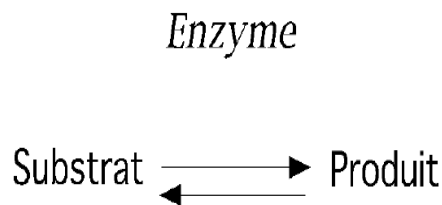


## Rappel sur l'enzymologie

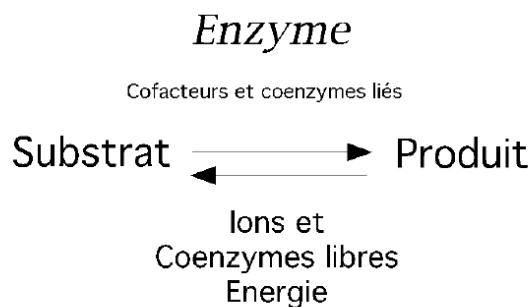
### 1- Propriétés des enzymes

#### a. L'enzyme

- Toutes les enzymes sont des protéines;
- Les enzymes sont **des « bio » catalyseurs** de réactions ;
- 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. La formulation réactionnelle :



Ou avec cofacteur



**Substrat de l'enzyme** : Molecule qui entre dans une réaction pour y être transformé grace à l'action catalytique d'une reaction. Toutes les molecules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement modifiées sont appelées substrats.

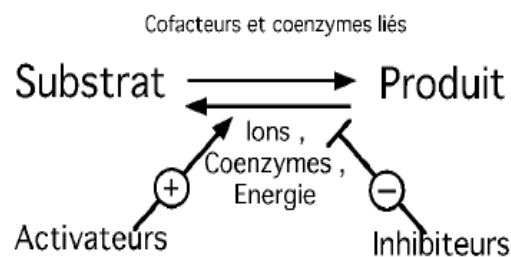
**Produit** : Molécules produite au cours d'une réaction catalysée par une enzyme. Produit résultat de la catalyse.

**Cofacteur** : appelé aussi effecteur positif, sont des atomes (exemple des métaux Mg, Zn, Mn, Fe...) ou des molécules (non protéique : NAD, FAD, CoA) qui interviennent dans la réaction enzymatique comme activateur, 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.

Les coenzymes sont également des cofacteurs que l'on peut qualifier de «biologique».

**Inhibiteur** : appelé également effecteur négatif et comme son nom l'indique, il s'agit d'atome ou de molécule pouvant inhiber la réaction catalytique. Son action peut se situer sur l'enzyme comme sur son substrat.



Les principaux inhibiteurs sont :

- Les inhibiteurs irréversibles : liaison covalente avec un des acides aminés du site actif
- Les inhibiteurs réversibles compétitifs : analogie structurale – mais pas de catalyse
- Les inhibiteurs réversibles non compétitifs : pas d'analogie structurale – mais se fixe sur d'autre site de l'enzyme spécifique à cet inhibiteur
- Des inhibiteurs à effets mixtes : pas d'analogie mais se fixe sur des sites spécifiques au niveau de l'enzyme

**Le site actif** : L'association de l'enzyme avec son réactif, nommé **substrat**, se produit dans une région bien précise de l'enzyme, nommée **site actif**. Celui-ci correspond à un repliement spatial de la protéine montrant une **complémentarité spatiale** avec le substrat. Ce site actif est constitué :

-Un **site de fixation ou site de reconnaissance**, fixant le substrat. Les groupements entre substrat et enzyme établissent des liaisons faibles (liaison hydrogènes, hydrophobes et ioniques) maintenant un contact étroit.

Le substrat est complémentaire au site actif de l'enzyme.

La fixation du substrat à ce site va induire un léger changement de conformation du site actif qui devient apte à catalyser la réaction. Cette reconnaissance dynamique est nommée **adaptation induite** ;

-Un **site catalytique**, n'exécutant qu'un seul type de transformation du substrat en produit.

**La Fixation protéines-ligand** : La liaison protéines-ligand est à la base de l'étude des interactions de l'enzyme avec son substrat, et par conséquent la formation du complexe « E-S : enzyme-substrat ». Ce modèle implique que l'enzyme ne se lie à un substrat qu'au niveau d'un seul site, dit site actif, et que ce dernier n'accepte qu'un substrat spécifique, comme une serrure qui ne peut fonctionner qu'avec sa propre clé.

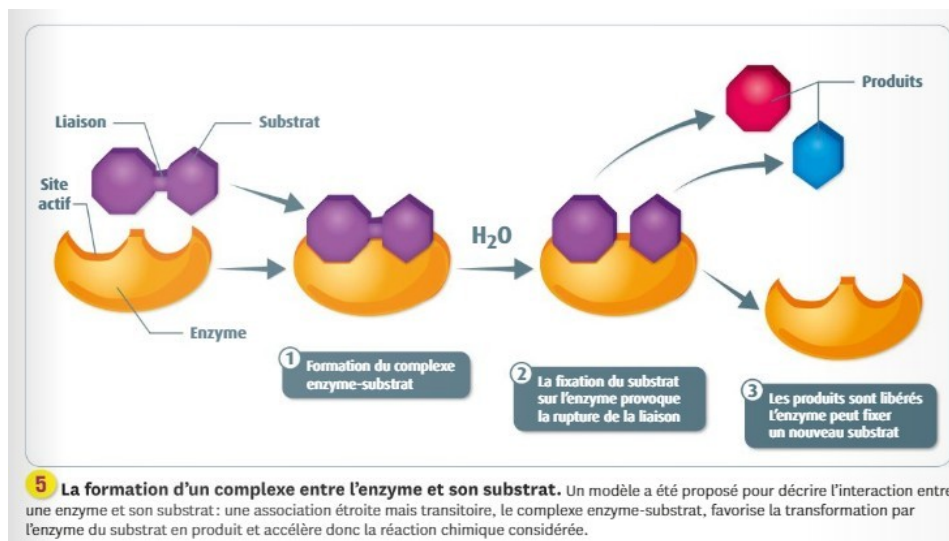


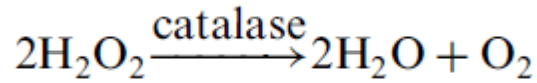
Figure 01 : la catalyse enzymatique

## La catalyse enzymatique

**Définition de La catalyse** : Un catalyseur agit à de très faibles concentrations, il augmente la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat.

Dans le cas de l'enzyme, à la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée et peut reprendre à nouveau une nouvelle catalyse.

*Exemple* : La réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est accélérée **10 fois** par l'intervention de la catalase.



Les propriétés catalytiques des enzymes dues aux caractéristiques d'un site dit actif au sein de la structure tridimensionnelle.

Le site actif étant constitué d'acides amines polaires à forte réactivité pouvant s'ioniser dans des conditions particulière formant des anions ou cations. Ces derniers peuvent alors participer à de fortes interactions électrostatiques avec des groupes de charge opposée appartenant au substrat.

### **a-1 La sélectivité de l'action enzymatique**

Un des avantages majeurs de l'utilisation des enzymes dans la catalyse est leur sélectivité. Les principaux types de sélectivités sont :

- **Chimio-sélectivité ;**

Spécificité liée au type de liaison, groupements fonctionnels présent sur la molécule, ex : protéases qui coupent les liaisons peptidiques NH-CO et séparent les acides amines

- **Regioselectivite ;**

Ex : trypsine coupe après une acide amine basique, chymotrypsine après une acide amine aromatique

- **Stereoselectivite ;**

Ex : L-amino-oxydase ou D-amino-oxydase,  $\alpha$  ou  $\beta$ -galactosidase, furamase qui réagit sur le furamate en configuration E pour donner du malate...

### **a-2 La classification des enzymes :**

1. **Les oxydoréductases** catalysent les réactions d'oxydoréduction. La plupart de ces enzymes sont connus sous le nom de déshydrogénases, mais certains d'entre eux sont appelés oxydases, peroxydases, oxygénases ou réductases.

2. **Les transférases** catalysent les réactions de transfert de groupes moléculaires d'une molécule à une autre. Cette classe inclut les kinases.

3. **Les hydrolases** catalysent les clivages hydrolytiques.

4. **Les lyases** catalysent les réactions d'élimination d'un substrat, non hydrolytique et non oxydative, ou lyse, avec création d'une double liaison. Dans le sens inverse, les lyases catalysent l'addition d'un substrat a une double liaison d'un second substrat ; une lyase qui catalyse une réaction d'addition dans les cellules est souvent appelée synthase.

5. **Les isomérases** catalysent les réactions d'isomérisation ou les réarrangements intramoléculaires.

6. **Les ligases** catalysent les réactions de ligation au cours desquelles deux molécules sont unies. Ces réactions nécessitent un apport d'énergie chimique, le plus souvent sous forme d'ATP. Les ligases sont aussi dénommées synthétases. Chaque enzyme a un numéro de code qui permet d'identifier.

### **a-3 Les Facteurs d'influence de la catalyse**

Facteurs intrinsèque à la réaction : lies aux protagonistes de la catalyse

- a. Intégrité de l'enzyme
- b. Concentration de l'enzyme
- c. Activation de l'enzyme
- d. Intégrité du Substrat
- e. Concentration

Facteurs extrinsèque : lies à l'environnement réactionnel tel l'action des agents physiques

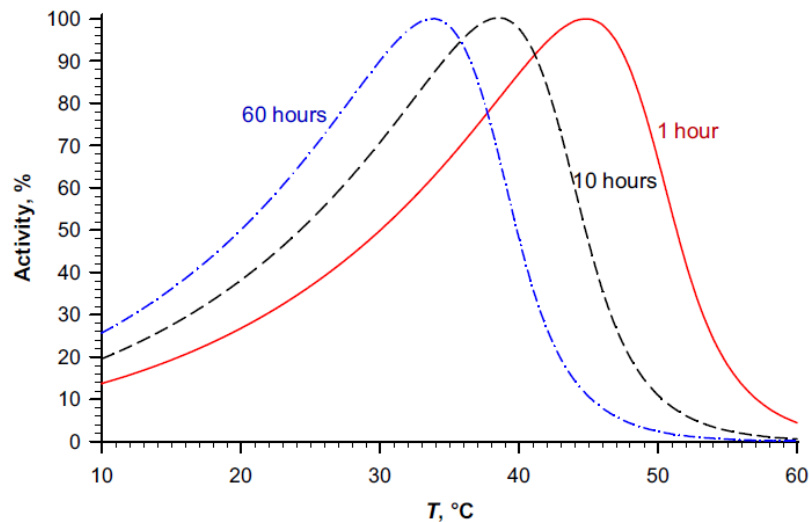
#### **1. pH**

L'action du pH se situe et se traduit par la modification de :

- la Conformation de la protéine enzymatique
- la Disponibilité des fonctions chimiques de l'enzyme et / ou du substrat (le substrat réel doit être sous une certaine forme, qui n'est pas nécessairement la forme de la neutralité).-
- Il est admit qu'à 2 unités du pH optimum, l'activité de l'enzyme est réduite de 100 fois.

#### **2- Effet de la température**

**Activité et Dénaturation** : l'activité de l'enzyme augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à un certain seuil. La température de dénaturation peut varier, mais seules quelques exceptions s'éloignent vraiment de la gamme 40 - 60 °C (protéines thermostables).

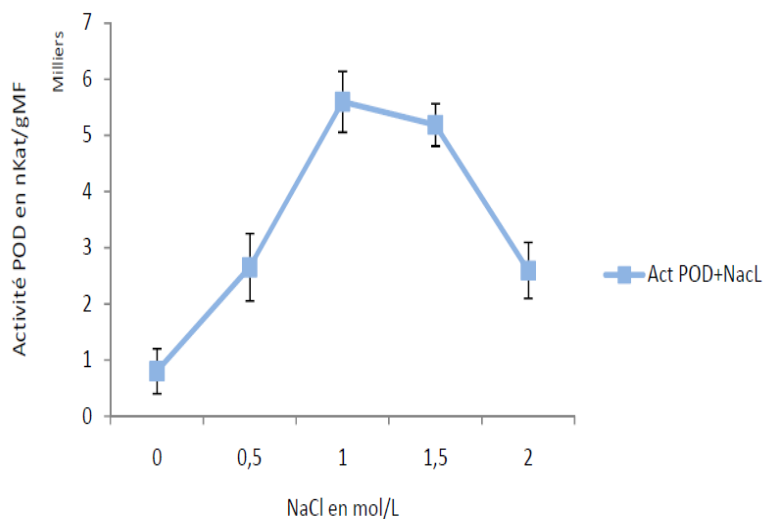


**Figure 02** : L'effet de la température et de la durée d'exposition sur l'activité enzymatique

La figure présente l'effet de la température et de la durée d'exposition sur l'activité enzymatique. L'allure ascendante traduit l'activation alors que l'allure descendante informe de la température de dénaturation.

### 3. Influence de la force ionique du milieu

En présence d'eau dans différentes conditions de pH et de force ionique, la solubilité des composés peut varier (diminuer ou augmenter leur affinité envers la phase aqueuse).



**Figure 03** : L'activité enzymatique en fonction de la force ionique du milieu.

#### ❖ L'Allostérie

L'allostérie désigne une variation de conformation de protéines sous l'effet de la fixation d'un substrat ou d'une molécule effectrice, d'où l'acquisition de propriétés particulières

(changement d'activité.) On décrit cela comme des effets coopératifs. Ceux ci sont concevables si et seulement si la macromolécule est sous forme oligomérique.

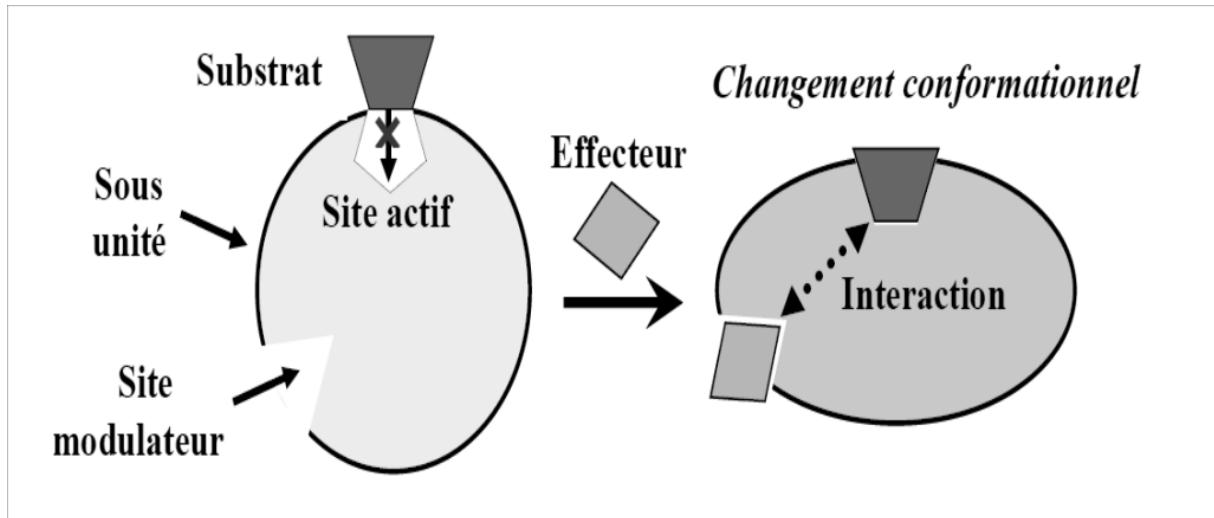


Figure 04 : L'allostérie

## 2. Cinétique enzymatique à un seul substrat

La réaction enzymatique peut se diviser en 3 étapes :

- La **formation du complexe ES** : l'enzyme (E) et le substrat (S) s'associent ;
- Le complexe ES subit un **réarrangement interne** qui va permettre la transformation du substrat en produit (P) ;
- L'enzyme libère le **produit**, et retrouve son état initial (et, peut donc repartir dans une nouvelle réaction enzymatique).

La cinétique enzymatique traduit l'activité enzymatique. Celle-ci peut se diviser en **trois phases**. Pour les distinguer, on met une quantité donnée d'enzyme (E) en présence d'un excès de substrat (S) (concentration en substrat **saturante**, condition **non limitant**), puis on mesure la quantité de produit (P) formé en fonction du temps.

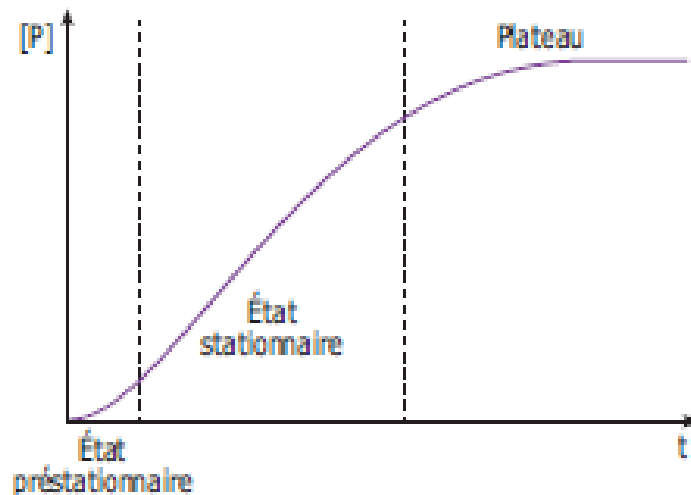


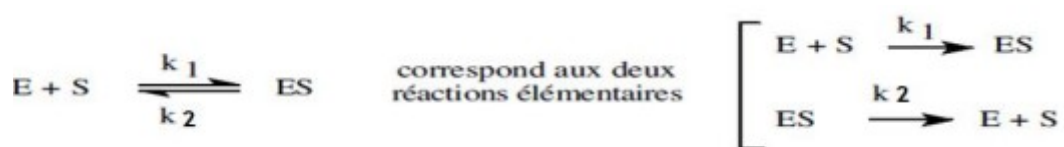
Figure 05 : La cinétique enzymatique

En 1902, Victor Henri suggère que dans la réaction enzymatique, l'hypothèse de la formation d'un complexe enzyme substrat était nécessaire pour interpréter la forme hyperbolique de la courbe vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat, les autres paramètres étant constants (concentration enzyme, température, pH, pression..).

L'hypothèse de Mickaelis-Menten: Le modèle de base de la cinétique enzymatique s'écrit ainsi :



où E est l'enzyme, S le substrat, P le produit de réaction et les  $k_i$  sont les constantes de vitesse des réactions élémentaires :



- 1) Les mesures cinétiques, la vitesse initiale ( $v_i$ ), pour  $[P] \cong 0$  et  $[S] \cong [S]_0$  où  $[S]_0$  est la concentration du substrat à l'instant initial. Cette hypothèse permet de négliger la réaction
- 2)  $[S]_0$  est grande ( $\gg$ ) devant celle de l'enzyme  $[E]_0$ .
- 3) Dès l'addition de l'enzyme dans la solution de substrat, il s'établit un équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe (appelé complexe de Michaëlis), on parle d'hypothèse du quasi-équilibre ou pré équilibre.

Méthodes de détermination de  $k_m$  et  $V_{max}$ : Expérimentalement  $V_{max}$  et  $K_m$  se déduisent de la  $v_i$  de la réaction dans une gamme de concentrations initiales de substrat. Un grand nombre de méthodes de détermination de ces deux paramètres, tant graphiques que numériques, ont été mises au point:

Méthode arithmétique: Si  $v = V_{max}/2$   $K_m = [S]$   $K_m$  est égale à  $[S]$  lorsque la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale

**Méthode de Lineweaver et Burk:** Cette équation s'obtient en inversant les deux membres de l'équation de Mickaelis-Menten: double inverse:

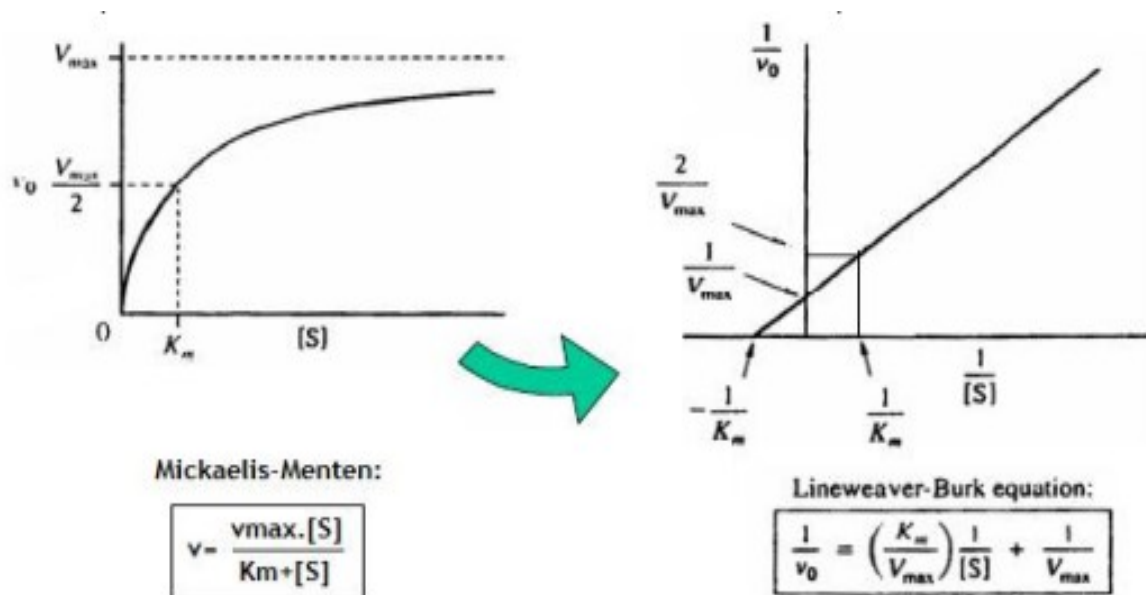


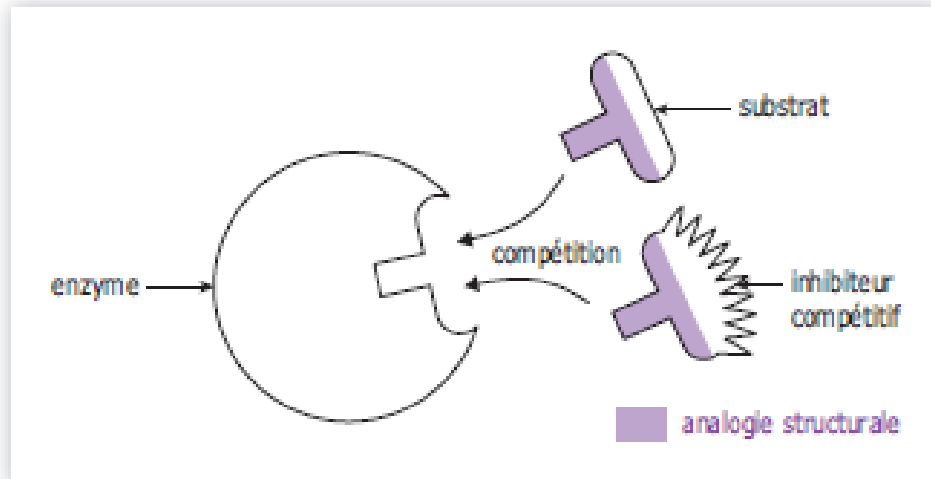
Figure 06 : Méthodes de détermination de  $k_m$  et  $V_{max}$

### 3- Inhibition enzymatique

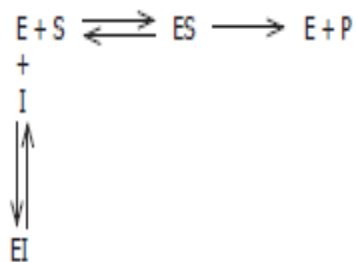
Les inhibiteurs enzymatiques sont des molécules qui vont diminuer, voire stopper la vitesse de la réaction. Il en existe deux types : les **inhibiteurs compétitifs** et **non compétitifs**.

#### 3-1 Inhibiteurs compétitifs

Un **inhibiteur compétitif** est un **analogue structural** du substrat, c'est-à-dire que ces deux composés présentent une analogie structurale. Le site actif de l'enzyme le reconnaît comme un substrat, mais ne peut pas le transformer. L'inhibiteur (I) rentre donc en compétition avec le substrat pour l'occupation du site actif. Cette fixation est **réversible**.

*Inhibiteur compétitif***Figure 07 : Inhibiteur compétitif**

Cette situation peut se schématiser sous la forme d'une équation



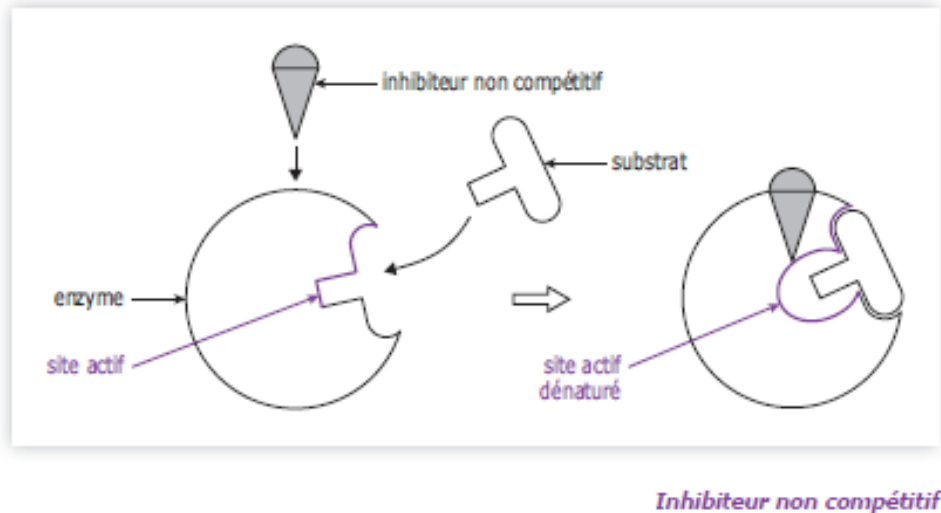
Le complexe EI empêchant le substrat de se fixer, il y a donc moins de complexe ES. La dissociation du complexe ES étant favorisée, le **K<sub>m</sub> augmente** (le nouveau K<sub>m</sub> est noté **K<sub>m</sub>'**), et l'affinité de l'enzyme pour le substrat est diminuée. La **réaction** est par conséquent **plus lente**.

L'occupation du site actif par l'inhibiteur n'est pas définitive. La formation du complexe EI est réversible. Ainsi, si on ajoute du substrat en quantité importante, on favorise la formation du complexe ES au dépend de la formation du complexe EI, et la **V<sub>max</sub>** peut donc être atteinte.

### 3-2. Inhibiteurs non compétitifs

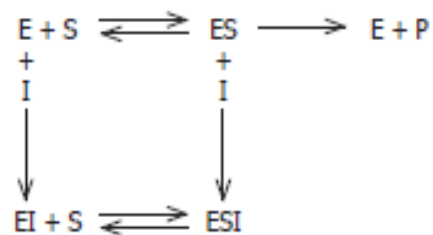
Un inhibiteur non compétitif n'a **aucune analogie avec le substrat**. Le substrat peut donc se fixer au site actif, il n'y a pas de compétition. Par contre, l'inhibiteur non compétitif se combine avec l'enzyme de manière **irréversible**, covalente et stable, et cette fixation

dénature le site actif. Contrairement à l'inhibiteur compétitif, il induit donc une **inactivation définitive de l'enzyme**.



**Figure 08** : inhibiteur non compétitif

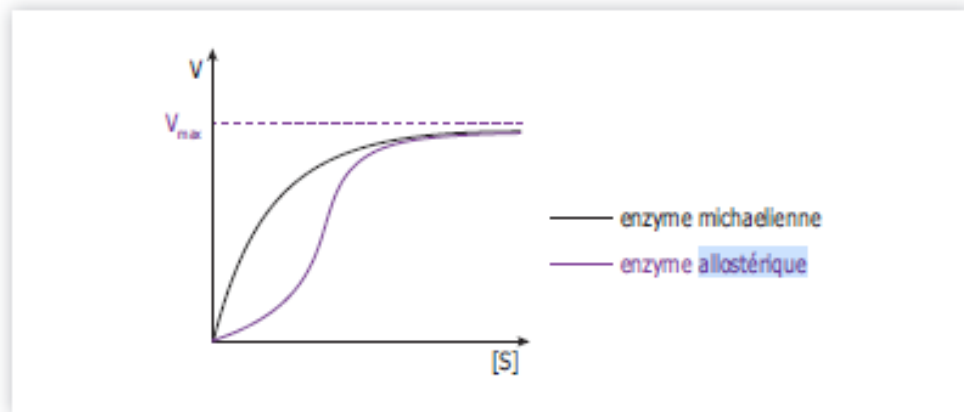
Cette situation peut se schématiser sous la forme d'une équation :



La fixation du substrat au site actif n'étant pas perturbée, la formation du complexe ES n'est pas modifiée, et le **K<sub>m</sub> est inchangé**. L'affinité de l'enzyme pour le substrat reste donc la même.

#### ***4- Enzymes allostériques***

Certaines enzymes montrent une cinétique différente du modèle Michaelien. Il s'agit des **enzymes allostériques**. Leur cinétique enzymatique ne présente pas une allure hyperbolique, mais **sigmoïde**



**Figure 09 :** Comparaison des cinétiques enzymatiques michaelienne et allostérique

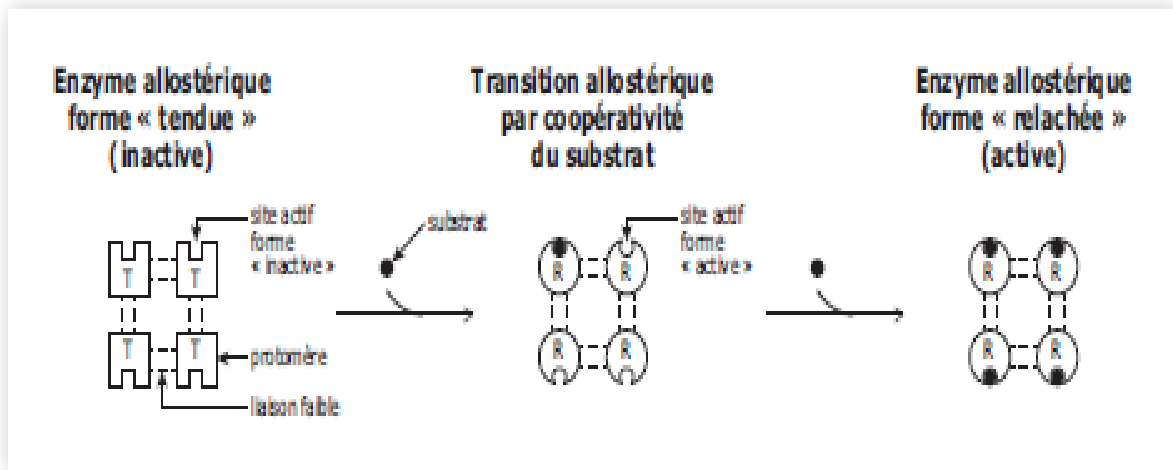
Cette différence s'explique par la structure d'une enzyme allostérique. Cette enzyme possède en fait une **structure quaternaire** avec plusieurs **protomères** (sous-unité de base d'une protéine multimerique) associés entre eux par des liaisons faibles ; elle est donc **oligomérique**.

Chaque protomère possédant un site actif, une enzyme allostérique possède plusieurs sites actifs.

Comment expliquer cette allure sigmoïde ? Ces enzymes existent en fait sous deux formes:

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

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



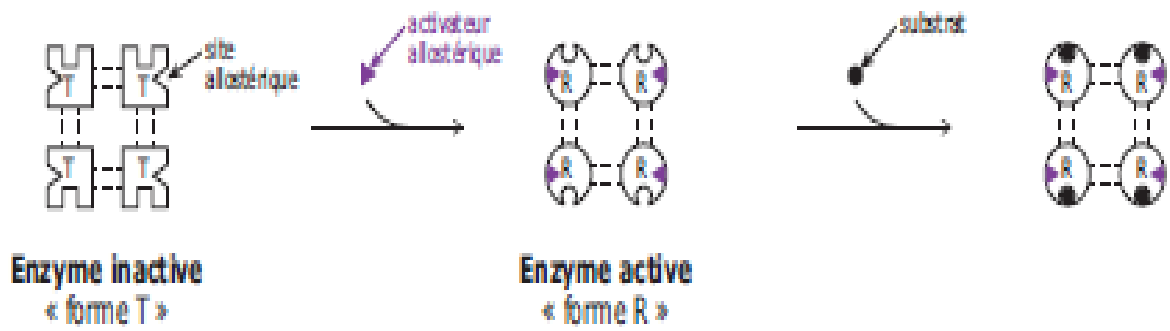
**Figure 10 :** Transition allostérique

Chaque protomère possède également des sites de fixation à des molécules régulatrices de leur activité. Ces sites portent le nom de **sites allostériques**, et les molécules régulatrices, d'**effecteurs allostériques**. La fixation de ces derniers peut faciliter la transition allostérique dans le sens T vers R, ce qui active l'enzyme. Dans ce cas, l'effecteur est nommé **activateur allostérique**.

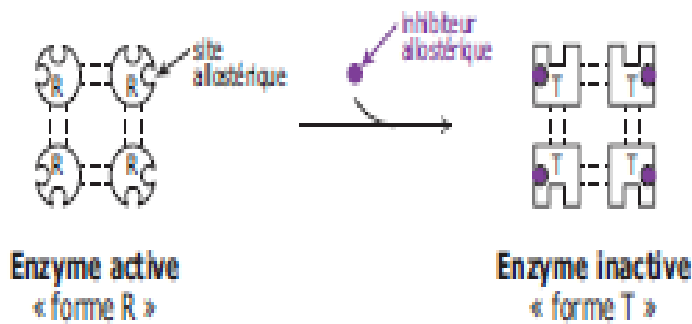
À l'inverse, la fixation peut faciliter la transition allostérique dans le sens R vers T, ce qui inactive l'enzyme. Dans ce cas, l'effecteur est nommé **inhibiteur allostérique**.

De ce fait, ces effecteurs ne vont donc pas modifier la **V<sub>max</sub>**, mais modifier l'affinité de l'enzyme pour son substrat, et donc le **K<sub>m</sub>**. Celui-ci augmente en présence d'inhibiteurs allostériques, et diminue en présence d'activateurs allostériques.

### Activation allostérique



### Inhibition allostérique



### Effets sur la cinétique enzymatique

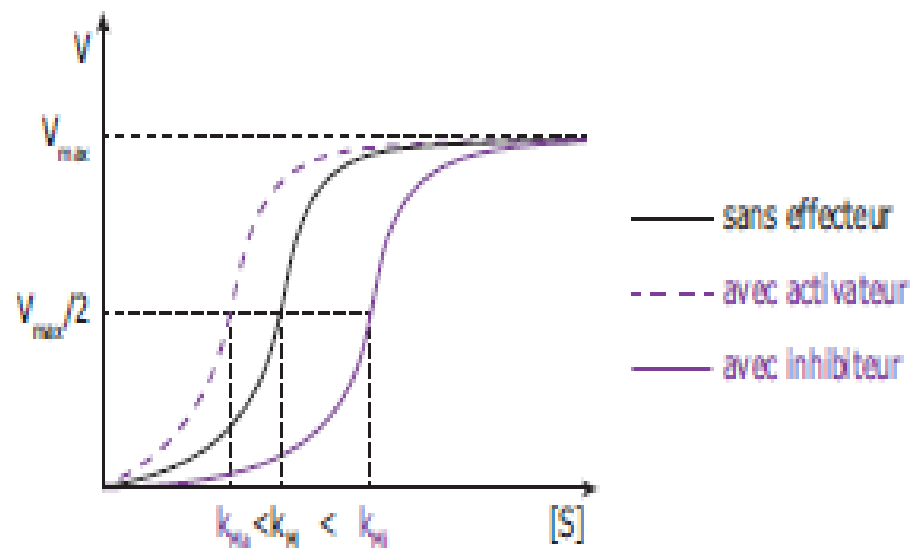


Figure 11 : Les effecteurs allostériques