

Chapitre 4: Les enzymes

I. Généralités

[www.facebook.com/ DomaineSNV/](http://www.facebook.com/DomaineSNV/)

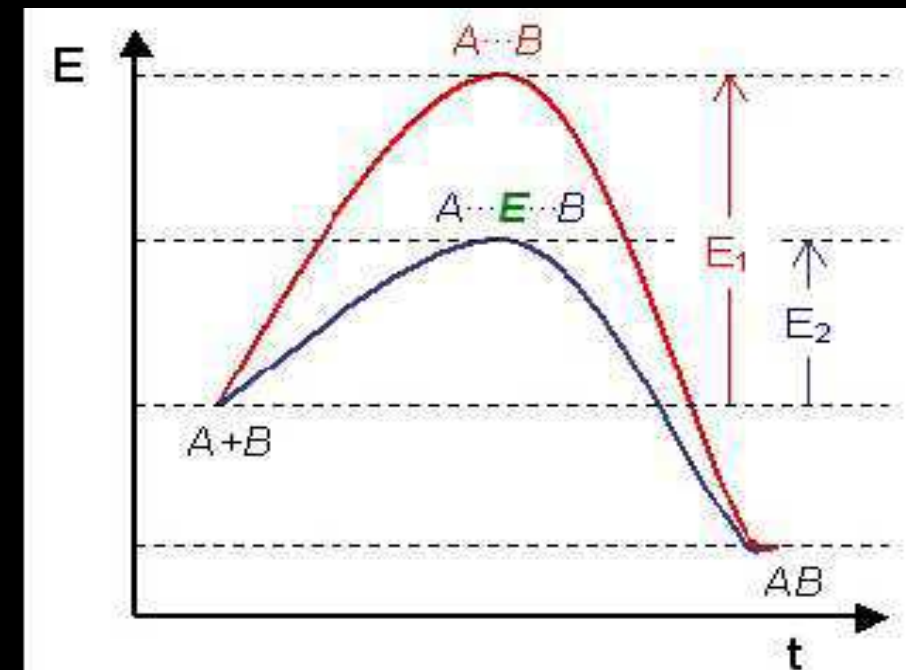
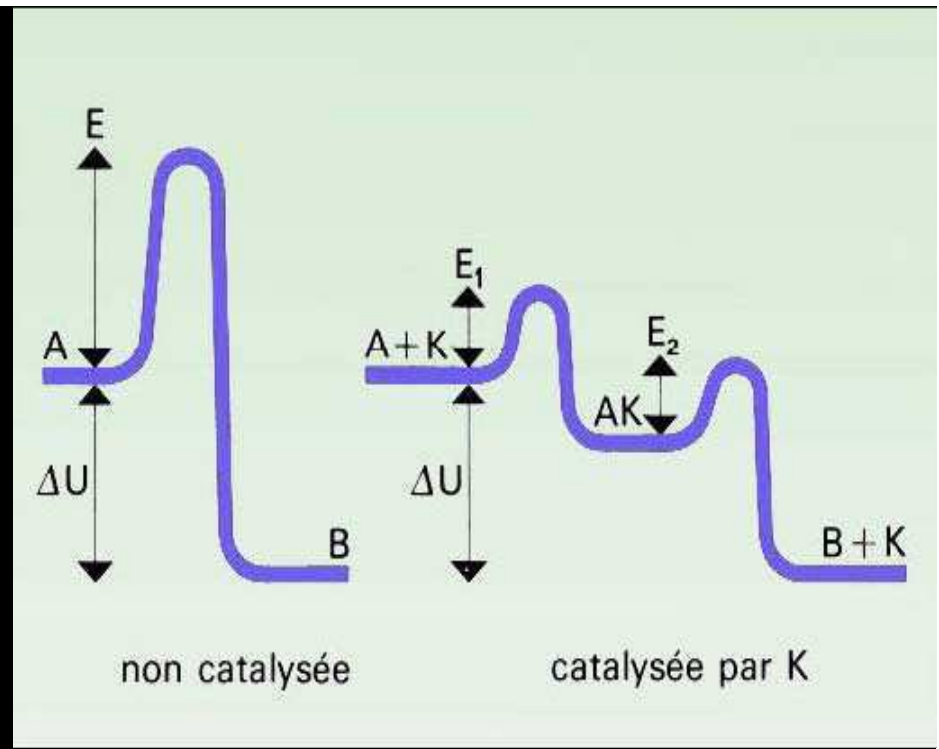
1.. Définitions-propriétés

@. Les enzymes: sont des protéines ayant un pouvoir catalytique et agissant à une très faible concentration, elles restent inchangées à la fin de la réaction qu'elles catalysent, et n'affectent pas l'équilibre d'une réaction réversible: c'est-à-dire, son mode d'action est d'augmenter la vitesse de réaction.

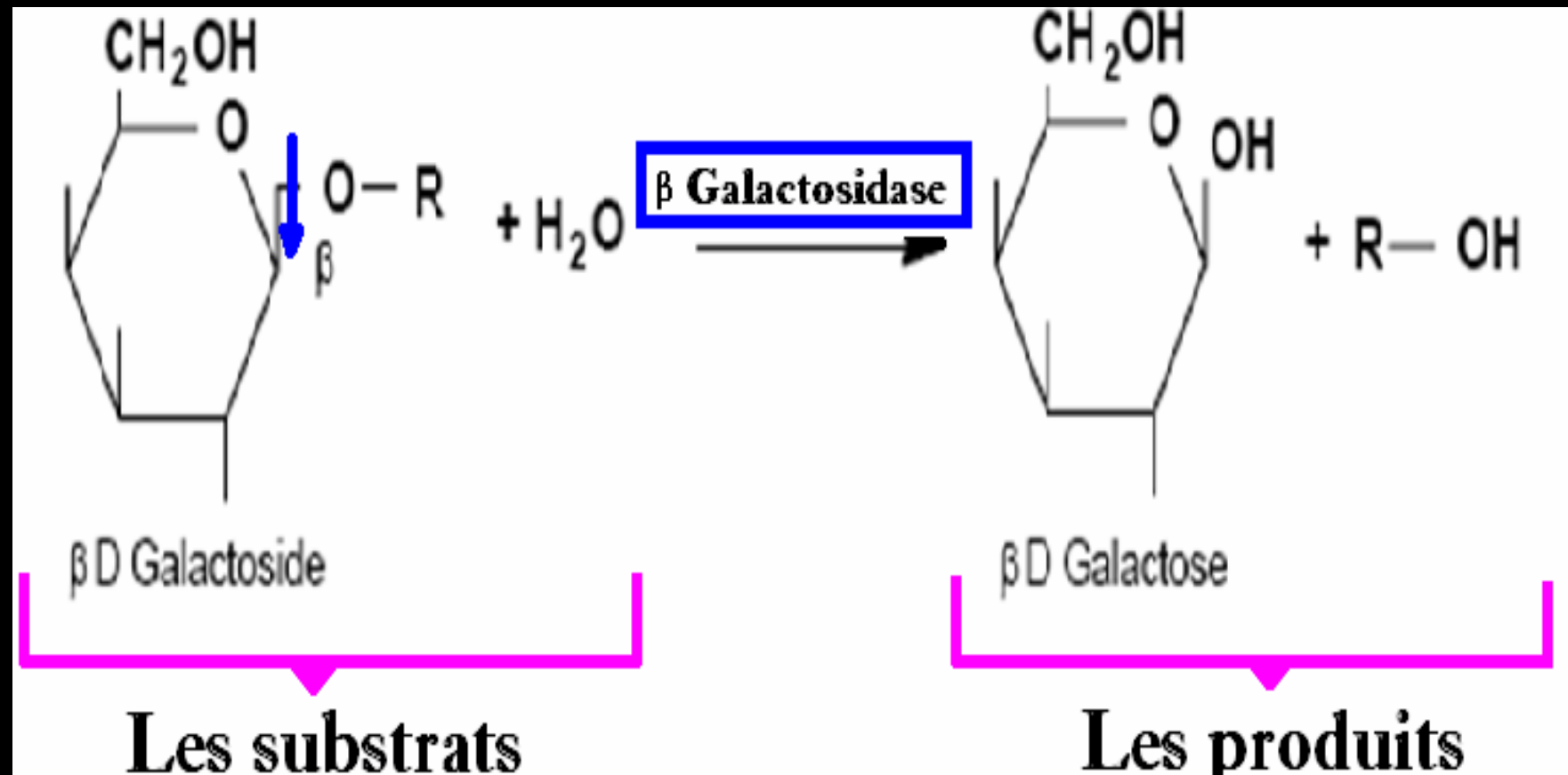
@. L'énergie d'activation: comme le montre la figure ci-dessous (ΔU : variation nette de l'énergie), un catalyseur (**K**) [un enzyme] diminue l'énergie d'activation **E** d'une réaction (qui transforme un **substrat A** en un **produit B**), en permettant la formation d'un ou plusieurs intermédiaires dont l'énergie d'activation est plus basse (**E1, E2**).

@. L'énergie d'activation:

comme le montre la figure ci-dessous (ΔU : variation nette de l'énergie), un catalyseur (**K**) [un enzyme] diminue l'énergie d'activation **E** d'une réaction (qui transforme un *substrat A* en un *produit B*), en permettant la formation d'un ou plusieurs intermédiaires dont l'énergie d'activation est plus basse (**E1, E2**).



@ Enzyme – substrat:



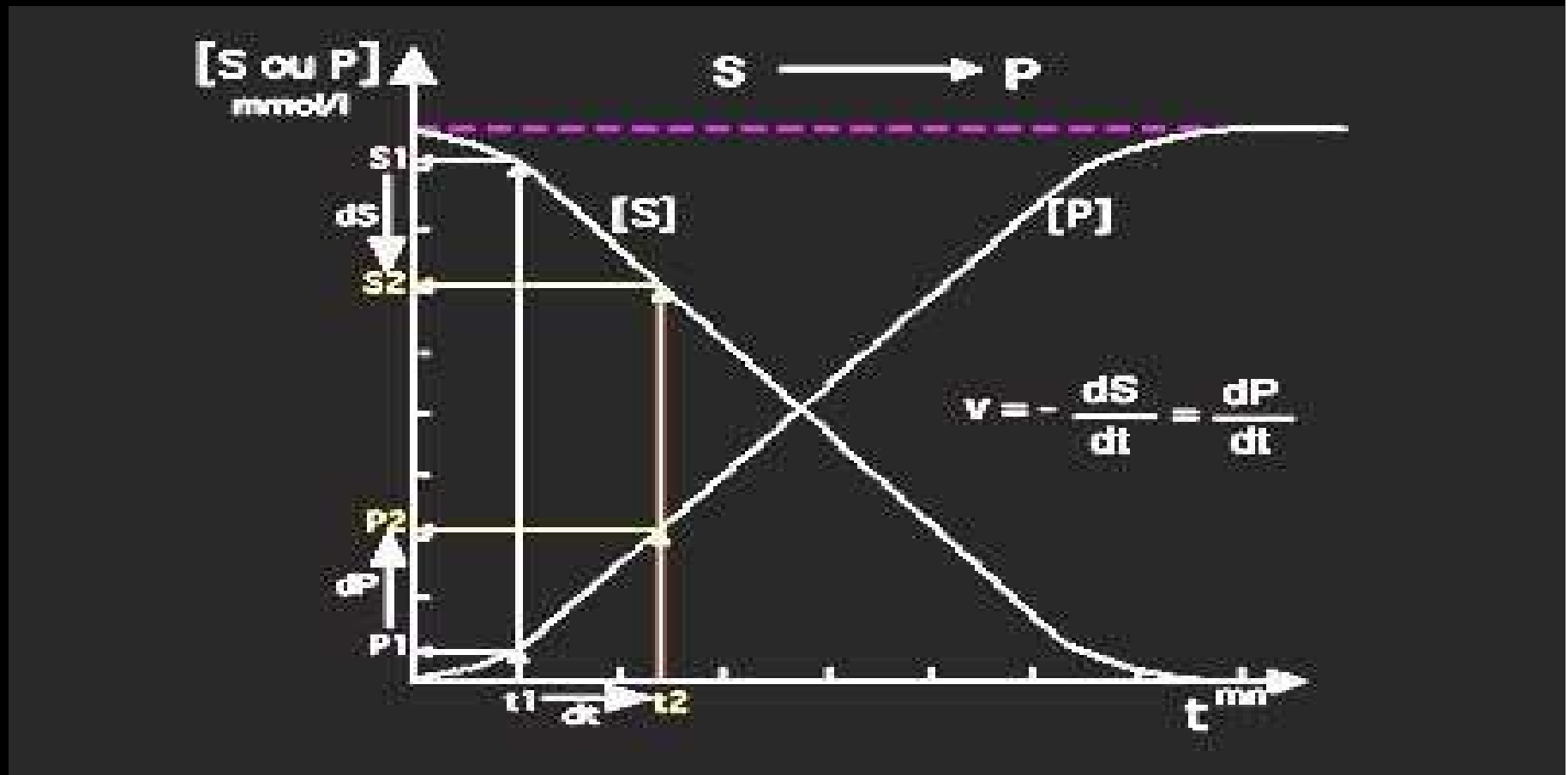
ENZYME :

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

SUBSTRAT :

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

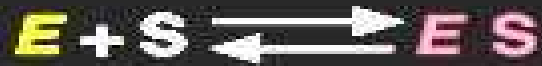
2. Vitesse de réaction



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

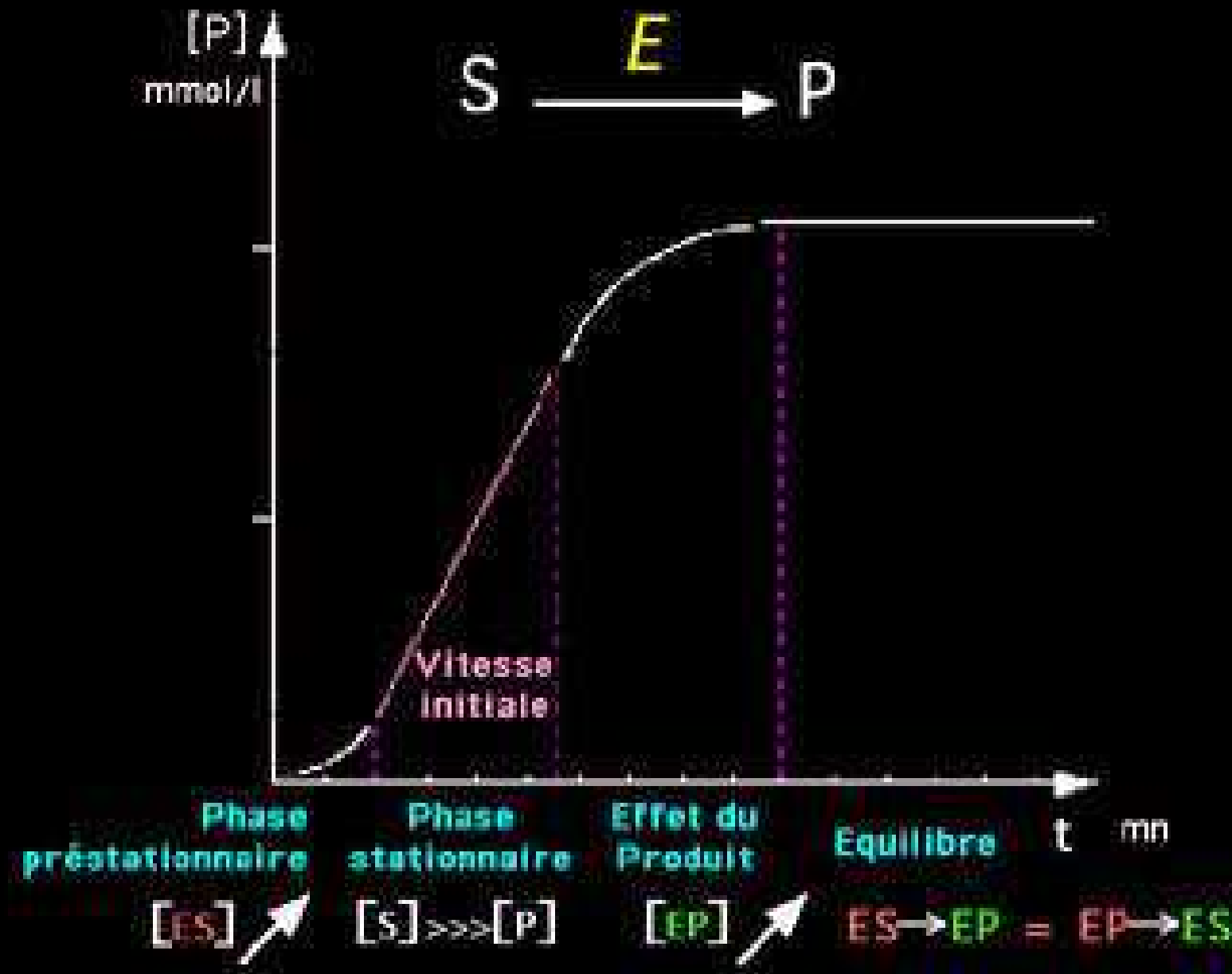
3. Les étapes de la réaction enzymatique

Phases de la réaction



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.

4. Les phases de réaction enzymatique



VITESSE INITIALE :

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

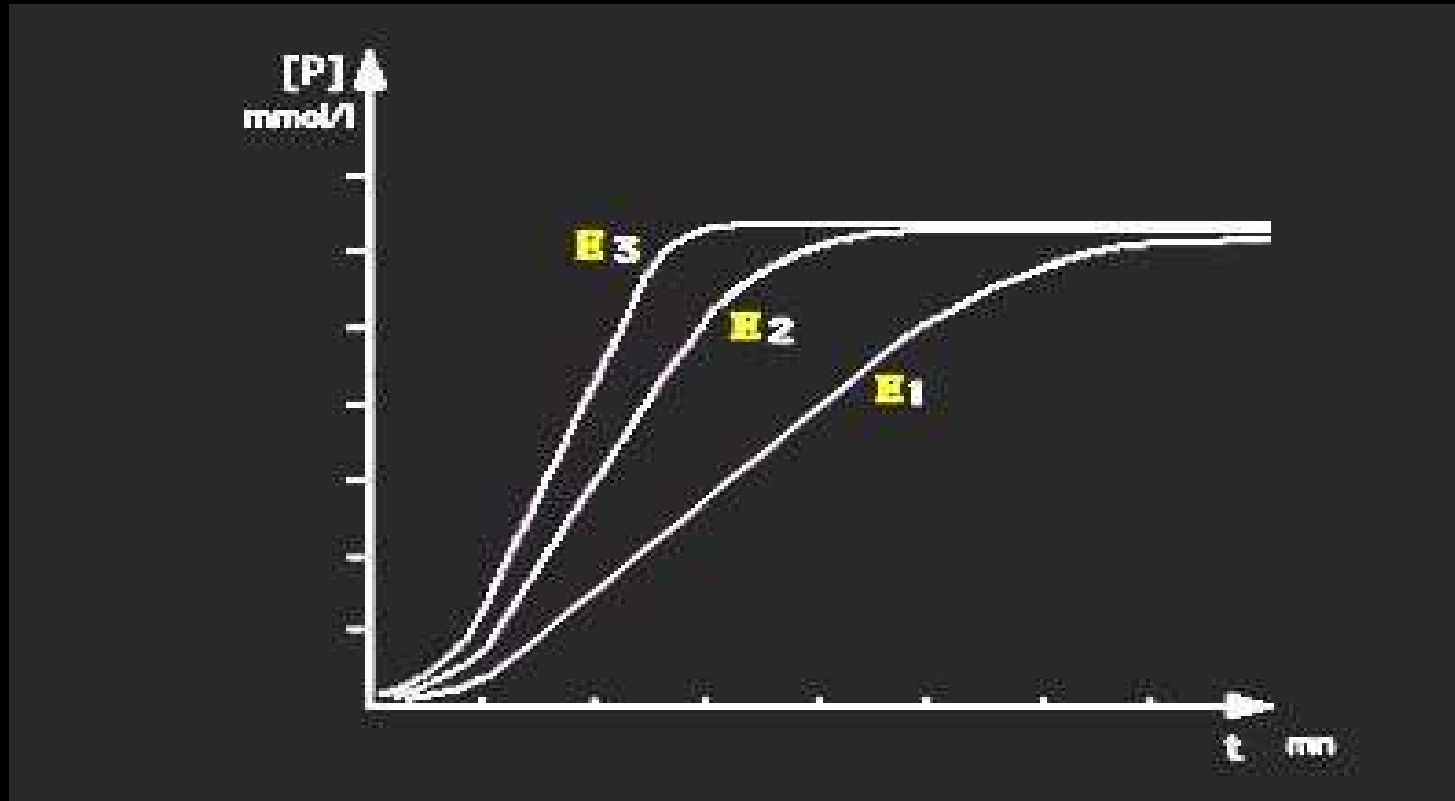
$$\frac{\text{Concentration du complexe Enzyme-Substrat}}{\text{Concentration totale de l'Enzyme}}$$

est maximum

est maximum

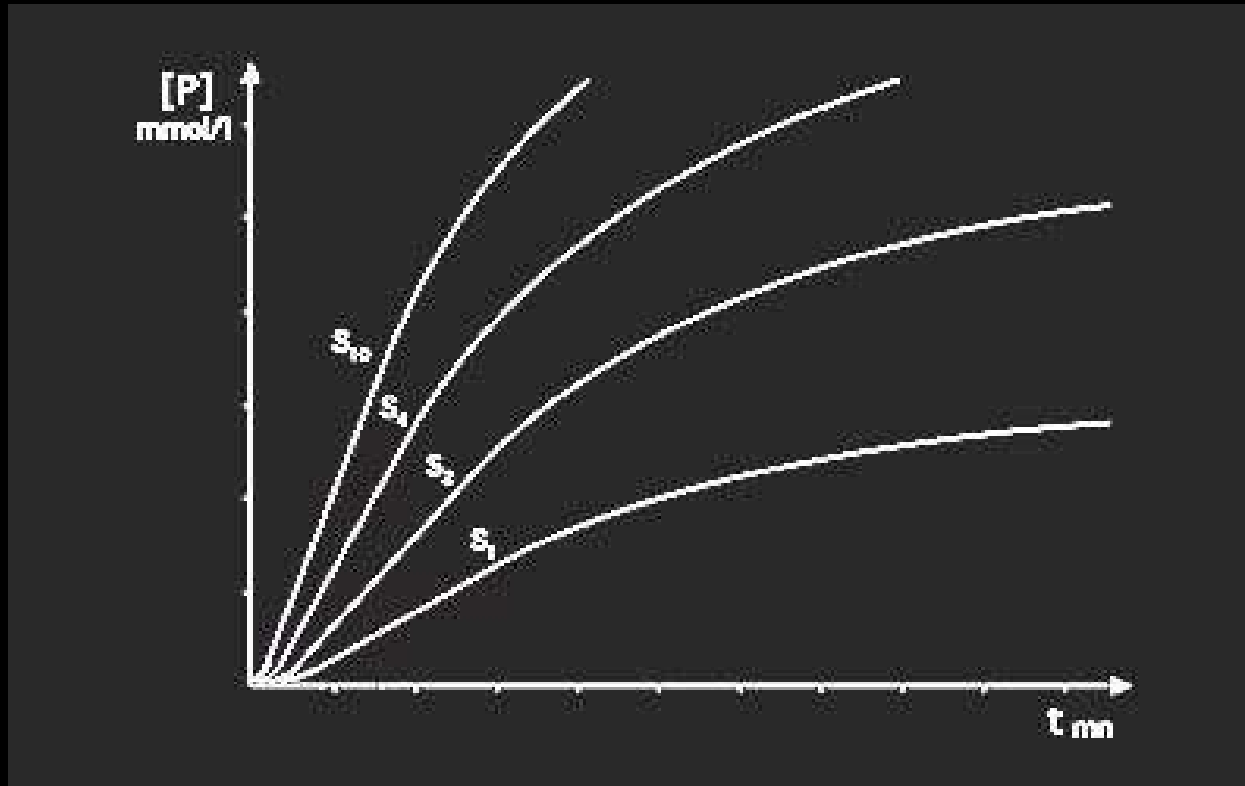
Durant la phase stationnaire, la vitesse est constante : **on l'appelle vitesse initiale**. C'est une phase de la réaction où un nombre maximum des molécules de l'enzyme sont liées à des molécules de substrat. Le rapport enzyme lié sur enzyme total est maximum. Dans ces conditions, l'efficacité catalytique 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.**

5. Concentration de l'enzyme



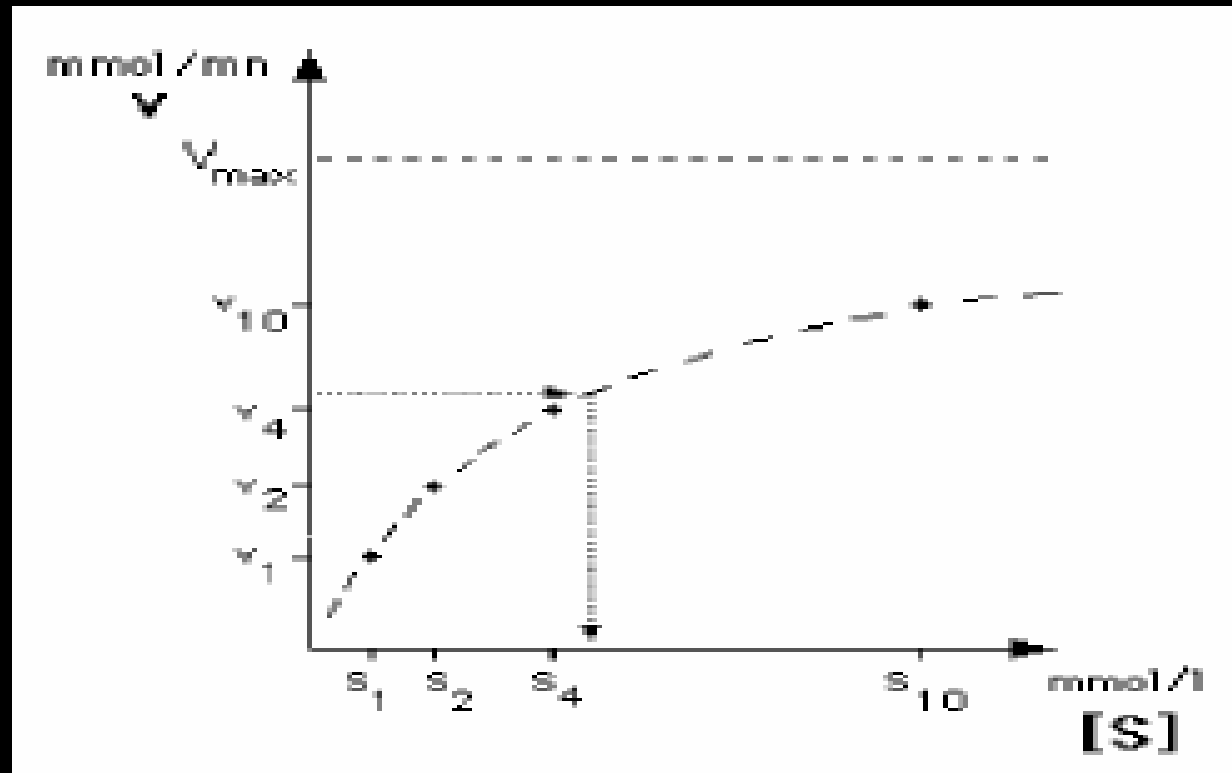
Lorsque la concentration de l'enzyme est grande (par exemple E3) la vitesse initiale est plus grande que lorsque la concentration de l'enzyme est petite (par exemple E1).

6. Concentration du substrat



- Lorsque la concentration du substrat est grande (ex S_{10}) la vitesse initiale est plus grande que lorsque la concentration du substrat est petite (ex S_1).
- 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.

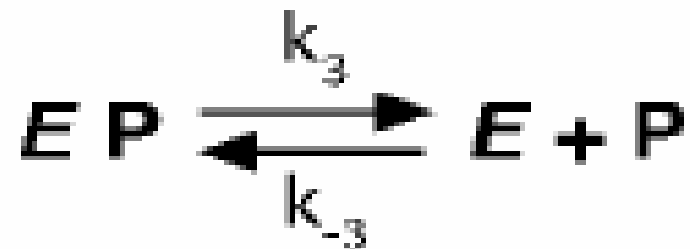
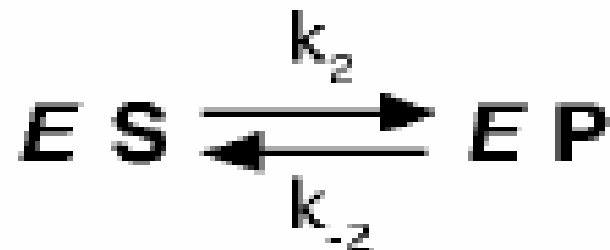
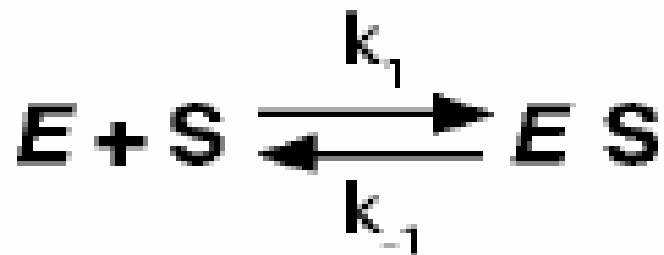
II. Cinétique michaelienne



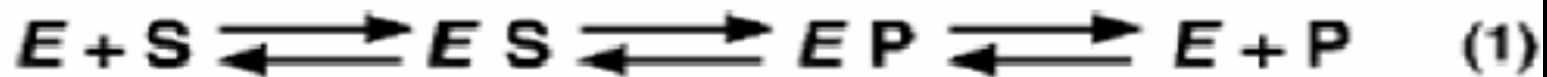
- Lorsque la concentration du substrat tend vers l'infini, l'hyperbole se rapproche de son asymptote
- Définissons le point de la courbe pour lequel l'ordonnée est égale à la moitié de celle de l'asymptote. L'abscisse de ce point est une concentration de substrat pour laquelle on peut mesurer une vitesse initiale égale à la moitié de la vitesse maximum. On appelle cette concentration la **constante de Michaelis**.

1. Constantes de la réaction

Constantes de réaction

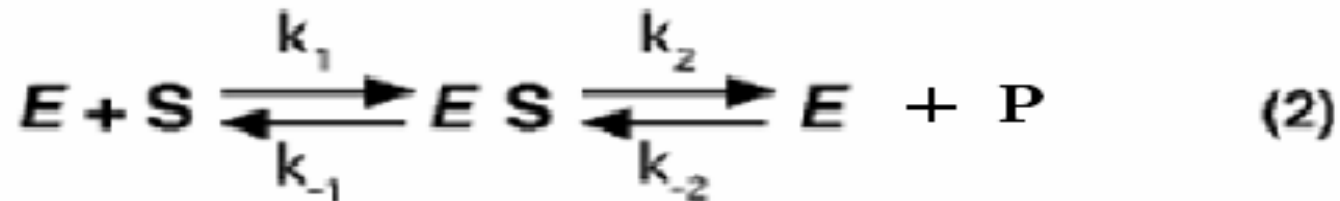


2. Phase stationnaire



Phase stationnaire

$$[P] \approx 0 \Rightarrow [EP] \ll [ES]$$

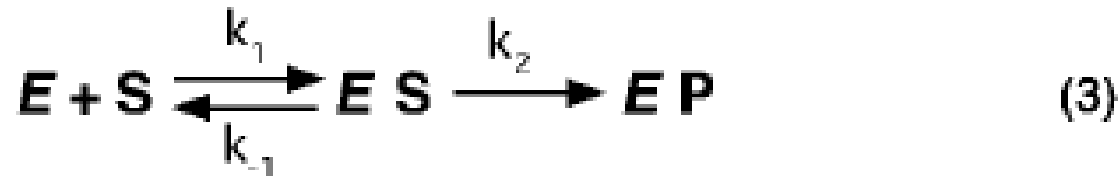


$$[EP] \approx 0 \Rightarrow v_{-2} \approx 0$$



Dans les conditions initiales la vitesse initiale obtenue dans la phase stationnaire suppose **[EP]** est trop minime et la **K -2** tend vers **0**. La formule (3) résume les réactions en activité en phase stationnaire.

3. Équation de la vitesse



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

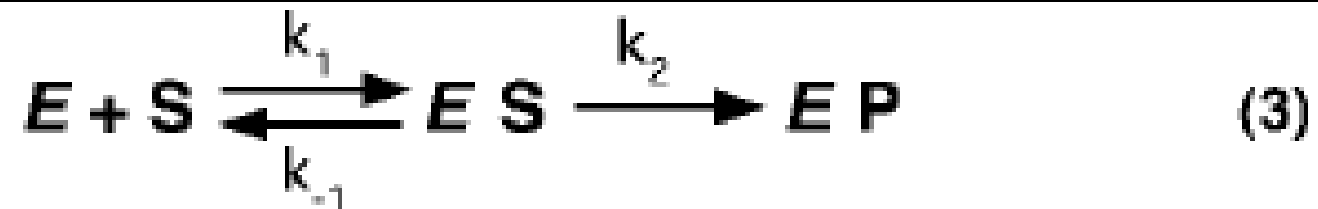
$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{k_2 [ES]}{k_2 [E_{\text{total}}]} \quad (6)$$

Equation
de la
vitesse

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

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**, mais on ne peut pas l'observer puisqu'il est impossible de réaliser dans le milieu une concentration infinie de substrat

4. Équation de la conservation de l'enzyme



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

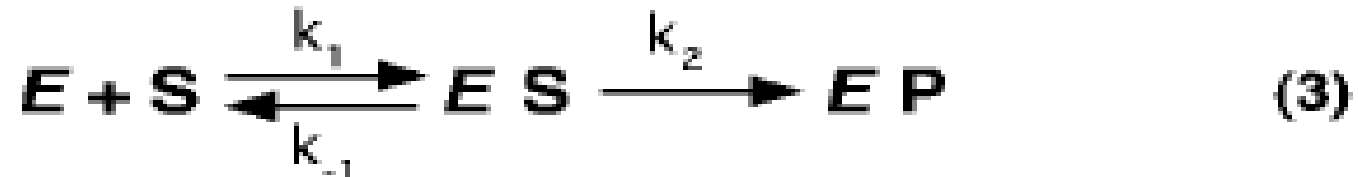
$$EP \approx 0$$

Equation de la conservation de l'enzyme

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

5. Constante de Michaelis

La constante de Michaelis est une grandeur physiquement mesurable, pour laquelle on observe une vitesse initiale à la moitié de la vitesse maximum.



formation de ES = dissociation de ES

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

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

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

$$\text{Constante de MICHAELIS} \quad (12)$$

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

Cette constante K_m est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

6. L'équation de Michaelis

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

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

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

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

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

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

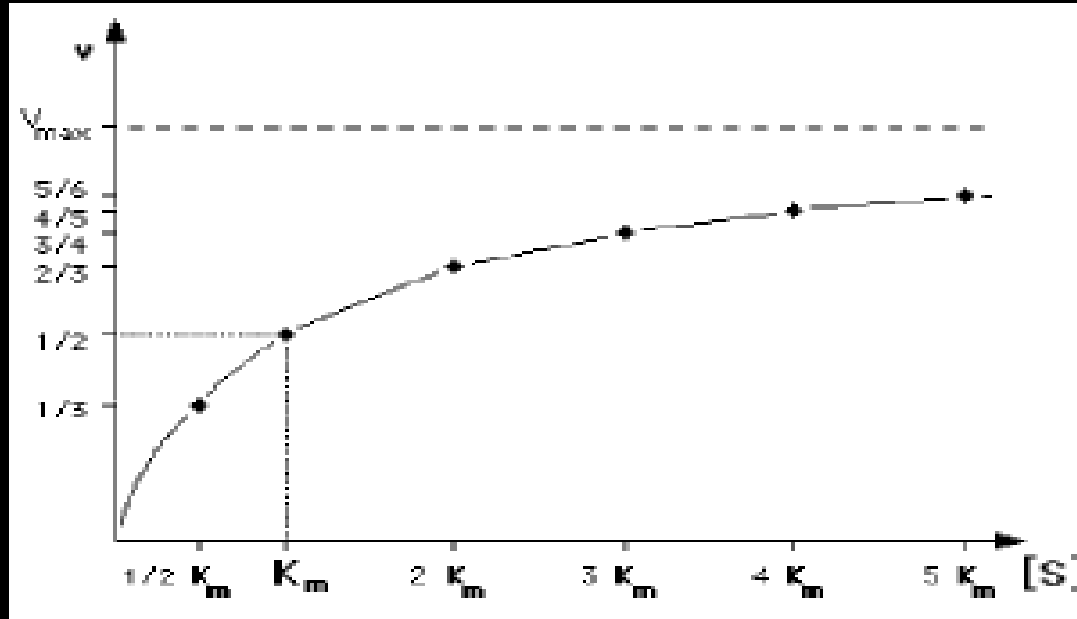
$$v = v_{\max} \frac{[E S]}{[E_{\text{total}}]} \quad (7)$$

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

Equation de MICHAELIS & MENTEN :

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

7. Hyperbole de Michaelis-Menten



- 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.
- 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

8. L'équation des inverses de LINEWAEVER et BURK.

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

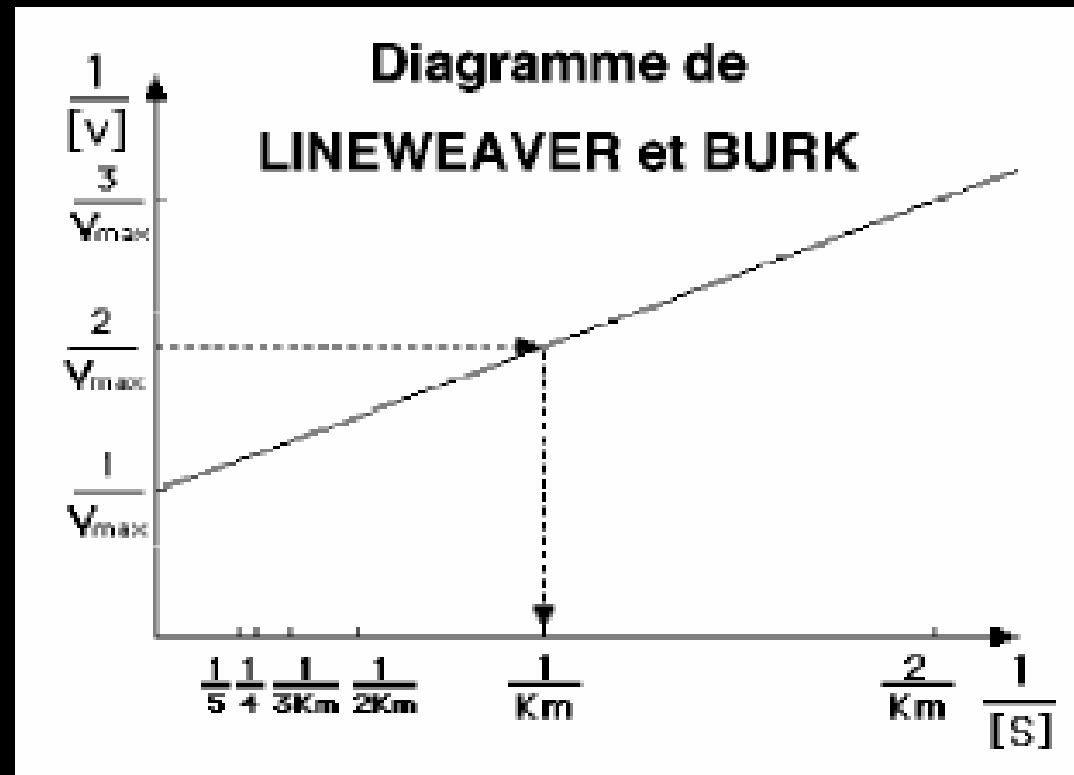
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} \quad (20)$$

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

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

L'équation de Michaelis & Menten prend alors une allure de fonction linéaire de type $y = ax + b$.

9. La représentation de de Lineweaver et Burk

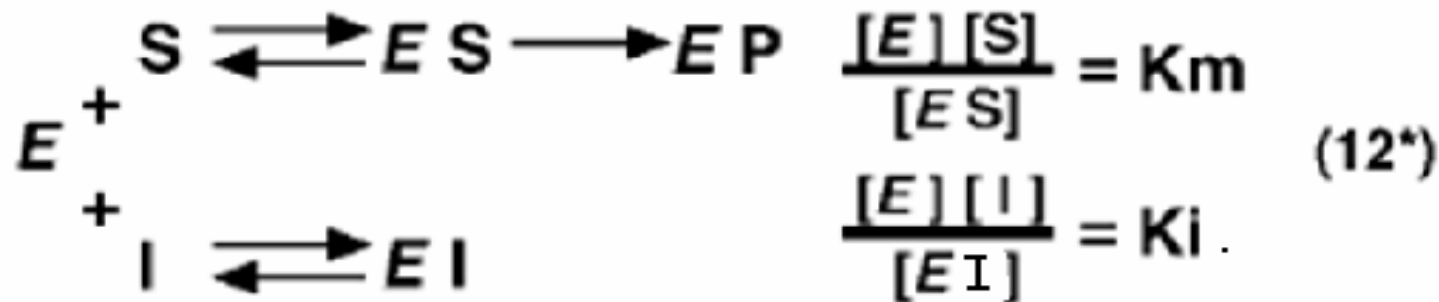


Une telle droite est facile à tracer à partir des mesures expérimentales, pourvu qu'on exprime les résultats en inverses des vitesses initiales en fonction des inverses des concentrations de substrat choisies. Cette extrapolation permet de déterminer graphiquement les valeurs cherchées des constantes **V_{max}** et **K_m** .

III. Cinétique enzymatique d'inhibition

A. Inhibition compétitive

1. Inhibition compétitive (équation)



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

$$E = ES(1 + K_m/[S] + K_m/[S] \cdot [I]/K_i)$$

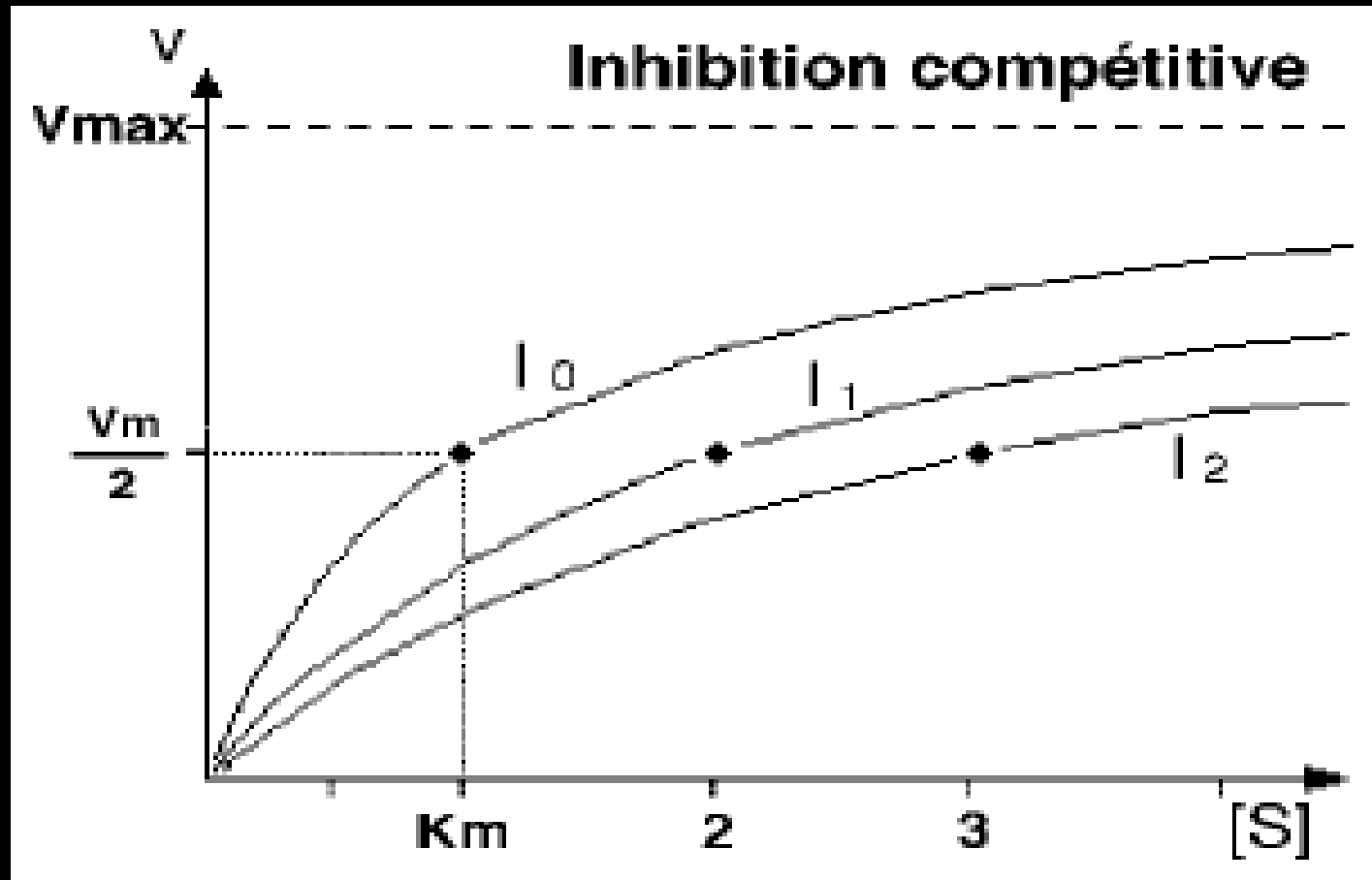
$$E = [ES] \left[1 + K_m/[s](1 + [I]/K_i) \right]$$

$$V/V_{\text{max}} = [ES]/[E_t] = 1 / 1 + K_m/[S] \cdot [1 + [I]/K_i]$$

$$V = V_{\text{max}} \cdot [S] / [S] + K_m(1 + [I]/K_i) \quad (18)$$

$$1/V_i = 1/V_{\text{max}} + K_m/V_{\text{max}} \cdot [S](1 + [I]/K_i)$$

2. Inhibition compétitive (hyperbole)

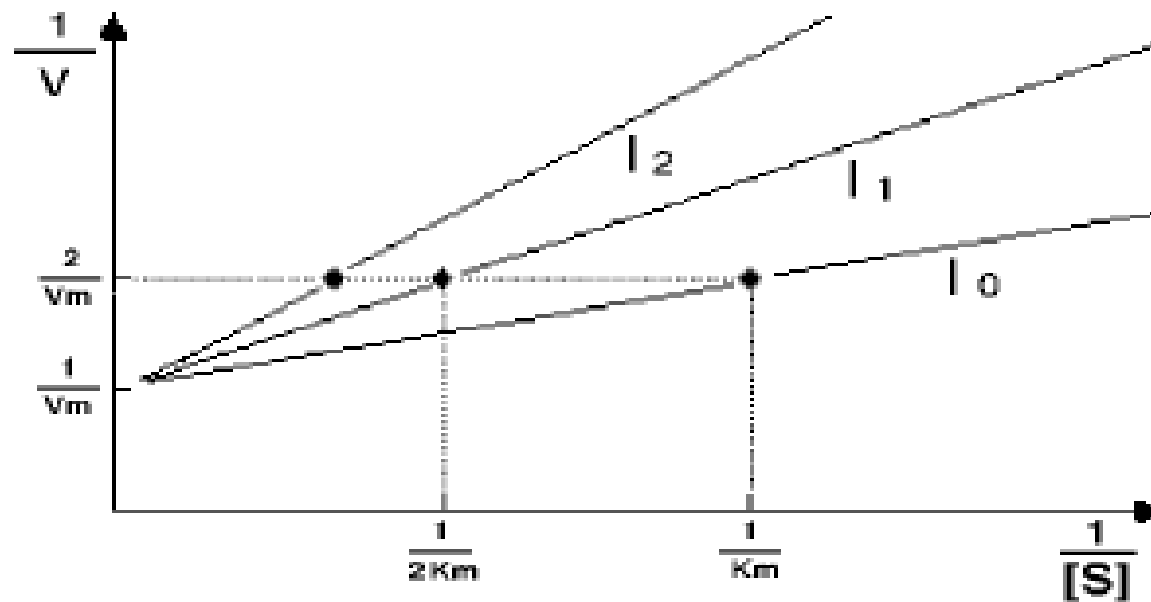


Le graphe représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat va donc dépendre de la concentration de l'inhibiteur. On observe que la vitesse maximum est inchangée

3. Inhibition compétitive (double inverse)

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

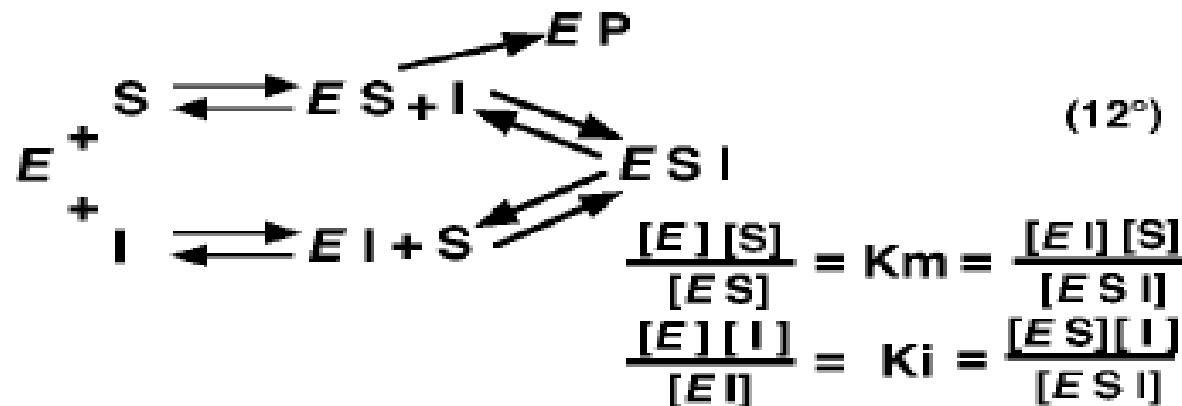
Inhibition compétitive



Ce graphe montre la droite présentant la situation sans inhibiteur (I_0) et les droites représentant l'effet des $[I]$ 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 $[I]$ d'un inhibiteur compétitif.

B. Inhibition non compétitive

1. Inhibition non compétitive (équation)



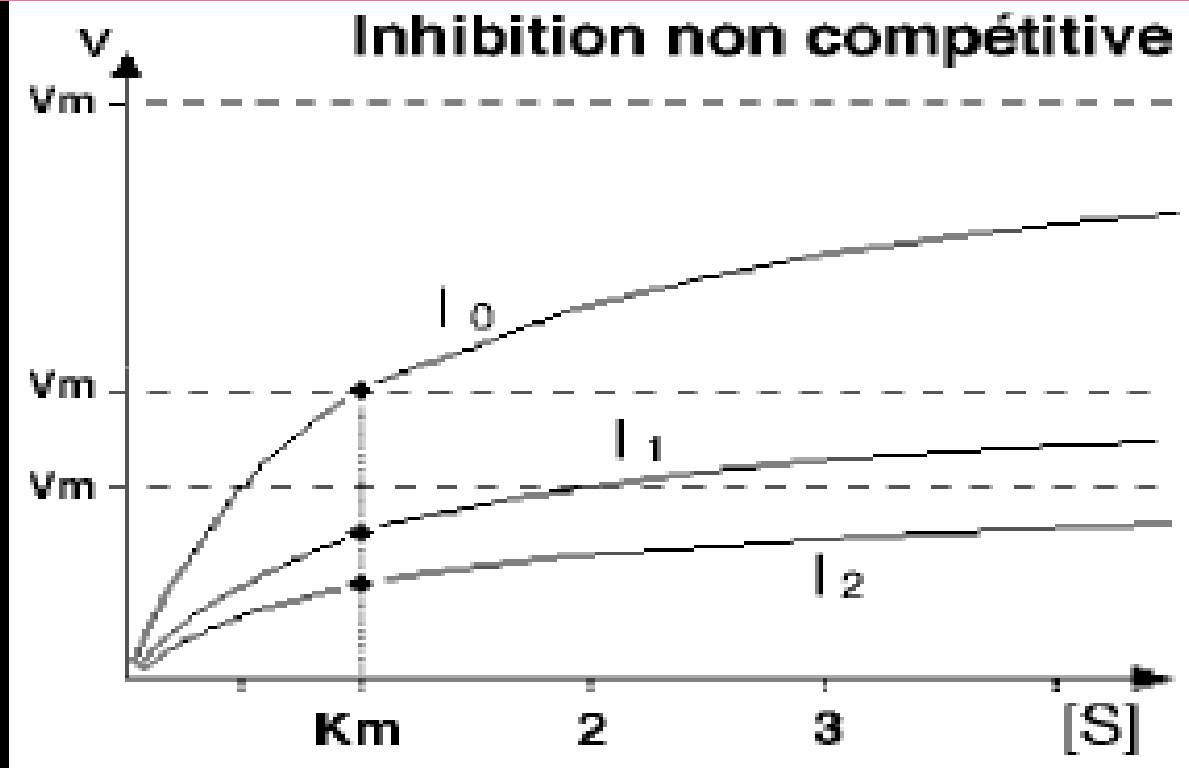
$$[E_{\text{total}}] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad (9^\circ)$$

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

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

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

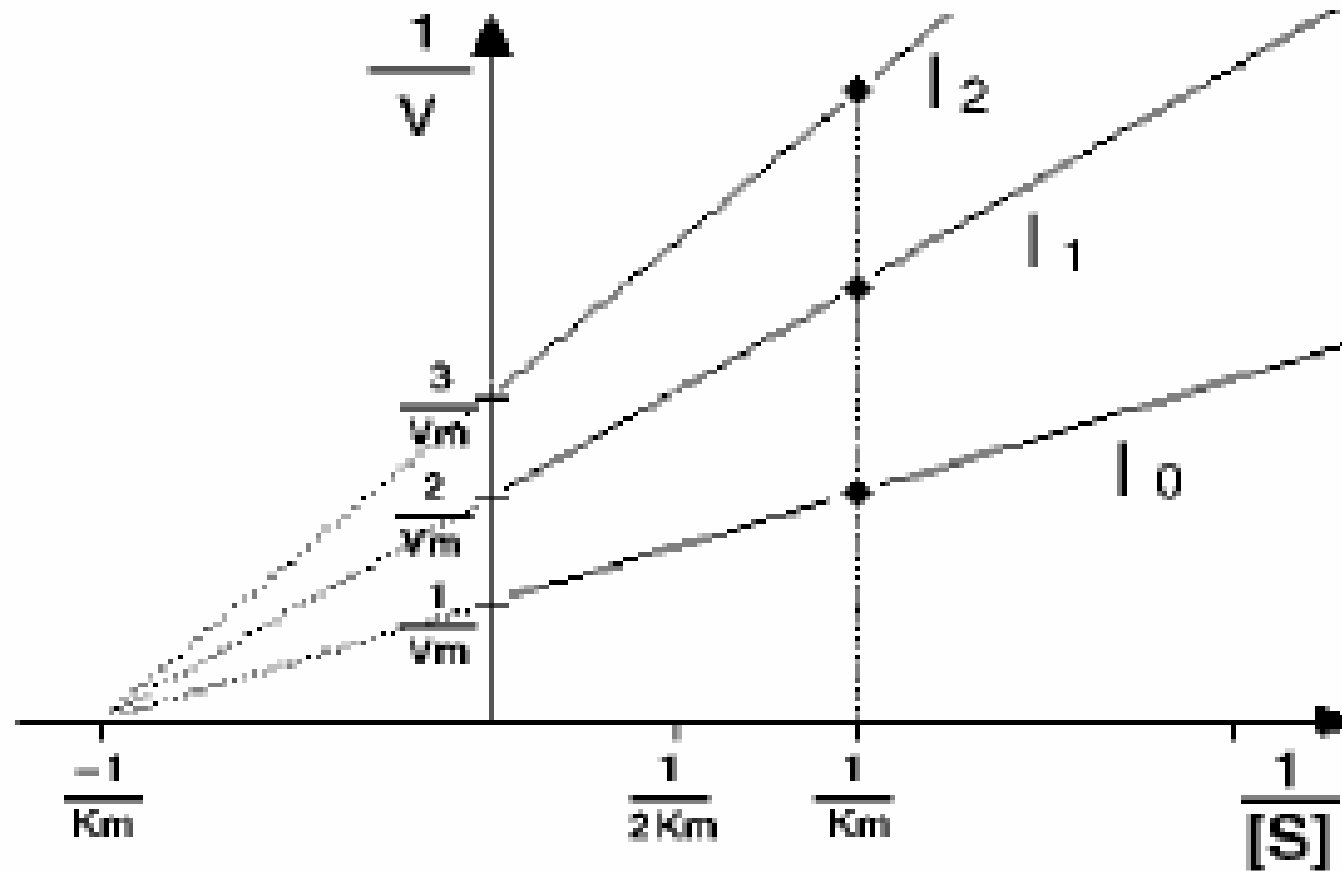
2. Inhibition non compétitive (hyperbole)



- La **vitesse maximum** change en fonction de la $[I]$ de l'I puisque la $[E]$ de l'enzyme, même à $[S]$ 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'I n'affecte pas la liaison de l'enzyme avec le substrat.

3. Inhibition non compétitive (double inverse)

Inhibition non compétitive



L'inverse de la vitesse maximum augmente avec la concentration de l'inhibiteur de même que la pente de la droite.

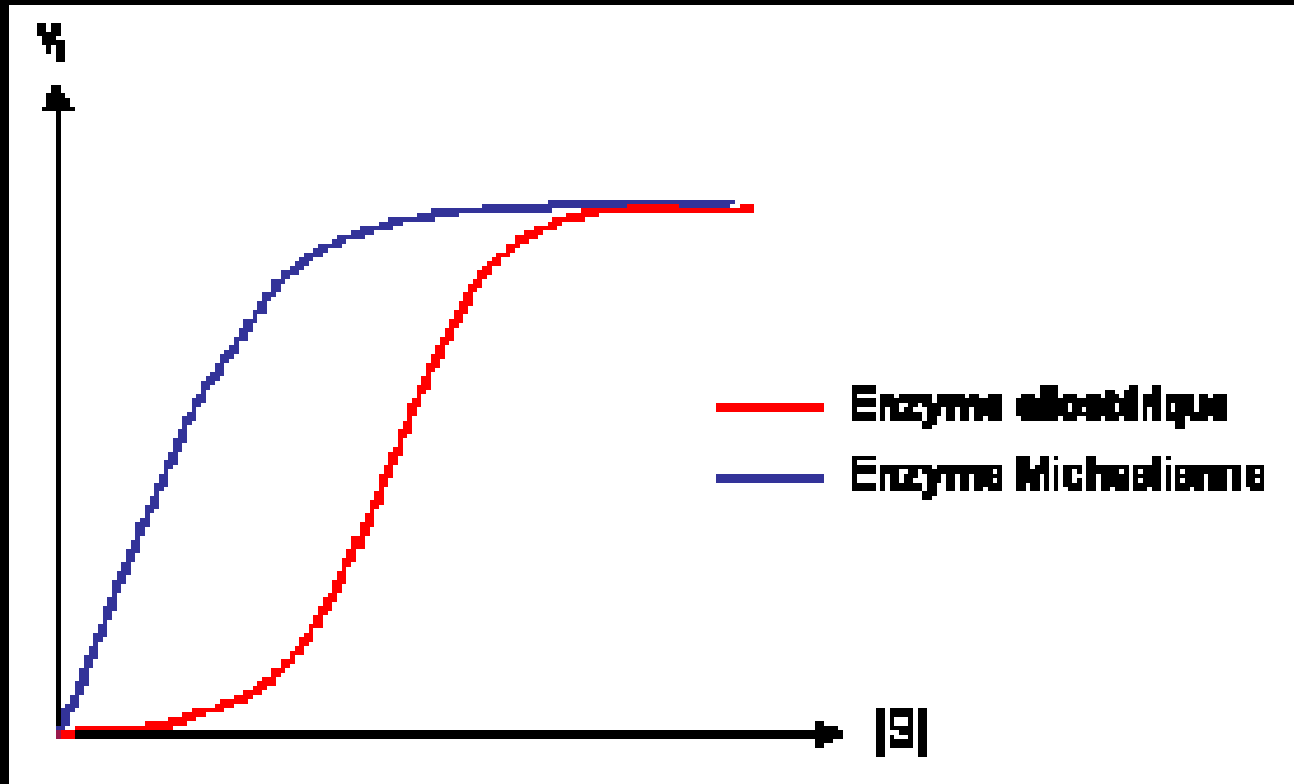
III. Effets allostériques

1. Allostérie

Propriétés de certaines protéine 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. On peut distinguer deux types d'effecteurs:

- Effecteurs positifs: Ce sont des modulateurs + qui changent la structure enzymatique en une configuration plus active
- effecteurs négatifs: Ce sont des modulateurs- qui changent la structure de l'enzyme en une configuration moins active.
- L'enzyme à effecteurs est dite **allostérique**.
- Une enzyme allostérique joue le rôle de **régulateur** d'une voie métabolique. L'enzyme est alors **régulateur allostérique à pH variable**

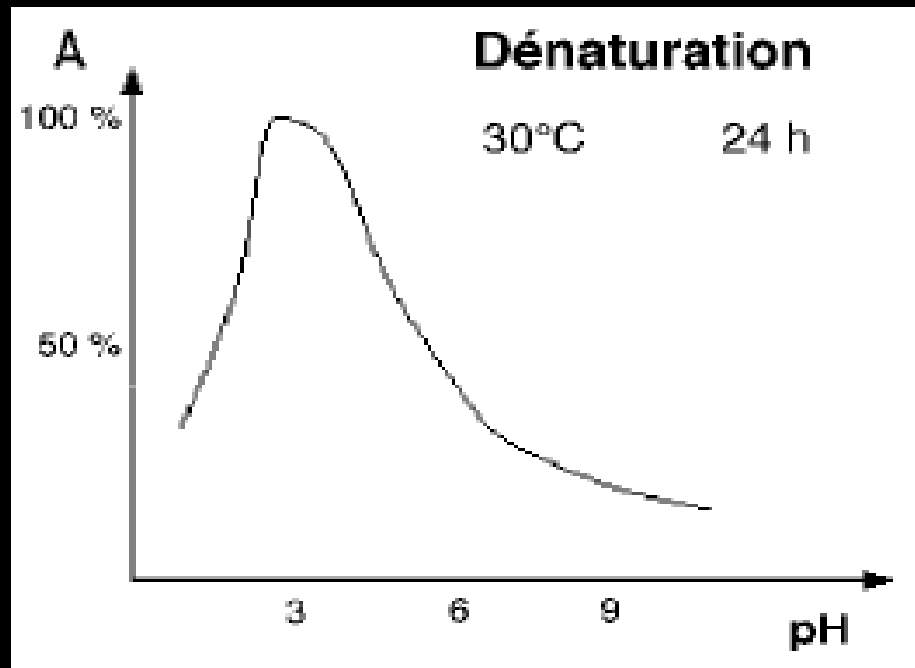
2. Diagramme de Hill



Cette **cinétique allostérique** est plus lente que la cinétique michaelienne pour les **petites** $[S]$ et devient plus rapide au-delà. 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.

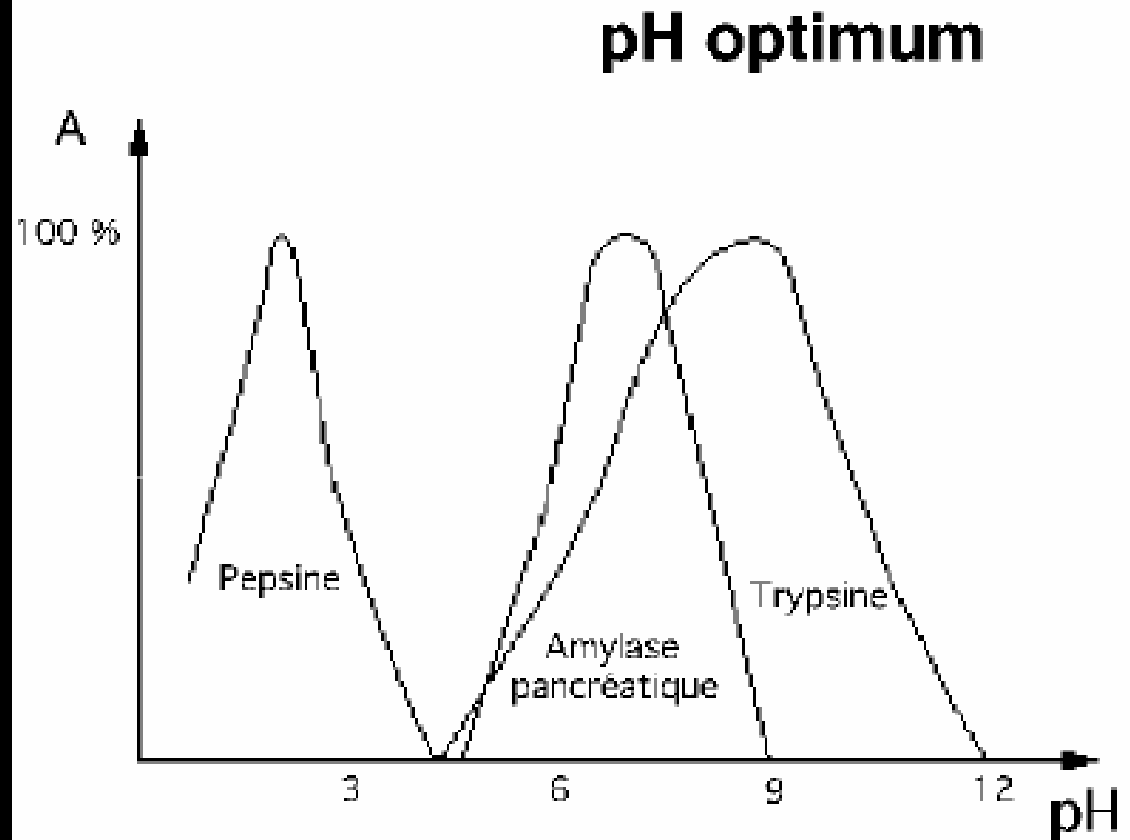
IV. Effet des constantes physiques

1. Effet du pH



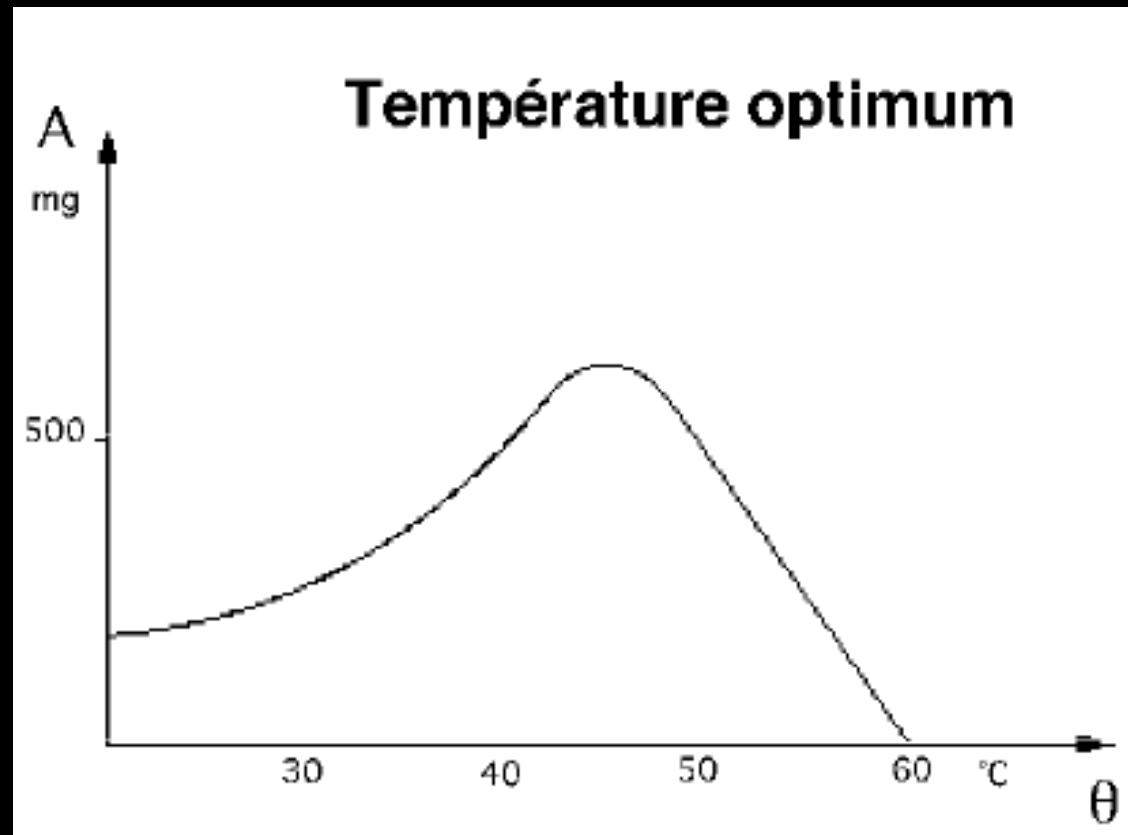
A pH 3 cette enzyme a été conservée dans des conditions optimales et son activité résiduelle est la plus grande : 100%. A pH 6 l'enzyme a subi une dénaturation partielle si bien qu'au bout de 24 heures son activité n'est plus que de la moitié de ce qu'elle aurait été si on l'avait conservée à pH 3. A pH 9 ou bien en dessous de pH 3, cet effet dénaturant est encore plus marqué.

- **Le pH optimum**



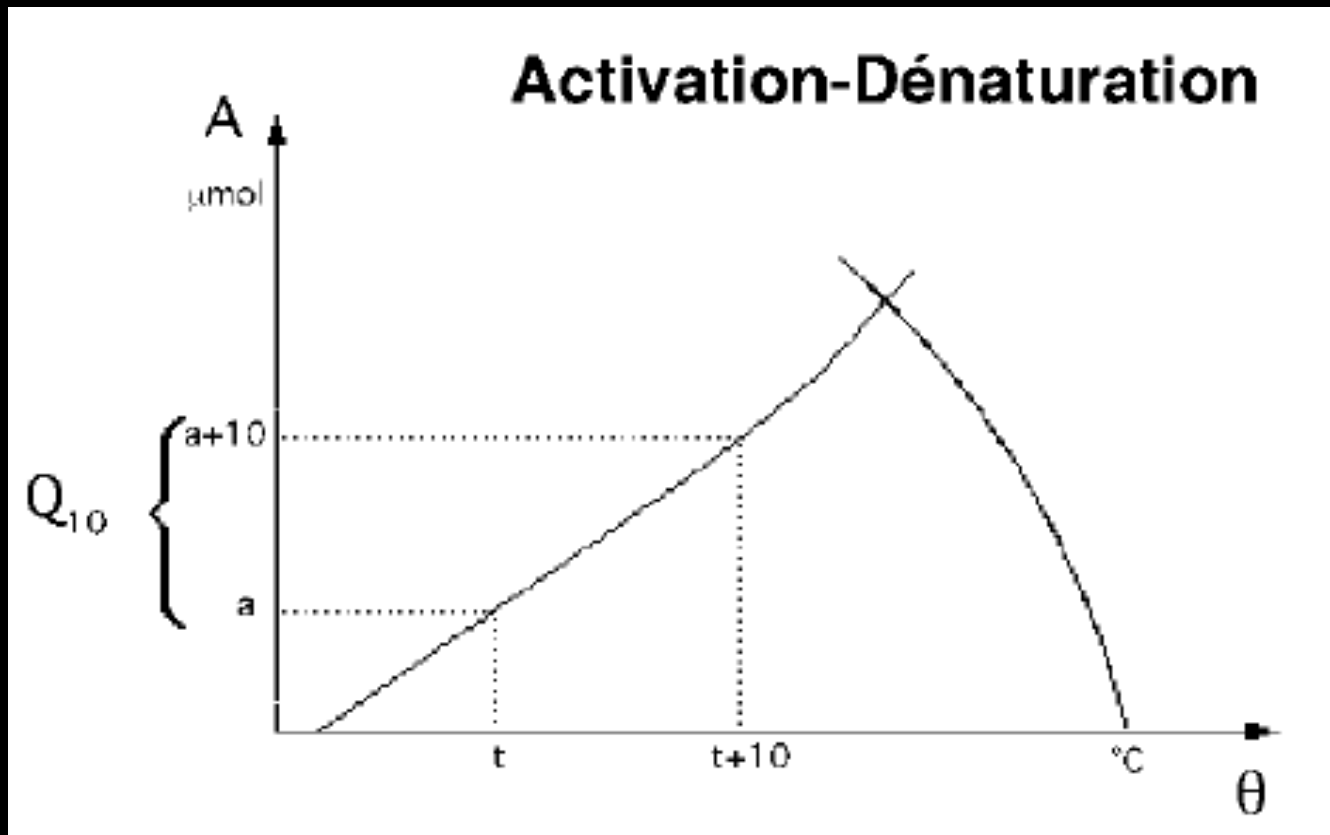
L'activité de la pepsine est maximum pour un milieu **très acide comme celui de l'estomac** où elle est sécrétée. Au contraire les enzymes pancréatiques comme l'amylase et la trypsine, ont un pH optimum d'action plus **alcalin car dans le duodénum où elles exercent leur activité le pH est normalement proche de 8.**

2. Effet de la température



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.

3. Activation ; dénaturation



- Pour les températures inférieures à 40°C , la chaleur du milieu apporte un supplément d'énergie qui facilite la réaction enzymatique.
- Au dessus de 40 ou 45°C . la chaleur dénature les structures secondaires et tertiaires de l'enzyme et l'activité tend rapidement vers zéro.

V. Classification des enzymes

- 1. Oxydo-réductases – EC1:** Catalysent les R. d'oxydoréduction.
- 2. Transférases – EC2:** Transfèrent les radicaux
- 3. Hydrolases – EC3:** catalysent la rupture des liaisons avec fixation de l'eau.
- 4. Lyases – EC4:** Catalysent la rupture des liaisons de C-C, C-N, C-O, C-S...avec formation d'une double liaison.
- 5. Isomérases – EC5:** Catalysent les isomérisations L-aa en D-aa, Gal en Glu.
- 6. Ligases (ou synthétases) – EC6:** Catalysent la condensation de deux molécules couplées avec la rupture d'une liaison riche en énergie

VI. Terminologies

1.Site actif de l'Enzyme: Partie de l'Enzyme sans CoA, composée de quelques aa, adaptée à la fixation de S et sa transformation. Ce site actif composé de deux sites: **Site catalytique** qui agit sur le S et le faire subir la réaction et le **site de fixation** qui lie le S avec des liaisons faibles.

2.Site allostérique: Une partie de l'enzyme allostérique sur la quelle s'effectue la fixation des effecteurs allostériques.

3.Effecteur allostérique: Substance pouvant modifier la structure native de l'enzyme allostérique afin de l'activer ou de la désactiver.

4.Coenzyme: Fraction aprotéique de l'Enzyme à CoA, fixe le S. Elle peut être organique comme les tétrapyrroliques (l'hème de l'Hb), métallique comme le Fer , Mn, Mg... Ou encore des dérivés vitaminiques hydrosolubles.

- 5. L'activité enzymatique:** est le nombre de molécules de S transformés par minute par une molécule d'enzyme dans les conditions optimales.
- 6. L'activité spécifique:** est le nombre d'unités d'enzyme contenu par mg de protéines.
- 7. L'unité internationale d'enzyme:** est la quantité d'E qui transforme une μmol de S par min dans les conditions optimales.
- 8. Le Katal:** Unité qui représente une quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une mole de substrat en une seconde. Il y a le **micro katal** et le **nano katal**