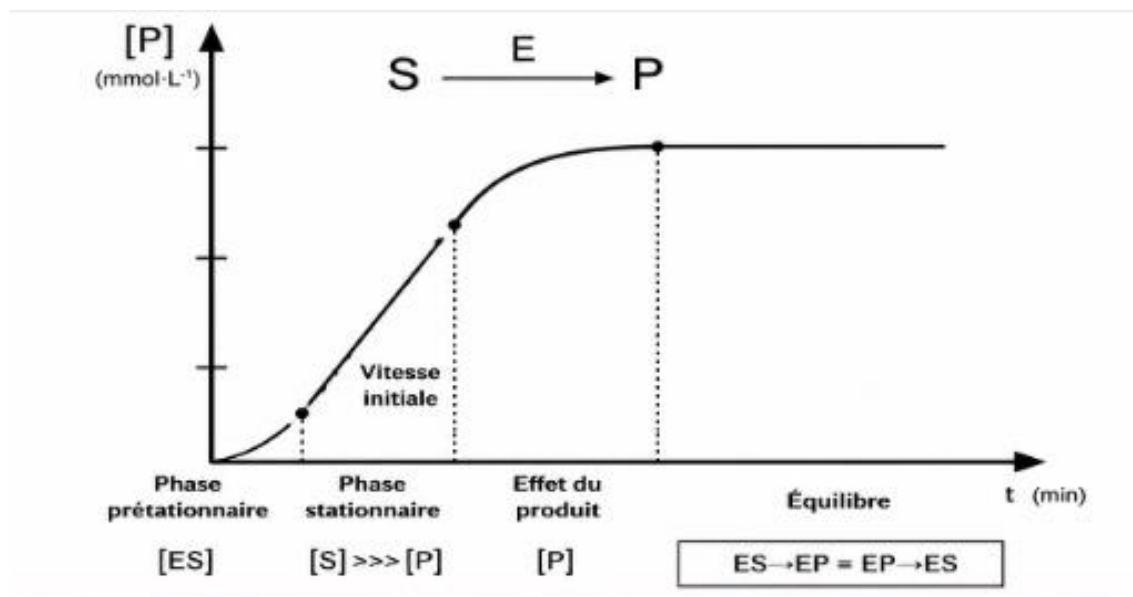


Les enzymes: catalyseurs des réactions biochimiques : Cours et Travaux Dirigés



Dr. Salima SEBAIHI-HARZOUN

AVANT PROPOS

Ce polycopié d'enzymologie est destiné aux étudiants de deuxième année LMD en Sciences Biologiques. Il a pour objectif de présenter de manière claire et structurée les notions fondamentales relatives aux enzymes et à leur rôle dans les réactions biologiques.

L'enzymologie permet de comprendre les mécanismes d'action des enzymes, leur spécificité ainsi que les principes de la cinétique enzymatique, incluant les paramètres V_{max} et K_m . Elle aborde également les inhibiteurs enzymatiques, qui jouent un rôle important dans la régulation de l'activité enzymatique et dans de nombreuses applications, notamment en pharmacologie.

Par ailleurs, ce document met à la disposition des étudiants une série d'exercices d'application visant à renforcer la compréhension des concepts abordés en cours. Ces exercices portent principalement sur l'interprétation des courbes cinétiques, le calcul des paramètres enzymatiques et l'analyse des différents types d'inhibition.

Afin de favoriser un apprentissage autonome et efficace, des corrigés détaillés sont proposés à la fin du polycopié. Ils permettent à l'étudiant de vérifier ses réponses, de comprendre ses erreurs et d'améliorer sa maîtrise des notions essentielles.

Ainsi, ce support constitue un outil pédagogique complet, combinant à la fois des éléments théoriques et pratiques, dans le but d'accompagner l'étudiant dans sa réussite académique.

L'auteure : **Dr.Salima SEBAIHI-HARZOUN**

SOMMAIRE

Liste des figures
Liste des tableaux

1. Introduction	1
2. Historique de l'enzymologie	1
3. Définition des enzymes	3
4. Fonctions biologiques des enzymes	4
5. Structure et conformation des enzymes	5
6. Constitution des enzymes	6
7. Types d'enzymes	6
8. Nomenclature et classification des enzymes	7
8.1. Nom systématique	7
8.2. Classification des enzymes	
9. Notion de spécificité	13
10. Caractères particuliers des enzymes	17
10.1. Les enzymes reconnaissent spécifiquement leurs substrats	17
10.2. Le substrat modifie localement la conformation de l'enzyme	17
10.3. Les enzymes sont des machines-outils miniatures	17
10.4. Les réactions enzymatiques ne forment aucun produit secondaire	18
10.5. Les enzymes possèdent une affinité remarquable pour l'état de Transition	18
11. Unités enzymatiques	19
12. Cinétique enzymatique	19
12.1. Introduction à la cinétique enzymatique	19
12.2. Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat	20
12.2.1. Modèle de Fisher : clé-serrure	20
12.2.2. Modèle de Koshland	21
12.2.3. Modèle de Strain-Jencks	21
13. Mesure des vitesses initiales	22
13.1. Généralités	22
13.2. Notion de vitesse initiale	22
13.2.1. Influence de la concentration d'enzyme	23
13.2.2. Influence de la concentration de substrat	24
14. Caractères communs avec la catalyse chimique	25
14.1. Les catalyseurs ne sont pas modifiés par les réactions	25
14.2. Les catalyseurs augmentent les vitesses	25
14.3. L'enthalpie libre d'activation	25
14.4. La vitesse d'une réaction ne dépend que du rapport $[ES^{\ddagger}]/[S]$	26
15. Équation de Michaelis-Menten	27
15.1. Objectif	27
15.2. Schéma réactionnel	27
15.3. Calcul de la vitesse initiale	28
16. Représentation graphique de l'équation de Michaelis-Menten	29
16.1. Signification de V_{max}	30
16.2. Signification de K_m	31
17. Détermination de K_m et V_{max}	32
17.1. Détermination de V_{max}	32
17.2. Méthodes de détermination graphique	33
17.3. Comparaison des méthodes graphiques	35
18. Récapitulation	37
19. Inhibiteurs	37
19.1. Inhibiteurs réversibles	38
19.1.1. Inhibition compétitive	38
19.1.2. Inhibition non compétitive	42
19.1.3. Inhibition incompétitive	43
19.2. Inhibition irréversible	46
19.3. Inhibiteurs suicide	47
20. Enzymes allostériques	49
20.1. Propriétés d'autorégulation	49

20.2. Caractéristiques générales	51
20.3. Classification des enzymes allostériques	52
20.4. Enzymes et effecteurs allostériques	52
20.5. Action des effecteurs allostériques	52
20.6. Transition allostérique : formes T et R	53
21. Modulation allostérique	55
21.1. Effets de coopérativité	55
22. Importance de la régulation allostérique	56
23. Influence des facteurs physicochimiques	56
23.1. Influence du pH	56
23.2. Influence de la température	57
23.3. Effet de la force ionique	58
23.4. Effet des radiations	58
23.5. Influence des agents chimiques	58
24. Exercices corrigés	59
25. Références bibliographiques	85

Liste des figures

Figure 1 : Exemple d'enzyme, la trypsine (forme tétramère) humaine	4
Figure 2 : Schéma illustratif de la structure des protéines	5
Figure 3 : Quelques exemples de nomenclature systématique des enzymes	8
Figure 4 : Mécanisme de l'action enzymatique	14
Figure 5 : Complexe enzyme-substrat : formation, catalyse et libération du produit	17
Figure 6 : Illustration du modèle clé-serrure : spécificité enzyme-substrat	21
Figure 7 : Illustration de l'interaction enzyme-substrat selon le modèle de Koshland	21
Figure 8 : Schéma de l'évolution temporelle du produit dans une réaction enzymatique	23
Figure 9 : Relation entre la concentration enzymatique, la vitesse initiale et la formation du produit	23
Figure 10 : Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat	24
Figure 11 : Variation de l'enthalpie libre d'activation en présence et en absence d'une enzyme	26
Figure 12 : Vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat : saturation enzymatique et détermination de V_{max} et K_m	31
Figure 13 : Représentation graphique selon Lineweaver et Burk	33
Figure 14 : Représentation graphique selon Hanes et Woolf	34
Figure 15 : Représentation graphique selon Eadie et Hofstee	34
Figure 16 : Représentation graphique selon Robert Eisenthal et Athel Cornish-Bowden	35
Figure 17 : Schéma illustrant le mécanisme d'action d'un inhibiteur compétitif	
Figure 18 : Comparaison des courbes cinétiques avec et sans inhibiteur compétitif	40
Figure 19 : Schéma illustrant le mécanisme d'action d'un inhibiteur non compétitif	41
Figure 20 : Comparaison des courbes cinétiques avec et sans inhibiteur non compétitif	43
Figure 21 : Schéma illustrant le mécanisme d'action d'un inhibiteur incompétitif	44
Figure 22 : Comparaison des courbes cinétiques avec et sans inhibiteur incompétitif	45
Figure 23 : Relation vitesse-substrat ($v = f([S])$) : profils michaelien et allostérique	50
Figure 24 : Représentation schématique d'une enzyme allostérique	51
Figure 25 : Mécanisme d'action des effecteurs allostériques	53
Figure 26 : Conformations T et R d'une enzyme allostérique	54

Figure 27 : Modulation allostérique de l'enzyme ATCase	56
Figure 28 : Influence du pH sur l'activité enzymatique	57
Figure 29 : Effet de la température sur l'activité enzymatique	58

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des enzymes selon la réaction catalysée	13
Tableau II : Exemples de cofacteurs et des enzymes associées	16
Tableau III : Détermination et interprétation des paramètres cinétiques V_{max} et K_m selon le modèle de Michaelis-Menten	37
Tableau IV : Effets des différents types d'inhibition enzymatique sur les paramètres cinétiques apparents (K_m et V_{max})	46

1. Introduction

L'enzymologie est un domaine d'étude qui traite d'un groupe spécifique de protéines appelées « Enzymes ». Ces protéines accélèrent des réactions chimiques spécifiques dans un système biologique et ces réactions sont essentielles à la croissance, au développement, à l'adaptation et à la survie de l'organisme. L'absence, l'accumulation ou le dysfonctionnement d'une enzyme a des effets drastiques sur l'organisme vivant, dont certains se traduisent par des troubles métaboliques. Elles sont indispensables à la compréhension des processus cellulaires et extracellulaires rendant la vie possible.

2. Historique de l'enzymologie

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques très diverses. Ces réactions s'effectuent dans des conditions où, normalement, elles ne pourraient se faire. Si elles ont lieu, c'est parce qu'elles sont catalysées par des macromolécules biologiques : les enzymes. Le pouvoir de catalyse des enzymes est lié, entre autre, à la très haute spécificité de reconnaissance des molécules sur lesquelles elles agissent. L'enzymologie est la partie de la biochimie qui étudie les propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes (la relation structure - fonction). En particulier, elle s'applique à décrire la vitesse des réactions catalysées par les enzymes.

1783 : Spallanzani a rapporté que la viande est liquéfiée par un extrait gastrique. Il a noté également que la température a un grand effet.

1814 : M. Kirchhoff observa qu'un composant "glutineux" (comme il l'a appelé à l'époque) de blé convertit l'amidon en sucre.

1833 : La première découverte d'une enzyme est d'habitude attribuée à Payen et Persoz qui ont traité un extrait aqueux de malt à l'éthanol puis précipité une substance labile à la chaleur qui hydrolyse l'amidon.

Ils ont appelé cette fraction "diastase" ("séparation" en Grec) puisque cette fraction sépare le sucre soluble de l'amidon insoluble. On sait maintenant que cette préparation était une solution non purifiée d'amylase.

1834 : Schwann a obtenu le premier un agent actif d'origine animale (la pepsine) qu'il a partiellement purifiée en traitant la paroi stomacale par l'acide.

1838 : Cagniard de Latour montra que le processus de fermentation est dû à des organismes vivants.

1858 à 1871 : Les travaux de Louis Pasteur confirmèrent cette idée. Pasteur émit l'hypothèse révolutionnaire que les changements chimiques lors de la fermentation résultaient des processus de la vie des micro-organismes impliqués dans la fermentation. A l'opposé, von Liebig privilégiait une théorie purement chimique : un "ferment" était une substance chimique produite par un organisme en décomposition.

1860 : Berthelot fit macérer de la levure et obtint une fraction précipitable à l'alcool capable de convertir le sucrose en glucose plus fructose. Il conclut que l'invertase (nom qu'il donna à l'agent actif de cet extrait) était l'un des multiples ferments présents dans la levure.

1878 : Kühne proposa le nom d'enzyme ("En-" et "zumê", signifiant "dans le levain") pour qualifier ces ferments. L'addition du suffixe "ase" au nom du substrat d'une enzyme pour dénommer cette enzyme fût proposé par Duclaux en 1898.

1897 : Un chimiste allemand, Hahn, tentait d'isoler des protéines de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) en broyant ces levures dans un mortier avec du sable fin et de terre de diatomées. Cependant, cette préparation d'extrait de levure se conservait mal. Hans et Eduard Buchner s'intéressaient aussi aux extraits de levure dans un but thérapeutique. Ces extraits étant destinés à l'homme ne pouvaient contenir des bactéricides.

Se souvenant que le sucre permet de conserver les fruits, Hans Buchner, proposa d'ajouter du saccharose à l'extrait de levure pour le conserver. Eduard Buchner observa que l'adjonction de sucre entraînait la formation de bulles dans le mélange.

Il conclut à la fermentation, processus décrit par Louis Pasteur comme "la vie à l'abris de l'air". En publiant ses observations, Eduard Buchner concluait : "La complexité de la levure n'est pas indispensable au déroulement de ce processus. Le ferment actif du jus n'est probablement qu'une substance dissoute, sans aucun doute une protéine : nous la baptiserons zymase". Pour cette découverte, Eduard Buchner reçut le Prix Nobel en 1907. On sait maintenant que la "zymase" des extraits de levure est en fait un mélange d'enzymes dont l'ensemble catalyse les réactions de la glycolyse.

1897 : La même année, Bertrand observa que certaines enzymes requièrent des facteurs dialysables pour leur activité. Il les nomma coenzymes. Au début du 20^e siècle, de gros travaux furent entrepris pour purifier des enzymes et surtout décrire leur activité catalytique en termes mathématiques.

1902 : V. Henri et Adrian Brown suggérèrent indépendamment que la formation d'un complexe enzyme - substrat est un intermédiaire obligatoire de la réaction enzymatique. Les enzymes (appelés anciennement ferments ou diastases), sont des composés biologiques de nature protéique, doués d'activité catalytique et produits par une cellule vivante. Il s'agit donc d'un catalyseur, c'est-à-dire un accélérateur de réaction biochimique. C'est pourquoi afin de faciliter la compréhension du mécanisme de fonctionnement de l'enzyme et des lois qui le régissent, il est nécessaire d'étudier au préalable quelques données simples concernant la Réaction chimique en général et les paramètres dont elle dépend.

3. Définition des enzymes

Une enzyme est un catalyseur biologique (biocatalyseur) de nature protéique capable d'accélérer (catalyser) la vitesse d'une réaction chimique dans des conditions spécifiques.

Il agit sur le substrat de la réaction et le transforme en produit sans être consommé lors de la réaction. Protéine présentant des propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique du métabolisme de l'être vivant qui la produit.

Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes corps chimiques initiaux. · Les protéines enzymatiques sont synthétisées par des êtres vivants. Cette synthèse est déterminée génétiquement : sa conservation dans le génome est favorisée par le besoin qu'éprouve cet être vivant de faire cette réaction.

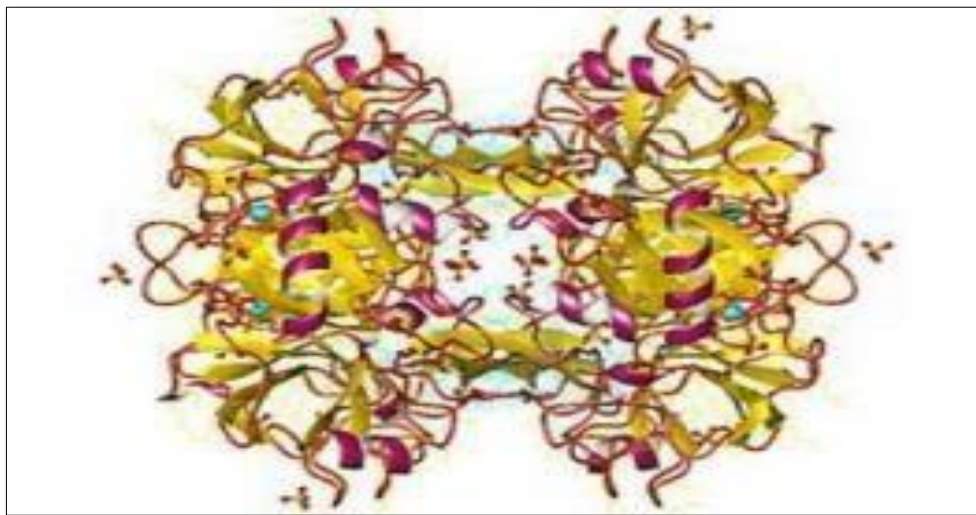


Figure 1 : Exemple d'enzyme, la trypsine (forme tétramère) de l'humain.

4. Fonctions biologiques des enzymes

Les enzymes sont présentes dans les êtres vivants et les virus, et contribuent à des fonctions importantes à divers niveaux : Parmi les fonctions biologiques expliquées grâce aux enzymes :

- la digestion
- la neurotransmission

- la contraction musculaire
- le métabolisme énergétique
- les fonctions hormonales

5. Structure et conformation des enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires. Ils se présentent sous :

- une structure primaire (succession des acides aminés)
- une structure secondaire (hélice α ou feuillet plissé β)
- une conformation tertiaire qui est un repliement de la molécule sur elle même
- une structure quaternaire qui est un degré d'organisation supérieur. Il correspond à l'association de plusieurs chaînes peptidiques qu'on appelle sous unités ou protomères.

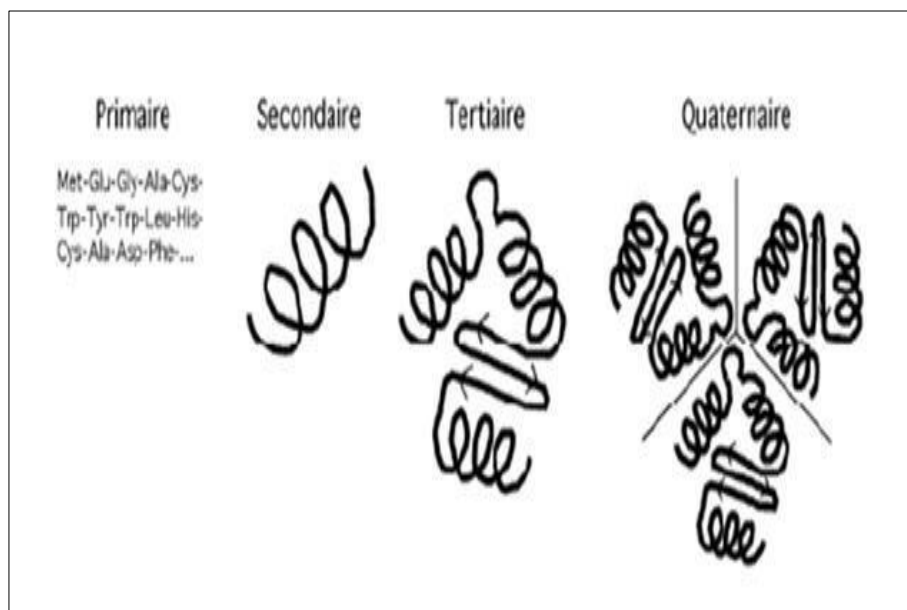


Figure 2 : Schéma illustratif de la structure des protéines

6. Constitution des enzymes

- **Site actif**

C'est une zone privilégiée de l'enzyme, située dans la zone hydrophobe de la protéine.

On y distingue :

- ✓ le site de fixation : ce site est constitué d'une séquence d'acides aminés.
- ✓ le site catalytique : c'est la partie de la protéine qui est responsable de la transformation du substrat en produit. Il comprend 3 types d'acides aminés :
 - 1- Acides aminés contributeurs : Permettent à la protéine enzymatique d'adopter une conformation spatiale pour que le ligand puisse s'adapter à la protéine
 - 2- Acides aminés auxiliaires : Assurent la mobilité des zones situées au voisinage du centre actif
 - 3- Acides aminés de contact : Lieu de la réaction enzymatiqueFait intervenir des groupements particuliers de ces acides aminés de contact, qui interagissent avec un ou plusieurs groupements particuliers du substrat.

Les réactions qui se déroulent dans une cellule sont toutes catalysées par des enzymes.

Certaines réactions, et non des moindres, sont catalysées par des ARN, les ribozymes, mais l'immense majorité des enzymes sont constituées de protéines.

- **Masse moléculaire des enzymes**

Ces protéines ont des masses moléculaires comprises entre 10 000 Da (ribonucléase A, une seule chaîne polypeptidique : 13 700 Da) et plusieurs millions de Da ; il s'agit alors de complexes multienzymatiques comme par exemple le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDC) qui est constitué de 260 chaînes polypeptidiques pour une masse moléculaire totale de 9 500 kDa.

- **Cofacteurs / coenzymes /groupements prosthétiques**

Très souvent les enzymes sont constituées d'une protéine associée à une espèce chimique de petite taille et de nature différente, un cofacteur. La différence essentielle entre la protéine et le cofacteur réside dans leur stabilité thermique : le cofacteur est thermostable, alors que la protéine est thermolabile. Les cofacteurs sont très variés. Il peut s'agir d'ions métalliques, ou de coenzymes, molécules organiques le plus souvent dérivées de vitamines.

Lorsque le cofacteur est fortement lié à la protéine (par exemple par covalence) on le qualifie de groupement prosthétique. C'est par exemple le cas des noyaux fer-tétrapyrroles, parties intégrantes des cytochromes. A l'opposé, les coenzymes nicotiniques, NAD^+ et NADP^+ passent alternativement de l'état oxydé à l'état réduit en faisant la navette d'une enzyme à l'autre. Pour cette raison, on les qualifie de coenzymes mobiles.

7. Type des enzymes

- **Enzymes holoprotéiques** : $\left\{ \begin{array}{l} \text{Site de fixation} = \text{AA} \\ \text{Site catalytique} = \text{AA} \end{array} \right.$
- **Enzymes hétéroprotéiques** : $\left\{ \begin{array}{l} \text{Site de fixation} = \text{AA (apoenzyme)} \\ \text{Site catalytique} = \text{Cofacteur qui peut être} \end{array} \right.$
 - inorganique comme les ions (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+})
 - organique appelé coenzyme

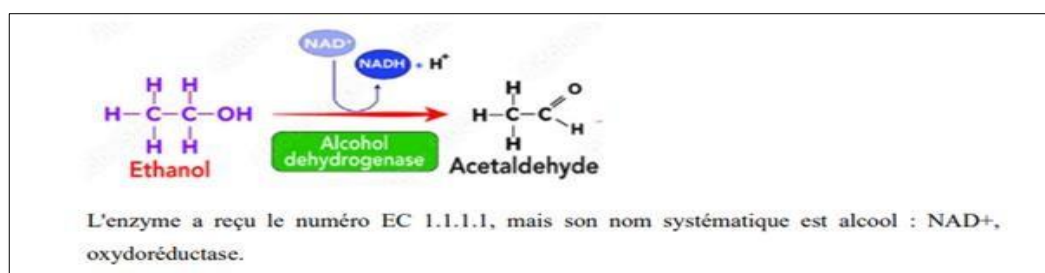
8. Nomenclature et classification des enzymes

8.1. Nom systematique

La nomenclature développée par l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire comporte ce qu'on appelle des numéros EC où chaque enzyme est précédée de EC. Le premier numéro de cette série classe cette enzyme en fonction de son mécanisme.

Le numéro EC est composé de l'abréviation EC et de quatre chiffres séparés par des points (EC. A.B.C. D). Le 1^{er} chiffre : indique les classes des enzymes, (le type de réaction catalysée) il existe six classes. Le second chiffre : la sous classe, la nature du groupement chimique donne le groupement, le type de fonction du substrat métabolisé. Le troisième chiffre : la sous-sous-classe, indique la nature chimique du l'accepteur. Le quatrième chiffre : numéro d'ordre de l'enzyme, en relation avec le substrat de l'enzyme. C'est le numéro de série enzymatique.

Exemple 1 : L'enzyme alcool déshydrogénase (nom recommandé) catalyse la réaction



Exemple 2 : l'enzyme hexokinase (nom recommandé), qui catalyse la réaction suivante a reçu le numéro C.E. 2.7.1.1. Il porte d'autres noms tels que glucokinase, et son nom systématique est ATP : D-hexose 6-phosphotransférase.

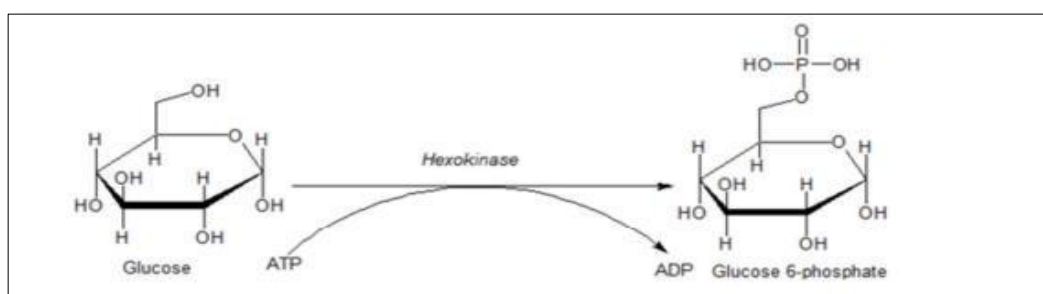


Figure 3 : Quelques exemples de nomenclature systématique des enzymes

8.2. Classification des enzymes classe 1 :

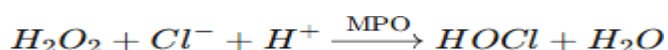
Oxydo-réductases

Ces réactions correspondent à l'oxydation ou à la réduction d'un substrat, utilisant soit un coenzyme, soit un second substrat tel que l'oxygène. Par exemple, le code E.C.1.1.1.1 désigne l'alcool déshydrogénase, qui catalyse la réaction suivante :



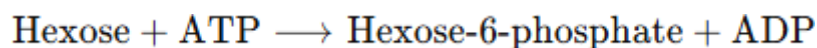
Cette réaction implique l'oxydation d'un groupe alcool primaire ou secondaire (sous-classe 1), avec le NAD^+ servant d'accepteur d'électrons (sous-sous-classe 1).

- **La myéloperoxydase (MPO)** est une enzyme hémique appartenant à la famille des oxydoréductases (EC 1.11.2.2), principalement localisée dans les granules azurophiles des neutrophiles et des monocytes. Elle joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée en participant au mécanisme de défense antimicrobien des phagocytes. En présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'ions chlorure (Cl^-), la MPO catalyse la formation d'acide hypochloreux ($HOCl$), un puissant agent oxydant capable de détruire bactéries, virus et champignons. Ainsi, cette enzyme contribue de manière importante au pouvoir microbicide des cellules immunitaires lors du processus de phagocytose. Réaction catalysée par la MPO en présence de Cl^-



Classe 2 : transférases

L'**hexokinase** est classée sous le code **E.C. 2.7.1.1**. Cette enzyme catalyse le transfert d'un **groupe phosphate** (sub-classe 7 : transférases) sur une **fonction alcool** (sub-sous-classe 1 : phosphate sur un alcool), et cette réaction est considérée comme la première dans la liste des réactions de phosphorylation des hexoses.

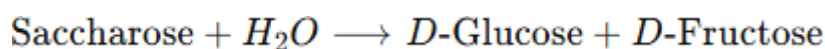


De manière générale, les hexokinases peuvent phosphoryler la plupart des hexoses, sans distinction particulière. Cependant, certaines hexokinases présentent une spécificité élevée pour un sucre donné. Par exemple, la glucokinase, qui agit spécifiquement sur le glucose, possède un code distinct : **E.C. 2.7.1.2**.

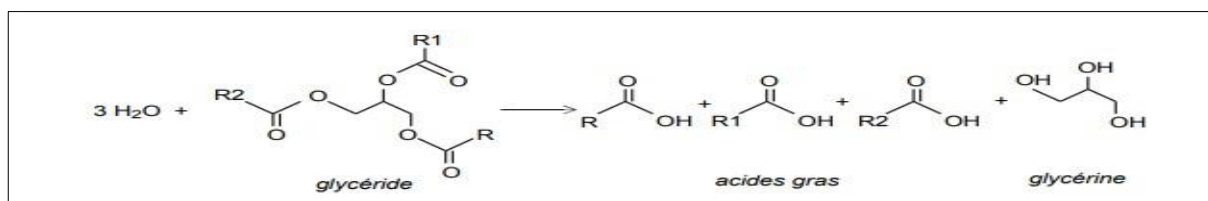
Classe 3 : hydrolases

Comme leur nom l'indique, il s'agit d'enzymes catalysant des réactions d'hydrolyse, qui consistent dans la rupture d'une liaison covalente à l'aide d'une molécule d'eau.

La β -fructosidase, également connue sous le nom d'invertase, est classée sous le code E.C. 3.2.1.26 (note : le code exact pour l'invertase est généralement 3.2.1.26, pas 3.2.1.1). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du saccharose en ses monosaccharides constitutifs :



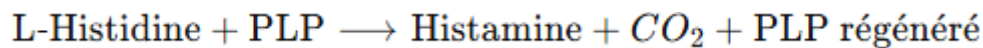
Cette enzyme est une glycosidase (sous-classe 2) qui agit sur une liaison O-glycosidique (sous-sous classe 1), et c'est la première de cette liste.



Classe 4 : lyases

Les lyases sont des enzymes qui catalysent la coupure d'une liaison entre deux atomes sans l'intervention d'une molécule d'eau (contrairement aux hydrolases) ou d'un oxydant (contrairement à certaines oxydases). Les décarboxylases font partie de cette classe d'enzymes, par exemple l'histidine décarboxylase est classée sous le code E.C. 4.1.1.22.

Cette enzyme catalyse la décarboxylation de l'histidine, produisant de l'histamine et du dioxyde de carbone (CO₂)



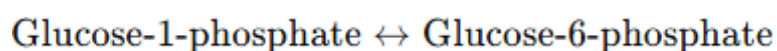
Cette réaction, irréversible, fait intervenir le pyridoxal phosphate comme cofacteur. Certaines lyases catalysent des réactions dont l'équilibre est en faveur du substrat ; elles peuvent donc catalyser la formation de liaisons covalentes, et on leur donne parfois le nom de synthases.

Il faut éviter de confondre ces lyases avec les ligases (classe 6) dont l'action catalytique fait toujours intervenir une molécule de nucléoside triphosphate (ATP ou autre).

Classe 5 : isomérases

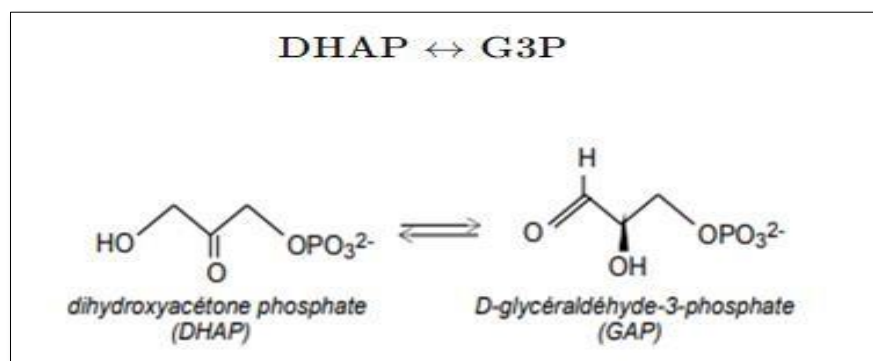
Les isomérases modifient l'arrangement des atomes dans une même molécule. Le substrat et le produit auront la même formule brute, mais se distingueront l'un de l'autre par leur formule développée. Par exemple :

- **La phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2)** est une enzyme qui catalyse l'interconversion réversible entre le glucose-1-phosphate (G1P) et le glucose-6-phosphate (G6P) :



Cette réaction joue un rôle central dans le métabolisme du glucose, permettant à la cellule d'utiliser le glucose provenant du glycogène pour la glycolyse ou la voie des pentoses phosphates.

- **La triose phosphate isomerase (EC 5.3.1.1) ou TPI** ; est une enzyme de la glycolyse qui catalyse l'interconversion réversible entre le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) :



Cette réaction est essentielle car seule la G3P peut continuer dans la voie glycolytique, optimisant ainsi la production d'énergie à partir du glucose.

Classe 6 : ligases

Les ligases catalysent la réunion de deux molécules par une liaison covalente en utilisant l'énergie d'une molécule d'ATP ou une molécule apparentée (nucléoside triphosphate).

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



Cette réaction est essentielle pour la néoglucogenèse et pour maintenir les niveaux d'oxaloacétate dans le cycle de Krebs.

Il existe 3 caractéristiques importantes dans le processus de nomenclature des enzymes, à savoir :

- Le suffixe -ase reconnaît une substance comme celle d'une enzyme. **Le suffixe -ine** est observé au nom des premières enzymes apprises comme la pepsine, la chymotrypsine, la trypsine.
- Le préfixe est identifié par le type de réaction catalysée par l'enzyme.

Enzyme hydrolase : catalyse une réaction d'hydrolyse. Enzyme oxydase : catalyse une réaction d'oxydation.

- Autre type de réaction, l'identité du substrat est prise en compte.

Glucose oxydase : catalyse de l'oxydation du glucose.

Lactate déshydrogénase : catalyse d'élimination de l'hydrogène de l'ion lactate.

Lactase : l'hydrolyse du lactose est catalysée.

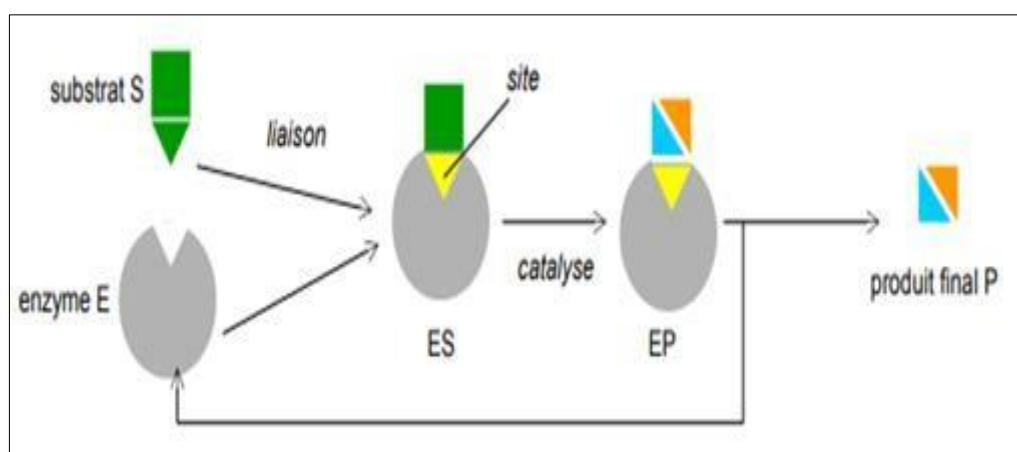
Uréease : l'hydrolyse de l'urée est catalysée

Tableau I : Classification des enzymes selon la réaction catalysée.

Classification	Type de réaction catalysée
1. Oxydo-réductases	Oxydo-réduction
2. Transférases	Transferts de groupements fonctionels
3. Hydrolases	Hydrolyse
4. Lyases	Elimination de groupements et formation de double liaisons
5. Isomérases	Isomérisation
6. Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

9. Notion de spécificité

- **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.
- **Produit** : Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme. · La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation est appelée produit.
- **Ligand** : Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une enzyme · Toutes les molécules ayant une liaison spécifique avec une protéine sont appelées ligands. · Pour chaque ligand, il existe au moins un site de fixation sur la protéine qui le reçoit



L'enzyme E se lie avec le produit initial, substrat S, pour former un complexe enzyme-substrat (ES). Par la réaction de catalyse, ES donne un complexe enzyme-produit (EP), qui se dissocie ensuite en l'enzyme E et le produit final P ; l'enzyme E est alors disponible pour une autre réaction enzymatique (processus cyclique). L'énergie d'activation correspondant à l'ensemble de ces réactions intermédiaires est beaucoup inférieure à celle requise pour la réaction $S \rightarrow P$ sans catalyse.

Figure 4 : Mécanisme de l'action enzymatique

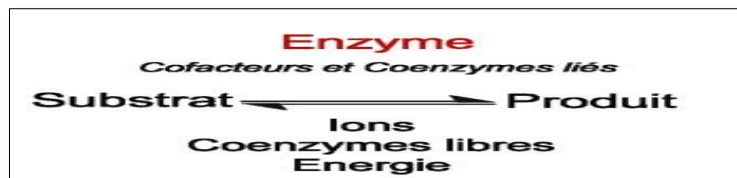
Certaines réactions enzymatiques se produisent simplement entre un substrat et l'enzyme, aboutissant à un produit.

- **Cofacteur**

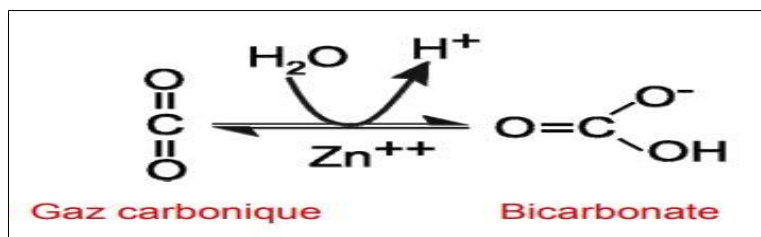
Les cofacteurs sont des atomes ou des molécules qui interviennent dans la réaction enzymatique, mais ne sont pas transformés définitivement à la fin de cette réaction.

Ils interviennent: - transport du substrat - réception du produit - participation à la structure de l'enzyme.

- La protéine enzymatique reconnaît spécifiquement les cofacteurs dont elle a besoin.



Exemple : L'anhydrase carbonique (une chaîne de 264 acides aminés; 29000 daltons), catalyse la réaction d'addition d'une molécule d'eau sur une molécule de gaz carbonique pour donner l'acide carbonique qui se dissocie au pH physiologique en un ion bicarbonate et un proton. Cette réaction est réversible et aboutit à un état d'équilibre. La présence d'un atome de Zinc est nécessaire à son activité= cofacteur



Certains cofacteurs sont des molécules plus complexes synthétisées par les cellules : nous les appellerons coenzymes.

- **Coenzymes**

Les coenzymes sont des molécules biologiques c'est à dire que leur synthèse naturelle ne peut être faite que par des cellules vivantes. Lorsque cette synthèse n'est pas inscrite dans le patrimoine génétique d'une espèce, alors tout ou partie de la molécule du coenzyme doit être apporté à cette espèce par son alimentation : cet aliment indispensable s'appelle **une vitamine**. Les coenzymes sont des cofacteurs donc des molécules indispensables à la catalyse enzymatique.

Tableau.II: Exemples de cofacteurs et des enzymes associées

Type de cofacteur	Cofacteur	Enzyme associée
Coenzymes	Thiamine pyrophosphate (TPP) Flavine adénine dinucléotide (FAD) Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD ⁺) Pyridoxal phosphate (PLP) Coenzyme A (CoA) Biotine 5'-Désoxyadénosylcobalamine Tétrahydrofolate (THF)	Pyruvate déshydrogénase Monoamine oxydase Lactate déshydrogénase Glycogène phosphorylase Acétyl-CoA carboxylase Pyruvate carboxylase Méthylmalonyl-CoA mutase Thymidylate synthase
Métaux	Zn ²⁺ Zn ²⁺ Mg ²⁺ Mg ²⁺ Ni ²⁺ Mo Se Mn K ⁺	Anhydrase carbonique Carboxypeptidase EcoRV Hexokinase Uréase Nitrate réductase Glutathion peroxydase Superoxyde dismutase Propionyl-CoA carboxylase

- ✓ Lorsque les coenzymes sont liés à l'enzyme par des liaisons de type électrostatique ou plus faiblement encore, cette liaison est renouvelée à chaque réaction effectuée : en effet, l'énergie mise en jeu par la liaison enzyme - coenzyme est du même ordre de grandeur que l'énergie mise en jeu dans la liaison enzyme-substrat ; dans ce cas, la concentration des coenzymes doit être du même ordre de grandeur que celle du substrat (on dit stœchiométrique). Ces coenzymes sont appelés coenzymes libres parce qu'ils se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée.
- ✓ Lorsque au contraire les coenzymes sont liés aux enzymes par des liaisons fortes de type covalent, leur concentration est nécessairement la même que celle de l'enzyme, c'est à dire très petite (on dit catalytique). Ces coenzymes sont appelés coenzymes liés parce qu'ils ne se dissocient pas de l'enzyme.

10. Caractères particuliers des enzymes

Une enzyme particulière fixe spécifiquement un substrat particulier. L'enzyme possède un site spécifique - le site de fixation du substrat - dont la structure est complémentaire du substrat. L'enzyme (*E*) et le substrat (*S*, en couleur dans la figure ci-dessous) forment le complexe enzyme-substrat (*ES*) stabilisé par des liaisons faibles.

10.1. Le substrat modifie localement la conformation de l'enzyme.

Au cours de sa fixation, le substrat induit localement des changements de conformation de l'enzyme ; ces modifications renforcent la stabilité du complexe *ES* et orientent les groupements réactifs de l'enzyme vers la liaison covalente cible de la molécule de substrat. On qualifie ce concept d'ajustement induit.

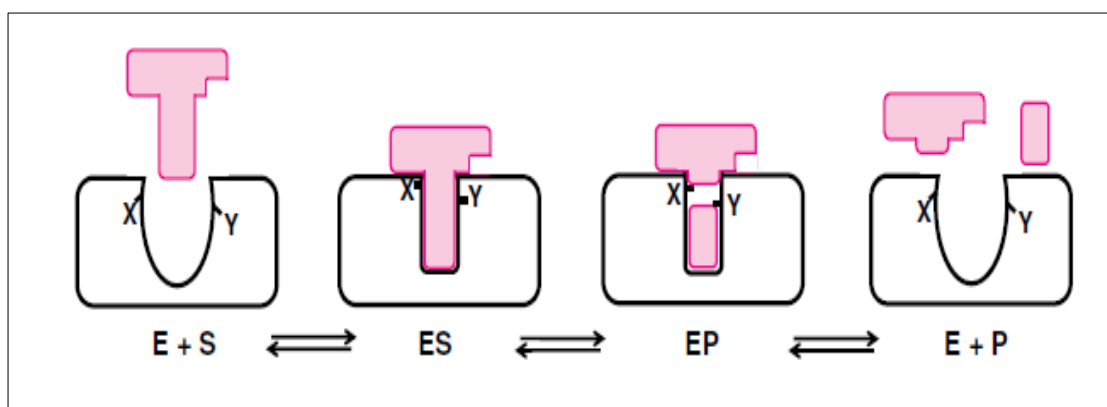


Figure 5 : Complexe enzyme-substrat : formation, catalyse et libération du produit

10.2. Les enzymes sont des machines-outils miniatures

Au cours de la réaction, le complexe enzyme-substrat (*ES*) se transforme en complexe enzyme-produit (*EP*).

C'est un réarrangement interne, une réaction « intramoléculaire » puisque le substrat ne quitte pas l'enzyme et subit l'action concertée des groupements catalytiques ici, les groupes X et Y. L'enzyme fonctionne à la manière d'une machine-outil dont les outils d'usinage agissent d'une manière programmée sur la pièce à transformer.

10.3. Les réactions enzymatiques ne forment aucun produit secondaire.

Contrairement à la plupart des réactions de chimie organique, les enzymes ne fournissent qu'un seul produit à partir d'un substrat donné. C'est la conséquence de la stricte stéréospécificité de la réaction catalysée. Par exemple, la réduction du pyruvate par le NADH, catalysée par la lactate déshydrogénase du muscle, produit du L-lactate (et du NAD⁺), alors que la réduction chimique du pyruvate par le borohydrure de sodium conduit au mélange équimoléculaire de L-lactate et de D-lactate.

10.4. Les enzymes possèdent une affinité remarquable pour l'état de transition des réactions qu'elles catalysent

C'est la raison pour laquelle les enzymes sont aussi performantes. Même si l'on n'arrive pas à isoler les états de transition, on s'en fait une idée, en déterminant la structure à trois dimensions des enzymes et des complexes enzyme-inhibiteurs (par cristallographie ou par résonance magnétique nucléaire). Pour preuve, des analogues de l'état de transition se révèlent être des inhibiteurs très puissants des enzymes correspondantes.

Le Tamiflu® est un analogue de l'état de transition de l'hydrolyse de l'acide neuraminique, catalysée par la neuraminidase des virus A et B de la grippe ; la protéase du VIH est très fortement inhibée par des analogues de l'état de transition de la réaction de protéolyse, comme le ritonavir ou le saquinavir.

11. Unites enzymatiques

- **Unité internationale:** Quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une micromole de substrat par min, dans des conditions optimales de mesure $UI = \mu \text{ mol/min}$

Activité enzymatique = V_{max}

UI/ unité de volume

- **Katal:** Quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde
- **Activité spécifique:** Nombre de molécules de substrat transformées par min et par milligramme d'enzyme.

$$\frac{\mu \text{ mol/min}}{\text{mg de protéine}} = \frac{UI}{\text{mg de protéine}}$$

Mesure le degré de pureté d'une préparation enzymatique

- **Activité spécifique moléculaire:**

Nombre de molécules de substrat transformées par min et par molécule d'enzyme

$$\frac{\mu \text{ mol/min}}{\mu \text{ mol de protéine}} = \frac{UI}{\mu \text{ mol de protéine}}$$

12. Cinétique enzymatique

12.1. Introduction à la cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique (du grec kinetos, signifiant 'en mouvement') a pour objet de déterminer les vitesses des réactions que l'enzyme catalyse, et à mesurer son affinité pour les substrats.

Même sans n'avoir isolé aucune enzyme, les chercheurs pouvaient faire une analyse mathématique de leur activité en mesurant les concentrations de substrats et de produits de la réaction et en observant comment ces quantités changeaient au cours du temps.

Les enzymologistes étudient en général les stades précoces d'une réaction, lorsque la concentration en substrat commence à peine à décroître et que la concentration en produit commence à peine à croître (pour les cinétiques enzymatiques, on calcule toujours v_0 qui est la vitesse de la réaction au temps 0). Il n'y aurait aucun intérêt à attendre jusqu'à ce que la réaction soit terminée (c'est-à-dire qu'elle atteigne l'équilibre) car les concentrations en substrat et en produit ne changent plus à ce moment-là. En effet, dans une cellule, de nombreuses réactions n'atteignent jamais l'équilibre car il y a arrivée permanente de nouveaux substrats et les produits sont utilisés dès leur production.

12.2. Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat

La réaction enzymatique fait appel à la fixation du substrat au niveau du site actif. Le site actif doit être dans une conformation spatiale telle que le substrat puisse s'y fixer, il existe différents modèles :

12.2.1. Modèle de fisher : cle-serrure

Dans ce modèle, la formation du complexe enzyme-substrat ES nécessite une interaction entre un ou plusieurs groupes fonctionnels ou domaines du substrat avec des motifs de la cavité enzymatique. Ce modèle explique la spécificité de l'enzyme pour son substrat, mais il n'explique pas l'effet des effecteurs.

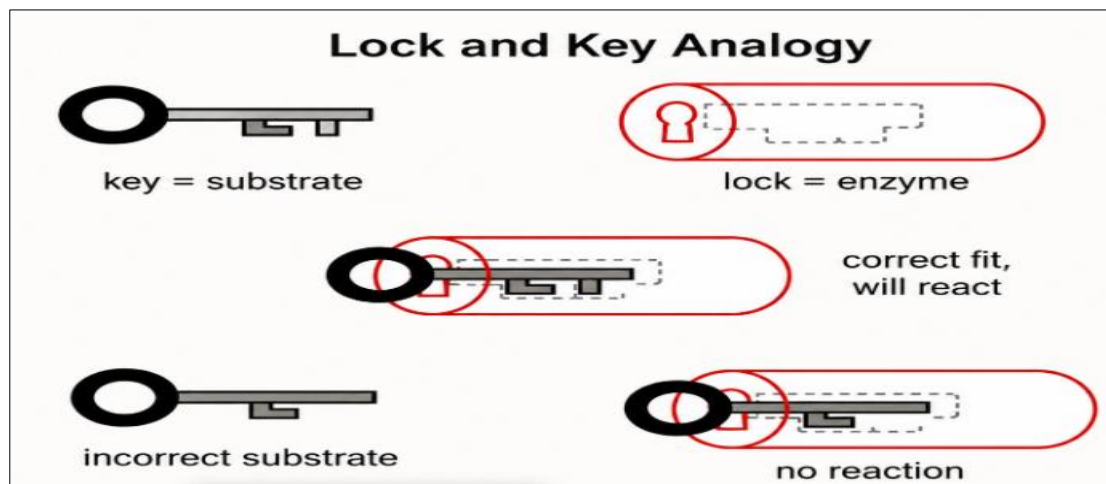


Figure 6 : Illustration du modèle clé-serrure : spécificité enzyme–substrat

12.2.2. Modele de koshland

Ajustement induit L'association enzyme-substrat est permise après une modification de la conformation de l'enzyme induite par l'entrée partielle du substrat.

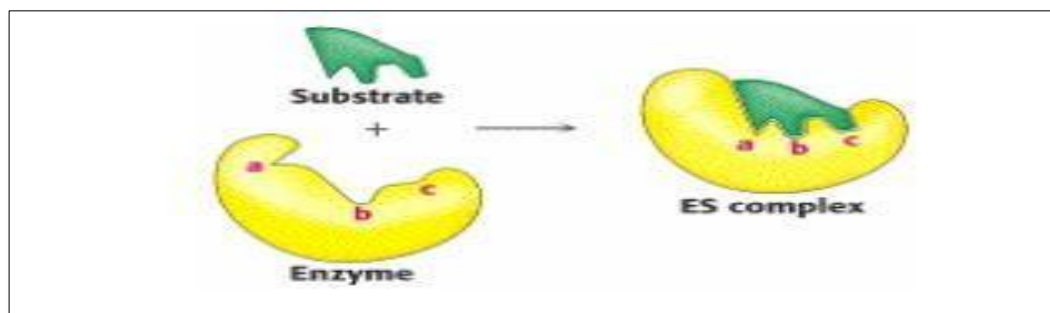


Figure 7 : Illustration de l'interaction enzyme–substrat selon le modèle de Koshland

12.2.3. Modele de strain-jenks

L'enzyme et le substrat lorsqu'ils ne sont pas dans le milieu présentent chacun une conformation particulière. La présence mutuelle de ces 2 molécules entraîne une déformation partagée de l'enzyme et du substrat, de manière à ce que le substrat se fixe sur les fonctions complémentaires des acides aminés de contacts.

13. Mesure des vitesses initiales

13.1. Généralités

L'étude de la cinétique d'une enzyme consiste dans un premier temps à mesurer l'influence de la concentration du substrat ou des substrats sur la vitesse de formation du produit ou des produits. Vient ensuite la phase d'interprétation de ces mesures qui conduit aux paramètres de vitesse maximum et d'affinité pour les substrats.

Pour étudier la cinétique d'une enzyme, il est préférable de disposer de l'enzyme pure afin d'éviter toute interférence d'une réaction parasite dans le déroulement de la réaction. Il faut également s'assurer de la stabilité de l'enzyme dans les conditions d'étude : pH, température, composition du milieu d'incubation.

L'interprétation des résultats expérimentaux suppose que la concentration d'enzyme est beaucoup plus faible que la plus petite concentration de substrat utilisée (voir l'établissement de l'équation de Michaelis-Menten).

13.2. Notion de vitesse initiale

Dès que l'on met l'enzyme en contact avec une solution contenant le substrat, on observe la formation du produit en fonction du temps (courbe ci-contre). En toute rigueur on devrait mesurer la tangente de cette courbe à l'origine. En pratique, on considère que la courbe présente une partie rectiligne et l'on mesure l'augmentation de la concentration de produit D $[P]$ pendant un intervalle de temps Dt .

On estime que les résultats restent acceptables tant que la concentration de produit reste inférieure à 10 % de la concentration initiale de substrat.

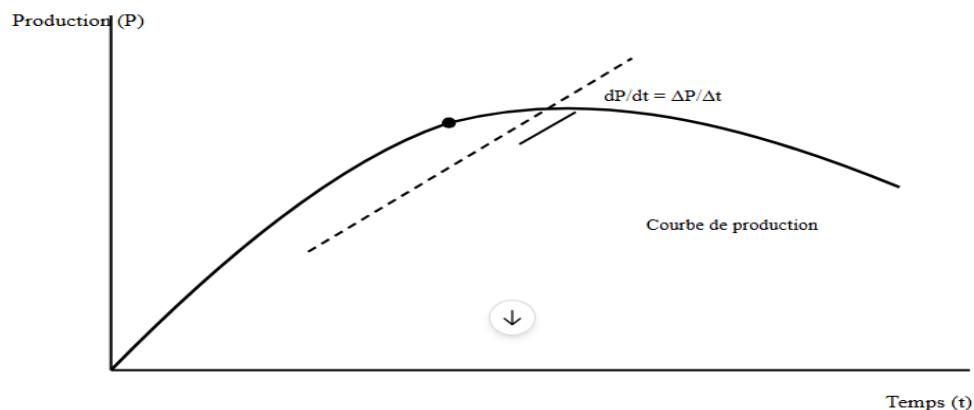


Figure 8 : Schéma de l'évolution temporelle du produit dans une réaction enzymatique

13.2.1. Influence de la concentration d'enzyme sur la vitesse initiale

Si, pour une concentration constante de substrat, on mesure la vitesse initiale en présence de concentrations croissantes d'enzyme (a à d, diagramme A ci-dessous), on constate que cette vitesse est proportionnelle à la concentration d'enzyme (diagramme B) :

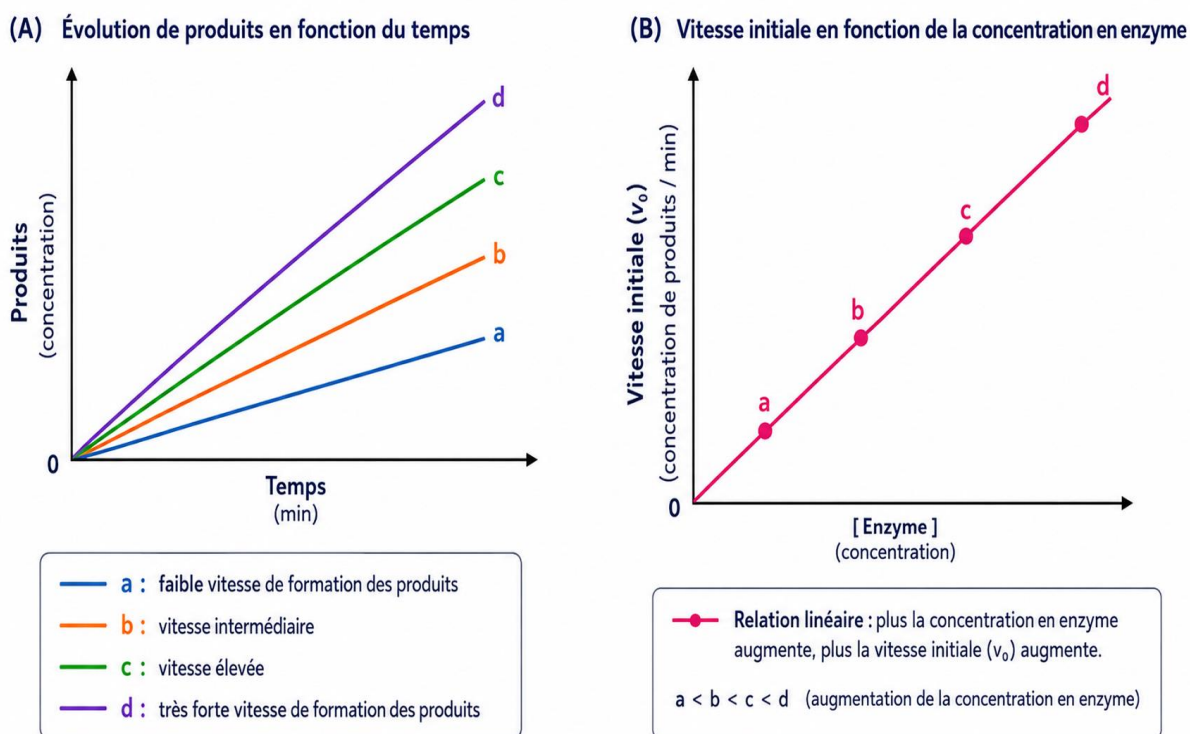


Figure 9: Relation entre la concentration enzymatique, la vitesse initiale et la formation du produit

13.2.2. Influence de la concentration de substrat sur la vitesse initiale

Si maintenant on mesure la vitesse initiale en présence d'une concentration constante d'enzyme, mais en fonction de concentrations croissantes de substrat (**a** à **f**, diagramme C), on voit que cette vitesse augmente en fonction de $[S]$ (diagramme D), mais cette vitesse ne croît pas indéfiniment ; on atteint une limite, la vitesse maximum V_{max} :

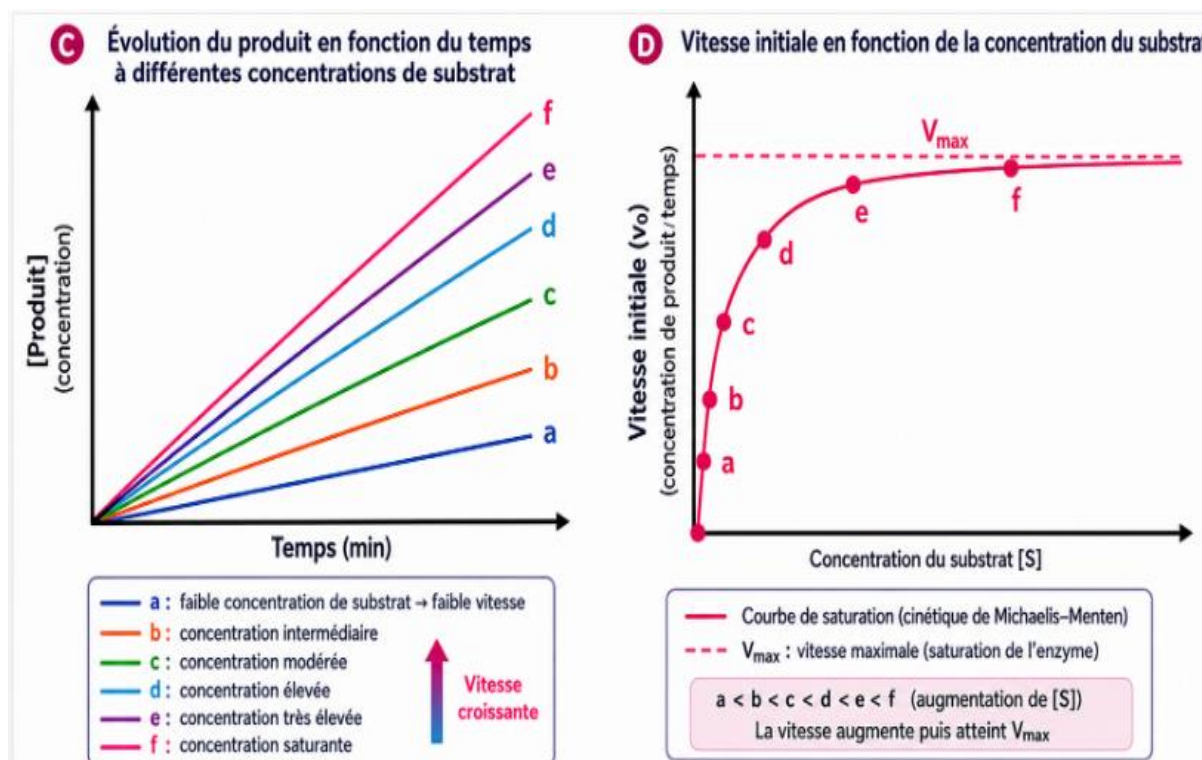


Figure 10: Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat.

Les graphes B et D peuvent être justifiés par l'existence d'un complexe entre l'enzyme et le substrat, ES, une espèce intermédiaire à l'origine de la formation du produit : la vitesse maximum est atteinte lorsque toutes les molécules d'enzyme se retrouvent sous la forme ES. Cette idée, suggérée par Victor Henri en 1903, a été formalisée par Leonor Michaelis et Maud Menten en 1913.

14. Caractères communs avec la catalyse chimique

14.1. Les catalyseurs ne sont pas modifiés par les réactions qu'ils catalysent.

Les catalyseurs entrent en contact avec les réactifs (en biochimie, les substrats) ; ils participent activement aux réactions qu'ils catalysent, mais on les retrouve intacts une fois la réaction terminée, tels qu'ils étaient au début.

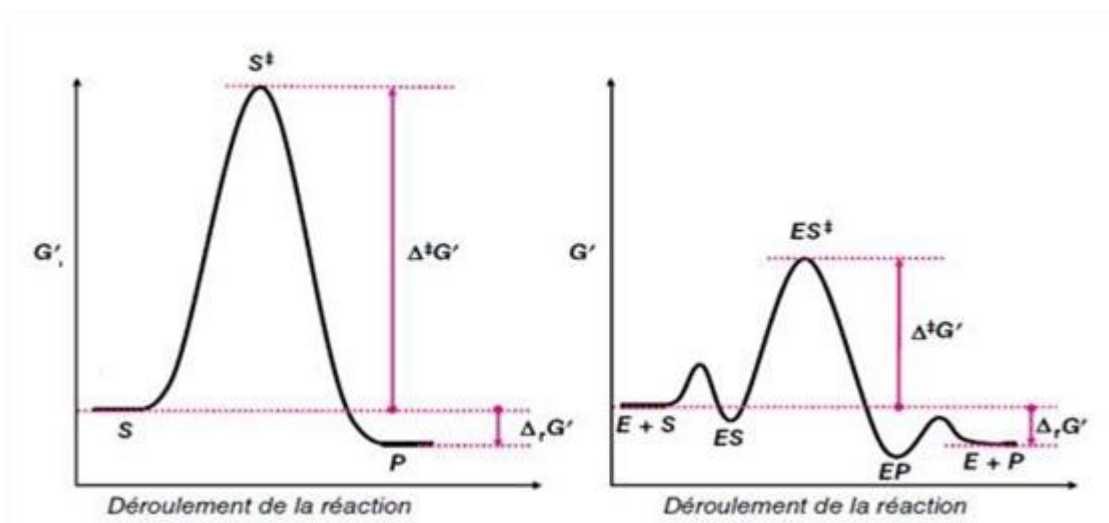
14.2. Les catalyseurs augmentent les vitesses car ils diminuent l'enthalpie libre d'activation

($\Delta G^\ddagger$). Toutefois, ils ne modifient en rien les équilibres thermodynamiques entre les réactifs (substrats) et les produits ; l'enthalpie libre de réaction $\Delta_r G^\circ$ reste inchangée en présence de catalyseur.

14.3. L'enthalpie libre d'activation mesure la différence entre l'enthalpie libre de l'état de transition et celle du réactif.

L'état de transition désigne un intermédiaire dans lequel on reconnaît une liaison du réactif sur le point de se rompre et une liaison du produit sur le point de se former. Il s'agit d'un état passager, très fugace, en théorie impossible à isoler et dont l'enthalpie libre est plus élevée que celle du réactif et plus élevée que celle du produit. L'état de transition se situe au sommet de la barrière énergétique qui doit être franchie pour que se forme le produit de la réaction.

Dans une réaction non catalysée, l'état de transition est constitué du réactif (ou des réactifs, ou du substrat S en l'absence d'enzyme) dans une configuration particulière ; dans la catalyse enzymatique, il s'agit d'une configuration particulière du complexe enzyme-substrat ES.



Influence d'une enzyme sur l'enthalpie libre d'activation $\Delta^{\ddagger}G'$.

A **gauche**, réaction non catalysée, à **droite**, réaction catalysée par une enzyme. L'enzyme diminue $\Delta^{\ddagger}G'$ l'enthalpie libre d'activation (ou barrière énergétique) mais l'enthalpie libre réactionnelle $\Delta_r G'$ reste inchangée. On notera que la formation du complexe ES est caractérisée par une modeste énergie d'activation - et de même la dissociation du complexe EP.

Figure 11 : Variation de l'enthalpie libre d'activation en présence et absence d'une enzyme

14.4. La vitesse d'une réaction ne dépend que du rapport $[ES^{\ddagger}]/[S]$.

C'est ce que suppose la théorie proposée par Henry Eyring (1935). On admet l'existence d'un équilibre entre le réactif R (ou le substrat S) et les états de transition respectifs $R^{\ddagger}$ et $ES^{\ddagger}$, soit, pour ce dernier :

$$K^{\ddagger} = \frac{[ES^{\ddagger}]}{[S]} \quad (1)$$

Cette constante d'équilibre d'activation correspond à l'enthalpie libre d'activation $\Delta^{\ddagger}G'$:

$$\Delta^{\ddagger}G' = -RT \log K^{\ddagger} = -RT \log \frac{[ES^{\ddagger}]}{[S]} \quad (2)$$

D'où la concentration de l'état de transition :

$$[ES^{\ddagger}] = [S] \exp \frac{-\Delta^{\ddagger}G'}{RT} \quad (3)$$

Dans le cadre de cette théorie, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration de l'état de transition $[ES^\ddagger]$, et à la constante de vitesse $k^\ddagger$, constante de vitesse d'une réaction d'ordre 1, dont la dimension est donc l'inverse d'un temps (seconde⁻¹) :

$$v = k^\ddagger [ES^\ddagger] = k^\ddagger [S] \exp \frac{-\Delta^\ddagger G'}{RT} \quad (4)$$

La théorie d'Eyring prévoit que la constante de vitesse $k^\ddagger$ est universelle : elle possède la même valeur pour toutes les réactions chimiques (d'où l'autre nom de la théorie d'Eyring : théorie des vitesses absolues) :

$$k^\ddagger = \frac{k_B T}{h} \quad (5)$$

k_B : constante de Boltzmann, T : température absolue, h : constante de Planck ;

$k^\ddagger = 6,2 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$ à 25 °C.

En résumé, les enzymes et les catalyseurs chimiques augmentent la vitesse des réactions car ils augmentent la proportion de réactif (ou de complexe enzyme-substrat) présent sous la forme de l'état de transition. Si $[ES^\ddagger]/[S]$ augmente, $K^\ddagger$ augmente (relation 1), $\Delta^\ddagger G'$ diminue (relation 2), et v augmente (relation 4).

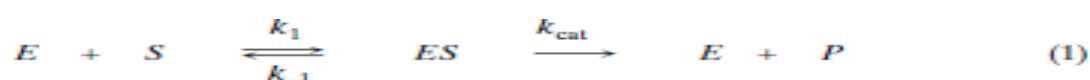
15. Equation de michaelis-menten

15.1. Objectif

Établir sous la forme d'une équation algébrique la relation entre la vitesse initiale d'une réaction enzymatique et la concentration du substrat.

15.2. Schéma réactionnel

La transformation enzymatique du substrat en produit nécessite la formation préalable du complexe enzyme-substrat, ES, suivie de sa conversion en enzyme et produit :



Dans ce schéma :

K_1 : constante de vitesse de formation du complexe ES , constante de vitesse d'ordre 2,
dimension $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

K_{-1} : constante de vitesse de dissociation du complexe ES , constante de vitesse d'ordre
1, dimension s^{-1} ;

K_{cat} : constante catalytique, constante de vitesse qui englobe la formation du complexe EP et sa dissociation en
 $E + P$; c'est une constante de vitesse d'ordre 1, dimension s^{-1} .

La concentration de produit est nulle, puisque l'on mesure la vitesse initiale ; aussi, on
ignore toute formation de complexe EP à partir de $E + P$. La réaction progresse uniquement
vers la formation de produit, d'où l'expression de la vitesse de réaction : $v = k_{cat} [ES]$

15.3. Calcul de la vitesse initiale en conditions d'état stationnaire

On considère que le système évolue dans des conditions d'état stationnaire ; en d'autres
termes, la concentration du complexe ES est constante : dans un intervalle de temps
infinitésimal, il se forme autant de complexe ES qu'il n'en disparaît :

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (2)$$

On exprime alors la vitesse de formation du complexe :

$$v_f = k_1 [E][S] \quad (3)$$

Et sa vitesse de disparition :

$$v_d = k_{-1} [ES] + k_{cat} [ES] \quad (4)$$

Dans les conditions d'état stationnaire :

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = v_f - v_d = k_1 [E][S] - k_{-1} [ES] - k_{cat} [ES] \quad (5)$$

La concentration totale d'enzyme $[E]_T$ est égale à la somme de la concentration de complexe
 $[ES]$ et d'enzyme libre $[E]$:

$$[E]_T = [ES] + [E] \text{ d'où } [E] = [E]_T - [ES] \quad (6)$$

Par ailleurs, comme $[E]_T \ll [S]$, la complexation du substrat par l'enzyme ne modifie pas sensiblement $[S]$ qui représente indistinctement la concentration totale de substrat *et* la concentration de substrat libre. La relation (5) devient :

$$k_1 [S] \{ [E]_T - [ES] \} - k_{-1} [ES] - k_{cat} [ES] = 0 \quad (7)$$

$$[ES] \{ k_1 [S] + k_{-1} + k_{cat} \} = k_1 [E]_T [S] \quad (8)$$

D'où $[ES]$:

$$[ES] = \frac{k_1 [E]_T [S]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_{cat}} \quad (9)$$

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}} \quad (10)$$

Et l'expression de la vitesse, $v = k_{cat} [ES]$:

$$v = \frac{k_{cat} [E]_T [S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}} \quad (11)$$

Ou bien :

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m} \quad (12)$$

où V_{max} est la vitesse maximum ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) : $V_{max} = k_{cat} [E]_T$,
et K_m est la constante de Michaelis ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) :

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

16. Représentation graphique de l'équation de michaelis

L'équation de Michaelis décrit la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat (graphe ci-contre). Si l'on transforme l'équation de Michaelis pour montrer la variation de v/V_{max} en fonction de $[S]$, on obtient la relation suivante :

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

Cette relation permet de souligner des propriétés communes à toutes les cinétiques michaeliennes, quelles que soient leurs valeurs de $V_{\max}$ ou de K_m :

- On mesure une vitesse égale à la moitié de $V_{\max}$ lorsque la concentration de substrat est numériquement égale à K_m :

$$[S]_{0,5} = K_m \quad (2)$$

K_m est la concentration de substrat pour laquelle $v = \frac{V_{\max}}{2}$

- La vitesse est égale à 9/10e de $V_{\max}$ lorsque la concentration de substrat est égale à 9 K_m : $[S]_{0,9} = 9K_m$; la vitesse est égale à 1/10e de $V_{\max}$ lorsque la concentration de substrat est égale à $K_m / 9$: $[S]_{0,1} = K_m / 9$; le rapport $[S]_{0,9}/[S]_{0,1}$ est donc égal à 81 :

$$\frac{[S]_{0,9}}{[S]_{0,1}} = 9K_m \times \frac{9}{K_m} = 81 \quad (3)$$

Cette valeur est caractéristique des cinétiques michaeliennes. Les cinétiques des enzymes allostériques présentent des rapports $[S]_{0,9}/[S]_{0,1}$ très différents de cette valeur

16.1. Signification de $V_{\max}$

La vitesse maximum est égale au produit de la concentration totale d'enzyme par la constante catalytique :

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_T \quad (4)$$

Il s'agit bien sûr d'une valeur limite, jamais atteinte ; c'est la vitesse initiale de la réaction lorsque l'enzyme est théoriquement saturée à 100 %, c'est-à-dire lorsqu'elle se présente totalement sous la forme de complexe $[ES]$. Si l'enzyme est pure, et si l'on connaît sa concentration, on peut en déduire k_{cat} .

Cette constante de vitesse d'ordre 1 (s^{-1}) est égale au nombre de moles de P formées à partir du complexe ES dans l'unité de temps (on a coutume d'appeler k_{cat} le nombre de turn-over de l'enzyme).

Par exemple, si $k_{cat} = 1\,000\,s^{-1}$, cela signifie que lorsqu'elle se trouve entièrement sous la forme ES, une mole d'enzyme fournit 1 000 moles de produit par seconde.

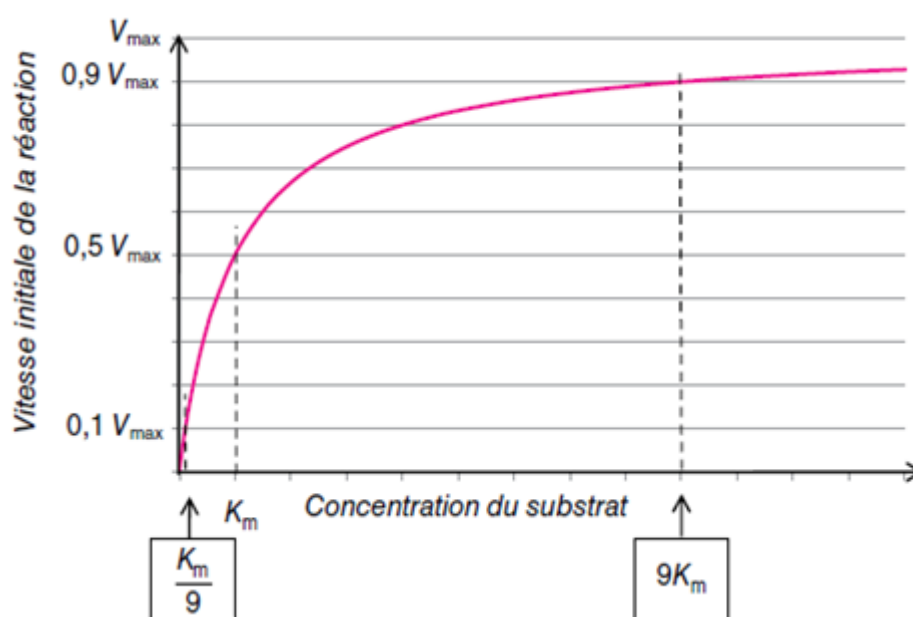


Figure 12 : Vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat : saturation enzymatique et détermination de V_{max} et K_m .

16.2. Signification de K_m

Le numérateur de la constante de Michaelis est la somme de deux constantes de vitesse affectées à deux réactions de directions opposées. K_m prend une signification différente selon les valeurs relatives de ces deux constantes ; on peut donner une interprétation simple dans deux situations extrêmes :

$$k_{cat} \ll k_{-1} \Rightarrow K_m \approx \frac{k_{-1}}{k_1}$$

La constante de Michaelis est assimilée au quotient des deux constantes de vitesse k_{-1} et k_1 , c'est-à-dire à la constante de dissociation du complexe ES.

Le schéma réactionnel (relation 1 de la fiche 53) décrit un système où E, S et ES forment un quasi-équilibre. L'affinité de l'enzyme pour le substrat est alors représentée par K_m : plus K_m est faible, plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est élevée, et vice-versa.

Cette situation est rencontrée chez un grand nombre d'enzymes, par exemple chez les kinases, enzymes qui transfèrent un groupe phosphate de l'ATP sur, par exemple, les fonctions alcool.

$$k_{cat} \gg k_{-1} \Rightarrow K_m \approx \frac{k_{cat}}{k_1}$$

K_m s'apparente à une constante cinétique plutôt qu'à une constante de dissociation. On se trouve dans une telle situation avec la catalase, enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en eau et dioxygène.

17. Détermination de K_m et v_{max}

17.1. Déterminer V_{max} à partir de mesures de vitesse initiale

Cinq mesures de vitesse initiale sont portées dans la figure A. Les cinq points, numérotés dans l'ordre croissant des concentrations de substrat se disposent de part et d'autre de la courbe théorique à laquelle ils devraient appartenir ($V_{max} = 1$ et $K_m = 3$, unités arbitraires). Ces cinq valeurs expérimentales se révèlent insuffisantes pour évaluer V_{max} à partir du graphe ci-dessous.

La courbe de saturation $v = f[S]$ est une hyperbole équilatère qui admet pour asymptotes $v = V_{max}$ et $[S] = -K_m$; il suffit d'introduire les données expérimentales dans un programme de calcul par régression non linéaire approprié pour en déduire les valeurs expérimentales de V_{max} et K_m .

On peut toutefois préférer une méthode de détermination graphique.

17.2. Méthodes de détermination graphique de $V_{\max}$ et K_m

Nous nous limiterons aux quatre méthodes les plus utilisées. Les trois premières consistent à transformer l'équation de Michaelis de manière à obtenir l'équation d'une droite.

Dans chacune de ces trois méthodes, les données transformées, reportées dans un système d'axes perpendiculaires, permettent de tracer une droite dont la pente et les intersections avec les axes servent à déterminer $V_{\max}$ et K_m ; on a coutume de désigner ces méthodes par les patronymes des auteurs qui les ont popularisées :

- $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]}$ (Lineweaver et Burk) ;

- $\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \times [S]$ (Hanes et Woolf) ;

- $v = V_{\max} - K_m \frac{v}{[S]}$ (Eadie et Hofstee).

La courbe théorique (en noir) et les points expérimentaux de la figure A sont reproduits dans les diagrammes suivants après les transformations correspondantes :

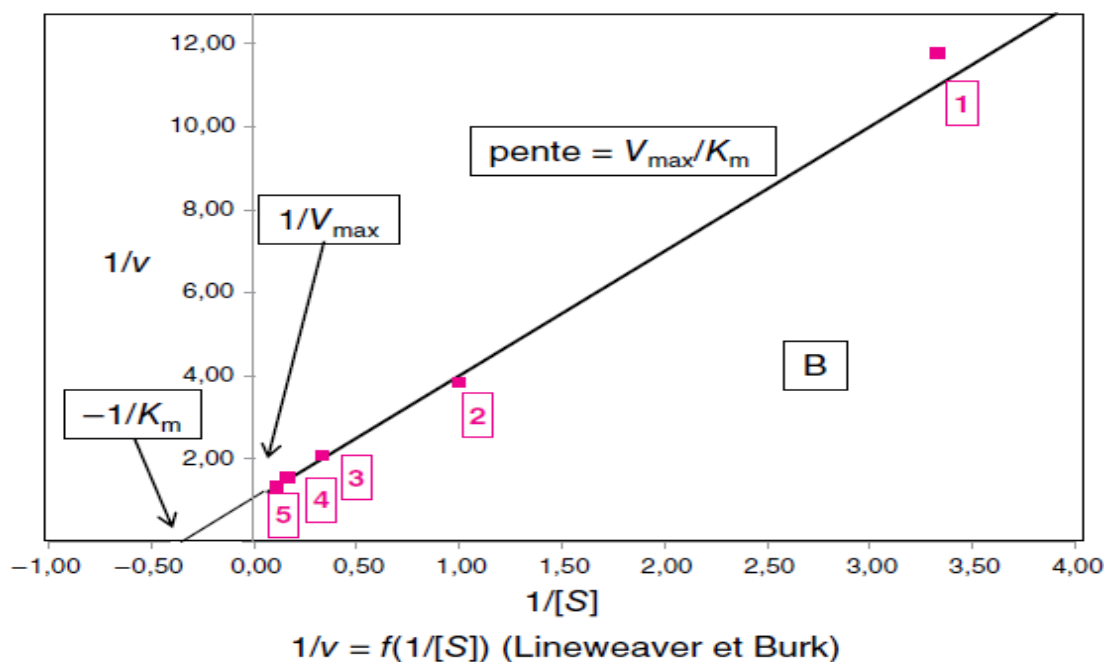


Figure 13 : Représentation graphique selon Lineweaver et Burk

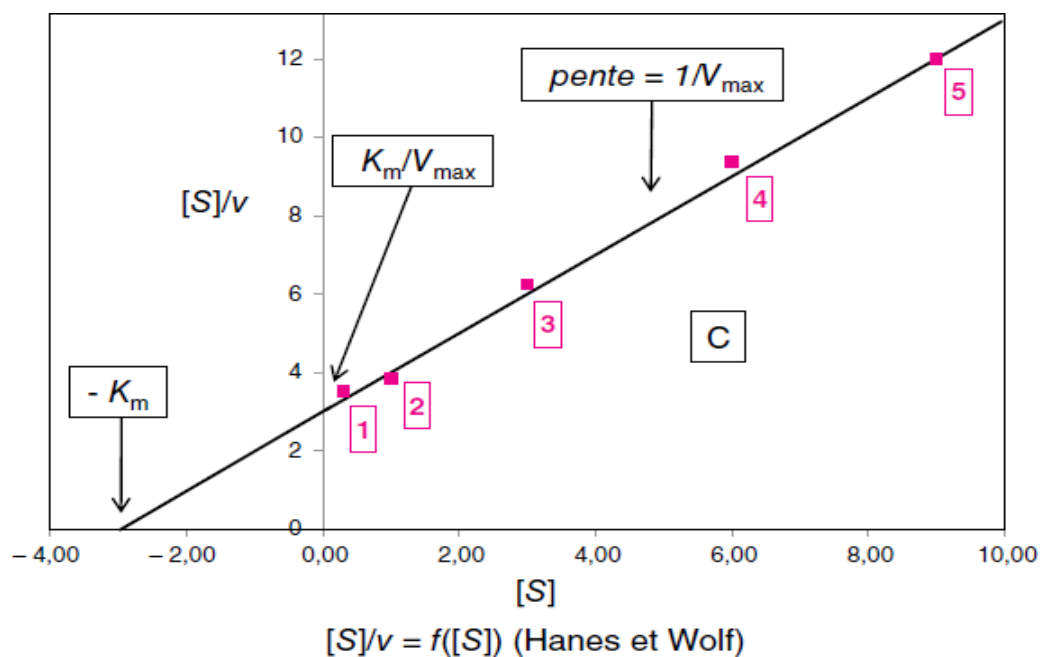


Figure 14 : Représentation graphique selon de Hanes et Wolf.

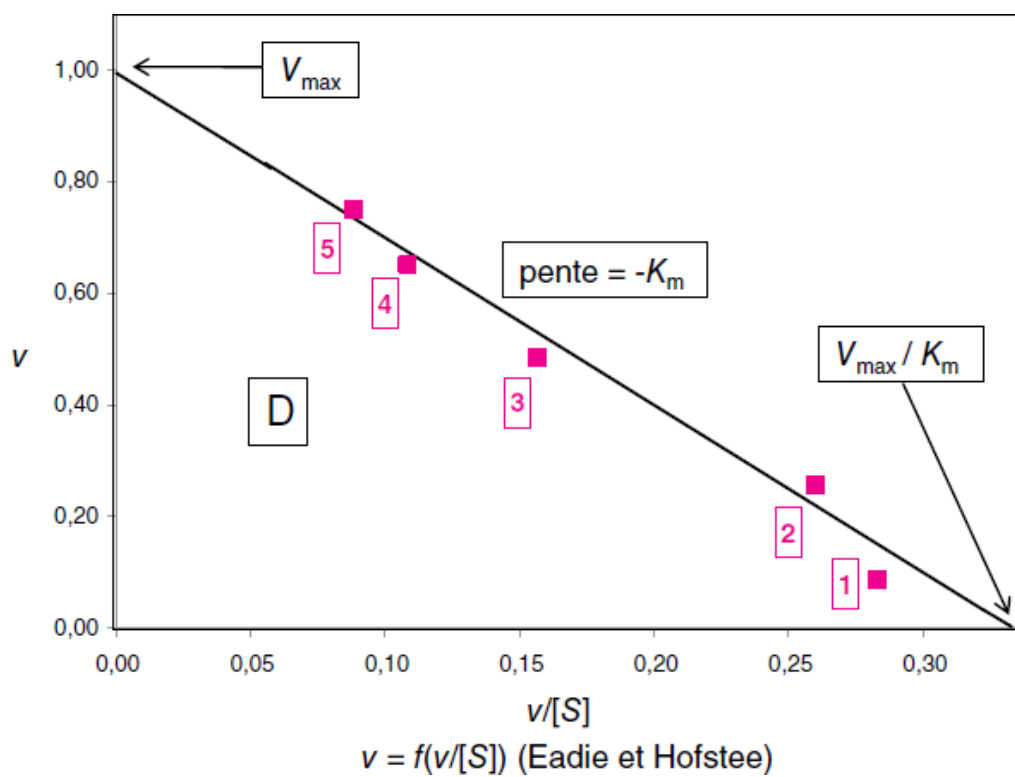


Figure 15: Représentation graphique selon Eadie et Hofstee.

La quatrième méthode, proposée par Robert Eisingal et Athel Cornish-Bowden (1974) consiste à tracer un réseau de droites à partir des couples de valeurs expérimentales ($[S]$, v). Chaque couple de valeur ($[S]_i$, v_i) détermine une droite qui passe par les deux points ($x = -[S]_i$, $y = 0$) et ($x = 0$, $y = v_i$) ; les droites se rencontrent dans le premier quadrant au point d'abscisse K_m et d'ordonnée V_{max} .

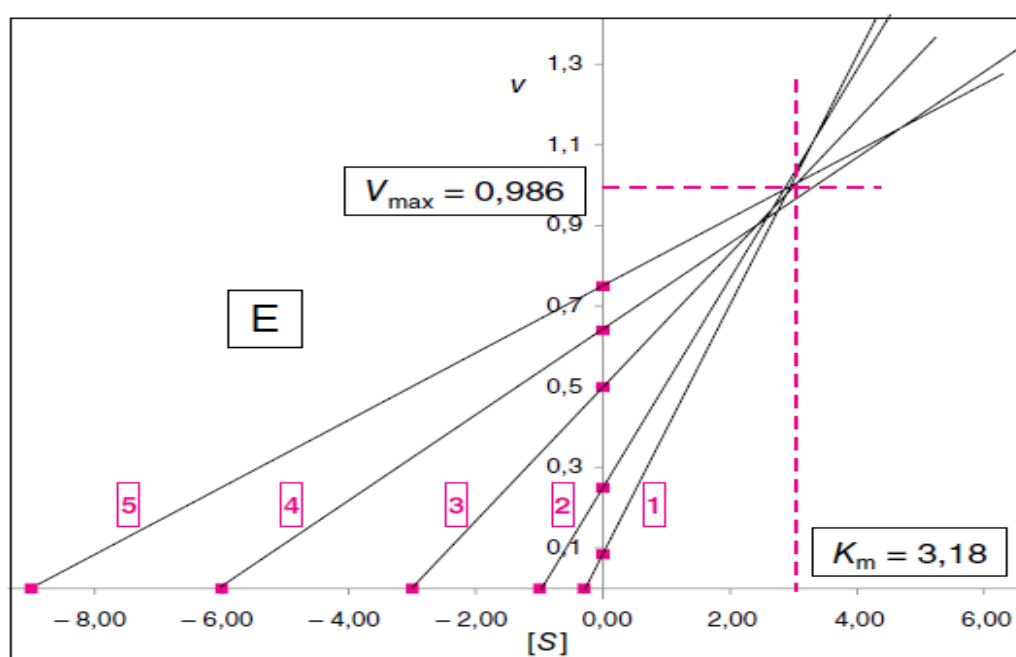


Figure 16: Représentation de Robert Eisingal et Athel Cornish-Bowden.

En raison des erreurs expérimentales, les cinq droites ne se rencontrent pas au même point. On dénombre 10 points d'intersection 1, et donc une série de 10 abscisses et une série de 10 ordonnées, dont on choisit les valeurs médianes 2 : K_m expérimental (valeur médiane de la série des abscisses) et V_{max} expérimentale (valeur médiane de la série des ordonnées).

17.3. Comparaison des méthodes graphiques

Ces quatre méthodes ont le mérite de conduire à des valeurs expérimentales de V_{max} et K_m . Les unes et les autres présentent toutefois des différences.

Les trois premières méthodes transforment les données expérimentales, avec des conséquences spécifiques sur l'interprétation des résultats.

La représentation en doubles inverses $1/v = f(1/[S])$ (Lineweaver-Burk) tout à la fois comprime les valeurs élevées, et disperse les valeurs faibles de v et de $[S]$ (comparer les positions des points 3, 4 et 5 à celles des points 1 et 2 sur les graphes A et B).

De ce fait, on perd la majorité des informations pour les valeurs élevées de la vitesse initiale, et on accorde une importance exagérée aux valeurs faibles, celles qui sont généralement entachées des plus fortes erreurs expérimentales.

La représentation $[S]/v = f([S])$ (Hanes et Woolf) gomme les erreurs expérimentales. À l'inverse, la représentation $v = f(v/[S])$ (Eadie et Hofstee) amplifie ces erreurs expérimentales, du fait que la vitesse est portée à la fois en abscisse et en ordonnée ; du moins cette dernière représentation permet d'apprécier du premier coup d'oeil la qualité d'une série de mesures.

La méthode d'Eisenthal et Cornish-Bowden analyse les résultats sans aucune transformation et propose un traitement statistique simple et rapide.

À l'expérience, on s'aperçoit que le choix des valeurs médianes est aussi fiable que des calculs de moyennes et d'écart-types qui prennent en compte toutes les valeurs expérimentales, y compris les valeurs extrêmes.

La représentation en doubles inverses (Lineweaver et Burk) reste néanmoins la plus populaire, malgré son manque de fiabilité. C'est en effet la seule qui permet de désigner les paramètres $1/V_{max}$ (intersection avec l'axe des ordonnées) et $1/K_m$ (intersection avec l'axe des abscisses) à l'aide d'une simple ligne droite.

18. Récapitulation

TableauIII: Détermination et interprétation des paramètres cinétiques V_{max} et K_m selon le modèle de Michaelis-Menten

Représentation	Nom usuel	Abscisse	Ordonnée	Pente
$V=f([S])$	Michaelis-Menten	—	—	—
$1/V=f(1/[S])$	Lineweaver-Burk	$-1/K_m$	$1/V_{max}$	K_m/V_{max}
$[S]/V=f([S])$	Hanes-Woolf	$-K_m$	K_m/V_{max}	$(1/V_{max})$
$V=f(V/[S])$	Eadie-Hofstee	V_{max}/K_m	V_{max}	$-K_m$

19. Inhibiteurs

Les inhibiteurs sont des composés dont la fixation sur l'enzyme entraîne leur inactivation partielle ou totale qui se traduit par la diminution ou l'annulation de la vitesse initiale. Il en existe deux catégories :

- **Inhibiteurs irréversibles**

Ce sont des inhibiteurs qui dénaturent irréversiblement l'enzyme. Il s'agit de tout réactif qui modifie de façon covalente la chaîne latérale d'un acide aminé d'une protéine.

- **Inhibiteurs suicide**

Constituent une classe spéciale d'inhibiteurs irréversibles. Ils sont inactifs jusqu'à ce qu'ils se lient au site actif de l'enzyme, ils effectuent alors les premières étapes de la réaction enzymatique comme dans le cas du substrat normal, mais au lieu d'être transformés en produit, ces inhibiteurs produisent une molécule très réactive qui se lie de manière irréversible à l'enzyme. Ils sont donc incapables d'effectuer une réaction complète et restent 'collés' dans le site actif.

- **Inhibiteurs réversibles**

Inhibiteurs réversibles Il y a inhibition enzymatique réversible lorsqu'une substance se fixe de façon réversible (c'est-à-dire de façon non covalente) à une enzyme et que cela altère ses propriétés catalytiques. Ils ralentissent la vitesse de la réaction enzymatique.

Ils modifient la cinétique enzymatique sans dénaturer l'enzyme. Il existe trois types d'inhibition réversible :

- Inhibition compétitive
- Inhibition non compétitive (pure ou mixte)
- Inhibition incompétitifs

19.1. Inhibiteurs réversibles

19.1.1. Inhibition compétitive

L'inhibiteur compétitif (IC) est souvent un **analogue de substrat**, de telle sorte qu'il se loge à la place de S, sans être en général transformé. On conçoit intuitivement que **c'est l'affinité apparente qui va diminuer et pas la V_{max}** . L'IC peut être délogé par un excès de substrat (inhibition levée).

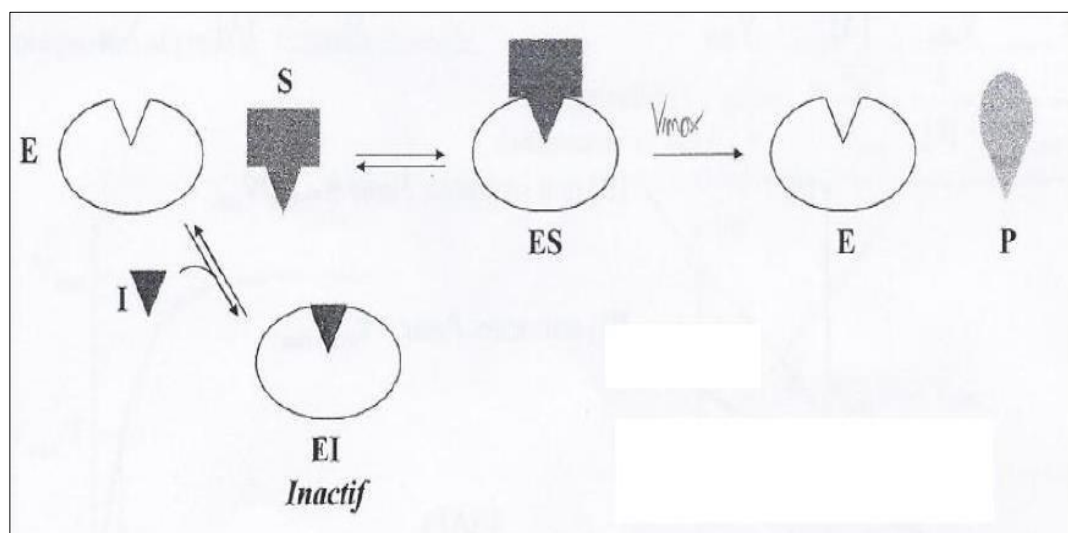
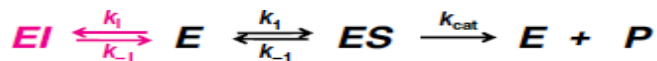


Figure 17: Schéma illustrant le mécanisme d'action d'un inhibiteur compétitif

La fixation de l'inhibiteur compétitif exclut la fixation ultérieure du substrat, et vice versa. Le complexe EI formé par l'association de l'enzyme et de l'inhibiteur est inactif :



La fixation réversible de l'inhibiteur sur l'enzyme est caractérisée par la constante de dissociation K_I :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (1)$$

Et l'expression de la vitesse initiale de la réaction en fonction des concentrations de substrat et d'inhibiteur :

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)} \quad (2)$$

La courbe $v = f [S]$ est toujours une hyperbole équilatère admettant $v = V_{max}$ comme asymptote horizontale. On mesure une vitesse initiale égale à la moitié de la vitesse maximum pour une concentration de substrat égale à une valeur apparente K_{m_app} plus élevée que K_m mesurée en absence d'inhibiteur :

$$K_{m_app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (3)$$

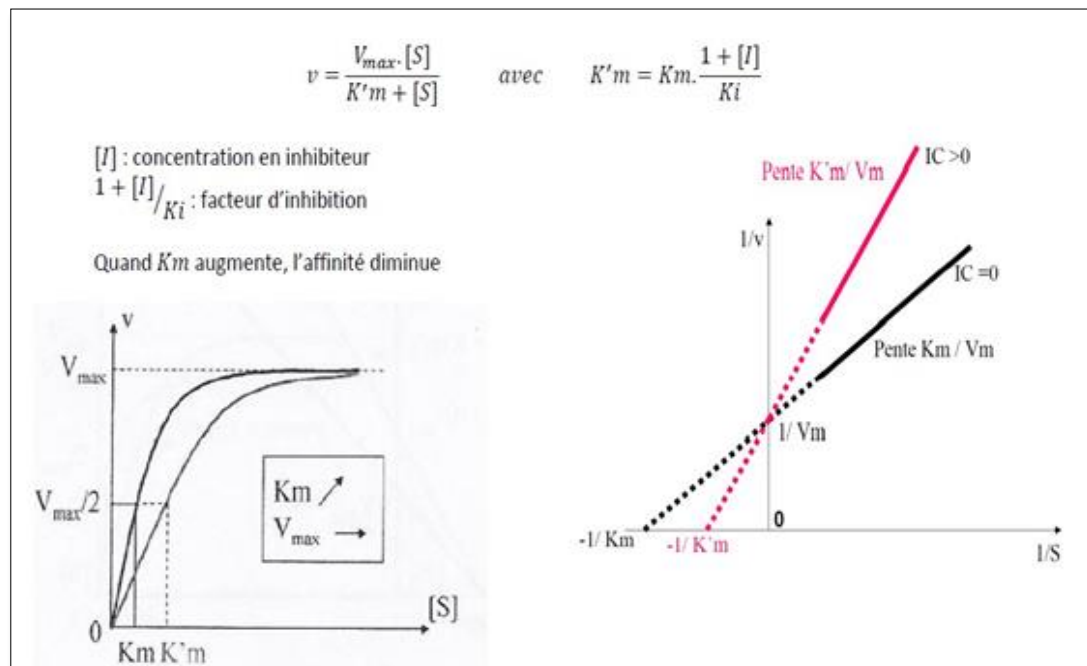


Figure 18: Comparaison des courbes cinétiques avec et sans inhibiteur compétitif

Quelques inhibiteurs compétitifs

- L'acide malonique, analogue de l'acide succinique est un inhibiteur compétitif de la succinate déshydrogénase.
- Parmi les antibiotiques, le chloramphénicol est un inhibiteur de la peptidyltransférase, en raison de son analogie avec l'extrémité 3' des aminoacyl-ARNt.
- La sulfanilamide, première molécule de la classe des sulfamides, inhibe la formation de l'acide folique, en raison de son analogie avec l'acide para-aminobenzoïque.
- Le glyphosate, utilisé comme herbicide systémique non sélectif (Roundup®) est un analogue du phosphoénolpyruvate qui inhibe la synthèse des aminoacides aromatiques chez les plantes.

19.1.2. Inhibition non compétitive

Les inhibiteurs non compétitifs (INC) ne sont pas des analogues structuraux de S. Ils se fixent de façon non covalente en un **site différent du site actif** de l'enzyme à la fois sur l'enzyme et sur le complexe enzyme/substrat. **Ils ne diminuent pas l'affinité de l'enzyme pour S (donc ne modifie pas K_m) mais diminuent la V_{max}** puisque l'inhibiteur ne peut être déplacé du complexe ternaire ESI par un excès de S. Tout se passe comme si $[E_0]$ était diminué.

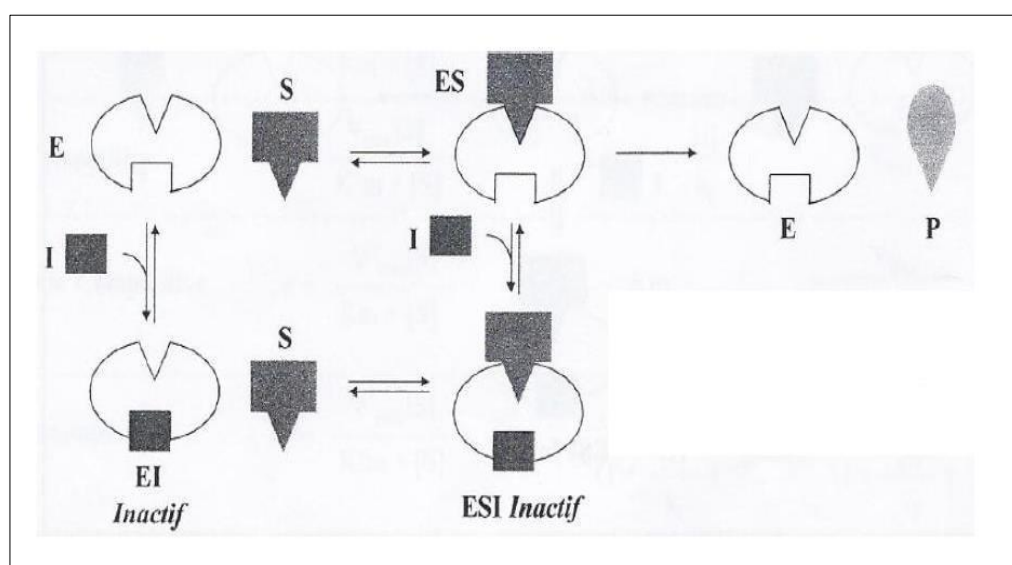
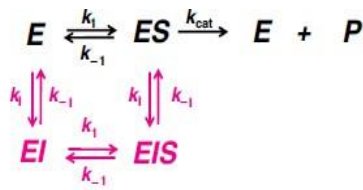


Figure 19: Schéma illustrant le mécanisme d'action d'un inhibiteur non compétitif.

Le complexe ternaire EIS se révèle inactif car dans cette forme d'inhibition, l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme et empêche d'une manière ou d'une autre la réalisation de la catalyse, sans toutefois gêner la fixation du substrat. De même, le substrat ne gêne pas la fixation de l'inhibiteur, et la constante de dissociation du complexe EI (en $E + I$) est égale à la constante de dissociation du complexe EIS (en $ES + I$). Ces hypothèses conduisent au schéma réactionnel suivant :



avec :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[EIS]} = \frac{k_{-I}}{k_I} \quad (1)$$

On traduit ce schéma par l'équation de vitesse initiale en fonction des concentrations de substrat et d'inhibiteur :

$$v = \frac{V_{\max}}{[S] + K_m} \times \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad (2)$$

On reconnait dans cette équation la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat en l'absence d'inhibiteur, multipliée par une fraction dont la valeur ne dépend que de $[I]$ et K_I . D'après cette équation, quelle que soit la concentration du substrat, la vitesse est divisée par un facteur constant, d'où la vitesse maximum apparente :

$$V_{\max app} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad (3)$$

La moitié de cette vitesse maximum apparente est obtenue pour une valeur de K_m identique à la K_m obtenue en absence d'inhibiteur.

En présence d'inhibiteur non-compétitif, la K_m est donc inchangée, ce que l'on constate sur la courbe $v = f [S]$.

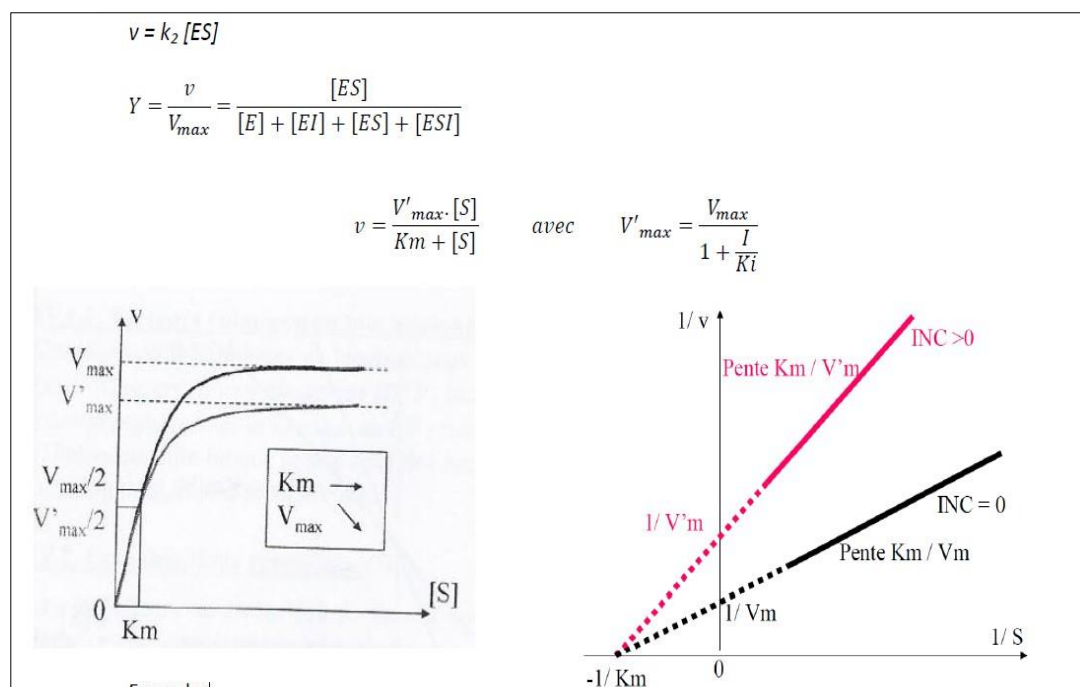


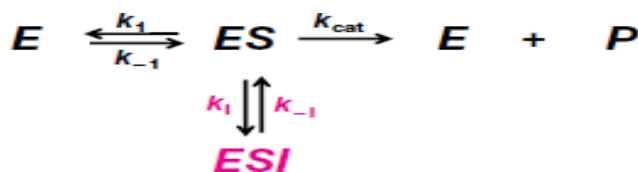
Figure 20: Comparaison des courbes cinétiques avec et sans inhibiteur non compétitif

19.1.3. INHIBITION INCOMPÉTITIVE

Les inhibiteurs incompétitifs (IIC) ne sont pas de sanalogues structuraux de S. Ils se fixent de façon non covalente en un site différent du site actif de l'enzyme uniquement sur le complexe enzyme/substrat pour donner un complexe ternaire ESI inactif.

K_m diminue (donc l'affinité de l'enzyme pour S augmente) et la V_{max} diminue.

On décrit le système par le schéma réactionnel suivant :



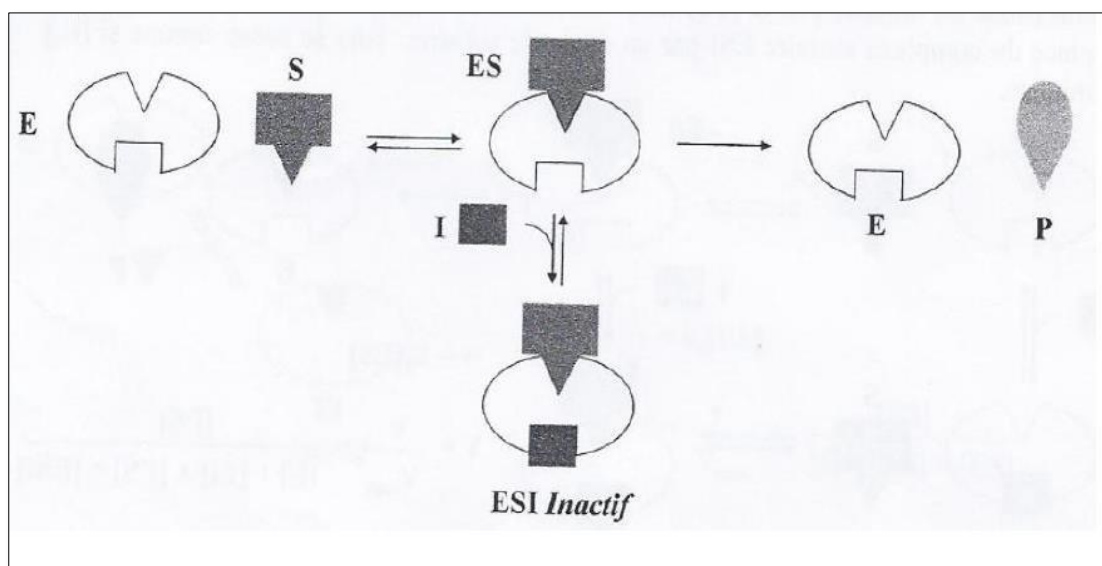


Figure 21: Schéma illustrant le mécanisme d'action d'un inhibiteur incompétitif

La formation de ce complexe est régie par la constante de dissociation :

$$K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} = \frac{k_{-I}}{k_I} \quad (1)$$

En régime d'état stationnaire, ce schéma conduit à l'équation de vitesse

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + K_m} \quad (2)$$

Lorsqu'on analyse cette équation, on voit que la vitesse maximum apparente et la K_m apparente sont obtenues en divisant les valeurs de $V_{\max}$ et K_m par le même facteur :

$$V_{\max app} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad ; \quad K_{m app} = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad (3)$$

Ce qui est illustré par le graphe des deux courbes en absence et en présence de l'inhibiteur.

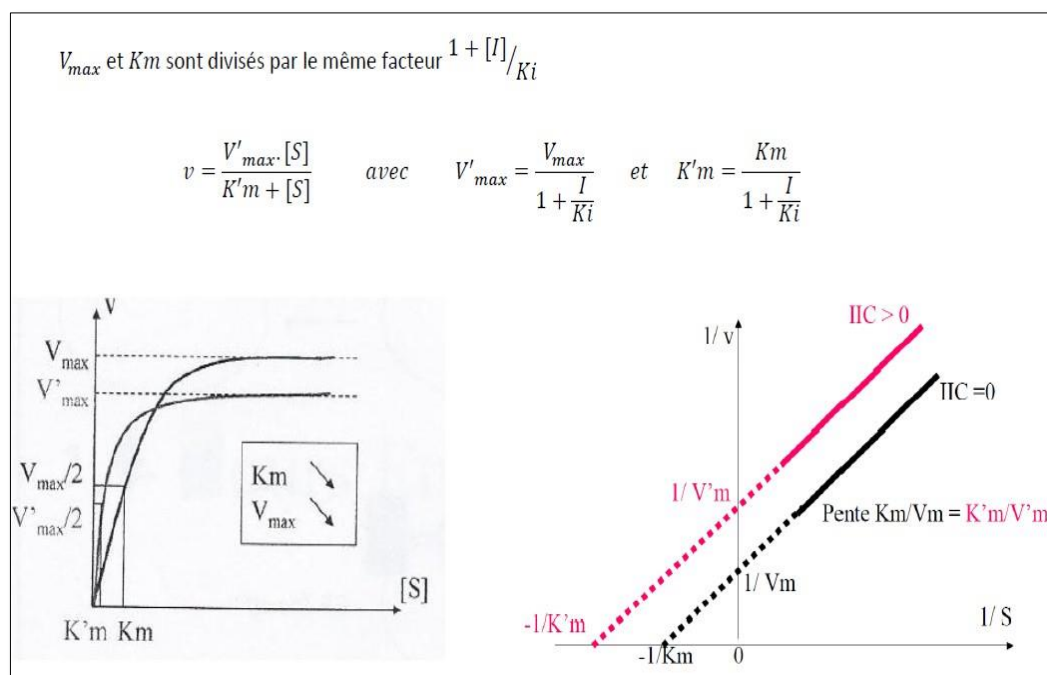


Figure 22: Comparaison des courbes cinétiques avec et sans inhibiteur incompétitif.

Exemples

- **Glyphosate** (dés herbant) : IIC d'une enzyme végétale
- **Li⁺** : cation IIC d'une phosphatase de l'inositol-di-phosphate (IP2)

Caractéristiques de l'inhibition incompétitive

L'étude des enzymes modifiant un seul substrat montre que l'inhibition anti-compétitive est assez peu répandue. On observe plus fréquemment cette inhibition avec les enzymes à deux substrats, lorsque la fixation d'un premier substrat précède obligatoirement la fixation du second : un analogue structural, compétitif du premier substrat, pourra se comporter comme un inhibiteur anti-compétitif vis-à-vis du second substrat. L'ion lithium (Li⁺) est un inhibiteur anti-compétitif de l'inositol-1-phosphatase. Cette inhibition pourrait rendre compte, du moins en partie, de l'action du lithium utilisé pour le traitement des troubles bipolaires.

Tableau IV: Effets des différents types d'inhibition enzymatique sur les paramètres cinétiques apparents (K_m et V_{max}).

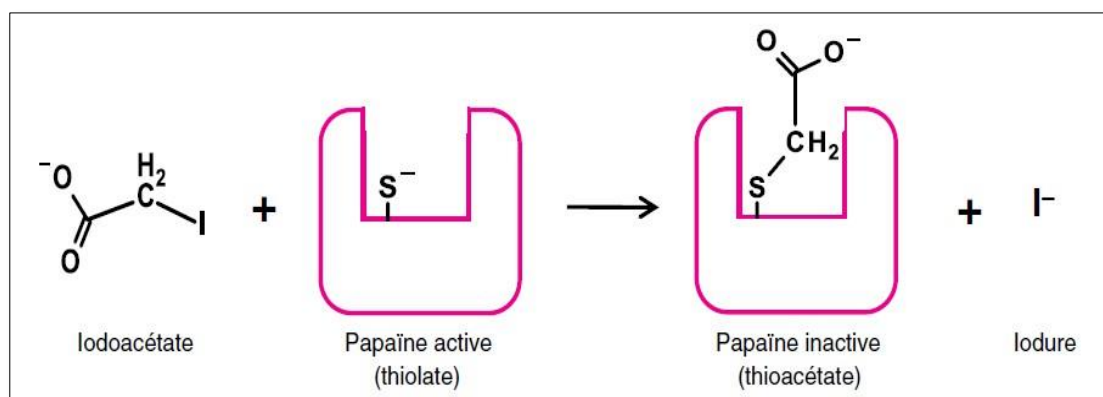
Inhibition	Equation de vitesse	K_m apparent	V_{max} apparente
Sans inhibition	$V = V_{max}[S] / (K_m + [S])$	K_m	V_{max}
Competitive	$V = V_{max}[S] / (K'_m + [S])$	$K_m \times (1 + [I]/K_I)$	V_{max}
Non competitive	$V = V'_{max}[S] / (K_m + [S])$	K_m	$V_{max} / (1 + [I]/K_I)$
Incompetitive	$V = V'_{max}[S] / (K'_m + [S])$	$K_m / (1 + [I]/K_I)$	$V_{max} / (1 + [I]/K_I)$

19.2. Inhibition irréversible

Du point de vue cinétique, un inhibiteur irréversible se comporte comme un inhibiteur non compétitif: il diminue la vitesse maximum sans toutefois modifier la K_m du substrat. La seule différence réside dans la stabilité du complexe enzyme-inhibiteur. L'inhibition non-compétitive est réversible : il suffit de dialyser la solution contenant le complexe EI), ou bien de la soumettre à une filtration sur gel pour dissocier le complexe, retrouver l'enzyme libre et, en principe, son activité. Les mêmes opérations seront sans effet si l'enzyme est associée, par exemple par liaison covalente, à un inhibiteur irréversible.

- **Agents alkylants**

Il s'agit de réactifs permettant de greffer par covalence des groupements sur les fonctions particulièrement réactives des sites actifs. Par exemple, l'iodoacétate inactive la papaïne, protéase du papayer, en réagissant avec la fonction thiolate (résidu cystéine) du site actif :



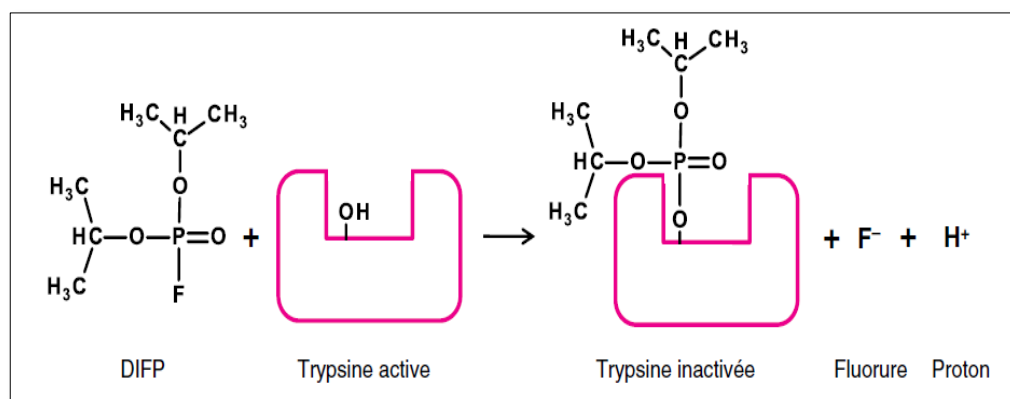
Une réaction similaire conduit à l'inactivation irréversible des protéases comme la trypsine, la chymotrypsine et des estérases comme l'acétylcholine estérase dont le site actif comporte un résidu sérine, par l'action du parahydroxymercuribenzoate (pOHMB) ou du fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). Ces deux réactifs sont utilisés au laboratoire afin de préserver les protéines purifiées de l'action éventuelle des protéases à sérine.

19.3. Inhibiteurs suicide

D'un point de vue chimique, ces inhibiteurs agissent comme les précédents, mais les inhibiteurs suicide agissent spécifiquement sur les enzymes qu'ils inactivent parce qu'ils sont reconnus comme des substrats, voire comme des analogues de l'état de transition. Par exemple, l'aspirine est un inhibiteur suicide des cyclo-oxygénases 1 et 2.

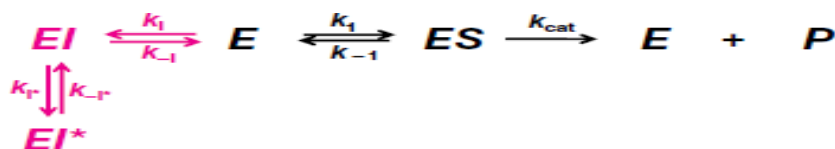
L'activité antibiotique des pénicillines et des céphalosporines est la conséquence de l'inhibition suicide des transpeptidases bactériennes, et de l'arrêt de la synthèse des peptidoglycannes des murs bactériens.

Les organophosphates, comme le *di*-isopropylfluorophosphate (DIFP) sont reconnus comme des analogues de l'état de transition des protéases et des estérases à sérine, mais en plus ils phosphorylent l'enzyme cible :



- **Analogues de l'état de transition**

Lorsqu'ils ne forment pas de liaison covalente avec le site actif, les analogues de l'état de transition se comportent comme des inhibiteurs compétitifs, car ils se fixent réversiblement sur les enzymes cibles. Toutefois, l'inhibition de ces enzymes est la conséquence de la formation d'un complexe EI, suivie d'une étape d'isomérisation au cours de laquelle la protéine change de conformation, ce qui conduit au complexe terminal EI* :



Les étapes de transconformation qui conduisent aux complexes EI*, mais surtout les dissociations de ces mêmes complexes sont particulièrement lentes ; par exemple, les temps de demi-vie des complexes EI* se chiffrent en dizaines de minutes, voire en heures, alors qu'un complexe enzyme-inhibiteur classique se dissocie totalement en l'espace de quelques millisecondes.

Aussi, compte tenu de la stabilité particulièrement élevée des complexes EI*, les inhibitions effectuées par les analogues de l'état de transition peuvent être considérées *de facto* comme des inhibitions irréversibles.

- **Inhibiteurs protéiques**

Ces molécules font partie de l'arsenal biologique assurant la régulation de l'activité des enzymes. L'inhibiteur de la trypsine, synthétisé par le pancréas, est une protéine de 6 kDa qui inactive spécifiquement la trypsine (34 kDa); ce complexe est donc très stable et il est préférable de considérer l'inhibiteur tryptique comme un inhibiteur irréversible.

20. Enzymes allostériques

Lorsqu'une protéine possède plusieurs sites de fixation pour un ligand, la saturation par ce ligand peut être Michaelienne ou non. Un comportement Michaelien est obtenu lorsque les sites sont équivalents et indépendants ; la courbe de la vitesse v en fonction de la concentration en substrat S suit alors une loi hyperbolique.

Les enzymes allostériques ne suivent pas la cinétique classique de Michaélis, la courbe $v = f(S)$ n'est pas hyperbolique mais sigmoïde. Ces enzymes jouent un rôle important dans la régulation métabolique ; ce sont des enzymes-clés.

Les sites de régulation allostérique sont des sites de liaison distincts du site actif (site catalytique) qui peuvent interagir avec des molécules de l'environnement cellulaire, appelées dans ce cas effecteurs allostériques.

(allostérie = autre structure) allos provient du grec et signifie « autre » : autre site qui fixe un ligand allostérique capable de moduler la vitesse de la réaction.

20.1 Propriétés d'autorégulation des systèmes enzymatiques

Certains systèmes multi-enzymatiques possèdent la capacité d'autorégulation. Dans la régulation allostérique, un métabolite de la voie réactionnelle peut se fixer de façon noncovalente à l'enzyme et ainsi moduler son activité catalytique. Ainsi, dans ces systèmes multienzymatiques, le produit final de la chaîne de réactions sert d'inhibiteur spécifique à une enzyme du début de la chaîne.

La rétro inhibition (feedback négatif ou inhibition par le produit final) a été mise en évidence dans de nombreux systèmes poly enzymatiques où le produit final de la réaction peut inhiber spécifiquement un enzyme se trouvant au début de la séquence réactionnelle. Tel que l'exemple dans les séquences réactionnelles de synthèse d'un aminoacide, l'isoleucine à partir de la thréonine.

La première étape de la séquence réactionnelle est appelée étape déclenchante car une fois qu'elle a lieu toutes les autres se réalisent.

La rétro inhibition est donc un phénomène d'inhibition spécifique d'un enzyme placé en début de séquence métabolique, par le produit final de séquence réactionnelle. Ce type d'enzyme inhibé par le produit final de la réaction est appelé : enzyme allostérique.

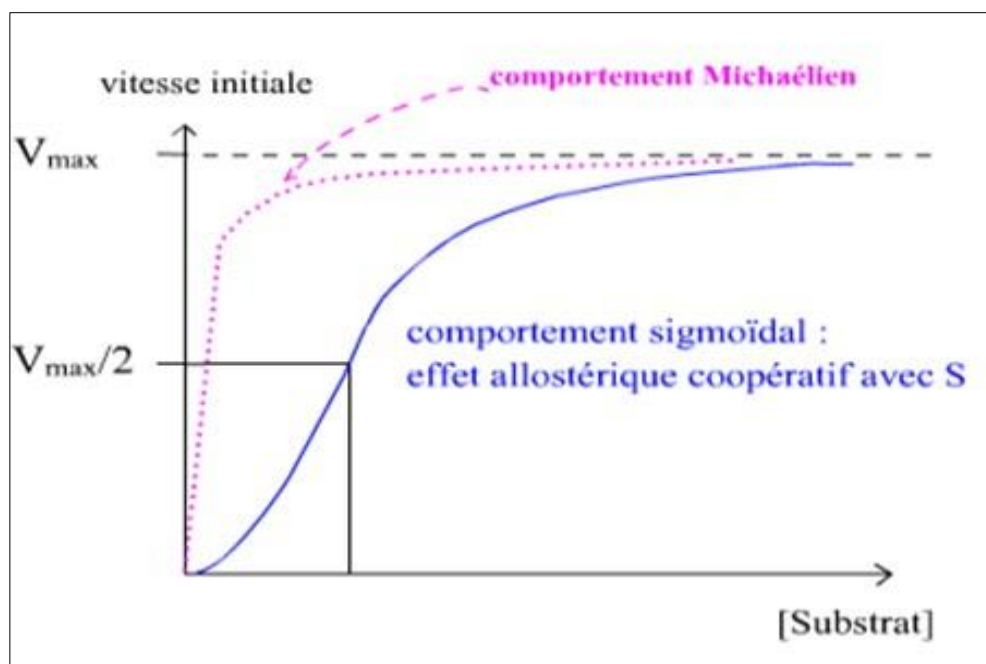


Figure 23: Relation vitesse-substrat ($v = f([S])$) : profils michaelien et allostérique

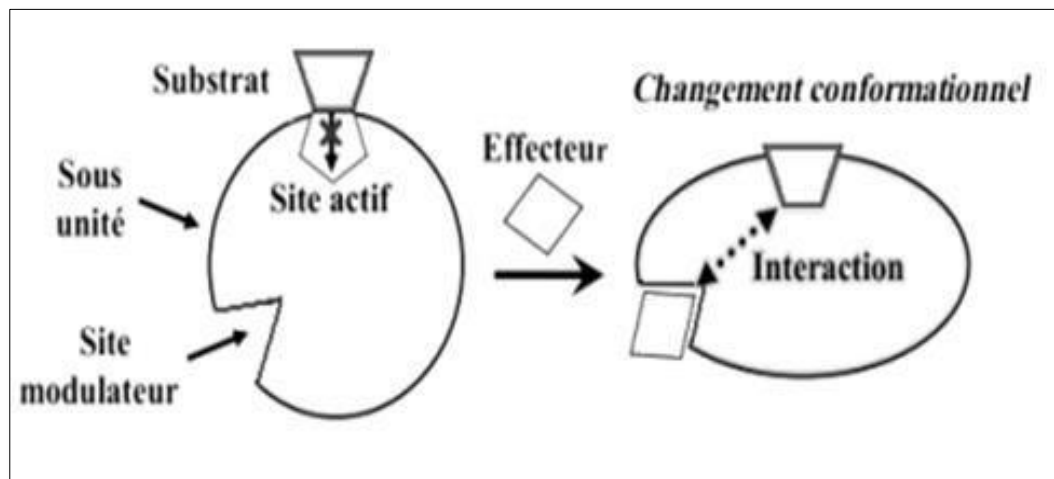


Figure 24: Représentation schématique d'une enzyme allostérique

20.2. Caracteristiques generales des enzymes allostériques

- Sont formés d'au moins 2 sous unités
- Possèdent une structure quaternaire, en effet la conformation quaternaire est responsable de l'activité régulatrice allostérique car une fois ces enzymes dénaturés ils deviennent des enzymes michaelienne
- Possèdent : site catalytique(s) + site allostérique(s)
- La liaison réversible et non covalente d'un effecteur sur le site allostérique induit un changement de la conformation de l'enzyme.
- Ces enzymes peuvent être activé ou inhibé suite à la fixation des effecteurs
- Ces enzymes jouent des rôles clef dans la régulation du métabolisme
- Les enzymes allostériques présentent souvent des courbes sigmoïdes qui donnent la vitesse de réaction V_o en fonction de la concentration en substrat $[S]$, et non pas les courbes hyperboliques prédites par l'équation de MichaelisMenten.
- Leur cinétique n'obéit pas à l'équation de MICHAELIS-MENTEN, elles ne donnent pas aux termes K_m et V_m le sens exacte qu'ils possèdent en cinétique michaelienne, on distingue:

- les enzymes de système K : l'effecteur ne modifie que l'affinité K_m de l'enzyme pour le substrat
- Les enzymes de système V: l'effecteur modifie la vitesse maximale V_m
- Les enzymes de systèmes mixtes : l'effecteur modifie la V_m et le K_m

20.3. Classification des enzymes allostériques

D'après Monod ; Wyman et Changeux (1965), on distingue 3 groupes d'enzymes de régulation :

1. Enzyme homotropiques

Le substrat dans ce groupe joue également le rôle de modulateur, il accélère l'activité enzymatique

2. Enzyme heterotropiques

Ces enzymes sont stimulés ou inhibés par des substances de régulation inhabituelles et différentes du substrat, il s'agit d'effecteurs

3. Enzyme homo-heterotropique

Dans ce groupe, les enzymes ont pour effecteurs le substrat et d'autres molécules.

20.4. Enzymes et effecteurs allostériques

La molécule qui se lie au site allostérique est appelée effectrice (elle peut aussi être appelée modulatrice) et elle régule l'activité de l'enzyme à laquelle elle se lie. L'activité de l'enzyme est augmentée lorsqu'un effecteur allostérique positif se lie au site allostérique. Tandis que l'activité de l'enzyme est diminuée lorsqu'un effecteur allostérique négatif se lie au site allostérique - ils inhibent l'enzyme.

20.5. Action des effecteurs allostérique

Ce sont des substances qui agissent comme activateurs ou inhibiteurs en modifiant la conformation des sites de liaison au substrat, ce qui change l'affinité pour le substrat.

Activateurs allostériques : Augmentent l'affinité de l'enzyme pour le substrat, lui permettant d'agir à de faible concentration en substrat
Inhibiteurs allostériques : Comme les inhibiteurs compétitifs, diminuent l'affinité de l'enzyme pour le substrat

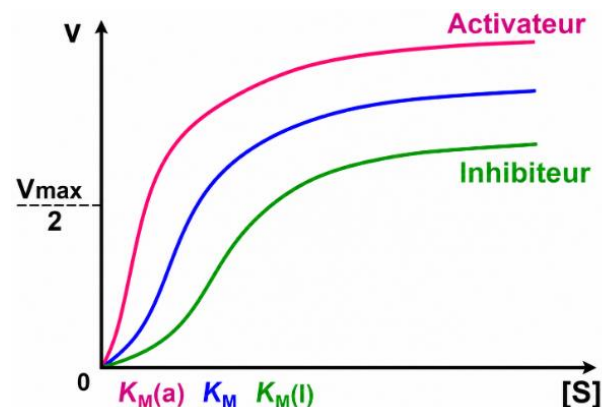


Figure 25 : Mécanisme d'action des effecteurs allostériques

20.6. Transition allostérique (notion de la forme T et R)

On distingue deux formes:

- **Une forme T (tendu)** à faible affinité pour le substrat, conformation compacte adoptée en l'absence du substrat
- **Une forme R (relâché)** à forte affinité pour le substrat, conformation plus relâchée adoptée en présence du substrat

Donc une transition allostérique est un changement conformationnel de la forme $T \rightarrow R$ ou $R \rightarrow T$ (déclenché par le substrat ou un effecteur) qui va respectivement augmenter ou diminuer l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

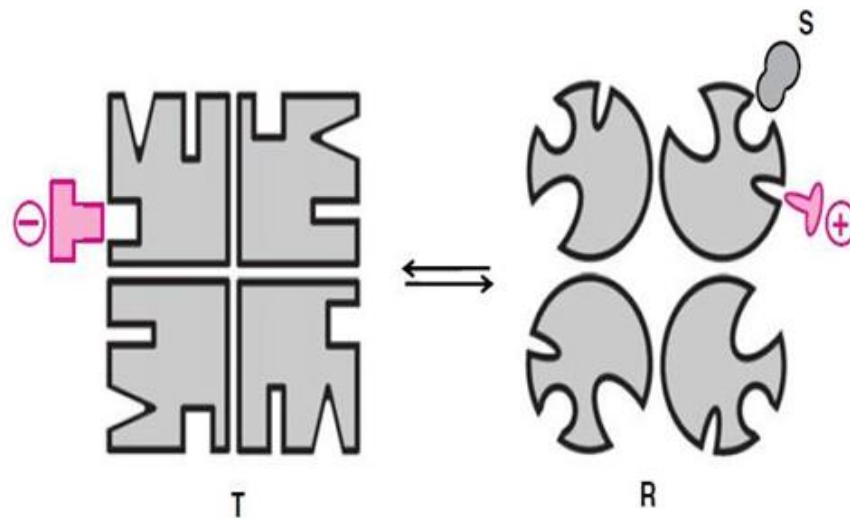


Figure 26 : Conformations T et R d'une enzyme allostérique

Exemple: L'aspartate transcarbamylase catalysant la première réaction de la voie de biosynthèse des nucléotides pyrimidiques. Elle est constituée de 6 sous-unités catalytiques maintenues en place par 6 sous-unités régulatrices. Ses substrats sont le carbamylphosphate et l'aspartate, se fixant successivement l'un après l'autre pour aboutir aux produits: enzyme + carbamylaspartate + phosphate.

L'aspartate transcarbamylase possède 3 axes de symétrie : un principal vertical et deux autres horizontaux secondaires. Sous forme T, sans substrat, la molécule est repliée. L'ajout d'aspartate permet la transition à la forme R (relâchée) par la rotation des sous-unités régulatrices autour de leurs axes de symétrie.

L'ACTase est activée par l'ATP et inhibée par le CTP

Le CTP maintiendrait les sous-unités à l'état T (inhibition), alors que l'ATP les maintiendrait à l'état R (stimulation) Une transition de T à R favorisée par la liaison du substrat à un site augmentera l'activité enzymatique des cinq sites restants, ce qui conduit à une augmentation globale de l'activité enzymatique.

Cette importante propriété est appelée coopérativité, parce que les sous-unités coopèrent les unes avec les autres. Lorsqu'une sous-unité change de conformation, toutes les autres font de même.

21. Modulation allostérique

21.1. Effets de coopérativités

- **Effet homotrope**

Se définit par le changement conformationnel de l'enzyme suite à la fixation du substrat lui-même sur le site allostérique. S'il y a augmentation de l'affinité pour le substrat (transition $T \rightarrow R$) on parle d'effet homotrope positif ; la fixation du substrat va entraîner la fixation d'autres molécules de substrat « l'appétit vient en mangeant ». S'il y a diminution de l'affinité pour le substrat on parle d'effet homotrope négatif; la fixation du substrat va inhiber la liaison d'autres molécules de substrat (phénomène plus rare).

- **Effet hétérotrope**

Cet effet permet d'expliquer des réponses positives ou négatives des enzymes à certains effecteurs chimiques. Il se définit par la modification de l'affinité de l'enzyme pour son substrat suite à la fixation sur le site allostérique de molécules sans apparenté structurel avec le substrat, ces molécules sont appelées « effecteurs allostériques »

- Lorsque ces effecteurs favorisent la fixation du substrat ($T \rightarrow R$) : On parle d'effecteurs hétérotropes positifs ou activateurs allostériques.
- Lorsque ces effecteurs inhibent la fixation du substrat (maintiennent la conformation T ou R ou $R \rightarrow T$) → effecteurs hétérotropes négatifs ou inhibiteurs allostériques.

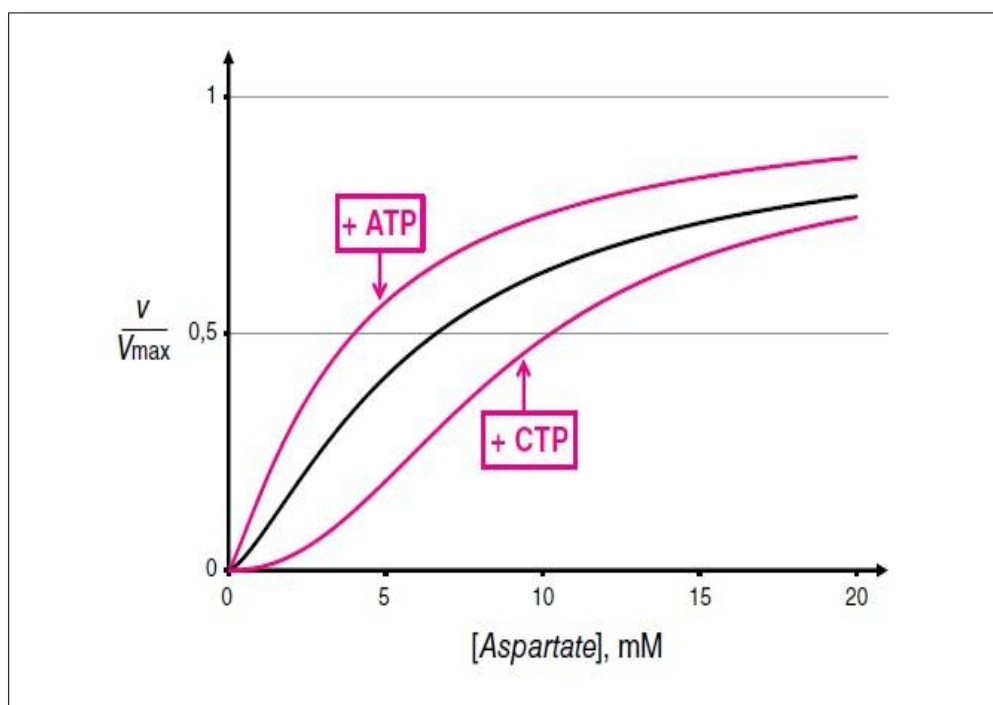


Figure 27 : Modulation allostérique de l'enzyme ATCase

22. Importance de la regulation allostérique

La régulation allostérique joue un rôle très important dans la vie cellulaire. Elle permet de moduler la synthèse ou la dégradation d'un composé en fonction de sa concentration et d'adapter ainsi le métabolisme de la cellule à ses besoins du moment. La rétro-inhibition (feedback) empêche l'accumulation des produits synthétisés alors que les activateurs allostériques favorisent la synthèse d'un composé important dont la concentration devient relativement insuffisante dans le milieu cellulaire.

23. Influence des facteurs physicochimiques

23.1. Influence du pH

Le pH joue sur l'ionisation des molécules : la conformation de la protéine enzymatique ; la disponibilité des fonctions chimiques de l'enzyme et / ou du substrat (i.e. le substrat réel doit être sous une certaine forme, qui n'est pas nécessairement la forme de la neutralité).

En général, à 2 unités du pH optimum, l'activité est réduite 100 fois, mais parfois la gamme est beaucoup plus restreinte. Valeurs extrêmes : il faut les atteindre pour qu'il y ait une dénaturation de l'enzyme par attaque acide ou basique, sinon, le plus souvent, c'est une inhibition réversible.

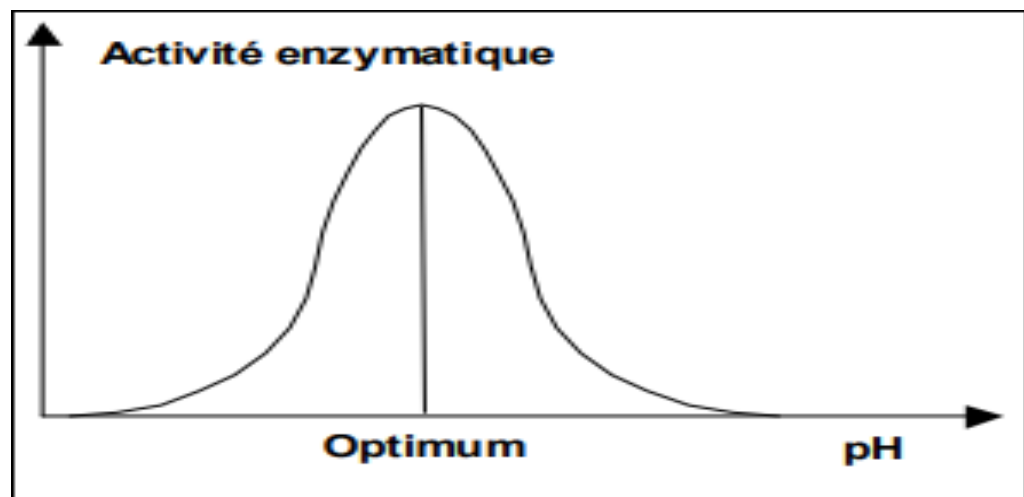


Figure 28 : Influence du pH sur l'activité enzymatique

23.2. Influence de la température

- i. **Augmentation de la température** : on fournit de l'énergie au système. Q_{10} = facteur d'augmentation de l'activité quand on augmente de 10°C $\rightarrow Q_{10} \neq 2$
- ii. **Dénaturation** : la température à laquelle elle intervient peut varier, mais seules quelques exceptions s'éloignent vraiment de la gamme $40 - 60^{\circ}\text{C}$ (protéines thermostables).

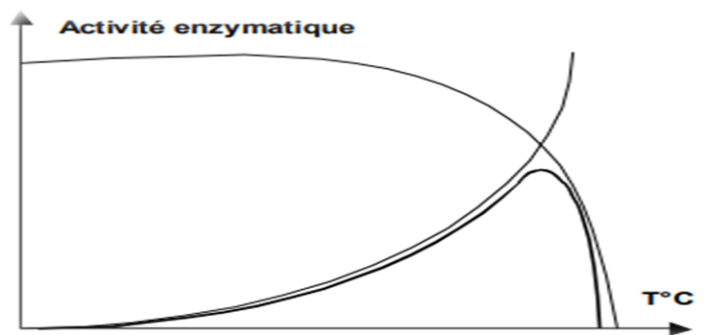


Figure 29: Effet de la température sur l'activité enzymatique

23.3. Effet du force ionique

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

- Certaines enzymes nécessitent des activateurs (ions métallique)
- Solubilité maximale pour une concentration faible en sels neutres

23.4. Effet de radiation

Les émissions radioactives α , β , γ , rayons X, et les neutrons peuvent directement ou indirectement entraîner l'inactivation des enzymes: Direct: Ionisation des molécules Indirect:

Ionisation du milieu réactionnel Formation de radicaux libres qui attaquent les enzymes

23.5. Influence des agents chimiques

i. Définition d'un effecteur

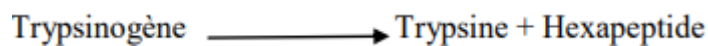
Est tout corps chimique, minéral ou organique capable de modifier la cinétique des réactions enzymatiques Il peut être soit activateur ou inhibiteur

ii. Activateurs enzymatiques

Est tout agent chimique, qui par sa liaison avec l'enzyme accélère la vitesse de la réaction enzymatique

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}
- 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 le rend actif



Activation par fixation covalente d'un groupement chimique: Par addition d'un groupement chimique, le plus souvent le phosphate



Phosphorylation d'un résidu
séryl par une kinase:
Phosphorylase b kinase

24. Exercices avec corrigés

Exercice 1

1. Définissez « enzyme »

Une enzyme est un catalyseur biologique de nature protidique. C'est-à-dire une protéine qui permet d'augmenter la vitesse d'une réaction chimique, qui serait possible sans elle, mais qui se ferait alors à une vitesse faible, incompatible avec les exigences des phénomènes vivants. Les réactions catalysées sont 10³ à 10⁷ fois plus rapides qu'elles ne le seraient sans l'enzyme. Une enzyme se retrouve non modifiée à la fin de la réaction, elle ne fait donc pas partie du bilan réactionnel.

De plus, se retrouvant intacte en fin de réaction, elle est alors disponible pour catalyser une nouvelle réaction, ce qui explique qu'elle soit active à faible concentration.

2. Comment nomme-t-on les réactifs d'une réaction enzymatique ?

Les substrats

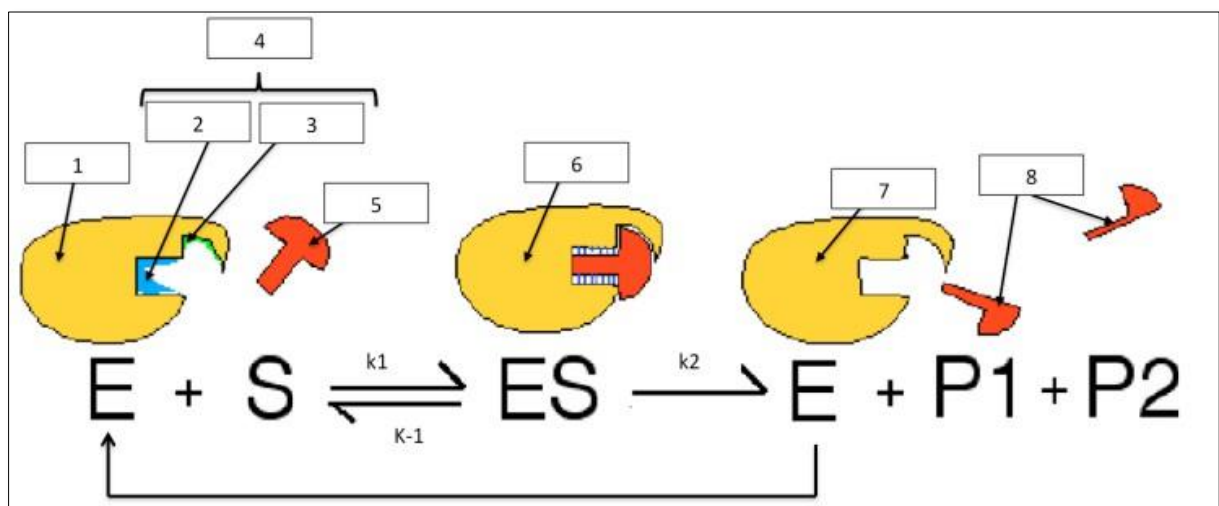
3. Comment nomme-t-on les composés résultant de la réaction enzymatique ?

Les produits.

4. Comment nomme-t-on l'action de l'enzyme ?

La catalyse enzymatique.

5. Titrez et légendez la figure suivante. Puis, décrivez la structure n°4. Enfin, décrivez les différentes étapes de la réaction illustrée.



Titre : Les différentes étapes de la réaction enzymatique.

1 : enzyme

2 : site catalytique

3 : site de reconnaissance

4 : site actif

5 : substrat

6 : complexe enzyme-substrat

7 : enzyme intacte

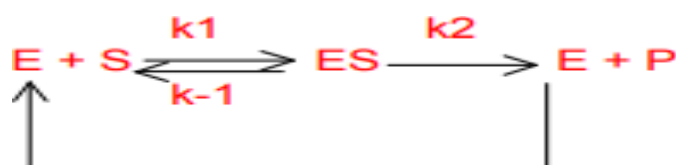
8 : produits.

La structure n°4 est le **site actif de l'enzyme**, région précise de l'enzyme où son substrat vient se fixer, est reconnu et catalysé. Celui-ci correspond à un repliement spatial de la protéine montrant une complémentarité spatiale avec le substrat. Ce site actif est constitué :

- **D'un site de fixation ou site de reconnaissance**, fixant le substrat. Les groupements entre substrat et enzyme établissent des liaisons faibles (Liaison hydrogènes, hydrophobes et ioniques) maintenant un contact étroit. Il n'y a pas de gêne stérique : le substrat est parfaitement complémentaire d'un point de vue spatial au site actif de l'enzyme (comme une clé et sa serrure).
- La fixation du substrat à ce site va induire un léger changement de conformation du site actif qui devient apte à catalyser la réaction. Cette reconnaissance dynamique est nommée adaptation induite.
- **D'un site catalytique**, n'exécutant qu'un seul type de transformation du substrat en produit.

La réaction enzymatique peut se diviser en 3 étapes :

1. La formation du complexe ES : L'enzyme (E) et le substrat (S) s'associent.
2. Le complexe ES subit un réarrangement interne qui va permettre la transformation du substrat en produit (P) => adaptation induite.
3. L'enzyme libère le produit, et retrouve son état initial (et, peut donc repartir dans une nouvelle réaction enzymatique). L'équation de cette réaction est :



Avec :

k = constante de vitesse.

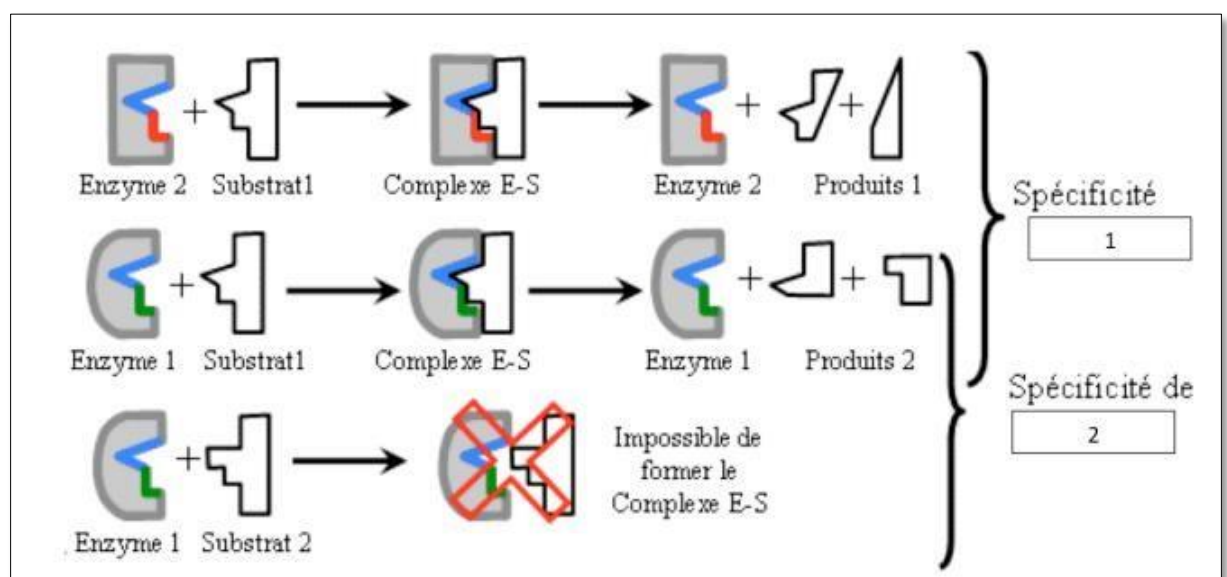
k_1 = constante de vitesse de formation du complexe ES

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

k_2 = constante de vitesse de formation de P = « Turn over » = nombre de cycles catalytiques par seconde.

Exercice 2

Après avoir titré et légendé la figure suivante, expliquez ce qu'elle présente.



Titre : la double spécificité enzymatique

1 : d'action

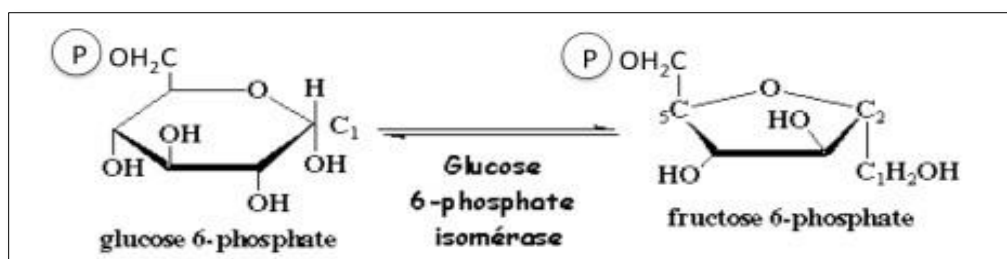
2 : de substrat.

La double spécificité enzymatique découle en fait de la constitution du site actif. Cette fixation, au niveau du site de reconnaissance, est basée sur **une stricte complémentarité tridimensionnelle entre l'enzyme et son substrat**. De ce fait, **il existe une spécificité de l'enzyme pour son substrat ; on parle de spécificité de substrat**.

D'autre part, le site catalytique d'une **enzyme ne catalyse qu'un seul type de réaction**. Il s'agit ici d'une **spécificité d'action**.

Exercice 3

À partir de la figure suivante, expliquez la nomenclature sur le nom d'une enzyme



Le nom de la plupart des enzymes est basé sur sa **double spécificité**. Il est construit sur le modèle suivant :

Nom du substrat.....Type de réaction.....ase

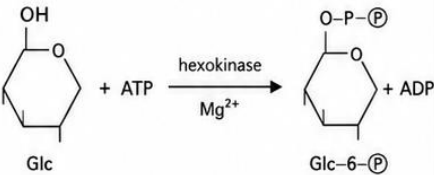
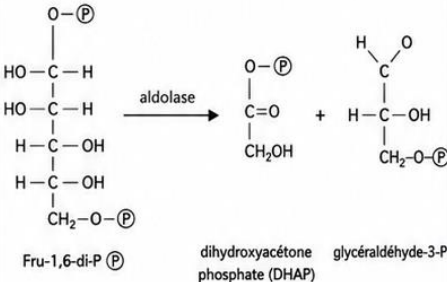
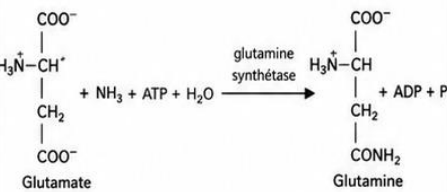
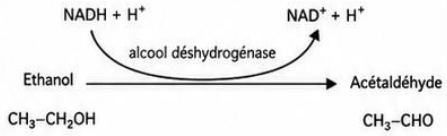
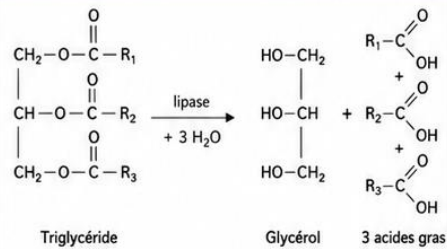
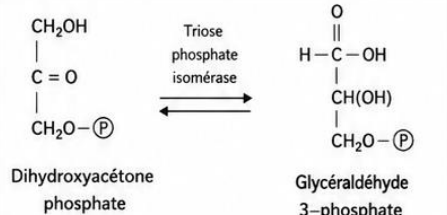
Ex : Glc-6-Pisomér.....ase

Glc-6-P isomérase

Certaines enzymes sont néanmoins désignées par leur **nom usuel**, comme par exemple la **pepsine**, une **endo-peptidase digestive** qui hydrolyse les liaisons peptidiques des protéines.

Exercice 4

Complétez le tableau suivant présentant la nomenclature EC basée sur la spécificité d'action des enzymes.

Réaction catalysée	Description	Exemple	Spécificité d'action	Classe de l'enzyme (EC)
$A-X + B \rightarrow A + B-X$	Transfert d'un atome ou d'un groupement d'atomes.	 Glc + ATP $\xrightarrow[\text{Mg}^{2+}]{\text{hexokinase}}$ Glc-6-P + ADP	Transférases	2
$A-B \rightarrow A + B$	Réaction lytique de clivage/rupture de liaison d'une liaison covalente (non hydrolytique sans H₂O) et non oxydative (sans oxydoréduction).	 Fru-1,6-di-P $\xrightarrow{\text{aldolase}}$ dihydroxyacétone phosphate (DHAP) + glycéraldéhyde-3-P	Lyases	4
$A + B \rightarrow A-B$	Condensation, ou formation d'une liaison covalente. Cette réaction nécessite de l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP.	 Glutamate + NH₃ + ATP + H₂O $\xrightarrow{\text{glutamine synthétase}}$ Glutamine + ADP + P_i	Ligases	6
$A + B \rightarrow A^{\circ} + B^{\circ}$	Oxydo-réduction, à transferts d'électrons (e⁻) et de protons (H⁺).	 Ethanol (CH₃-CH₂OH) $\xrightarrow{\text{alcool déshydrogénase}}$ Acétaldéhyde (CH₃-CHO) + NADH + H⁺	Oxydoréductases	1
$A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$	Hydrolyse, ou clivage, rupture d'une liaison covalente. Cette réaction nécessite la présence de l'eau dans les substrats.	 Triglycéride + 3 H₂O $\xrightarrow{\text{lipase}}$ Glycérol + 3 acides gras	Hydrolases	3
$A \rightarrow B$, isomérisie de A	Réaction d'isomérisie, à réarrangements intramoléculaires.	 Dihydroxyacétone phosphate $\xrightleftharpoons{\text{triose phosphate isomérase}}$ Glycéraldéhyde 3-phosphate	Isomérases	5

Exercice 5

1. Qu'est-ce qu'une cinétique enzymatique ?

La cinétique enzymatique traduit l'activité d'une enzyme.

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes de la réaction enzymatique, en étudiant leur vitesse c'est-à-dire leur évolution en fonction du temps. Elle permet de décrire quantitativement les propriétés catalytiques des enzymes et les mécanismes mis en place pour leur régulation.

2. Lorsqu'on effectue une cinétique enzymatique, que signifie « se placer en concentration de substrats saturante, condition non limitante » ?

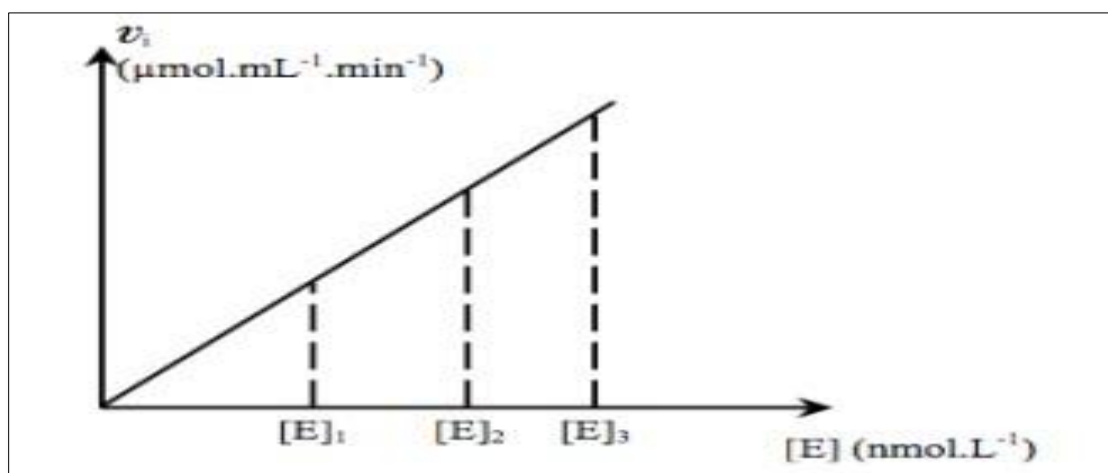
C'est-à-dire que le substrat est en excès. Sa concentration ne limitera pas la réaction enzymatique. Autrement dit, $[S] \gg [E]$.

3. Lorsqu'on effectue une cinétique enzymatique, que signifie « se placer en concentration d'enzymes non saturante, condition limitante » ?

C'est-à-dire que la concentration d'enzymes est fixe. Cette concentration va limiter la réaction enzymatique.

4. Que mesure-t-on pour déterminer la vitesse de la réaction enzymatique à un temps donné ? On mesure la quantité de produit formé (On peut aussi mesurer la quantité de substrat disparu) à l'instant t . Puis, on calcule la vitesse de la réaction à un temps donné, avec $V = d(P)/dt$.

5. Que traduit le graphique ci-dessous ? Dans quelles conditions expérimentales a-t-il été réalisé ?

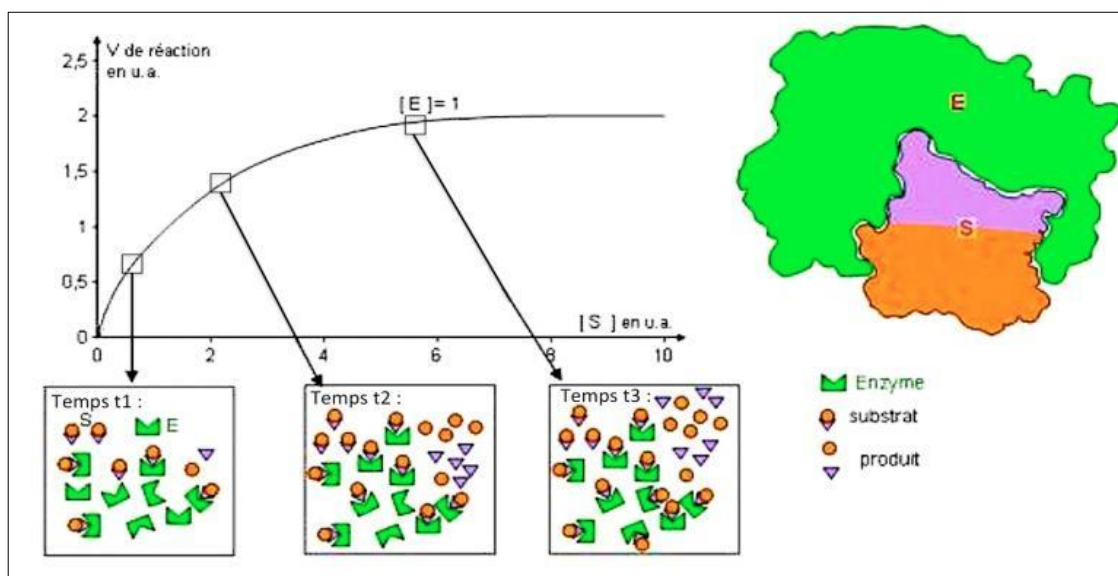


Ce graphique traduit l'effet de la concentration en enzyme sur la cinétique enzymatique. Plus la concentration en enzyme est importante, plus la vitesse augmente.

Conditions expérimentales : [S] limitante, non saturante et [E] non limitante et saturante.

Exercice 6

À partir de la figure ci-dessous, expliquez dans quelles conditions expérimentales a été effectué cette cinétique d'une enzyme michaelienne ou non allostérique. Quelle est l'allure de la courbe ? Puis, décrivez les différentes étapes expliquant l'allure de cette courbe.



Conditions expérimentales : [E] limitante, non saturante et [S] non limitante et saturante.

Allure de la courbe : hyperbole.

- Dans un premier temps (temps t_1), la vitesse augmente proportionnellement à la concentration en substrat.
- Dans un deuxième temps (temps t_2), la vitesse tend vers un plateau de saturation. Lorsque la vitesse des réactions enzymatiques n'augmente plus alors qu'il y a de plus en plus de substrat (temps t_3), on a atteint la vitesse maximale de la réaction (V_{max}), car tous les sites catalytiques des enzymes sont occupés. On dit que l'enzyme est saturée en substrat.

Exercice 7

1. Définissez la V_{max} .

Lorsque la vitesse des réactions enzymatiques n'augmente plus alors qu'il y a de plus en plus de substrat, on a atteint la V_{max} , vitesse maximale.

Tous les sites catalytiques des enzymes sont occupés. On dit que l'enzyme est saturée en substrat ; on a atteint le plateau de saturation.

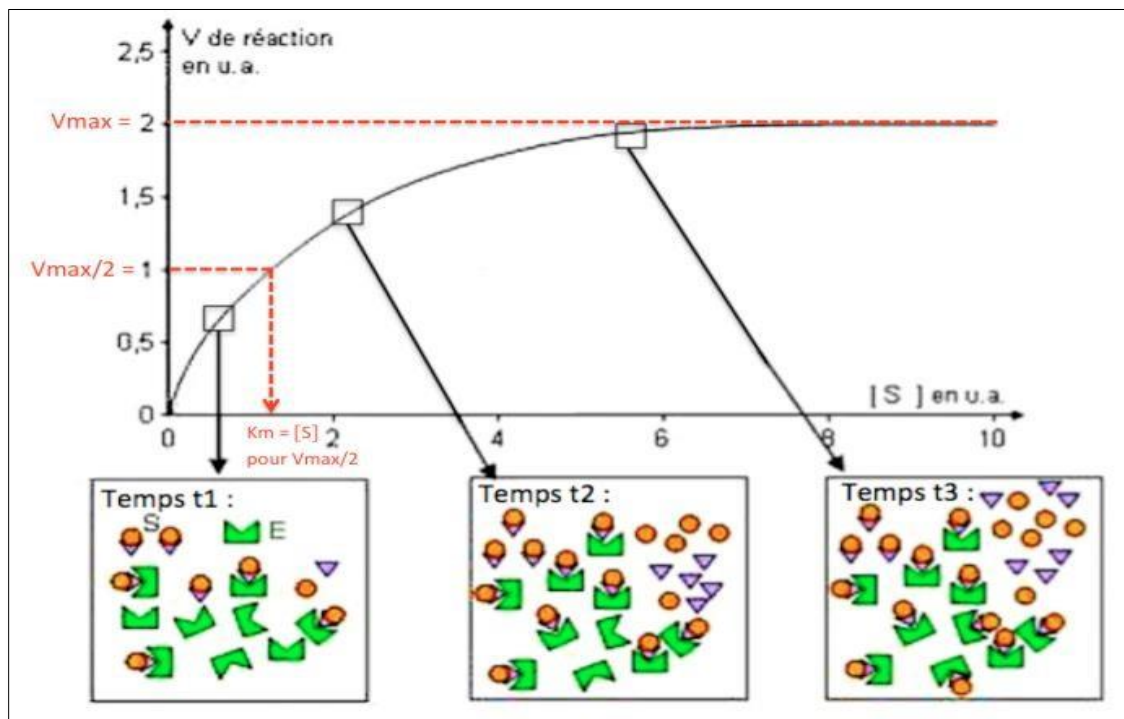
La V_{max} s'exprime en unités internationales (1 UI = 1 μmol de produit formé par minute) ou en kat (1 kat = 1 μmol de produit formé par seconde).

2. Définissez le K_m .

K_m est la constante de Michaelis. Il s'agit de la constante d'équilibre de dissociation du complexe ES. Elle traduit l'affinité de l'enzyme pour son substrat. L'affinité représente la facilité qu'à un substrat de se lier à une enzyme. Ainsi, plus le K_m est grand, plus le complexe ES a tendance à se dissocier, et donc moins l'enzyme a d'affinité pour le substrat. Le K_m est donc inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

Le K_m peut également être défini comme la concentration en substrat pour laquelle $V = V_{max}/2$.

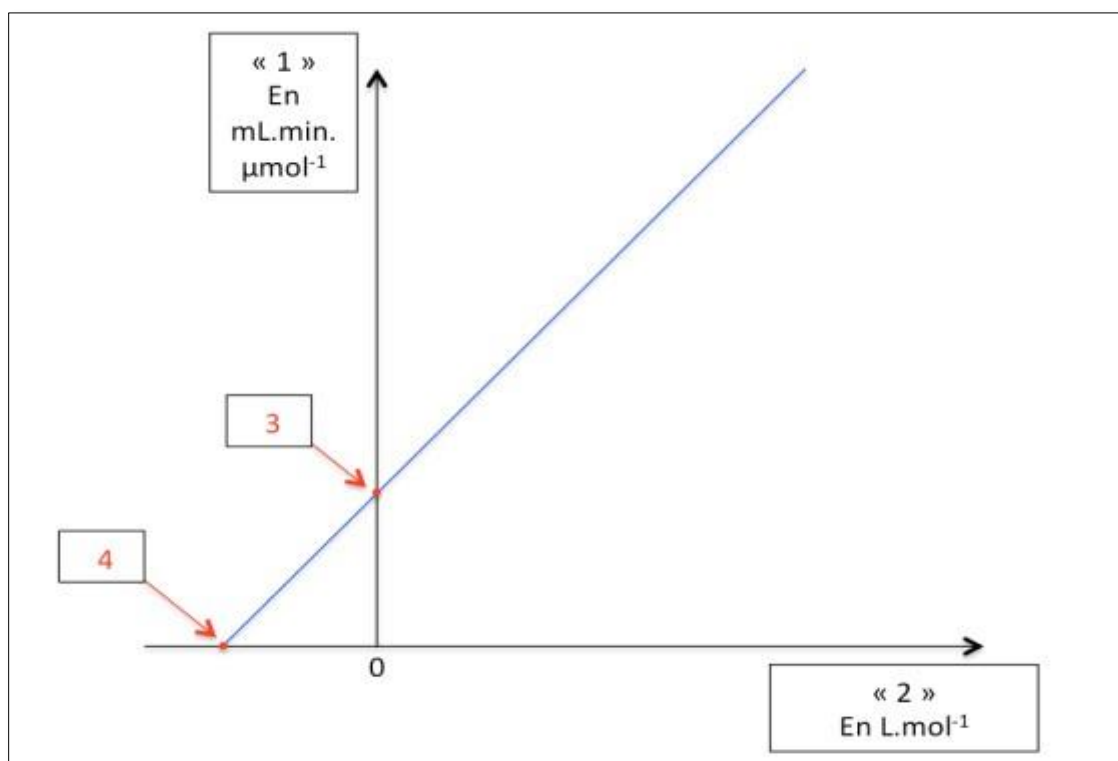
3. Déterminez les 2 paramètres cinétiques. Quel est leur intérêt ?



D'où $V_{max} = 2$ u.a. Et $K_m =$ environ 1,3 u.a. L'activité d'une enzyme pour un substrat donné est déterminée par la V_{max} et le K_m , les deux principaux paramètres cinétiques.

Exercice 8

Titrez et légendez le graphique suivant. Puis, donnez les calculs pour déterminer les 2 paramètres cinétiques.



Titre : Représentation de la cinétique enzymatique en double inverse, représentation de Lineweaver-Burk.

1. : $1/V$
2. : $1/[S]$
3. : $1/V_{\text{max}}$
4. : $-1/K_m$

La droite coupe l'axe des abscisses en $-1/K_m$ et l'axe des ordonnées en $1/V_{\text{max}}$ permettant de déterminer rapidement ces deux paramètres cinétiques, et donc l'activité de l'enzyme.

Calcul pour trouver la V_{max} :

$$1/V_{\text{max}} = X \text{ mL.min.}\mu\text{mol}^{-1}$$

$$\text{D'où } V_{\text{max}} = 1/X \mu\text{mol/mL/min}$$

Calcul pour trouver le K_m :

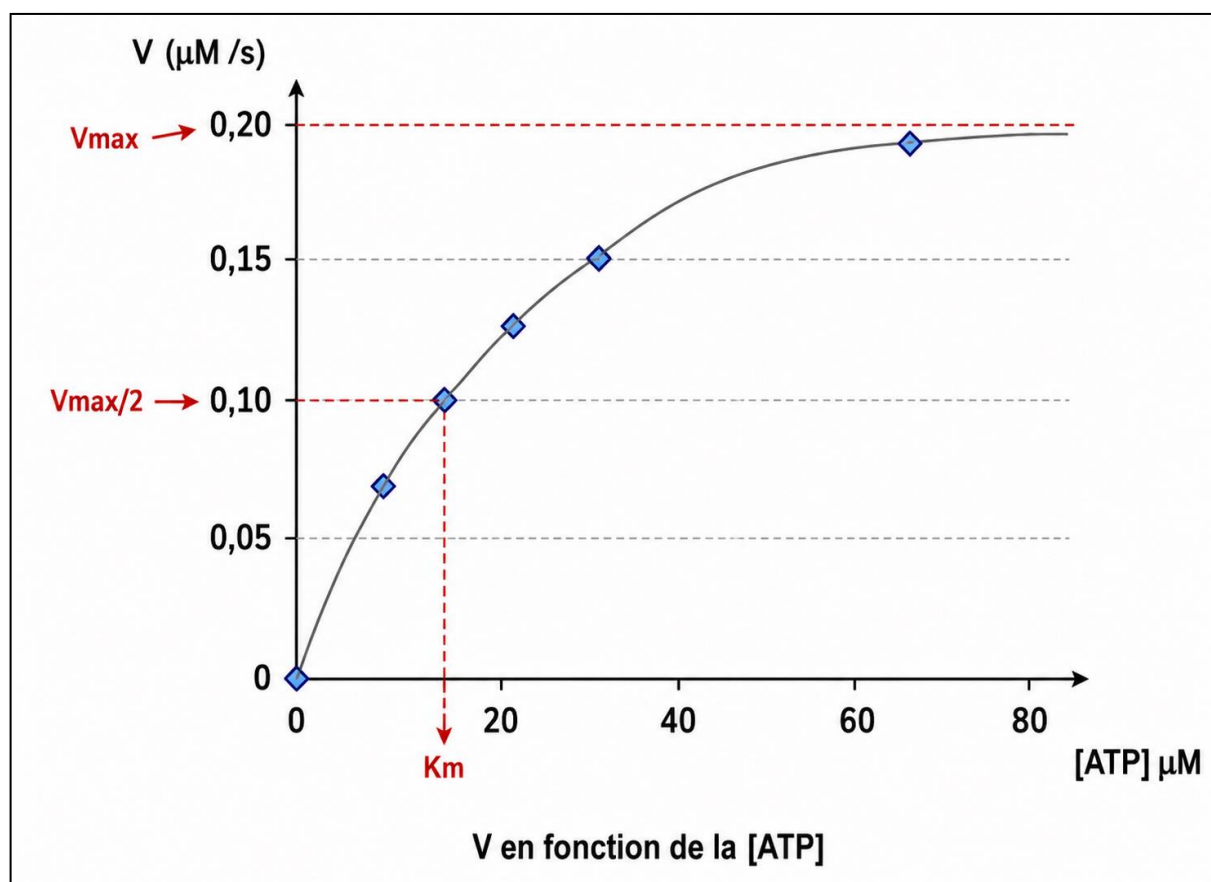
$$-1/K_m = -Y \text{ L.mol}^{-1} \quad \text{D'où } 1/K_m = Y \text{ L.mol}^{-1} \quad \text{D'où } K_m = 1/Y \text{ mol/L}$$

Exercice 9

L'étude de la déphosphorylation d'un substrat par un enzyme, expérience réalisée à température constante et pH donné, et avec une concentration d'ATP non limitante devant la concentration d'enzyme, donne les résultats suivants :

[ATP] μM	75	12.5	20.1	32.5	62.5
V ($\mu\text{M} / \text{s}$)	0.067	0.095	0.12	0.15	0.185

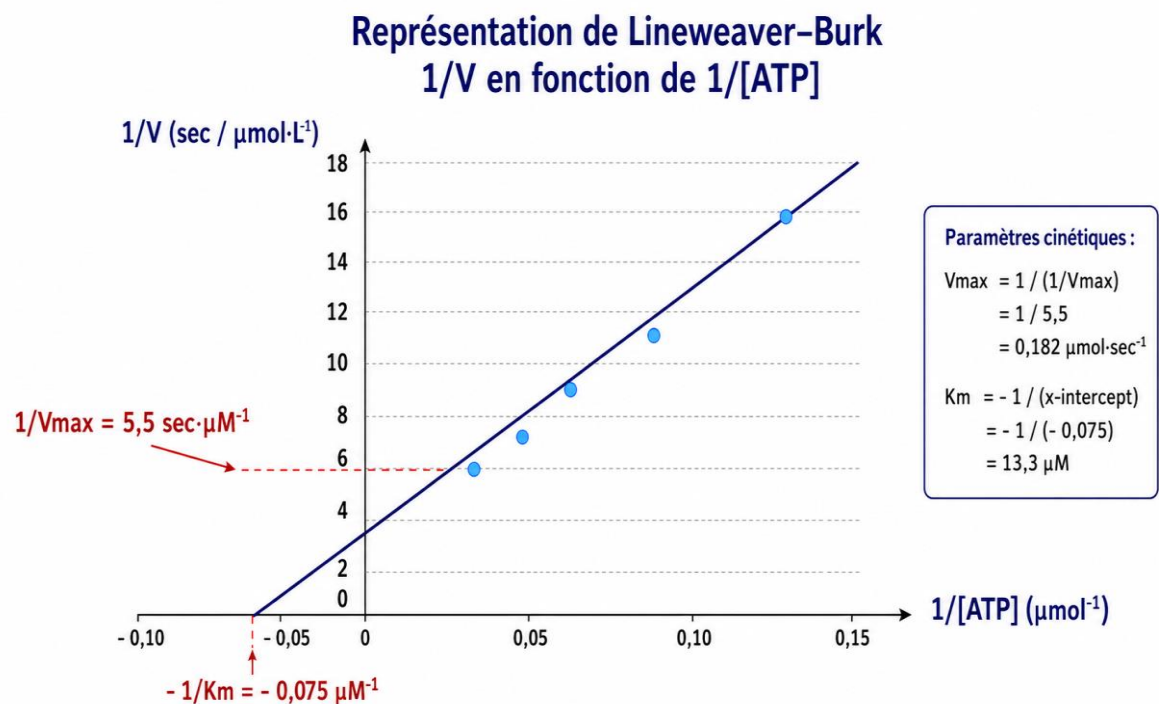
- Tracez le graphique V en fonction de la [ATP].
- Reportez les 2 paramètres cinétiques, V_{max} et K_m , sur votre graphique.
- Réalisez la représentation en double inverse.



Après calcul, on trouve :

1/[ATP] en μmol^{-1}	0.13	0.08	0.05	0.032	0.016
1/V en (sec / μmol^{-1})	15.63	10.52	8.33	6.66	5.4

D'où :



- a. Reportez les 2 paramètres cinétiques, $V_{\max}$ et K_m , sur votre graphique, puis déterminez-les par le calcul.

Calcul pour trouver la $V_{\max}$:

$$1/V_{\max} = 5,5 \text{ sec}\cdot\mu\text{M}^{-1} \quad \text{D'où } V_{\max} = 1/5,5 \mu\text{M}/\text{sec}$$

$$\text{D'où } V_{\max} = \text{environ } 1,8 \cdot 10^{-1} \mu\text{M}/\text{sec}$$

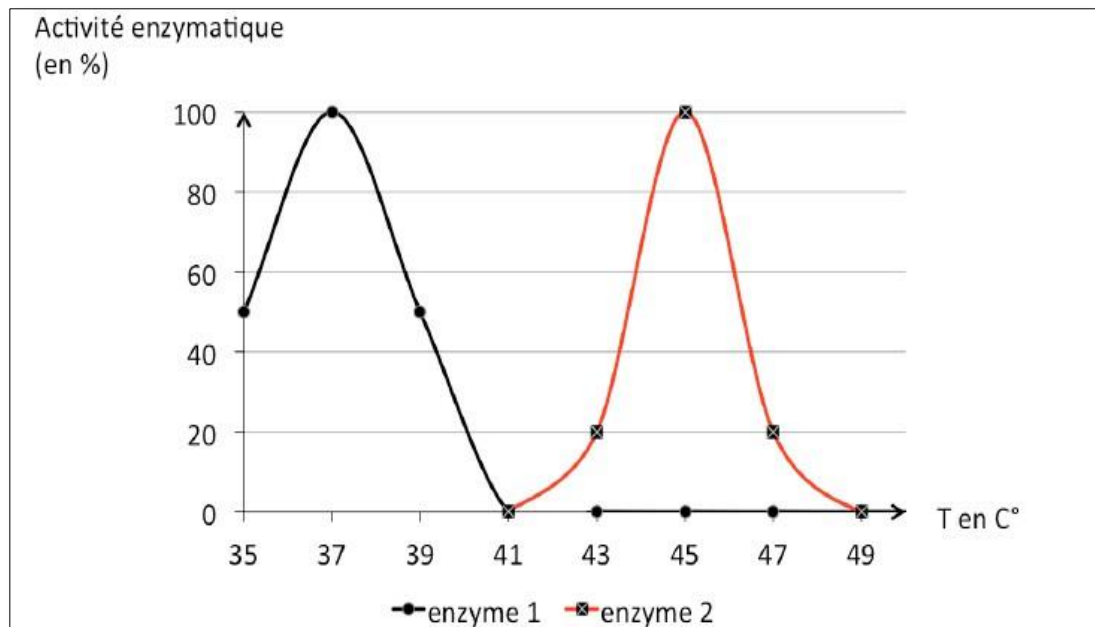
Calcul pour trouver le K_m :

$$- 1/K_m = - 0,075 \mu\text{M}^{-1} \quad \text{D'où } 1/K_m = 0,075 \mu\text{M}^{-1} \quad \text{D'où } K_m = 1/0,075 \mu\text{M}$$

$$\text{D'où } K_m = \text{environ } 13 \mu\text{M}.$$

Exercice 10

Expliquez l'effet de la température sur l'activité enzymatique des enzymes 1 et 2.



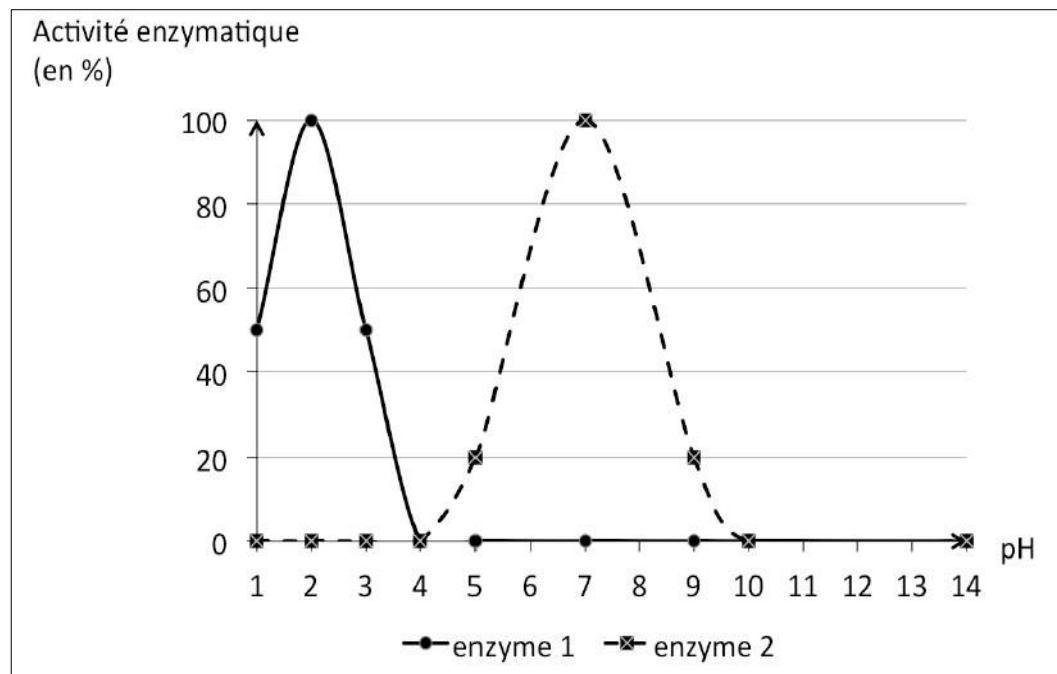
- ✓ Dans un premier temps, L'activité enzymatique augmente en même temps que la température car **l'agitation thermique** créée par l'augmentation de température favorise la rencontre de l'enzyme et de son substrat et donc, la formation du complexe ES. La **température optimale est celle où l'activité de l'enzyme est optimale** (100% d'activité enzymatique).
- ✓ Puis, dans un deuxième temps, la vitesse de la réaction chute rapidement pour devenir nulle.

L'enzyme **perd son activité catalytique** car elle est **dénaturée** ; elle **perd sa conformation spatiale par perte des liaisons faibles**.

- Dans le cas de l'enzyme 1, sa **température optimale est à 37°C**. Elle peut être une enzyme humaine, par exemple.
- Dans le cas de l'enzyme 2, sa **température optimale est à 45°C**.

Exercice 11

Expliquez l'effet du pH sur l'activité enzymatique des enzymes 1 et 2.



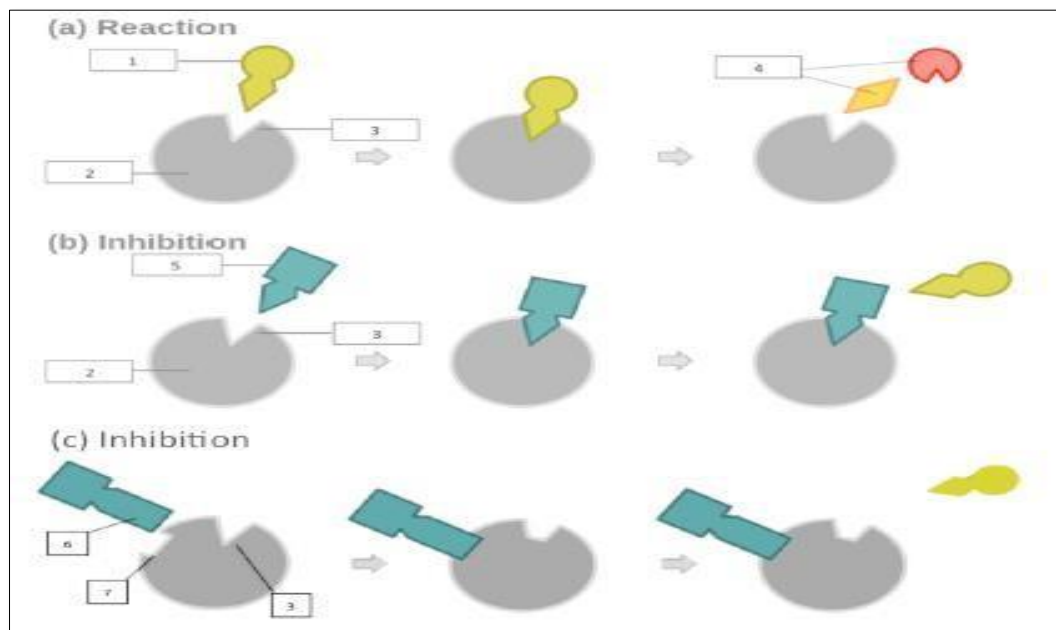
De la même manière que pour la température, **lorsqu'on atteint 100% d'activité enzymatique**, le pH correspondant est le **pH optimal**. Lorsque l'on s'éloigne de ce pH optimal, l'activité enzymatique diminue très vite. Ceci est dû au fait que l'enzyme possède des **groupements ionisés dans son site actif** nécessaire à son activité catalytique, et que la **stabilisation du complexe ES** est due en partie à la **formation de liaisons ioniques**.

Les changements de pH vont changer l'ionisation des AA du site actif, et faire **perdre ces liaisons ioniques**.

- Dans le cas de l'enzyme 1, son **pH optimal est à 2**. Elle peut être une enzyme gastrique par exemple.
- Dans le cas de l'enzyme 2, son **pH optimal est à 7**. Elle peut être une enzyme pancréatique par exemple.

Exercice 12

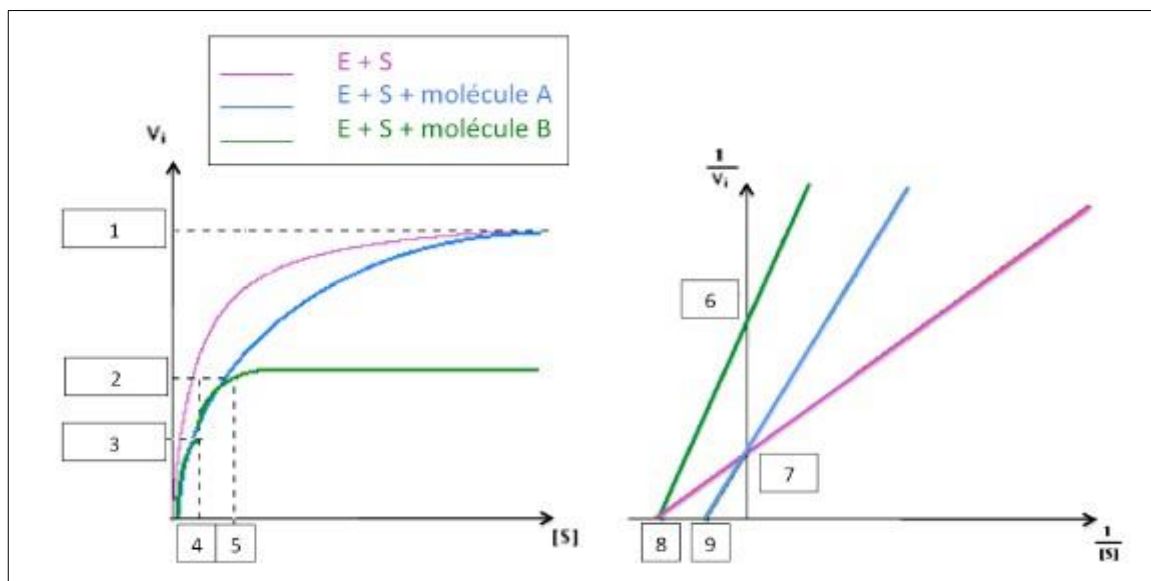
Légendez la figure suivante :



1. : Substrat
2. : enzyme
3. : site actif
4. : produit
5. : inhibiteur compétitif (analogue structural du substrat, fixation réversible)
6. : inhibiteur non compétitif (aucune analogie avec le substrat, en général. Fixation irréversible).
7. : Site de fixation de l'inhibiteur non compétitif.

Exercice 13

Après avoir légendez les graphiques ci-dessous, analysez-les et interprétez sur l'effet des molécules A et B. Vous l'expliquerez en détails (notamment avec des équations



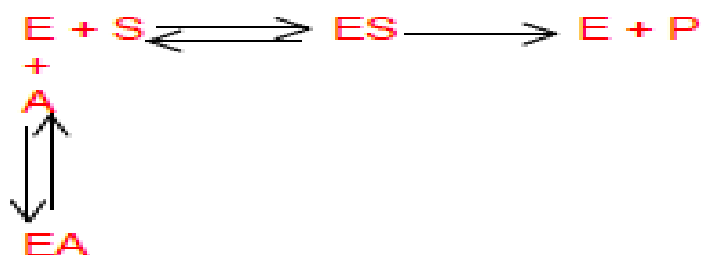
1. : $V_{\max} = V_{\max} A$
2. : $V_{\max}/2 = V_{\max} A/2$ et $V_{\max} B$
3. : $V_{\max} B/2$
4. : $K_m = K_m B$
5. : $K_m A$
6. : $1/V_{\max}$
7. : $1/V_{\max} = 1/V_{\max} A$
8. : $-1/K_m = -1/K_m B$
9. : $-1/K_m A$

En présence de la molécule A :

Le **K_m** est **augmenté** ($K_m A > K_m$), l'**affinité** de l'enzyme pour le substrat est donc **diminuée** en présence de la molécule A. La **réaction** est par conséquent **plus lente**.

La **$V_{\max}$** est **inchangée** ($V_{\max} A = V_{\max}$). Mais, elle est plus longue à atteindre.

Ces résultats sont caractéristique d'**un inhibiteur compétitif** tel que :

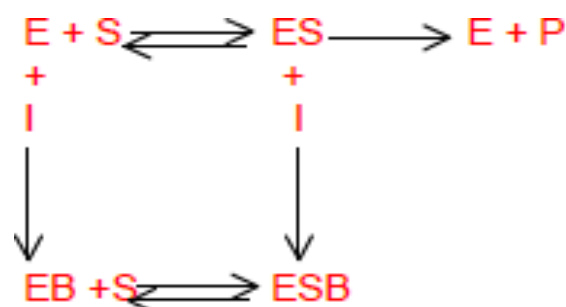


L'occupation du site actif par l'inhibiteur n'est pas définitive. La **formation du complexe EA** est **réversible**. Composés présentent une analogie structurale.

De ce fait, le site actif de l'enzyme le reconnaît comme un substrat, mais ne peut pas le transformer. La molécule A rentre donc en compétition avec le substrat pour l'occupation du site actif, d'où son nom. Cette fixation est **réversible**.

- **En présence de la molécule B :**

Le **Km est inchangé** ($K_m B = K_m$), l'**affinité** de l'enzyme pour le substrat reste donc la **même en présence de la molécule B**. La **Vmax est diminuée** ($V_{max} B < V_{max}$) en présence de la molécule B. Ces résultats sont caractéristique **d'un inhibiteur non compétitif** tel que :



La fixation du substrat au site actif n'étant pas perturbée, la formation du complexe ES n'est pas modifié.

La V_{max} correspond à la vitesse atteinte lorsque toutes les molécules d'enzyme sont sous la forme du complexe ES. Or, le nombre de complexes ES diminué à la faveur des complexes EB. En effet, un **inhibiteur non compétitif** n'a, en général, **aucune analogie avec le substrat**. Le substrat peut donc se fixer au site actif, il n'y a pas de compétition. Par contre, l'inhibiteur non compétitif se combine avec l'enzyme de manière **irréversible**, covalente et stable, et cette fixation **dénature le site actif**

Exercice 14

Complétez le tableau suivant :

	Inhibiteur compétitif	Inhibiteur non compétitif
Fixation avec l'enzyme :	En compétition avec le S, mais réversible	Pas de compétition avec le S, mais irréversible
Km :	Augmenté	Inchangée
Affinité de l'enzyme pour son substrat	Diminuée	Inchangée
Vmax :	Inchangée	Diminuée

Exercice 15

I. Quelles sont les trois manières d'activer une enzyme ?

1. Lorsqu'elle synthétisée sous forme inactive (**pro-enzyme** ou **zymogène**), **clivage du peptide qui l'inactive.**
2. Par **ajout d'un groupement chimique : phosphorylation** (ajout d'un groupement phosphate, ce qui selon l'enzyme peut l'activer ou l'inhiber), **acylation** (ajout d'un groupement acyle, ce qui selon l'enzyme peut l'activer ou l'inhiber) ou **alkylation** (ajout d'un groupement alkyle, ce qui selon l'enzyme peut l'activer ou l'inhiber).
3. Grâce à la présence d'un **co-facteur** ou **co-enzyme** => molécule se liant à l'enzyme, nécessaire à son activité.

II. Quelle est la principale différence entre les co-enzymes libres (également nommé co-substrats) et les co-enzymes liés ?

Le **co-enzyme libre** se lie de manière transitoire à l'enzyme, par des **liaisons faibles**.

Il peut donc être dissocié de son enzyme. Alors que le **co-enzyme liée** reste tout le temps lié

à l'enzyme, par des liaisons covalentes. Il ne peut donc pas être dissocié de son enzyme

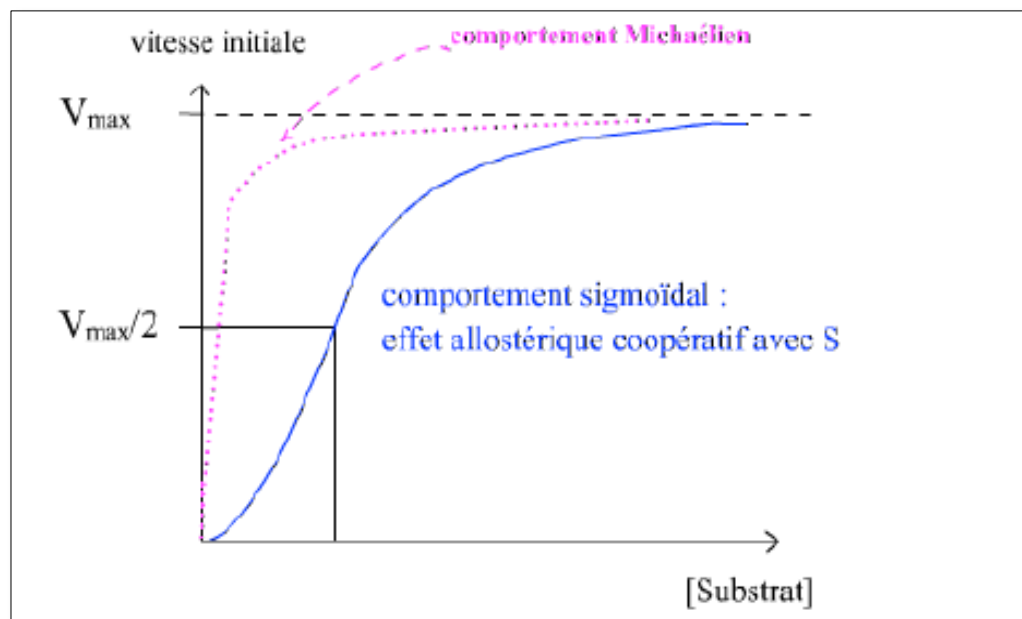
I. Définissez « co-enzyme d'oxydo-réduction » et « co-enzyme de transfert ».

Les **coenzymes d'oxydoréduction** permettent l'échange d'électrons (Une réaction d'oxydoréduction est une réaction chimique au cours de laquelle se produit un échange d'électrons). Les **coenzymes de transfert** permettent le **transfert de groupements fonctionnels** carbonés ou non (éléments aminés, éléments carbonés, phosphate, nucléotide, hydrogène).

Exercice 16

À partir de l'analyse des graphiques ci-dessous.

1. expliquez les différences de cinétique entre les enzymes allostériques et les non allostériques, les michaeliennes.



Contrairement à la cinétique des enzymes michaeliennes, la cinétique enzymatique des enzymes allostériques ne présente pas une allure hyperbolique, mais sigmoïde.

Cette différence s'explique par la structure d'une enzyme allostérique.

Cette enzyme possède en fait une structure quaternaire avec plusieurs protomères (sous-unité d'une protéine multimérique) associés entre eux par des liaisons faibles ; elle est donc oligomérique. Chaque protomère possédant un site actif, une enzyme allostérique possède plusieurs sites actifs.

2. Comment expliquer cette allure sigmoïde ?

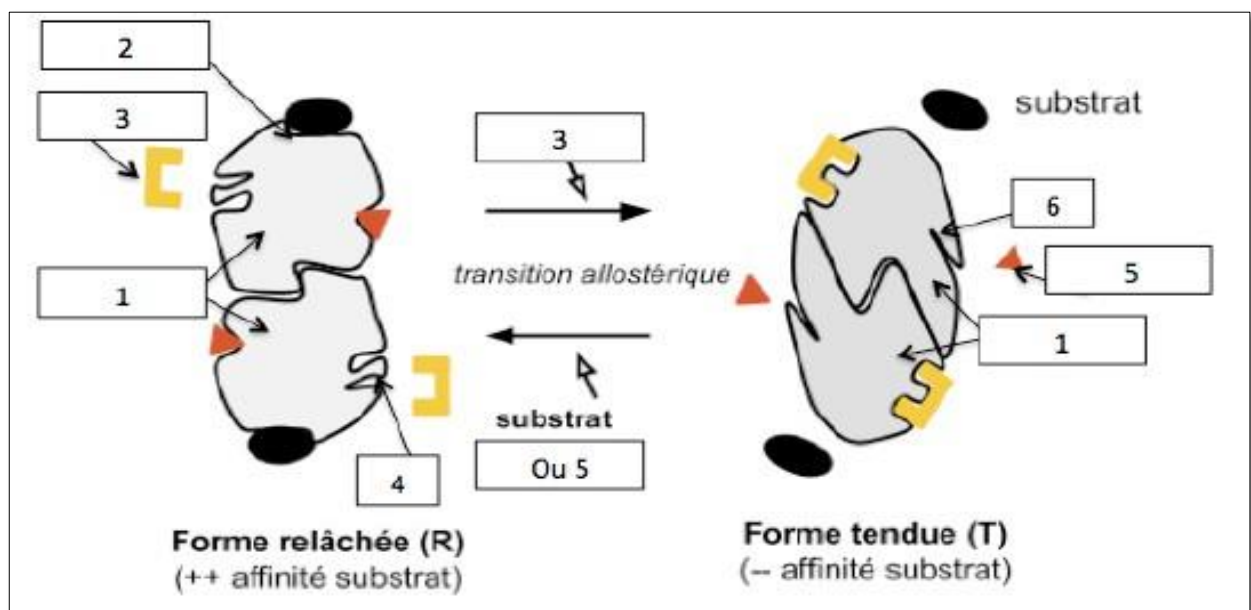
Ces enzymes **existent en fait sous deux formes** :

- Une forme dite « **tendue** », notée « **T** », **inactive**, où les protomères montrent **peu d'affinité pour le substrat**,
- Une forme dite « **relâchée** », notée « **R** », **active**, où les protomères montrent une **forte affinité pour le substrat**.

L'explication vient en fait de la **coopérativité du substrat**. Initialement, les protomères sont sous la forme T. L'occupation d'un seul des sites actifs par un substrat suffit à modifier légèrement la conformation spatiale de l'enzyme, les protomères vont alors prendre la forme R. Le passage de la forme T à la forme R porte le nom de **transition allostérique**.

Exercice 17

Titrez et légendez la figure suivante :



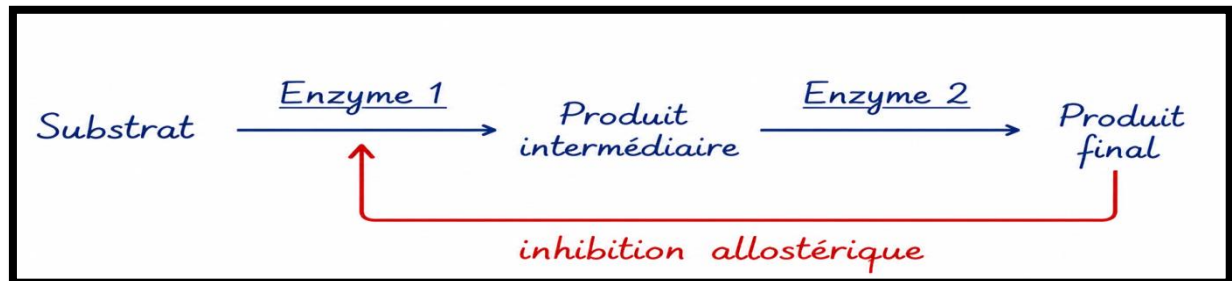
Exercice 18

Quels sont les trois moyens de réguler l'activité d'une enzyme dans une cellule ?

Les trois moyens de réguler l'activité d'une enzyme dans une cellule

- Grâce à la **biodisponibilité du substrat ou du coenzyme** : Une quantité importante de substrat va stimuler l'activité de l'enzyme. Sans sa coenzyme, une enzyme reste inactive ; il faut donc qu'elle soit disponible.
- Par **régulation allostérique**, grâce aux effecteurs allostériques : Par exemple, dans une voie métabolique, plusieurs réactions enzymatiques se succèdent. Un des produits de cette chaîne

de réactions peut se comporter comme inhibiteur allostérique, et inactiver une des enzymes participant à la chaîne des réactions. Dans ce cas, on parle de rétro-inhibition ou rétrocontrôle.



- Par **régulation hormonale** : une hormone peut **par exemple induire la phosphorylation** d'une enzyme provoquant son **activation**, ou encore sa **déphosphorylation**, provoquant son **inactivation**, ou inversement. Les hormones sont également **capables d'induire la biosynthèse d'enzymes**. Elles peuvent activer la transcription de gènes codant pour ces enzymes. Par exemple, l'insuline active la transcription du gène codant la glucokinase (catalyse la formation de glucose 6-phosphate à partir de glucose) dans les cellules hépatiques.

Exercice 19

Le glucose est dégradé dans l'organisme par la voie de la glycolyse. La première réaction de cette voie est une phosphorylation du glucose qui peut être catalysée par deux enzymes différentes : la glucokinase ou l'hexokinase. On se propose d'étudier les caractères cinétiques de ces deux enzymes vis-à-vis de leur substrat commun, le glucose.

La vitesse initiale de la réaction a été mesurée pour des concentrations différentes en substrat à 20 °C et à pH 7. La concentration en enzyme utilisée pour les deux séries d'expériences est la même.

Les résultats expérimentaux sont reproduits dans le tableau ci-dessous.

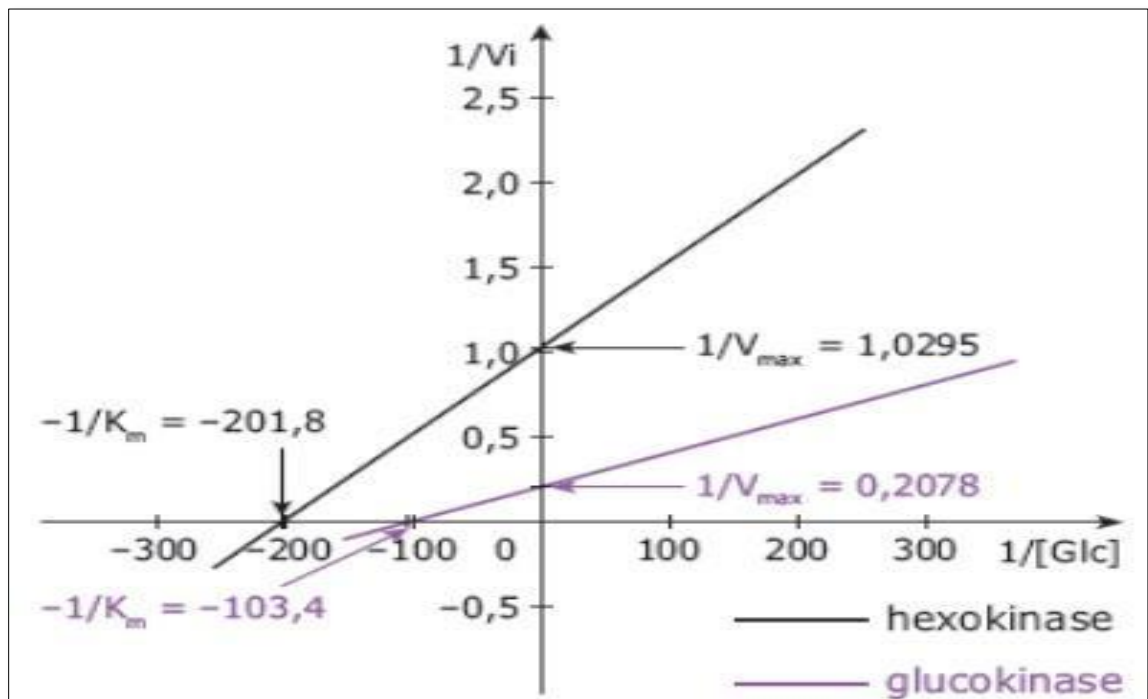
[Glucose] en mol/L	Vi avec la glucokinase en $\mu\text{mol/L/min}$	Vi avec l'hexokinase en $\mu\text{mol/L/min}$
5.0×10^{-3}	1.61	0.490
6.7×10^{-3}	2.00	0.575
10.0×10^{-3}	2.67	0.607
20.0×10^{-3}	2.93	0.806
50.0×10^{-3}	1.17	0.893

1. Déterminer les valeurs de K_m et de V_{max} pour ces deux enzymes.

Afin de déterminer rapidement les K_m et V_{max} , on utilise la **représentation en double inverse**, la représentation de Lineweaver et Burk. Pour cela, il vous faut avant tout, recalculer les paramètres tels que

1/ [Glucose]	1/Vi avec la glucokinase	1/Vi avec l'hexokinase
200	0.621	2.041
150	0.500	1.739
100	0.375	1.674
50	0.341	1.241
20	0.240	1.120

D'où la représentation de Lineweaver et Burk :



Pour la glucokinase

Calcul de la Vmax : lorsque $1/[Glucose] = 0$, $1/V_i = 1/V_{max}$,

d'où $1/V_{max} = 0,2078$, d'où $V_{max} = 4,81 \mu\text{mol/L/min}$.

Calcul du Km

lorsque $1/V_i = 0$, $1/[Glucose] = -1/K_m$, d'où $-1/k_m = -103,4$, d'où, **$K_m = 9,62 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$** .

Pour l'hexokinase

Avec le même principe de calculs, on trouve :

$V_{max} = 0,97 \mu\text{mol/L/min}$ et

$K_m = 4,95 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$.

2 Comparer les deux Km, et conclure.

Le K_m est un paramètre cinétique qui indique l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus il est petit, plus cette affinité est grande.

D'après les résultats, on en déduit que **l'hexokinase a plus d'affinité pour le glucose que la glucokinase.**

3 Comparer les deux V_{max} , et conclure.

La V_{max} est un paramètre cinétique qui indique la vitesse maximale de la réaction enzymatique, lorsque toutes les enzymes sont saturées en substrats.

La V_{max} de la glucokinase, est ici, plus importante que celle de l'hexokinase.

4 Sachant que la glycémie normale est d'environ 5 mmol/L, indiquer si chacune de ces deux enzymes agit dans les conditions d'obtention de la vitesse maximale.

Une glycémie normale est d'environ 5 mmol/L, soit aux alentours du K_m de l'hexokinase. Le K_m étant égale à la concentration en substrats pour $V_{max}/2$, dans ces conditions, la vitesse de réaction serait environ de $V_{max}/2$. De même, cette valeur est très inférieure au K_m de la glucokinase. Ceci nous permet d'en déduire, que ces enzymes fonctionnent « au ralenti » dans ces conditions physiologiques.

5 Quelle serait l'influence d'une augmentation importante de la glycémie ?

Si la glycémie augmente de manière importante, la vitesse de réaction devrait se rapprocher de la V_{max} . De plus, le K_m de la glucokinase étant élevé, cela montre qu'elle agit de manière significative lorsque la concentration en glucose augmente.

Exercice 20

La vitesse d'une réaction enzymatique a été mesurée pour plusieurs concentrations du substrat.

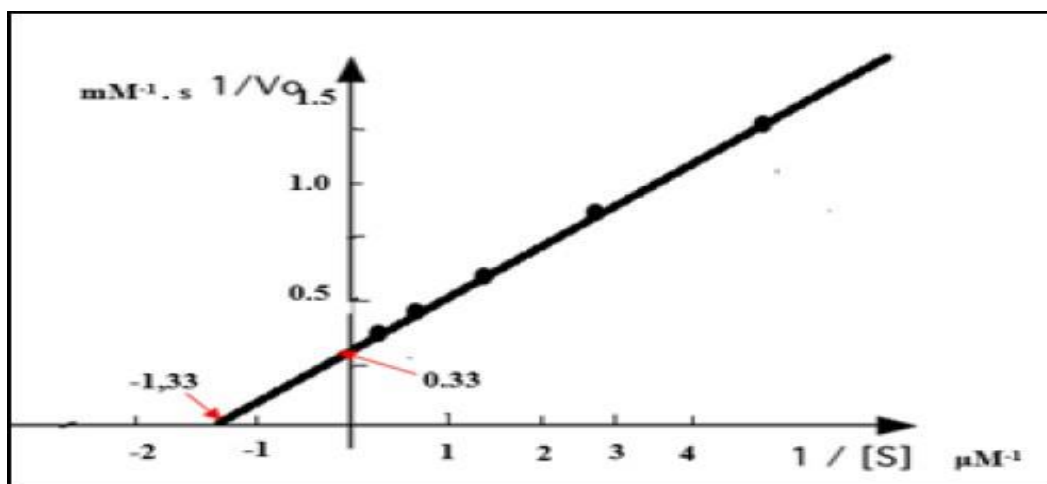
Calculer les valeurs de K_M et V_{max} de cette réaction.

[S] (μM)	v_0 (mM.s-1)
0,25	0,75
0,5	1,20
1,0	1,71
2,0	2,18
4,0	2,53

Solution

On calcule les valeurs inverses des concentrations en substrat et des vitesses, puis on trace une représentation de $1/v_0$ en fonction de $1/[S]$ (représentation de Lineweaver-Burk).

$1/[S] (\mu\text{M}^{-1})$	$1/v_0 (\text{mM}^{-1}\cdot\text{s})$
4,0	1,33
2,0	0,83
1,0	0,58
0,5	0,46
0,25	0,40



Le point d'intersection sur l'axe $1/[S]$ (qui est égal à $-1/K_M$) a une valeur de $-1,33 \mu\text{M}^{-1}$

$$K_M = \left[\frac{1}{-1,33 \mu\text{M}^{-1}} \right] = 0,75 \mu\text{M}$$

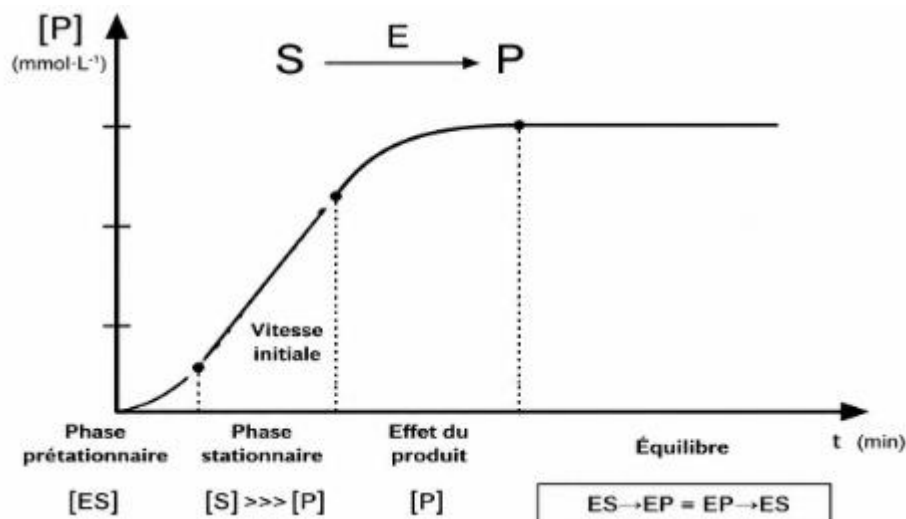
Le point d'intersection sur l'axe $1/v_0$ (qui est égal à $1/V_{\text{max}}$) a une valeur de $0,33 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}$

$$V_{\text{max}} = \frac{1}{0,33 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}} = 3,0 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$$

References bibliographiques

1. Agarwal, P. K., Bernard, D. N., & Bafna, K. (2020). Enzyme Dynamics: Looking Beyond a Single Structure. *ChemCatChem*, 12(19), 4704–4720.
2. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2019). *Biochemistry* (9th ed.). W.H. Freeman, 1120 p.
3. Bisswanger, H. (2017). *Enzyme Kinetics: Principles and Methods* (3rd ed.). Wiley-VCH, 316 p.
4. Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* (2nd ed.). Wiley-VCH, 416 p.
5. Cornish-Bowden, A. (2012). *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (4th ed.). Wiley-Blackwell, 498 p.
6. Fersht, A. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman, 631 p.
7. Leskovac, V. (2003). *Comprehensive Enzyme Kinetics*. Springer, 438 p.
8. Nagar, S., Argikar, U. A., & Tweedie, D. (Eds.). (2021). *Enzyme Kinetics in Drug Metabolism: Fundamentals and Applications*. Humana Press / Springer, 881 p.
9. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2021). *Lehninger Principles of Biochemistry* (8th ed.) W.H. Freeman, 1328 p.
10. Price, N. C., & Stevens, L. (1999). *Fundamentals of Enzymology: The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins* (3rd ed.). Oxford University Press, 478 p.
11. Punekar, N. S. (2025). *Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms* (2nd ed.). Springer, 520 p.
12. Purich, D. L. (Ed.). (2009). *Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism* (3rd ed.). Academic Press / Elsevier, 600 p.
13. Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Wiley-Interscience, New York. ISBN: 978-0471570831.
14. Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level* (5th ed.). Wiley, 1152 p.
15. Wang, Y., Wang, G., Moitessier, N., & Mittermaier, A. K. (2020). Enzyme Kinetics by Isothermal Titration Calorimetry: Allostery, Inhibition, and Dynamics. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 583826.

Légende et explication de la figure de couverture



L'axe des ordonnées représente la concentration du produit **[P]** ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) formé au cours du temps.

L'axe des abscisses représente le temps (**min**).

La courbe sigmoïde correspond à l'évolution de **[P]** lors d'une réaction enzymatique $S \rightarrow P$ catalysée par l'enzyme **E**.

Phase préstationnaire : formation du complexe enzyme-substrat **[ES]**. La quantité de produit est encore très faible.

Phase stationnaire : la vitesse de formation du produit est maximale et constante (**vitesse initiale**). Le substrat est en large excès : $[S] \gg [P]$.

Effet du produit : le produit **[P]** s'accumule, la réaction inverse $EP \rightarrow ES$ devient significative, ce qui ralentit la réaction directe.

Équilibre : les vitesses de la réaction directe ($ES \rightarrow EP$) et de la réaction inverse ($EP \rightarrow ES$) sont égales. La concentration de **[P]** n'augmente plus.