

# BIOCHIMIE



## Chapitre4 : Enzymologie

### Contenu de chapitre :

1. Introduction .....	2
2. Généralités .....	2
3. Propriétés des enzymes .....	2
4. Structure des enzymes .....	5
5. Mécanisme d'action des enzymes .....	6
6. Nomenclature et classification .....	7
7. Cinétique enzymatique .....	11
8. Activité catalytique .....	17
9. Les enzymes allostérique .....	21

## 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.

## 2. Généralité

Les enzymes sont des biocatalyseurs utilisés pour accélérer les réactions chimiques. Le mot « enzyme » a été utilisé pour la première fois par le physiologiste allemand Wilhelm Kühne en 1878, lorsqu'il décrivait la capacité de la levure à produire de l'alcool à partir de sucres. Il est dérivé des mots grecs en (qui signifie « à l'intérieur ») et zume (qui signifie la 'levure'). Les enzymes sont des protéines constituées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques. Les enzymes ont un site actif qui fournit un environnement chimique unique, constitué de certains groupes R d'acides aminés (résidus). Cet environnement unique est bien adapté pour convertir des réactifs chimiques particuliers pour cette enzyme appelés substrats. On pense que les enzymes et les substrats se lient avec un ajustement induit, ce qui signifie que les enzymes et les substrats subissent de légers ajustements conformationnels au contact du substrat, conduisant à la liaison. L'action des enzymes doit être régulée de manière à ce que dans une cellule donnée, à un moment donné, les réactions souhaitées soient catalysées et les réactions indésirables ne le soient pas. Les enzymes sont régulées par des conditions cellulaires appropriées telles que la température et le pH.

## 3. Propriétés des enzymes

### 3.1. Propriétés générales

- Les enzymes sont des protéines qui déclenchent et accélèrent les réactions biologiques
- L'acidité du milieu affecte l'activité enzymatique (pH spécifique). À un certain pH, chaque catalyseur est le plus actif. Par exemple, la pepsine a un pH de 2 alors que la trypsine a un pH de 8,5. Le pH de la plupart des enzymes internes est proche de la neutralité
- Les enzymes ont la capacité d'accélérer une réaction dans les deux sens
- Toutes les enzymes ont des sites actifs qui participent à des activités biologiques.
- Les enzymes sont des molécules extrêmement instables qui ne peuvent être dissoutes que dans du glycérol dilué, du NaCl et de l'alcool dilué.

- Les enzymes sont actives lorsque la température est parfaite
- Les enzymes sont des protéines dans la nature, même si toutes les protéines ne sont pas des enzymes.
- Les enzymes réduisent la quantité d'énergie nécessaire pour activer une molécule de substance, permettant ainsi à la réaction biochimique de se produire à la température corporelle, qui est de 37 °C.

### **3.2. Propriétés physiques**

- **Activité enzymatique**

Le mécanisme d'action de l'enzyme dépend fortement de paramètres tels que la température, le pH et les concentrations d'enzyme et de substrat présents dans la solution. L'activité enzymatique maximale est observée à la température et au pH optimaux (37°C). La réaction enzymatique sera ralentie si les concentrations d'enzyme et de substrat sont trop faibles.

En revanche, une plus grande concentration d'enzyme se traduira par une activité enzymatique plus rapide car davantage de substrats interagiront avec le site actif de l'enzyme, entraînant la création de davantage de produits. La réaction enzymatique ne changera pas une fois que la vitesse de réaction aura atteint sa valeur maximale, même après l'ajout de l'enzyme et du substrat.

- **Nature colloïdale**

En raison de leur taille énorme ou de leur poids moléculaire élevé, les enzymes agissent comme des colloïdes. En conséquence, les enzymes ont peu ou pas de tendance à dialyser ou à traverser la membrane semi-perméable.

- **Précipitation enzymatique**

Les enzymes étant amphotères, elles peuvent être précipitées par des solutions acides et alcalines. La présence d'éthanol ainsi qu'une concentration élevée de sels inorganiques tels que le sulfate d'ammonium facilitent la précipitation des enzymes.

- **Masse moléculaire**

Les enzymes sont de grosses macromolécules protéiques qui contiennent une chaîne polypeptidique contenant des acides aminés provenant de diverses séquences d'acides aminés. Les acides aminés sont maintenus ensemble par environ 200 à 300 liaisons peptidiques. En conséquence, les enzymes ont un poids moléculaire assez important.

- **Solubilité enzymatique**

Les enzymes sont solubles dans diverses solutions, notamment l'eau, le NaCl, le glycérol dilué et l'alcool.

- **Dénaturation enzymatique**

Divers facteurs, notamment des températures élevées (plus de 40°C), des fluctuations de pH (à la fois trop faibles et trop élevées), l'ionisation des métaux lourds et une concentration élevée de sel, peuvent dénaturer une enzyme en perturbant les connexions non covalentes entre et au sein de l'enzyme. Après un certain temps, cela provoque des changements structurels et fonctionnels dans l'enzyme, conduisant finalement à une perte d'activité enzymatique.

### 3.3. Propriétés chimiques

- **Propriétés catalytiques**

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques dotés de caractéristiques catalytiques. Les quantités plus élevées de produits chimiques sont catalysées par un petit nombre d'enzymes. Cela signifie que les enzymes ont une grande capacité à convertir de grandes quantités de substrat en produit.

- **Spécificité des enzymes**

Les enzymes sont de nature extrêmement spécifique, ce qui signifie qu'une seule enzyme peut catalyser un seul processus. L'enzyme sucrase, par exemple, peut catalyser exclusivement l'hydrolyse du saccharose. Il existe différents types de spécificités dans les enzymes :

- Spécificité de la liaison : également appelée spécification relative. Ici, les enzymes sont directement liées à l'obligation. Par exemple ; La peptidase est une liaison liée à un peptide spécifique, la lipase est directement liée à la liaison ester dans les lipides.
- Spécificité de groupe : Également appelées spécifications structurelles. Par exemple ; la pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques entre les groupes d'acides aminés qui font partie des acides aminés parfumés.
- Spécificité du substrat : Également appelée spécification complète. Ici, l'enzyme ne fonctionne que sur un substrat particulier. Par exemple ; L'anhydrase carbonique ne fonctionne que sur l'acide carbonique.

- Spécificité Optique : Aussi appelée stéréo-spécificité. Il s'agit de la plus haute spécificité exprimée par une enzyme. Ici, les enzymes ciblent non seulement le substrat mais également leur activation optique. Par ex. La L-aminoacide oxydase ne fonctionne que pour les acides aminés L, pas pour les acides aminés D. De même, l' $\alpha$ -amylase ne fonctionne que dans l'interaction glycosidique  $\alpha$ -1--4 de l'amidon et du glycogène. Incapable d'hydrolyser la liaison glycosidique  $\beta$ -1--4 de la cellulose.
- Spécificité du cofacteur : certaines enzymes s'associent à un cofacteur non protéique nécessaire pour l'activité enzymatique. Les cofacteurs couramment rencontrés comprennent les ions métalliques tels que comme  $Zn^{+2}$  ou  $Fe^{+2}$  et des molécules organiques, appelées coenzymes, qui sont souvent dérivés de vitamines. Par exemple, la coenzyme contient de la niacine, FAD contient de la riboflavine et la coenzyme A contient de l'acide pantothénique.
- Spécificité géométrique : Ici, la spécification est très réduite. D'autres enzymes fonctionneront sur un petit éventail de substrats similaires ayant la géométrie de la même structure. Par exemple. L'alcool déshydrogénase peut convertir le méthanol et le n-propanol en aldéhydes.
- **Réversibilité**

La plupart des réactions catalysées par les enzymes sont réversibles. La réversibilité de la réaction dépend des exigences de la cellule. Dans certains cas, il existe des enzymes distinctes pour les réactions directes et inverses. Certaines réactions catalysées par des enzymes ne sont pas réversibles.

#### **4. Structure des enzymes**

Il est important de comprendre la structure des enzymes, les enzymes catalysant les réactions chimiques nécessaires au métabolisme, à la croissance et à la reproduction.

Les enzymes sont composées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques, qui sont de longues chaînes d'acides aminés. La séquence spécifique d'acides aminés dans une enzyme détermine sa structure primaire. La structure primaire est la séquence linéaire d'acides aminés dans un polypeptide ou une protéine. Cependant, la structure primaire ne peut à elle seule expliquer la complexité et la diversité des fonctions enzymatiques ; c'est là que les niveaux supérieurs de structure entrent en jeu.

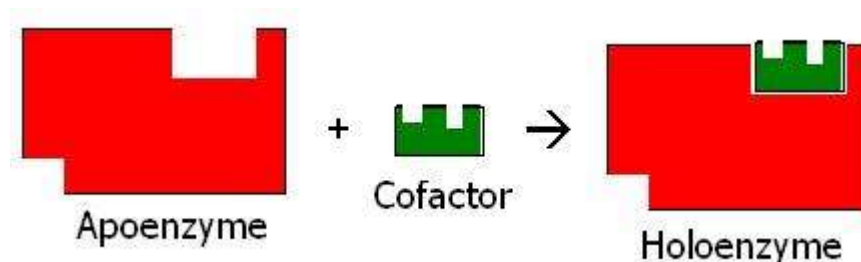
La disposition spécifique des résidus d'acides aminés dans l'espace détermine la structure tridimensionnelle de l'enzyme, essentielle à son fonctionnement. La structure tridimensionnelle des enzymes peut être divisée en plusieurs niveaux :

- Structure secondaire, qui fait référence à la structuration locale des acides aminés, telle que la formation d'hélices alpha ou de feuillets bêta.
- Structure tertiaire, qui fait référence à la conformation tridimensionnelle globale de l'enzyme, y compris l'emplacement du site actif et d'autres groupes fonctionnels.
- Structure quaternaire, qui fait référence à la relation spatiale entre les sous-unités dans les enzymes multimériques (Multimère fait référence à un complexe de plusieurs sous-unités identiques ou non identiques).

De nombreuses enzymes nécessitent la présence de petites unités ou cofacteurs non protéiques pour effectuer leur réaction particulière. Les cofacteurs peuvent être un ou plusieurs ions inorganiques, tels que  $Zn^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$ , ou une molécule organique complexe appelée coenzyme. Un métal ou une coenzyme attachée de manière covalente à l'enzyme est appelé groupe prothétique (hème dans l'hémoglobine). Certaines coenzymes, telles que le  $NAD^+$ , sont liées et libérées par l'enzyme au cours de son cycle catalytique et fonctionnent effectivement comme des co-substrats. De nombreuses coenzymes sont dérivées de précurseurs de vitamines.

Une enzyme complète catalytiquement active avec son coenzyme ou son ion métallique est appelée holoenzyme.

La partie protéique de l'enzyme seule, sans son cofacteur, est appelée apoenzyme.



## 5. Mécanisme d'action enzymatique

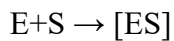
Le mécanisme d'action des enzymes implique une série d'étapes qui facilitent les réactions biochimiques dans notre corps. Les enzymes possèdent un site actif, une partie spécifique de la molécule qui a une forme définie et les groupes fonctionnels nécessaires à la liaison des

molécules réactives, appelés substrats. L'enzyme et le substrat forment une réaction intermédiaire avec une faible énergie d'activation, obtenue sans aucun catalyseur.

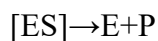
Le mécanisme de base de l'action de l'enzyme commence par la liaison du substrat au site actif de l'enzyme. Ce site actif est une zone spécifique qui se combine au substrat. Une fois le substrat lié à ce site actif, ils forment un complexe qui produit alors le produit et l'enzyme. Le substrat qui se fixe à l'enzyme a une structure spécifique et ne peut s'adapter qu'à une enzyme particulière. Ainsi, en fournissant une surface au substrat, un enzyme réduit l'énergie d'activation de la réaction.

L'action enzymatique se déroule essentiellement en deux étapes :

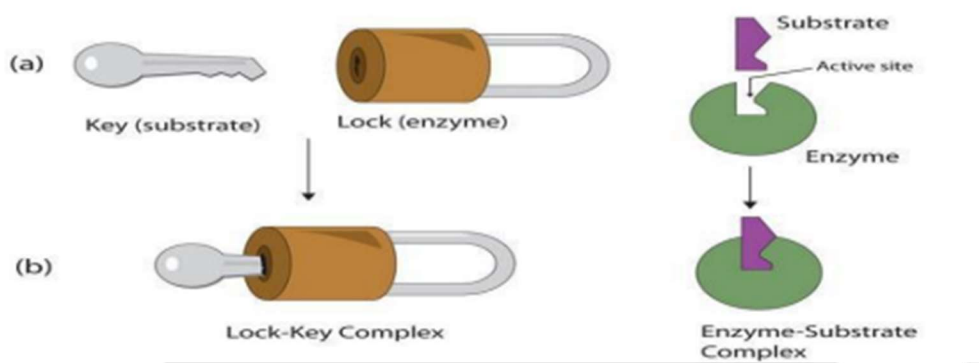
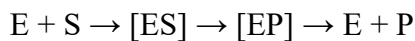
Étape 1 - Combinaison de l'enzyme et du substrat.



Étape 2 – Désintégration de la molécule complexe pour donner le produit.



Ainsi, l'ensemble de l'action catalytique des enzymes se résume comme suit :



## 6. Nomenclature et classification

### 6.1. Classification des enzymes

La classification enzymatique (appelée enzyme commission EC) est basée sur les recommandations du Comité de nomenclature de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB).

La Commission des enzymes (CE) divise les enzymes en six classes principales selon le type de réaction catalysée :

- **Classe 1 : Oxydoréductases (EC1)**

Ce sont des enzymes qui impliquent des réactions redox dans lesquelles l'hydrogène ou des atomes d'oxygène ou des électrons sont transférés entre les molécules. Cette classe comprend les déshydrogénases (transfert d'hydrure), les oxydases (transfert des électrons vers l'oxygène moléculaire), oxygénases (transfert d'oxygène) et les peroxydases (transfert d'électrons au peroxyde). Par exemple : l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH),  $\text{NAD}^+$  utilisé comme donneur d' $\text{H}^+$ .

- **Classe 2 : Transférases (EC 2)**

Ces enzymes permettent le transfert des radicaux ou des groupes d'atomes d'une molécule (substrat donneur) à une molécule (substrat accepteur). Le nom complet comprend le donneur, l'accepteur, le radical transféré suivi de transférase. Il en existe plusieurs types :

- Des enzymes qui transfèrent un groupe méthyle ( $-\text{CH}_3$ ) : Ce sont les méthyltransférases ou méthylases. Le donneur est souvent la S-adénosylméthionine.
- Des enzymes qui transfèrent un groupe hydroxyméthyl ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ).
- Des enzymes qui transfèrent un groupement carboné comportant des fonctions aldéhydes ( $-\text{CHO}$ ) ou cétones ( $-\text{CO}-\text{R}$ ).
- Des enzymes qui transfèrent des carboxyles ( $-\text{COOH}$ ).
- Des enzymes qui transfèrent des molécules glucidiques.
- Aminotransférases ( $-\text{NH}_2$ ).
- Phosphotransférases.

- **Classe3 : Hydrolases (EC 3)**

Ces enzymes catalysent l'hydrolyse d'une liaison chimique, ce qui implique l'ajout d'eau. Les exemples incluent les lipases, qui décomposent les lipides en acides gras et en glycérol, et les protéases, qui décomposent les protéines en acides aminés.



- **Classe4 : Lyases (EC 4)**

Les lyases catalysent l'ajout ou la suppression de groupes chimiques par des réactions de rupture de liaison non hydrolytiques. Ces enzymes clivent C C, C O, C N, C S, conduisant à la formation d'une double liaison ou ajoutant des groupes aux doubles liaisons. Ces enzymes catalysent le clivage d'une liaison chimique sans ajout d'eau et sans transfert d'électrons. Les exemples incluent les décarboxylases, qui éliminent un groupe carboxyle d'un substrat, et les synthases, qui catalysent la synthèse de nouvelles molécules.

- **Classe5 : Isomérase (EC 5)**

Les enzymes isomérases catalysent les changements structurels présents dans une molécule, provoquant ainsi le changement de forme de la molécule. Ils catalysent la formation d'un isomère d'un composé. Exemple : le phosphoglucomutase catalyse la conversion du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate (le groupe phosphate est transféré d'une position à une autre dans le même composé) lors de la glycogénolyse (le glycogène est converti en glucose pour que l'énergie soit libérée rapidement).

- **Classe6 : Ligases (EC 6)**

Ces enzymes catalysent la formation d'une liaison entre deux molécules, ce qui nécessite un apport d'énergie. Les exemples incluent l'ADN ligase, qui relie les fragments d'ADN pendant la réplication de l'ADN, et l'ATP synthase, qui synthétise l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate.

## **6.2. Nomenclature des enzymes**

### **6.2.1. Nom commun recommandé**

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. Uréase – l'hydrolyse de l'urée est catalysée

### 6.2.2. Nom systématique

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).

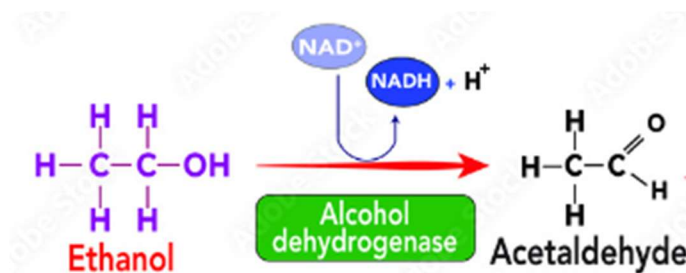
Le 1<sup>er</sup> chiffre : indique les classes des enzymes, (le type de réaction catalysée) il existe six classes.

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.

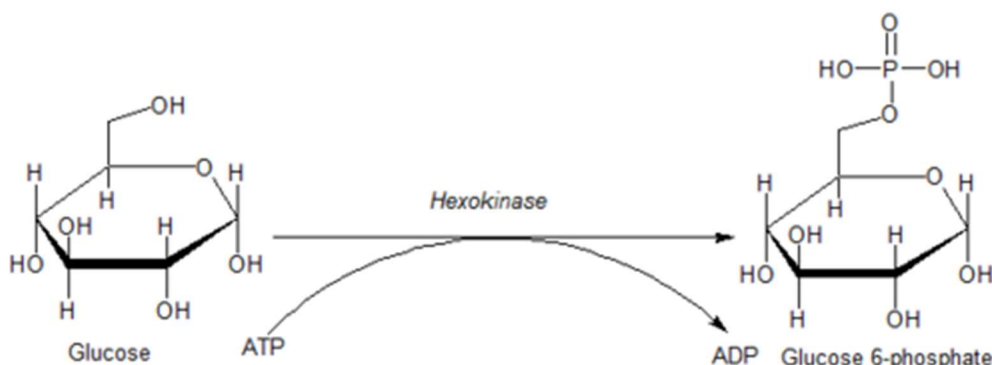
Le quatrième chiffre : numéro d'ordre de l'enzyme, en relation avec le substrat de l'enzyme. C'est le numéro de série enzymatique.

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



L'enzyme a reçu le numéro EC 1.1.1.1, mais son nom systématique est alcool : NAD<sup>+</sup>, oxydoréductase.

**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.

<p><b>Redox</b></p>	<p><b>Oxidoreductases EC 1.x.x.x</b></p> <p>Dehydrogenases Hydrogenases Oxidases/Oxygenases Hydroxylases</p>	<p>Catalase</p>
<p><b>Single replacement</b></p>	<p><b>Transferases EC 2.x.x.x</b></p> <p>Acytransferases Aminotransferases Phosphotransferases</p>	<p>Glutathione S-transferase</p>
<p><b>Double replacement/acid-base</b></p>	<p><b>Hydrolases EC 3.x.x.x</b></p> <p>Esterases Lipases Phosphatases Peptidases</p>	<p>6-Phosphogluconolactonase</p>
<p><b>Decomposition</b></p>	<p><b>Lyases EC 4.x.x.x</b></p> <p>Decarboxylases Aldolases Synthases</p>	<p>Cystathionine gamma-lyase</p>
<p><b>Isomerisation</b></p>	<p><b>Isomerases EC 5.x.x.x</b></p> <p>Razemases Mutases</p>	<p>Triosephosphate isomerase</p>
<p><b>Synthesis</b></p>	<p><b>Ligases EC 6.x.x.x</b></p> <p>Synthetases Carboxylases</p>	<p>Tryptophanyl-tRNA synthetase</p>

Current Opinion in Biotechnology

## 7. Cinétique enzymatique

### 7.1. Définition

La cinétique enzymatique est l'étude des vitesses de réaction enzymatique dans des conditions expérimentales qui les affectent.

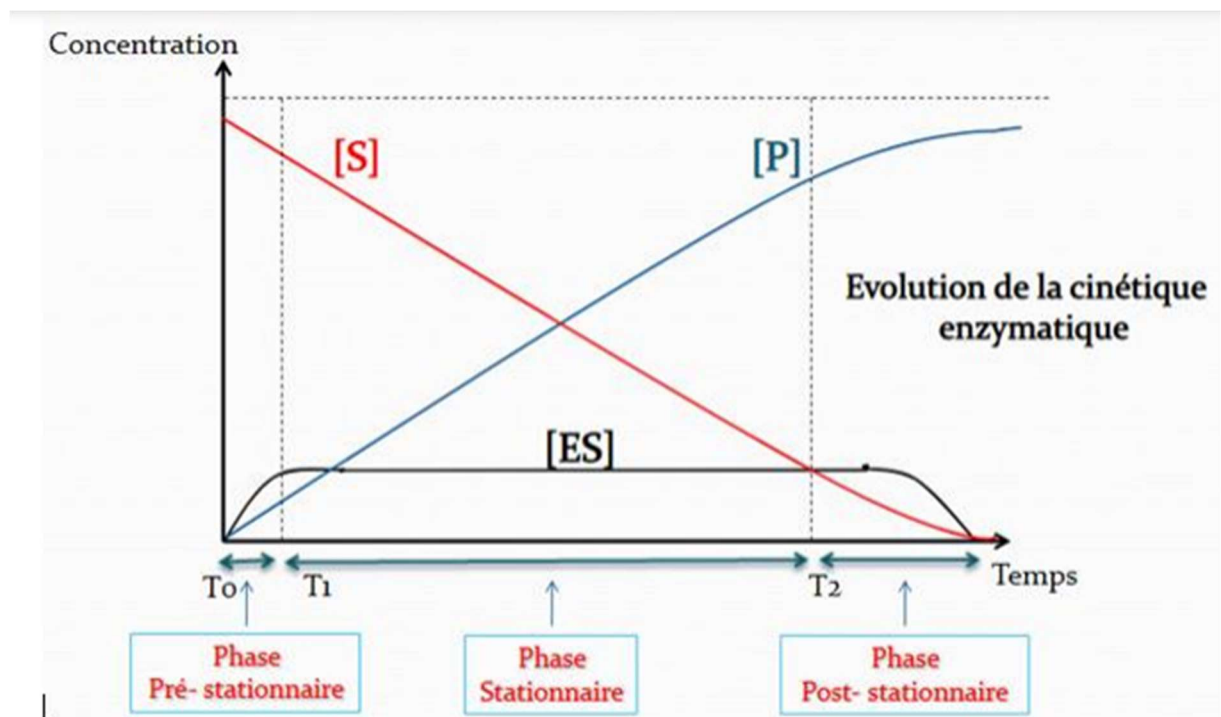
### 7.2. Phases de réactions chimiques

Soit une réaction chimique catalysée par l'enzyme E transforme le substrat S en produit P, cela se déroule en trois étapes :

-**La phase pré-stationnaire** : L'enzyme E mis en présence du substrat S, combinaison de E-S pour former un complexe Enzyme-substrat ES rapide (milliseconde).

-**La phase stationnaire** : L'enzyme saturée par le substrat S, le complexe Enzyme-substrat à concentration maximal est constante.

-**La phase post stationnaire** : La concentration en substrat S diminue significativement au bout d'un temps plus ou moins long.



### 7.3. Définition de la vitesse de réaction enzymatique

La vitesse initiale d'une réaction est la vitesse instantanée au début de la réaction (c'est-à-dire lorsque  $t = 0$ ). Le taux initial est égal au négatif de la pente de la courbe de concentration du réactif en fonction du temps à  $t = 0$ .

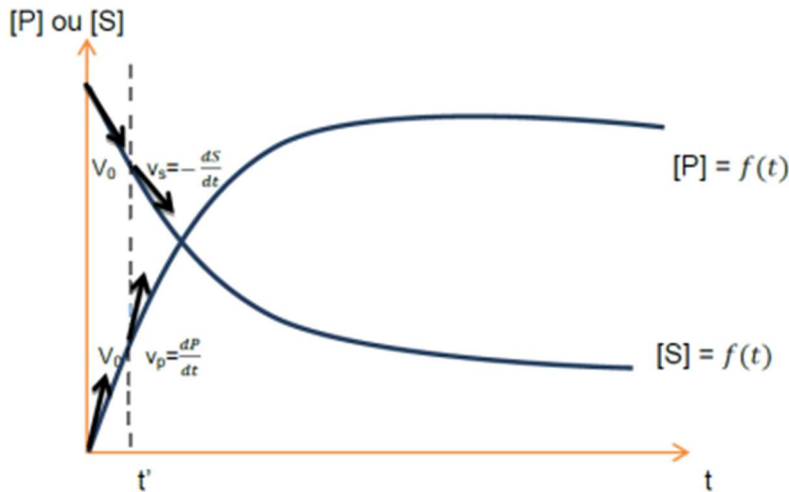
Au cours de la réaction chimique, la concentration du substrat réduit tandis que la concentration du produit augmente. La vitesse d'une réaction exprime par :

- La quantité de substrat métabolisé par unité de temps :  $V = - dS / dt$

- La quantité de produit formé par unité de temps :  $V = +dP / dt$

Il est indispensable d'étudier la vitesse de réaction dans les conditions où  $[S] > [E]$

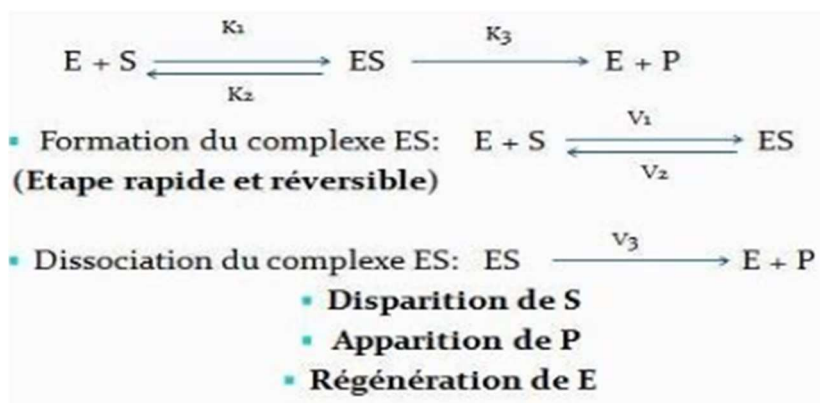
Si le temps de la réaction est très court, le changement de  $[S]$  est négligeable, il peut être considéré comme constante.



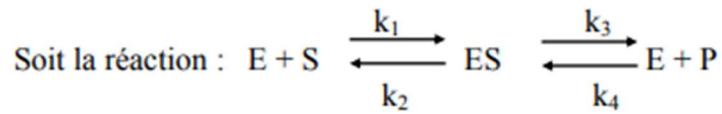
#### 7.4. Cinétique Michaelis-Menten

La cinétique de Michaelis-Menten est un modèle de cinétique enzymatique qui explique comment la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme dépend de la concentration de l'enzyme et de son substrat. Considérons une réaction dans laquelle un substrat (S) se lie de manière réversible à une enzyme (E) pour former un complexe enzyme-substrat (ES), qui réagit ensuite de manière irréversible pour former un produit (P) et libérer à nouveau l'enzyme.

- La constante de Michaelis :



On a :



$$\begin{aligned} V_1 &= k_1 [E].[S] & V_3 &= k_3 [ES] \\ V_2 &= k_2 [ES] & V_4 &= k_4 [E].[P] = 0 \end{aligned}$$

La vitesse de disparition du substrat est :  $-dS / dt = V_1 - V_2$

La vitesse de l'apparition du produit est :  $+dP / dt = V_3$

$$\text{Donc : } V_1 - V_2 = V_3$$

$$\text{D'où : } k_1 [E].[S] = [ES] (k_2 + k_3)$$

$$\text{Alors : } K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

**K<sub>m</sub>** (également connue sous le nom de constante de Michaelis) : la concentration du substrat à laquelle la vitesse de réaction est de 50 % de la V<sub>max</sub>. K<sub>m</sub> est une mesure de l'affinité d'une enzyme pour son substrat, car plus la valeur de K<sub>m</sub> est faible, plus l'enzyme est efficace pour remplir sa fonction à une concentration de substrat inférieure.

La constante de Michaelis K<sub>m</sub> est la concentration de substrat nécessaire pour donner un taux d'exactly 0,5 V<sub>max</sub>. [S] = K<sub>m</sub> lorsque V<sub>o</sub> = 0,5 V<sub>max</sub>

K<sub>m</sub> a des unités de concentration et les valeurs typiques de K<sub>m</sub> se situent entre 10<sup>-6</sup> M et 10<sup>-2</sup> M.

Un faible K<sub>m</sub> indique que l'enzyme se lie et utilise bien le substrat ; un [S] inférieur suffit pour occuper l'enzyme (liaison forte).

Un K<sub>m</sub> élevé indique que l'enzyme se lie et utilise mal le substrat ; un [S] plus élevé est nécessaire pour que S occupe l'enzyme (liaison faible).

• L'équation de Mickaelis-Menten

Soit  $[E_T]$  la concentration totale de l'enzyme dans le milieu.

La  $[E]$  libre s'écrira :  $[E] = [E_T] - [ES]$

$$K_m \text{ devient alors } : K_m = \frac{([E_T] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]}$$

$$K_m = \frac{[E_T] \cdot [S]}{[ES]} - \frac{[ES] \cdot [S]}{[ES]}$$

$$K_m = \frac{[E_T] \cdot [S]}{[ES]} - [S]$$

$$K_m + [S] = \frac{[E_T] \cdot [S]}{[ES]}$$

$$[ES] = \frac{[E_T] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Sachant que la vitesse de la réaction :  $V = k_3 \cdot [ES]$

On peut donc écrire en remplaçant  $[ES]$  :  $V = k_3 \cdot [E_T] \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$

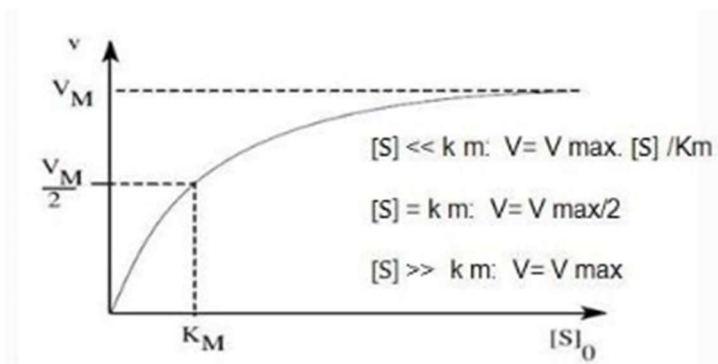
La vitesse est maximale lorsque tout E est combiné à S  $[E_T] = [ES]$

$$V = k_3 \cdot [ES]$$

$$V_{max} = k_3 \cdot [E_T]$$

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad y = \frac{a \cdot x}{b + x} \quad \text{avec } a = V_{max}/k_m + [S]$$

**V<sub>max</sub>** : c'est la vitesse maximale de réaction chimique, lorsque tous les sites actifs de l'enzyme sont occupés de substrat. Cette équation définit comment la vitesse de réaction initiale (V) est affectée par la concentration initiale du substrat ([S]). Cela suppose que la réaction se déroule à l'état stationnaire, où la concentration en ES reste constante.



• **Méthodes de détermination de km et Vmax :**

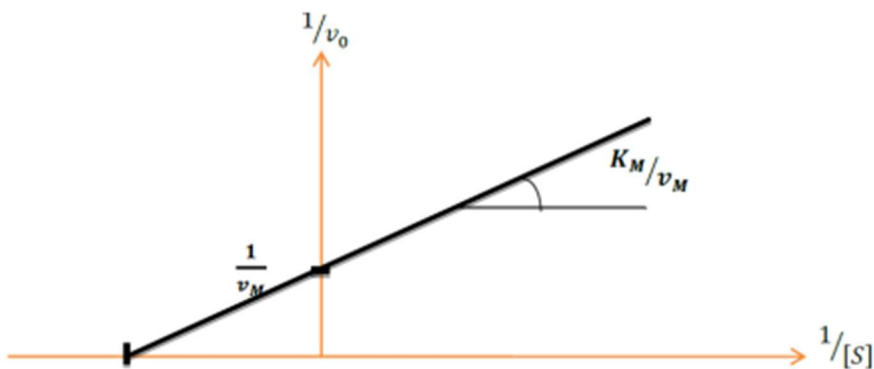
- **Méthode arithmétique :**

Si  $V = V_{max}/2$        $K_m = [S]$

- **Méthode graphique de Line weaver et Burk:**

Cette équation s'obtient en inversant les deux membres de l'équation de Mickaelis-Menten :  
double inverse :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{v_M \cdot [S]} \Rightarrow \boxed{\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_M} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_M}}$$



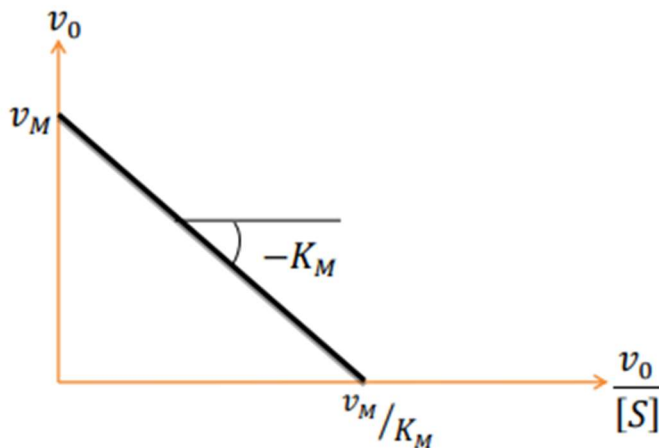
- **Méthode graphique d'Eadie Hofstee :**

$$\frac{1}{v_0} = \frac{v_M \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$$v_0 \left( \frac{1}{v_0} \right) = v_0 \left( \frac{K_M}{v_M} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_M} \right) \Rightarrow 1 = \frac{v_0}{v_M} \times \frac{K_M}{[S]} + \frac{v_0}{v_M} \Rightarrow v_M = \frac{v_0}{[S]} \times K_M + v_0$$

$$\boxed{v_0 = -K_M \frac{v_0}{[S]} + v_M}$$





## 8. Activité catalytique

### 8.1. Unité de l'activité enzymatique

#### 8.1.1. Unité internationale

C'est la quantité d'enzyme capable de transformer d'une micromole de substrat par min, dans des conditions optimales de mesure

UI=  $\mu$  mol/min

Activité enzymatique= V max

UI/ unité de volume

#### 8.1.2. Katal

Quantité d'enzyme qui catalyse la réaction de transformation d'une mole de substrat par seconde

#### 8.1.3. Activité spécifique

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

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

Mesure le degré de pureté d'une préparation enzymatique

#### 8.1.4. Activité spécifique moléculaire

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

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

## 8.2. Effecteur de l'activité enzymatique

### 8.2.1. Les activateurs

Les activateurs enzymatiques sont des composés chimiques qui augmentent la vitesse de réaction enzymatique. Leurs actions sont opposées à l'effet des inhibiteurs enzymatiques. Parmi les activateurs, on trouve des ions, des petites molécules organiques, ainsi que des peptides, des protéines et des lipides.

Il existe de nombreuses enzymes qui sont spécifiquement et directement activées par de petites molécules inorganiques, principalement par des cations comme le  $\text{Ca}^{2+}$  qui est un deuxième messenger (parmi les enzymes activées par le  $\text{Ca}^{2+}$ , on peut trouver différentes enzymes régulatrices, notamment les phospholipases II, les protéines kinases C, adénylyles cyclases, etc.). Ces enzymes ont généralement un site spécial pour la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  ; la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  avec celui-ci entraîne un changement de conformation enzymatique qui augmente l'activité enzymatique

### 8.2.2. Les inhibiteurs

Une substance est dite inhibitrice lorsque la réaction se ralentit en sa présence. Quand la réaction est complètement bloquée, l'inhibition est alors dite totale. L'inhibition affecte la cinétique de différente façon.

Tous les inhibiteurs peuvent être combinés en différents groupes en fonction de leur structure chimique : ions de métaux ( $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ), composés organiques (par exemple, N-éthylmaléimide, phosphofluoridate de diisopropyle, oligomycine) et grandes molécules bioorganiques (peptides), protéines, etc.). Cependant, cette classification ne reflète pas le mécanisme de leur coopération avec le ferment.

Les inhibiteurs sont généralement divisés en deux groupes. La première se compose d'inhibiteurs réversibles qui forment des interactions avec diverses parties de la surface de l'enzyme, qui peut être facilement inversé par dilution ou dialyse. La deuxième comprend des inhibiteurs irréversibles qui interagissent avec différents groupes fonctionnels à la surface de l'enzyme en formant des liaisons covalentes fortes qui persistent souvent même pendant une période complète dégradation des protéines.

**8.2.2.1. Les inhibiteurs compétitifs**

Dans ce cas, il existe deux types de complexes : l'inhibiteur enzymatique (EI) et le substrat enzymatique (ES) ; Le complexe EI n'a aucune activité enzymatique. Le substrat et l'inhibiteur ne peuvent pas se lier simultanément à l'enzyme. Cette inhibition peut être inversée par l'augmentation de la concentration du substrat. Cependant, la valeur de la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) reste constante. La valeur du  $K_m$  apparent augmentera ; cependant, la valeur de la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) reste constante. Il peut s'agir d'une inhibition compétitive non seulement par rapport au substrat mais également par rapport aux cofacteurs, ainsi qu'aux activateurs.



$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$   $K_I$  : étant la constante d'inhibition

L'équation de vitesse est modifiée :

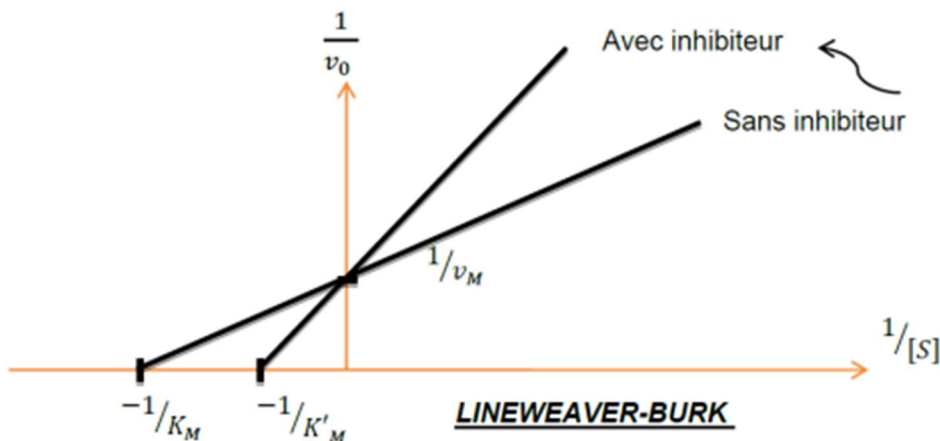
$$v = \frac{v_M \cdot [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} = \frac{v_M \cdot [S]}{K'_M + [S]}$$

[I] : Concentration en inhibiteur ;

$K'_M$  : Est la constante de MICHAELIS apparente ;

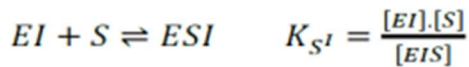
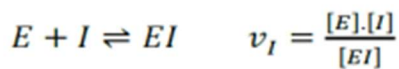
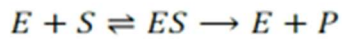
$K'_M$  Augmente par rapport à  $K_M$ , alors que  $v_M$  ne change pas.

**En présence d'inhibiteur compétitif, c'est l'affinité de l'enzyme pour son substrat qui est affectée.**



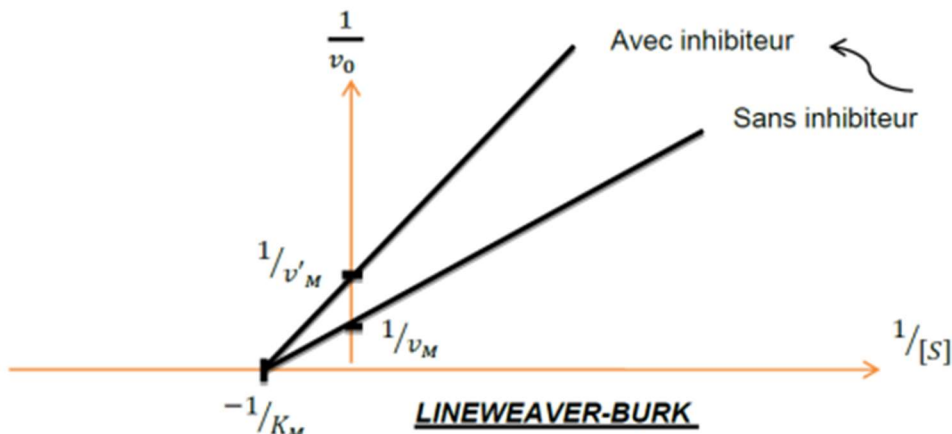
**8.2.2.2. Les inhibiteurs non compétitifs**

Dans ce cas, l'inhibiteur se lie au complexe E ou ES. La liaison de l'inhibiteur à l'enzyme réduit son activité mais n'affecte pas la liaison du substrat. En conséquence, l'étendue de l'inhibition dépend uniquement de la concentration de l'inhibiteur. Dans ce cas, Vmax diminuera, mais Km restera le même



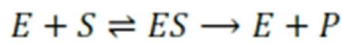
$$v = \frac{v_M [S]}{(K_M + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad \text{avec} \quad v'_M = \frac{v_M}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

Donc  $K_M$  ne change pas, seul  $v_M$  change, elle diminue.

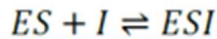


**8.2.2.3. Les inhibiteurs incompetitifs**

Dans ce cas, l'inhibiteur se lie uniquement au complexe substrat-enzyme ; il n'interfère pas avec la liaison du substrat avec le site actif mais empêche la dissociation du substrat enzymatique complexe : il en résulte une dépendance de l'inhibition uniquement à l'égard de la concentration de l'inhibiteur et de sa valeur  $K_i$ . Ce type d'inhibition entraîne une diminution de Vmax et une diminution de Km.



$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

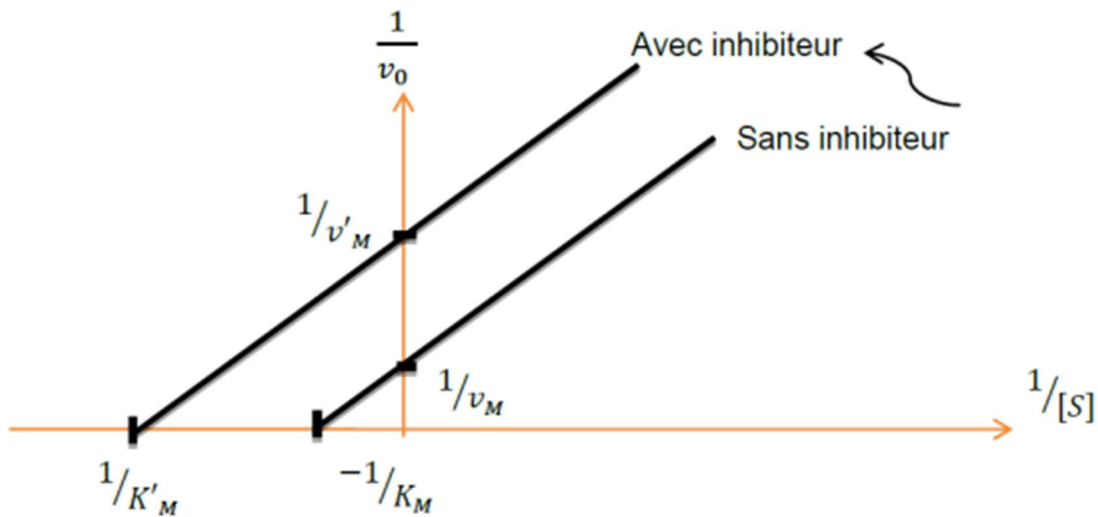


$$K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$v = \frac{\frac{v_M \cdot [S]}{1 + I/K_I}}{\frac{K_M}{1 + I/K_I} + [S]} = \frac{v'_M [S]}{K'_M + [S]}$$

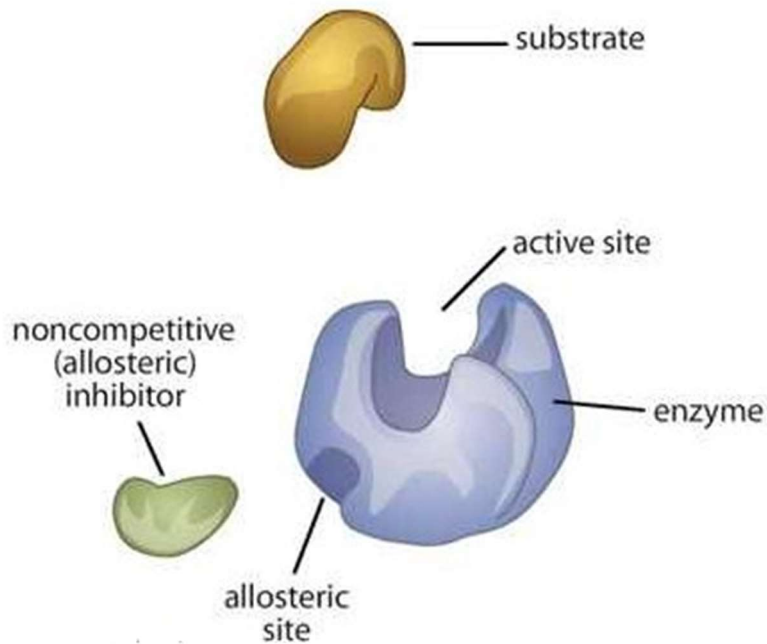
$$v'_M = \frac{v_M}{1 + I/K_I}$$

$$K'_M = \frac{K_M}{1 + I/K_I}$$



### 9. Les enzymes allostériques

Allo : autre ; Stereos : site ou forme. Allostérie= autre site. Le terme « allostérique » désigne principalement une molécule allostérique dont le site régulateur est physiquement séparé de son site actif. Les enzymes allostériques sont des enzymes qui possèdent un site de liaison supplémentaire pour les molécules effectrices autre que le site actif. La liaison entraîne des changements conformationnels, modifiant ainsi ses propriétés catalytiques. La molécule effectrice peut être un inhibiteur ou un activateur. Tous les systèmes biologiques sont bien régulés.



### 9.1. Propriétés des enzymes allostériques

- Les sites allostériques sont des sites de liaison sur l'enzyme qu'ils sont différents du site actif et du site de liaison au substrat.
- La molécule qui se lie au site allostérique est appelée effecteur (on peut aussi l'appeler modulateur) et régule l'activité de l'enzyme à laquelle elle se lie.
- L'activité de l'enzyme augmente lorsqu'un effecteur allostérique positif se lie au site allostérique. Cela signifie que l'activité de l'enzyme diminue lorsqu'un effecteur allostérique négatif se lie au site allostérique, il inhibe l'enzyme.
- Les enzymes allostériques sont plus grandes et plus complexes que les enzymes non allostériques et comportent souvent de nombreuses sous-unités. Les enzymes comportant plusieurs effecteurs ont des sites de liaison différents et spécifiques pour chacun. Dans la plupart des enzymes allostériques, le site de liaison du substrat et le site de liaison d'effecteur se trouvent sur des sous-unités différentes.
- Le site de liaison au substrat se trouve sur la sous-unité catalytique, souvent appelée sous-unité C. Le site de liaison effecteur se trouve sur la sous-unité régulatrice souvent appelée sous-unité R.
- Lorsqu'une molécule effectrice sur un site de liaison provoque un changement de conformation dans cette sous-unité, un changement de conformation est alors provoqué dans les autres sous-unités de la protéine, cela signifie qu'une grande partie de l'énergie de liaison de l'effecteur est utilisée pour modifier la conformation de l'ensemble du complexe protéique.

- Les enzymes allostériques peuvent également « basculer » entre leur forme active et leur forme inactive. Cela permet des modèles de réponse sophistiqués en matière d'activité, qui peuvent jouer un rôle énorme dans la fonction biologique. Une fois l'effecteur se dissocie du site de liaison, l'enzyme est alors capable de revenir à sa forme inactive. Ils peuvent contrôler la vitesse de réaction très importantes, telles que la production d'ATP.

### 9.2. Effecteurs allostériques

Il existe deux types de régulation allostérique basée sur des molécules substrat et effectrices :

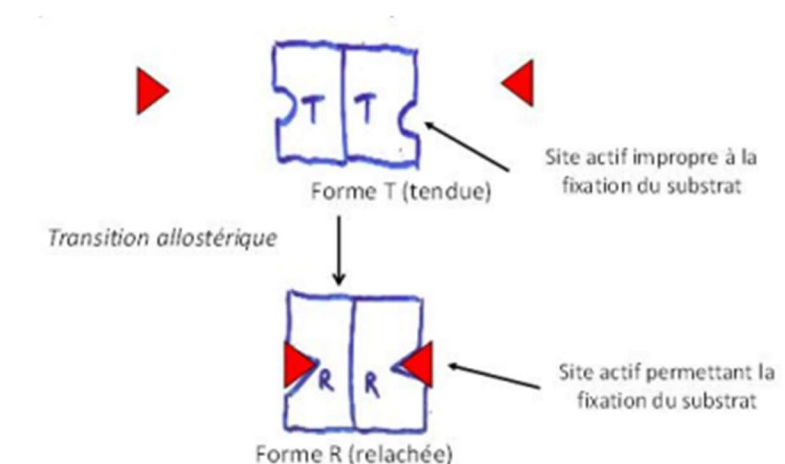
- **Régulation homotrope** : Ici, la molécule substrat agit également comme effecteur. Il s'agit principalement d'une activation enzymatique et également appelée coopérativité, par ex. liaison de l'oxygène à l'hémoglobine.
- **Régulation hétérotrope** : Lorsque le substrat et l'effecteur sont différents. L'effecteur peut activer ou inhiber l'enzyme, par ex. Liaison du CO<sub>2</sub> à l'hémoglobine

### 9.3. Transition allostérique

On distingue deux formes :

- Une forme T (tendue) à faible affinité pour le substrat, conformation plus compacte adoptée en l'absence du substrat
- Une forme R (relâchée) 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→R ou R→T qui va respectivement augmenter ou diminuer l'affinité de l'enzyme pour son substrat.



#### 9.4. La coopérativité

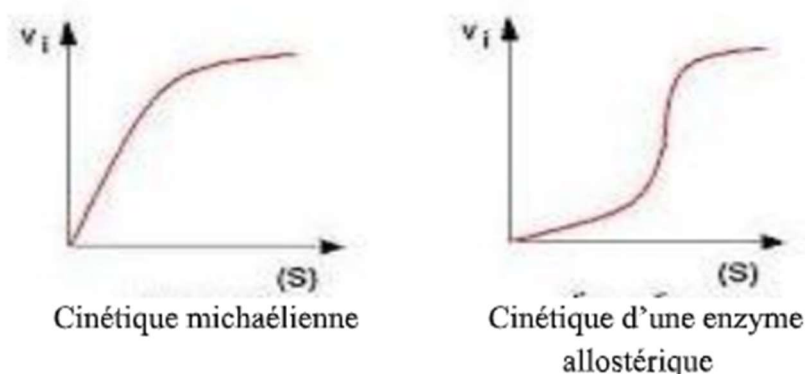
La coopérativité traduit le fait que la fixation d'une molécule sur l'enzyme d'un effet allostérique (activateur ou inhibiteur) influe sur l'activité de l'un et l'autre des ligands (substrats, effecteurs) de l'enzyme soit en augmentant on dit coop+ ou en réduisant on dit coop-.

Un exemple de coopérativité positive est la liaison entre l'oxygène et l'hémoglobine. Une molécule d'oxygène se lie au fer ferreux de la molécule d'hème dans chacune des quatre chaînes d'une molécule d'hémoglobine. La désoxyhémoglobine a une affinité faible pour l'oxygène, mais lorsqu'une molécule se lie à un seul hème, l'affinité pour l'oxygène est élevée, permettant à la deuxième molécule de se lier plus facilement, et à la troisième et également à la quatrième plus facilement. L'affinité pour l'oxygène de la 3-oxy-hémoglobine est environ 300 fois supérieure à celle de la désoxyhémoglobine. Ce comportement conduit la courbe d'affinité de l'hémoglobine à être sigmoïdale plutôt qu'hyperbolique comme avec la myoglobine monomère. Par le même processus, la capacité de l'hémoglobine à perdre de l'oxygène augmente à mesure que moins de molécules d'oxygène sont liées.

La coopérativité négative (également connue sous le nom d'inhibition allostérique) se produit lorsque la liaison d'un ligand diminue l'affinité pour le substrat sur d'autres sites actifs. Par exemple, lorsque le 2,3-BPG se lie à un site allostérique de l'hémoglobine, l'affinité pour l'oxygène de toutes les sous-unités diminue. C'est lorsqu'un régulateur est absent du site de liaison.

#### 9.5. La cinétique des enzymes allostériques

Sur le plan cinétique, la coopérativité se fait par des courbes vitesse en fonction de substrat de forme sigmoïdale.





$$V = V_{\max}/2$$

$$K_{1/2} = [S]$$

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]^n}{K_H + [S]^n}$$

$K_H$  (c'est la constante du Hill) : La constante d'équilibre ; elle correspond à la concentration de substrat pour laquelle la moitié de l'enzyme est saturée (on parle de  $K_{0,5}$  ou  $K_{1/2}$ )

$n$  (nombre du Hill ou indice de coopérativité) : fournit une mesure de la coopération de substrat se liant à l'enzyme. Plus  $n$  est grand, plus la coopérativité est forte.

$n > 1$  : coopérativité positive

$n = 1$  : coopérativité nulle (Michaelis-Menten)

$n < 1$  : coopérativité négative