

XI. Modulation de l'activité enzymatique

Dans une cellule, l'activité des enzymes peut être contrôlée par de nombreux processus :

- Leur concentration et le changement de la localisation subcellulaire, par exemple d'une membrane intra cellulaire vers la surface de la cellule, peut amener une enzyme à proximité de son substrat pour augmenter la vitesse de la réaction. L'effet opposé, par séquestration d'une enzyme à l'écart de son substrat, diminue la vitesse de la réaction,
- Un signal 'ionique' comme un changement de pH ou la libération d'ions Ca^{2+} stockés peut activer ou désactiver une enzyme en modifiant sa conformation,
- Un changement de la vitesse de synthèse ou de dégradation d'une enzyme peut modifier la quantité d'enzyme disponible pour catalyser une réaction,
- Leur environnement : concentration de substrat, cofacteurs, pH, température.
- **Facteurs chimiques influençant la réaction enzymatique :**

- **Modifications covalentes**

- **Réversibles** : des modifications covalentes d'une enzyme peuvent modifier son K_M ou son k_{cat} . Le plus souvent, un groupe phosphoryle ($-\text{PO}_3^{2-}$) ou acide gras (lipide) est ajouté sur l'enzyme pour modifier son activité catalytique. Les effets de ces modifications covalentes sont considérés comme réversibles, puisque les cellules contiennent des enzymes qui catalysent l'élimination de ces groupes modificateurs ou leur addition. La phosphorylation et la déphosphorylation peuvent modifier l'activité de certaines protéines de façon spectaculaire.
- **Irréversibles** : la modification covalente peut être irréversible comme dans le cas de la protéolyse ménagée. On appelle zymogène le précurseur inactif d'une enzyme activée par protéolyse. La plupart des protéases sont synthétisées sous forme de zymogènes. L'élimination post sécrétoire de certains acides aminés transforme les zymogènes inactifs en enzymes actives.

- **Effecteurs** (activateurs et inhibiteurs).

- **Facteurs physiques influençant la réaction enzymatique :**

- pH et force ionique
- Température

XI.1. Facteurs chimiques influençant la réaction enzymatique : Effecteurs enzymatiques Michaeliens

De nombreuses substances modifient l'activité d'une enzyme en s'y combinant. Les effecteurs sont des agents chimiques, minéraux ou organiques capables de modifier les vitesses

des réactions enzymatiques. Ils se comportent comme des inhibiteurs (ralentissent la vitesse de la réaction) ou comme des activateurs (augmentent la vitesse de la réaction).

XI.1.1. Activateurs

Les activateurs sont de nature très diverse. On en distingue :

- **Activateurs vrais** : c'est le cas de beaucoup d'ions métalliques.
- **Agents protecteurs** : c'est le cas de la cystéine qui protège les groupements thiols du site actif de nombreux enzymes.
- **Activateurs de proenzymes** : une **proenzyme** est une substance protéinique inactive, donnant naissance sous l'influence d'un agent activateur, ion hydrogène ou métallique, à une enzyme active.

XI.1.2. Inhibiteurs

Les inhibiteurs sont des composés dont la fixation sur l'enzyme entraîne leur inactivation partielle ou totale qui se traduit par la diminution ou l'annulation de la vitesse initiale. Il en existe deux catégories :

- Inhibiteurs irréversibles

Ce sont des inhibiteurs qui dénaturent irréversiblement l'enzyme. Il s'agit de tout réactif qui modifie de façon covalente la chaîne latérale d'un acide aminé d'une protéine. Exemple : Aspirine.

Les inhibiteurs suicide : constituent une classe spéciale d'inhibiteurs irréversibles. Ils sont inactifs jusqu'à ce qu'ils se lient au site actif de l'enzyme, ils effectuent alors les premières étapes de la réaction enzymatique comme dans le cas du substrat normal, mais au lieu d'être transformés en produit, ces inhibiteurs produisent une molécule très réactive qui se lie de manière irréversible à l'enzyme. Ils sont donc incapables d'effectuer une réaction complète et restent 'collés' dans le site actif.

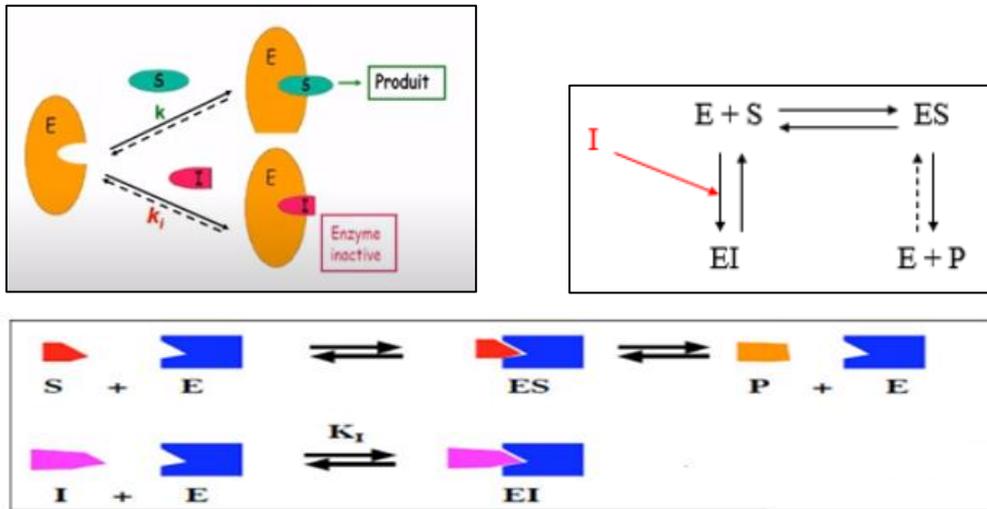
- Inhibiteurs réversibles

Il y a inhibition enzymatique réversible lorsqu'une substance se fixe de façon réversible (c'est-à-dire de façon non covalente) à une enzyme et que cela altère ses propriétés catalytiques. Les inhibiteurs réversibles ralentissent la vitesse de la réaction enzymatique. Ils modifient la cinétique enzymatique sans dénaturer l'enzyme. Il existe trois types d'inhibition réversible :

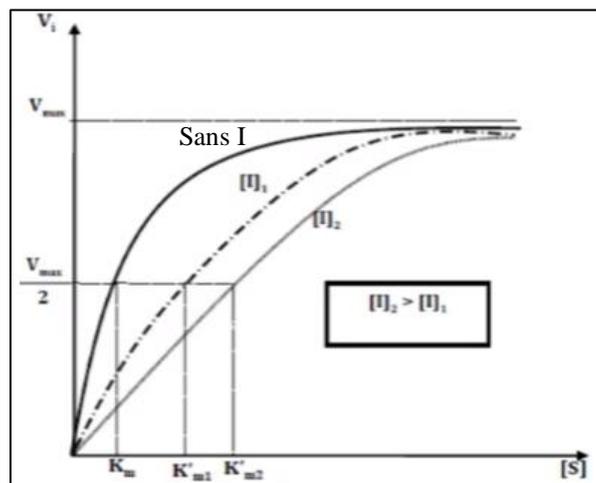
- Inhibition compétitive
- Inhibition non compétitive (pure ou mixte)
- Inhibition incompétitive.

a- Inhibition compétitive

L'inhibiteur est un analogue structural du substrat. Il y a compétition entre le substrat et l'inhibiteur sur le site actif de l'enzyme. Deux complexes peuvent être formés : ES et EI



La représentation de Michaëlis-Menten est la suivante :



L'inhibiteur empêche une partie du substrat d'atteindre le site actif, le K_M semble augmenter, l'affinité de l'enzyme pour le substrat diminue. Mais comme la fixation de l'inhibiteur est réversible, il se dissocie constamment de l'enzyme et s'y réassocie, cela permet à une molécule de substrat d'entrer parfois dans le site actif.

Les fortes concentrations de substrat peuvent vaincre l'effet de l'inhibiteur car lorsque $[S] \gg [I]$, l'enzyme a plus de chance de se lier à S qu'à I.

- **Constante d'inhibition et facteur d'inhibition**

K_I est la constante d'inhibition, c'est la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur (EI). Comme la K_M , c'est aussi une indication de l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

α est un facteur d'inhibition qui fait paraître le K_M plus grand. La valeur de α correspond au degré d'inhibition : $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$

• **Conséquences de l'inhibition compétitive :**

Plus la $[I]$ augmente :

- K_M augmente

$$K'_M = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

- L'affinité de l'enzyme pour le substrat diminue

$$1/K'_M < 1/K_M \longrightarrow K'_M > K_M$$

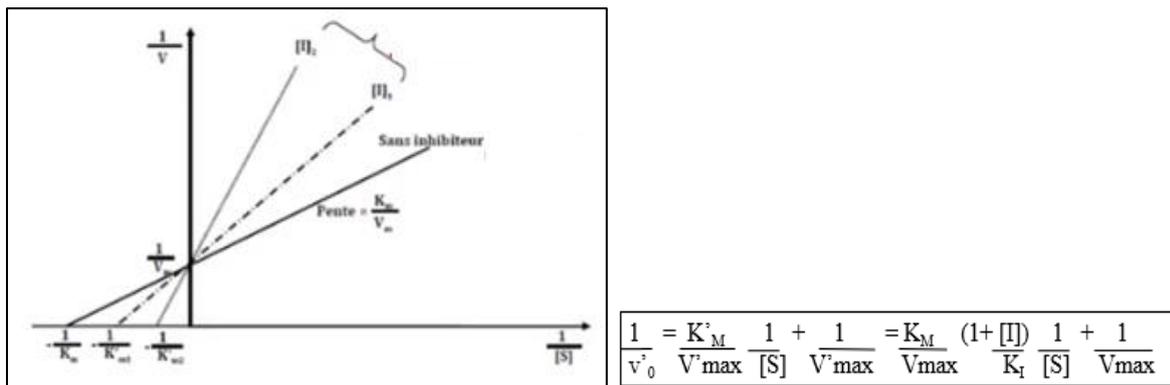
- L'affinité E-S diminue
- V_{max} reste inchangée

$$V'_{max} = V_{max}$$

- k_{cat} reste inchangée
- L'inhibition compétitive peut être levée par un excès de substrat : quand $[S]$ augmente, l'effet de l'inhibiteur disparaît.
- La vitesse se calcule comme suit :

$$v = V_{max} \frac{[S]}{K_M \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right] + [S]}$$

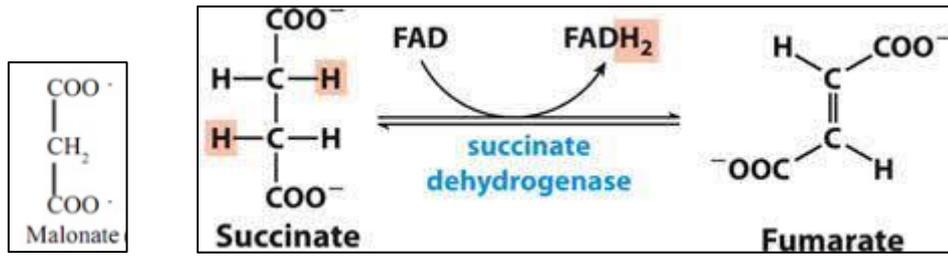
La représentation de Lineweaver-Burk sera comme suit :



$$\frac{1}{v} = \frac{K'_M}{V'_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V'_{max}} = \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Exemple d'un inhibiteur compétitif

Le malonate prend la place du succinate sur la succinate déshydrogénase lors de la réaction :

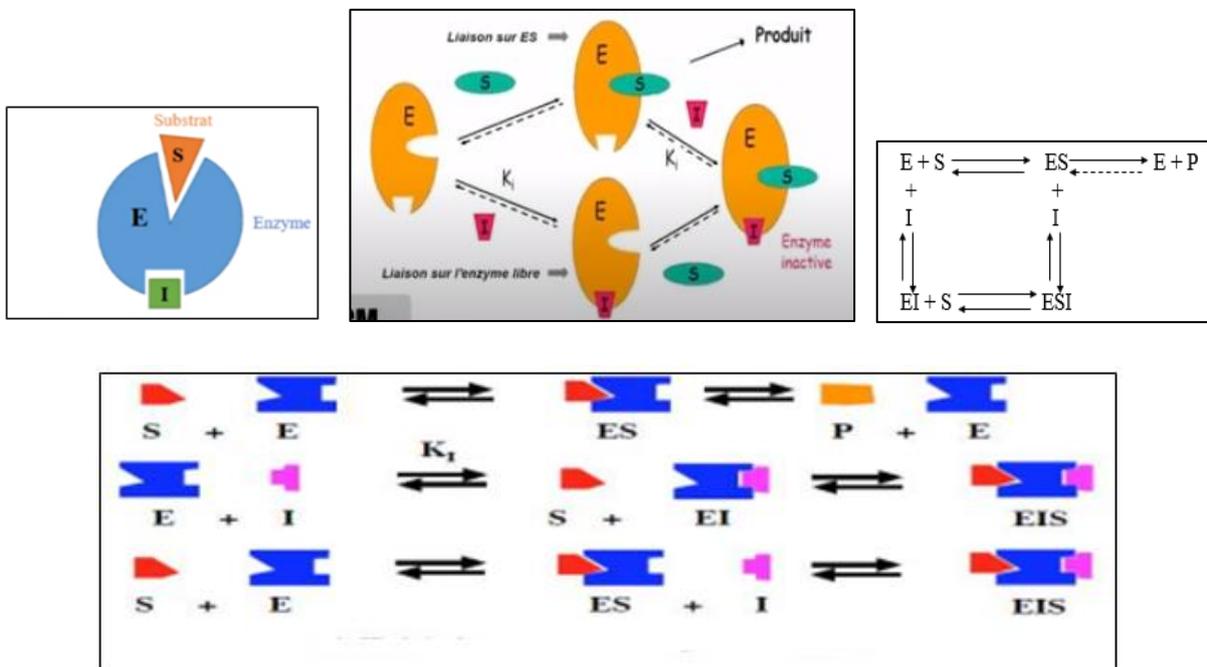


Le malonate est un analogue structural du succinate. C'est un inhibiteur compétitif qui affecte l'activité de la succinate déshydrogénase qui catalyse l'oxydation (déshydrogénation) du succinate pour produire le fumarate. Il inhibe la réaction, en se fixant dans le site actif de la succinate déshydrogénase, mais il ne peut pas être déshydrogéné.

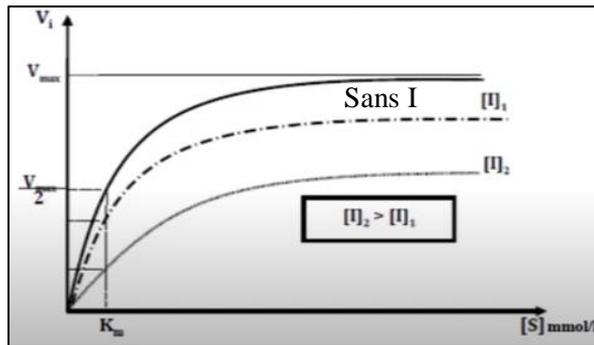
Remarque : L'inhibition par le produit a lieu quand le produit d'une réaction occupe le site actif d'une enzyme, empêchant ainsi la fixation de nouvelles molécules de substrat. C'est une des raisons pour lesquelles les mesures d'activité enzymatique sont faites en début de réaction, avant une accumulation significative de produit.

b- Inhibition non compétitive

Un inhibiteur non compétitif présente une structure totalement différente de celle du substrat, il y a absence de compétition entre le substrat et l'inhibiteur. L'affinité n'est pas affectée car le site de l'inhibiteur est différent du site du substrat. L'inhibiteur peut se fixer à la fois sur l'enzyme et sur le complexe ES.



La représentation de la courbe de Michaelis-Menten est la suivante :



• **Conséquences de l'inhibition non compétitive :**

- Plus la [I] augmente :
- V_{max} diminue

$$V'_{\max} < V_{\max} \quad \longrightarrow \quad \frac{1}{V'_{\max}} > \frac{1}{V_{\max}} \quad \longrightarrow \quad \frac{1}{V'_{\max}} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

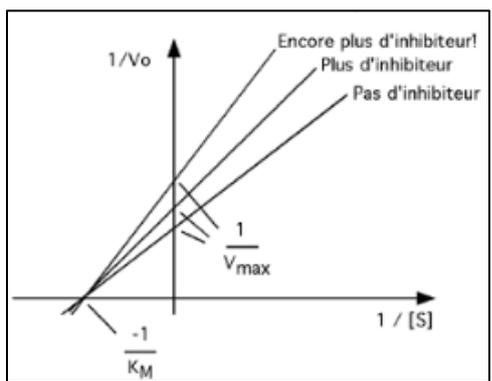
- K_M reste inchangée

$$K'_M = K_M$$

- L'affinité E-S n'est pas affectée
- L'inhibition n'est pas levée par un excès de substrat.
- La vitesse se calcule comme suit :

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

La représentation de Lineweaver-Burk est la suivante :



$$\frac{1}{v} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{v_{\max}}$$

Il existe deux types d'inhibiteurs non compétitifs :

- **Inhibiteurs non compétitifs purs**

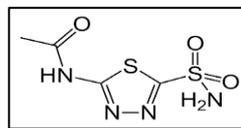
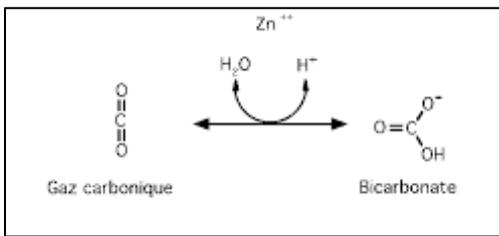
Ne possèdent pas d'analogie structurale avec le substrat. Ils se lient sur l'enzyme en un site différent de celui du substrat, la liaison de l'inhibiteur n'affecte pas celle du substrat. Trois complexes sont formés : ES, EI et EIS.

- Inhibiteurs non compétitifs mixtes

Ne possèdent pas d'analogie structurale. Ils se lient sur un site distinct mais proche de celui du substrat, donc la liaison de l'inhibiteur influence celle du substrat. La vitesse de la catalyse enzymatique est diminuée à la fois par diminution du turnover de l'enzyme et par diminution des proportions de ES. V_{max} est diminuée ; K_M est diminuée.

Exemple d'un inhibiteur non compétitif

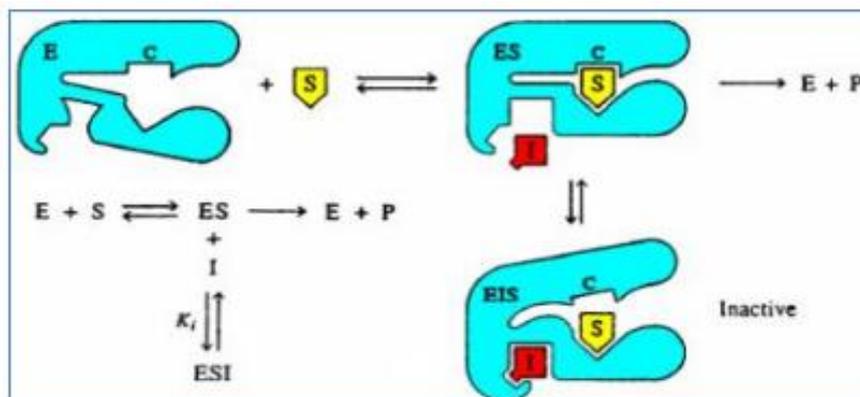
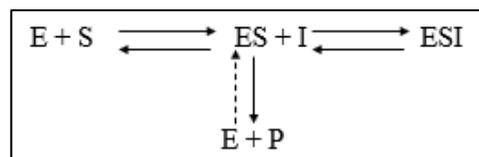
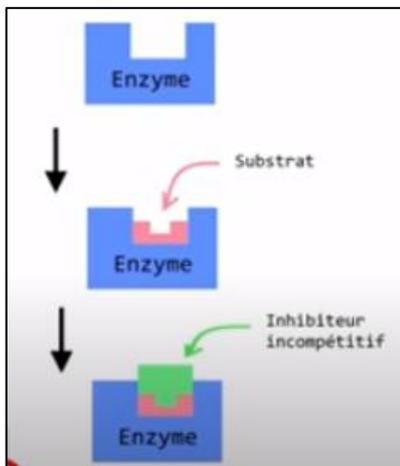
Dans la réaction catalysée par l'anhydrase carbonique, l'inhibiteur non compétitif du gaz carbonique est l'acétazolamide :



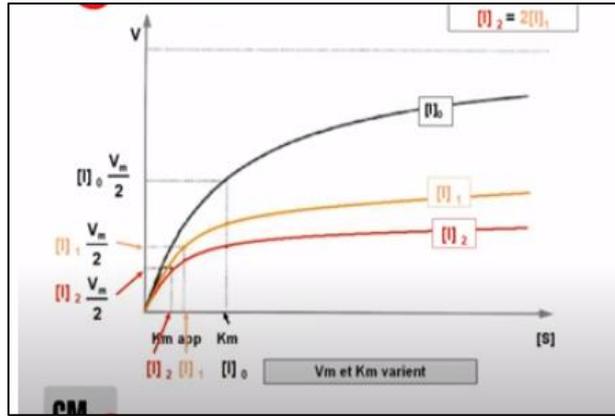
Acétazolamide

c- Inhibition incompétitive

L'inhibiteur ne se fixe pas sur l'enzyme libre mais uniquement sur le complexe ES. Les complexes formés sont ES et EIS.



La représentation graphique de Michaelis-Menten sera comme suit :



• Conséquences de l'inhibition incompétitive :

- La vitesse maximale est diminuée

$$V'_{\max} < V_{\max} \quad \longrightarrow \quad \frac{1}{V'_{\max}} > \frac{1}{V_{\max}} \quad \longrightarrow \quad \frac{1}{V'_{\max}} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

- L'affinité est augmentée

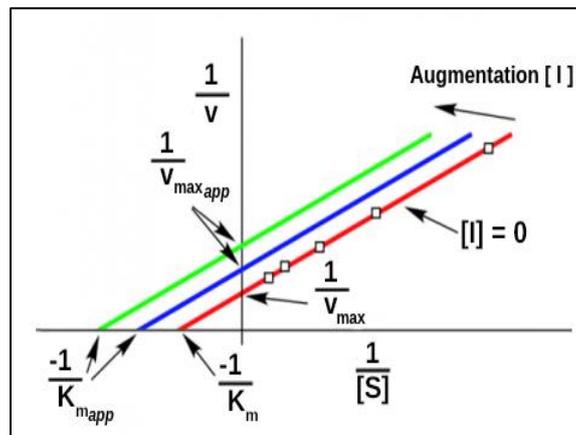
$$\frac{1}{K'_M} > \frac{1}{K_M} \quad \longrightarrow \quad K'_M < K_M \quad \longrightarrow \quad K'_M = \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

- La pente de la droite n'est pas modifiée car le rapport K_M/V_{\max} est inchangé.
- La vitesse se calcule comme suit :

$$v = \frac{v_m [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

Ce type d'inhibition est aussi appelé inhibition anti-compétitive ou inhibition par blocage.

La représentation de Lineweaver-Burk est la suivante :



$$\frac{1}{v'_0} = \frac{K'_M}{V'_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V'_{\max}} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

Exemples d'inhibiteurs incompétitifs : l'iodacétamide, Ag⁺, Hg⁺...

Remarque : Il est possible de distinguer l'inhibition compétitive, de celle qui est mixte, non compétitive ou incompétitive car le fait d'augmenter la concentration du substrat inverse les effets d'un inhibiteur compétitif. L'augmentation de la concentration du substrat ne réduit pas l'inhibition mixte, non compétitive ou incompétitive car l'inhibiteur n'empêche pas le substrat de se fixer dans le site actif.

Tableau récapitulatif des différents types d'inhibition

Type d'inhibition	Pente	Abscisse à l'origine	Ordonnée à l'origine
Sans inhibiteur	K_M/V_{max}	- $1/K_M$	$1/V_{max}$
Compétitive	$\frac{K_M}{V_{max}} (1 + \frac{[I]}{K_I})$	$-\frac{1}{K_M (1 + \frac{[I]}{K_I})}$	$1/V_{max}$
Non compétitive	$\frac{K_M}{V_{max}} (1 + \frac{[I]}{K_I})$	- $1/K_M$	$\frac{1}{V_{max}} (1 + \frac{[I]}{K_I})$
Incompétitive	K_M/V_{max}	$-\frac{(1 + \frac{[I]}{K_I})}{K_M}$	$\frac{1}{V_{max}} (1 + \frac{[I]}{K_I})$

XI.1.3. Les anti-activateurs

Ce sont des inhibiteurs secondaires qui modifient l'activité enzymatique en réagissant avec un activateur présent dans le milieu.

XI.2. Facteurs physiques influençant la réaction enzymatique

XI.2.1. Potentiel hydrogène (pH)

Le pH joue un rôle régulateur sur l'activité de l'enzyme dans le milieu intracellulaire. La réaction enzymatique a besoin pour se dérouler d'une ionisation convenable des acides aminés du site actif (et du substrat) ; cette ionisation dépend du pH et doit être maintenue constante durant la manipulation, d'où l'emploi d'un tampon à un pH proche du pH optimum. Chaque enzyme a un pH optimal c'est-à-dire un pH pour lequel son activité est maximale. De part et d'autre de cette zone restreinte de pH, l'activité enzymatique décroît très vite.

Le pH agit sur :

L'enzyme :

- Modification de l'état d'ionisation du site actif
- Modification de la structure tertiaire ou quaternaire

- Dénaturation de la protéine aux pH extrêmes.

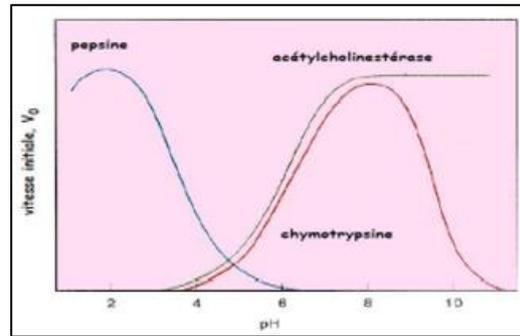
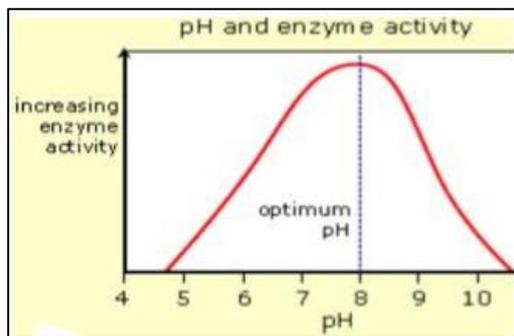
Le substrat :

- Modification de l'ionisation des groupements fonctionnels du substrat empêchant la liaison E-S

Le complexe ES :

- À un certain pH, il y a dissociation du complexe.

Exemples : L'amylase a un fonctionnement maximal pour un pH de 7, mais certains enzymes nécessitent un pH acide (pepsine) et d'autres un pH basique (chymotrypsine).



XI.2.2. Température

- Loi d'Arrhenius

Selon la loi d'Arrhenius, la vitesse d'une réaction chimique augmente avec la température. Cela évolue de manière exponentielle : la vitesse d'une réaction double lorsque la température augmente de 10°C.

Les constantes de vitesse k varient avec la température. Cette variation est donnée par la relation :

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

k : constante de vitesse

A : constante d'Arrhenius

E_a : énergie d'activation (KJ/mol). Energie nécessaire pour que la réaction puisse se produire

R : constante des gaz parfaits (8.31 J.K⁻¹.mol⁻¹)

T : température en Kelvin.

La loi peut également s'écrire sous la forme logarithmique :

$$\ln k = \ln A - E_a/RT$$

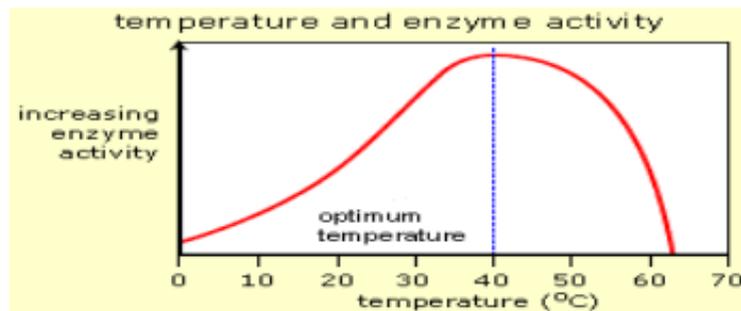
En pratique, on trace la courbe $\ln k$ en fonction de $1/T$: on obtient une droite dont le coefficient directeur est égal à $-E_a/R$. Il est alors possible de calculer l'énergie d'activation.

Les réactions enzymatiques n'échappent pas à cette règle, mais cette augmentation de vitesse n'est pas infinie. Les enzymes peuvent être dénaturées par une température élevée et perdre partiellement ou complètement leur activité. Une augmentation de la température rompt les liaisons H et hydrophobes, dénature la structure et rend l'enzyme inactif.

L'effet de la température est la résultante de deux effets :

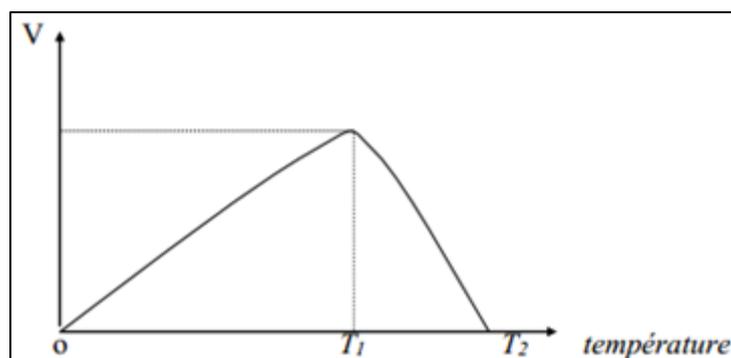
- Activation par l'augmentation de température
- Dénaturation par la chaleur liée à la nature protéique des enzymes.

Les enzymes présentent un optimum de température qui se situe, en moyenne, aux alentours de 40°C. Si l'on s'éloigne de cette valeur, en abaissant ou en augmentant la température, on constate rapidement une chute de l'activité enzymatique. Mais aux basses températures, l'inactivation est réversible : les enzymes sont inhibés par le froid mais non dénaturés. En revanche, à partir de 50 ou 60°C, les enzymes subissent une dénaturation thermique et sont alors détruits.



La courbe est la résultante de deux actions :

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



XI.2.3. Radiations ionisantes

Les radiations ionisantes (rayons X par exemple) peuvent inactiver l'enzyme en dénaturant sa structure.