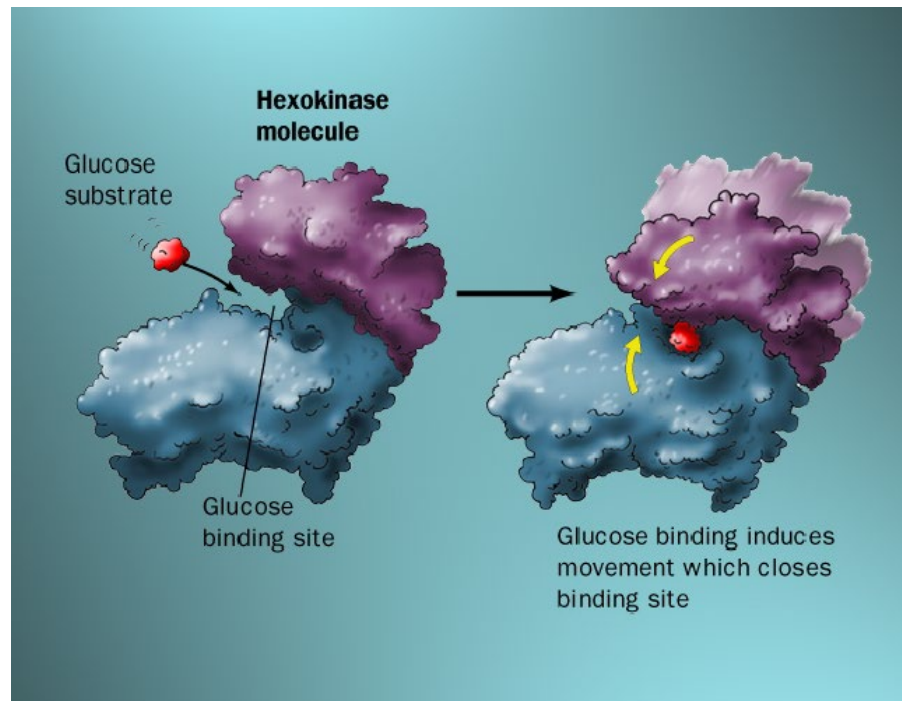


# Biochimie et Métabolisme

Pierre Maechler

## 3. Enzymes-1: Réaction enzymatique

Ref: Moussard 2<sup>ème</sup> & 3<sup>ème</sup> éditions: p.43-51



# **Biochimie et Métabolisme** (Pierre Maechler)

## **1. Introduction**

*Introduction à la biochimie*

## **2. Bioénergétique**

*Bioénergétique*

## **3. Enzymes 1**

*Réaction enzymatique*

## **4. Enzymes 2**

*Régulation + coenzymes*

## **5. Énergétique cellulaire 1**

*Glycolyse*

## **6. Énergétique cellulaire 2**

*Cycle de l'acide citrique et chaîne respiratoire*

## **7. Adaptation métabolique**

*Intégration tissulaire*

## *Enzymes-1*

Ref. Moussard 2ème & 3ème éditions: p.43-51

- Définitions et propriétés (catalyseurs, protéines, spécifiques, régulables)
- Cinétique enzymatique (vitesse initiale,  $V_{max}$ ,  $K_m$ )
- Site actif des enzymes (clé-serrure, ajustement induit, catalyse)
- Facteurs influents (température, pH, inhibiteurs compétitifs/non compétitifs/mixtes, activateurs)
- Enzymes allostériques (courbe sigmoïde, effet coopératif, modèles concerté/séquentiel)
- Classification (6 classes d'enzymes)

# Enzymes

## Définitions et propriétés

Une réaction exergonique est spontanée

Mais: **spontanée  $\neq$  instantanée**

Ex: saccharose + H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  glucose + fructose



# Enzymes

## Définitions et propriétés

Une réaction exergonique est spontanée

Mais: **spontanée  $\neq$  instantanée**

Ex: saccharose + H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  glucose + fructose

$\Delta G^{\circ'} = -29.3$  kJ/mol

Une **enzyme** spécifique (ici saccharase) **catalyse** (accélère) la réaction d'hydrolyse du saccharose (sucrose) à l'échelle de secondes.

# Enzymes

## Définitions et propriétés

- **enzyme** vient des racines grecques **en** (*dans*) **zume** (*levain*).
- Le **levain**, est la pâte de levures vivantes utilisée pour faire lever le pain.
- Les premières enzymes identifiées ont été extraites des levures (transforment le glucose en alcool).

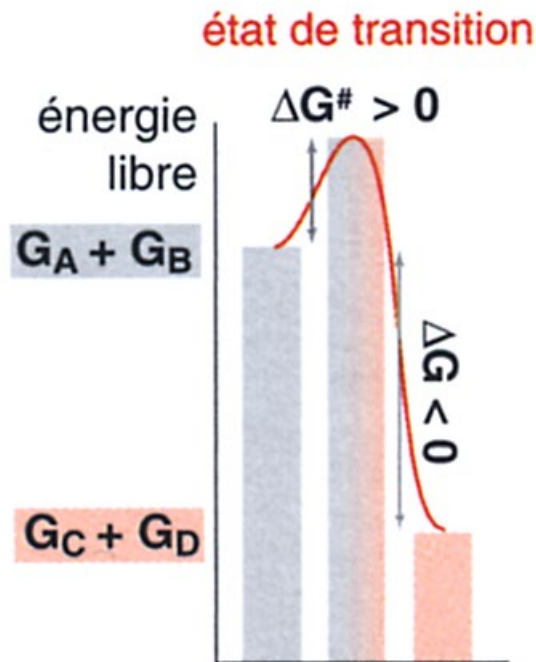


# Classification des enzymes

- **Oxydoréductase**: transfert d'électrons
- **Transférase**: transfert d'atomes ou de groupements
- **Hydrolase**: coupure de liaison par H<sub>2</sub>O
- **Lyase (ou synthase)**: coupe ou crée des liaisons
- **Ligase (ou synthétase)**: crée des liaisons en consommant de l'ATP
- **Isomérase**: isomérisation

# Énergie libre d'activation $\Delta G^\ddagger$ :

La vitesse de réaction dépend de  $\Delta G^\ddagger$ : différence d'énergie libre entre l'état initial et l'état de transition.



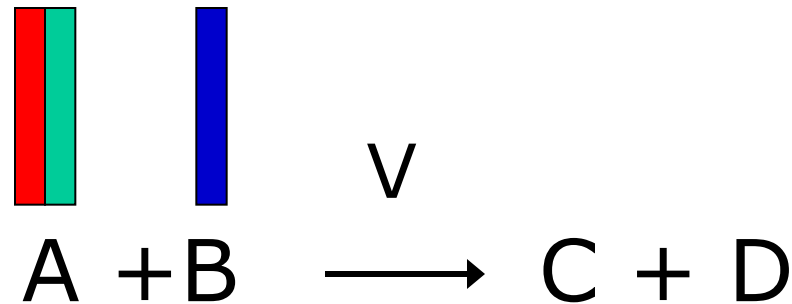
Réaction exergonique:  $A + B \rightarrow C + D$

# Définitions et propriétés

## Enzyme:

- Est une protéine
- Catalyseur biologique de réactions biochimiques
- Augmente la vitesse de réaction
- Ne change pas la constante d'équilibre  $K_{eq}$
- Diminue l'énergie libre d'activation  $\Delta G^\#$
- Est spécifique (à son substrat)
- Est régulable

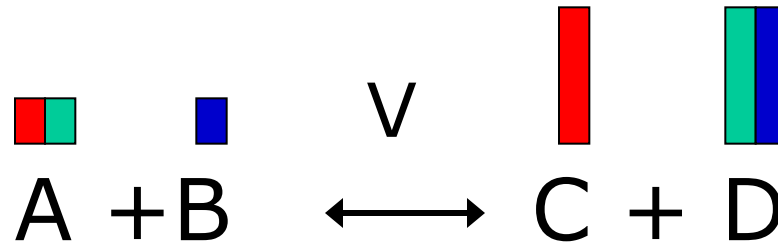
# Cinétique enzymatique à $t_0$ :



A et B: substrats

C et D: produits

# Cinétique enzymatique à l'équilibre:



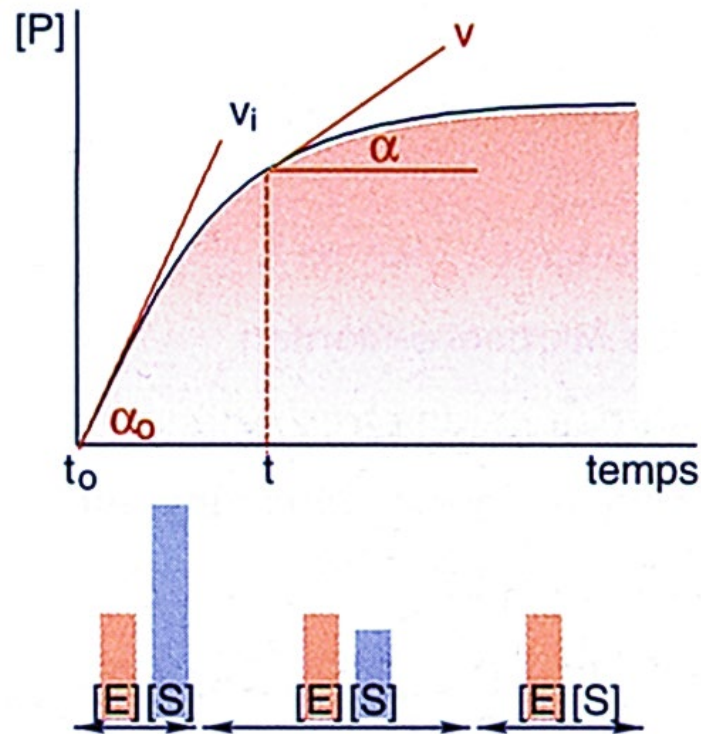
A et B: substrats

C et D: produits

# Cinétique enzymatique: vitesse initiale

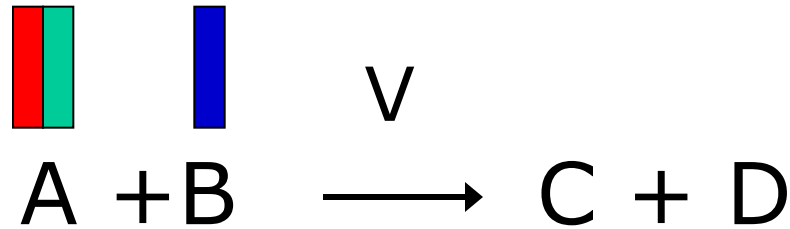
Soit la réaction  $S \xrightarrow{E} P$

A l'instant  $t_0$  :  $v$  est optimale pour cette réaction  
= **vitesse initiale  $v_i$**

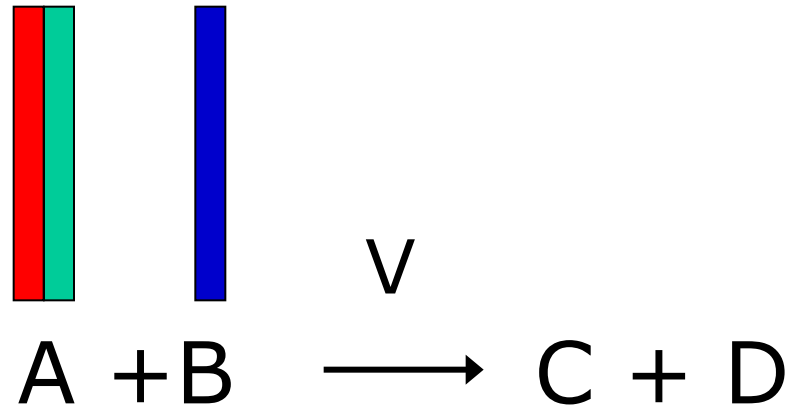


# Cinétique enzymatique à $t_0$ :

1

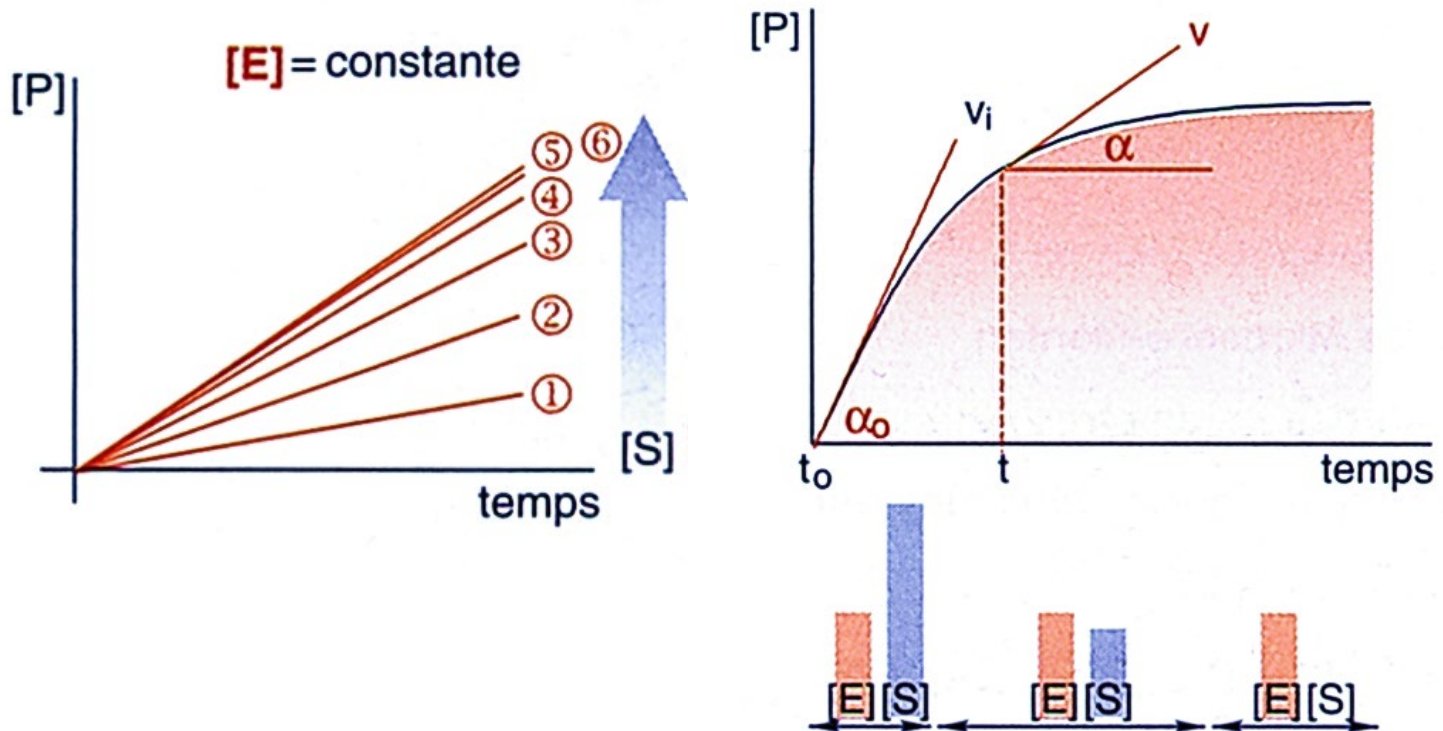


2



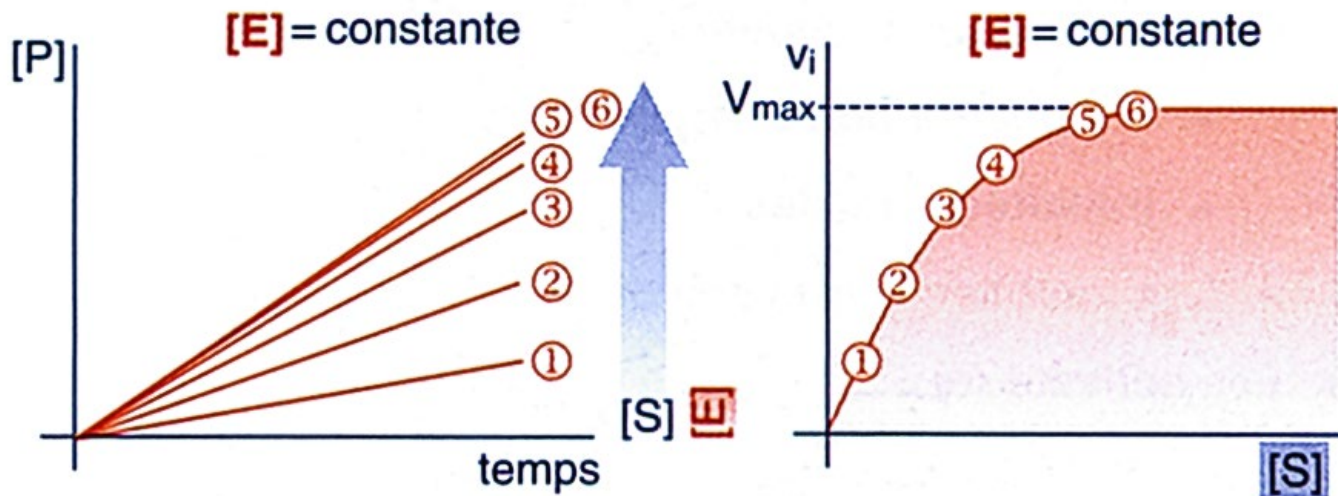
# Cinétique enzymatique: vitesse maximale

La concentration de substrat influence la  $v_i$ ,  
on détermine la **vitesse maximale de E =  $v_{max}$**



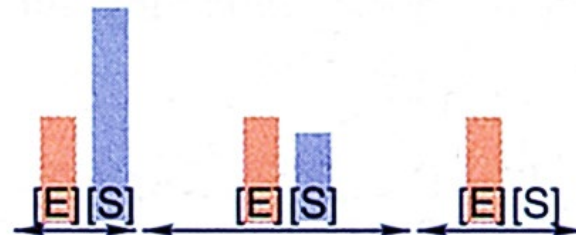
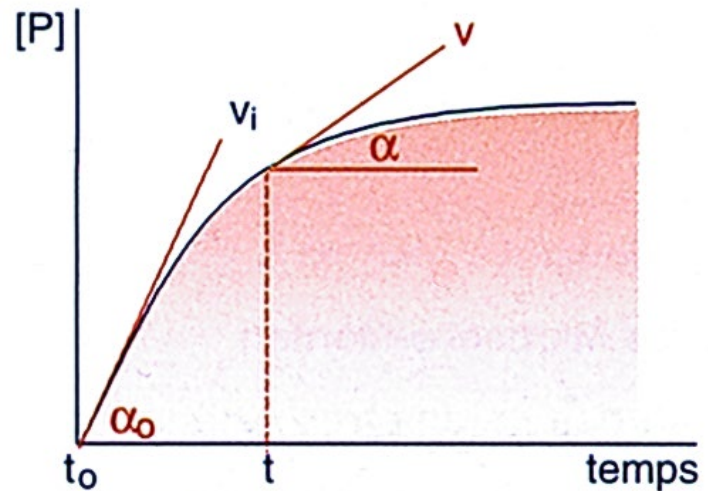
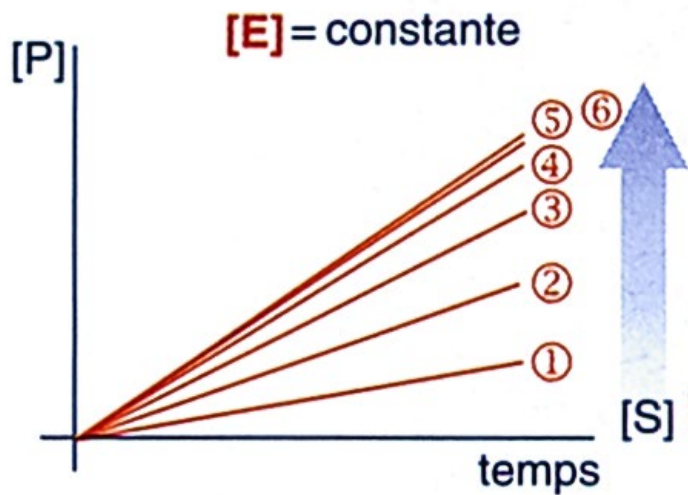
# Cinétique enzymatique: vitesse maximale

La concentration de substrat influence la  $v_i$ ,  
on détermine la **vitesse maximale de E =  $v_{max}$**



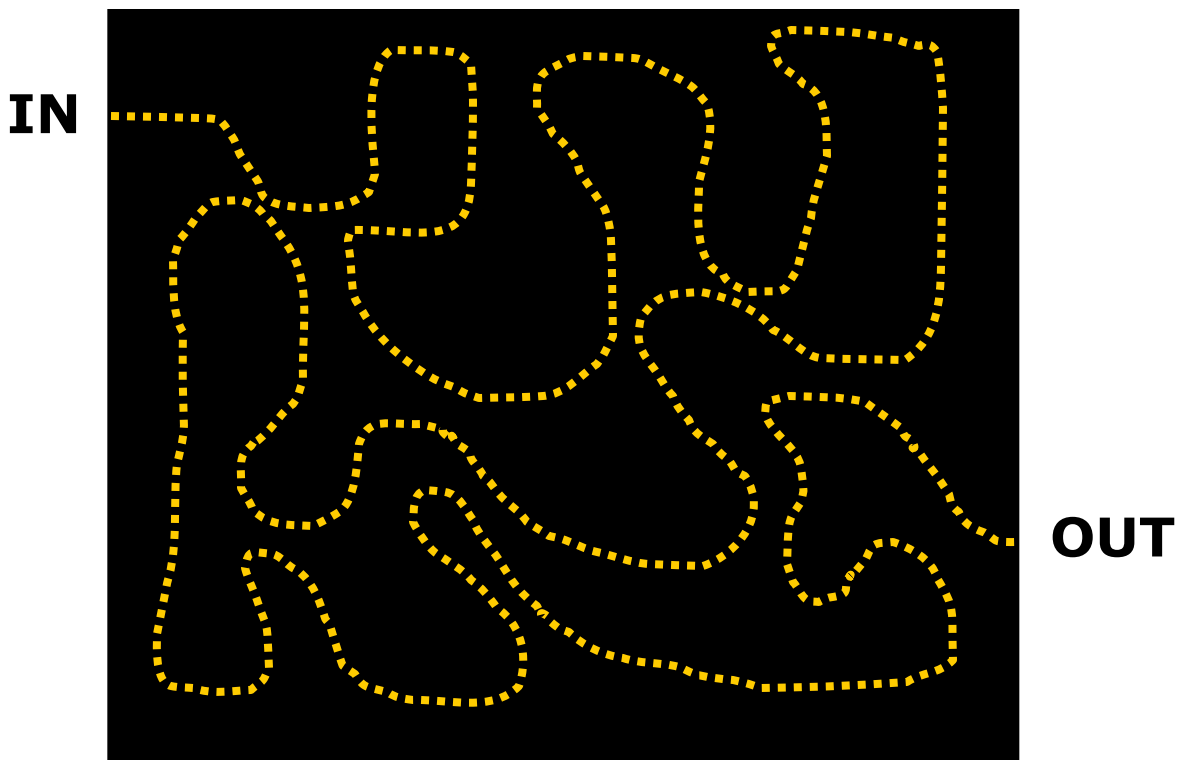
# Cinétique enzymatique: vitesse maximale

Substrat – Enzyme – Produit: une relation à trois



# Modèle Michaelis-Menten

Étude de l'activité enzymatique



“Boîte noire”

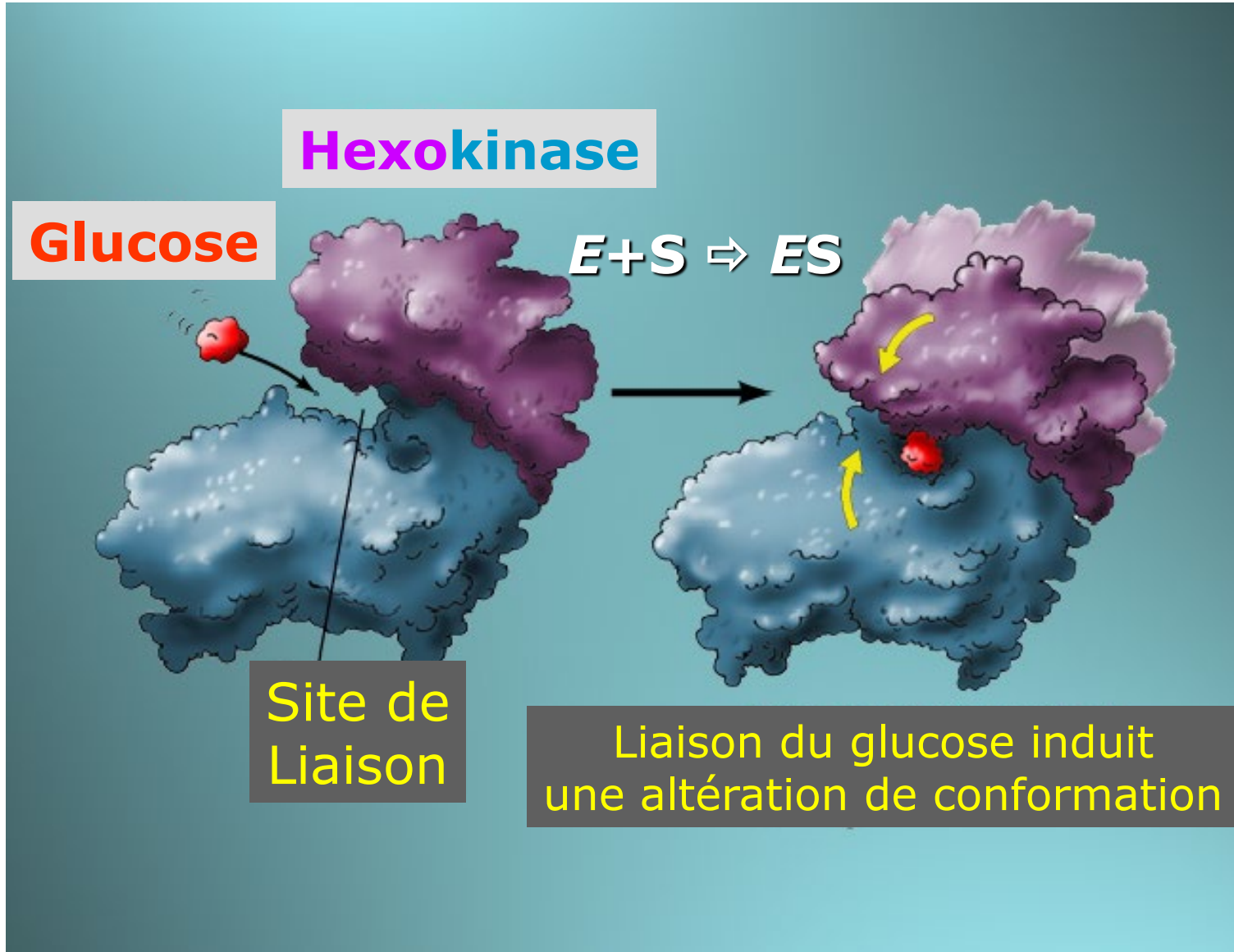
Mesurables: E, S (en excès), V, P



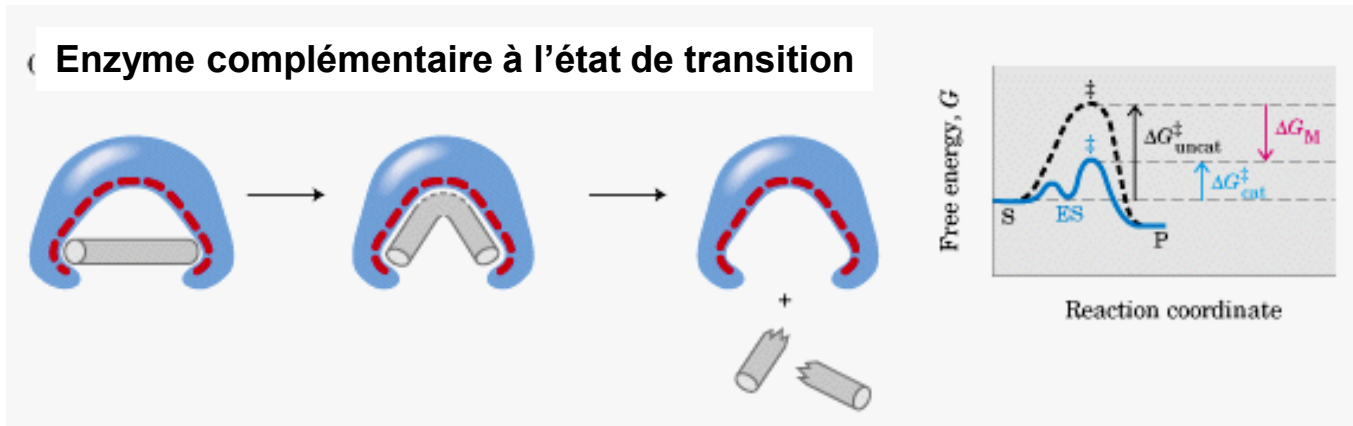
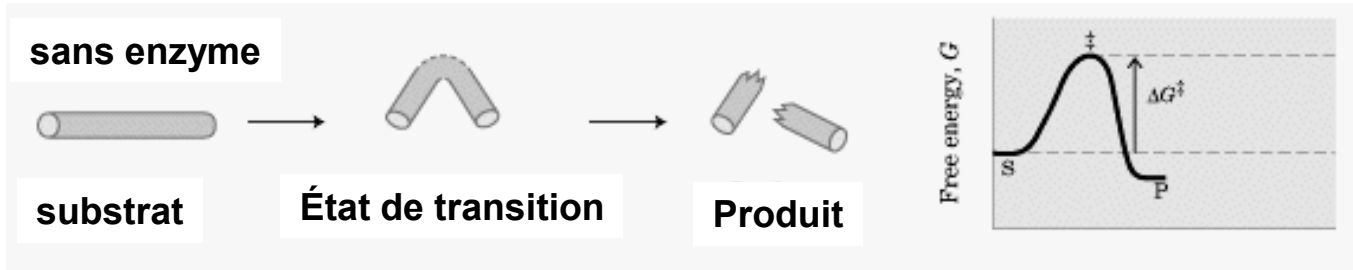
En 1911, Maud MENTEN obtient son doctorat à Toronto et part pour Berlin chez Leonard MICHAELIS

En 1913 ils publient leur fameuse équation

# Liaison **substrat** + **enzyme**

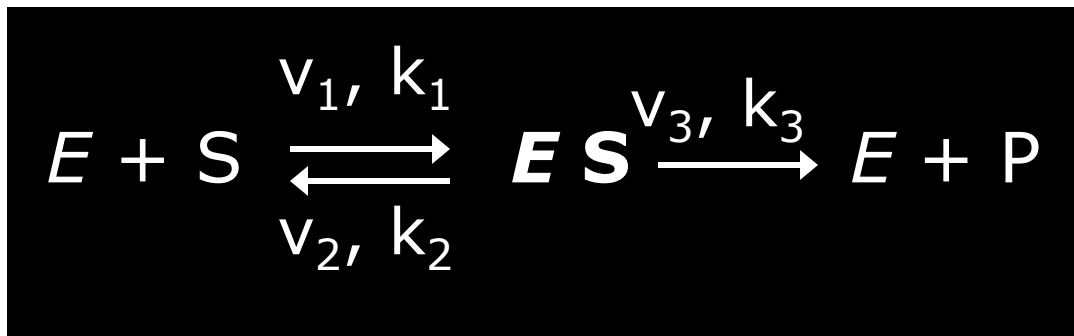


# Modèle Michaelis-Menten



# Modèle Michaelis-Menten

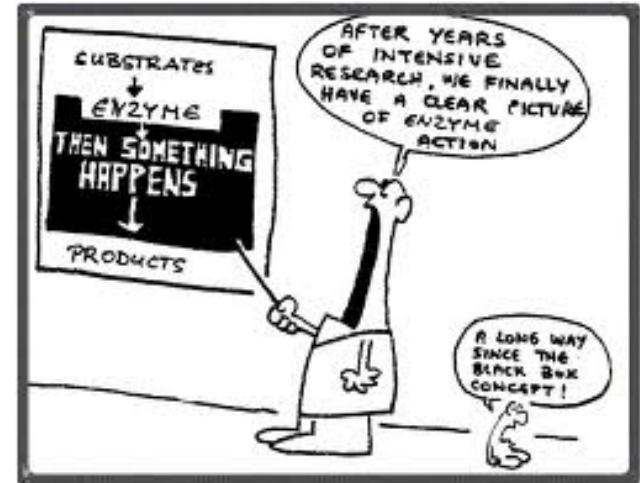
Soit la réaction  $S \xrightarrow{E} P$  se décompose en:



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

$K_M$  = constante de Michaelis-Menten

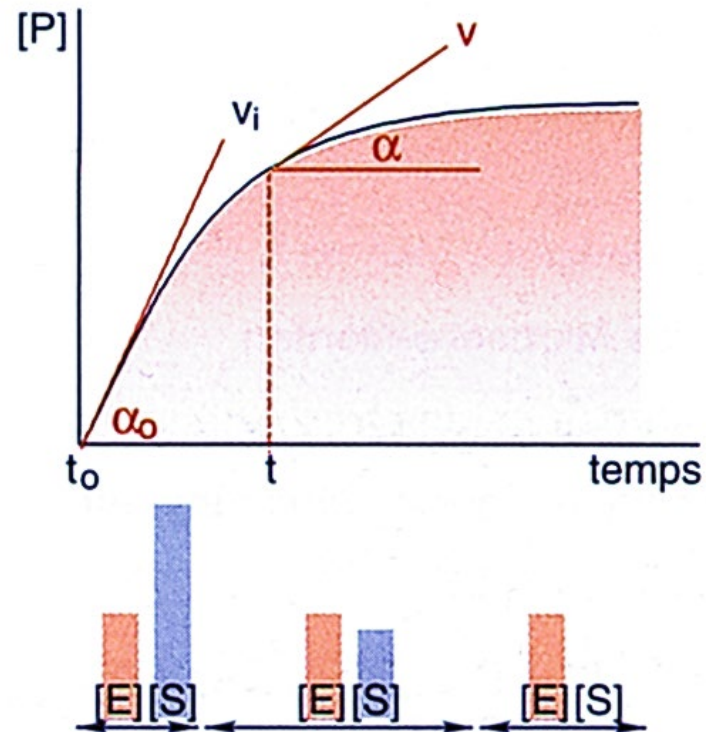
elle définit la relation enzyme - substrat



# Modèle Michaelis-Menten

Equation de Michaelis-Menten:

$$v_i = \frac{v_{\max} [S]}{k_M + [S]}$$



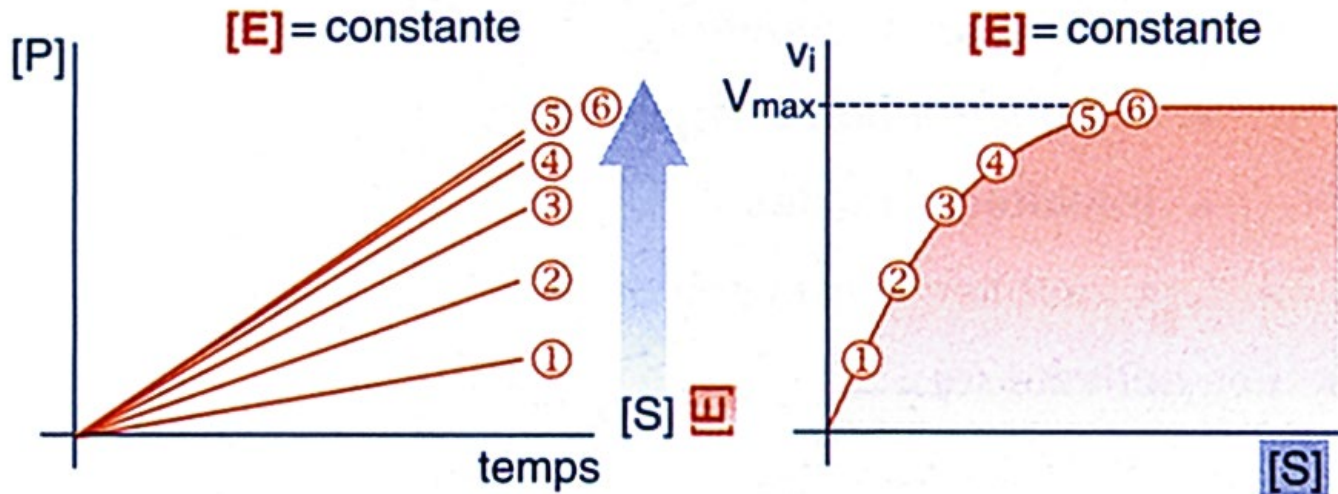
Quand  $[S]$  tend vers l'infini,  $v_i = v_{\max}$

# Modèle Michaelis-Menten

Equation de Michaelis-Menten:

$$v_i = \frac{v_{\max} [S]}{k_M + [S]}$$

Quand  $[S]$  tend vers l'infini,  $v_i = v_{\max}$



# Modèle Michaelis-Menten

Equation de Michaelis-Menten:

$$v_i = \frac{v_{\max} [S]}{k_M + [S]}$$

Quand  $[S]$  tend vers l'infini,  $v_i = v_{\max}$

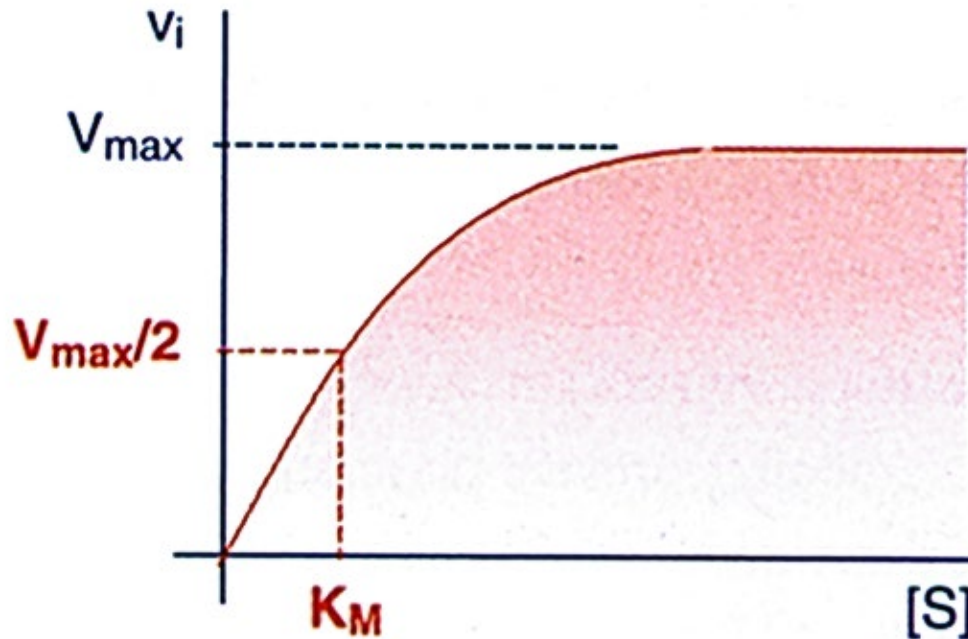
**Dans ces conditions, la vitesse dépend des propriétés de l'enzyme définies par le  $K_M$**

On définit que pour  $v_i = v_{\max}/2 \Leftrightarrow [S] = K_M$

**Constante Michaelis-Menten  $K_M = [S]$  à  $v_{\max}/2$**

# Modèle Michaelis-Menten

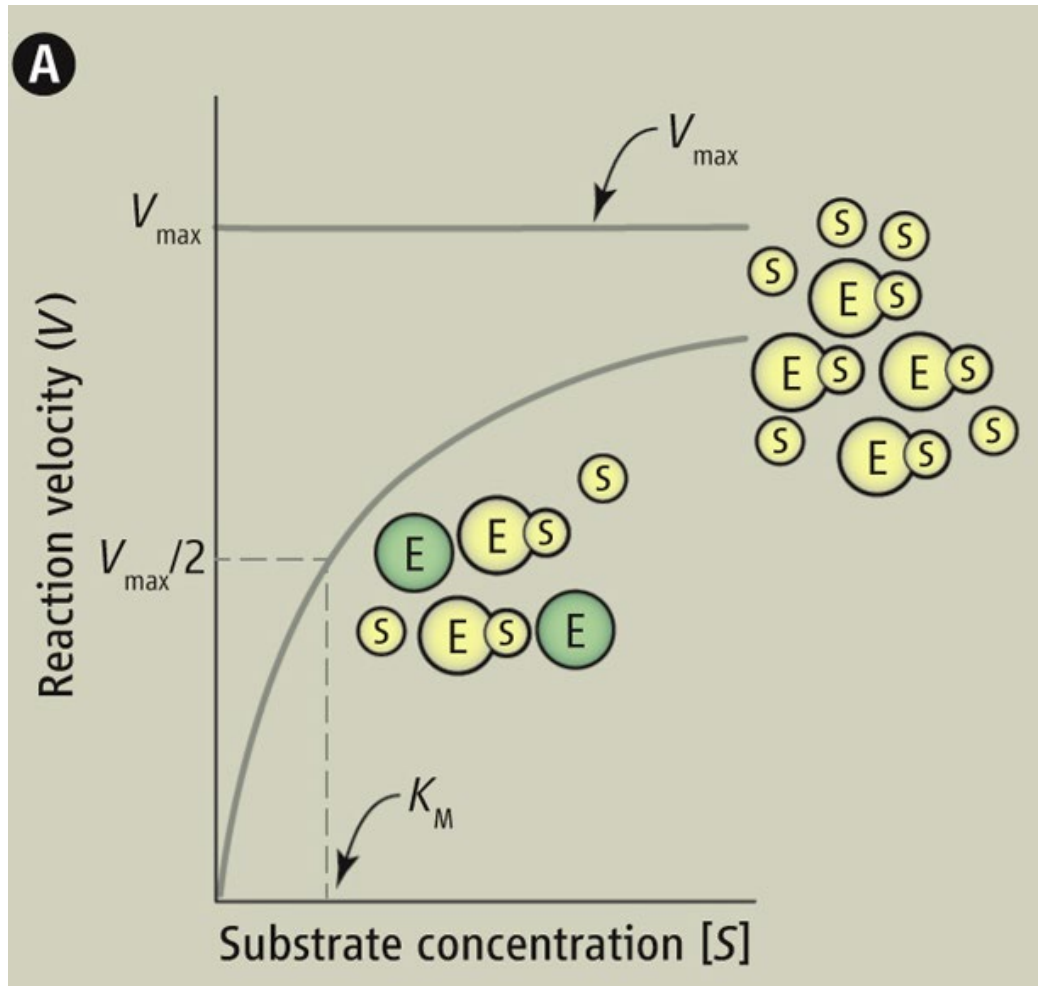
$K_M$ : concentration de substrat qui permet à l'enzyme de travailler à la moitié de sa vitesse maximale.



Constante Michaelis-Menten  $K_M = [S]$  à  $v_{max}/2$

# Modèle Michaelis-Menten

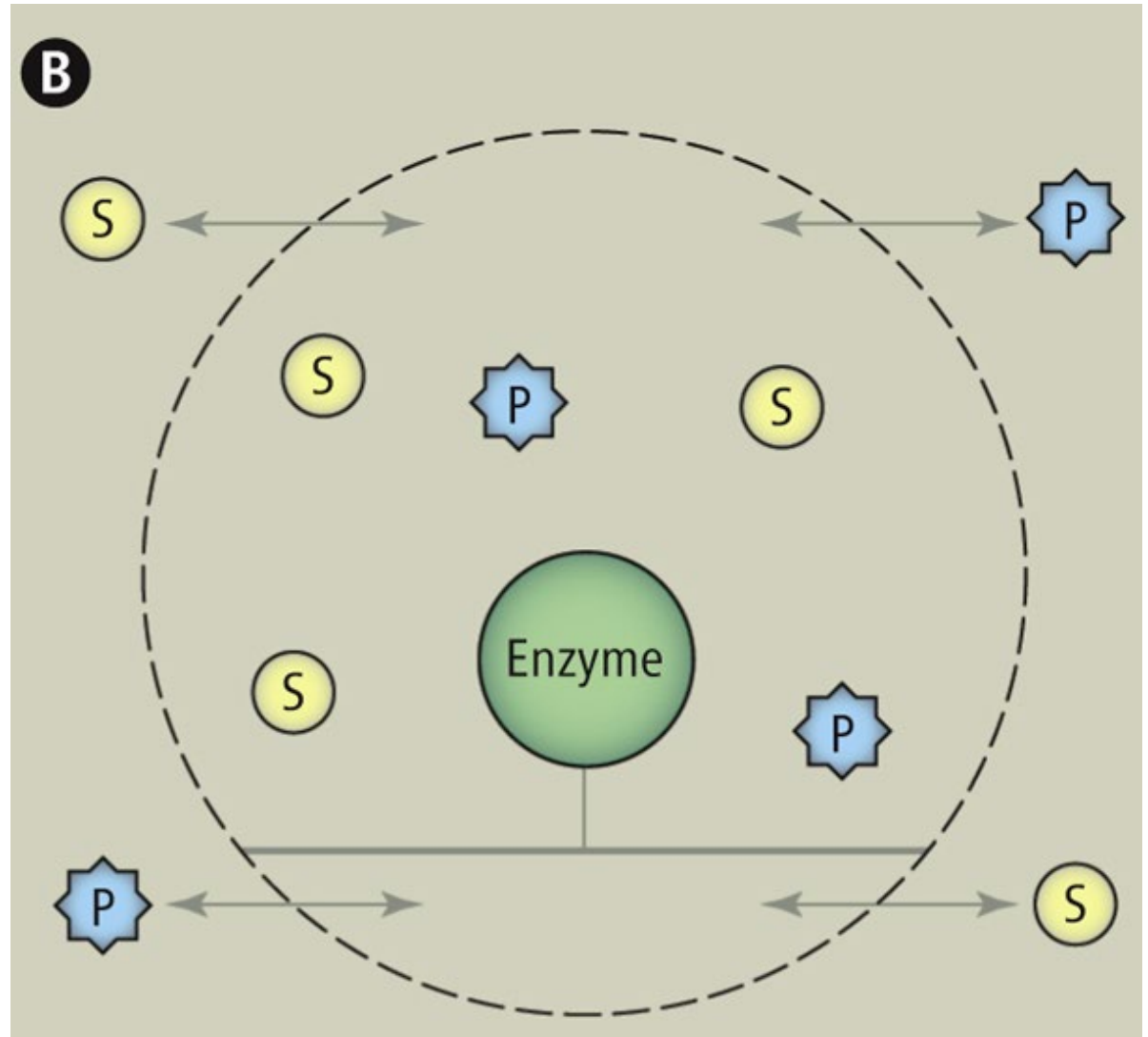
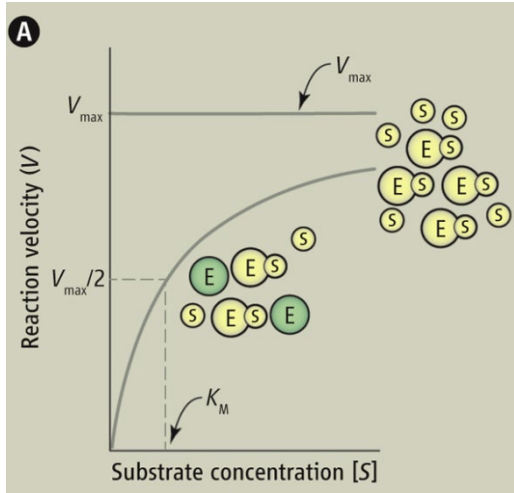
- $V_{\max}/2$ : la concentration de substrat  $[S]$  est à  $1/2$  saturante =  $K_M$
- $V_{\max}$ : la concentration de substrat est saturante, plus d'enzyme libre



En conditions réelles cellulaires:  
système ouvert non équilibré, en  
lien avec d'autres voies (substrats **S**  
et produits **P** entrent et sortent du système)

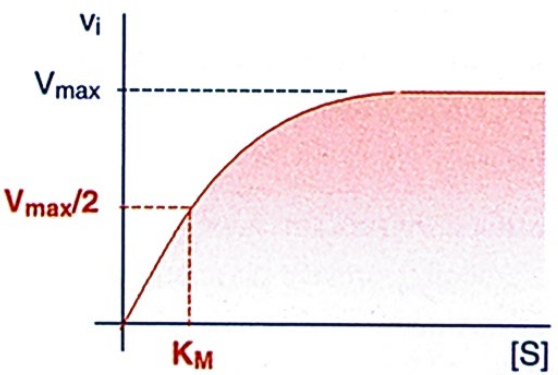
Modèle

Michaelis-Menten



$K_M$  indique la cadence de travail d'une enzyme

Le nombre de places sur un télésiège aussi.



**Enzyme**



**Produits**



**2 places**



**6 places**

**Substrat**



# Substrat: Comment l'évaluer?

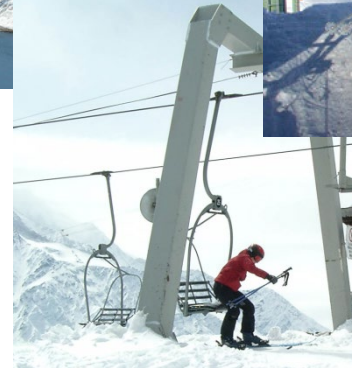


$K_M$  indique la cadence de travail d'une enzyme

Le nombre de places sur un télésiège aussi.

A l'arrivée du télésiège, qu'est ce qui vous renseigne sur le nombre de skieurs au départ ?

**Enzyme**



**Produits**

**Substrat**



# Modèle Michaelis-Menten

## Or donc...

- La  $V_{\max}$  est la vitesse de réaction lorsque l'enzyme est à **saturation**
- La  $K_M$  est la concentration de substrat lorsque l'enzyme est à **demi-saturation** (indique la cadence de travail d'une enzyme)

$K_M$  basse rime avec haute affinité et faible capacité.

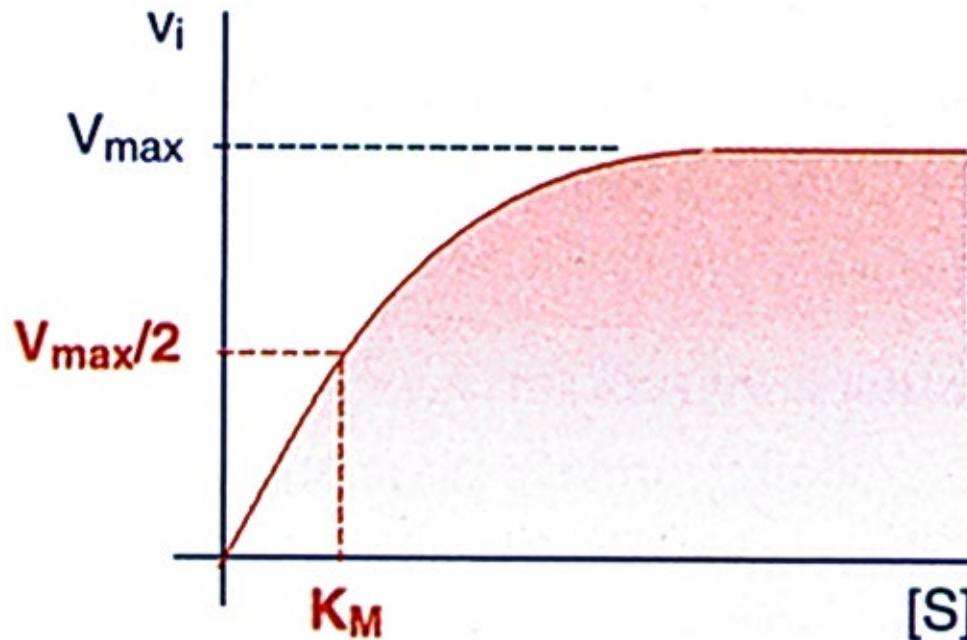
$K_M$  élevée rime avec faible affinité et haute capacité.

*...affinité à comprendre dans le sens de saturabilité...*

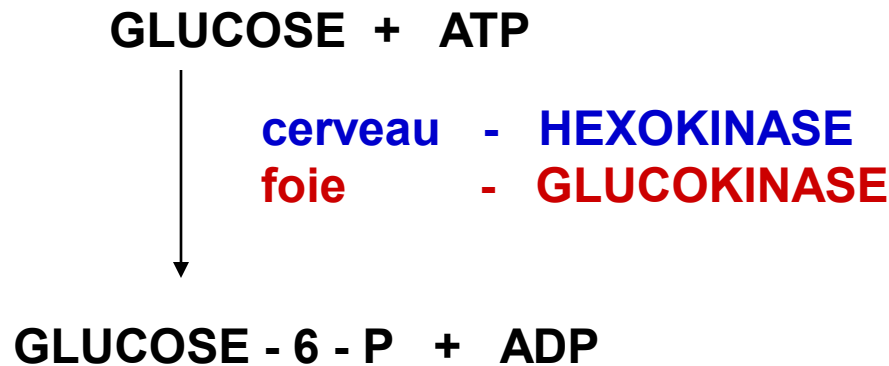
# Modèle Michaelis-Menten

La  $K_M$  permet de prédire si, dans des conditions physiologiques,

- une enzyme opère proche de sa  $V_{max}$
- un changement dans la concentration du substrat va changer sa vitesse



Modèle Michaelis-Menten: comparons la  $K_M$  de deux kinases (enzymes phosphorylantes) pour leur substrat (glucose): **hexokinase** et **glucokinase**



---

|                    | $K_M$<br>( $\mu\text{M}$ ATP) | $K_M$<br>(mM glucose) |
|--------------------|-------------------------------|-----------------------|
| <b>HEXOKINASE</b>  | <b>400</b>                    | <b>0.05</b>           |
| <b>GLUCOKINASE</b> | <b>100</b>                    | <b>10</b>             |

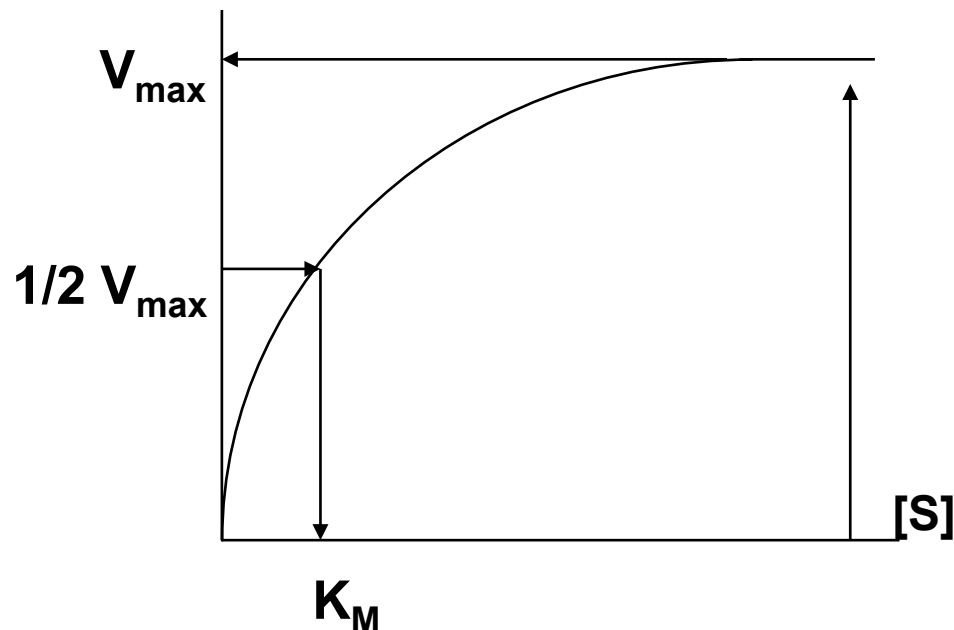
---

Modèle Michaelis-Menten: comparons la  $K_M$  de deux kinases (enzymes phosphorylantes) pour leur substrat (glucose): **hexokinase** et **glucokinase**

$K_M$   
(mM glucose)

**HEXOKINASE: 0.05 mM**

**GLUCOKINASE: 10 mM**



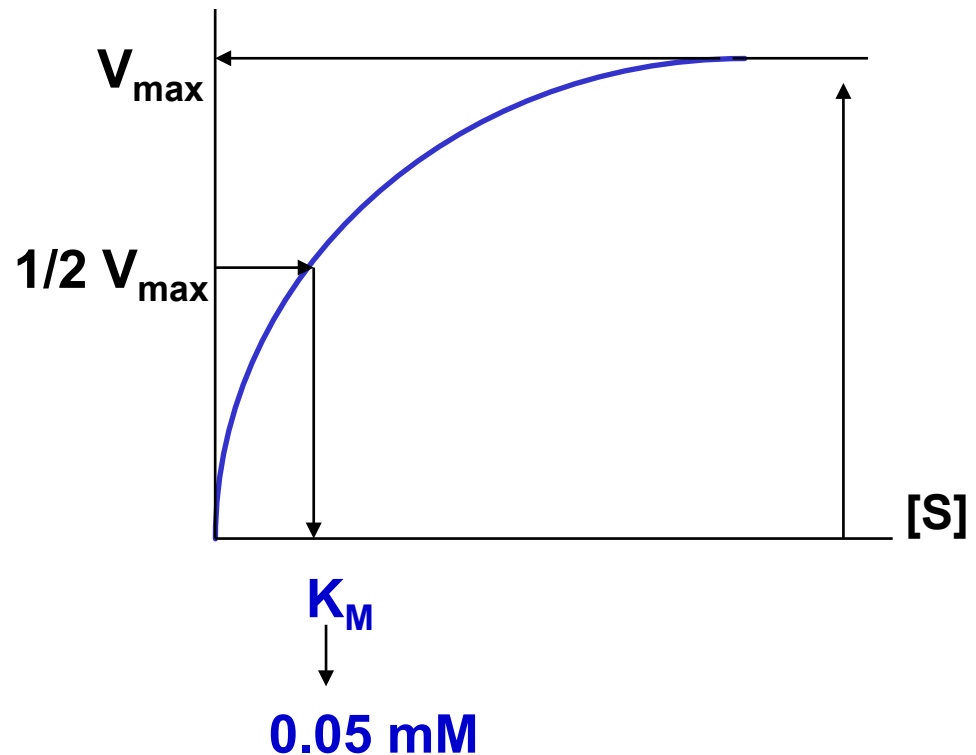
La concentration sanguine de glucose (glycémie) varie de 4 à 10 mM. Laquelle de ces kinases va réagir aux changements de la concentration de glucose?

Modèle Michaelis-Menten: comparons la  $K_M$  de deux kinases (enzymes phosphorylantes) pour leur substrat (glucose): **hexokinase** et **glucokinase**

$K_M$   
(mM glucose)

**HEXOKINASE (cerveau): 0.05 mM**

**GLUCOKINASE (foie): 10 mM**



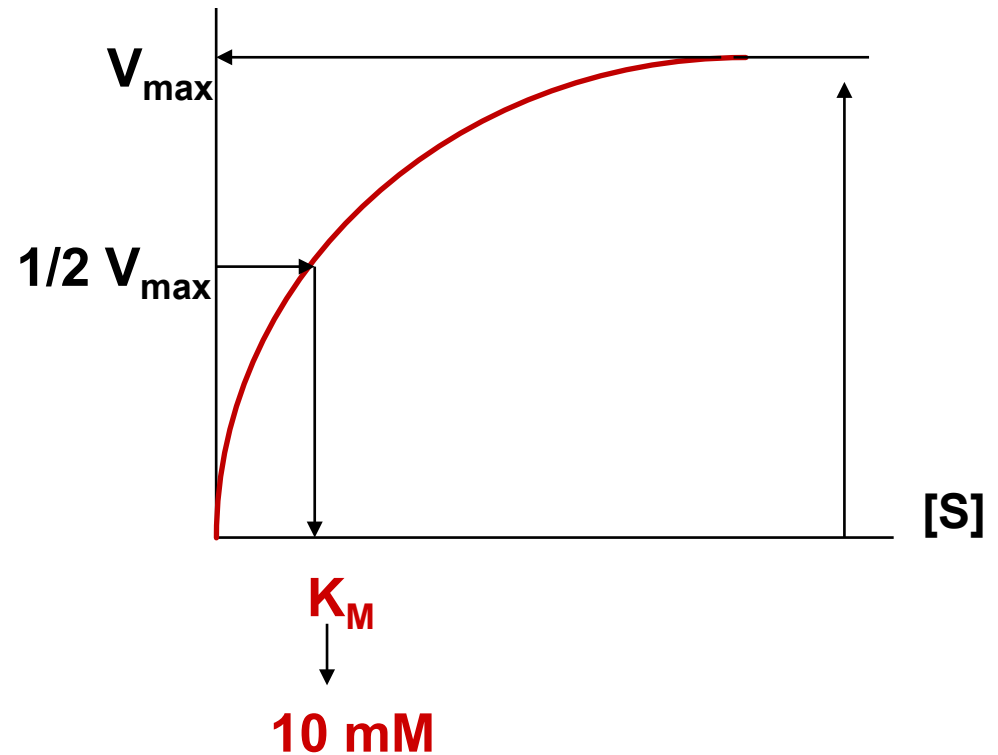
Avec son  $K_M$  bas, l'**hexokinase** est continuellement en  $v_{max}$ , métabolisant le glucose efficacement dans des conditions physiologiques.

Modèle Michaelis-Menten: comparons la  $K_M$  de deux kinases (enzymes phosphorylantes) pour leur substrat (glucose): **hexokinase** et **glucokinase**

$K_M$   
(mM glucose)

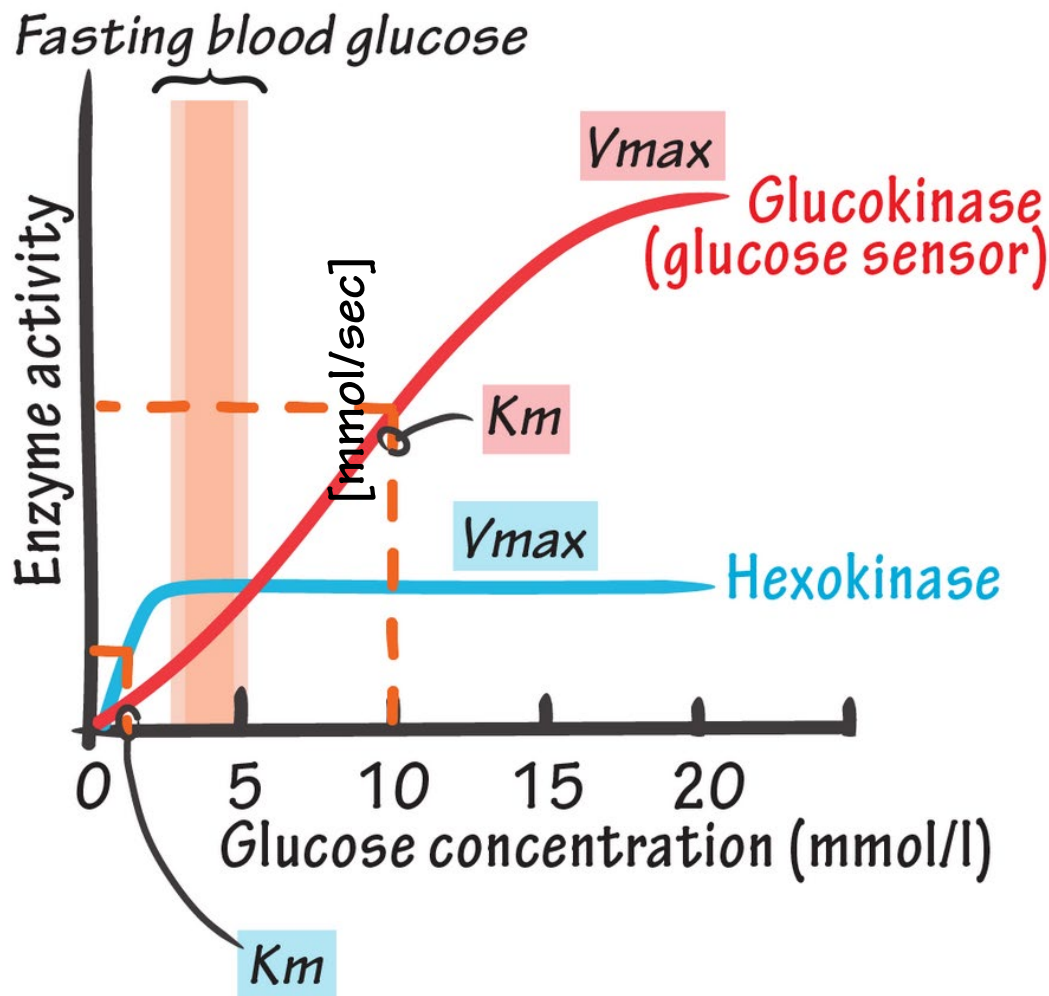
HEXOKINASE (cerveau): 0.05 mM

**GLUCOKINASE (foie): 10 mM**



Avec son  $K_M$  élevé, la **glucokinase** peut « sentir » des changements de glucose entre 4-10 mM.  
(+/- active, donc senseur au glucose)

Modèle Michaelis-Menten: comparons la  $K_M$  de deux kinases ( $V$  en valeur absolue [mmol/sec]) pour leur substrat (glucose): **hexokinase** et **glucokinase**



$K_M \sim 10$  mM: faible affinité, haute capacité (foie, cellule  $\beta$ )

$K_M \sim 0,05$  mM: haute affinité, faible capacité (cerveau, muscles, etc...)

$K_M$  indique la cadence de travail d'une enzyme

Le nombre de places sur un télésiège aussi.

Hexokinase:  
2 places

Glucokinase:  
6 places

**Enzyme**



**Produits**



2 places



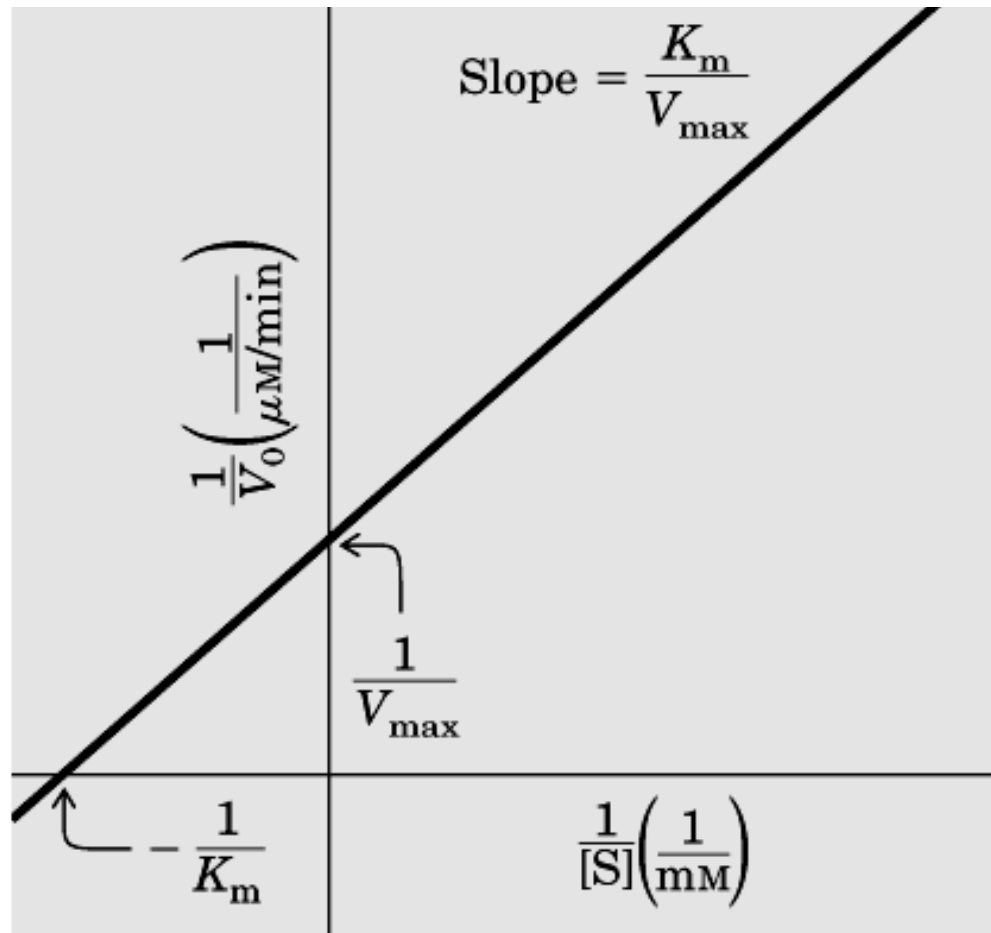
6 places



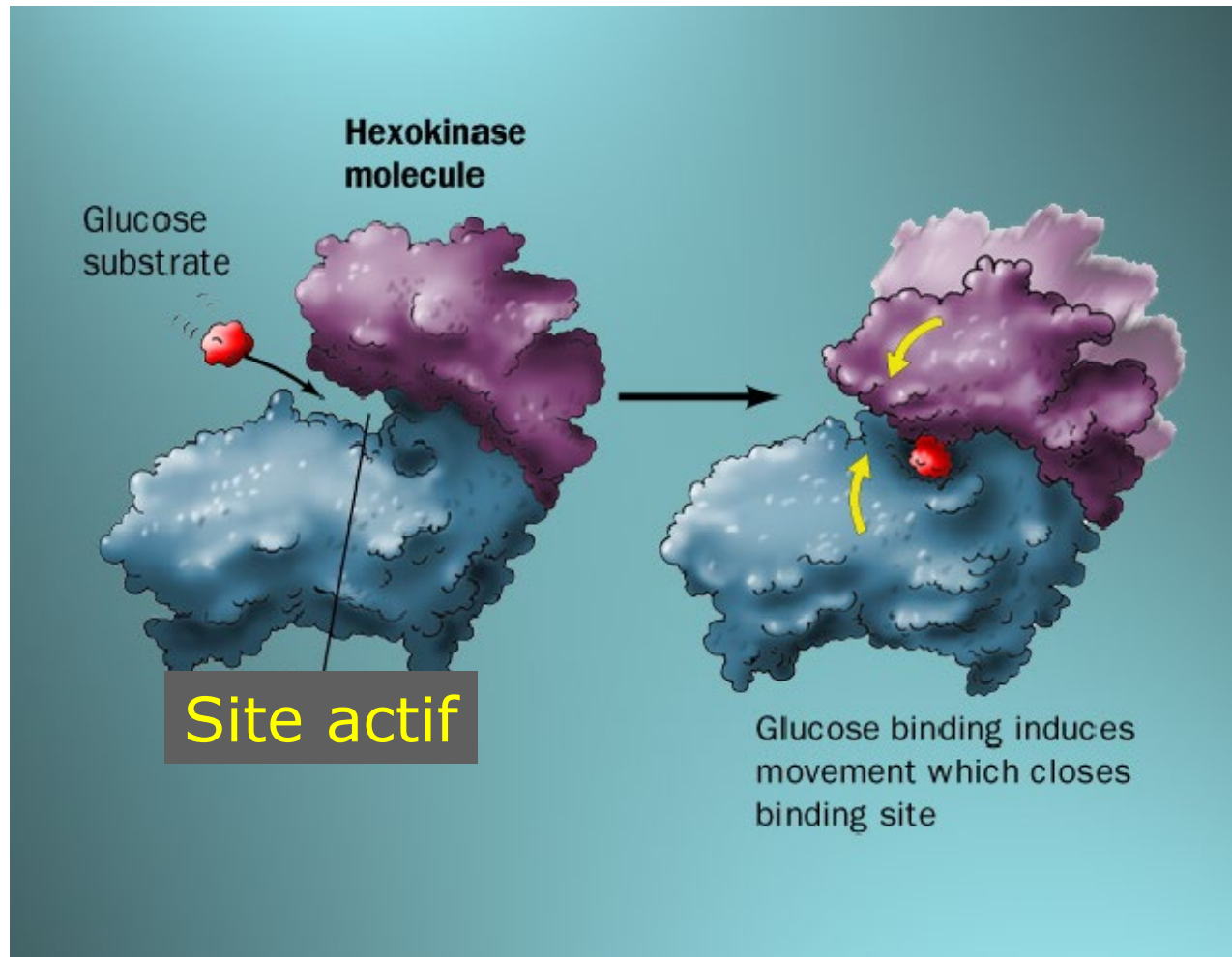
**Substrat**

$K_M$  est inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

Représentation de **LINWEAVER-BURK** ou "double inverse"



# Site actif des enzymes

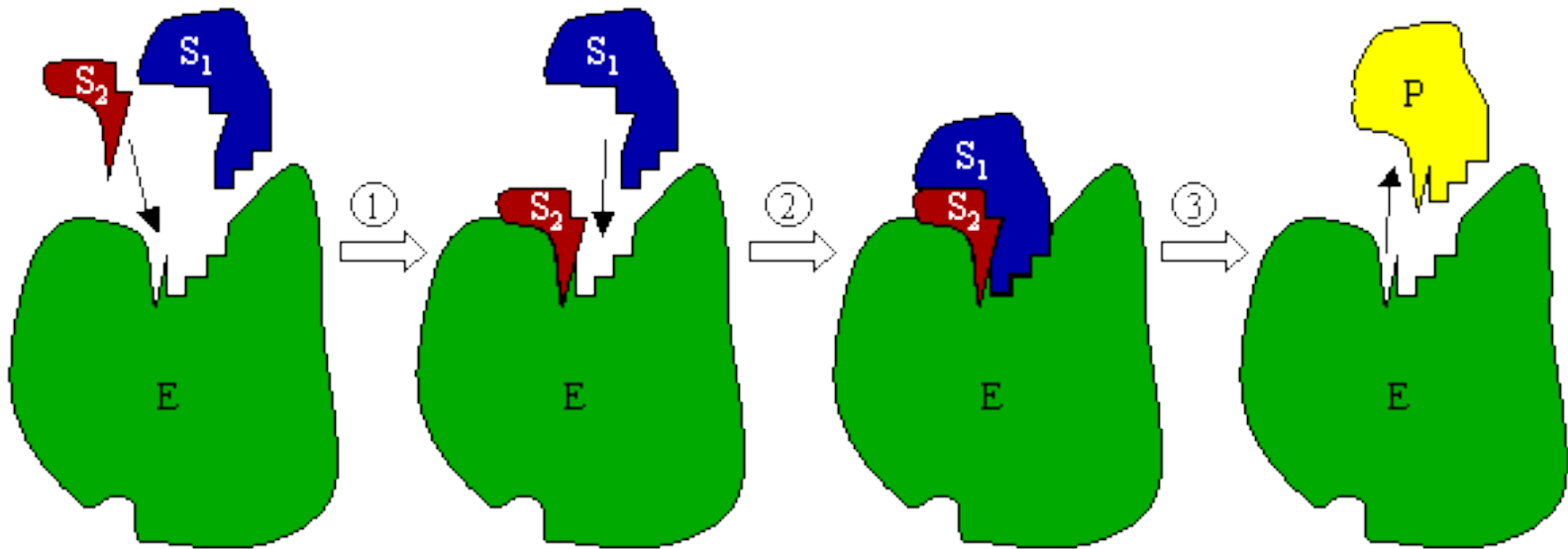


# Site actif des enzymes

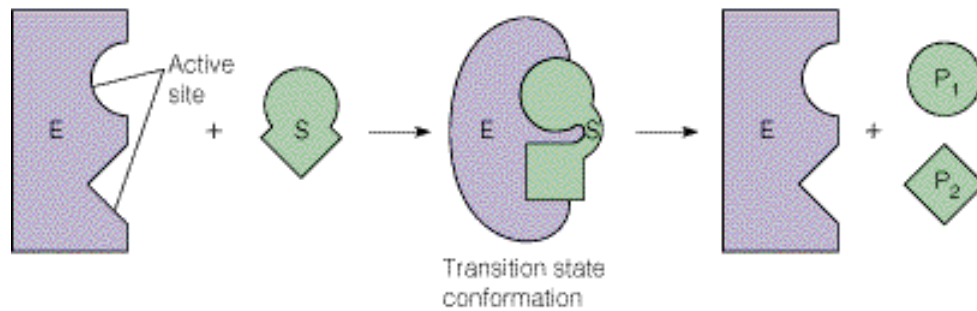
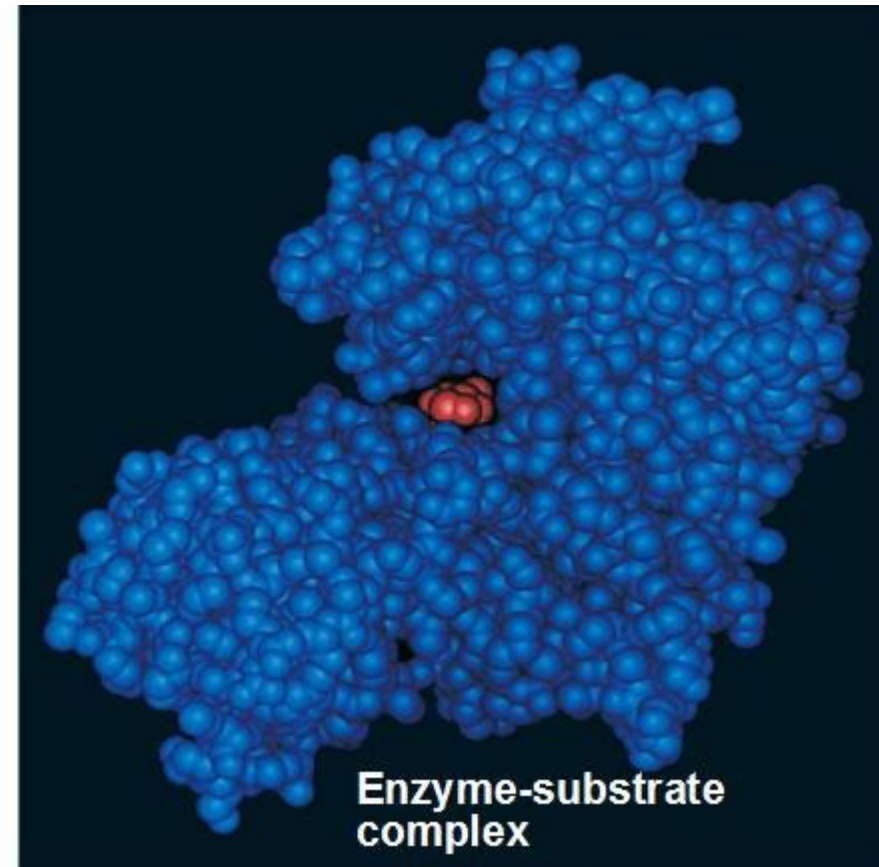
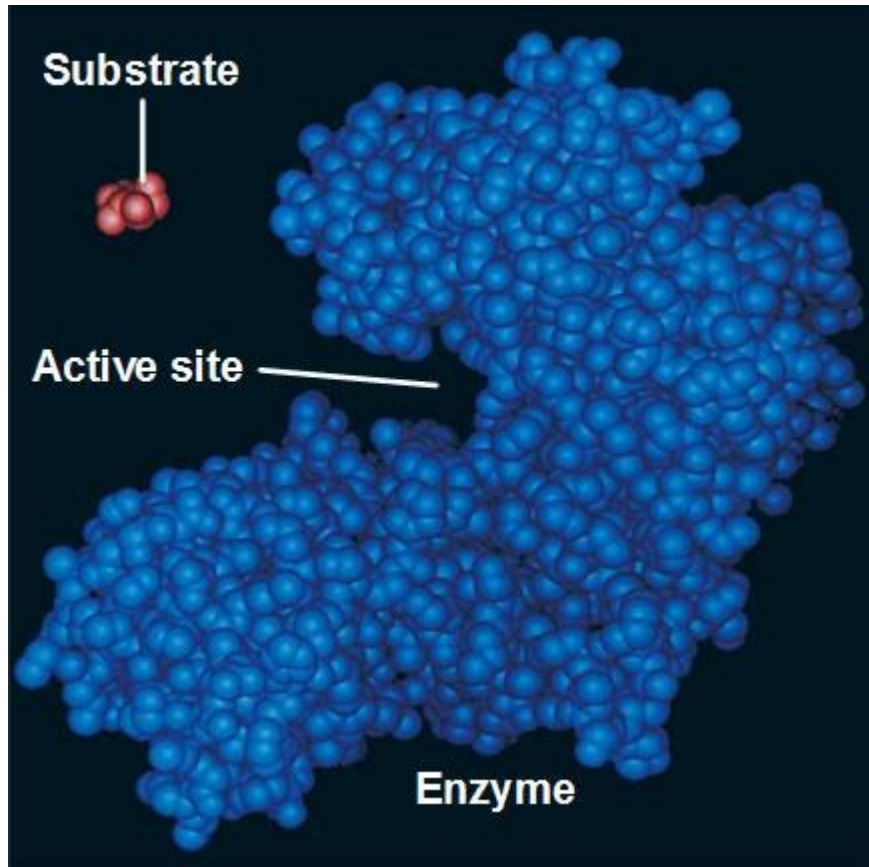
## Site actif d'une enzyme:

- Site catalytique
- Lieu de la réaction
- Site de liaison du/des substrat/s
- Localisé au fond d'une poche de la zone interne de la protéine
- Modèle de clé - serrure
- Modèle d'ajustement induit

# Modèle clé - serrure de deux **substrats** sur site actif de **l'enzyme** pour un **produit**



# Modèle d'ajustement induit (*induced fit*)



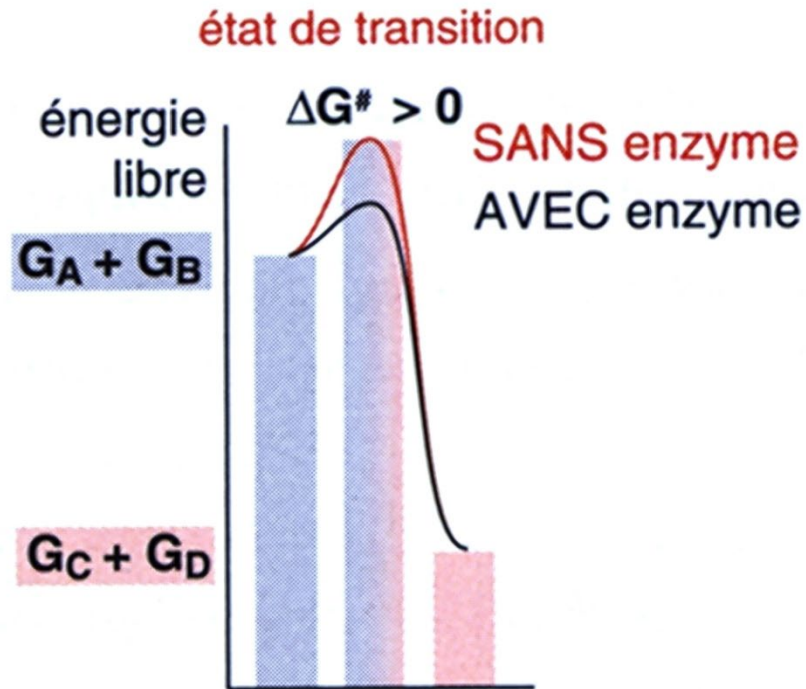
(b) Induced fit model

# Site actif des enzymes

**dans le site actif, il y a catalyse car:**

- Augmentation de la concentration des réactants
- Orientation propice des molécules
- Abaissement de l'énergie libre d'activation  $\Delta G^\#$  pour atteindre l'état de transition

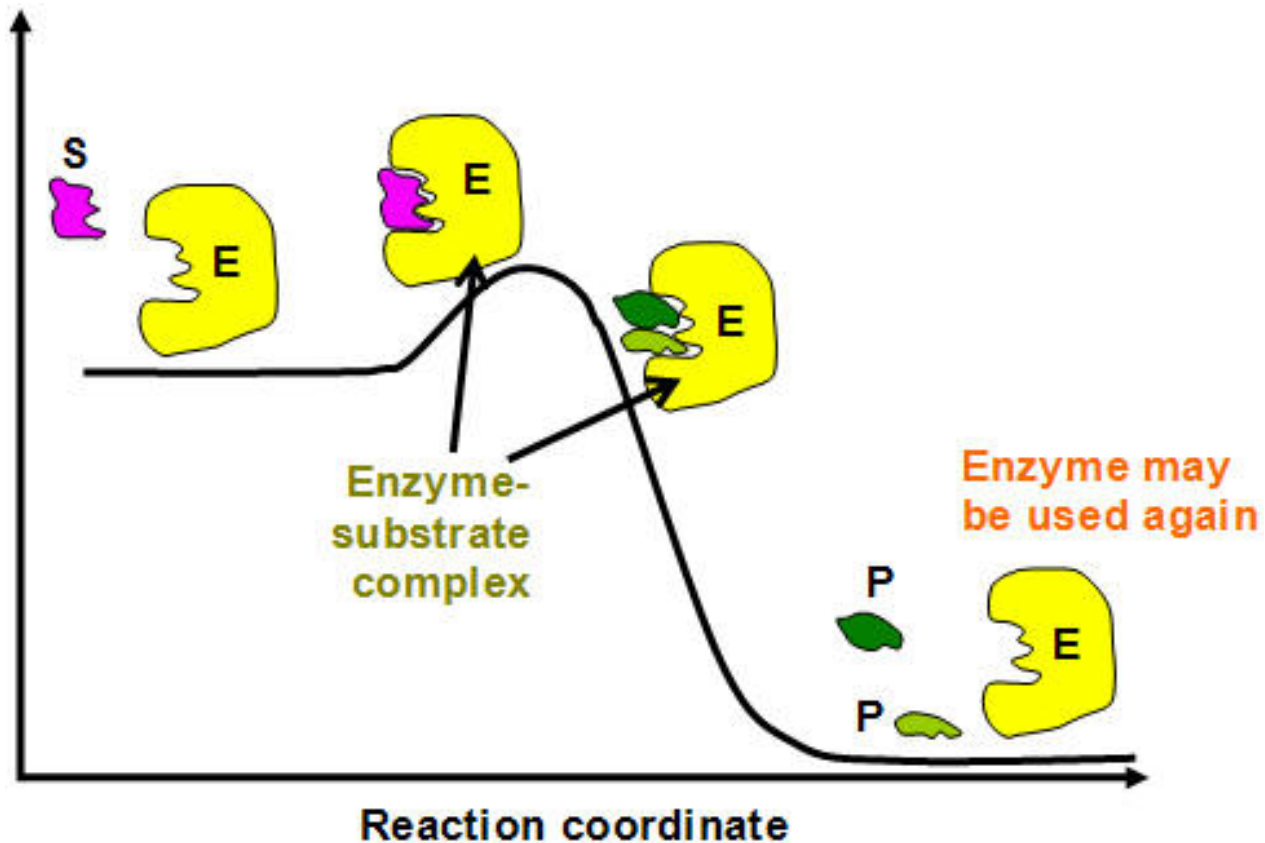
# Site actif des enzymes



Réaction exergonique :  $A + B \rightarrow C + D$

# Site actif des enzymes

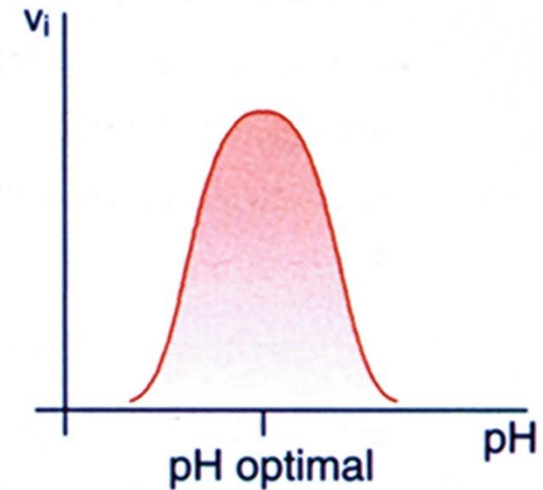
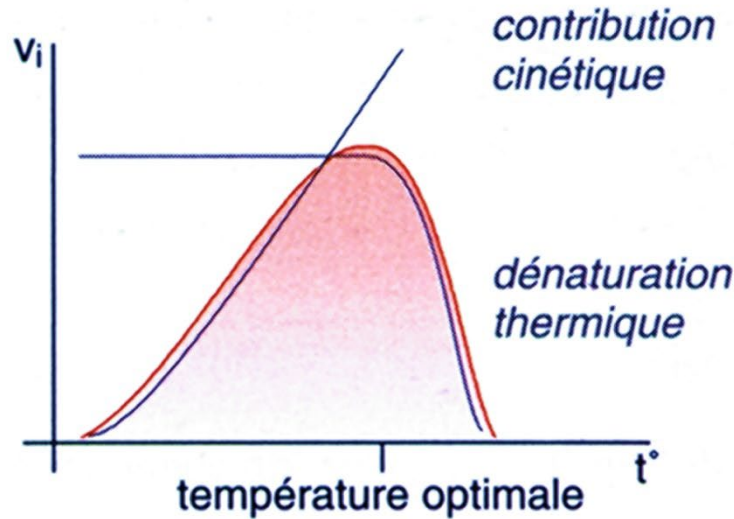
Abaissement de l'énergie libre d'activation



# Facteurs influençant la réaction

➤ Température

➤ pH



Blanc d'œuf = *Eiweiss* = protéines

A l'extrême, une dénaturation des protéines (enzymes) produit une inhibition non spécifique

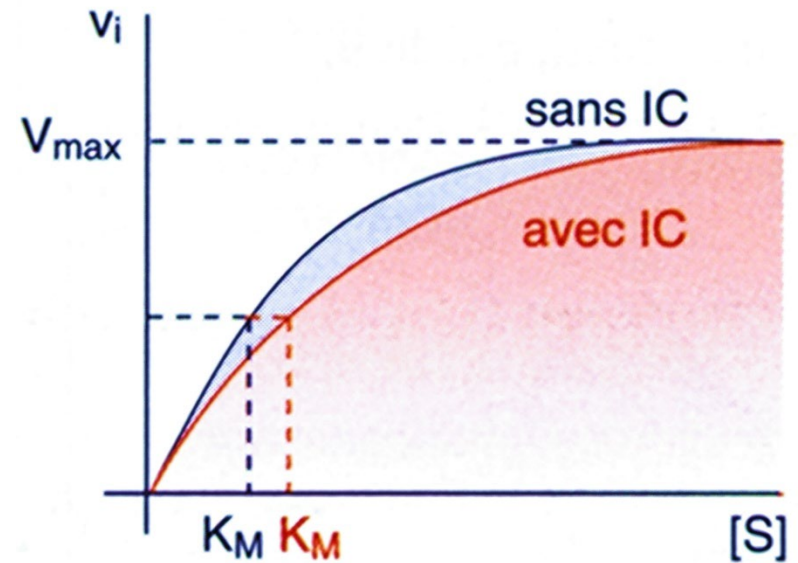
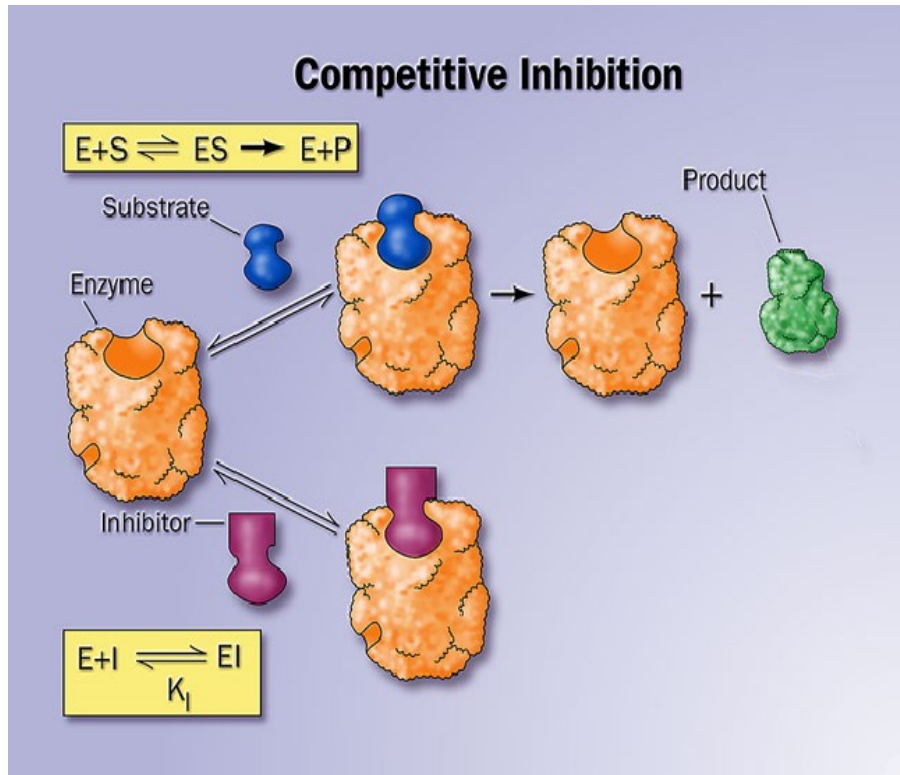
# Les inhibiteurs

- **Irréversibles** (se lient de façon covalente à un groupe fonctionnel)
- **Réversibles** (compétitifs, non compétitifs, mixtes)

# Inhibiteurs réversibles compétitifs

Analogues structuraux du substrat

Augmentent la  $K_M$ , ne changent pas la  $V_{\max}$



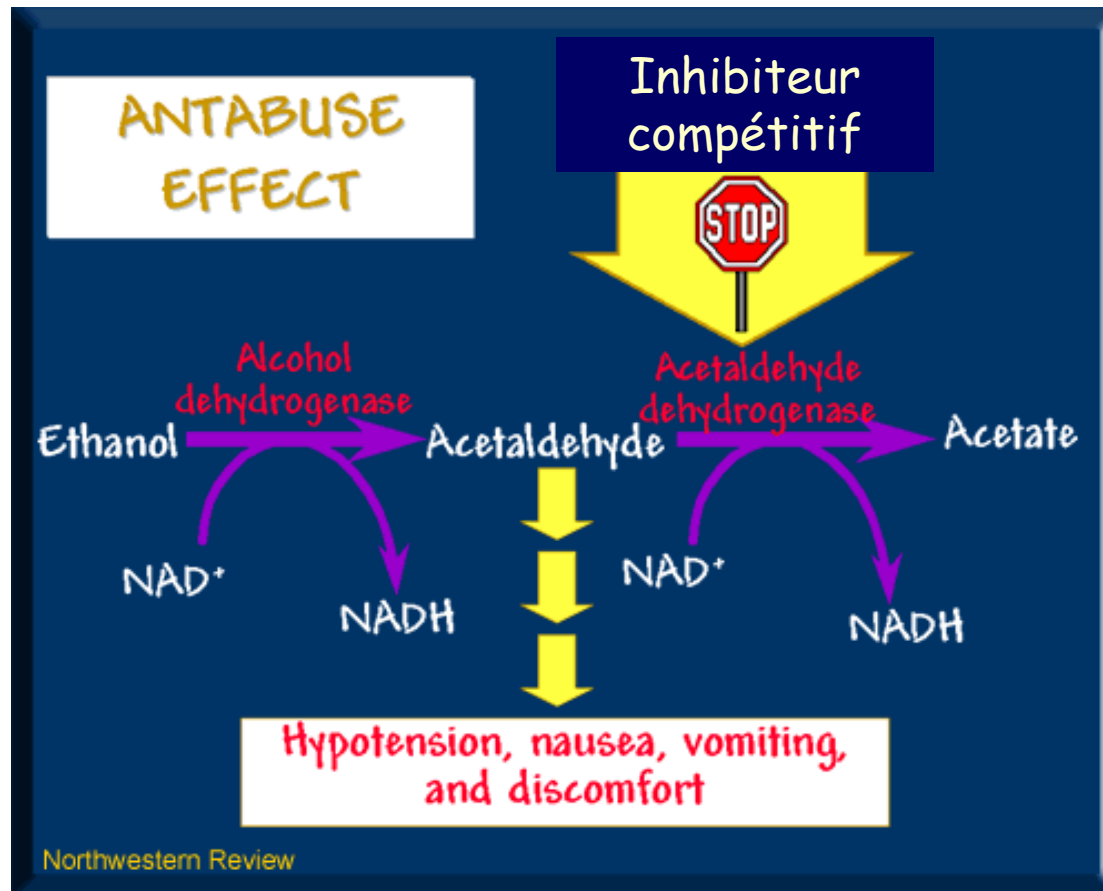
Le **cyanure** est un **inhibiteur compétitif** de la *cytochrome oxydase*. Enzyme essentielle à l'une des dernières étapes de la respiration cellulaire. Sans son activité, les mouvements respiratoires pulmonaires cessent.

Le Zyclon-B utilisé dans les camps de la mort nazis était constitué d'acide cyanhydrique.



**L'éthanol** est catabolisé dans le foie par une double oxydation: 1) en acétaldéhyde, 2) en acide acétique.

Antabuse: **inhibiteur compétitif** de l'acétaldéhyde déshydrogénase, causant une accumulation d'acétaldéhyde aux effets indésirables...vomissements, nausée!

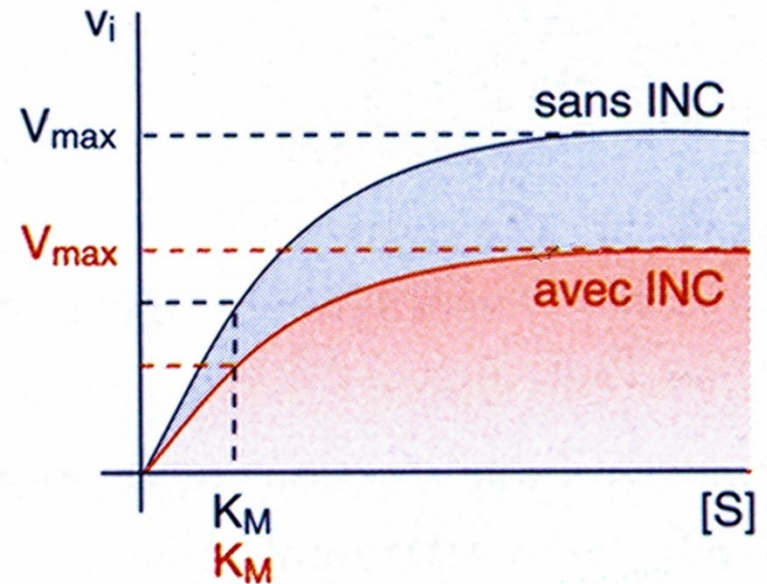
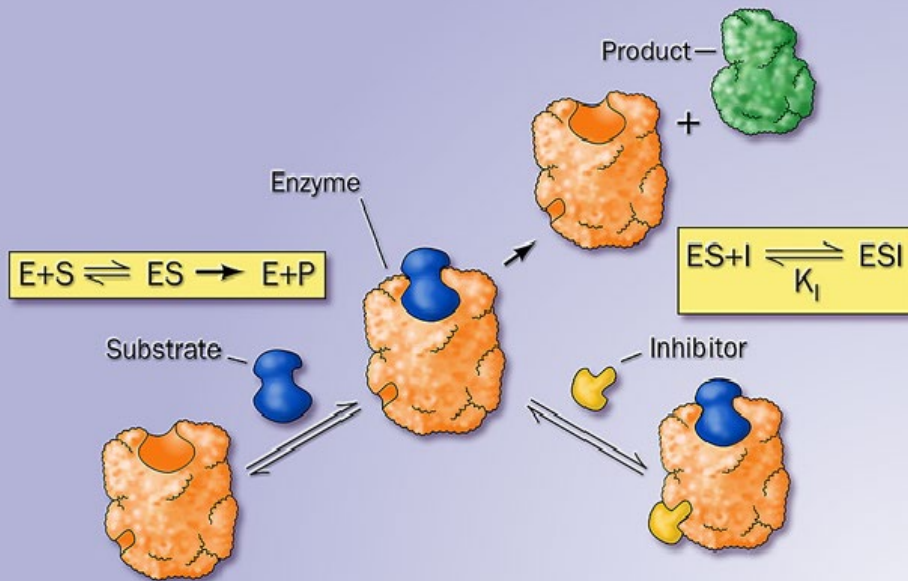


# Inhibiteurs non compétitifs

Non-analogues structuraux du substrat

Ne changent pas la  $K_M$ , mais diminuent la  $V_{\max}$

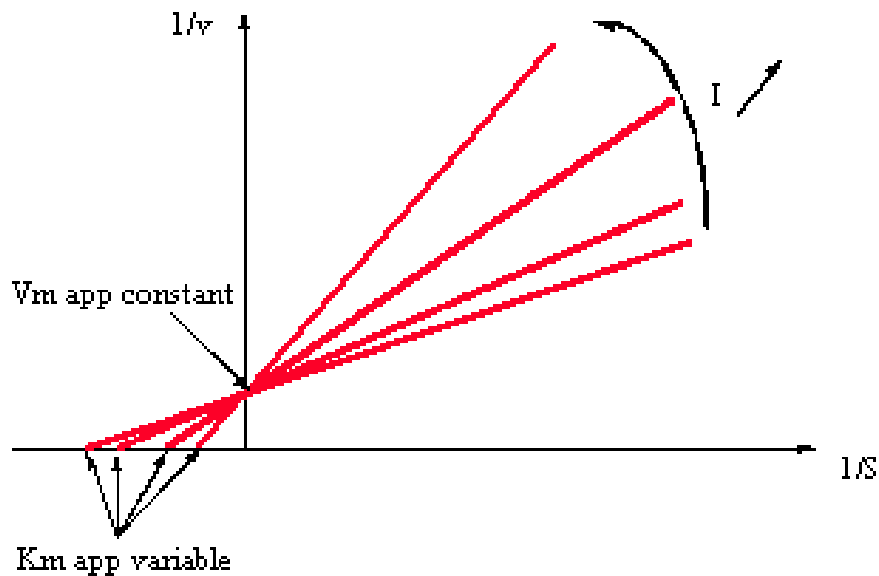
## Uncompetitive Inhibition



Typiquement des ions métalliques (cuivre, mercure, argent...)

# En **LINEWEAVER-BURK** "double inverse"

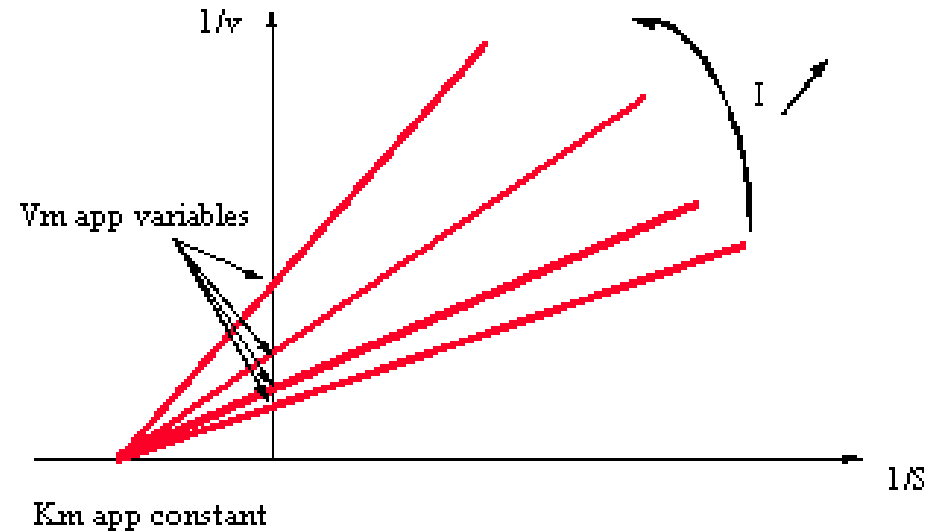
Inhibition compétitive



## **Inhibiteurs compétitifs**

Augmentent la  $K_M$ , ne changent pas la  $V_{max}$

Inhibition non compétitive

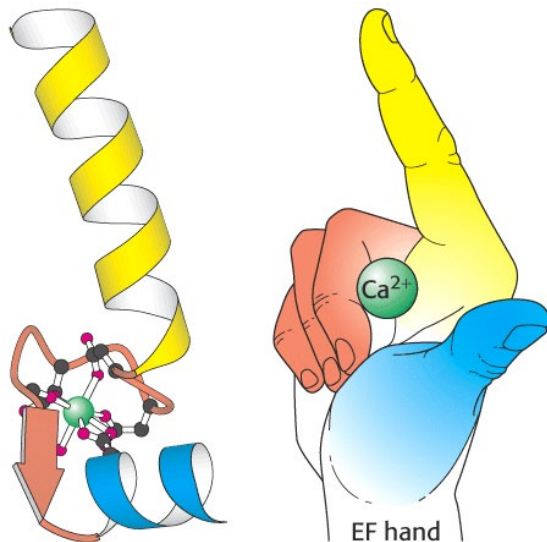


## **Inhibiteurs non compétitifs**

Ne changent pas la  $K_M$ , mais diminuent la  $V_{max}$

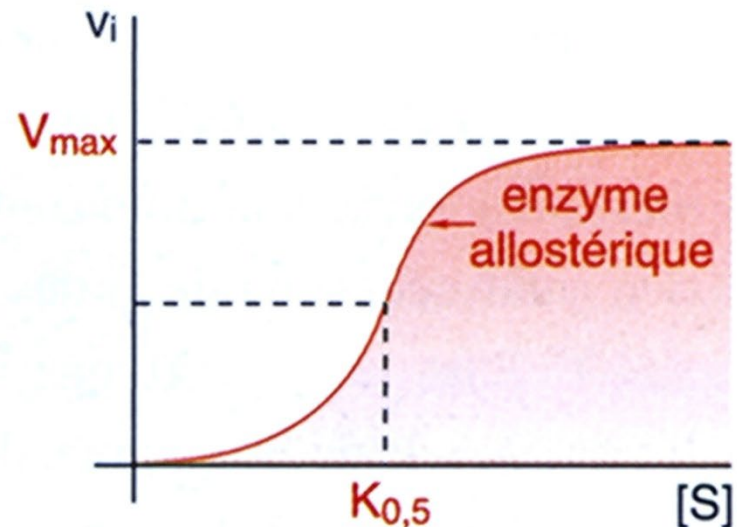
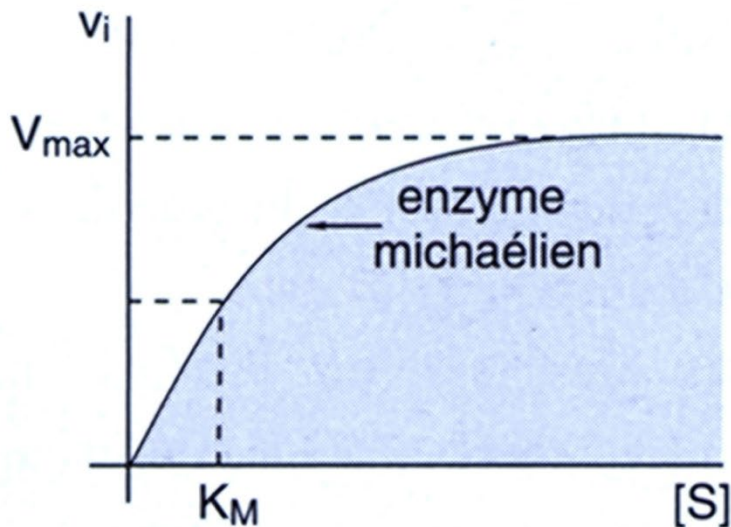
# Les activateurs

- Protéolyse limitée activatrice (clivage d'une liaison peptidique d'une proenzyme ou zymogène, enzymes digestion)
- Modification covalente réversible (phosphorylation / déphosphorylation)
- Ions métalliques (calcium, magnésium, etc..)



# Les enzymes allostériques

Enzymes **allostériques** caractérisés par une courbe **sigmoïde** (donc non-Michaeliens)

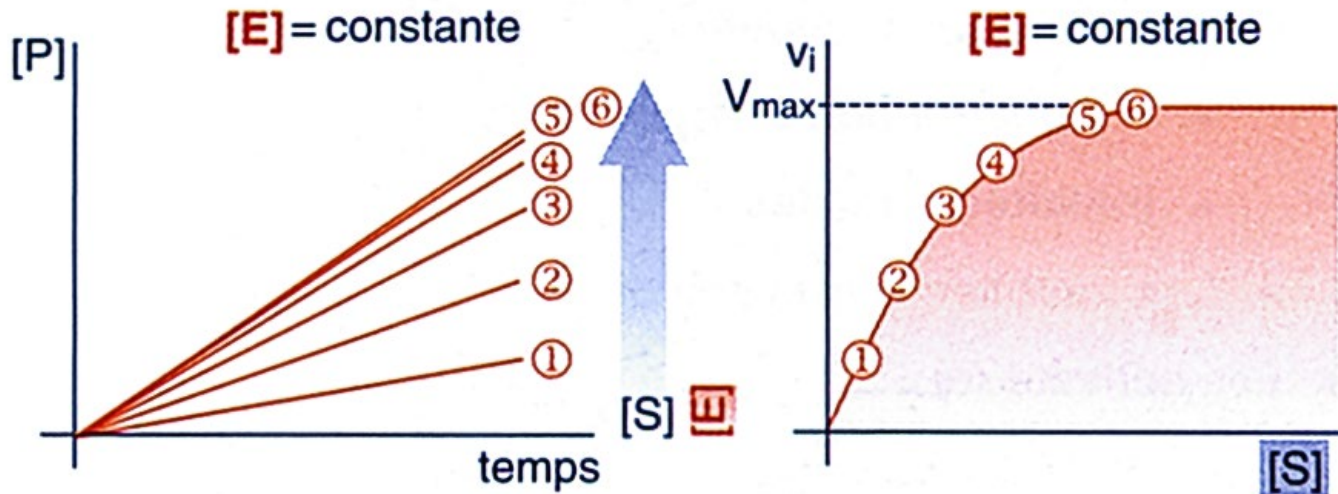


# Modèle Michaelis-Menten

Equation de Michaelis-Menten:

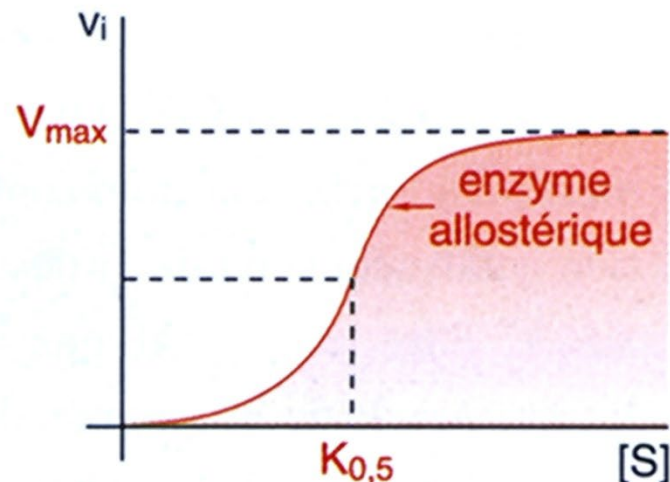
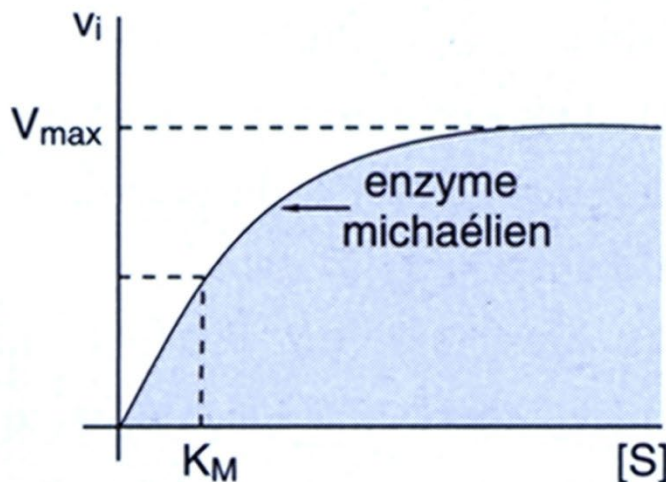
$$v_i = \frac{v_{\max} [S]}{k_M + [S]}$$

Quand  $[S]$  tend vers l'infini,  $v_i = v_{\max}$



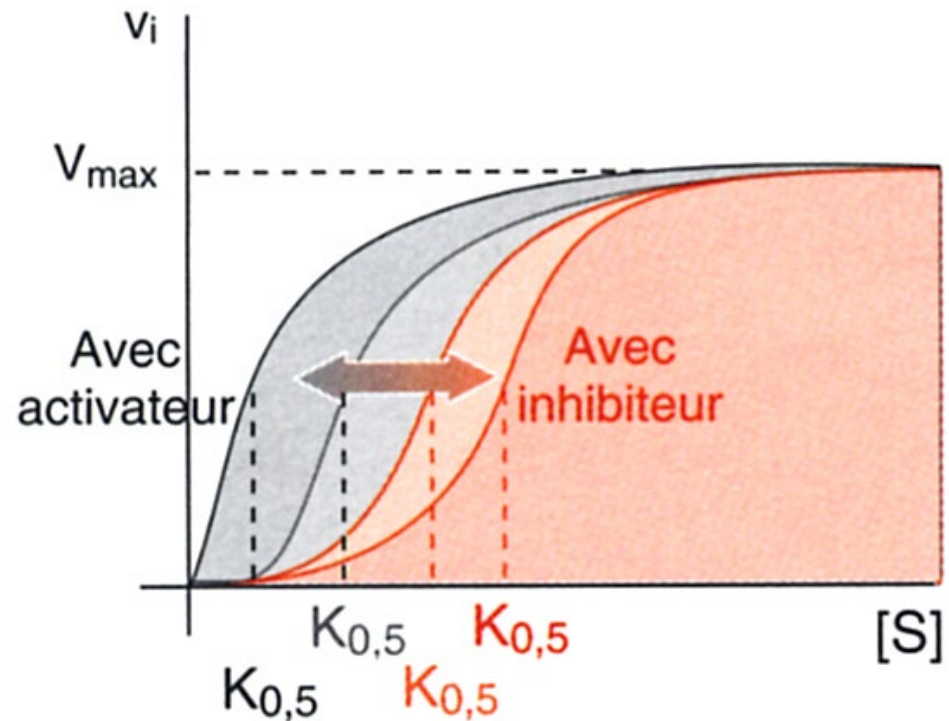
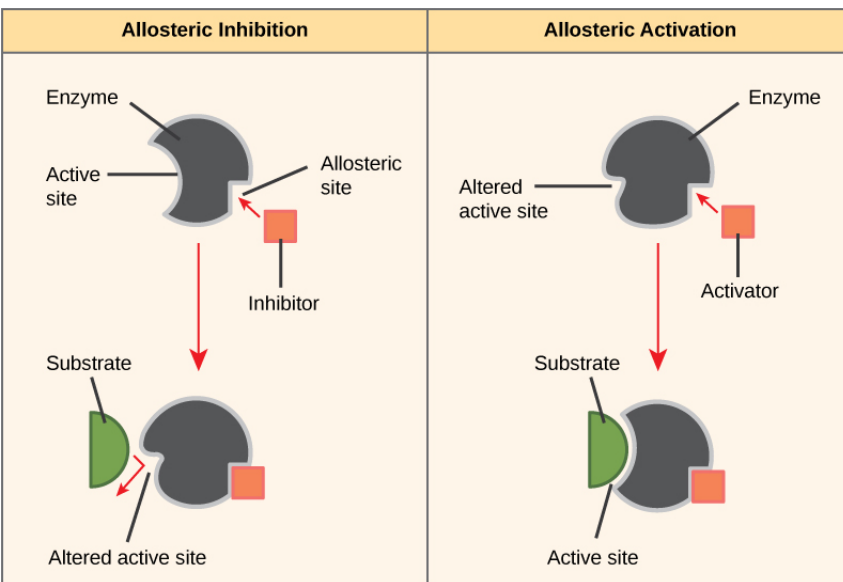
# Les enzymes allostériques

- $V_i$  accélère à l'approche du  $K_M$  (ou  $K_{0.5}$ ), **point d'inflexion** au  $K_M$ , puis  $V_i$  ralenti brutalement après  $K_M$
- La fixation du substrat sur l'enzyme augmente l'affinité de l'enzyme pour le substrat: **coopératif**



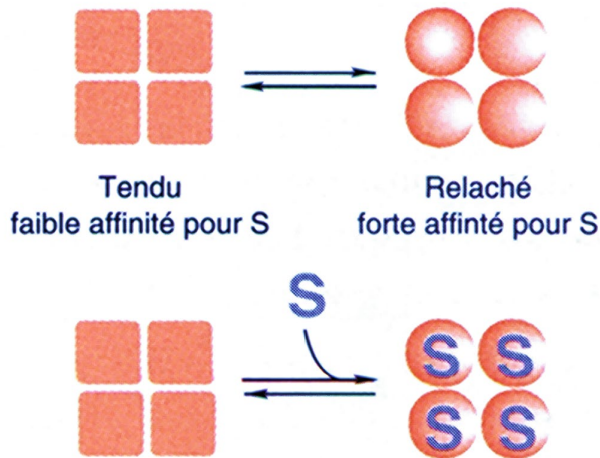
# Les enzymes allostériques ont des **effecteurs**

- Se lient sur les sites allostériques (du grec allos [allo-], autre, différent), donc  $\neq$  site substrat
- Effecteurs positifs (activateurs) ou négatifs (inhibiteurs)
- Augmentation ou diminution de l'affinité envers le substrat

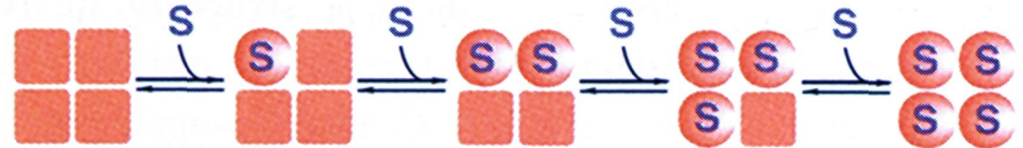


# Les enzymes allostériques: principe de coopérativité entre les sous-unités d'une enzyme.

## modèle concerté



## modèle séquentiel

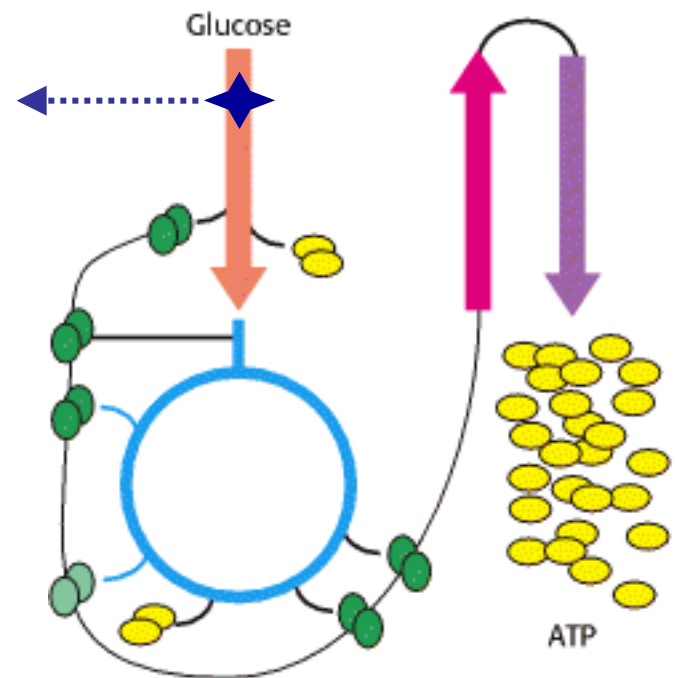
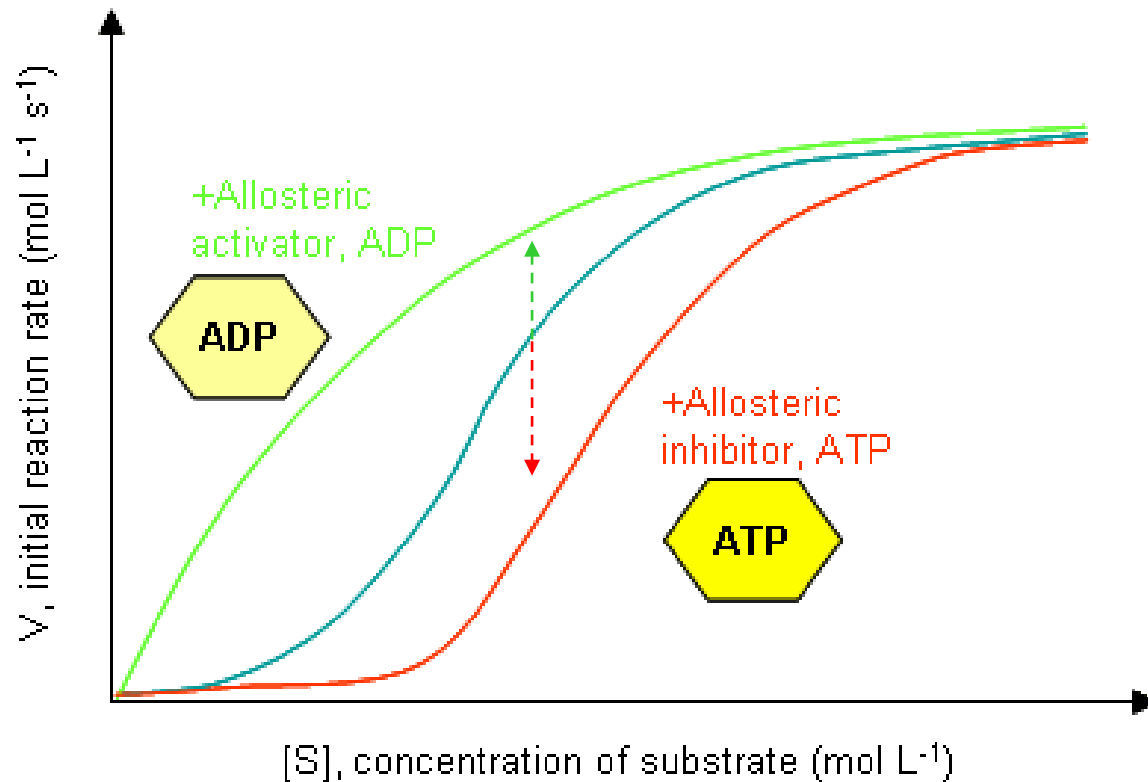


Quel que soit le modèle (concerté ou séquentiel):  
La présence d'un peu de substrat augmente l'affinité de l'enzyme pour ce même substrat  
→ Déplacement de la courbe à gauche  
→ Effet activateur

# La phosphofructokinase (glycolyse) est sous contrôle allostérique:

+++ par ADP

--- par ATP



# Inhibiteurs enzymatiques

## Non-spécifique

### Dénaturation

- Température
- pH  
(acides/bases)
- Alcool
- Métaux lourds

## Spécifique

### Réversible

#### Compétitif

### Irréversible

- Non-compétitif
- Effecteur  
allostérique négatif

- Métaux lourds

# Inhibiteur non compétitif et effecteur allostérique négatif: quelles différences ?

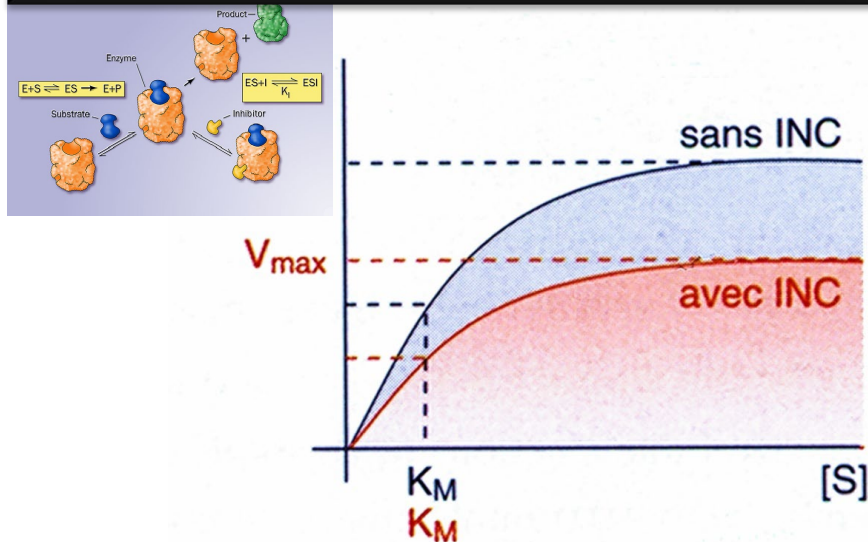
## Inhibiteur non compétitif

Ne changent pas la  $K_M$

Effets sur une enzyme  
*Michaelienne*

Effets non physiologiques,  
enzyme *piratée*

(assimilable à un poison)



## Effecteur allostérique

Module la  $K_{0,5}$

Effets sur une enzyme  
allostérique non-*Michaelienne*

Effets physiologiques,  
enzyme *régulée*

