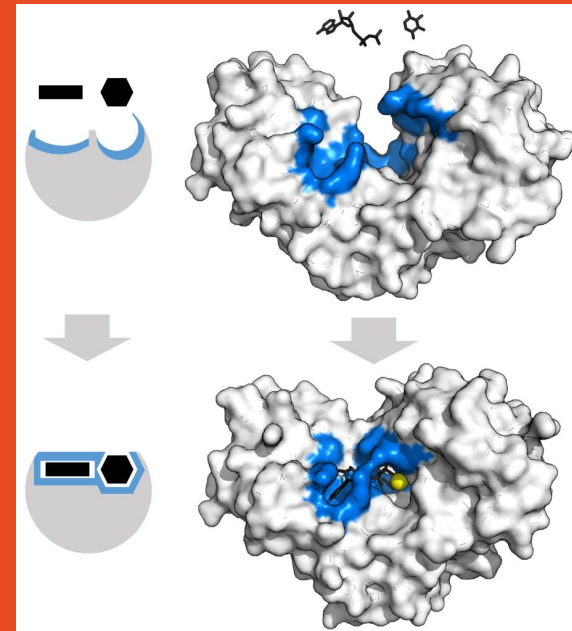
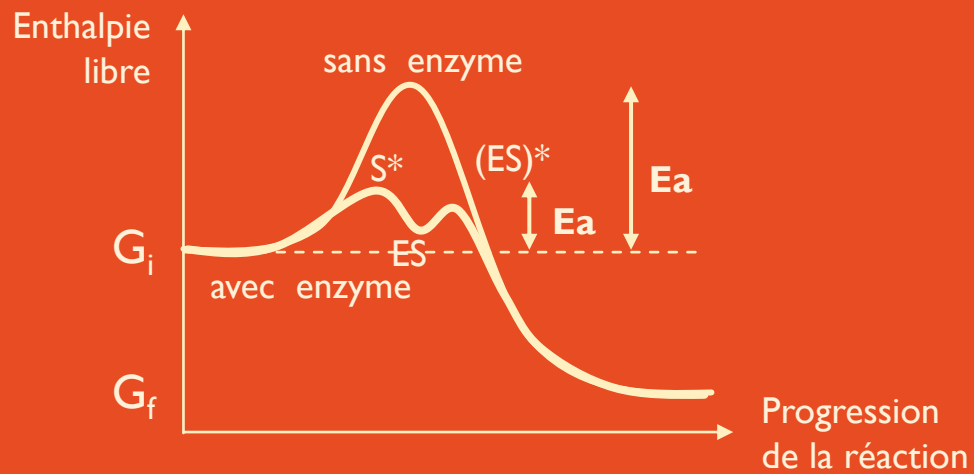


SV-E-3 LES ENZYMES ET LA CATALYSE DES RÉACTIONS

SV-E LE MÉTABOLISME CELLULAIRE



EXTRAIT DU B.O.

Savoirs visés

On distingue les enzymes à comportement coopératif (enzymes allostériques) et à comportement michaelien.

Pour une enzyme oligomérique, l'allostérie correspond à l'influence d'un site de fixation d'un ligand sur un autre qu'il soit identique (effet homotrope) ou différent (effet hétérotrope).

Les principaux paramètres cinétiques permettant de décrire une activité enzymatique sont V_{\max} , K_M ou $K_{0,5}$.

Les enzymes sont des biocatalyseurs et jouent souvent le rôle d'agents de couplage entre réactions. La catalyse enzymatique implique la formation d'un complexe enzyme-substrat au niveau du site actif de l'enzyme. Le site actif est à l'origine de la spécificité de substrat et de réaction. Il est constitué d'acides aminés jouant un rôle dans la fixation du substrat, dans la catalyse enzymatique ou dans les deux phénomènes à la fois.

Plusieurs facteurs modifient l'activité enzymatique et donc les réactions du métabolisme :

- la quantité d'enzyme, liée à l'expression génétique et à sa localisation (adressage)
- les conditions physico-chimiques (pH, T)
- les modifications conformationnelles de l'enzyme par modification covalente ou par fixation d'un ligand.

Les enzymes sont des éléments de spécialisation des cellules ou des compartiments cellulaires.

Capacités exigibles

- Réaliser le suivi expérimental d'une réaction enzymatique :
 - Obtention d'une cinétique et détermination de la vitesse initiale ;
 - Construction d'une courbe $V_i = f([S]_0)$ et linéarisation en double inverse ;
 - Détermination de K_M , V_{\max} et de l'efficacité catalytique.
- Argumenter le comportement coopératif ou michaelien d'une enzyme sur la base de la courbe $V_i = f([S])$
- Comparer et discuter les principales caractéristiques structurales et fonctionnelles des enzymes michaeliennes et des enzymes allostériques (enzymes à comportement coopératif).
- Argumenter le rôle d'agent de couplage à l'aide d'exemples de couplages chimio-chimiques.
- Relier la spécificité de substrat et de réaction à la structure tridimensionnelle et aux interactions du complexe enzyme-substrat.
- Exploiter des données de modélisation moléculaire.
- Exploiter des résultats de mutagenèse ou autres pour expliquer un mécanisme catalytique.
- Comparer les effets des inhibiteurs compétitif et non compétitif sur les paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne.
- Argumenter, sur un exemple, la diversité des effecteurs allostériques et de leurs effets.
- Expliquer l'importance physiologique et pharmacologique des effecteurs sur la base de quelques exemples.
- Analyser et interpréter des données cinétiques en présence de différents types d'effecteurs.

INTRODUCTION

- Dans cellule, plusieurs milliers de réactions biochimiques se déroulent en même temps → **métabolisme**.
- Plusieurs réactions biochimiques se succèdent → **voies métaboliques**
 - Certaines voies libèrent de l'énergie en dégradant la matière organique → **catabolisme**
 - Certaines voies consomment de l'énergie pour synthétiser la matière organique → **anabolisme**
- Lois de la Thermodynamique: réactions spontanées ssi $\Delta rG' \ll 0$
 - certaines réactions spontanées infiniment lentes
 - Accélération des réactions via **catalyseurs** :
 - ✓ **substance qui agit en petite quantité pour accélérer une réaction mais sans être consommée par la réaction.**
 - ✓ Dans la cellule : réactions métaboliques à très grande vitesse grâce à des catalyseurs particuliers : les **enzymes**.
 - ✓ Catalyse = nécessité cellulaire (↗ vitesse de réaction)

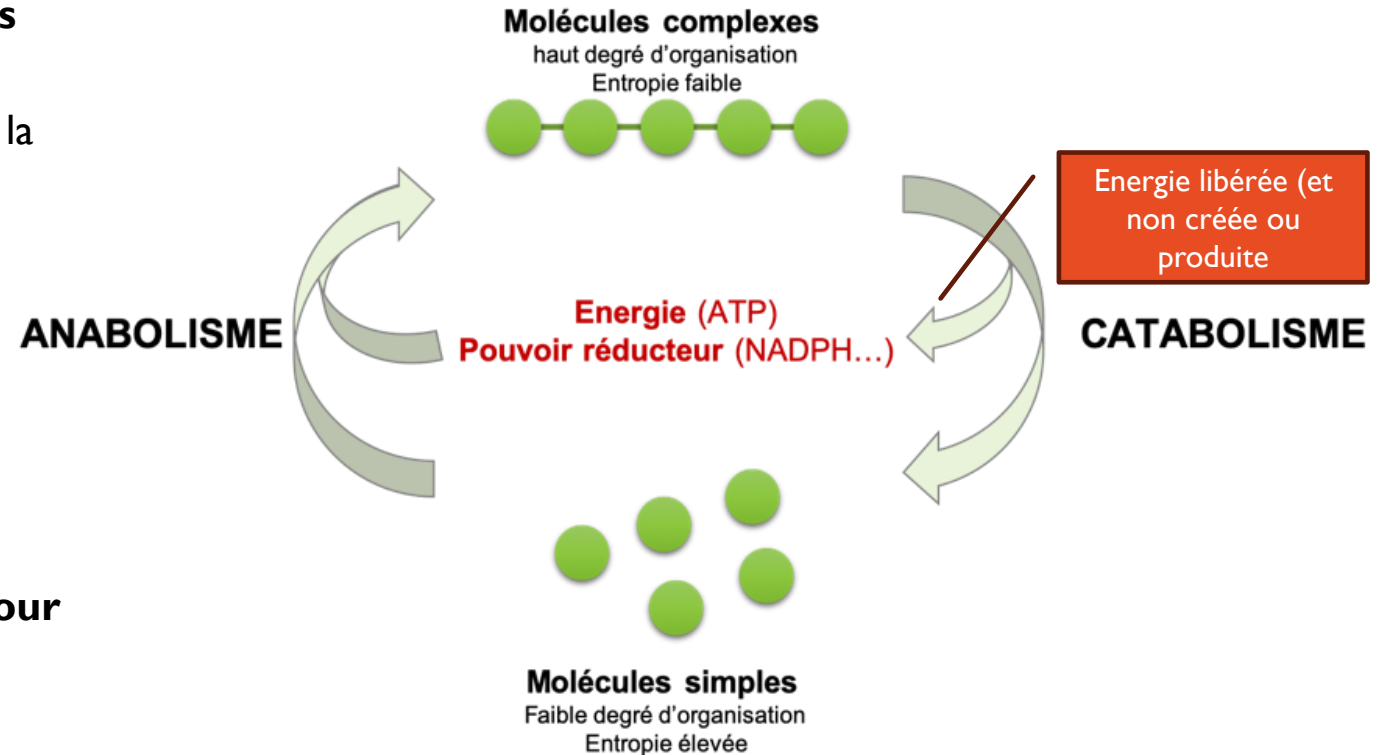
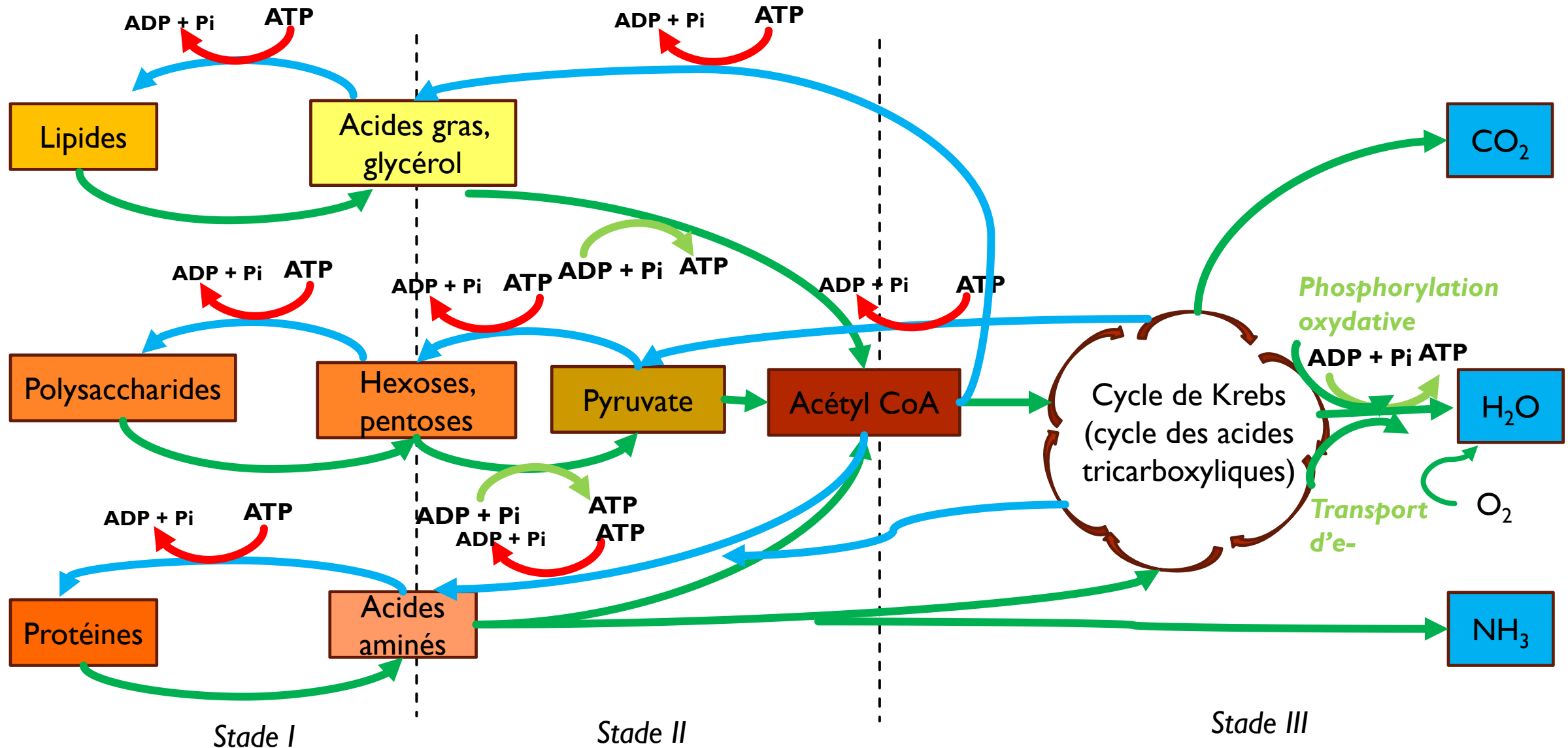


Figure 1 :Vue simplifiée du métabolisme (E. Bouguyon)

Quelles sont les caractéristiques des enzymes ? Comment fonctionnent-elles ?

LA CELLULE TRANSFORME LA MATIÈRE ET CONVERTIT L'ÉNERGIE



Les 3 stades du métabolisme (d'après Karp 2016)

PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaélienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

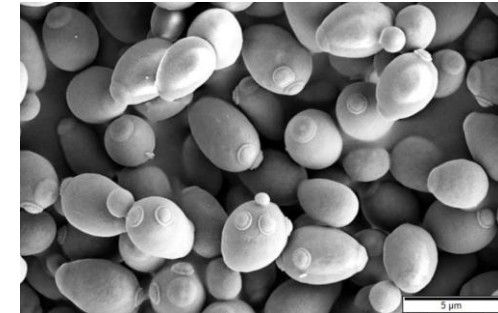
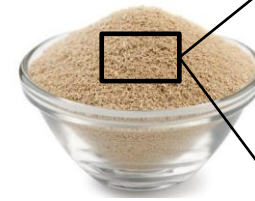
I. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

A. DÉCOUVERTE HISTORIQUE

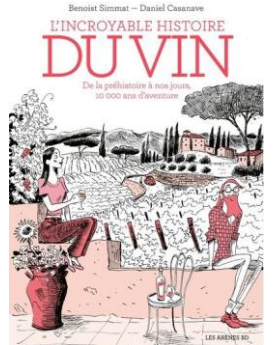
- A partir du 19^e siècle, découverte des enzymes liée à étude de la **fermentation alcoolique** chez la **levure** - utilisée pour produire de l'alcool à partir de sucre (bière, vin).
 - W. Kühne (1878) - la fermentation requiert des catalyseurs sans équivalent en chimie, on les nomme **enzymes** (« en- » = dans, « -zyme » = levure).
 - Les frères Buchner (1897) - la fermentation peut se produire en dehors de la cellule.
 - E. Fischer (1894) - les enzymes qui catabolisent les sucres chez la levure peuvent distinguer différents sucres
→ **notion de spécificité** (de substrat)
 - J. Sumner (1926) – une enzyme (extraite du haricot sabre) est en fait une **protéine**.

→ **Enzyme = biocatalyseur de nature protéique**

La levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*)
et son utilisation par l'Homme



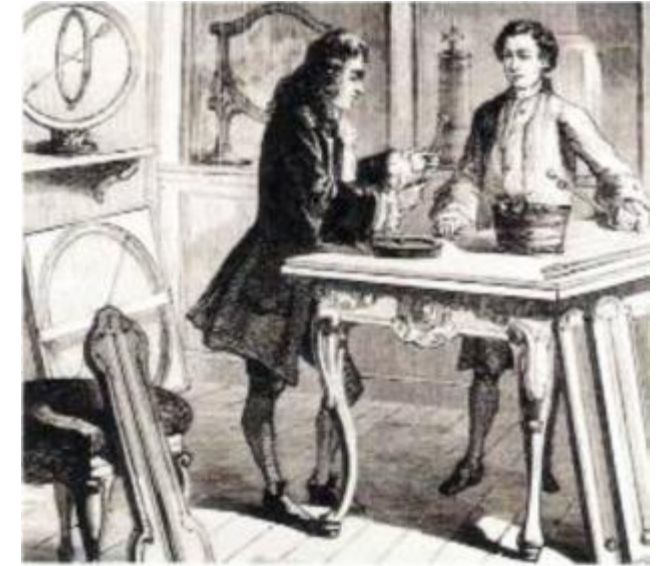
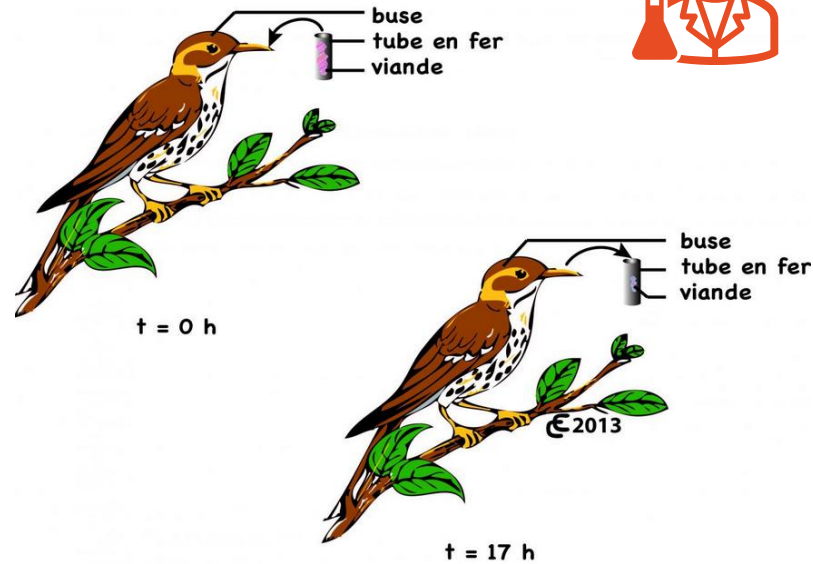
Haricot sabre
(*Canavalia gladiata*)



I. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

A. DÉCOUVERTE HISTORIQUE

Réaumur (1683 – 1757), naturaliste français a réalisé les premières expériences sur la digestion.



Réaumur (1683 – 1757), mise en évidence de substances chimiques digestives (enzymes)

Voici l'une d'elles (1752), faite sur une buse qui est un rapace qui rejette par son bec ce qui n'est pas digéré par son estomac (plumes, os, ...).

«Une buse, à qui j'avais seulement arraché quelques plumes des ailes pour la laisser vivre en liberté dans mon jardin, fut destinée à des expériences.

Je plaçai un morceau de viande dans un tube de fer ouvert par les deux bouts. Le tube ainsi garni fut donné à la buse pour son premier déjeuner.

Ce ne fut que le lendemain que je trouvai le tube qu'elle venait de rendre : il avait toute sa rondeur ; on ne trouvait sur sa surface extérieure aucune trace de frottements.

Le morceau de viande avait été réduit peut-être au quart de son premier volume ; ce qui en restait était couvert par une espèce de bouillie, venue probablement des parties qui avaient été dissoutes.»

I. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

A. DÉCOUVERTE HISTORIQUE



Spallanzani et les travaux sur le suc gastrique: mise en évidence de substances digestives dans le suc gastrique

Lazzaro Spallanzani (1729 –1799)



1787 :

«J'en fis entrer dans un tube en verre ; je mis avec ce suc quelques brins de chair . Je le plaçai dans un fourneau où l'on éprouvait un peu près la chaleur de mon estomac ; j'y mis aussi un tube semblable avec une égale quantité de chair , mais je le remplis avec une quantité d'eau qui était la même que celle du suc gastrique pour me servir de terme de comparaison.

Voici les événements que j'observai. La chair qui était dans le suc gastrique commença à se défaire avant 12 heures, et elle continua insensiblement jusqu'à ce que, au bout de 35 heures, elle ait perdu toute consistance . Il n'en fut pas de même dans le petit tube où j'avais mis de l'eau : la plus grande partie des fibres charnues plongées dans l'eau étaient encore entières au bout du 3ème jour »

I. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

A. DÉCOUVERTE HISTORIQUE

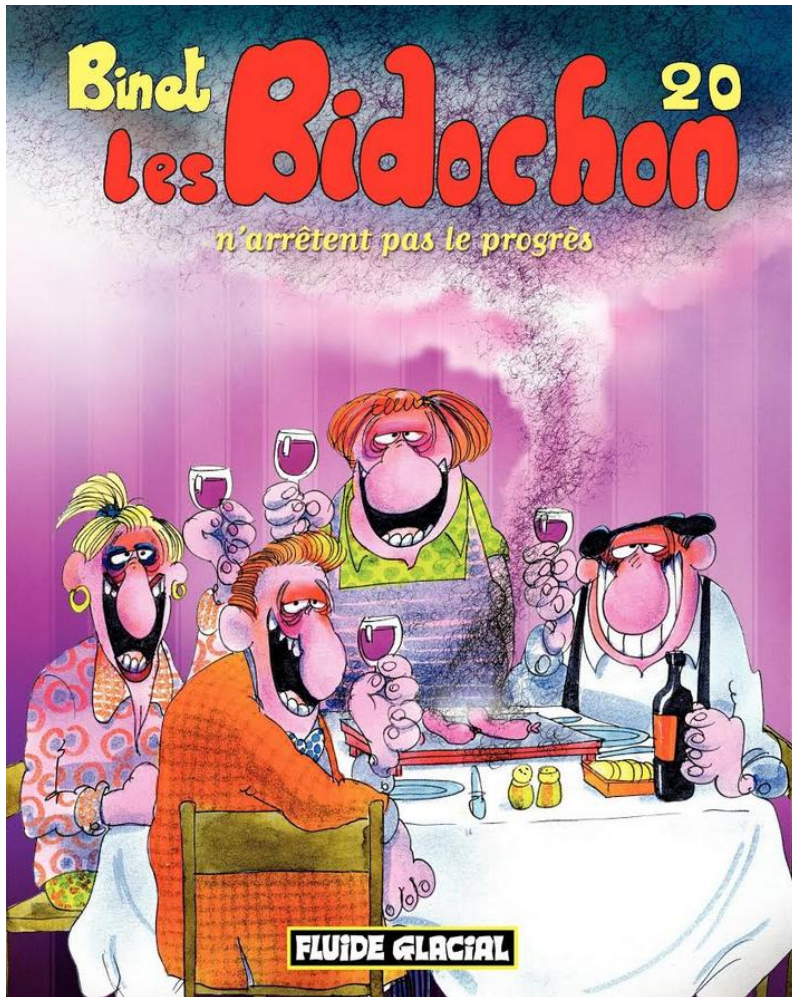


- 1700 : premières études connues sur la digestion de la viande par les **sécrétions de l'estomac**
 - **1713 : Réaumur** montre que la viande introduite dans un tube métallique, percé de trous et absorbé par une buse (oiseau), peut être partiellement digérée ;
 - **1783 : Spallanzani** se procure du *suc gastrique* de buse, et réalise la première digestion expérimentale in vitro.
- Fin 19^e, les scientifiques cherchaient à comprendre le fonctionnement de la fermentation.
Deux hypothèses :
 - Justus von Liebig : les réactions de fermentation sont similaires aux réactions organiques en tube à essai
 - Louis Pasteur : la fermentation n'a lieu que dans une cellule intègre
- **1878** : Kühne découvre que la fermentation requiert des catalyseurs qui n'ont pas d'équivalent en chimie ; on les nomme **enzymes** (« en- » = dans ; « -zyme » = levure).
- 1897 : Les **frères Büchner** extraient du « **jus de levure** » par broyage de levures avec du sable suivi d'une filtration sur papier filtre. Afin de conserver cette préparation, ils y ajoutent du sucre (comme pour une confiture). Cela déclenche la production de gaz (CO₂) pendant plusieurs jours, ce qui révèle la présence d'une **réaction de fermentation**.
 - La fermentation ne requiert pas la présence d'une cellule intègre
- 1894 : **Fischer** montre que les enzymes qui catabolisent les sucres chez la levure peuvent distinguer les différents types de sucres (spécificité). Il en découle la notion de **spécificité** du substrat et l'idée qu'il se produit une **interaction** entre **l'enzyme** et son **substrat** (modèle clé-serrure).
- 1926 : Sumner montre que l'uréase du haricot sabre (*Canavalia gladiata*) est une **protéine**.
- Années 1930 : Northrop & Kunitz étudient plusieurs autres enzymes et généralisent la conclusion de Sumner : les enzymes sont toutes des protéines.

I. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

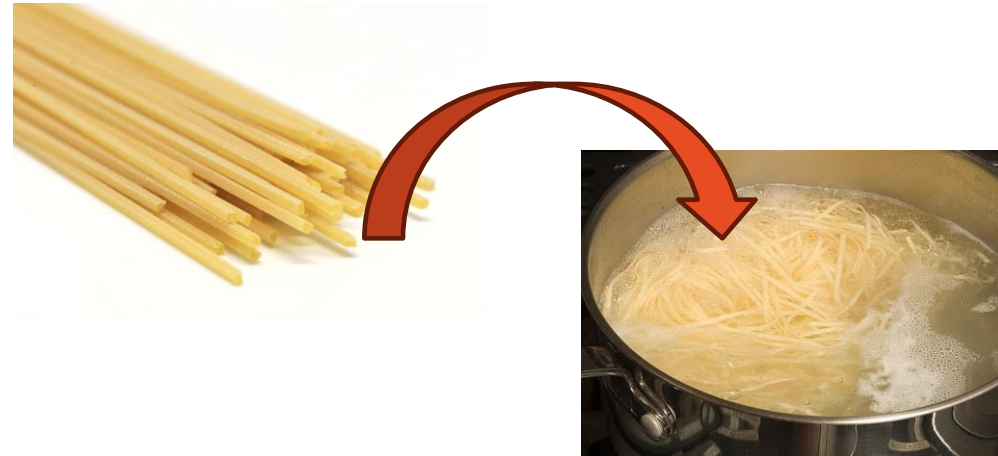
A. DÉCOUVERTE HISTORIQUE

Parce que les enzymes sont dans notre quotidien...



Expérience de votre professeure qui rate ses nouilles (c'est pas al dente et c'est pas bon...)

L'amidon : stable à température ambiante...
et même à 100 °C



Mais si l'on attendait très longtemps... on verrait la
quantité d'amidon diminuer

BILAN

- Enzymes : **catalyseurs spécifiques** d'un substrat.
 - Enzymes = **protéines**
- **ENZYMES** = biocatalyseur = catalyseur biologique (fonctionnant aux conditions physiologiques) = catalyseur de nature protéique

Rem : aujourd'hui on sait que certains ARN sont aussi des catalyseurs ; on les appelle des ribozymes.



PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

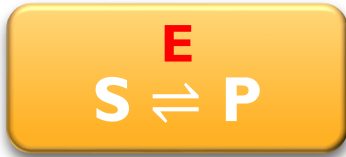
I. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

B. MÉTHODE D'ÉTUDE

Cinétique chimique = étude de la vitesse des réactions chimiques (en fonction de divers paramètres : température, pH, concentration...).

I. Réaction étudiée

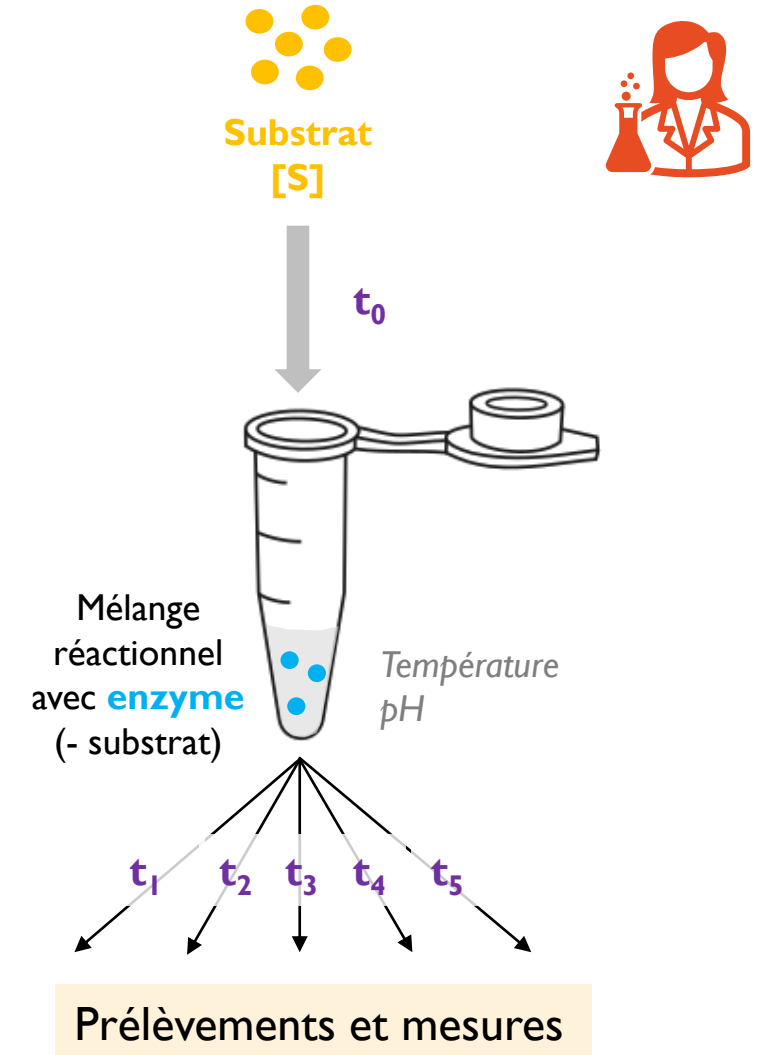
- On considère une réaction catalysée par une **enzyme monomérique (E)**



S : substrat
P : produit

2. Protocole pour l'étude cinétique d'une réaction :

- Préparation du **mélange réactionnel** (à T°C et pH souhaités) avec :
 - l'enzyme purifiée
 - tous les éléments nécessaires **sauf le substrat**
- Déclenchement** de la **réaction** par ajout du substrat manquant
- Mesure** de la quantité de produit formé **au cours du temps** (par spectrophotométrie, dosage...).
- Répétition** de l'expérience avec **différentes [S]** (\pm différentes [E])



I. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

B. MÉTHODE D'ÉTUDE



3. Vitesse de la réaction

- A partir des mesures, on trace le graphe :

$$[P] = f(\text{temps})$$

- On détermine alors la vitesse de la réaction :

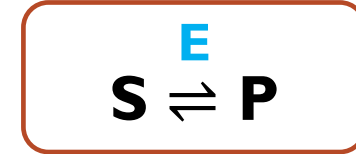
$$v = \frac{d[P]}{dt}$$

Résultats :

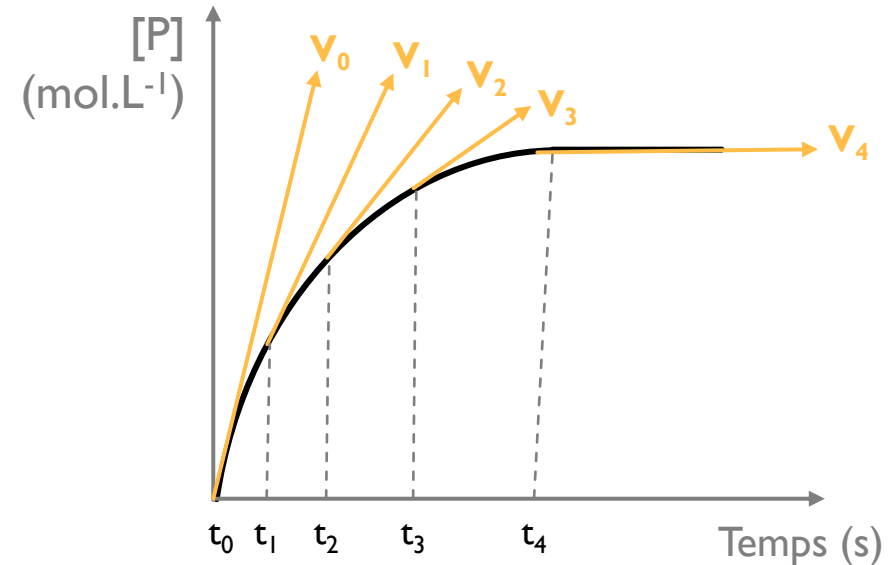
- La vitesse de réaction diminue au cours du temps.
- Après un certain temps, on atteint un **plateau**.

Interprétation :

- A t_0 , il n'y a que des réactifs (pas de produits), la réaction est : $S \rightarrow P$ $\Rightarrow V$ est max (V_0)
- Au cours du temps, le produit apparaît et la réaction inverse se déroule : $P \rightarrow S \Rightarrow V \searrow$
- Au bout d'un certain temps, le système atteint l'équilibre $\Rightarrow V = 0$



Evolution de la concentration en produit au cours du temps (E. Bouguyon)



I. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

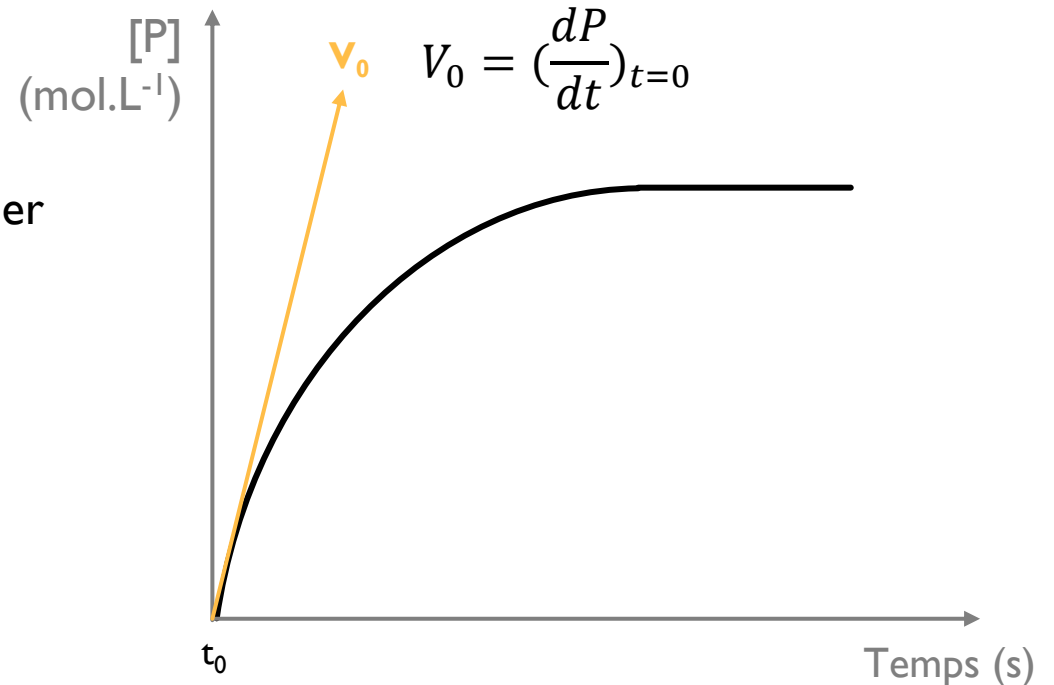
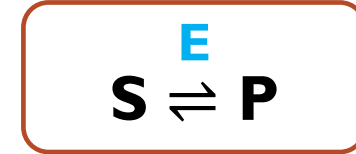
B. MÉTHODE D'ÉTUDE

3. Vitesse initiale

- Pour l'étude cinétique d'une enzyme, on utilise la **vitesse initiale (V_0)**.
- La mesure de V_0 est la meilleure approche pour déterminer **l'efficacité réelle (maximale) de l'enzyme** car :
 - **A t_0 , la réaction inverse ne se produit pas.**
 - **A t_0 , il n'y a pas de produits** qui pourraient interférer avec le fonctionnement de l'enzyme.

Conséquences :

- Etude cinétique sur des **temps courts**
- Recours à des **techniques** de mesure très **sensibles**



Evolution de la concentration en produit au cours du temps (E. Bouguyon)

I. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

B. MÉTHODE D'ÉTUDE

3. Vitesse initiale et [S]

- On **répète** plusieurs fois l'expérience et la mesure de V_0 avec **différentes concentrations en substrat [S]**
- On trace alors le graphe :

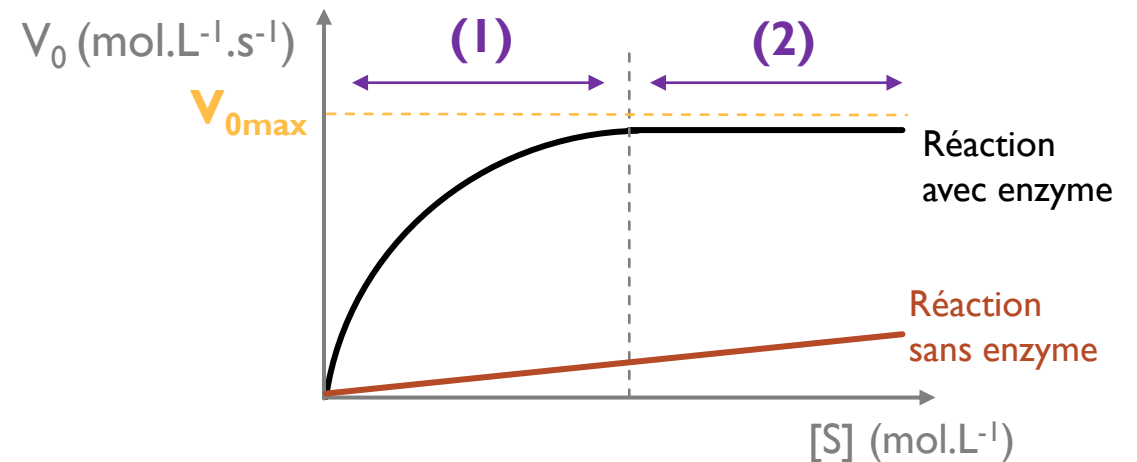
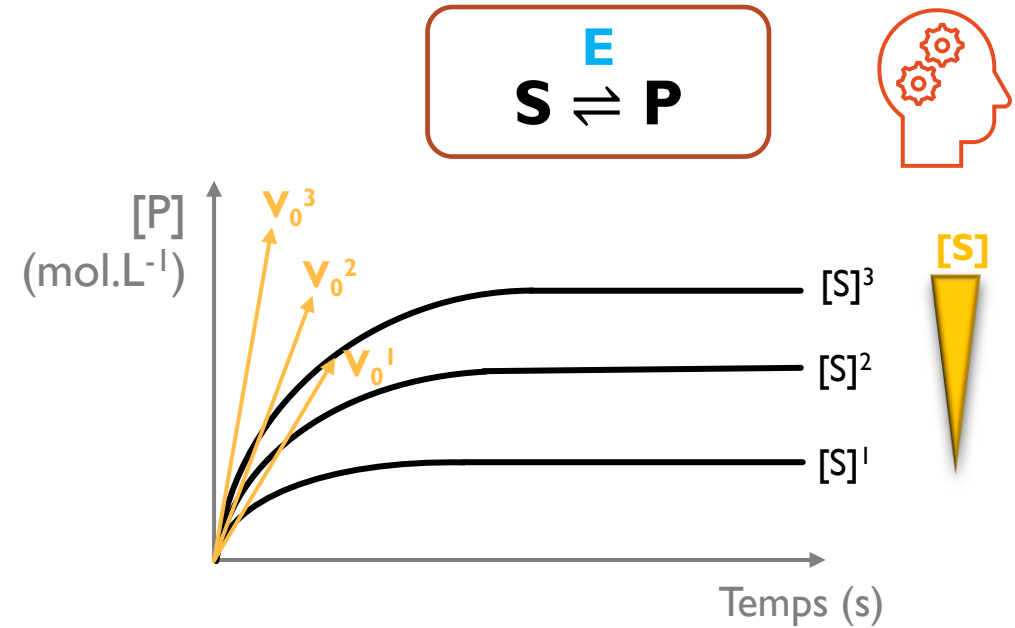
$$V_0 = f([S])$$

Résultats : courbe en 2 parties

- (1) La vitesse initiale augmente avec [S]
- (2) La vitesse atteint une valeur maximale (plateau)

Interprétation

- Il se produit un phénomène de **saturation de l'enzyme**
→ Au-delà d'un certain seuil de [S], l'enzyme atteint sa **vitesse de catalyse maximale (V_{0max})**.



I. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

B. MÉTHODE D'ÉTUDE



1. Réaliser le suivi cinétique d'une réaction biochimique pour différentes $[S]$, avec $[E]$ donnée



2. Pour une $[S]$ donnée, tracer la courbe : $[P] = f(\text{temps})$



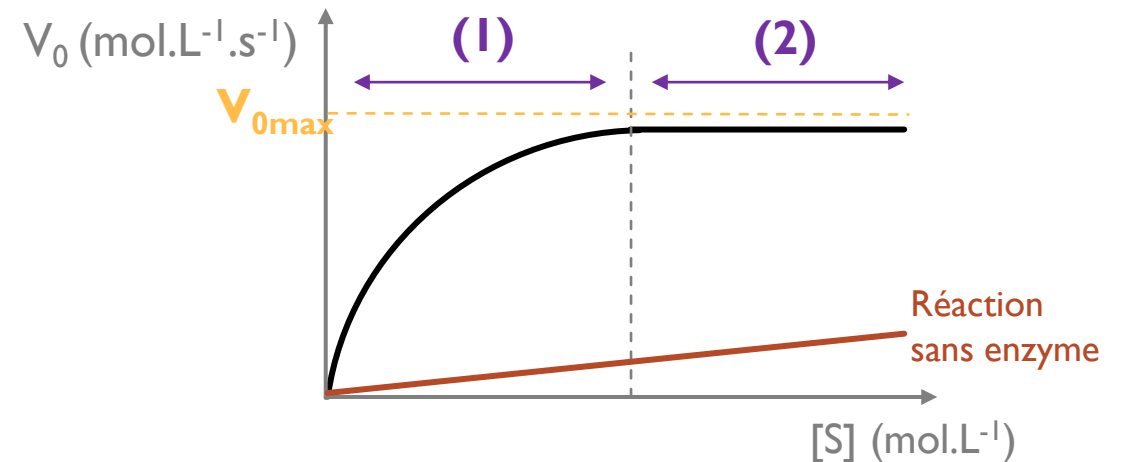
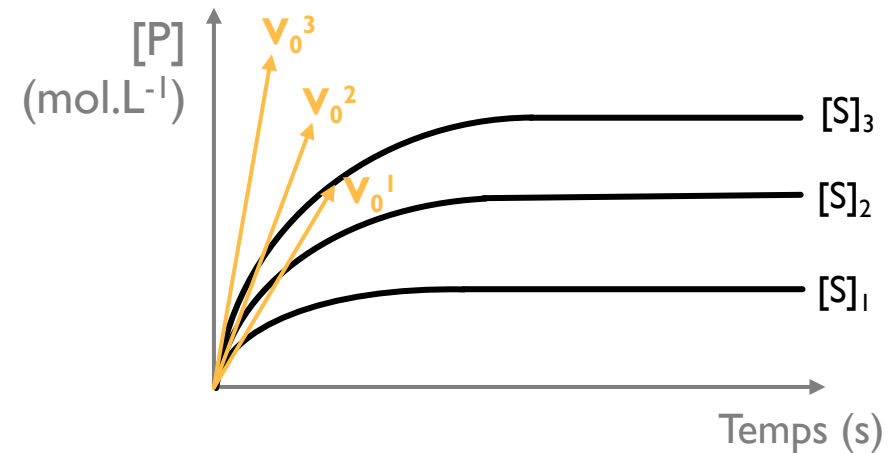
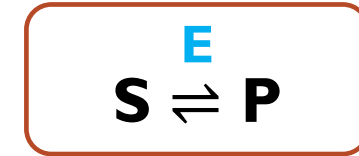
3. Déterminer la pente de la courbe à t_0 : pente = V_0



4. Répéter les étapes n°2 et 3 pour les autres $[S]$



5. Tracer la courbe : $V_0 = f([S])$



PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

II. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAÉLIENNE

A. LES ENZYMES MONOMÉRIQUES AFFICHENT UNE CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

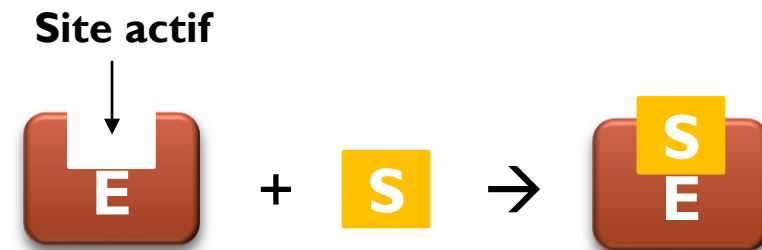
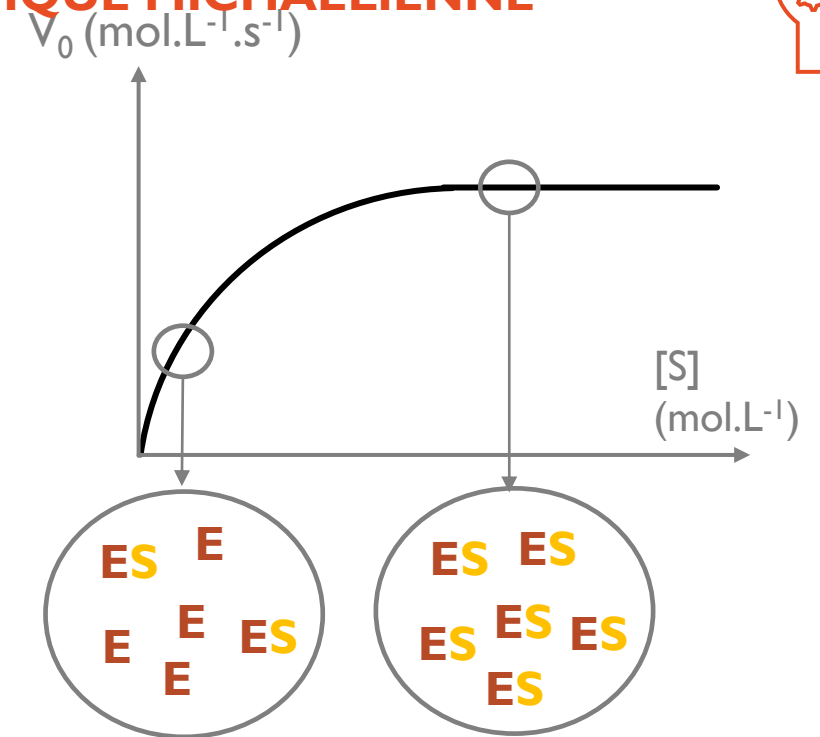


I. Le complexe enzyme-substrat

- Le **phénomène de saturation** observé en cinétique suggère la formation d'une interaction physique entre E et S
→ Notion de **complexe enzyme-substrat (ES)** :

$$[E]_{\text{total}} = [ES] + [E]_{\text{libre}}$$

- Plus [S] augmente, plus il y a d'enzymes (E_{libre}) qui s'associent au substrat (ES)
 - Lorsque toutes les enzymes sont impliquées dans la **formation d'un complexe**, $[E]_{\text{total}} = [ES]$ → vitesse maximale atteinte ($V_{0\text{max}}$)
- La région de l'enzyme où se fait l'interaction physique entre E et S est appelée : **site actif**

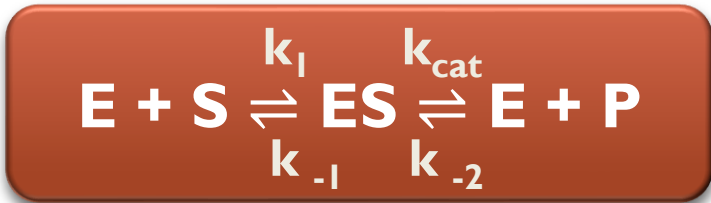


II. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAÉLIENNE

A. LES ENZYMES MONOMÉRIQUES AFFICHENT UNE CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

2. Equation de Michaelis-Menten (1913)

- **Michaelis et Menten** travaillaient sur l'hydrolyse enzymatique du saccharose chez la levure (enzyme monomérique).
- Proposition du mécanisme suivant pour une **enzyme monomérique** :



- ❖ Avec :
- ❖ k_1 : cte d'association entre l'enzyme et le substrat
- ❖ k_{-1} : cte de dissociation entre l'enzyme et le substrat
- ❖ k_{cat} : cte catalytique = cte de la réaction catalysée
- ❖ k_{-2} : cte de la réaction inverse
- ❖ $V_1, V_{-1}, V_{-2}, V_{cat}$: vitesses associées aux réactions

- De plus, on pose que :
 - k_1 et k_{-1} conduisent à un **équilibre** très rapide, de **durée négligeable**.
 - Dans les conditions initiales (t_0), k_{-2} est **négligeable** (car étude de la vitesse initiale).
 - k_{cat} est **limitante** ; elle détermine la vitesse de réaction (V_0).

Leonor Michaelis
(1875-1949) et
Maud Menten
(1879-1960),
biochimistes



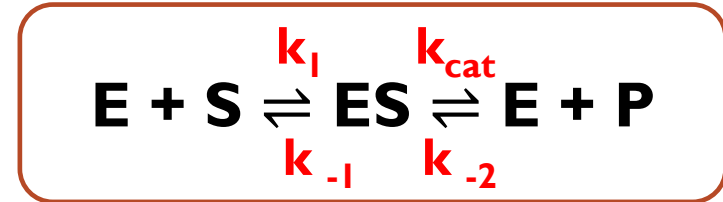
II. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAÉLIENNE

A. LES ENZYMES MONOMÉRIQUES AFFICHENT UNE CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE



2. Equation de Michaelis-Menten (1913)

- Soit les conditions suivantes :
 - Enzyme monomérique
 - $[E] = \text{cte}$
 - $\text{pH} = \text{cte}$
 - $T = \text{cte}$
 - $P = \text{cte}$
- Alors, l'expression de V_0 est donnée par l'équation de Michaelis-Menten :



$$V_0 = \frac{V_{0\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Que devient V_0 si $K_m \ll [S]$?

Que vaut $[S]$ si $V_0 = \frac{1}{2} V_{0\text{max}}$?

II. LA CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

A. LES ENZYMES MONOMERIQUES AFFICHENT UNE CINETIQUE MICHAELIENNE



3. Equation de Michaelis-Menten (1913)

Pour quelle valeur de [S]
la vitesse initiale atteint-elle 50% de V_{max} ?

$$V_0 = \frac{V_{0max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$V_0 = \frac{V_{0max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{\cancel{V_{0max}}}{2} = \frac{\cancel{V_{0max}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \Leftrightarrow \quad K_m + [S] = 2 \cdot [S] \quad \Leftrightarrow \quad \boxed{K_m = [S]}$$

→ K_m correspond à la valeur de [S] pour laquelle $V_0 = \frac{V_{0max}}{2}$

II. LA CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

A. LES ENZYMES MONOMERIQUES AFFICHENT UNE CINETIQUE MICHAELIENNE



3. Equation de Michaelis-Menten (1913)

Que devient la vitesse initiale
si K_m est négligeable devant $[S]$?

$$V_0 = \frac{V_{0max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$V_0 = \frac{V_{0max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Si $[S] \gg K_m$

$$\text{Alors } V_0 = \frac{V_{0max} \cdot [S]}{\cancel{K_m} + [S]}$$

$$\Leftrightarrow V_0 = \frac{V_{0max} \cdot [S]}{[S]}$$

$$\Leftrightarrow V_0 = \frac{V_{0max} \cdot \cancel{[S]}}{\cancel{[S]}}$$

\Leftrightarrow

$$V_0 = V_{0max}$$

→ V_{max} correspond à la vitesse maximale atteinte lorsque l'enzyme est saturée en substrat.

II. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAÉLIENNE

A. LES ENZYMES MONOMÉRIQUES AFFICHENT UNE CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE



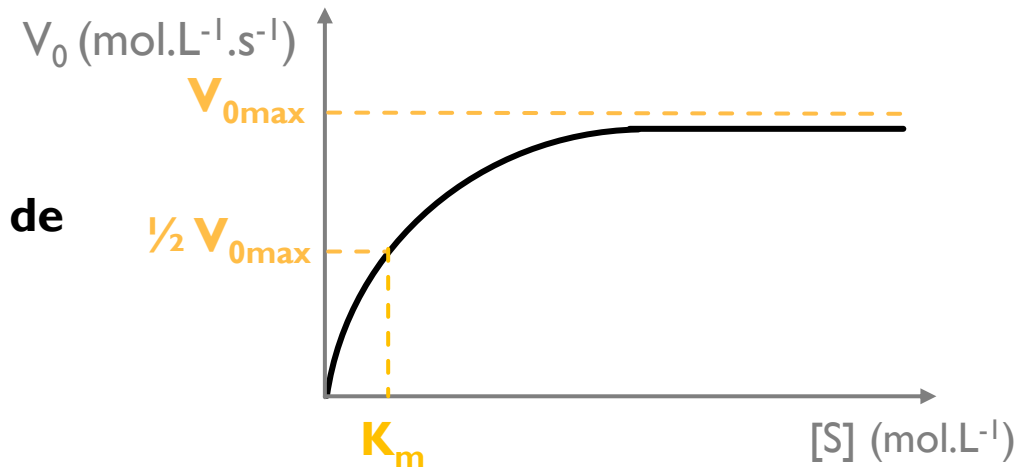
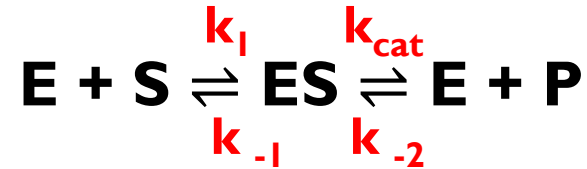
2. Equation de Michaelis-Menten (1913)

- Soit les conditions suivantes :
 - Enzyme monomérique
 - $[E] = \text{cte}$
 - $\text{pH} = \text{cte}$
 - $T = \text{cte}$
 - $P = \text{cte}$
- Alors, l'expression de V_0 est donnée par l'équation de Michaelis-Menten :

$$V_0 = \frac{V_{0\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$V_{0\text{max}}$: vitesse initiale maximale, atteinte quand l'enzyme est saturée en substrat

$K_m = [S]$ pour laquelle $V_0 = \frac{1}{2} \cdot V_{0\text{max}}$



- Interprétation de l'équation :
 - Si $K_m \ll [S]$, l'enzyme est saturée en substrat et alors : $V_0 \rightarrow V_{0\text{max}}$
 - $V_0 = \frac{1}{2} V_{0\text{max}} \Leftrightarrow [S] = K_m$

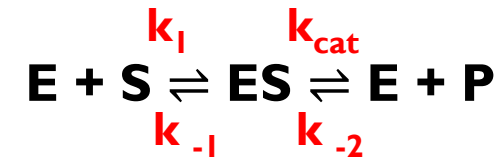
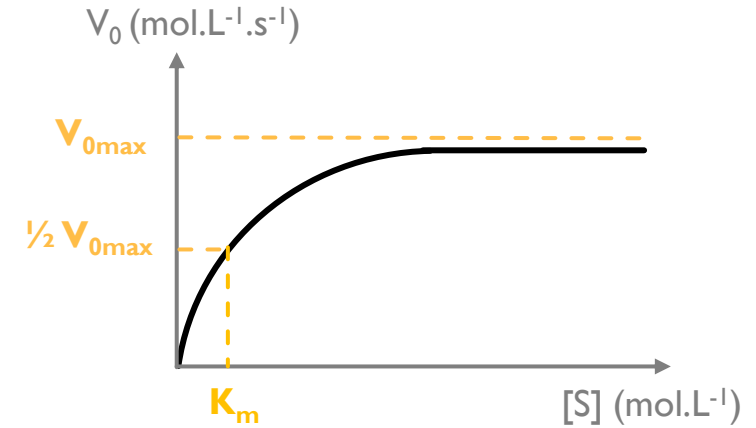
II. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

A. LES ENZYMES MONOMÉRIQUES AFFICHENT UNE CINÉTIQUE MICHAELIENNE



2. Equation de Michaelis-Menten (1913)

- Pour étudier la cinétique enzymatique, on détermine la **vitesse initiale (V_0)** de la réaction pour différentes concentrations de substrat $[S]$ (avec $[E]$ fixée).
- On représente ensuite graphiquement : $V_0 = f([S])$
- Pour une enzyme **monomérique**, on obtient une **hyperbole**.
- Le plateau de l'hyperbole permet d'inférer l'existence d'une association physique entre E et S : c'est le **complexe enzyme-substrat (ES)**
- Le **site actif** est la région de l'enzyme où se fixe le substrat.
- **L'équation de Michaelis-Menten** formalise les données cinétiques :
 - V_{0max} : valeur max de V_0 (asymptote de la courbe) atteinte à saturation de E
 - K_m : valeur de $[S]$ pour laquelle $V_0 = \frac{1}{2} V_{0max}$



$$V_0 = \frac{V_{0max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

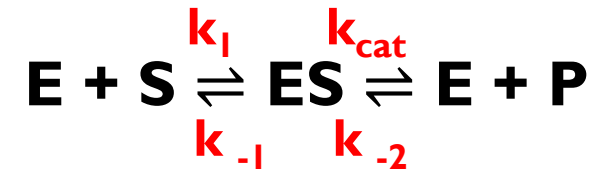
II. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAÉLIENNE

A. LES ENZYMES MONOMÉRIQUES AFFICHENT UNE CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE



1. Exprimer la vitesse (V) de la réaction : $ES \rightleftharpoons E + P$
2. Que devient cette expression à t_0 (V_0) ?
3. Que se passe-t-il pour les différentes formes de l'enzyme quand elle est saturée en substrat ?
4. En déduire alors l'expression de V_{0max} .

$$[E]_{total} = [ES] + [E]_{libre}$$



$$V_0 = \frac{V_{0max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

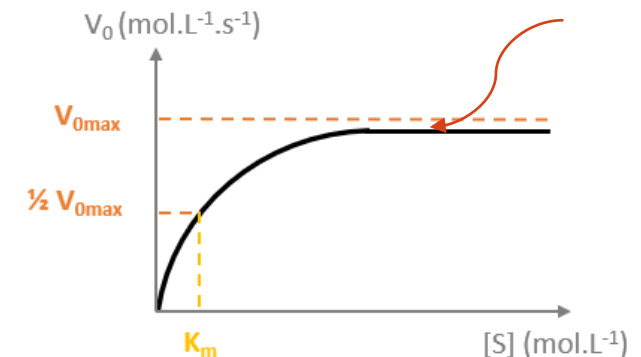
1. $V = k_{cat} \cdot [ES] + k_{-2} \cdot [E] \cdot [P]$

2. A t_0 : $V = V_0 = k_{cat} \cdot [ES]$

3. Si l'enzyme est saturée en substrat, alors $[E]_{libre} = 0$ donc $[ES] = [E]_{totale}$

4. Quand l'enzyme est saturée en substrat : $V_0 = V_{0max} = k_{cat} \cdot [E]_{totale}$

À saturation
 $[E]_{tot} = [ES]$



PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

II. LA CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

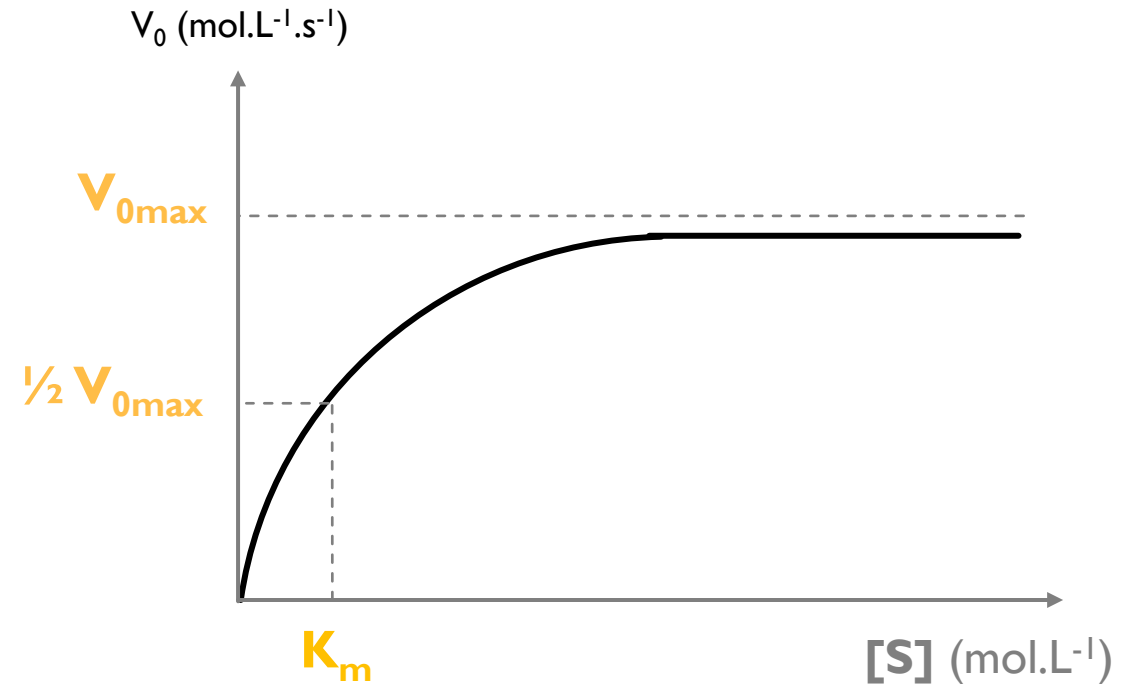
B. LES PARAMETRES CINETIQUES INFORMENT SUR LE MECANISME CATALYTIQUE



I. V_{0max} et K_m

I.1. Détermination graphique de V_{0max} et K_m

- Les paramètres (K_m, V_{0max}) peuvent être déterminés graphiquement.
- **Utilisation du graphe : $V_0 = f([S])$**
 - Expérimentalement, on atteint **rarement V_{0max}**
 - ⇒ Erreur dans l'estimation de V_{0max} et donc de K_m



Représentation classique

II. LA CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

B. LES PARAMETRES CINETIQUES INFORMENT SUR LE MECANISME CATALYTIQUE



I. V_{0max} et K_m

I.1. Détermination graphique de V_{0max} et K_m

Transformer l'équation de Michaelis-Menten sous la forme :

$$\frac{1}{V_0} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$$

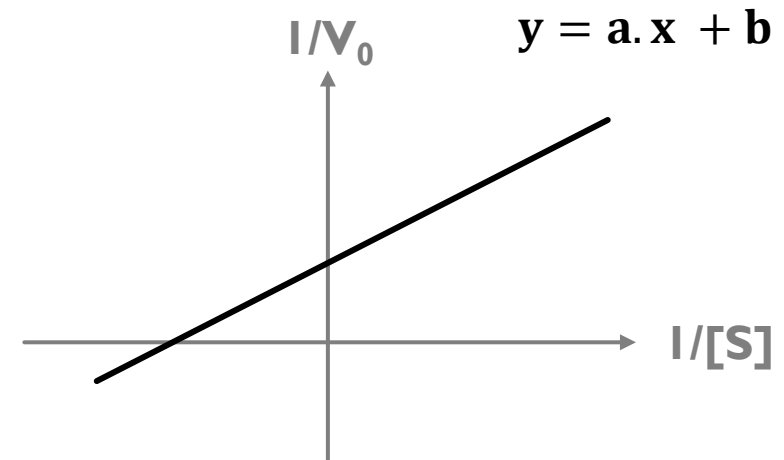
$$V_0 = \frac{V_{0max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{0max} \cdot [S]}$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{0max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{0max} \cdot [S]}$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{0max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{0max}}$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{V_0} = a \cdot \frac{1}{[S]} + b \quad \text{avec :} \quad \begin{aligned} a &= K_m/V_{0max} \\ b &= 1/V_{0max} \end{aligned}$$



II. LA CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

B. LES PARAMETRES CINETIQUES INFORMENT SUR LE MECANISME CATALYTIQUE



I. V_{0max} et K_m

I.1. Détermination graphique de V_{0max} et K_m

Que valent l'ordonnée à l'origine, la pente et l'intersection avec l'axe des abscisses ?

$$b = I/V_{0max}$$

b = ordonnée à l'origine → détermination graphique

$$a = K_m/V_{0max}$$

a = pente → détermination de K_m de deux façons :

1) Par calcul : on détermine la pente « a » et on calcule $K_m = a \cdot V_{0max}$

2) Par détermination graphique :

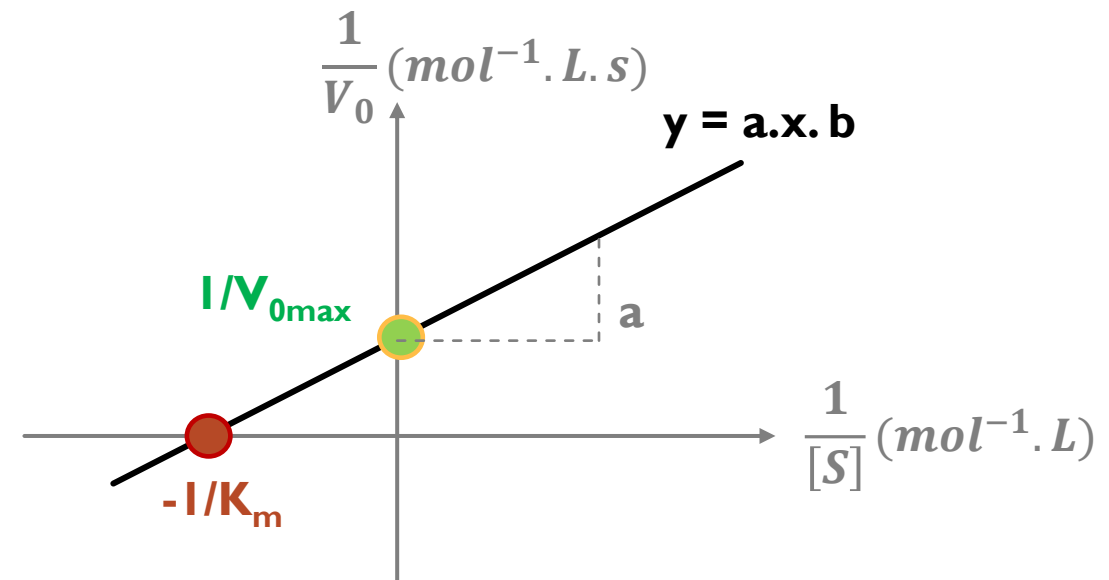
Si $y = 0$

Alors $x = -\frac{b}{a} \Leftrightarrow x = -\frac{1}{V_{0max}} \cdot \frac{V_{0max}}{K_m} \Leftrightarrow$

$$x = -\frac{1}{K_m}$$

$$\frac{1}{V_0} = a \cdot \frac{1}{[S]} + b$$

avec : $a = K_m/V_{0max}$
 $b = I/V_{max}$

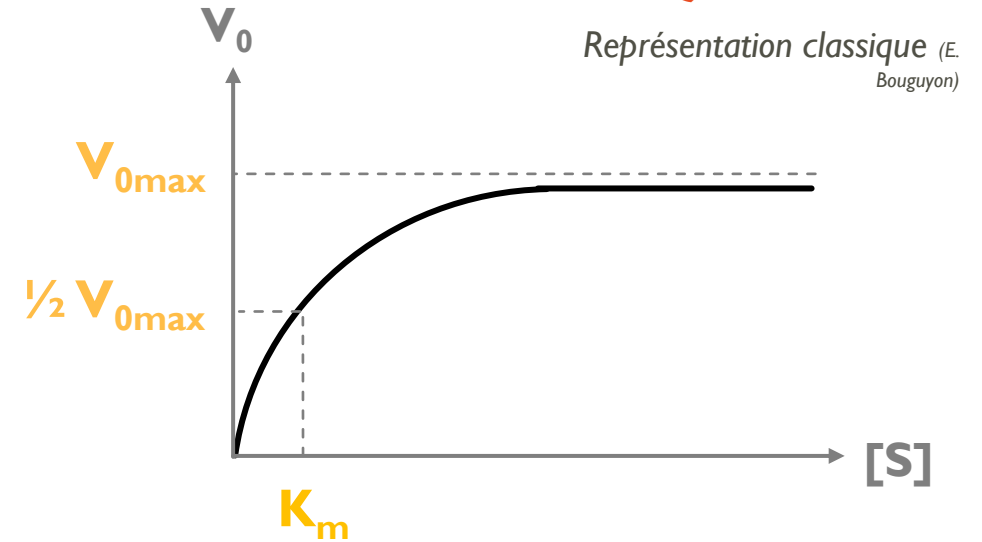


II. LA CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

B. LES PARAMETRES CINETIQUES INFORMENT SUR LE MECANISME CATALYTIQUE

I. V_{0max} et K_m

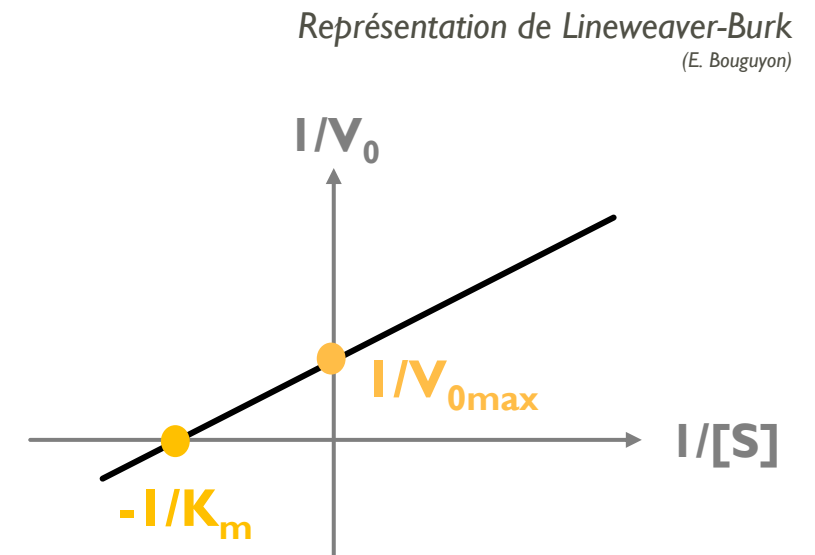
I.1. Détermination graphique de V_{0max} et K_m



- Représentation de Lineweaver-Burk ou « en double-

inverse » : $\frac{1}{V_0} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$

- Moins de points de mesure nécessaires
- Meilleure estimation de V_{0max} et K_m



II. LA CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

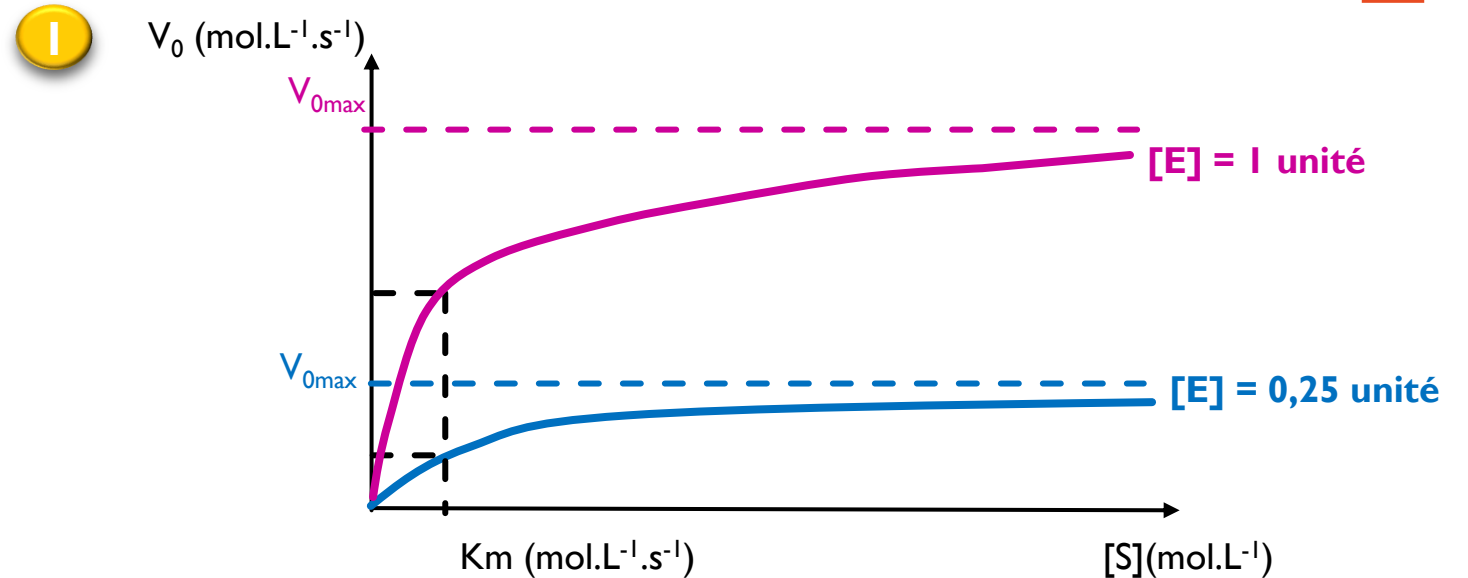
B. LES PARAMETRES CINETIQUES INFORMENT SUR LE MECANISME CATALYTIQUE



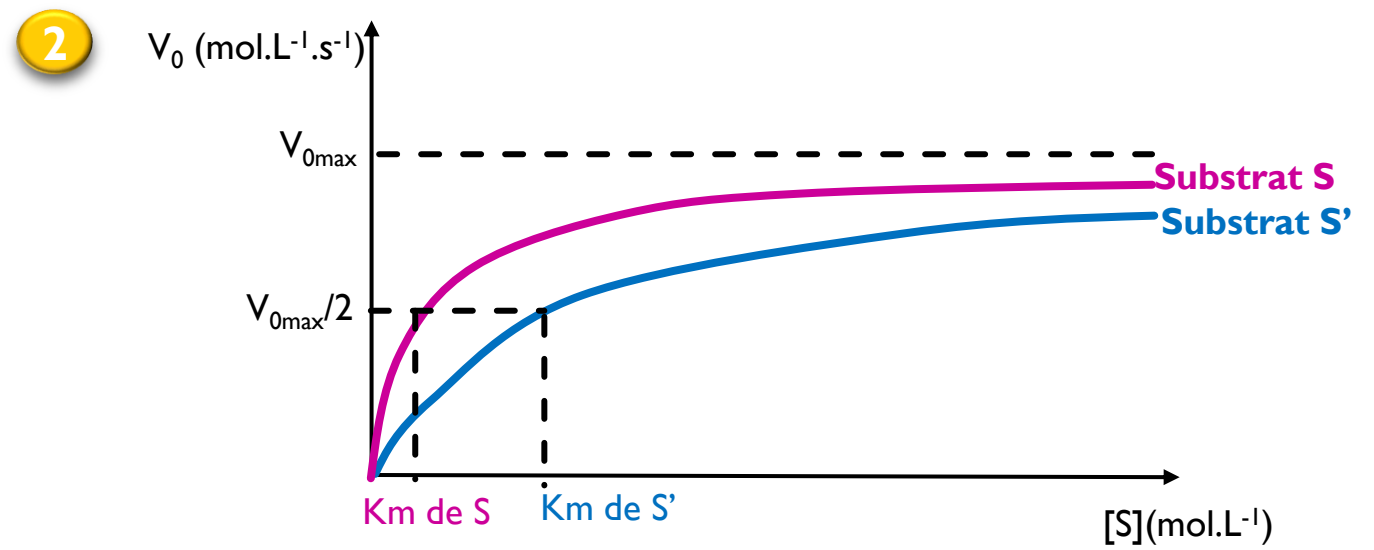
I. V_{0max} et K_m

I.2. Interprétation V_{0max}

Quel est l'effet d'un changement de $[E]$ sur V_{0max} et K_m ?



Quel est l'effet du changement de substrat sur V_{0max} et K_m ?



II. LA CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

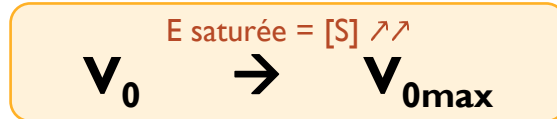
B. LES PARAMETRES CINETIQUES INFORMENT SUR LE MECANISME CATALYTIQUE

I. V_{0max} et K_m

I.2. Interprétation V_{0max}

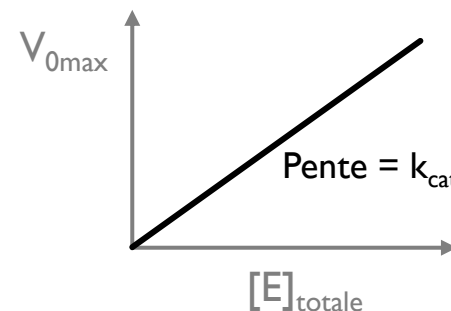
La vitesse maximale (V_{0max})

- V_{0max} correspond à la valeur maximale que peut atteindre la **vitesse** de catalyse dans les **conditions initiales** (V_0), lorsque l'**enzyme** est **saturée** en substrat.



- Elle dépend de deux paramètres :
 - Un paramètre **intrinsèque** à l'enzyme : la cte catalytique (k_{cat})
 - Un paramètre **variable** : la $[E]_{totale}$ utilisée pour l'étude

$$V_{0max} = k_{cat} \cdot [E]_{totale}$$

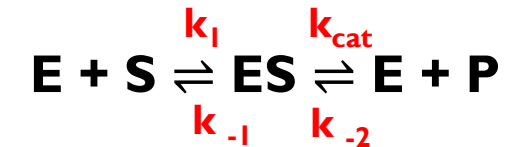


- Unité de V_{0max} : $\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$



Démonstration

$$[E]_{total} = [ES] + [E]_{libre}$$



Dans les conditions initiales :

$$V = V_0 = k_{cat} \cdot [ES]$$

Si l'enzyme est saturée :

$$[ES] = [E]_{totale}$$

et

$$V_0 = V_{0max}$$

Alors, on a :

$$V_{0max} = k_{cat} \cdot [E]_{totale}$$

II. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAÉLIENNE

B. LES PARAMÈTRES CINÉTIQUES INFORMENT SUR LE MÉCANISME CATALYTIQUE

I. V_{0max} et K_m

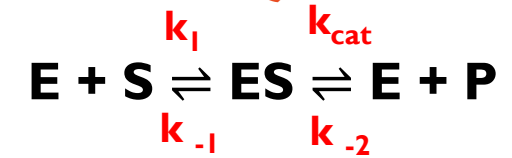
I.3. Interprétation K_m

$$K_m = [S] \text{ tq } V_0 = \frac{1}{2} V_{0max}$$

- K_m peut être définie de 2 façons :
 - valeur de $[S]$ pour laquelle $V_0 = \frac{1}{2} V_{0max}$
 - rapport entre 3 constantes de vitesse
- En général, K_m est assimilable à **la constante de dissociation du complexe ES**.
- K_m mesure l'**affinité** de l'enzyme pour le substrat
 - K_m est inversement proportionnelle à l'affinité
→ plus K_m est petit, plus l'affinité est grande
 - En général, $K_m = 10^{-1}$ à 10^{-7} mM (moy : 10^{-4} mM)
- Unité : **mol.L⁻¹**



Affinité : (n.f.) force avec laquelle une enzyme se fixe à son substrat



$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

En général : $k_{cat} \ll k_{-1}$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

$$K_m \sim \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Enzyme	Substrat	K_m (mM)
Hexokinase (cerveau)	ATP	0,4
	D-Glucose	0,05
	D-Fructose	1,5
Anhydrase carbonique	HCO ₃ ⁻	26
Chymotrypsine	Glycyltyrosinglycine	108
	N-Benzoyltyrosinamide	2,5
β -Galactosidase	D-Lactose	4,0
Thréonine déshydratase	L-Thréonine	5,0

II. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAÉLIENNE

B. LES PARAMÈTRES CINÉTIQUES INFORMENT SUR LE MÉCANISME CATALYTIQUE



2. Constante catalytique k_{cat} ou turnover

- La constante catalytique est déterminée par calcul.
- Il y a deux méthodes possibles.
- Après **détermination graphique** de V_{max} et connaissant la valeur de $[E]_{totale}$:

$$V_{0max} = k_{cat} \cdot [E]_{total}$$

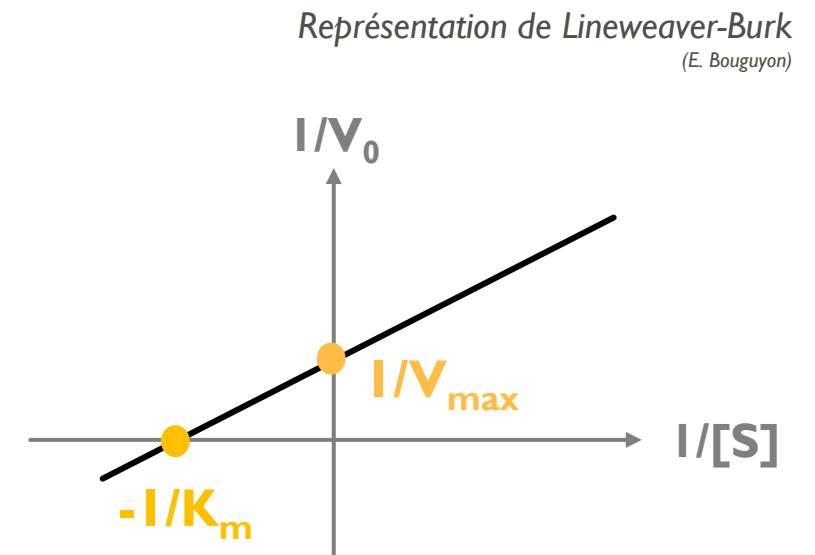
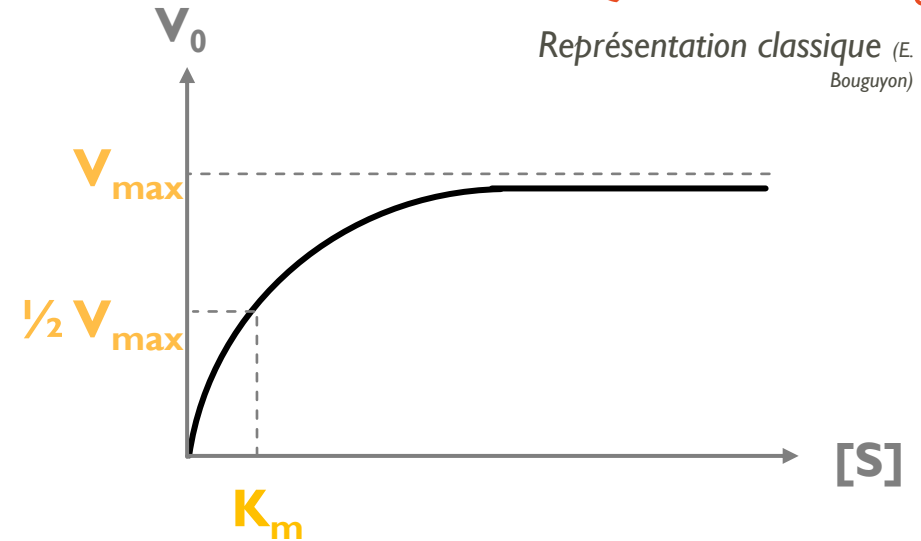
$$k_{cat} = \frac{V_{0max}}{[E]_{total}}$$



- En utilisant la **loi d'Arrhenius** :

$$k_{cat} = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

A : facteur de fréquence
 E_a : énergie d'activation
 R : cte des gaz parfaits
 T : température



II. LA CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

B. LES PARAMETRES CINETIQUES INFORMENT SUR LE MECANISME CATALYTIQUE



2. Constante catalytique k_{cat} ou turn over

- k_{cat} est la **constante catalytique**, soit la cte de vitesse de la réaction : $ES \rightarrow E + P$
- Elle correspond au nombre de molécules de S transformées par enzyme et par seconde.
- Elle donne une idée de l'**efficacité catalytique** de l'enzyme.
- En général, une enzyme peut transformer 1-1 000 molécules de substrat par sec
→ Les enzymes sont **très efficaces** même **en faible quantité**.

Unité : s^{-1}

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.5

Valeurs de k_{cat} pour
quelques enzymes
(Lehninger p207)

PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

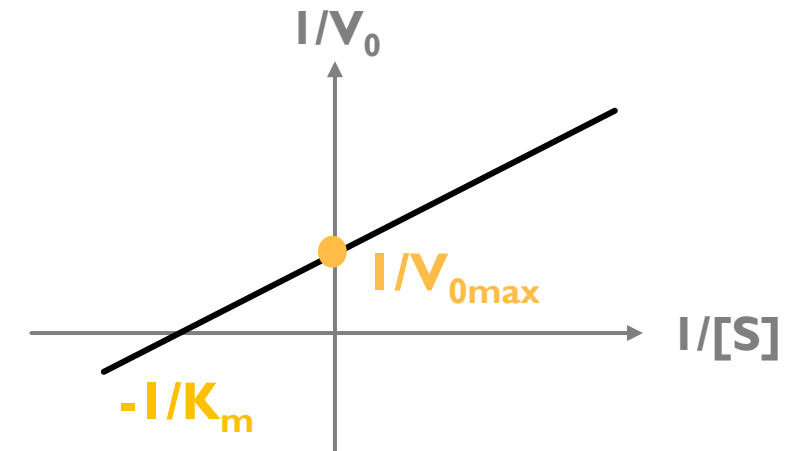
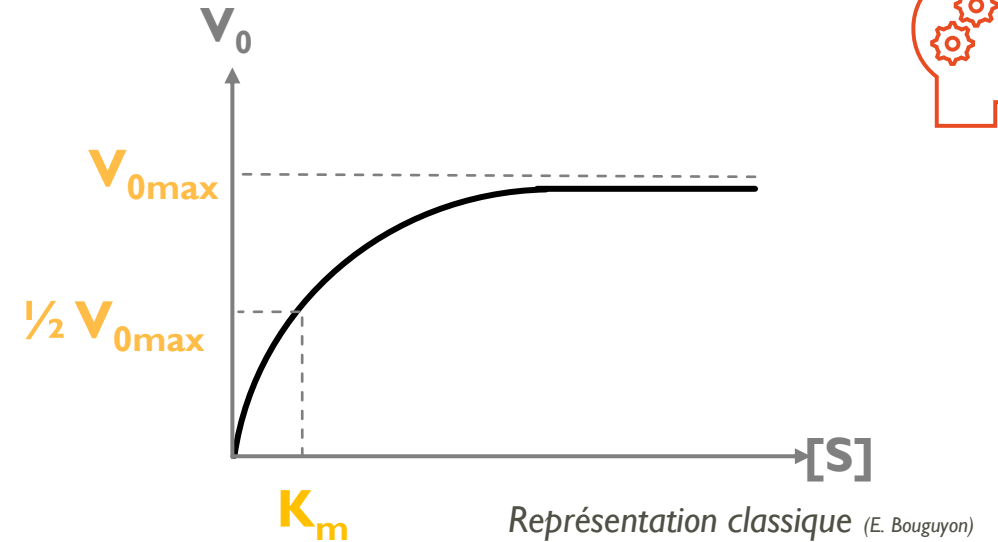
VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

II. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

C. BILAN

- Les **paramètres cinétiques** de l'équation de Michaelis-Menten peuvent être déterminés graphiquement ou par calcul.
- La **vitesse maximale** V_{0max} (en $\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$) est la **vitesse** de réaction initiale atteinte lorsque l'**enzyme** est **saturée** en substrat.
 - V_{0max} dépend de la quantité d'enzyme totale et de la constante catalytique : $V_{0max} = k_{cat} \cdot [E]_{total}$
- La **cte de Michaelis** K_m (en mol.L^{-1}) est assimilable à la **constante de dissociation** entre l'enzyme et son substrat :
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \sim = \frac{k_{-1}}{k_1}$$
 - C'est aussi la valeur de $[S]$ pour laquelle $V_0 = \frac{1}{2} \cdot V_{0max}$
 - Elle mesure l'**affinité** de l'enzyme pour son substrat.
- La **constante catalytique** k_{cat} (en s^{-1}) est la constante de la réaction catalytique ($ES \rightarrow E + P$) : $k_{cat} = \frac{V_{0max}}{[E]_{total}}$
- Elle donne une idée de l'**efficacité catalytique** de l'enzyme.



PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

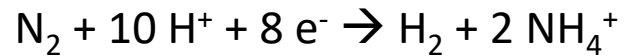
III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

A. LES ENZYMES SE DISTINGUENT DES CATALYSEURS CHIMIQUES



I. Conditions de fonctionnement modérées

- Les enzymes catalysent les réactions dans des **conditions compatibles avec la vie**.
 - faible **température** (< 60°C chez les eucaryotes)
 - **pression** atmosphérique (moy ~ 1.10⁵ Pa)
 - **pH** neutre (en général)
- Pour chaque enzyme, on peut définir des **conditions de fonctionnement optimales**, en termes de **température** et **pH**.



$$\Delta_r G < 0$$

$$V \sim 0$$

Réaction de synthèse d'ammonium à partir de diazote :

	Synthèse chimique (industrie)	Synthèse biologique (bactéries du sol)
Catalyseur	Fe pulvérisé	Enzyme
Température	550 °C	5-30 °C
Pression	250 atm	1 atm

III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

A. LES ENZYMES SE DISTINGUENT DES CATALYSEURS CHIMIQUES



2. Efficacité

- Les enzymes sont présentes en très faibles quantités mais sont **très efficaces**.
En général, $k_{\text{cat}} = 1-1\ 000\ \text{s}^{-1}$
- Les enzymes sont plus efficaces que les catalyseurs chimiques.

Enzyme	Quantité de réactif transformé	Durée
pepsine	50 kg (prot)	2h
uréase	150 g (urée)	5 min

Efficacité de réaction pour 1g d'enzyme

Catalyseur	Augmentation de vitesse
Pt, Mg	$\times 10^2-10^3$
Enzyme	$\times 10^6-10^{12}$

Efficacité comparée des catalyseurs biologiques et chimiques

Enzyme	$T_{1/2}$ sans enz	Nb de cycle par sec	Augmentation de vitesse
Décarboxylase OMP	78 000 000 ans	39	$\times 1,4 \cdot 10^{17}$
Adénosine désaminase	120 ans	370	$\times 2,1 \cdot 10^{12}$
Phosphodiesterase	2,9 ans	2100	$\times 2,8 \cdot 10^{11}$
Anhydrase carbonique	5 sec	10^6	$\times 7,7 \cdot 10^6$

Efficacité comparée de plusieurs enzymes

III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

A. LES ENZYMES SE DISTINGUENT DES CATALYSEURS CHIMIQUES

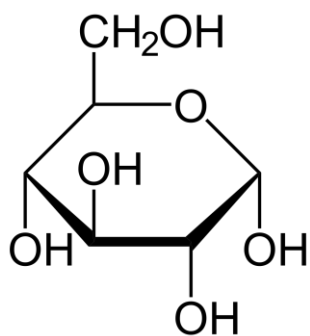


3. Spécificité

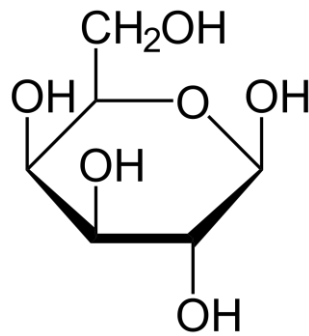
- Les enzymes sont **spécifiques** de :
 - leur **substrat**
 - le type de **réaction catalysée**
- Cette spécificité est +/- forte
 - Spécificité pour une famille de molécules (ex : hexokinase)
 - Séréospécificité (ex : fumarase)

Enzyme	Hexokinase	Fumarase
Réaction	phosphorylation	(des)hydratation
Substrat	Nombreux hexoses	Ac. Fumarique (pas ac. Malique)

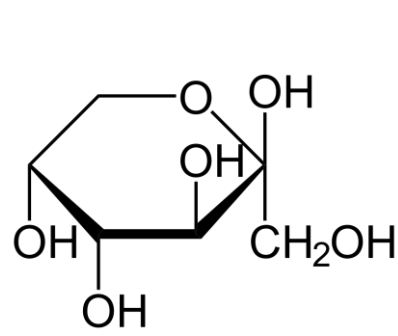
Spécificité comparée de deux enzymes



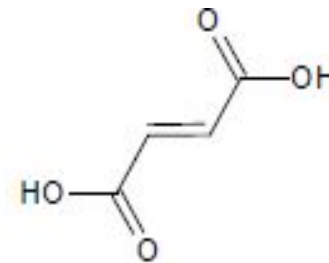
Glucose



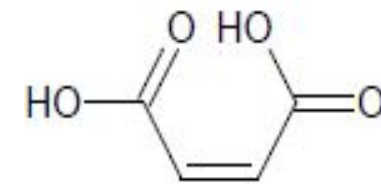
Galactose



Fructose



Ac. fumarique (trans)



Ac. malique (cis)

III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

A. LES ENZYMES SE DISTINGUENT DES CATALYSEURS CHIMIQUES



4. Cofacteurs et coenzymes

Diversité des cofacteurs

- On distingue 2 grandes catégories de cofacteurs :

- Les **cofacteurs (s.s.)** → ions

Ex : Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}

Ex : Mg^{2+} pour l'hexokinase (1^e enzyme de la glycolyse) cf plus loin

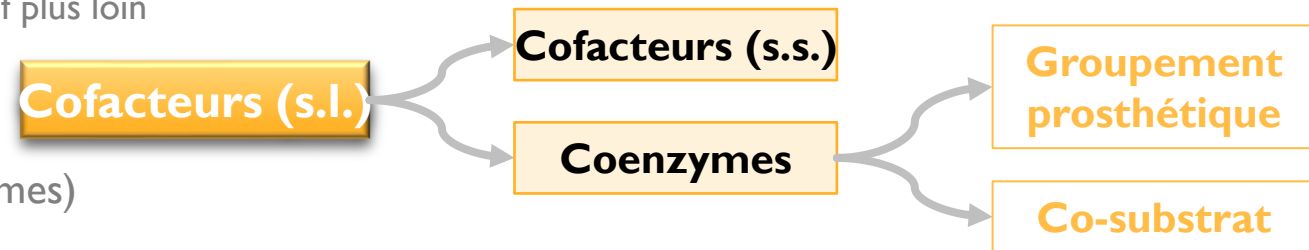
- Les **coenzymes** → biomolécules

- ✓ **Groupe ment prosthétique**

Ex : Hème de la catalase (dans les péroxysomes)

- ✓ **Co-substrat**

Ex : $FADH_2$, NADH, NADPH, ATP, Coenzyme A



- De nombreuses **vitamines** sont des **précurseurs** de **coenzymes**.
- C'est pourquoi les **carences** entraînent souvent des troubles ou des **maladies**.

III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

A. LES ENZYMES SE DISTINGUENT DES CATALYSEURS CHIMIQUES

Encart sur le scorbut

Le collagène est une protéine très stable en forme de fibre, dont la stabilité est assurée en grande partie par une **enzyme (proline hydroxylase)** qui hydroxyle les **prolines en hydroxyproline**. Cette enzyme est une métalloprotéine qui utilise un ion de fer, comme **cofacteur**, sous forme **Fe²⁺**.

La **vitamine C** participe au **maintien** de l'ion fer sous sa **forme réduite Fe²⁺**, en l'empêchant de s'oxyder, assurant le bon fonctionnement de l'enzyme (on appelle cela un cofacteur enzymatique).

Lorsque la vitamine C vient à manquer, les ions ferreux de la proline hydroxylase s'oxydent en Fe³⁺ et rendent l'enzyme inactive. Ainsi les hélices de collagènes s'appauvrissent en hydroxyproline, ce qui lui fait perdre en stabilité et ce qui fragilise tous les tissus.

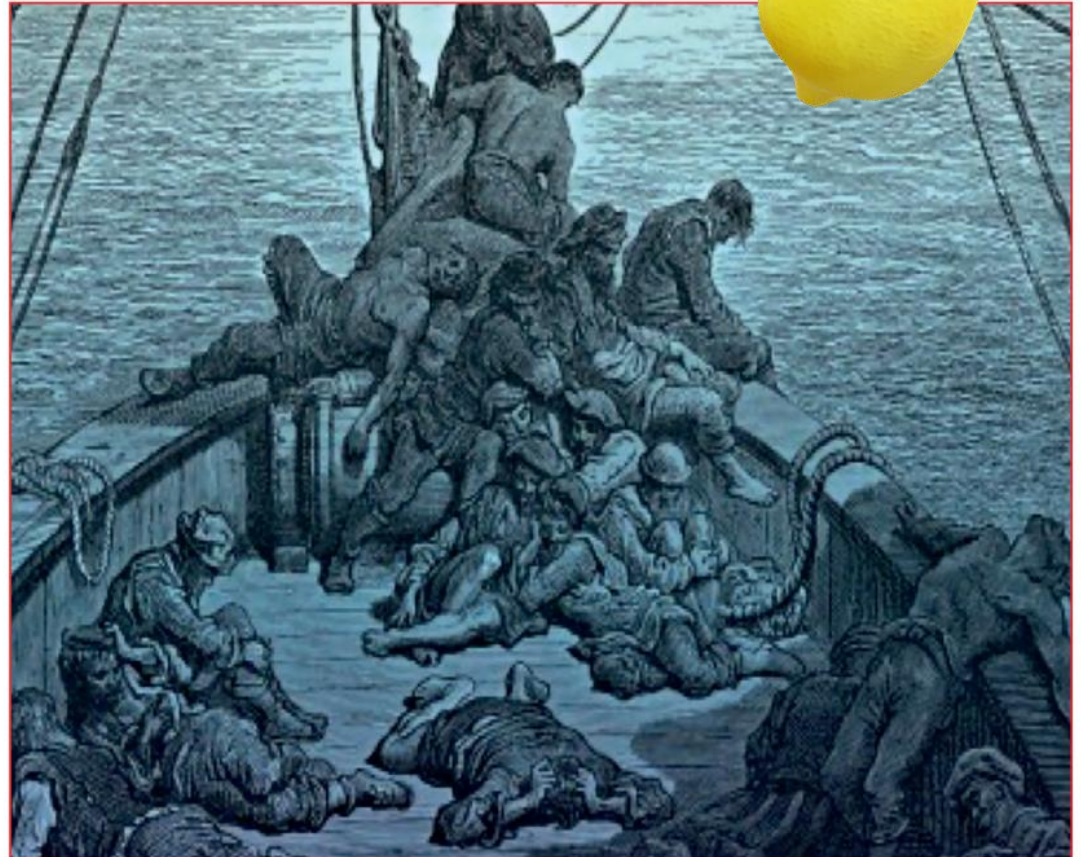
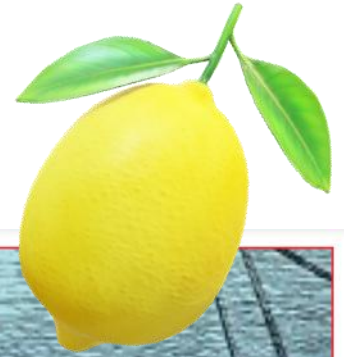
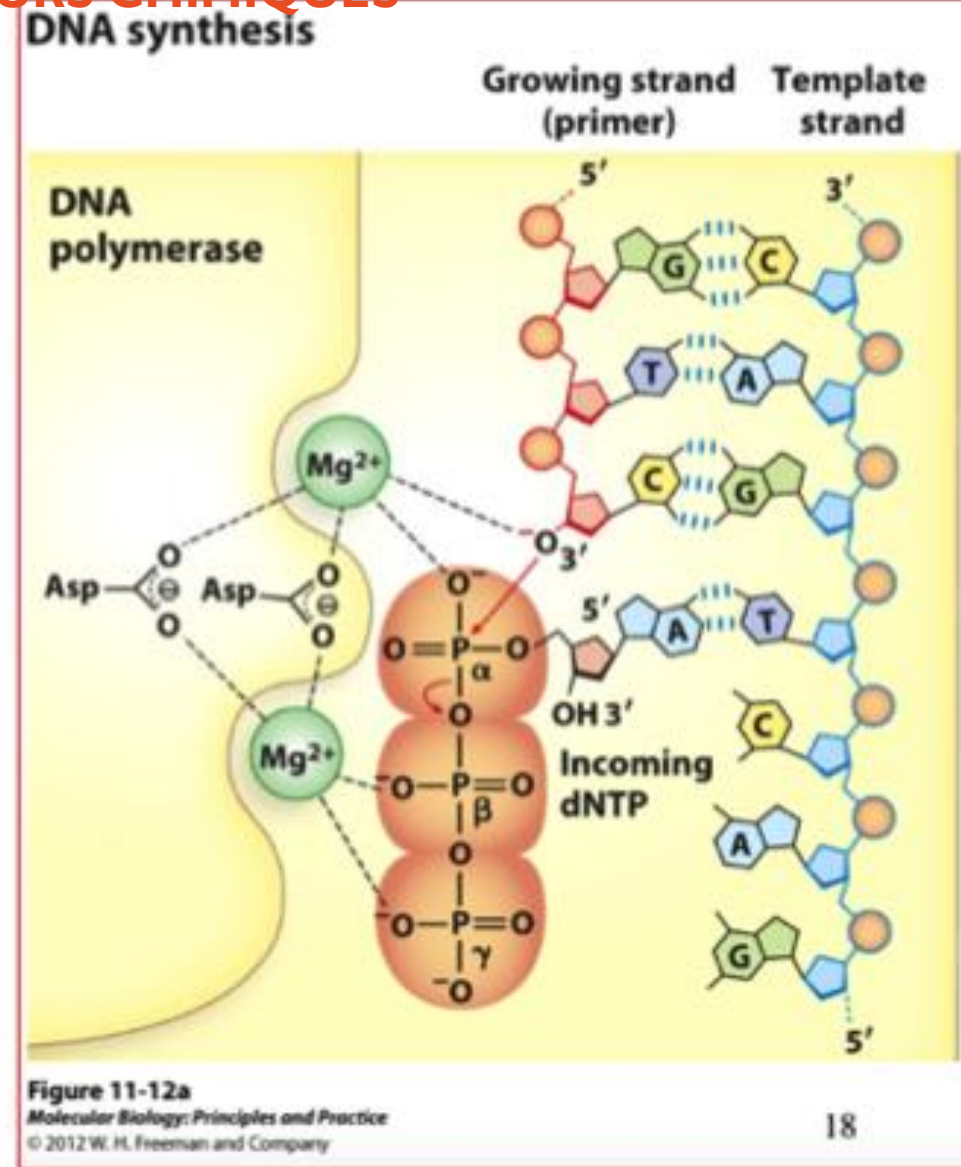
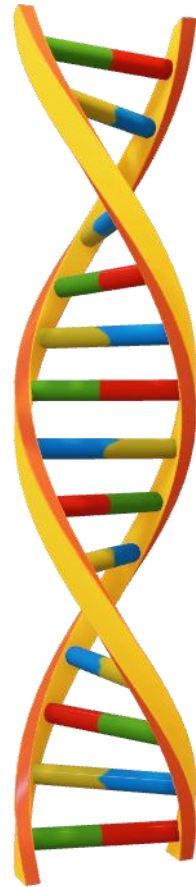


Fig. 1 - Gravure de Gustave Doré illustrant le livre « La balade du vieux marin ». Le scorbut était responsable de plus de morts en mer que les tempêtes, les naufrages, les combats et toutes les autres maladies.

III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

A. LES ENZYMES SE DISTINGUENT DES CATALYSEURS CHIMIQUES

Exemple de **cofacteur**: Mg^{2+} pour l'ADN polymérase III dans la réplication de l'ADN



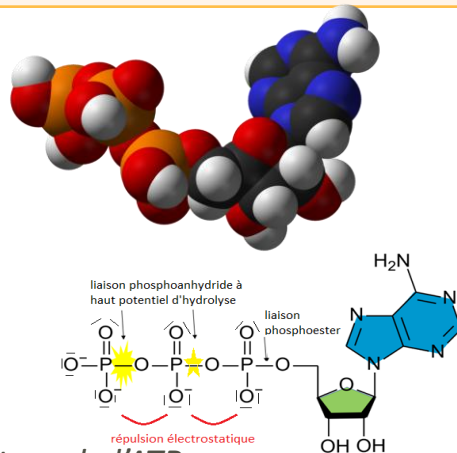
III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

A. LES ENZYMES SE DISTINGUENT DES CATALYSEURS CHIMIQUES

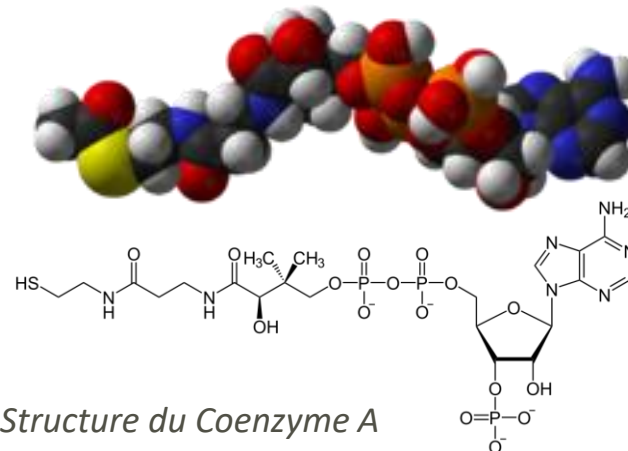
4. Cofacteurs et coenzymes

Principaux co-substrats dans la cellule

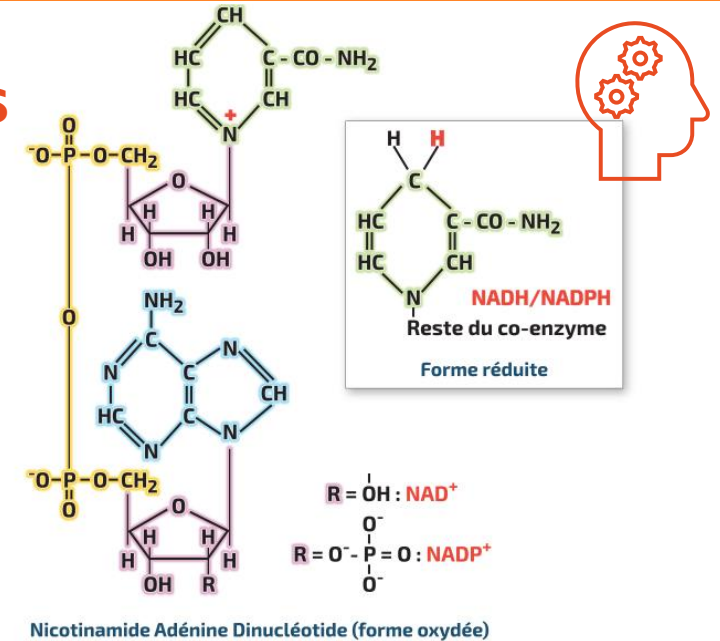
Type de co-substrat	Groupement transféré
ATP	Groupement phosphate
Coenzymes réduits FADH ₂ ; NADH ; NADPH	électrons
Coenzyme A	Groupement acyle



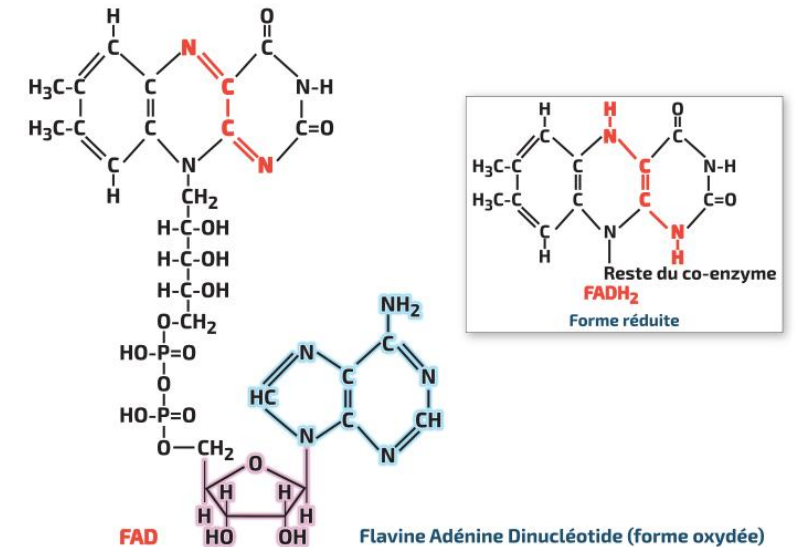
Structure de l'ATP



Structure du Coenzyme A



Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée)



FAD Flavine Adénine Dinucléotide (forme oxydée)

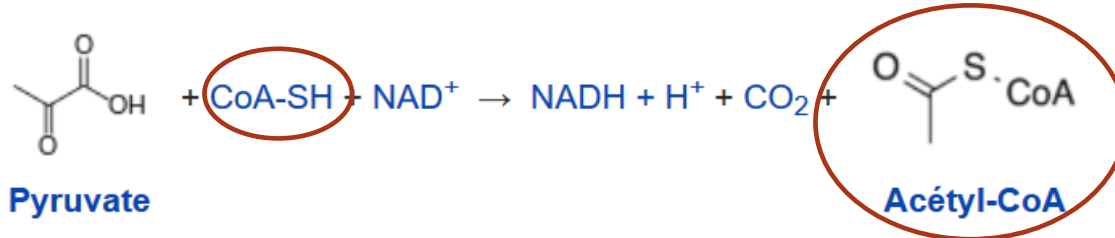
Structure des principaux coenzymes

réduits utilisés par les cellules (site RN'Bio)

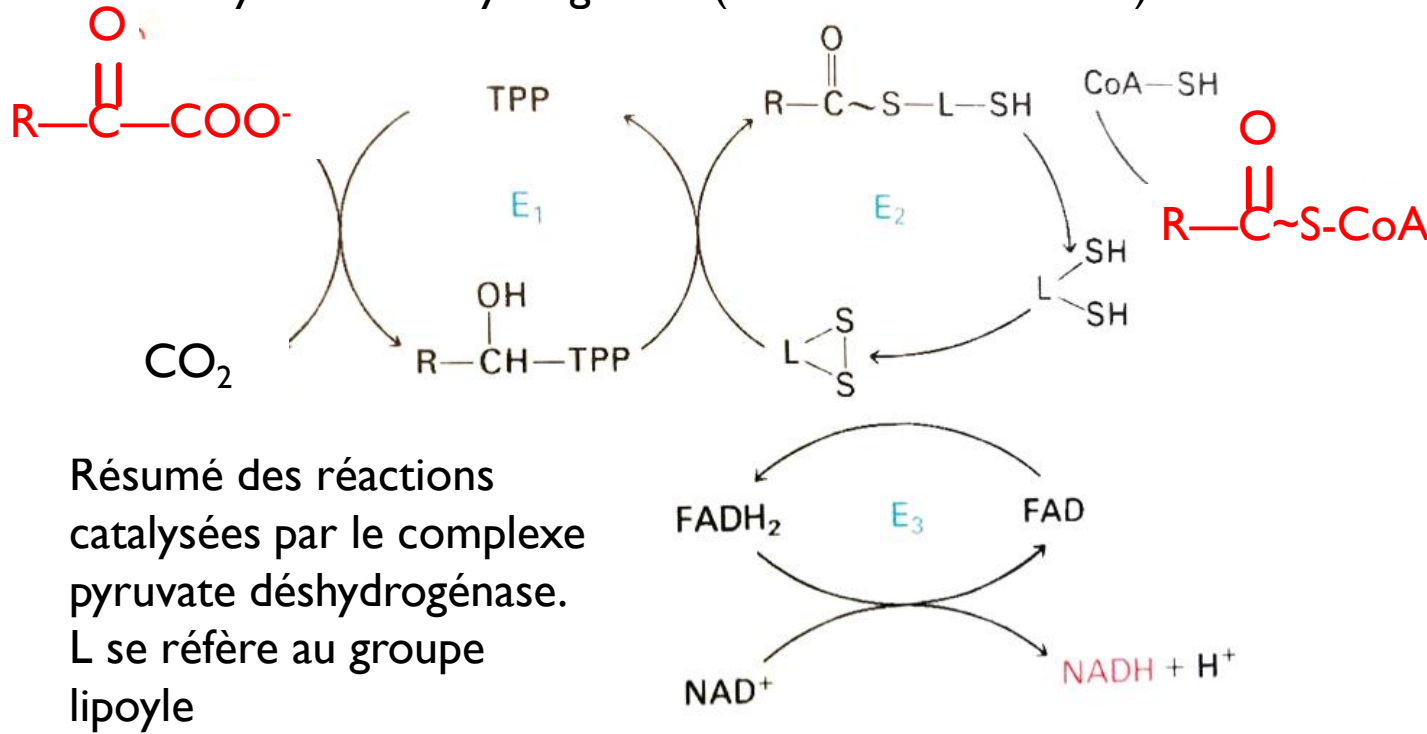
III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

A. LES ENZYMES SE DISTINGUENT DES CATALYSEURS CHIMIQUES

Coenzymes de transfert de groupements :



Pyruvate déshydrogénase (dans la mitochondrie)



Résumé des réactions catalysées par le complexe pyruvate déshydrogénase. L se réfère au groupe lipoylé

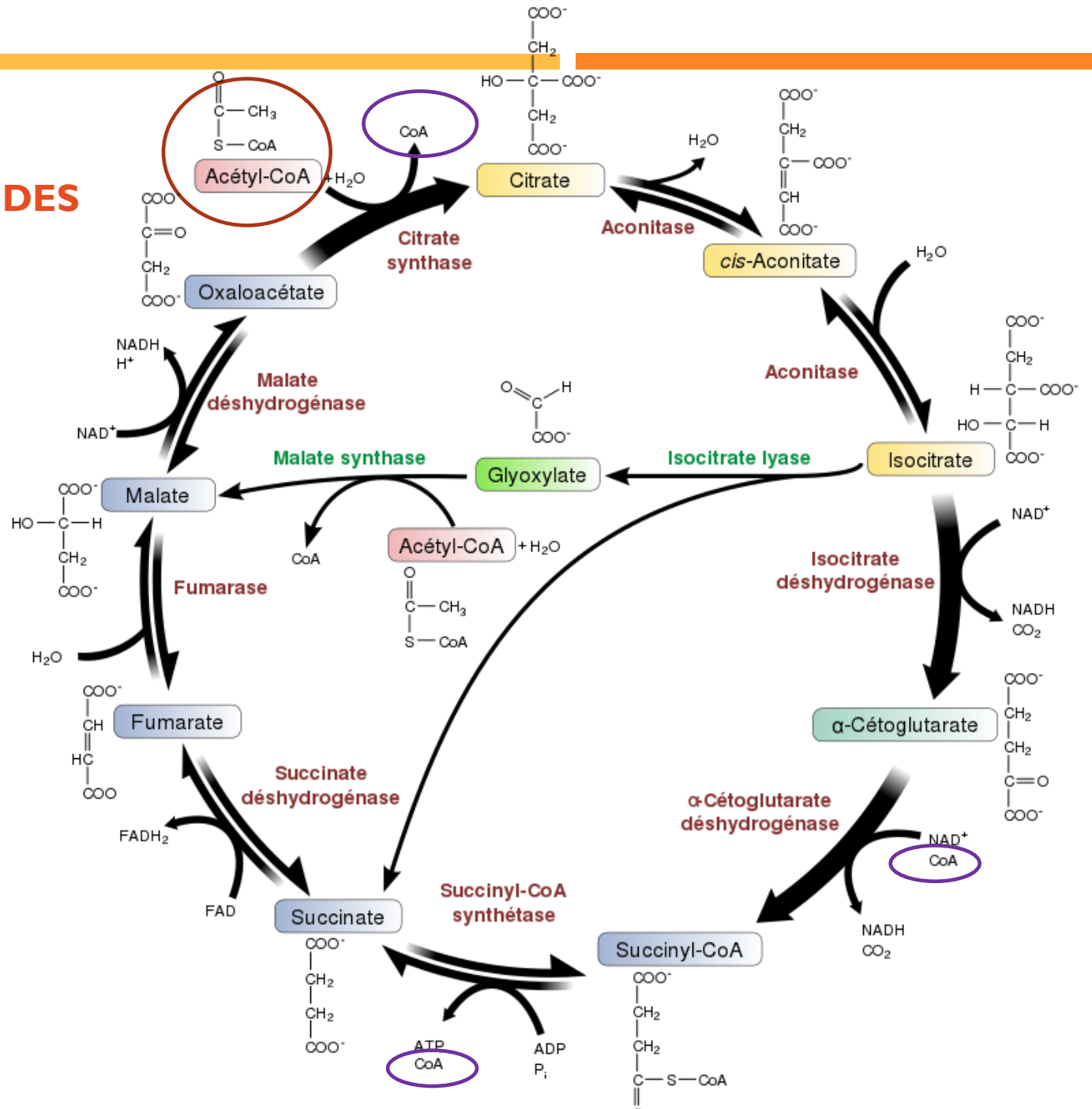
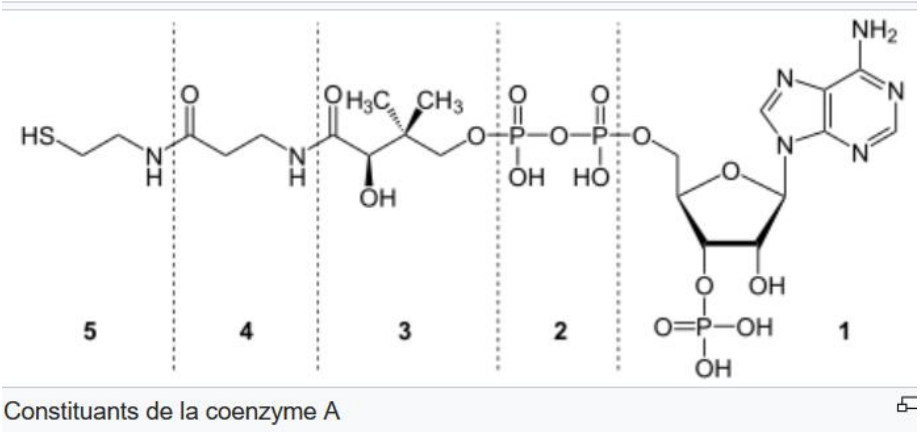
Coenzymes de transfert de groupements :

- Adénosine triphosphate (ATP/ADP/AMP) ;
- Cytidine triphosphate (CTP/CDP/CMP) ;
- Guanosine triphosphate (GTP/GDP/GMP) ;
- Thymidine triphosphate (TTP/TDP/TMP) ;
- Uridine triphosphate (UTP/UDP/UMP) ;
- Coenzyme A (CoA-SH) ;
- Thiamine pyrophosphate (TPP) ;
- Acide lipoïque ou lipoate ;
- Pyridoxal phosphate (PALP) ;
- Biotine (vitamine B8) ;
- 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS)
- S-adénosylméthionine (SAM)
- Cobalamine (coenzyme B₁₂)

III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

A. LES ENZYMES SE DISTINGUENT DES CATALYSEURS CHIMIQUES

Coenzyme A



PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

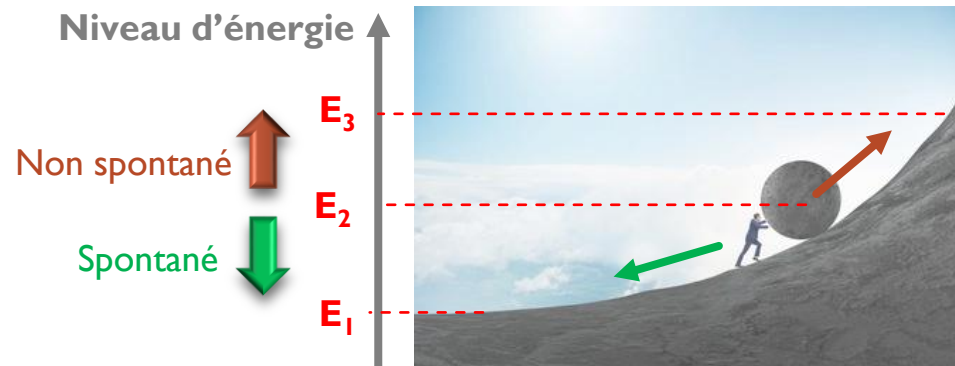
III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

B. LES ENZYMES MODIFIENT LA CINÉTIQUE ET NON LA THERMODYNAMIQUE



I. Enthalpie libre inchangée (G)

- ΔG mesure la **quantité d'énergie utile**, réellement disponible pour effectuer un travail
- En **biochimie**, $\Delta_r G$ permet de savoir si une **réaction est spontanée**.
 - $\Delta_r G < 0 \rightarrow$ sens direct favorable (spontané)
 - $\Delta_r G > 0 \rightarrow$ sens direct non favorable (non spontané)
- Pour une réaction biochimique, $\Delta_r G$ dépend des **concentrations** en réactifs et produits, mais pas de la vitesse de réaction.



Enthalpie libre -
analogie
mécanique



$$\Delta_r G = \Delta_r G^{\circ'} + R \cdot T \cdot \ln(Q_r)$$

$$\Delta_r G = R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{Q_r}{K}\right)$$

$$Q_r = \frac{[C] \times [D]}{[A] \times [B]}$$

$$K = \frac{[C]_{\text{éq}} \times [D]_{\text{éq}}}{[A]_{\text{éq}} \times [B]_{\text{éq}}}$$

Avec

$\Delta_r G^{\circ'}$: enthalpie libre dans les conditions standard biologiques

Q_r : quotient de réaction

$K_{\text{éq}}$: cte d'équilibre

III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

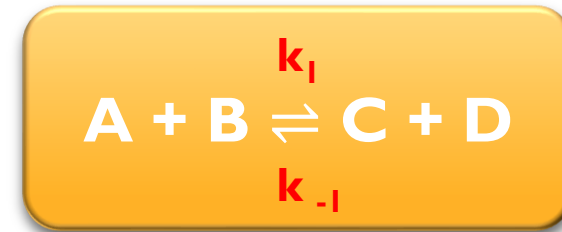
B. LES ENZYMES MODIFIENT LA CINÉTIQUE ET NON LA THERMODYNAMIQUE



I. Variation d'enthalpie libre inchangée ($\Delta_r G$)

Effet des enzymes

- Les enzymes **accélèrent autant la réaction dans un sens que dans l'autre.**
 $\rightarrow k_1/k_{-1} = K$
- Les enzymes ne modifient donc pas l'équilibre chimique (K)
 - Pas d'effet sur les concentrations à l'équilibre
 - Pas d'effet sur $\Delta_r G'$
- Il n'y a pas de lien direct entre $\Delta_r G'$ et la vitesse d'une réaction
 - Une réaction peut être thermodynamiquement très spontanée mais infiniment lente



A l'équilibre,

$$v_1 = v_{-1}$$

$$k_1 \cdot [A] \cdot [B] = k_{-1} \cdot [C] \cdot [D]$$

$$k_1/k_{-1} = [C] \cdot [D] / [A] \cdot [B] = K$$

État standard χ : $T^\circ C = 25^\circ C$, 1 atm,
 $5 = 1 \text{ mol.L}^{-1}$

État standard bio
(physiologique): pH=7

$$\Delta_r G' = \Delta_r G^{\circ\prime} + RT \cdot \ln ([C][D] / [A][B])$$

Si $\Delta_r G' > 0$, c'est la réaction inverse qui se réalise

\rightarrow Les enzymes ne modifient ni l'état initial, ni l'état final, ni l'équilibre d'une réaction

III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

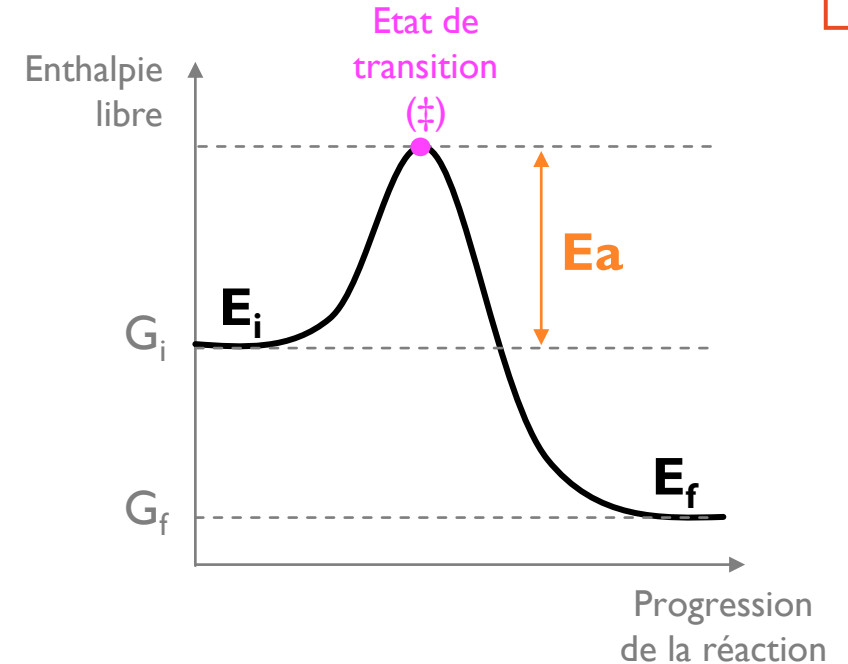
B. LES ENZYMES MODIFIENT LA CINETIQUE ET NON LA THERMODYNAMIQUE



2. Energie d'activation abaissée

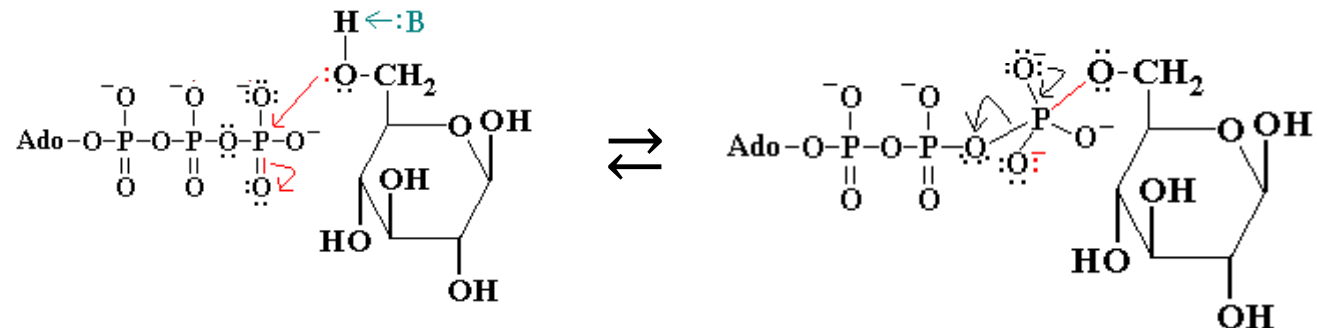
Rappels

- Lors d'une réaction chimique spontanée, le système passe d'un état initial (E_i) à un état final (E_f) de moindre énergie.
- La réaction implique la rupture de liaisons covalentes nécessitant un apport d'énergie.
→ **Energie d'activation (E_a)**
- Les réactifs passent alors par un **état activé, l'état de transition (\ddagger)**, avant de se transformer en produits.



Evolution de l'énergie libre au cours d'une réaction chimique (E. Bouguyon)

Etat de transition dans le cas de la phosphorylation du glucose sur le carbone 6 (Wikipédia)



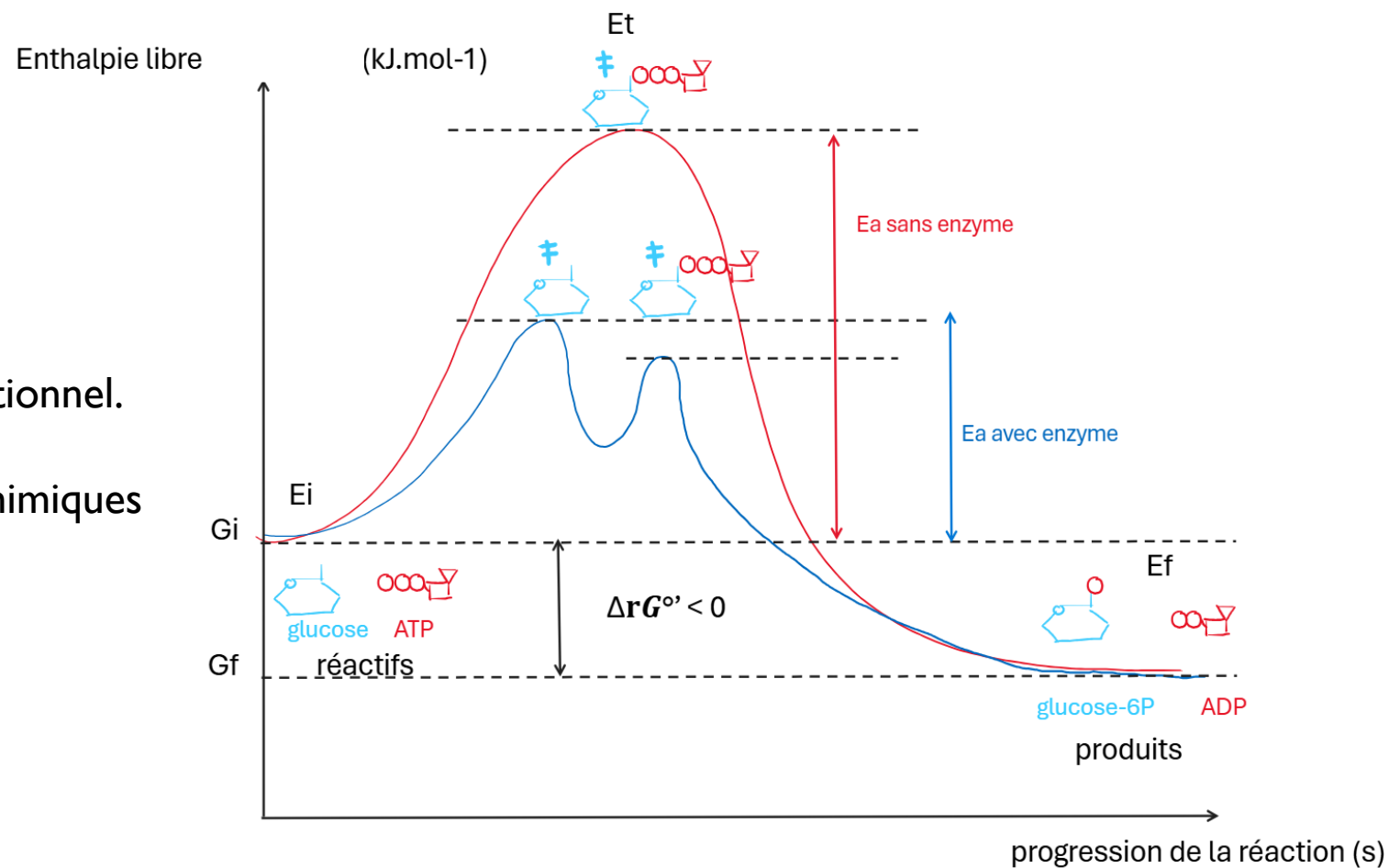
III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

B. LES ENZYMES MODIFIENT LA CINETIQUE ET NON LA THERMODYNAMIQUE

2. Energie d'activation abaissée

Effet des enzymes

- Si $\searrow E_a$ alors \nearrow probabilité de réaction
 \rightarrow vitesse de la réaction \nearrow
- La valeur de l' E_a dépend du mécanisme réactionnel.
- Les enzymes **accélèrent** les réactions biochimiques en **abaissant l'énergie d'activation**.
 - Elles modifient le mécanisme réactionnel
 - Elles s'associent plus étroitement à l'état de transition qu'aux réactifs/produits
 - \rightarrow Stabilisation de l'état de transition
 - \rightarrow Diminution de l' E_a

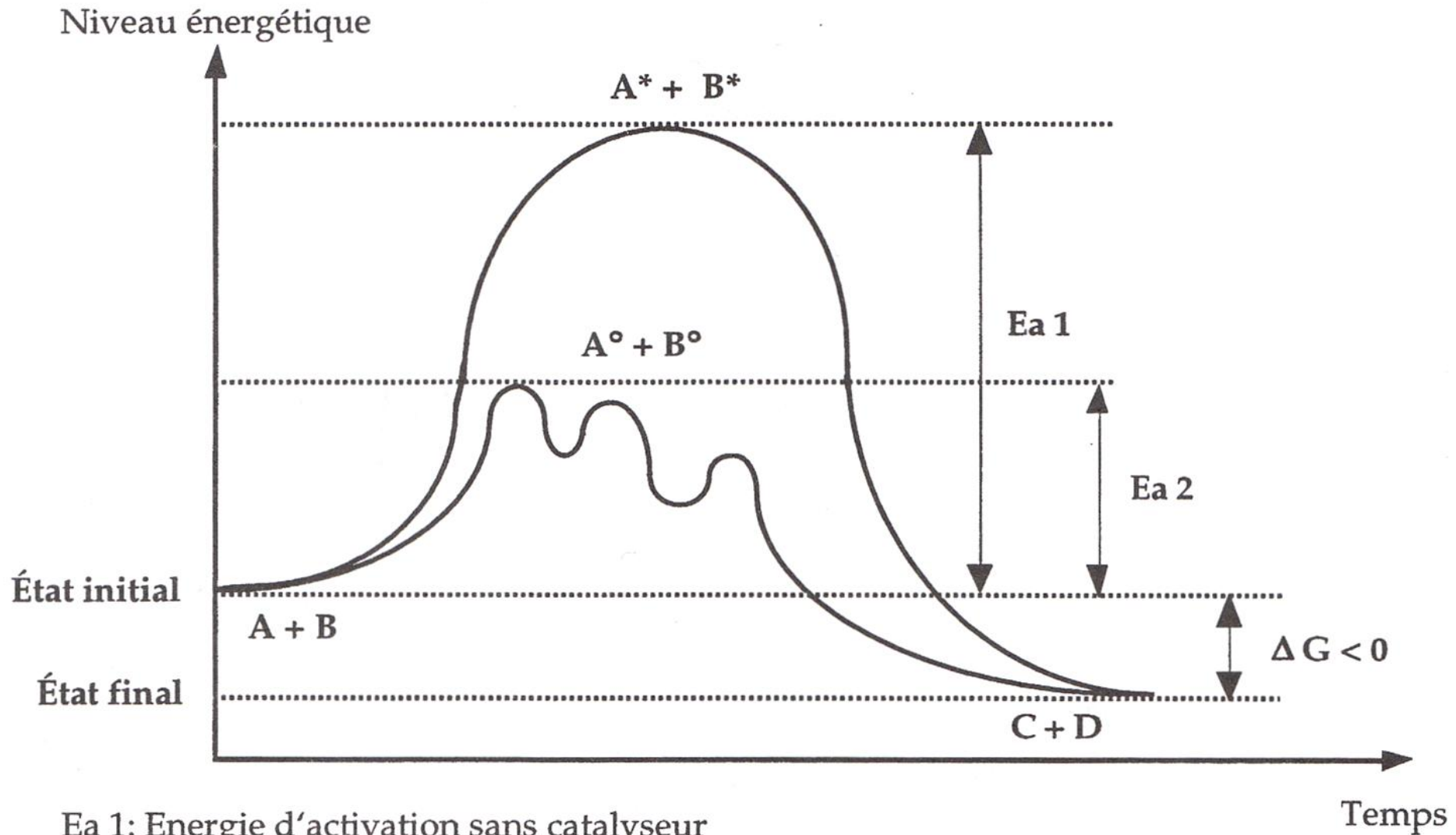


Evolution de l'enthalpie libre au cours d'une réaction chimique (S. Dalaine)

\rightarrow Les enzymes accélèrent les réactions biochimiques en abaissant l' E_a

Effet des enzymes sur l'énergie d'activation

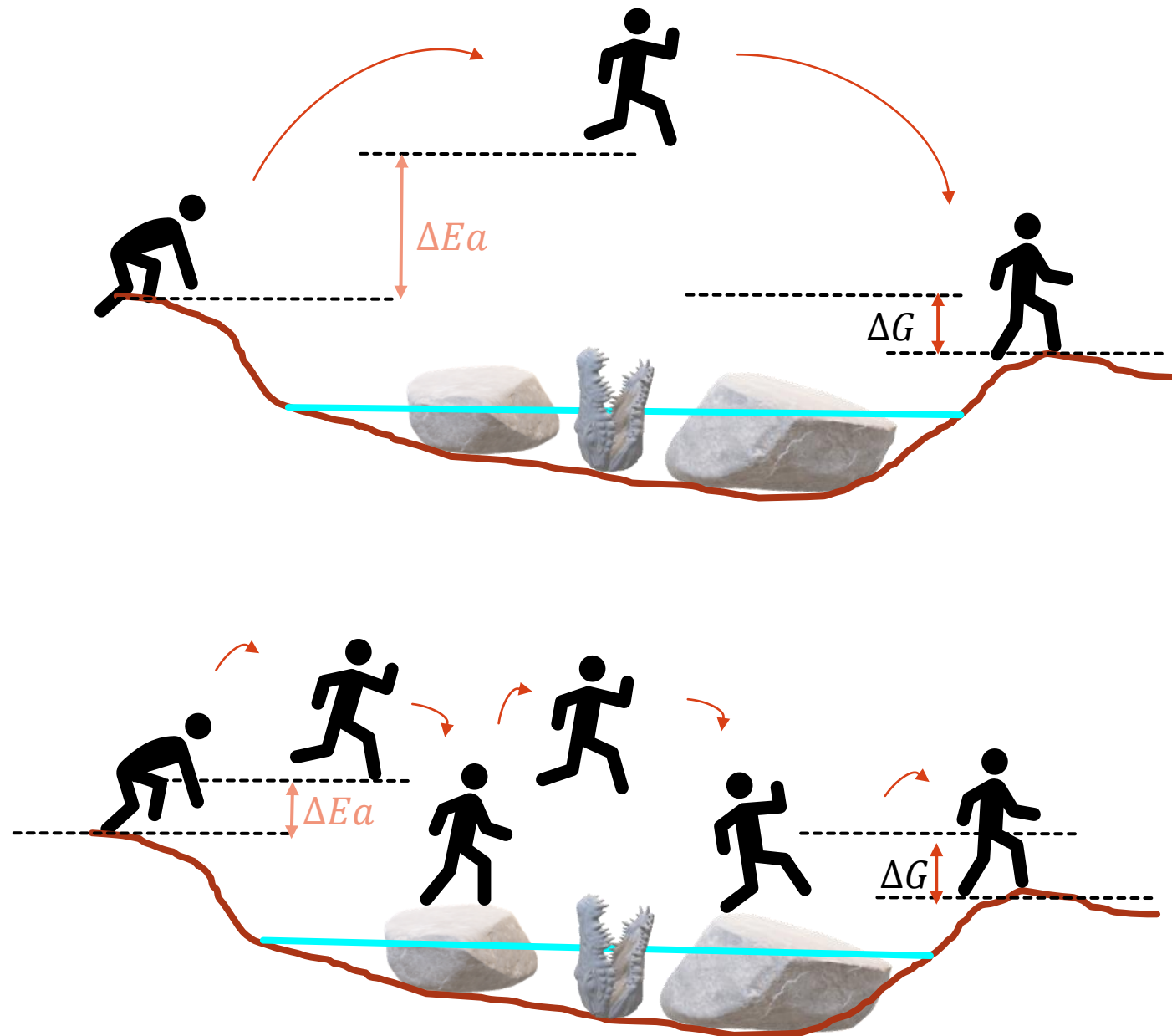
Abaissement de l'énergie d'activation par l'action enzymatique.



$Ea 1$: Energie d'activation sans catalyseur

$Ea 2$: Energie d'activation avec catalyseur

$\Delta G < 0$: Variation d'enthalpie libre de la réaction exergonique



III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

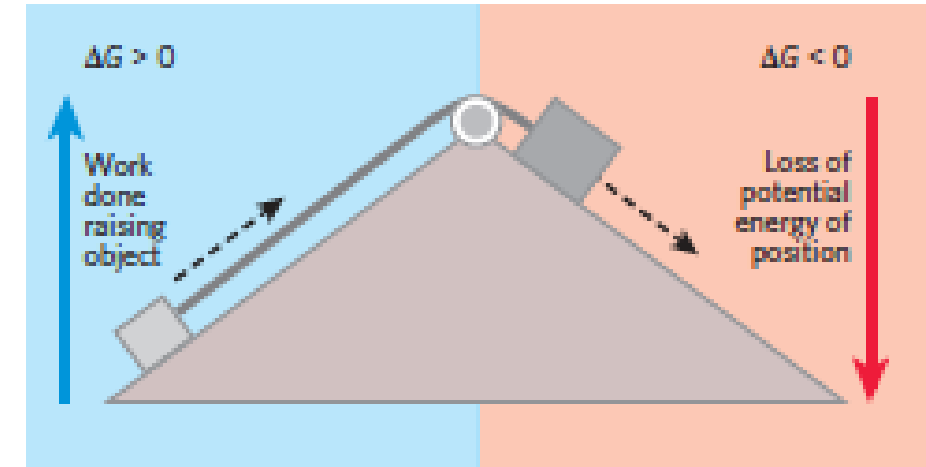
B. LES ENZYMES MODIFIENT LA CINETIQUE ET NON LA THERMODYNAMIQUE

3. Couplages énergétiques

Généralités

- Les enzymes permettent à des **réactions** thermodynamiquement **exergoniques** mais à forte **Ea** de **se produire**
- Elles interviennent alors comme **éléments de couplage**
- Un tel **couplage** peut se produire **ssi** : $\Delta_r G \ll 0$

(a) Mechanical example



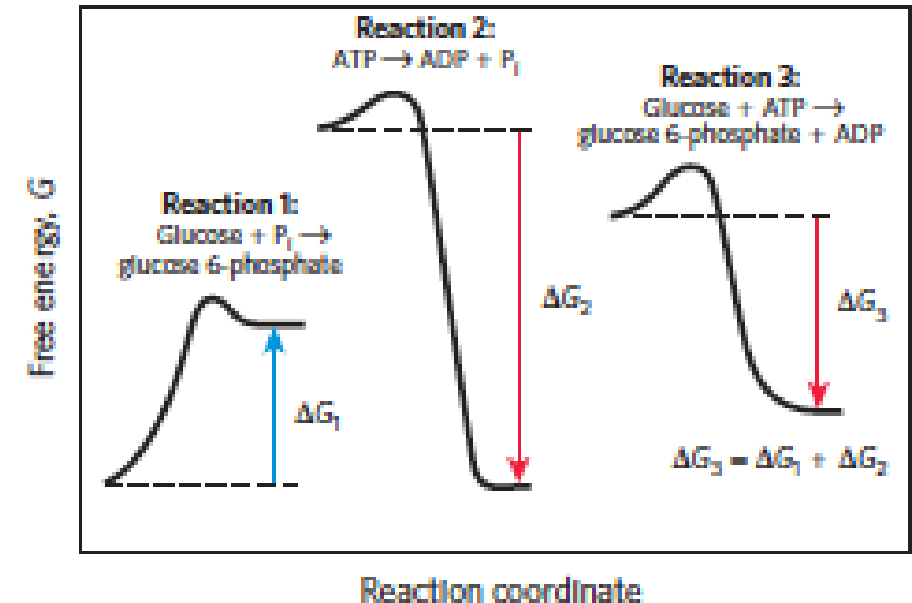
Endergonic

Exergonic

Notion de couplages énergétiques

(in Lehninger)

(b) Chemical example



III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

B. LES ENZYMES MODIFIENT LA CINÉTIQUE ET NON LA THERMODYNAMIQUE

3. Couplages énergétiques

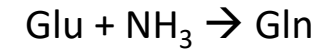
Mécanisme

- Lors d'un couplage, la **réaction non spontanée** est « découpée » en **deux réactions spontanées**.
- Le couplage passe ainsi par la production d'un **intermédiaire activé**, produit d'une réaction et réactif de l'autre.
- Dans la cellule, les réactions non spontanées sont souvent couplées à l'hydrolyse spontanée de l'ATP qui libère beaucoup d'énergie ($\Delta G \sim -11 \text{ kcal/mol}$).



Exemple de couplage : synthèse de Gln par la Gln-synthétase

La synthèse de Gln est non spontanée



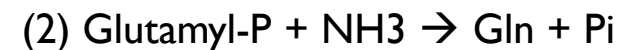
$$\Delta_r G^{\circ'} = +3,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Hydrolyse de l'ATP :

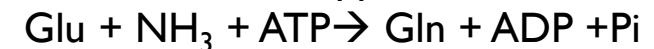


$$\Delta_r G^{\circ'} = -7,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Synthèse en présence de l'enzyme :



Réaction apparente:



$$\Delta_r G^{\circ'} \text{ global} = -3,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

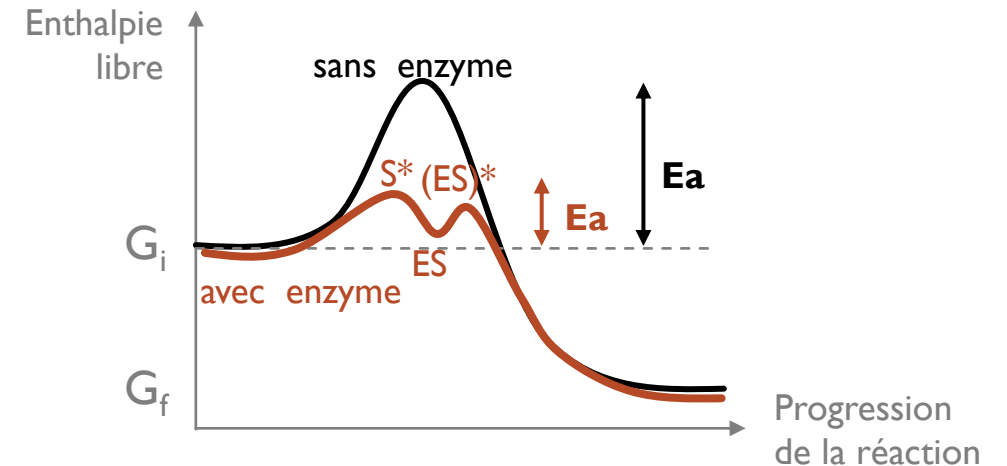
III. LES ENZYMES, DES BIOCATALYSEURS

BILAN

Enzyme : (n.f.) biocatalyseur présentant une spécificité de substrat et d'action qui fonctionne dans des conditions compatibles avec la vie



- Les **enzymes** sont des **protéines** qui jouent le rôle de **biocatalyseurs**.
- Elles se distinguent des catalyseurs chimiques par plusieurs aspects :
 - Leur grande efficacité
 - Leurs conditions de fonctionnement modérées
 - Leur double spécificité (d'action et de substrat)
 - Leur recours à des cofacteurs (s.l.) pour réaliser certaines réactions
- Les enzymes ne **modifient pas l'équilibre** d'une réaction biochimique ($\Delta_r G' = \text{cte}$) :
 - elles ne catalysent que des **réactions spontanées**
 - elles permettent des **couplages énergétiques** ($\Delta_r G_{\text{global}} \ll 0$)
- Les enzymes **accélèrent** les réactions en **abaissant l'énergie d'activation (E_a)** par stabilisation de l'état de transition.



→ Les enzymes agissent uniquement sur la cinétique des réactions biochimiques.

PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

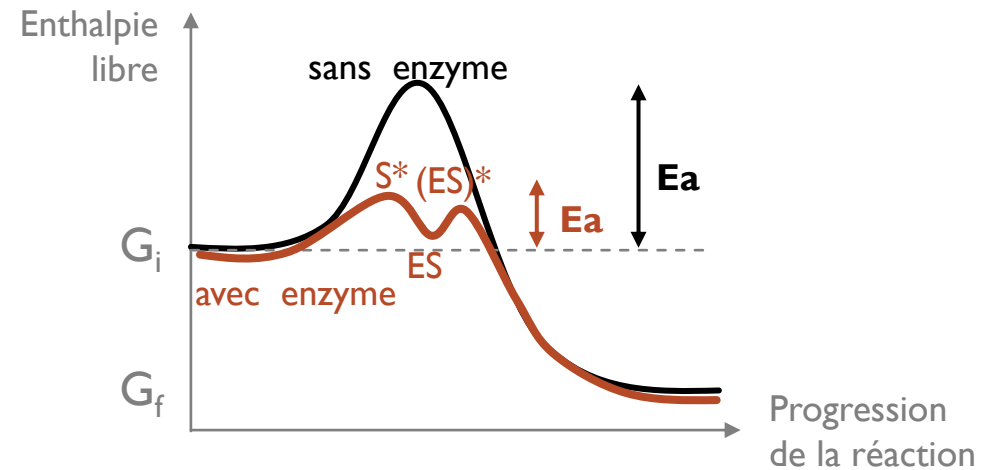
IV. L'INHIBITION DE LA CINETIQUE MICHAELIENNE



INTRODUCTION



- Un **inhibiteur** est une substance capable d'empêcher le fonctionnement d'une enzyme



Comment agissent ces inhibiteurs ?
Quel peut être leur intérêt ?



T

Inhibiteurs

IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

A. LES INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES

Exemples :

- le DIFP, inhibiteur de la chymotrypsine : il se lie de façon covalente à un AA clé pour la catalyse (Ser195)
- Les cations de métaux lourds empêchent la formation de ponts disulfures → modification de la structure de l'enzyme

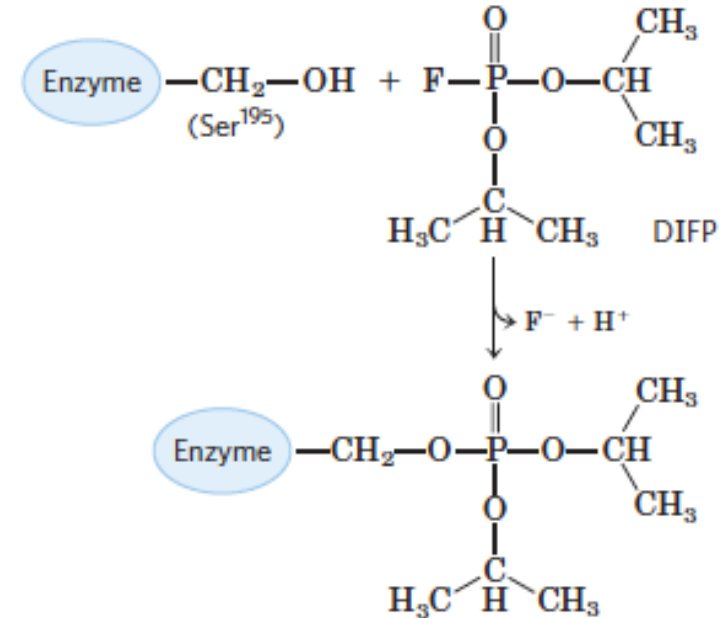
- **Mécanisme d'action** : **Liaison** étroite et **irréversible**, souvent par liaisons covalentes, avec l'enzyme

- **Conséquences** : souvent **toxiques** pour l'organisme

cf. gaz de combat (ex : sarin) inhibiteurs de l'ACh estérase

Applications :

- **Outil** d'étude des mécanismes catalytiques
- **Pesticides** (ex : pesticides organophosphorés inhibiteurs de l'ACh estérase)
- **Médicaments** (Ex : aspirine inhibiteur de la cyclooxygénase)



Le DIFP, un inhibiteur irréversible de la chymotrypsine
(in Lehninger)

Chymotrypsine : (n.f.) enzyme protéolytique du suc pancréatique

Acétylcholine estérase : (n.f.) enzyme responsable de la dégradation de l'ACh dans la synapse

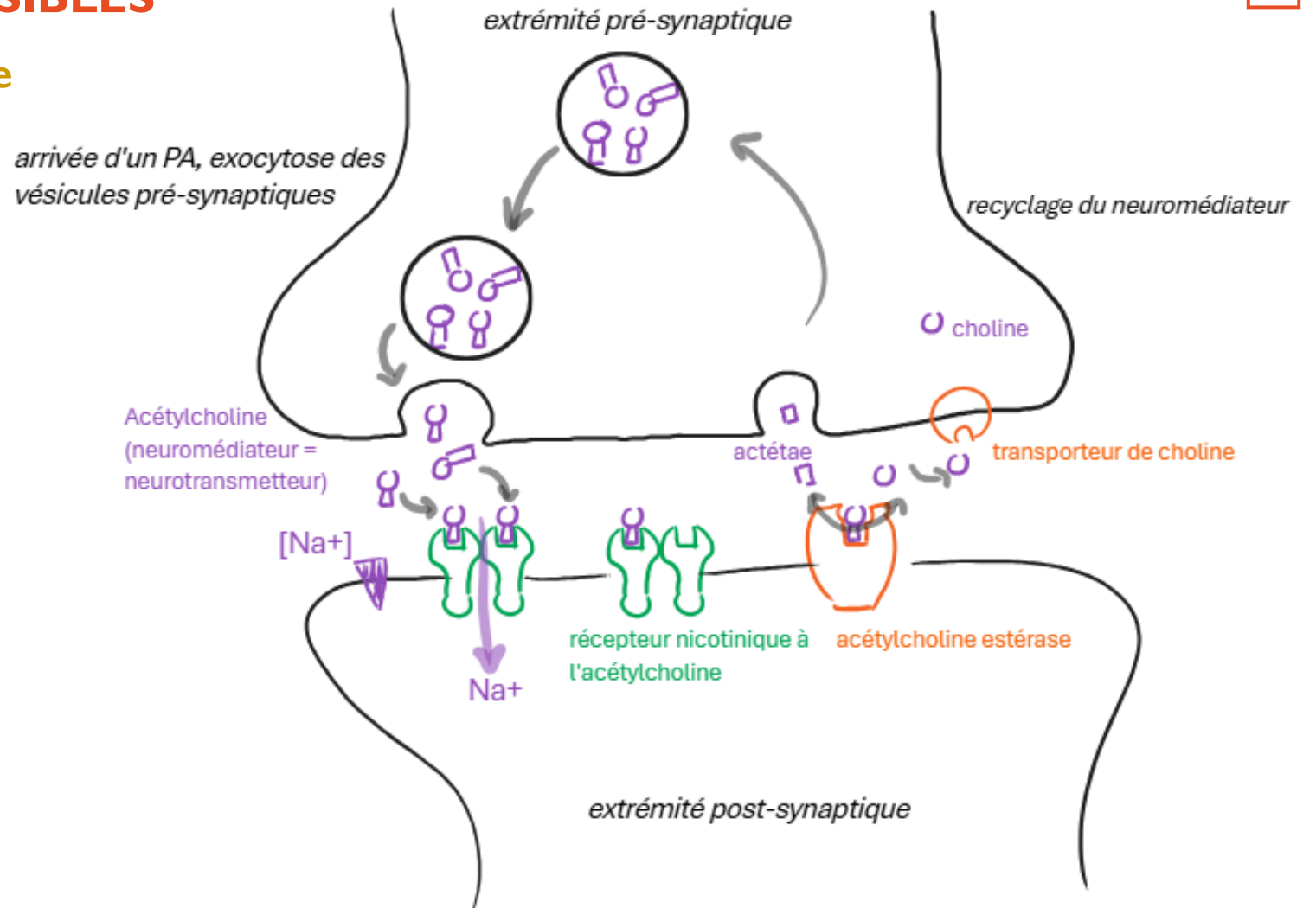
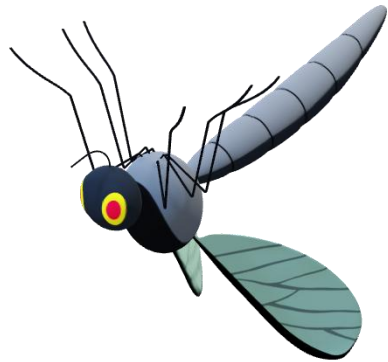
inhibiteur irréversible : (n.m.) molécule qui s'associe de façon très étroite avec l'enzyme, souvent par liaisons covalentes et irréversibles.

IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE



A. LES INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES

Action d'un inhibiteur irréversible le diisopropylfluorophosphate

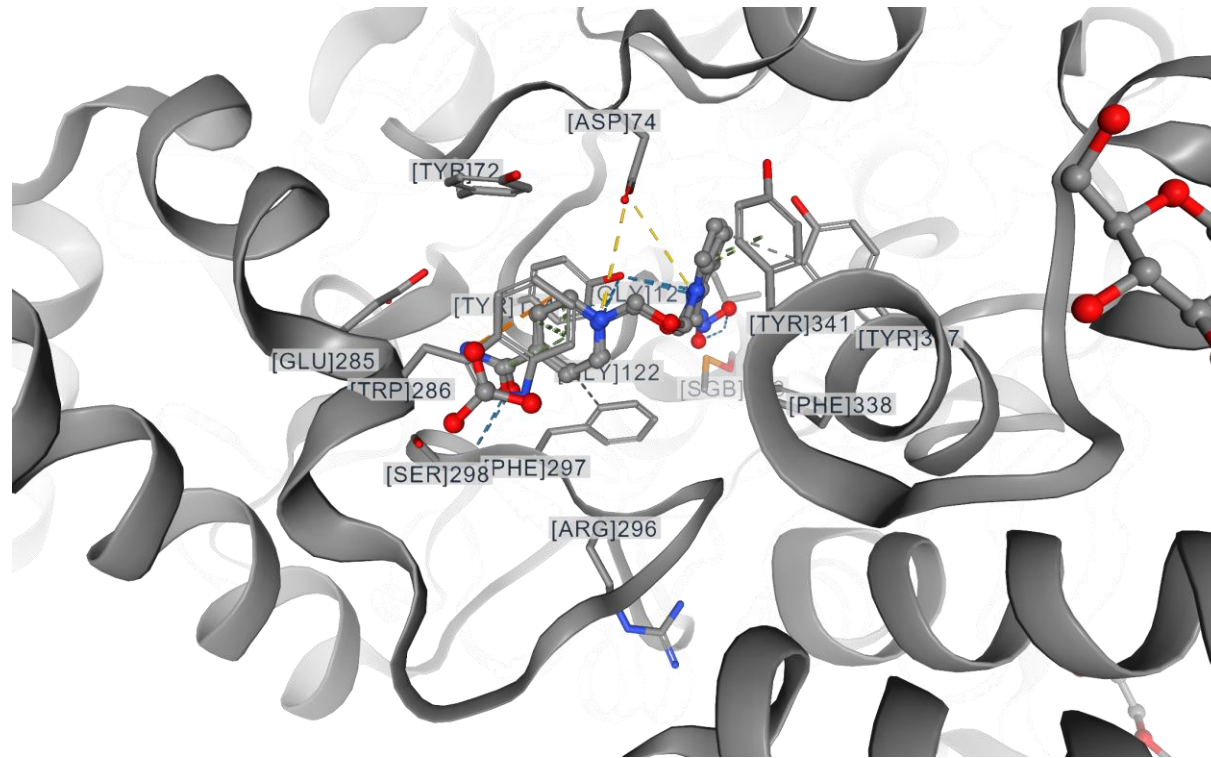


Localisation de l'acétylcholine estérase, cible des organosphosphorés

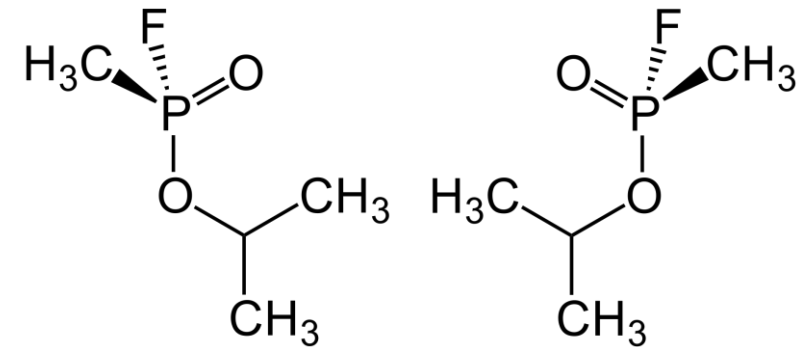
IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

A. LES INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES

Gaz sarin: organophosphoré, inhibiteur irréversible de l'ach estérase



Attentat dans le métro de Tokyo en mars 1995



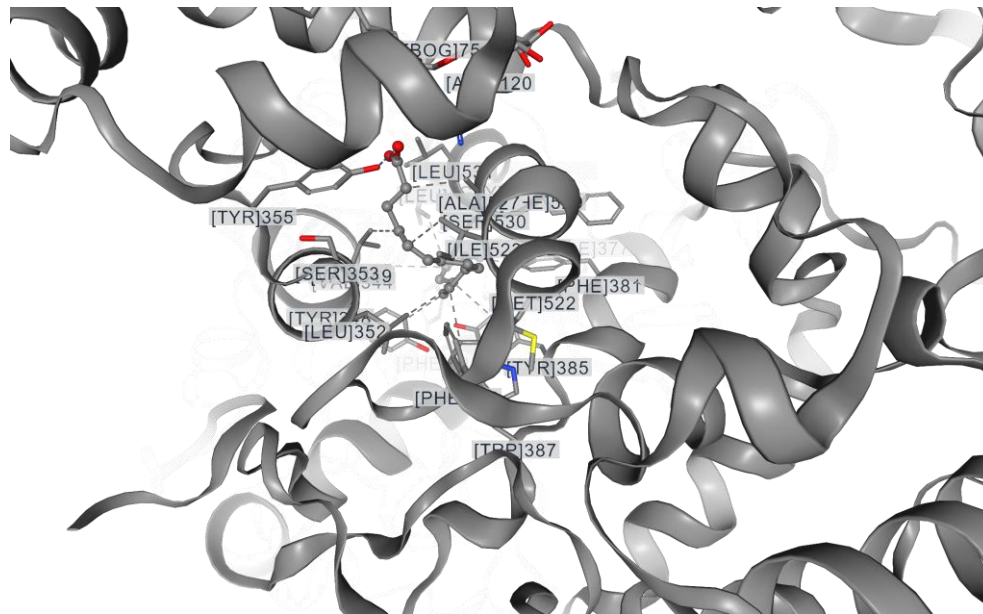
Mise en évidence via Libmol des interactions nombreuses (ioniques, H, VDW, empilement de cycles aromatiques) entre le sarin et le site actif de l'Ach E (molécule 5fpp)

IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

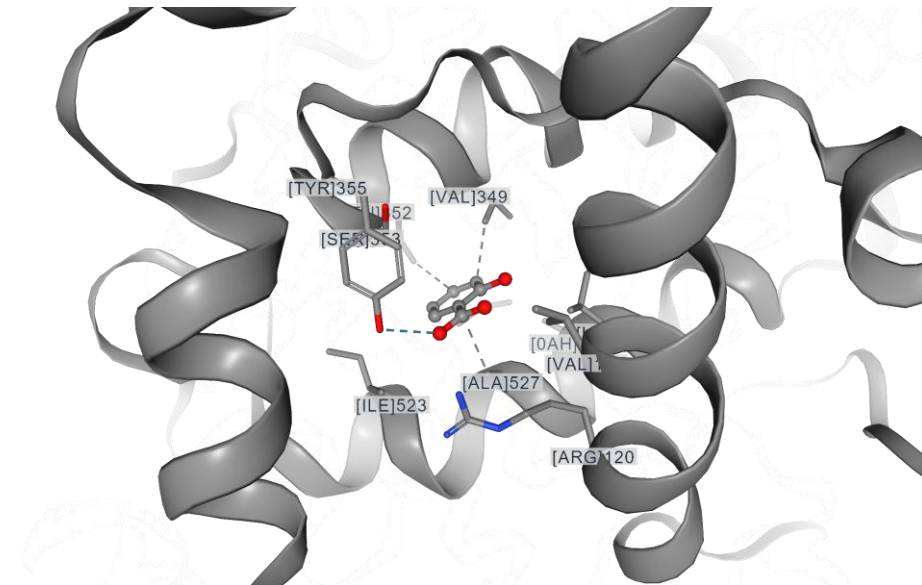
A. LES INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES

Aspirine, anti-inflammatoire non stéroïdien, inhibiteur irréversible de la COX

Entraînement à
Libmol



Interactions ES entre l'acide
arachidonique et la COX I

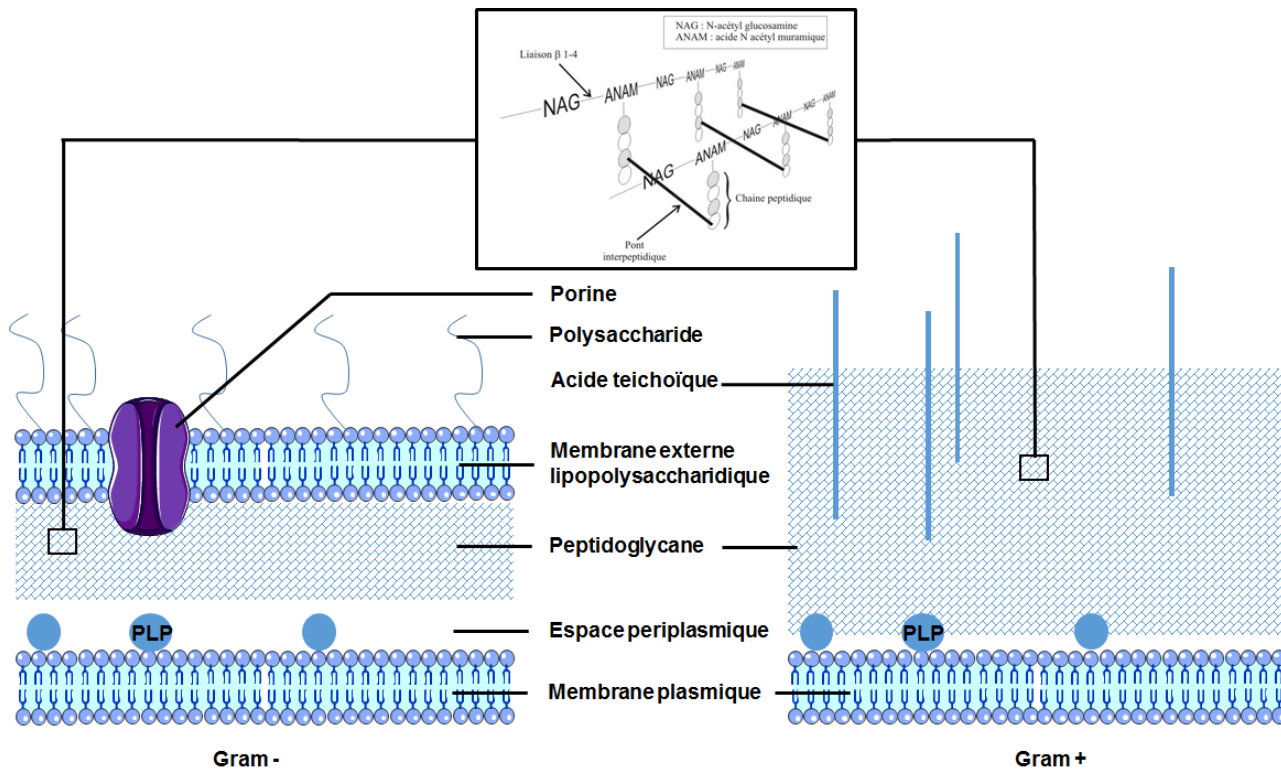


Interactions ES entre l'aspirine
et la COX I

IV. L'INHIBITION DE LA CINETIQUE MICHAELIENNE

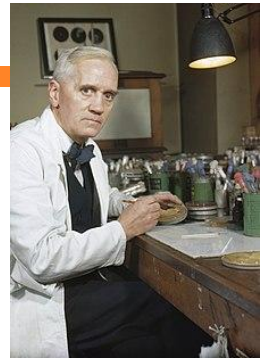
A. LES INHIBITEURS IRRÉVERSIBLES

Effet de la pénicilline, inhibiteur irréversible de l'enzyme de la synthèse de la paroi bactérienne GRAM+

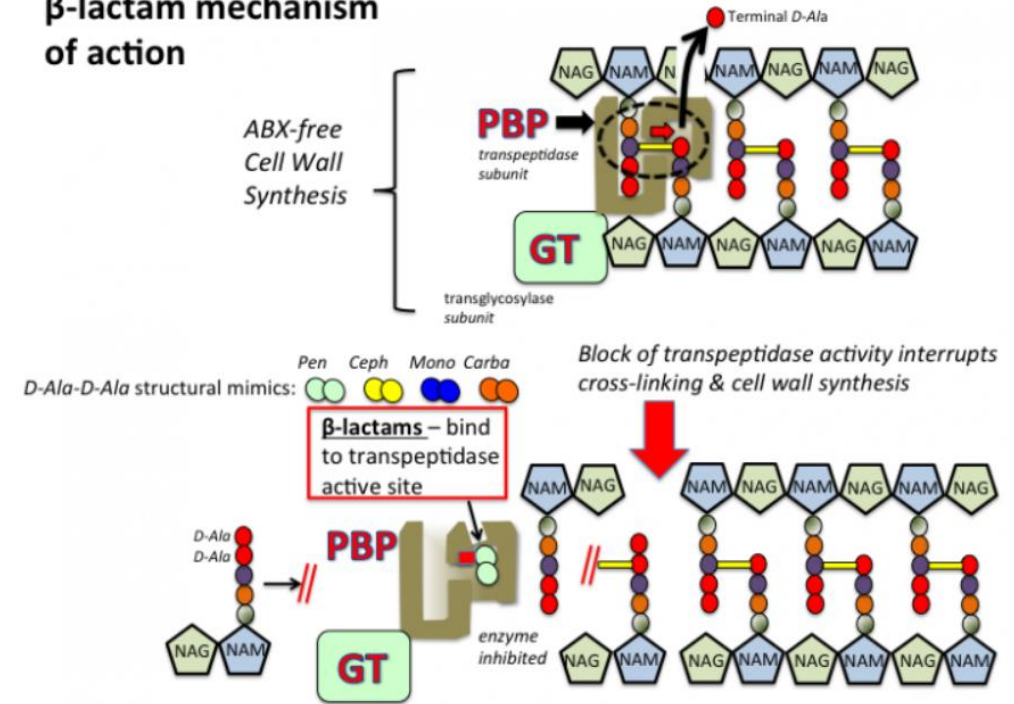


Agencement des chaînes de peptidoglycane = muréine dans la paroi bactérienne
(source: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/beta-lactamines-penicillines-cephalosporines>)

Alexander Fleming (1881 – 1955)
Physiologie - Médecine



β-lactam mechanism of action



La pénicilline = famille des bêta-lactamines
=> Inhibition de la transpeptidase qui catalyse les liaisons peptidiques entre les peptidoglycanes

PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

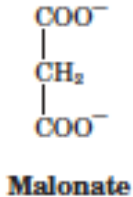
B. LES INHIBITEURS RÉVERSIBLES ABAISSENT LA VITESSE DE RÉACTION

I. Inhibiteurs compétitifs

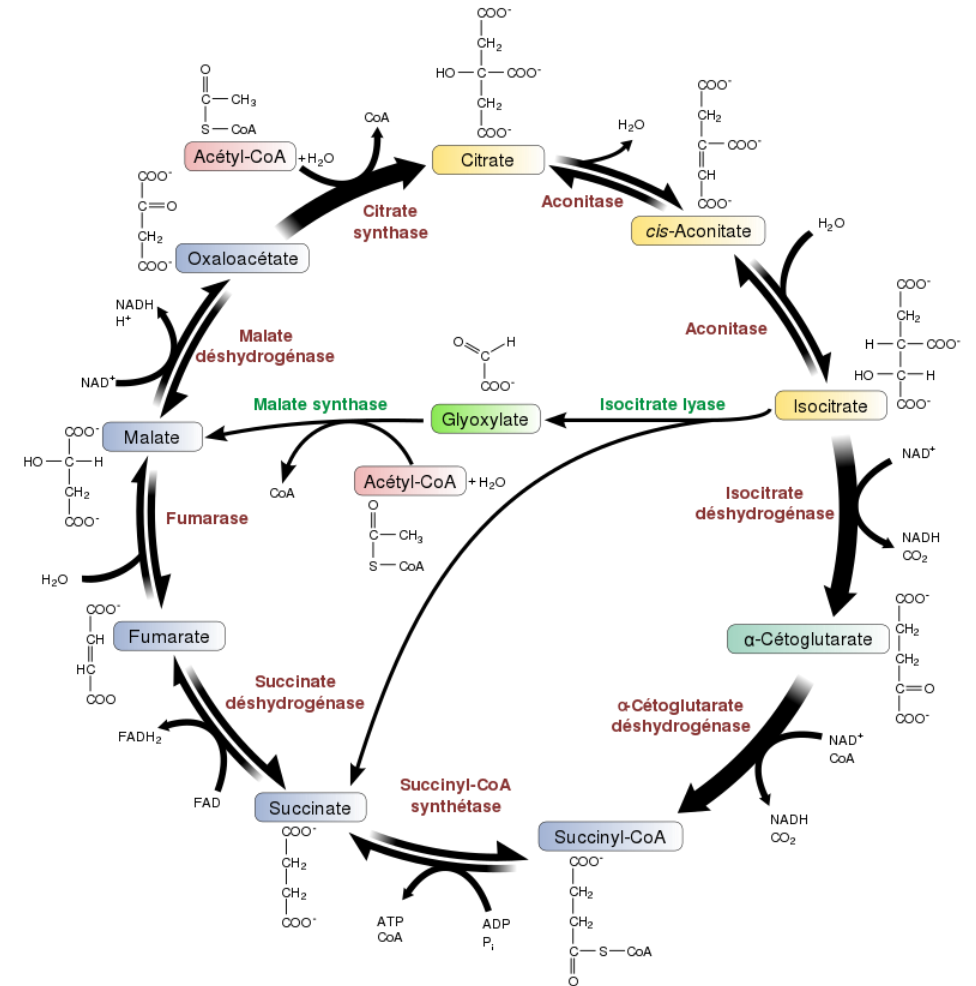
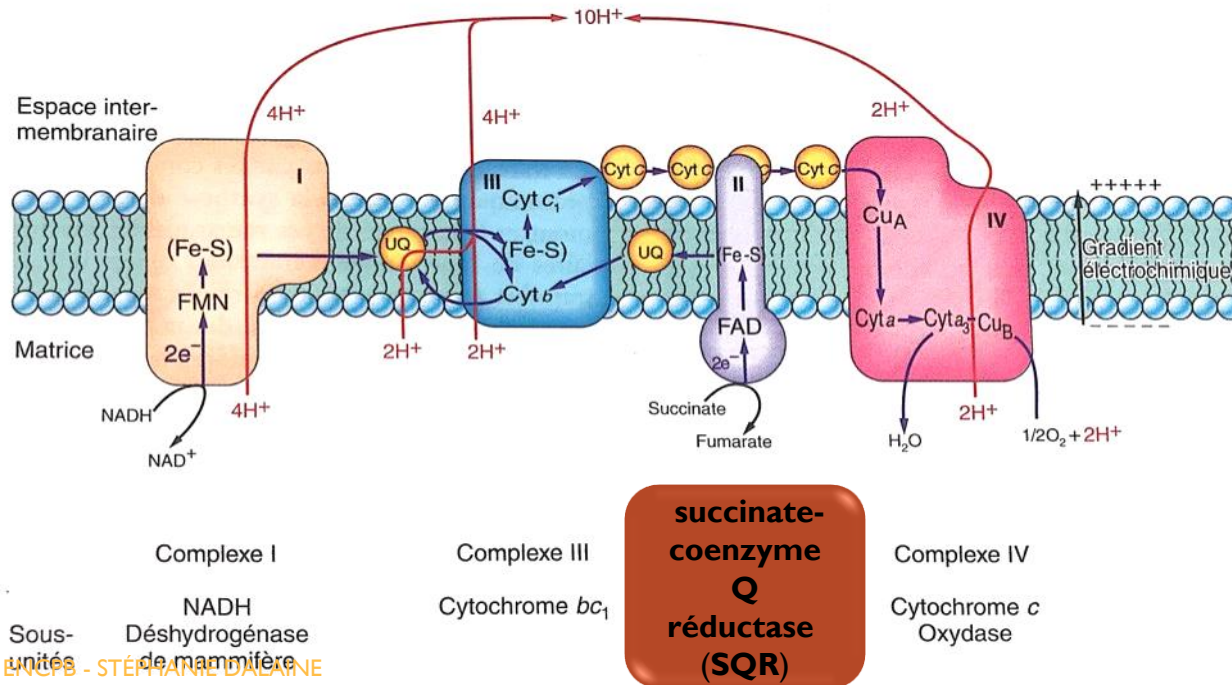
Approche expérimentale

- **Modèle d'étude** : la succinate déshydrogénase (SDH)

- **Réaction** :



- **Inhibiteur** :



IV. L'INHIBITION DE LA CINETIQUE MICHAELIENNE

B. LES INHIBITEURS RÉVERSIBLES ABAISSENT LA VITESSE DE RÉACTION

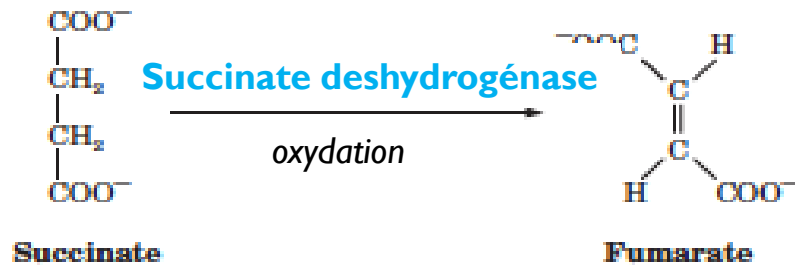


I. Inhibiteurs compétitifs

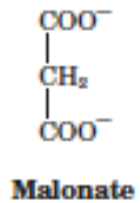
Approche expérimentale

- **Modèle d'étude** : la succinate déshydrogénase (SDH)

- **Réaction** :



- **Inhibiteur** :

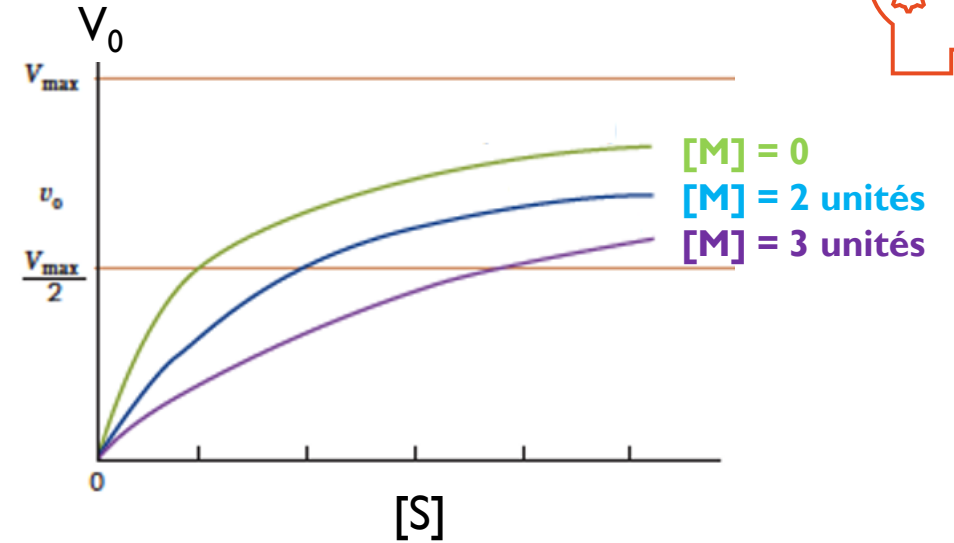


- **Analyse** : Lorsque [M] augmente...

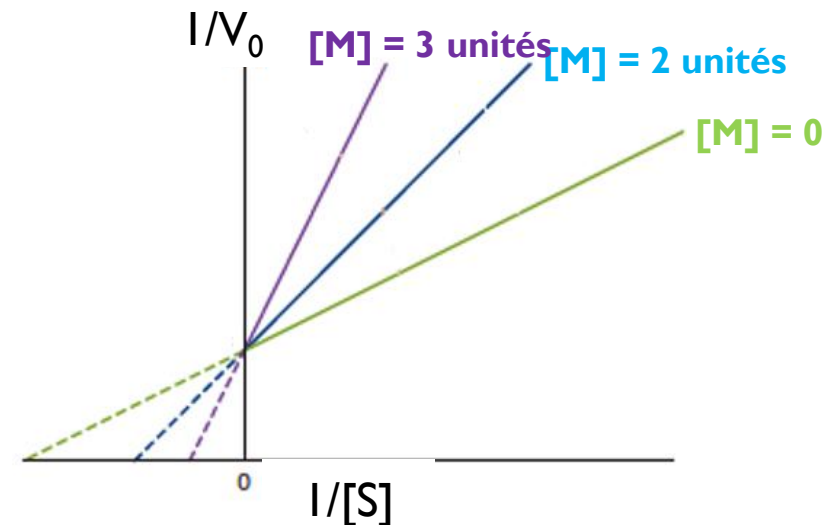
- $V_{\max} = \text{cte}$
- K_m augmente

→ En présence d'inhibiteur (malonate),

l'enzyme a moins d'affinité pour son substrat (succinate)



Etude cinétique de la SDH en présence de malonate
(in Voet)



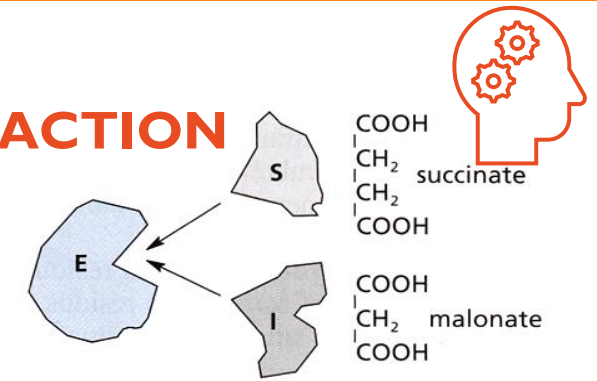
IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

B. LES INHIBITEURS RÉVERSIBLES ABAISSENT LA VITESSE DE RÉACTION

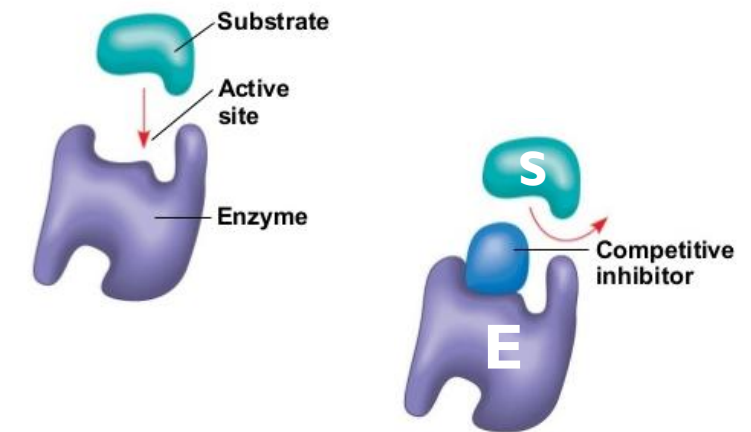
I. Inhibiteurs compétitifs

Interprétation

- La baisse d'affinité de l'enzyme pour son substrat révèle une **compétition** entre le substrat et l'inhibiteur **au niveau du site actif** de l'enzyme
→ Notion d'**inhibiteur compétitif (I_C)**
- Les I_C sont des **analogues structuraux des substrats**
 - Les I_C ont une structure très similaire à celle de S
 - Les I_C peuvent donc occuper la place de S au niveau du site actif ce qui l'empêche de se lier à E.
- L'**interaction** entre E et I_C est **transitoire, réversible** et se fait par **liaisons faibles**.
- L'**inhibition** compétitive peut être **levée** en **augmentant** le rapport **$[S]/[I_C]$** .
 - La probabilité de rencontre entre E et I_C diminue alors que celle entre E et S augmente
- Les I_C ne sont **pas transformés** en produits



Compétition du succinate (S) et du malonate (I)
au niveau du site actif de la SDH



Les inhibiteurs compétitifs prennent la place du substrat au niveau du site actif de l'enzyme

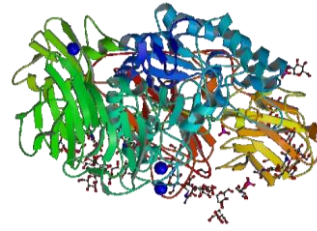
IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

B. LES INHIBITEURS RÉVERSIBLES ABAISSENT LA VITESSE DE RÉACTION

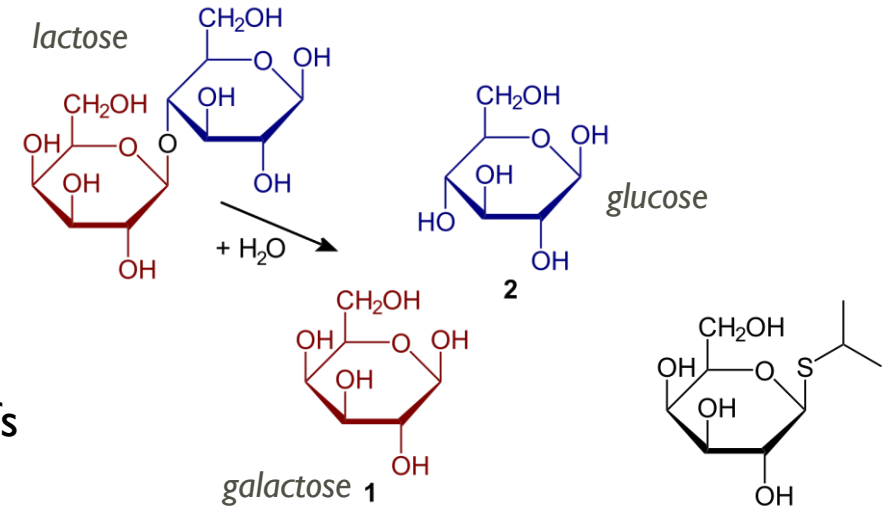
I. Inhibiteurs compétitifs

Rôles biologiques et applications

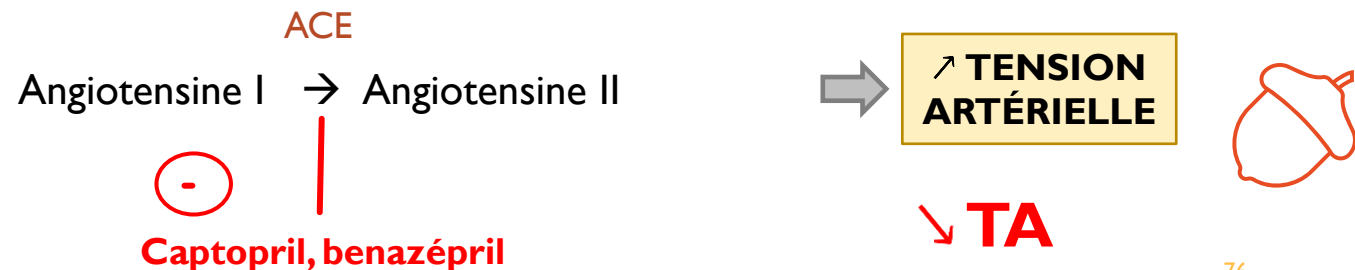
- Les **produits** de réactions qui sont des analogues structuraux des réactifs sont souvent des **inhibiteurs compétitifs (I_C)** exerçant un **retrocontrôle négatif** sur l'activité des enzymes.
- C'est le type d'inhibition le plus fréquent dans les systèmes biologiques.
- Les I_C sont des **outils pour étudier les enzymes** (ex : étude de la beta-galactosidase)
 - pour identifier la structure du site actif
 - pour comprendre comment fonctionne l'interaction E-S
 - Pour comprendre le mécanisme catalytique
- Certains **médicaments** sont des I_C d'enzymes.
 - ✓ Ex : Le captopril utilisé en cas d'hypertension est un inhibiteur compétitif de l'ACE (angiotensin-converting enzyme)
 - ✓ Ex: le benazépril



β -Galactosidase



Inhibiteur compétitif
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside



IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

B. LES INHIBITEURS RÉVERSIBLES ABAISSENT LA VITESSE DE RÉACTION

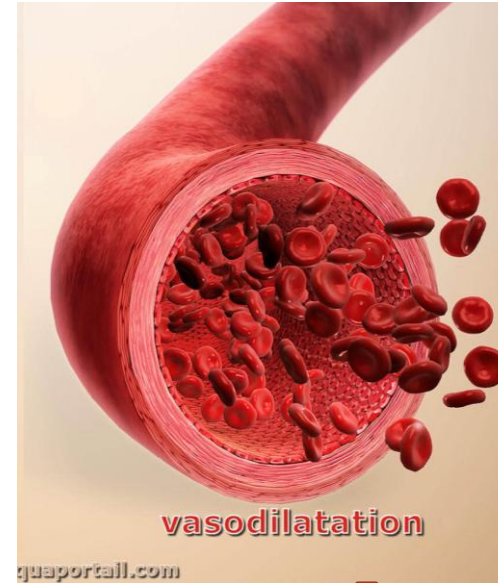
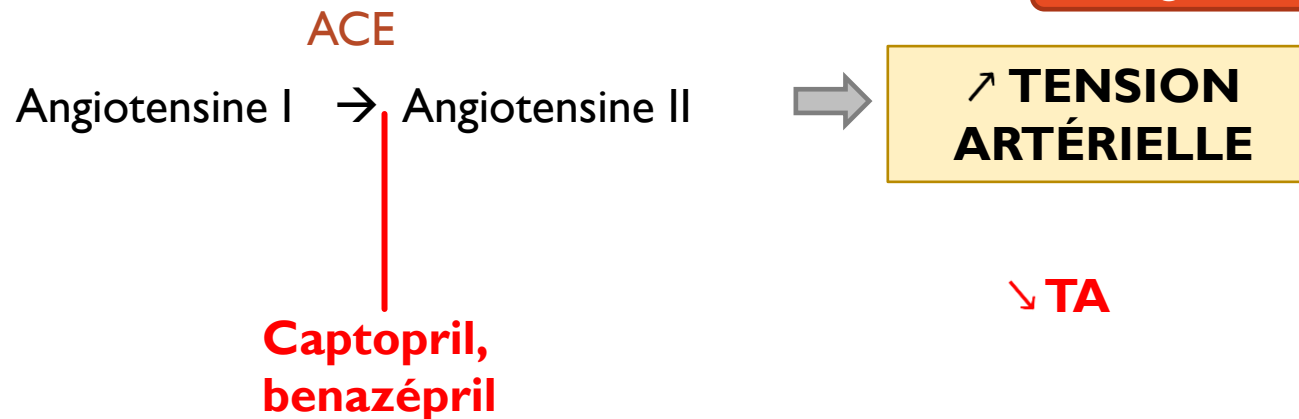
I. Inhibiteurs compétitifs

Rôles biologiques et applications

- Certains **médicaments** sont des I_c d'enzymes.



Ex : Le captopril utilisé en cas d'hypertension est un inhibiteur compétitif de l'ACE (angiotensin-converting enzyme)



Angiotensine II

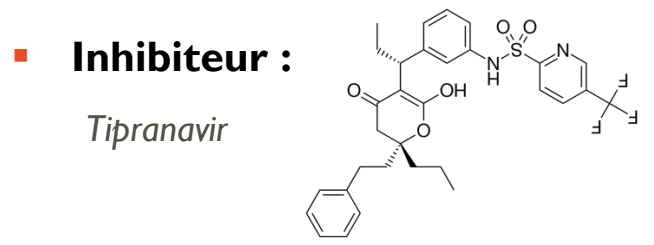
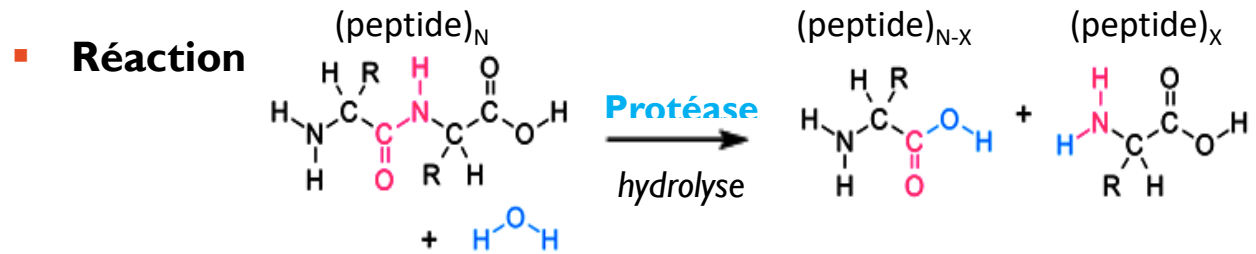
IV. L'INHIBITION DE LA CINETIQUE MICHAELIENNE

B. LES INHIBITEURS RÉVERSIBLES ABAISSENT LA VITESSE DE RÉACTION

2. Inhibiteurs non compétitifs

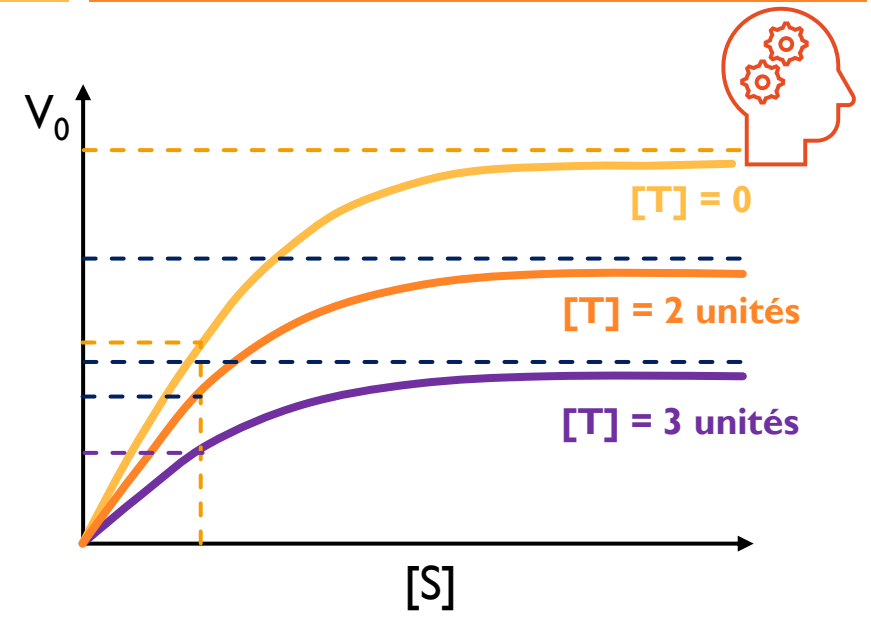
Approche expérimentale

- **Modèle d'étude** : la protéase du VIH

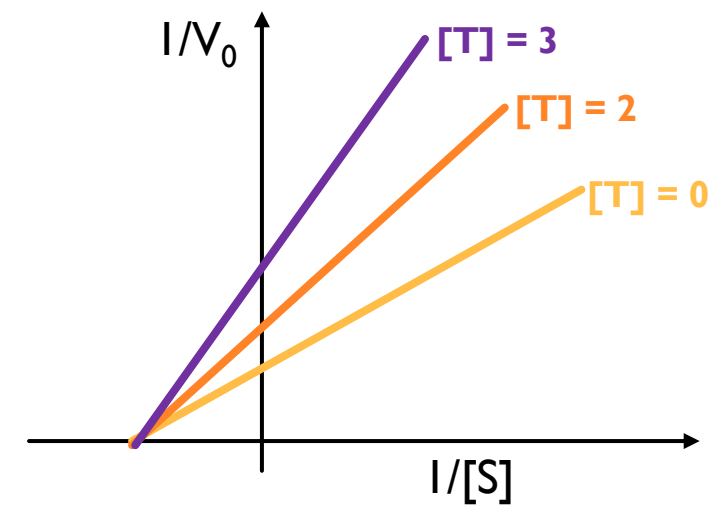


- **Analyse** : Lorsque [T] augmente...
 - V_{\max} diminue
 - K_m est cte

→ En présence d'inhibiteur (Tiplranavir), l'enzyme est moins efficace mais son affinité est peu affectée.



Etude cinétique de la protéase du VIH en présence de Tiplranavir (E. Bouguyon)



IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

B. LES INHIBITEURS RÉVERSIBLES ABAISSENT LA VITESSE DE RÉACTION

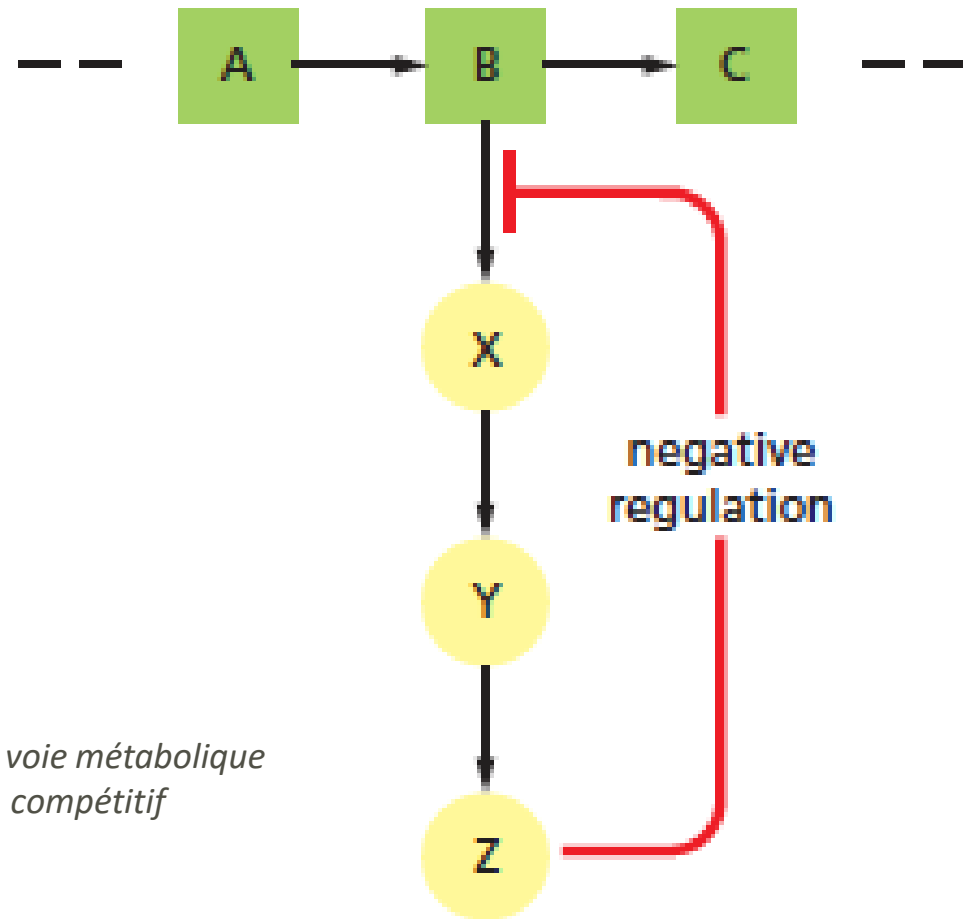


2. Inhibiteurs non compétitifs

Rôles biologiques et applications

- Les inhibiteurs non compétitifs permettent de réguler l'activité enzymatique.

Ex : les produits finaux des voies métaboliques sont souvent des inhibiteurs non compétitifs des premières enzymes de la voie = **rétrocontrôle négatif**



*Rétrocontrôle négatif d'une voie métabolique
par un inhibiteur non compétitif
(in Alberts)*

IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE

B. LES INHIBITEURS RÉVERSIBLES ABAISSENT LA VITESSE DE RÉACTION

3. Modélisation mathématique

- Les inhibiteurs réversibles diminuent la vitesse de la réaction, en jouant sur V_{0max} et/ou K_m
- En présence d'inhibiteur, l'équation de Michaelis-Menten s'applique toujours (hyperbole) mais les paramètres cinétiques sont modifiés :

$$V_0 = \frac{V_{0max}' \cdot [S]}{K_m' + [S]}$$

Inhibiteur compétitif

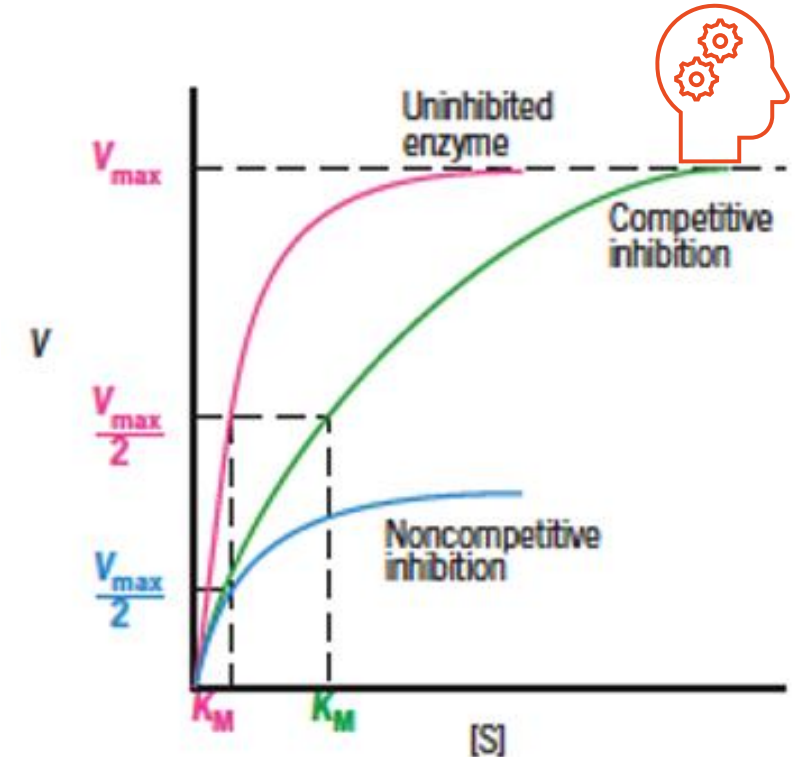
$$K_m' = K_m \cdot (1 + [I]/K_i) \quad V_{0max}' = V_{0max}$$



Inhibiteur non compétitif

$$K_m' = K_m \quad V_{0max}' = \frac{V_{0max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Avec : $[I]$ concentration en inhibiteur
 K_i affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur



Cinétique enzymatique en présence d'inhibiteurs compétitifs et non compétitifs
(in Karp 2016)

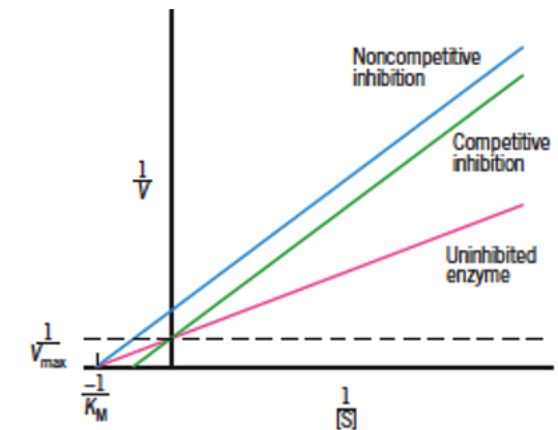
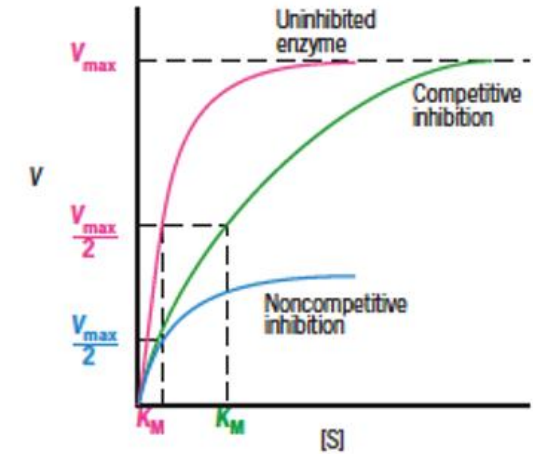
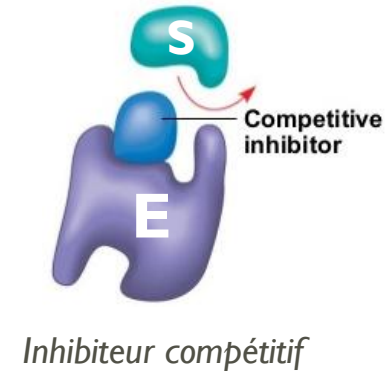
IV. L'INHIBITION DE LA CINÉTIQUE MICHAÉLIENNE



BILAN

Inhibiteur réversible : (n.m.) molécule qui s'associe de façon lâche avec l'enzyme, par liaisons faibles.

- Tous les **inhibiteurs réversibles réduisent la vitesse** de la réaction catalysée.
- Ils s'associent à l'enzyme de façon **transitoire**, par **liaisons faibles**.
- Les inhibiteurs **compétitifs** se fixent sur le **site actif**, comme le substrat, et sont donc en **compétition** avec lui.
 - **Diminution de l'affinité** de l'enzyme (efficacité cte)
 - $V_{0max} = cte$
 - K_m augmente
- Les inhibiteurs **non compétitifs** se fixent hors du site actif et **modifie la conformation de l'enzyme**.
 - **Diminution de l'efficacité** de l'enzyme (affinité cte)
 - V_{0max} diminue
 - $K_m = cte$



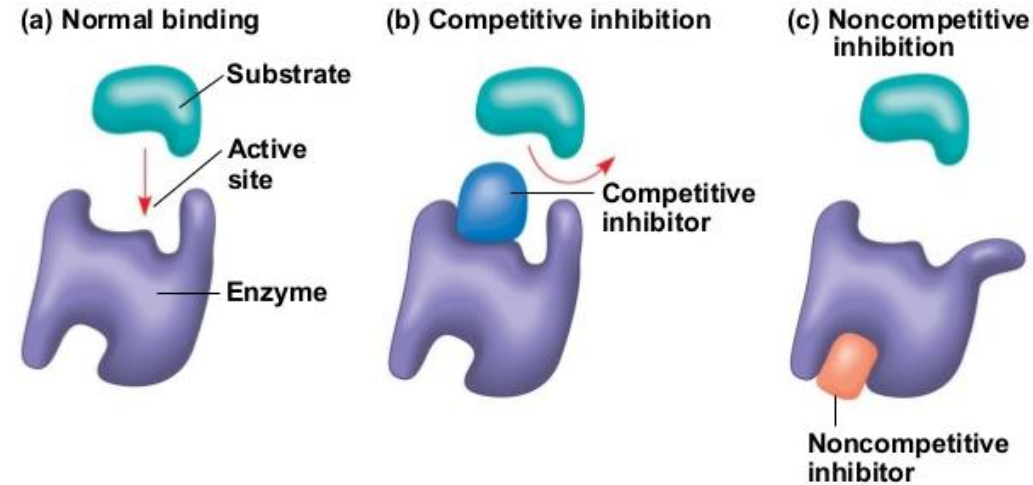
Cinétique enzymatique en présence d'inhibiteurs compétitifs et non compétitifs

(in Karp 2016)

Rem : tous les cas intermédiaires existent.

IV. L'INHIBITION DE LA CINETIQUE MICHAELIENNE

BILAN



	Compétitif	Non compétitif
Vitesse de catalyse	diminuée	diminuée
K_m et V_{0max}	$\nearrow K_m$ (V_{0max} cte)	$\searrow V_{0max}$ (K_m cte)
Affinité et efficacité	\searrow affinité	\searrow efficacité
Levée d'inhibition	$\nearrow [S]/[I]$	—
Structure	Ressemblance structurale avec S	Pas de ressemblance structurale avec S
Site de fixation	Site actif de l'enzyme libre	En dehors du site actif de l'enzyme libre
Mode d'action	prend la place du substrat au niveau du site actif	modifie la conformation de l'enzyme

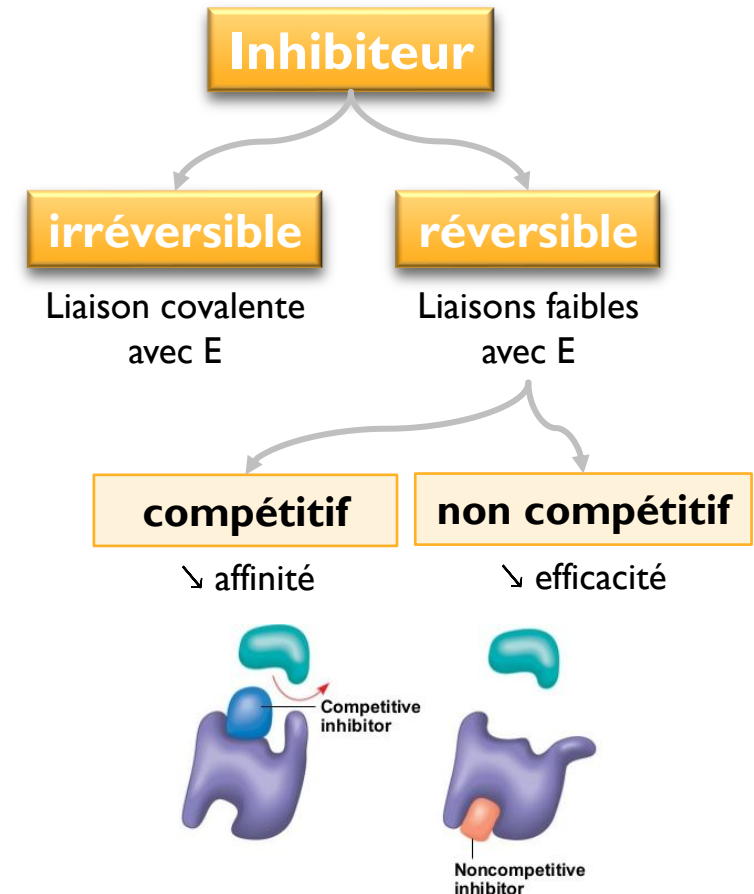
IV. L'INHIBITION DE LA CINETIQUE MICHAELIENNE

BILAN

- Les enzymes peuvent non seulement s'associer à leur substrat mais aussi à d'autres molécules, notamment des **inhibiteurs**.
- Il existe différents types d'inhibiteurs :
 - les inhibiteurs **irréversibles** se lient à l'enzyme par liaisons covalentes (ou non covalentes)
 - les inhibiteurs **réversibles** se lient à l'enzyme par liaisons faibles
- Les inhibiteurs **réversibles** ont tous pour effet de réduire l'activité enzymatique mais par différents mécanismes, on distingue :
 - Les inhibiteurs **compétitifs** : ↘ affinité
 - Les inhibiteurs **non compétitifs** : ↘ efficacité
- Les inhibiteurs jouent un **rôle essentiel** dans le **contrôle de l'activité enzymatique** dans les cellules.
- Applications : **outils** pour étudier les enzymes, **médicaments**



Inhibiteur : (n.m.) substance capable de bloquer l'activité enzymatique, ou susceptible de former avec l'enzyme un complexe qui l'empêche de fixer le substrat ou d'assurer la catalyse.



PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

INTRODUCTION

- En 1926, J. Sumner montre que l'uréase du haricot-sabre est une protéine.
- Cette conclusion sera ensuite étendue : **toutes les enzymes sont des protéines.**
- Comme toute protéine, la fonction d'une enzyme est étroitement liée à sa structure native.
- Or, l'étude cinétique des enzymes suggère la formation d'un complexe enzyme-substrat (ES), donc l'interaction physique entre l'enzyme et son substrat.

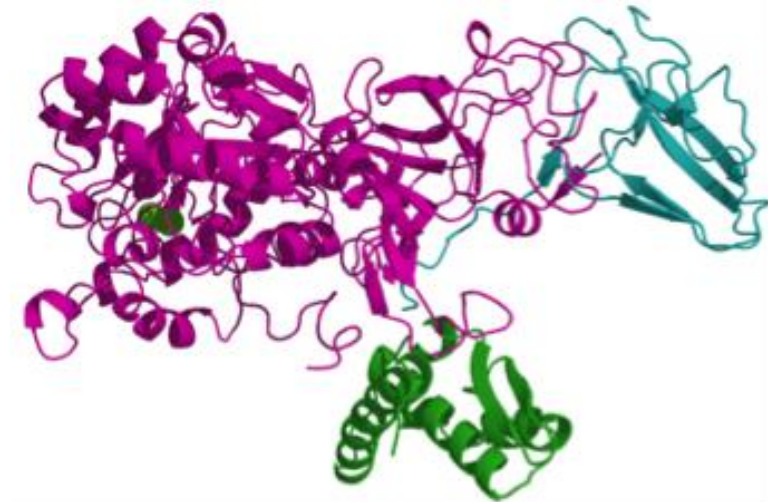
A-t-on d'autres preuves de l'existence du complexe ES ?

Comment se fait l'interaction E-S ?

Quel est le lien structure-fonction chez ces protéines ?



haricot-sabre



uréase du haricot-sabre

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

A. LA COMPLÉMENTARITÉ ENZYME-SUBSTRAT



Ajout
d'enzyme **E**

I. Approche expérimentale

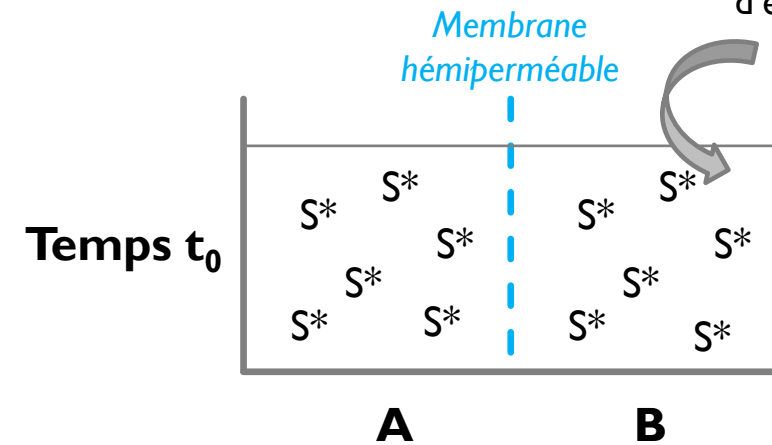
Expérience historique (1/2)

Protocole:

- Utilisation de substrat radioactif
- **Membrane hémiperméable qui laisse passer S* mais pas E**
- On mesure la radioactivité (*) dans les compartiments A et B aux temps t_0 et t

Résultats :

- à t_0 : la radioactivité est équivalente en **A** et en **B**
- à t : la radioactivité est plus élevée en **B** qu'en **A**



équilibre

Compartiment	t_0	t
A	6	4
B	6	8

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

A. LA COMPLÉMENTARITÉ ENZYME-SUBSTRAT



Ajout
d'enzyme **E**

I. Approche expérimentale

Expérience historique (1/2)

Protocole:

- Utilisation de substrat radioactif
- Membrane hémiperméable qui laisse passer S^* mais pas **E**
- On mesure la radioactivité (*) dans les compartiments A et B aux temps t_0 et t

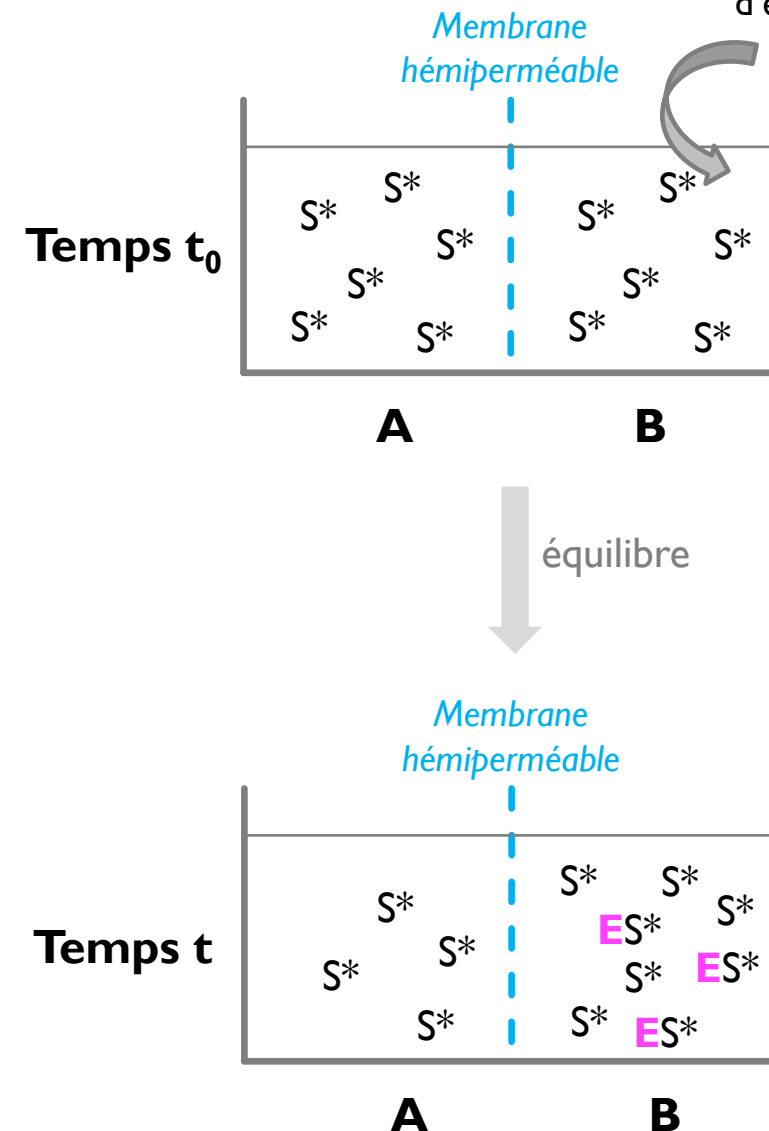
Résultats :

- à t_0 : la radioactivité est équivalente en **A** et en **B**
- à t : la radioactivité est plus élevée en **B** qu'en **A**

Interprétation :

- En B, le substrat interagit avec l'enzyme
 - diminution de $[S^*]_{\text{libre}}$
 - déplacement de S de A vers B (diffusion)

→ Mise en évidence de la formation du complexe ES



V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

A. LA COMPLÉMENTARITÉ ENZYME-SUBSTRAT



Ajout de substrat
non radioactif S

I. Approche expérimentale

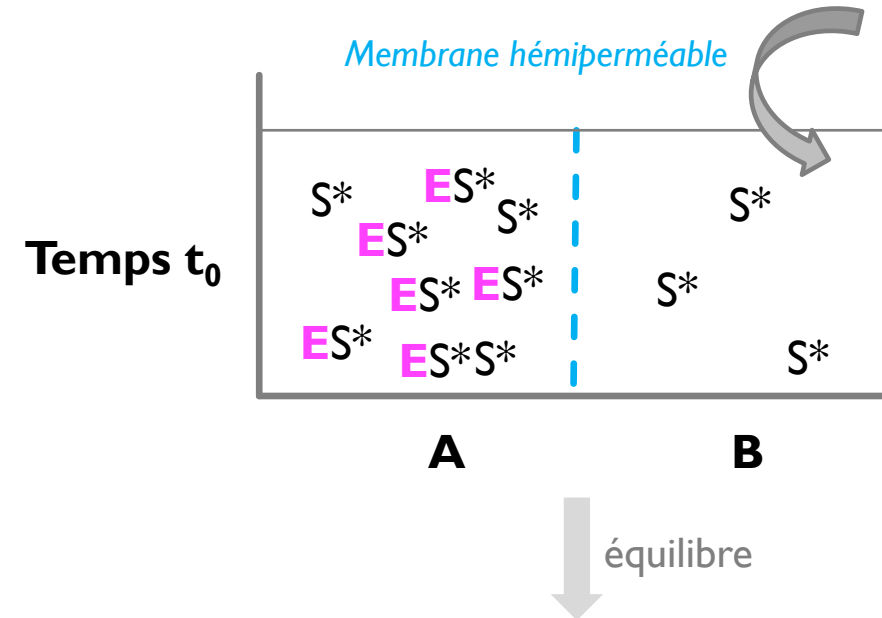
Expérience historique (2/2)

Protocole:

- Cf. expérience I

Résultats :

- L'ajout de substrat non radioactif entraîne une diminution de la radioactivité dans le compartiment A au profit du compartiment B.



Compartiment	t_0	t
A	9	8
B	3	4

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

A. LA COMPLÉMENTARITÉ ENZYME-SUBSTRAT

I. Approche expérimentale

Expérience historique (2/2)

Protocole:

- Cf. expérience I

Résultats :

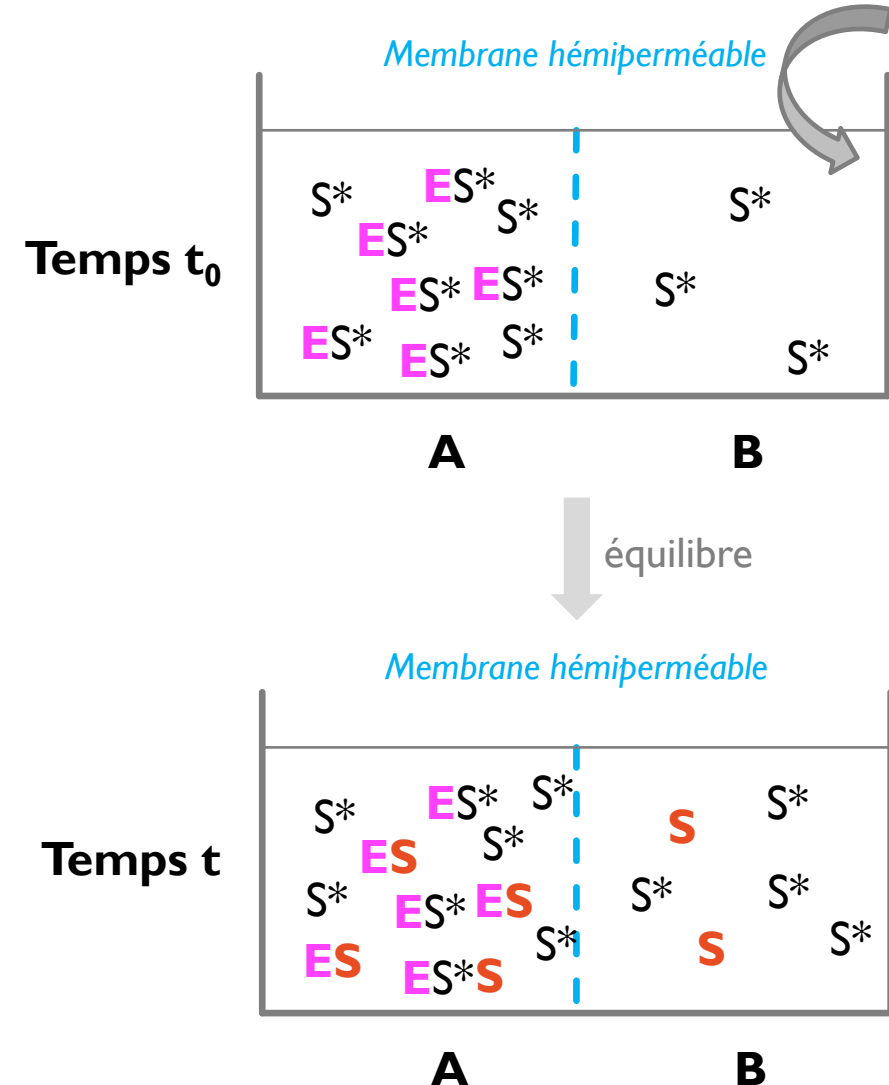
- L'ajout de substrat non radioactif entraîne une diminution de la radioactivité dans le compartiment A au profit du compartiment B.

Interprétation :

- **S** diffuse de B vers A et prend la place de S^* au sein du complexe ES
→ Libération de S^*
→ déplacement de S^* de A vers B (diffusion)

→ Mise en évidence de la réversibilité du complexe ES

Ajout de substrat **non radioactif S** et en **excès** par rapport à S^*



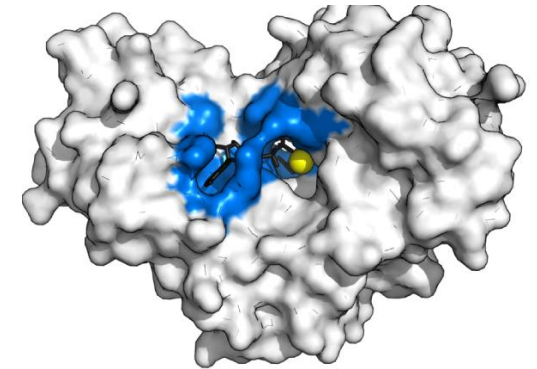
V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES



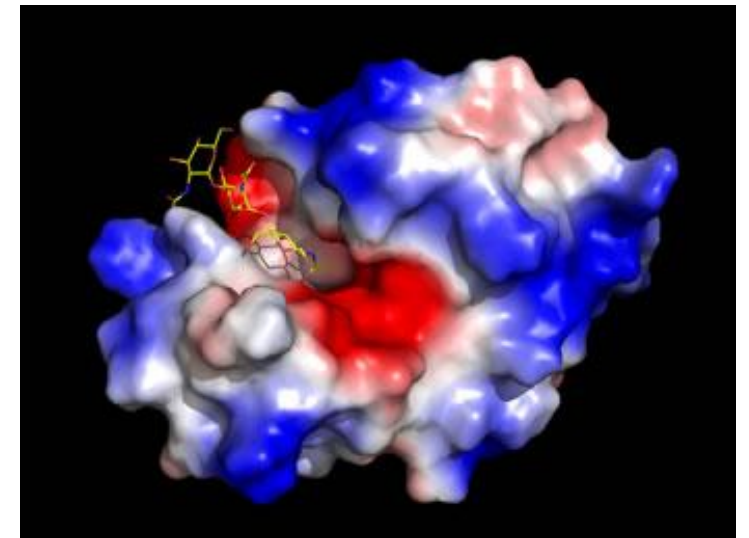
A. LA COMPLÉMENTARITÉ ENZYME-SUBSTRAT

2. Forme générale des enzymes

- Aujourd'hui, on utilise la **crystallographie aux rayons X** (ou la **RMN**) pour visualiser et étudier la structure des enzymes +/- en présence de S.
- Ces données ont permis d'établir des **caractéristiques structurales** communes aux enzymes :
 - En dehors des enzymes travaillant sur les macromolécules (nucléases, amylases...), les enzymes sont en général bien **plus grosses que leurs substrats**
(ex : hexokinase)
 - Elles sont **globulaires** et présentent des **crevasses** ou des **sillons hydrophobes** où a lieu l'interaction Enzyme-Substrat
(ex : lysozyme)



Modélisation du lysozyme avec son substrat



Modélisation de l'hexokinase avec son substrat

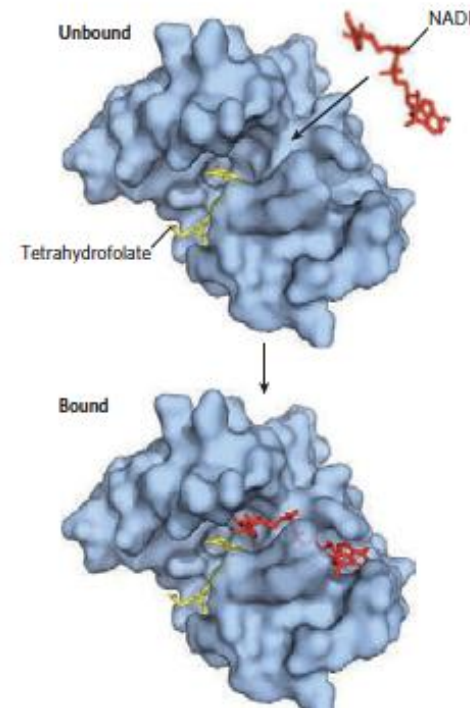
V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

A. LA COMPLÉMENTARITÉ ENZYME-SUBSTRAT

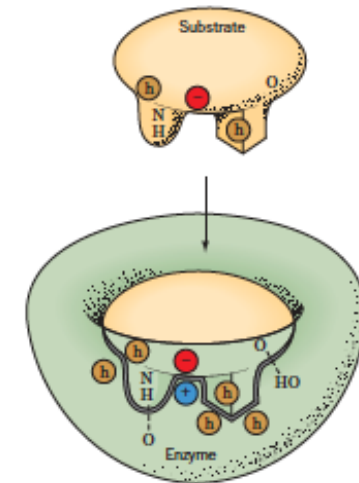


3. Site actif

- Le complexe enzyme-substrat se forme par **interaction** étroite entre le **substrat** et **l'enzyme**
- Cette interaction se fait dans une région particulière de l'enzyme faite de quelques AA : le **site actif**
- Le site actif peut être subdivisé en 2 parties :
 - Le **site de reconnaissance**, de **forme** et de **propriétés complémentaires** à celles de S (charge, caractère acido-basique...) → interaction entre E et S par liaisons faibles (parfois covalentes)
 - Le **site de catalyse**, constitué d'AA réactifs car situés dans un environnement hydrophobe (crevasse, sillon) → modification du substrat et stabilisation de l'état de transition ($\searrow E_a$).



Complémentarité de forme enzyme-substrat : la dihydrofolate réductase et le NADP+ (Lehninger p195)



Complémentarité enzyme-substrat au niveau du site actif (in Voet)

Rem : les AA du site actif sont en général éloignés dans la séquence de l'enzyme mais étroitement associés au sein de la structure native

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES



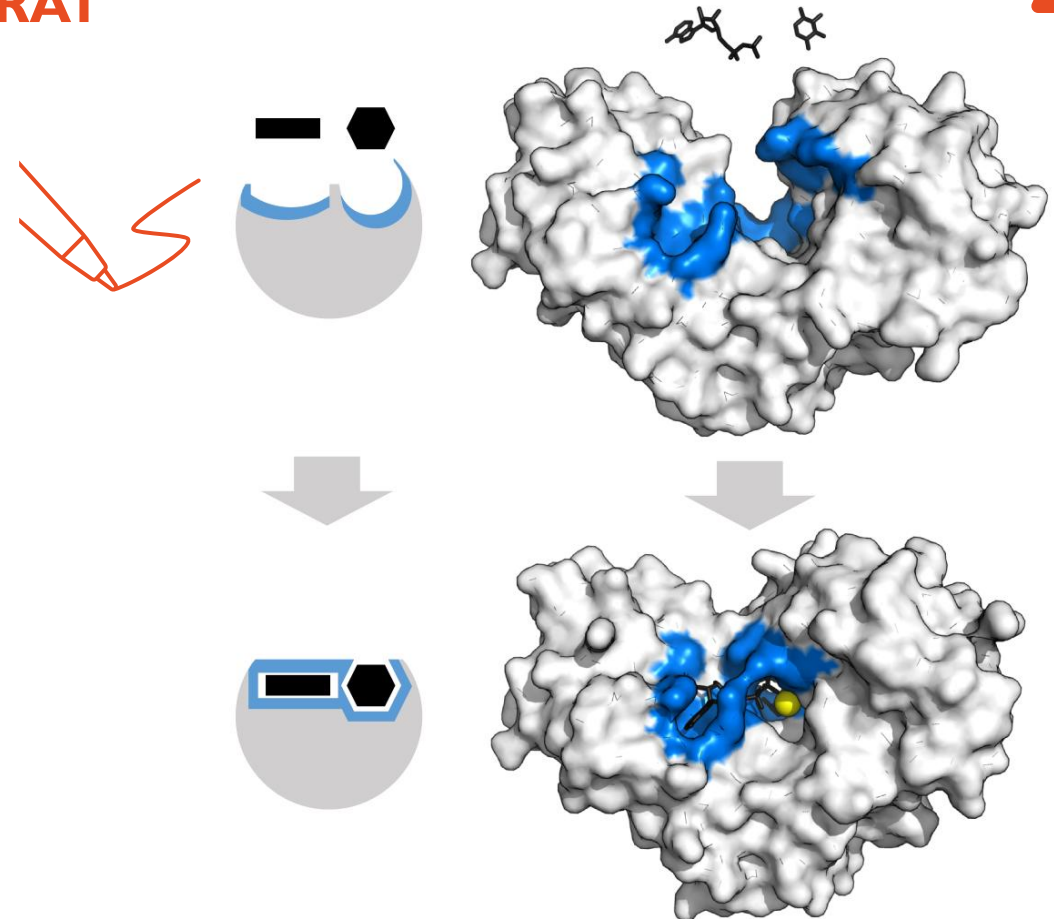
A. LA COMPLÉMENTARITÉ ENZYME-SUBSTRAT

3. Site actif

- Au moment de l'interaction entre l'enzyme et le substrat, il se produit un changement de conformation de l'enzyme (et du substrat)
 - C'est l'**ajustement induit**
- Analogie : poignée de main (plutôt que clé-serrure)



- L'ajustement induit augmente la proximité et la complémentarité de E et S → **diminution de Ea.**
- La complémentarité E/S a pour **conséquence** la **spécificité** de l'interaction.



Ajustement induit de l'hexokinase
(wikimedia Commons)

<https://www.youtube.com/watch?v=TypDtEaGY9k>

PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

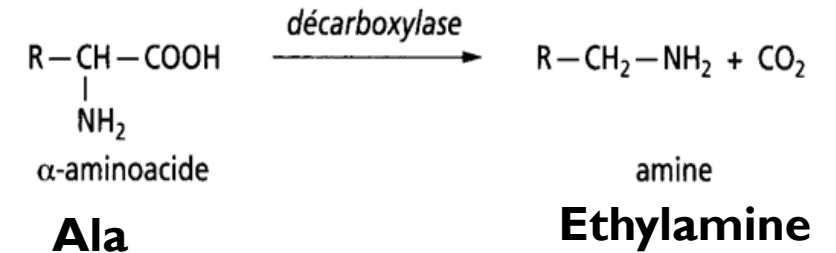
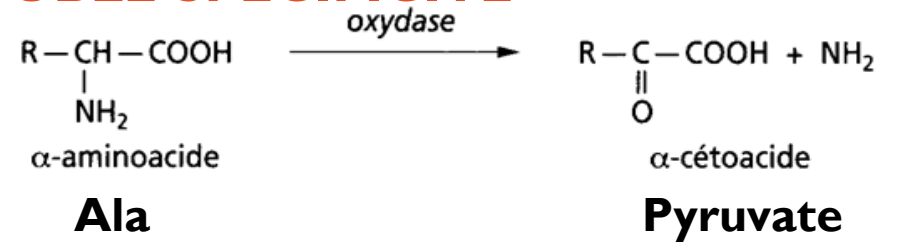
B. LES ENZYMES SE CARACTERISENT PAR UNE DOUBLE SPECIFICITE



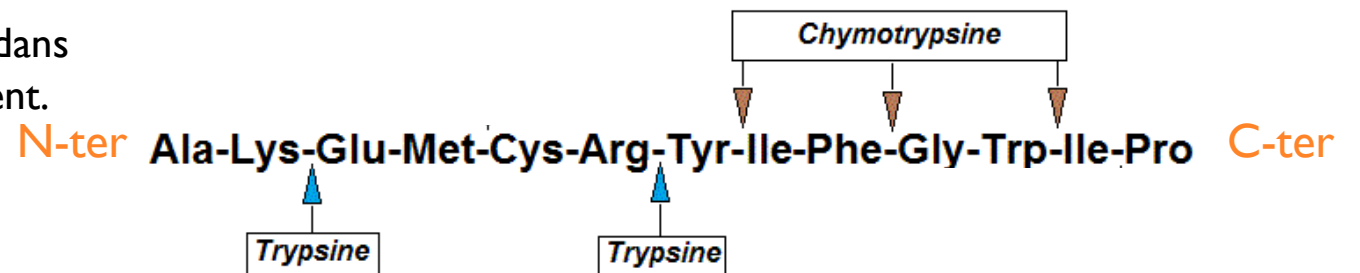
I. Spécificité d'action

- Une enzyme catalyse un type de réaction donné.
- A partir du même réactif, des enzymes différentes donnent des produits différents.
- Certaines enzymes ne fonctionnent que dans des contextes particuliers.
 - Ceci est lié à la façon dont le substrat se fixe dans le site actif et aux interactions qui s'y établissent.

- ✓ Ex : trypsine, chymotrypsine
- ✓ Ex : enzymes de restriction



Un même substrat, 2 enzymes



Contexte de fonctionnement particulier

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

B. LES ENZYMES SE CARACTERISENT PAR UNE DOUBLE SPECIFICITE

Les grandes catégories d'enzymes :
classification par leur activité.

HYDROLASES
Elles "hydrolisent", c'est-à-dire qu'elles découpent une molécule en deux grâce à de l'eau. Elles assurent, par exemple, la digestion.
 $A-B + H_2O \rightarrow A + B$

OXYDORÉDUCTASES
Elles pratiquent l'oxydo-réduction qui est un échange d'électrons entre deux molécules. Vous verrez l'importance de ce trafic au chapitre IV.
 $A + B \rightarrow A^{+} + B^{-}$ (Pop!)

TRANSFÉRASES
Elles s'occupent tout bêtement de passer un groupe d'atomes d'une molécule à une autre.
 $A-B + C \rightarrow A-C + B$

LYASES
Elles font et défont les liaisons doubles entre deux groupes d'atomes.
 $A + B \rightleftharpoons A=B$

ISOMÉRASES
Elles se contentent de déplacer, à l'intérieur d'une molécule, un paquet d'atomes.
 $A \rightleftharpoons isoA$ (deux molécules qui ont exactement les mêmes atomes, mais disposés différemment, sont des ISOMÈRES)

SYNTHÉTASES
Elles soudent deux molécules énergiquement!
 $A + B \rightarrow A-B$ (BANG)

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

B. LES ENZYMES SE CARACTERISENT PAR UNE DOUBLE SPECIFICITE



2. Spécificité de substrat

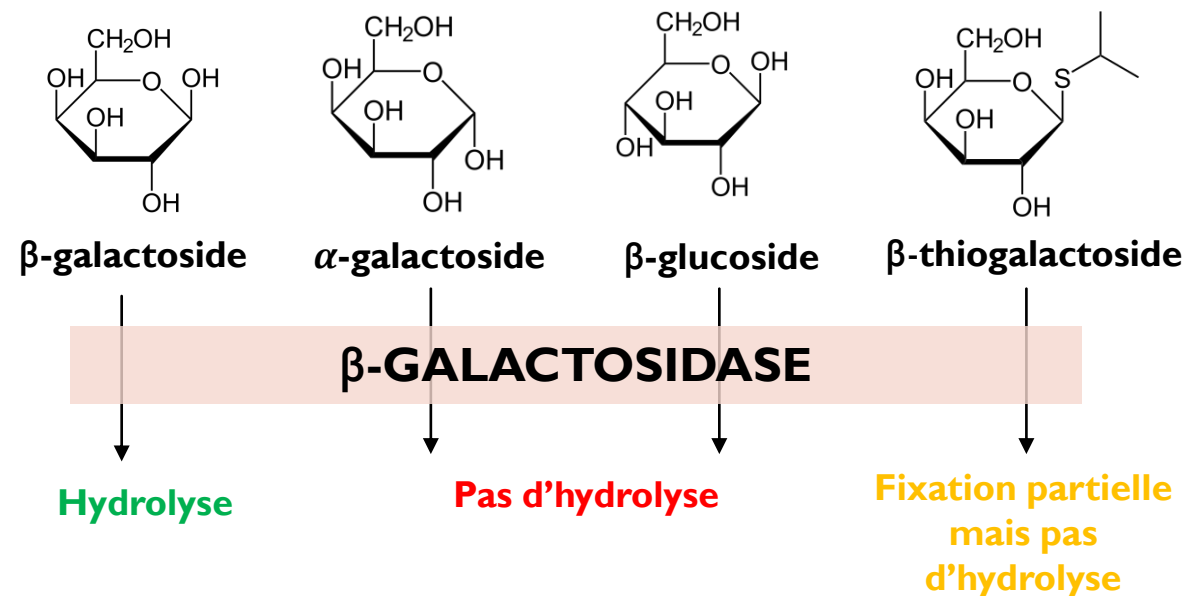
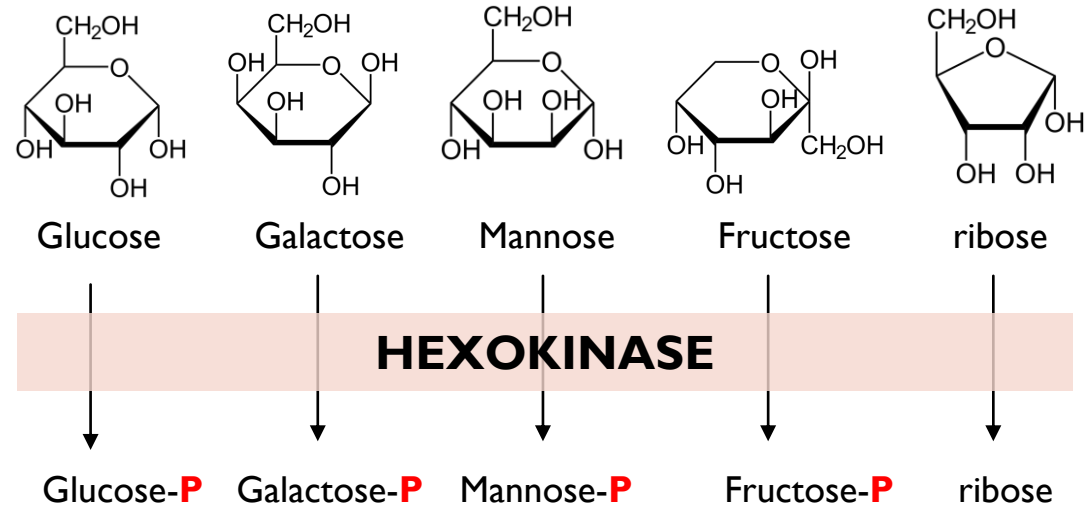
Approche expérimentale

- Etude de l'**hexokinase** (1^{ère} enzyme de la glycolyse, réaction de phosphorylation)

- Reconnaissance du cycle pyrane
- Spécificité de substrat assez large

- Etude de la **β -galactosidase** (enzyme bactérienne, réaction d'hydrolyse)

- Reconnaissance de la disposition des hydroxyles (-OH) sur le cycle
- Stéréospécificité



V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

B. LES ENZYMES SE CARACTERISENT PAR UNE DOUBLE SPECIFICITE

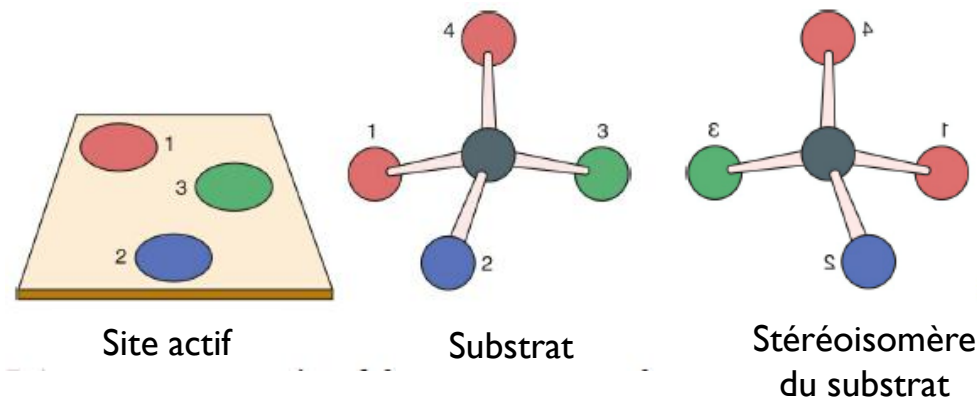


2. Spécificité de substrat

Généralisation

- Une enzyme agit sur un substrat et pas un autre → **spécificité de substrat**
- Cette **spécificité** est +/- **stricte** et peut aller jusqu'à la **stéréospécificité**.
- La spécificité de substrat est liée à :
 - La **complémentarité de forme** entre enzyme et substrat
 - La formation de **liaisons faibles complémentaires** entre enzyme et substrat.

Stéréospécificité des enzymes
(Harper 2018)



PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

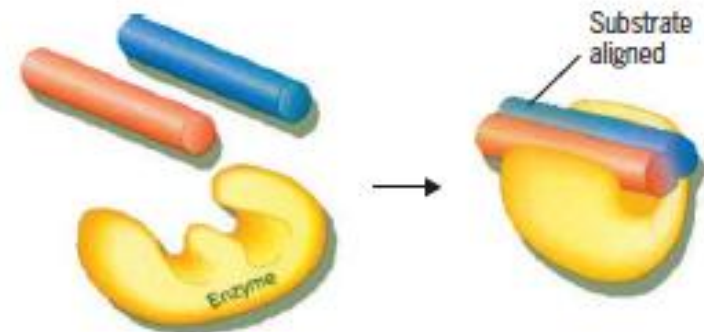
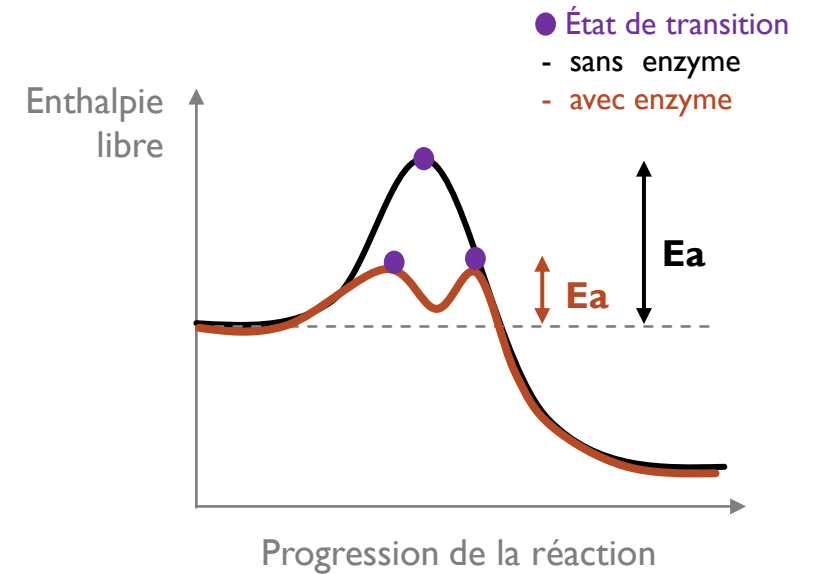
V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

C. LA DIVERSITE DES MECANISMES CATALYTIQUES

- **Méthode d'étude** : cristallographie au rayons X au cours du temps
 - Etude des modifications structurales d'une enzyme au cours d'un seul cycle catalytique (tps ~picosec).
 - On peut ensuite inférer un mécanisme.
- Les enzymes accélèrent les réactions en abaissant E_a de 3 façons.

I. Orientation du substrat

- L'enzyme permet le rapprochement des réactifs et l'orientation du substrat pour favoriser la formation et la rupture des liaisons requises → état de transition
- Ceci démultiplie la probabilité de réaction et donc la vitesse de la réaction.



V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

C. LA DIVERSITE DES MECANISMES CATALYTIQUES



2. Activation du réactif

Ex : la chymotrypsine

Présentation

- ✓ **Protéase** qui clive uniquement **après** les **AA aromatiques** (Tyr, Phe, Trp).
- ✓ **Synthétisée** par les CAP sous **forme inactive** (chymotrypsinogène)
- ✓ **Activée** par **clivage** dans le duodénum.

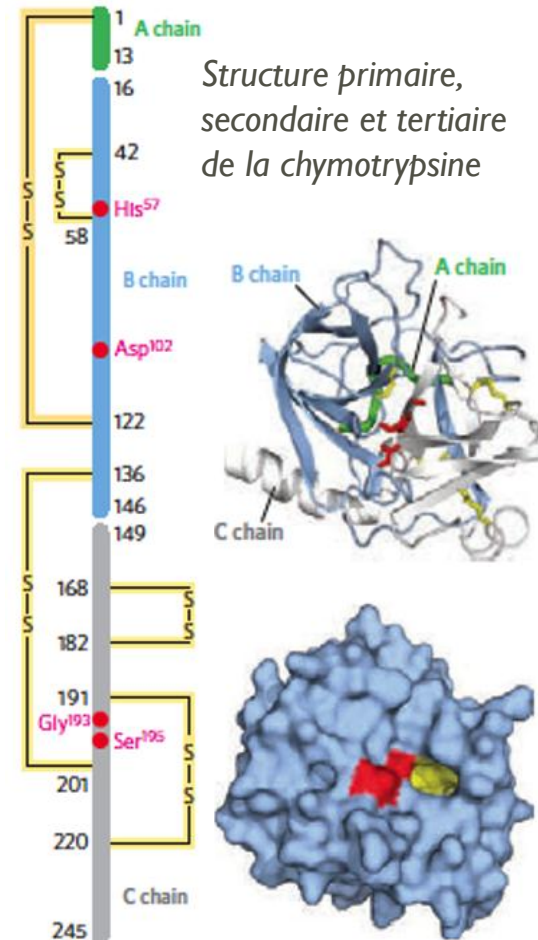
Structure 3D

Cristallographie aux rayons X

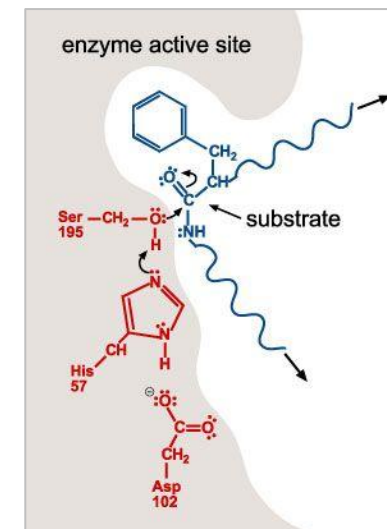
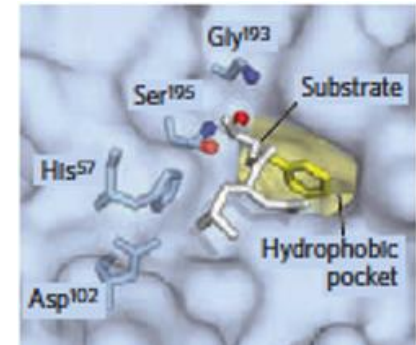
- ✓ Forme globulaire
- ✓ 3 chaînes (A, B, C) reliées par des ponts disulfures
- ✓ **Site actif = logette hydrophobe** contenant :
 - 1 **sérine** (Ser195) très **réactive** (car contexte hydrophobe)
 - 2 AA axillaires (His57, Asp102)
→ interaction avec le radical des AA aromatiques

Contexte
de clivage

N-ter **Arg-Tyr-Ile-Phe-Gly-Trp-Ile-Pro** C-ter



Structure de la logette hydrophobe



V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES



C. LA DIVERSITE DES MECANISMES CATALYTIQUES

2. Activation du réactif

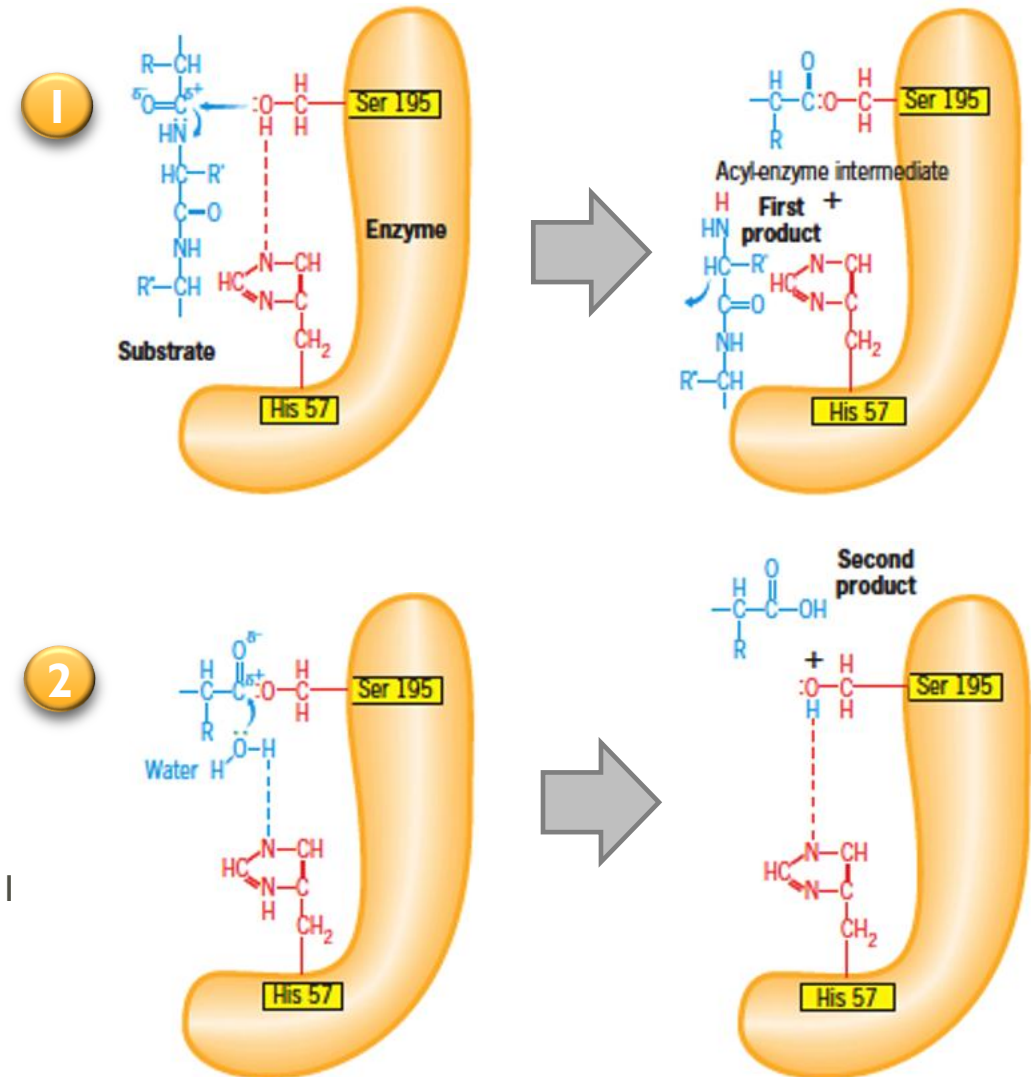
Ex : la chymotrypsine

Mécanisme

- Hydrolyse de la liaison peptidique dont la fonction C=O provient de l'AA aromatique.
- La **Ser195** est responsable d'une **attaque nucléophile** qui délocalise les électrons de la liaison peptidique, en collaboration avec Asp102 et His57.
- L'hydrolyse se fait en **2 étapes** avec des transferts de H⁺ par formation de liaisons covalentes.

Détails du mécanisme

- Attaque nucléophile de Ser195 sur S
 - liaison covalente entre S et Ser195
 - clivage de la liaison peptique de S et libération du produit n°1
- Attaque nucléophile de H₂O sur S
 - Rupture de liaison covalente entre S et Ser195
 - Restauration de Ser195 et libération du produit n°2



V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES



C. LA DIVERSITE DES MECANISMES CATALYTIQUES

3. Changement de conformation du substrat

Ex : le lysozyme

Présentation

- Enzyme présente dans les larmes, la salive, le blanc d'œuf, le lait maternel
- Action antibactérienne par clivage du peptidoglycane de la paroi bactérienne des gram(+) : la muréine.

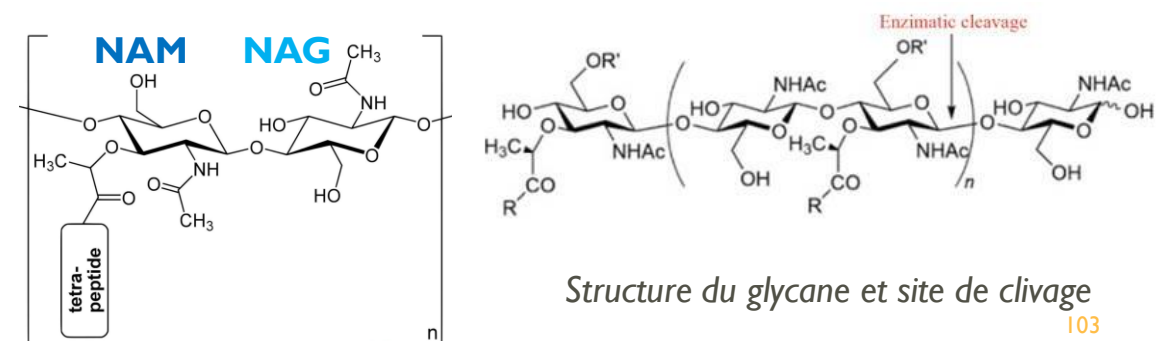
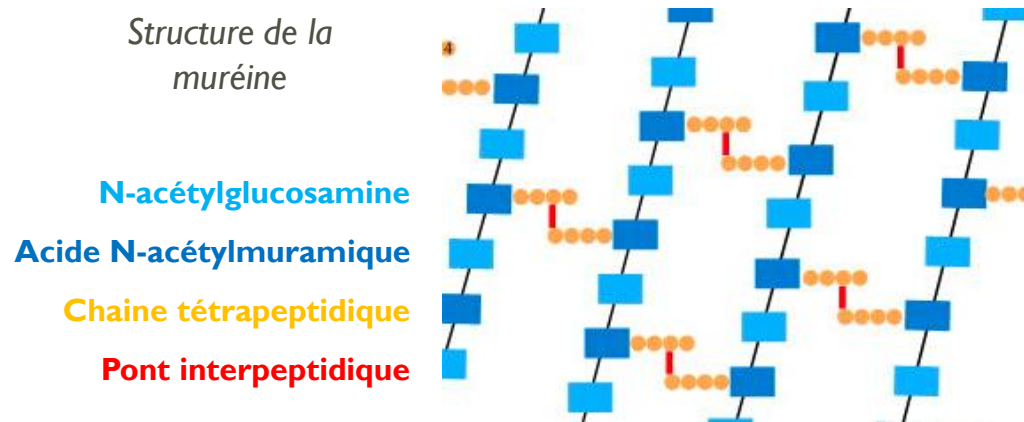
Substrat

- Le peptidoglycane est fait de **longues chaînes de glycanes** reliées entre elle par des **peptides**
- Le glycanes est un polymère constitué d'une succession de **NAM** (ac. N-acétylmuramique) et de **NAG** (N-acétylglucosamine) liés en $\beta(1 \rightarrow 4)$

Découverte

1922 – Fleming (découvreur de la pénicilline), atteint d'un rhume, remarque qu'une goutte de mucus nasal induit la lyse des bactéries cultivées sur boîte
→ identification du **lysozyme** (enzyme), responsable de cette lyse

Structure de la muréine



Structure du glycanes et site de clivage

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES



C. LA DIVERSITE DES MECANISMES CATALYTIQUES

<https://www.youtube.com/watch?v=TK7onDEEIYc>

3. Changement de conformation du substrat

Ex : le lysozyme

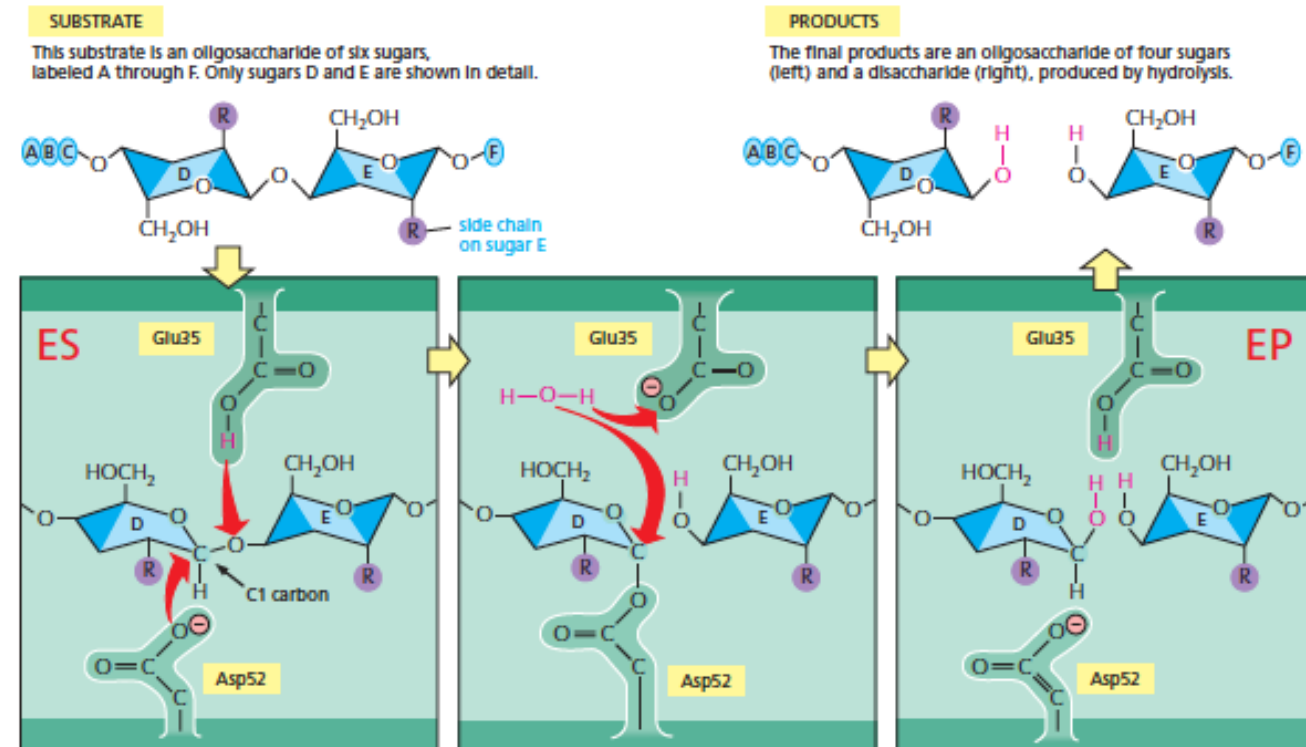
Mécanisme catalytique du lysozyme (in Alberts, 2017)

Mécanisme

- Quand 6 résidus d'oses sont logés dans le sillon, le 4^e doit **changer de conformation** pour s'insérer dans le site D
- La lyse se produit au niveau de la liaison osidique entre les sous-sites D et E, par catalyse acide en 2 étapes.

Détails du mécanisme

- Changement de conformation du résidu D
- Attaque acide** de la liaison osidique par Glu35
 - Rupture de la liaison osidique
 - Formation d'un **ion oxocarbonium** (état de transition) stabilisé par liaison covalente avec Asp52
- Réaction de l'ion oxocarbonium avec l'eau** (polarisée par Glu35)
 - Rupture de la liaison entre résidu D et Asp52
 - Libération des produits et restauration de l'enzyme



V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES



C. LA DIVERSITE DES MECANISMES CATALYTIQUES

3. Changement de conformation du substrat

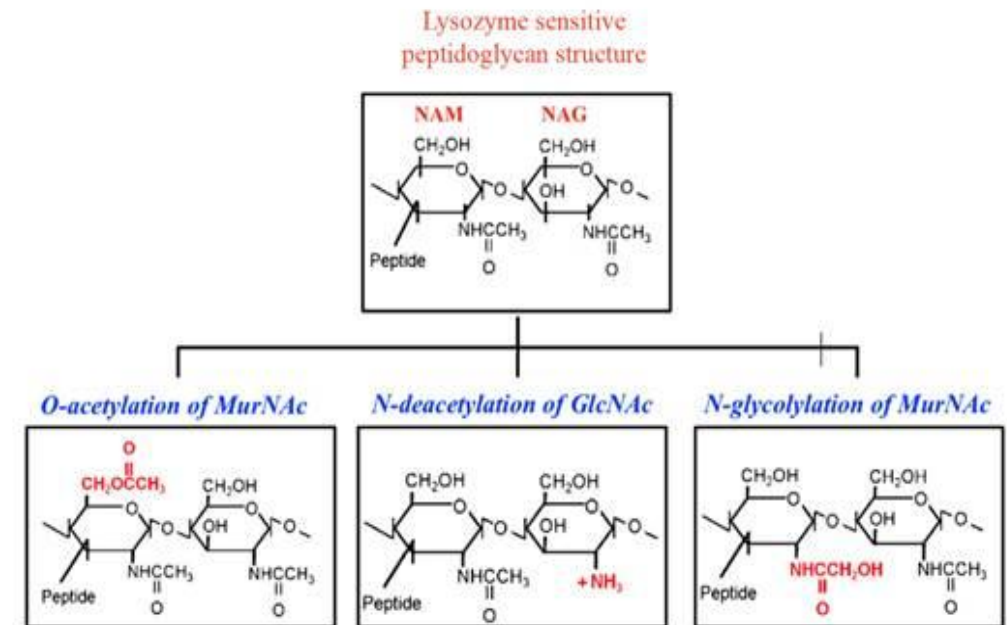
Ex : le lysozyme

Mécanisme

- Ce modèle a permis de nombreuses prédictions qui ont été testées → validation du modèle
- Utilisation de polymères **(NAG)_n** de différentes longueurs
 - ✓ Si $n \leq 4$ → il n'y a pas d'hydrolyse
 - ✓ Si $n = 5$ → hydrolyse faible
 - ✓ Si $n = 6$ → hydrolyse efficace avec production de $(NAG)_2$ et de $(NAG)_4$
- Utilisation d'un **(NAG)₄** avec le 4^e résidu **modifié** pour loger plus facilement dans le sillon
 - ✓ fixation 40-50 fois plus forte à l'enzyme
- Production de **lysozyme mutant** par mutagenèse dirigée où Glu35 et Aps52 sont substitués
 - ces protéines mutantes ont pas/peu d'activité catalytique

- Certaines bactéries, résistantes au lysozyme, produisent des peptidoglycanes modifiés (cf. figure)

Structure du peptidoglycane lysé par le lysozyme

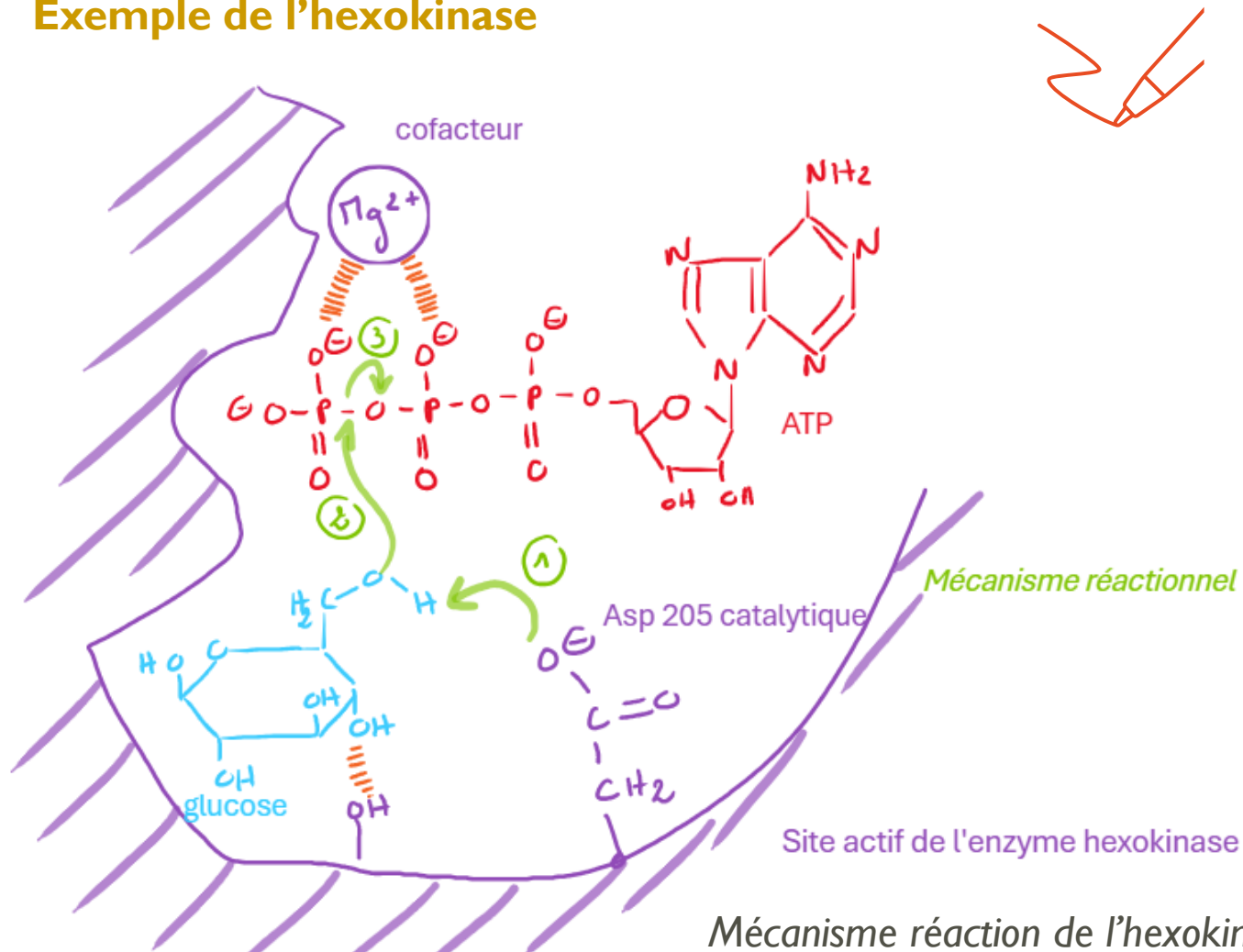


Structure de peptidoglycanes non lysés par le lysozyme

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

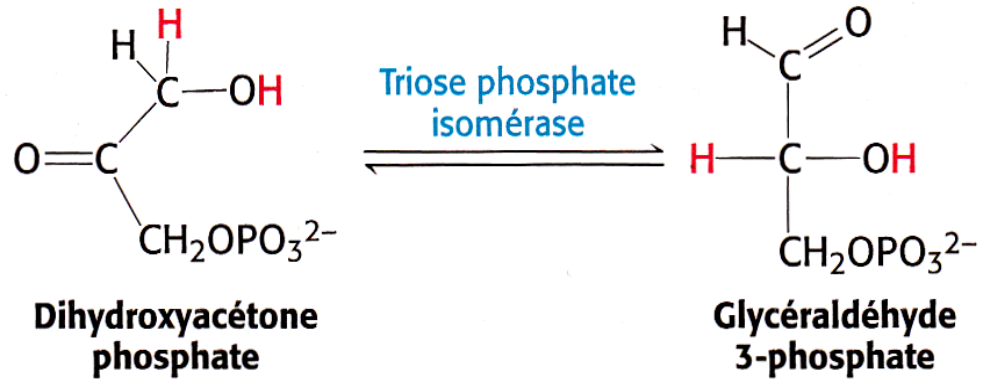
C. LA DIVERSITE DES MECANISMES CATALYTIQUES

Exemple de l'hexokinase

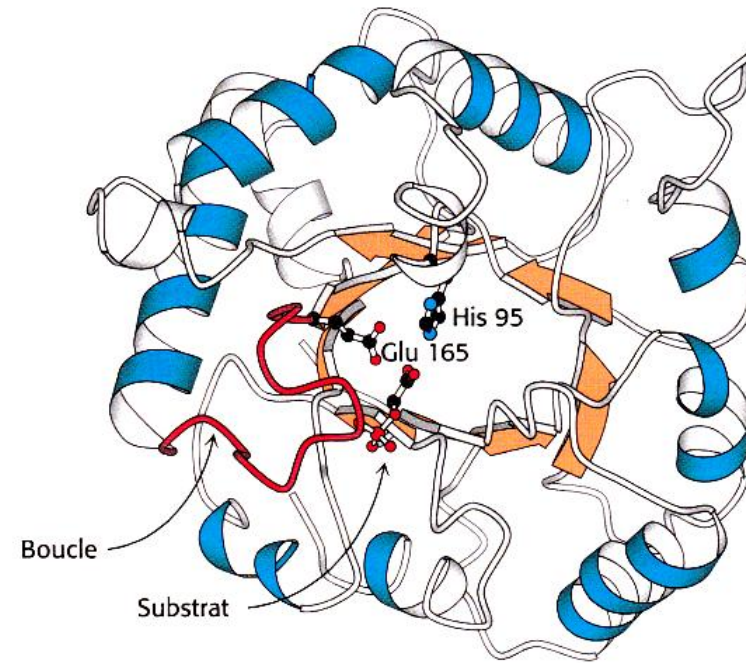
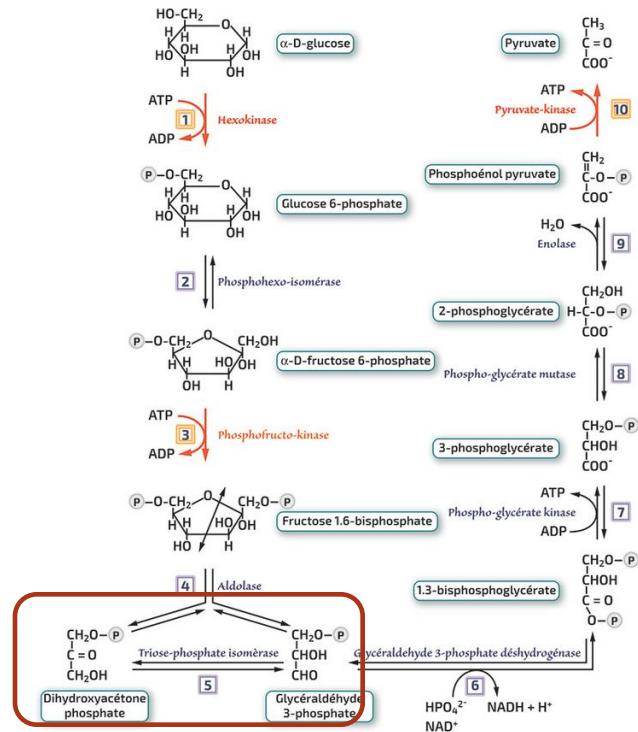


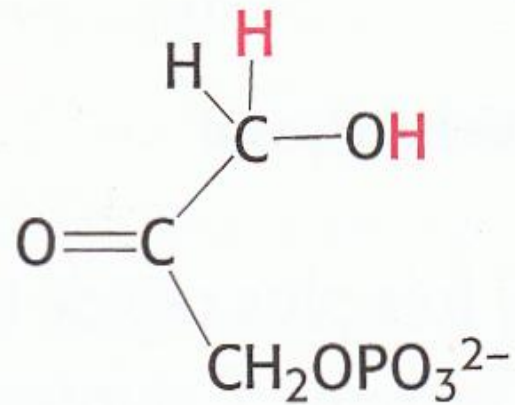
Mécanisme réaction de l'hexokinase enzyme de transfert de groupement phosphoryle

Exemple de la triade catalytique de la triose phosphate isomérase



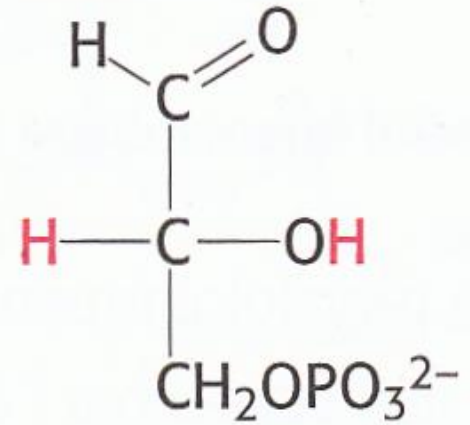
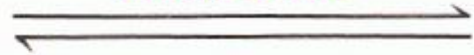
DEGRADATION DU GLUCOSE OU GLYCOLYSE (voie d'Embden-Meyerhof)



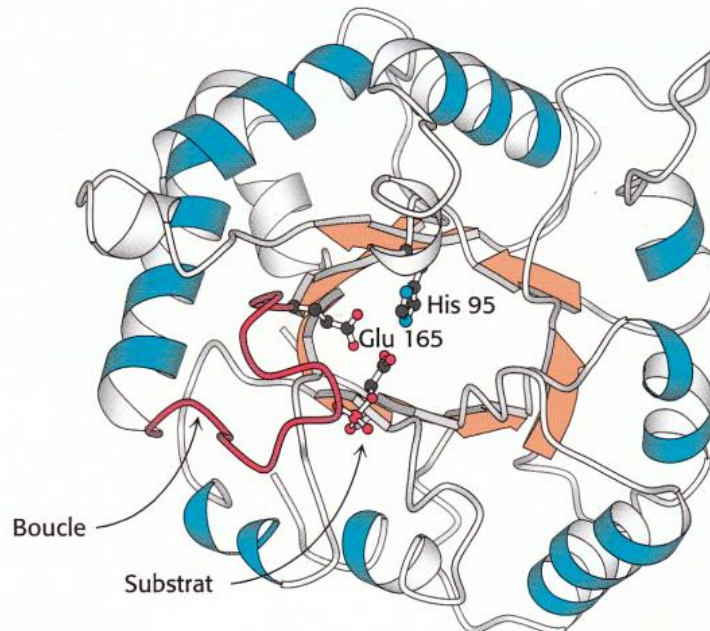


**Dihydroxyacétone
phosphate**

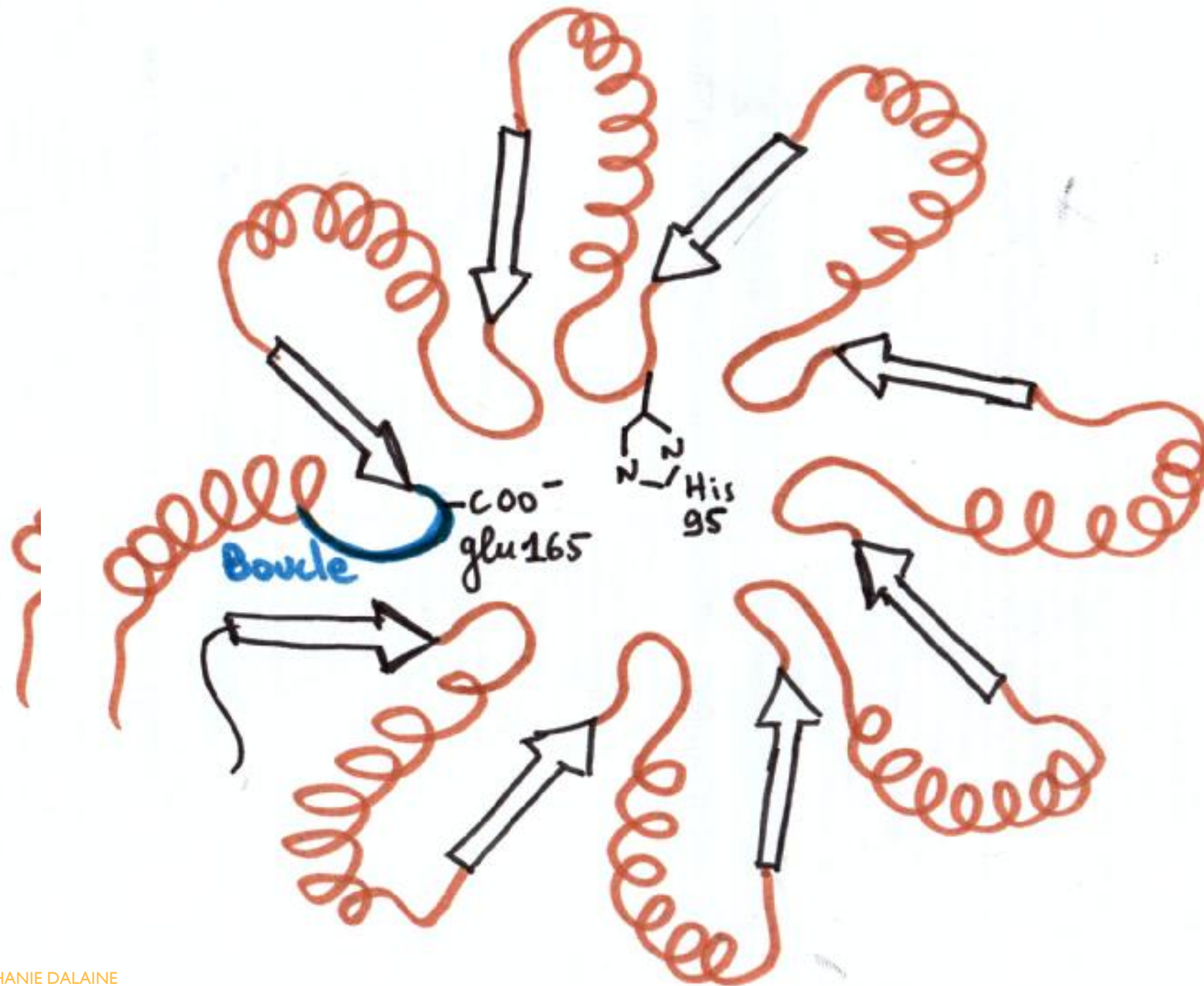
Triose phosphate
isomérase



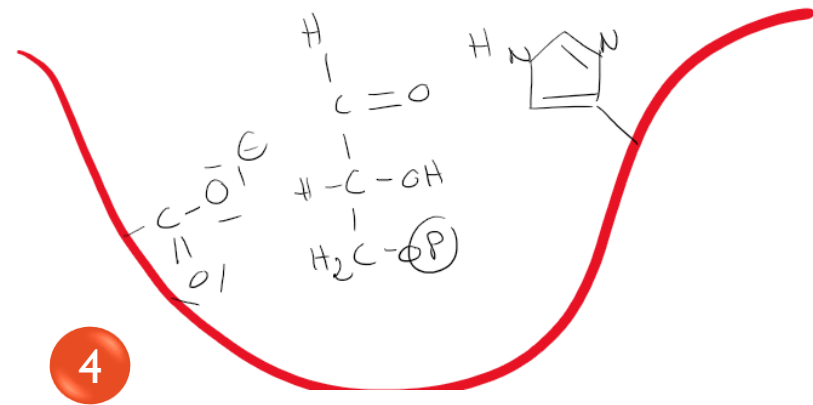
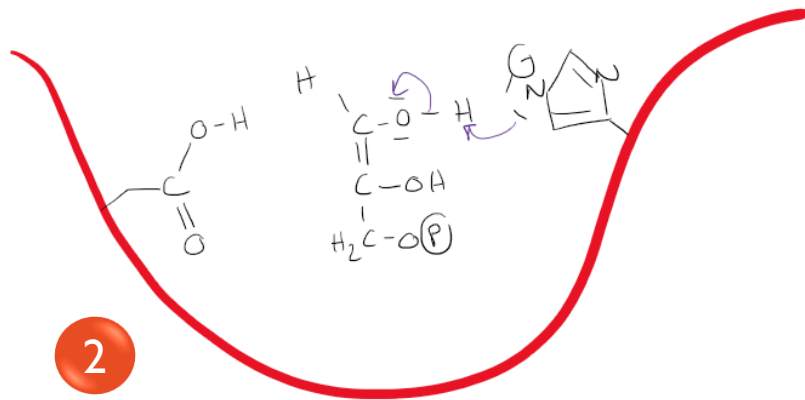
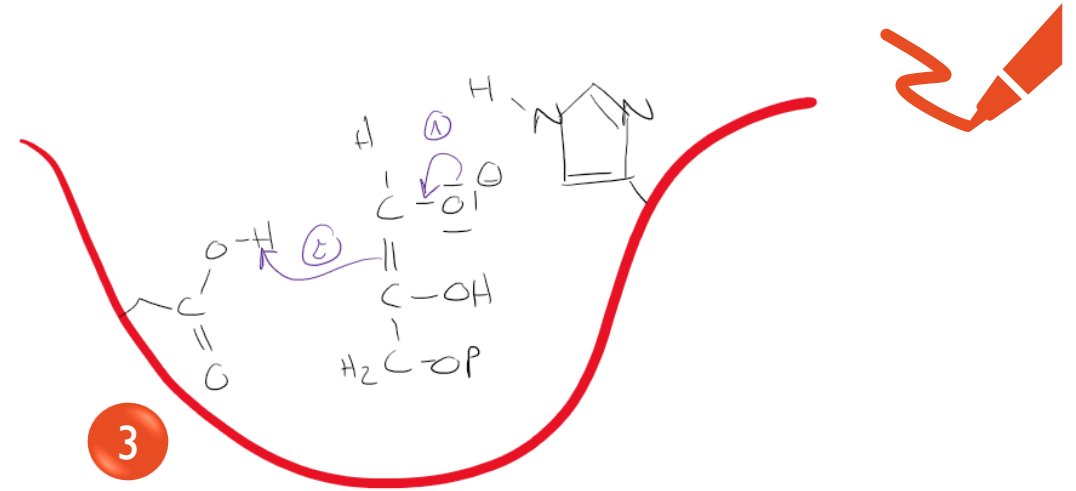
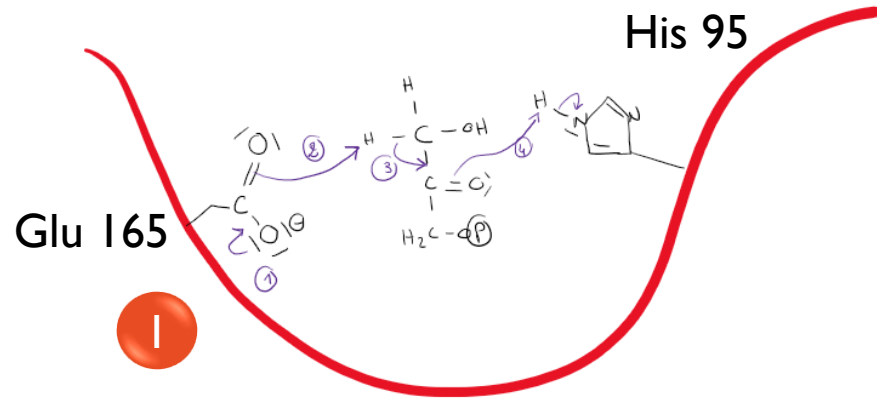
**Glycéraldéhyde
3-phosphate**

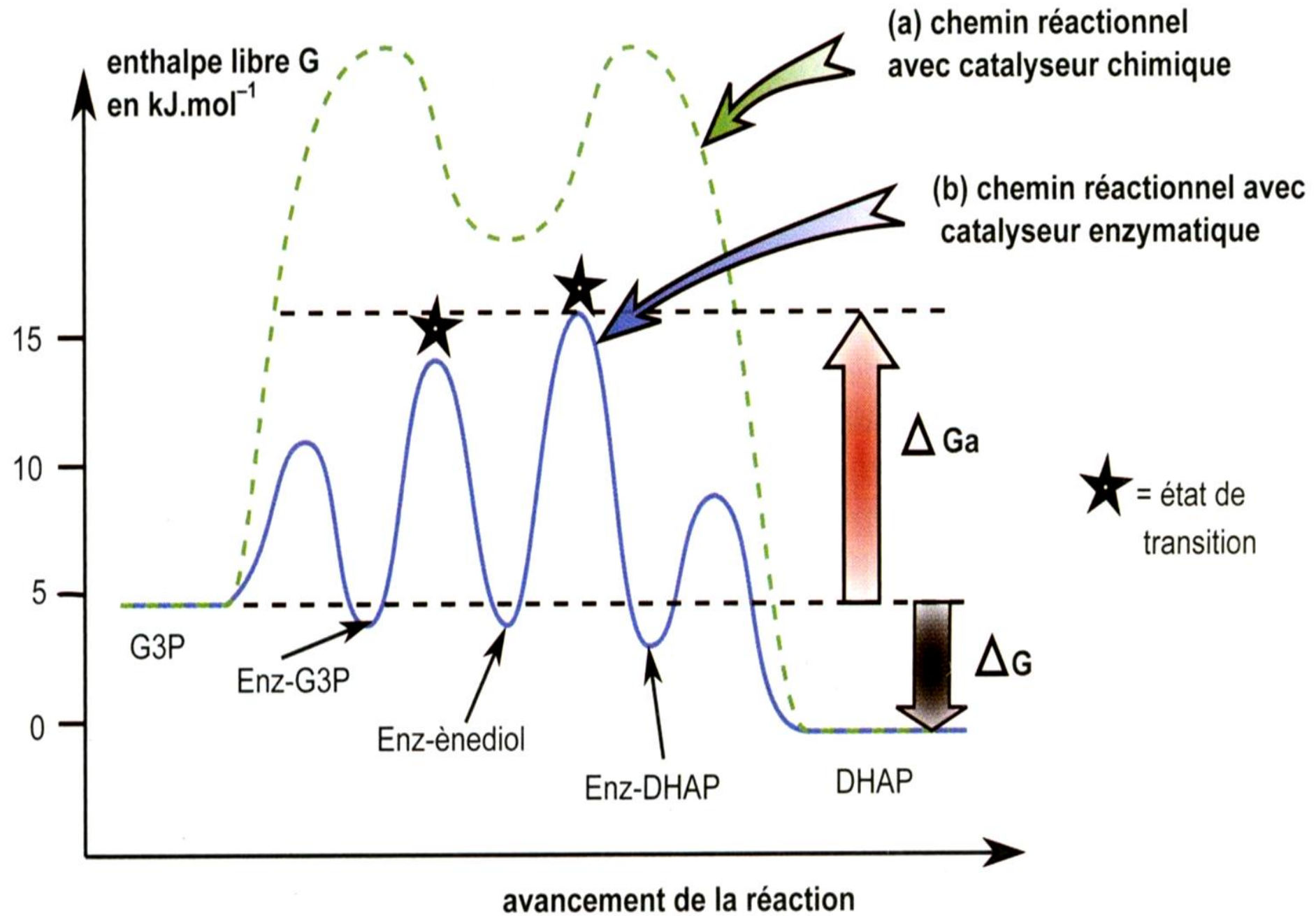


La TIM, un exemple de
navette à protons
enzymatique.



Mode d'action de la diade catalytique His 95 et Glu 165 de la Triose phosphate isomérase





V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES



C. LA DIVERSITÉ DES MÉCANISMES CATALYTIQUES

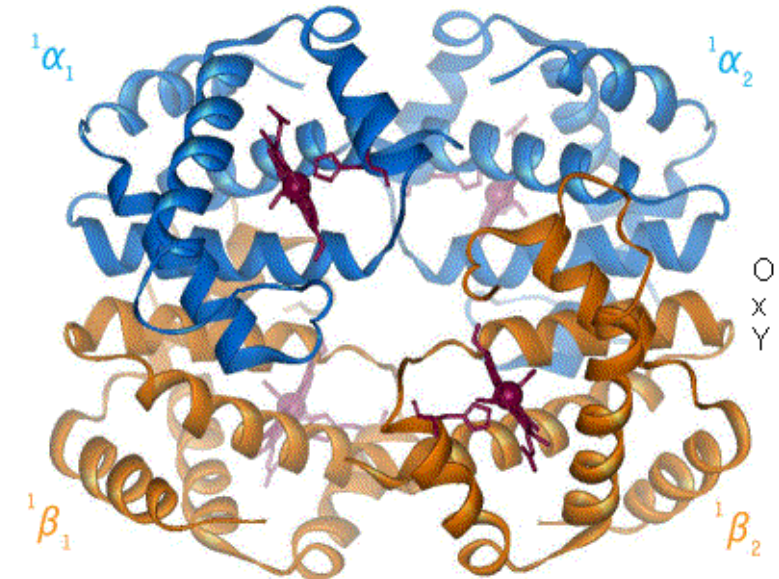
Allostérie : (n.f.) modification de la structure et de l'activité d'une protéine par fixation d'une autre molécule sur un site différent du site actif

4. Cas des enzymes allostériques

- Les **enzymes allostériques** sont **multimériques** (souvent 4 unités) et possèdent un **axe de symétrie**.
- Elles existent sous **2 conformations** : **active** ou **inactive**
- Le **changement de conformation** est **contrôlé** par des **effecteurs allostériques** activateurs ou inhibiteurs qui se fixent souvent en dehors du site actif.

Effecteur allostérique : (n.f.) molécule pouvant se fixer sur une enzyme, en dehors du site actif, pour réguler son activité catalytique

→ La **structure quaternaire** modulable **des enzymes allostériques** permet une **régulation** très **fine** de leur **activité catalytique** en fonction des conditions : c'est le phénomène **d'allostérie**

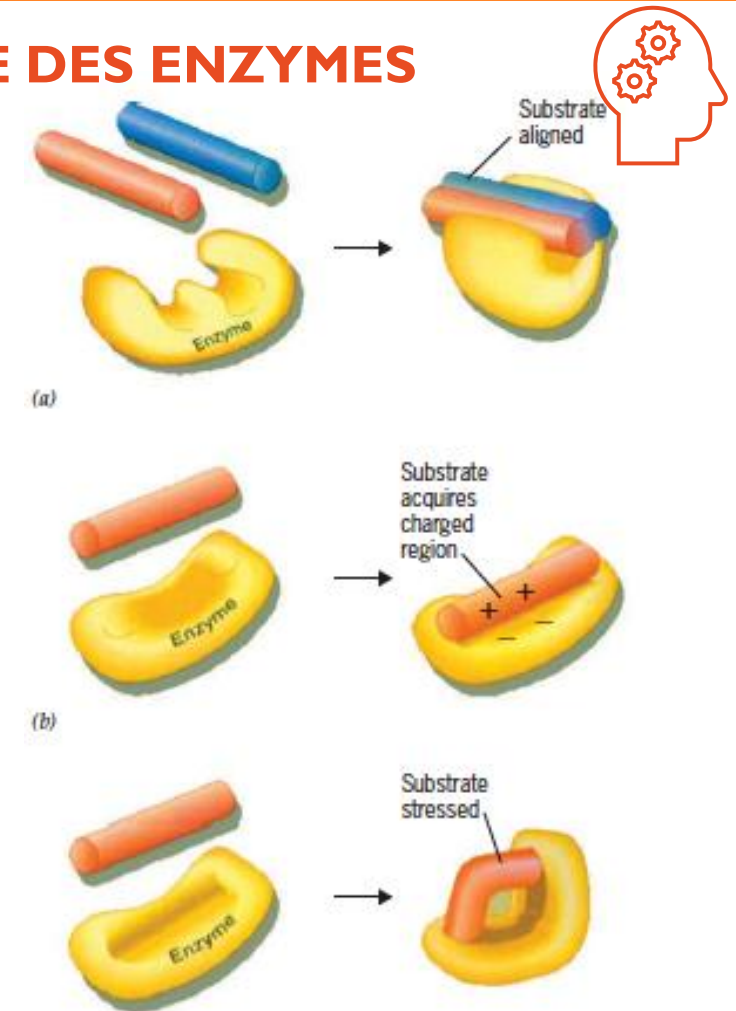


Allostérie de l'hémoglobine (≠ enzyme)

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES

BILAN

- Les enzymes utilisent principalement **3 mécanismes catalytiques** :
 - 1) l'orientation de S** : le rapprochement et l'orientation des réactifs favorise la rupture et la formation de liaisons
→ Passage à l'état de transition
 - 2) l'activation de S** : un atome de l'enzyme particulièrement réactif (car environnement hydrophobe) réagit avec S et l'active → Passage à l'état de transition
Ex : chymotrypsine à Ser active
 - 3) le changement de conformation de S** : l'enzyme exerce une contrainte physique ou électronique sur S qui adopte l'état de transition pour libérer cette contrainte – c'est de **l'ajustement induit**
Ex : lysozyme
- Les protéines quaternaires peuvent avoir un fonctionnement allostérique.



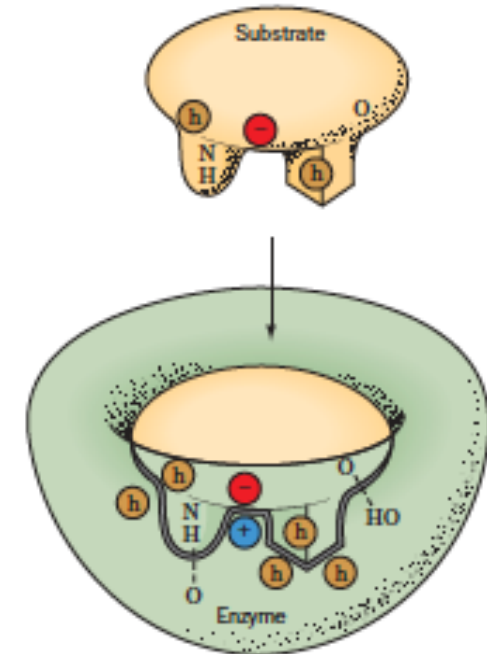
Trois mécanismes enzymatiques pour accélérer les réactions (Karp p94)

V. APPROCHE STRUCTURALE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES



BILAN

- Les enzymes sont des **protéines globulaires** capables de se lier au substrat au niveau de leur **site actif** (souvent hydrophobe) grâce à une forme et des liaisons faibles complémentaires.
- Cette complémentarité confère aux enzymes une **double spécificité** : spécificité de substrat et d'action.
- L'association physique entre l'enzyme et son substrat se traduit par un changement de conformation, à la fois de l'enzyme et du substrat, qui renforce leur proximité ; c'est **l'ajustement induit**.
- Les enzymes utilisent principalement **3 types de mécanismes catalytiques** : l'orientation de S, l'activation de S et le changement de conformation de S.
- L'activité catalytique des enzymes quaternaire peut être finement régulée par **allostérie**.



PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

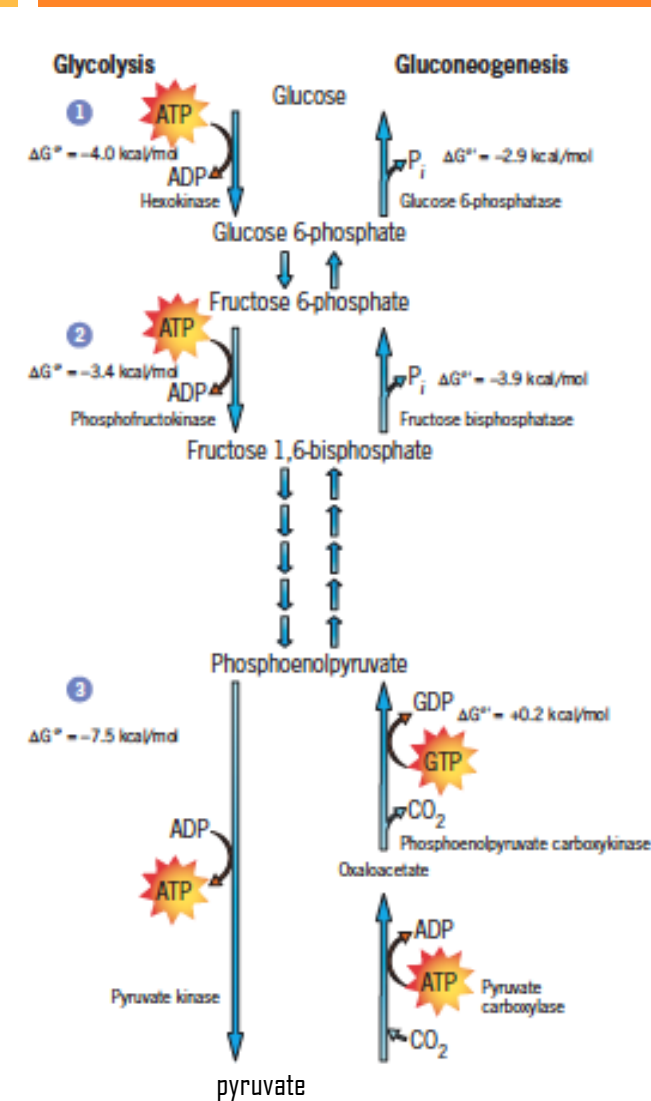
VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

INTRODUCTION

- Dans la cellule, les réactions chimiques sont reliées au sein de **voies métaboliques**.
- De plus, les différentes **voies métaboliques** sont **interconnectées** : un produit donné peut être **orienté** vers telle ou telle voie, **selon les besoins** de la cellule, à un moment donné.
- Des **voies** aux effets **contradictaires** (anaboliques et cataboliques) **cohabitent** également.
- Cela implique une **régulation de l'activité enzymatique**, qui a lieu à plusieurs niveaux :
 - régulation de la **concentration** en enzyme
 - régulation de **l'activité catalytique** de l'enzyme
 - régulation de la **localisation subcellulaire** de l'enzyme



Glycolyse et Néoglucogenèse se déroulent dans une même cellule (in Karp, 2016)

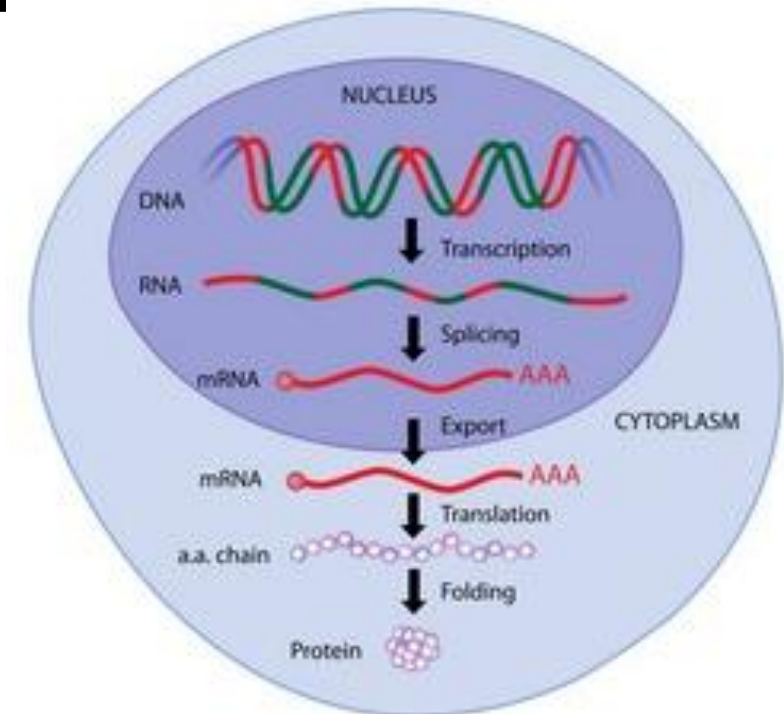
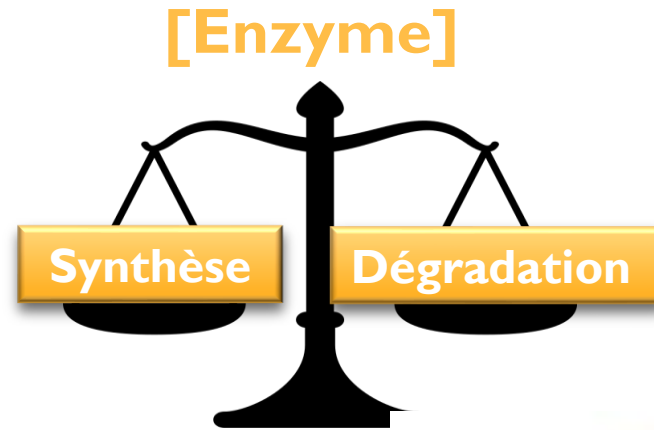
VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE



INTRODUCTION

- La concentration totale en enzyme dans une cellule résulte d'un équilibre entre sa **synthèse** et de sa **dégradation**.
- La **synthèse** d'une enzyme repose sur l'expression du (ou des) gène(s), par **transcription** puis **traduction**.
- A chaque étape, des points de régulation existent.
- La **dégradation** de l'enzyme peut être spontanée ou non.

Ici nous nous intéresserons principalement à la régulation de la transcription et de la dégradation.



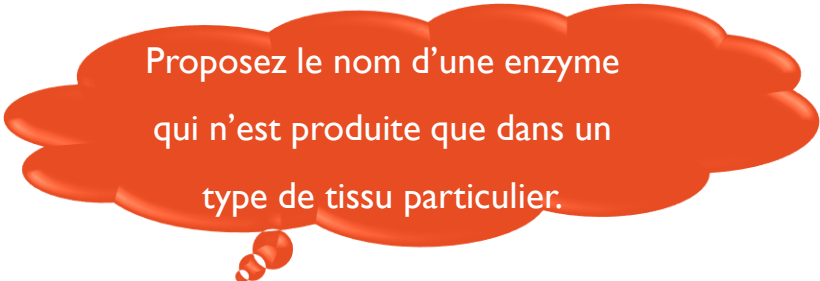
VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

A. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

I. Régulation dans le temps

- La transcription des gènes codant les enzymes peut être régulée dans le temps.
 - Ex : L'intolérance au lactose chez l'adulte est liée à l'arrêt de la production de lactase après sevrage du lait maternel.
- Elle peut aussi être soumise à des facteurs extérieurs.
 - Ex : Chez E. Coli, la beta-galactosidase est synthétisée seulement en présence de lactose, permettant son métabolisme par la bactérie.

2. Régulation dans l'espace



Proposez le nom d'une enzyme qui n'est produite que dans un type de tissu particulier.

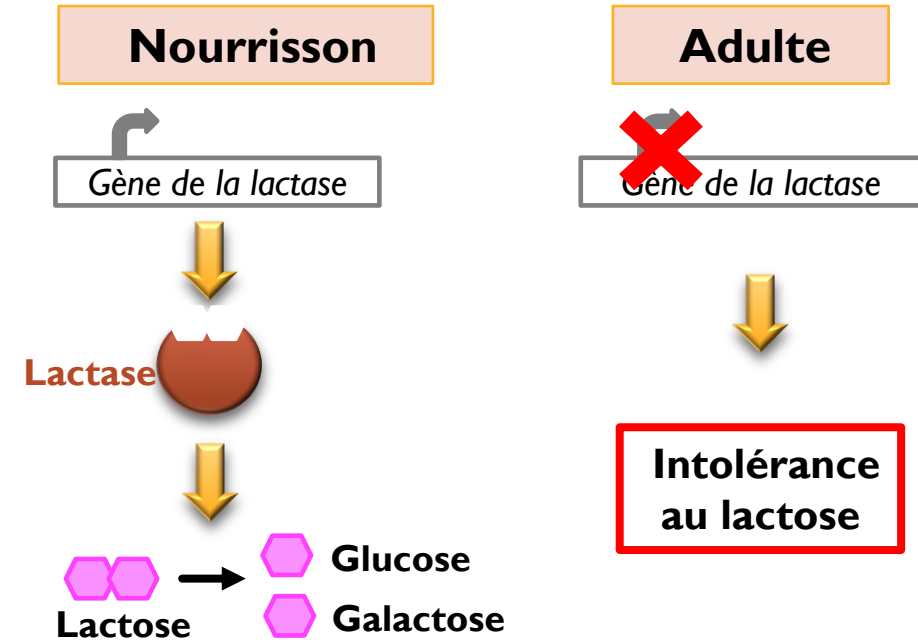
VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

A. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

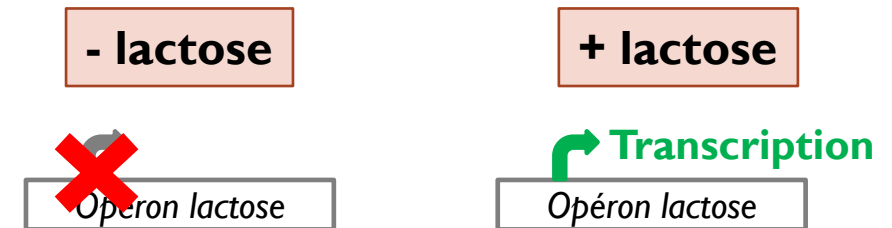
I. Régulation dans le temps

- La synthèse d'enzymes peut être **programmée** au cours du développement d'un organisme.
 - Ex - régulation dans le temps
 - La synthèse de lactase s'arrête normalement chez le nourrisson, après sevrage
 - Intolérance au lactose chez l'adulte
- La synthèse d'enzymes peut aussi être soumise à des **facteurs extérieurs**.
 - Ex : Chez E. coli, la synthèse de β -galactosidase est induite uniquement en présence de lactose
 - métabolisation du lactose

Cf. opéron lactose



Régulation de l'expression de la lactase au cours du développement chez l'Homme



Régulation de l'expression de l'opéron lactose par le lactose

VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

A. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION



2. Régulation dans l'espace

- Dans une cellule donnée, il y a des milliers d'enzymes différentes.
- Certaines enzymes sont exprimées **dans toutes les cellules**, elles sont **ubiquitaires**

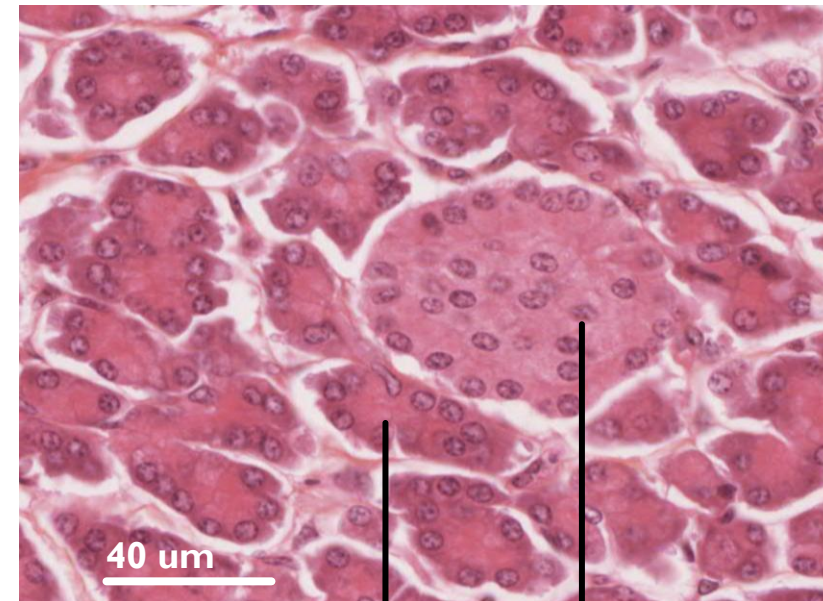
Ex : enzymes de la glycolyse

- D'autres enzymes sont **spécifiques** de certains **types cellulaires**.

Ex : enzymes pancréatiques (trypsinogène, chymotrypsinogène) produites exclusivement par la CAP

→ Les enzymes participent ainsi à la spécialisation fonctionnelle des cellules et des tissus.

Enzymes ubiquitaires et spécifiques de la CAP



Enzymes de la glycolyse

Enzymes
pancréatiques

VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Exemple de l'hexokinase des mammifères

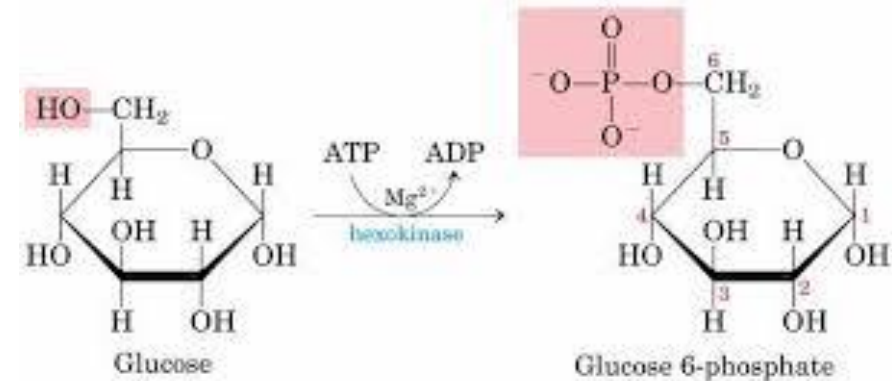


A. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

3. Cas des isoenzymes

Isoenzymes (ou isoformes ou enzymes isofonctionnelles) : (n.f.) enzymes, en général oligomériques, provenant de familles multigéniques et qui ont la même fonction.

L'hexokinase catalyse la 1^e réaction de la glycolyse :



Il existe 4 isoformes de l'hexokinase :

	HK1	HK2	HK3	HK4
Localisation du gène	Chr. 10	Chr. 2	Chr. 5	Chr. 7
Nb de résidus (AA)	917	917	923	465
Masse mol. (kDa)	102	102	99	52
Structure IV	dimère	dimère	dimère	monomère
Km pour glucose (mM)	0,03	0,3	0,003	10
Km pour ATP (mM)	0,5	0,7	1	—
Effet de Gluc-6-P	inhibition			aucun
Localisation majoritaire	Ubiquit.	Muscle, cerveau	Ubiquit.	Foie, pancréas

- Les **isoenzymes** catalysent la **même réaction** avec le(s) même(s) substrat(s).
- Cependant, elles peuvent avoir des **localisations cellulaires** ou **subcellulaires** différentes.
- Elles peuvent aussi **fonctionner différemment** de par...
 - des paramètres cinétiques variables
 - une +/- grande sensibilité à certains régulateurs

VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

A. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION



3. Cas des isoenzymes

1) Analysez ces données.

2) Mettez en relation ces données avec la physiologie des cellules (cellule banale vs. Hépatocyte)

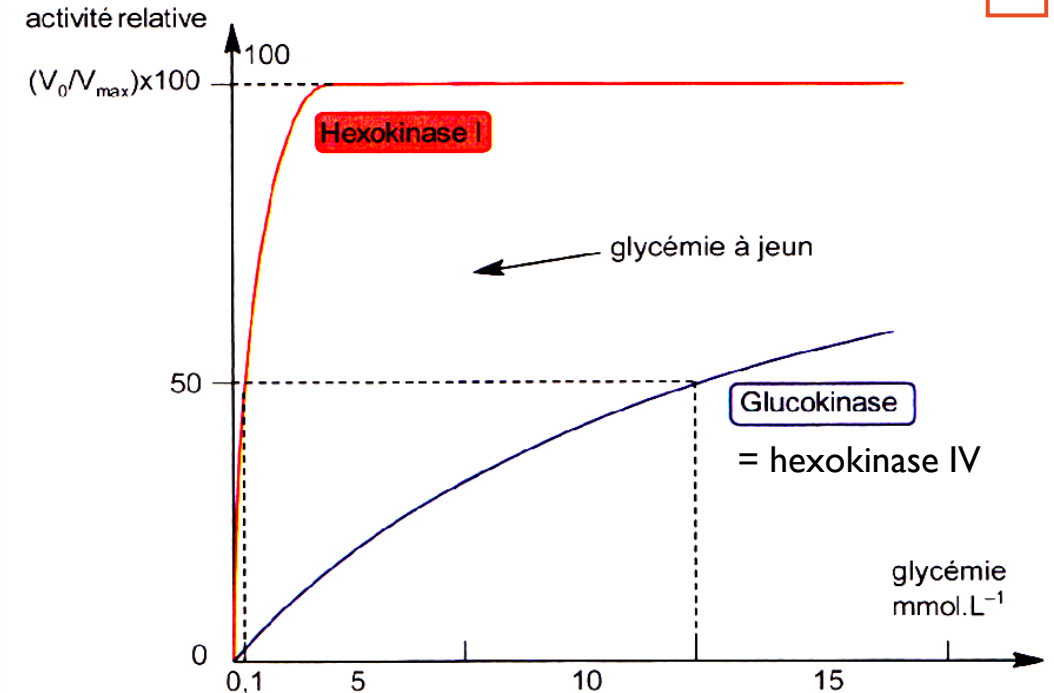
Pour une glycémie faible (à jeun) :

- l'hexokinase I peut fonctionner car elle possède une affinité élevée pour le glucose (K_m faible)
- Par contre, la glucokinase est très peu active, ayant une affinité beaucoup plus faible.

Après un repas:

- l'hexokinase est à saturation, elle ne peut pas prendre en charge tout le glucose supplémentaire (+ inhibition par le G-6-P)
- La glucokinase peut, elle, fonctionner.
 - Le G₆P formé dans le foie va être stocké sous forme de glycogène via la glycogénogenèse

CCL : Grâce à ces 2 isoformes aux propriétés différentes, le glucose n'est stocké par le foie que lorsqu'il est présent en excès. Cela ne se fait pas au détriment de l'approvisionnement des autres organes.



Remarques

- HKI est ubiquitaire
- HK4 est majoritaire dans le foie
- La glycémie d'un homme à jeun est de ~ 5 mM et elle peut atteindre 12-15 mM.
- HKI est inhibée par le G-6-P mais pas HK4

Comparaison cinétique de HKI et HK4 (glucokinase)

PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

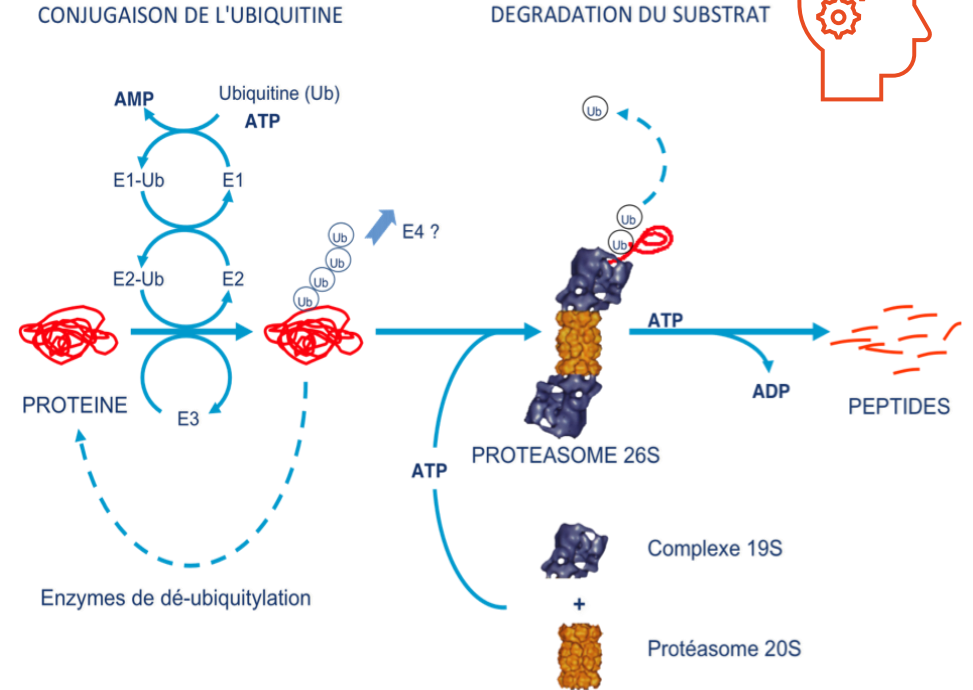
B. RÉGULATION DE LA DÉGRADATION

- Comme pour toute protéine, la **dégradation** d'une enzyme peut être spontanée ou **induite**, donc contrôlée.

Ex : dégradation par le protéasome suite à une polyubiquitinylation

- La vitesse de dégradation de l'enzyme va déterminer sa **durée de vie** et donc sa **durée d'activité**.
- In vitro*, on utilise la notion de **demi-vie** pour estimer la durée d'activité d'une enzyme avant dénaturation spontanée.

Demi-vie : (n.f.) temps nécessaire pour qu'une enzyme perde 50% de son activité spécifique, in vitro



Dégradation de protéines via le protéasome

Temperature (°C)	Half-life (min)	
	Cellulase	Amylase
40	746.2 ± 0.64	470.4 ± 1.3
50	360 ± 0.86	86.9 ± 1.09
60	252.4 ± 0.44	24.7 ± 0.77

Demi-vie de 2 enzymes

PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

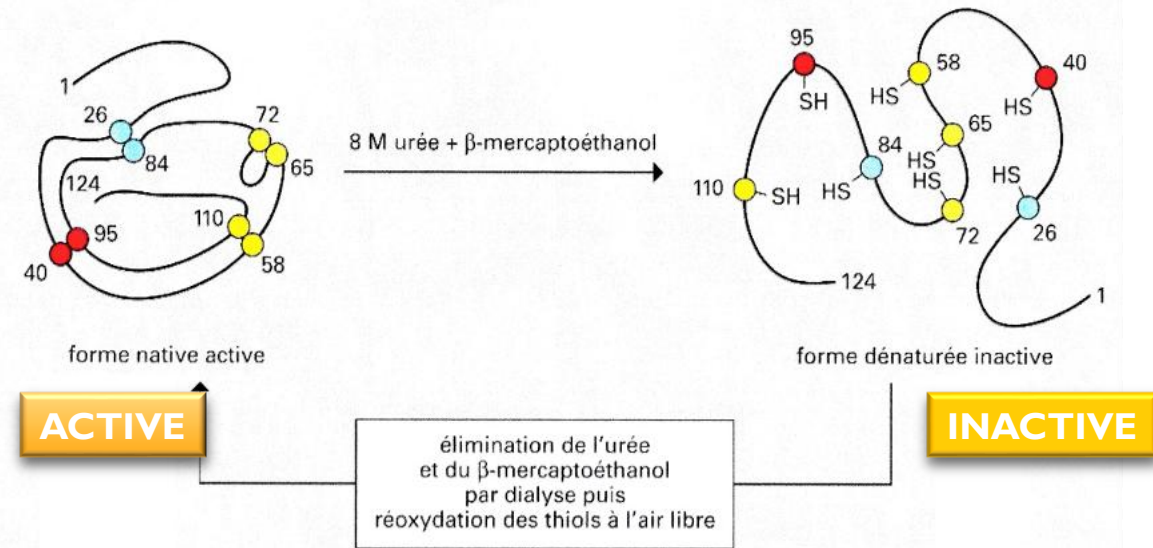
C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME



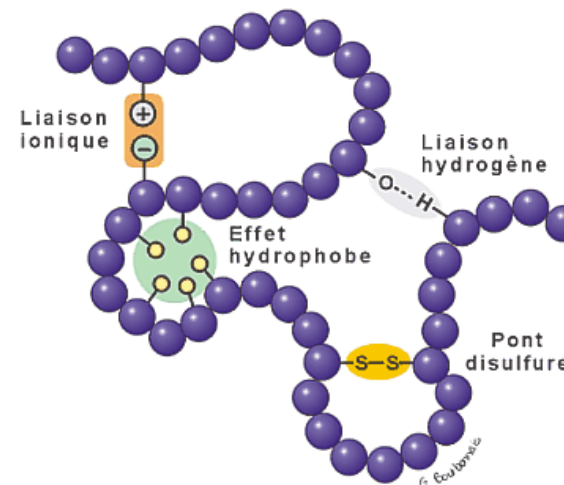
Rappels

- L'activité catalytique d'une enzyme est intimement liée à sa **conformation native**.
- **L'intégrité structurale** de l'enzyme est donc nécessaire à son **fonctionnement**.
 - Si on dénature une enzyme elle perd toute activité catalytique.
- Or cette structure native est maintenue en grande partie par des **liaisons faibles** (H, ioniques, VDW) donc **labiles**.

Quel est l'effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique ?



Expérience d'Anfinsen et structure 3D de la ribonucléase



Liaisons stabilisatrices de la structure tertiaire des protéines

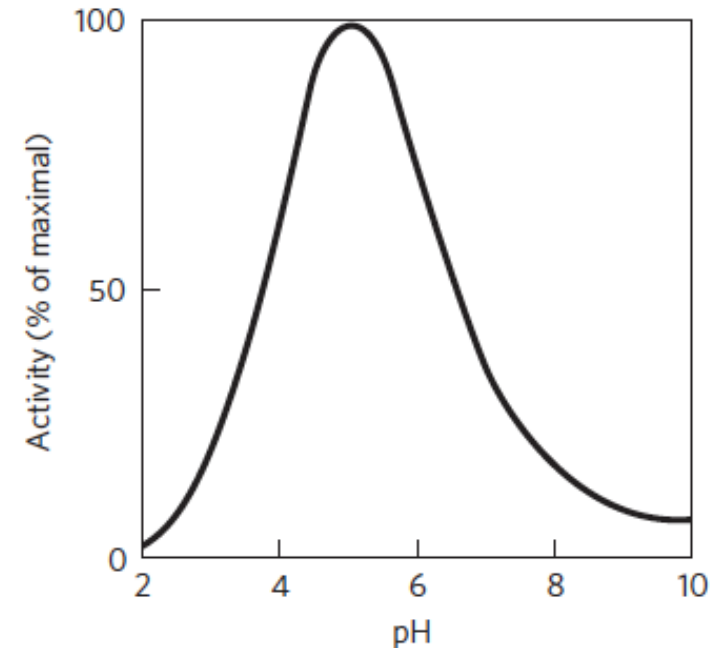
VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME



I. Effet du pH

I) Décrivez et interprétez cette courbe.



Activité relative du lysozyme en fonction du pH

- Le site actif du lysozyme contient 2 AA essentiels à la catalyse : **Glu35 et Asp52**.
- Le **pKa** de la chaîne latérale de ces 2 AA est respectivement de **5,9 et 4,5**.

VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME

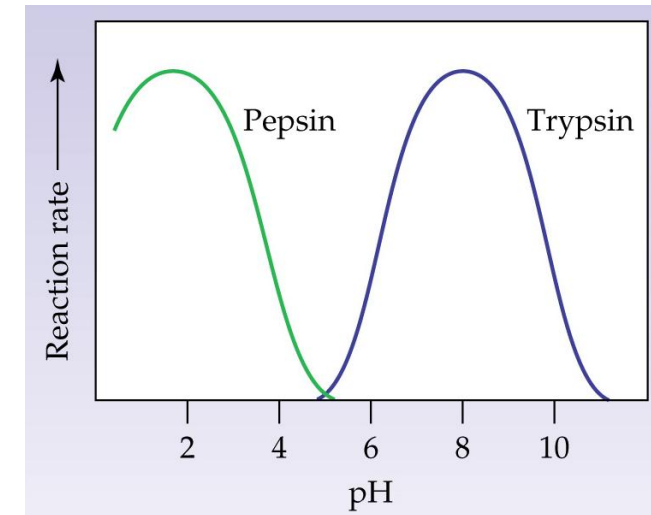


I. Effet du pH

- Pour chaque enzyme, il existe une zone de **pH optimal** où l'activité est maximale.
- En dessous ou au-dessus de ce pH, l'activité est moindre.
- En effet, les protons (H^+) peuvent **modifier l'état ionique** de certains AA et interférer avec les **liaisons H et ioniques** qui interviennent à plusieurs niveaux :
 - structure native de l'enzyme → **dénaturation de l'enzyme**
 - interaction enzyme-substrat → **pas de formation du complexe ES**
 - acte catalytique → **pas de catalyse**
- Ainsi, *in vivo*, l'**activité catalytique** des enzymes peut être étroitement **régulée par le pH**. (Ex : pepsine, trypsine)

In vitro, quand on étudie une enzyme, on utilise un tampon adapté pour stabiliser le pH à une valeur optimale pour l'enzyme

Effet du pH sur l'activité de deux enzymes



Les enzymes gastriques ont un pH optimal acide (pH~5), leur permettant de fonctionner dans l'estomac.

Lorsque le contenu stomacal passe dans le duodénum le pH augmente (pH~8), ce qui inactive les enzymes gastriques mais favorise les enzymes pancréatiques.

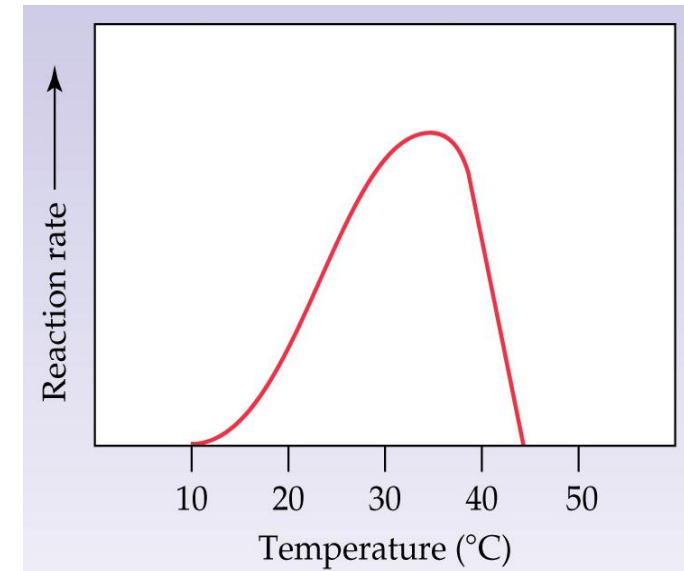
VI. LA REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME



2. Effet de la température

- Pour chaque enzyme, il existe une **température optimale** de fonctionnement ($T = 40-70^{\circ}\text{C}$).
- L'effet de la température est double :
 - Si $T \nearrow$ mais $< T_{\text{optimal}}$
 - Augmentation de l'activité enzymatique par augmentation de l'agitation moléculaire (cf. loi d'Arrhénius).
 - Si $T > T_{\text{optimal}}$
 - D'abord, diminution de la probabilité de rencontre de E et S car l'agitation moléculaire est trop importante
 - Puis, diminution de l'activité par dénaturation de la protéine
- La **température contrôle** donc la **vitesse** de réaction et la **structure** de l'enzyme.



Effet de la température sur l'activité d'une enzyme

$$k_{\text{cat}} = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

Loi d'Arrhenius



In vitro, on se place à la température optimale pour étudier une enzyme.
Certaines enzymes sont capables de fonctionner à haute température (cf. Taq polymérase)

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME

3. (Dé)phosphorylation

3.1. Approche expérimentale – Fischer & Krebs (1950)

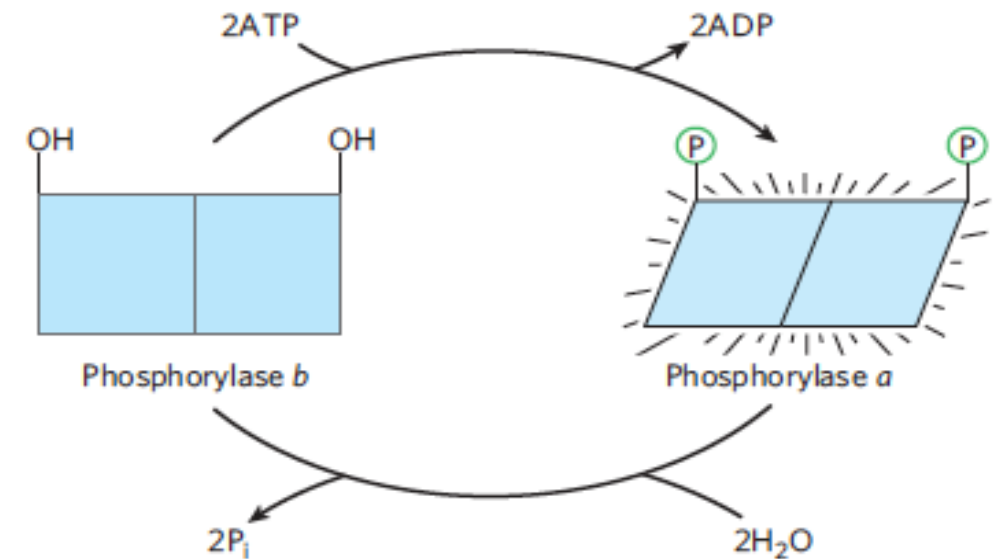
- **Modèle d'étude** : la **glycogène phosphorylase** localisée dans les cellules musculaires :



- **Protocole** :
 - Préparation d'un extrait brut de cellules musculaires
 - Mesure de l'activité enzymatique
- **Résultats** :
 - L'enzyme est présente sous 2 formes (active et inactive) interconvertibles
 - La part de forme active augmente par ajout d'ATP
 - Identification d'une enzyme qui utilise l'ATP pour phosphoryler la glycogène phosphorylase
 - La forme phosphorylée est la forme active



Edmond Fischer
(1920-2021)
et Edwin Krebs
(1918-2009),
biochimistes,
Prix Nobel 1992



Régulation de la **glycogène phosphorylase** par phosphorylation et déphosphorylation

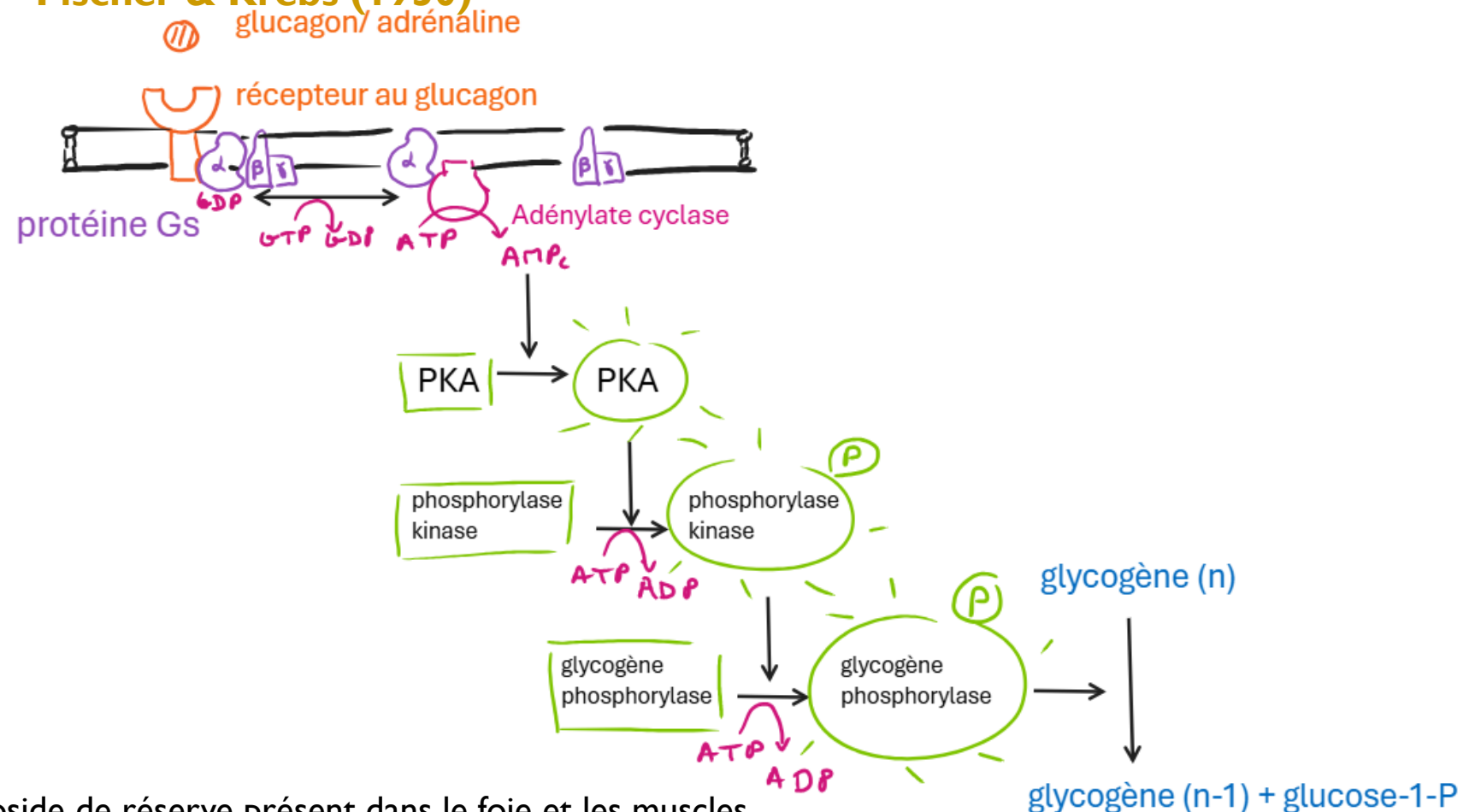
→ **L'activité de la glycogène phosphorylase est contrôlée par une phosphorylation réversible.**

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME

3. (Dé)phosphorylation

3.1. Approche expérimentale – Fischer & Krebs (1950)

Libération de glucose à partir du glycogène en réponse au glucagon ou à l'adrénaline



- Le glycogène est un homopolysaccharide de réserve présent dans le foie et les muscles
- Sa dégradation permet de libérer du glucose directement utilisable par les cellules.

D. LES CONTROLES EXERCES SUR LES ETAPES LES PLUS EXERGERONNIQUES DE LA GLYCOLYSE

2. Contrôle de la PFKI par des effecteurs allostériques

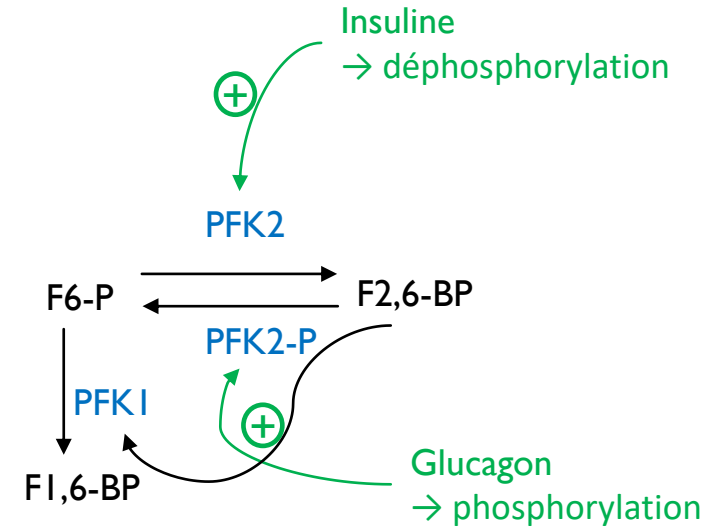
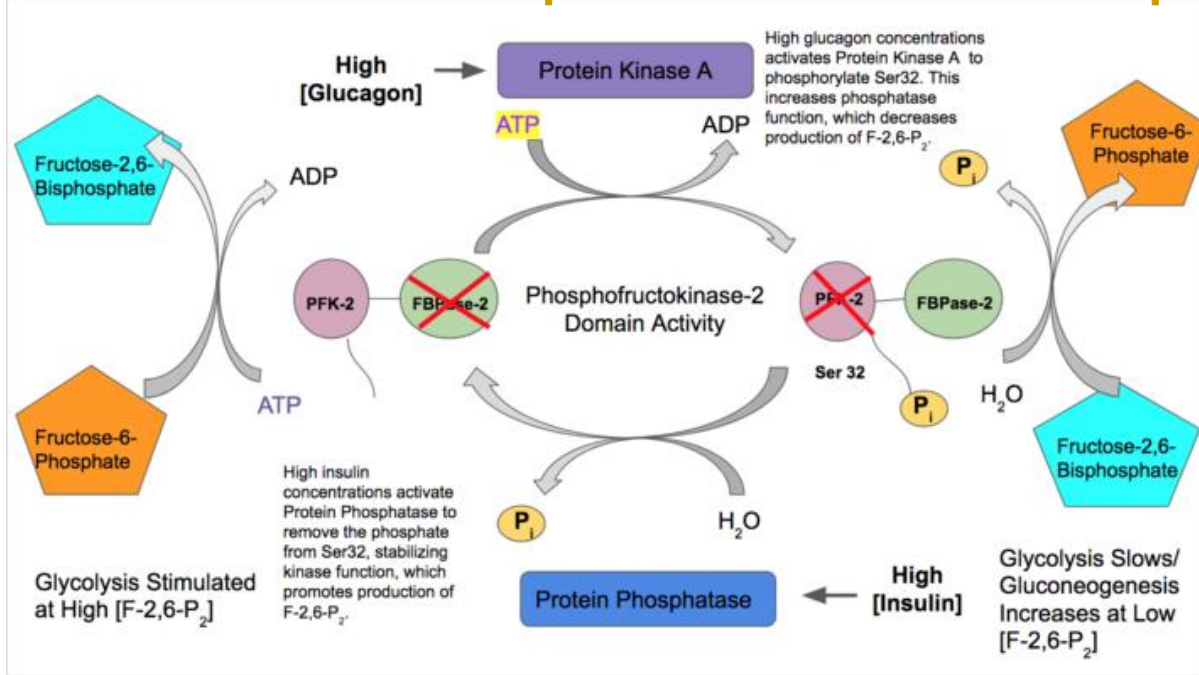
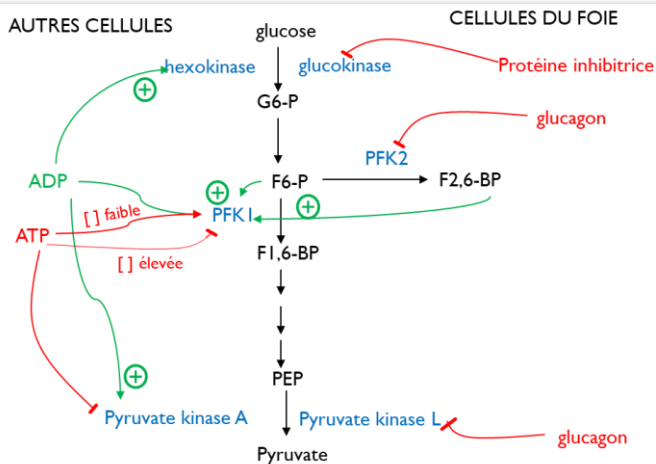


Figure 10 : activité de la PFK1 et son contrôle dans le foie



Glycémie élevée

⇒ ↗ [insuline]

⇒ ↗ [PFK2]

⇒ ↗ [F-2,6-BP]

⇒ Augmentation de l'affinité de PFK I pour F-6-P

⇒ ↗ glycolyse

⇒ ↗ [ATP]

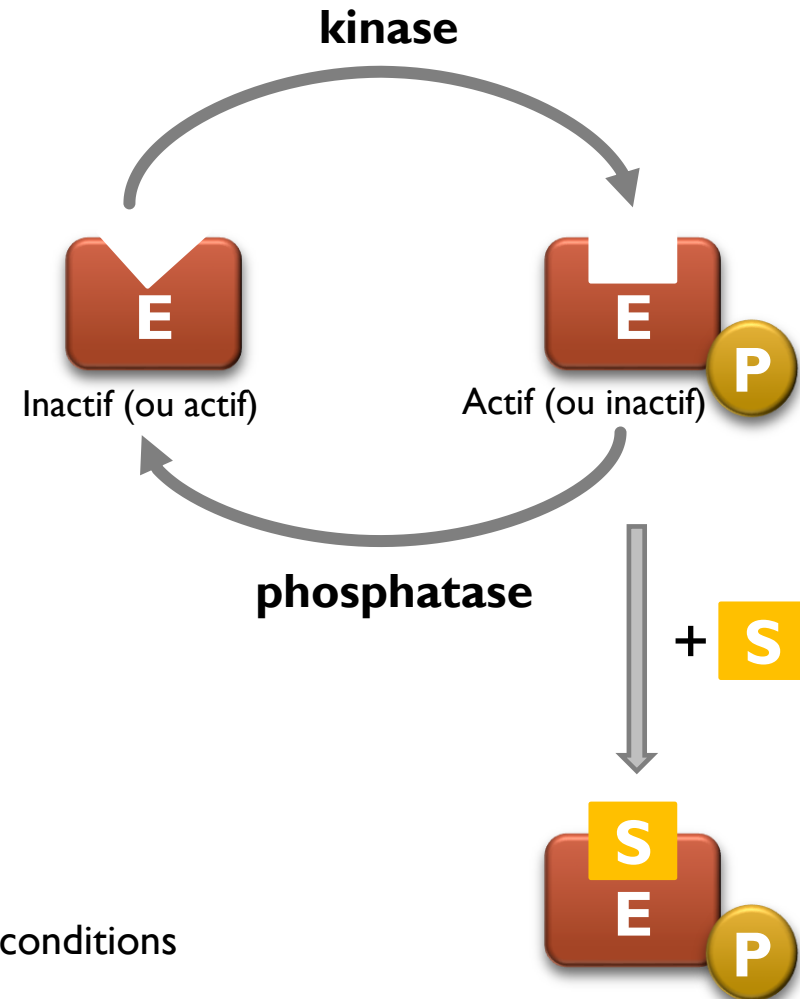
C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME



3. (Dé)phosphorylation

3.2. Généralisation

- L'activité de nombreuses enzymes est réglée de façon **réversible** par **phosphorylation/déphosphorylation**.
- **Conséquence** : changement de conformation du site actif qui devient actif/inactif.
- **Mécanismes** : ces modifications post-traductionnelles sont effectuées par des enzymes au rôle antagoniste.
 - ✓ **Kinase** → phosphorylation
 - ✓ **Phosphatase** → déphosphorylation
- **Intérêt biologique** :
 - ✓ Système de contrôle ON/OFF rapide des enzymes, en réponse aux conditions
 - Ex : Cascades de phosphorylations → signalisation de courte durée
 - Ex : Contrôle de la dégradation du glycogène → adaptation aux besoins de la cellule



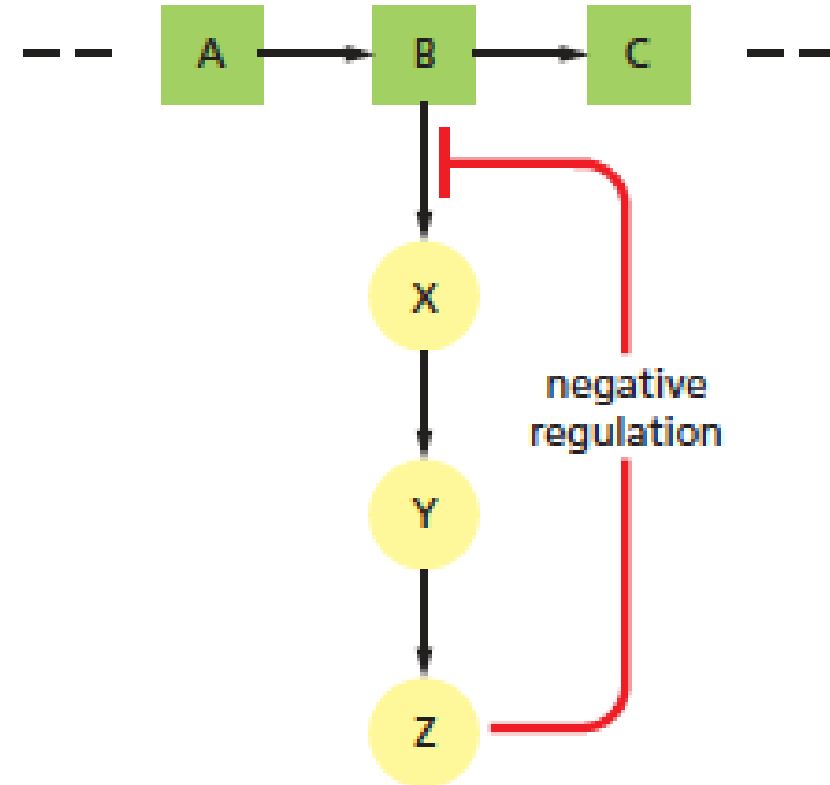
C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME



4. L'EXISTENCE D'INHIBITEURS COMPETITIFS ET NON COMPETITIFS

- L'activité des enzymes peut être régulée par des **inhibiteurs réversibles** qui sont souvent :
 - les produits de leur réaction
 - Le produit de fin de voie métabolique

→ **Régulation des voies métaboliques selon les besoins de la cellule**



Rétrocontrôle négatif d'une voie métabolique par son produit final

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME

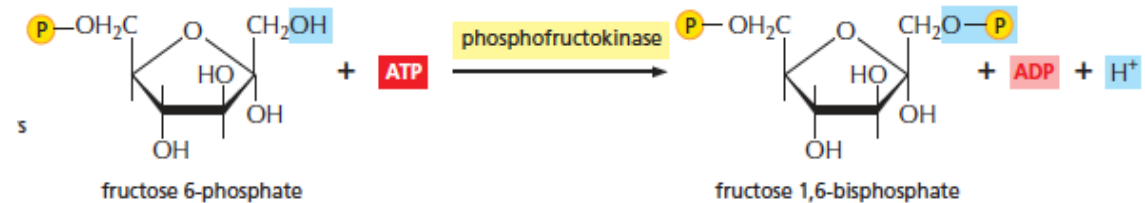
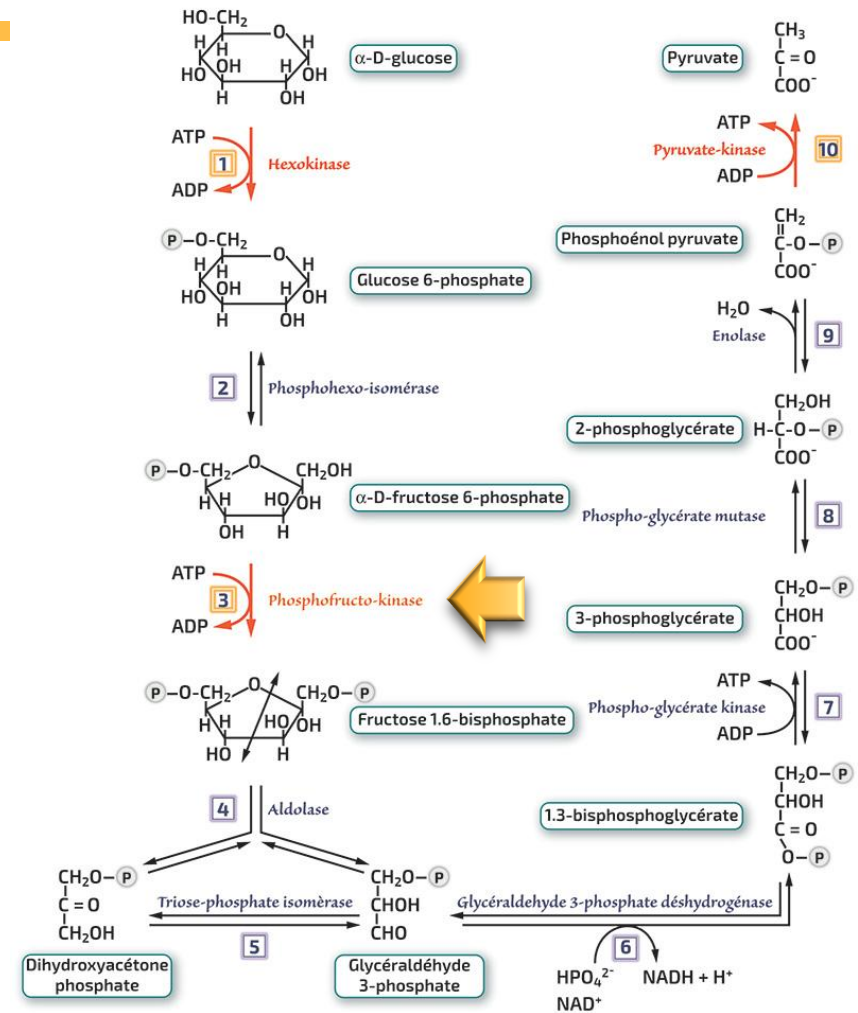
I. Etude de la PFKI

Présentation

- La phosphofructokinase I (PFKI) catalyse la 3^e étape de la glycolyse → engagement du glucose dans la voie de la glycolyse de manière **spécifique** et **irréversible**.
- Chez les animaux...
 - C'est un des 3 points de contrôle de la glycolyse
 - C'est l'enzyme limitante de la glycolyse

Réaction catalysée

- La PFK I produit du Fructose-1,6-bisphosphate à partir de Fructose-6-phosphate et d'ATP.
- Elle utilise Mg^{2+} comme cofacteur

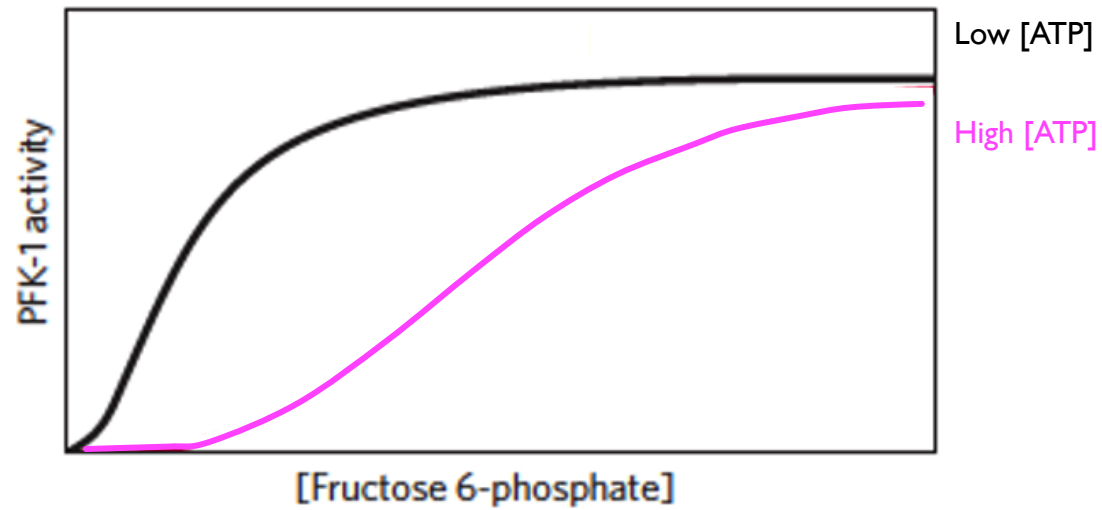


C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME



I. Etude de la PFK1

Etude cinétique



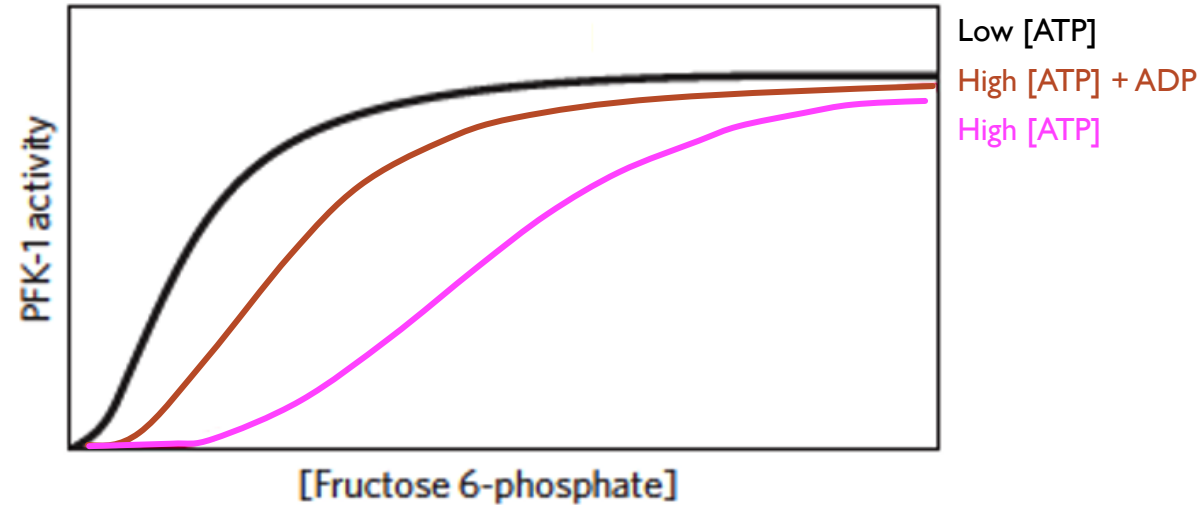
Analysez ce graphique.

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME



I. Etude de la PFK1

Etude cinétique



- A faible [ATP] : Hyperbole → cinétique michaelienne
 - A forte [ATP] : Sigmoide → effet inhibiteur de l'ATP à forte [C] uniquement
 - A forte [ATP] + ADP : Sigmoide atténuée → l'ADP antagoniste de l'effet de l'ATP
- **La sigmoïde est caractéristique des enzymes allostériques.**

Quel mécanisme se cache derrière cette cinétique ?

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME

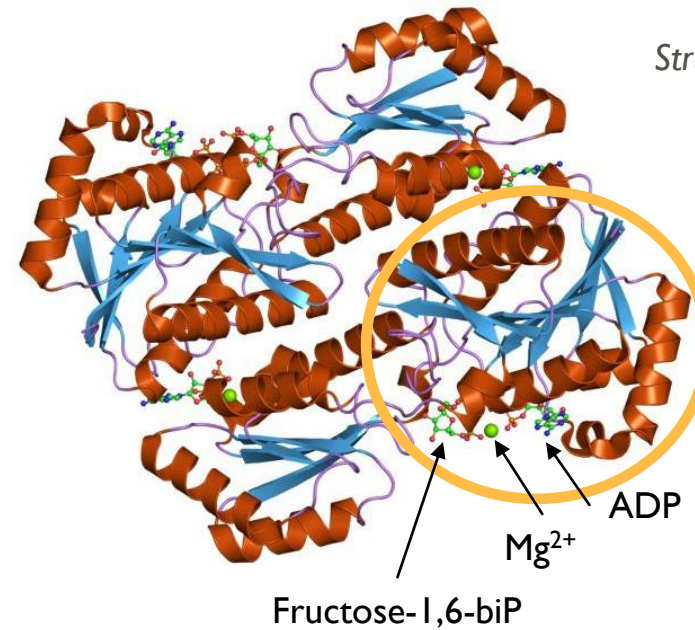


I. Etude de la PFK I

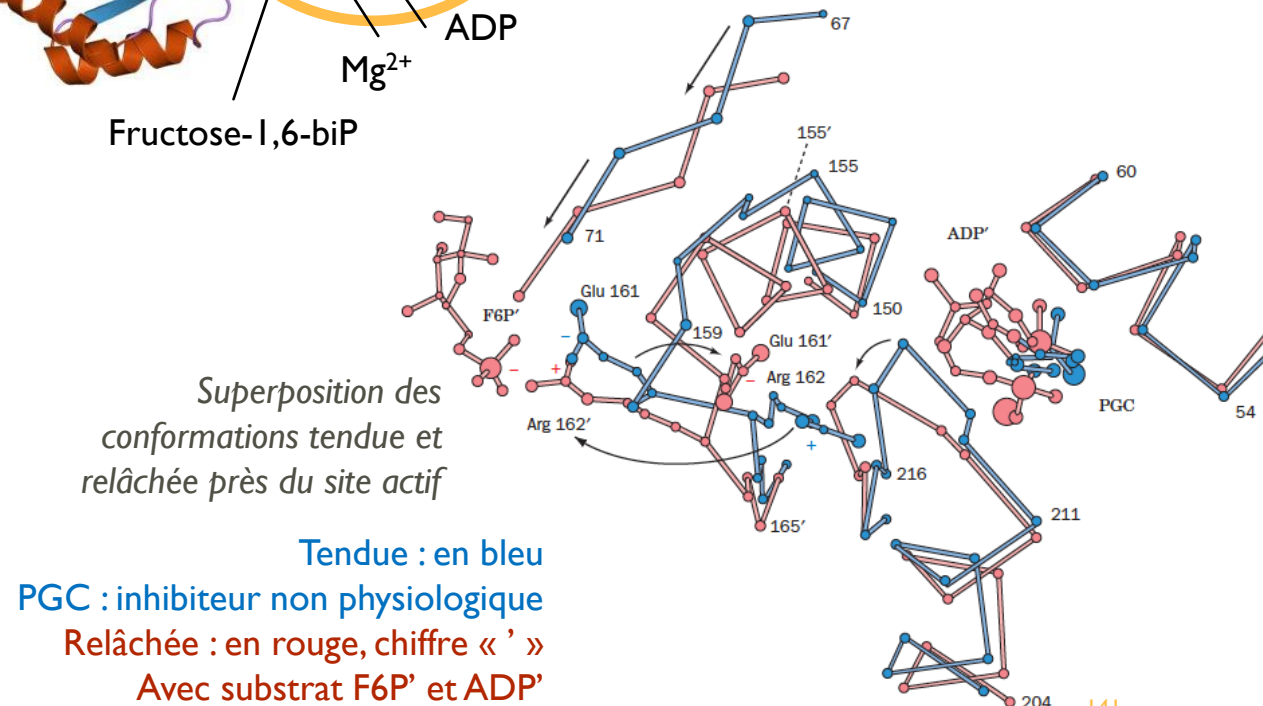
Structure

- Structure I : ~ 300 AA
- Structure II : hélices alpha et feuilletts beta
- Structure III : 2 lobes similaires
 - un lobe avec site de liaison à l'ATP à forte affinité
 - un lobe avec site de liaison au Fructose-6-P + autre site de liaison à l'ATP à faible affinité
- Structure IV : multimérique, **homotétramère**
- La PFK I existe sous 2 conformations :
 - **R** = relâchée, à forte affinité pour F6P
 - **T** = tendue, à faible affinité pour F6P

→ **La PFK I oscille entre 2 conformations**



Structure quaternaire de la PFK I
avec cofacteurs et produits



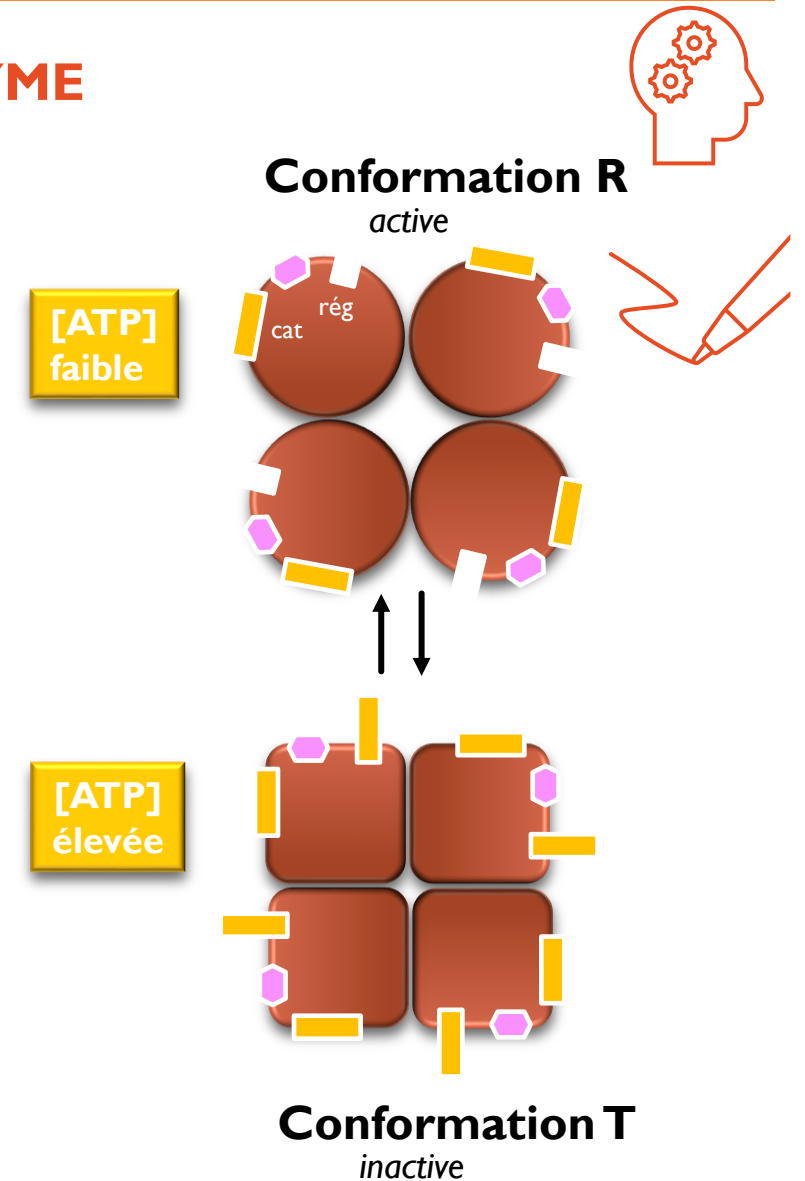
C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME

I. Etude de la PFKI

Légende : PFKI F6P ATP

Mécanisme

- La PFKI est régulée par de nombreuses molécules, dont l'ATP.
- L'ATP** est donc à la fois **substrat** et **régulateur** de la PFKI.
- Cependant, il se fixe à 2 sites différents :
 - un **site catalytique** à haute affinité
 - un **site régulateur** à faible affinité
- A faible [ATP]** : l'ATP ne se fixe qu'au site catalytique (à forte affinité)
→ La PFKI est sous forme R et fonctionne activement.
- A forte [ATP]** : l'ATP se fixe à la fois sur le site catalytique (à forte affinité) mais aussi sur le site régulateur (à faible affinité).
 - Transconformation de R vers T (moins d'affinité pour le F6P).
 - La PFKI fonctionne alors au ralenti, réduisant le flux de toute la glycolyse.



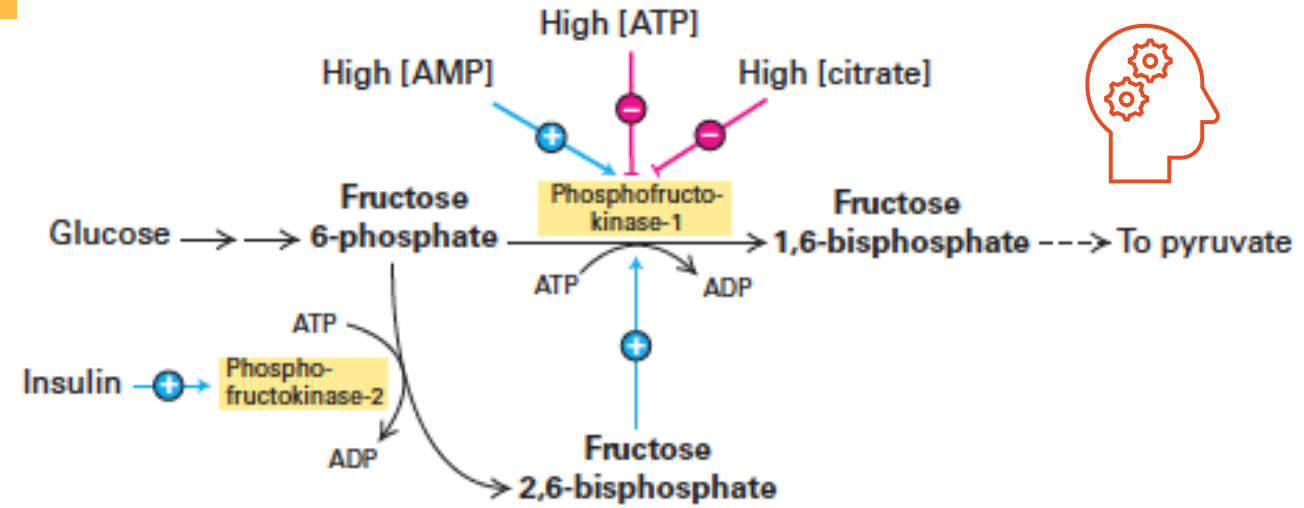
Rem : La PFKI est aussi stimulée par l'AMP, l'ADP et inhibée par le PEP (produit de la glycolyse) et le citrate (produit du cycle de Krebs).

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME

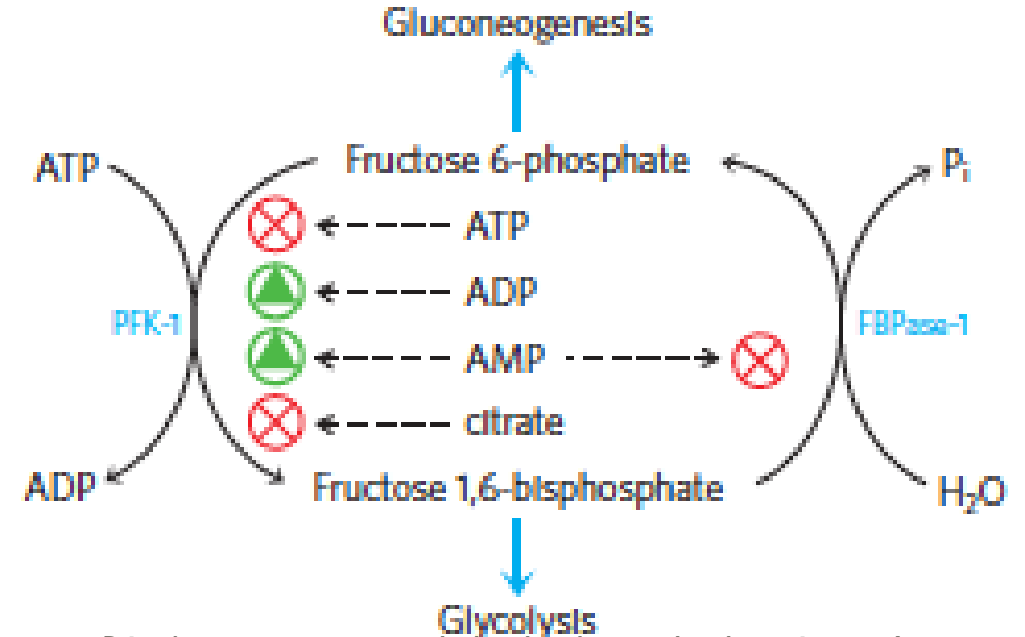
I. Etude de la PFKI

Contexte biologique

- La PFK I est régulée par le ratio entre ATP (produit par la glycolyse) et ADP (consommé par la glycolyse).
- Ainsi la PFK I contrôle un point clé de la glycolyse en fonction du « statut » énergétique de la cellule.
 - Si ratio ATP/ADP élevé → glycolyse ralentie
 - Si ratio ATP/ADP faible → glycolyse accélérée pour produire de l'ATP
- La PFK I contrôle aussi la quantité d'oses dans la cellule.
- Dans le **foie**, elle empêche que la glycolyse et la glycogénogenèse ne soient activées en même temps
 - stimulation par le **fructose-2,6-biP**, via une boucle d'activation parallèle à la glycolyse (catalysée par la PFK2)



Régulation de la PFK I par de nombreux facteurs

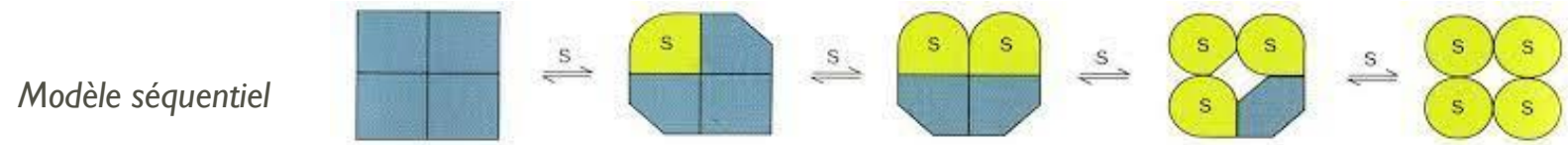


Régulation antagoniste de la glycolyse et la glycogénogenèse

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME



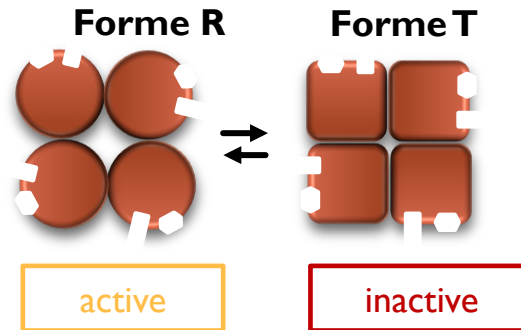
2. Généralisation



Structure

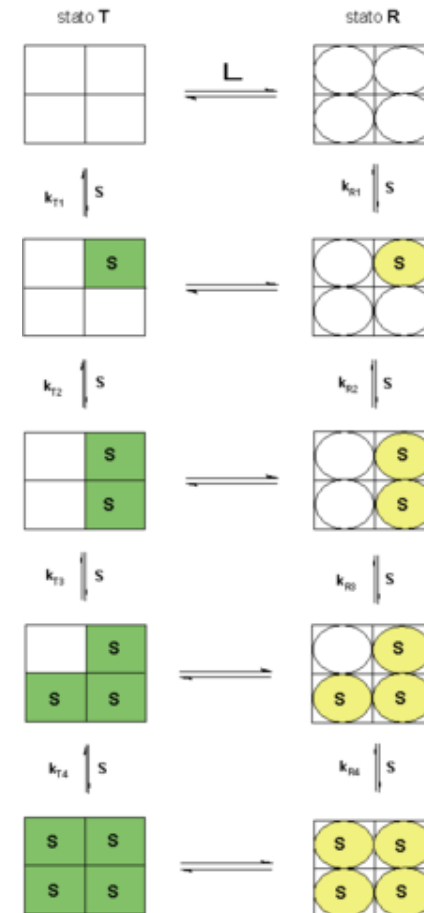
- Les enzymes allostériques sont **multimériques** (souvent tétramériques).

- Les enzymes allostériques ont 2 conformations possibles :
 - **T** = « tendu », forme **inactive**
 - **R** = « relâché », forme **active**



- Il existe 2 modèles pour expliquer la transition $T \leftrightarrow R$
- Modèle concerté (Monod, Wyman, Changeux)**
 - Les monomères basculent tous simultanément de la forme T à la forme R par la fixation du substrat sur 1 des sous-unités
 - Chaque molécule S qui se lie augmente la probabilité de transition de T vers R
- Modèle séquentiel (Koshland, Nemethy, Filmer)**
 - Les différentes sous-unités d'une même enzyme peuvent être en conformation R ou T mais le substrat ne se fixe que sur les s.u. en conformation R.

Modèle concerté



C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME

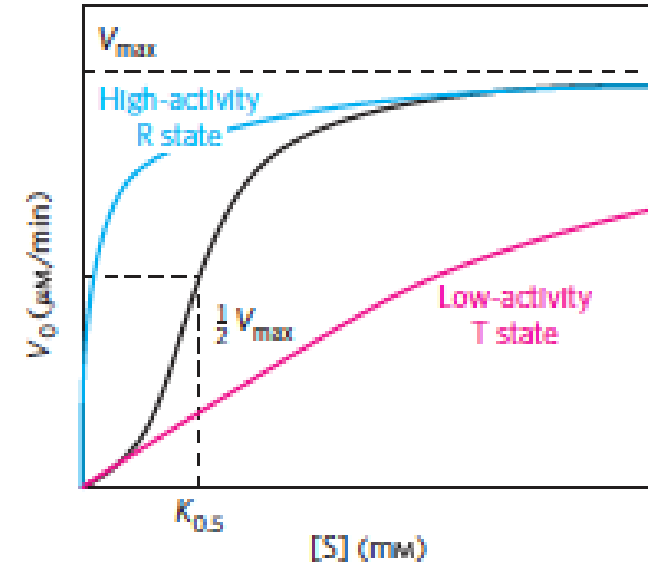


Coopérativité : (n.f.) propriété des protéines (enzymes, récepteurs) multimériques caractérisées par le fait que la fixation d'un ligand sur un site renforce la fixation du ligand sur les autres sites.

2. Généralisation

Cinétique

- Les enzymes allostériques se caractérisent par une courbe cinétique en forme de **sigmoïde** \neq cinétique michaelienne (hyperbole)
 - Plus $[S]$ augmente, plus l'affinité de l'enzyme pour S augmente
 - **Coopérativité** entre les s.u.
- La vitesse de réaction (V_0) est alors modélisée par l'équation suivante :



$$V_0 = \frac{V_{\max} \times [S]^n}{K_m + [S]^n}$$

n : **nombre de Hill** qui traduit la **coopérativité** entre les s.u.

- ✓ $n = 1 \rightarrow$ pas de coopérativité, cinétique michaelienne (hyperbole)
- ✓ $n > 1 \rightarrow$ coopérativité, cinétique allostérique (sigmoïde)

Plus **n** est grand, plus la coopérativité est forte.

En général, **n** est inférieur au nombre de sites (i.e. nb de s.u. de l'enzyme).

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME

2. Généralisation



Effecteurs allostériques

- La cinétique des enzymes allostériques s'explique par l'action **d'effecteurs allostériques**.
 - Fixation des effecteurs allostériques sur l'enzyme
changement de conformation
→ modulation de l'activité enzymatique

Effecteur allostérique : (n.m.) molécule qui se fixe sur un site allostérique, distinct du site actif, et qui régule l'activité de l'enzyme

- On distingue 2 types d'effets dus aux effecteurs :
 - Effet homotrope** = effet exercé par le substrat
 - ✓ Ex : effet homotrope négatif de ATP sur PFK I
 - Effet hétérotrope** = effet exercé par une molécule autre que le substrat
 - ✓ Ex : effet hétérotrope positif de AMP et ADP sur la PFK I

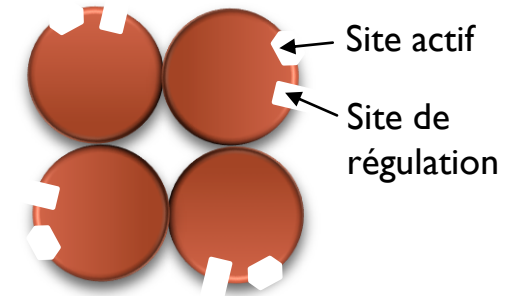
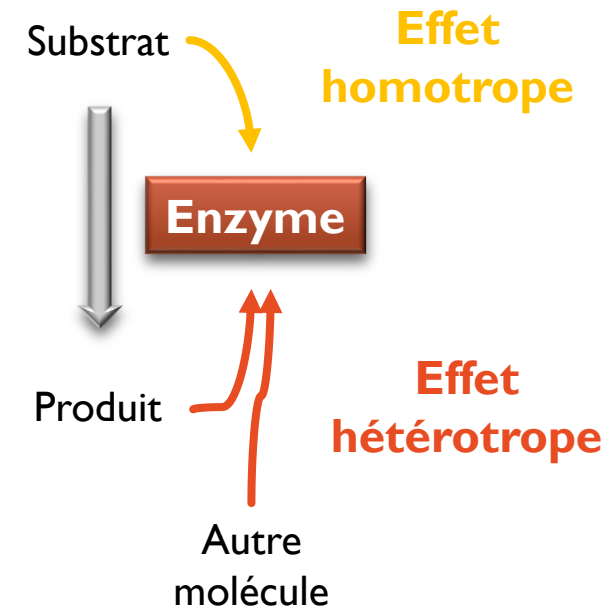


Schéma théorique d'enzyme allostérique



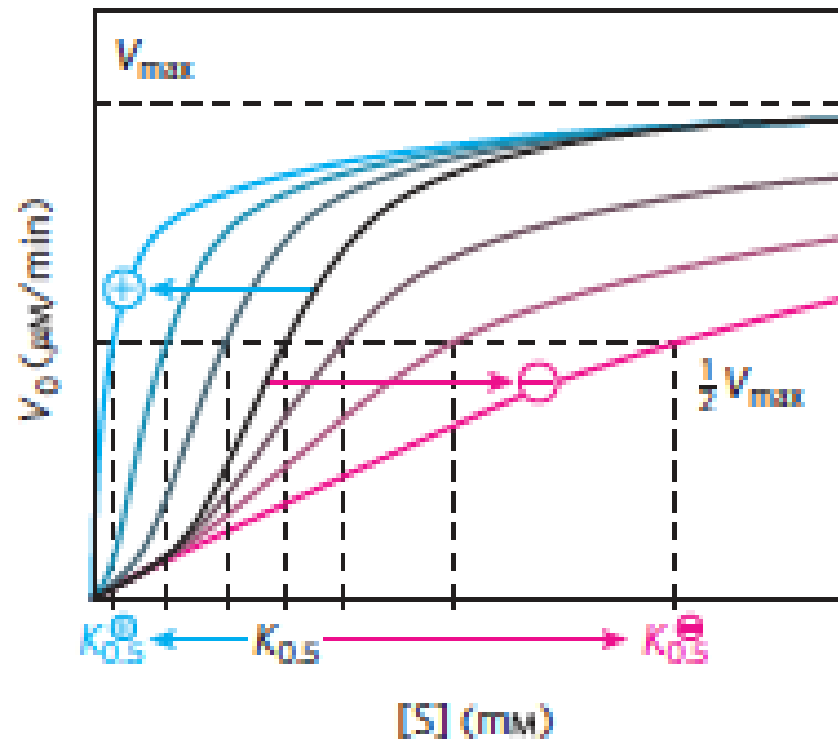
C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME



2. Généralisation

Effecteurs allostériques

- Les effecteurs allostériques peuvent avoir un **effet positif (stimulateur)** ou **négatif (inhibiteur)** sur l'activité enzymatique.



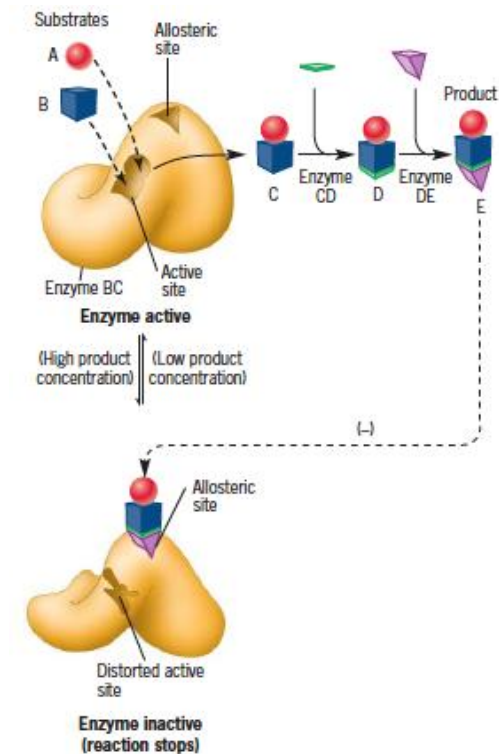
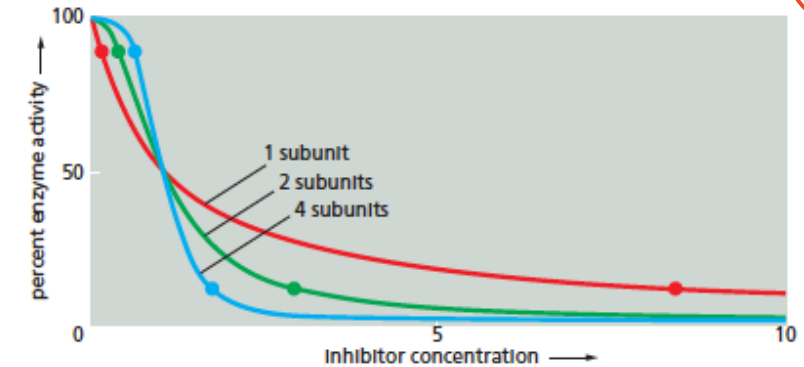
C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME

Diminution de l'activité enzymatique pour une enzyme mono- ou multimérique, en présence d'inhibiteur (in Alberts)

2. Généralisation

Intérêt de l'allostérie

- En présence d'un inhibiteur, l'activité d'une enzyme allostérique peut être réduite jusqu'à 2% (max 10% pour une enzyme michaelienne).
→ **Régulation plus modulable des enzymes allostériques**
- Souvent, l'enzyme de la 1^e étape d'une voie métabolique est allostérique et elle est inhibée par le produit final de cette voie = **rétro-inhibition**.
→ **Régulation des voies métaboliques en fonction des besoins** de la cellule.



Rétro-inhibition d'une voie métabolique par régulation allostérique de l'enzyme n°1 par le produit final E (in Karp)

C. REGULATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME



BILAN

- L'activité catalytique des enzymes peut être finement **régulée** à différents niveaux :
 - Le pH
 - La température
 - La phosphorylation/déphosphorylation par des kinases/phosphatases
 - La fixation couplée des substrats
 - Les inhibiteurs réversibles, compétitifs ou non compétitifs
 - L'allostérie qui permet une modulation fine de l'activité catalytique par des effecteurs allostériques (inhibiteurs ou activateurs)

Type de régulation	Détails	Exemple
Température et pH	Dénaturation de la protéine	Taq polymérase
Phosphorylation et déphosphorylation	Kinase/phosphatase	Glycogène phosphorylase
Fixation couplée	Pour les enzymes à 2 substrats	Hexokinase (ATP et glucose)
Inhibiteurs	compétitifs ou non-compétitifs	Succinate deshydrogénase inhibée par le malonate
Allostérie	effet homotrope positif ou négatif, effet hétérotrope positif ou négatif indice de coopérativité (n)	PFK I

PLAN DU COURS

I. Approche expérimentale

- A. Découverte historique
- B. Méthode d'étude

II. La cinétique enzymatique michaelienne

- A. Les enzymes monomériques affichent une cinétique michaelienne
- B. Les paramètres cinétiques informent sur le mécanisme catalytique
- C. Bilan sur la cinétique enzymatique

III. Les enzymes, des biocatalyseurs

- A. Biocatalyseurs vs. catalyseurs chimiques
- B. Les enzymes modifient la cinétique et non la thermodynamique

IV. L'inhibition de la cinétique michaelienne

- A. Les inhibiteurs irréversibles affectent durablement les enzymes
- B. Les inhibiteurs réversibles abaissent la vitesse de réaction

V. Approche structurale de l'activité catalytique des enzymes

- A. Les enzymes ont une structure complémentaire de leur substrat
- B. Les enzymes se caractérisent par une double spécificité
- C. Les enzymes utilisent différents mécanismes catalytiques

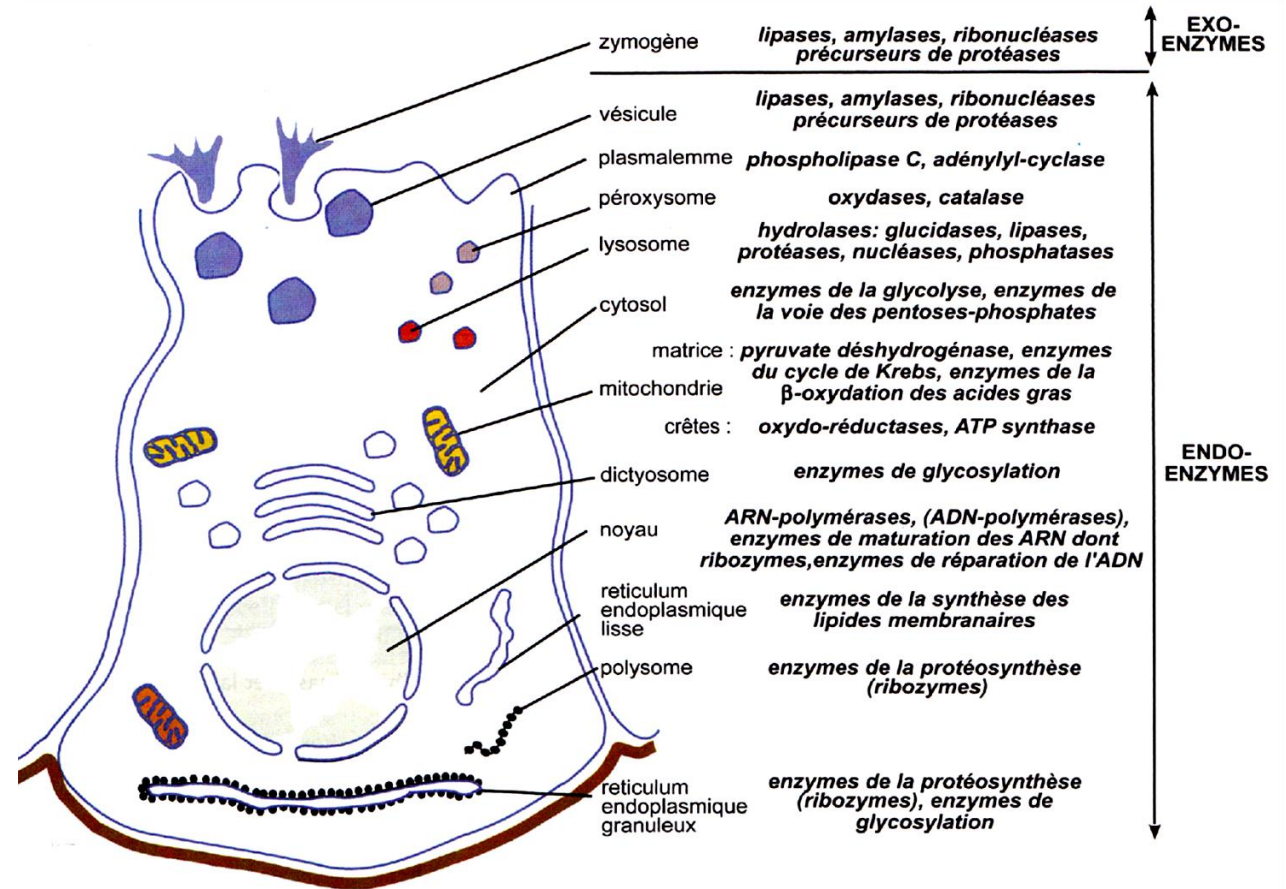
VI. La régulation de l'activité enzymatique

- A. Régulation de la transcription des gènes codant les enzymes
- B. Régulation de la dégradation des protéines enzymatiques
- C. Régulation de l'activité catalytique de l'enzyme
- D. Régulation par la localisation subcellulaire

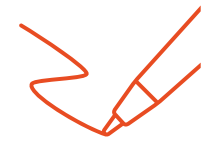
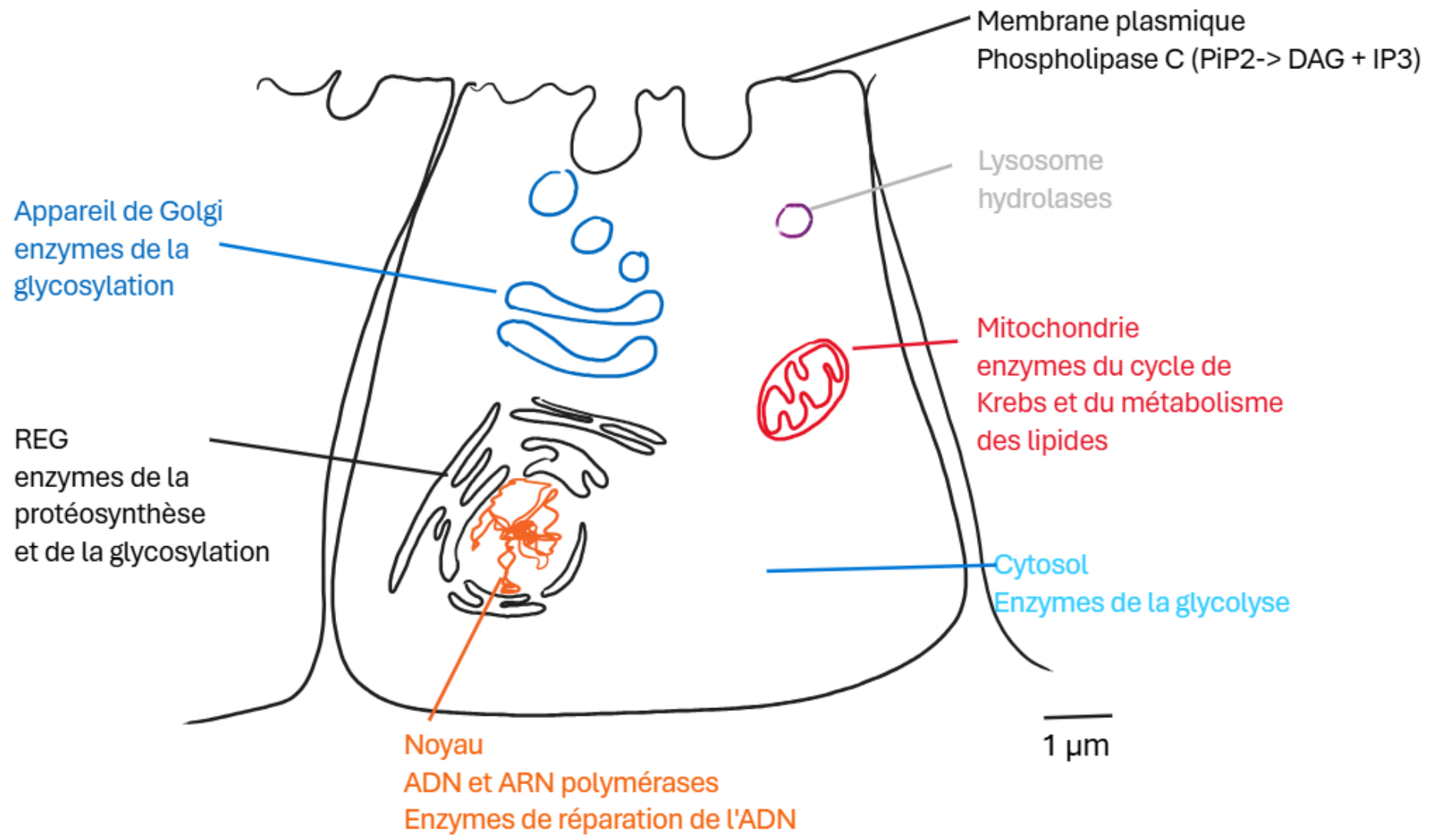
D. L'ACTIVITE DES ENZYMES PEUT ETRE CONTROLÉE VIA LEUR LOCALISATION SUBCELLULAIRE



- Certaines **enzymes** sont **confinées** dans tel ou tel **compartiment** subcellulaire (cytosol, noyau, mitochondrie, REG...) ou dans une **membrane**.
- Cette distribution subcellulaire des enzymes est contrôlée par des **signaux d'adressage**.
- L'action de ces enzymes est donc **contrôlée** et limitée **spatialement**.
- Chaque compartiment endomembranaire possède ainsi ses propres enzymes et ne peut donc réaliser que certains types de réactions biochimiques → **spécialisation fonctionnelle**
 - ✓ Ex : Le noyau comporte les enzymes de la réplication et de la transcription.
 - ✓ Ex : La mitochondrie contient, entre autres, les enzymes du catabolisme oxydatif aérobie.



Répartition des principales enzymes de la CAP

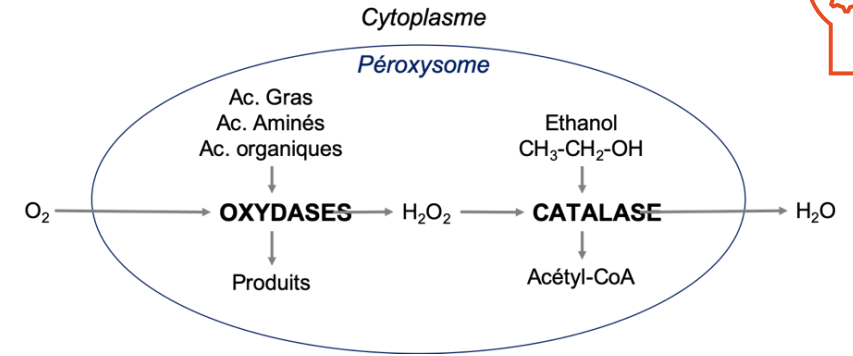


Enzymes et compartimentation cellulaire

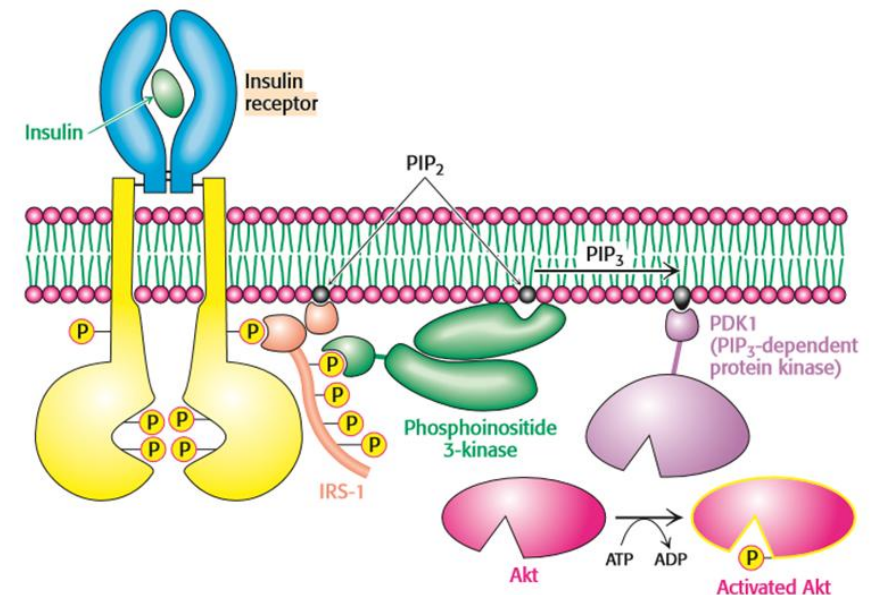
D. L'ACTIVITE DES ENZYMES PEUT ETRE CONTROLEE VIA LEUR LOCALISATION SUBCELLULAIRE

I. Intérêt biologique

- Le confinement spatial des enzymes a plusieurs intérêts :
 - **Séparer** physiquement des réactions antagonistes pour éviter qu'elles n'annulent leurs effets.
 - ✓ Ex : synthèse des protéines (cytoplasme, REG) et dégradation des protéines (lysosome)
 - **Créer un environnement** favorable à l'action de certaines enzymes
 - ✓ Ex : pH acide du lysosome propice à l'action des hydrolases
 - **Protéger** la cellule d'intermédiaires réactionnels dangereux
 - ✓ Ex : détoxification par le peroxysome d' H_2O_2 toxique
- La localisation particulière des enzymes transmembranaires permet...
 - **d'exploiter un gradient** transmembranaire d'ions
Ex : ATP-synthétase de la membrane des mitochondries qui utilise le gradient de H^+ pour produire de l'ATP
 - de participer à la **transduction** d'un signal
Ex : Récepteur de l'insuline, couplé à une kinase



Confinement de l'oxydase et de la catalase dans le peroxysome



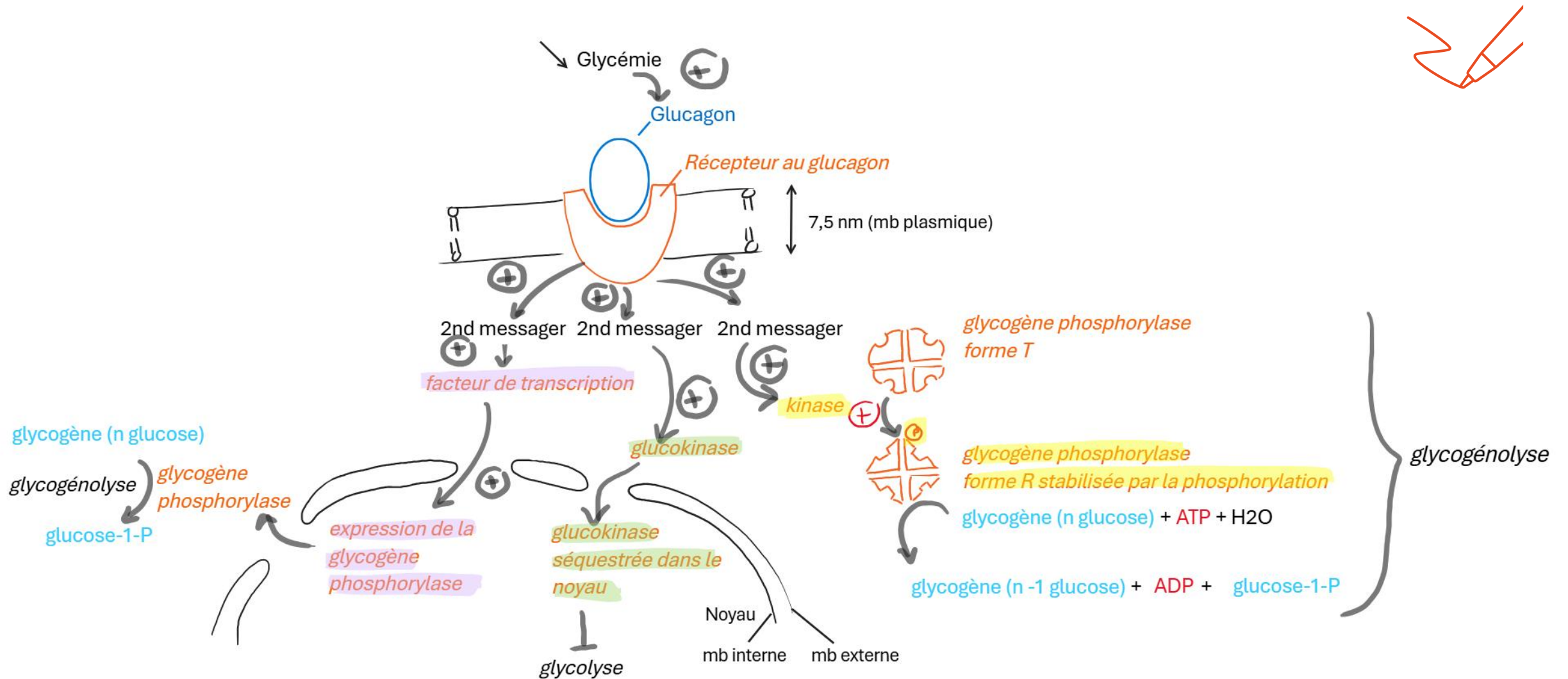
Le récepteur à l'insuline, couplé à une enzyme

D. L'ACTIVITE DES ENZYMES PEUT ETRE CONTROLEE VIA LEUR LOCALISATION SUBCELLULAIRE

BILAN GÉNÉRAL

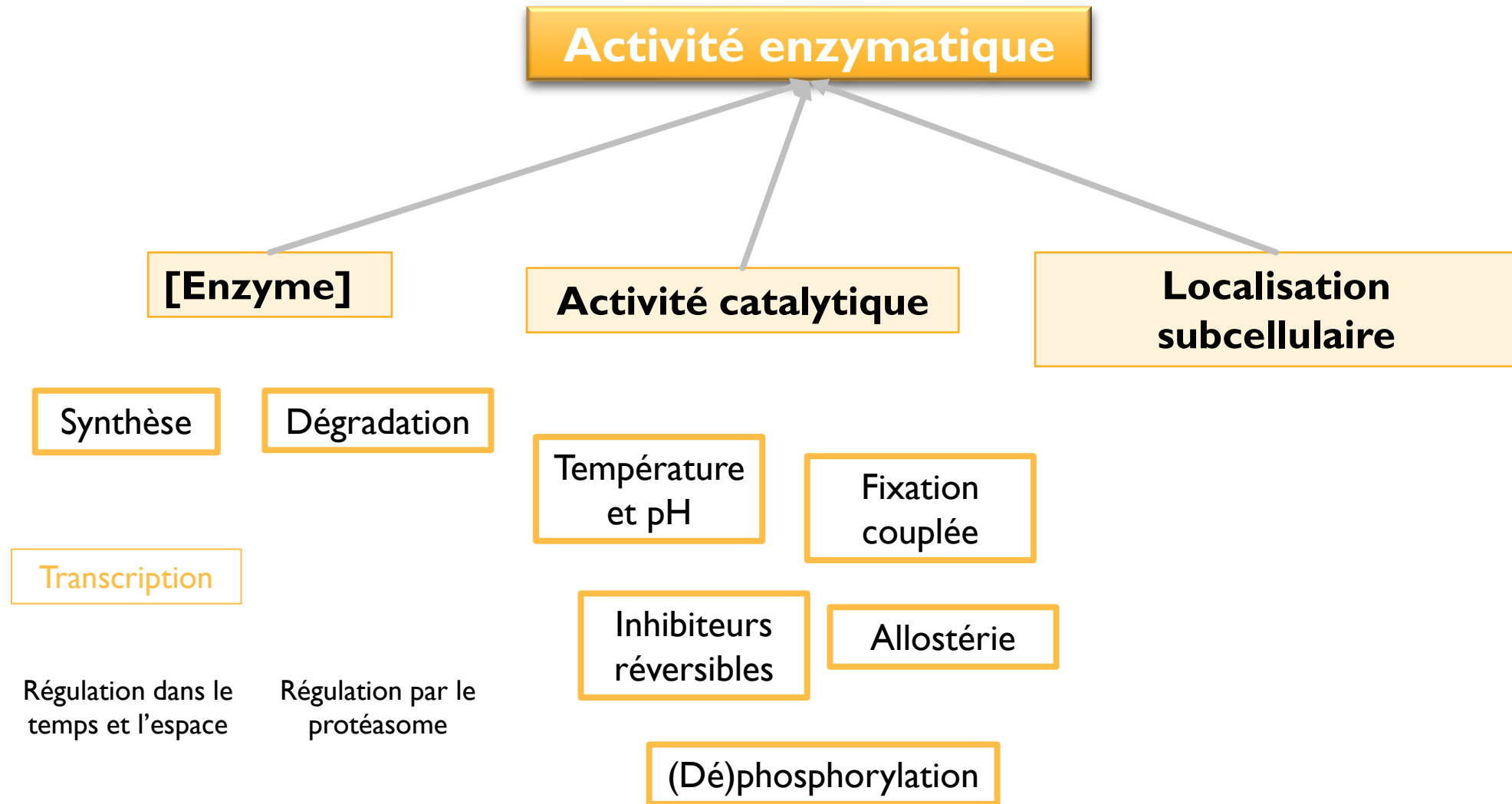


- L'activité des enzymes peut être finement **régulée** grâce à différents leviers :
 - 1) régulation de la **concentration** en **enzyme** qui dépend de la quantité produite et de la quantité dégradée
 - 2) régulation de l'**activité catalytique** de l'enzyme par divers moyens :
 - Le pH
 - La température
 - La phosphorylation/déphosphorylation
 - La fixation couplée des substrats
 - Les inhibiteurs réversibles
 - L'allostérie
 - 3) régulation de la **localisation subcellulaire** de l'enzyme
 - dans des compartiments subcellulaires
 - dans la membrane
- **Spécialisation fonctionnelle** des compartiments subcellulaires



Les modalités de régulation de l'activité enzymatique: contrôle de leur expression, de leur localisation et de leur conformation

BILAN GÉNÉRAL



SUJETS D'ORAUX

- La diversité des enzymes et son importance dans le fonctionnement des cellules
- Relation entre nature protéique et fonction des enzymes
- Enzymes et contrôle du fonctionnement cellulaire
- La diversité des enzymes
- Enzymes et énergie
- Approche expérimentale de la cinétique enzymatique
- Comparaison enzyme michaelienne vs allostérique
- Contrôle de l'activité enzymatique

