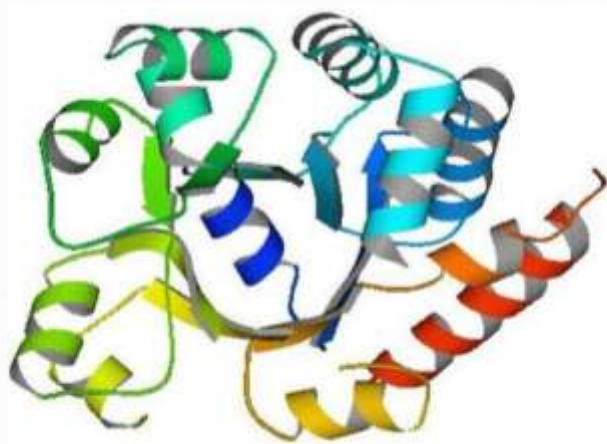


**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université des Frères Mentouri Constantine**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**

***Enzymologie fondamentale***



**Support pédagogique destiné aux étudiants de niveau Licence (L3), spécialité  
« Microbiologie ».**

**Fait par Dr. BENKAHOUL MALIKA**

**Année universitaire : 2017-2018**

## Sommaire

Généralités sur les enzymes.....	01
1. Nomenclature et classification.....	01
2. Paramètres modifiant l'efficacité des réactions enzymatiques.....	02
<b>Chapitre 1 : Rappels de cinétique chimique</b>	
1. Vitesse d'une réaction .....	03
1.1. Cas des réactions irréversibles.....	04
1.1.1. Notion d'ordre d'une réaction .....	04
1.1.2. Détermination de l'ordre par la méthode d'intégration .....	05
1.1.3. Temps de demi-réaction .....	06
<b>Chapitre 2 : Catalyse Enzymatique</b>	
1. Spécificité de l'association [protéine - ligand] (Notion de site actif) .....	09
1.1. Stéréospécificité .....	09
1.2. Mécanisme de la catalyse.....	10
1.2.1. Catalyse acide-base générale.....	11
1.2.2. Catalyse par covalence.....	11
<b>Chapitre 3 : Cinétique enzymatique à un seul substrat et inhibition</b>	
1. Modèle de Michaélis-Menten et ses limites.....	13
1.1. Evolution générale d'une réaction enzymatique en fonction du temps .....	14
1.2. Signification physique des paramètres cinétiques.....	15
1.2.1. Constante de Michaélis $K_M$ .....	15
1.2.2. Activités enzymatiques et paramètres cinétiques.....	15
1.2.3. Linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten.....	16
2. Types d'inhibitions.....	17
2.1. Inhibition compétitive.....	18
2.2. Inhibition incompétitive .....	19
2.3. Inhibition non compétitive.....	20
<b>Chapitre 4 : Cinétique enzymatique à deux substrats</b>	
1. Approche expérimentale.....	22
2. Réactions à simple déplacement.....	23
2.1. Mécanisme ordonné (séquencé).....	23
2.2. Mécanisme au hasard ou non ordonné (aléatoire).....	25
2.2.1. Association dépendante.....	25
2.2.2. Association indépendante.....	27
3. Réactions à double déplacements impliquant la formation d'un complexe binaire .....	30
3.1. Mécanisme Pin-Pong (appartient aux réactions ordonnées).....	30
<b>Chapitre 5 : Effet du pH sur l'activité enzymatique</b>	
1. Action du pH sur la conformation de l'enzyme.....	33
2. Action du pH sur les paramètres cinétiques.....	34
2.1. Effet du pH sur $V_m$ .....	35
2.2. Effet du pH sur $K_m$ .....	35
2.3. Effet du pH sur le rapport $V_m / K_m$ .....	36
<b>Chapitre 6 : Effet de la température sur l'activité enzymatique</b>	

1. Quelques notions de thermodynamiques.....	37
2. Effet de la température sur les constantes d'équilibre.....	38
2.1. Effet de la température sur la vitesse de la réaction.....	39
2.1.1. Définition du Q10.....	39
2.1.2. Théories expliquant le mécanisme de réactions.....	40
2.2. Dénaturation thermique des enzymes.....	42

### **Chapitre 7 : Enzymes allostériques**

1. Propriétés d'autorégulation des systèmes enzymatiques.....	44
2. Propriétés et classification des enzymes de régulation.....	45
2.1. Propriétés.....	45
2.2. Classification.....	45
3. Cinétique des enzymes de régulation.....	45
3.1. Paramètres cinétique et action des modulateurs.....	45
3.2. Désensibilisation.....	47
3.3. Coopérativité.....	48
3.3.1. Nombre de Hill.....	49
4. Mécanisme de régulation.....	50
4.1. Théorie de MONOD-WYMAN et CHANGEUX (MWC).....	50
4.1.1. Formes R et T.....	50
4.1.2. Modèles K et V.....	50
4.1.3. Développement théorique.....	51
4.1.4. Modèle de l'hémoglobine.....	53
4.2. Sites catalytiques et sites de régulation.....	54

# Généralités sur les enzymes

## Introduction

Les enzymes sont des catalyseurs d'une efficacité fonctionnelle remarquable. Ils accélèrent les réactions métaboliques d'un organisme vivant. En effet, ils ont un pouvoir catalytique de  $10^6$  à  $10^{12}$  fois supérieur aux réactions spontanées et interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction. Les catalyseurs enzymatiques ne sont pas consommés et sont restitués en fin de réaction. Ce sont toujours des macromolécules protéiques associées éventuellement à des cofacteurs de petite taille.

Les enzymes sont réparties sur des organites cellulaires différents et peuvent, ainsi, être qualifiées de "enzymes marqueurs". On cite comme exemples :

- \* la cytochrome C oxydase dans la membrane interne mitochondriale;
- \* la lactate déshydrogénase dans la fraction cytoplasmique soluble. Selon leur localisation *in vivo*, les enzymes peuvent être répartis en deux groupes :
- \* **Enzymes extracellulaires** (ou exoenzymes) : Ils sont synthétisés à l'intérieur de la cellule, puis sécrétés dans l'espace extracellulaire.
- \* **Enzymes intracellulaires** : Ils sont synthétisés et utilisés entièrement à l'intérieur de la cellule où ils sont généralement liés à des particules subcellulaires ou membranes intracellulaires rendant leur extraction plus difficile.

## 1. Nomenclature et classification

Les enzymes sont classés selon la réaction qu'ils catalysent. Chaque enzyme est caractérisé par un nom usuel simple (exemple: carboxypeptidase A), un nom systématique plus informatif de la réaction catalysée (exemple: peptidyl-L-amino acide hydrolase) et un numéro de code à quatre chiffres précédé de EC (EC « Enzyme Commission » exemple: 3.4.17.1). Ce numéro est spécifique pour chaque enzyme.

- Le premier chiffre indique le type de réaction en jeu. Ces réactions sont classées en six groupes (classes) :

1. oxydoréductase (Réaction oxydation – réduction)
2. transférase (Transfère des groupements fonctionnels)
3. hydrolase (Réactions hydrolytiques)
4. lyase (Réaction d'élimination pour former des liaisons doubles)
5. isomérase (Isomérisation)

6. ligase Union de molécules couplée avec l'utilisation de nucléotides tri-phosphoré

- Le deuxième chiffre précise le type de groupement chimique ou de liaison concernée (sous-classe)
- Le troisième chiffre détermine la nature précise des groupements chimiques en jeu ou les mécanismes réactionnels quand ils sont connus (sous-sous-classe)
- Le quatrième chiffre est le numéro d'ordre d'enregistrement de l'enzyme dans la sous-sous-classe concernée.

Les enzymes protéolytiques ont été les plus étudiés, ce qui permet leur classement en fonction de leur mécanisme catalytique.

**Exemple :**

La carboxypeptidase porte le numéro de classe 3 (hydrolase), la sous-classe 4 (lien peptidique), la sous-sous-classe 17 (métallo-carboxypeptidase) et 1 (numéro de l'enzyme dans cette série).

## **2. Paramètres modifiant l'efficacité des réactions enzymatiques**

Les enzymes présentent un optimum de température. Il 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. De même, chaque enzyme a un pH optimal c'est-à-dire un pH pour lequel son activité est maximale. L'amylase a un fonctionnement maximal pour un pH de 7, mais certains enzymes nécessitent un pH acide et d'autres un pH basique. Les deux paramètres, température optimale et pH optimal dépendent des enzymes et des organismes concernés.

### **Quelques définitions**

**Substrat :** C'est une substance entrant en transformation au cours de la réaction enzymatique

**Produit :** C'est la substance qui résulte de la réaction

**Coenzymes :** Eléments non protéiques qui participent à la réaction enzymatique, ces molécules ne sont pas liées par des liaisons covalentes à la protéine.

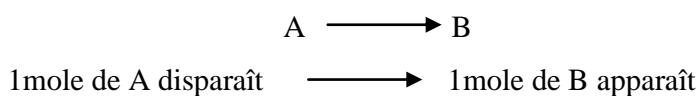
# Chapitre 1 : Rappels de cinétique chimique

## Introduction

La cinétique chimique est l'étude de la vitesse à laquelle la réaction a lieu. Certaines réactions sont totales et très rapides voire instantanées, comme les explosions. D'autres sont tellement lentes qu'elles durent plusieurs années (comme la formation de la rouille), voire plusieurs siècles (comme la formation du charbon ou du pétrole).

### 1. Vitesse d'une réaction

La vitesse d'une réaction est définie comme étant la vitesse d'apparition ou de disparition d'une espèce moléculaire caractéristique de la réaction, comme le montre la réaction suivante :



$$v = - \frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt}$$

Plusieurs facteurs influent sur la vitesse d'une réaction :

- 1- Concentration en substrats
- 2- Température
- 3- Les catalyseurs

Seule la concentration en substrat est prise en considération dans notre cours (**Figure. 1**)

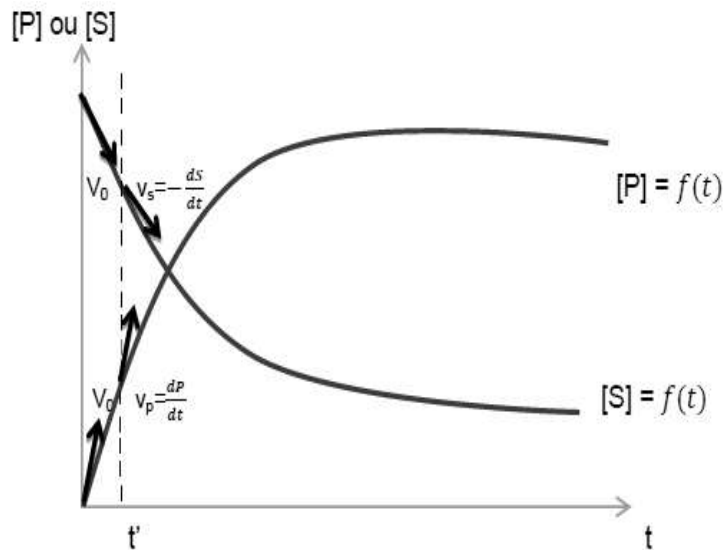
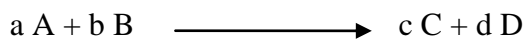


Figure 1. La vitesse de réaction et la notion de vitesse initiale  $v_0$

Soit la réaction suivante:



a, b, c et d étant les coefficients stœchiométriques des substrats et des produits, ainsi la vitesse de réaction est exprimée comme suit :

$$v(t) = \ominus \frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = \ominus \frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = \oplus \frac{1}{c} \frac{d[C]}{dt} = \oplus \frac{1}{d} \frac{d[D]}{dt}$$

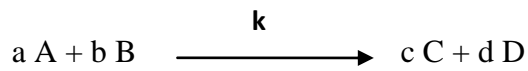
$\uparrow$   $\uparrow$   $\uparrow$   $\uparrow$   
*disparition des réactifs*      *apparition des produits*

v s'exprime en  $\underbrace{\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}}_{\text{concentration} \cdot \text{temps}^{-1}}$

## 1.1. Cas des réactions irréversibles

### 1.1.1. Notion d'ordre d'une réaction

Quand la vitesse d'une réaction est proportionnelle à la concentration des corps réagissant, elle est levée à une certaine puissance, la somme des puissances est appelée **ordre de la réaction**. L'ordre de la réaction est une notion expérimentale. Soit la réaction suivante :



$$v = k [A]^\alpha \cdot [B]^\beta$$

$\alpha$  : ordre partiel par rapport à A

$\beta$  : ordre partiel par rapport à B

$\alpha + \beta$  : ordre global de la réaction

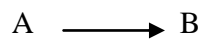
$k$  : étant la constante de vitesse et son unité dépend de l'ordre global

L'ordre de la réaction est égal au nombre de molécules qui réagissent ( $a=\alpha$ ,  $b=\beta$ ). L'écart entre ce nombre et l'ordre de la réaction suppose que le mécanisme réactionnel n'est pas simple et que la réaction se fait en plusieurs étapes.

### 1.1.2. Détermination de l'ordre par la méthode d'intégration

*Si la réaction est d'ordre 0 : La vitesse est indépendante de la concentration (Figure. 2)*

.



$$v = - \frac{d[A]}{dt} = k[A]^0$$

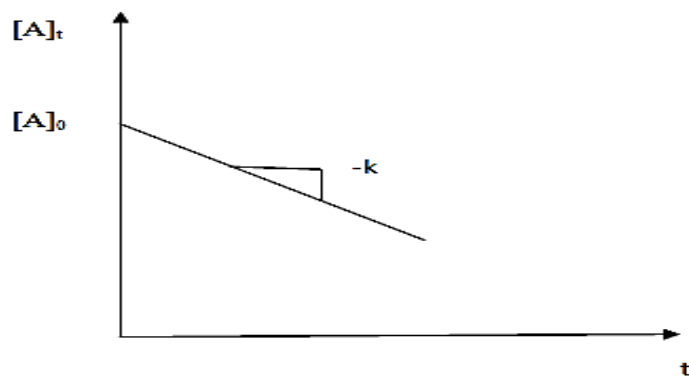
$$\int d[A] = -k \int dt$$

$$A = -k t + \text{constante}$$

$$\text{Au temps : } t = 0, \quad A = A_0$$

$$A_0 = \text{constante} \longrightarrow A = -kt + A_0$$





**Figure 2. Représentation graphique d'une réaction d'ordre 0 selon la méthode d'intégration**

**1.1.3. Temps de demi-réaction :** Il correspond au temps au bout duquel la moitié de la quantité de la substance considérée a disparu. L'expression du temps de demi-vie en fonction de la concentration initiale varie avec l'ordre de la réaction et par conséquent sa connaissance permet d'identifier l'ordre de la réaction

Au temps :

$$t = 0 : [A] = [A_0]$$

$$t = t_{1/2} : [A] = [A_0]/2, \text{ en remplaçant } [A] \text{ dans l'équation intégrée on obtient } t_{1/2}$$

$$t_{1/2} = [A_0]/2k, \text{ le temps de demi-vie est proportionnel à la concentration initiale}$$

L'unité de la constante de vitesse est : **mole/l /temps (M/min, M/s)**.

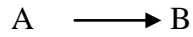
Une réaction est d'ordre 0 lorsque la vitesse de réaction est indépendante de la concentration des espèces moléculaire transformées. En général l'ordre de réaction ne reste pas nul et les réactions de ce type ne peuvent s'expliquer que si on admet que la vitesse mesurée est en réalité la vitesse de modification d'une substance intermédiaire dont la concentration reste constante pendant la durée de l'observation.

Les réactions d'ordre 0 interviennent lorsque:

- le réactif est fortement absorbé sur la surface où il réagit,
- le réactif est gazeux,
- la concentration de la molécule est en excès,
- et la substance est peu réagissante ou peu soluble.

**Si la réaction est d'ordre 1 :** La vitesse de la réaction dépend de la concentration de A.

Au cours de la réaction, la concentration de A diminue. De ce fait, la vitesse varie (**Figure. 3**)



Au temps  $t = 0$ :             **$a$**              **$0$**

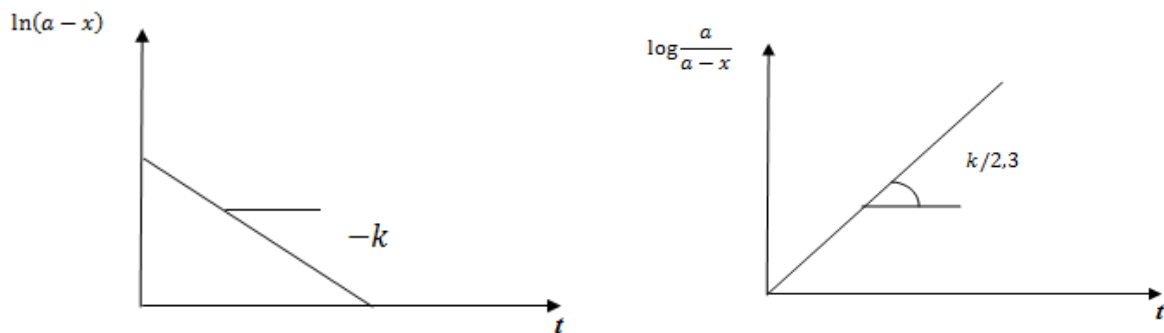
Au temps  $t = x$  :             **$a - x$**              **$x$**

$$v = -\frac{d(a-x)}{dt} = \frac{dx}{dt} = k(a-x)$$

L'intégration permet d'avoir l'équation suivante :

$$\ln(a-x) = -kt + cte$$

Au temps  $t = 0$ , la constante :  $cte = \ln a$ ,  $\ln = 2,3 \log$



**Figure3. Représentation graphique d'une réaction d'ordre 1 selon la méthode d'intégration**

**Temps de demi-réaction :**  $t_{1/2} = \ln 2 / k$

Le temps de demi-vie est indépendant de la concentration initiale dans une réaction d'ordre 1

L'unité de la constante de vitesse dans le cas d'une réaction d'ordre 1 est  **$\text{min}^{-1}$  ou  $\text{s}^{-1}$**

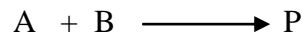
Les réactions d'ordre 1 sont par exemples :

- la dénaturation thermique des protéines,
- la mutarotation des sucres,

- la racémisation des acides aminés,
- les réactions d'hydrolyse,
- et la décroissance de la radioactivité.

***Si la réaction est d'ordre 2***

Cas où les concentrations de A et de B sont égales :  $[A] = [B]$ .



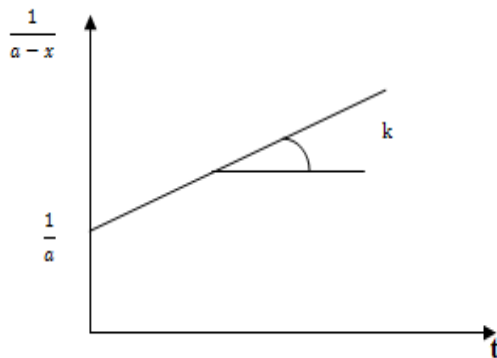
Au temps  $t = 0$ :             $a$      $a$              $0$

Au temps  $t = x$  :             $a - x$      $a - x$              $x$

$$v = -\frac{d(a-x)}{dt} = \frac{dx}{dt} = k(a-x)^2$$

L'intégration permet d'avoir l'équation suivante qui nous permet de tracer la représentation graphique (**Figure. 4**) :

$$\frac{1}{a-x} = kt + \frac{1}{a}$$



**Figure4.** Représentation graphique d'une réaction d'ordre 2 selon la méthode d'intégration, les concentrations des deux substances A et B sont égales.

**Temps de demi-réaction** Le temps de demi-vie est inversement proportionnel à la concentration initiale  $t_{1/2} = k \cdot a$

## Chapitre 2 : Catalyse Enzymatique

### 1. Spécificité de l'association [protéine- ligand] (Notion du site actif)

Les protéines natives se replient dans une conformation tertiaire fonctionnelle unique d'où l'acquisition de leur activité biologique, dans notre cas, il s'agit de la catalyse enzymatique. Cette structure globale de la macromolécule permet à une région particulière d'adopter elle aussi une structure spatiale reconnue par le ligand spécifique de la protéine.

On peut citer divers types d'associations entre une protéine et un ligand :

- le complexe enzyme - substrat(s)
- enzyme - régulateur (inhibiteur, activateur, coenzymes, ...)
- antigène - anticorps
- récepteurs - hormones
- hémoglobine - oxygène

Dans le cas des enzymes, cette région particulière s'appelle le site actif. On distingue au sein du site actif :

- les acides aminés qui constituent le site de fixation (ces acides aminés n'ont pas de fonction chimique impliquées dans la réaction)
- les acides aminés qui constituent le site catalytique

Le site actif est constitué d'un petit nombre d'acides aminés qui le plus souvent ne sont pas contigus dans l'enchaînement de la chaîne polypeptidique. Ces acides aminés sont caractérisés par une chaîne latérale dont à la fois la **nature chimique** (groupement ionisable) et **la structure** (encombrement stérique) sont spécifiquement adaptés à la reconnaissance du substrat.

#### 1.1. Stéréospécificité

La stéréochimie qui résulte de l'agencement unique des acides aminés qui constituent le site actif est la cause de la stéréospécificité de reconnaissance entre ces acides aminés et le substrat. La nature des forces dans les associations [enzyme - substrat] sont :

- forces d'interactions électrostatiques : entre atomes ou groupes d'atomes qui possèdent une charge électrique permanente. : Ces interactions sont classées dans les interactions de Van der Waals
- interactions électrocinétiques ou forces de dispersion : interactions entre groupes non polaires.
- répulsions à courtes distances : répulsions électrostatiques entre les électrons par suite du recouvrement des nuages électroniques de 2 atomes.
- liaisons hydrogène : elles s'établissent entre 2 atomes électronégatifs reliés par un atome d'hydrogène. Elles sont de nature électrostatique.
- interactions hydrophobes : Elles résultent de la réorganisation de la structure des molécules d'eau en présence d'un composé non polaire. Les molécules d'eau autour d'un composé non polaire sont organisées de manière à établir le maximum de liaisons hydrogène autour d'elles. L'accroissement d'entropie dû à la désorganisation de la structure du réseau de molécules d'eau constitue la contribution majeure à l'énergie des interactions hydrophobes.
- liaison covalente : partage d'une paire d'électrons entre 2 atomes. Ce type de liaison est parfois impliqué dans les complexes [enzyme - substrat] : elle intervient alors dans une étape consécutive à la formation du complexe de Michaelis-Menten-Henri.

## 1.2. Mécanisme de la catalyse

La compréhension du mécanisme de la catalyse repose principalement sur la connaissance et l'identification des acides aminés faisant parti de la structure enzymatique et de leurs groupements fonctionnels directement impliqués dans la catalyse. Les méthodes de recherche de ces groupes actifs se basent sur l'analyse des modifications de l'enzyme qui apparaissent suite à l'usage de différents facteurs extrinsèques :

- variation de pH,
- variation de température,
- emploi de réactifs chimiques spécifiques des groupements fonctionnels,
- utilisation d'analogues structuraux du substrat,
- détermination de la séquence primaire de l'enzyme,
- et emploi de techniques physico-chimiques, optique, cristallographique, résonance magnétique nucléaire, etc...

Par ailleurs, la vitesse d'une réaction enzymatique dépend de l'efficacité de la rencontre (collision) entre les molécules qui vont former l'état de transition. Cette efficacité dépend à la fois :

- de l'orientation des molécules l'une par rapport à l'autre
- d'une énergie minimale requise : l'énergie d'activation

Les deux grands types chimiques de mécanismes catalytiques sont les suivants :

**1.2.1. Catalyse acide-base générale :** c'est le mécanisme le plus courant de la catalyse enzymatique. L'accélération de la réaction résulte du transfert d'un proton. Par exemple, ce proton peut provenir du couple imidazole de la chaîne latérale de l'histidine. L'activité catalytique des enzymes de ce type est largement influencée par le pH.

**1.2.2. Catalyse par covalence** (aussi appelée catalyse nucléophile) : elle concerne essentiellement les réactions enzymatiques où plusieurs substrats sont impliqués (environ 20% des enzymes et toutes les enzymes qui catalysent un mécanisme à 2 substrats de type "*ping-pong*"). Une partie du premier substrat est transférée à l'enzyme *via* la formation d'une liaison covalente puis cette partie du substrat est transférée au second substrat.

### **Exemple de la protéase à sérine**

Les protéases à sérine ont en commun le mécanisme de coupure, basé sur la polarisation de la liaison peptidique par un groupement sérine. Les membres de ce groupe présentent un site actif déterminé par trois résidus comprenant en plus de la sérine, un aspartate et une histidine formant ainsi une triade pour que le groupement OH de la sérine soit très fortement polarisé. Le polypeptide s'insère dans la protéase à sérine de telle manière que le groupement carbonyle soit proche de la sérine. Le groupement OH de la sérine attaque le groupement carbonyle et l'azote de l'histidine accepte le OH de la sérine. Une association enzyme-substrat intermédiaire se forme, puis, le produit d'hydrolyse est libéré (**Figure. 1**).

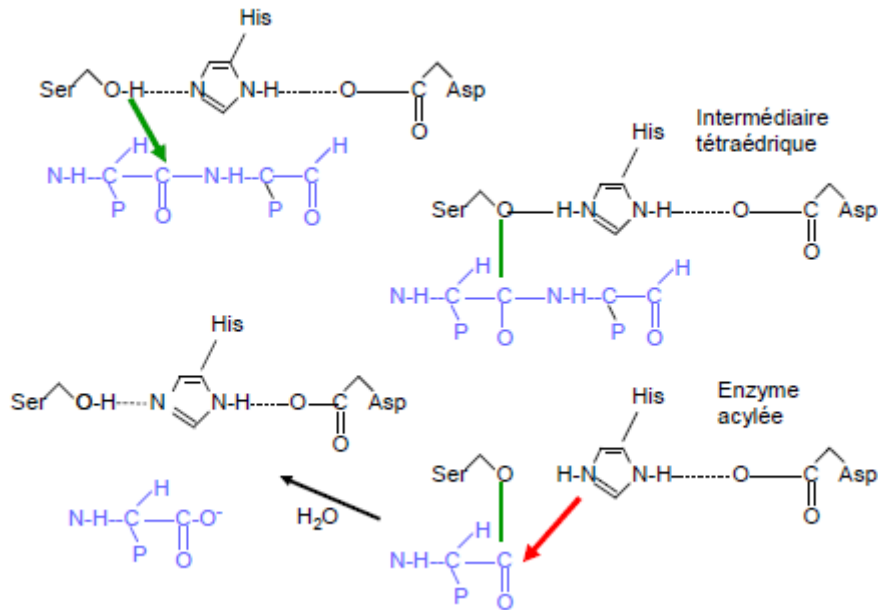


Figure 1. Mécanisme catalytique de la protéase à Sérine

- On peut citer aussi la **chymotrypsine** (protéase à sérine) qui est constituée de trois segments d'une même chaîne polypeptidique originelle reliés par des ponts disulfure.

Lorsqu'elle se replie, la chymotrypsine adopte une conformation qui correspond à deux domaines structuraux.

- le domaine N-terminal porte deux des trois acides aminés catalytiques : l'histidine 57 (H57) et l'aspartate 102 (D102).
- le domaine C-terminal porte la sérine 195 (S195). Ces 3 acides aminés forment ce que l'on appelle la "triade catalytique" des protéases à sérine.

## **Chapitre 3 : Cinétique enzymatique à un seul substrat Et inhibition**

### **Introduction**

Il existe plusieurs mécanismes enzymatiques différents selon l'enzyme considéré. Les enzymes de **Michaelis** fonctionnent selon le mode suivant : un substrat S se lie avec l'enzyme E pour donner un intermédiaire ES, puis cet intermédiaire se dissocie pour donner un produit P avec régénération de l'enzyme E.

Il existe bien d'autres mécanismes. Citons en particulier les enzymes **allostériques** qui possèdent nécessairement plus d'un site actif par molécule (au moins 2) et pour lesquels les caractéristiques cinétiques d'un site actif varient en fonction de l'état des autres sites de la même molécule (liés ou non liés à un substrat).

Chaque mécanisme se traduit par des caractéristiques cinétiques spécifiques (évolution de la vitesse de catalyse au cours du temps). Pour faire une étude cinétique, il faut mesurer la vitesse initiale ( $V_i$ ) de la réaction à différents moments en ayant choisi avec soin les conditions initiales. À partir des mesures on peut tracer des courbes représentant la cinétique de la réaction, ce qui permet de déterminer certaines valeurs caractéristiques

### **1. Modèle de Michaélis-Menten et ses limites**

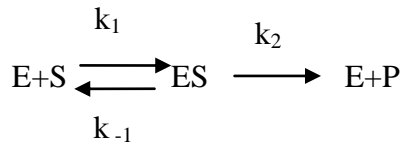
Le modèle de Michaélis, sert généralement de base aux études cinétiques des enzymes non allostériques en milieu homogène ; aussi bien pour les enzymes a un seul substrat que pour certains enzymes a deux substrats. L'un des substrats, présent en large excès peut en effet être négligé pendant l'étude cinétique.

Le modèle de Michaélis, avec formation d'un seul complexe enzyme-substrat, donne en état stationnaire le complexe **ES**.



## 1.1. Evolution générale d'une réaction enzymatique en fonction du temps

Soit la réaction suivante :



$k_1$  = constante d'association de E + S

$k_{-1}$  = constante de dissociation du complexe ES

$k_2$  = constante de réaction de ES en E + P

**Si on reste dans les conditions de Michaelis, au début de la réaction, la quantité de produit formé étant négligeable, la réaction  $\text{E} + \text{P} \rightarrow \text{ES}$  ne se fait pas**

### - Equation de vitesse de Michaëlis-Menten

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

L'équation de Michaelis-Menten est une expression mathématique décrivant les paramètres cinétiques d'une réaction chimique catalysée par un enzyme classique. À partir de cette équation, on peut déterminer la  $V_i$  pour toutes les conditions initiales connues puisque  $V_{max}$  et  $K_M$  sont des constantes qui peuvent être déterminées expérimentalement et  $[S]$  correspond à une valeur connue puisqu'il s'agit de la concentration en substrat introduite par l'expérimentateur.  $V$  varie en fonction de  $[S]$  selon une **hyperbole** dont l'asymptote horizontale est  $V_{max}$  (Figure.1). Il apparaît que  $K_M$  peut aussi se définir comme la concentration du substrat pour laquelle la vitesse est la moitié de  $V_{max}$ . Lorsque la concentration du substrat est nulle la vitesse est évidemment 0, donc l'hyperbole passe par l'origine du graphe (**Figure. 1**).

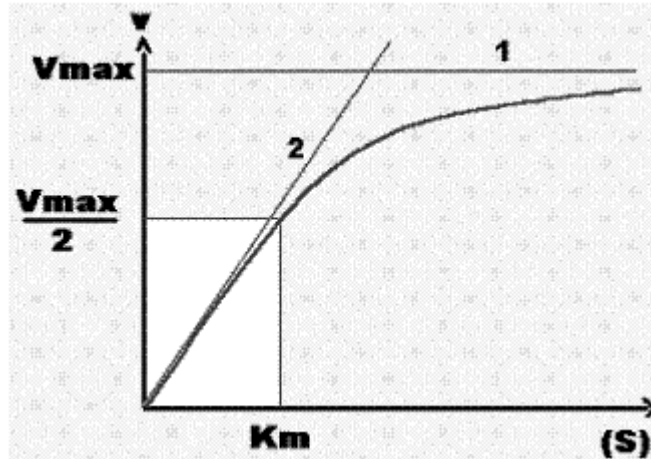


Figure 1. Représentation des vitesses initiales en fonction des concentrations du substrat

## 1.2. Signification physique des paramètres cinétiques

1.2.1. Constante de Michaélis  $K_M$  : C'est la constante de dissociation du complexe ES :

$$\frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_M$$

$K_M$  permet d'évaluer l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Le  $K_M$  est spécifique d'un enzyme pour un substrat, dans des conditions données. Cette constante est d'autant moindre que l'affinité de l'enzyme pour le substrat est plus grande.

## 1.2.2. Activités enzymatiques et paramètres cinétiques

Les dosages d'activité enzymatique sont effectués en mesurant la vitesse d'apparition d'un produit ou de disparition d'un substrat, à l'état stationnaire, dans les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme dans ces conditions, la concentration saturante de substrat,  $V = V_{max} = k_{cat} [E_0]$ . Les unités employées sont diverses :

- Unité internationale (UI.) : Elle reste largement utilisée. C'est la quantité d'enzyme apte à catalyser la transformation d'une micromole de substrat par minute.
- Katal : quantité d'enzyme qui convertit une mole de produit par seconde ; l'énormité de cette unité amène à recourir au **microkatal**, ou au **nanokatal**,

$$1 \text{ UI} = 16,67 \text{ nkat}$$

- Activité spécifique (AS), unités enzymatique par milligramme de protéines de l'extrait enzymatique ; elle est surtout utilisé pour suivre la purification d'un enzyme ;
- Activité moléculaire, nombre de molécules de produit formées par unité de site actif et par unité de temps ; elle ne peut être évaluée que pour des enzymes purs dont on connaît le poids moléculaire.

### 1.2.3. Linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten

Malheureusement, l'extrapolation d'une hyperbole à partir de quelques points n'est pas facile. Des erreurs sur l'estimation des paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_M$ ) sont possibles. La linéarisation de la représentation graphique de l'équation de Michaelis-Menten, transforme l'hyperbole en droites de différentes équations (changement des axes). L'exemple en est la transformation de **Lineweaver et Burke (représentation des doubles inverses)**:

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

On obtient une droite dont l'extrapolation coupe l'axe des  $1/V$  en un point d'ordonnée  $1/V_{max}$  et l'axe des  $1/[S]$  en un point d'abscisse  $-1/K_M$ . Cette équation représente une droite de pente  $K_M / V_{max}$  (**Figure.2**). Il existe plusieurs autres représentations : **Eadie-Hofstee (Figure.3)** qui utilise une autre transformation et **Dixon (Figure.4)**.

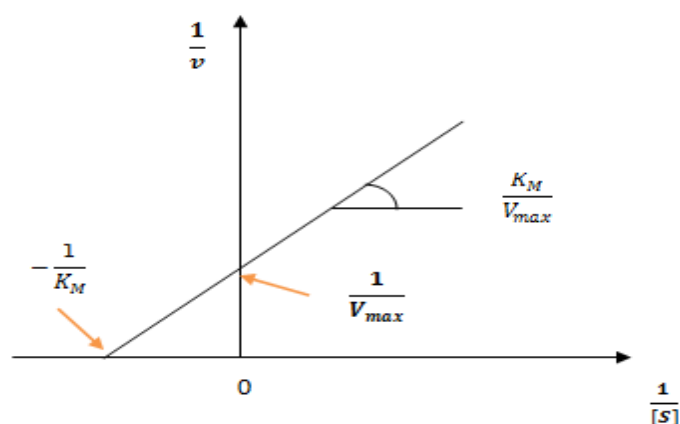


Figure 2. Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Line-weaver et Burck

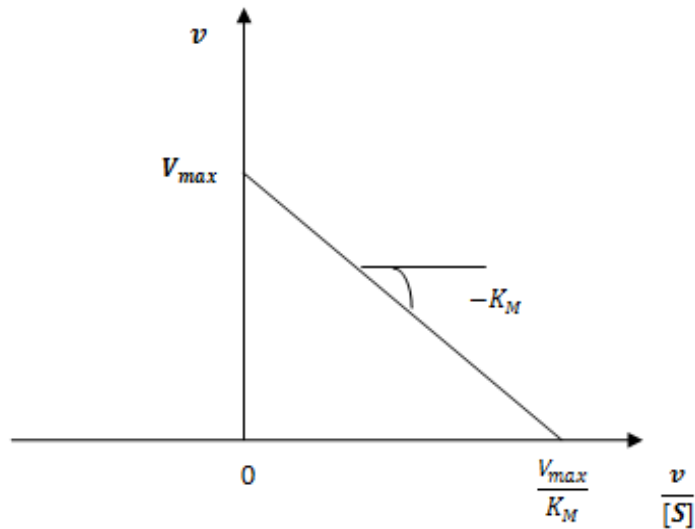


Figure 3. Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Eadie-Hofstee

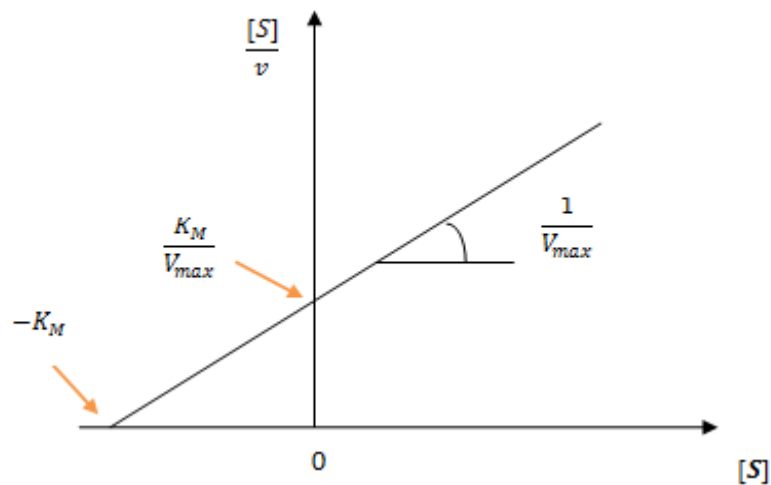


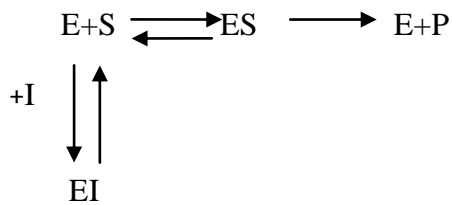
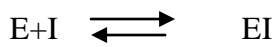
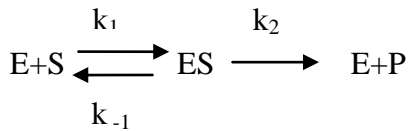
Figure 4. . Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Dixon

## 2. Types d'inhibitions

Une substance inhibe une réaction enzymatique lorsque celle-ci est ralentie, l'inhibition se fait par la liaison d'une petite molécule (différente que la dénaturation)

L'étude des inhibiteurs a permis de les classer en plusieurs types. Pour notre cas on prendra le cas des enzymes monomériques à un substrat :

**2.1. Inhibition compétitive** Lorsque la liaison d'un inhibiteur sur l'enzyme a pour effet d'empêcher la liaison enzyme substrat, on parle **d'inhibition compétitive** vis à vis de ce substrat. Concomitamment à la liaison enzyme-substrat il y a une liaison enzyme-inhibiteur qui aboutit à un complexe **EI** inactif.



La constante de dissociation du complexe EI est  $K_i$ . Elle est définie par rapport aux concentrations de l'enzyme libre, de l'inhibiteur et du complexe EI.

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

L'équation de la vitesse, qui ne dépend que du complexe ES puisque le complexe EI est inactif, reste inchangée. Les calculs conduisent à une équation de Michaelis dans laquelle le facteur  $K_M$  est affecté d'un coefficient qui dépend de la concentration de l'inhibiteur et de l'inverse de la constante  $K_i$  c'est à dire **l'affinité** de l'enzyme pour l'inhibiteur.

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

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

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

$K'_M$  : est la constante de Michaelis apparente en présence de l'inhibiteur

D'après le graphe (**Figure. 5**)  $V_{max}$  ne change pas et  $K_M$  change (il augmente) donc l'affinité diminue

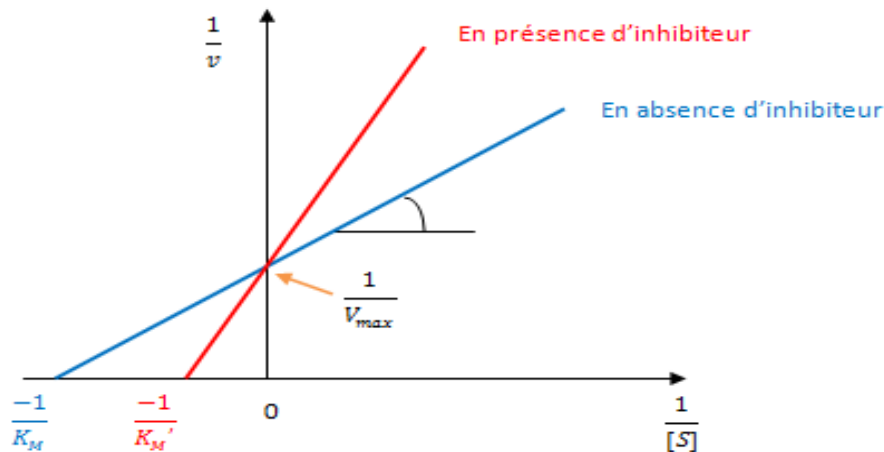
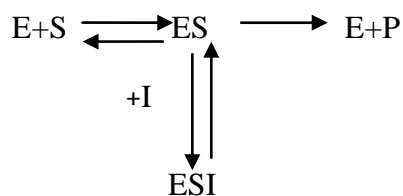


Figure 5. Représentation de la cinétique enzymatique en présence d'un inhibiteur compétitif

**2.2. Inhibition incompétitive :** L'inhibiteur incompétitif ne peut se fixer que sur l'enzyme préalablement complexée au substrat (ES) et empêche la formation du produit.



La constante de dissociation de ce complexe ESI, soit  $K_i$  est définie par rapport aux concentrations de ES, de l'inhibiteur et du complexe ESI.

$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Ce type d'inhibition est connu cinétiquement par une diminution parallèle de  $V_{max}$  et de  $K_M$  (augmentation de l'affinité de E pour S). La diminution de  $K_M$  s'explique par le fait que le complexe ES est susceptible à l'inhibition; l'équilibre de liaison est donc déplacé vers ES par

la diminution de sa concentration lors de la formation du complexe ESI d'où l'augmentation de l'affinité de E pour S (**Figure. 6**).

$$v = \frac{V'_{max}[S]}{K'_M + [S]}$$

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

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

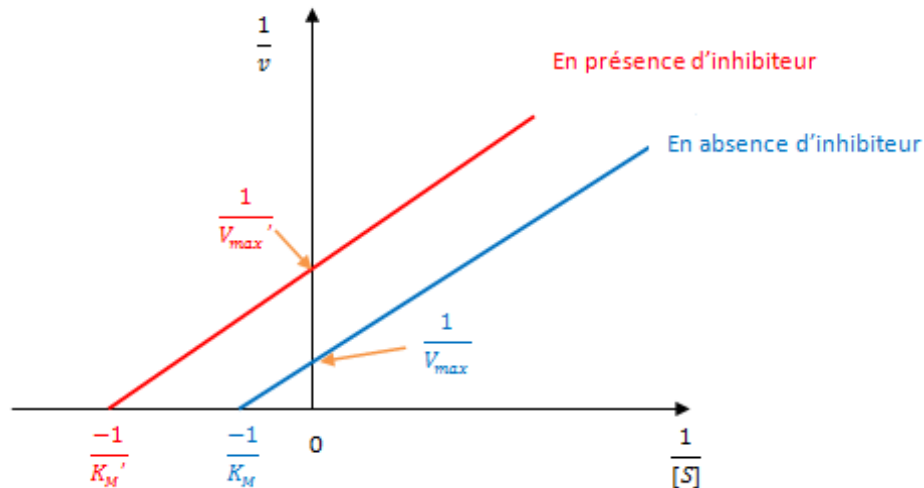
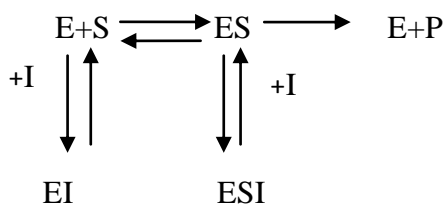


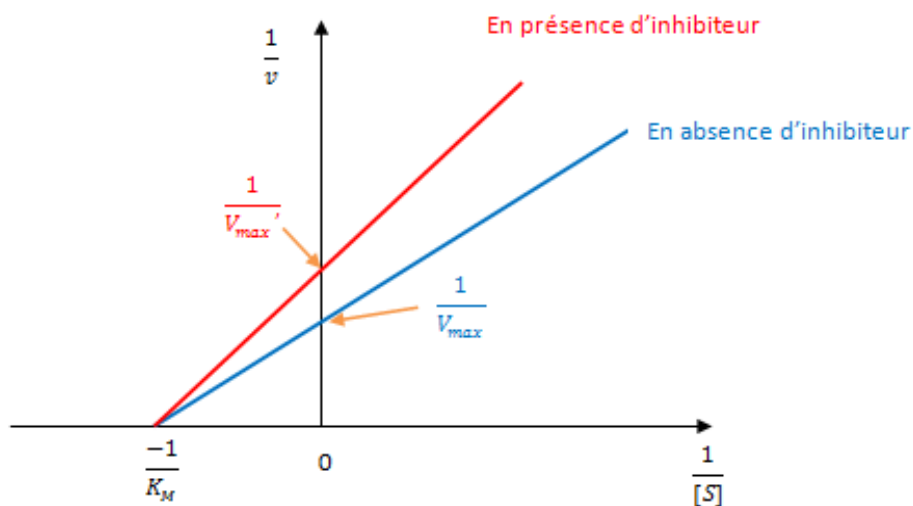
Figure 6. Représentation de la cinétique enzymatique en présence d'un inhibiteur incompétitif

**2.3. Inhibition non-compétitive** (l'inhibiteur se fixe à un autre site, que celui où se fixe le substrat) Lorsque la liaison d'un inhibiteur sur l'enzyme se fait sur un site indépendant du site actif, il n'y a évidemment aucune compétition entre le substrat et l'inhibiteur. L'inhibiteur en se liant rend la molécule d'enzyme incapable de catalyser la réaction on parle alors d'inhibition non compétitive. La constante  $K_M$  de l'enzyme vis à vis du substrat représente toujours la constante de dissociation du complexe ES mais aussi celle du complexe ESI en EI et substrat libre. La constante  $K_i$  de l'enzyme vis à vis de l'inhibiteur représente toujours la constante de dissociation du complexe EI mais aussi celle du complexe ESI en ES et inhibiteur libre. L'équation de la vitesse, qui ne dépend que du complexe ES puisque les complexes EI et ESI sont inactifs, reste donc inchangée.



Les calculs conduisent à une équation de Michaelis dans laquelle la vitesse maximum est affectée d'un coefficient qui dépend de la concentration de l'inhibiteur et de l'inverse de la constante  $K_i$ . La constante  $K_M$ , au contraire reste la même que dans le cas général (**Figure. 7**).

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



**Figure 7. Représentation de la cinétique enzymatique en présence d'un inhibiteur non compétitif**

Le tableau 1 regroupe les différents paramètres cinétiques dans les différents cas d'inhibitions :

**Tableau 1 : récapitulation des paramètres cinétiques en présence d'inhibiteurs**

Type d'inhibition	$K_m$ apparent	$V_m$ apparente
Compétitive	$K_m (1 + [I]/ K_i)$	$V_{max}$
Incompétitive	$K_m / (1 + [I]/ K_i)$	$V_{max} / (1 + [I]/ K_i)$
Non compétitive	$K_m$	$V_{max} / (1 + [I]/ K_i)$



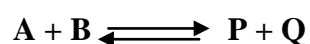
## Chapitre 4 : Cinétique enzymatique à deux substrats

### Introduction

Les réactions enzymatiques à un seul substrat sont rares. Les enzymes catalysent des réactions entre 2 ou 3 substrats. Dans les réactions à deux substrats, il peut y avoir ou non la formation d'un complexe ternaire entre l'enzyme et les deux substrats, suivant le chemin réactionnel. La plus part des réactions à deux substrats peuvent être classées dans un des deux cadres suivants :

- Réactions à simple déplacement
- Réactions à double déplacement

Soit la réaction générale :



### 1. Approche expérimentale

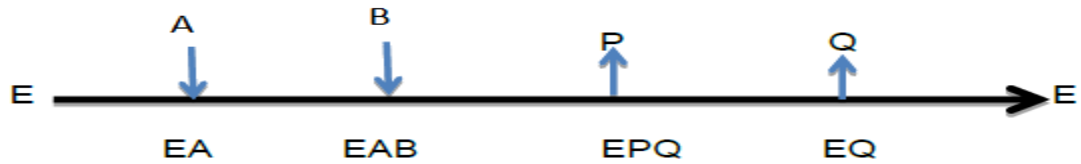
L'étude des réactions enzymatiques à 2 substrats consiste à déterminer l'ordre de fixation des substrats, les constantes d'affinité de chacun d'eux en présence ou en absence de l'autre et la vitesse maximale de la réaction, lorsque les 2 substrats sont en concentrations saturantes.

#### 1.1. Première étape :

On effectue l'expérience avec le premier substrat(A) en excès, on l'appelle le substrat fixe et on mesure la vitesse en faisant varier B (substrat variable) et ceci en phase stationnaire

#### 1.2. Deuxième étape :

On prend B en excès et on fait varier A pour mesurer les vitesses en phase stationnaire. Les deux étapes (cinétiques) sont de type Michaelien, mais le traitement mathématique est complexe et c'est pourquoi on utilise **la notation de Cheland (1963)**. On symbolise la réaction enzymatique à l'aide d'un trait horizontale, alors que les flèches symbolisent les substrats et les produits au cours du cycle de la réaction.



## 2. Réactions à simple déplacement :

Elles impliquent la formation d'un complexe ternaire et les conditions expérimentales dans ces réactions sont :

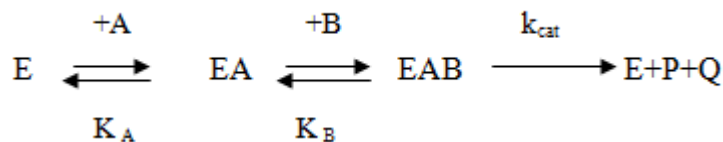
La réaction réverse est négligée :  $A + B \longrightarrow P + Q$

- Les deux substrats A et B doivent être présents simultanément
- L'association des substrats à l'enzyme peut suivant les systèmes s'effectuée de manière différente.

On distingue deux types d'association des substrats à l'enzyme :

### 2.1. Mécanisme ordonné (séquencé)

Dans ce mécanisme un substrat se fixe nécessairement le premier sur l'enzyme pour que la fixation du second soit possible, soit la réaction suivante :



$K_A$  et  $K_B$  sont les constantes d'équilibre des deux étapes :

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad K_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

Quand on fixe A et on fait varier B, on obtient l'équation de vitesse :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A \cdot K_B}{[A][B]}}$$

## Représentations graphiques

$$[A] = \text{cte}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[B]} \left( K_B + \frac{K_A}{[A]} \cdot K_B \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

Les droites de la représentation primaire de  $1/V = f(1/[B])$  se coupent sur l'axe des ordonnées. Du moment que B ne se fixe que sur le complexe EA, sa présence en excès déplace l'équilibre entre E et A vers les formes complexées et tout l'enzyme est alors sous la forme EA-B; on mesure ainsi la vitesse maximale (**Figure. 1**).

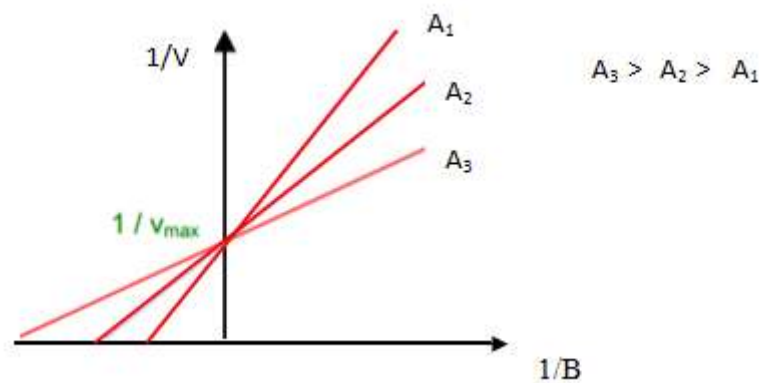


Figure 1. Représentation Primaire :  $1/V = f(1/B)$

On met :  $[B] = \text{Cte}$  et la représentation graphique se fait en fonction de A (Figure.2)

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[A]} \left[ \frac{K_A \cdot K_B}{[B]} \right] + \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{K_B}{[B]} \right)$$

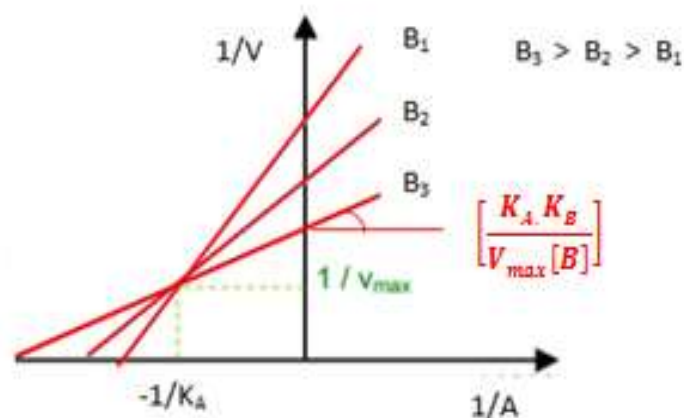
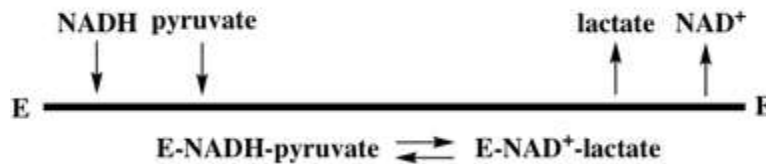


Figure2. Représentation Primaire :  $1/V = f(1/A)$

### Exemple de mécanisme ordonné ou séquentiel (Les déshydrogénases à NAD<sup>+</sup>)

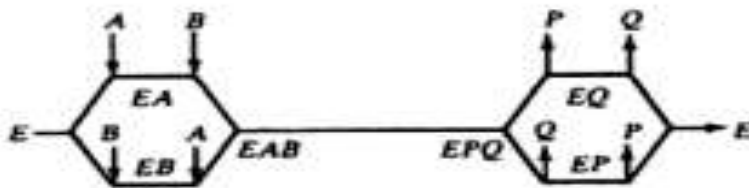
- **Cas de lactate déshydrogénase (Mécanisme à simple déplacement):** Certains enzymes nécessitent la présence d'un coenzyme dissociable, pour l'analyse le coenzyme peut être considéré comme un second substrat.



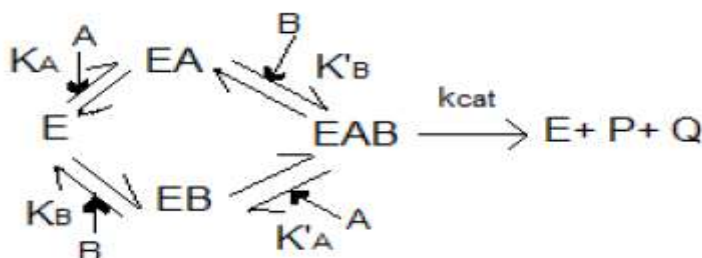
### 2.2. Mécanisme au hasard ou non ordonné (aléatoire)

Les 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). La réaction implique l'existence de quatre constantes d'équilibre  $K_A$ ,  $K_B$ ,  $K'_A$  et  $K'_B$ . Dans ce mécanisme, la fixation des deux substrats peut être soit dépendante ou indépendante. Dans le premier cas, le plus fréquent, l'association de A et B à l'enzyme dépend l'une de l'autre alors que dans le second cas, l'association de A et B à l'enzyme est indépendante.

### Représentation de Cleland :



**2.2.1. Association dépendante :** C'est-à-dire que la fixation de A modifie l'affinité de l'enzyme pour B et réciproquement



$$v = k[EAB]$$

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \qquad K'_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

$$K_B = \frac{[E][B]}{[EB]} \qquad K'_A = \frac{[EB][A]}{[EAB]}$$

$K_A$  : constante de dissociation de EA ;

$K_B$  : constante de dissociation de EB

$K'_A$  : constante de dissociation de EAB ;

$K'_B$  : constante de dissociation de EAB

Pour chaque concentration de A ou de B, la vitesse en fonction de A ou de B suit la loi de Michaelis et la vitesse maximale est obtenue lorsque l'enzyme est saturé en A et en B:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K'_A}{[A]} + \frac{K'_B}{[B]} + \frac{K_A K'_B}{[A][B]} \right)$$

**Représentations graphiques :**

a)  $[A] = Cste$        $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[B]}\right)$  permet de tracer la figure 3.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[B]} \left( \frac{K'_B}{V_{max}} + \frac{K_A K'_B}{[A] V_{max}} \right) + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K'_A}{[A]} \right)$$

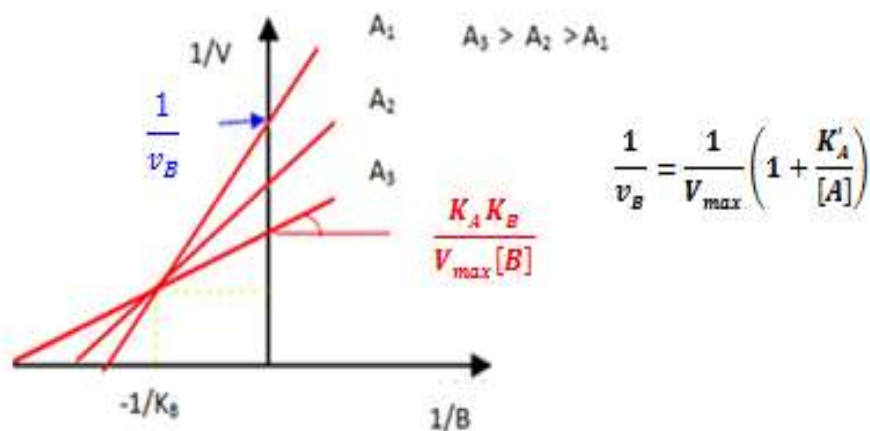


Figure 3. Représentation Primaire :  $1/V = f(1/B)$

Quand on prend  $[B]=$  constante, on trace la représentation primaire  $1/v_f$  ( $1/A$ )

- Les graphes primaires permettent de déterminer de nouvelles valeurs : voir les équations des droites.
- Ces valeurs sont reportées dans le graphe secondaire pour le substrat A (**Figure 4**) et le graphe secondaire pour le substrat B.
- Elles permettent de déterminer les paramètres cinétiques

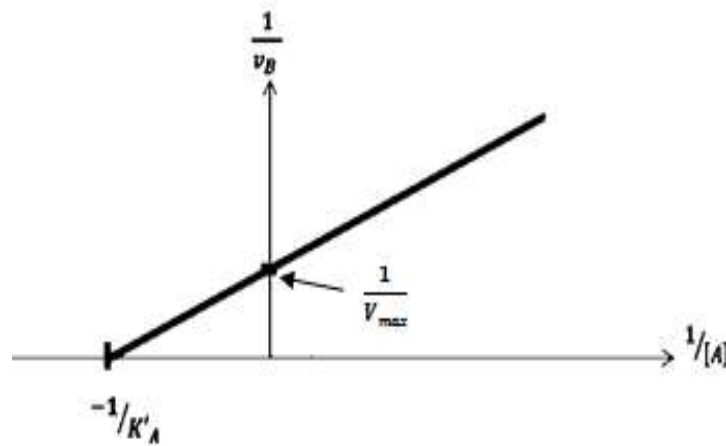


Figure 4. Représentation secondaire  $1/V_B f$  ( $1/A$ )

**Deux cas se présentent :**

- Premier cas : Lorsque l'ordonnée est positif par rapport au point d'intersection :

- Si  $K'_A < K_A$ , la fixation de B augmente l'affinité de EB pour A
- Si  $K'_B < K_B$ , la fixation de A augmente l'affinité de EA pour B

Et donc on obtient une fixation **dépendante positive** car la fixation du premier substrat facilite la fixation du second substrat.

- Deuxième cas : Lorsque l'ordonnée est négatif par rapport au point d'intersection :

- Si  $K'_A > K_A$ , la fixation de B diminue l'affinité de EB pour A
- Si  $K'_B > K_B$ , la fixation de A diminue l'affinité de EA pour B

**2.2.2. Association indépendante :**

Dans le cas d'une fixation indépendante :  $K_A = K'_A$  et  $K_B = K'_B$

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} = \frac{[EB][A]}{[EAB]}$$

$$K_B = \frac{[E][B]}{[EB]} = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]} \right)$$

$$\frac{1}{v} \text{ en fonction de } \left( \frac{1}{A} \right): \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[A]} \left( K_A + \frac{K_A K_B}{[B]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{K_B}{[B]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Figure 5})$$

$$\frac{1}{v} \text{ en fonction de } \left( \frac{1}{B} \right): \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[B]} \left( K_B + \frac{K_A}{[A]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{K_A}{[A]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Figure 7})$$

Représentations graphiques :

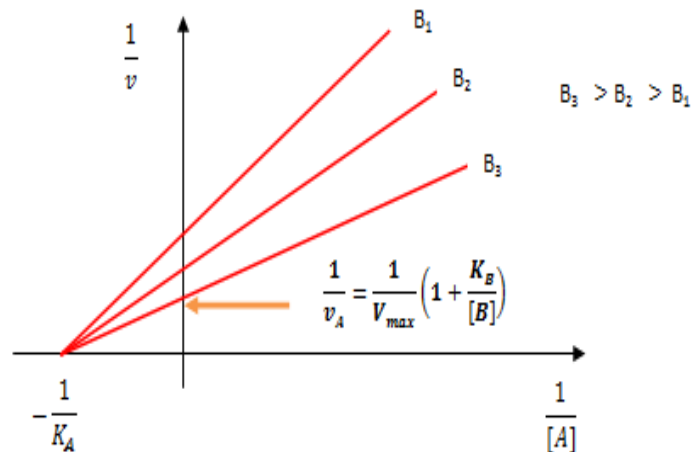
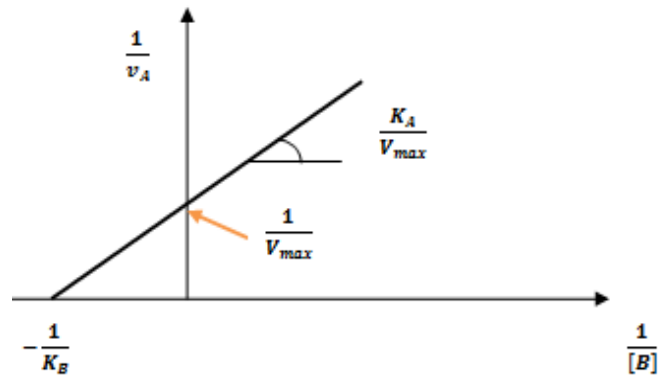


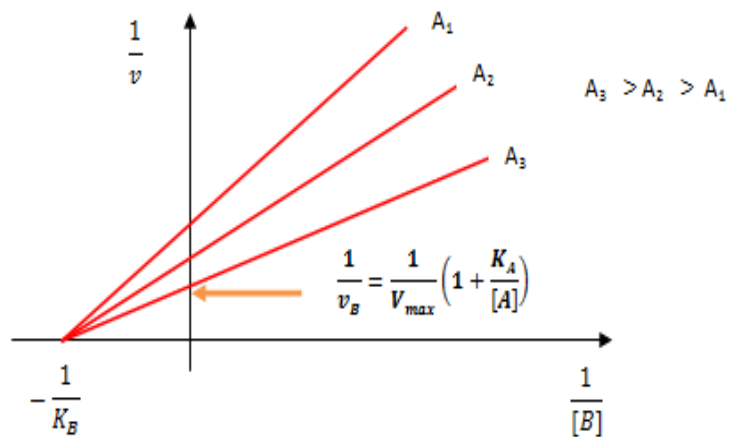
Figure 5. Représentation Primaire :  $1/v$  f ( $1/A$ )

Une représentation secondaire (**Figure 6**) est effectuée depuis les points d'intersection avec l'axe des ordonnées dans la figure 5 et permet de tracer le graphe selon l'équation :

$$\frac{1}{v_A} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[A]} \left( 1 + \frac{K_B}{[B]} \right)$$



**Figure 6.** Représentation secondaire  $1/v_A f(1/B)$

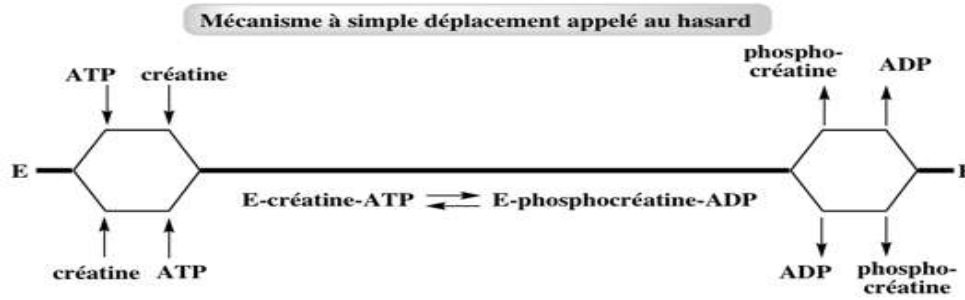


**Figure 7.** Représentation primaire  $1/v f(1/B)$

### Exemple d'enzymes

- la créatine kinase (E.C. 2.7.3.2). Il s'agit d'un mécanisme Bi Bi au hasard.



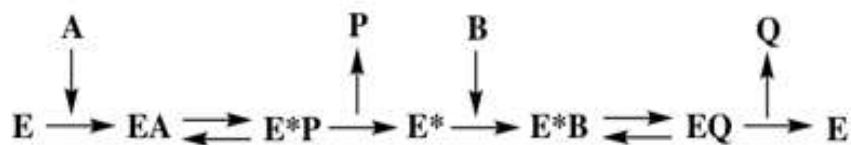


### 3. Réactions à double déplacements impliquant la formation d'un complexe binaire

Certaines réactions du métabolisme impliquant deux substrats se produisent sans que la réaction nécessite la formation d'un complexe ternaire. C'est le cas de beaucoup de réaction de transfert de groupes qui mettent en jeu la formation de complexes binaires.

#### 3.1. Mécanisme Pin-Pong (appartient aux réactions ordonnées)

C'est un mécanisme séquencé, l'enzyme se complexe d'abord avec ce 1<sup>er</sup> substrat qui subit une première transformation avec libération du premier produit (P) puis elle s'effectue la 2<sup>ème</sup> association de l'enzyme avec le second substrat et le complexe formé est toujours binaire. Le second produit et l'enzyme sont libérés.



Si on considère uniquement la réaction dans le **sens de gauche à droite** et on se place dans les conditions initiales qui permettent de négliger la réaction inverse, on aboutit à l'équation suivante :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} \right)$$

$\frac{1}{v}$  en fonction de  $\left(\frac{1}{A}\right)$ : Figure 8

$\frac{1}{v}$  en fonction de  $\left(\frac{1}{B}\right)$ : Figure 9

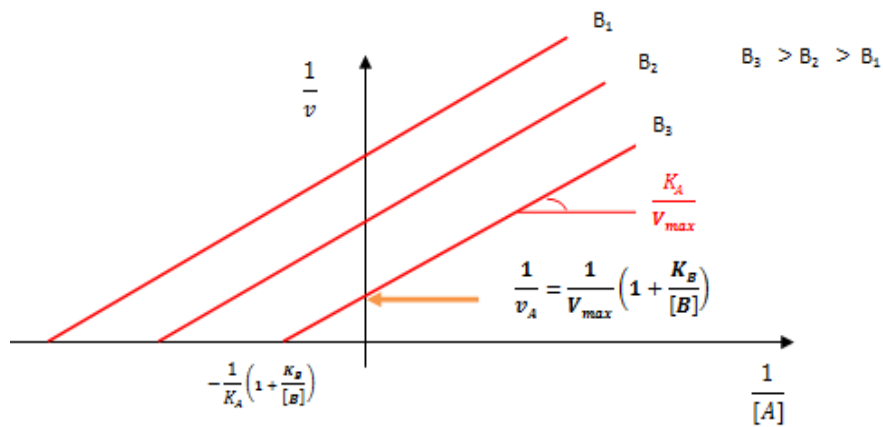


Figure 8. Représentation primaire  $1/v$  f ( $1/A$ )

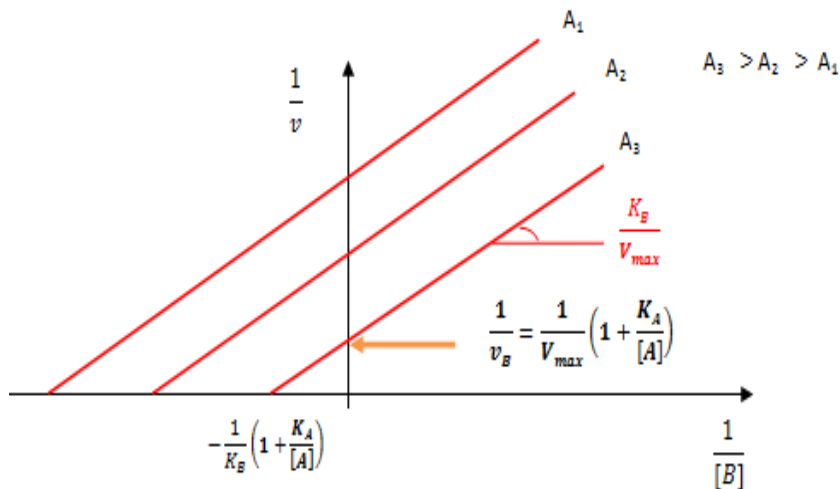
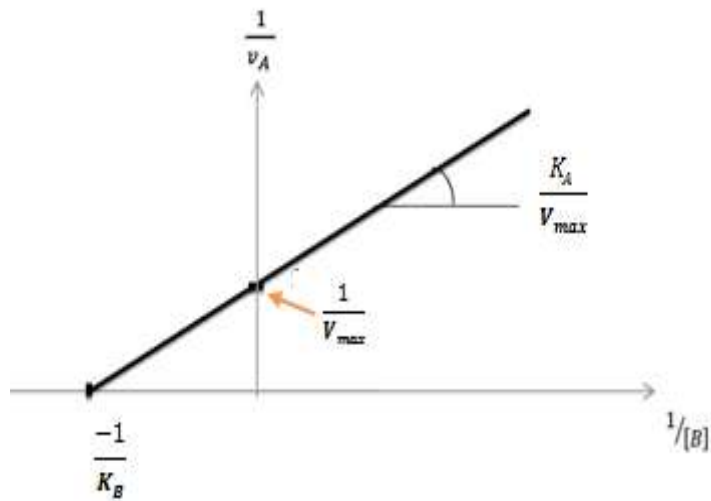


Figure 9. Représentation primaire  $1/v$  f ( $1/B$ )

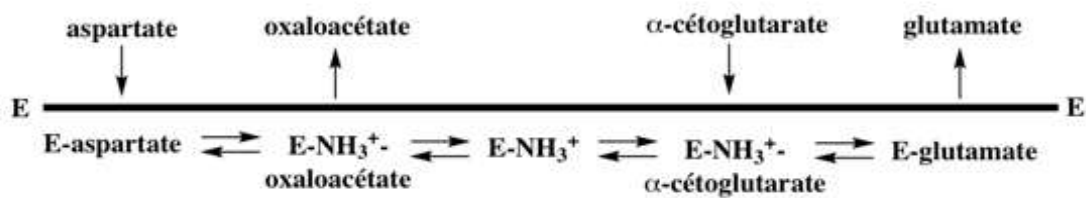
Si on porte  $1/v_A = f(1/B)$ , on obtient la représentation secondaire (**Figure 10**), celle-ci permet de mesurer :  $V_{max}$  et  $K_B$



**Figure 10.** Représentation secondaire  $1/v_A f(1/B)$

### Exemple d'enzyme

- les aminotransférases : mécanisme Ping- Pong (figure ci-dessous)



## Chapitre 5 : Effet du pH sur l'activité enzymatique

### Introduction

Le  $H^+$  est l'effecteur général de la réaction enzymatique. La concentration en  $H^+$  détermine le pH du milieu. Ce dernier affecte les paramètres cinétiques des enzymes et les paramètres conformationnels des protéines qui sont très sensibles aux variations de pH.

Les mesures de nombreuses activités enzymatiques en fonction du pH donnent des courbes qui passent par un maximum montrant l'existence d'un pH optimum, donc pour beaucoup d'enzymes, le pH optimal a été déterminé.

Le pH peut avoir différents effets:

- L'ionisation des résidus de l'enzyme, du substrat et du produit
- La structure tertiaire des protéines et donc la stabilité de l'enzyme
- La liaison du substrat à l'enzyme
- Un effet sur l'activité catalytique elle-même

### 1. Action du pH sur la conformation de l'enzyme

Les différents groupements chimiques ionisables qui sont présents dans une protéine peuvent être **protonés** ou **déprotonés** suivant le pH. Il est fréquent que les enzymes se dénaturent en milieu très acide ou au contraire très alcalin, cet effet entraîne un changement de la structure tridimensionnelle et la perte de l'activité est due en partie à une variation de la charge globale.

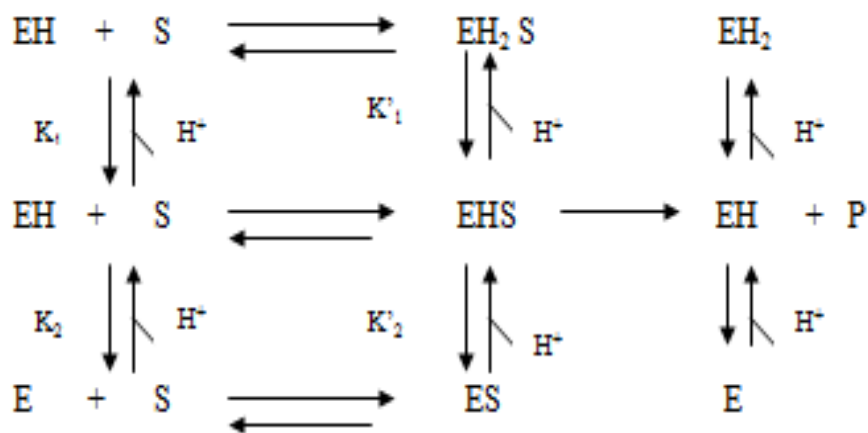
L'action du pH ( $H^+$  ou  $OH^+$ ) entraîne souvent une dénaturation réversible. Aux pH extrêmes, la dénaturation est irréversible. Le changement de structure lié au pH et entraînant la perte de l'activité catalytique est parfois dû à la protonation ou à la déprotonation d'un seul groupe de la protéine. C'est le cas de la trypsine où la structure active met en jeu une interaction électrostatique  $COO^- \dots NH_3^+$ .

## 2. Action du pH sur les paramètres cinétiques

Le pH a un effet sur les paramètres  $V_{\max}$  et  $K_M$  de la réaction. Cela peut résulter de l'ionisation de l'enzyme ou du substrat ou les deux molécules.

Dans les études cinétiques, on ne tient pas compte de l'ionisation du substrat si elle existe, on tiendra compte seulement de l'ionisation de l'enzyme.

La plupart des effets de pH sur les réactions enzymatiques résultent d'un effet à la fois sur  $V_m$  et  $K_m$ . Il semble seule une des formes ionique de l'enzyme ou d'une partie des formes ioniques de l'enzyme soit catalytiquement active c'est la forme EH (**Figure 1**):



**Figure1.** Schéma simplifié où un seul complexe intermédiaire intervient (le complexe de Michaelis EHS)

$K_1$  : Constante de protonation de l'enzyme libre

$K_2$  : Constante de déprotonation de l'enzyme libre

$K'_1$  : Constante de protonation du complexe ES

$K'_2$  : Constante de déprotonation du complexe ES

$K_1$ ,  $K_2$ ,  $K'_1$  et  $K'_2$  représentent les différentes constantes d'ionisation de l'enzyme libre et du complexe de Michaelis. Seule la forme EHS donne le produit.

### Equation de vitesse

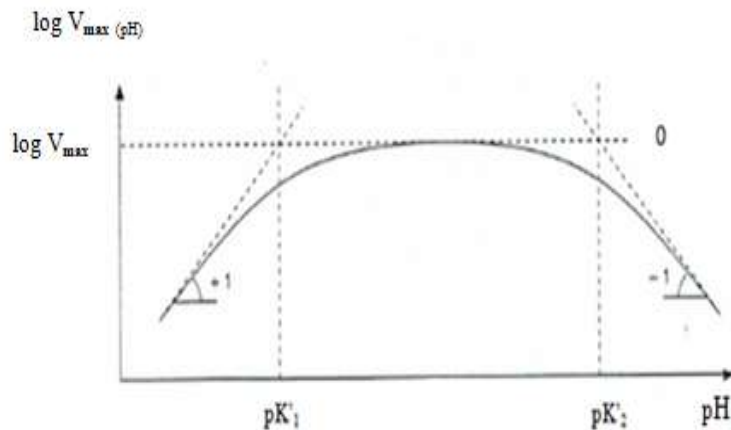
La vitesse est proportionnelle à la quantité du complexe intermédiaire. Pour étudier le comportement catalytique d'une enzyme en fonction du pH, nous travaillons avec une

concentration saturante en substrat, on mesure donc  $V_{max}$  apparent. C'est un  $V_{max}$  mais qui n'est qu'apparent : c'est la vitesse la plus grande mesurable.  $V_{max}$  est donnée par l'équation suivante :

$$V_{max(pH)} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_1} + \frac{K'_2}{[H^+]}}$$

### 2.1. Effet du pH sur $V_{max}$ : ( $V_{max}=f(pH)$ )

L'étude des variations de  $V_{max(pH)}$  permet de déterminer  $K'_1$  et  $K'_2$ , la méthode utilisée est celle de DIXON ( $\log V_{max(pH)}$  en fonction du pH,  $pH = \log [H^+]$ ). La courbe expérimentale est tangente à trois segments de droites, de pentes respectives +1, 0, -1 (**Figure 2**).



**Figure2. Représentation graphique de  $\log V_{max}$  en fonction du pH**

Si  $pK'_1$  et  $pK'_2$  sont suffisamment séparés, les intersections de ces trois segments de droites permettent de définir  $pK'_1$  et  $pK'_2$ .  $V_{max}$  dépend de l'ionisation du complexe de Michaelis.

L'intérêt de la méthode de Dixon est qu'elle permet de déterminer aux pH extrêmes, le nombre de groupes dont la protonation ou la déprotonation entraîne une perte de l'activité enzymatique.

### 2.2. Effet du pH sur $K_M$ ( $K_M=f(pH)$ )

La valeur du  $K_M$  en fonction du pH présente une variation plus complexe, car elle dépend à la fois des  $pK$  d'ionisation des groupes dans l'enzyme libre ( $pK_1$ ,  $pK_2$ ) et dans le complexe de Michaelis ( $pK'_1$ ,  $pK'_2$ ). Les paramètres cinétiques sont donnés par l'équation suivante :

$$K_{M(pH)} = K_M \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_1} + \frac{K'_2}{[H^+]}}$$

$pK = \log K_M$ , si  $pK_1$  et  $pK'_1$  sont suffisamment séparés de  $pK_2$  et  $pK'_2$ , l'expression de  $K_{M(pH)}$  se simplifie en milieu acide comme en milieu alcalin (**Figure 3**) :

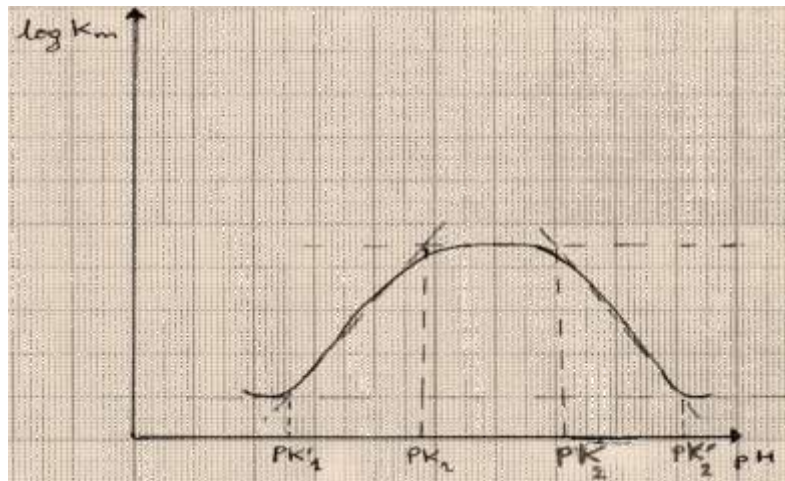


Figure3. Représentation graphique de  $\log K_M$  en fonction du pH

### 2. 3. Effet du pH sur le rapport ( $V_{max}/K_M$ )

$(V_{max}/K_M)_{pH}$  dépendent que de l'ionisation de l'enzyme libre et la courbe de  $(V_{max}/K_M)$  en fonction du pH est représentée dans la figure 4 et l'équation est comme suit :

$$\frac{V_{max(pH)}}{K_{M(pH)}} = \frac{V_{max}}{K_M} \times \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}}$$

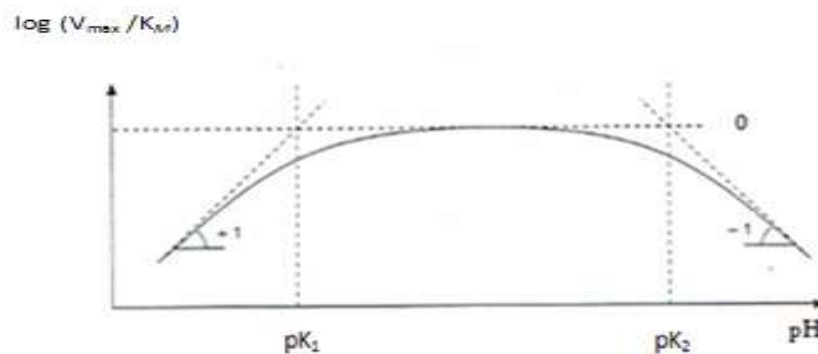


Figure4. Représentation graphique de  $\log V_{max}/K_M$  en fonction du pH

## Chapitre 6 : Effet de la température sur l'activité enzymatique

### 1. Quelques notions de thermodynamiques

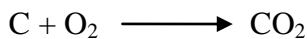
La thermodynamique est l'étude d'un système au cours de son évolution en fonction des échanges mécaniques et thermiques avec le milieu extérieur (**Figure 1**).

**H** : l'enthalpie est une fonction d'état, elle s'exprime en joule et le mot est d'origine grec qui veut dire chaleur présente dans une molécule

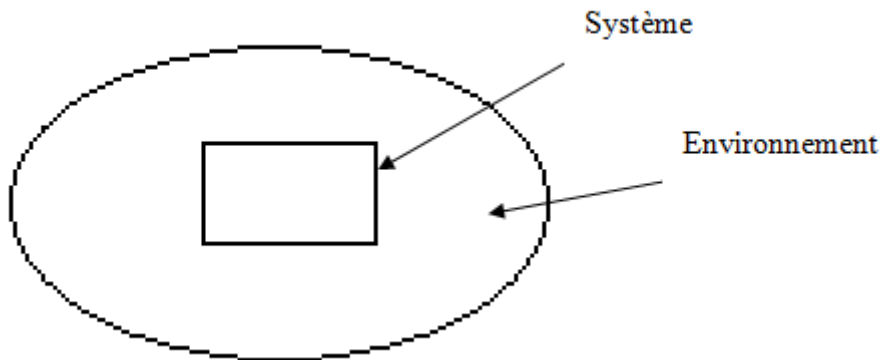
**$\Delta H$**  : variation d'enthalpie, elle rend compte des variations de chaleur entre le système où se déroule la réaction (partie étudiée) et le milieu environnant (partie restante)

Les réactions chimiques sont soit exothermiques (la chaleur est dégagée vers le milieu environnant) et donc  $\Delta H$  est négatif et c'est le cas le plus général, soit endothermique et la variation d'enthalpie est positive, c'est-à-dire que la système le absorbe la chaleur

Exemple :



Avec dégagement de chaleur,  $\Delta H = - 393,51 \text{ kJ}$



**Figure 1.** Les échanges mécaniques et thermiques entre le système et le milieu extérieur

**$\Delta G$**  : variation d'énergie libre, elle représente l'énergie que le système est libre d'utiliser pour produire du travail

Soit la réaction suivante :



**S** : contient une quantité d'énergie dite  **$H_S$**

**P** : contient une quantité d'énergie dite  **$H_P$**



$$\Delta H = H_P - H_S \text{ (Figure 2)}$$

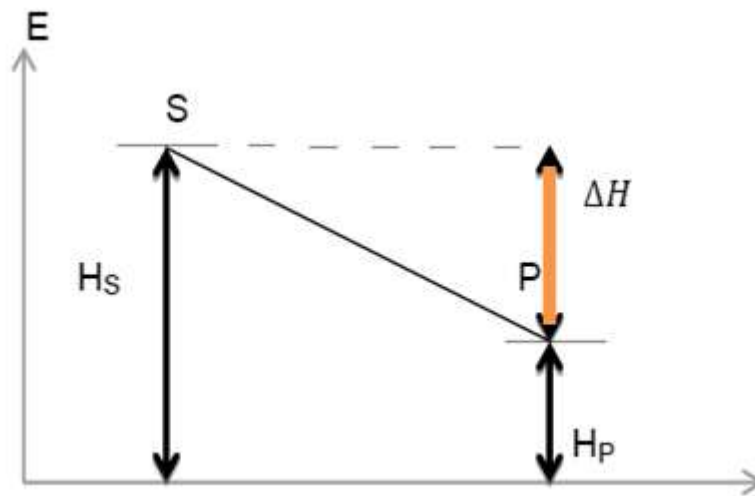
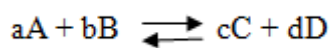


Figure 2. Bilan énergétique d'une réaction

En thermodynamique, un processus est défini comme la variation d'une des propriétés du système. Quand de la chaleur, du travail ou de la matière sont échangés entre le système et son environnement, le système évolue de son état d'équilibre initial vers un nouvel état d'équilibre

## 2. Effet de la température sur les constantes d'équilibre

Soit la réaction suivante :



$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln K$$

Lorsque l'équilibre est atteint :  $\Delta G = 0$  et donc

$$\Delta G = - RT \ln K$$

R : constante des gaz universelle,  $R = 1,987 \text{ kcal/mol}$

T : température (Kelvin)

K : constante d'équilibre

La variation d'énergie libre, entropie et enthalpie sont liés par la relation suivante (fonction de Gibbs) :

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0$$

$\Delta G^0$ : est la variation d'énergies libres standard ou énergie de Gibbs. Elle est associée au principe d'évolution des systèmes physico-chimiques lorsqu'on travaille à pression et à volume constant ce qui est le cas de la plus part des réactions enzymatiques étudiées et tous les composés sont dans leur état standard

$\Delta S$  : entropie, un terme introduit par Rudolf Clausius en 1865 à partir d'un mot grec signifiant « transformation », il caractérise le degré de désorganisation du système. L'entropie permet de mesurer le degré de dispersion de l'énergie (thermique, chimique ou électrique) à l'intérieur d'un système.

L'étude des variations de  $\ln K$  en fonction de la température permet de calculer les paramètres thermodynamiques selon l'équation de Vant' Hoff (**Figure3**).

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

$$\frac{d \ln K}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H}{R}$$

Représentation graphique :

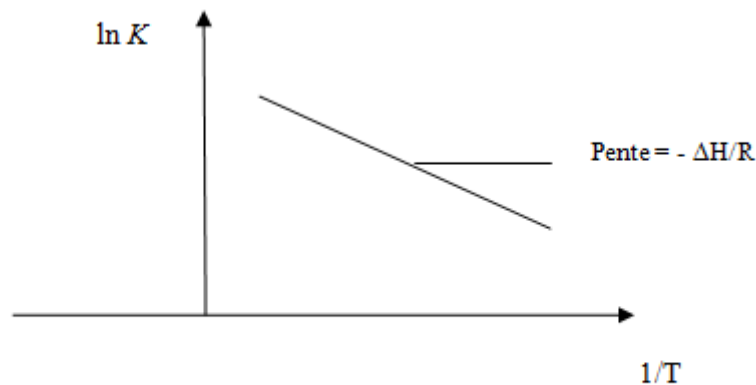


Figure 3. Représentation de la variation de  $\ln K$  en fonction de  $1/T$

## 2.1. Effet de la température sur la vitesse de la réaction

### 2.1.1. Définition du $Q_{10}$

$Q_{10}$ : est le facteur de croissance de la vitesse d'une réaction enzymatique lorsque la température augmente de  $10^{\circ}\text{C}$ , ce facteur croit de l'ordre de 2 à 3 par intervalle de 10

### 2.1.2. Théories expliquant le mécanisme de réactions

Il y'a deux théories qui permettent d'expliquer le mécanisme de réactions, la théorie des collisions et la théorie des vitesses absolues :

#### a/Théorie des collisions

C'est une théorie au hasard. L'énergie d'activation est fournie par la collision entre les molécules réagissantes. Le nombre de collisions croit avec la température mais de façon très faible qui n'explique pas l'augmentation de la vitesse de la réaction, par contre l'énergie des collisions croit de manière importante et elle est justement à l'origine de l'augmentation de la vitesse

La fraction des molécules dont l'énergie est supérieure à  $\Delta G^*$  est calculée par l'équation de Boltzman

$$n = e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}}$$

Où  $\Delta G^*$  est l'énergie d'activation cinétique suffisante des molécules appelée aussi  $E_a^*$ . La vitesse de la réaction est donnée par la loi d'Arrhenius

$$v = p \times Z e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Où Z : représente le nombre de collisions par unité de temps et de volume à une température donnée

P : la fraction de molécule déclenchant la réaction

P-Z : est un facteur non mesurable, il est remplacé par le facteur A qui est désigné comme une constante du système. A l'échelle logarithmique, l'équation s'écrit comme suit :

$$\ln v = \ln A - E_a^*/RT$$

Cette équation nous permet de tracer une courbe qui va être linéaire :  $\ln v$  en fonction de  $1/T$  (**figure 4**).

## Représentation graphique

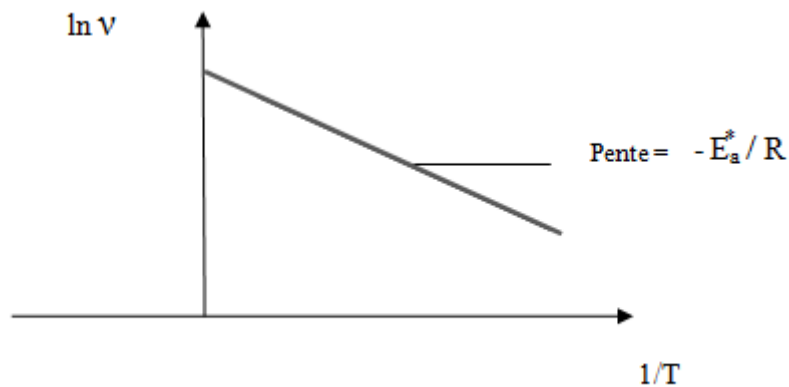


Figure4. Courbe de  $\ln v$  en fonction de  $1/T$

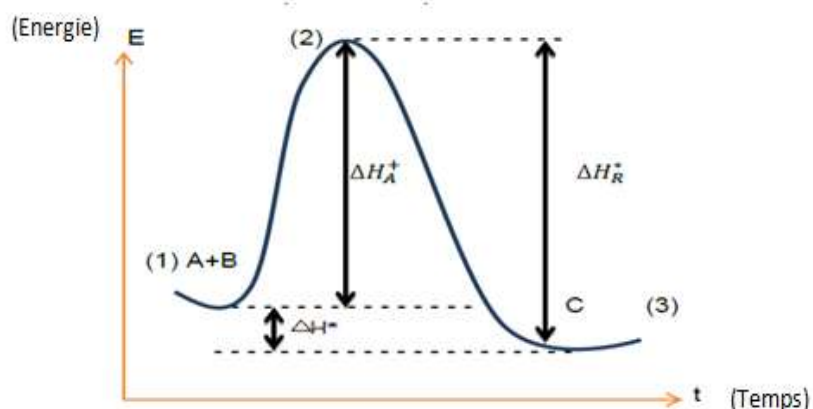
$E_a^*$  est reliée à l'énergie d'activation par l'équation :

$$\Delta H^* = E_a^* - RT \quad (\text{à partir de } E_a^* \text{ on calcul } \Delta H^*)$$

### b/Théorie des vitesses absolues

Cette théorie fait intervenir un intermédiaire qui est le complexe activé, ce dernier existe en équilibre avec les espèces réagissantes. La vitesse de la réaction dépend du nombre de molécules possédant un état énergétique suffisant. Le développement de cette théorie montre que la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du complexe activé, appelé aussi complexe de transition.

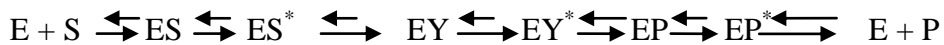
La réaction :  $A + B \longrightarrow C$  peut être représentée comme suit :



- (1) état initiale
- (2) état intermédiaire
- (3) état finale

$\Delta H^*$  : variation d'enthalpie libre de la réaction

Dans les réactions enzymatiques E+S donne plusieurs complexes



La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du complexe activé et le facteur de proportionnalité est identique pour toutes les réactions :

**k: Constante de BOLTZMANN**

**h: Constante de PLANK**

$$D'où: v = \frac{k T}{h} [\text{complexe activé}]$$

$$k_R = \frac{k T}{h} \times K^*$$

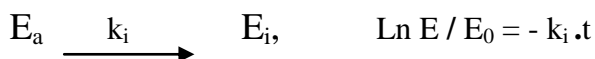
$$\Delta G^* = -R T \ln K^*$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^*$$

A partir des variations de  $\ln K^*$  en fonction de la température, on pourra déterminer  $\Delta H^*$  et  $\Delta S^*$

## 2.2. Dénaturation thermique des enzymes

La dénaturation thermique suit souvent une cinétique d'ordre 1



$k_i$  : est la constante d'inactivation

$E_a$  : enzyme actif  $E_i$  : enzyme inactif

$E$  : est l'activité enzymatique en temps  $t$

$E_0$  : est l'activité enzymatique enzyme en temps  $t_0$ .

En pratique, on suit l'activité résiduelle de l'enzyme après différents temps de chauffage

La représentation graphique  $\ln E / E_0 = f(t)$  permet d'avoir la pente  $-k$  (Figure 5).

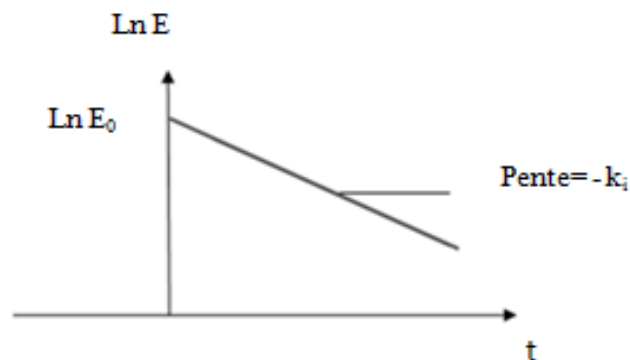


Figure5. Courbe de  $\ln E$  en fonction du temps  $t$

## Chapitre 7 : Enzymes allostériques

### (Régulation enzymatique)

#### Introduction

Lorsqu'une protéine possède plusieurs sites de fixation pour un ligand, la saturation par ce ligand peut être Michaelienne ou non. Un comportement Michaelien est obtenu lorsque les sites sont équivalents et indépendants ; la courbe de la vitesse  $v$  en fonction de la concentration en substrat  $S$  suit alors une loi hyperbolique. Les enzymes allostériques ne suivent pas la cinétique classique de Michaélis, la courbe  $v=f(S)$  n'est pas hyperbolique mais sigmoïde (**Figure1**). Ces enzymes jouent un rôle important dans la régulation métabolique ; ce sont des enzymes-clés. Les sites de régulation allostérique sont des sites de liaison distincts du site actif (site catalytique) qui peuvent interagir avec des molécules de l'environnement cellulaire, appelées dans ce cas effecteurs allostériques. (allostérie = autre structure)

*allos* provient du grec et signifie « autre » : autre site qui fixe un ligand allostérique capable de moduler la vitesse de la réaction

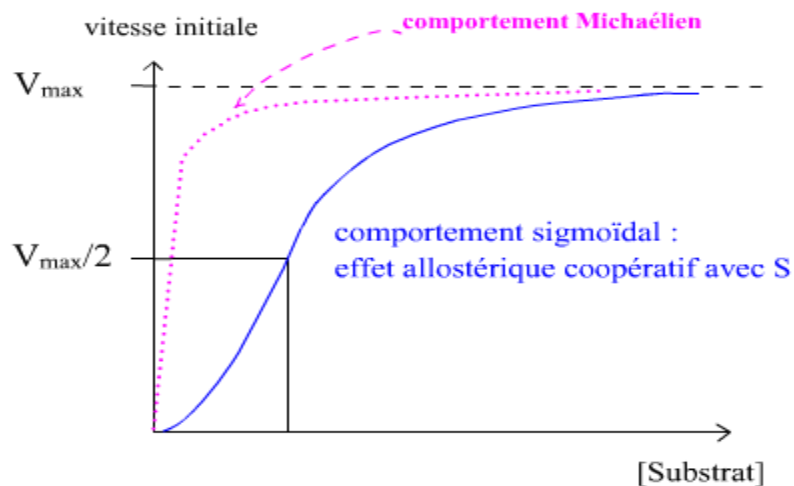
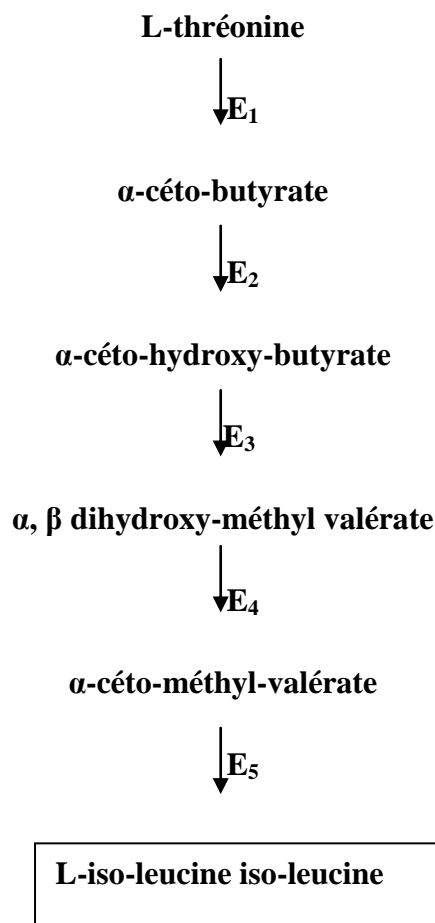


Figure1. Courbe  $v = f[S]$  avec un comportement Michaelien pour l'un et allostérique pour l'autre

## 1. Propriétés d'autorégulation des systèmes enzymatiques

Certains systèmes multi-enzymatiques possèdent la capacité d'autorégulation. Dans la régulation allostérique, un métabolite de la voie réactionnelle peut se fixer de façon non-covalente à l'enzyme et ainsi moduler son activité catalytique. Ainsi, dans ces systèmes multi-enzymatiques, le produit final de la chaîne de réactions sert d'inhibiteur spécifique à une enzyme du début de la chaîne. La rétro inhibition (feedback négatif ou inhibition par le produit final) a été mise en évidence dans de nombreux systèmes poly enzymatiques où le produit final de la réaction peut inhiber spécifiquement un enzyme se trouvant au début de la séquence réactionnelle. Tel que l'exemple dans les séquences réactionnelles de synthèse d'un aminoacide, l'isoleucine à partir de la thréonine. La première étape de la séquence réactionnelle est appelée étape déclenchante car une fois qu'elle a lieu toutes les autres se réalisent. La **rétro inhibition** est donc un phénomène d'inhibition spécifique d'un enzyme placé en début de séquence métabolique, par le produit final de séquence réactionnelle. Ce type d'enzyme inhibé par le produit final de la réaction est appelé : **enzyme allostérique**.

### Exemple de la conversion de la L-thréonine en iso-leucine qui se fait en 5étapes



$E_1$  est la thréonine désaminase ; L-iso-leucine agit selon un *Feed back* ou par **rétro-inhibition**. Dans l'exemple,  $E_1$  qui est le premier enzyme dans le « système enzymatique autorégulé » est inhibé par le produit final (L-iso-leucine) du système enzymatique :  $E_1$  est un **régulateur** ou **enzyme allostérique** et l'inhibiteur est un **modulateur** ou **effecteur**, dans ce cas il est négatif.

## 2. Propriétés et classification des enzymes de régulation

### 2.1. Propriétés

Les enzymes de régulation appelés aussi enzymes allostériques (terme proposé par Monod, et Changeux) possèdent un poids moléculaire élevé et sont complexes et donc plus difficiles à purifier que les autres enzymes. Ils ont souvent des propriétés inhabituelles : certains sont instables à 0° et stables à température ambiante. Tous les enzymes de régulation connus possèdent plus d'une chaîne polypeptidique, parfois plusieurs qu'on appelle aussi les **sous-unités**

### 2.2. Classification

D'après Monod Wyman et Changeux (1965), on distingue 3 groupes d'enzymes de régulation

1. Enzyme homotropiques : Le substrat dans ce groupe joue également le rôle de modulateur, il accélère l'activité enzymatique
2. Enzyme hétérotropiques : Ces enzymes sont stimulés ou inhibés par des substances de régulation inhabituelles et différentes du substrat, il s'agit d'effecteurs
3. Enzyme homo-hétérotropique : Dans ce groupe, les enzymes ont pour effecteurs le substrat et d'autres molécules

## 3. Cinétique des enzymes de régulation

### 3.1. Paramètres cinétiques et actions des modulateurs

Soit la cinétique en absence et en présence d'effecteurs (modulateurs) (**Figure2**), on obtient les courbes suivantes :



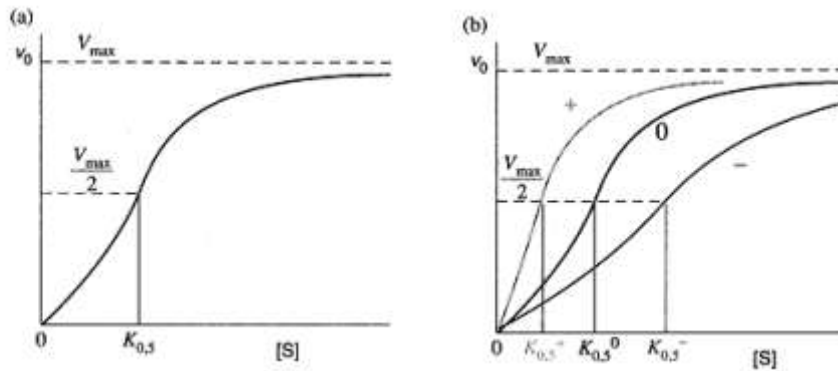


figure2. Courbes en absence et en présence des modulateurs où dans les cas :

- (a) : Courbe sigmoïdale donnée par un enzyme allostérique pour lequel le substrat sert également de modulateur positif (activateur).  $K_M$  est la concentration de substrat donnant la demi-vitesse maximale. Une augmentation relativement faible de la concentration du substrat augmente une forte augmentation de la vitesse de la réaction.
- (b) : Les effets d'un modulateur (+), d'un modulateur inhibiteur (-) et d'absence de modulateurs sur un enzyme allostérique

Les enzymes soumis à ce type de contrôle d'activité présentent des caractéristiques communes :

- La relation entre l'activité enzymatique et la concentration du substrat et la concentration d'un effecteur n'est pas de type hyperbolique. Le contrôle de type allostérique donne des courbes sigmoïdes.
- Ces enzymes peuvent être inhibés ou activés par des métabolites autres que les substrats ou leurs analogues.
- La coopérativité au niveau de la courbe montre que la liaison d'une molécule de substrat facilite relativement la fixation de la seconde.
- Des interactions coopératives sont également observées dans la fixation d'effecteurs allostériques, ce qui suggère que les enzymes allostériques renferment plus qu'un site allostérique par molécule.

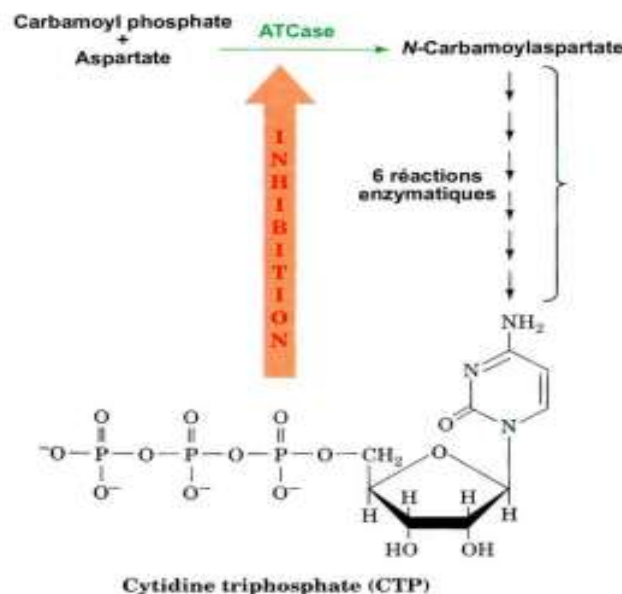
### 3.2. Désensibilisation

La capacité des enzymes de régulation d'être activés ou inhibés par des modulateurs spécifiques peut disparaître sans altérer l'activité catalytique. Ceci est obtenu après traitement de l'enzyme par un agent chimique ou thermique, ce qui entraîne des modifications du site de l'effecteur. L'enzyme est dite désensibilisée, parfois de manière irréversible. Seul, le site allostérique est détruit ; il en résulte une perte du phénomène de coopérativité et la cinétique devient hyperbolique.

La désensibilisation est dans certains cas provoquée par une mutation génétique ; celle-ci entraîne alors la synthèse d'un enzyme ayant perdu la sensibilité à l'effecteur.

**Exemple : L'ATCase** possède deux substrats catalytiques (l'aspartate ou  $S_1$  et le carbamoyl-P ou  $S_2$ ) et deux effecteurs (l'ATP ou  $F_1$  comme activateur et le CTP ou  $F_2$  comme inhibiteur).

La réaction catalysée par l'ATCase appartient à la voie de synthèse des pyrimidines, c'est la première étape dans la cascade de synthèse du nucléotide CTP (**Figure 3**):



**Figure. 3** Schéma illustrant la synthèse du nucléotide CTP

Une régulation allostérique (rétro-inhibition) par le nucléotide CTP. Le CTP réduit le taux de catalyse. Les activités de l'ATCase en présence et en absence d'effecteurs puis après l'action du *para*-chloromercuribenzoate (*p*CMB) donnent les courbes suivantes (**Figure 4**):

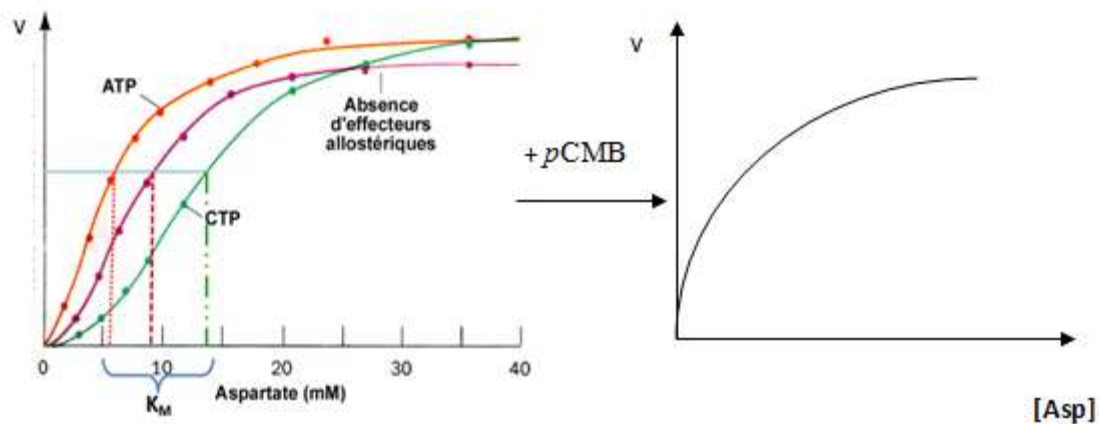


Figure4. L'ATCase en présence et en absence d'effecteurs puis après l'action du (pCMB)

Les effecteurs peuvent entraîner à la fois le changement de  $K_M$  et de  $V_{max}$ . L'action du pCMB sur l'ATCase entraîne la fixation du mercure sur les cystéines de l'enzyme et donc sa dénaturation, d'où le comportement michaelien. On constate également que le CTP et l'ATP n'agissent plus sur l'enzyme.

### 3.3. Coopérativité

La coopérativité traduit le fait que la fixation sur l'enzyme d'une molécule d'un effecteur allostérique (exemples: activateur allostérique (A) et inhibiteur allostérique (I)) influe sur la fixation des molécules suivantes.

Dans le cas de coopérativité en présence du substrat (sigmoïde de  $v=f(S)$ ), Si l'effecteur allostérique est le substrat lui-même on parle de **modulation homotrope**.

Si l'effecteur est différent du substrat on parle de **modulation hétérotrope**. Dans une **coopérativité positive**, une molécule d'un effecteur entraîne l'augmentation de l'affinité pour les mêmes molécules et vice versa pour une **coopérativité négative**.

Les enzymes allostériques sont des oligomères ayant un axe de symétrie ; le nombre des unités étant un nombre pair. La coopérativité exprime l'interaction entre les unités. Celle-ci peut être positive ou négative

**La coopérativité positive** : lorsque l'amorce d'un phénomène **accélère** la suite

**La coopérativité négative** : lorsque l'amorce d'un phénomène **décélère** la suite

### 3.3.1. Nombre de Hill

Pour mesurer la cinétique, on ne peut plus utiliser l'équation de Michaélis-Menten, aussi on utilise la formule empirique que Hill a déterminée lors des études sur l'hémoglobine en 1910. Cette équation exprime la fraction des sites occupés en fonction de la concentration en substrats. Elle permet de déterminer le type de coopérativité au niveau de la liaison E-S.

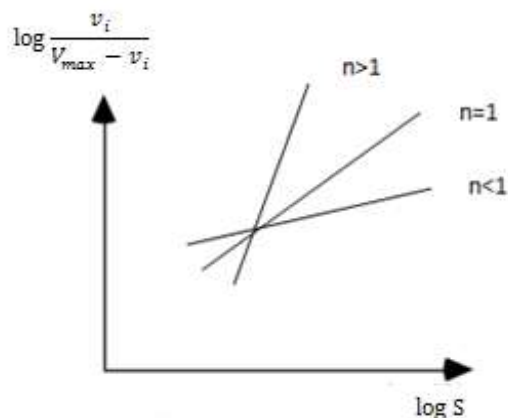
Equation de Hills: sites liés / sites totaux =  $[ES] / [Et] = [S]^n / (K + [S]^n)$  où **n** et **K** sont des constantes. Pour faire une analogie avec l'équation de Michaélis-Menten, on utilise le fait que

$$v_i = k_{cat}[ES].$$

Donc le nombre de Hill exprime la coopérativité d'une enzyme allostérique. Il est calculé à partir de la transformée de Hill qui s'écrit comme suit :

$$\log \frac{v_i}{V_{max} - v_i} = n \cdot \log S - \log K_M$$

La transformée de Hill permet de tracer la courbe de  $\log \frac{v_i}{V_{max} - v_i}$  en fonction de **S** (**Figure 5**) et donc de calculer **n** et **K<sub>M</sub>**



**Figure5. La représentation de la transformée de Hill**

L'intérêt de ce graphique est de permettre de déterminer le type de coopération grâce à la pente **n**

- si  $n = 1$ , la coopérativité est nulle, la cinétique de l'enzyme est michaelienne
- si  $n > 1$ , la coopérativité est positive ; dans ce cas  $1 < n < N$  ( $N$  étant le nombre de sous-unités)
- si  $n < 1$ , la coopérativité est négative.

#### 4. Mécanisme de régulation

La question que l'on peut se poser est « comment la fixation d'un modulateur sur le site spécifique régule l'activité catalytique lorsque le site de fixation du modulateur est éloigné du site catalytique et peut être situé sur une autre chaîne polypeptidique ? ».

Plusieurs théories ont été développées, toutes ont aboutis à la conclusion suivante :

**La fixation d'un modulateur (effecteur) sur son site de fixation entraîne un changement conformationnel de la structure tridimensionnelle de la molécule enzymatique.**

##### 4.1. Théorie de MONOD-WYMAN et CHANGEUX (MWC)

###### 4.1.1. Formes R et T

L'enzyme existe sous deux formes  $R_0$  et  $T_0$  en équilibre. Lorsque E est sous l'une des deux formes, les sites de fixation du ligand sont équivalents et indépendants. **La cinétique de fixation est michaelienne.**

Si un ligand a plus d'affinité pour une des deux formes (exp R), il se fixe de préférence sur R ; la concentration de  $R_0$  diminue alors que celle de  $R_1$  augmente. Cela entraîne un déplacement de l'équilibre de  $T_0$  vers  $R_0$  pour le maintenir à son état initial. Donc les formes R augmentent, d'où la coopérativité qui intervient lors de la fixation de ligand. Lorsque l'équilibre est presque **entièrement déplacé vers R**, les sites deviennent équivalents et indépendants ; **l'enzyme se comporte alors de façon michaelienne.**

###### 4.1.2. Modèles K et V

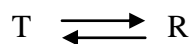
- **Le modèle K** : suppose que le substrat présente plus d'affinité pour une des deux formes que pour l'autre (par définition R), les  $K_M$  des deux formes sont différents
- **Le modèle V** : suppose que le substrat possède la même affinité pour les deux formes R et T. S ne se comporte plus comme un effecteur allostérique. La cinétique est michaelienne.

Les propriétés allostériques de l'enzyme sont mises en évidence par l'addition d'effecteurs allostériques.

#### 4.1.3. Développement théorique

La transition allostérique modifie les forces de liaisons qui associent les sous-unités entre elles sans aller à l'état de dissociation. La molécule entière se trouve soit dans un état contraint (**T**) soit dans un état relâché (**R**).

Deux modèles rendent compte de la transition que présentent les enzymes allostérique au moment de la fixation du substrat : le model **concerté** (ou symétrique) (élaboré par Monod, Wyman et Changeux en 1965) et le model **séquentiel** (élaboré par Koshland en 1966). Ces deux modèles impliquent que l'enzyme existe sous plusieurs conformations dont deux extrêmes : T (*tense*) et R (*relaxed*). Ce dernier a pour le substrat une affinité plus marquée que T. Les deux formes existent en équilibre.



- Dans le modèle concerté, la transition se fait en un seul bloc. Elle concerne simultanément toutes les sous-unités (**Figure 6**). Toutes les sous-unités d'un enzyme doivent conserver la symétrie moléculaire, et, par conséquent, elles sont toutes en même temps au même état T ou R, à un moment précis. L'enzyme global existe donc sous forme T ou R, puisque c'est seulement dans cette configuration qu'il y a la conservation de symétrie par toutes les sous-unités. Ainsi, la fixation du substrat dans un premier site actif provoque une transition telle que toutes les sous-unités de l'enzyme deviennent sous forme R, et ceci représente l'état de compétence catalytique. L'effecteur se lie à l'état T ou R de préférence et ainsi exerçant son rôle d'inhibiteur ou d'activateur.

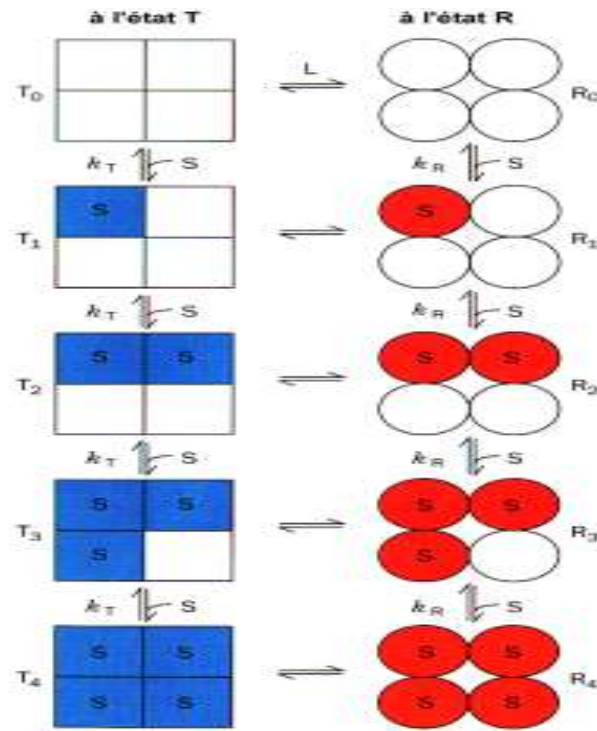


Figure 6. Transition en un seul bloc

-Dans le modèle séquentiel (**Figure 7**), la transition se fait sous-unités par sous-unités. Chaque sous-unité a la possibilité d'être sous forme R ou T, indépendamment des autres sous-unités. L'enzyme est constitué d'un mélange de sous-unités sous forme T et R. La liaison d'un premier substrat change la structure de la sous-unité à laquelle il s'est fixé (R), alors que les autres sous-unités acquièrent une affinité intermédiaire entre celle observée à l'état T et celles à l'état R. La liaison du ligand induit donc progressivement des changements conformationnels dans les sous-unités, les changements les plus importants se produisant au niveau des sous-unités qui ont lié le ligand. Le couplage entre les sous-unités n'est pas nécessairement assez fort pour préserver la symétrie de l'oligomère comme c'est le cas dans le modèle symétrique.

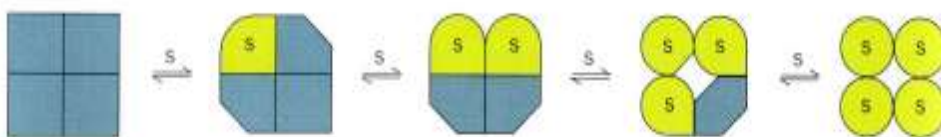


Figure 7. Transition sous-unités par sous-unités

#### 4.1.4. Modèle de l'hémoglobine :

L'hémoglobine est formée par l'association de 4 sous-unités protéiques : 2 sous-unités dites  $\alpha$  et 2 sous-unités dites  $\beta$ . La structure peut ainsi s'écrire  $\alpha_2\beta_2$ . Associée à chaque chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$ , on trouve une structure non protéique appelée hème. Chaque hème (4 au total, identiques) portant en son centre un ion  $\text{Fe}^{2+}$ . Ainsi, l'hémoglobine est une hétéroprotéine. L'hème est enchâssé dans un repli hydrophobe tout juste accessible à l' $\text{O}_2$ .

A l'état libre, la conformation de Hb  $\alpha_2\beta_2$  est ainsi faite que le site pour l' $\text{O}_2$  de chacune des 2 chaînes  $\beta$  est inaccessible. Les chaînes  $\alpha$  présentent en revanche un accès à l' $\text{O}_2$ . Même s'il est très étroit cet accès existe : l'affinité pour l' $\text{O}_2$  pour les chaînes  $\alpha$  est faible.

Si une première molécule d' $\text{O}_2$  se fixe sur une chaîne  $\alpha$ , elle va induire un mouvement conformationnel global, comme on l'a vu ci-dessus. Et en fait ce mouvement va se répercuter essentiellement sur la deuxième chaîne  $\alpha$  qui va voir son affinité pour  $\text{O}_2$  fortement augmentée. Quand les 2 chaînes  $\alpha$  ont lié chacune un  $\text{O}_2$ , l'induction de changement conformationnel fait passer les 2 chaînes  $\beta$  en conformation à très haute affinité pour  $\text{O}_2$ . L'Hb se sature alors en  $\text{O}_2$

**D'où l'énoncé :  $\text{O}_2$  exerce un effet coopératif positif sur sa propre fixation (l'affinité s'améliore avec la première fixation). La courbe sigmoïde de saturation est une conséquence directe de ce phénomène.**

La figure 8 montre la fonction de saturation de l'hémoglobine. Elle est comparée à celle de la myoglobine. La myoglobine est une protéine des cellules musculaires. Elle leur assure un stockage de dioxygène. La myoglobine est monomérique, formée par une chaîne polypeptidique de structure très voisine de celles des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine et cette chaîne polypeptidique est associée à un hème. La myoglobine lie évidemment le dioxygène.

Pour l'hémoglobine (Hb): 100% de saturation signifie 4  $\text{O}_2$  par Hb  $\alpha_2\beta_2$ . Pour la myoglobine (Mb) : 100% de saturation signifie 1  $\text{O}_2$  pour une Mb.

La courbe de saturation de Mb est une hyperbole classique. La courbe de saturation de Hb possède **une allure sigmoïde**. Cette allure est **due à un effet coopératif**.



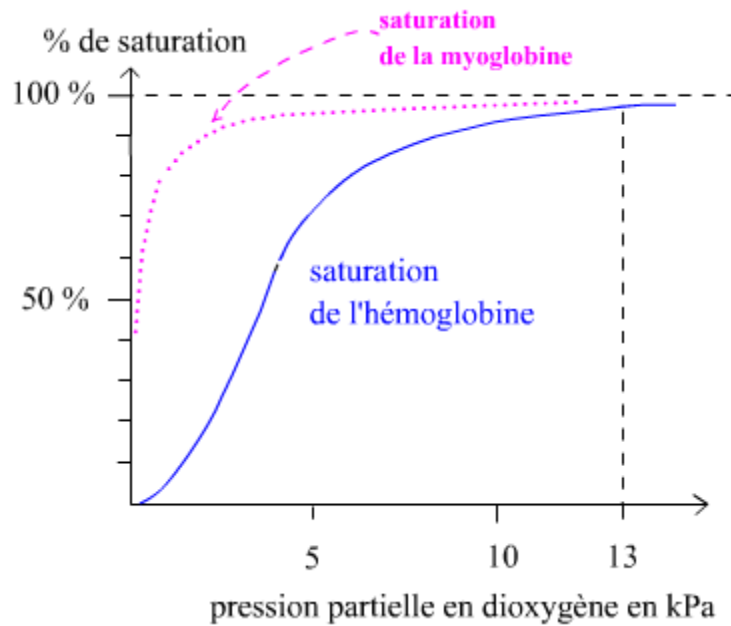


Figure 8. La fonction de saturation de l'hémoglobine et de la myoglobine

#### 4.2. Sites catalytiques et sites de régulation

##### Exemple de l'aspartate transcarbamylase (ATCase)

L'existence de sites catalytiques et sites régulateurs est illustrée par l'exemple de l'**aspartate transcarbamylase (ATCase)** d'*E. coli*.

L'enzyme fixe  $S_1$  et  $S_2$  sur une sous-unité dite **catalytique**, présente en 6 exemplaires, (unités  $\alpha$ ). Il fixe les effecteurs sur une autre sous-unité dite **effectrice**, présente également en 6 exemplaires (unités  $\beta$ ). L'enzyme comporte au total 12 unités ; il a pour formule  $\alpha_6 \beta_6$ , avec des  $MM^{\text{aire}}$  de 34000 pour l'unité  $\alpha$  et 17000 pour l'unité  $\beta$ .

L'action des effecteurs modifie l'équilibre entre T et R :

- $F_1$  a plus d'affinité pour R ; il entraîne le déplacement d'équilibre de T vers R.
- $F_2$  a plus d'affinité pour T ; il entraîne le déplacement d'équilibre de R vers T.
- Une régulation positive par le nucléotide ATP, qui augmente le taux de catalyse. Il semble que l'ATP compétitionne avec le CTP pour se fixer au site modulateur. L'interaction allostérique change la conformation des sites de liaison du substrat. Selon la théorie de l'allostérie, chaque sous-unité catalytique peut exister sous une forme T (basse affinité pour le substrat) ou sous forme R (haute affinité pour les substrats).

Les deux états sont dus à une transition de la structure quaternaire de l'enzyme qui modifie la structure du site actif et ainsi change la capacité de liaison du substrat et sa catalyse. Les changements tertiaires (dans une sous-unité) et quaternaires (entre les sous-unités) manifestés ne sont pas indépendants; ils sont fortement couplés dû à des contacts étroits entre sous-unités. L'état T et R représentent un équilibre contrôlé par la force de la liaison de chacun des ligands.

## ***Références Bibliographiques***

Baty F *et al.* (2015). "A Toolbox for Nonlinear Regression in R: The Package *nlstools*". *Journal of Statistical Software*, 66 (5)

Bugg T D H (2012). Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. third edition: WILEY. 290 p

**Sine Jean-Pierre** (2010). Enzymologie et applications. Edition Ellipses. 464 p

Aron W. Fenton (2008). Allostery: an illustrated definition for the 'second secret of life'; *Trends Biochemical Sciences*, 33(9): 420–425

Athel-cornish-bowden, Marc jamin, Valdur Saks. (2005). Cinétique enzymatique. Publié par EDP Sciences dans la collection Grenoble Science dirigée par Jean Bornarel. 462 p

Goudar CT *et al.* (2004). "Progress curve analysis for enzyme and microbial kinetic reactions using explicit solutions based on the Lambert W function". *Journal of Microbiol. Methods*, 59(3): 317 - 326

Schnell S & Mendoza C.(1997). "A closed form solution for time-dependent enzyme kinetics". *J. Theor. Biol*, 187 : 207–212

Jean Pelmont (1995). Enzymes catalyseurs du monde vivant. Publié par EDP Sciences dans la collection Grenoble Science 2<sup>ème</sup> édition. 1040 p

Segel, I. (1993). "Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems". Wiley classics Library Edition., New York

Lehninger A.L (1986). Principes de Biochimie (2<sup>ème</sup> édition)

Michaelis & Menten (1913) "Die kinetic der invertinwirkung" *Biochem. Z.* 49, 333 - 369