

Université Pierre et Marie Curie

Enzymologie élémentaire

Objectifs au cours de

Révisions Biochimie PCEM2

Révisions Biochimie métabolique

2002 - 2003

Pr. A. Raisonnier (alain.raisonnier@upmc.fr)

Mise à jour : 19 juin 2002
Relecture : Pr. A. Raisonnier

Plan du cours

3 **Plan du cours**

7 **Objectifs**

9 **Partie I : Les enzymes**

11 **Chapitre 1 : Définitions**

12 1.1 Enzyme

13 1.2 Exemple d'enzyme : l'anhydrase carbonique

15 1.3 Substrat

16 1.4 Produit

17 **Chapitre 2 : La réaction enzymatique**

18 2.1 Réaction enzymatique

19 2.2 Facteurs : enzyme

20 2.3 Facteurs : autres facteurs indispensables

21 2.4 Ligand

22 2.5 Cofacteur

23 2.6 Coenzyme

25 **Partie II : Cinétique**

27 **Chapitre 3 : Effet de la concentration d'enzyme**

28 3.1 Vitesse de réaction

29 3.2 Phases de la réaction

30 3.3 Phases de la réaction

31 3.4 Vitesse initiale

32 3.5 Concentration de l'enzyme

33 3.6 Passage à la forme active

34 3.7 Dosage enzymatique

35 **Chapitre 4 : Effet de la concentration de substrat**

36 4.1 Concentration du substrat

37 4.2 Cinétique michaélienne

38	4.3	Vitesse maximum
39	4.4	Constante de Michaelis
40	4.5	Exemple de K_m : la lactate déshydrogénase
41	4.6	Constantes de la réaction
42	4.7	Exemple de constantes : la fumarase
43	4.8	Exemple de constantes : l'aspartate aminotransférase = ASAT
44	4.9	Exemple de constantes : la créatine phosphokinase
45	4.10	Phase stationnaire
46	4.11	Equation de la vitesse
47	4.12	Equation de la conservation de l'enzyme
48	4.13	Constante de Michaelis
49	4.14	Exemple de K_m : la glycérophosphate déshydrogénase
50	4.15	Exemple de K_m : l'anhydrase carbonique
51	4.16	Exemple de K_m : l'isocitrate déshydrogénase
52	4.17	Calculs
53	4.18	Calculs
54	4.19	Equation de Michaelis & Menten
55	4.20	Hyperbole de Michaelis-Menten
56	4.21	Calculs
57	4.22	Diagramme de Lineweaver et Burk

59 **Chapitre 5 : Effet de la concentration des effecteurs**

60	5.1	Facteurs : les effecteurs
61	5.2	Effecteur
62	5.3	Inhibition compétitive (équation)
63	5.4	Inhibition compétitive (hyperbole)
64	5.5	Calculs
65	5.6	Inhibition compétitive (double inverse)
66	5.7	Exemple d'inhibition compétitive : la succinate déshydrogénase
67	5.8	Inhibition non compétitive (équation)
68	5.9	Calculs
69	5.10	Inhibition non compétitive (hyperbole)
70	5.11	Inhibition non compétitive (double inverse)
71	5.12	Exemple d'inhibition non compétitive : l'anhydrase carbonique

73 **Chapitre 6 : Effets allostériques**

74	6.1	Sous-unité (d'une protéine)
75	6.2	Protomère
76	6.3	Symétrie
77	6.4	Sites de liaison
78	6.5	Conformations
79	6.6	Etats de transition
80	6.7	Effets sur la réaction enzymatique

81	6.8	Conservation de la symétrie
82	6.9	Allostérie
83	6.10	Modèle symétrique
84	6.11	Modèle non symétrique
85	6.12	Diagramme de Hill
86	6.13	Exemple d'allostérie : myoglobine ; hémoglobine
87	6.14	Exemple d'allostérie : l'hexokinase
88	6.15	Exemple d'allostérie : la phosphofructokinase
89	6.16	Effet de l'ATP sur la PFK
90	6.17	Exemple d'allostérie : la glycogène phosphorylase
91	6.18	Effet de l'AMP sur la glycogène phosphorylase
92	6.19	Voie métabolique
93	6.20	Voie métabolique
94	6.21	Carrefour métabolique
95	6.22	Enzyme-clé
97		Chapitre 7 : Cinétique à deux substrats
98	7.1	Mécanisme bibi ordonné
99	7.2	Exemple de bibi ordonné : l'alcool déshydrogénase
100	7.3	Exemple de bibi ordonné : la malate déshydrogénase
101	7.4	Exemple de bibi ordonné : la phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase
102	7.5	Exemple de bibi ordonné : l'UDP-glucose pyrophosphorylase
103	7.6	Mécanisme bibi aléatoire
104	7.7	Exemple de bibi aléatoire : la créatine phosphokinase
105	7.8	Exemple de bibi aléatoire : la citrate synthase
106	7.9	Mécanisme ping-pong
107	7.10	Exemple de ping-pong : l'alanine aminotransférase = ALAT
108	7.11	Exemple de ping-pong : l'aspartate aminotransférase = ASAT
109	7.12	Exemple de ping-pong : la phosphoénolpyruvate carboxykinase = PEPCCK
111		Partie III : Effet des constantes physiques
113		Chapitre 8 : Effet du pH
114	8.1	Dénaturation
115	8.2	Charges électriques
116	8.3	pH optimum
117	8.4	Exemple de pH optimum : la fumarase
118	8.5	Exemple de pH optimum : la lactate déshydrogénase
119		Chapitre 9 : Effet de la température
120	9.1	Température optimum

121	9.2	Activation ; dénaturation
122	9.3	Relation d'Arrhenius
123	9.4	Energie d'activation
124	9.5	Exemple d'énergie d'activation : la fumarase
125	9.6	Energie interne de la fumarase
126	9.7	Energie d'activation
127	9.8	Réaction couplée
128	9.9	Exemple de réaction couplée : l'hexokinase
129	9.10	Exemple de réaction couplée : la phosphoglycérate kinase
130	9.11	Liaisons riches en énergie
131	9.12	Liaison riche en énergie

Objectifs

- Définir¹ les termes d'enzymologie : enzyme, substrat, produit, coenzyme, activateur, inhibiteur, réaction enzymatique, voie métabolique, enzyme-clé.
- Etudier² sur un exemple la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du temps, de la concentration de l'enzyme, de la concentration du substrat, en représentation normale ou en double inverse. Cet objectif peut faire l'objet de problèmes numériques.
- Définir la vitesse initiale, la vitesse maximum, la constante de MICHAELIS.
- Donner des exemples³ d'inhibitions de réactions enzymatiques en expliquant les effets de cette inhibition sur les paramètres de la réaction.
- Donner des exemples d'effets allostériques : activation homotrope coopérative et rétroinhibition hétérotrope.
- Donner des exemples de cinétiques à deux substrats, ou avec coenzyme libre.
- Etudier la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du pH ou de la température.
- Etudier les variations de l'énergie libre du complexe enzyme-substrat au cours des phases de la réaction enzymatique. Définir l'énergie d'activation, la réaction enzymatique couplée et la liaison riche en énergie.

-
1. **Définir** : préciser dans une phrase concise l'essence d'un objet ou les limites d'un concept en excluant toute notion étrangère et en comprenant toutes les variations possibles de l'objet ou du concept cerné.
 2. **Etudier** : suivre les valeurs d'une fonction pour toutes les valeurs de la variable.
 3. **Donner un exemple** : choisir, décrire et expliquer une situation où un concept ou un corps défini joue le rôle principal et met en évidence ses propriétés essentielles.

Partie I

Les enzymes

Chapitre 1

Définitions

1.1 Enzyme

ENZYME :

- **Protéine présentant des propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique du métabolisme de l'être vivant qui la produit**

EE 1

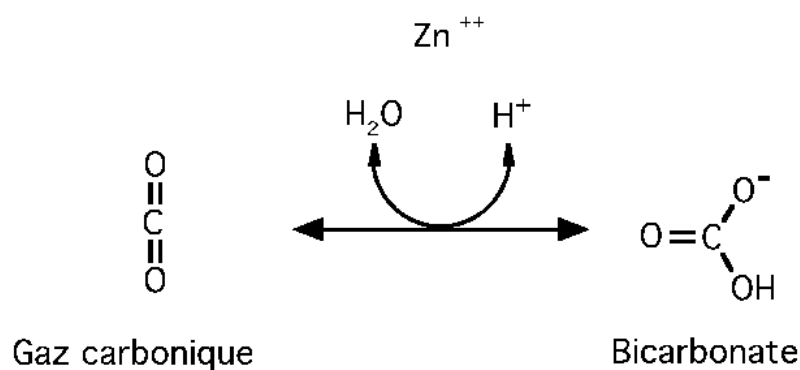
- L'Enzymologie est l'étude des enzymes.
- Le substantif « enzyme » est du genre féminin.
- Toutes les enzymes sont des protéines.
- Les protéines enzymatiques sont des catalyseurs, c'est-à-dire qu'en agissant à des concentrations très petites, elles augmentent la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat. A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée.
- 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.

1.2 Exemple d'enzyme : l'anhydrase carbonique

29000
Isoenzymes

4.2.1.1

Anhydrase carbonique



EE 2

- L'anhydrase carbonique est une enzyme présente dans toutes nos cellules. C'est une protéine d'une masse de 29000 daltons, constituée d'une chaîne de 264 acides aminés. La présence d'un atome de Zinc est nécessaire à son activité.
- Elle 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 que la catalyse enzymatique ne change pas.
- La nomenclature des réactions enzymatiques est exprimée par un ensemble de quatre nombres séparés par des points. Le premier de ces nombres désigne le type de la réaction catalysée, parmi les six grandes classes de réactions enzymatiques. Le deuxième et le troisième expriment la nature des corps chimiques sur lesquels cette réaction se produit. Le quatrième nombre est un numéro d'ordre. Ainsi, l'anhydrase carbonique catalyse la réaction 4.2.1.1, ce qui signifie qu'elle agit sur une réaction d'addition au niveau d'une liaison double (premier nombre 4), que la réaction crée une liaison entre des atomes de carbone et d'oxygène (deuxième nombre 2), que le corps ajouté est une molécule d'eau (troisième nombre 1) et qu'elle est la première de cette espèce (quatrième nombre 1). Une réaction réversible est classée sous un seul numéro quel que soit son sens.
- Sur cette image et de droite à gauche le bicarbonate, réassocié à un proton, va perdre avec

l'aide catalytique de l'enzyme, une molécule d'eau pour donner l'anhydride ou gaz carbonique. Dans ce sens, on appelle substrat le bicarbonate et produit le gaz carbonique.

1.3 Substrat

SUBSTRAT :

- **Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme**

EE 3

- Toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement modifiées sont appelées substrats.

1.4 Produit

PRODUIT :

- **Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme.**

EE 3/1

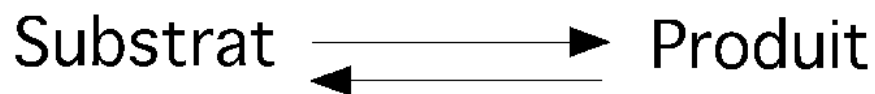
- La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation est appelée produit.

Chapitre 2

La réaction enzymatique

2.1 Réaction enzymatique

Réaction enzymatique



EE 4

- Lorsque le sens d'une réaction enzymatique réversible est changé le produit devient substrat et vice-versa.

2.2 Facteurs : enzyme

Masse Moléculaire
Isoenzymes

Classification

Enzyme

Substrat \rightleftharpoons Produit

EE 4/1

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

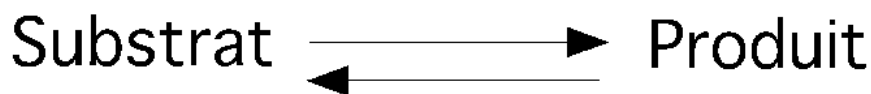
2.3 Facteurs : autres facteurs indispensables

Masse Moléculaire
Isoenzymes

Classification

Enzyme

Cofacteurs et coenzymes liés



Ions et
Coenzymes libres
Energie

EE 4/2

- D'autres fois, un troisième corps chimique est indispensable : nous l'appellerons 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 pour transporter le substrat, pour recevoir le produit ou comme participant à la structure de l'enzyme.
- La protéine enzymatique reconnaît spécifiquement les cofacteurs dont elle a besoin.
- La réaction enzymatique nécessite aussi que le complexe enzyme-substrat échange de l'énergie libre avec le milieu environnant.

2.4 Ligand

LIGAND :

- **Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une protéine**

EE 5

- 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.

2.5 Cofacteur

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

EE 6

- 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.

2.6 Coenzyme

COENZYME :

- **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

EE 7

- 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.
- 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 covalentiel, 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.

Partie II

Cinétique

Rappel des objectifs

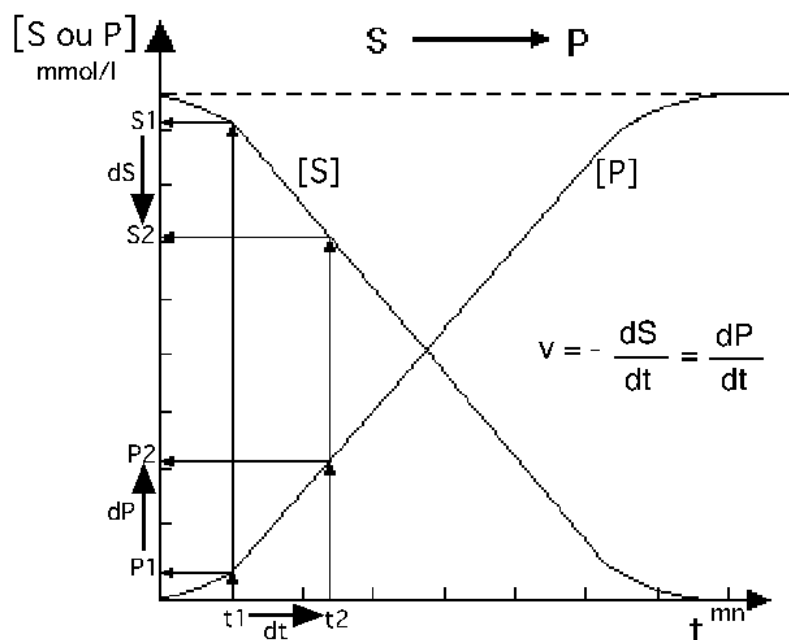
- Définir¹ la vitesse initiale, la vitesse maximum, la constante de MICHAELIS.
- Donner des exemples² d'inhibitions de réactions enzymatiques en expliquant les effets de cette inhibition sur les paramètres de la réaction.
- Donner des exemples d'effets allostériques : activation homotrope coopérative et rétroinhibition hétérotrope.
- Donner des exemples de cinétiques à deux substrats, ou avec coenzyme libre.

-
1. **Définir** : préciser dans une phrase concise l'essence d'un objet ou les limites d'un concept en excluant toute notion étrangère et en comprenant toutes les variations possibles de l'objet ou du concept cerné.
 2. **Donner un exemple** : choisir, décrire et expliquer une situation où un concept ou un corps défini joue le rôle principal et met en évidence ses propriétés essentielles.

Chapitre 3

Effet de la concentration d'enzyme

3.1 Vitesse de réaction

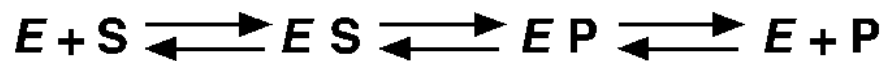
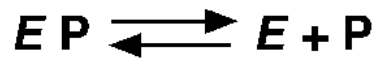
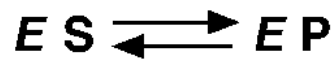
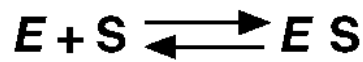


EE 08

- 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.

3.2 Phases de la réaction

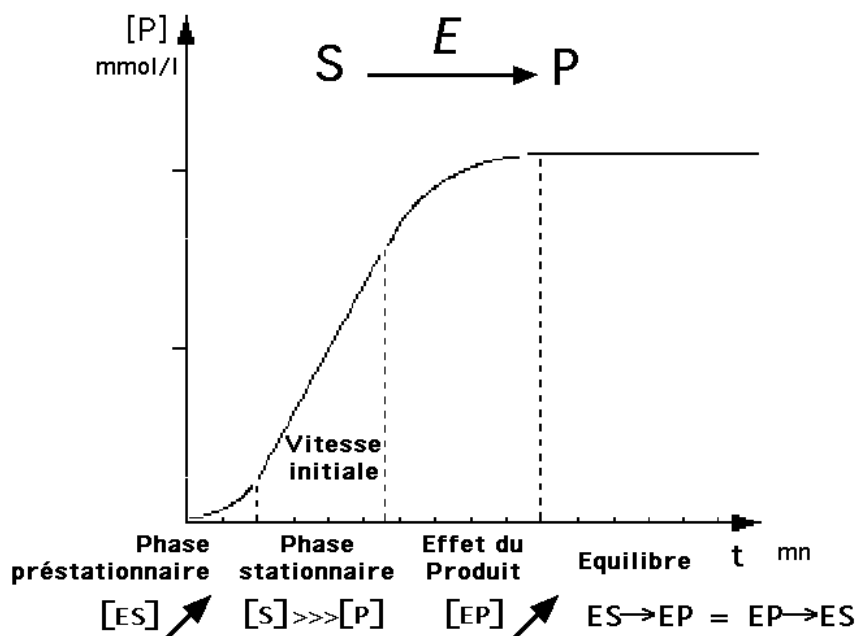
Phases de la réaction



EE 9

- Dans un premier temps, chaque molécule d'enzyme va se lier à une molécule de substrat. Ce complexe peut bien sûr se redissocier.
- L'effet catalytique de l'enzyme transforme alors le complexe enzyme-substrat en complexe enzyme-produit. Si la réaction aboutit à un équilibre, cette phase de la réaction est réversible.
- Dans un dernier temps, le complexe enzyme-produit peut se dissocier. Si la réaction est réversible, le produit devient substrat en s'associant à l'enzyme pour revenir ensuite au point de départ.
- En somme, dans le cas d'une réaction réversible six réactions chimiques participent à cet équilibre entre les concentrations du substrat et du produit, de l'enzyme et des complexes E S et E P.

3.3 Phases de la réaction



EE 10

- 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.

3.4 Vitesse initiale

VITESSE INITIALE :

- **Vitesse d'une réaction enzymatique au cours de la phase stationnaire où le rapport :**

Concentration du complexe Enzyme-Substrat

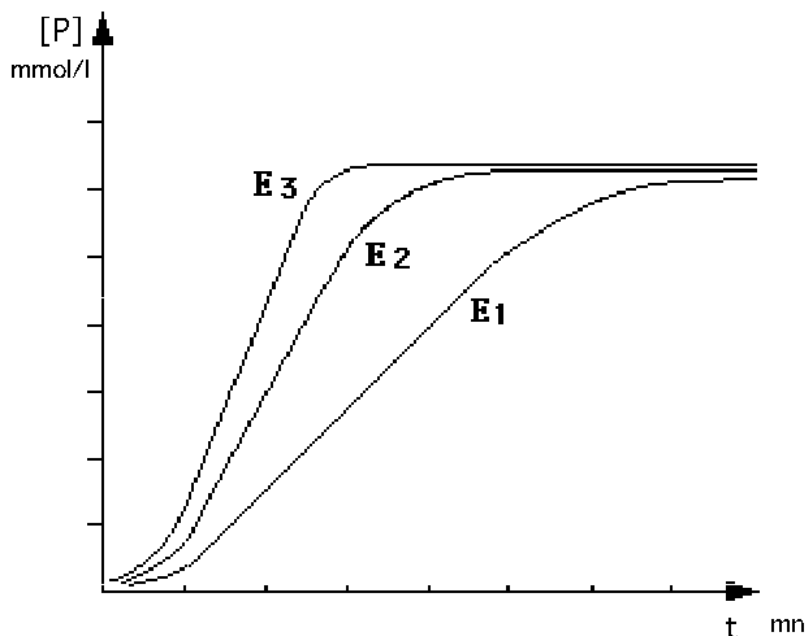
Concentration totale de l' Enzyme

est maximum

EE 11

- Durant la phase stationnaire, la vitesse est constante : on l'appelle vitesse initiale.
- C'est une phase de la réaction où un nombre maximum des molécules de l'enzyme sont liées à des molécules de substrat. Le rapport enzyme lié sur enzyme total est maximum. Dans ces conditions, l'efficacité catalytique de l'enzyme est la plus grande, donc la vitesse initiale est la plus grande de toutes les vitesses qu'on peut mesurer en fonction des phases de la réaction.
- Dans la suite de ce cours, la vitesse étudiée sera toujours la vitesse initiale.

3.5 Concentration de l'enzyme



EE 12

- Examinons l'évolution de la réaction lorsqu'on change la concentration de l'enzyme.
- Les mesures de la concentration du produit en fonctions du temps sont différentes pour chacune des concentrations de l'enzyme essayées. Lorsque la concentration de l'enzyme est grande (par exemple E₃) la vitesse initiale est plus grande que lorsque la concentration de l'enzyme est petite (par exemple E₁).

3.6 Passage à la forme active

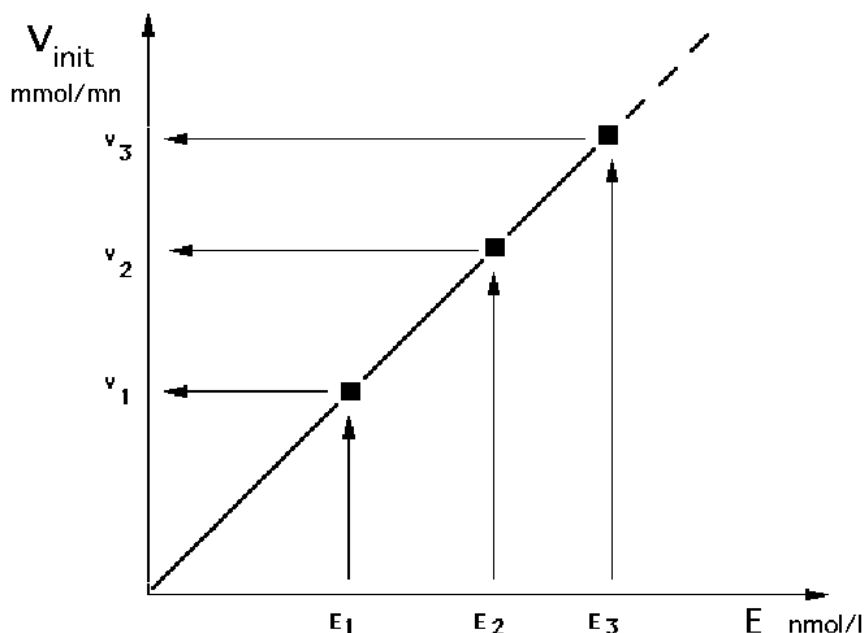
Passage à la forme active

- **1) Protéolyse : zymogènes, proenzymes**
- **2) Phosphorylation, déphosphorylation :
Sérine, Thréonine, Tyrosine**
- **3) Liaison avec un cofacteur ou un coenzyme lié :
Ion métallique, Flavine, Hème**
- **4) Acylation, alkylation :
Myristyl, Géranyl, Farnésyl**

EE 12/1

- Lorsqu'une enzyme existe à la fois sous une forme active (capable de catalyser la réaction) et sous une forme inactive, la concentration efficace de l'enzyme est celle de la forme active seule.
- Toutes les modifications de la structure postérieures à la synthèse de l'enzyme, qui font passer les molécules de l'enzyme de la forme inactive à la forme active, ont pour effet d'augmenter la concentration efficace de l'enzyme et donc la vitesse de la réaction catalysée.
- Ces modifications peuvent être :
 - l'hydrolyse d'un fragment de la chaîne d'acides aminés: activation des zymogènes en enzymes actives au cours de la digestion, activation des facteurs de la coagulation du sang ;
 - le transfert d'un radical Phosphoryl- sur un acide aminé de l'enzyme : phosphorylation des enzymes pour augmenter le taux de glucose dans le sang, déphosphorylation des enzymes pour diminuer le taux de glucose dans le sang ;
 - la fixation d'un groupement prosthétique sur l'enzyme : ion Zinc sur les déshydrogénases à NAD, flavine sur les flavoprotéines, hème sur les cytochromes ;
 - le transfert de radicaux Acyl- ou Alkyl- sur des acides aminés de l'enzyme.

3.7 Dosage enzymatique



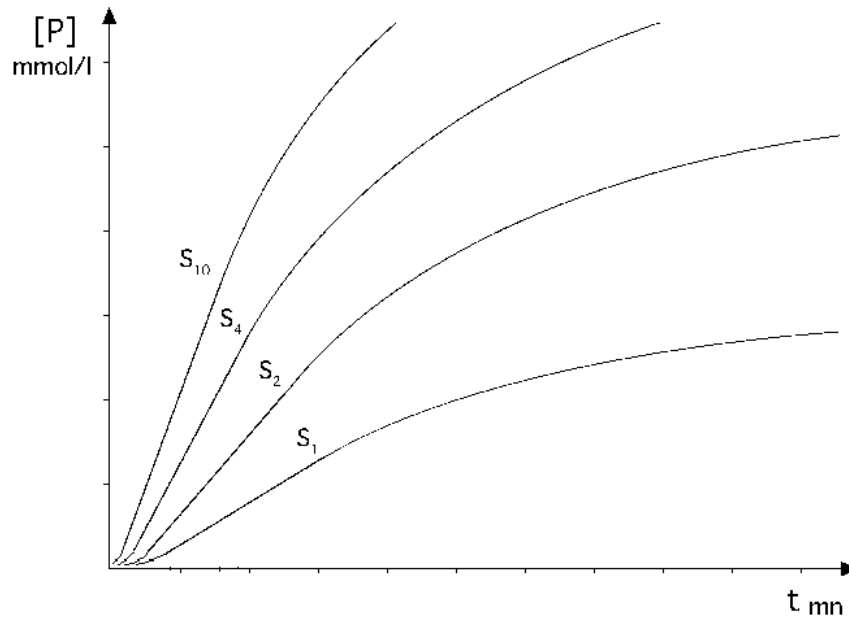
EE 13

- Représentons cette fois ces vitesses initiales en fonction des concentrations E_1 , E_2 et E_3 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.

Chapitre 4

Effet de la concentration de substrat

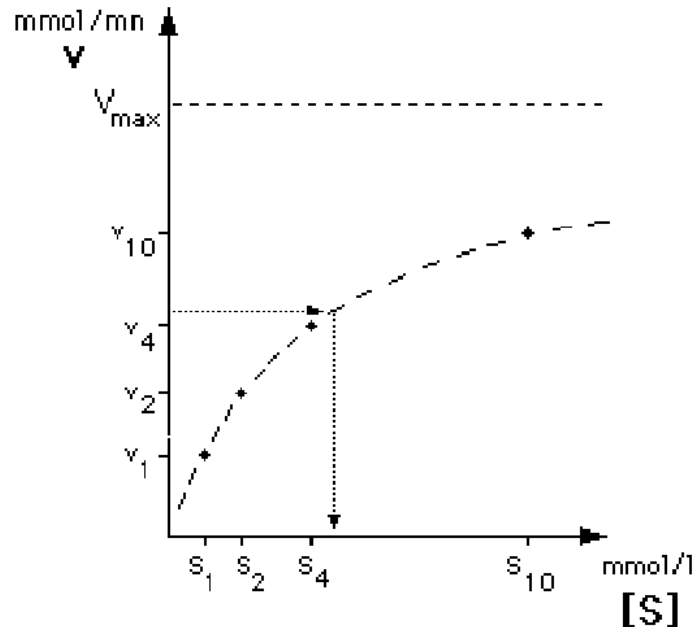
4.1 Concentration du substrat



EE 14

- Examinons à nouveau l'évolution de la réaction lorsqu'on change cette fois-ci la concentration du substrat.
- Les mesures de la concentration du produit en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations de substrat essayées. Lorsque la concentration du substrat est grande (par exemple S₁₀) la vitesse initiale est plus grande que lorsque la concentration du substrat est petite (par exemple S₁).
- On peut mesurer ces vitesses initiales en calculant la différence de concentration de produit au cours d'un temps donné, pour chaque concentration du substrat.

4.2 Cinétique michaélienne



EE 15

- Représentons cette fois ces vitesses initiales en fonction des concentrations du substrat que nous avons essayées.
- Les vitesses mesurées croissent en fonction des concentrations du substrat. Mais cette relation n'est pas linéaire : le graphe de cette fonction est une hyperbole (tirets longs).
- Lorsque la concentration du substrat est nulle la vitesse est évidemment 0, donc l'hyperbole passe par l'origine du graphe. La fonction n'a pas de sens en dessous de cet origine. Lorsque la concentration du substrat tend vers l'infini, l'hyperbole se rapproche de son asymptote matérialisée par les tirets courts.
- Pour définir complètement une telle courbe il suffit d'indiquer un de ses points et l'asymptote. Nous savons en plus que la courbe passe par l'origine. L'asymptote correspond à la vitesse initiale qu'on observerait si la concentration du substrat était infinie, c'est à dire à la vitesse maximum possible. Définissons le point de la courbe pour lequel l'ordonnée est égale à la moitié de celle de l'asymptote. L'abscisse de ce point est une concentration de substrat pour laquelle on peut mesurer une vitesse initiale égale à la moitié de la vitesse maximum. On appelle cette concentration la constante de Michaelis.

4.3 Vitesse maximum

VITESSE MAXIMUM :

- **Vitesse initiale théorique d'une réaction enzymatique pour une concentration infinie du substrat**

EE 16

- La vitesse maximum est donc une vitesse initiale, mais on ne peut pas l'observer puisqu'il est impossible de réaliser dans le milieu une concentration infinie de substrat.

4.4 Constante de Michaelis

CONSTANTE DE MICHAELIS :

- **Concentration du substrat pour laquelle la vitesse initiale d'une réaction enzymatique atteint la moitié de la vitesse maximum**

EE 16/1

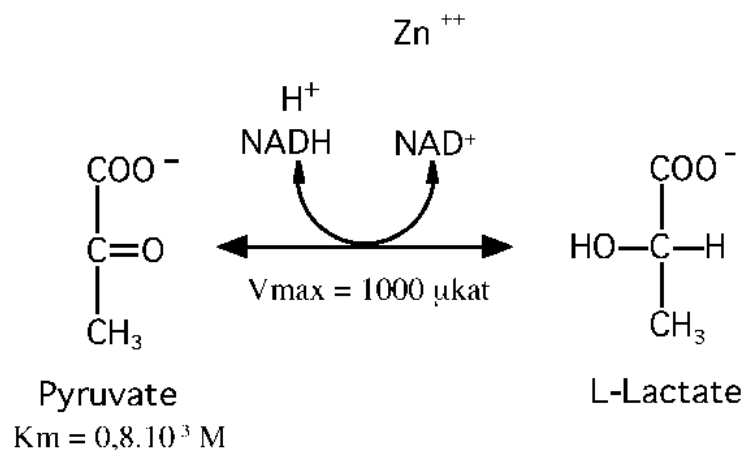
- La constante de Michaelis, au contraire, correspond à une grandeur physiquement mesurable, pour laquelle on observe une vitesse initiale à la moitié de la vitesse maximum. Ces deux paramètres suffisent à définir en totalité la fonction qui lie la vitesse initiale à la concentration du substrat.

4.5 Exemple de K_m : la lactate déshydrogénase

140000
4 sous-unités
Isoenzymes

1.1.1.27

Lactate déshydrogénase

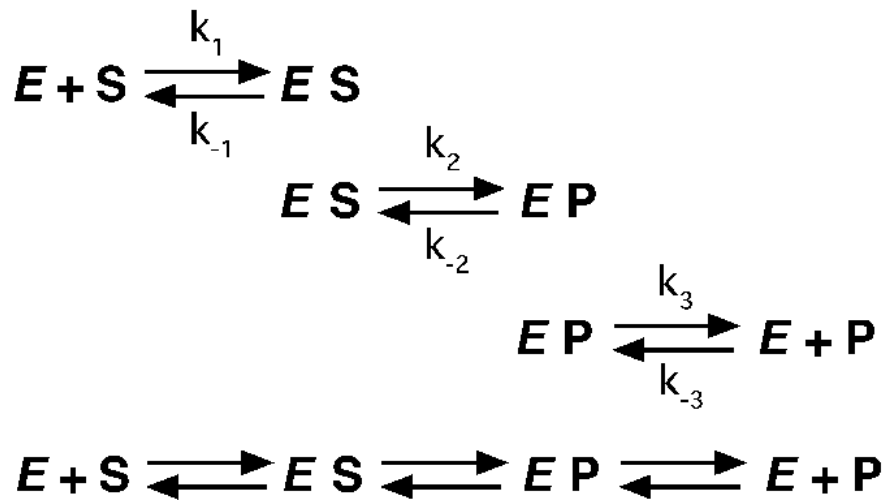


EE 17

- La lactate déshydrogénase ou LDH est une enzyme très répandue dans nos cellules. C'est une protéine de 140000 daltons constituée de 4 chaînes d'acides aminés. Le Zinc est un cofacteur de cette enzyme et le NADH/NAD⁺ en est le coenzyme. Elle réduit son substrat le pyruvate en lactate en lui transférant les hydrogènes apportés par le coenzyme.
- Lorsque la LDH est à une concentration de 1 micromolaire la vitesse maximum est de 1000 microkatal ; pour réaliser la moitié de cette vitesse la concentration du pyruvate doit être 0,8 millimolaire soit 70 mg/L.

4.6 Constantes de la réaction

Constantes de réaction



EE 18

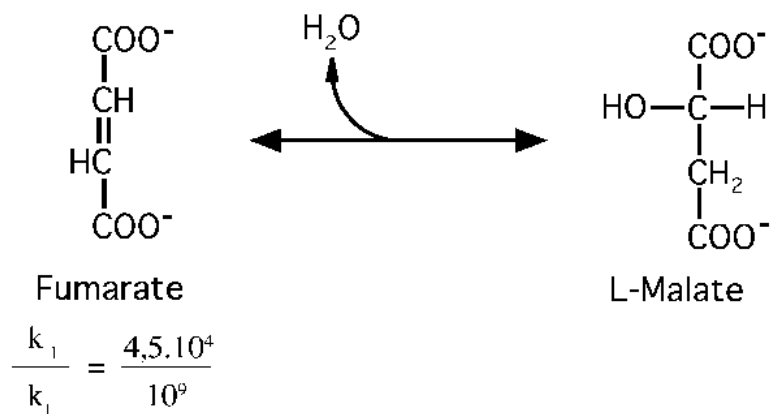
- Revenons aux étapes moléculaires de la réaction pour étudier mathématiquement le sens de ces deux paramètres géométriques. Six réactions chimiques entre les molécules représentées sont possibles.
- La vitesse de chacune d'elles est fonction des concentrations des molécules au départ et d'une constante k caractéristique de la réaction.
- Ainsi, dans l'association de l'enzyme avec le substrat (ligne du haut, de gauche à droite), la vitesse sera égale au produit de la concentration de l'enzyme, de la concentration du substrat et d'une constante k_1 . La constante caractéristique de la réaction inverse (ligne du haut, de droite à gauche) sera appelée k_{-1} . Et ainsi de suite dans les autres réactions avec les constantes k_2 et k_{-2} , k_3 et k_{-3} .

4.7 Exemple de constantes : la fumarase

220000
4 sous-unités

4.2.1.2

Fumarase



EE 19

- La fumarase est un autre exemple d'enzyme qui réalise une réaction d'hydratation voisine de celle de l'anhydrase carbonique.
- Dans cet exemple la constante k_1 de l'association de l'enzyme avec le fumarate est de 1 000 000 000, alors que la constante k_{-1} n'est que de 45 000. Ce qui montre encore que l'association de l'enzyme avec le substrat est beaucoup plus rapide que la dissociation du complexe formé.

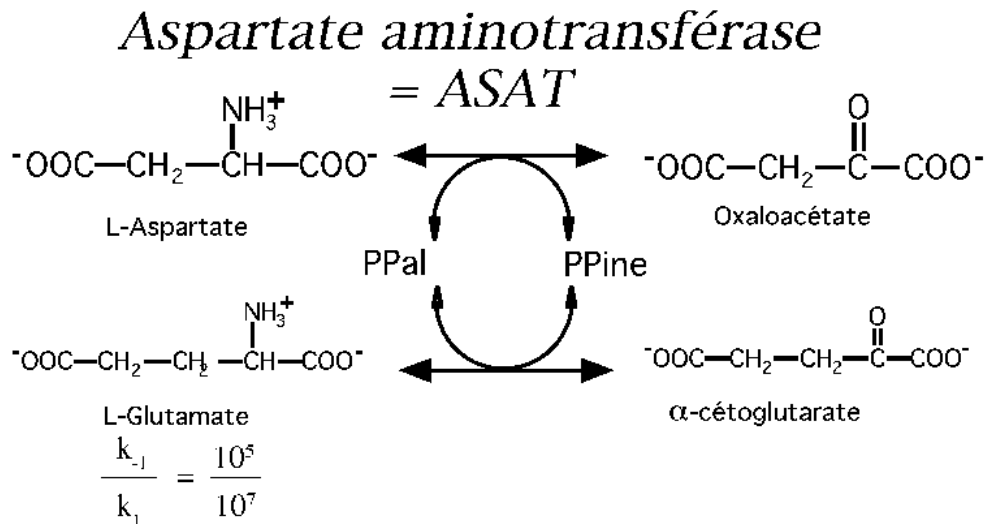
4.8 Exemple de constantes : l'aspartate aminotransférase = ASAT

88000

2 sous-unités

Isoenzymes

2.6.1.1



EE 19/1

- L'aspartate aminotransférase est un autre exemple d'enzyme qui réalise une réaction plus complexe dans laquelle le glutamate est désaminé en alpha-cétoglutarate.
- Dans cet exemple la constante k_1 de l'association de l'enzyme avec le glutamate est de 10 000 000, alors que la constante k_{-1} n'est que de 100 000. Ce qui montre encore que l'association de l'enzyme avec le substrat est beaucoup plus rapide que la dissociation du complexe formé.

4.9 Exemple de constantes : la créatine phosphokinase

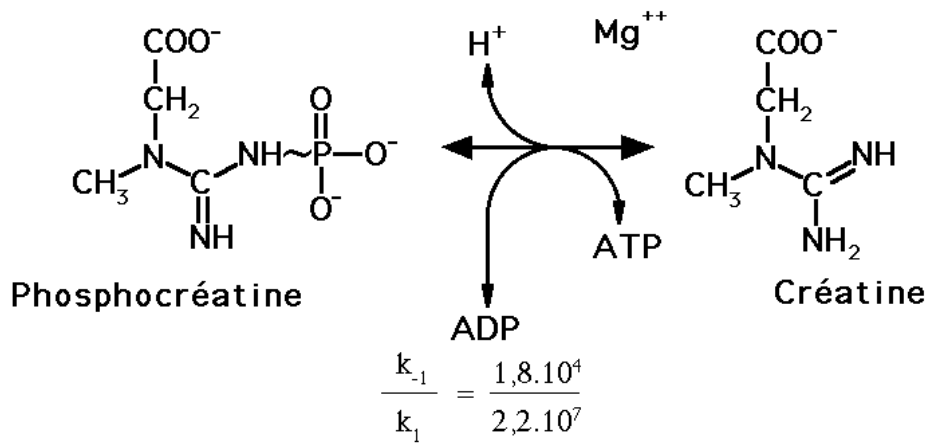
84000

2 sous-unités

Isoenzymes

2.7.3.2

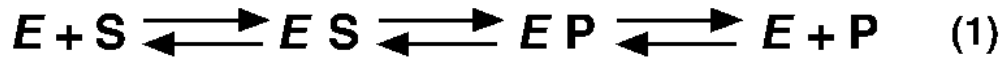
Créatine Phosphokinase



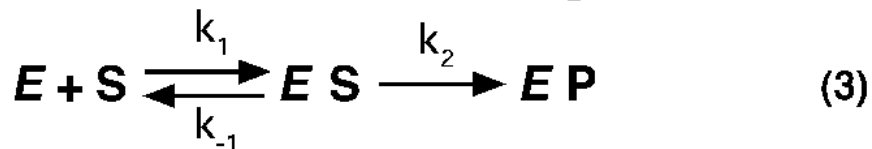
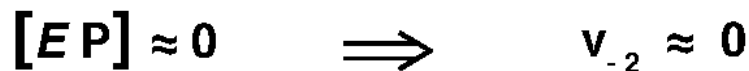
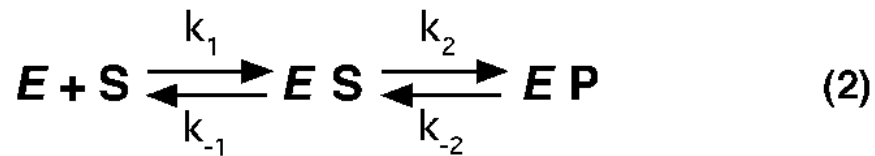
EE 19/2

- La Créatine Phosphokinase (CPK) est une enzyme des muscles des Vertébrés. Elle catalyse le transfert d'un radical phosphoryl du substrat, la créatine-phosphate vers un coenzyme libre transporteur d'énergie : l'ADP. La réaction est réversible.
- Dans cet exemple la constante k_1 de l'association de l'enzyme avec le coenzyme libre ADP est de 22 000 000, alors que la constante k_{-1} n'est que de 18 000. Ce qui montre encore que l'association de l'enzyme avec le coenzyme libre est beaucoup plus rapide que la dissociation du complexe formé.

4.10 Phase stationnaire



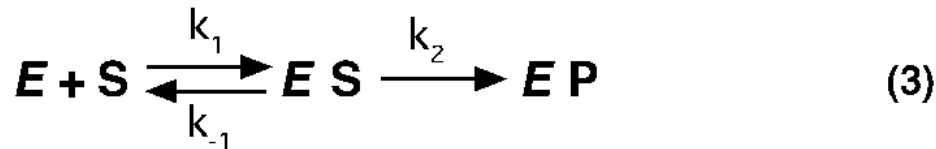
Phase stationnaire



EE 20

- Dans les conditions de nos mesures, il n'existe dans le milieu que des molécules d'enzyme et de substrat qui s'associent en complexes enzyme-substrat.
- La concentration du produit est nulle au départ et négligeable par rapport à celle du substrat durant la phase stationnaire. En conséquence, la concentration du complexe enzyme-produit durant cette phase est très petite par rapport à celle du complexe E S.
- La réaction de dissociation du complexe E P (à droite de la ligne 1) est donc inexistante et la réaction se simplifie comme le montre la ligne 2.
- La concentration très petite du complexe enzyme-produit entraîne que la vitesse v_{-2} de la transformation de ce complexe E P en complexe E S est aussi négligeable.
- La ligne 3 résume donc les trois réactions réellement en activité au cours de la phase stationnaire.

4.11 Equation de la vitesse



$$v = k_2 [E S] \implies V_{\max} = k_2 [E_{\text{total}}] \quad (4 \Rightarrow 5)$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{k_2 [E S]}{k_2 [E_{\text{total}}]} \quad (6)$$

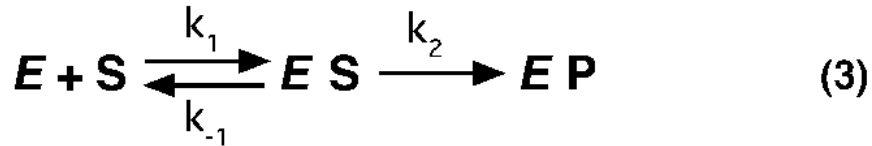
Equation de la vitesse

$$v = V_{\max} \frac{[E S]}{[E_{\text{total}}]} \quad (7)$$

EE 21

- La vitesse de la réaction enzymatique est la vitesse d'apparition du produit dans le milieu. Dans les conditions initiales (ligne 3), $v = k_2 E S$. Si la concentration du substrat était infinie, toutes les molécules de l'enzyme seraient liées à des molécules de substrat et la concentration du complexe $[E S] = [E_{\text{total}}]$. La vitesse initiale qu'on obtiendrait alors (qui est donc la vitesse maximum) est donc $V_m = k_2 [E_{\text{total}}]$.
- Nous pouvons donc écrire l'égalité des rapports des deux membres des équations 4 et 5 ce qui donne l'égalité 6 et multiplier les deux membres de celle-ci par la vitesse maximum.
- La ligne 7, que nous appellerons équation de la vitesse montre que la vitesse initiale réelle est égale à la vitesse maximum multipliée par le rapport des concentrations du complexe E S et de l'enzyme totale.
- Plus le nombre de molécules d'enzyme qui sont liées au substrat se rapproche de la totalité de l'enzyme, plus la vitesse réelle se rapproche de la vitesse maximum.

4.12 Equation de la conservation de l'enzyme



$$E_{\text{total}} = E + ES + EP \quad (8)$$

$$EP \approx 0$$

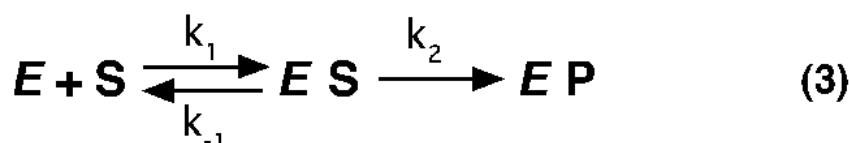
Equation de la conservation de l'enzyme

$$\boxed{[E_{\text{total}}] = [E] + [ES]} \quad (9)$$

EE 22

- Reprenons la ligne 3 pour examiner quelles molécules d'enzyme sont présentes durant la phase stationnaire.
- L'enzyme totale est répartie en molécules d'enzyme libre, de complexe E S et de complexe E P.
- La quantité de complexe E P avoisine 0 et peut être négligée. Nous pouvons donc écrire la ligne 9, dite équation de la conservation de l'enzyme pour exprimer que dans un volume donné, la concentration de l'enzyme totale est la somme de la concentration de l'enzyme libre et de la concentration du complexe enzyme-substrat.

4.13 Constante de Michaelis



formation de $E S$ = dissociation de $E S$

$$k_1 [E] [S] = (k_{-1} + k_2) [E S] \quad (10)$$

$$[E] = [E_{\text{total}}] - [E S] \quad (9)$$

$$k_1 ([E_{\text{total}}] - [E S])[S] = (k_{-1} + k_2) [E S] \quad (11)$$

Constante de MICHAELIS (12)

$$\boxed{\frac{[E][S]}{[E S]} = \frac{([E_{\text{total}}] - [E S])[S]}{[E S]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} = K_m}$$

EE 23

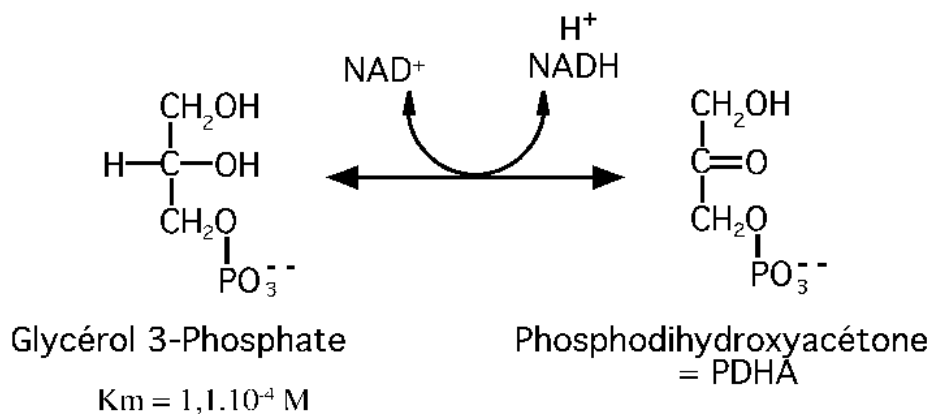
- Durant la phase stationnaire, la concentration du complexe enzyme-substrat est constante. Donc la vitesse de formation de ce complexe $E S$ doit être égale à celle de dissociation de ce même complexe. D'après la ligne 3, il n'y a qu'une réaction de formation du complexe $E S$ dont la vitesse est $v_1 = k_1 [E] [S]$.
- Il y a au contraire 2 réactions diminuant la concentration du complexe $E S$: l'une est la dissociation dont la vitesse est $v_{-1} = k_{-1} [E S]$, l'autre est la transformation enzymatique proprement dite dont la vitesse est $v_2 = k_2 [E S]$.
- Mettons $E S$ en facteur dans le second membre.
- D'après l'équation de la conservation de l'enzyme (ligne 9), on peut remplacer dans le premier membre la concentration de l'enzyme libre par la différence entre la concentration de l'enzyme totale et celle du complexe $E S$.
- Ce qui donne la ligne 11, dont nous pouvons diviser les deux membres par k_1 ou par la concentration d' $E S$ pour aboutir à une expression qu'on appelle constante de Michaelis ou K_m et qui est proche de la constante de dissociation du complexe $E S$.
- Cette constante K_m est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

4.14 Exemple de K_m : la glycérophosphate déshydrogénase

Isoenzymes

1.1.1.8

Glycérophosphate déshydrogénase



EE 24

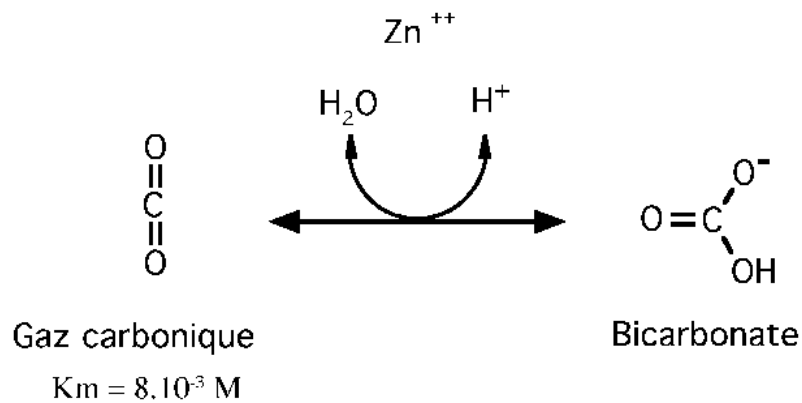
- La glycérophosphate déshydrogénase est une enzyme présente dans le cytoplasme de toutes nos cellules. Elle utilise le coenzyme NAD^+/NADH pour oxyder le glycéro-phosphate en phosphodihydroxyacétone.
- La constante K_m de cette enzyme pour le glycéro-phosphate est de 0,1 millimolaire, constante plus petite que celle que nous avons vue pour la LDH vis-à-vis du pyruvate. Cette déshydrogénase a donc une affinité plus grande pour son substrat que la LDH pour le sien.

4.15 Exemple de K_m : l'anhydrase carbonique

29000
Isoenzymes

4.2.1.1

Anhydrase carbonique



EE 24/1

- L'anhydrase carbonique, que nous avons déjà rencontrée comme exemple, a pour substrat le gaz carbonique.
- La constante K_m de cette enzyme pour le gaz carbonique est de 8 millimolaire, constante plus grande que celle que nous avons vue pour la LDH vis-à-vis du pyruvate. Cette déshydrogénase a donc une affinité plus petite pour son substrat que la LDH pour le sien.

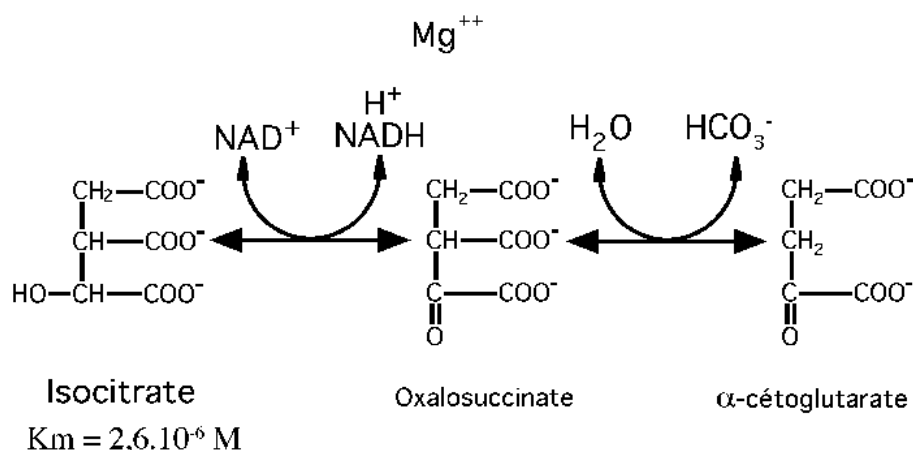
4.16 Exemple de K_m : l'isocitrate déshydrogénase

350000

Isoenzymes

1.1.1.41

Isocitrate déshydrogénase



EE 24/2

- L'isocitrate déshydrogénase est une enzyme présente dans toutes nos cellules. Elle utilise le coenzyme NAD^+/NADH pour oxyder, puis décarboxyler l'isocitrate en α -cétoglutarate.
- La constante K_m de cette enzyme pour l'isocitrate est de 2,6 micromolaire, constante bien plus petite que celle que nous avons vue pour la LDH vis-à-vis du pyruvate. Cette déshydrogénase a donc une affinité beaucoup plus grande pour son substrat que la LDH pour le sien.
- L'oxalosuccinate, produit intermédiaire de la réaction, n'est pas libéré par l'enzyme. Inversement, l'isocitrate déshydrogénase n'a pas d'affinité pour l'oxalosuccinate libre.

4.17 Calculs

$$\frac{([E_{\text{total}}] - [E S])[S]}{[E S]} = K_m \quad (12)$$

$$\left(\frac{[E_{\text{total}}]}{[E S]} - 1 \right) [S] = K_m \quad (13)$$

$$\frac{[E_{\text{total}}][S]}{[E S]} - [S] = K_m \quad (14)$$

$$\frac{[E_{\text{total}}][S]}{[E S]} = K_m + [S] \quad (15)$$

EE 25

- D'après la ligne 12, K_m est le produit de la différence entre les concentrations de l'enzyme totale et de l'enzyme-substrat, multipliée par la concentration du substrat et divisée par la concentration du complexe E S. Mettons en facteur la concentration du substrat (ligne 13) puis effectuons la multiplication (ligne 14) avant de faire passer les termes concentration de substrat dans le deuxième membre de l'équation.

4.18 Calculs

$$\frac{[E_{\text{total}}][S]}{[ES]} = K_m + [S] \quad (15)$$

$$\frac{[E_{\text{total}}]}{[ES]} = \frac{K_m + [S]}{[S]} \quad (16)$$

$$\frac{[ES]}{[E_{\text{total}}]} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (17)$$

EE 25/1

- En prenant les inverses des deux membres, on aboutit (ligne 17) à une expression du rapport de la concentration du complexe E S à celle de l'enzyme totale en fonction d'une constante et de notre variable, la concentration de substrat.

4.19 Equation de Michaelis & Menten

$$v = V_{\max} \frac{[E S]}{[E_{\text{total}}]} \quad (7)$$

$$\frac{[E S]}{[E_{\text{total}}]} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (17)$$

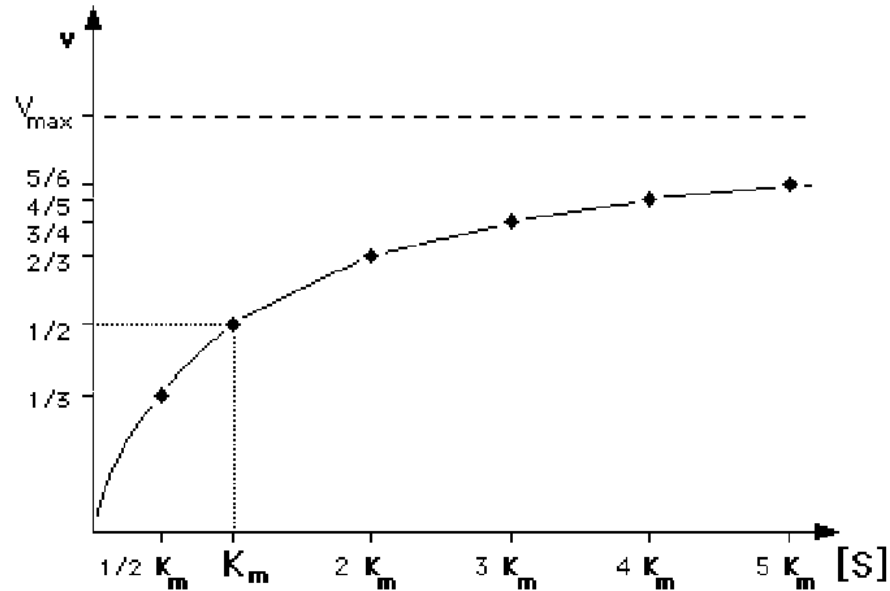
Equation de MICHAELIS & MENTEN :

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (18)$$

EE 26

- Rapprochons enfin les lignes 7 et 17, pour remplacer le facteur E S sur E_{total} de l'équation de la vitesse par la valeur que nous en avons trouvé à partir de la constante K_m .
- Cela nous permet d'écrire l'équation de Michaelis et Menten (ligne 18) qui est une expression de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat et des deux constantes caractéristiques d'une réaction enzymatique, la vitesse maximum et la constante de Michaelis.
- En étudiant cette fonction on observe qu'elle est univoque, que la vitesse initiale v est nulle si la concentration du substrat est nulle, que le terme $S / K_m + S$ tend vers 1 lorsque la concentration de S tend vers l'infini, ce qui entraîne que v tende vers la vitesse maximum, et enfin que lorsque la constante K_m est égale à la concentration du substrat, la vitesse initiale devient égale à la moitié de la vitesse maximum.

4.20 Hyperbole de Michaelis-Menten



EE 27

- Le graphe représentant cette fonction dans tout le domaine où elle a un sens physique, confirme ces conclusions mathématiques.
- Le calcul de la vitesse initiale à partir de concentrations de substrat égales à des multiples entiers de K_m aboutit à des fractions entières de la vitesse maximum. On trace une hyperbole à partir des points obtenus, qui permet de voir la signification réelle des paramètres géométriques K_m et V_{max} que nous avons choisis au début de cette étude.
- V_{max} est une vitesse initiale que la réaction aurait si la concentration du substrat était infinie.
- K_m est la concentration du substrat pour laquelle on observe une vitesse égale à la moitié de la vitesse maximum.
- Malheureusement, l'extrapolation d'une hyperbole à partir de quelques points n'est pas facile et ne permet pas de faire le tracé d'une telle courbe à partir des mesures de vitesses initiales faites réellement au cours d'expériences avec des concentrations de substrat différentes.

4.21 Calculs

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{K_m + [S]}{[S]} \quad (19)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} \quad (20)$$

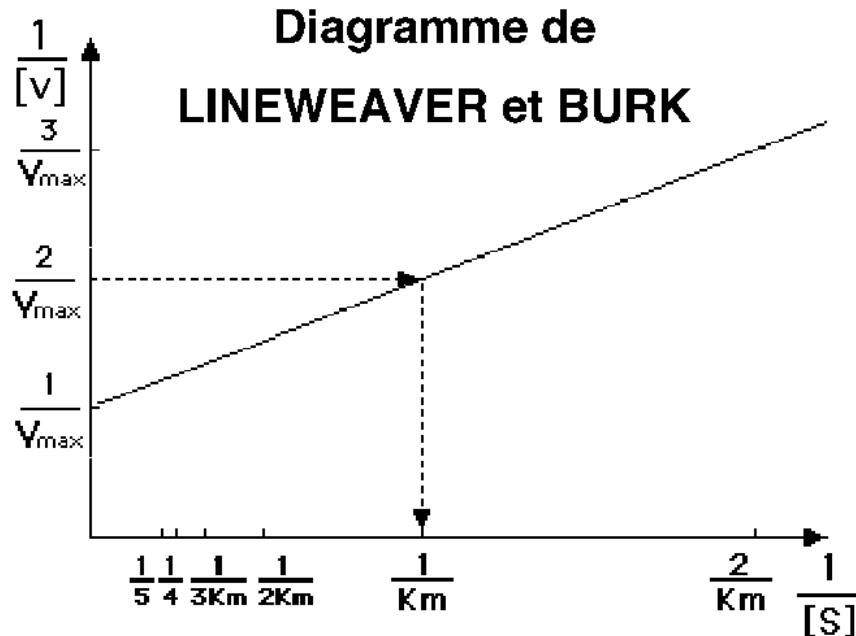
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]} \quad (21)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (22)$$

EE 28

- Pour écrire la ligne 19, on a pris les inverses des deux membres de l'équation de Michaelis & Menten.
- En effectuant le produit des facteurs du second membre (ligne 20) en séparant les deux termes additifs du numérateur (ligne 21) puis le facteur contenant la variable S (ligne 22) l'équation de Michaelis & Menten prend alors une allure de fonction linéaire de type $y = ax + b$. Dans cette transformation due à LINEWAEVER et BURK, l'inverse de la vitesse initiale est exprimé en fonction de l'inverse de la concentration du substrat et des constantes K_m et V_{\max} .

4.22 Diagramme de Lineweaver et Burk



EE 29

- 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 .

Chapitre 5

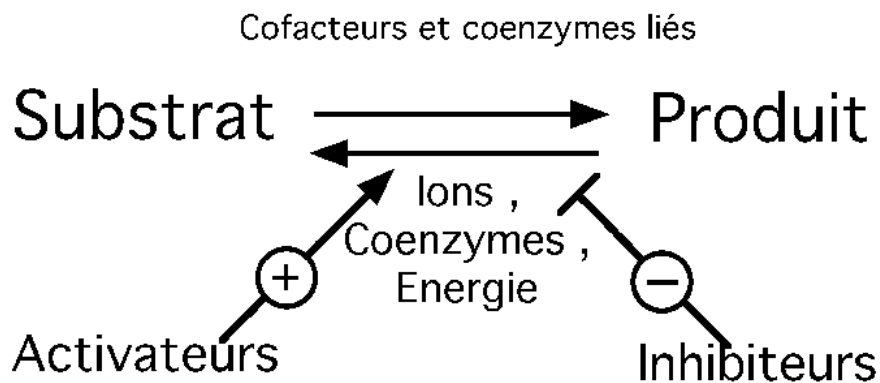
Effet de la concentration des effecteurs

5.1 Facteurs : les effecteurs

Masse Moléculaire
Isoenzymes

Classification

Enzyme



EE 30

- 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.

5.2 Effecteur

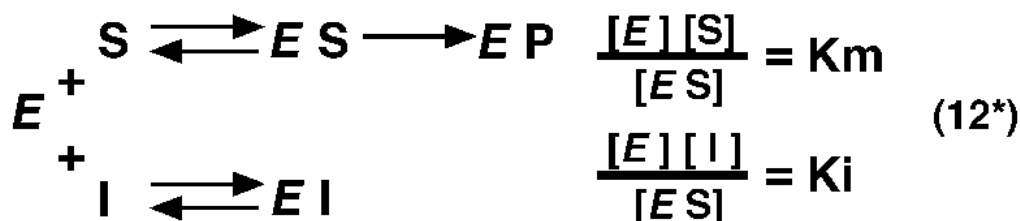
EFFECTEUR :

- **Corps chimique qui par sa liaison avec l'enzyme modifie la vitesse de la réaction enzymatique**
 - soit en l'accélération : Activateur
 - soit en la ralentissant : Inhibiteur

EE 31

- Les ligands qui peuvent modifier la vitesse de la réaction sans être des cofacteurs indispensables, nous les appellerons effecteurs. Les effecteurs peuvent être des molécules ou des atomes quelconques, minéraux ou organiques. Ceux des effecteurs qui accélèrent la réaction sont les activateurs. Ceux qui la ralentissent sont les inhibiteurs.

5.3 Inhibition compétitive (équation)



$$[E_{\text{total}}] = [E] + [ES] + [EI] \quad (9^*)$$

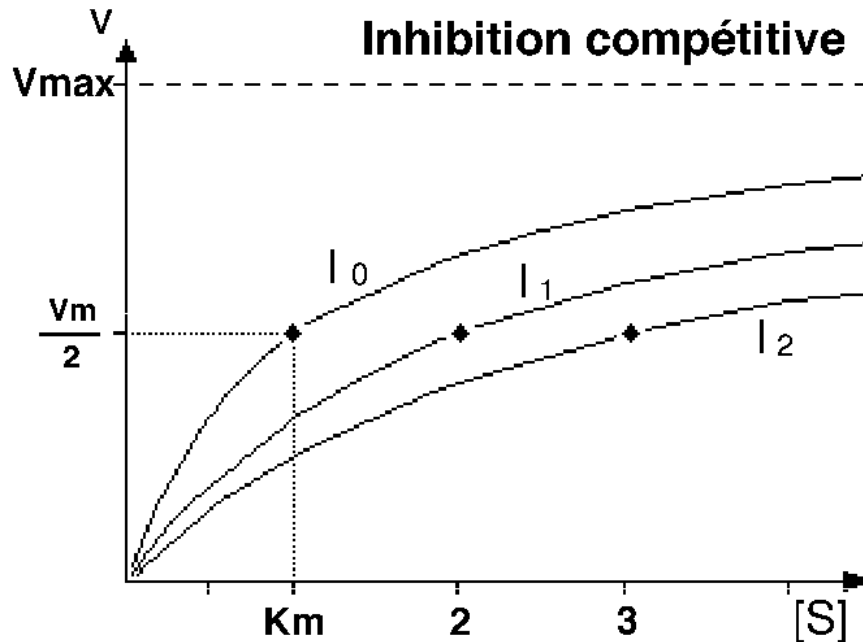
$$v = v_{\text{max}} \frac{[ES]}{[E_{\text{total}}]} \quad (7^*)$$

$$v = v_{\text{max}} \frac{[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (18^*)$$

EE 32

- Lorsque la liaison d'un inhibiteur sur l'enzyme a pour effet d'empêcher la liaison enzyme-substrat, on parle d'inhibition compétitive vis à vis de ce substrat. Concurrentement à la liaison enzyme-substrat il y a une liaison enzyme-inhibiteur qui aboutit à un complexe E I inactif. La constante de dissociation de ce complexe E I soit K_i est définie par rapport aux concentrations de l'enzyme libre, de l'inhibiteur et du complexe E I.
- Dans l'équation de la conservation de l'enzyme (ligne 9^{*}) il apparaît une autre forme de l'enzyme : le complexe E I. L'équation de la vitesse (ligne 7^{*}), qui ne dépend que du complexe E S puisque le complexe E I est inactif, reste inchangée.
- Les calculs conduisent à une équation de Michaelis dans laquelle le facteur K_m est affecté d'un coefficient qui dépend de la concentration de l'inhibiteur et de l'inverse de la constante K_i c'est à dire l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur (ligne 18^{*}).

5.4 Inhibition compétitive (hyperbole)



EE 33

- Le graphe représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat va donc dépendre de la concentration de l'inhibiteur.
- La courbe I_0 représente la fonction en l'absence de l'inhibiteur. Les courbes I_1 et I_2 représentent la fonction à deux concentrations d'inhibiteur, la seconde double de la première.
- On observe que la vitesse maximum est inchangée puisqu'elle représente une situation où la totalité des molécules d'enzyme sont occupées par des molécules de substrat et qu'il n'y a donc pas de complexes enzyme-inhibiteur. La moitié de cette vitesse maximum est atteinte pour des concentrations de substrat croissantes avec la concentration de l'inhibiteur : le K_m apparent est donc bien une fonction de cette concentration d'inhibiteur.

5.5 Calculs

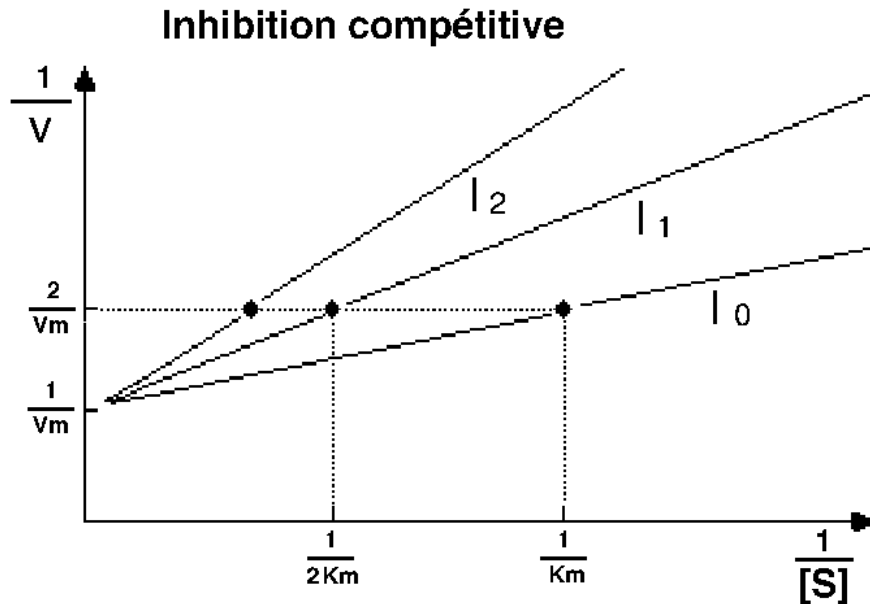
$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_m(1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]} \quad (18^*)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (22^*)$$

EE 34

- En prolongeant les calculs jusqu'à la ligne 22*, on aboutit toujours à une équation de fonction linéaire.

5.6 Inhibition compétitive (double inverse)



EE 34/1

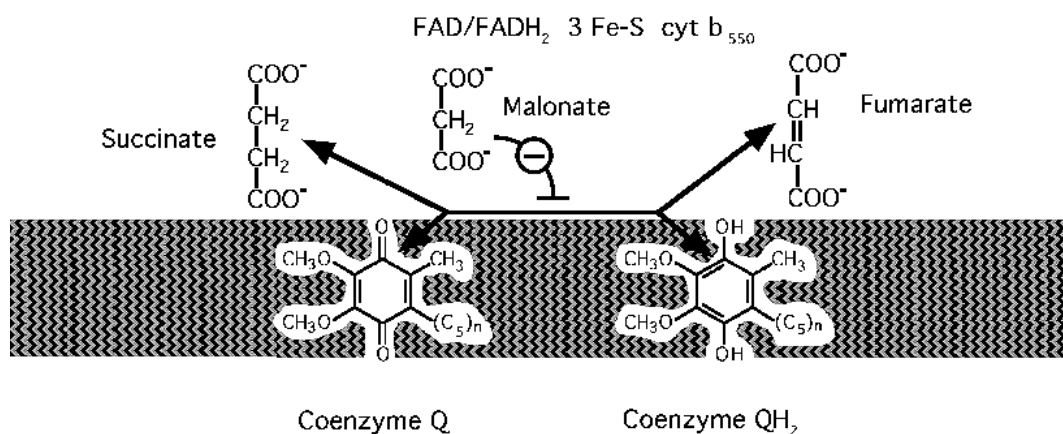
- Le graphe en double inverse montre la droite représentant la situation sans inhibiteur (I_0) et les droites représentant l'effet des concentrations I_1 et I_2 de l'inhibiteur. L'inverse de la vitesse maximum, inchangée, représente le point commun de toutes ces droites : ceci est caractéristique des graphes en double inverse en présence de différentes concentrations d'un inhibiteur compétitif.

5.7 Exemple d'inhibition compétitive : la succinate déshydrogénase

130000

1.3.5.1

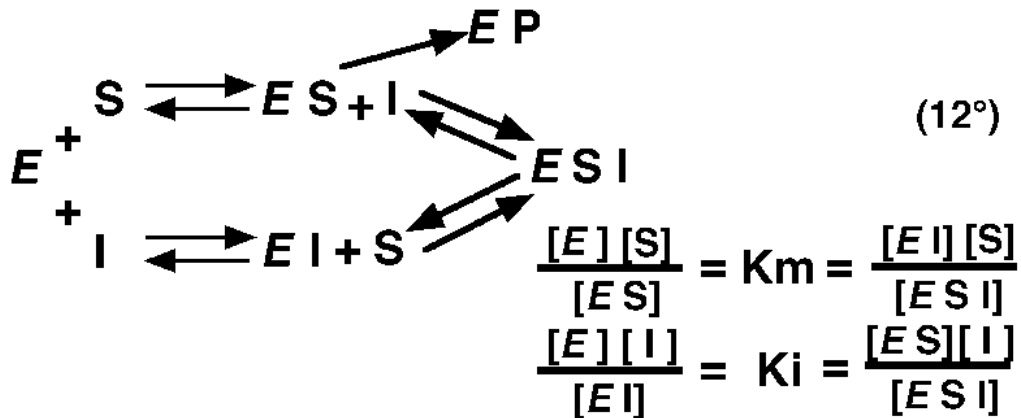
Succinate déshydrogénase (Complexe II)



EE 35

- 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.

5.8 Inhibition non compétitive (équation)



$$[E_{\text{total}}] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad (9^\circ)$$

$$v = V_{\text{max}} \frac{[ES]}{[E_{\text{total}}]} \quad (7^\circ)$$

EE 36

- Lorsque la liaison d'un inhibiteur sur l'enzyme se fait sur un site tout à fait indépendant du site actif, il n'y a évidemment aucune compétition entre le substrat et l'inhibiteur. L'inhibiteur en se liant rend la molécule d'enzyme incapable de catalyser la réaction : on parle alors d'inhibition non compétitive.
- Toutes les molécules d'enzyme peuvent entrer en liaison avec l'inhibiteur. Le complexe enzyme-substrat donne un complexe enzyme-substrat-inhibiteur inactif. L'enzyme libre en s'associant avec l'inhibiteur donne un complexe enzyme-inhibiteur qui peut lui-même lier une molécule de substrat, en donnant un complexe E S I, identique à celui obtenu à partir du complexe E S et bien sûr inactif. La constante K_m de l'enzyme vis à vis du substrat représente toujours la constante de dissociation du complexe E S mais aussi celle du complexe E S I en E I et substrat libre. La constante K_i de l'enzyme vis à vis de l'inhibiteur représente toujours la constante de dissociation du complexe E I mais aussi celle du complexe E S I en E S et inhibiteur libre.
- Dans l'équation de la conservation de l'enzyme (ligne 9°) il apparaît deux autres formes de l'enzyme : le complexe enzyme-inhibiteur et le complexe enzyme-substrat-inhibiteur. L'équation de la vitesse (ligne 7°), qui ne dépend que du complexe E S puisque les complexes E I et E S I sont inactifs, reste donc inchangée.

5.9 Calculs

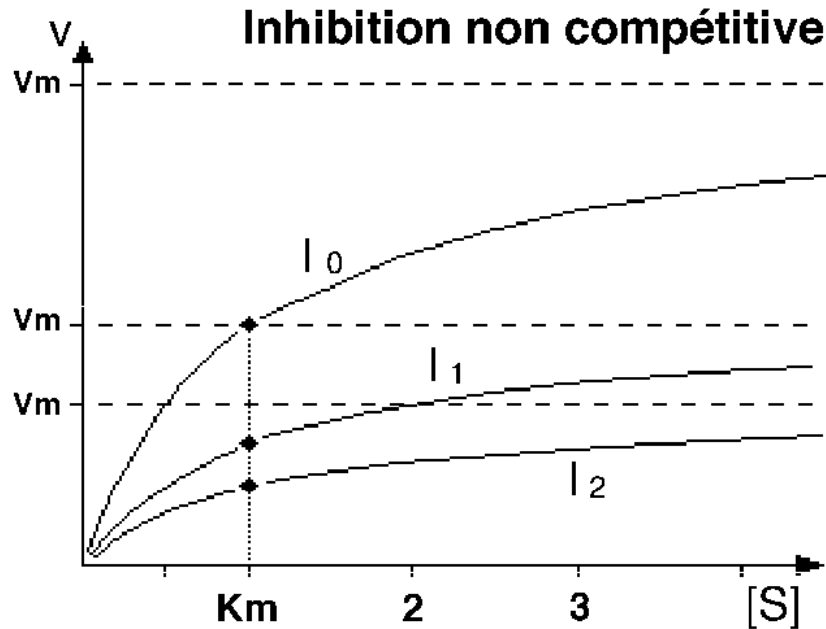
$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (18^\circ)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{V_{\max}} \quad (22^\circ)$$

EE 37

- Les calculs conduisent à une équation de Michaelis (ligne 18°) dans laquelle la vitesse maximum est affectée d'un coefficient qui dépend de la concentration de l'inhibiteur et de l'inverse de la constante K_i c'est à dire de l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur.
- La constante K_m , au contraire reste la même que dans le cas général.
- En prolongeant les calculs jusqu'à la ligne 22°, on aboutit toujours à une fonction linéaire.

5.10 Inhibition non compétitive (hyperbole)

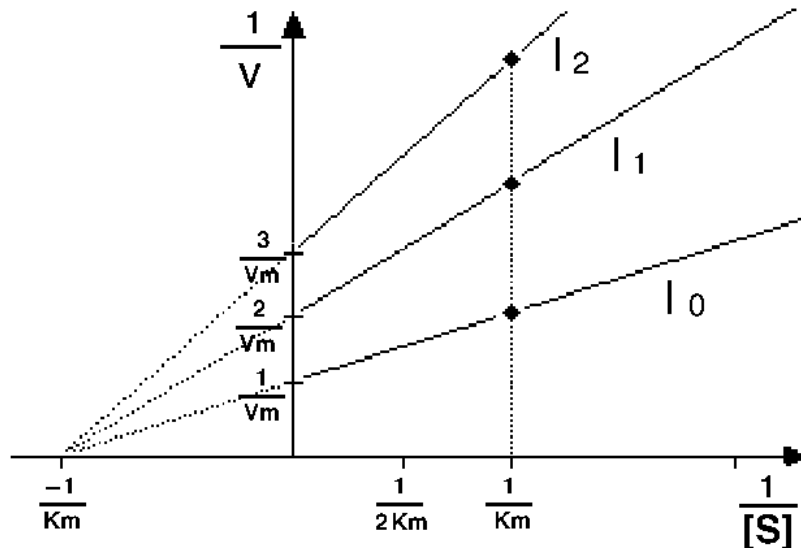


EE 37/1

- Le graphe représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat va donc dépendre de la concentration de l'inhibiteur.
- La courbe I_0 représente la fonction en l'absence de l'inhibiteur. Les courbes I_1 et I_2 représentent la fonction à deux concentrations d'inhibiteur, la seconde double de la première. On observe que la vitesse maximum change en fonction de la concentration de l'inhibiteur puisque la concentration de l'enzyme, même à concentration infinie du substrat, se trouve diminuée des molécules d'enzyme liées à l'inhibiteur, devenues inactives.
- La moitié de cette vitesse maximum est atteinte pour des concentrations de substrat toujours égales puisque l'inhibiteur n'affecte pas la liaison de l'enzyme avec le substrat.

5.11 Inhibition non compétitive (double inverse)

Inhibition non compétitive



EE 38/1

- Le graphe en double inverse montre la droite représentant la situation sans inhibiteur (I_0) et les droites représentant l'effet des concentrations I_1 et I_2 de l'inhibiteur.
- L'inverse de la vitesse maximum augmente avec la concentration de l'inhibiteur de même que la pente de la droite. Pour chacune de ces droites, le point qui a pour ordonnée le double de l'ordonnée à l'origine (losanges) correspond toujours à la même abscisse qui est l'inverse du K_m . Le point commun de toutes ces droites est situé à gauche de l'axe des y, dans une partie du graphe qui n'a pas de sens physique puisqu'on est au-delà d'une concentration infinie du substrat ! Mais le calcul de cette abscisse montre qu'elle est de $-1/K_m$ ce qui permet une détermination graphique facile de cette constante. La rencontre de toutes les droites en ce point de l'axe des x est caractéristique des graphes en double inverse en présence de différentes concentrations d'un inhibiteur non compétitif.

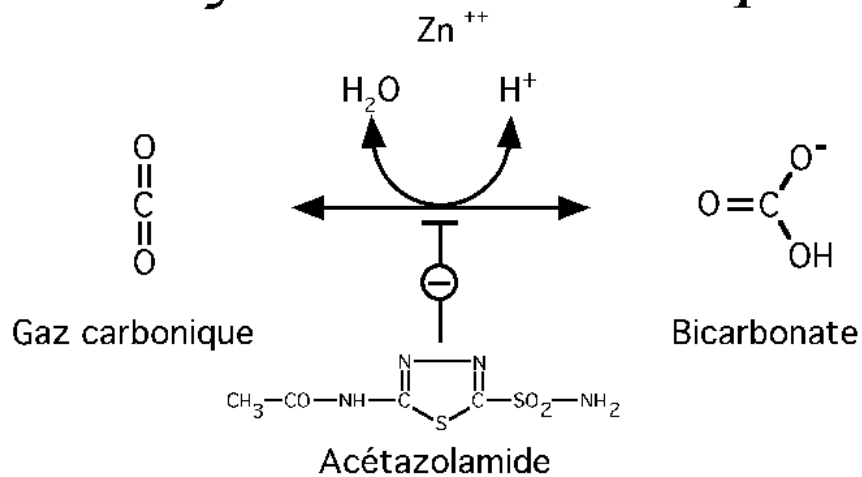
5.12 Exemple d'inhibition non compétitive : l'anhydrase carbonique

4.2.1.1

29000

Isoenzymes

Anhydrase carbonique



EE 39

- L'anhydrase carbonique, que nous avons déjà rencontrée comme exemple, est inhibée par l'acétazolamide qui est un médicament.
- Cette inhibition est non compétitive vis à vis du gaz carbonique, substrat de l'enzyme.

Chapitre 6

Effets allostériques

6.1 Sous-unité (d'une protéine)

SOUS-UNITE (d'une protéine) :

- **Chaîne d'acides aminés constituant une partie de la structure quaternaire d'une protéine**

EE 40

- Lorsqu'une protéine est composée de plusieurs chaînes d'acides aminés, chacune de ces chaînes est une sous-unité de la protéine.
- L'arrangement spatial des sous-unités constitue la structure quaternaire de la protéine.

6.2 Protomère

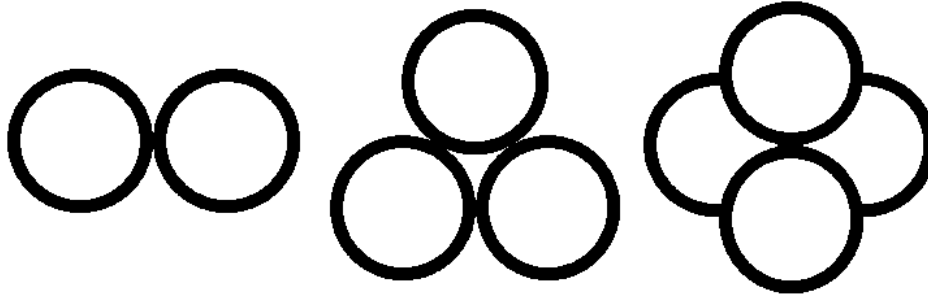
PROTOMERE :

- **Chacune des parties équivalentes de la structure répétitive d'un corps chimique appelé "polymère"**

EE 40/1

- Les corps chimiques dont la molécule est constituée de répétitions multiples d'un même ensemble d'atomes sont des polymères. L'unité structurale ainsi répétée est un protomère ou monomère. Lorsque le nombre de répétitions est faible le polymère est appelé oligomère.
- Une protéine constituée de sous-unités identiques est un oligomère.
- Chaque protomère d'une protéine oligomérique peut être formé de plusieurs sous-unités.

6.3 Symétrie



1- Les protéines allostériques sont des oligomères dont les protomères occupent tous des positions équivalentes. Il y a donc symétrie par rapport à chaque protomère.

EE 41

- 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 arrangés dans l'espace de façon que chacun d'entre eux ait les mêmes liaisons avec les autres. Un tel arrangement est dit symétrique. C'est le cas des deux protomères d'une paire ou des quatre protomères placés aux 4 sommets d'un tétraèdre.

6.4 Sites de liaison



2- Chaque ligand d'une enzyme allostérique (effecteur, cofacteur ou substrat) a un site sur chaque protomère.

EE 41/1

- Les sites de liaison existent de façon identique sur chaque protomère.

6.5 Conformations



3- La conformation de chaque protomère est contrainte par la conformation des autres.

EE 41/2

- Parce que chaque protomère a des liaisons avec les autres protomères du système, le plus souvent de type électrostatique, sa structure secondaire et tertiaire et son énergie interne sont modifiées par ces liaisons.

6.6 Etats de transition



4- Il y a au moins deux états possibles par protomère différant par le niveau d'énergie libre du protomère (tendu , relaché).

EE 41/3

- Lorsque l'énergie interne d'un protomère augmente par suite de la modification de ces liaisons, on dit qu'il passe à un état tendu. Au contraire lorsque les dites liaisons lui imposent une structure correspondant à une énergie interne diminuée, on dit qu'il passe à un état relaché.

6.7 Effets sur la réaction enzymatique



5- Les affinités des sites de fixation du protomère pour les ligands et la vitesse maximum de la réaction dépendent de l'état du protomère.

EE 41/4

- Ces changements d'énergie interne se traduisent par des modifications de l'affinité de l'enzyme vis à vis du substrat ou encore de la vitesse initiale de la réaction.

6.8 Conservation de la symétrie



6- Lorsqu'un protomère change d'état, la symétrie de la protéine est conservée.

EE 41/5

- Le passage d'un protomère de l'état relâché à l'état tendu implique en général la transformation de la structure des autres protomères dans le même sens pour maintenir la symétrie de la structure d'ensemble.

6.9 Allostérie

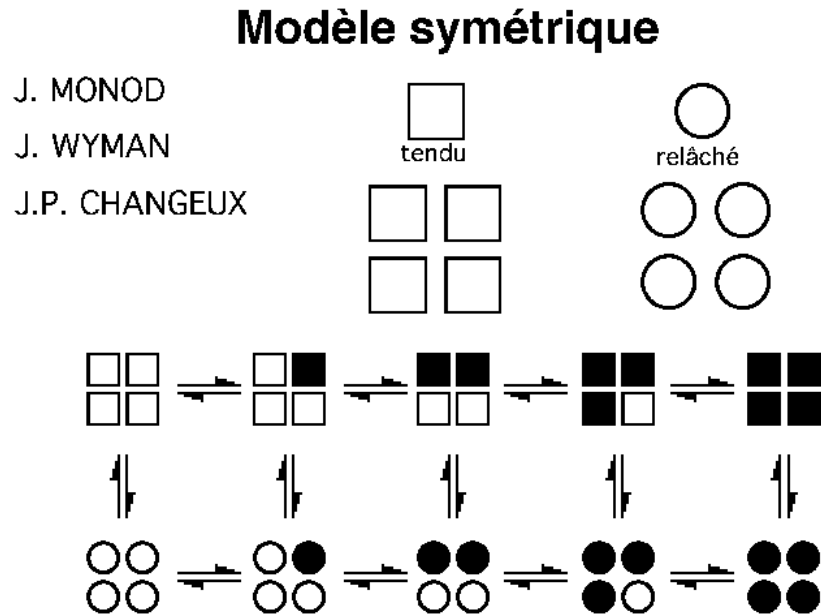
ALLOSTÉRIE

- **Propriété de certaines protéines actives qui peuvent changer de structure spatiale lorsqu'elles se lient à un effecteur en un site différent du site actif, cette liaison se traduisant par une modification de l'activité.**

EE 42

- L'allostérie concerne des protéines douées d'activité : enzymes, transporteurs, canaux, pompes, récepteurs, protéines contractiles, etc...
- Les effecteurs allostériques sont des ligands dont le site de fixation est différent du site de fixation du substrat (site actif, site catalytique). Cela peut être une autre molécule de substrat ou de produit, différente de celle qui participe à la réaction enzymatique ou au transport : on parle alors d'effet allostérique homotrope. Si au contraire l'effecteur est une molécule différente, on parle alors d'effet allostérique hétérotrope.
- Lorsqu'une protéine allostérique comporte plusieurs sous-unités, la fixation du substrat ou de l'effecteur sur une sous-unité se traduit par un effet sur les autres sous-unités de la protéine.
- La modification de l'activité est toujours quantitative : augmentation, on parle alors d'activation allostérique ou ralentissement, ou inhibition allostérique.

6.10 Modèle symétrique

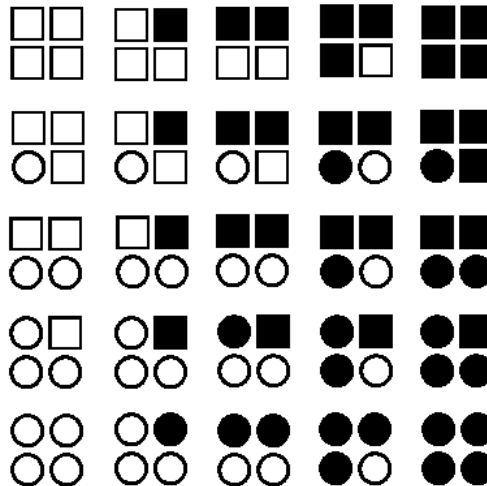


- Ce modèle symétrique des enzymes allostériques est dû à MONOD, WYMAN et CHANGEUX.
- Supposons pour simplifier qu'il n'y ait que deux états possibles des protomères : l'état tendu et l'état relâché. Dans une protéine à 4 sous-unités la conformation tendue de 2 d'entre elles imposera aux deux autres de prendre cette structure.
- Supposons que cet état relâché implique une affinité plus grande pour le substrat et que la présence du substrat lui-même favorise le passage à cet état : les 4 protomères à l'état tendu (en haut à gauche) vont être contraints si l'un d'entre eux se lie au substrat, de passer à l'état relâché, ce qui entraînera pour les trois autres une affinité plus grande vis à vis du substrat et activera la réaction.
- Il s'établit une **coopération** entre les protomères pour que le substrat soit plus efficacement transformé.

6.11 Modèle non symétrique

Modèle non symétrique

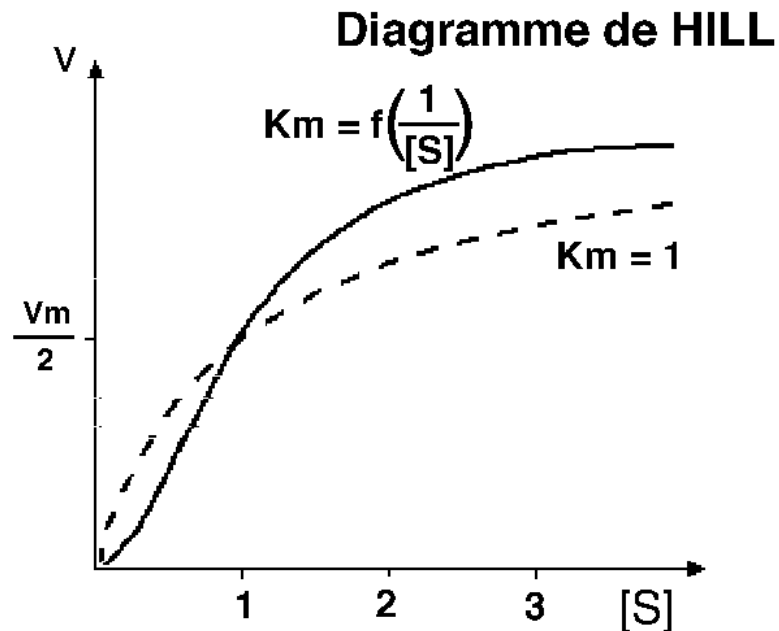
D.E. KOSHLAND



EE 42/2

- KOSHLAND a étendu ce modèle à des oligomères non symétriques dans la structure desquels chacun des protomères peut être tendu ou relâché, sans cesser de subir la contrainte des autres pour le faire changer d'état.

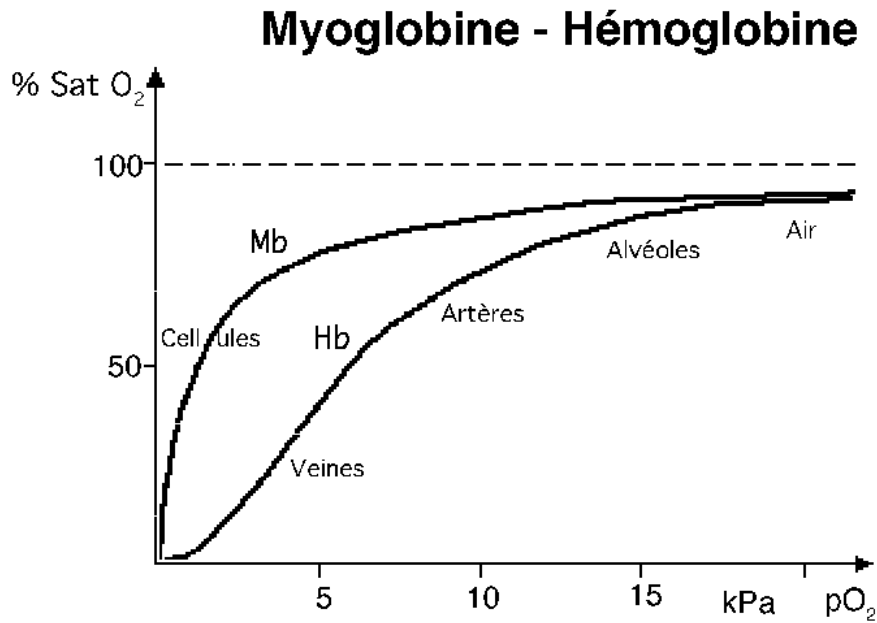
6.12 Diagramme de Hill



EE 43

- 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.

6.13 Exemple d'allostérie : myoglobine ; hémoglobine



EE 44

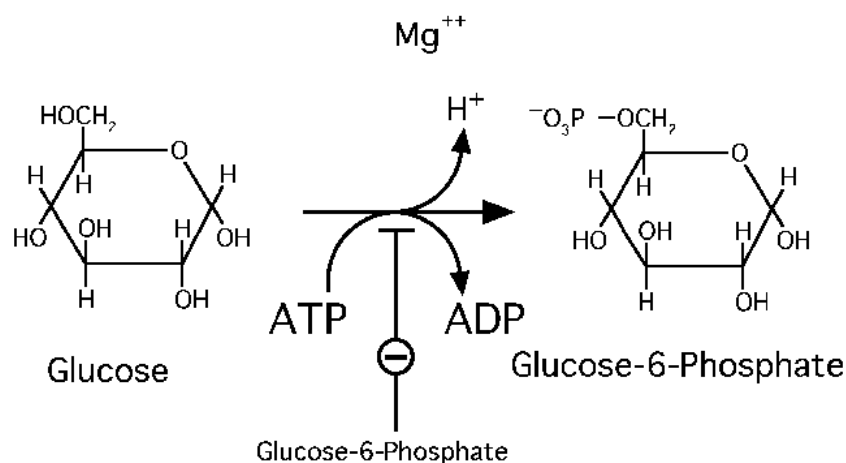
- La myoglobine est une protéine qui transporte l'oxygène dans le cytoplasme des cellules. Elle est constituée d'une seule chaîne d'acides aminés. Sa vitesse de transport de l'oxygène en fonction de la pression de ce gaz, est de type michaelien et la courbe qui la représente est une hyperbole.
- L'hémoglobine 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.

6.14 Exemple d'allostérie : l'hexokinase

95000
Isoenzymes

2.7.1.1

Hexokinase



EE 44/1

- L'hexokinase est une enzyme de la membrane plasmique de toutes nos cellules.
- Elle catalyse une réaction de transfert de phosphate et d'énergie du coenzyme ATP vers le glucose qu'elle active en glucose-6-phosphate. Un proton est libéré.
- La réaction couplée est exergonique et irréversible.
- Le glucose-6-phosphate, produit de la réaction catalysée, est en outre un régulateur allostérique de l'hexokinase. Il se fixe sur un site de liaison différent du site actif et cette fixation diminue l'affinité du site actif pour le glucose. Il en résulte un ralentissement de la vitesse de réaction.

6.15 Exemple d'allostérie : la phosphofructokinase

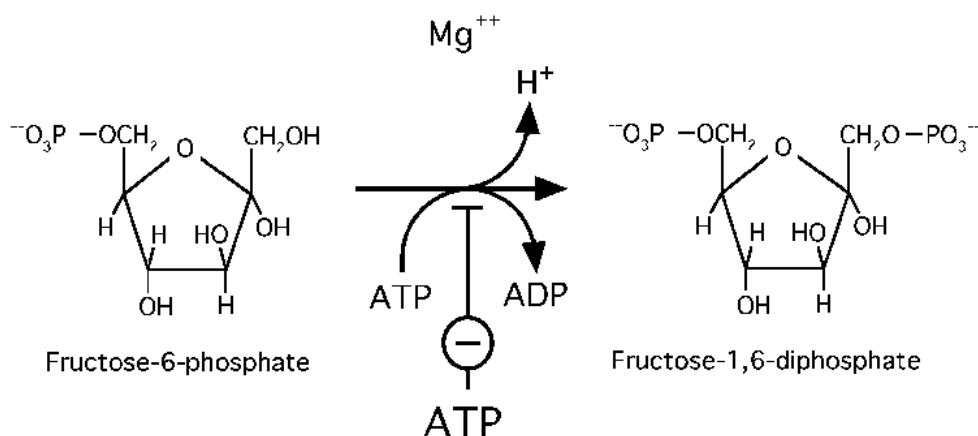
340000

4 sous-unités

Isoenzymes

2.7.1.11

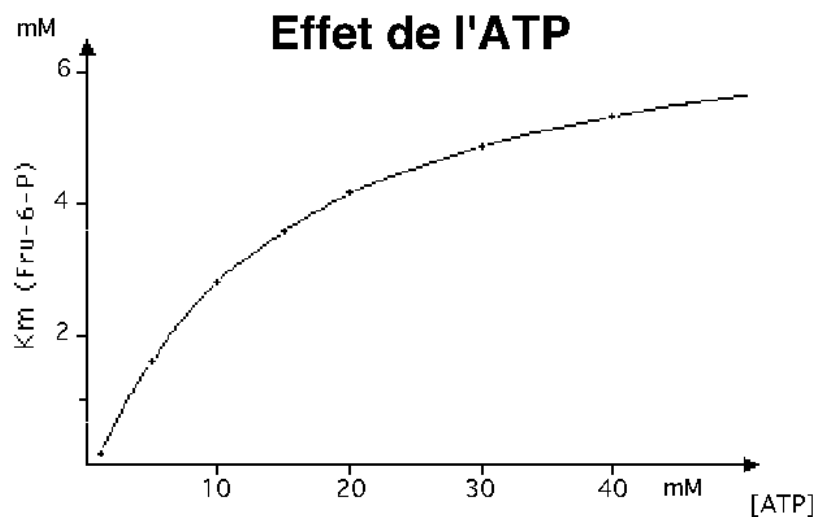
PhosphoFructoKinase



EE 44/2

- La phosphofructokinase (en abrégé PFK) est une enzyme présente dans toutes nos cellules.
- Elle comporte 4 sous-unités presque identiques, avec 4 sites actifs pour une masse moléculaire de 340000 daltons.
- Elle catalyse une réaction de transfert de phosphate et d'énergie du coenzyme ATP vers le fructose 6-phosphate qu'elle active en fructose 1,6-diphosphate. Un proton est libéré.
- La réaction couplée est exergonique et irréversible.
- La PFK est l'enzyme la plus lente de la glycolyse cytoplasmique, voie métabolique du métabolisme énergétique. Elle catalyse l'étape d'engagement des glucides dans la production d'énergie. Elle est donc l'enzyme-clé de cette voie métabolique.
- La cinétique de la PFK est allostérique; elle est rétroinhibée par le produit final de la glycolyse, l'ATP. Une molécule d'ATP (effecteur allostérique), différente de celle qui apporte le phosphate et l'énergie (coenzyme), se fixe sur un site de liaison de chaque protomère et cette fixation diminue l'affinité du site actif pour le fructose 6-phosphate. Il en résulte un ralentissement de la vitesse de réaction.

6.16 Effet de l'ATP sur la PFK



EE 44/3

- Lorsque on représente sur un graphe la constante K_m de la PhosphoFructoKinase pour son substrat le Fructose-6-phosphate, en fonction de la concentration de l'ATP, produit final du métabolisme énergétique, on montre que cette constante K_m est d'autant plus élevée que cette concentration augmente.
- L'affinité de la PFK pour le Fructose-6-phosphate diminue avec l'augmentation de la concentration du produit final : il y a donc rétroinhibition de l'enzyme par l'ATP.

6.17 Exemple d'allostérie : la glycogène phosphorylase

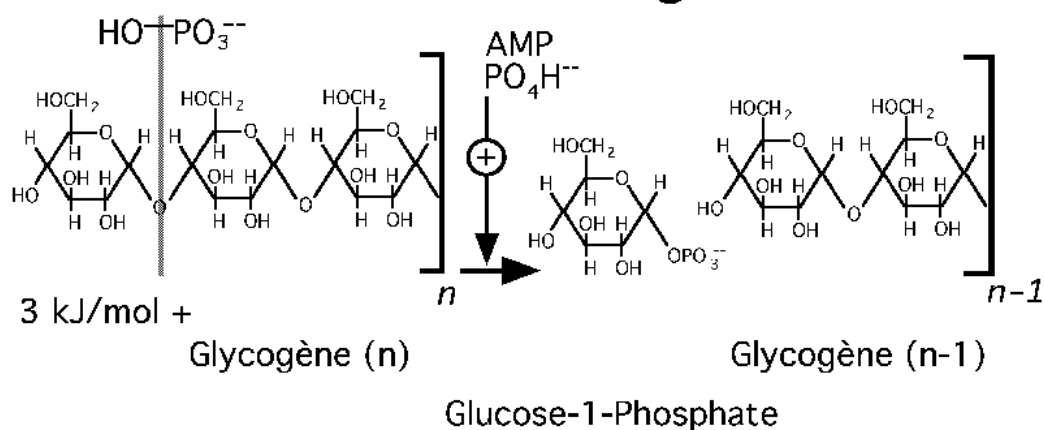
450000

2 ou 4 sous-unités

Isoenzymes

2.4.1.1

Glycogène Phosphorylase

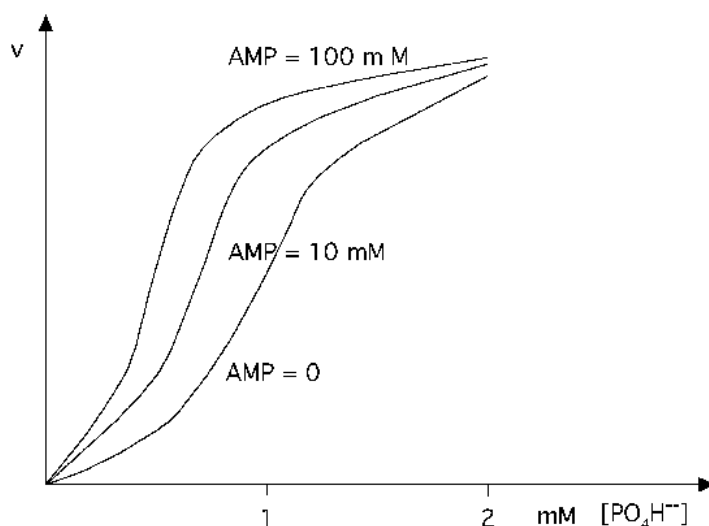
PPal, Phosphorylée \oplus 

EE 44/4

- Les glycogène phosphorylases sont des enzymes qui catalysent la première réaction de la glycogénolyse. Ce sont de grosses protéines d'une masse moléculaire de 500000 daltons.
- On les rencontre dans le cytoplasme des cellules contenant du glycogène (foie, muscles). La phosphorylase du foie est formée de 4 sous-unités, celle du muscle de 2 sous-unités.
- Elle catalyse la phosphorolyse de la liaison glycosidique α -1,4 qui unit le dernier glucose d'une branche au reste de la molécule de glycogène. Le glucose ainsi détaché reçoit le radical phosphoryl sur son Carbone 1, tandis que le glucose suivant récupère la fonction alcool secondaire sur son Carbone 4. La réaction est faiblement endergonique.
- La phosphorylation de l'enzyme (sur une Sérine) est indispensable pour que l'enzyme soit active.
- La glycogène phosphorylase du muscle est activée allostériquement par deux effecteurs : le phosphate, également substrat (effet homotrope) et l'AMP qui ne prend pas part à la réaction (effet hétérotrope). En outre, à l'état actif l'enzyme se dimérise, passant de 2 à 4 sous-unités par molécule.

6.18 Effet de l'AMP sur la glycogène phosphorylase

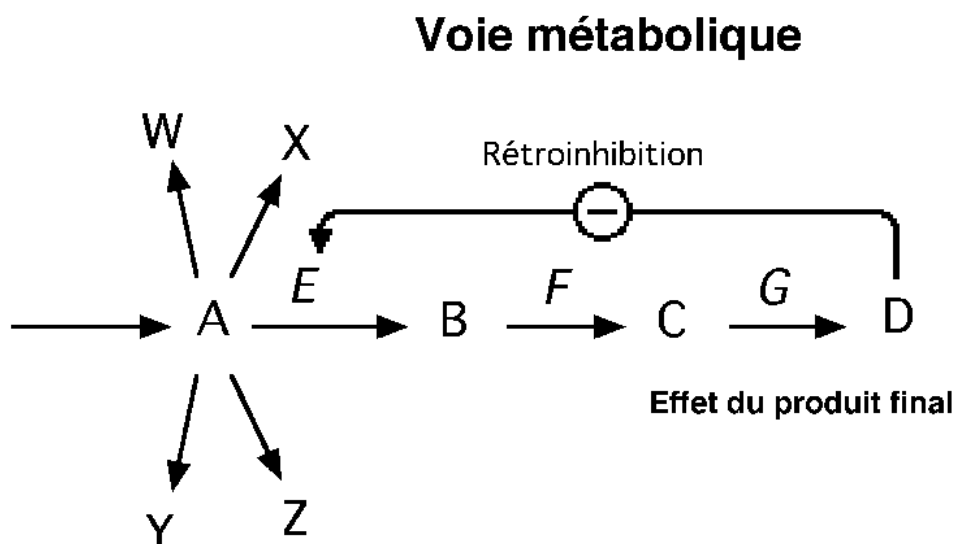
Régulation allostérique de la phosphorylase



EE 44/5

- Le graphe représente la vitesse de la réaction en fonction de la concentration du phosphate, qui est à la fois substrat et activateur allostérique.
- La courbe sigmoïde traduit un effet coopératif du phosphate sur les sous-unités, favorisant le passage à la forme relâchée, plus rapide : c'est un effet homotrope positif.
- L'adjonction de l'AMP dans le milieu à des doses croissantes (10 puis 100 mM) montre une activation de la réaction pour toutes les concentrations de phosphate. L'AMP, activateur allostérique, favorise également le passage des sous-unités à la forme relâchée.

6.19 Voie métabolique



EE 45

- Les réactions enzymatiques permettent à notre organisme de faire la synthèse des molécules biologiques dont il a besoin. Cette synthèse s'effectue à partir de composés simples souvent d'origine alimentaire. Un composé A par exemple peut être le substrat de réactions enzymatiques conduisant vers des synthèses variées. C'est un carrefour métabolique. Chacune de ces synthèses va se faire en plusieurs étapes (A, B, C, D,...) chacune catalysée par une enzyme spécifique (E, F, G,...).
- La vitesse de synthèse du dernier produit dépend de la vitesse de la plus lente de ces enzymes. Si ce produit final est en quantité insuffisante, il faut que cette enzyme soit activée. Si au contraire il y a une concentration élevée du produit D, il faut que cet enzyme soit inhibée.
- Il est souhaitable que les composés intermédiaires ne s'accumulent pas, donc que l'enzyme la plus lente, qui va être régulée, soit celle qui catalyse la première des réactions conduisant au produit final. Dans cet ensemble de réactions enzymatiques l'enzyme E, catalysant la transformation de A en B, première étape de la synthèse, est celle qui doit être régulée par des effecteurs qui permettront de contrôler la vitesse de l'ensemble. Par exemple, un excès de produit final peut aboutir à l'inhibition de cette première étape : c'est la **rétroinhibition**.

6.20 Voie métabolique

VOIE METABOLIQUE :

- **Ensemble de réactions métaboliques successives aboutissant à la production d'un composé biologique ayant une fonction indispensable pour l'organisme qui les réalise**

EE 46

- Cette unité de production cellulaire d'un composé biologique s'appelle une voie métabolique.
- Elle est constituée de plusieurs réactions catalysées par des enzymes diverses. Chacune de ces enzymes peut éventuellement participer à plusieurs voies métaboliques.
- Lorsque le métabolisme d'un composé implique un très grand nombre d'étapes, et plusieurs carrefours métaboliques, la synthèse totale constitue un ensemble de voies métaboliques successives.

6.21 Carrefour métabolique

CARREFOUR METABOLIQUE :

- **Corps chimique pouvant être le substrat de plusieurs enzymes appartenant à des voies métaboliques différentes**

EE 46/1

- Les intermédiaires métaboliques à partir desquels on peut entrer dans des voies métaboliques différentes sont les carrefours métaboliques.
- Toute voie métabolique commence par un substrat initial qui est un carrefour métabolique, un nutriment ou un aliment.
- Toute voie métabolique s'achève par un produit final qui est un carrefour métabolique ou un produit sécrété par la cellule.

6.22 Enzyme-clé

ENZYME-CLE :

- **Enzyme qui catalyse l'étape d'engagement dans une voie métabolique et qui contrôle la vitesse de cette voie**
- L'enzyme-clé est celle des enzymes d'une voie métabolique dont la vitesse de réaction est la plus lente

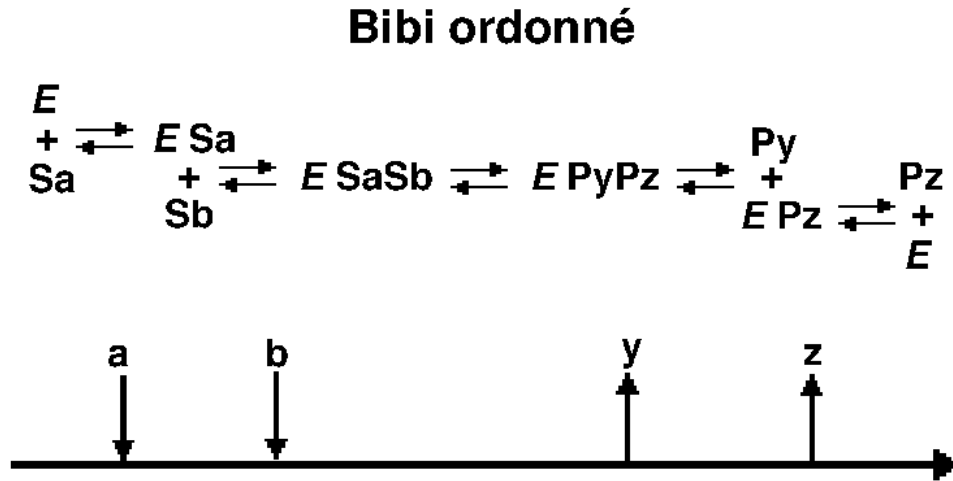
EE 47

- Dans une voie métabolique, celle des enzymes qui a la vitesse la plus lente et qui par conséquent contrôle la vitesse de la synthèse est appelée l'enzyme-clé.
- C'est habituellement la première des enzymes de la voie. Cette enzyme-clé est inhibée pour diminuer la synthèse du produit final de la voie métabolique ou au contraire activée pour l'augmenter. Les enzymes-clés sont toutes des enzymes allostériques contrôlées par de multiples effecteurs.

Chapitre 7

Cinétique à deux substrats

7.1 Mécanisme bibi ordonné



EE 48

- Lorsqu'une réaction enzymatique implique deux substrats ou un substrat et un coenzyme libre, les phases de la réaction enzymatique au niveau moléculaire se compliquent : on parle de cinétique à deux substrats.
- Pour certaines enzymes, il se forme d'abord un premier complexe entre le premier substrat et l'enzyme. Ce complexe Enzyme-Substrat A forme ensuite un complexe avec le second substrat : Enzyme-Substrat A-Substrat B. Ce complexe ternaire est alors transformé par l'action de l'enzyme en un complexe Enzyme-Produit Y-Produit Z qui se dissocie en libérant dans l'ordre le produit Y et le produit Z.
- L'enzyme libre n'ayant pas d'affinité pour le substrat B, le complexe ne peut pas se former dans un ordre différent : c'est ce qui justifie l'appellation bibi ordonné qu'on donne à ce mécanisme.

7.2 Exemple de bibi ordonné : l'alcool déshydrogénase

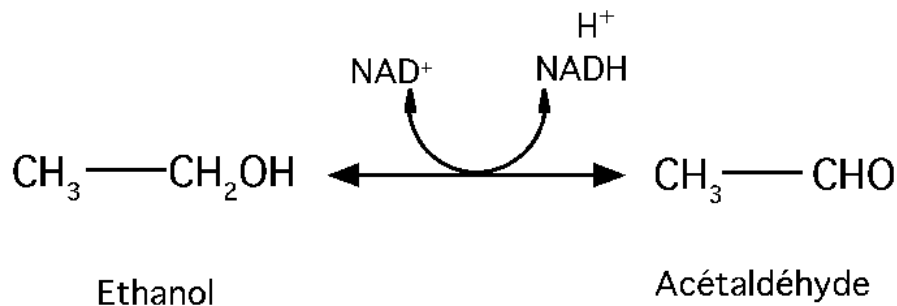
76000

2 sous-unités

Isoenzymes

1.1.1.1

Alcool déshydrogénase

Zn⁺⁺

EE 49

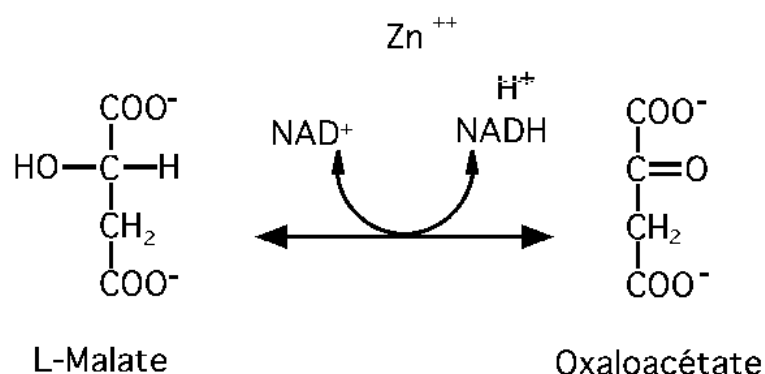
- L'alcool déshydrogénase est une enzyme qu'on trouve dans le cytoplasme de la plupart de nos cellules. Elle catalyse l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde en réduisant simultanément un coenzyme NAD^+ en NADH .
- Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour l'alcool si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD^+ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme- NAD^+ -Ethanol se transforme en un complexe Enzyme- NADH -Acétaldéhyde ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'acétaldéhyde puis le NAD réduit.
- De nombreuses autres déshydrogénases utilisant le NAD comme coenzyme suivent un mécanisme de type bibi ordonné.

7.3 Exemple de bibi ordonné : la malate déshydrogénase

62000
Isoenzymes

1.1.1.37

Malate déshydrogénase



EE 49/1

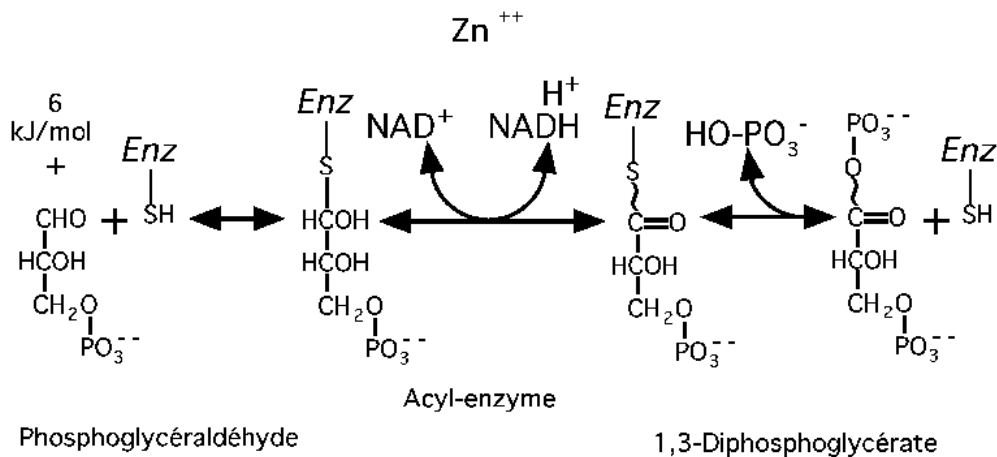
- La malate déshydrogénase est une enzyme qu'on trouve dans toutes les cellules. Elle catalyse l'oxydation du malate en oxaloacétate en réduisant simultanément un coenzyme NAD^+ en NADH .
- Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour le malate si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD^+ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme- NAD^+ -Malate se transforme en un complexe Enzyme- NADH -Oxaloacétate ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'oxaloacétate puis le NAD réduit.
- De nombreuses autres déshydrogénases utilisant le NAD comme coenzyme suivent un mécanisme de type bibi ordonné.

7.4 Exemple de bibi ordonné : la phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase

148000
4 sous-unités

1.2.1.12

Phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase



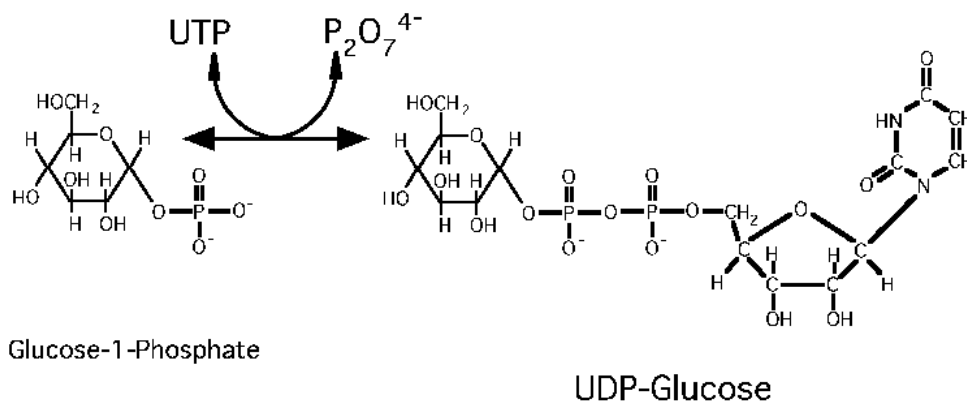
EE 49/2

- La phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase est une enzyme qu'on trouve dans toutes les cellules. Elle catalyse l'oxydation du phosphoglycéraldéhyde en 1,3-diphosphoglycérate en réduisant simultanément un coenzyme NAD^+ en $NADH$.
- Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour le phosphoglycéraldéhyde si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD^+ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme- NAD^+ -Phosphoglycéraldéhyde se transforme en un complexe Enzyme- $NADH$ -Diphosphoglycérate ; ce dernier complexe se dissocie en libérant le diphosphoglycérate puis le NAD réduit.
- De nombreuses autres déshydrogénases utilisant le NAD comme coenzyme suivent un mécanisme de type bibi ordonné.

7.5 Exemple de bibi ordonné : l'UDP-glucose pyrophosphorylase

2.7.7.9

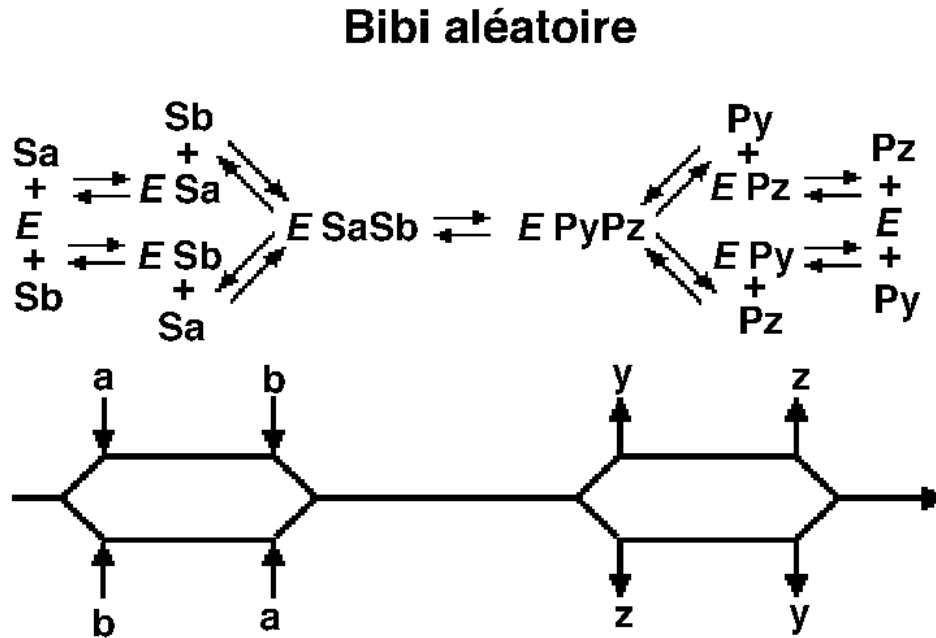
Glucose 1-phosphate uridyl transférase
= *UDP-Glucose Pyrophosphorylase*



EE 49/3

- L'UDP-Glucose pyrophosphorylase est une enzyme du foie et du muscle qui active le glucose-1-phosphate en transférant une molécule d'acide uridylique provenant de l'UTP. Le produit activé est appelé UDP-Glucose. Un pyrophosphate est libéré.
- Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour l'UTP si elle n'est pas préalablement associée au glucose-1-phosphate en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme-UTP-Glucose-1-phosphate se transforme en un complexe Enzyme-UDP-Glucose-Pyrophosphate ; ce dernier complexe se dissocie en libérant le pyrophosphate puis l'UDP-Glucose.

7.6 Mécanisme bibi aléatoire



EE 50

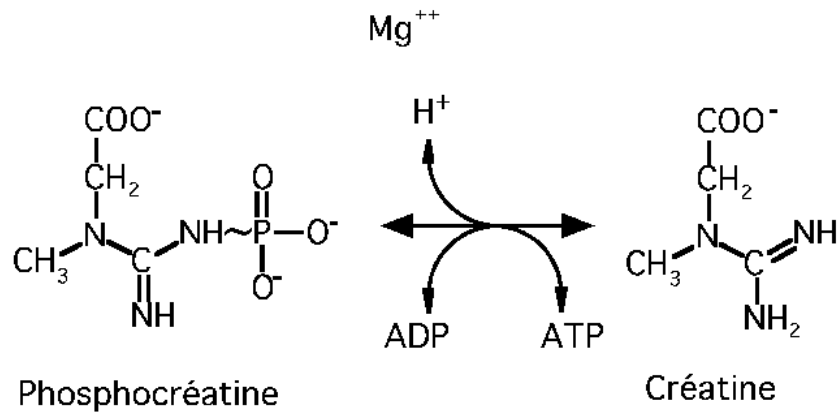
- D'autres enzymes à deux substrats sont capables de former le complexe Enzyme-Substrat A-Substrat B en fixant les deux substrats (ou coenzyme libre) l'un après l'autre mais sans ordre fixe : la probabilité de commencer par Enzyme-Substrat A ou par Enzyme-Substrat B ne dépendant que des affinités respectives de l'enzyme pour ces deux corps chimiques. C'est ce qui justifie l'appellation bibi aléatoire qu'on donne à ce mécanisme.

7.7 Exemple de bibi aléatoire : la créatine phosphokinase

84000
2 sous-unités
Isoenzymes

2.7.3.2

Créatine PhosphoKinase



EE 51

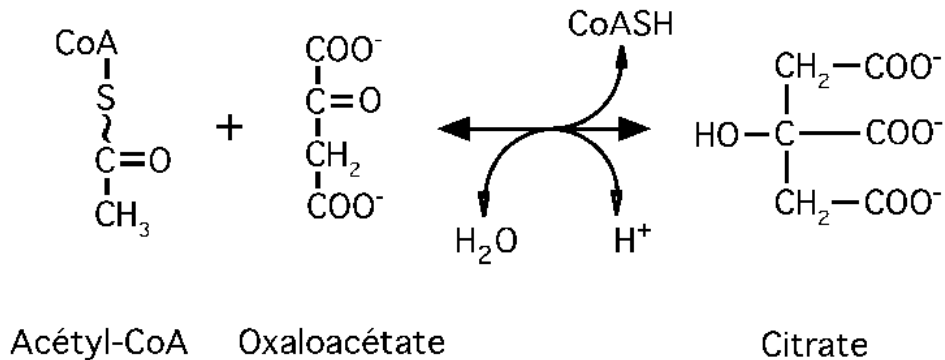
- La créatine phosphokinase (CPK) est une enzyme des muscles des Vertébrés. Elle catalyse le transfert d'un radical phosphoryl du substrat, le phosphate de créatine, vers un coenzyme transporteur, l'ADP.
- L'affinité de l'enzyme pour ces deux corps chimiques étant voisine, la liaison de l'enzyme avec chacun d'entre eux se fait dans un ordre qui dépend uniquement des concentrations.

7.8 Exemple de bibi aléatoire : la citrate synthase

98000
2 sous-unités

4.1.3.7

Citrate synthase

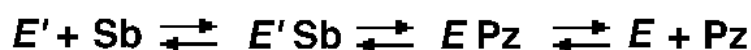


EE 51/1

- La citrate synthase est une enzyme des mitochondries. Elle catalyse le transfert d'un radical acétyl du premier substrat, l'acétate transporté par le coenzyme A vers l'autre substrat, l'oxaloacétate.
- L'affinité de l'enzyme pour ces deux corps chimiques étant voisine, la liaison de l'enzyme avec chacun d'entre eux se fait dans un ordre qui dépend uniquement des concentrations.

7.9 Mécanisme ping-pong

Ping-pong



EE 52

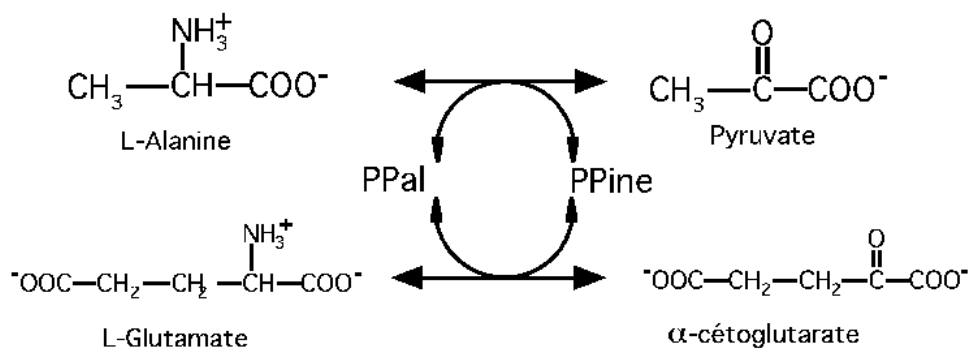
- Pour d'autres enzymes, la réaction sera catalysée en deux temps.
- Le complexe formé entre l'enzyme et le substrat A est transformé d'abord en enzyme + produit Y, mais l'enzyme E a été chimiquement modifiée en enzyme E' au cours de cette première partie de la réaction.
- L'enzyme E' ayant une affinité pour le deuxième substrat, va former un deuxième complexe Enzyme E'-Substrat B qui va être transformé en complexe Enzyme-Produit Z dans une seconde partie de la réaction où l'enzyme va retrouver sa forme chimique initiale.
- Il n'y a jamais de complexe ternaire dans un tel mécanisme, mais l'enzyme (ou un coenzyme lié à sa structure) subit une transformation réversible et provisoire qui permet le lien entre les deux substrats.
- C'est ce qui justifie l'appellation de ping-pong qu'on donne à ce mécanisme.

7.10 Exemple de ping-pong : l'alanine aminotransférase = ALAT

90000

2.6.1.2

Alanine aminotransférase = ALAT



EE 53

- L'ALAT catalyse le transfert de la fonction amine de l'alanine vers l' α -cétoglutarate qu'elle transforme en glutamate.
- Dans un premier temps, l'ALAT se lie à l'alanine puis transfère la fonction amine sur un coenzyme lié : le phosphate de pyridoxal qui devient phosphate de pyridoxamine sans cesser d'être lié à l'enzyme. L'enzyme se dissocie alors du pyruvate.
- Dans le second temps, l'enzyme liée au phosphate de pyridoxamine, forme un complexe avec l' α -cétoglutarate, puis transfère la fonction amine du coenzyme qui redevient phosphate de pyridoxal, vers le second substrat qui est transformé en glutamate. Enfin, le complexe ALAT-glutamate se dissocie : l'enzyme et son coenzyme lié ont recouvré leurs structures initiales.

7.11 Exemple de ping-pong : l'aspartate aminotransférase = ASAT

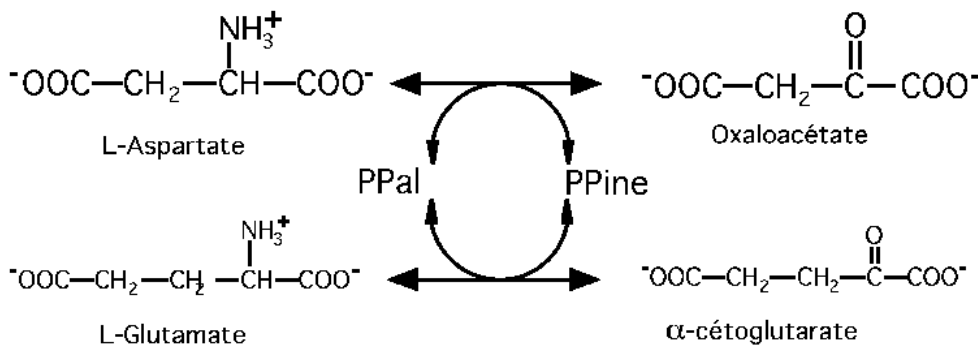
88000

2 sous-unités

Isoenzymes

2.6.1.1

Aspartate aminotransférase = ASAT



EE 53/1

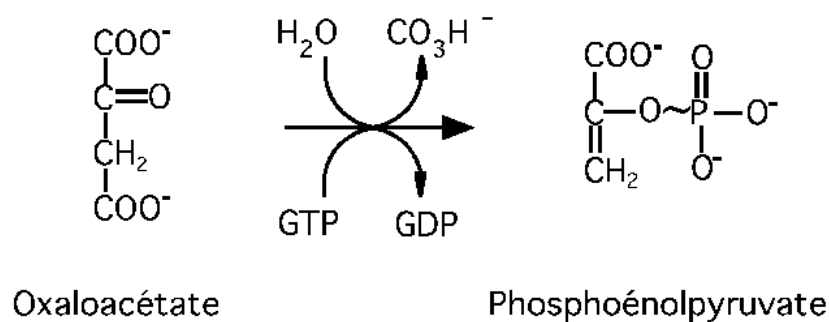
- L'ASAT catalyse le transfert de la fonction amine de l'aspartate vers l' α -cétoglutarate qu'elle transforme en glutamate.
- Dans un premier temps, l'ASAT se lie à l'aspartate puis transfère la fonction amine sur un coenzyme lié : le phosphate de pyridoxal qui devient phosphate de pyridoxamine sans cesser d'être lié à l'enzyme. L'enzyme se dissocie alors de l'oxaloacétate.
- Dans le second temps, l'enzyme liée au phosphate de pyridoxamine, forme un complexe avec l' α -cétoglutarate, puis transfère la fonction amine du coenzyme qui redevient phosphate de pyridoxal, vers le second substrat qui est transformé en glutamate. Enfin, le complexe ASAT-glutamate se dissocie : l'enzyme et son coenzyme lié ont recouvré leurs structures initiales.

7.12 Exemple de ping-pong : la phosphoénolpyruvate carboxykinase = PEPCK

4.1.1.32

Isoenzymes C, M

Phosphoénolpyruvate carboxykinase
= *PEPCK*

**EE 53/2**

- La PEPCK est une enzyme du foie ou du rein qui catalyse le transfert d'un radical phosphoryl du GTP vers l'oxaloacétate puis décarboxyle ce produit intermédiaire pour aboutir au phosphoénolpyruvate (PEP).
- Dans un premier temps, la PEPCK se lie au GTP puis transfère le radical phosphoryl sur un acide aminé du site actif. L'enzyme se dissocie alors du GDP.
- Dans le second temps, l'enzyme phosphorylée forme un complexe avec l'oxaloacétate, puis transfère le radical phosphoryl vers le substrat qui est phosphorylé et décarboxylé. Enfin, le complexe PEPCK-PEP se dissocie : l'enzyme a retrouvé sa structure initiale.

Partie III

Effet des constantes physiques

Rappel des objectifs

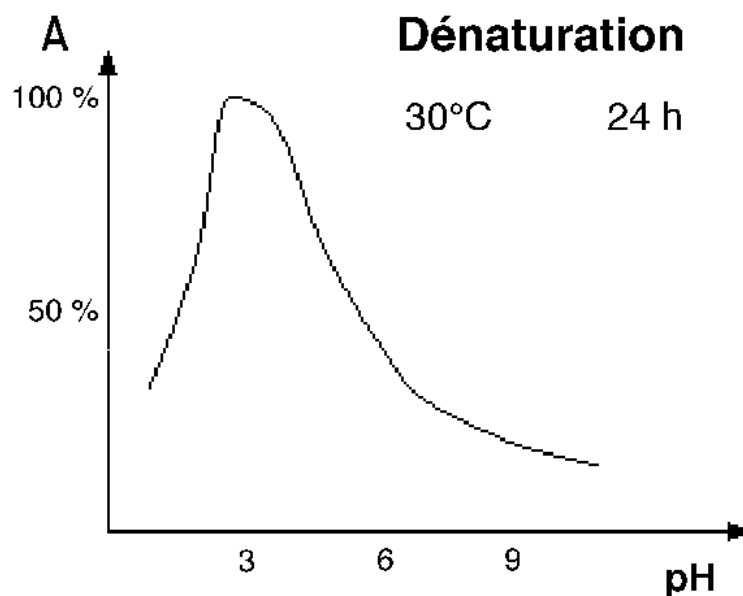
- Etudier¹ la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du pH ou de la température.
- Etudier les variations de l'énergie libre du complexe enzyme-substrat au cours des phases de la réaction enzymatique. Définir² l'énergie d'activation, la réaction enzymatique couplée et la liaison riche en énergie.

-
1. **Etudier** : suivre les valeurs d'une fonction pour toutes les valeurs de la variable.
 2. **Définir** : préciser dans une phrase concise l'essence d'un objet ou les limites d'un concept en excluant toute notion étrangère et en comprenant toutes les variations possibles de l'objet ou du concept cerné.

Chapitre 8

Effet du pH

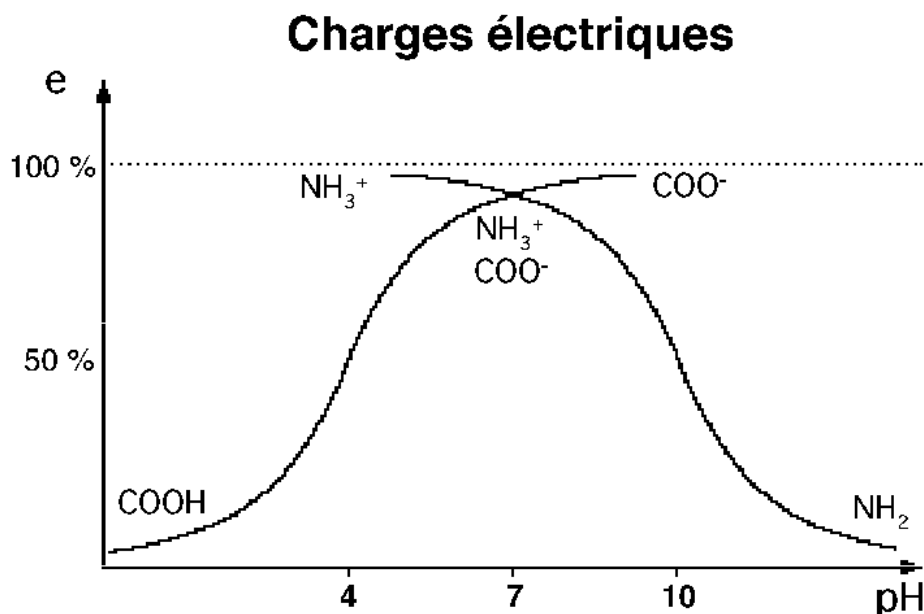
8.1 Dénaturation



EE 54

- L'enzyme, les substrats, les cofacteurs sont les corps chimiques qui interviennent obligatoirement dans la réaction enzymatique.
- Parmi les facteurs qui interviennent il y a aussi des facteurs physiques : le pH et la température par exemple. Le pH intervient de deux manières différentes : soit en modifiant la structure secondaire ou tertiaire de l'enzyme, soit en modifiant les charges électriques des radicaux des acides aminés du site actif.
- Lorsqu'une enzyme est conservée dans un milieu dont le pH est défavorable au maintien de sa structure, elle va subir une dénaturation.
- Examinons cet effet sur un graphe représentant l'activité résiduelle d'une enzyme qui a été conservée pendant 24 heures à une température de 30°C., en fonction du pH de ce milieu de conservation.
- A pH 3 cette enzyme a été conservée dans des conditions optimales et son activité résiduelle est la plus grande : 100%. A pH 6 l'enzyme a subi une dénaturation partielle si bien qu'au bout de 24 heures son activité n'est plus que de la moitié de ce qu'elle aurait été si on l'avait conservée à pH 3. A pH 9 ou bien en dessous de pH 3, cet effet dénaturant est encore plus marqué.

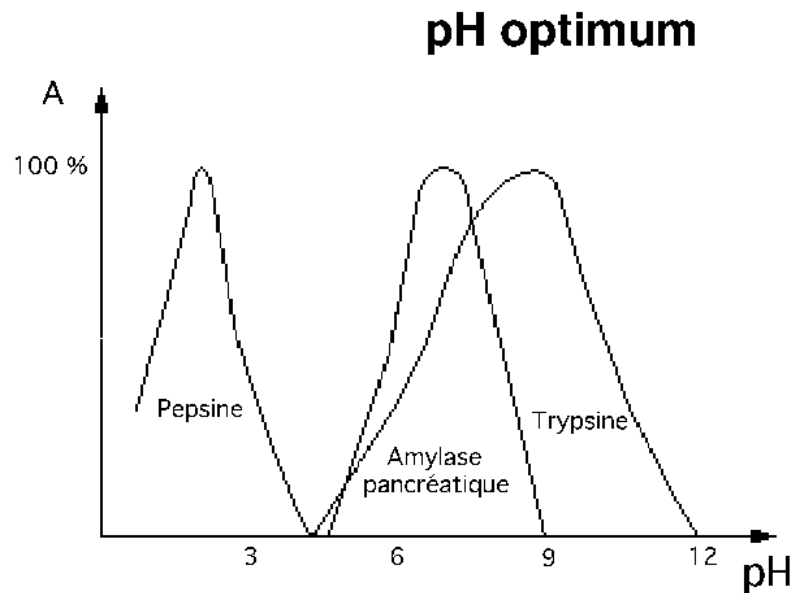
8.2 Charges électriques



EE 55

- Le milieu dans lequel se produit la réaction enzymatique détermine la charge électrique des radicaux des acides aminés de la protéine.
- Aux pH très acides la plupart des fonctions ionisables de ces radicaux sont sous la forme protonée c'est à dire COOH pour la fonction acide carboxylique et NH₃⁺ pour la fonction amine.
- Aux pH les plus alcalins les fonctions ionisables de ces mêmes radicaux sont sous la forme déprotonée c'est à dire COO⁻ pour la fonction acide carboxylique, et NH₂ pour la fonction amine.
- A pH voisin de la neutralité, une très grande majorité de ces radicaux à fonctions ionisables sont chargés ce qui facilite les liaisons enzyme-substrat ou enzyme-coenzyme de type électrostatique.
- Il existe donc un pH du milieu réactionnel où les charges électriques des radicaux du site actif de l'enzyme seront les plus favorables à la liaison enzyme-substrat : on appelle ce pH le **pH optimum** de la réaction enzymatique.

8.3 pH optimum



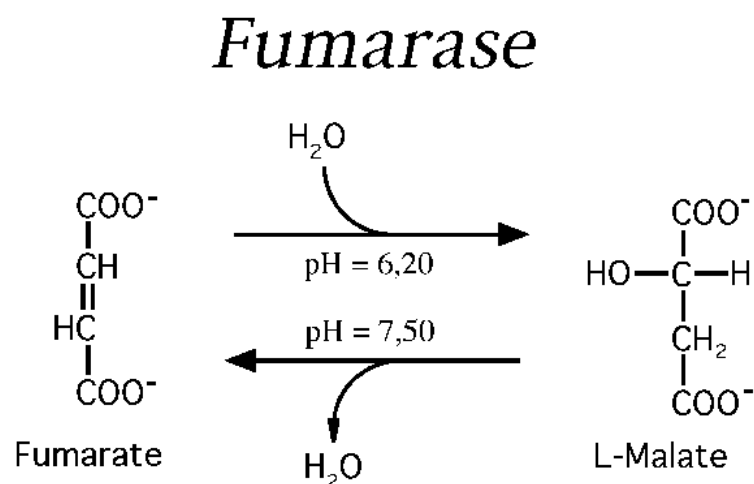
EE 56

- Les enzymes de la digestion des protéines ont des pH optimums différents pour s'adapter aux conditions de pH qui règnent dans la lumière aux différents étages du tube digestif. Ainsi l'activité de la pepsine est maximum pour un milieu très acide comme celui de l'estomac où elle est sécrétée. Au contraire les enzymes pancréatiques comme l'amylase et la trypsine, ont un pH optimum d'action plus alcalin car dans le duodénum où elles exercent leur activité le pH est normalement proche de 8.

8.4 Exemple de pH optimum : la fumarase

220000
4 sous-unités

4.2.1.2



EE 57

- La fumarase est une enzyme des mitochondries qui catalyse la transformation réversible du fumarate en malate.
- Le pH de la matrice mitochondriale où se trouve cette activité enzymatique, varie en fonction des circonstances physiologiques.
- Le pH optimum de l'enzyme est différent pour la réaction avec le fumarate comme substrat (6,20) ou pour la réaction inverse avec le malate (7,50).
- De sorte que lorsque le pH de la mitochondrie est bas (acidose) l'enzyme favorisera la transformation du fumarate en malate.
- Le pH agit donc ici comme un effecteur de la réaction.

8.5 Exemple de pH optimum : la lactate déshydrogénase

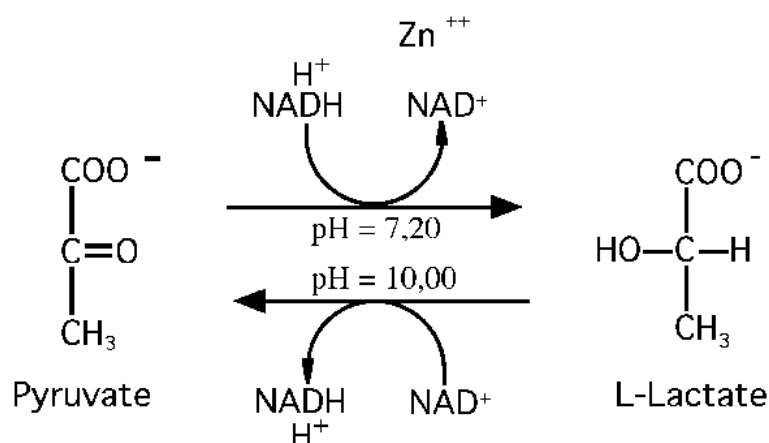
140000

4 sous-unités

Isoenzymes

1.1.1.27

Lactate déshydrogénase



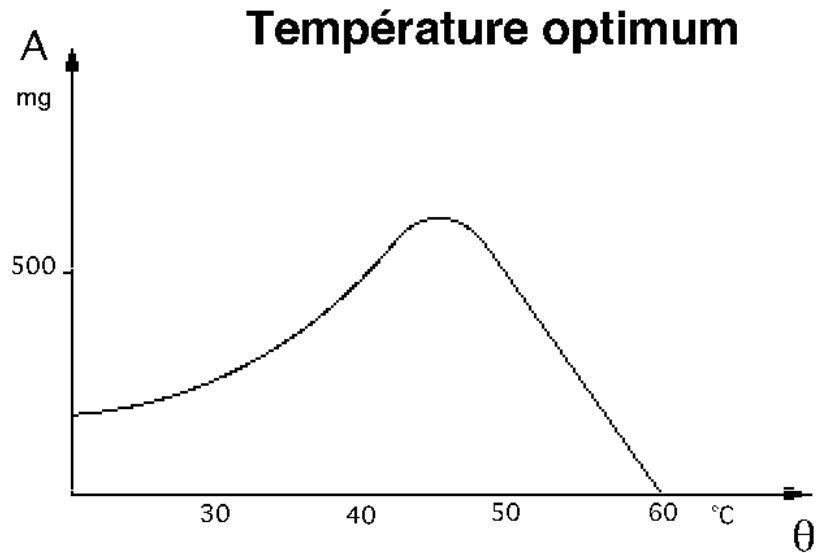
EE 57/1

- La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme du cytoplasme qui catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate.
- Le pH du cytoplasme de la cellule varie en fonction des circonstances physiologiques.
- Le pH optimum de l'enzyme est différent pour la réaction avec le pyruvate comme substrat (7,20) ou pour la réaction inverse avec le lactate (10,00).
- De sorte que lorsque le pH du cytoplasme est bas (acidose) l'enzyme favorisera la transformation du pyruvate en lactate.
- Le pH agit donc ici comme un effecteur de la réaction.

Chapitre 9

Effet de la température

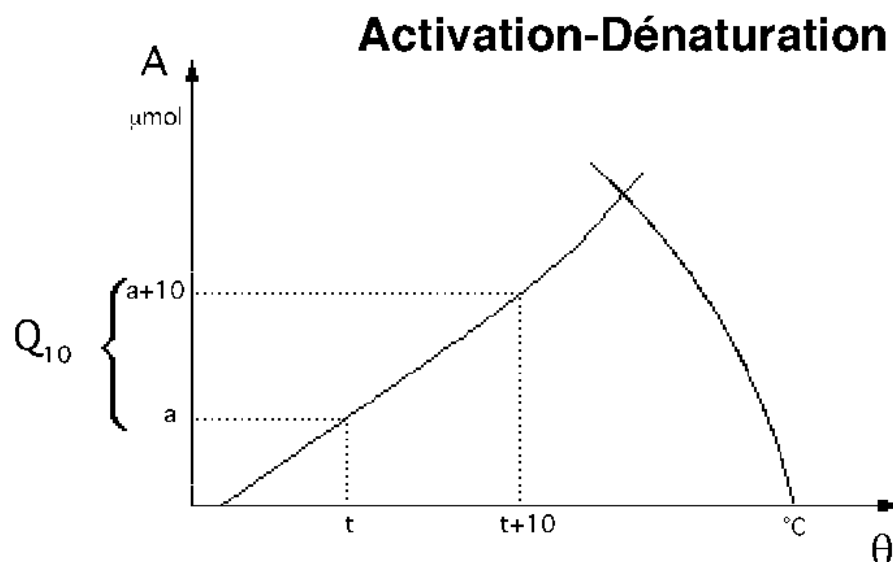
9.1 Température optimum



EE 58

- Examinons maintenant l'effet de la température du milieu sur la réaction enzymatique qui s'y déroule.
- Le graphe qui représente les quantités de produit transformées par une enzyme (A) en fonction de la température (θ) du milieu d'incubation, est une courbe ascendante jusqu'à une température (ici 45°C.) où l'activité de l'enzyme est la plus grande, puis rapidement descendante.

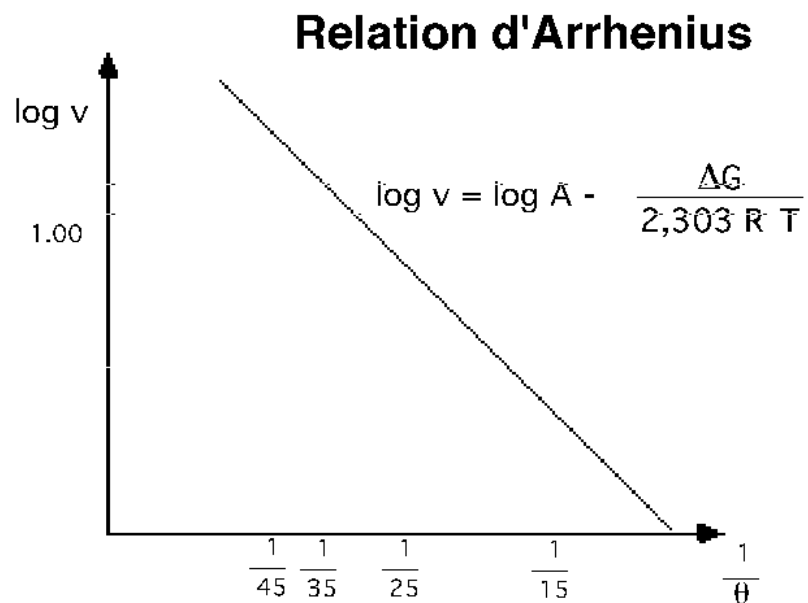
9.2 Activation ; dénaturation



EE 59

- Ce type de courbe est la somme de deux effets superposés de la température sur la vitesse de la réaction enzymatique.
- Au dessus de 40 ou 45 $^{\circ}\text{C}$. la chaleur dénature les structures secondaires et tertiaires de l'enzyme et l'activité tend rapidement vers zéro.
- Pour les températures inférieures, la chaleur du milieu apporte un supplément d'énergie qui facilite la réaction enzymatique.
- Pour mesurer cet effet de la température sur l'activité de l'enzyme on compare l'activité de l'enzyme pour une température t avec l'activité pour une température $t + 10^{\circ}\text{C}$.. Cette différence d'activité appelée Q_{10} est le paramètre permettant de mesurer l'activation de l'enzyme par la chaleur.

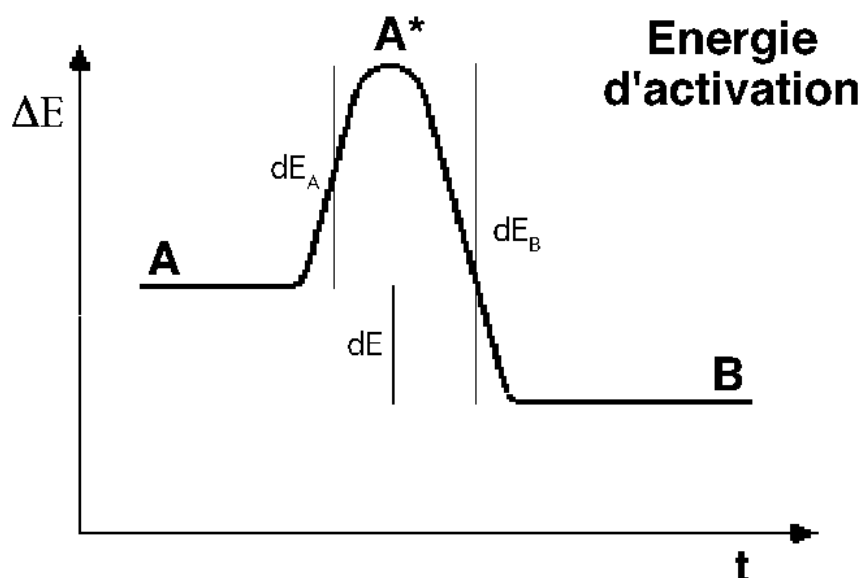
9.3 Relation d'Arrhenius



EE 60

- La vitesse de réaction pour les températures non dénaturantes (ici en dessous de 45°C.) est reliée à la température par la relation d'Arrhenius qui montre que le logarithme de cette vitesse est inversement proportionnel à l'inverse de cette température.

9.4 Energie d'activation



EE 61

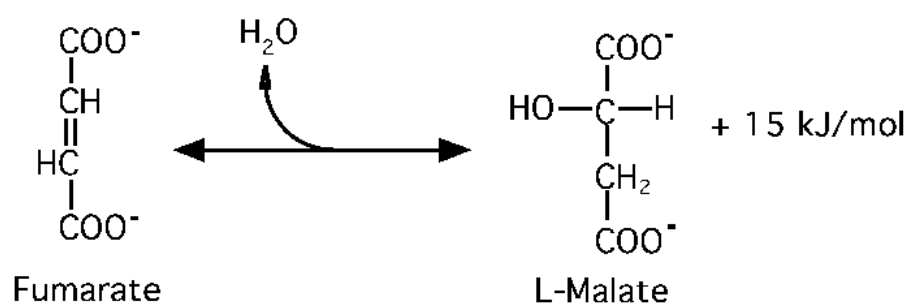
- Au cours de la réaction enzymatique les corps en présence, enzyme, substrats, cofacteurs, etc... échangent donc de la chaleur avec les autres molécules de ce milieu : on dit qu'il y a échange d'énergie libre entre le complexe enzyme-substrat et le milieu.
- On représente sur un graphe l'énergie interne de ce complexe en fonction du temps au cours des phases de la réaction, dans l'hypothèse où l'énergie interne du complexe enzyme substrat (A) est supérieure à celle du complexe enzyme-produit (B) ce qui revient à dire que la réaction libèrera en fin de compte de la chaleur dans le milieu.
- Pour que cette réaction soit possible, le complexe enzyme-substrat va d'abord recevoir du milieu une quantité de chaleur (dE_A énergie d'activation) qui portera ce complexe à un état activé (A^*) où la réaction va pouvoir se produire en libérant dans le milieu une quantité de chaleur (dE_B) égale à l'énergie d'activation (dE_A) augmentée de la chaleur de la réaction proprement dite (dE).

9.5 Exemple d'énergie d'activation : la fumarase

220000
4 sous-unités

4.2.1.2

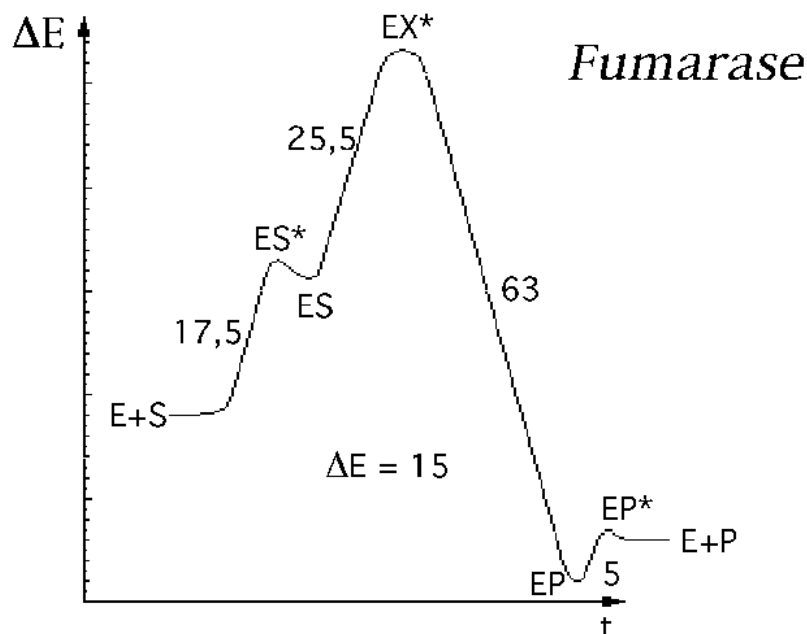
Fumarase



EE 62

- Reprenons l'exemple de la fumarase qui dans certaines conditions de milieu catalyse une réaction où la production de malate s'accompagne d'une libération de chaleur dans le milieu de 15 kJ/mol.

9.6 Energie interne de la fumarase



EE 62/1

- Suivons donc l'évolution de l'énergie interne des complexes au cours de l'action de cette enzyme.
- L'enzyme et le substrat libre au début possèdent ensemble une énergie interne $E + S$.
- Le milieu va communiquer à ces molécules une énergie cinétique de 17,5 kJ/mol pour que la collision d'une molécule de substrat sur l'enzyme soit assez forte pour faire entrer le fumarate dans la cavité du site de fixation (ES^*). Le complexe enzyme-substrat ainsi formé va recevoir ensuite du milieu une énergie d'activation (25,5 kJ/mol) qui va le porter à un état activé (EX^*) qui permettra l'addition d'une molécule d'eau sur la double liaison.
- Dès que cette réaction est faite, une énergie de 63 kJ/mol est libérée dans le milieu.
- Le complexe enzyme-produit (EP) devra être encore réactivé par le milieu (5 kJ/mol = EP^*) pour arracher la molécule de malate à la cavité du site actif.
- A l'état final, libres dans le milieu, la fumarase et le malate ($E + P$), ont ensemble une énergie interne inférieure de 15 kJ/mol à l'énergie interne du substrat et de l'enzyme au départ de la réaction.

9.7 Energie d'activation

ENERGIE D'ACTIVATION :

- **Energie libre moyenne qu'une molécule de complexe Enzyme-Substrat doit recevoir du milieu environnant pour que la réaction se produise à une vitesse donnée**
- **La vitesse de la réaction sera proportionnelle à l'énergie captée par le système**

EE 64

- L'énergie transmise au complexe Enzyme-Substrat par la température du milieu est répartie statistiquement entre les molécules du complexe qui y sont dissoutes.
- Plus la quantité d'énergie ainsi transmise est grande, plus nombreux seront les complexes Enzyme-Substrat activés où la réaction enzymatique va se produire.
- La vitesse de réaction va donc augmenter en fonction de l'énergie libre que le complexe peut recevoir du milieu.
- La présence de l'enzyme a pour effet de diminuer de façon très importante l'énergie d'activation d'une réaction chimique.

9.8 Réaction couplée

Réaction couplée



EE 65

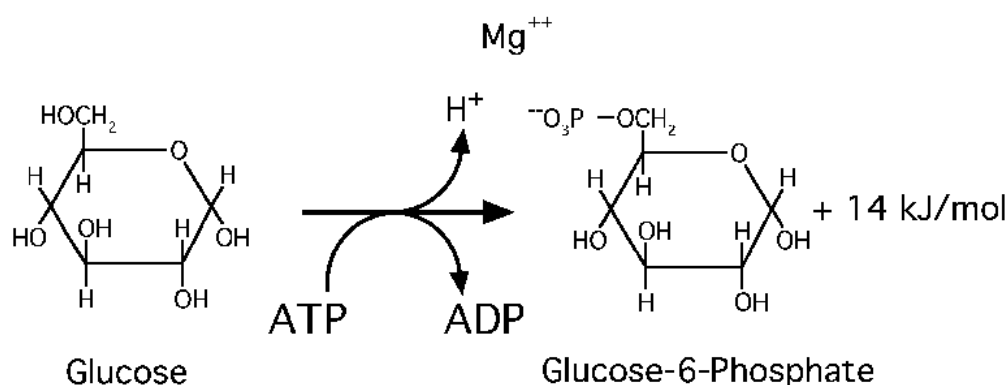
- Une réaction A donne Y qui libère dans le milieu plus d'énergie qu'elle n'en a reçue est dite exergonique. Cette réaction est thermodynamiquement possible.
- Une réaction B donne Z qui reçoit du milieu ambiant plus d'énergie qu'elle n'en libère est dite endergonique. Une telle réaction est thermodynamiquement improbable voire impossible.
- Une même enzyme peut catalyser les deux réactions en utilisant l'énergie produite par la première pour permettre à la seconde d'avoir lieu.
- De telle sorte que les deux substrats A et B donnent les deux produits Y et Z en libérant une petite quantité d'énergie libre égale à la différence de l'énergie produite et consommée par les deux réactions isolément.
- Un tel mécanisme s'appelle une réaction couplée.

9.9 Exemple de réaction couplée : l'hexokinase

90000
Isoenzymes

2.7.1.1

Hexokinase



EE 66

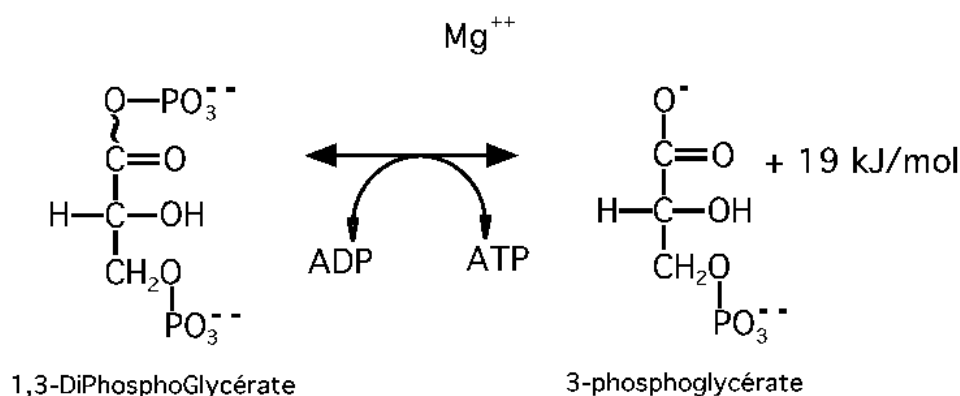
- L'hexokinase est une enzyme de la membrane plasmique de toutes nos cellules.
- Elle catalyse d'une part la réaction très exergonique de transformation du coenzyme ATP en ADP, qui libère 31 kJ/mol.
- Elle catalyse en même temps la réaction endergonique de phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate, qui consomme 16 kJ/mol.
- En effectuant ces deux réactions en une seule réaction couplée, l'hexokinase réalise une réaction exergonique de 14 kJ/mol.

9.10 Exemple de réaction couplée : la phosphoglycérate kinase

50000

2.7.2.3

Phosphoglycérate kinase

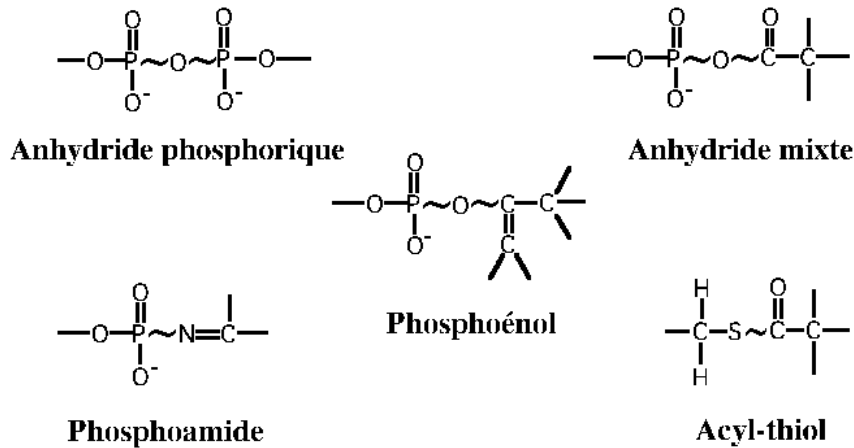


EE 66/1

- La phosphoglycérate kinase est une enzyme du cytoplasme de toutes nos cellules.
- Elle catalyse d'une part la réaction très exergonique d'hydrolyse de la liaison de l'acide phosphorique avec la fonction acide du glycérate, qui libère 50 kJ/mol.
- Elle catalyse en même temps la réaction endergonique de phosphorylation du coenzyme ADP en ATP, qui consomme 31 kJ/mol.
- En effectuant ces deux réactions en une seule réaction couplée, la phosphoglycérate kinase réalise une réaction exergonique de 19 kJ/mol.

9.11 Liaisons riches en énergie

Liaisons riches en énergie



EE 67

- Ces réactions couplées sont surtout possibles grâce à des substrats énergétiques dont l'hydrolyse libère une grande quantité d'énergie, directement utilisable par les protéines de la cellule.
- Le coenzyme ATP en est un exemple.
- Dans ces molécules les liaisons chimiques dont l'hydrolyse libère plus de 31 kJ/mol d'énergie biologiquement utilisable, sont appelées liaisons riches en énergie et symbolisées dans la formule développée par une liaison de forme ondulée (~).
- Ces liaisons peuvent être des liaisons anhydrides entre 2 acides phosphoriques ou anhydrides mixtes entre un acide phosphorique et un acide carboxylique, des liaisons phosphoamides, phosphoénol ou encore des thioesters.

9.12 Liaison riche en énergie

Liaison riche en énergie

- **Liaison chimique dont la rupture au cours d'une réaction enzymatique s'accompagne d'une libération d'énergie interne supérieure à 31 kilojoules par mole.**

EE 67/1

- Un composé riche en énergie est un métabolite capable de subir une réaction dans un environnement physiologique (cellule, réaction enzymatique...) avec une large diminution d'énergie libre : $\Delta G < 0$.
- Les composés riches en énergie sont des substrats de réactions couplées au cours desquelles l'énergie libre reçue par l'enzyme au cours de la rupture d'une liaison spécifique de ce substrat (la liaison riche en énergie), est utilisée pour permettre une synthèse sur un autre substrat.
- La limite inférieure d'énergie incluse dans cette définition est celle de l'hydrolyse (ou de la synthèse) de la liaison anhydride d'acide entre les phosphates β et γ de l'ATP, coenzyme habituel du transport d'énergie dans la cellule.
- Une liaison dont la rupture libère de l'énergie sans que cette énergie puisse être réutilisée par le métabolisme, n'est pas considérée comme une liaison riche en énergie.