

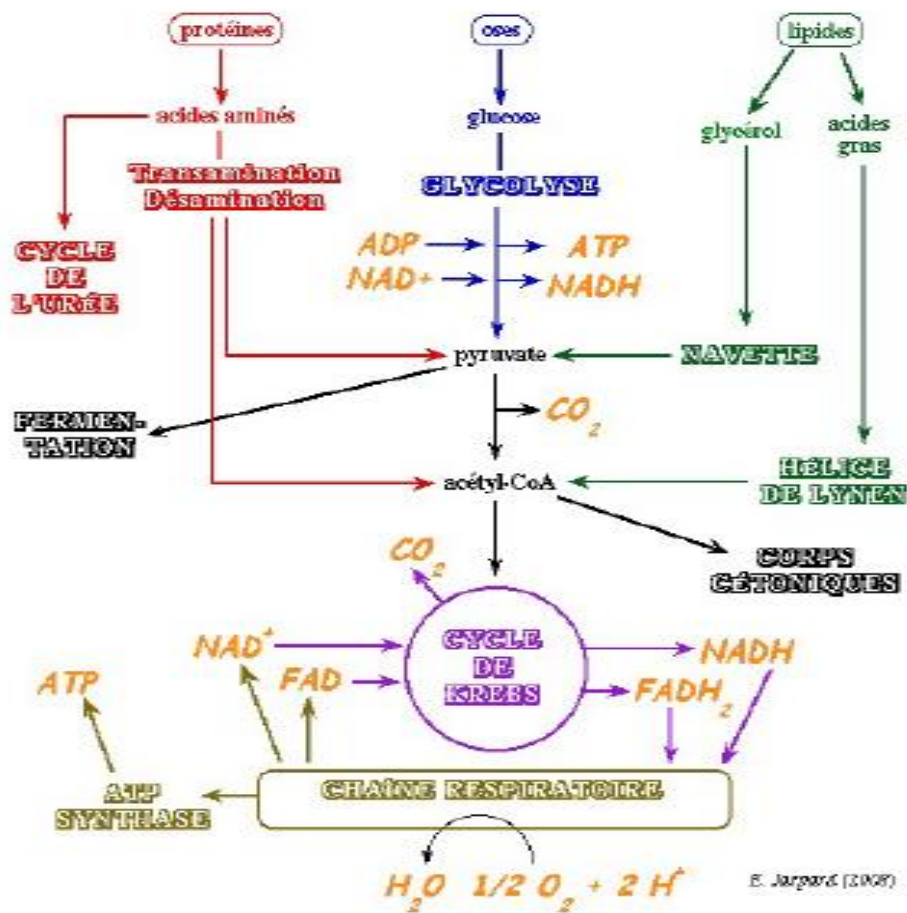
UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
ECOLE SUPERIEURE DE TECHNOLOGIE
FKIH BEN SALEH

Filière : Industrie-Agroalimentaire

BIOCHIMIE METABOLIQUE

Enzymologie, Bioénergétique et Voies Métaboliques

"Cours"



Pr. BOUDA S.

Année universitaire 2019- 2020

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : ENZYMOLOGIE	2
1. DEFINITION.....	2
2. CLASSIFICATION DES ENZYMES	2
3. QUELLES SONT LES CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES ENZYMES ?.....	4
4. LA SPECIFICITE ENZYMATIQUE	4
5. NATURE DU SITE ACTIF.....	4
6. LA CATALYSE ENZYMATIQUE	5
7. ELEMENTS DE CINETIQUE CHIMIQUE.....	6
7.1. <i>Rappel de l'ordre d'une réaction</i>	6
7.2. <i>Rappel de calcul de la vitesse d'une réaction</i>	7
8. LA CINETIQUE ENZYMATIQUE.....	7
8.1. <i>Vitesse initiale d'une réaction enzymatique</i>	7
a. vitesse d'une réaction du premier ordre	7
b. vitesse de réaction enzymatique	8
c. phases de la réaction	9
d. Vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat.....	9
e. Détermination de l'équation de Michaelis-Menten $V = f([S])$	10
f. représentation graphique de Lineweaver et Burk	12
9. INHIBITION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.....	13
9.1. <i>Effets de paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique</i>	14
9.1.1. Influence de la température	14
9.1.2. Influence du pH.....	15
9.2. <i>Inhibiteurs</i>	15
9.2.1. Inhibiteurs compétitifs.....	16
9.2.2. Inhibiteurs non compétitifs.....	17
9.2.3. Inhibiteurs incompétitifs	19
9.2.4. Inhibition par excès de substrat.....	20
9.2.5. Effets allostériques	21
9.3. <i>Dosage enzymatique</i>	22
10. L'UNITE ENZYMATIQUE	23

INTRODUCTION

Le métabolisme est l'ensemble des transformations moléculaires et des transferts d'énergie qui se déroulent de manière ininterrompue dans la cellule ou l'organisme vivant. C'est un processus ordonné, qui fait intervenir des processus de dégradation et de synthèse organique. Pour vivre et croître, les organismes ont besoin de synthétiser de la matière organique, de se déplacer, de réparer et substituer les tissus endommagés... Cela demande de l'énergie.

D'où les cellules tirent-elles cette énergie?

Comment les cellules utilisent l'énergie et synthétisent les composants cellulaires?

Chimiotrophes ...

Les organismes chimiotrophes utilisent des substances organiques réduites à la fois comme source d'énergie et source de pouvoir réducteur)

Chimiohétérotrophes: substances organiques réduites préexistants d'origine animale ou végétale (la plupart des animaux, champignons et beaucoup des bactéries)

Chimioautotrophes: substances inorganiques réduites (certains bactéries et archaebactéries extrémophiles)

Phototrophes

Les organismes phototrophes utilisent la lumière comme source d'énergie

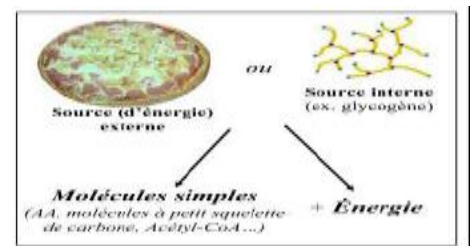
Photoautotrophes: Organisme capables de produire de la matière organique pour la survie en procédant à la réduction de matière inorganique en utilisant la seule énergie lumineuse (végétaux et la plupart de bactéries photosynthétiques)

Photohétérotrophes: Organismes qui utilisent l'énergie lumineuse pour la survie mais qui ont besoin aussi d'une source de composés organiques (certaines bactéries photosynthétiques)

Le métabolisme comprend deux types de processus métaboliques :

- Le **catabolisme** : ensemble de réactions enzymatiques de dégradation de macromolécules qui **convergent en peu de molécules de petite taille**. Ces réactions s'effectuent avec une libération d'énergie dont une partie est stockée sous forme d'ATP et de transporteurs d'électrons réduits (ex. NAD(P)H et FADH₂) :

- Glycolyse
- Cycle de krebs
- Dégradation du glycogène
- Phosphorylation oxydative
- La voie des pentoses phosphates
- β -oxydation des acides gras
- Transamination/Désamination des acides aminés



- **L'anabolisme:** ensemble de réactions enzymatiques de biosynthèse qui divergent à former beaucoup de macromolécules ou de leurs précurseurs. Ces réactions nécessitent un apport d'énergie fournie généralement par l'hydrolyse de l'ATP et/ou par le pouvoir réducteur du NAD(P)H et du FADH₂ :

- La gluconéogenèse
- Cycle de Krebs
- Synthèse glycogène
- La voie des pentoses phosphates
- Synthèses des acides gras

- Synthèses des acides aminés
- Photosynthèse

Par ailleurs, les voies de dégradation et de biosynthèse *qui pourraient être en compétition* sont, chez les eucaryotes, souvent localisées dans des **compartiments** sub-cellulaires distincts.

Par exemple : la voie de dégradation oxydative des acides gras est localisée dans la mitochondrie et celle de leur biosynthèse est localisée dans le cytosol.

Toutes les réactions du métabolisme se déroulent à une très grande vitesse, bien supérieure à celles qu'elles auraient isolément dans la nature, grâce à des catalyseurs biologiques, les **enzymes**.

CHAPITRE I : ENZYMOLOGIE

1. Définition

Les enzymes sont des protéines douées d'activité catalytique spécifique. Elles permettent aux réactions chimiques nécessaires à la vie et à la multiplication cellulaire de s'effectuer à vitesse élevée et avec une spécificité qui élimine la formation de sous-produits.

2. Classification des enzymes

Le nom de la plupart des enzymes est bâti en ajoutant le suffixe «-ase» au terme qualifiant la réaction ou encore la nature du substrat (par exemple, la lactate déshydrogénase). D'autres sont désignées par leur nom usuel (par exemple, la pepsine).

Chaque enzyme est désignée par un numéro donné par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie Moléculaire.

Ce numéro est précédé par les lettres EC et comporte quatre chiffres séparés par des points : EC (W.X.Y.Z) :

Le 1er chiffre : indique la classe de l'enzyme, il en existe six.

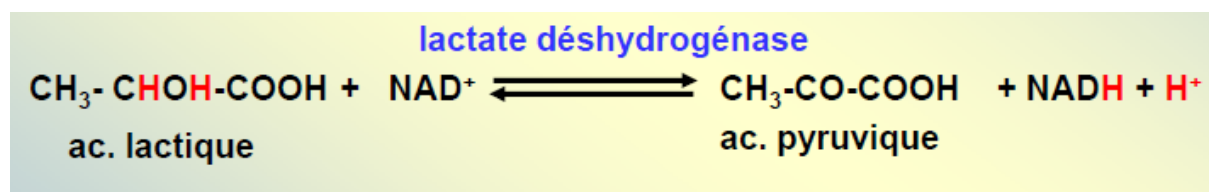
Le second chiffre : la sous classe, la nature du groupement chimique donneur de groupement, type de fonction du substrat métabolisé.

Le troisième chiffre : la sous-sous-classe, indique la nature chimique de l'accepteur.

Le quatrième chiffre : numéro d'ordre de l'enzyme (dans la sous sous classe), en relation avec le substrat de l'enzyme

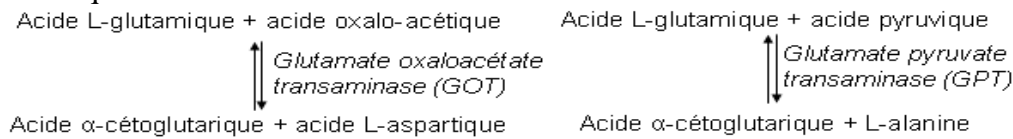
• Classe 1 : Oxydoréductases

Elles catalysent les réactions d'oxydoréduction, c'est-à-dire le transfert de protons et d'électrons. C'est le cas des déshydrogénases, des réductases, des oxydases ... (par exemple, la lactate déshydrogénase permet la réduction du pyruvate en lactate ou encore l'oxydation du lactate en pyruvate).



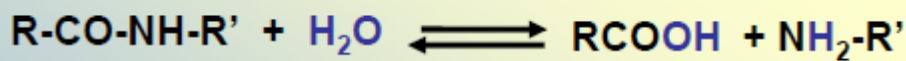
• Classe 2 : Transférases

Elles catalysent les réactions de transfert d'atome ou de groupement d'atomes. C'est le cas des transaminases qui transfèrent la fonction amine d'un acide aminé sur un acide α -cétonique.



• Classe 3 : Hydrolases

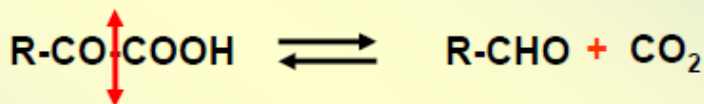
Elles catalysent des réactions de coupure de liaison covalente nécessitant de l'eau. C'est le cas de toutes les enzymes digestives comme la trypsine (spécialisée dans la coupure des liaisons peptidiques).



• Classe 4 : Lyases

Elles catalysent les réactions lytiques non hydrolytiques et non oxydantes en créant des doubles liaisons. Dans la réaction inverse, les lyases catalysent l'addition d'un groupement fonctionnel sur la double liaison d'un substrat. C'est le cas de l'aldolase (qui transforme le fructose 1,6-biphosphate en deux trioses-phosphate, (glycolyse)).

- décarboxylase d'acide cétonique: le coenzyme est la thiamine pyrophosphate (TPP)



• Classe 5 : Isoméras

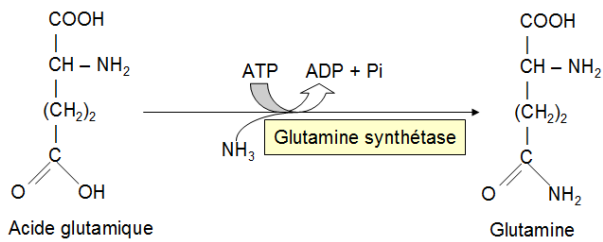
Elles catalysent des réactions d'isomérisation, c'est-à-dire des remaniements intramoléculaires. C'est le cas de l'aconitase qui transforme le citrate en isocitrate (Cycle de Krebs).

Epiméras: provoquent des interconversions d'oses



• Classe 6 : Ligases

Elles catalysent les réactions de ligation, de condensation, c'est-à-dire la formation de liaisons covalentes nécessitant de l'énergie chimique, le plus souvent apportée par l'hydrolyse d'ATP. C'est le cas des synthétases comme la glutamine synthétase, qui permet l'amidification de l'acide glutamique en glutamine (métabolisme azoté).



Le système de dénomination internationale attribue à chaque enzyme quatre nombres séparés par un point.

Le premier nombre correspond à la classe, le deuxième (sous-classe) précise le type de réaction, le troisième et le quatrième précisent la nature du substrat utilisé.

3. Quelles sont les caractéristiques structurales des enzymes ?

Les enzymes sont des protéines, c'est-à-dire des polymères d'acides aminés formant de longues chaînes repliées dans l'espace.

Toute enzyme comporte :

- Une structure primaire : séquence en acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Cette structure correspond à un enchaînement linéaire sans organisation particulière dans l'espace.
- Une structure tridimensionnelle (structure spatiale) comportant plusieurs niveaux d'organisation qui permettent d'obtenir la protéine repliée.
- La structure tertiaire définitivement repliée correspond à l'état **natif (fonctionnel)** : la protéine a alors une forme compactée stabilisée par de nombreuses liaisons (hydrogènes, ioniques, hydrophobes, pont disulfures). **Cette forme permet l'activité enzymatique.**
- Pour certaines enzymes, on distingue un niveau d'organisation supplémentaire : **la structure quaternaire**

Les protéines oligomériques sont constituées de quelques monomères (généralement entre 2 et 4 le plus souvent)

Chaque monomère présente un état natif, mais l'enzyme ne pourra exercer son activité biologique que lorsque les différents monomères seront reliés ensemble.

4. La spécificité enzymatique

Un enzyme catalyse une réaction bien précise, à partir d'un substrat ou d'un groupe de substrat donné.

L'enzyme reconnaît la forme du substrat qui vient s'emboîter au niveau du site actif de l'enzyme. On parle de stéréospécificité enzymatique.

Exemples :

- La glucose-oxydase catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique.
- L'alpha-amylase hydrolyse les liaisons chimiques α 1-4 de la molécule d'amidon.
- L'alcool-déshydrogénase transforme réversiblement l'éthanol en éthanal.

5. Nature du site actif

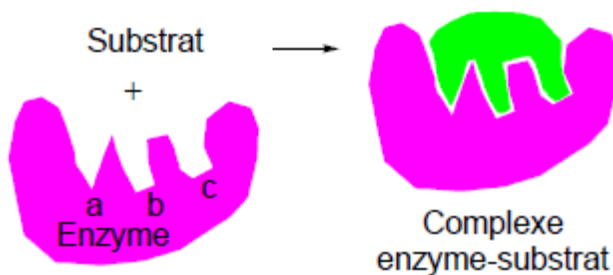
Le «site actif» d'une enzyme est la région tridimensionnelle qui se lie au substrat. Les sites actifs sont des cavités de caractère non polaire et dans lesquelles les substrats s'insèrent.

L'eau est normalement exclu du site actif lorsque le substrat est lié, sauf si elle est un réactif. Le site actif consiste d'au moins deux parties fonctionnelles, qui peuvent ou non être voisines sur la chaîne polypeptidique (si non, la structure tertiaire les amène près l'une de l'autre):

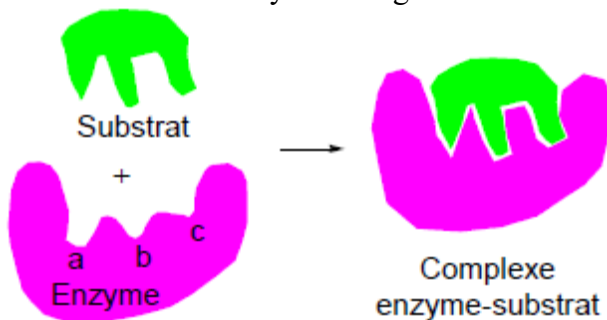
- le **site de reconnaissance** du substrat est constitué de certains acides aminés qui sont associés avec l'orientation du substrat, et donc, avec la spécificité de l'enzyme
- le **site catalytique** est constitué des résidus qui sont directement impliqués dans la formation et rupture des liens chimiques. Ces résidus sont souvent localisés dans le fond de la cavité, et dans la majorité des cas, possèdent des chaînes latérales ioniques ou réactives (ex. His, Lys, Cys, Ser, Asp, Glu).

Deux modèles pour expliquer la spécificité des enzymes:

Clé-serrure: la forme du site actif est complémentaire à celle du substrat



Forme induite: l'enzyme change sa conformation lors de la liaison du substrat.



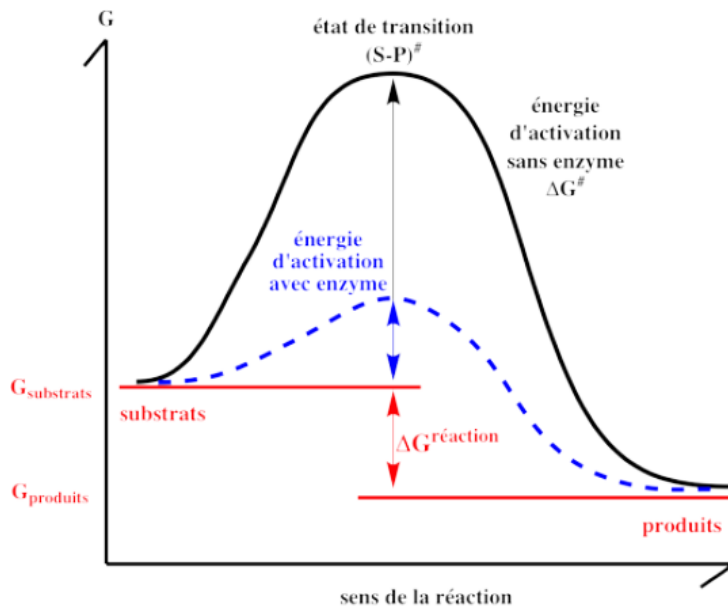
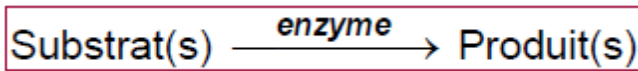
6. La catalyse enzymatique

Une enzyme est un catalyseur biologique qui augmente la vitesse d'une réaction par plusieurs ordres de grandeur en diminuant son énergie libre d'activation, sans être elle-même affectée. Certains enzymes sont extrêmement spécifiques et ne fonctionneront que sur un seul et unique réactif (substrat); d'autres ont un large spectre et fonctionnent sur une structure partagée par de nombreuses molécules qui peuvent toutes lui servir de substrat. Une enzyme agit comme catalyseur en se liant au substrat et facilite sa réaction en stabilisant son état de transition vers un produit spécifique.

Les propriétés importantes de l'enzyme sont :

- 1) il agit à des concentrations très petites
- 2) il est retrouvé inchangé à la fin de la réaction
- 3) il modifie la vitesse des réactions thermodynamiquement possibles (il ne modifie pas l'énergie du système réactionnel)
- 4) il est stéréospécifique du substrat (à la différence de nombreux catalyseurs chimiques)
- 5) notons que certains enzymes n'ont d'activité catalytique qu'en présence de leur cofacteur, composé non protéique

Le facteur d'accroissement de la vitesse de la réaction par un enzyme peut aller jusqu'à la valeur de 10^{17} fois (cas de la phosphatase alcaline).



L'énergie d'activation ou l'énergie libre d'activation (ΔG_A) est l'énergie que doit être absorbée par les réactifs pour que leurs liaisons soient brisées.

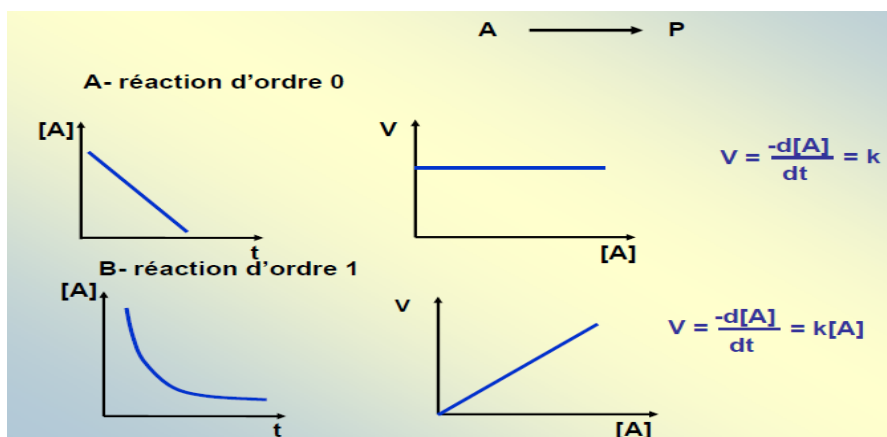
Les réactifs doivent atteindre un état de transition instable dans lequel les liaisons sont plus fragiles et plus faciles à briser. Même une réaction exergonique, où le ΔG ($G_{\text{produit}} - G_{\text{substrat}}$) est négatif, requiert l'absorption d'énergie pour atteindre l'état de transition.

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.

7. Eléments de cinétique chimique

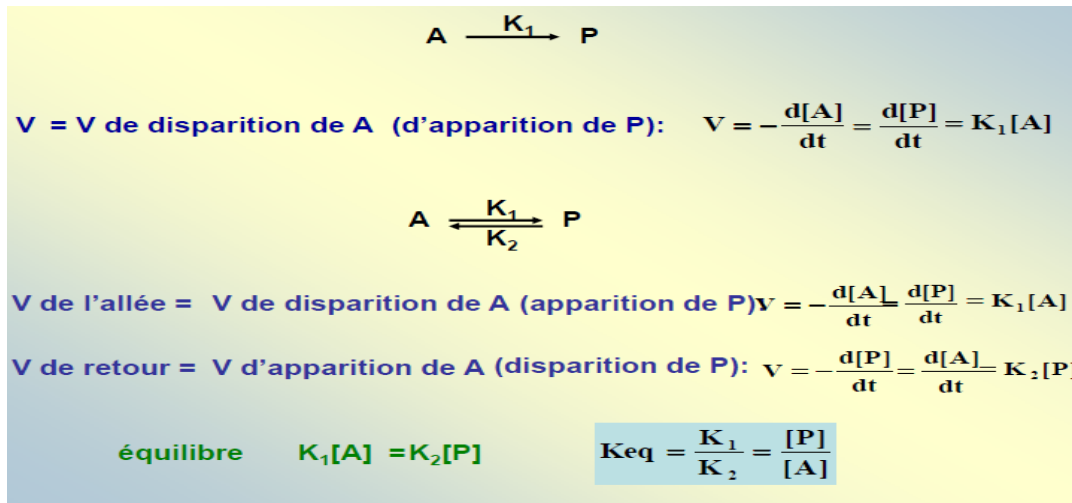
7.1. Rappel de l'ordre d'une réaction

On modifie la vitesse réactionnelle en faisant varier la concentration de ses substrats. Déterminer l'ordre d'une réaction, c'est définir, par un nombre, la manière dont chaque substrat affecte la vitesse.



7.2. Rappel de calcul de la vitesse d'une réaction

La vitesse d'une réaction chimique et les facteurs dont elle dépend font l'objet de l'étude de la cinétique chimique. A partir de l'équation de réaction, la vitesse de la transformation peut être déterminée en suivant la disparition des réactifs ou l'apparition des produits en fonction du temps (**cinétique chimique**)



8. La cinétique enzymatique

Le phénomène fondamental de l'action enzymatique est que pour agir l'enzyme doit se combiner au substrat. Après formation du complexe le substrat est transformé en produit et est libéré, l'enzyme retrouve sa structure primitive.

La vitesse de réaction se mesure par le dosage du produit apparu sous l'action de l'enzyme ou du substrat disparu, par unité de temps (**cinétique enzymatique**).

8.1. Vitesse initiale d'une réaction enzymatique

a. vitesse d'une réaction du premier ordre

Soit une réaction élémentaire : $A \longrightarrow P$

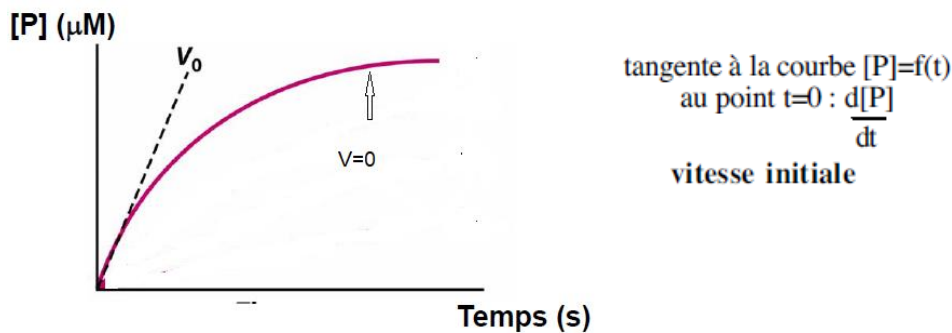
Si la réaction est d'ordre 1 par rapport à A, la vitesse de réaction s'écrit :

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A], \text{ d'où } \frac{d[A]}{[A]} = -kdt \text{ et en intégrant :}$$

$$\ln\left(\frac{[A]}{[A]_0}\right) = -kt \text{ ou encore } [A] = [A]_0 e^{-kt}, \text{ ou encore } \ln([A]) = -kt + \ln([A]_0)$$

où $[A]_0$ est la concentration de A à l'instant $t_0 = 0$.

La concentration des réactifs diminue exponentiellement en fonction du temps, et évidemment celle des produits augmente exponentiellement en fonction du temps.



De cette courbe nous pouvons déduire la vitesse de la réaction à l'instant t [$v=d(P)/dt$] qui n'est autre que le coefficient angulaire de la tangente au point d'abscisse t .

La courbe est d'abord rectiligne, la vitesse V est une constante, mais ceci ne correspond à une réaction d'ordre zéro que si l'on opère en présence d'un large excès de substrat.

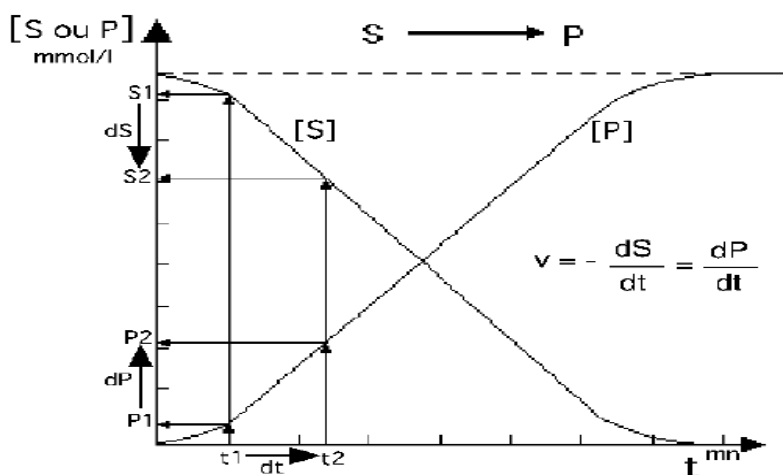
Dans ces conditions, l'enzyme est saturée en substrat (S), toute augmentation de (S) ne modifie pas la vitesse.

Puis, au fur et à mesure que la réaction évolue, la vitesse décroît pour finalement s'annuler quand tout le substrat est consommé, ou quand il s'établit un équilibre.

La vitesse qui correspond à la partie rectiligne de la courbe et, à la limite, à sa tangente à l'origine est appelée vitesse initiale de la réaction (V_i ou V_0), et lorsqu'on parle de vitesse de réaction enzymatique, c'est toujours de la vitesse initiale dont il est question.

La détermination de la **vitesse initiale** de la réaction correspond au début de celle-ci, quand peu de substrat est transformé (moins de 5 à 10%).

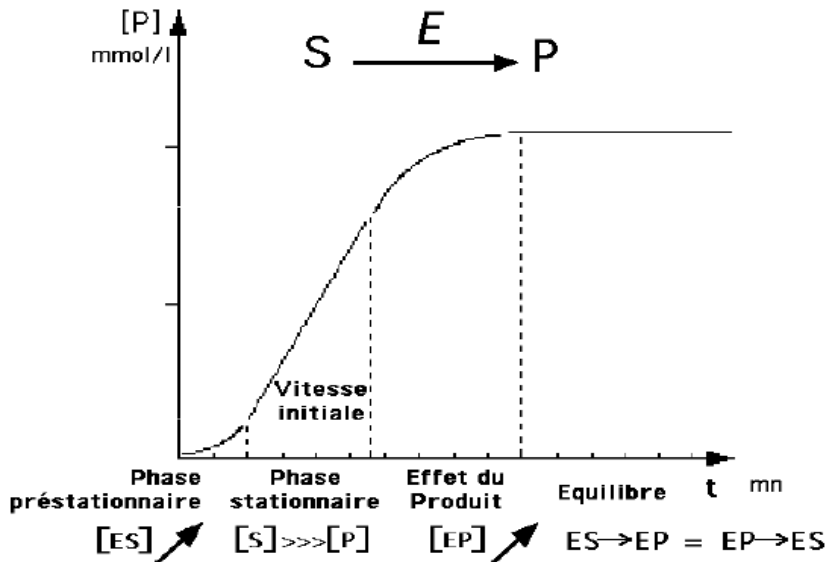
b. vitesse de réaction enzymatique



- Pour mesurer l'activité d'une réaction enzymatique n'ayant qu'un substrat et un produit, dans un milieu défini, on observe les concentrations du substrat ou du produit, qui sont des fonctions du temps écoulé : la concentration du substrat décroît au cours du temps, celle du produit croît au cours du temps.
- Lorsqu'on fait ces mesures à des temps t_1 puis t_2 séparés par un délai dt , on appelle S_1 et P_1 les concentrations du substrat et du produit au temps t_1 , et S_2 et P_2 les concentrations du substrat et du produit au temps t_2 . La différence entre les concentrations du substrat dS est l'opposé de la différence entre les concentrations du produit dP . **On appelle vitesse de la réaction le rapport moins dS sur dt , qui est égal au rapport dP sur dt .**

La vitesse de réaction représente le nombre de moles de substrat transformées en moles de produit, dans un volume donné et dans un temps donné.

C. phases de la réaction



- ◆ Revenons à notre échelle, en mesurant la concentration du produit P en fonction du temps. Dans un milieu où il n'y a au temps 0 que des molécules de l'enzyme et du substrat, la réaction se déroule de façon non uniforme.
- ◆ On distingue une première phase très brève, au cours de laquelle la vitesse de la réaction est croissante. Durant cette phase, les molécules de substrat se lient avec l'enzyme : la concentration du complexe enzyme-substrat augmente.
- ◆ Lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont occupées par des molécules du substrat la vitesse de la réaction est maximum et reste constante tant que la concentration du substrat est grande et celle du produit petite. C'est ce qu'on observe lors des premières mesures.
- ◆ Lorsque la concentration du produit augmente, la réaction inverse commence à concurrencer celle qu'on mesurait : la vitesse diminue.
- ◆ Enfin dans une dernière phase, tardive, la vitesse de la transformation inverse devient égale à celle de départ : les concentrations ne changent plus, on est à l'équilibre.

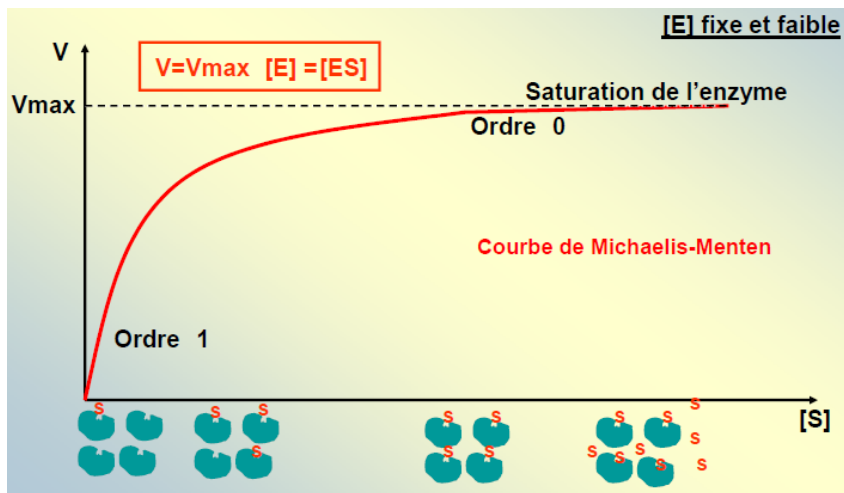
d. Vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat [S] : Equation de Michaelis-MENTEN

L'étude de la cinétique enzymatique a été réalisée essentiellement par Michaelis et Menten en 1913.

- **Courbe de Michaelis-Menten** (figure suivante)

Interprétation de la courbe de MM :

- Aux faibles concentrations de substrat, la vitesse de la réaction est proportionnelle à celle du substrat (réaction d'ordre 1)
- Lorsque la concentration de S augmente, la vitesse ne s'accroît plus dans les mêmes proportions



- Aux fortes concentrations de S la vitesse devient constante, indépendante de cette concentration (réaction d'ordre 0): l'enzyme est saturée par son substrat. Ce phénomène est particulier à la cinétique enzymatique.

e. Détermination de l'équation de Michaelis-Menten $V = f([S])$

Conditions initiales

$$S + E \xrightleftharpoons[K_2]{K_1} ES \xrightleftharpoons[K_4]{K_3} P + E$$

$S + E \xrightleftharpoons[K_2]{K_1} ES$ (rapide)

$ES \xrightarrow{K_3} P + E$ (lente)

$[E] =$ concentration totale de l'enzyme
 $[ES] =$ concentration du complexe Enz-Sub
 $[E]_L =$ concentration de l'enzyme libre

$[E] = [E]_L + [ES] \implies [E]_L = [E] - [ES]$

$V = K_3[ES]$

Vitesse de formation de $[ES] = \frac{d[ES]}{dt} = K_1[E]_L[S] = K_1([E] - [ES])[S]$

Vitesse de disparition de $[ES] = -\frac{d[ES]}{dt} = K_2[ES] + K_3[ES] = [ES](K_2 + K_3)$

Etat stationnaire: V de formation de $[ES] =$ V de disparition de $[ES]$

$K_1([E] - [ES])[S] = [ES](K_2 + K_3)$

$$K_1([E]-[ES])[S] = [ES] (K_2 + K_3)$$

$$\frac{([E]-[ES])[S]}{[ES]} = \frac{(K_2+K_3)}{K_1} = K_M \quad [E][S] - [ES][S] = [ES] K_M$$

$$[ES](K_M+[S]) = [E][S] \quad [ES] = \frac{[E][S]}{K_M+[S]}$$

Or, $V = K_3[ES]$

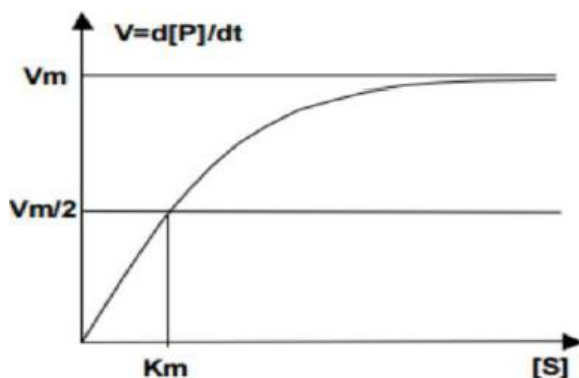
$$V = K_3 \frac{[E][S]}{K_M+[S]}$$

$$V=V_{max} \quad [E]=[ES]$$

$$V_{max} = K_3 [E]$$

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

Equation de M-M



$[S] \ll K_M$	$V = V_{max} [S] / K_M$
$[S] = K_M$	$V = V_{max} / 2$
$[S] \gg K_M$	$V = V_{max}$

- Signification de la vitesse maximale V_{max} et constante de Michaélis K_M

a- V_{max}

- Correspond à la vitesse initiale quand l'enzyme est saturée par son substrat
- Renseigne sur l'efficacité catalytique de l'enzyme $V_{max} = k_2 [Et] \Rightarrow V_{max} = k_{cat}[Et]$

k_{cat} : Turn Over Number « **TNO** », nombre de molécules de substrat transformé en produit par unité de temps, c'est l'**efficacité catalytique** de l'enzyme : la fréquence de l'acte catalytique (s^{-1}).

b- K_M

□ **Affinité** de l'enzyme pour le substrat, K_M (10^{-2} à 10^{-6} moles/litre) est d'autant plus élevée que l'affinité de l'enzyme pour le substrat est plus faible (inversement proportionnelle à l'affinité).

□ Concentration initiale de substrat pour laquelle $V_i = 1/2 V_{max}$, donc la moitié des sites actifs de l'enzyme est occupée par le substrat.

Quand $[S] \gg K_M$

$$V_i = V_{max} = k_{cat} [E_t]$$

□ Quand $[S] \ll K_M$

$$V_i = (k_{cat} / K_M) [E_t] [S]$$

❖ **Activité enzymatique (AE)**: moles (ou mmoles) de substrat transformé par minute et pour un volume donné.

AE = vitesse de réaction

Parfois on trouve Unité Internationale d'Enzyme UI

UI = AE = micromoles de substrat transformés / minute pour un volume donné

❖ **Activité spécifique** d'une réaction enzymatique est toujours déterminée dans les conditions saturantes $[S] \gg [E]$.

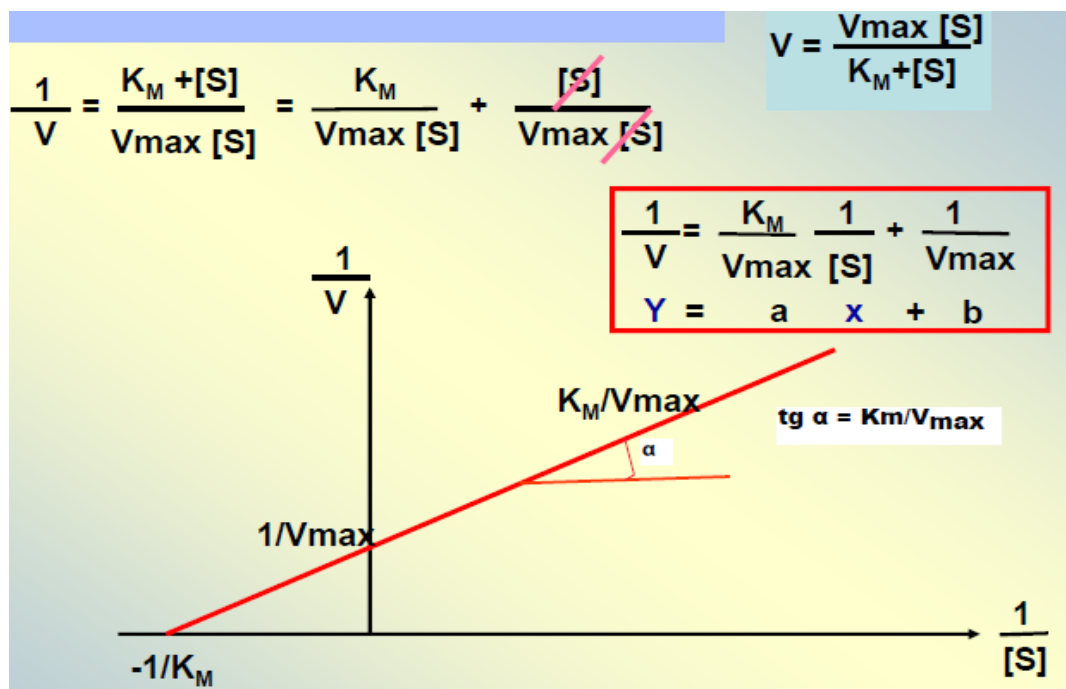
❖ **Activité spécifique** = Activité enzymatique rapportée à une quantité de protéines (mg) utilisée pour la catalyse. AS = mmoles/min/mg.

❖ **Nombres d'unités** = Activité spécifique x totla mg protéines dans la préparation enzymatique.

❖ **Activité moléculaire spécifique** = moles de substrat transformé par minute et par mole d'enzyme (aux environs de 10^5)

f. représentation graphique de Lineweaver et Burk

On peut écrire l'équation de Michaelis-Menten selon l'équation de Lineweaver et Burk (figure suivante).

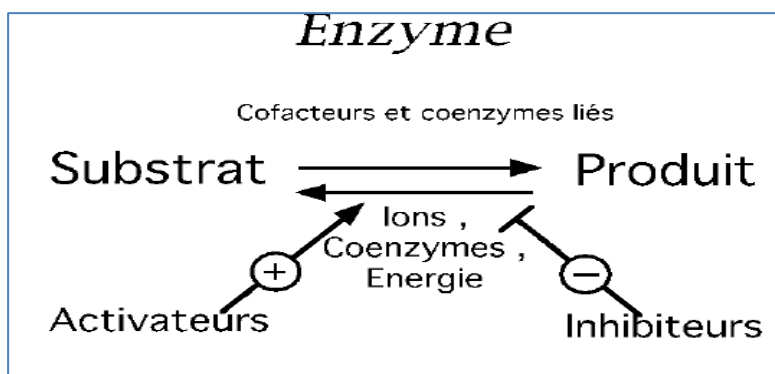


- ❖ Cette représentation de **Lineweaver et Burk** est plus commode que la précédente pour déterminer les constantes cinétiques K_m et V_{max} puisqu'il suffit de lire sur le graphique les valeurs correspondant aux intersections de la droite avec les axes de coordonnées. De plus, étant une droite, elle nécessite moins de points expérimentaux. En outre, elle permet de distinguer entre différents types d'inhibiteurs comme nous le verrons plus loin.
- ❖ Le graphe représentant cette fonction linéaire est appelé graphe en double inverse puisque les deux variables sont respectivement les inverses des variables de l'hyperbole précédente. Sur l'axe des x , les concentrations croissantes du substrat ont des inverses qui diminuent de sorte que le croisement des axes représente l'inverse d'une concentration infinie du substrat, alors que la plus petite concentration voit son inverse ($2 / K_m$) repoussé à l'extrémité de l'axe. De même sur l'axe des y , les inverses des vitesses les plus lentes sont les plus haut situés. L'étude de cette fonction montre que l'ordonnée à l'origine est égale à l'inverse de la vitesse maximum. Le double de cette ordonnée correspond à l'inverse de la moitié de la vitesse maximum et par conséquent l'abscisse du point de la droite qui a cette ordonnée est l'inverse du K_m . Une telle droite est facile à tracer à partir des mesures expérimentales pourvu qu'on exprime les résultats en inverses des vitesses initiales en fonction des inverses des concentrations de substrat choisies. Cette extrapolation permet de déterminer graphiquement les valeurs cherchées des constantes V_{max} et K_m .

9. Inhibition de l'activité enzymatique

Toute molécule qui modifie la vitesse d'une réaction enzymatique est appelée un **effecteur** :

- les effecteurs qui augmentent l'activité enzymatique sont des **activateurs**
- à l'inverse, ceux qui la diminuent sont des **inhibiteurs**
- certaines molécules peuvent, selon les conditions, se comporter comme un activateur ou un inhibiteur.



Le substrat et le produit, l'enzyme, les ions, les coenzymes et l'énergie sont les facteurs indispensables à la réaction enzymatique. Les autres molécules qui entrent en liaison avec l'enzyme, les ligands, peuvent avoir un effet positif ou négatif. Ils peuvent favoriser ou au contraire contrarier le déroulement de la réaction.

◆ 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.

◆ Cofacteur

Corps chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique :

- pour transporter ou compléter un substrat ;
- pour accepter un produit ;
- comme participant à la structure de l'enzyme.

· Les cofacteurs peuvent être des ions comme l'atome de Zinc de l'anhydrase carbonique ou de petites molécules minérales habituellement présentes dans les milieux biologiques, à commencer bien sûr par la molécule d'eau.

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

◆ Coenzymes

Molécule biologique intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction :

- les coenzymes libres interviennent dans la réaction de manière stoechiométrique ;
- les coenzymes liés interviennent dans la réaction de manière catalytique.

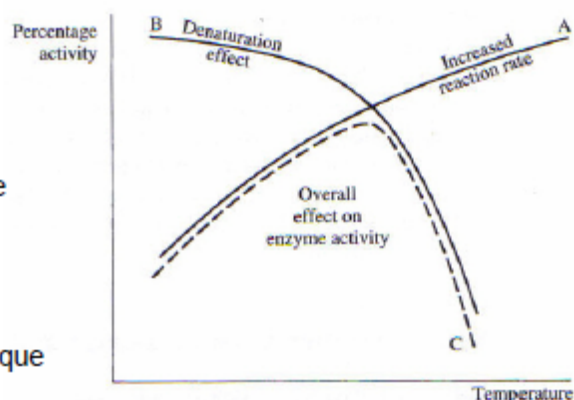
· Les coenzymes sont des molécules biologiques c'est à dire que leur synthèse naturelle ne peut être faite que par des cellules vivantes. Lorsque cette synthèse n'est pas inscrite dans le patrimoine génétique d'une espèce, alors tout ou partie de la molécule du coenzyme doit être apporté à cette espèce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

9.1. Effets de paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique

Les paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température, la force ionique, la pression et d'autres, conditionnent l'activité des enzymes. Ce sont des caractéristiques particulières car la très grande majorité des organismes vit dans des conditions qui correspondent à une plage réduite de ces paramètres.

9.1.1. Influence de la température

- ❖ Une augmentation de la température:
 - augmente la vitesse de la réaction chimique
 - augmente la vitesse de dénaturation de l'enzyme (une protéine), diminuant ainsi son activité catalytique
- ❖ La somme de ces deux effets donne une courbe caractéristique de l'activité enzymatique-température qui passe par un maximum, montrant ainsi l'existence d'une température optimale.

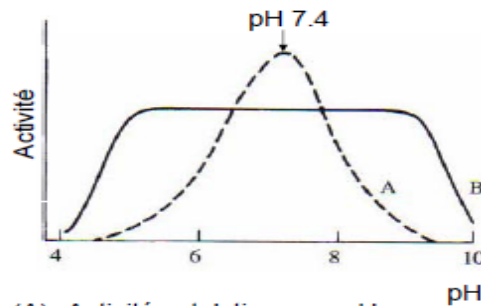


(D'après D.J. Holme, H. Peck, *Analytical Biochemistry*, 3^e éd., 1998)

9.1.2. Influence du pH

- ❖ Les enzymes sont très sensibles aux variations du pH et fonctionnent bien sur une gamme limitée du pH.
- ❖ Les mesures de nombreuses activités enzymatiques en fonction du pH donnent des courbes qui passent par un maximum, montrant ainsi l'existence d'un pH optimum.
- ❖ Le pH peut agir sur plusieurs facteurs :
 - l'ionisation des résidus de l'enzyme et du substrat et/ou du produit
 - la structure tertiaire des protéines et donc la stabilité de l'enzyme
 - la liaison du substrat à l'enzyme
 - l'activité catalytique de l'enzyme

Effet du pH sur l'activité de la lactodéshydrogénase

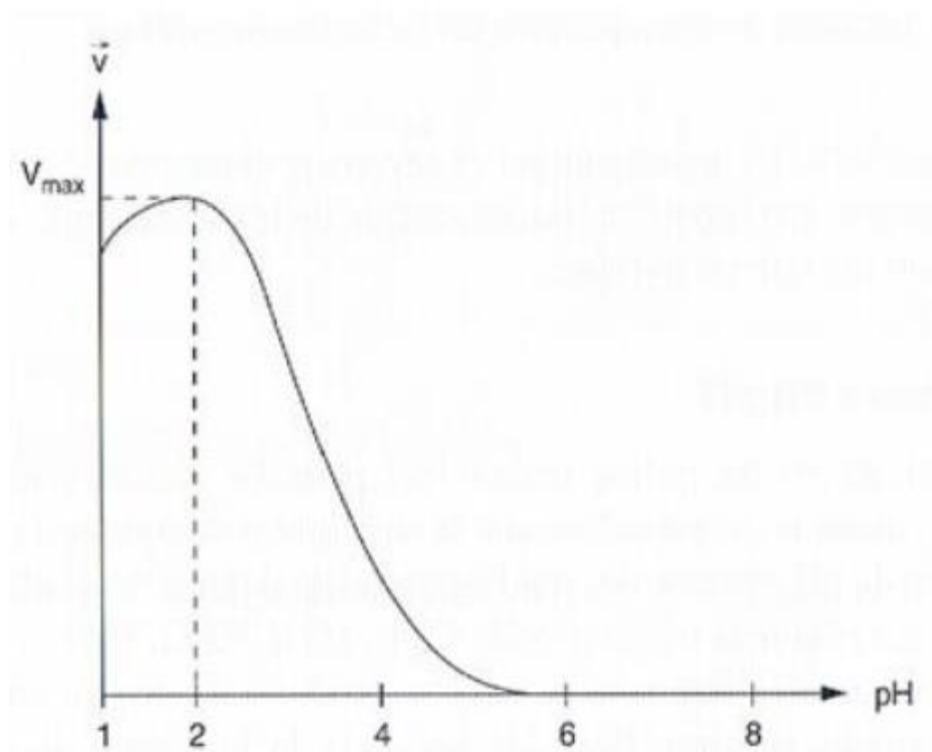


(A) Activité catalytique vs. pH

(B) Activité mesurée à pH 7.4 après incubation de l'enzyme pendant 1 h à différents pH's

(D'après D.J. Holme, H. Peck, *Analytical Biochemistry*, 3^e éd., 1998) 126

La plupart des enzymes ont un pH optimal proche de 7, qui est le pH des liquides physiologiques. Il existe toutefois des cas particuliers dont celui de la pepsine est très intéressant. Cette protéase, enzyme spécialisée dans l'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau de la cavité gastrique où règne un pH allant de 2 à 3,5. La pepsine présente la particularité d'avoir un pH optimal sensiblement égale à 2



e 24. Influence du pH sur l'activité enzymatique de la pepsine.

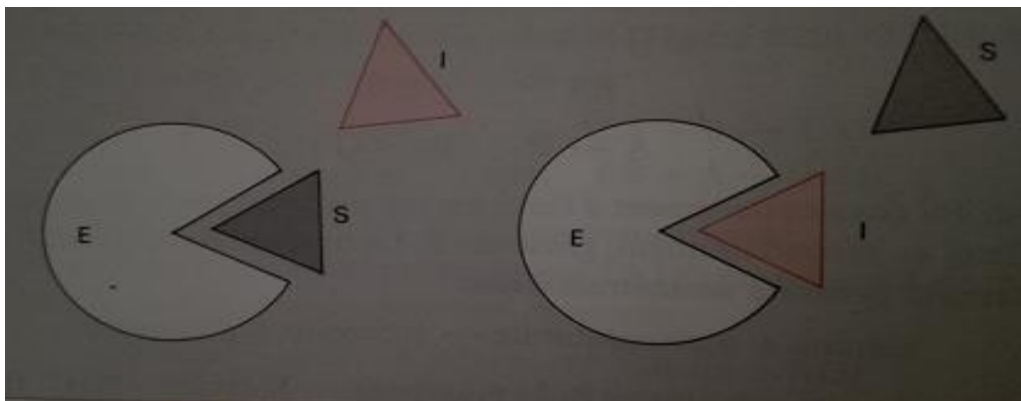
9.2. Inhibiteurs

En plus de leurs substrats, des enzymes fixent des substances dont elles sont pourtant incapables de catalyser la conversion. Ces substances sont souvent des **inhibiteurs**. Elles se

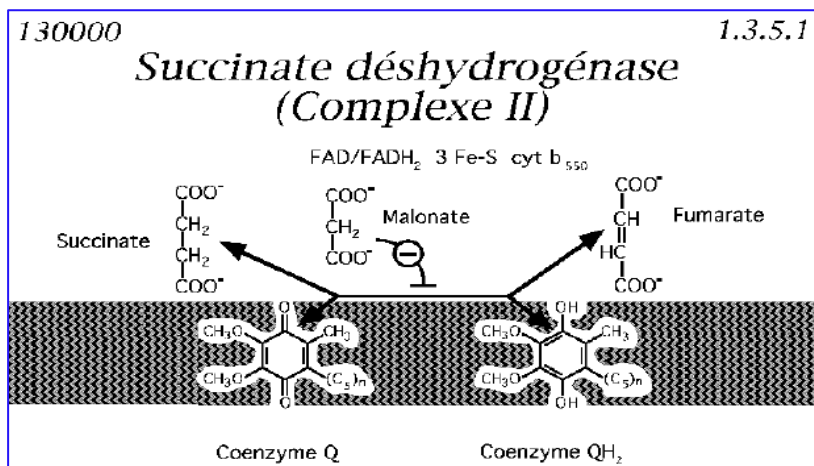
lient aux enzymes en des sites spécifiques, en principe de façon réversible et non-covalente. L'inhibition enzymatique a une signification physiologique. Elle indique que les enzymes sont sensibles à des signaux chimiques.

9.2.1. Inhibiteurs compétitifs

L'inhibition compétitive est probablement la plus fréquemment rencontrée. Du fait, de quelque analogie structurale, l'inhibiteur entre en compétition avec le substrat pour le même site de liaison (figure suivante). Il barre la route au substrat.



❖ Exemple d'inhibition compétitive : la succinate déshydrogénase

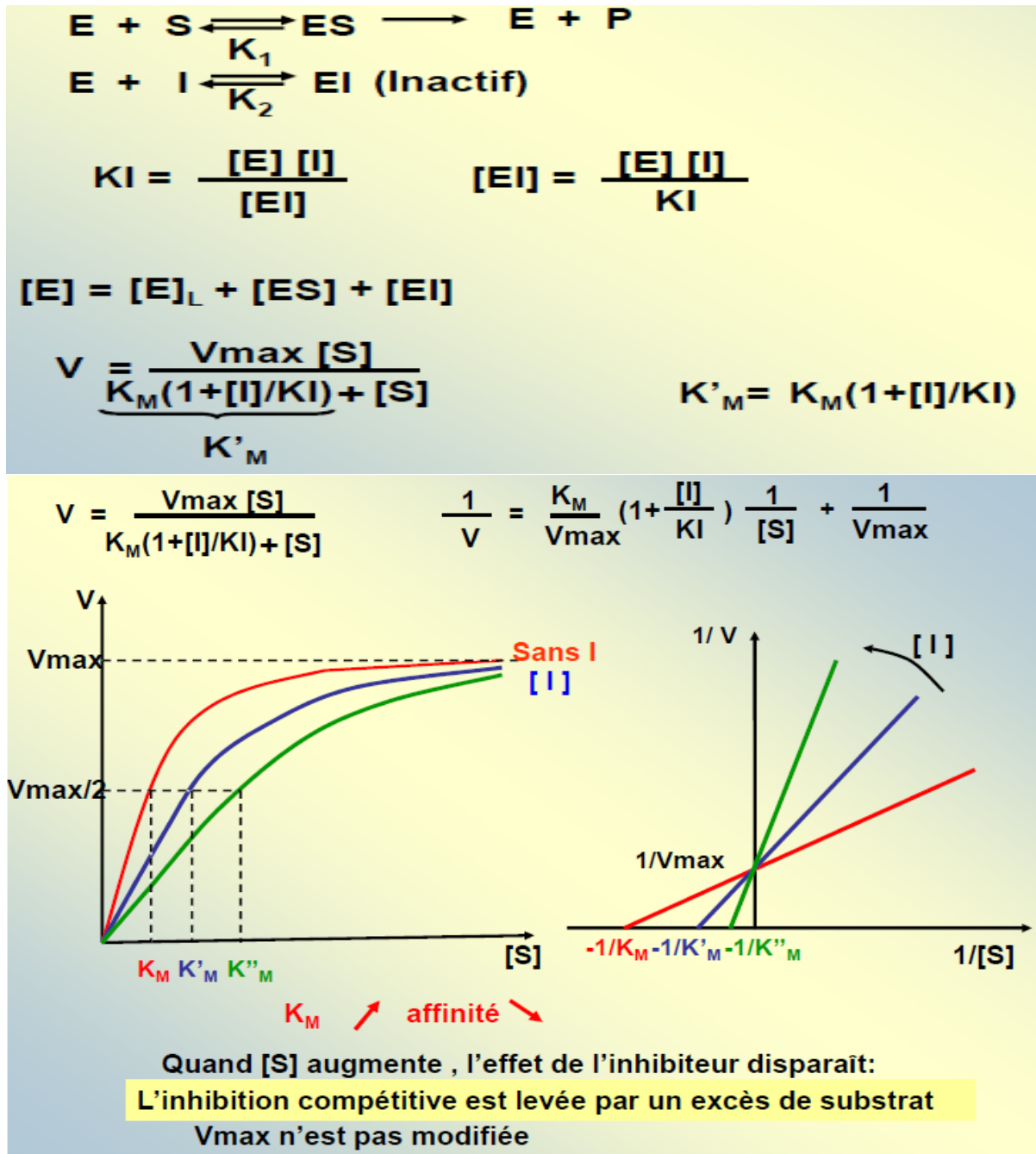


- La succinate déshydrogénase est une enzyme de la membrane interne de la mitochondrie. Sa structure est complexe et comporte plusieurs coenzymes liés.
- La réaction catalysée est une oxydation du succinate en fumarate avec transfert des hydrogènes sur le coenzyme Q. Le succinate est un diacide à 4 carbones, qui se fixe à l'enzyme grâce aux charges négatives de ses fonctions acides ; l'enzyme peut alors déplacer les deux hydrogènes des carbones centraux.
- Le malonate est aussi un diacide et la distance entre ses deux charges négatives est voisine de celle qui sépare les deux fonctions acides du succinate : le malonate peut se fixer aussi sur le site actif de l'enzyme, mais la structure de son unique carbone intermédiaire ne permet évidemment pas l'oxydation ; la liaison de la succinate déshydrogénase avec le malonate rend donc l'enzyme inactive. Une concentration plus élevée de l'un de ces deux diacides chassera l'autre du site actif de l'enzyme, de sorte qu'il y a bien compétition des deux molécules vis à vis de l'enzyme.

La présence simultanée de l'inhibiteur et du substrat entraîne une compétition pour occuper le site actif de l'enzyme.

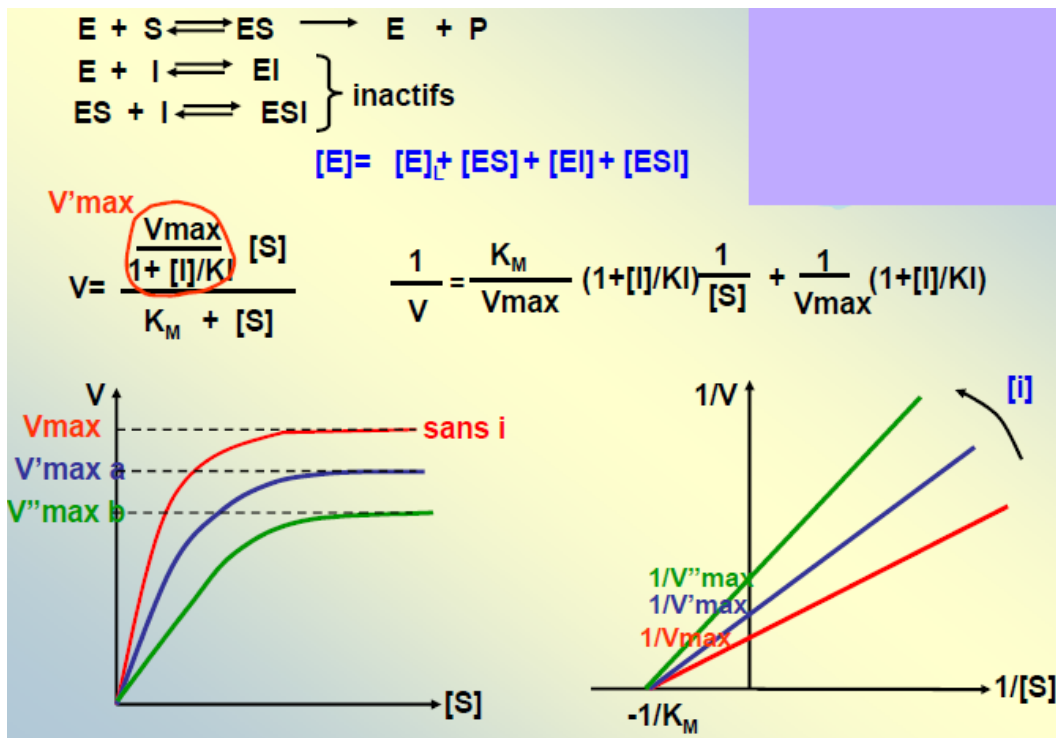
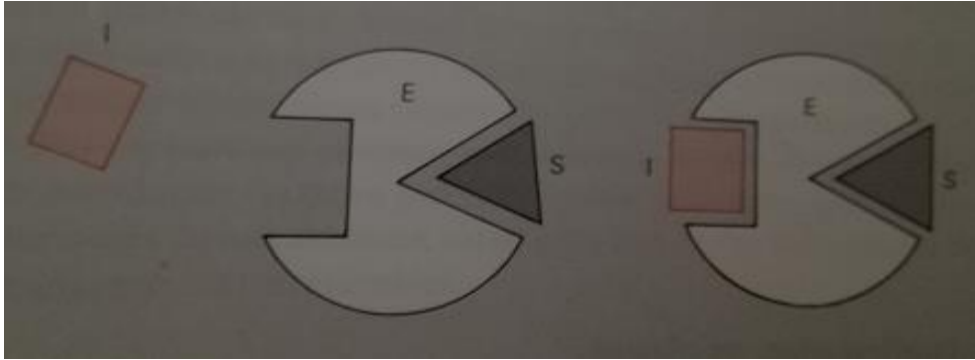
Deux possibilités s'offrent donc à l'enzyme ES et EI, selon les équilibres suivants :

La présence de l'inhibiteur **ne change pas Vmax** mais **augmente Km**. En d'autres termes, dans l'équation de Michaelis-Menten, Km est remplacé par un Km'.



9.2.2. Inhibiteurs non compétitifs

Dans ce cas, la fixation de l'inhibiteur se fait sur l'enzyme au niveau d'un site différent du site de fixation du substrat. Il n'y a donc aucune compétition entre le substrat et l'inhibiteur pour l'occupation du site actif (figure suivante).



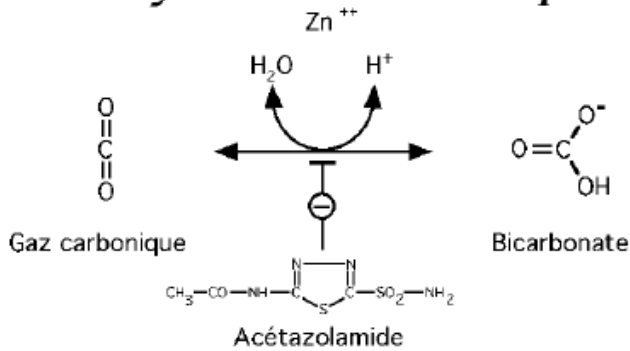
- Ce type d'inhibition n'est pas levé par un excès de substrat
- K_M est inchangé, l'affinité de E pour S n'est pas affectée
- L'inhibiteur peut interagir avec l'enzyme libre ou avec le complexe ES.
- Dans ce type d'inhibition, la quantité d'enzyme active semble diminuer lorsque $[I]$ augmente; V_{max} de la réaction diminue.

Exemple d'inhibition non compétitive : l'anhydrase carbonique

L'anhydrase carbonique est inhibée par l'acétazolamide qui est un médicament. Cette inhibition est non compétitive vis à vis du gaz carbonique, substrat de l'enzyme.

4.2.1.1
29000
Isoenzymes

Anhydrase carbonique



9.2.3. Inhibiteurs incompétitifs

L'inhibiteur ne se combine pas avec l'enzyme libre et n'affecte pas la réaction de celui-ci avec son substrat, mais il se fixe sur le complexe enzyme-substrat pour donner un complexe enzyme-substrat-inhibiteur inactif qui ne peut plus fournir le produit normal de la réaction.

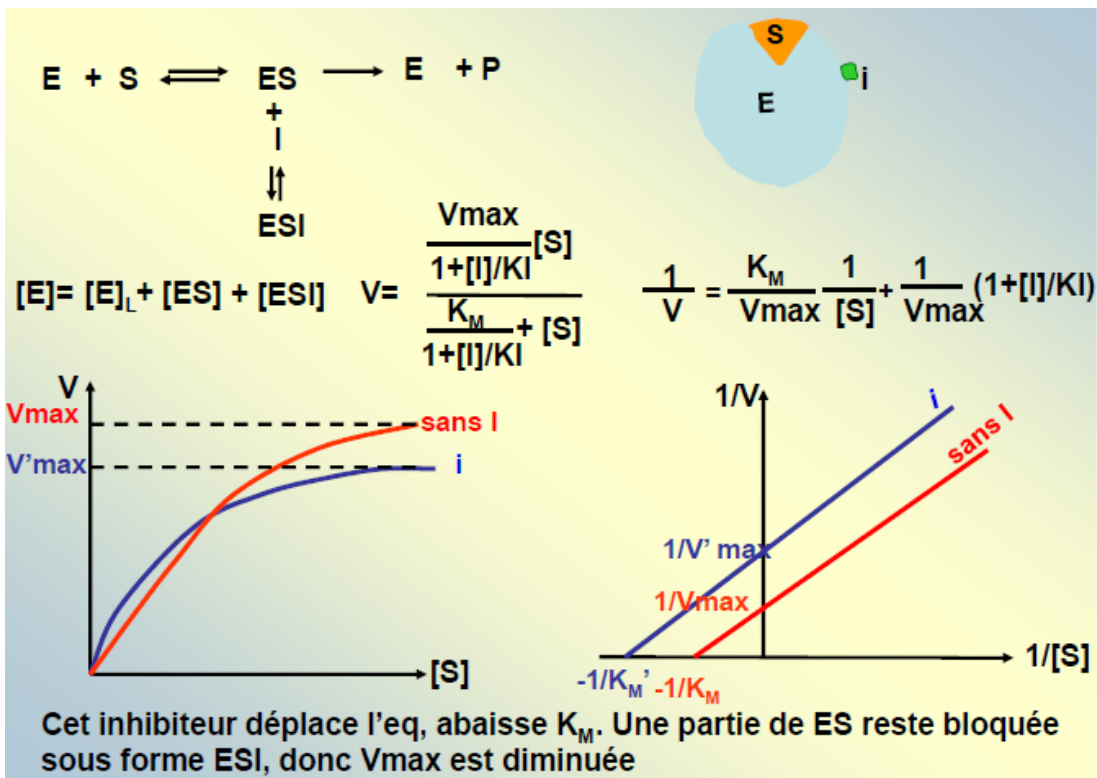


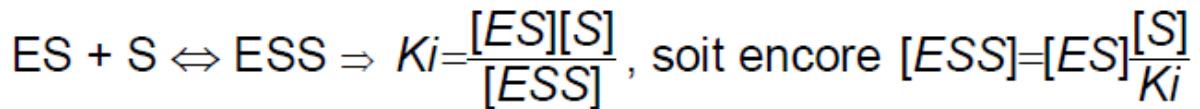
Tableau récapitulatif des inhibitions réversibles

	K_M	V_{max}	Pente
Compétitive	↗	—	↗
Non compétitive	—	↘	↗
Incompétitive	↘	↘	—

9.2.4. Inhibition par excès de substrat

Soit la réaction $E + S \rightleftharpoons ES \Rightarrow P$. On a : $K_m = \frac{[S][E_L]}{[ES]}$, soit encore $[E_L] = \frac{[ES]K_m}{[S]}$

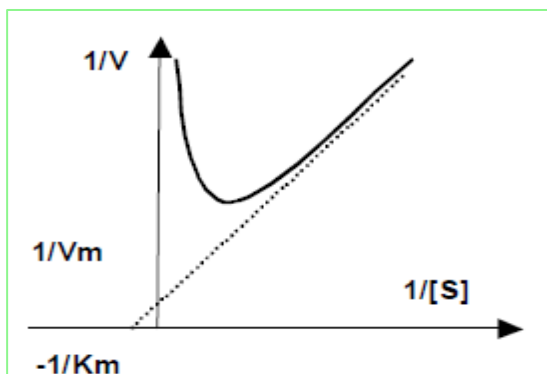
Supposons qu'une deuxième molécule de substrat puisse se fixer sur le complexe ES et le rendre inactif : cette molécule se fixe sur un site différent du premier, et nous l'appellerons site inhibiteur. Cette molécule se comporte comme un inhibiteur :



Equation de vitesse

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

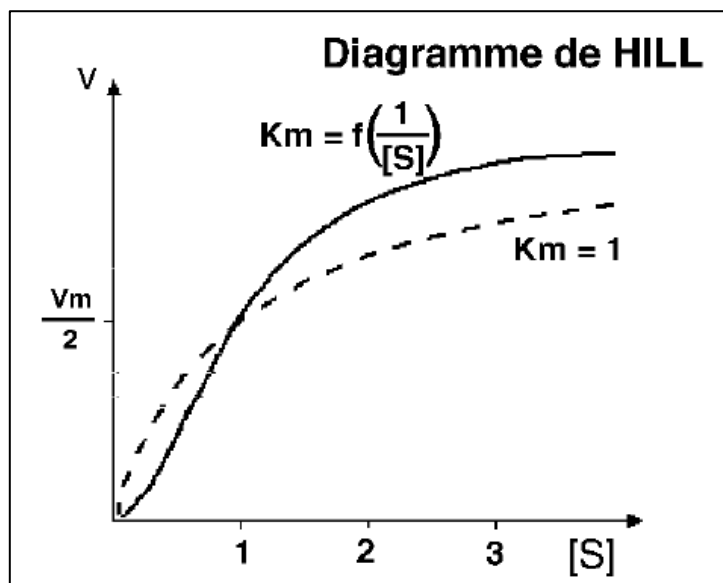
Si $[S]$ est grand, $\frac{[S]}{K_m} \rightarrow \infty$ donc $\left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i} \right) \rightarrow \infty$ soit $\frac{1}{v_i} \rightarrow \infty \Leftrightarrow v_i \rightarrow 0$



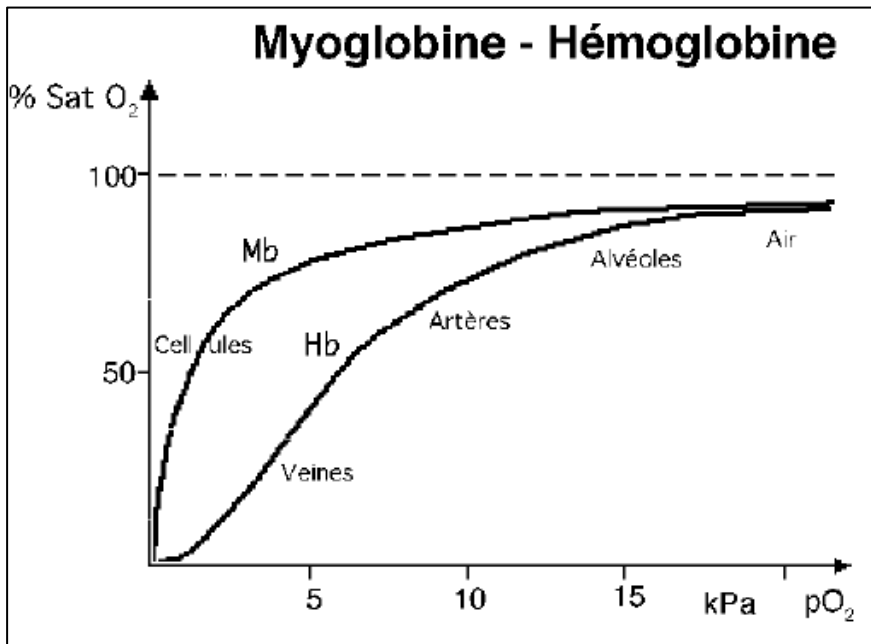
Quand on porte $1/V_i$ en fonction de $1/[S]$, on obtient une hyperbole dont l'asymptote oblique, de pente K_m/V_{max} , coupe l'axe en un point $-1/K_m$.

9.2.5. Effets allostériques

- Le comportement des enzymes que nous avons vues jusque-là, lorsque la concentration du substrat change, répond à l'équation de Michaelis : ce sont des enzymes à **cinétique michaelienne**.
 - D'autres enzymes de structure plus complexe ont une affinité vis à vis du substrat qui n'est pas une constante ou bien voient leur vitesse maximum changer en fonction de la concentration des effecteurs : ce sont les enzymes à **cinétique allostérique**.
 - Ces enzymes ont toujours une structure quaternaire composée de plusieurs chaînes d'acides aminés, formant des sous-unités ou protomères presque identiques entre elles. La protéine est donc un oligomère de 2 ou 4 sous-unités par exemple. Les protomères sont arrangées dans l'espace de façon que chacun d'entre eux ait les mêmes liaisons avec les autres.
-
- Le graphe représentant la vitesse initiale d'une enzyme allostérique n'est pas une hyperbole comme celui des enzymes michaeliennes. Les constantes de vitesse et d'affinité de telles enzymes varient en fonction des ligands, de telle sorte que la courbe prend une forme **sigmoïde**, caractéristique de la coopération qui se fait entre les protomères.
 - Sur cet exemple, on a représenté la vitesse initiale d'une réaction allostérique en fonction de la concentration d'un substrat qui lui-même exerce un effet sur l'enzyme tendant à diminuer la constante K_m . Par comparaison, la courbe en tirets représente la même réaction en cinétique michaelienne (sans cet effet allostérique).
 - Cette cinétique allostérique est plus lente que la cinétique michaelienne pour les petites concentrations du substrat et devient plus rapide au-delà. Aux environs du point d'inflexion de cette sigmoïde la pente de la courbe est plus accusée, ce qui signifie que pour une même différence entre deux concentrations du substrat, l'accélération de la réaction sera plus grande dans le cas de l'enzyme allostérique. Cette propriété de **coopérativité** des protomères donne un avantage aux systèmes allostériques par rapport aux enzymes à cinétique michaelienne pour la régulation de la vitesse des réactions enzymatiques

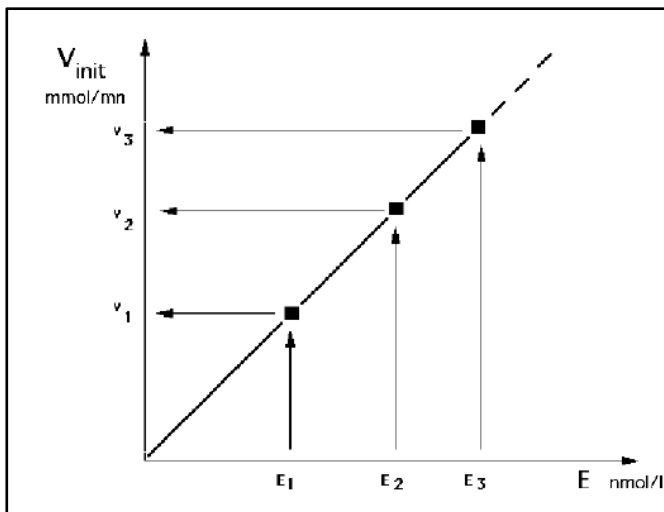


❖ Exemple d'allostérie : myoglobine ; hémoglobine



- La myoglobine est une protéine qui transporte l'oxygène dans le cytoplasme des cellules. Elle est constituée d'une seule chaîne d'acides aminés. Sa vitesse de transport de l'oxygène en fonction de la pression de ce gaz, est de type michaelien et la courbe qui la représente est une hyperbole.
- L'hémoglobine est une protéine qui transporte l'oxygène dans les globules rouges. Elle est constituée de quatre chaînes d'acides aminés. Sa vitesse de transport de l'oxygène en fonction de la pression de ce gaz, est de type allostérique et la courbe qui la représente est une sigmoïde. La coopération entre les protomères confère à l'hémoglobine une grande affinité pour l'oxygène dans les poumons où il est abondant, et au contraire une faible affinité pour l'oxygène dans les tissus où il est transmis aux cellules.
- L'hémoglobine a donc un comportement différent d'un organe à l'autre lorsque les pressions d'oxygène sont différentes. Cette protéine s'adapte mieux aux conditions du milieu grâce à l'allostérie.

9.3. Dosage enzymatique



- Représentons cette fois ces vitesses initiales en fonction des concentrations E1, E2 et E3 de l'enzyme. Il apparaît que les vitesses mesurées sont linéairement proportionnelles aux concentrations de l'enzyme utilisées.
- Cette constatation est le fondement du dosage enzymatique : en effet, la vitesse initiale d'une réaction enzymatique dans un milieu où la concentration de l'enzyme est inconnue est proportionnelle à cette concentration. En comparant cette vitesse initiale (qu'on appelle dosage enzymatique) à celles d'autres milieux de concentration en enzyme connues, on peut évaluer la concentration en enzyme qu'on cherchait. Ces dosages enzymatiques sont des mesures d'activités catalytiques qu'on exprime dans le Système International en Katal, unité qui représente une quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une mole de substrat en une seconde. En pratique médicale, le microkatal et le nanokatal sont les sous-multiples correspondant à l'ordre de grandeur des activités mesurées. Pour exprimer des concentrations d'enzyme on rapporte au volume considéré et l'unité devient le nanokatal par litre par exemple.
- L'Unité Internationale est une ancienne unité de mesure représentant la quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une micromole de substrat en une minute. Une Unité Internationale égale 15 nanokatal.

10. L'unité enzymatique

C'est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une certaine quantité de substrat par unité de temps. Actuellement il en existe deux :

- L'unité internationale « UI » : la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute.
- Le katal « kat » : la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde.

▪ L'activité enzymatique spécifique

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

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

Elle permet de vérifier la pureté d'une préparation enzymatique.

▪ L'activité enzymatique moléculaire

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

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