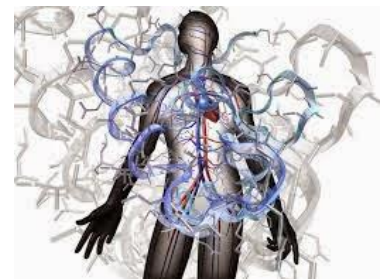
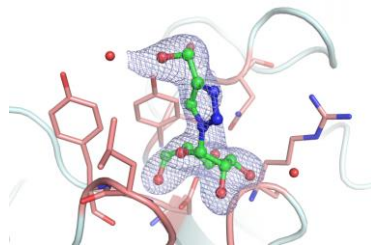
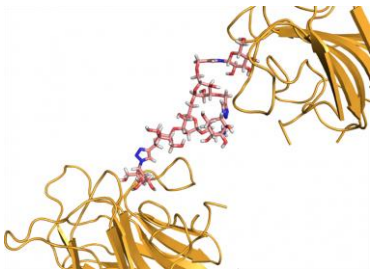


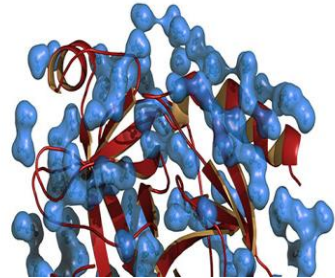
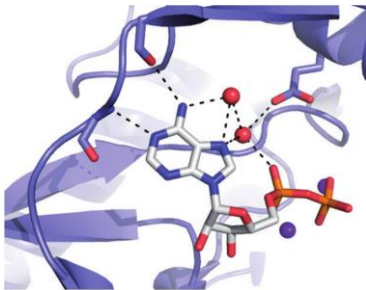
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Centre universitaire Belhadj Bouchaib – Ain Témouchent Institut des Sciences
Département des sciences de la nature et de la vie



Cours d'enzymologie



***Polycopie destinés aux étudiants
de 03^{eme} année Biochimie (LMD),
domaine SNV***



Présenté par Dr. Bennabi Farid

Département des sciences de la nature et de la vie

Institut des Sciences

Centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain-Temouchent

Filière : Biologie

sommaire

Introduction	4
I-Définitions.....	4
1-Enzyme	4
2- Substrat	4
3-Produit	4
4-Ligand	4
5- Cofacteur	4
6- Le coenzyme	4
7-la réaction enzymatique.....	5
II- Généralités.....	5
III-Structure des enzymes	5
1-Structure primaire	5
2-Structure secondaire.....	6
3-Structure tertiaire.....	7
4-Structure quaternaire.....	8
IV-Propriétés générales des enzymes	8
1- Propriétés d'un catalyseur chimique.....	8
2-Spécificité des enzymes	9
a-Spécificité de réaction :	9
b-Spécificité de substrat	9
c-Stéréospécificité	9
3- Régulation de leurs activités catalytique	10
V- Nomenclature et classification des enzymes	10
1-Numérotation conventionnelle.....	11
2-Les différents types d'enzymes.....	12
2.1-Les enzymes d'oxydoreduction et de fixation d'oxygène.....	12
2.1.1-DESHYDROGENATION DES FONCTIONS ALCOOL, CARBONYLES OU CARBOXYLES.....	12
2.1.2 - DESHYDROGENASES FAISANT APPARAÎTRE DES DOUBLES LIAISONS.....	13
2.1.3 - DESHYDROGENASES AGISSANT SUR LES FONCTIONS AZOTÉES.....	13
2.1.4-ENZYMES PARTICIPANT AU TRANSFERT D'ELECTRONS DANS LA MITOCHONDRIE	13
2.1.5 – OXYGENASES.....	13
2.2 - LES TRANSFERASES.....	14
2.2.1 - ENZYMES TRANSFÉRANT UN GROUPE METHYLE.....	14
2.2.2 - ENZYMES TRANSFÉRANT DES RADICAUX A PLUSIEURS CARBONES.....	14
2.2.3 - ENZYMES TRANSFÉRANT DES MOLECULES GLUCIDIQUES.....	14
2.2.4 – AMINOTRANSFERASES.....	14
2.2.5 – PHOSPHOTRANSFERASES.....	15

2.3 - LES HYDROLASES	15
2.3.1 - HYDROLASES DES GLUCIDES.....	15
2.3.2 - HYDROLASES DES ESTERS PHOSPHORIQUES D'OSSES.....	15
2.3.3 HYDROLASES DES LIPIDES.....	16
2.3.4 - HYDROLASES DES PEPTIDES ET DES PROTEINES.....	16
2.3.5 - HYDROLASES DES NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES ET ACIDES NUCLEIQUES.....	17
2.3.6 - HYDROLASES DES ESTERS OU ANHYDRIDES PHOSPHORIQUES.....	17
2.4 - LES LYASES OU SYNTHASES.....	17
2.4.1 – DECARBOXYLASES.....	17
2.4.2 - ALDEHYDES-LYASES.....	18
2.4.3 - ACYL-LYASES OU ACYLSYNTHESE.....	18
2.4.4 - HYDR.....	18
2.5 - LES ISOMERASES.....	18
2.5.1 - EPIMERISATION.....	18
2.5.2 - OXYDOREDUCTION INTRAMOLECULAIRE.....	18
2.5.3 - TRANSPORT DE RADICAUX.....	18
2.6 - LIGASES (SYNTHETASES)	18
2.6.1 - LIGASES FORMANT LES LIAISONS C-O.....	18
2.6.2 - LIGASE FORMANT DES LIAISONS C-C.....	19
2.6.3 - LIGASES DES LIAISONS C-S.....	19
2.6.4 - LIGASES DES LIAISONS C-N.....	19
VI- Site actif des enzymes	19
1- Définition :	20
a- Site de liaison, fixation, et reconnaissance	20
b- Site catalytique	20
VII- Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat	20
VIII- La Cinétique enzymatique à un substrat.....	21
1-Définition de la cinétique enzymatique.....	21
2- Différentes phases de la réaction enzymatique.....	22
3-La vitesse de la réaction ou taux de catalyse.....	23
4- Notion de vitesse initiale.....	23
5-Influence de de concentration du substrat sur la vitesse initiale.....	24
6-Influence de concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale.....	24
IX- LA CINETIQUE MICHAELIENNE.....	25
1- La constante de Michaelis	25
2-L'équation de Michaelis.....	25
3-Détermination de la constante de Michaélis : méthode graphique de Lineweaver et Burk	27
4-Mesure de l'activité enzymatique.....	27
5-Définition des unités enzymatiques	27

6- Influence des agents physiques et chimiques sur la cinétique:	28
6-1-Influence de la température	28
6-2-Influence du pH	28
7-les inhibiteurs enzymatiques	29
a-Les inhibiteurs réversibles	29
• Les inhibiteurs compétitifs	29
• Les inhibiteurs non compétitifs	30
• Les inhibiteurs in-compétitifs	30
b- Les inhibiteurs irréversibles	31
X. Régulation de l'activité des enzymes	31
1- Régulation par modifications covalentes	32
a- Régulation par protéolyse partielle.....	32
b-Régulation par fixation de groupes fonctionnels	32
2-REGULATION PAR ALLOSTERIE	33
a- Enzymes allostériques	33
b-Vitesse initiale et allostérie	33
c- Phénomène de coopérativité	34
▪ Le modèle concerté (Monod)	34
▪ Le modèle séquentiel (Koshland)	34
d-Régulation par rétrocontrôle négatif (ou rétroinhibition ou feedback négatif)	35
XI- Réactions de deux substrats	35
a-Réactions séquentielles	36
1-Mécanisme séquentiel au hasard (bibi aléatoire)	36
2-Mécanisme ordonné ou obligatoire (bibi ordonné)	37
b-Réactions de type pingpong (à complexe binaire)	37
XII- Iso-enzymes	39
Définition.....	39
XIII- Applications des enzymes	40
1-le secteur de la santé.....	40
2-Principaux domaines d'utilisation des enzymes dans l'industrie.....	40
XIV- Références	41

Enzymologie

Introduction

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques diverses. Chez tous les organismes vivants, les réactions chimiques du métabolisme sont catalysées par des molécules de nature protéique que l'on appelle enzymes (E).

I- Définitions

1- Enzyme

Une enzyme est une molécule (protéine ou ARN dans le cas de **ribozyme**) permettant d'accélérer jusqu'à des mille de fois les réactions chimiques de métabolisme se déroulant sur le milieu cellulaire ou extracellulaire.

Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intact en fin de réaction, ce sont des biocatalyseur.

2- Substrat

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

3- Produit

Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme suite à la transformation de substrat.

4- Ligand

Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une protéine, sur un site de fixation bien précis.

5- Cofacteur

Corps chimique non protéique intervenant obligatoire dans la réaction enzymatique :

- Pour le transport de substrat ;
- Pour la réception du produit ;
- Comme participant à la structure de l'enzyme.

Les cofacteurs peuvent être :

- Des ions : le Zinc pour l'anhydrase carbonique.
- Des molécules : eau
- Des molécules complexes : synthétisées par la cellule : coenzymes.

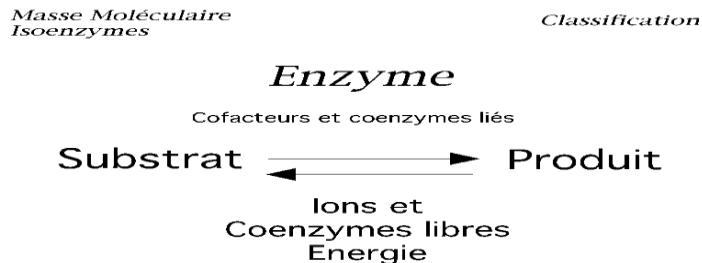
6- Le coenzyme

Molécule biologique intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction, il est soit synthétisé par l'organisme (molécule organique) ou apporté par l'alimentation (vitamine).il peut être:

- *Libre* : - se dissocie de l'enzyme à la fin de chaque réaction.
- il est lié à l'enzyme par des liaisons faibles (type électrostatique).
- la concentration du coenzyme est du même ordre de grandeur que celle du substrat : *stoéchiométrie*.

- *Lié* : - ne se dissocie pas de l'enzyme.
- il est lié à l'enzyme par des liaisons fortes (type covalent).
- sa concentration est la même que celle de l'enzyme (faible).
- il est dit groupement prosthétique.

7- la réaction enzymatique



II- Généralités

Chimiquement, ils augmentent la vitesse de réactions chimiques, sans modifier les résultats, en agissant à de très faibles concentrations.

Ils se trouvent intacts (inchangés) à la fin de la réaction.

Biologiquement, ils sont produits par la cellule : les enzymes sont des protéines (exception : les ribozymes sont des ARN doués d'activité catalytique), leur synthèse est déterminée génétiquement.

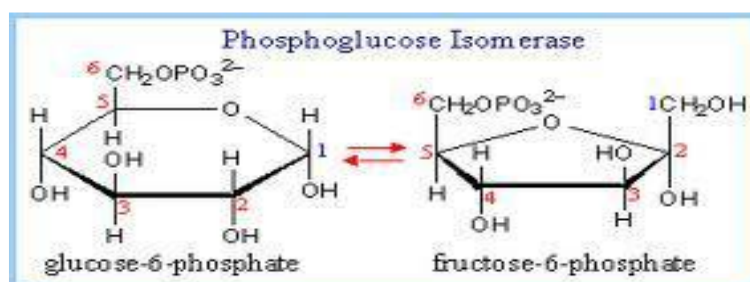
Un enzyme donné est *spécifique* : ils transforment un substrat donné (spécificité de substrat) grâce à une réaction donnée (spécificité d'action).

Les enzymes sont *régulables*; ils modifient leur activité catalytique en réponse aux besoins cellulaires.

Rôle : Ils interviennent dans diverses réactions de dégradation, ou de synthèse

Exemple :

Isomérases : Transforment une molécule en son isomère



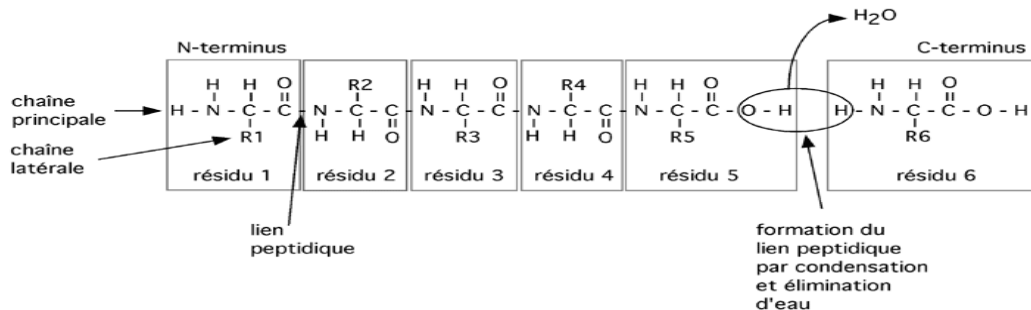
III-Structure des enzymes

Comme toutes les protéines les enzymes sont constituées de structures primaire, secondaire, tertiaire ou parfois quaternaire.

1- Structure primaire

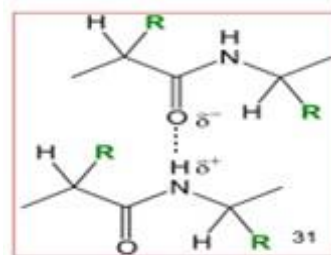
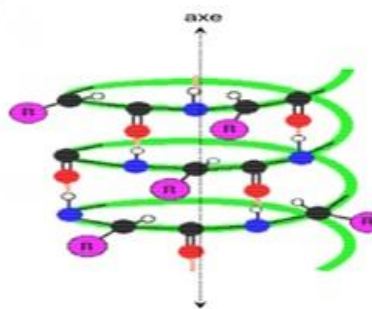
Chaque acide aminé est lié au suivant par un lien peptidique, qui se forme quand le groupement carboxylique d'un premier acide aminé réagit avec le groupement aminé d'un second, avec élimination d'eau. Quand les acides aminés sont incorporés dans une chaîne (qu'on appelle chaîne polypeptidique), on les appelle des résidus. La chaîne polypeptidique

n'est pas branchée; elle forme un unique filament étiré. Par convention, on désigne le premier acide aminé de la chaîne comme étant celui dont le groupement aminé reste libre; on dit qu'il est en 5' ou encore qu'il constitue l'extrémité N-terminale ou le N-terminus. On désigne comme étant le dernier résidu de la chaîne celui dont le groupement carboxylique reste libre; on le dit en 3', ou à l'extrémité C-terminale



2- Structure secondaire

- ❖ La structure secondaire d'une protéine se réfère aux régions d'une protéine dans lesquelles les chaînes peptidiques sont organisées dans des structures régulières, tels que les hélices α et les feuilles plissées β .
- ❖ Ces structures régulières sont déterminées par la conformation du squelette peptidique; l'influence des groupements latéraux des acides aminés n'est pas tenue en compte.
- ❖ Les hélices α et les feuilles plissées β résultent de la formation des ponts hydrogènes entre les groupements C=O et N-H du squelette peptidique

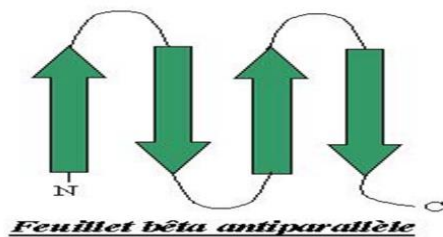
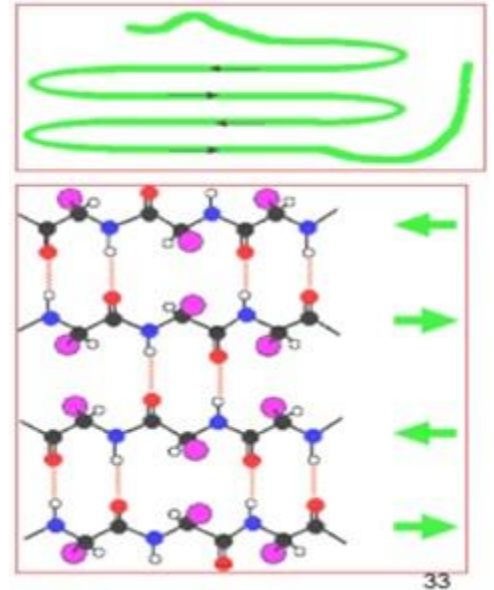


Hélice α

- ❖ cette forme hélicoïdale résulte de la formation de ponts hydrogènes entre les groupes C=O du $n^{\text{ème}}$ et les groupements N-H du $(n+4)^{\text{ème}}$ résidu.
- ❖ Chaque tour complet de la spirale est constitué d'environ 3,6 résidus d'acides aminés pour assurer l'alignement des groupements C=O (pointant vers le bas) et N-H (pointant vers le haut).
- ❖ Les groupements latéraux « R » sont orientés vers l'extérieur perpendiculairement à l'axe de la spirale.

Feuilles pliées β

- ❖ dans une feuille pliée β deux chaînes peptidiques sont pliées et alignées l'une à côté de l'autre. Le repliement β des chaînes peptidiques est favorisé dans le cas d'acides aminés portant des petits groupements latéraux « R » non chargés
- ❖ les chaînes peptidiques sont maintenues par des ponts hydrogène.
- ❖ Les groupements latéraux « R » sont orientés vers l'extérieur, pointant vers le haut et le bas de chaque feuille
- ❖ Les chaînes adjacentes peuvent être alignées, soient dans la même direction (plis parallèle β) ou dans la direction opposée (plis anti-parallèle β).



3- Structure tertiaire

- ❖ la structure tertiaire d'une protéine décrit la configuration tridimensionnelle (3-D) d'une chaîne polypeptidique.
- ❖ Elle inclut la relation entre les différents domaines (hélice α et feuilles pliées β) formés par la structure secondaire de la protéine et les interactions des groupements latéraux « R ».
- ❖ la structure 3-D est thermo-dynamiquement stable dans un domaine restreint de température, pH et force ionique. Au-delà de ce domaine une protéine peut se déplier et perdre son activité biologique (dénaturation).

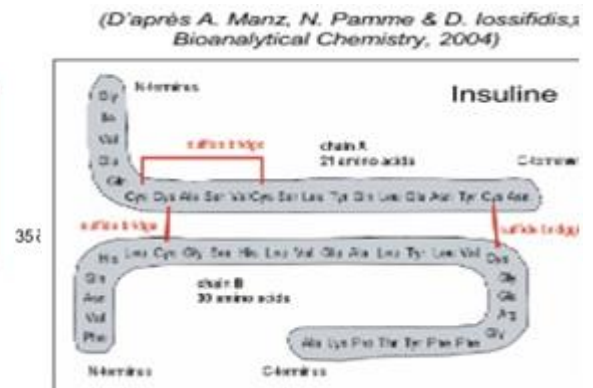
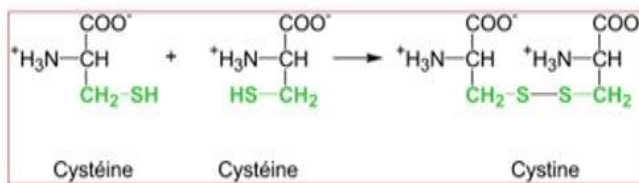


Structure 3-D de la ribonucléase H (Escherichia coli) (D'après A. Manz, N. Pamme & D. Iossifidis, Bioanalytical Chemistry 2004)

Dans une structure tertiaire, des régions hélicoïdales ou plissées de la chaîne polypeptidique se replient les unes sur les autres et forment une molécule en forme de boule, ou molécule globulaire. La structure tertiaire est maintenue par des liaisons (covalentes, hydrogène ...) entre des acides aminés souvent très éloignés sur la chaîne primaire.

4- Structure quaternaire

- ❖ une protéine peut être constituée de deux ou plusieurs chaînes polypeptidiques différentes liées ensemble.
- ❖ La structure quaternaire décrit comment les différentes chaînes et autres constituants sans lier et interagissant ensemble via des ponts hydrogène, attraction électrostatique et liens disulfure.



IV-Propriétés générales des enzymes

1- Propriétés d'un catalyseur chimique

- Un catalyseur augmente la vitesse d'une réaction, mais la présence de catalyseur ne provoque pas de réaction de réaction, ou rend possible une réaction qui ne l'est pas sur le plan thermodynamique ($\Delta G < 0$)

- Un catalyseur abaisse l'énergie d'activation

- Il se trouve intacte à la fin de la réaction

- Au cours des réactions chimiques réversibles, le catalyseur accélère de la même manière les 2 vitesses de réaction évoluant simultanément en sens inverse.

Il ne modifie pas l'équilibre final de la réaction

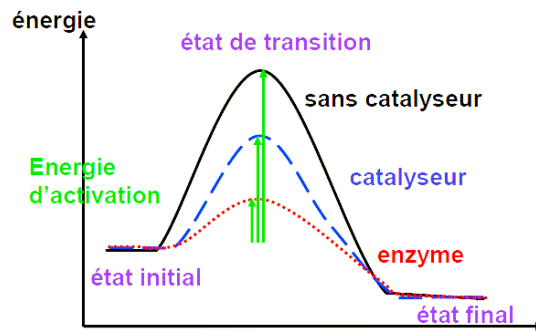
Les enzymes accélèrent les réactions en diminuant l'énergie libre d'activation (car plus elle est élevée et plus la réaction est lente):

Toutes ces caractéristiques sont applicables aux enzymes, mais les enzymes sont plus efficaces que les catalyseurs

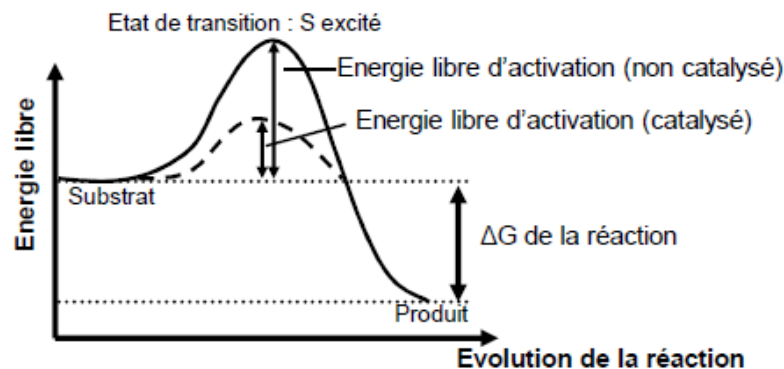
- Ils agissent à très faible dose

- Toutes les enzymes sont des protéines

- Ils abaissent l'énergie d'activation d'une manière plus importante qu'un catalyseur



- Les enzymes accélèrent les réactions en diminuant l'énergie libre d'activation (car plus elle est élevée et plus la réaction est lente):



2- Spécificité des enzymes

La spécificité et la caractéristique principale des enzymes elle exerce à la fois au niveau de la réaction chimique et au niveau des substrats.

- a- Spécificité de réaction** cette spécificité est assez étroite puisqu'elle recouvre un mécanisme de réaction ou est la plus évident :

Une déshydrogénase catalyse une réaction d'hydrogénation. C'est sur cette spécificité de réaction qui est fondée la nomenclature actuelle des enzymes.

- b- Spécificité de substrat** chaque enzyme possède un substrat préféré (privilège) porteur du groupe d'atomes sur lesquels a lieu la réaction. Cette spécificité peut être plus ou moins étroite, chaque enzyme accepte comme substrat de molécules voisines de substrat normal, pour chaque une cinétique particulière.

Exemple

- Trypsine : coupe des liaisons peptidiques au niveau des acides aminés basiques ;
 - Chymotrypsine : coupe des liaisons peptidiques au niveau des acides aminés aromatique (phénylalanine, tyrosine, tryptophane).
- c- Stéréospécificité** : la capacité de distinguer des stéréo-isomères est une propriété commune des enzymes et une caractéristique de la logique moléculaire des cellules vivantes. Si le site de la liaison sur une protéine est complémentaire pour un isomère

d'un composé chiral il ne sera pas complémentaire pour un autre isomère, pour la même raison qu'un gant d'une main gauche ne s'adapte pas à une main droite.

Exemple

L'acide aminé désaminé présente une spécificité vis-à-vis des acides aminés de la série L et n'agit pas sur les acides aminés de la série D

3- Régulation de leurs activités catalytiques

L'activité d'une enzyme est contrôlée par des modulateurs :

- Les activateurs augmentent l'activité.
- Les inhibiteurs la diminuent.

Ce qui permet d'ajuster la vitesse globale d'un métabolisme au besoin cellulaire

Exemple

La phosphofructokinase est activée par l'AMP et inhibée par l'ATP.

Cette modulation active ou inhibe la glycolyse selon que la charge énergétique est faible ou élevée.

V- Nomenclature et classification des enzymes

L'ancienne nomenclature consistait en une addition du suffixe « ase » au nom du substrat de l'enzyme. Ainsi l'uréase catalyse l'hydrolyse d'urée en NH_3 et en CO_2 .

Cependant cette nomenclature s'est vite trouvée dépassée par le nombre élevé d'enzymes et elle est devenue trop générale et trop imprécise.

Dans d'autres cas, l'usage a consacré des appellations tout à fait imprécises telles que la trypsine, la pepsine Pour ces raisons une nomenclature systématique a été proposée et adoptée:

L'enzyme est désignée par un numéro de code ou n° de classification, c'est la nomenclature en usage dans les revues spécialisées,

Les enzymes sont réparties en 6 classes numérotées de 1 à 6 selon le type de catalyse

- 1:** Les oxydoréductases, qui catalysent des transferts d'électrons;
- 2:** Les transférases, qui catalysent les transferts de groupements;
- 3:** Les hydrolases, qui catalysent des réactions d'hydrolyse;
- 4:** Les lyases, qui catalysent l'addition de groupes à des liens doubles ou l'inverse;
- 5:** Les isomérases, qui catalysent le transfert de groupes dans une même molécule pour produire des formes isomères (la conversion d'un acide amine L en acide amine D par exemple);
- 6:** Les ligases, qui forment des liens C-C, C-S, C-O et C-N lors de réactions de condensation couplées à l'utilisation d'ATP.

Ces 6 classes sont subdivisées en sous-classes selon la nature chimique du groupement donneur (substrat) et ces s/classes sont subdivisées elles-mêmes en s/s/classes selon la nature chimique de l'accepteur (substrat).

Chaque enzymes possède un numéro de code précédé des lettres E.C.= enzyme commission. Ce N° comporte 4 chiffres séparés

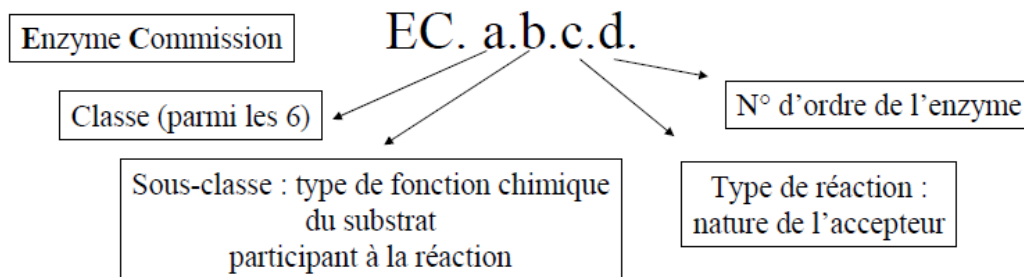
Le 1^{er} (a) chiffre indique la classe

Le 2eme chiffre (b) indique la s/classe

Le 3eme chiffre (c) indique la s/s/classe

Le 4eme chiffre (d) indique le n° d'ordre désignant l'enzyme dans la s/s/classe considérée

1- Numérotation conventionnelle



Exemple1:



n° de code de l'enzyme = **EC 2.7.3.2**

2 c'est la classe = transférase

7 c'est s/classe phosphotransférase

3 c'est s/s/ classe phosphotransférase utilisant 1 composé azoté comme accepteur

2 c'est créatine kinase ou créatine phosphotransférase

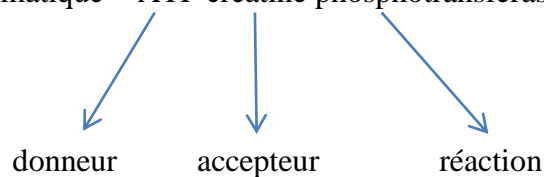
2eme type de nomenclature: nom systématique basé sur la réaction catalysée

Il indique clairement - la nature du donneur

- la nature de l'accepteur

- le type de réaction catalysée,

Exemple EC 2. 7. 3.2 : nom systématique = ATP créatine phosphotransférase



3eme type de nomenclature c'est le nom recommandé:

habituellement c'est un nom court et pratique, pour l'usage courant.

Exemple 1: EC 2.7.3.2 = créatine kinase.

Exemple 2 :



n° de code d'enzyme E.C.2.7.1.1.

classetransférase

s/classe transfert de phosphate

s/s/classe = fonction alcool accepteur du phosphate Hexokinase

nom systématique = ATP – D – Hexokinase 6- phosphotransférase

nom commun = hexokinase

Remarque

Les enzymes qui catalysent le transfert de groupement phosphate sont appelés : **Kinases**
Nom classique de l'enzyme : **Créatine kinase**

Phosphatases : les enzymes qui coupent le groupement phosphate

Phosphorylases : les enzymes qui hydrolysent les liaisons osidiques et assurent le transfert d'un groupement phosphate

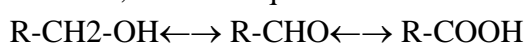
2 - Les différents types d'enzymes

2.1 - Les enzymes d'oxydoreduction et de fixation d'oxygène

Les réactions, qui échangent des électrons ou des hydrogènes, sont les plus fréquentes en biochimie, celles de fixation d'oxygène sont rares. Les enzymes qui catalysent ces réactions sont appelées des déshydrogénases. Lorsque les enzymes fixent préférentiellement des électrons ou des hydrogènes sur des substrats elles sont appelées des déshydrogénases ou des réductases. Voyons les principales enzymes d'Oxydoréduction.

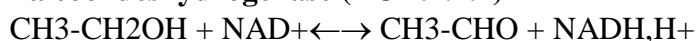
2.1.1 – DESHYDROGENATION DES FONCTIONS ALCOOL, CARBONYLES OU CARBOXYLES

Dans les réactions de dégradation le coenzyme ou cofacteur des déshydrogénases est le NAD^+ chargé de récupérer les électrons. Dans les réactions de biosynthèses les réactions de réductions sont les plus fréquentes. Les électrons sont alors apportés par le coenzyme NADPH, H^+ . La séquence est la suivante :

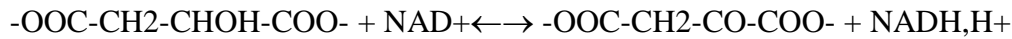


Quelques exemples

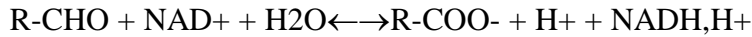
- alcool déshydrogénase (EC 1.1.1.1)



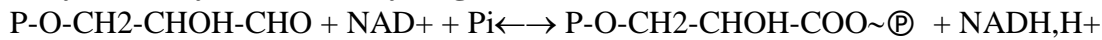
- Malate déshydrogénase (EC .1.1.37)



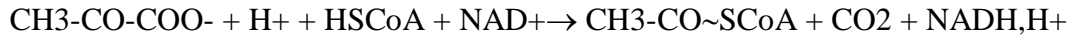
- Aldéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.3.)



- Glycéraldéhyde 3- P déshydrogénase (1.2.1.12)



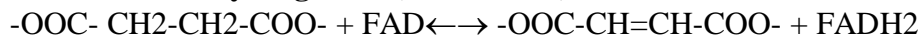
- Pyruvate déshydrogénase (EC 1.2.4.1)



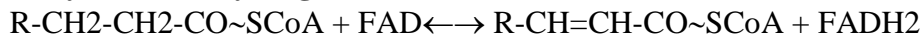
2.1.2 - DESHYDROGENASES FAISANT APPARAÎTRE DES DOUBLES LIAISONS

Le cofacteur accepteur des hydrogènes est le FAD. Il est lié à l'enzyme par une liaison covalente. On ne citera que :

- Succinate déshydrogénase (EC 1.3.99.1)

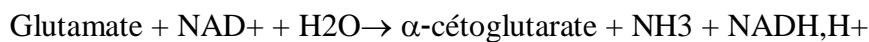


- Acyl-CoA déshydrogénase (EC 1.3.99.3)



2.1.3 - DESHYDROGENASES AGISSANT SUR LES FONCTIONS AZOTÉES

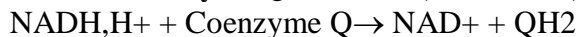
Elles utilisent comme cofacteur NAD^+ ou $NADP^+$. Nous citerons essentiellement la L-Glutamate déshydrogénase (EC 1.4.1.3) qui joue un rôle important dans le métabolisme des acides aminés



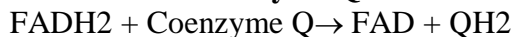
2.1.4 - ENZYMES PARTICIPANT AU TRANSFERT D'ELECTRONS DANS LA MITOCHONDRIE

Ce sont des complexes multi-enzymatiques regroupant plusieurs séquences de réactions. Ils interviennent dans la chaîne respiratoire :

- NADH-Coenzyme Q réductase (EC 1.6.99.3)



- Succinate - Coenzyme Q réductase (1.3.99.1)



- Coenzyme QH₂ - Cytochrome c réductase



- Cytochrome c oxydase (EC 1.9.3.1)

Elle est autooxydable au contact de l'oxygène moléculaire

2.1.5 - OXYGENASES

Elles n'utilisent pas l'oxygène pour dégrader une molécule mais fixent l'oxygène sur le substrat pour créer une fonction alcool par exemple. On parle de

- monooxygénases si un atome d'oxygène est fixé, l'autre atome forme de l'eau avec H_2 arraché à la molécule.

- de dioxygénases si 2 atomes d'oxygène sont fixés.

2.2 - LES TRANSFERASES

Ces enzymes transfèrent des radicaux ou des groupes d'atomes d'une molécule (substrat donneur) à une molécule (substrat accepteur). Leur nom complet comporte le donneur, l'accepteur, le radical transféré suivi de transférase. Les groupes transportés sont :

- le méthyle (-CH₃), l'hydroxyméthyle (-CH₂OH), Carboxyle (-COOH), groupement carboné comportant des fonction aldéhydes ou cétones (-CHO) ou (-CO-R), groupe acyle, groupe osidyle, amine, phosphoryle, etc...

2.2.1 - ENZYMES TRANSFERANT UN GROUPE METHYLE

Ce sont les méthyltransférases ou méthylases. Le donneur est souvent la S adénosylméthionine. On peut citer

- **Protéines -N-méthyl transférase (EC 2.1.1.23)** : elles méthylent les résidus basiques comme arginine et la lysine dans des protéines spécifiques.

- **ARNt-méthyl transférases (EC 2.1.1.29)** : elles méthylent les résidus cytosine du ARNt.

- **ADN-méthyltransférases (EC 2.1.1.37)**. La méthylation porte sur la cytosine du DNA.

2.2.2 - ENZYMES TRANSFERANT DES RADICAUX A PLUSIEURS CARBONES

On peut citer

- **la transcétolase (EC 2.1.1.1)**

- **la transaldolase (EC 2.1.1.2)**

Ces deux enzymes sont importantes dans la voie des pentoses phosphates. Elles échangent des radicaux carbonés entre oses.

- **Acyltransférases (transacylase)**

Ici ce sont des radicaux acylés (R-CO-) qui sont transportés. On les retrouve dans la synthèse des lipides :

- **glycérol 3-phosphate acyltransférase (EC 2.3.1.1)**

acyl-CoA + glycérol 3- → Acylglycérol 3-P + HSCoA

2.2.3 - ENZYMES TRANSFERANT DES MOLECULES GLUCIDIQUES

Les radicaux osidiques sont transférés sur des molécules appropriées. En voici quelques exemples :

- **Glycogène phosphorylase (EC 2.4.1.1)**

glycogène(n) + ATP → glycogène (n-1) + glucose 1-P + ADP

- **Glycogène synthase**

UDPglucose + glycogène (n) → glycogène (n+1) + UDP7

2.2.4 – AMINOTRANSFERASES

Elles transfèrent les groupements aminés. Le coenzyme est le pyridoxal phosphate

- **Aspartateaminotransférase (EC 2.6.1.1)**

Aspartate + α-cétoglutarate → oxaloacétate + glutamate

- **Alanine aminotransférase (EC 2.6.1.2)**

Alanine + α-cétoglutarate → pyruvate + glutamate .

2.2.5 - PHOSPHOTRANSFERASES

La fixation d'un groupe phosphate à une molécule sert à son activation et à sa reconnaissance comme substrat dans les réactions du métabolisme glucidique. On leur donne le nom de kinases ou de phosphorylases.

Sur les oses

- Hexokinase (EC 2.7.1.1)
- Glucokinase (EC 2.7.1.2)
- Phosphofructokinase ou fructose 6-Pkinase (EC 2.7.1.4)

Sur les lipides

- Glycérol kinase (EC 2.7.1.30)

Sur les molécules aminées

- Créatine kinase (EC 2.7.3.1)

ATP + créatine → Phosphocréatine + ADP

Sur les nucléosides et les nucléotides

- Adénosine kinase (EC 2.7.1.20)

ATP + Adénosine → ADP + AMP

- Adénylate kinase (EC 2.7.4.3)

ATP + AMP → 2 ADP

- les nucléosides monophosphates kinases

- les nucléosides diphosphates kinases qui interviennent dans la synthèse des acides nucléiques.

2.3 - LES HYDROLASES

Ce sont des enzymes de dégradation. Elles provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ce sont des enzymes sans coenzymes. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-O des peroxydes, C-N des amides. Il est très difficile de les classer. Le plus simple est d'étudier leur action sur quelques groupes de molécules.

2.3.1 - HYDROLASES DES GLUCIDES

On les appelle des osidases. Elles coupent les liaisons O-osidiques ou N-osidiques. Elles sont spécifiques de leurs substrats et de l'anomérisation des carbones acétaliques. Sur les osides on distingue les **α-glucosidases**, **β-glucosidases**, **β-galactosidases**. Sur les polysides, on a les **α-amylases**, **β-amylases**, elles hydrolysent toutes les deux les liaisons $\alpha(1,4)$ et l'**amyloglucosidase** qui hydrolyse à la fois les liaisons $\alpha(1,4)$ et $\alpha(1,6)$.

2.3.2 - HYDROLASES DES ESTERS PHOSPHORIQUES D'OSSES

On y rencontre les phosphatases qui enlèvent le groupement phosphorique. Leur rôle est inverse de celui des kinases :

- **Glucose 6-phosphatase**

Glucose 6-P + H₂O → Glucose + Pi

- **Glucose 1-phosphatase**

Glucose 1-P + H₂O → Glucose + Pi

- **Fructose 1,6 bisphosphatase**

Fructose-1,6-bis P + H₂O → Fructose 6-P + Pi

2.3.3 HYDROLASES DES LIPIDES

* Hydrolases des triglycérides

- **Triglycéride lipase**

Triglycéride + H₂O → 2 Acides gras + 2-monoacylglycérol

- **Diglycéride lipase**

Diglycéride + H₂O → 2 Acides gras + glycérol

* Phospholipases : ces enzymes hydrolysent les phospholipides. On distingue selon le site d'action de l'enzyme

- **Phospholipase A1 (3.1.1.32)** enlève l'acide gras lié à la fonction alcool primaire du glycérol

- **Phospholipase A2 (3.1.1.4)** enlève l'acide gras lié à la fonction alcool secondaire du glycérol

- **Phospholipase C (3.1.1.4)** intervient sur la fonction ester liant le glycérol et le phosphate

- **Phospholipase D (3.1.4.4.)** sépare l'acide phosphatidique de l'alcool.

2.3.4 - HYDROLASES DES PEPTIDES ET DES PROTEINES

Ces hydrolases interviennent sur la liaison peptide des peptides et des protéines. On distingue les peptidases et les protéinases selon que le produit de la réaction est un acide aminé ou un peptide.

Les peptidases

- **Amino-peptidases** libèrent séquentiellement les acides aminés N-terminaux.

- **Carboxypeptidases** libèrent séquentiellement les acides aminés C-terminaux.

- **Dipeptidases** hydrolysent les dipeptides.

- **Protéinases : hydrolases des protéines**

On les appelle des endoprotéinases car elles coupent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur de la protéine loin des acides aminés C et N terminaux. On peut les nommer suivant leur site d'action ou la structure des protéines elles-mêmes.

- Selon leur lieu d'action on distingue

• les **protéinases des sucs digestifs**

• les **protéinases du plasma sanguin**

• les **protéinases du tissu conjonctif**

• les **protéinases intracellulaires**

Selon la structure, leur nom dérive de l'acide aminé ou du métal situé au niveau de leur site catalytique . C'est ainsi que nous distinguons :

les sérine-protéinases

• la **trypsine du pancréas (3.2.21.4)**

• la **chymotrypsine (3. 4. 21. 1) du pancréas**

• la **thrombine (3.4.21.5) du plasma sanguin**

les thiol-protéinases

la **papaïne (3.4.22.2) protéine végétale**

les métalloprotéinases

la **collagénase (3.4.24;3)**

2.3.5 - HYDROLASES DES NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES ET ACIDES NUCLEIQUES

On distingue les
Nucléosidases

- **Les Nucléosidases (3.2.2.1)** Elles clivent les liaisons N-osidiques

N-ribosyl-purine + H₂O → purine + ribose

- **AMP-nucléosidase (3.2.2.4)**

AMP + H₂O → Adénine + ribose phosphate

Nucléotidases

- **5'-Nucléotidases (3.1.3.5)**

Ribonucléoside 5-phosphate → Ribonucléoside + H₃PO₄

Nucléases ou hydrolases des acides nucléiques

Elles clivent les liaisons phosphodiesterés des acides nucléiques. On distingue les

endonucléases qui coupent des liaisons à l'intérieur de la molécule et les **exonucléases** lorsqu'elles enlèvent les nucléosides 5'-phosphates les uns après les autres à partir de l'extrémité.

- **3'-Exonucléase ou Phosphodiesterase I (3.1.4.1)**, les mononucléotides 5'- phosphates sont enlevés les uns après les autres à partir de l'extrémité 3'.

- **Déoxyribonucléase I (3.1.4.5) (DNAse 1)**, c'est une endonucléase qui libère des Oligodéoxynucléotides

- **Ribonucléase I (3.1.4.2.2)**, endonucléase contenue dans le suc pancréatique. Elle fragmente aussi les ARN en oligonucléotides.

- **Les enzymes de restriction appartiennent aussi à cette classe.**

2.3.6 - HYDROLASES DES ESTERS OU ANHYDRIDES PHOSPHORIQUES

- **Phosphatase alcaline (3.1.3.1)** : elle n'est active qu'en milieu alcalin, peu spécifique des monoesters alcalins, active dans toutes les cellules.

- **Phosphatase acide (3.1.3.2)** : elle est active dans les cellules osseuses

- **ATPases ou adénosine triphosphatase (3.6.1.3)**

- **Nucléoside diphosphatase (3.6.1.1)**

ADP (ou GDP) + H₂O → AMP (ou GMP) + H₃PO₄

- **Pyrophosphatase (3.6.1)** transforme le pyrophosphate en 2 orthophosphate

2.4 - LES LYASES OU SYNTHASES

On y trouve les enzymes suivantes : décarboxylases, lyases proprement dites, synthases, hydratases, déshydratases, etc...

2.4.1 – DECARBOXYLASES

Le produit de réaction après le départ de CO₂ est un carbonyle ou une amine

- **Acétoacétate décarboxylase (4.1.1.4)**

Acétoacétate → Acétone + CO₂

- **Lysine décarboxylase (4.1.1.18)**

Lysine → cadavérine + CO₂

2.4.2 - ALDEHYDES-LYASES

Les enzymes font apparaître une liaison aldéhyde à la suite du clivage d'une liaison -C-C dont l'un des carbones porte une fonction alcool secondaire. C'est le cas de

- fructose 1-6 bisphosphatealdolase

fructose 1-6 bisP → 3-P dihydroxyacétone + 3-Pglycéraldéhyde

2.4.3 - ACYL-LYASES OU ACYLSYNTHESE

- 3-Hydroxy 3-méthyl glytaryl-CoA lyase (4.1.3.4)

3-Hydroxy 3-méthyl glytaryl-CoA Acétoacétate + Acétyl-CoA

- **Citrate synthase (4.1.3.7)** On l'appelle aussi enzyme condensante. C'est une enzyme importante du cycle de Krebs

Oxaloacétate + acétyl-CoA + H₂O → Citrate + HSCoA

2.4.4 - HYDRATASES ET DESHYDRATASES

Elles fixent ou enlèvent une molécule d'eau, à ne pas confondre avec une hydrolase
R-CHOH-CH₂-R' ↔ R-CH=CH-R' + H₂O

On trouve dans ce groupe :

- la fumarase ou fumarate hydratase (4.2.1.2)

-OOC-CH=CH-COO- + H₂O ↔ -OOC-CH₂-CHOH-COO-

- l'énolase (4.2.1.11)

2-phosphoglycérate ↔ Phosphoénolpyruvate + H₂O

2.5 - LES ISOMERASES

Elles catalysent des changements de structure dans une même molécule sans changer sa formule globale (isomérisation Cis-trans, épimérisation, déplacement de radicaux, etc.)

2.5.1 - EPIMERISATION

- **Ribulose 5P 3-épimérase (5.1.3.2)** enzyme de la voie des pentoses phosphate

D-ribulose 5-P ↔ D-xylulose 5-phosphate

- **UDP glucose 4-épimérase** ↔ **UDP galactose**

UDP glucose 4 ↔ UDP galactose

2.5.2 - OXYDOREDUCTION INTRAMOLECULAIRE

- **triose phosphate isomérase (5.3.1.1)**

- **Glucose 6-phosphate isomérase (5.3.1.10)**

2.5.3 - TRANSPORT DE RADICAUX

- **Phosphoglycératemutase (5.4.2.1)**

- **Méthyl malonylCoAcarboxymutase (5.4.99.2)**

2.6 - LIGASES (SYNTHETASES)

Elles forment des liaisons C-C, C-N, C-S, C-O, O-P grâce à l'utilisation de l'énergie fournie par l'hydrolyse concomitante d'un groupement phosphate ou pyrophosphate de l'ATP

2.6.1 - LIGASES FORMANT LES LIAISONS C-O

On connaît les ligases des synthèses protéiques et des acides nucléiques.

2.6.2 - LIGASE FORMANT DES LIAISONS C-C

- Pyruvate carboxylase (6.4.1.1)

Pyruvate + CO₂ + ATP → Oxaloacétate + ADP + Pi

- AcétylCoA carboxylase

- PropionylCoA carboxylase (6.4.1.3)

2.6.3 - LIGASES DES LIAISONS C-S

- AcétylCoA synthétase (6.2.1.1) n'existe pas chez les vertébrés

ATP + Acétate + HSCoA → AcétylCoA + AMP + P-P

- AcylCoA synthétase (6.2.1.2) agit sur les acides gras à longue chaîne de carbone.

R-COO⁻ + H⁺ + ATP + HSCoA → R-CO-SCoA + AMP + P_Pi

2.6.4 - LIGASES DES LIAISONS C-N

- Glutamine synthétase (6.3.1.2)

ATP + glutamate + NH₃ → ADP + H₃PO₄ + Glutamine

- 5-phosphoribosylamine synthétase (6.3.4.7)

ATP + ribose 5-phosphate + NH₃ → 5-phosphoribosylamine + ADP + H₃PO₄

VI- Site actif des enzymes

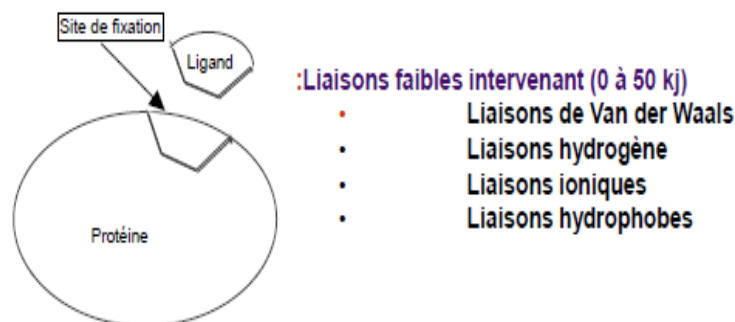
Comme pour toute protéine, un mécanisme enzymatique commence par la fixation d'un substrat (ligand) par des liaisons faibles sur une zone particulière de l'enzyme, dite site de fixation.

- La fixation du ligand s'effectue par des interactions faibles entre les fonctions portées par celui-ci et des restes d'acides aminés ou des cofacteurs.

Le substrat est immobilisé dans son site de fixation : il y a donc un minimum de 3 groupes

- Cette fixation implique que le site de fixation aie, en creux, une forme voisine de celle du substrat.

Lorsque celui-ci se fixe, l'ajustement induit lui permet d'acquérir exactement sa forme.



- A ce site, le substrat est transformé en produit, puis celui-ci est libéré.

Le site de fixation du substrat est dit site actif.

L'interaction entre E et S ne concerne que quelques acides aminés : c'est le site actif de l'enzyme.

Il y a complémentarité spatiale (forme 3D) et physique (formation de liaisons faibles entre des groupements voisins) entre le site actif et le substrat, assurant ainsi la spécificité de l'interaction ES.

Le site actif se divise en 2 groupes d'acides aminés :

- un groupe de reconnaissance spatiale et d'établissement de liaison
- un groupe de transformation chimique du substrat : site catalytique

1- Définition :

Le site actif est une zone privilégiée, qui a la forme d'une cavité, situé dans la zone hydrophobe de la protéine, au niveau de laquelle s'exerce électivement le pouvoir catalytique de l'enzyme.

Il est subdivisé en 2 parties :

a- Site de liaison, fixation, et reconnaissance :

Reconnait la complémentarité de forme avec un substrat spécifique de l'enzyme

b- Site catalytique :

Permet la réaction transformant le substrat en produit.

Le site actif comprend 3 types d'acides aminés :

1. Acides aminés de "contact" : ils sont les composants du site actif, ils sont situés trop près du substrat. Ils assurent la catalyse.

2. Acides aminés "auxiliaires" : ils assurent la mobilité des zones situées au voisinage du site actif. Ils assurent également une certaine flexibilité à la chaîne moléculaire.

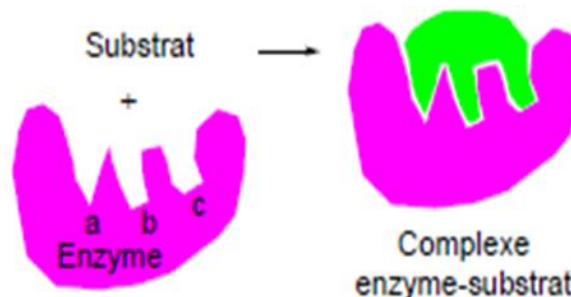
3. Acides aminés "collaborateurs" : ils servent de support pour les acides aminés fonctionnels. Si on les enlève, l'activité enzymatique demeurera mais elle devient fragile.

VII- Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat

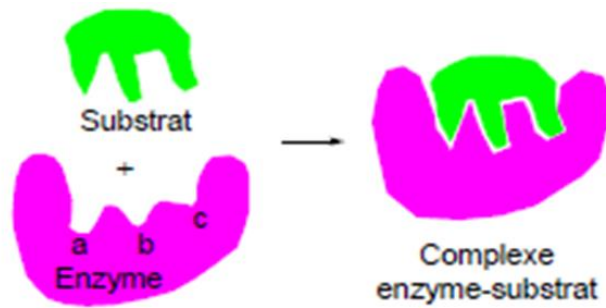
La réaction enzymatique fait appel à la fixation du substrat au niveau du site actif.

Le site actif doit être dans une conformation spatiale telle que le substrat puisse s'y fixer, il existe différents modèles

Modèle clé-serrure de Fischer (1890) : structure rigide de l'enzyme qui s'adapte rigoureusement au substrat. Ce modèle a évolué et n'est plus d'actualité.



Modèle actuel de Koshland (1957) : modification conformationnelle de E lors de l'association à S, permettant une orientation optimale des groupes catalytiques : on parle d'adaptation induite (ajustement induit).

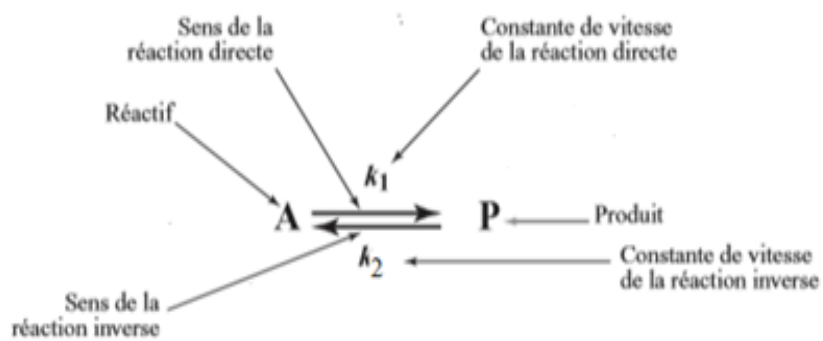


VIII- La Cinétique enzymatique à un substrat

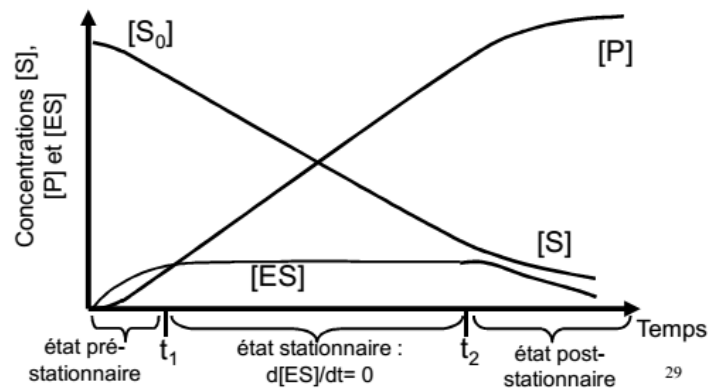
1- Définition de la cinétique enzymatique :

C'est l'étude des vitesses de la réaction enzymatique et de leurs modifications en réponse aux changements des conditions expérimentales.

Les intervenants d'une réaction :



2- Différentes phases de la réaction enzymatique



Il y a trois phases :

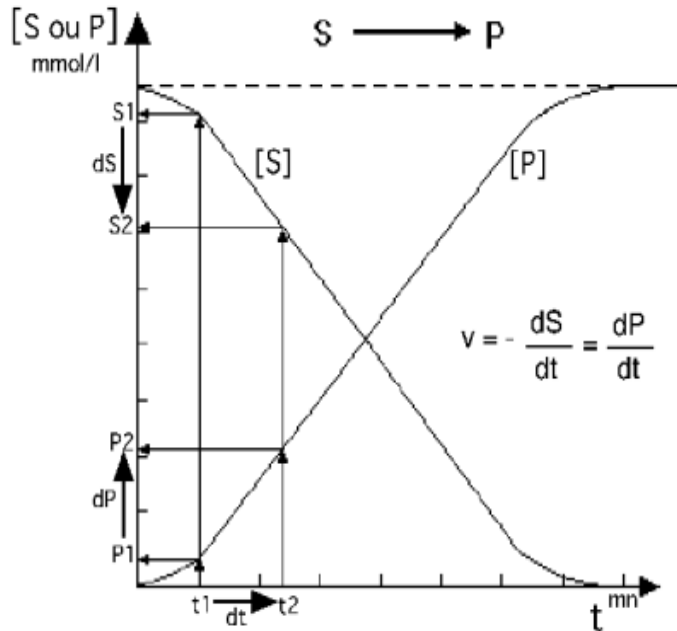
- $0 \rightarrow T_1$: phase pré-stationnaire, [ES] augmente, très rapide.
- $T_1 T_2 \rightarrow$ phase stationnaire, l'enzyme est saturée par son substrat, la réaction est dite d'ordre 0 (nul), [ES] est maximale, l'enzyme est saturée par son substrat.
- $T_2 \rightarrow \infty$: phase post-stationnaire, [S] diminue.

Différentes phases	Pré-stationnaire	Stationnaire	Post stationnaire
Caractéristiques	Enzyme mise en présence d'excès de substrat Combinaison ES très rapide [ES] augmente [S] très élevée [E] diminue [P] très faible	Enzyme saturée par le substrat Combinaison ES est à concentration maximale Constante Vitesse de la réaction est constante: Vitesse initiale (Reste constante tant que le substrat est à concentration saturante de l'enzyme) [ES] maximum et constante [S] diminue [E] faible [P] augmente	Diminution de S de manière significative au bout d'un temps plus au moins long selon l'enzyme [ES] diminue [S] très faible [E] augmente [P] très élevé

3- La vitesse de la réaction ou taux de catalyse

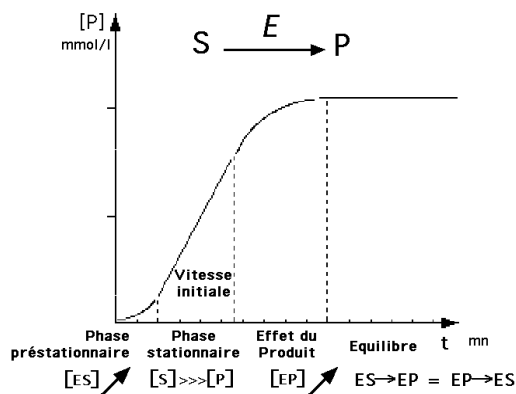
Elle est définie par la quantité de substrat transformé (dS) par unité de temps (dt) ou la quantité de produit apparu (dP) par unité de temps (dt).

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



4- Notion de vitesse initiale

La vitesse de la réaction enzymatique augmente avec la concentration de substrat jusqu'à atteindre la vitesse maximale V_{max} (saturation de l'enzyme par S)



VITESSE INITIALE :

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

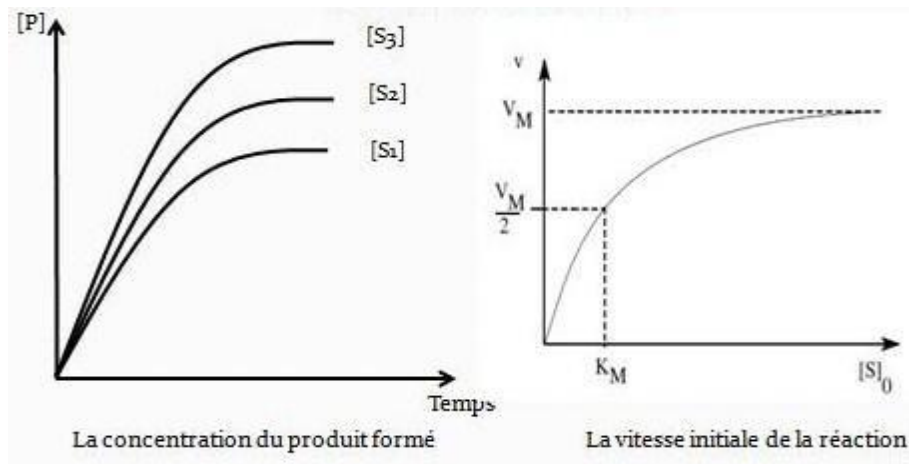
$$\frac{\text{Concentration du complexe Enzyme-Substrat}}{\text{Concentration totale de l' Enzyme}}$$

est maximum

- La vitesse initiale est la vitesse tout au début de la réaction ;
- La phase initiale (pré-stationnaire) est très brève => vitesse initiale est la vitesse à la phase stationnaire ou l'enzyme est saturée par son substrat.
- La vitesse étudiée est toujours la vitesse initiale.

5- Influence de de concentration du substrat sur la vitesse initiale

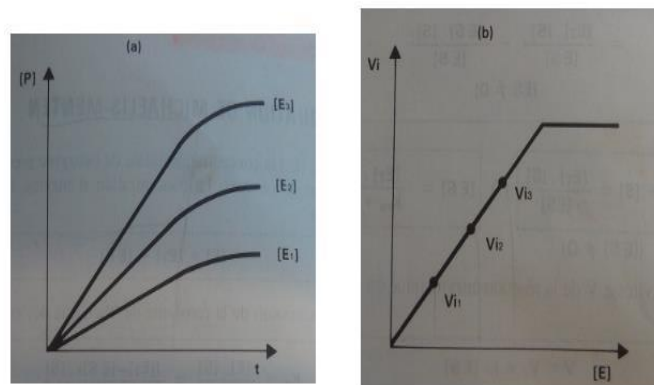
- La vitesse initiale augmente si on augmente la concentration de substrat :



Examinons à nouveau l'évolution de la réaction lorsqu'on change cette fois-ci la concentration du substrat.

- Les mesures de la concentration du produit en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations de substrat essayées. Lorsque la concentration du substrat est grande (par exemple S3) la vitesse initiale est plus grande que lorsque la concentration du substrat est petite (par exemple S1).
- On peut mesurer ces vitesses initiales en calculant la différence de concentration de produit au cours d'un temps donné, pour chaque concentration du substrat.

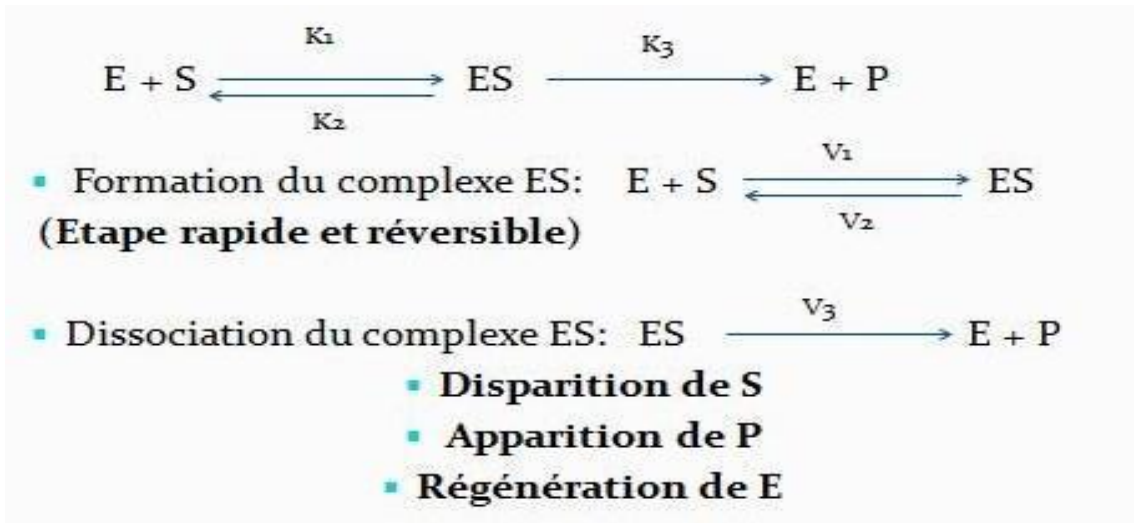
6- Influence de concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale



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

IX- LA CINETIQUE MICHAELIENNE

Soit la réaction enzymatique :



1- La constante de Michaelis :

D'après la loi d'action de masse:

$$V_1 = k_1 [E][S]$$

$$V_2 = k_2 [ES]$$

$$\text{Vitesse d'apparition des produits: } dP/dt = V_3 = k_3 [ES]$$

La vitesse de disparition des substrats est égale à la vitesse d'apparition du produit :

$$-dS/dt = dP/dt$$

La vitesse de disparition des substrats : $-dS/dt = V_1 - V_2$

$$V_1 - V_2 = V_3$$

$$k_1 [E] \cdot [S] - k_2 [ES] = k_3 [ES]$$

$$k_1 [E] \cdot [S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

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

$$K_1 \frac{[E]}{[ES]}$$

K_m: Constante de dissociation du complexe ES

Constante de Michaelis

Valeur de K_m est d'autant plus élevée que la:

- dissociation du complexe ES est forte

- Et donc que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est faible

2- L'équation de Michaelis :

[Et]: Concentration totale de l'enzyme présente dans le système

$$[E] = [Et] - [ES]$$

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([Et] - [ES])[S]}{[ES]}$$

$$K_m + [S] = \frac{[Et][S]}{[ES]} \quad \text{donc:} \quad [ES] = \frac{[Et][S]}{K_m + [S]}$$

V = vitesse de la réaction enzymatique = V₃ (la vitesse de disparition de complexe [ES])

$$\text{Donc: } V = V_3 = k_3 [ES]$$

$$V = k_3 \cdot \frac{[Et] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$K_m + [S]$

La vitesse de la réaction dépend de la:

- concentration en enzyme totale [Et]
- Concentration en substrat [S]
- De la constante de Michaelis K_m de l'enzyme

**La vitesse est maximale lorsque [ES] sera la plus grande possible (maximum):
Lorsque la totalité de l'enzyme sera combiné au substrat**

[Et] = [ES] $V_{max} = V_3 = k_3 \cdot [Et]$ donc:

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

Interprétation et intérêts :

quand $V = V_{max}/2$ $V_{max} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \Rightarrow 2(K_m + [S]) = 2[S] \Rightarrow K_m = [S]$

Donc : $K_m = [S]$ lorsque la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse max

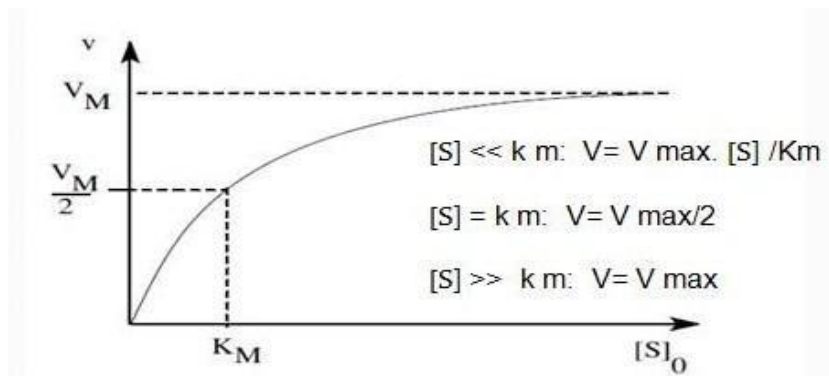
Signification de la vitesse maximale V_{max} et constante de Michaelis K_m

a- V_{max}

- Correspond à la vitesse initiale quand l'enzyme est saturée par son substrat
- Renseigne sur l'efficacité catalytique de l'enzyme $V_{max} = k_3 [Et] \Rightarrow V_{max} = k_{cat}[Et]$
- **k_{cat}** : Turn Over Number « **TNO** », nombre de molécules de substrat transformé en produit par unité de temps, c'est l'**efficacité catalytique** de l'enzyme : la fréquence de l'acte catalytique (s^{-1}).

b- K_m

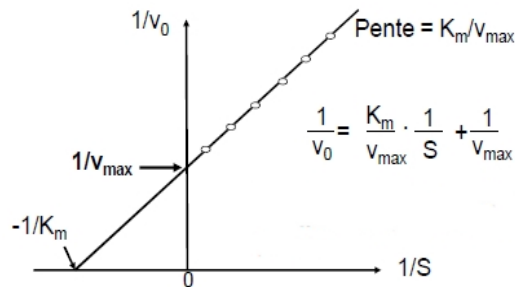
- **Affinité** de l'enzyme pour le substrat, K_m est d'autant plus élevée que l'affinité de l'enzyme pour le substrat est plus faible (inversement proportionnelle à l'affinité).
- Concentration initiale de substrat pour laquelle $V_i = 1/2 V_{max}$, donc la moitié des sites actifs de l'enzyme est occupée par le substrat.
- Quand $[S] \gg \gg K_m$
 $V_i = V_{max} = k_{cat}[Et]$
- Quand $[S] \ll \ll K_m$
 $V_i = (k_{cat} / K_m) [Et] [S]$



3- Détermination de la constante de Michaélis : méthode graphique de Lineweaver et Burk

C'est une représentation en double inverse, partant de l'écriture suivante de l'équation de Michaelis-Menten : $1/V_0 = k_m/[S] + 1/v_{max}$.

La représentation obtenue est une droite de la forme $ax+b$ (avec $a = k_m/v_{max}$, $b = 1/v_{max}$ et la variable x est $1/[S]$) :



Cette représentation permet une détermination plus précise de v_{max} et k_m

4- Mesure de l'activité enzymatique

Dosage par **spectrophotométrie** : absorbance (DO) à λ donnée

loi de **Beer-Lambert** : $Do = \epsilon \cdot l \cdot [P]$ → concentration de P

- **dosage direct** de S ou P

- **dosage indirect** : substrat ou produit d'une réaction **couplée**

En cinétique:

$$Do = \epsilon \cdot C \cdot l \quad C = Do / \epsilon \cdot l$$

$$\text{Activité enzymatique en UI/l} = \Delta Do / \Delta t \cdot 1 / \epsilon \cdot 1 / l \cdot Vt / Ve \cdot 10^6$$

Δt : temps de mesure en min

ϵ : coefficient d'absorption molaire (**mol⁻¹.l.cm⁻¹**)

l : trajet optique

Vt : volume du mélange réactionnel total ou se fait la mesure

Ve : volume du milieu contenant l'enzyme à doser

5 -Définition des unités enzymatiques

5-1- Unité internationale (unité enzymatique):

= quantité d'enzyme transformant 1 μ mole (10^{-6} M) de substrat par minute (μ mol/min) dans les conditions standard (température et pH)

5-2- Katal (kat) : unité SI (catalyseurs)

= quantité d'enzyme transformant 1 mole de substrat par seconde (mole/s)

5-3- Activité spécifique:

Activité spécifique (AS) utilisation pour le suivi de la purification d'une enzyme

= activité enzymatique par unité de masse de protéines totales (**UI/mg**) traduit le degré de pureté de l'enzyme

AS = activité enzymatique / masse totale de protéines

$$AS = \frac{\mu \text{ mol/min}}{\text{mg de protéine}} = \frac{UI}{\text{mg de protéine}}$$

mg de protéine

Mesure le degré de pureté d'une préparation enzymatique

5-4-Activité spécifique moléculaire:

Nombre de molécules de substrat transformées par min et par molécule d'enzyme

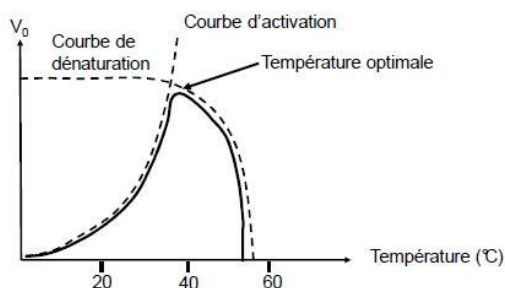
$$ASM = \frac{\mu \text{ mol/min}}{\mu \text{ mol de protéine}} = \frac{UI}{\mu \text{ mol de protéine}}$$

6- Influence des agents physiques et chimiques sur la cinétique:

6-1-Influence de la température

Les enzymes possèdent un pic d'activité à une température donnée : plus le milieu réactionnel est chaud, plus la réaction est facilitée, mais si trop de chaleur est apportée, l'enzyme est dénaturée.

La plupart des enzymes du milieu physiologique humain possèdent un pic à 37.5°C, mais certaines enzymes utilisées en PCR par exemple peuvent avoir un pic à 100°C.



L'activité enzymatique augmente jusqu'à une température optimale puis diminue pour atteindre une activité nulle à de grandes températures.

A la température optimale l'activité enzymatique est la plus importante.

Cette température optimale varie d'une enzyme à un autre.

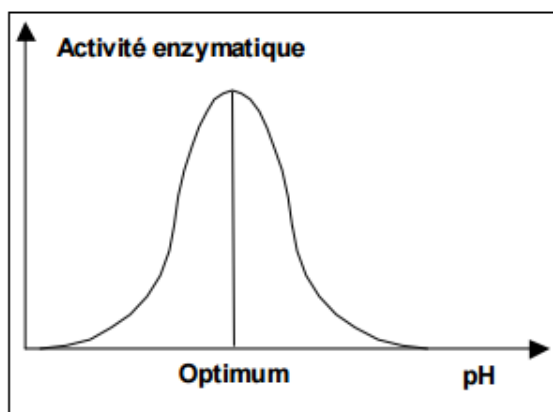
6-2-Influence du pH

Les enzymes sont des protéines constituées d'acides aminés pouvant porter des fonctions chimiques sensibles aux variations de pH. Ces fonctions chimiques peuvent se protonner ou se déprotonner selon le pH du milieu dans lequel se trouve l'enzyme.

La plupart des enzymes sont actifs dans une gamme de pH restreinte (les enzymes possèdent un pH optimal), typiquement entre pH 5 à 9. Le pH influence l'activité d'un enzyme à plusieurs niveaux :

- 1) par la liaison du substrat à l'enzyme
- 2) de l'activité catalytique
- 3) de l'ionisation de substrat
- 4) de la stabilité structurale

Pour la plupart des enzymes, le pH optimal est situé autour de 6-8 (neutre), mais certaines peuvent observer un pic en milieu très acide (pepsine, 1.5-2) ou basique (arginase, 9.5-10).



7- Les inhibiteurs enzymatiques

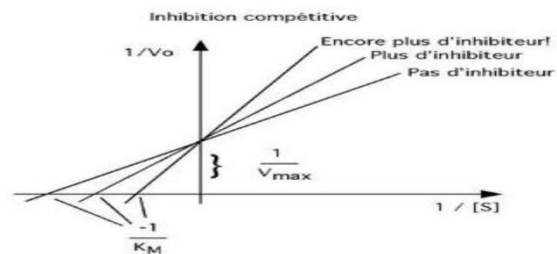
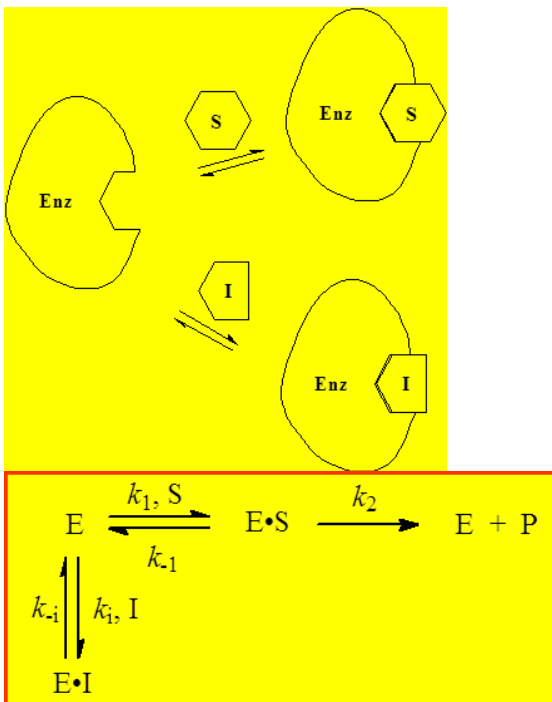
Inactivation d'une enzyme c'est le ralentissement de la réaction enzymatique par la liaison d'une petite molécule, cette inactivation est différente que la dénaturation

a- Les inhibiteurs réversibles

Dissociation rapide du complexe enzyme/inhibiteur
Trois types d'inhibiteurs

▪ Les inhibiteurs compétitifs

Dans le cas d'une inhibition compétitive, l'inhibiteur a une structure qui ressemble au substrat, il se combine à l'enzyme pour lequel leur affinité est parfois plus élevée que celle du substrat naturel et prend la place de celui-ci. Dans ce type d'inhibition on observe une fixation exclusive de S ou I sur le site actif.

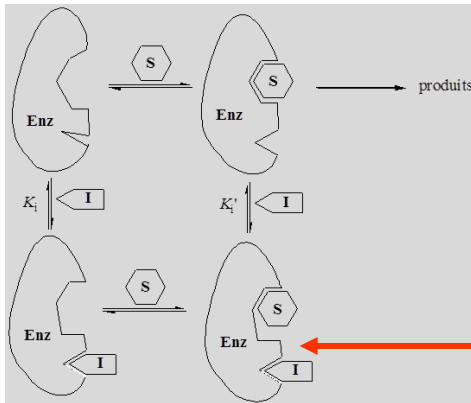


Vmax inchangée
- Km augmente
 → diminution de l'affinité apparente pour S

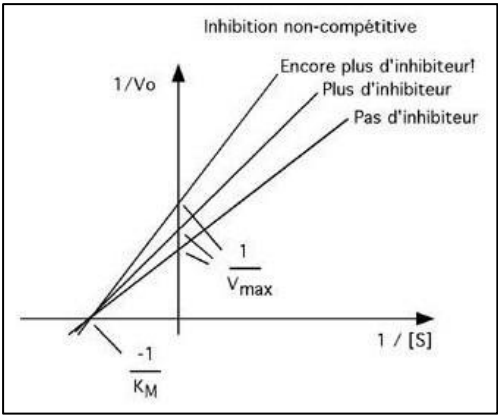
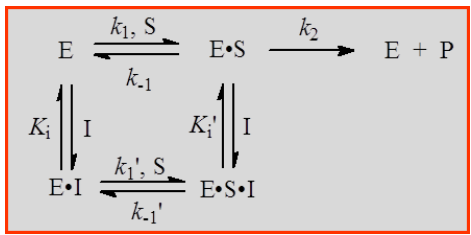
Levée de l'inhibition par excès de substrat : déplacement de l'équilibre entre EI et E

▪ **Les inhibiteurs non compétitifs**

L'inhibiteur se fixe sur l'enzyme libre et sur le complexe ES c-à-d que l'inhibiteur se fixe sur un site autre que le site actif



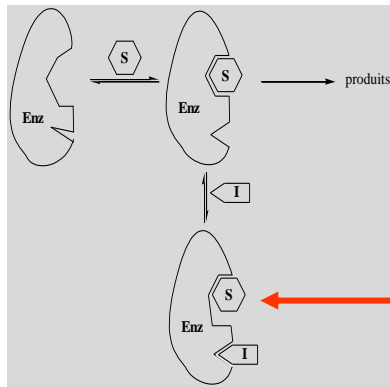
nemène pas aux produits



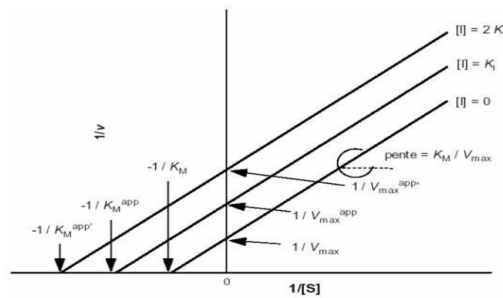
- L'affinité de l'enzyme n'est pas modifiée, Km inchangée.
- La Vmax diminue.

▪ **Les inhibiteurs in-compétitifs**

l'inhibiteur est lié uniquement par le complexe (E-S)



nemène pas aux produits



-Modification de K_m , et de V_{max}

V_{max} diminue

K_m diminue

→ augmentation de l'affinité apparente pour S

b- Les inhibiteurs irréversibles

Ils se lient de façon covalente à site important de l'enzyme entraînant une inhibition définitive,

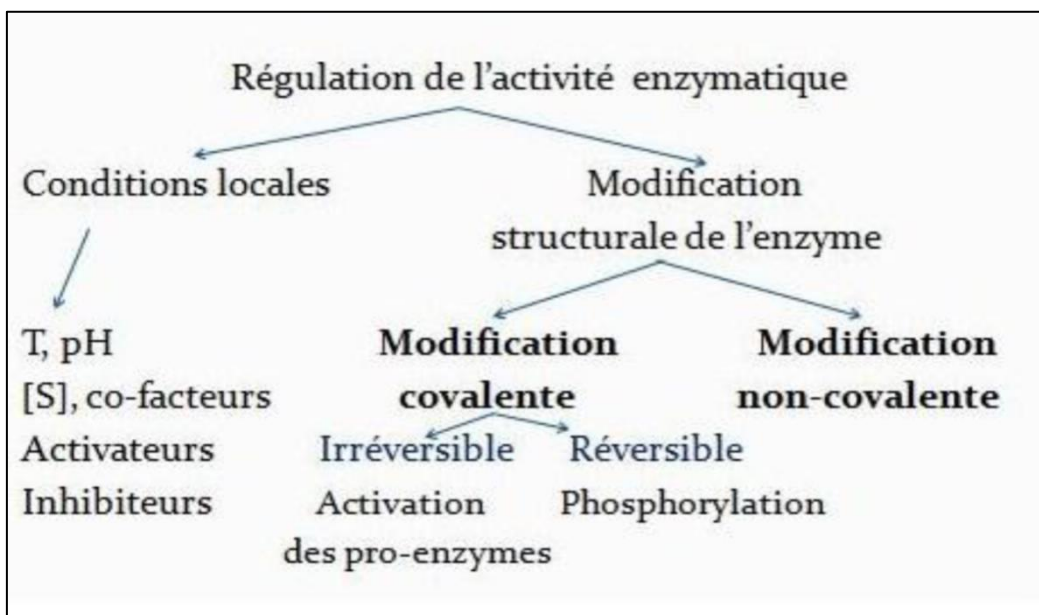
Exemple: 5Fluoro-uracile utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse

Inhibe la **thymidilatesynthase**; enzyme qui intervient dans la synthèse de la thymine (ADN)

Arrêt de la multiplication des cellules tumorales

X. Régulation de l'activité des enzymes

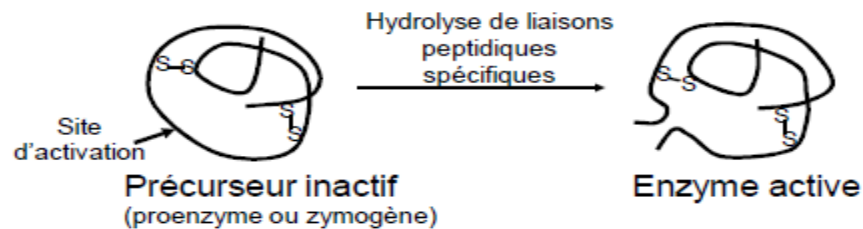
Il existe beaucoup d'enzymes et de voies métaboliques, d'où le besoin de réguler l'activité des enzymes pour coordonner les voies métaboliques et permettre une adaptation en temps réel. Il y a deux grandes possibilités de régulation : soit par contrôle de la disponibilité en enzyme, soit par contrôle de l'activité enzymatique.



1- Régulation par modifications covalentes

a- Régulation par protéolyse partielle

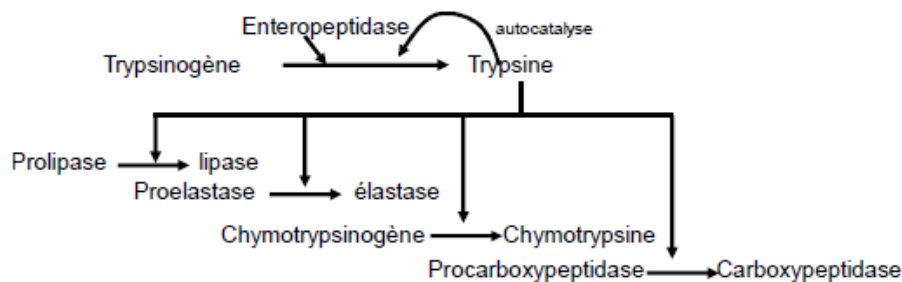
Certaines enzymes sont synthétisées sous la forme d'un précurseur inactif (aussi appelé proenzyme ou zymogène). Un clivage de certaines liaisons peptidiques engendre ensuite une enzyme active.



Ce processus est surtout présent chez les enzymes utilisées par intermittence (protéases digestives, facteurs de coagulation) qui doivent par exemple être activées dans un environnement particulier, parfois différent de leur site de production.

Exemple

Activation simultanée de zymogènes pancréatiques au niveau du duodénum (segment initial de l'intestin grêle) lors du processus de digestion.



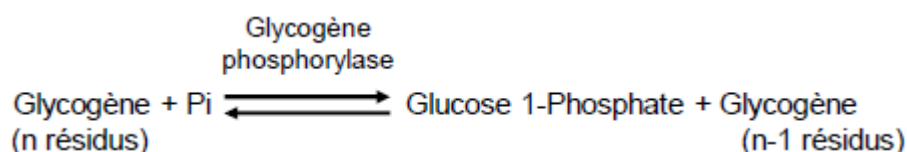
Le trypsinogène, sécrété dans le suc pancréatique, parvient dans le duodénum qui initie l'activation en cascade des zymogènes. Là, il est activé en trypsine par l'entérokinase intestinale et la réaction se continue par autoactivation de la trypsine elle-même. Elle catalyse aussi celle d'autres enzymes digestives.

b- Régulation par fixation de groupes fonctionnels

Certaines enzymes peuvent être régulées par phosphorylation (par une kinase) et déphosphorylation (par une phosphatase).

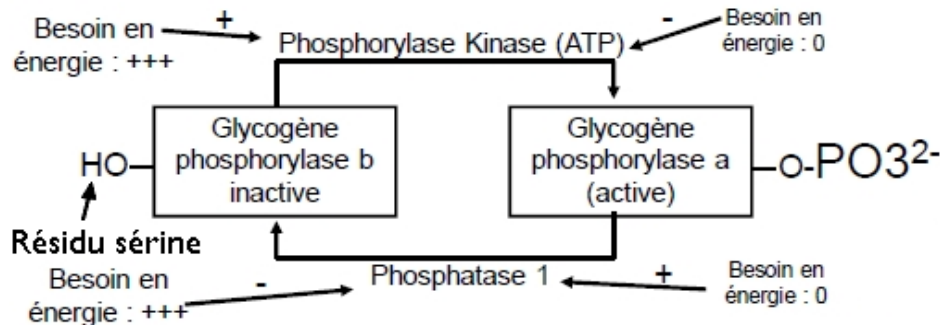
Exemple :

La glycogène phosphorylase est une enzyme catalysant le clivage phosphorolytique du glycogène en glucose 1-Phosphate :



La régulation de l'activité de la glycogène phosphorylase se fait en fonction des besoins en énergie :

- En cas de besoins importants, elle est activée par phosphorylation par une phosphorylase kinase.
- En cas de besoins faibles, elle est désactivée par déphosphorylation par une phosphatase 1.



2- REGULATION PAR ALLOSTERIE

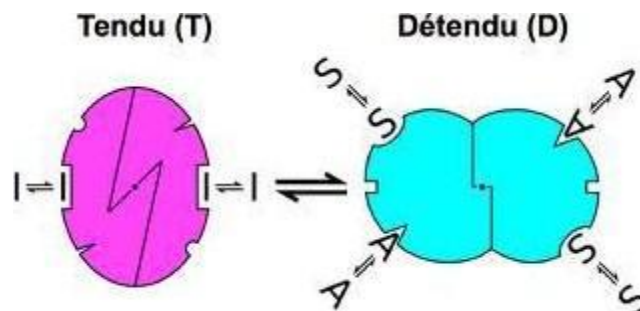
a- Enzymes allostériques

Les enzymes allostériques ont une structure quaternaire oligomérique.

Ces enzymes sont sous la dépendance d'effecteurs se fixant au niveau d'un site allostérique. Il y a en général un site actif et un site allostérique par protomère.

La protéine peut exister sous deux conformations distinctes :

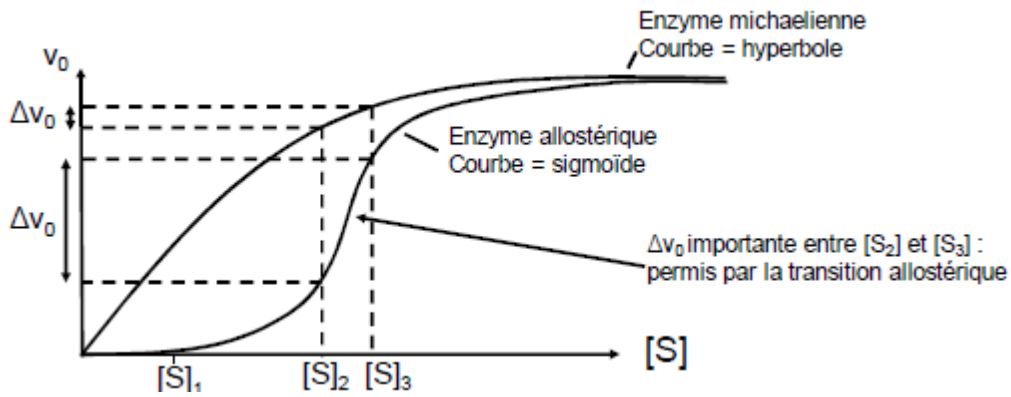
- La forme relâchée ou R a une affinité élevée pour l'activateur allostérique ainsi que pour le substrat (k_m faible).
- La forme tendue ou T a une affinité élevée pour l'inhibiteur allostérique mais une affinité faible pour le substrat (k_m élevé).



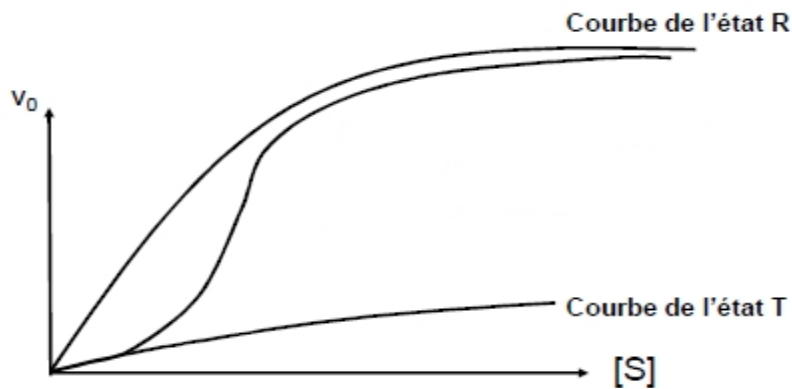
b- Vitesse initiale et allostérie

Les enzymes allostériques sont dites non Michaeliennes : elles n'obéissent pas à la loi de Michaelis-Menten. La représentation graphique de v_0 en fonction de la concentration en substrat est une sigmoïde.

La réactivité de l'enzyme est assurée par une hausse sensible de l'activité pour une faible variation de concentration en substrat.



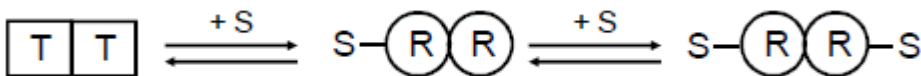
Les enzymes allostériques peuvent en fait être assimilées à un mélange de 2 enzymes michaeliennes : une à k_m élevé (état T) et l'autre à k_m faible (état R). L'augmentation de [S] fait déplacer l'équilibre de T vers R.



c- Phénomène de coopérativité

La fixation d'une molécule de substrat sur un protomère fait passer celui-ci de l'état T à l'état R : transition allostérique. Cette transition se répercute de proche en proche aux autres protomères selon 2 modèles :

- **Le modèle concerté (Monod)**



Le substrat se fixe sur un protomère, ce qui entraîne un changement de conformation de l'ensemble des protomères simultanément.

- **Le modèle séquentiel (Koshland)**

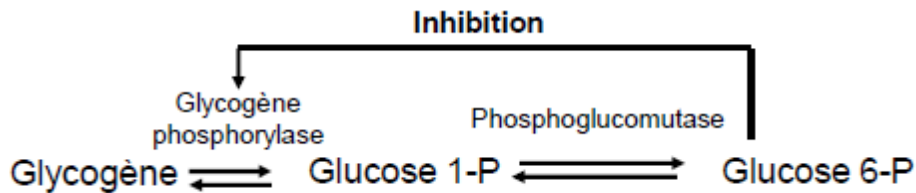


Le substrat se fixe sur un protomère, ce qui entraîne le changement de sa conformation et facilite le changement de conformation des autres protomères.

d- Régulation par rétrocontrôle négatif (ou rétroinhibition ou feedback négatif)

Pour les enzymes allostériques, l'inhibiteur est souvent un métabolite situé en aval de la voie métabolique.

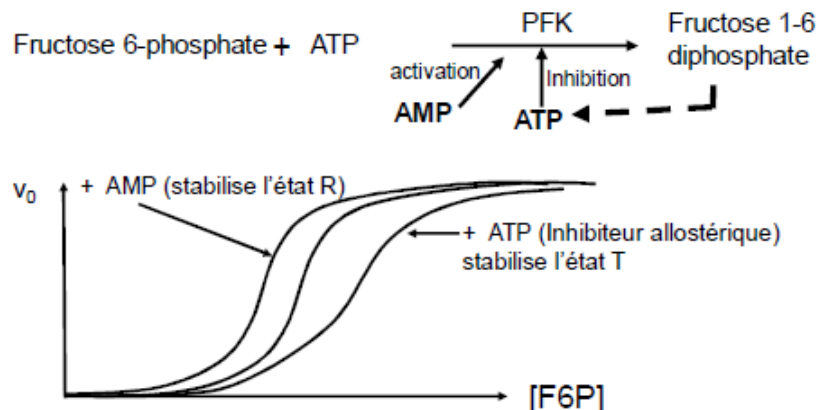
Exemple de la glycogène phosphorylase :



La rétroinhibition est un autre moyen de réguler le clivage du glycogène : quand on n'a plus besoin d'énergie, on ne consomme plus le glucose 6-P qui s'accumule et agit alors comme inhibiteur.

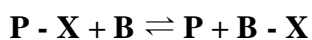
Exemple de la phosphofructokinase :

Elle est composée de 4 sous unités et de 4 sites actifs. C'est l'enzyme limitante de la voie de la glycolyse cytoplasmique. Elle est activée par l'AMP et inhibée par l'ATP (quand il n'est plus consommé, il s'accumule et agit comme inhibiteur).



XI- Réactions de deux substrats

Les réactions enzymatiques impliquant deux substrats et deux produits représentent à peu près 60% des réactions biochimiques connues.

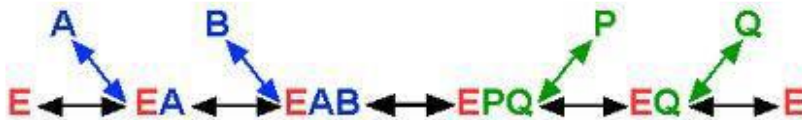


Presque toutes les réactions bisubstrats sont soit des réactions transférases où l'enzyme catalyse le transfert d'un groupement fonctionnel spécifique, X, d'un substrat à l'autre, soit des réactions oxydation - réduction où des équivalents réducteurs sont transférés entre deux substrats. Parmi toutes les réactions bisubstrats (bi bi) possibles seulement quelques sont observés.

Il y a deux classifications mécanistiques majeures.

a- Réactions séquentielles

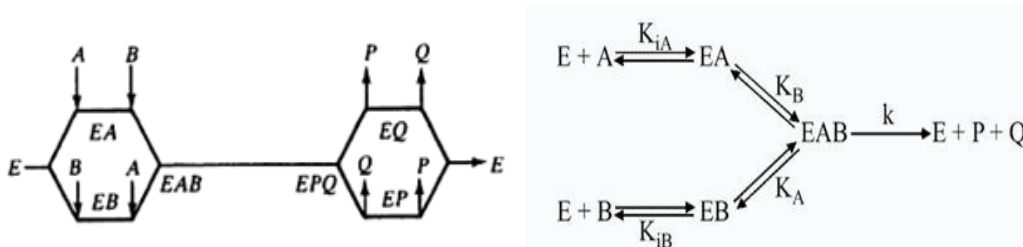
On parle de mécanisme séquentiel lorsque la réaction enzymatique n'intervient qu'après formation d'un complexe entre l'enzyme et les deux substrats. La fixation des substrats peut-elle même être ordonnée (l'un des substrats se fixant nécessairement en premier lieu) ou se produire au hasard (l'un ou l'autre des substrats se fixant en premier, sa présence pouvant soit ne pas modifier, soit défavoriser la fixation de l'autre) , on distingue 2 mécanismes: Bi-Bi aléatoire Bi-Bi ordonné



1- Mécanisme séquentiel au hasard (bibi aléatoire)

Deux substrats, A et B, se fixent de manière aléatoire sur l'enzyme libre E (c'est-à-dire qu'il n'y a pas de fixation privilégiée de l'un ou l'autre des deux substrats) avant qu'aucun produit ne soit libéré, avec une constante de dissociation K_A et K_B , respectivement.

Représentation de Cleland:

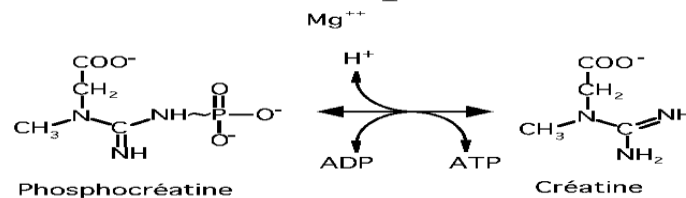


Exemple

84000
2 sous-unités
Isoenzymes

2.7.3.2

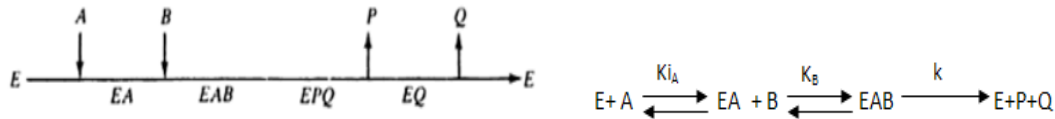
Créatine PhosphoKinase



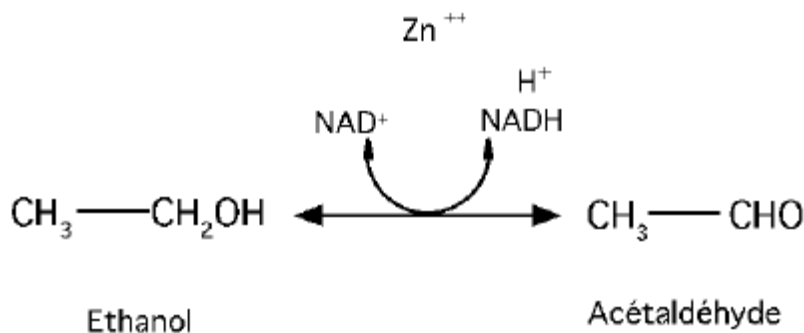
Creatinephosphokinase catalyse le transfert d'un radical phosphoryl du substrat:phospho-créatine, vers un co-enzyme transporteur ADP L'affinité de l'enzyme pour ces 2 substrats étant voisine

2- Mécanisme ordonné ou obligatoire (bibi ordonné)

Dans un tel système, l'ordre de fixation est obligatoire : le substrat A doit se fixer à l'enzyme libre E avant le substrat B. En d'autres termes, le substrat B ne peut se fixer qu'au complexe EA. **Représentation de Cleland**



Exemple l'alcool Déshydrogénase :



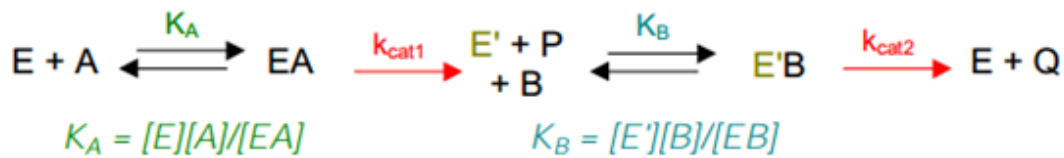
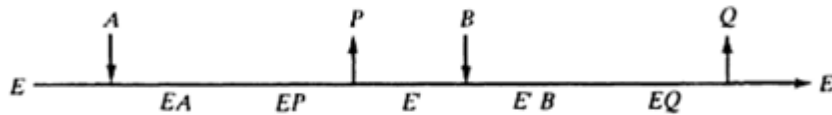
L'alcool déshydrogénase est une enzyme, catalyse l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde en réduisant simultanément un coenzyme NAD^+ en NADH . • Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour l'alcool si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD^+ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme- NAD^+ -Ethanol se transforme en un complexe Enzyme- NADH -Acétaldéhyde ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'acétaldéhyde puis le NAD réduit.

b- Réactions de type pingpong (à complexe binaire)

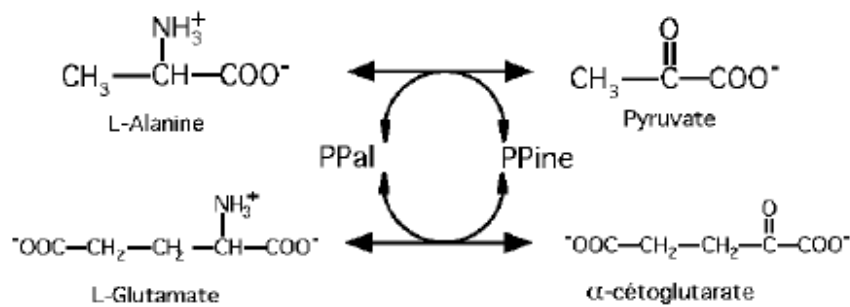
Où un ou plusieurs produits sont libérés avant que tous les substrats aient participé dans la réaction. Dans la réaction pingpong bi bi, le produit P est libéré après l'attachement de substrat A et l'enzyme devient accepteur du groupement X. La liaison de B à l'enzyme permet le transfert d'X au produit Q.

▪ Mécanisme enzyme substitué (pingpong)

- ces réactions connues sous le nom **déplacement double** impliquent une modification de l'enzyme et les deux substrats, A et B, ne se rencontrent pas sur la surface de l'enzyme.



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



L'ALAT catalyse le transfert de la fonction amine de l'alanine vers l'α-cétoglutarate qu'elle transforme en glutamate.

- Dans un premier temps, l'ALAT se lie à l'alanine puis transfère la fonction amine sur un coenzyme lié : le phosphate de pyridoxal qui devient phosphate de pyridoxamine sans cesser d'être lié à l'enzyme. L'enzyme se dissocie alors du pyruvate.

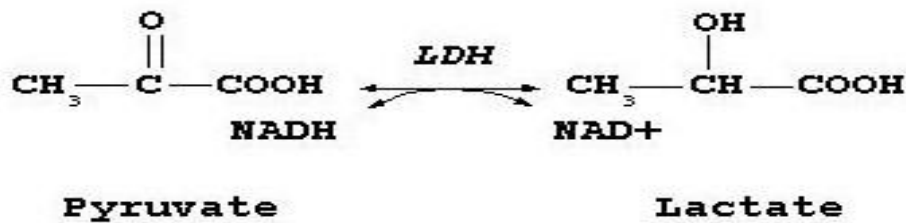
- Dans le second temps, l'enzyme liée au phosphate de pyridoxamine, forme un complexe avec l'α-cétoglutarate, puis transfère la fonction amine du coenzyme qui redevient phosphate de pyridoxal, vers le second substrat qui est transformé en glutamate. Enfin, le complexe ALAT glutamate se dissocie : l'enzyme et son coenzyme lié ont recouvré leurs structures initiales.

XII- Iso-enzymes

1- Définition

- Se sont des enzymes de **structures différentes**, qui catalysent la **même réaction** chimique :
- Elles sont **séparable** par électrophorèse ou chromatographie
 - Elles sont **spécifiques** des tissus chez les eucaryotes
 - Elles sont caractérisées par des **propriétés** différentes (affinité pour le substrat)
- permettent une régulation fine du métabolisme

Exemple de la LDH: Lactate déshydrogénase



- catalyse étape **cytosolique** du métabolisme du glucose en conditions anaérobies :
- **réduction** réversible du pyruvate en lactate
- couplée à l'**oxydation** d'un NADH, H⁺ en NAD⁺

Lactate déshydrogénase possède 4 chaînes polypeptidiques

- 2 types de chaînes : **H** dans le **coeur**, **M** dans le **muscle**
 - **5 formes** possibles selon le développement ou les organes
 - LDH1 (**H4**): Coeur
 - LDH2 (**H3M1**): érythrocytes
 - LDH3 (**H2M2**): Leucocytes, rate, et ganglions
 - LDH4 (**H1M3**): muscle utérin, poumon
 - LDH5 (**M4**): Foie
- 2- Rôle** : utilisation de certaines isoenzymes comme marqueurs de pathologies (état des tissus)

XIII- Applications des enzymes

1. le secteur de la santé

La variété des enzymes et leurs applications thérapeutiques potentielles sont considérables. Le tableau suivant présente une sélection des enzymes qui ont pris conscience de ce potentiel

Enzyme	Numéro CE	Réaction	Utilisation
Asparaginase	3.5.1.1	$\text{L-Asparagine} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{L-aspartate} + \text{NH}_3$	Leucémie
Collagénase	3.4.24.3	Hydrolyse du collagène	Ulcères de la peau
Glutaminase	3.5.1.2	$\text{L-Glutamine} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{L-glutamate} + \text{NH}_3$	Leucémie
Hyaluronidase ^a	3.2.1.35	Hydrolyse de l'hyaluronate	Attaque cardiaque
Lysozyme	3.2.1.17	Hydrolyse de la paroi cellulaire bactérienne	Antibiotique
Rhodanase ^b	2.8.1.1	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{CN}^- \longrightarrow \text{SO}_3^{2-} + \text{SCN}^-$	Empoisonnement au cyanure
Ribonucléase	3.1.26.4	Hydrolyse de l'ARN	Antiviral
β -lactamase	3.5.2.6	Pénicilline \longrightarrow pénicillo	Allergie à la pénicilline
Streptokinase ^c	3.4.22.10	Plasminogène \longrightarrow plasmine	Caillots sanguins
Trypsine	3.4.21.4	Hydrolyse des protéines	Inflammation
Uricase ^d	1.7.3.3	$\text{Urate} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{allantoïne}$	Goutte
Urokinase ^e	3.4.21.31	Plasminogène \longrightarrow plasmine	Caillots sanguins

2- Principaux domaines d'utilisation des enzymes dans l'industrie

- l'industrie des détergents (exemple d'application potentielle : des détergents qui contiendraient des enzymes fonctionnelles à 100°C)
- l'industrie de l'amidon
- l'agroalimentaire (alimentation humaine et animale)
- la chimie fine
- les domaines de l'analyse et des capteurs

XIV- Références

- ANTONIOTTI .S, cours de biocatalyse ,2007
- BECKER H ; Eléments de biochimie : Notions d'enzymologie ,h.becker@ibmc.u-strasbg.fr
- BENDAVID .C,2009, *Enzymes et coenzymes*
- CHIBRAOUI Layachi et KABBACH Wafae, *Enzymologie*, 2011-2012
- COLLAS .Ph : **Enzymologie théorique**
- CORNISH-BOWDEN .A , JAMIN.M et SAKS.V , cinétique enzymatique ,2005DELAHAYE .A, *Enzymologie*, <http://www.arnobio2.com>
- KEILLOR.J.W, *Inhibitions des réactions enzymatiques* ,2004
- PAPY –GARCIA.D et GARRIGUE ANTAR.L , *Cinétique enzymatique*
- RAISONNIER .A, 2002,*Enzymologie élémentaire*
- TOUSSAINT B., *Les enzymes*,2011
- WEINMAN .S et MEHUL.P , *Toute la biochimie*, ed. Dunod, Paris, 2004
- Casimir BLONSKIENZYMOLOGIEINHIBITIONS ENZYMATIQUESNotes de cours.
- Cours d'enzymologie Pr Miloud SLIMANI Département de Biologie Faculté des Sciences Université de Saida (Algérie)
- Dr KASSOUL. AENZYMOLOGIE
- Cours bioch1an16-cinetique_enzymatique_substrat
- Cours notions de base Enzymologie Licence Angers
- Catalyse biologique. Mécanisme d'action et modulation des activités enzymatique- Eléments de base de la biologie structurale. Polycopié Dr BaazizUNIVERSITE CADI AYYAD FACULTE DES SCIENCES-SEMLALIA MARRAKECH (MAROC).
- Cours Mesure de l'activité enzymatique DR AKSAS