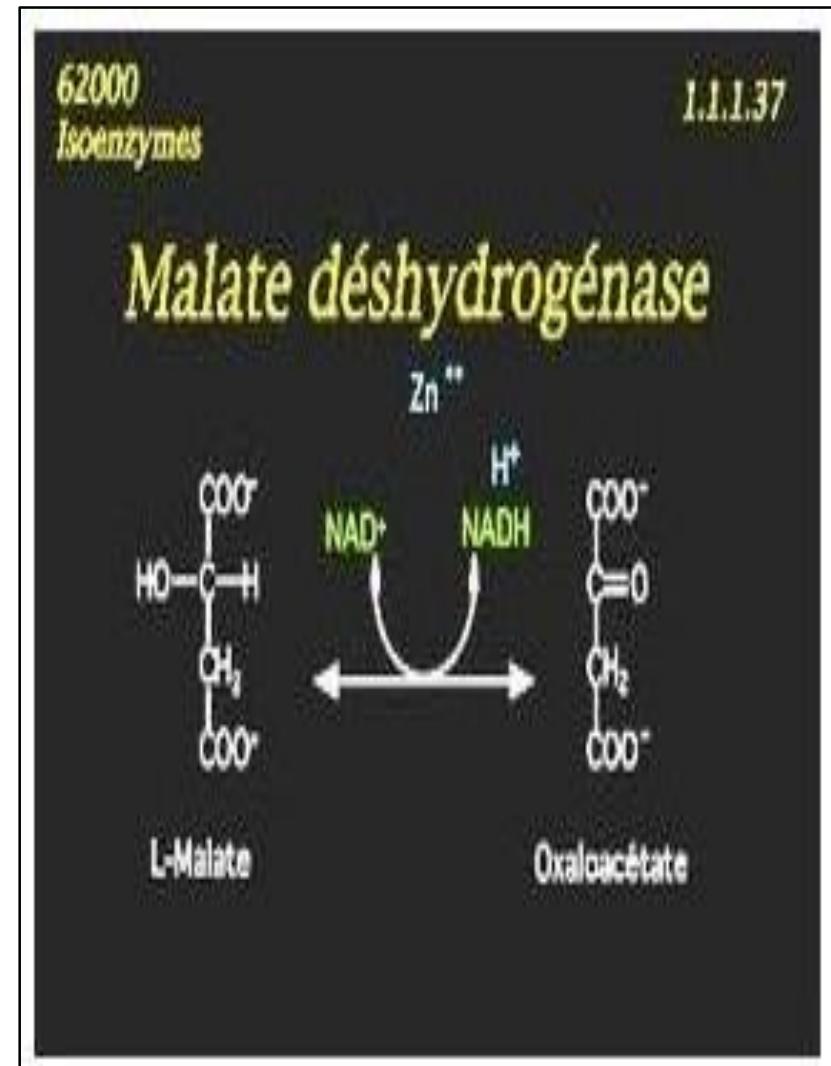
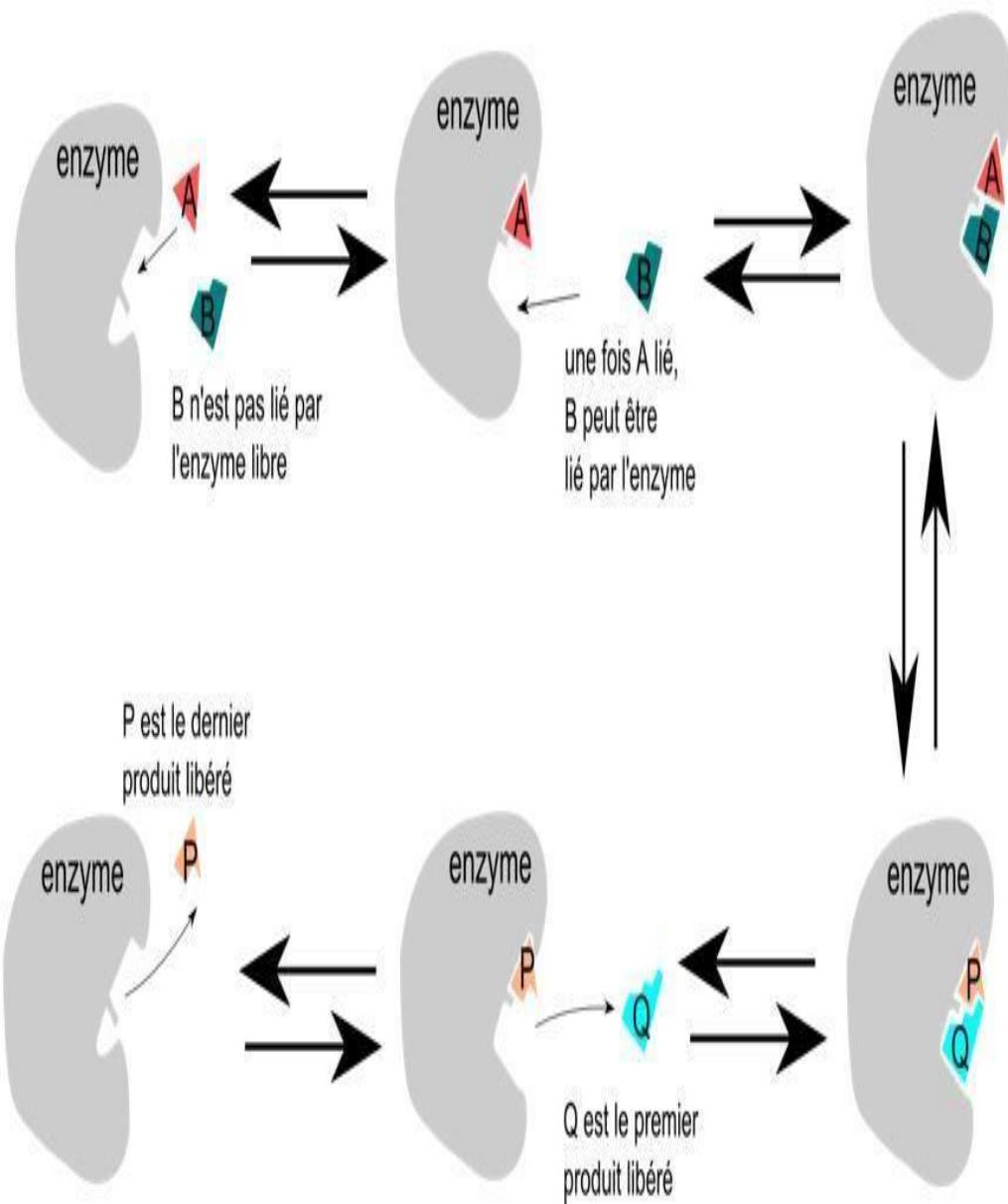
- Dans ce modèle, un substrat **A** se fixe obligatoirement au stade initial sur **E**.
- Le substrat **B** ne se fixe qu'en **deuxième lieu** donnant ainsi la combinaison **ternaire EAB**.
- La suite de la réaction conduit à la libération de
 - 1- 1^{er} Produit **Q(Issu de B)**
 - 2- Ensuite 2nd Produit **P (Issu de A)**



(les k_i sont les coefficient de vitesse des différentes réactions aller et retour)

complexe ternaire

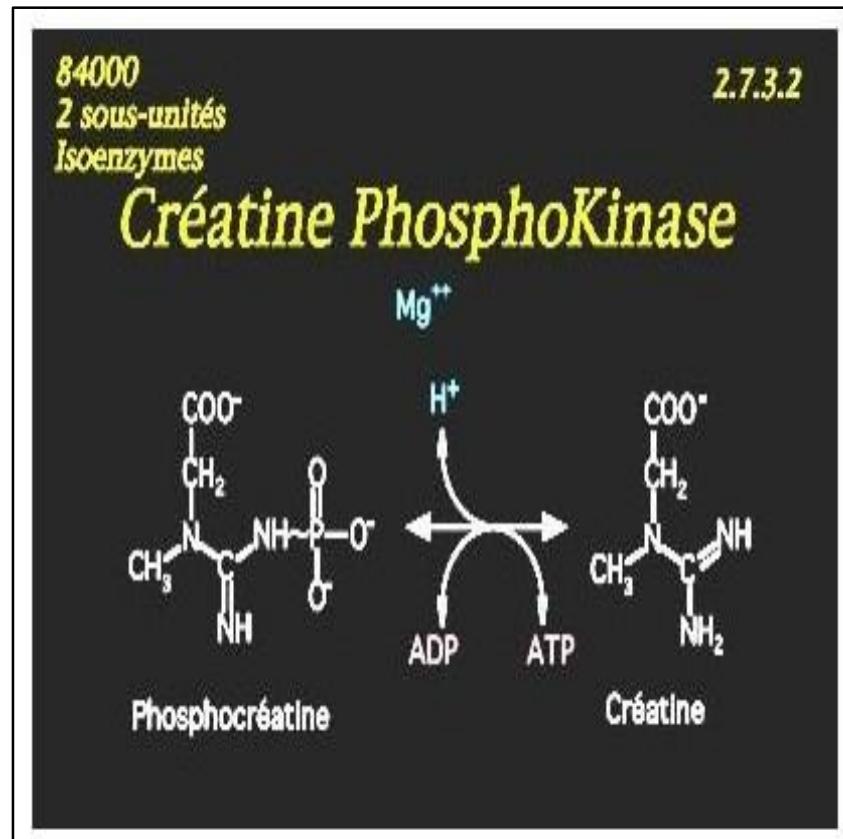
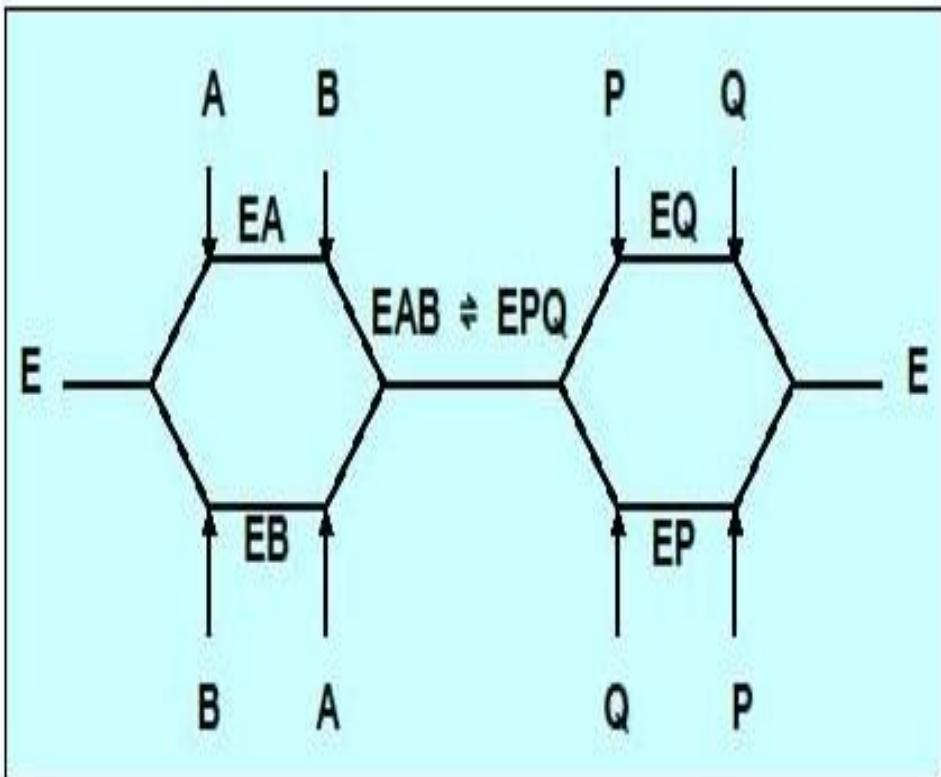
Exemple :



1.2. Bi-Bi aléatoire:

- Aucun ordre n'est observé dans ce type de mécanisme, la fixation des substrats se fera **aléatoirement**, il en est de même pour la libération des produits.

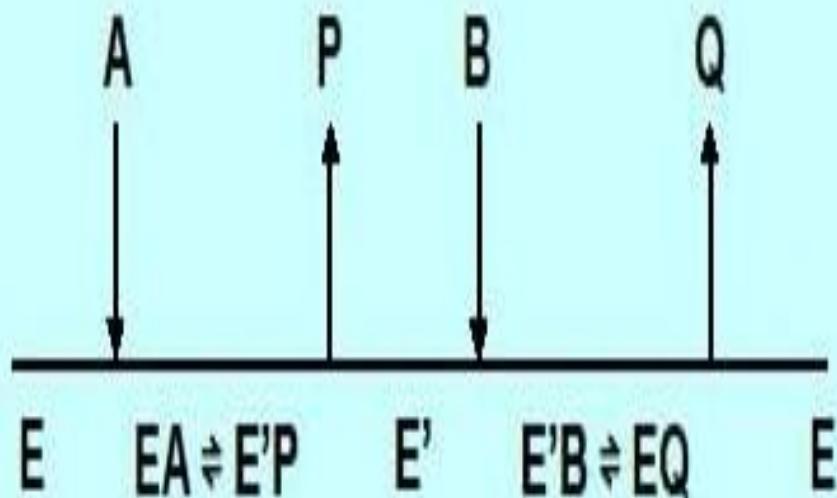
Exemple:



2. Réaction type Ping-pong (à complexe binaire)

- Il s'agit d'un **transfert** entre **A** et **B** où **A** laisse sur l'**E** un **groupement** qui sera renvoyé ultérieurement sur **B**, ou vice versa. (l'enzyme est transitoirement modifiée (**E'**)).
- Les 2 substrats **A** et **B** ne peuvent jamais se trouver en même temps sur l'**E**.

Exemple :



VII. Les facteurs influençant la réaction enzymatique

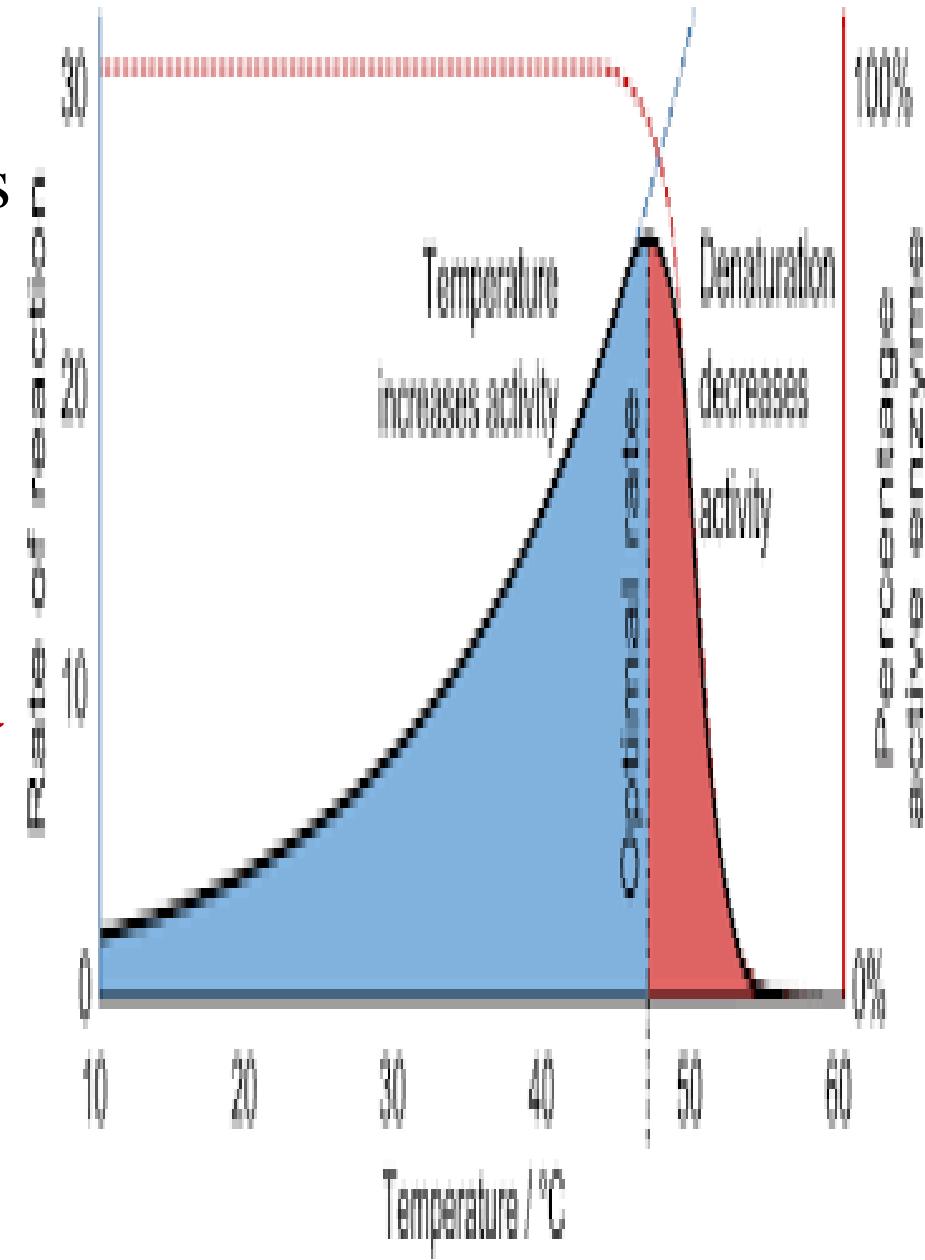
A-Influence des agents physiques:

1-Influence de la température :

2 effets sur la réaction enzymatique:

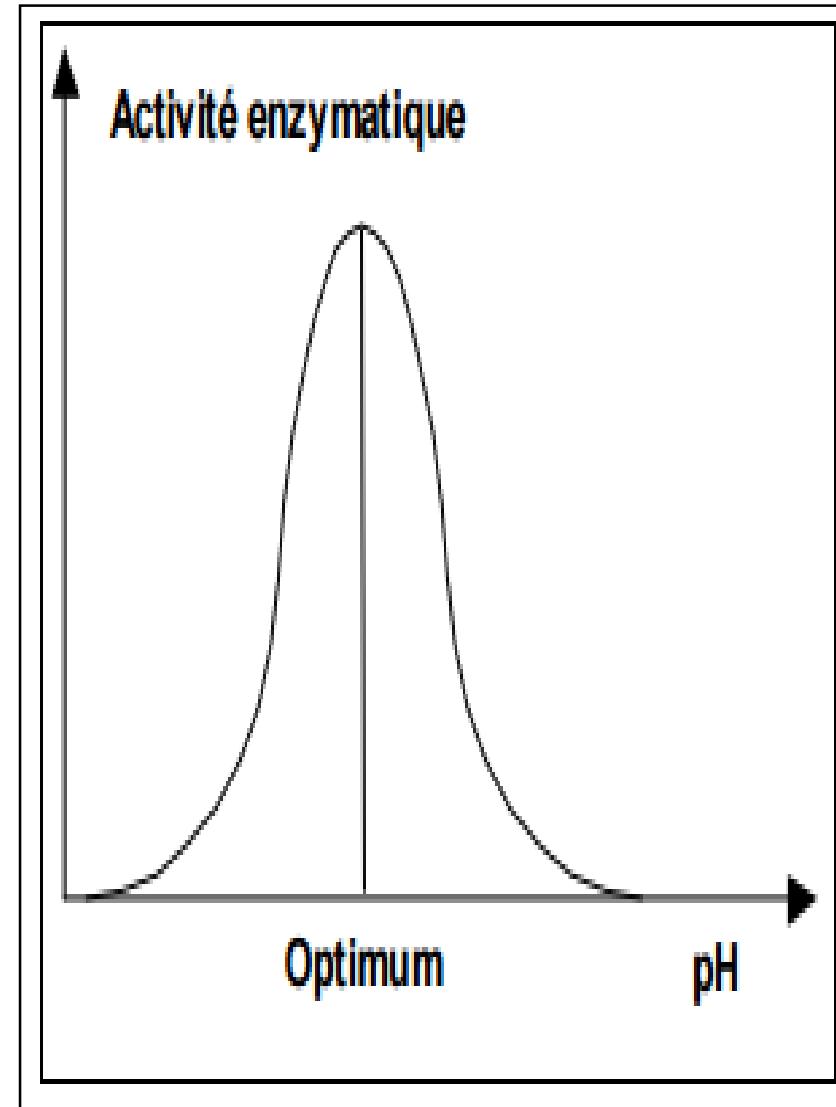
- Elle **accélère la réaction** en fournissant l'**énergie** nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation.
- Une température **élevée fragilise** les liaisons et rend la structure tertiaire instable, avec **dénaturation la protéine**, Il y aura diminution de l'activité catalytique voir même perte de l'activité.

- L'activité enzymatique **augmente** jusqu'à une **température optimale** puis **diminue** pour atteindre une activité nulle à de **grandes températures**.
- A la température **optimale** l'activité enzymatique est **la plus importante**.
- Cette température optimale **varie d'une enzyme à une autre**.



2-Influence du pH:

- Le pH joue sur l'ionisation des molécules => Modification de la conformation de l'enzyme et du substrat.
- Aux valeurs extrêmes : dénaturation de la protéine enzymatique.
- Aux valeurs intermédiaires : modification de la conformation du site actif et celle de substrat.
- Au pH optimum : activité enzymatique est optimale.



3-Force ionique:

La présence d'ions dans le milieu réactionnel joue un rôle important:

- Certaines enzymes nécessitent des **activateurs** (ions métalliques).
- **Solubilité maximale** pour une concentration **faible en sels**.

4-Effet des radiations:

- Les émissions radioactives α , β , γ , rayons X, et les neutrons peuvent directement ou indirectement entraîner **l'inactivation des enzymes**:
 - **Effet Direct:** - Ionisation des molécules.
 - **Effet Indirect:** - Ionisation du milieu réactionnel.
 - Formation de radicaux libres qui attaquent les enzymes.

B-Influence des agents chimiques

Un effecteur:

- Corps chimique, minéral ou organique capable de modifier la cinétique des réactions enzymatiques.
- Il peut être soit activateur ou inhibiteur.

1. Activateurs enzymatiques :

- Tout agent chimique, qui par **sa liaison** avec l'enzyme **accélère la vitesse** de la réaction enzymatique.

1.1. Ions métalliques:

- Se **fixent par coordinance** à des atomes d'oxygène des groupements COOH, et d'azote des groupements NH₂ des enzymes.
- Ils confèrent **une grande stabilité** dans le **site actif** de l'enzyme
- L'ion métallique favorise:
 - Une **bonne conformation** de l'enzyme.
 - La **fixation du substrat**.
 - Participe de manière directe à la **catalyse**.
- Exemple: Kinases activées par Mg +2

1.2. Activation des pro-enzymes inactifs:

- La plupart des enzymes **protéolytiques** sont synthétisés sous forme de précurseurs **inactifs**.
- L'**élimination** d'une **séquence** d'acides aminés par clivage spécifique **le rend actif** (permettant **l'apparition du site actif**).

Trypsinogène  Trypsine + Hexapeptide.

1.3. Activation par fixation covalente d'un groupement chimique:

- L'enzyme peut exister entre deux formes interconvertibles, l'une **active** et l'autre **non-active**.
- ex : **phosphorylation** et **déphosphorylation**.

Phosphorylase b inactive → Phosphorylase a active



Phosphorylation d'un résidu séryl
par une kinase:

Phosphorylase b kinase

2. Les inhibiteurs enzymatiques :

- Tout effecteur, qui par sa liaison avec l'enzyme **ralentit** la vitesse de la réaction enzymatique
- Intérêt:
 - Mécanisme essentiel de **contrôle** des systèmes biologiques .
 - Source d'information sur le **mécanisme d'action** des enzymes .

2.1.Les inhibiteurs irréversibles:

- Se lient de façon **irréversible** avec l'enzyme.
- Agissent brutalement en **dénaturant** l'enzyme.

Exemple: **5Fluoro-uracile** utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse.

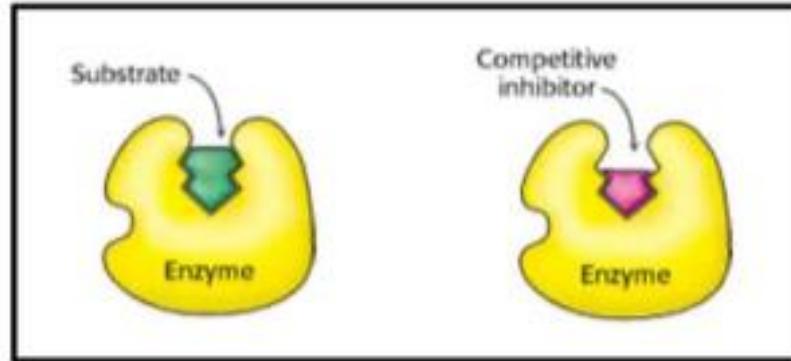
- Inhibe la **thymidilate synthase**; enzyme qui intervient dans la synthèse de **la thymine (ADN)**.
- Arrêt de la multiplication des cellules tumorales.

2.2. Les inhibiteurs réversibles:

- Perturbent la cinétique et peuvent stopper la réaction.
- L'inhibition peut **être levée** dans des conditions réactionnelles particulières.
- Ont un grand intérêt puisqu'ils permettent une étude très fine des mécanismes moléculaire de la catalyse.
- On distingue:
 - ✓ Les inhibiteurs compétitifs.
 - ✓ Les inhibiteurs non compétitifs.
 - ✓ Les inhibiteurs incompétitifs.

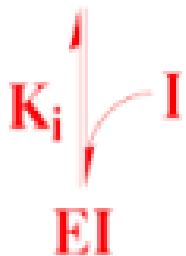
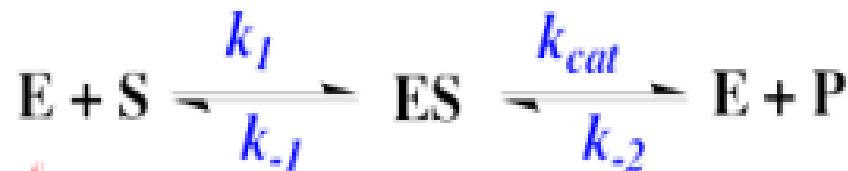
2.2.1. Les inhibiteurs compétitifs:

- Analogie structurale avec le substrat.



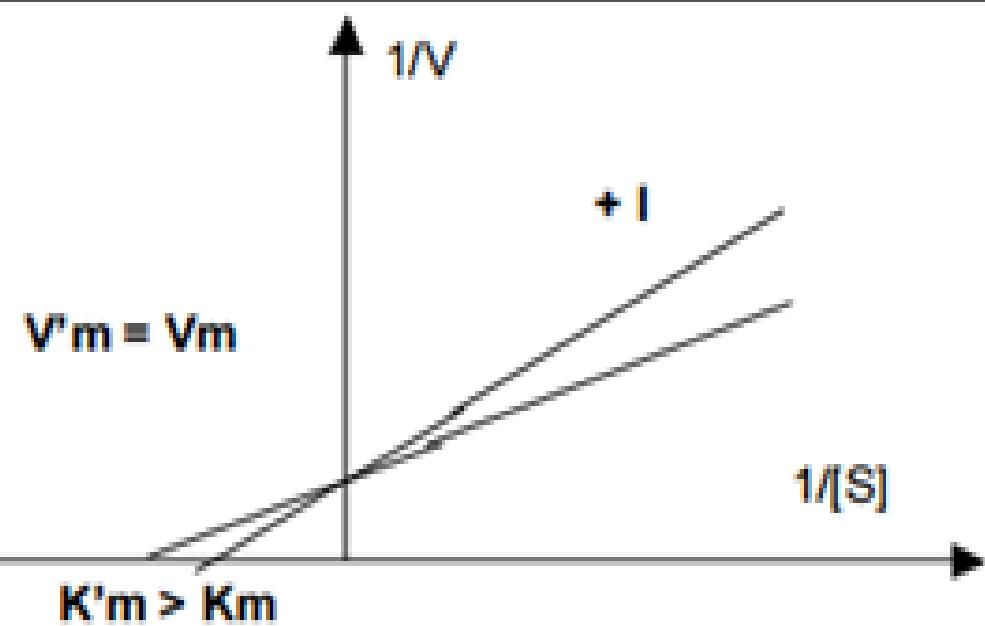
- Compétition avec les molécules de substrat pour se lier au site actif
- Liaison réversible.
- Diminuent la vitesse de catalyse en abaissant la proportion de molécules d'enzyme liées au substrat.
- L'affinité de E pour S diminue => **K_m augmente.**
- La V_{max} est inchangée.**
- L'inhibition est levée par un excès de substrat.

Inhibition compétitive



$$K_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

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

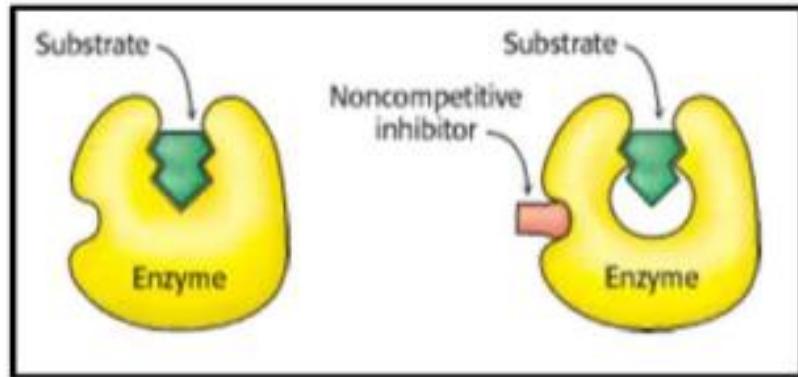


$$\frac{1}{V} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

V_{max} inchangée
 K_m est augmentée

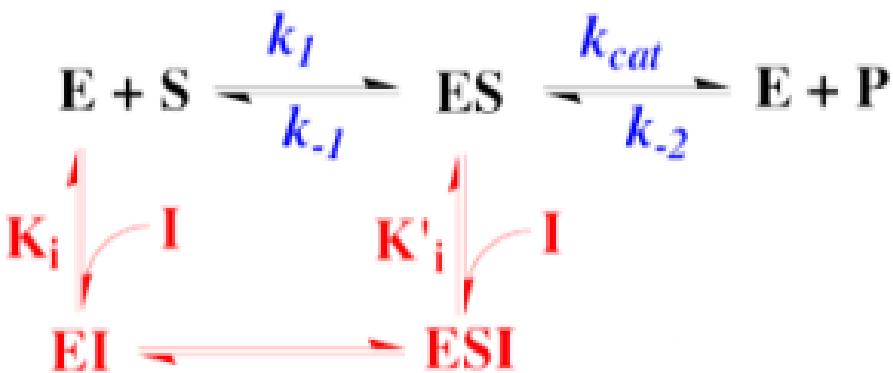
2.2.2.Les inhibiteurs non compétitifs:

- Liaison réversible à un site autre que le site actif.



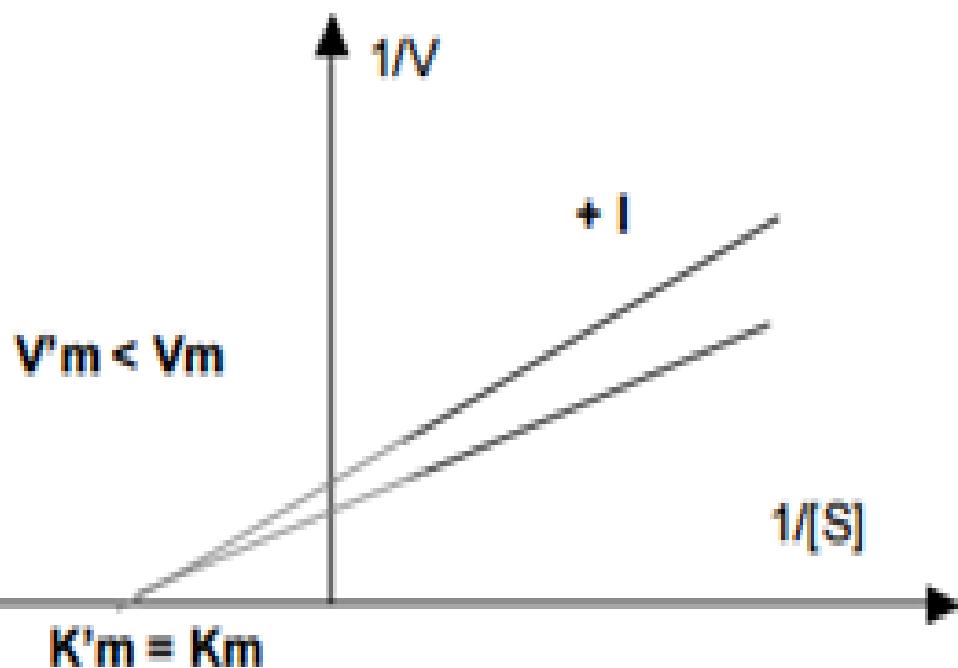
- L'enzyme peut se lier à:
 - l'inhibiteur.
 - au substrat.
 - à l'inhibiteur et au substrat à la fois.
- L'enzyme est inactivée quand l'inhibiteur est lié, en présence ou non du substrat.
- L'inhibiteur diminue la concentration de l'enzyme active.
- L'excès de substrat ne lève pas l'inhibition.
- L'affinité de l'enzyme n'est pas modifiée, **K_m inchangée**.
- **La V_{max} diminuée.**

Inhibition non compétitive



$$V_m = \frac{V_m}{(1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$



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

**V_{max} diminuée
 K_m inchangée**

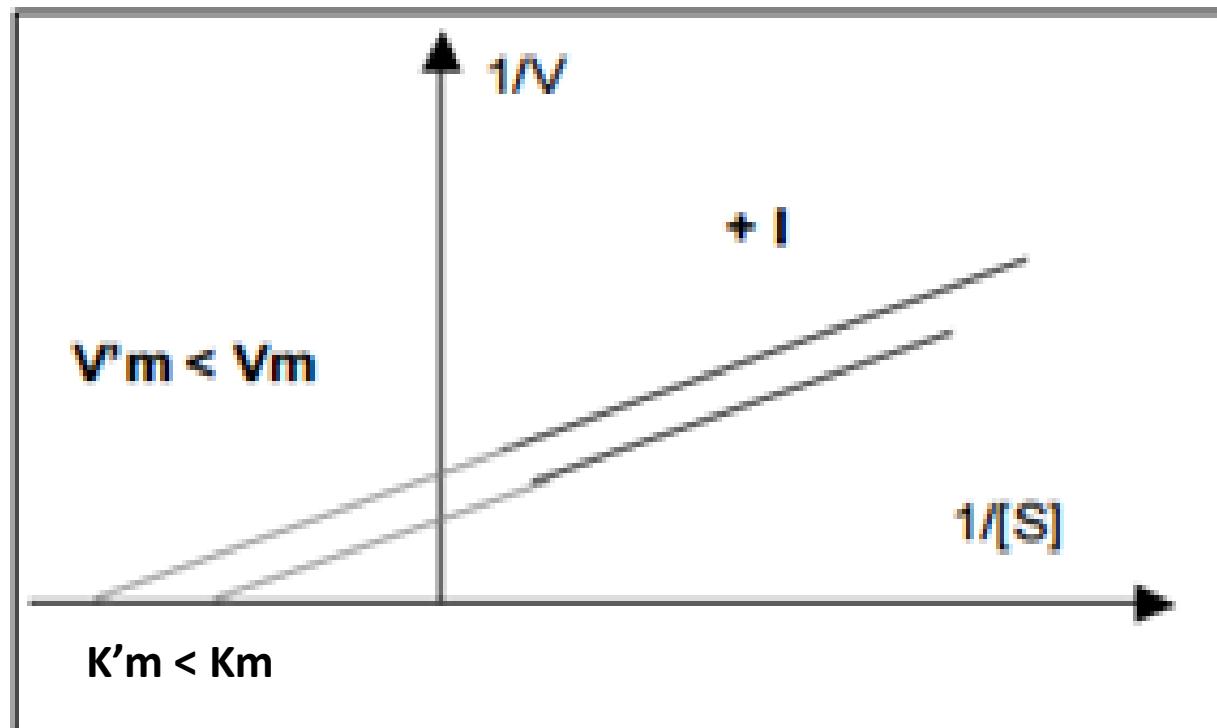
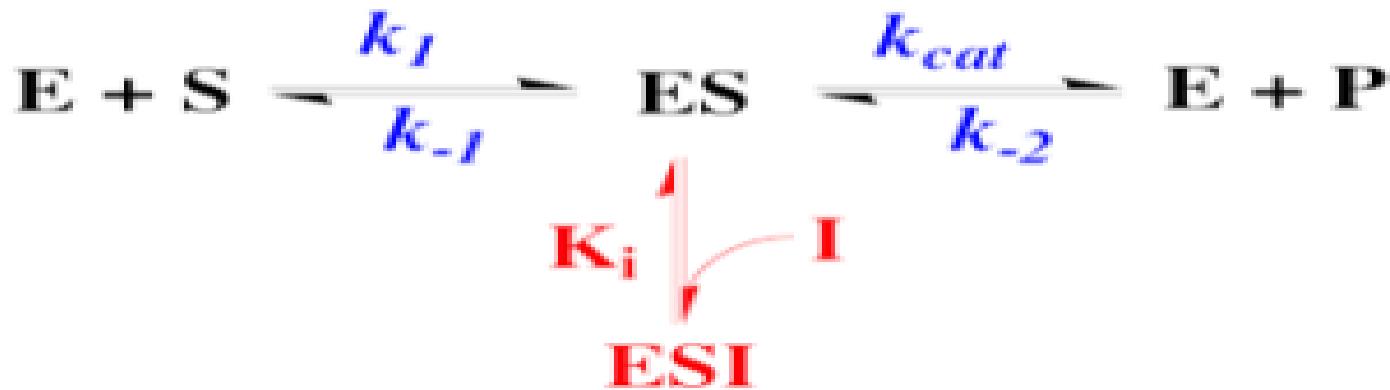
2.2.3. Les inhibiteurs incompétitifs:

- L'inhibiteur ne se fixe pas à E libre mais à ES.
- Modification de Km, et de Vmax.

$$K_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad V_m = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{V_{max}}$$

Inhibition incompétitive



V_{max} modifiée
 K_m modifiée