

## ENZYMOLOGIE

### DEFINITION DES ENZYMES

Les enzymes sont des **catalyseurs** biologiques de nature protéique qui :

- **accélèrent** la vitesse des réactions chimiques
- s'impliquent dans les mécanismes de **régulation du métabolisme**.

### STRUCTURE ET CONFORMATION DES ENZYMES

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

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

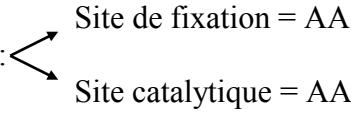
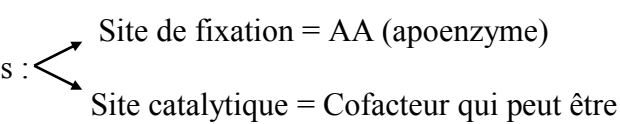
### SITE ACTIF

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

On y distingue :

- le site de fixation : ce site est constitué d'une séquence d'acides aminés.
- le site catalytique : c'est la partie de la protéine qui est responsable de la transformation du substrat en produit

### TYPES DES ENZYMES

- Enzymes holoprotéiques : 
  - Site de fixation = AA
  - Site catalytique = AA
- Enzymes hétéroprotéiques : 
  - Site de fixation = AA (apoenzyme)
  - Site catalytique = Cofacteur qui peut être
    - inorganique comme les ions ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ )
    - organique appelé coenzyme

### CLASSES D'ENZYMES

- 1.- Oxydoréductases
- 2.- Transférases
- 3.- Hydrolases
- 4.- Lyases
- 5.- Isomérases
- 6.- Ligases

### NOMENCLATURE

- **Numéro de code** : une enzyme possède un numéro de code, précédé des lettres E.C. (Enzyme commission) et comportant 4 chiffres séparés par des points. *E.C.*  
Le premier chiffre indique la classe à laquelle appartient l'enzyme.  
Le second indique la s/c qui correspond à la nature chimique du donneur.

- Le troisième indique la s/c correspondant à la nature chimique de l'accepteur. Le quatrième chiffre représente le numéro d'ordre dans la sous-sous classe.
- **Nom systématique** : il indique clairement
  - o La nature du donneur
  - o La nature de l'accepteur
  - o Le type de réaction catalysée
- **Nom commun recommandé** : C'est une appellation simple consacrée par l'usage.

Soit la réaction de transfert d'un groupement phosphate de l'ATP au D glucose.



L'enzyme qui catalyse cette réaction est :

- Numéro de code : E.C.2.7.1.2
- Nom systématique : ATP : D-Glucose-6-phosphotransférase
- Nom commun : Glucokinase

### PROPRIETES DES ENZYMES

- **Spécificité** au substrat et à la réaction
- **Accélèrent** les vitesses des réactions
- Ne **modifie pas la variation d'énergie libre ( $\Delta G^\circ$ )**
- Ne **peut pas rendre possible** une réaction endergonique
- **Abaissent l'énergie d'activation**
- **Restent intactes** après les réactions
- **Catalysent** plusieurs réactions
- Agissent à de très **faibles doses**

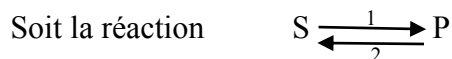
### UNITE DE MESURE

**Unité d'activité enzymatique** = Quantité d'enzyme qui transforme 1  $\mu\text{mol}$  substrat / min

**Katal** : Quantité d'enzyme qui transforme 1 mole de S / seconde.

**Activité enzymatique spécifique** : C'est l'unité d'activité enzymatique /mg de protéine.

### ENERGIE D'ACTIVATION



Le sens de déroulement de la réaction dépend de  $\Delta G^\circ$  qui elle-même dépend de l'état initial (S) et l'état final (P).

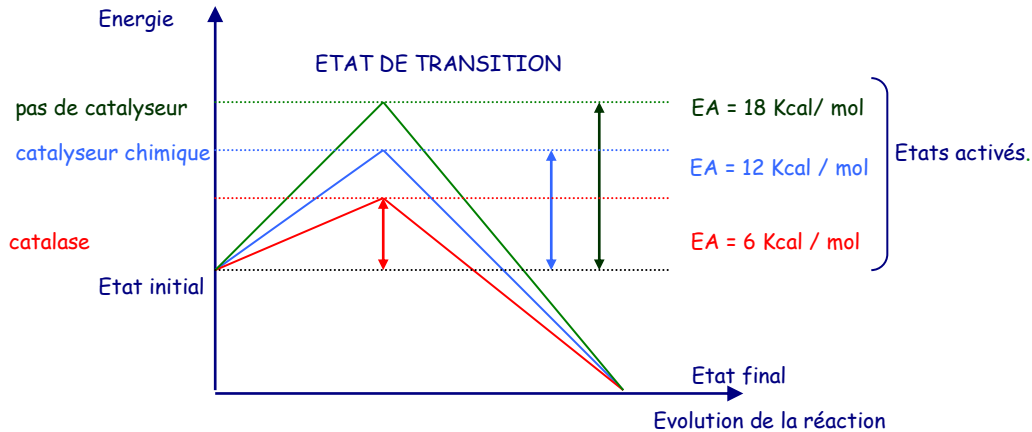
- si S possède plus d'énergie que P, la réaction se fait spontanément dans le sens 1 la réaction est dite exergonique ( $\Delta G^\circ < 0$ )
- Si P possède plus d'énergie que S, la réaction ne se fait spontanément dans le sens 1 La réaction est dite endergonique ( $\Delta G^\circ > 0$ ).

Dans toutes les réactions il existe une **barrière d'énergie** qui doit être surmontée pour que la réaction puisse se dérouler. Elle correspond à la **quantité d'énergie nécessaire pour faire passer les molécules du substrat à un état de transition** ; c'est l'**énergie d'activation**.

L'état de transition est l'état excité, dès lors la réaction évolue spontanément vers un état énergétique plus faible donnant un produit plus stable.

Les enzymes sont capables d'abaisser l'énergie d'activation des réactions, de ce fait augmentent les vitesses des réactions.

Soit la décomposition de l'eau oxygénée.  $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$



A, B et C = Energies d'activation.

$Q_A = 18.000 \text{ cal /mol}$  en absence de catalyseur

$Q_B = 12.000 \text{ cal /mol}$  en présence d'un catalyseur métallique : platine

$Q_C = 6.000 \text{ cal /mol}$  en présence de catalyseur biologique : catalase

On peut constater que les catalyseurs agissent en **diminuant l'énergie d'activation** nécessaire au déroulement des réactions.

Les enzymes sont plus efficaces que les catalyseurs chimiques, en effet :

- La vitesse de la réaction est plus grande
- Les conditions de réactions sont plus douces
- Spécificité à la réaction est plus grande : ne donnent que rarement des produits secondaires.
- Les enzymes contribuent à la régulation du métabolisme.

## SPÉCIFICITÉ DES ENZYMES

### Spécificité vis à vis de la réaction

L'enzyme **ne catalyse qu'une réaction précise** même si le substrat est le même.

### Spécificité vis à vis du substrat

Dans d'autres cas l'enzyme **ne catalyse qu'un seul substrat**. Il lui est spécifique. Cette spécificité peut-être étroite (Exp : les phosphatases) ou large (trypsine).

## CINETIQUE ENZYMATIQUE

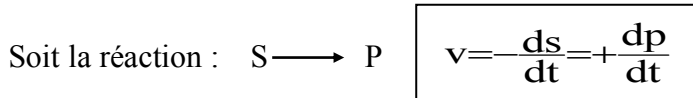
C'est l'étude de la variation de la concentration du substrat ou plus souvent du produit en fonction du temps.

### 1-Rappel

#### Vitesse de la réaction chimique

La vitesse d'une réaction peut être mesurée en suivant la disparition du substrat ou en suivant l'apparition du produit par unité de temps.

#### Vitesse globale d'apparition du produit et disparition du substrat



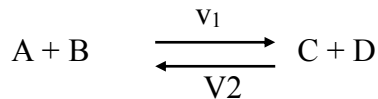
La vitesse est proportionnelle à la [S]  $V = k \cdot [S]$   $k =$  constante de vitesse

Ordre d'une réaction chimique

Ordre de réaction	Modèle de réaction	Vitesse de réaction	
0		$V = k$	$n = 0$
1	$[A] \longrightarrow [B]$	$V = k \cdot [A]$	$n = 1$
2	$[A] [B] \longrightarrow [C] [D]$	$V = k \cdot [A] [B]$	$n = 2$

Constante d'équilibre d'une réaction.

Soit la réaction qui conduit à un état d'équilibre.



$V_1 = K_1 \cdot [A] \cdot [B]$

$V_2 = K_2 \cdot [C] \cdot [D]$

L'équilibre de la réaction sera atteint lorsque  $V_1 = V_2$

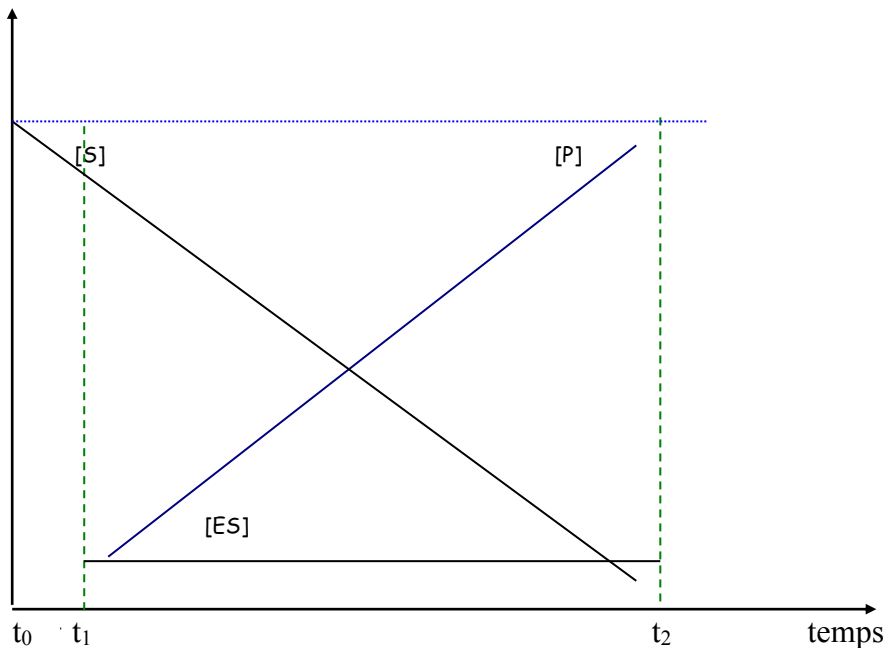
Ainsi la constante d'équilibre de la réaction K s'écrit :

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

**2. Phase stationnaire**

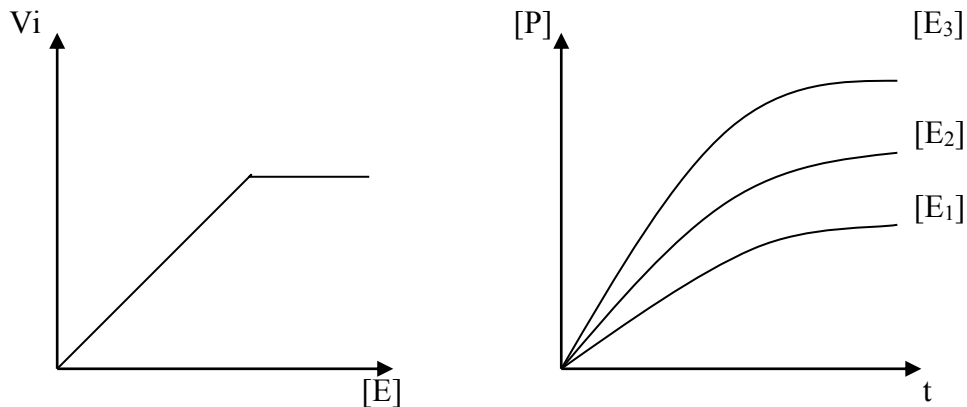
Lorsqu'une enzyme est mise en présence de son substrat on observe :

Une phase pré-stationnaire, une phase stationnaire et une phase post-stationnaire :

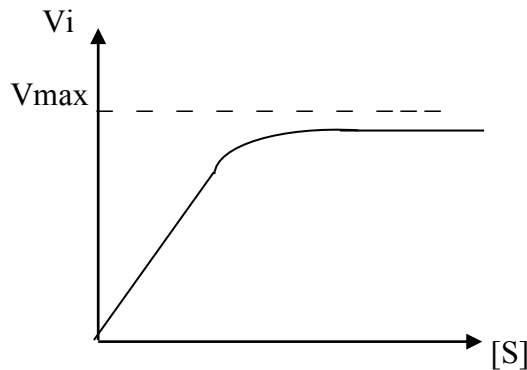


**3. Influence de la concentration d'enzyme**

Si on maintient la concentration en substrat constante, la vitesse de la réaction est d'abord proportionnelle à la concentration de l'enzyme, puis elle demeure constante pour des concentrations enzymatiques plus élevées.

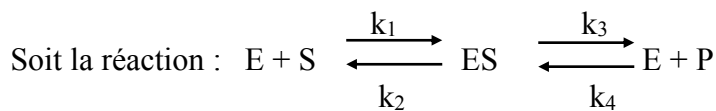


#### 4. Influence de la concentration du substrat



Aux faibles concentrations de substrat, une droite apparaît qui correspond à la fixation progressive du substrat sur l'enzyme. Aux fortes concentrations de substrat, la courbe (hyperbole) tend vers une valeur maximale qui correspond à la vitesse maximale

#### HYPOTHESE DE MICHAELIS MENTEN



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

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

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

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

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

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

$K_m$  : constante de Michaélis est la constante de dissociation du complexe enzyme substrat

$K_m$  augmente lorsque l'affinité de l'enzyme pour le substrat diminue.

### EQUATION DE MICHAELIS MENTEN

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

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

$$\begin{aligned}K_m \text{ devient alors} \quad & : K_m = ([E_T] - [ES]) \cdot [S] / [ES] \\ & K_m = [E_T] \cdot [S] / [ES] - [ES] \cdot [S] / [ES] \\ & K_m = [E_T] \cdot [S] / [ES] - [S] \\ & K_m + [S] = [E_T] \cdot [S] / [ES] \\ & [ES] = [E_T] \cdot [S] / K_m + [S]\end{aligned}$$

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

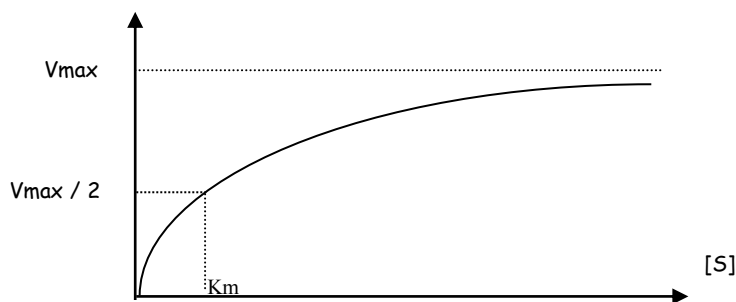
On peut donc écrire en remplaçant  $[ES]$  :  $V = k_3 \cdot [E_T] \cdot [S] / K_m + [S]$

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

$$\begin{aligned}V &= k_3 \cdot [ES] \\ V_{\max} &= k_3 \cdot [E_T]\end{aligned}$$

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

### REPRESENTATION DE MICHAELIS MENTEN



Si on porte la courbe  $V$  en fonction de  $[S]$ , on obtient une hyperbole.

Lorsque le substrat est en large excès, la vitesse de la réaction est alors maximale

La  $K_m$  est la  $[S]$  lorsque la vitesse de la réaction est égale à la moitié de vitesse maximale !

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

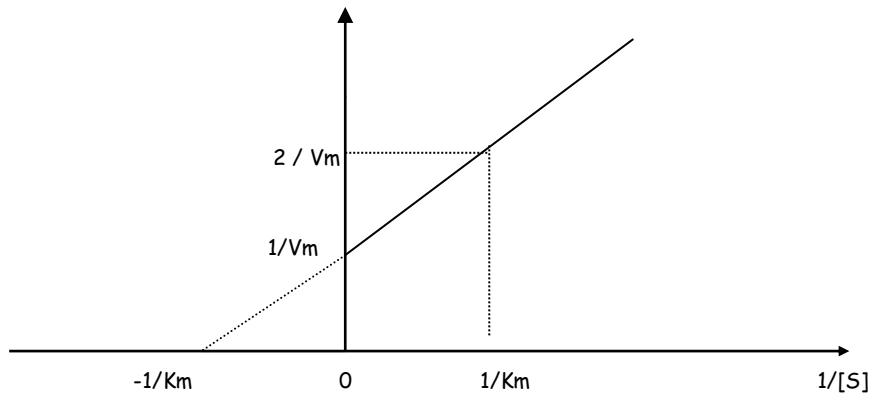
### REPRESENTATION DE LINEWEAVER BURK (L-B)

La représentation de MM ( $V = f[S]$ ) ne permet pas de donner avec précision  $V_{\max}$  et  $K_m$ .

L-B ont remédié à cela en prenant les doubles inverses  $1/v = f(1/[S])$ .

Cette méthode est appelée représentation des doubles inverses puisqu'on porte  $1/V$  en fonction de  $1/[S]$ . L'équation devient alors :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left( \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \quad Y = ax + b \quad \text{avec } a = \frac{K_m}{V_{\max}}$$

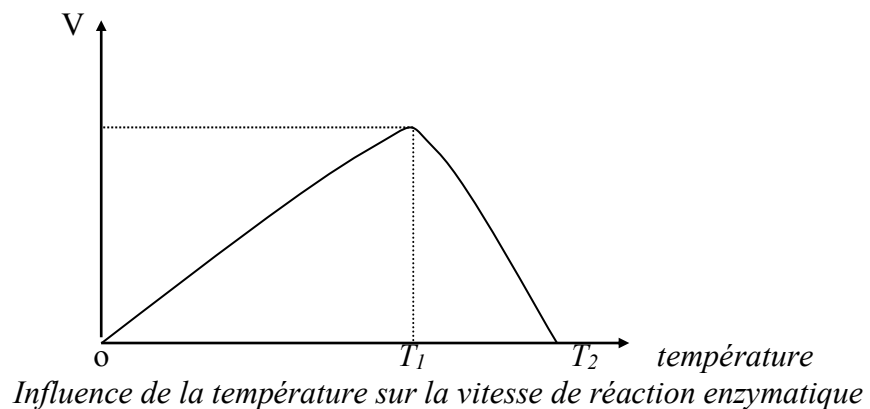


## MODULATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

### A / Influence des agents physiques

#### Influence de la température :

Selon la relation d'Arrhenius la vitesse d'une réaction chimique augmente avec la température. Il en est de même pour les réactions enzymatiques, mais cette augmentation de vitesse n'est pas infinie.

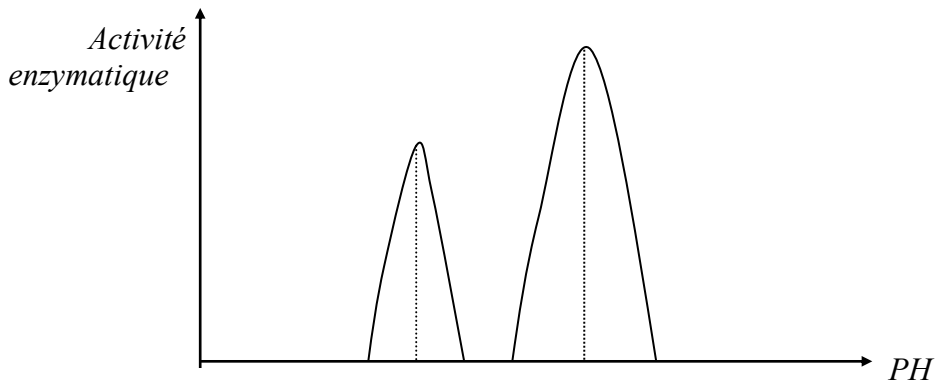


La courbe est la résultante de deux actions

- la partie ascendante de la courbe correspond à la loi d'Arrhenius :
- la partie descendante de la courbe correspond à l'inactivation progressive de l'enzyme

### Influence du pH

Les enzymes ne sont actifs que dans une zone restreinte du pH.



### **B- Influence des agents chimiques**

Les agents chimiques, minéraux ou organiques sont capables de modifier les vitesses des réactions enzymatiques. Ils se comportent comme des inhibiteurs ou comme des activateurs.

#### B.1 Influence des inhibiteurs

Ce sont des composés dont la fixation sur l'enzyme entraîne leur inactivation partielle ou totale qui se traduit par la diminution ou l'annulation de la vitesse initiale

#### **Inhibiteurs irréversibles**

Ce sont des inhibiteurs qui dénaturent irréversiblement l'enzyme. Exp : Trichloroacétique

#### **Inhibiteurs réversibles**

- modification de la cinétique enzymatique
- pas de dénaturation de l'enzyme.

##### **a- inhibiteurs compétitifs**

Le substrat et l'inhibiteur sont des analogues structuraux ; l'inhibiteur entre en compétition avec le substrat pour se fixer sur le site actif.

$$K_m' > K_m$$
$$V_{\max} = \text{constante}$$

$$K_m' = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

**N.B !** L'inhibition est levée par excès de substrat.

##### **b- inhibiteurs non compétitif**

L'inhibiteur se fixe sur un autre site que le site actif

$$K_m = \text{constante}$$
$$V'_{\max} < V_{\max}$$

$$\frac{1}{V_{\max}'} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

##### **c- inhibiteur incompétitif**

L'inhibiteur ne peut se fixer sur l'enzyme libre mais uniquement sur le complexe ES.  
Ce type d'inhibition est aussi appelé inhibition anti-compétitive ou inhibition par blocage.



$$K_m' < K_m$$
$$V'_{max} < V_{max}$$

## B.2- les activateurs

Sont de nature très diverses, on distingue :

- activateurs vrais : c'est le cas de beaucoup d'ions métalliques.
- Agents protecteurs : c'est le cas de la cystéine qui protège les groupements thiols du site actifs de nombreux enzymes.
- Activateurs de proenzymes

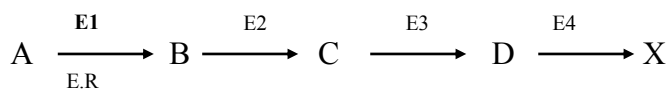
## REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

### 1. Notion de rétro-inhibition

Il apparaît que le produit final de la chaîne enzymatique de biosynthèse peut assurer la régulation de toute l'activité de la chaîne. Par exemple la thréonine désaminase enzyme situé au début de la chaîne de synthèse de l'Isoleucine, est inhibée par l'Isoleucine elle-même. Ce mécanisme est appelé rétro-inhibition ou « feed-back »

### 2. Effet allostérique

Dans toutes séquences métaboliques, il existe une enzyme douée d'activité particulière. Cette enzyme prend le nom de « *enzyme régulatrice* ».

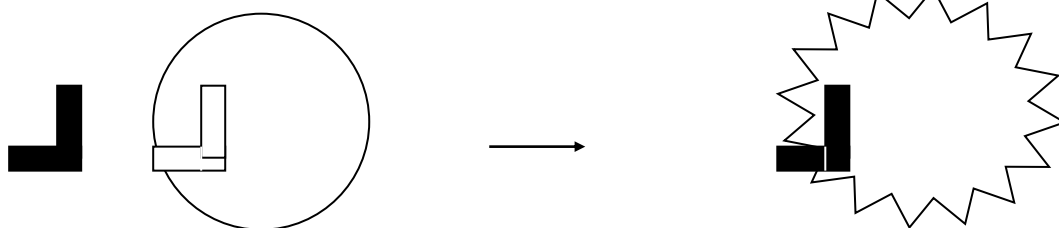


Cette enzyme régulatrice est inhibée par X qui est le produit final. L'enzyme régulatrice est la seule à être sensible à X. X n'agit jamais par un effet iso-stérique sur l'enzyme régulatrice.

### 3. Transition allostérique

L'enzyme régulatrice possède au moins deux sites fonctionnels :

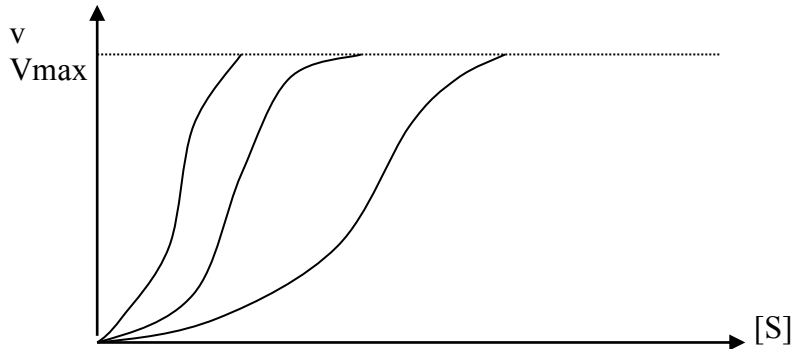
- le site actif adapté au substrat
- le site allostérique dont la conformation spatiale est adapté à l'effecteur allostérique. Lorsque l'effecteur allostérique se combine au site allostérique il entraîne au niveau de la protéine enzymatique toute entière une très légère modification de structure qui est réversible : c'est la transition allostérique, qui a pour conséquence directe de modifier la cinétique de la réaction.



#### 4. Cinétique des enzymes allostériques

Les enzymes allostériques ne répondent pas aux cinétiques classiques de M-M, mais à une courbe sigmoïde qui traduit le phénomène de coopérativité.

On distingue la coopérativité (+) et la coopérativité (-)



#### 5. Effet de désensibilisation

L'effet allostérique peut disparaître sous l'action de la température ou par traitement chimique (urée). Dans ce cas on observe que l'enzyme régulatrice n'est plus sensible à l'effecteur car le site allostérique a été détruit au cours du traitement de désensibilisation de telle façon que l'effecteur allostérique ne pourrait plus s'y fixer. La transition allostérique ne peut plus avoir lieu. La cinétique devient alors de type michaélien.

L'effet d'un agent de désensibilisation est donc :

- la suppression des interactions entre sites actifs et sites allostériques ; la transition allostérique n'a pas lieu.
- la suppression de la coopérativité entre plusieurs sites actifs de l'enzyme.