

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

Université de RELIZANE
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences Biologiques



جامعة غليزان
RELIZANE UNIVERSITY

POLYCOPIÉ DE COURS

Destiné aux étudiants de 1^{er} année Master Biochimie Appliquée

Intitulé

ENZYMOLOGIE

Elaboré par :

Dr. BRAHMI Mostapha

Année universitaire : 2023/2024

Avant-propos

Ce polycopié est destiné aux étudiants de Master 1 en Biochimie Appliquée dans le cadre de l'enseignement du module d'Enzymologie. Il a été conçu comme un support pédagogique synthétique, visant à accompagner les cours magistraux et à offrir une base solide pour la compréhension des mécanismes enzymatiques.

L'enzymologie est une discipline clé en biochimie, qui permet d'analyser le rôle des enzymes dans les réactions biologiques, leur spécificité, leurs mécanismes d'action et leur régulation. Ces connaissances sont essentielles pour aborder les nombreuses applications en recherche biomédicale, en biotechnologie, en agroalimentaire ou encore en pharmacie.

Ce cours est structuré en **trois grands chapitres** :

1. **La cinétique enzymatique classique**, qui présente les fondements de la catalyse enzymatique, les paramètres cinétiques fondamentaux (K_m , V_{max} , etc.) et les modèles utilisés pour décrire le comportement des enzymes.
2. **Les enzymes allostériques**, qui explore les mécanismes de régulation enzymatique, les interactions coopératives, ainsi que les modèles de Monod-Wyman-Changeux (MWC) et de Koshland.
3. **La cinétique enzymatique à deux substrats**, qui aborde les mécanismes biomoléculaires, les modèles séquentiels et ping-pong, ainsi que leur représentation graphique.

Ce document constitue un guide théorique clair et concis qui permet de mieux comprendre les concepts abordés pendant les cours. Il vise à encourager une lecture active, en complément des supports visuels et des explications apportées durant les séances d'enseignement.

TABLE DES MATIERS

CHAPITRE 01 : CINETIQUE ENZYMATIQUE

1	INTRODUCTION	1
1.1	STRUCTURE DES ENZYMES	1
1.1.1	COFACTEURS	1
1.1.2	LES COENZYMES	2
1.1.3	COENZYME MOBILE OU COSUBSTRAT	4
1.2	SPECIFICITE POUR LE SUBSTRAT	5
1.3	SPECIFICITE DES ENZYMES	5
1.4	CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE DES ENZYMES	6
1.4.1	NOMENCLATURE	6
1.5	LES FACTEURS INFLUENÇANT LA REACTION ENZYMATIQUE	13
1.5.1	LA TEMPERATURE	13
1.5.2	INFLUENCE DU PH	14
1.6	ENERGIE D'ACTIVATION	14
1.6.1	LES ENZYMES ET L'ENERGIE D'ACTIVATION DE LA REACTION	14
1.6.2	ASPECTS THERMODYNAMIQUES	15
1.7	LA CINETIQUE ENZYMATIQUE	17
1.7.1	PRINCIPES DE BASE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE	17
1.8	RELATIONS ENTRE LA VITESSE DE REACTION ET LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT OU DE L'ENZYME	18
1.8.1	EFFET DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT	18
1.8.2	EFFET DE LA CONCENTRATION EN ENZYME	19
1.9	ETUDE DE LA VITESSE INITIALE D'UNE REACTION ENZYMATIQUE	20
1.9.1	CINETIQUE MICHAELIENNE	20
1.9.2	LA REPRESENTATION DE LINEWEAVER-BURK	23
1.9.3	INHIBITIONS DES REACTIONS ENZYMATIQUES	23
2	REPRESENTATION DE DIXON	27
3	EXPRESSIONS DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	29

CHAPITRE 02 : ENZYMES ALLOSTRIQUE

1	DEFINITION	32
2	PROPRIETES DES ENZYMES ALLOSTERIQUES	32
2.1	EFFET DE COOPERATIVITE	33
2.2	FORMALISME DE HILL	34
2.3	MODELISATION	35
2.3.1	LA TRANSITION CONCERTEE OU MODELE SYMETRIQUE DE MONOD, WYMAN ET CHANGEUX (1965) MWC	36

2.3.2	MODELE SEQUENTIEL OU MODELE KNF (KOSHLAND, NEMETHY, FILMER, 1966)	37
2.4	ACTION DES EFFECTEURS ALLOSTERIQUES	39
2.4.1	ACTIVATEURS ALLOSTERIQUES	39
2.4.2	INHIBITEURS ALLOSTERIQUES	39
2.4.3	MODULATIONS ALLOSTERIQUES DE TYPES K ET V	39
2.5	IMPORTANCE DES ENZYMES ALLOSTERIQUES	41
2.5.1	ENZYME ASPARTATE TRANS CARBAMYLASE (OU ATCase)	41
2.5.2	ENZYME HEXOKINASE	43

CHAPITRE 03 : CINETIQUE ENZYMATIQUES A DEUX SUBSTRATS

1	INTRODUCTION	47
2	ETUDE DES VITESSES INITIALES DE LA REACTION	47
2.1	ETUDE DESCRIPTIVE	47
2.2	NOMENCLATURE DES SYSTEMES	47
2.3	MECANISMES SEQUENTIELS	47
2.3.1	FIXATION AU HASARD	48
2.3.2	FIXATION ORDONNEE	50
2.4	MECANISME PING-PONG	52
2.5	ETUDE DES INHIBITEURS	55
2.5.1	UTILISATION DES ANALOGUES DE SUBSTRATS	55
2.5.2	INHIBITION PAR LES PRODUITS	56

Liste des figures

Figure 1 Les structures et les réactions du nicotinamide adénine dinucléotides (NAD+)	4
Figure 2 Activité enzymatique en fonction de la température	13
Figure 3 Activité enzymatique en fonction du PH ($V_i = f(\text{PH})$)	14
Figure 4 Evolution de l'énergie libre	15
Figure 5 Evolution de la vitesse initiale en fonction des espèces	17
Figure 6 Evolution de la concentration du produit en fonction du temps	18
Figure 7 Evolution de la réaction en fonction la concentration croissante du substrat	19
Figure 8 Effet de la concentration en substrat	19
Figure 9 Effet de la concentration en Enzyme	20
Figure 10 Evolution de la réaction enzymatique	21
Figure 11 Cinétique Michaelienne $V=f(S)$	22
Figure 12 La representation de Lineweaver-Burk $1/V=f(1/S)$	23
Figure 13 Graphe de Lineweaver-Burk dans le cas de réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur compétitif	24
Figure 14 Graphe de lineweaver-Burk dans le cas de réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur non compétitif	26
Figure 15 Graphe de Lineweaver-Burk dans le cas de réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur incompétitif	27
Figure 16 Representation graphique de l'inhibition compétitive	28
Figure 17 Representation graphique de l'inhibition non compétitive	29
Figure 18 Représentation de l'inhibition incompétitive	29
Figure 19 Structure des enzymes allostérique	32
Figure 20 Representation graphique de la cinétique des enzymes Michaelienne et allostérique	33
Figure 21 Evolution de la vitesse en fonction du nombre de Hill	35
Figure 22 Le modèle concerté de MWC	36
Figure 23 Modèle symétrique de NKF	37
Figure 24 Représentation des deux modèles MWC et NKF	38
Figure 25 Cinétique $V_i=f(S)$ pour une E allostérique de type K	40
Figure 26 Cinétique $V_i=f(S)$ pour une E allostérique de type V	40
Figure 27 Régulation allostérique de E Aspartate (ATCase)	42
Figure 28 Aspartate transarbamylase: Cinétique en absence et en presence d'effecteur allostérique (ATP, CTP)	43
Figure 29 La vitesse de la réaction catalysée par la PFK-1 en fonction de la concentration d'ATP	44
Figure 30 La vitesse de la réaction catalysée par la PFK-1 en fonction de la concentration de citrate et du NADH	45

Figure 31	Représentation primaire de la fixation au hasard indépendante	49
Figure 32	Représentation primaire de la fixation au hasard dépendante	50
Figure 33	Représentation primaire $1/V=f(1/A)$	53
Figure 34	Représentation secondaire	54

CHAPITRE 01
CINETIQUE ENZYMATIQUE

1 Introduction

Chez tous les organismes vivants, 99,9% des réactions chimiques sont catalysées par des molécules de nature protéique que l'on appelle enzymes. Une enzyme est une protéine qui sert à accélérer une réaction biochimique au sein d'un organisme vivant qui atteint des proportions considérables (plusieurs millions de fois), s'appelle la catalyse.

Les enzymes sont des macromolécules, des protéines ou des ARN (les ARN catalytiques sont dénommés ribozymes), qui reconnaissent spécifiquement certaines molécules et accélèrent les réactions de transformation de ces molécules suffisamment pour que leur vitesse devienne compatible avec le fonctionnement de l'organisme. Un second rôle essentiel joué par les enzymes est d'assurer le couplage physique entre réactions endergoniques et réactions exergoniques et de permettre ainsi de maintenir les systèmes biologiques dans des états hors d'équilibre, également indispensables pour le maintien de la vie.

1.1 Structure des enzymes

Une enzyme est un catalyseur biologique qui augmente la vitesse d'une réaction par plusieurs ordres de grandeur en diminuant son énergie libre d'activation, sans être elle-même affectée. Les molécules transformées sont les substrats et les molécules obtenues sont les produits.

La majorité des enzymes sont des protéines ou des glycoprotéines

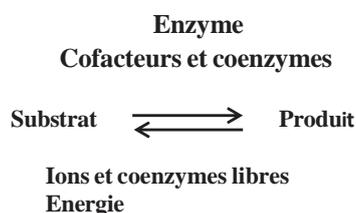
1.1.1 Cofacteurs

Plusieurs enzymes requièrent de petits constituants non protéiques, appelés : cofacteurs, pour leur activité.

Un cofacteur est un composé chimique non protéique ou un ion métallique, nécessaire à l'activité biologique d'une protéine, thermostable et de faible masse moléculaire, nécessaire à l'action d'une enzyme. Le cofacteur se lie à une structure protéique, appelée apoenzyme, et le complexe apoenzyme-cofacteur est appelé holoenzyme.

Certaines apoenzymes peuvent agir isolément, et n'ont pas besoin de substance adjuvante pour être des holoenzymes actives. C'est le cas de la RNase.

Schématiquement : cofacteur + apoenzyme = holoenzyme. (Enzyme complète et fonctionnelle).



Lorsqu'il est libre, le coenzyme s'associe au moment de la catalyse à la partie protéique appelée : apoenzymes pour former le complexe fonctionnel apoenzyme-coenzyme appelé Holoenzyme. Dans ce cas ces coenzymes prennent le nom de coenzymes vrais ou coenzymes Co substrat.

D'autres enzymes comportent dans leur structure le coenzyme. Ce dernier est lié à l'apoenzymes par une liaison covalente. Le coenzyme est alors appelé groupement prosthétique de l'enzymes et à un rôle activateur.

Ils interviennent:

- Pour transporter ou compléter un substrat.
- Pour accepter un produit
- Comme participant à la structure de l'enzyme.

Finalement, un enzyme qui est synthétisé sous une forme inactive qui demande à être activée par protéolyse partielle est un zymogène.

1.1.2 Les coenzymes

Les coenzymes sont des molécules organiques, non protéique, associée à l'apoenzyme qui sont indispensables à la réaction en permettant soit le transport d'un groupement du substrat, soit en participant à la structure de l'enzyme ou directement à la réaction de catalysé, par exemple :

- Comme substrats particuliers (Co substrats) comme des coenzymes redox (NAD, FAD, groupements héminiques...), l'ATP...
- Comme activateurs de substrats (coenzyme A, biotine...)
- Comme partie du site actif catalytique (thiamine pyrophosphate, pyridoxal-phosphate...)
- Le coenzyme n'est pas consommé lors de la réaction

Les coenzymes, sont généralement des vitamines (vitamines B, vitamine C, vitamine D, par exemple), une carence en vitamines dans un organisme, provoque une carence en enzymes et donc un manque de réactions essentielles.

Les vitamines B hydrosolubles fournissent des composants essentiels de nombreux coenzymes, la nicotinamide est un constituant des coenzymes rédox NAD et NADP , tandis que la riboflavine(vitamineB2) est un constituant des coenzymes rédox FMN et FAD .L'acide pantothénique (vitamineB5) est un constituant du coenzymes A, transporteur de groupes acyle et le pyridoxal(vitamine B6)est le cofacteur des transaminases et des décarboxylases. Sous sa

forme pyrophosphate, la thiamine participe à la décarboxylation des α -céto acides. L'acide folique et le cobamide sont des coenzymes utilisés dans le métabolisme des unités monocarbonées. En outre, plusieurs coenzymes contiennent l'adénine, le ribose et les groupes phosphorylés au sont l'AMP ou ADP.

Par exemple les déshydrogénases utilisent soit le nicotinamide- adénine dinucléotide (NAD⁺), soit le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺). Ce sont deux coenzymes parmi les plus importantes.

La fonction de la coenzyme est d'accepter deux électrons et un ion d'hydrogène du substrat, Lequel devient ainsi oxydé :



Les deux électrons du NADH peuvent être transférés à une seconde molécule, laquelle deviendra réduite (gain d'électrons).

- Cofacteur métallique : Ce sont des ions minéraux qui sont indispensable à l'activité enzymatique :
- Soit parce qu'il est responsable de la stabilité de la structure tertiaire de l'apoenzyme.
- Soit parce qu'il intervient dans la fixation du substrat.
- Soit parce qu'il participe directement à la catalyse.

Les groupements prosthétiques sont fortement liés à l'apoenzyme par des liaisons covalentes. Ils ne se détachent pas de l'apoenzyme au cours de la réaction (exemple : FAD). L'enzyme elle-même les remet en état initial. On peut citer : le phosphate de pyridoxal, la flavine mononucléotide (FMN), la flavine adénine dinucléotide (FAD), le pyrophosphate de thiamine et la biotine.

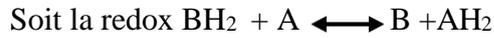
Les ions métalliques sont les groupes prosthétiques les plus fréquents. Un tiers environ des enzymes contient des ions métalliques de Fe (cytochromeoxydase , catalase , peroxydase) ,Cu (cytochrome oxydase , super oxyde dismutase) ,Mg(hexokinase ,glucose6 phosphatase ,pyruvate kinase) ,Mn(Arginase) , Ni (uréase) , Se (glutahion peroxydase) , Mo (nitrate réductase) et Zn (ADN polymérase ,anhydrase carbonique ,alcool déshydrogénase Anhydrase carbonique, Carboxypeptidases, phosphatase alcaline) , fortement associés, on les appelle des métallo-enzymes.

Les ions métalliques participent au processus catalytique selon trois modalités principales :

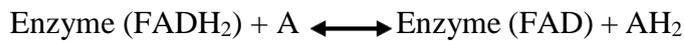
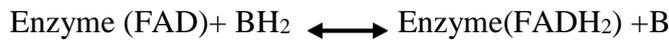
- ✓ En se liant aux substrats de sorte à les orienter correctement pour la réaction
- ✓ En participant à des réactions d'oxydo-réduction par des changements réversibles de l'état d'oxydation de l'ion métallique.
- ✓ En stabilisant électro-statiquement ou en masquant des charges négatives.

Exemples

Le couple FAD/FADH₂ fournit un bon exemple de cofacteur organique d'enzyme groupement prosthétique. Le FAD, un groupement prosthétique est lié de façon covalente à l'apoenzyme. Son cycle passe par les 2 états redox FAD (état oxydé) et FADH₂ (état réduit).

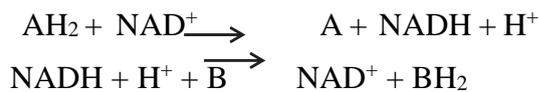


Catalysée par une oxydoréductase à dinucléotide d'adénine flavine (FAD), qui est lié de manière non-covalente à l'apoenzyme.



1.1.3 Coenzyme mobile ou cosubstrat

Le Co substrat, capable de se fixer réversiblement au site actif de l'enzyme, l'exemple le plus représentant : est fourni par les dérivé du nicotinamide (NAD et NADP) qui entrent dans les réaction d'oxydoréduction de métabolisme des glucide et lipides, il permet le transfert d'hydrogène et électron d'un substrat, qui sera oxydé ; à un autre qui sera réduit.



Par conséquent, NAD⁺ est capable de transférer des électrons du premier substrat (qui devient oxydé) au second (qui devient réduit).

Dans la cellule, les processus cataboliques produisant de l'énergie, requièrent le NAD⁺ comme coenzyme ; les processus synthétiques, cependant, utilisent le NADPH comme donneur d'hydrogène (figure 01).

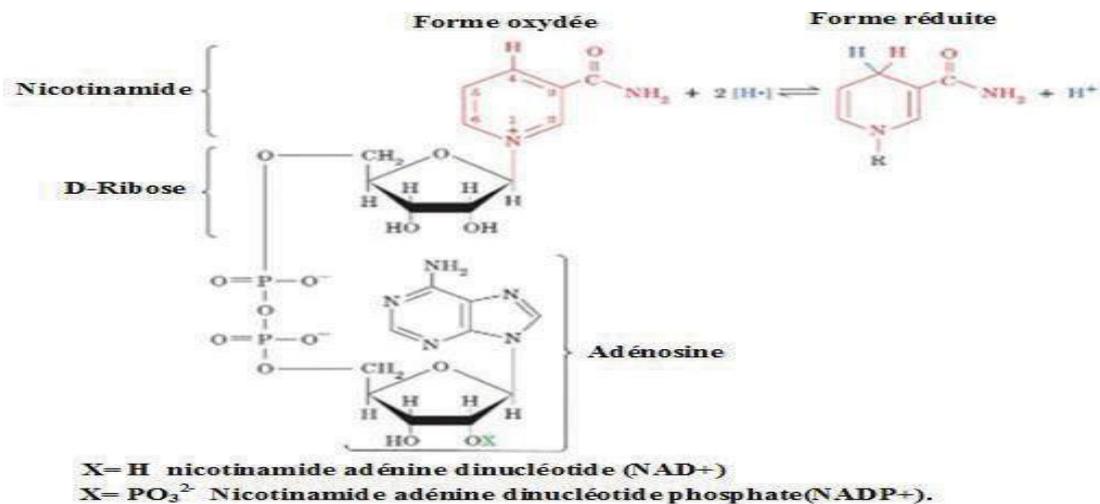


Figure 01 : les structures et les réactions du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺)

et du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate(NADP⁺). Leurs formes réduites sont NADH et NADPH.

- Un autre exemple, est la coenzyme A (CoA), qui, sous forme libre ou acétylée, participe à plusieurs étapes du cycle de l'acide citrique et du métabolisme des acides gras. De même, dans le cycle de l'acide citrique, mais aussi dans la glycolyse, les coenzymes flavine adénine dinucléotide (FAD) et nicotine-amide-adénine-dinucléotide (NAD), d'abord comme accepteurs d'électrons puis comme accepteurs de protons ou donneurs de protons, jouent un rôle. D'autres coenzymes, telles que l'adénosine triphosphate (ATP), transportent des groupes entiers, par exemple des résidus de phosphate.

1.2 Spécificité pour le substrat

Les forces non covalentes qui permettent aux substances et à d'autres molécules de se lier aux enzymes sont de même nature que celles qui imposent leurs conformations aux protéines elles-mêmes : forces de van der Waals, interactions électrostatiques, liaisons hydrogène, et interactions hydrophobes.

1.3 Spécificité des enzymes

La spécificité de l'enzyme pour son substrat est l'une des caractéristiques de la catalyse Enzymatique. Généralement, le site de liaison d'un substrat correspond à une poche à la surface de la molécule d'enzyme dont la forme est complémentaire à celle du substrat (complémentarité géométrique). De plus, les résidus d'acide aminé qui constituent le site de liaison sont disposés afin d'interagir spécifiquement avec le substrat pour l'attirer (complémentarité électronique). Les molécules qui diffèrent du substrat par la forme ou la distribution de leurs groupements fonctionnels ne peuvent se lier à l'enzyme efficacement : autrement dit, elles ne peuvent former de complexe enzyme –substrat qui conduise à la formation de produits.

La spécificité de substrat est variable : certains enzymes ont une spécificité absolue, transforment un substrat en un produit unique, d'autres ont une spécificité plus large, transforment les substrats d'une classe de substrats en autant de produits. Par exemple, la glucokinase ne phosphoryle que le glucose, tandis que l'hexokinase phosphoryle divers hexoses, dont le glucose ; l'alcool déshydrogénase catalyse la déshydrogénation de l'éthanol mais aussi d'autres alcools.

Quant à la spécificité d'action, elle est invariable : un enzyme, une seule réaction catalysée. Par exemple, les kinases ne catalysent que des réactions de phosphorylation en présence d'ATP. La spécificité enzymatique est due à un complément moléculaire entre le substrat et une région particulière de l'enzyme appelé, le centre actif.

Ils sont réglables : certains enzymes modifient leur activité catalytique en réponse à de signaux Métaboliques, ce qui permet l'ajustement de l'offre métabolique à la demande cellulaire.

Les iso enzymes (isozymes) : sont des enzymes qui ont même propriété catalytique mais qui diffèrent par leurs propriétés physico chimiques, telles que le pH, le point isoélectrique, la conductivité électrique et la mobilité électrophorétique. Les iso enzymes peuvent différer d'un tissu à l'autre. Ils sont spécifiques : ils transforment un substrat donné (spécificité de substrat) grâce à une réaction donnée (spécificité d'action).

Exemple : La lactate déshydrogénase (LDH)

La lactate déshydrogénase (LDH) catalyse l'oxydation de L-lactate en pyruvate. La lactate déshydrogénase (LDH) a 5 iso enzymes, visible par électrophorèse.

La LDH est un tétramère qui peut être formé par deux types de sous-unités : M (prédominante dans le muscle) et H (prédominante dans le cœur). Chaque sous-unités est le produit d'un gène différent.

La LDH est présente dans de nombreux organes :

- LDH-1 (H₄) - principalement dans le cœur
- LDH-2 (H₃M₁) - principalement dans le système réticulo-endothélial
- LDH-3 (H₂M₂) - principalement dans les poumons
- LDH-4 (H₁M₃) - principalement dans les reins
- LDH-5 (M₄) - principalement dans le foie et les muscles squelettiques

1.4 Classification et nomenclature des enzymes

1.4.1 Nomenclature

Les enzymes sont classées selon la réaction qu'ils catalysent. Quelques enzymes ont reçu un nom commun tel que trypsine, chymotrypsine ou papaïne qui est encore utilisé. Cependant, la plupart des enzymes sont désignés en ajoutant le suffixe « ase » au nom du substrat sur lequel ils agissent : ATPase, DNase, ou à un terme décrivant la réaction catalysée : glucose 6-phosphate déshydrogénase, pyruvate carboxylase.

La Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie a proposé une nomenclature, ajoutée au nom courant, qui tient compte des types de réaction que l'enzyme catalyse : elle s'écrit sous la forme E.C. a.b.c.d (E.C. abréviation de "Enzyme Commission") :

- EC : enzyme commission
- a : le type de réaction (classe)
- b : sous classe : type de fonction chimique du substrat participant à la réaction

- c : type de réaction : nature de l'accepteur
- d : numéro d'ordre de l'enzyme

Les 6 principales 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 Formation des liaisons avec hydrolyse ATP

1.4.1.1 EC 1 : oxido-réductases

Les oxydoréductases sont des enzymes catalysant les réactions d'oxydo-réduction en transférant les ions H⁺ et des électrons et jouent un rôle fondamental dans les processus biochimiques de la respiration. Elles sont associées à des coenzymes d'oxydoréduction (NAD, FAD, FMN...). Une enzyme catalysant une réaction du type :



Dans cet exemple, A est le réducteur (donneur d'électron) et B l'oxydant (accepteur d'électron). Les oxydoréductases sont classées EC 1 dans la nomenclature E.C des enzymes. Les oxydoréductases peuvent être ensuite divisées en sous-classes :

EC 1.1: les oxydoréductases qui agissent sur les groupes donneurs CH-OH (alcool oxydoréductase) : donneur d'hydrogène

1.1 Avec le NAD⁺ ou le NADP⁺ comme accepteur d'hydrogène

Exemples : L-Malate : NAD⁺-oxydoréductase (E.C 1.1.1.37)

Réaction : L- Malate + NAD⁺ \longleftrightarrow Oxaloacétate + NADH + H⁺ Lactate déshydrogénase à NADH (EC 1.1.1.27) :

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme du cytoplasme qui catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate ;



(1.1.2) avec un cytochrome comme accepteur

Exemples : L-lactate : Ferricytochrome C-oxydoréductase (E.C 1.1.2.3)



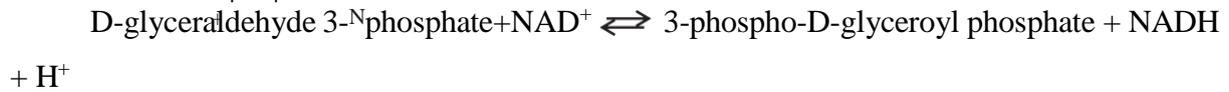
(1.1.3) Avec O₂ comme accepteur d'hydrogène

Exemples : glucose oxydase ou β -D-glucose : oxygène -oxydoréductase (1.1.3.4) Elle catalyse l'oxydation du β-D-glucose selon la réaction suivante :



EC 1.2 : les oxydoréductases qui agissent sur les groupes donneurs aldéhyde ou cétone
(1-2-1) : avec le NAD⁺ ou le NADP⁺ comme accepteur

Exemples D-glycéraldéhyde -3- phosphate : NAD⁺ –oxydoréductase (1.2.1.12)



(1-2-3) : avec O₂ comme accepteur

Exemples Xanthine : oxygène oxydoréductase (1.2.3.2) Xanthine+H₂O₂ +O₂ \rightleftharpoons Urate + H₂O₂

EC 1.3 : les oxydoréductases qui agissent sur les groupes donneurs :CH-CH (CH-CH oxydo réductases)

(1-3-1) avec le NAD⁺ ou le NADP⁺ comme accepteur

Exemples : dihydro-uracile NAD oxydoréductase ou 5,6-dihydropyrimidine:NAD⁺ oxydoréductase (E.C 1.3.1.1)



5,6-dihydrouracile:NADP⁺ 5-oxidoreductase (EC 1.3.1.2)



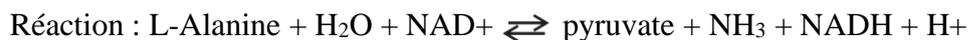
(1.3.2) avec le un cytochrome accepteur

(1.3.3) avec O₂ comme accepteur

EC 1.4 : les oxydoréductases qui agissent sur les groupes donneurs : CH-NH₂ (acide aminé oxydoréductases, monoamine oxydase)

(1.4.1) avec le NAD⁺ ou le NADP⁺ comme accepteur

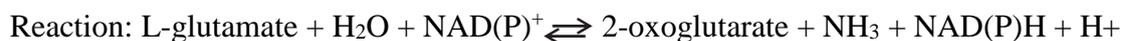
-Alanine déshydrogénase (EC 1.4.1.1)



- L-glutamate : NAD oxydoréductase (1.4.1.2)



-Glutamate déshydrogénase [NAD(P)⁺] (EC 1.4.1.3)



1.4.1.2 EC 2 : Transférases

Une transférase est une enzyme dont le rôle est de catalyser le transfert d'un groupe fonctionnel (méthyl transférases, glycosyltransférases , phosphotransférases) ,d'une molécule (appelée donneur) à une autre (appelée accepteur).

Par exemple, une enzyme catalysant la réaction suivante sera une transférase: A–X + B \rightarrow A + B–X

Dans cet exemple, A est le donneur et B l'accepteur. Il est courant que le donneur soit un

coenzyme.

Les transférases sont classées EC 2 dans la nomenclature EC. Elles peuvent ensuite être classées dans neuf sous-classes :

EC 2.1 qui regroupe les enzymes transférant un groupe à un carbone (méthyltransférase)

Exemple : L-homocystéine S-méthyl transférase (E.C 2.1.1.10)

Réaction : S-méthyl-L-méthionine + L-homocystéine \rightleftharpoons 2 L-méthionine

ARNt- méthyl transférases (EC 2.1.1.29), elles méthyle les résidus cytosine du ARNt

EC 2.2 qui regroupe les enzymes transférant un groupe carbonyle (aldéhyde ou cétone)

Transaldolase : EC 2.2.1.2

La transaldolase est une transférase qui intervient dans la voie des pentoses phosphates en catalysant la réaction suivante

Reaction: Sedoheptulose 7-phosphate + D-glyceraldehyde 3-phosphate \rightleftharpoons D-Erythrose 4-phosphate + D-fructose 6-phosphate.

EC 2.3 qui regroupe les Acyltransférases

Les acyltransférases sont des enzymes qui agissent sur le transfert d'un groupe acyle.

Exemple : amino-acid N- acetyltransferase (EC 2.3.1.1)

Réaction : acétyl-CoA + L-glutamate \rightleftharpoons CoA + N-acétyl-L-glutamate

EC 2.4 qui regroupe les glycosyltransférases Exemple : -Glycogène phosphorylase (EC 2.4.1.1)

Réaction : [(1 \rightarrow 4)- α -D-glucosyl] $_n$ + phosphate \rightleftharpoons [(1 \rightarrow 4)- α -D-glucosyl] $_{n-1}$ + α -D-glucose 1-phosphate

Aspartate aminotransférase : (EC 2.6.1.1)

Elle catalyse la réaction suivante : Aspartate + α -Cétoglutarate \rightleftharpoons Oxaloacétate + Glutamate. Il y a transfert de la fonction amine de l'aspartate sur l' α -Cétoglutarate (acide α -Cétoglutarique).

1.4.1.3 EC 3 : Les hydrolases

Les hydrolases constituent une classe d'enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse de molécules suivant la réaction générale :



On y trouve par exemple

Les estérases hydrolysent les liaisons des esters des acides organiques ou des acides minéraux, phosphorique, sulfurique, etc.

-les estérases (EC 3.1), qui hydrolysent les esters (R-CO-O~R'),

Exemple : Une phospholipase A2 (PLA2) : E.C 3.1.1.4, est une hydrolase qui libère spécifiquement l'acide gras estérifiant l'hydroxyle du carbone 2 du glycérol d'un

phosphoglycérine pour donner un lysophospholipide

Phosphatidylcholine + H₂O \rightleftharpoons Acide gras + 2-lysophosphatidylcholine

-les glucosidases, qui hydrolysent les oligo- ou polysaccharides : (sucre1-O~sucre2)

- α -glucosidase (E.C 3.2.1.20) est une glycoside hydrolase qui agit sur les liaisons osidiques dans lesquelles le glucose est engagé dans la liaison α -1-4

-les peptidases, qui hydrolysent les liaisons peptidiques : (Aa1-CO~NH-Aa2),

Exemple : Aminopeptidases libèrent séquentiellement les acides aminés N-terminaux.

leucyl aminopeptidase (EC 3.4.11.1).

les phosphatases, qui hydrolysent les produits phosphorés (exemple : ATP + H₂O \rightleftharpoons ADP + P).

Exemple :

Diphosphate phosphohydrolase (EC 3.6.1.1)

Diphosphate + H₂O \longleftrightarrow 2 phosphate

Triphosphatase (E.C 3.6.1.25)

Reaction: triphosphate + H₂O \leftrightarrow diphosphate + phosphate

- Groupe EC3.5 (enzymes agissant sur les liaisons carbone-azote)

Le groupe EC3.5 rassemble des enzymes appartenant à la famille des hydrolases. Elles ont pour particularité de catalyser des réactions d'hydrolyse dans des molécules possédant un carbone et un azote liés par liaison simple, double ou triple.

Asparaginase (EC 3.5.1.1)

Réaction : L-asparagine + H₂O \rightleftharpoons L-aspartate + NH₃

Glutaminase (EC 3.5.1.2) Réaction :

L-glutamine + H₂O \rightleftharpoons L-glutamate + NH₃

Groupe EC3.6 (enzymes spécifiques des anhydrides d'acides)

EC 3.6.1 : Polyphosphatases (enzymes spécifiques des anhydrides contenant du phosphore) Exopolyphosphatase (EC 3.6.1.11)

Réaction : (polyphosphate)_n + H₂O \rightleftharpoons (polyphosphate)_{n-1} + phosphate Triphosphatase (EC 3.6.1.25) :

Réaction : triphosphate + H₂O \rightleftharpoons diphosphate + phosphate

EC 3.6.2 : Sulfatases (enzymes spécifiques des anhydrides contenant un groupe sulfonyle)

Phosphoadenylylsulfatase : EC 3.6.2.2

3'-phosphoadenylyl sulfate + H₂O \rightleftharpoons adenosine 3',5'-bisphosphate + sulfate

1.4.1.4 EC 4 lyases

Les lyases clivent les liaisons C-C, C-O, C-N par d'autres types de réactions que les hydrolyses ou les oxydations, formant ainsi souvent une nouvelle liaison double ou un nouveau cycle.

Les lyases diffèrent des autres enzymes, en ce sens qu'elles ne nécessitent qu'un réactif dans le sens direct de la réaction, mais deux dans le sens inverse :



Par exemple une enzyme lyase catalyse la réaction de transformation de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) :



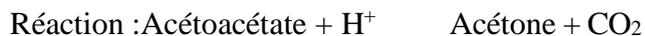
Les lyases peuvent être ensuite classées dans sept différentes sous-catégories :

EC 4.1 qui regroupe les lyases qui coupent les liaisons carbone-carbone :

les décarboxylases (EC 4.1.1), les aldolases (EC 4.1.2), oxacide lyases (EC 4.1.3)

Exemple :

Lyases : catalyse les réactions de coupure Pyruvate décarboxylase : EC 4.1.1.1
Acétoacétate décarboxylase (E.C 4.1.1.4)



EC 4.2 qui regroupe les lyases qui coupent les liaisons carbone-oxygène ; comme les déshydratases

EC 4.3 qui regroupe les lyases qui coupent les liaisons carbone-azote, comme la phénylalanine ammonia - lyase

EC 4.4 qui regroupe les lyases qui coupent les liaisons carbone-soufre.

1.4.1.5 EC 5 isomérases

Les isomérases se sont des enzymes qui catalysent les changements au sein d'une molécule, souvent par réarrangement des groupements fonctionnels et conversion de la molécule en l'un de ses isomères. Ces isomérases comprennent des racémases qui catalysent la transformation d'une forme D en forme L.

-Les isomérases catalysent des réactions du type :



Les isomérases sont regroupées dans la classe EC 5 dans la nomenclature EC. Elles sont ensuite réparties dans six sous-classes :

La classe EC 5.1 qui regroupe les enzymes qui catalysent des réactions de racémisation (racémases et d'épimerisation (épimérases)

Ex : Alanine racémase (E.C 5.1.1.1) :

Réaction : L-alanine = D-alanine

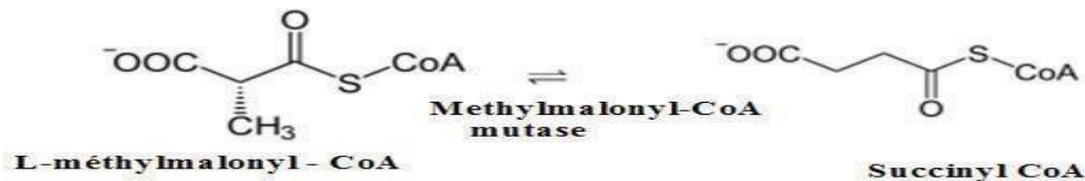
EC 5.2 qui regroupe les enzymes qui catalysent les réactions d'isomérisation cis-trans (cis-trans isoméras)

EC 5.3 qui regroupe les oxydo-réductases intramoléculaires

EC 5.4 qui regroupe les transférases intramoléculaire (mutases).

Exemple : Méthyl malonyl CoA mutase : E.C 5.4.99.2

La méthylmalonyl-CoA mutase, est une isomérase qui catalyse l'isomérisation de la L-méthylmalonyl-CoA en Succinyl-CoA par transfert intramoléculaire d'un groupe fonctionnel carboxyle en faisant intervenir de la cobamamide (ou adénosyl-cobalamine, un dérivé de la vitamine B12) comme groupement prosthétique :



1.4.1.6 EC 6 ligases

Les ligases sont des enzymes qui catalysent la jonction de deux molécules par de nouvelles liaisons covalentes avec hydrolyse concomitante de l'ATP ou d'autres molécules similaires. On différencie les ligases entre elles selon la liaison qu'elles créent : carbone-carbone, carbone- azote, etc.

Réaction : $X + Y + \text{ATP} \rightleftharpoons X\text{-}Y + \text{AMP} + \text{PPi}$ ou $X + Y + \text{ATP} \rightleftharpoons X\text{-}Y + \text{ADP} + \text{Pi}$.

Les ligases sont classées EC 6 dans la nomenclature EC des enzymes. Cette classe peut ensuite être divisée en six sous-classes :

EC 6.1 : regroupe les ligases qui forment des liaisons carbone-oxygène Exemple : Alanyl RNA synthétase (E.C 6.1.1.7)

Est une enzyme qui catalyse la jonction de deux molécules par de nouvelles liaisons covalentes avec hydrolyse concomitante de l'ATP ou d'autres molécules similaires.

EC 6.2 : regroupe les ligases qui forment des liaisons carbone-soufre Exemple : Acétyl CoA synthétase (E.C 6.2.1.1) ou acétate-CoA ligase Réaction : $\text{ATP} + \text{Acétate} + \text{HSCoA} \rightleftharpoons \text{Acétyl CoA} + \text{AMP} + \text{PPi}$

EC 6.3 : regroupe les ligases qui forment des liaisons carbone-azote Exemple : Glutamine synthétase (E.C 6.3.1.2)

Réaction : $\text{ATP} + \text{glutamate} + \text{NH}_3 \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{Glutamine}$ EC 6.4 : regroupe les ligases qui forment des liaisons carbone-carbone Exemple : Pyruvate carboxylase (6.4.1.1)

Réaction : Pyruvate + HCO₃⁻ + ATP ⇌ ADP + P_i + Oxaloacétate.

1.5 Les facteurs influençant la réaction enzymatique

1.5.1 La température

Toute variation de température peut agir sur un système enzymatique par deux effets indépendants qui doivent être considérés séparément : l'action sur les constantes cinétiques de la réaction et l'action dénaturante sur la protéine enzymatique entraînant son inactivation.

La vitesse des réactions chimiques est fonction de la température.

Pour des températures comprises entre 10 et 60°C environ, une réaction enzymatique (comme toute réaction chimique) voit sa vitesse de réaction augmenter ;

Chaque enzyme est caractérisée par une température optimale pour laquelle son activité enzymatique est maximale (figure 2).

Quand la température augmente au-delà de 40°C, il se produit une inactivation (« dénaturation ») progressive de la protéine enzymatique.

A températures élevées, fluctuations importantes de la structure 3D de la protéine avec perte de La perte de la structure tridimensionnelle entraîne une perte de fonction et donc une chute de l'activité enzymatique structure tertiaire : dénaturation thermique, souvent irréversible.

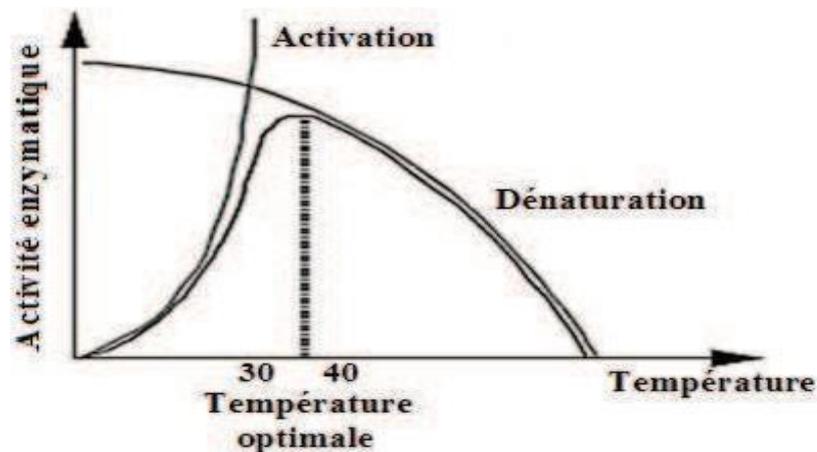


Figure 2 : Activité enzymatique en fonction de la température

-Le pic autour de 40°

-Le graphe qui représente les quantités de produit transformées par une enzyme (A) en fonction de la température (θ) du milieu d'incubation, est une courbe ascendante jusqu'à une température (ici 45°C.) où l'activité de l'enzyme est la plus grande, puis rapidement descendante.

1.5.2 Influence du pH

Les enzymes sont des protéines constituées d'acides aminés pouvant porter des fonctions chimiques sensibles aux variations de pH. Ces fonctions chimiques peuvent se protonner ou se déprotonner selon le pH du milieu dans lequel se trouve l'enzyme (figure 3).

Le pH peut agir sur plusieurs facteurs :

L'ionisation des résidus de l'enzyme et du substrat et/ou du produit

La structure tertiaire des protéines et donc la stabilité de l'enzyme

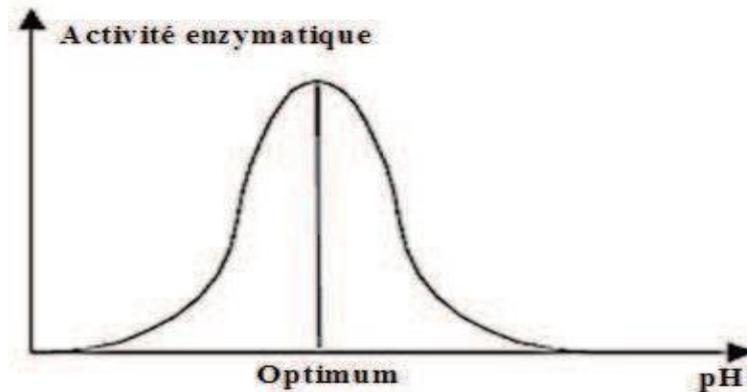


Figure 3 : Activité enzymatique en fonction du pH ($V_i = f(\text{pH})$)

1.6 Energie d'activation

1.6.1 Les enzymes et l'énergie d'activation de la réaction

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

La fonction d'une enzyme E est de catalyser une réaction chimique conduisant d'un substrat S à un produit P :

L'activité enzymatique se manifeste donc par une accélération des vitesses de réaction en présence de l'enzyme, par rapport à la réaction, non-catalysée (Figure 4).

Exemple : $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ Sans catalyseur : 18 kcal/mole d' H_2O_2

Catalyseur chimique (le platine) : 11.7 kcal/mole d' H_2O_2

Enzyme(catalase) : 2 kcal/mole d' H_2O_2

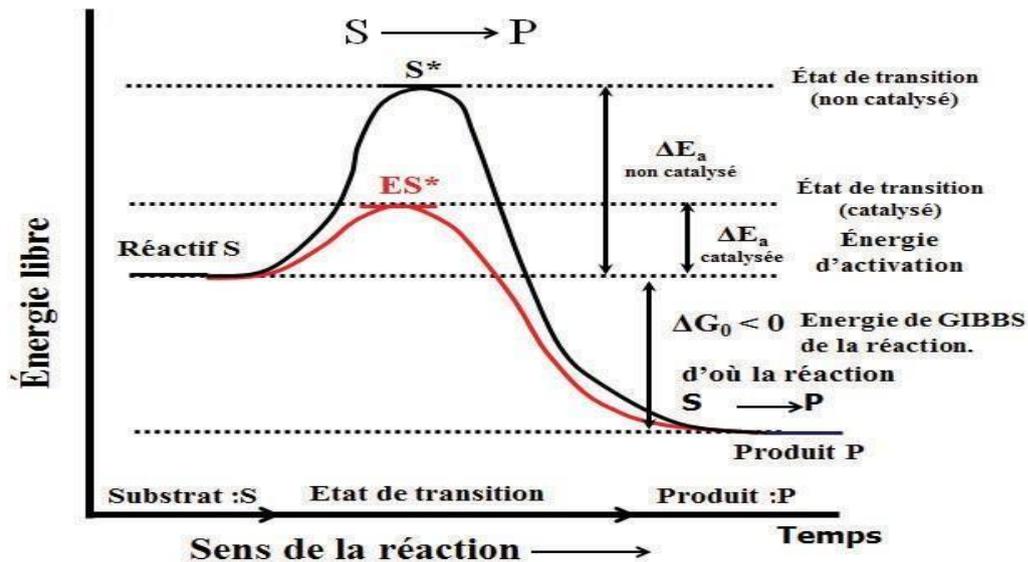


Figure 4 : Evolution de l'énergie libre

Au cours d'une réaction enzymatique, des échanges d'énergie avec le milieu environnant ont lieu : certaines liaisons du substrat sont rompues en absorbant de l'énergie et les liaisons du produit sont formées en libérant de l'énergie.

L'énergie d'activation ou l'énergie libre d'activation (ΔG_0) est l'énergie qui doit être absorbée par les réactifs pour que leurs liaisons soient brisées.

Les réactifs doivent atteindre un état de transition instable dans lequel les liaisons sont plus fragiles et plus faciles à briser.

Dans toutes les réactions il existe une barrière d'énergie qui doit être franchie pour que la réaction puisse se dérouler.

Elle correspond à la quantité d'énergie nécessaire pour faire passer les molécules du substrat sous une conformation correcte pour être transformée en molécule P, c'est à dire pour que S atteigne son état de transition, c'est l'énergie d'activation, car, pour que la réaction ait lieu, le substrat doit atteindre un état d'énergie libre plus élevée et l'on dit qu'il est activé lorsqu'il se trouve dans cet état. L'état de transition est le point le plus élevé d'énergie libre sur la voie réactionnelle qui conduit du substrat jusqu'au produit.

La présence de l'enzyme entraîne donc une diminution de l'énergie d'activation nécessaire pour atteindre l'état de transition. Il apparaît alors que l'accroissement de vitesse de réaction est dû à un abaissement de la barrière énergétique, qui sépare les éléments initiaux et finals d'une réaction.

1.6.2 Aspects thermodynamiques

La variation d'énergie libre de Gibbs ΔG_0 , décrit de façon quantitative, à la fois la

direction dans laquelle une réaction chimique a tendance à se faire et les concentrations en réactifs et en produits qui seront présents lorsqu'un état d'équilibre sera atteint.

Plus grande est la diminution d'énergie libre, plus les réactifs seront transformés en produits à l'équilibre.

La variation d'énergie de GIBBS, définie comme la différence entre l'énergie de GIBBS des produits et l'énergie de GIBBS des réactifs qui permet de déterminer le sens spontané d'une réaction : $\Delta G_0^{\text{réaction}}$

ΔG_0 de la réaction = G produits – G réactifs < 0 Avec G produits < G réactifs

Le système évolue spontanément vers l'état pour lequel l'énergie de GIBBS est la plus basse ; le sens spontané d'une réaction correspond à une variation négative d'énergie de GIBBS, $\Delta G < 0$, la réaction sera spontanée de la gauche vers la droite (S → P) En condition standard de pression et de concentration des réactifs , et avec un pH neutre (conditions biologiques), la valeur de la variation d'énergie de Gibbs ΔG_0 standard d'une réaction chimique à l'équilibre est liée à la constante d'équilibre K_{eq} par la relation suivante : $\Delta G = \Delta G_0 + RT (\ln K_{eq}) = 0$

$$\Delta G_0 + RT (\ln K_{eq}) = 0$$

$$\Delta G_0 = -RT \ln K_{eq} = -RT \ln ([P]_{eq}/[R]_{eq})$$

K_{eq} : La constante d'équilibre d'une réaction correspond au rapport entre les concentrations des produits (P) et des réactifs (R) à l'équilibre

R : est la constante des gaz parfaits (1.98 cal/mol.°K ou 8.31J /mol.°K)

T : température en °K(Kelvin)

Pour qu'un processus ait lieu, la variation globale d'énergie libre (ΔG_0) doit être négative. Si $\Delta G_0 < 0$, la réaction est dite exergonique ou spontanée; elle peut se faire spontanément de gauche vers la droite (S → P)

Si $\Delta G_0 > 0$, la réaction ne se fait spontanément, la réaction est dite endergonique.

Si $\Delta G_0 = 0$ la réaction se fait sans consommation d'énergie.

En conséquence, les enzymes augmentent la vitesse à laquelle un équilibre est atteint mais elles ne modifient pas ΔG réaction (la constante d'équilibre de dissociation n'est pas modifiée).

1.7 La cinétique Enzymatique

1.7.1 Principes de base de la cinétique enzymatique

La vitesse initiale de réaction consiste à mesurer la vitesse de disparition du substrat dans des conditions expérimentales telles que cette vitesse soit linéaire au cours du temps. On peut également apprécier cette vitesse en mesurant la vitesse d'apparition du produit de la réaction. Soit la réaction catalysée par l'enzyme E qui transforme le substrat S en produit P (figure 5).



La vitesse de la réaction v est la suivante :

$$V = - d[S]/dt = d[P]/dt = K [S].$$

La vitesse de réaction représente le nombre de moles de substrat transformées en moles de produit, dans un volume donné et dans un temps donné.

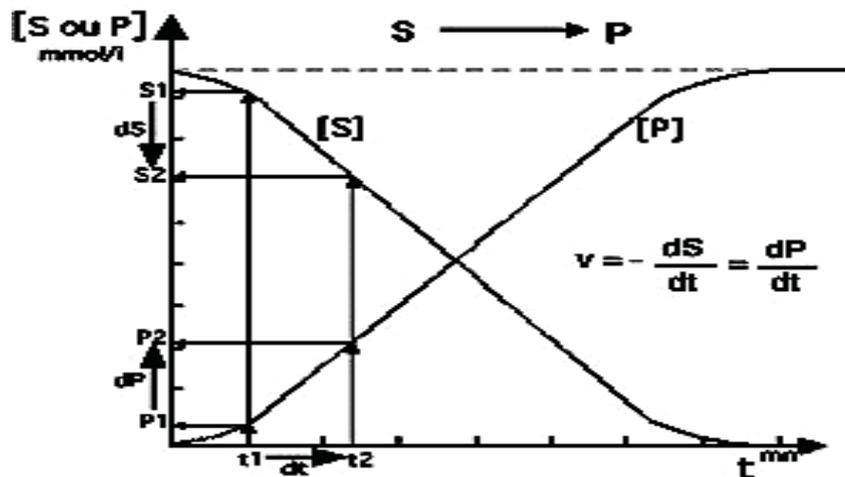


Figure 5 : Evolution de la vitesse initiale en fonction des espèces

La figure 5 montre, pendant un temps assez bref, l'accumulation du produit est linéaire en fonction du temps, ce qui signifie que la vitesse de réaction est constante pendant la période initiale où $S \rightarrow P$.

Par la suite, la réaction se ralentit, puis s'arrête ; le ralentissement est dû à l'épuisement graduel du substrat et l'arrêt à l'équilibre avec la réaction inverse $P \rightarrow S$.

Dans les expérimentations de cinétique enzymatique simples, afin d'étudier dans des conditions expérimentales comparables la vitesse d'une réaction en fonction de la concentration des molécules qui y prennent part et de la température, on se limite à l'étude de la vitesse initiale V_i , c'est-à-dire la vitesse au début de la réaction, qui est la tangente $d[P]/dt$ à la courbe expérimentale ; dans cette phase, la réaction inverse est négligeable.

La vitesse de réaction (caractérisée par la vitesse d'apparition du produit, soit $v = d[P]/dt$), varie avec le temps (figure 6).

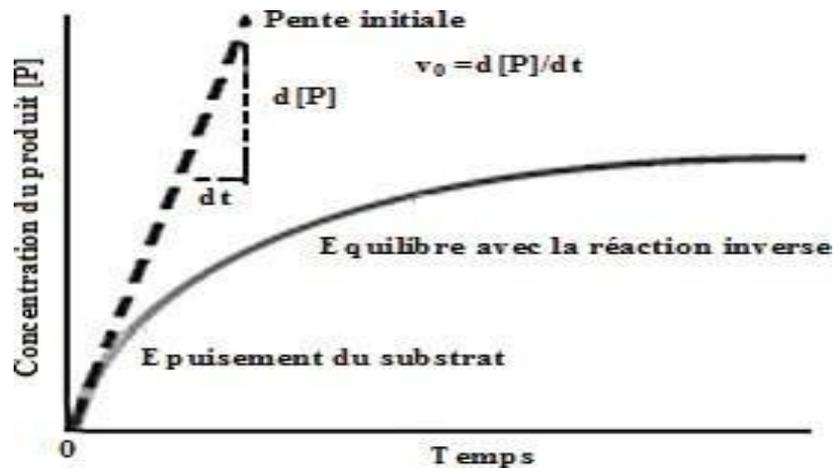


Figure 6 : Evolution de la concentration du produit en fonction du temps

La représentation des vitesses initiales de réaction mesurées pour différentes concentrations en substrat ($v_0 = f([S])$), a une allure hyperbolique et tend asymptotiquement vers une limite dite vitesse maximale V_{max} atteinte pour une valeur de $[S]$ dite saturante, l'enzyme est saturée par le substrat et le rendement est maximum. Ce phénomène de saturation est un caractère essentiel des réactions enzymatiques ; les réactions non catalysées par un enzyme ne présentent pas ce phénomène.

1.8 Relations entre la vitesse de réaction et la concentration du substrat ou de l'enzyme

1.8.1 Effet de la concentration en Substrat

L'activité enzymatique varie grandement selon la concentration en substrat. Pour une concentration constante d'enzyme $[E]$, la concentration du produit $[P]$ peut être mesurée en fonction du temps t pour des valeurs croissantes de la concentration du substrat $[S]$ (figure 7).

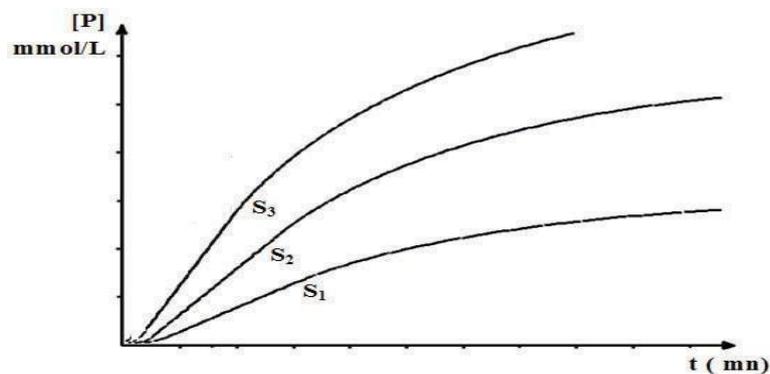


Figure 7 : l'évolution de la réaction en fonction de la concentration croissante du substrat

Aux faibles concentrations en substrat, la formation de produit sera lente parce que l'enzyme rencontrera rarement une molécule de substrat et la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du substrat.

Aux fortes concentrations en substrat, l'enzyme s'y fixe plus souvent et la vitesse de la réaction est plus élevée qu'une présence de faibles concentrations en substrats. Dans ce cas, la vitesse de réaction est indépendante de la concentration du substrat et tend vers une valeur constante (vitesse maximale V_{max}). Toute augmentation de la concentration du substrat n'augmente plus V_{max} , on dit que l'enzyme est saturée en substrat.

La courbe de l'activité en fonction de la concentration en substrat a une forme d'hyperbole (figure 8).

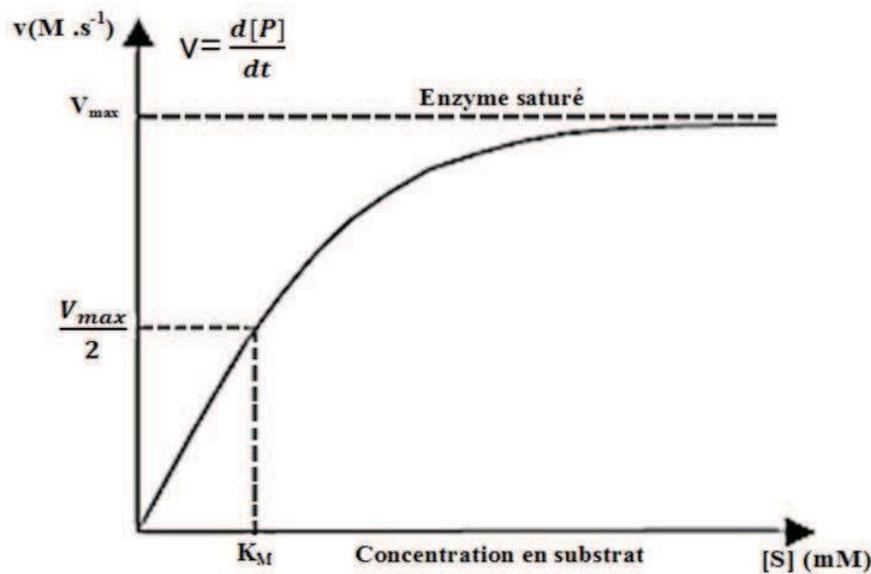
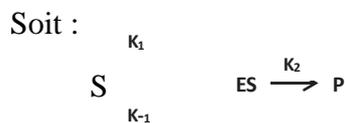


Figure 8 : Effet de la concentration en substrat

1.8.2 Effet de la concentration en enzyme



Plus forte est $[E]$, plus rapide est la réaction et V_i apparaît alors comme directement proportionnelle à $[E]$.

La mesure de l'activité enzymatique en présence de concentrations croissantes d'enzyme, et dans certaines conditions, montre que V_i et V_{max} varient linéairement avec $[E]$. A l'état stationnaire : $v = k [E]$ (figure 9).

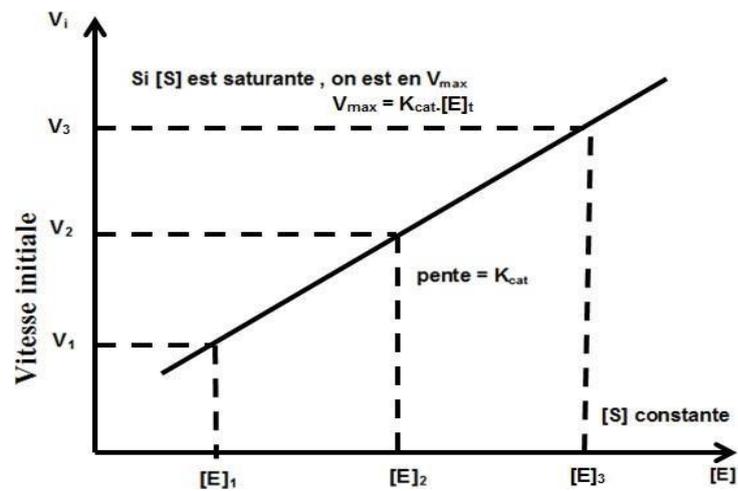


Figure 9 : Effet de la concentration en enzyme

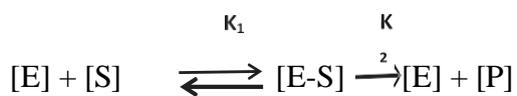
V_i : étant le nombre de molécules de substrat transformées par unité de temps K : est la constante de vitesse de la réaction enzymatique

La relation linéaire entre V_i et $[E]$ permet de doser l'enzyme d'après son activité. L'unité est définie comme la quantité d'enzyme qui, dans des conditions expérimentales déterminées, donne une mole de produit par unité de temps.

1.9 Etude de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique

1.9.1 Cinétique Michaelienne

Michaelis et Menten ont proposé un modèle s'appuyant sur les hypothèses suivantes :
La première étape de la transformation de S en P est la fixation de S par liaison faible sur E, la réaction étant réversible



La deuxième étape est la transformation d'ES en EP, P étant immédiatement libéré. Cette étape correspond à des ruptures –formations de liaisons covalentes (figure 10).

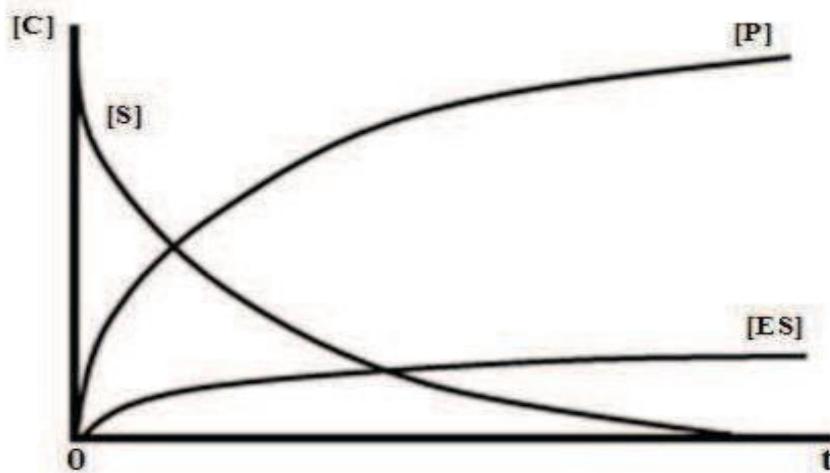


Figure 10 : Evolution de la réaction enzymatique

à $t=0$, la concentration en substrat est désignée $[S]_0$

La concentration en enzyme est désignée $[E]_T$ et reste constante tout au long de la mesure
à $t=0$, la concentration du complexe enzyme-substrat, $[ES]$, est égale à 0

À $t=0$, la concentration en produit est égale à 0

Leonor Michaelis et Maud Menten ont déduit de ce modèle en 1913 une équation qui prédit la vitesse initiale (de formation de P) en fonction de la concentration du substrat : Vitesse initiale de la réaction : $v_i = d[P]/dt = k_2 \cdot [ES]$

La vitesse d'apparition du produit P (vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme) dépend de k_2 et de la concentration en ES. $v_i = k_2 [ES]$

La $[ES]$ dépend de sa vitesse de formation et de sa vitesse de disparition. V formation ES = $k_1 [E] [S]$

$$v_{\text{disparition ES}} = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

La vitesse de réaction dépend de la concentration du complexe enzyme-substrat $[ES]$. Il faut donc calculer la concentration de $[ES]$: $[E-S]$ se forme à partir de $[E] + [S]$ et se décompose soit en $[E] + [S]$, soit en $[E] + [P]$.

Vitesse de formation de $[E-S]$: $v_f = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$ Vitesse de dégradation de $[E-S]$: $v_d = (k_{-1} + k_2) \cdot [E-S]$

$[ES]$ atteint rapidement une valeur constante (condition dite de "steady state"),

$$\text{donc } v_d = v_f$$

$$(k_{-1} + k_2) \cdot [E-S] = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$$

$$[E-S] = ([E] \cdot [S] k_1) / (k_{-1} + k_2) = [E] \cdot [S] / K_M$$

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1 = \text{constante de Michaelis (-Menten)}$$

La constante de Michaelis-Menten, K_M :

La constante K_M représente l'affinité du substrat pour l'enzyme, elle caractérise la réaction enzymatique. Elle correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction est à la moitié de sa valeur maximale. Elle est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour le substrat : plus le K_M est faible plus l'affinité pour l'enzyme est forte.

La concentration de l'enzyme libre $[E] = [E]_T - [E-S]$

Où $[E]_T$ est la concentration totale d'enzyme, libre ou lié. On a donc:

$$\begin{aligned}
 [E-S] &= ([E]_T - [E-S]) \cdot [S] / (K_M) = ([E]_T \cdot [S]) / (K_M) - ([E-S] \cdot [S]) / K_M \\
 [E-S] &+ ([E-S] \cdot [S]) / K_M = ([E]_T \cdot [S]) / K_M \\
 [E-S] \cdot (1 + [S] / K_M) &= ([E]_T \cdot [S]) / K_M \\
 [E-S] \cdot (K_M + [S]) / K_M &= ([E]_T \cdot [S]) / K_M \\
 [E-S] \cdot (K_M + [S]) &= [E]_T \cdot [S] \\
 [E-S] &= [E]_T \cdot [S] / (K_M + [S])
 \end{aligned}$$

On peut enfin introduire ce terme dans l'équation pour la vitesse initiale :

$$V_i = k_2 \cdot [E-S] = k_2 \cdot ([E]_T \cdot [S]) / (K_M + [S]) = (V_{max} \cdot [S]) / (K_M + [S])$$

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

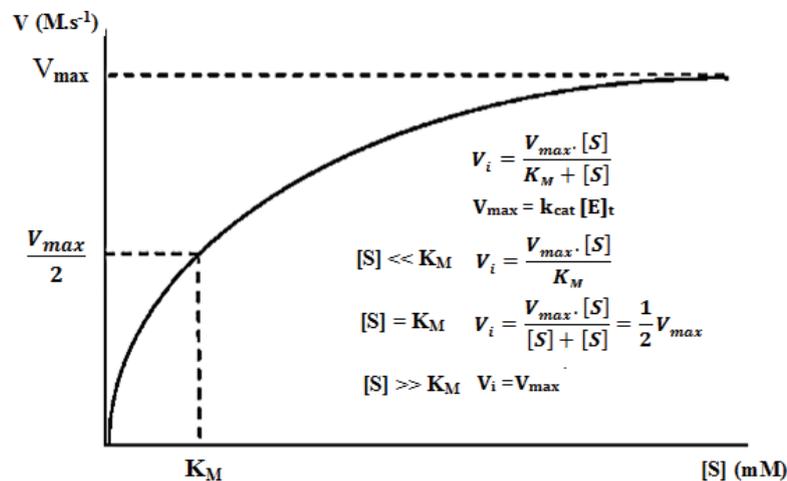


Figure 11 : Cinétique Michaelienne $v=f(S)$

K_M est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme. Plus l'affinité est élevée, et moins il faudra de substrat pour que l'enzyme fonctionne.

$k_2 = V_{max} / [E]_T$ est souvent appelée constante catalytique k_{cat} , ou le nombre de turnover, car le nombre de cycles catalytiques que chaque site actif effectue par seconde (nombre de rotations), ou le nombre de molécules de substrat transformées en molécules de produit par une seule

molécule d'enzyme en un temps donné.

Le nombre de turnover est une constante de vitesse d'ordre un, elle a donc pour unité des s^{-1} .

Le rapport K_{cat}/K_m est souvent aussi donné comme mesure de l'efficacité catalytique d'une enzyme, car il correspond à une constante de vitesse pour de basses concentrations de substrat ($[S] \ll K_M$, donc $[E] = [E]_T$). Plus k_{cat} est grand et plus K_m est petit et plus l'enzyme est à la fois efficace et rapide.

1.9.2 La représentation de Lineweaver-Burk

La représentation la plus couramment utilisée pour linéariser l'équation de Michaelis est : La représentation de Lineweaver-Burk : $1/v = f(1/[S])$, est une transformation de l'hyperbole en droite (Figure 12).

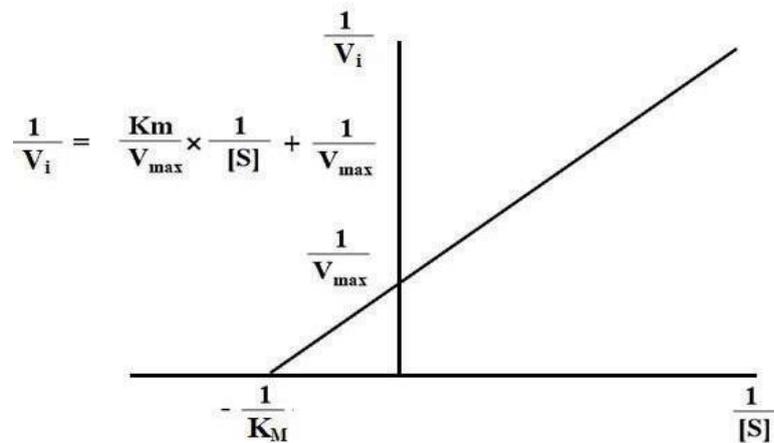


Figure 12 : La représentation de Lineweaver-Burk $1/V = f(1/S)$

1.9.3 Inhibitions des réactions enzymatiques

L'activité enzymatique peut être affectée de façon spécifique par de nombreux agents chimiques. L'étude de ces effecteurs est importante. Elle permet d'analyser les processus enzymatiques et de comprendre certains aspects du mécanisme d'action des enzymes. On peut distinguer deux types d'effecteurs, les inhibiteurs et les activateurs, mais tous agissent en se combinant soit avec l'enzyme, soit avec le complexe enzyme-substrat, soit avec le substrat lui-même.

Dans le cas des inhibiteurs, certains s'associent de manière réversible à l'enzyme en interagissant de manière non covalente. D'autres se fixent de manière irréversible et sont souvent utilisés pour déterminer les groupes actifs du site catalytique.

Selon le type d'inhibiteur, l'enzyme peut fixer :

-le substrat ou l'inhibiteur : c'est la fixation exclusive avec formation de complexes binaires ES ou EI : Inhibiteurs compétitifs ;

-le substrat et l'inhibiteur : c'est la fixation non-exclusive avec formation de complexes ternaires (ESI). Les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont distincts. Les inhibiteurs non compétitifs n'ont pas d'homologie structurale avec le substrat.

-Inhibiteurs incompétitifs se lient uniquement au complexe Enzyme-Substrat, avec formation d'un complexe ternaire Enzyme –Substrat-Inhibiteur.

1.9.3.1 Inhibiteur compétitif (fixation exclusive)

1.9.3.2 Détermination des constantes cinétiques

Dans un système où un enzyme peut se combiner de façon réversible avec son substrat ou avec un inhibiteur pour former des complexes ES ou EI mutuellement exclusifs l'un de l'autre, ou l'inhibiteur peut prendre la place du substrat dans le centre catalytique de l'enzyme mais pas se fixer sur le complexe ES, l'effet est une inhibition dite compétitive. L'addition d'une très forte concentration de substrat déplace l'équilibre $E + S \rightleftharpoons ES$ en faveur d'ES et donc déplace l'équilibre $EI \rightleftharpoons E + I$ en faveur de E.

Un inhibiteur compétitif ne peut se fixer que sur l'enzyme libre (K_i a une valeur infinie).

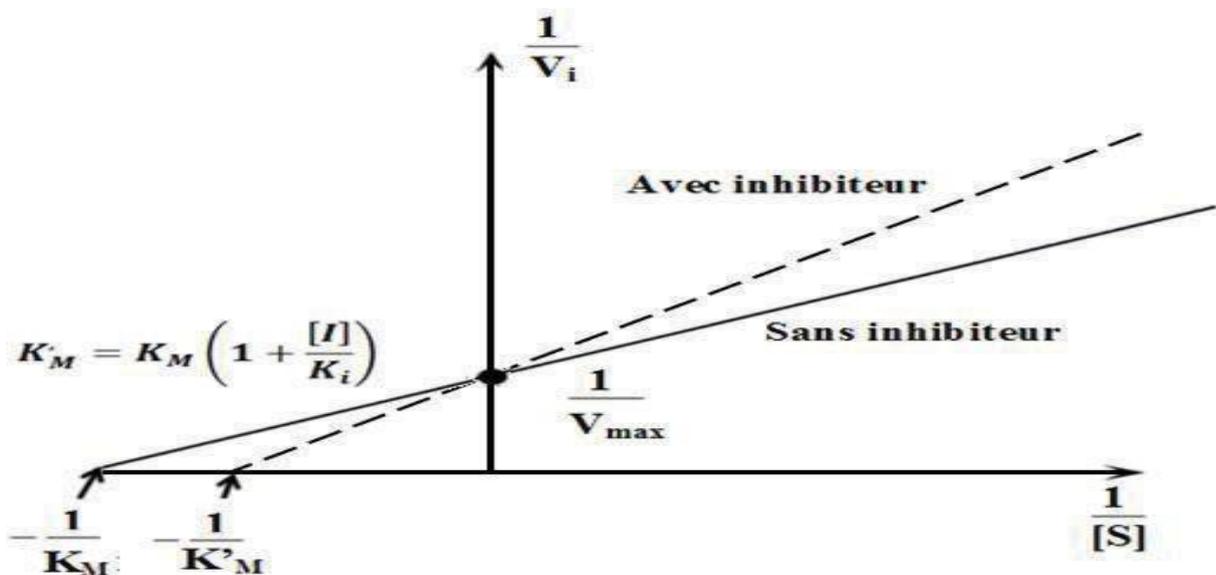
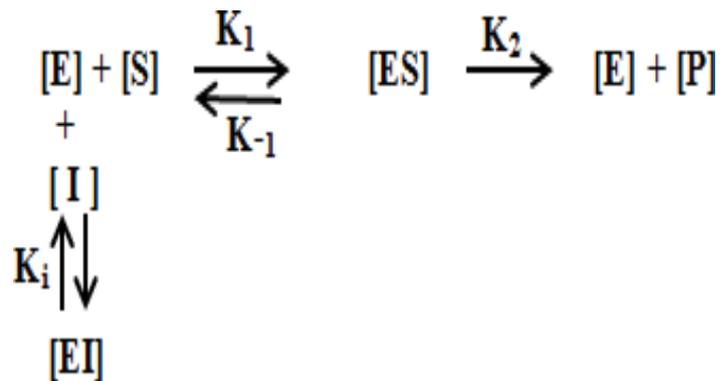
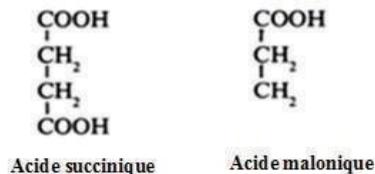


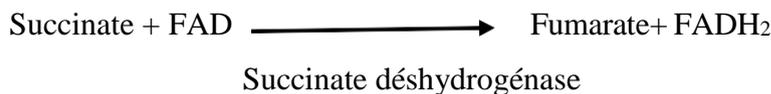
Figure 13 : Graphe de Lineweaver-Burk dans le cas de réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur compétitif.

Exemple de l'inhibition compétitive

La succinate déshydrogénase, une enzyme à FAD catalyse la déshydrogénation de l'acide succinique en acide fumarique et elle est inhibée de manière compétitive par l'acide malonique qui ressemble à l'acide succinique



L'acide malonique, est un inhibiteur compétitif car, à cause de sa structure similaire, l'enzyme ne peut différencier l'acide succinique de l'acide malonique.



Dans ce cas, et le substrat (succinate) et l'inhibiteur(Malonate) entre en compétition pour le site actif ,et l'activité enzymatique est réduite .

Cette inhibition peut être renversée en augmentant la concentration du substrat, de sorte que les Molécules du substrat sont plus nombreuses que celles de l'inhibiteur.

1.9.3.3 Inhibiteur non compétitif : (fixation non exclusive)

1.9.3.4 Détermination des constantes cinétiques

Dans un système où un enzyme peut se combiner de façon réversible, indépendamment, avec son substrat S, au niveau de son centre catalytique, ou avec un inhibiteur I, au niveau d'un autre site, sans que la fixation de ce dernier modifie l'affinité de l'enzyme pour le substrat, l'effet est une inhibition dite non compétitive, car elle n'est pas levée par l'addition de substrat. Dans un tel système, seul le complexe ES évolue vers la formation d'un produit P. Les deux complexes EI et EIS sont inactifs. Les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont distincts. Les inhibiteurs non compétitifs n'ont pas d'homologie structurale avec le substrat. Un inhibiteur non compétitif au sens large peut se fixer à la fois sur l'enzyme libre et sur le complexe E-S, avec des constantes d'équilibre différentes.

L'inhibition non compétitive est rare et on en trouve des exemples essentiellement dans le cas des enzymes à régulation allostérique.

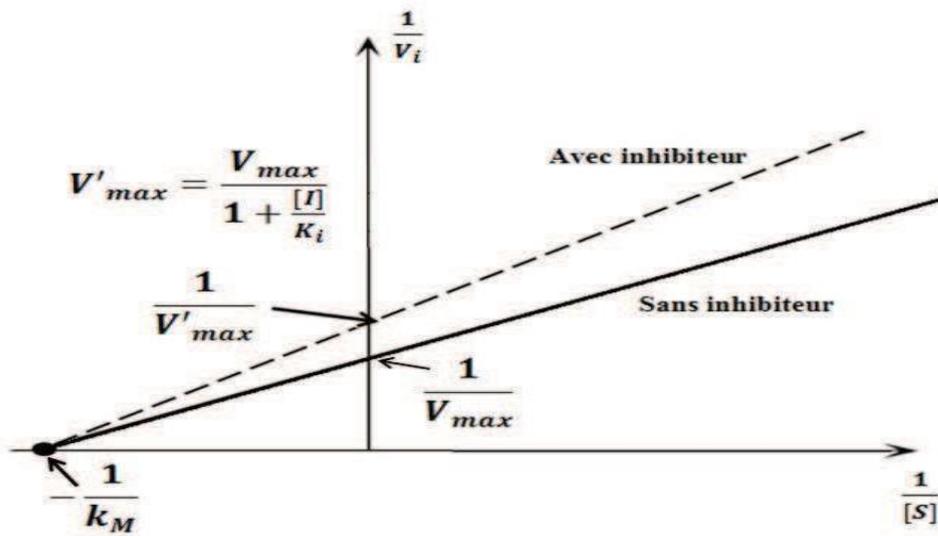
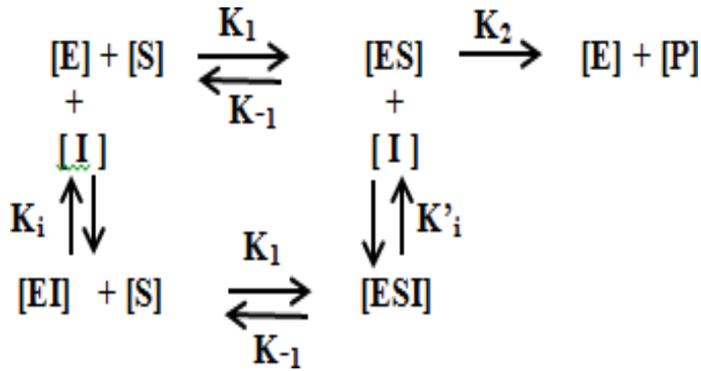


Figure 14 : Graphe de Lineweaver-Burk dans le cas de réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur non-compétitif

1.9.3.5 Inhibiteur incompétitif : (fixation non exclusive)

1.9.3.6 Détermination des constantes cinétiques

Dans un système où l'inhibiteur se combine de façon réversible exclusivement au complexe enzyme-substrat ES, mais pas à l'enzyme libre. Cela signifie que EI ne se forme pas et que seul ESI et elle n'est pas levée par l'addition de substrat.

Ce type d'inhibition est appelé 'inhibition incompétitive (uncompetitive) ou inhibition par blocage du complexe intermédiaire.

L'inhibition incompétitive se retrouve rarement pour les enzymes spécifiques à un substrat. Par contre, les enzymes pouvant réagir avec plusieurs substrats donnent ce type de cinétique en présence d'inhibiteurs.

caractéristique des trois types d'inhibition particuliers :

-Inhibition compétitive, les droites obtenues se coupent toujours au-dessus de l'axe des abscisses ou $[I] = -K_i$ et d'ordonnée du point d'intersection est $1/V_m$ (figure 16).

-Inhibiteur non compétitive, les droites obtenues se coupent sur l'axe des abscisses, ou $[I] = -K_i$ (figure 17).

-Inhibition un-compétitive, on obtient un faisceau de droites parallèles de pente $1/V_m \cdot 1/K_i$ (impossible de déterminer K_i), (figure 18).

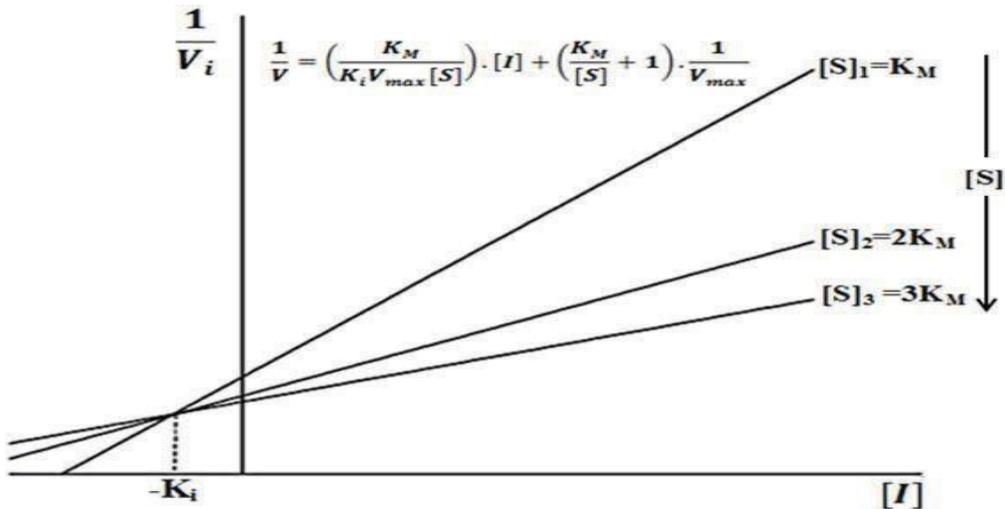


Figure 16 : Représentation graphique de l'inhibition compétitive

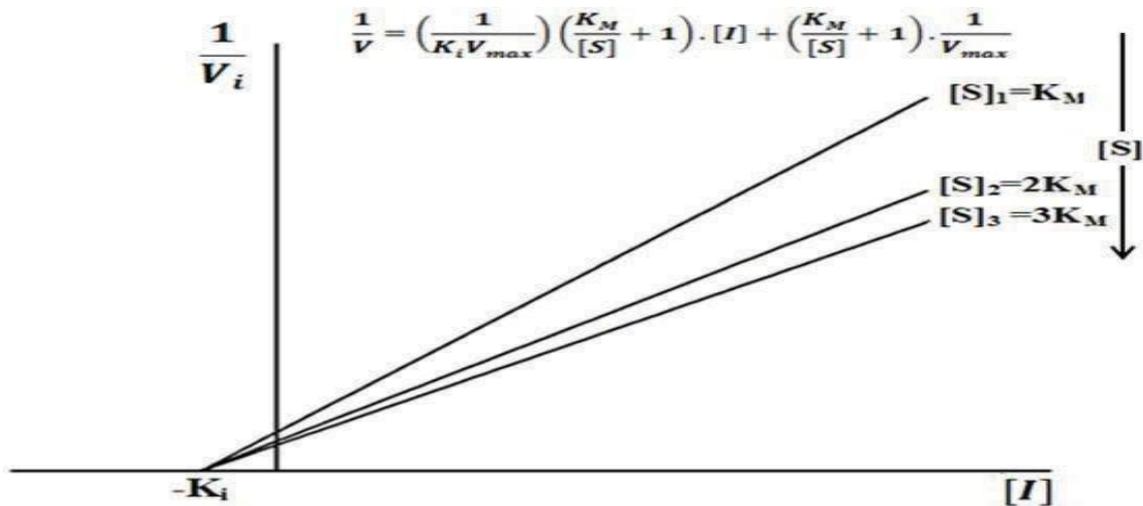


Figure 17 : Représentation graphique de l'inhibition non compétitive

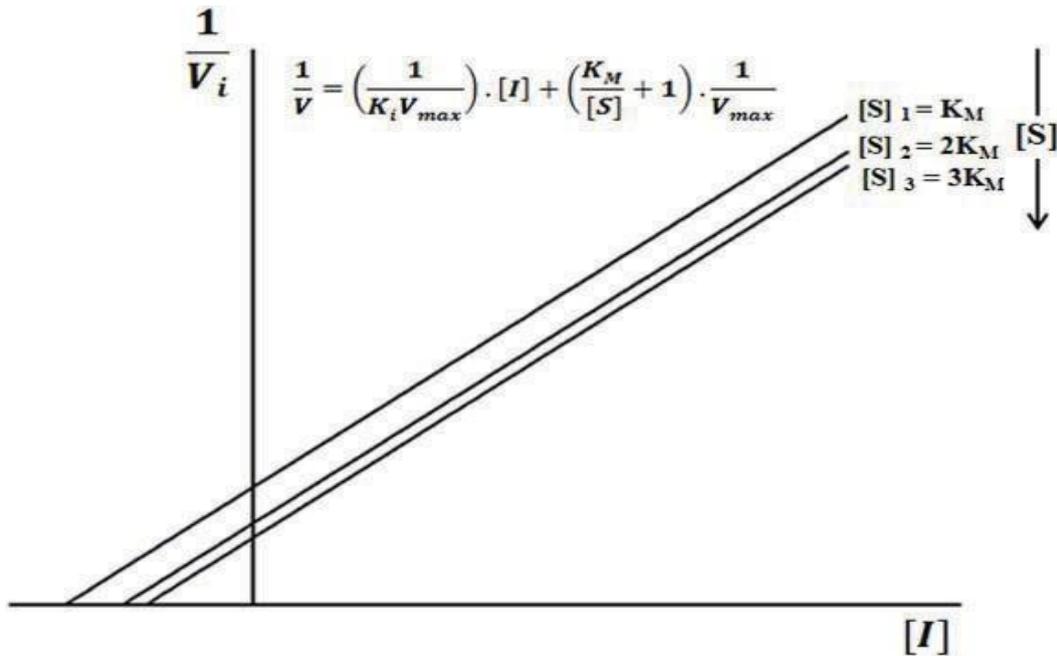


Figure 18 : Représentation graphique de l’Inhibition incompétitive

3 Expressions de l'activité enzymatique

L'unité enzymatique est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une certaine quantité de substrat par unité de temps.

Deux types d'unités sont actuellement utilisés, qui correspondent à deux modes d'expression de la V_{max} :

- l'unité internationale (UI), correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une $1 \mu\text{mole}$ de substrat par minute ;. 60 IU valent donc $1 \mu\text{kat}$. Une Unité Internationale égale 15 nanokatal.

- UI , correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de $1 \mu\text{mole}$ de substrat par minute. 60 IU valent donc $1 \mu\text{kat}$.

Le nombre de rotations (k_{cat}) est le nombre de molécules de substrat transformées par molécule d'enzyme par seconde (ou le nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme. Le katal (kat), quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde (les sous-multiples sont seuls utilisés : millikatal, microkatal et nanokatal).

$$1\text{UI} = 1\text{U.E} = 1\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} = 10^{-6}/60 \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1} = 10^{-6} / 60 \text{ kat} = 0.01667 \mu\text{kat} = 16.67\text{nkat}=16.67 \text{ nmol}\cdot\text{s}^{-1}$$

L'activité molaire est le nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme par minute ($k_{cat} \times 60$).

L'activité spécifique : nombre de molécules de substrat transformées par minute et par mg d'enzymes

Activité enzymatique spécifique : = $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ de protéine = UI/ mg de protéines.

Activité enzymatique moléculaire : = $\mu\text{mol} / \text{min} / \mu\text{mol}$ de protéine= UI/ μmol de protéines

-L'activité spécifique (activité totale / quantité totale de protéine, IU/mg), elle mesure le degré de pureté d'une préparation enzymatique, est donnée en IU/mg protéine (ou $\mu\text{kat}/\text{mg}$).

-Rendement de purification = Activité enzymatique totale de l'extrait / Activité enzymatique totale de départ

-Taux de purification = AS de l'extrait / AS de départ.

CHAPITRE 02
ENZYMES ALLOSTERIQUES

1 Définition

Le terme allostérique vient du grec allos, différent, autre, et stéréos, structure, volume, forme. Les enzymes allostériques ont une structure quaternaire, ce sont des protéines complexes composée de plusieurs sous-unités. Souvent leurs sous unités sont disposées de manière à ce que la molécule ait un axe de symétrie. Chaque sous unité peut fixer une molécule de substrat. Il existe au moins un site de fixation pour le substrat (site actif, catalytique) et au moins un site de fixation (spécifique) pour un modulateur (site régulateur).

Les enzymes allostériques prennent une autre conformation à la suite de la liaison du modulateur (figure 19).

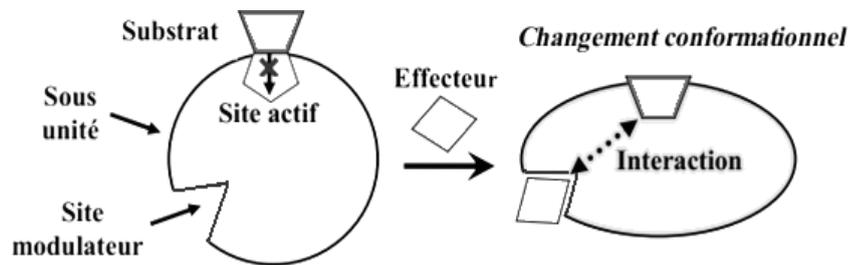


Figure 19 : Structure des enzymes allostériques

Les enzymes allostériques fonctionnent selon le mode suivant :

Un substrat S se lie avec une enzyme E pour former un complexe E-S, qui se dissocie pour donner un produit P avec régénération de l'enzyme E. Chaque site actif se comporte indépendamment des autres, qu'ils soient physiquement séparés (un site actif par molécule) ou non (plusieurs sites actifs par molécule).

Les enzymes allostériques possèdent plus d'un site actif par molécule (aux moins deux) et pour lesquelles les caractéristiques cinétiques d'un site actif vont varier en fonction de l'état des autres sites de la même molécule.

L'allostérie désigne une variation de conformation de protéines sous l'effet de la fixation d'un substrat ou d'une molécule effectrice, d'où l'acquisition de propriétés particulières (changement d'activité). On décrit cela comme des effets coopératifs, si la molécule est sous forme oligomérique.

La variation de conformation de la structure dépend du taux d'occupation des sites de liaison.

2 Propriétés des enzymes allostériques

Les enzymes allostériques se distinguent des autres enzymes (Michaeliens) par leur courbe $v=f(S)$ qui n'est pas une hyperbole correspond à l'équation Michaelis Menten , mais une courbe

sigmoïde (figure 20).

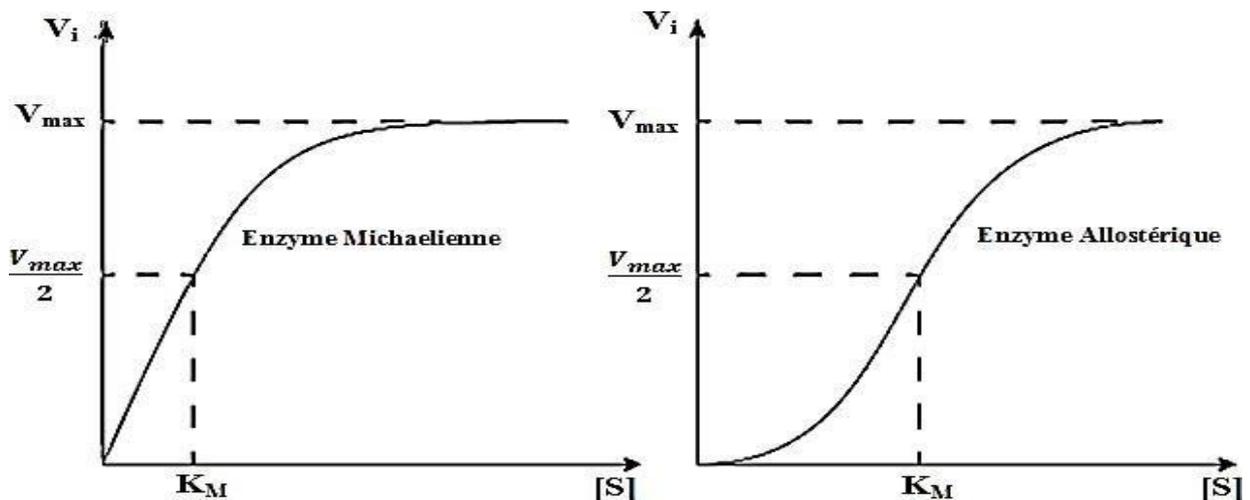


Figure 20 : Représentation graphique de la cinétique des enzymes Michaelienne et allostérique

L'allure sigmoïde : les enzymes allostériques existent sous de formes :

1. Une forme dite « tendue » : T, inactive ou les protomères montrent une très faible affinité pour le substrat.
 2. Une forme « relâchée » : R, active ou les protomères présentent une très forte affinité pour le substrat.
 3. Une cinétique sigmoïde reflète en général des interactions coopératives entre plusieurs sous unités protéiques.
- Initialement, les protomères sont sous la forme T. L'occupation d'un seul des sites actifs par un substrat suffit à modifier légèrement la conformation spatiale de l'enzyme, les protomères vont alors prendre la forme R, cette transition de forme porte le nom de transition allostérique. Cette propriété de coopérativité des protomères donne un avantage aux systèmes allostériques par rapport aux enzymes à cinétique michaelienne pour la régulation de la vitesse des réactions enzymatiques.

2.1 Effet de coopérativité

La coopérativité traduit le fait que la fixation sur l'enzyme d'une molécule d'un effecteur allostérique influe sur la fixation des molécules suivantes. Dans le cas de coopérativité en présence du substrat :

- Si l'effecteur allostérique est le substrat lui-même on parle de modulation homotrope : interactions entre des ligands identiques.
- Si l'effecteur est différent du substrat on parle de modulation hétérotrope : interaction entre différents ligands.

-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.

2.2 Formalisme de Hill

Le modèle coopératif :



La constante de dissociation:

$$K_D = \frac{[P] + [L]^n}{[P-L_n]} \quad \text{ou} \quad [P] = (K_D \cdot [P-L_n]) / [L]^n$$

La fonction de saturation :

$$Y_L = \frac{[P-L_n]}{[P] + [P-L_n]}$$

Par substitution :

$$Y_L = \frac{[P-L_n]}{[P] + [P-L_n]}, \quad \text{avec} \quad [P] = (K \cdot [P-L_n]) / [L]^n$$

$$Y_L = \frac{[P-L_n]}{((K \cdot [P-L_n]) / [L]^n) + [P-L_n]}$$

$$Y_L = \frac{[P-L_n]}{([P-L_n] (K / [L]^n + 1))}$$

On simplifie $[P-L_n]$, et on obtient : $Y_L = 1 / (K / [L]^n + 1)$, d'où : $Y_L = 1 / (K / [L]^n + L^n / [L]^n)$

L'équation de Hill

$$T_L = (L)^n / K_d + (L)^n$$

L'équation de Hill concerne le cas particulier de la fixation d'un même ligand sur plusieurs sites d'une protéine oligomérique possédant un site de fixation sur chaque monomère. L'équation exprime le degré de saturation d'une protéine oligomérique en fonction de la concentration en ligand.

Y_L : la fraction des sites comportant un ligand lié, $[L]$ est la concentration de ligand et K_d est la constante de dissociation apparente. Qui indique la concentration de substrat à mi-saturation.

Y_L : qui varie entre 0 et 1, et renseigne sur le degré de saturation de la protéine

n : la constante de Hill, paramètre qui dépend du degré de coopérativité entre les sites de liaison du ligand en interaction

En l'absence de coopérativité ($n=1$), les sites de fixation agissent tous de façon indépendante et un comportement cinétique simple du type Michaelis-Menten est observé. La courbe de saturation des sites par le ligand est une branche d'hyperbole (figure 21).

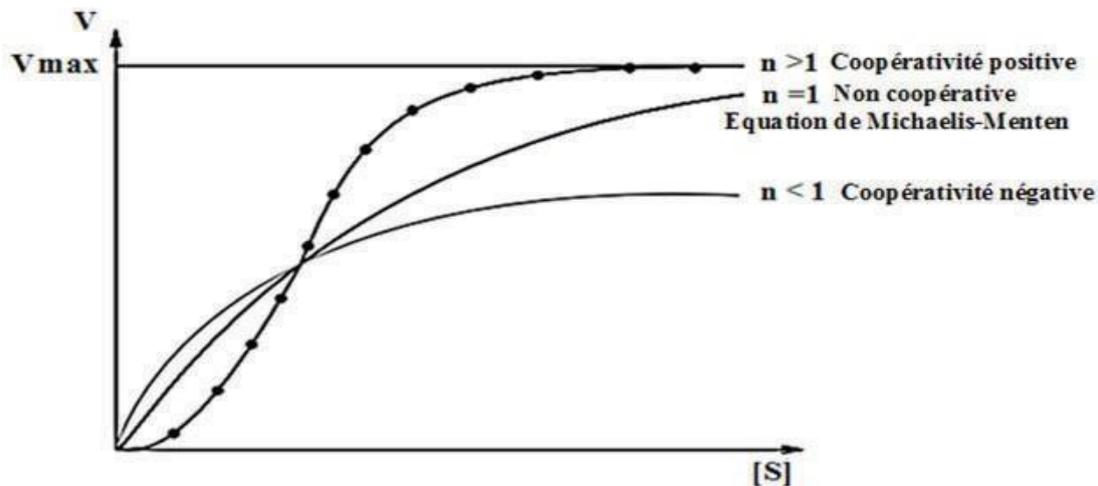


Figure 21 : Evolution de la vitesse en fonction du nombre de Hill

Quand l'enzyme n'est pas michaelienne, le graphe $V = F([S])$ n'est pas hyperbolique (cas des enzymes allostériques, $n > 1$ ou $n < 1$).

- Si $n=1$, l'équation est une hyperbole, en l'absence de coopérativité, la courbe de saturation des sites par le ligand est une branche d'hyperbole. L'équation de Hill se réduit alors à une fixation simple, comme dans l'équation de Michaelis-Menten.
- Si $n > 1$, les sites manifestent une coopérativité positive. La fixation du substrat sur un des sites augmente l'affinité des autres sites pour le substrat. Plus la valeur de n est grande, plus le degré de coopérativité est élevé et plus la forme sigmoïde de la courbe représentant V_i en fonction de $[S]$, d'autant plus marquée que la coopérativité est forte. En général, le coefficient de Hill, n , est inférieur au nombre de sites, c'est-à-dire au nombre de sous-unités de la protéine. Pour la myoglobine, $n = 1$, l'hémoglobine (hétéro tétramère) $n = 2.8$, et la phosphofructokinase (tétramère) $n = 3.8$ pour le substrat fructose 6-phosphate.
- Si $n < 1$, la coopérativité est négative, la liaison avec le ligand diminue l'affinité apparente pour des ligands ultérieurs : fixation anti-coopérativité.

La constante de Hill (n) augmente avec le degré de coopérativité d'une réaction. Après linéarisation de l'équation de Hill :

$$T_L = \frac{(L)^n}{K_d + (L)^n}$$

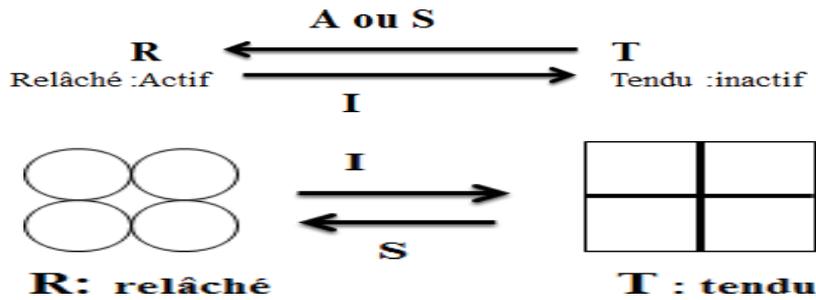
2.3 Modélisation

Selon la théorie de l'allostérie chaque sous-unité catalytique peut exister sous deux états conformationnels R ou T :

-une forme T tendu (tense) à faible affinité pour le substrat (S) ou sous forme R : relâché (relax) à forte affinité pour le substrat.

Lorsque l'énergie interne d'un protomère augmente par suite de la modification de ces liaisons, on dit qu'il passe à un état tendu. Au contraire lorsque les dites liaisons lui imposent une structure correspondant à une énergie interne diminuée, on dit qu'il passe à un état relâché. C'est la fixation du ligand qui modifie l'équilibre entre les formes R et T.

- En présence du substrat, l'équilibre est déplacé vers R
- Un effecteur activateur favorisera le maintien de la forme R de l'enzyme.
- Ces états sont en équilibre et ceci indépendamment de la liaison d'un ligand à l'oligomère.



Deux modèles relatifs à la coopérativité existent : Modèle symétrique et modèle séquentiel.

2.3.1 La transition concertée ou modèle symétrique de Monod, Wyman et Changeux (1965) MWC

Le modèle MWC considère que :

- Enzyme allostérique : oligomères (plusieurs sous-unités) ;
- Chaque protomère (sous-unité) ne contient qu'un seul site pour un ligand
- Les sous-unités (protomères) sont équivalentes afin que chaque oligomère possède au moins un axe de symétrie.

Le modèle MWC, postule que les sous - unités de l'enzyme sont connectés de telle manière qu'un changement de conformation dans une sous - unité est nécessairement conféré à tous les autres sous - unités. Ainsi, toutes les sous - unités doivent exister dans la même Conformation (figure 22).

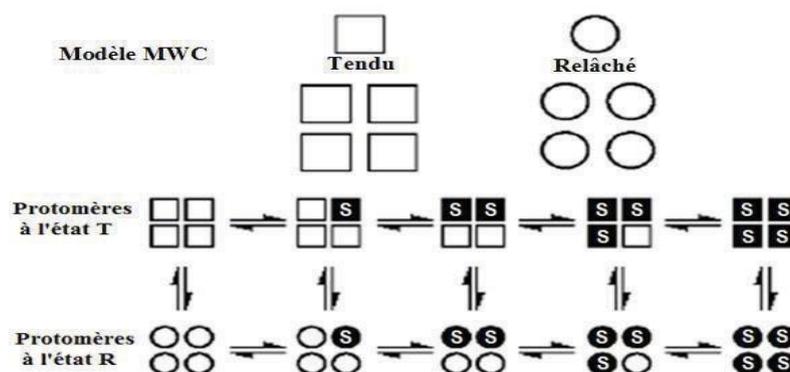


Figure 22 : Le modèle concerté de MWC

Dans le modèle concerté, toutes les sous-unités d'une enzyme doivent conserver la symétrie moléculaire et par conséquent elles sont toutes sous la forme T ou R.. L'enzyme globale 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. La transition se produit en bloc. Une coopération entre les protomères pour que le substrat soit plus efficacement transformé.

L'effecteur se lie à l'état T ou R de préférence et ainsi exerçant son rôle d'inhibiteur ou d'activateur.

-Un effecteur inhibiteur favorisera le maintien de la forme T de l'enzyme

2.3.2 Modèle séquentiel ou modèle KNF (Koshland, Nemethy, Filmer, 1966)

Le modèle séquentiel ou modèle KNF (Koshland, Nemethy, Filmer, 1966) est fondé sur la notion qu'une protéine est suffisamment flexible pour que la liaison d'un ligand au niveau d'un site modifie directement la conformation d'un autre site de la molécule protéique et affecte l'affinité de ce dernier site pour son ligand (figure 23).

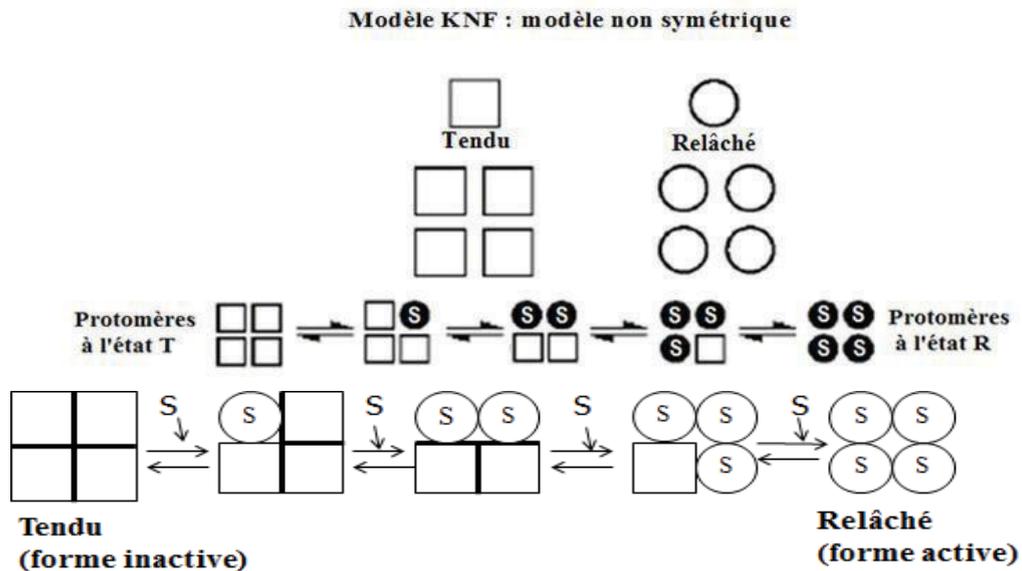


Figure 23 : Modèle symétrique de NKF

En absence du substrat, toutes les molécules d'enzymes sont en conformation T.

La fixation de la première molécule de substrat induit la transition $T \rightarrow R$ de la première sous unité ce qui facilite la transition $T \rightarrow R$ de la sous unité voisine et la fixation d'une

deuxième molécule de substrat , et ainsi de suite pour une molécule d'enzyme (sous unité par sous unité). Ces changements et leurs effets sur l'affinité des sites apparaissent séquentiellement, au fur et à mesure que les ligands se fixent. Le couplage entre les sous unités n'est pas assez fort pour préserver la symétrie de l'oligomère comme c'est le cas dans le modèle symétrique (modèle MWC) (figure 24).

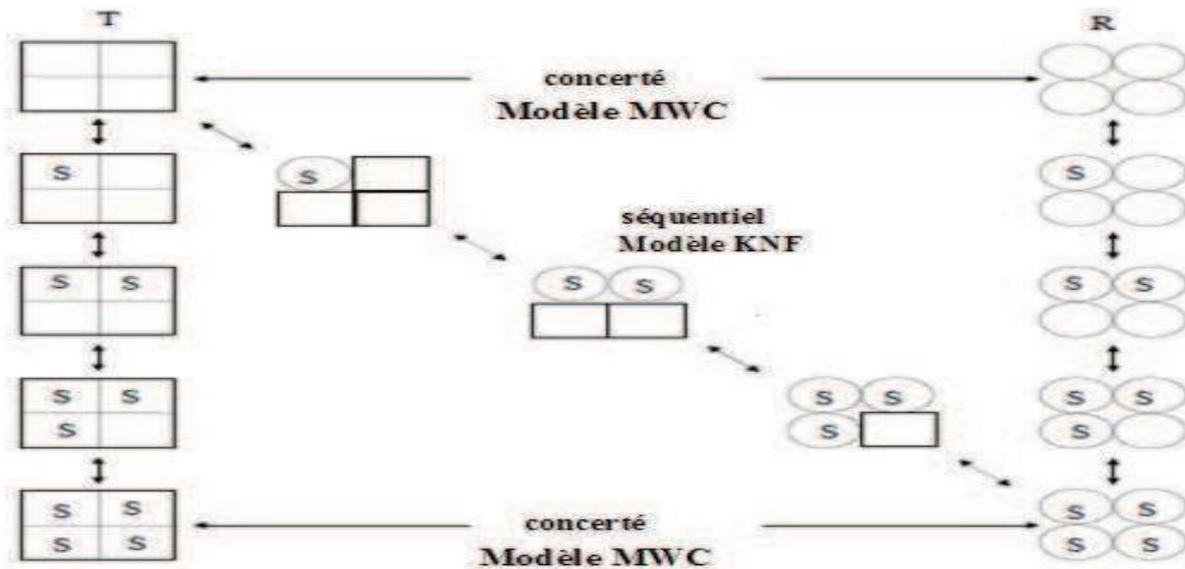


Figure 24 : Représentation des deux modèles MWC et KNF

Exemple : le cas de l'Hémoglobine (Hb)

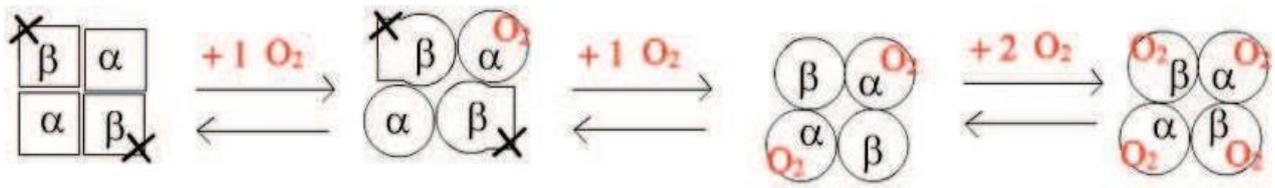
- Pour l'hémoglobine (Hb): 100% de saturation signifie 4 O₂ par Hb $\alpha_2\beta_2$, La courbe de saturation de Hb possède une allure sigmoïde qui est due à un effet coopératif (figure 25). L'hémoglobine désoxygénée (dés oxyhémoglobine) présente une conformation T, ou tendue, tandis que l'hémoglobine oxygénée (oxyhémoglobine) présente une conformation R, ou relâchée.

La forme T a une faible affinité pour l'oxygène et tend par conséquent à le libérer, tandis que la forme R a une forte affinité pour l'oxygène et tend à le fixer.

Hb : Si une première molécule de O₂ se fixe sur une chaîne α , elle va induire un mouvement conformationnel global. Et en fait ce mouvement va se répercuter essentiellement sur la deuxième chaîne α qui va voir son affinité pour O₂ fortement augmentée.

- Quand les 2 chaînes α ont lié chacune un O₂, l'induction de changement conformationnel fait passer les 2 chaînes β en conformation à très haute affinité pour O₂. L'Hb se sature alors en O₂ O₂ 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.



Plusieurs facteurs favorisent l'une ou l'autre de ces conformations :

-La forme T est favorisée par une diminution du pH (acide), une forte concentration en CO₂ (effet Bohr) et un taux élevé en 2,3-bisphosphoglycérate (2,3-BPG), ce qui favorise la libération de l'oxygène lorsque le sang circule à travers les tissus.

-Le 2,3-bisphosphoglycérate (2,3-BPG), est un effecteur hétéroallostérique, se fixe dans une cavité au centre du tétramère entre les sous-unités β de l'hémoglobine, favorise la forme T du tétramère diminuant ainsi l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène en formant une sorte de liaison entre les chaînes β. Plus la concentration en BPG dans le milieu est élevée, plus Hb a tendance à être maintenue sous forme tendue à faible affinité pour O₂.

-La forme R est favorisée par un pH élevé, une faible pression partielle de CO₂ et un faible taux de 2,3-BPG, ce qui favorise la fixation de l'oxygène lorsque le sang circule au niveau des alvéoles pulmonaires.

2.4 Action des effecteurs allostériques

2.4.1 Activateurs allostériques

Activateur allostérique déplace l'équilibre $T \rightarrow R$ vers R : l'affinité de l'enzyme pour le substrat est augmenté, la $K_{0.5}$ est diminué, La courbe $v=f(S)$ est déplacée vers la gauche.

2.4.2 Inhibiteurs allostériques

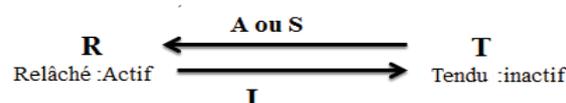
Un inhibiteur allostérique déplace l'équilibre $T \rightarrow R$ vers T : l'affinité de l'enzyme pour le substrat est diminué, la $K_{0.5}$ est augmentée, la courbe $v=f(S)$ est déplacée vers la droite. L'inhibition allostérique est un phénomène hétérotrope négatif

Exemple : l'aspartate transcarbamylase, inhibée par le CTP (cytidine triphosphate), est activée spécifiquement par l'ATP.

2.4.3 Modulations allostériques de types K et V

Les enzymes allostériques peuvent être distingués selon les effets exercés sur elles par les effecteurs homotropes et hétérotropes qui les concernent. Ainsi, on distingue :

1-Les enzymes du système K (K est le symbole de la constante d'affinité) où l'effecteur ne modifie que l'affinité apparente ($K_{1/2}$ équivalent K_m) de l'enzyme pour le substrat.



- La liaison d'un inhibiteur allostérique (sur ses sites spécifiques) va favoriser l'état tendu à faible affinité pour le substrat.
- La liaison d'un activateur allostérique (sur ses sites spécifiques) déplace l'enzyme vers l'état relâché à forte affinité pour le substrat.

A concentration saturante en activateur, toutes les sous-unités de l'enzyme sont déplacées sous la forme relâchée : le comportement de l'enzyme devient Michaelien. On Parle parfois de "désensibilisation de l'enzyme" (figure 25).

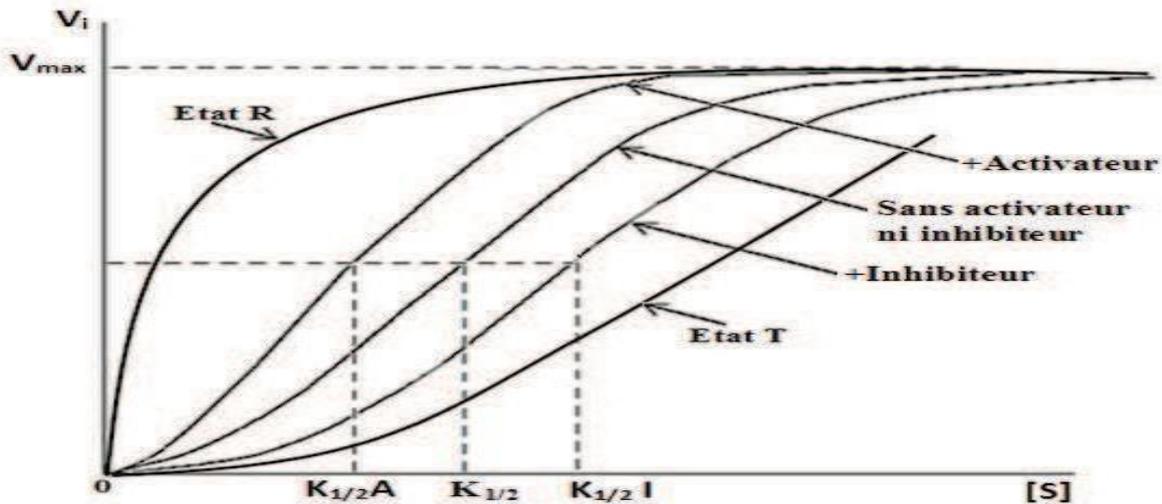


Figure 25 : Cinétique $v_i=f([S])$ pour une enzyme allostérique de type K, à effet coopératif du Substrat en absence d'effeteur et en présence d'un activateur ou d'un inhibiteur allostérique

- Les enzymes du système V où l'effecteur ne modifie que la vitesse maximale (V_{max}) de la réaction

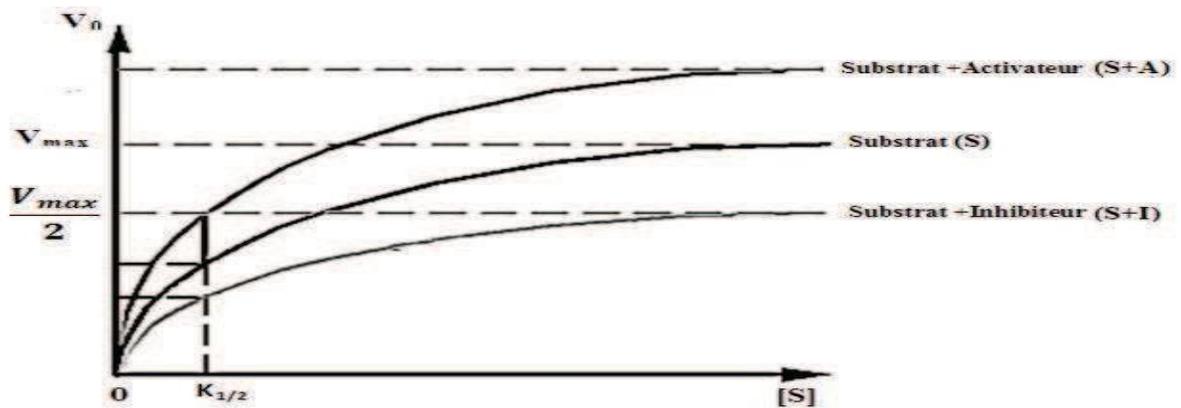


Figure 26 : Cinétique $v_i=f([S])$ pour une enzyme allostérique de type V, à effet coopératif du substrat en absence d'effeteur et en présence d'un activateur ou d'un inhibiteur allostérique .

- Coopératif positif (augmentation de l'affinité)
- Coopératif négatif (diminution de l'affinité)

2.5 Importance des enzymes allostériques

Les enzymes allostériques ont un rôle de régulation très important dans la cellule: En général l'enzyme allostérique catalyse la 1ère réaction, limitante d'une voie métabolique. Son activité peut être contrôlée par des activateurs ou inhibiteurs appartenant à cette voie métabolique permettent l'adaptation du métabolisme au besoin de la cellule.



A : le substrat de E1 enzyme clé, allostérique, est un modulateur positif (= activateur allostérique, il active l'enzyme) et X, le produit final est un modulateur négatif (= inhibiteur allostérique, il inhibe l'enzyme), chaque fois qu'il se trouve en excès par rapport aux besoins. Ce type de régulation est appelée rétrocontrôle (inhibition par « feed-back »).

Exemples : l'aspartate transcarbamylase est le premier enzyme d'une voie conduisant en six étapes à la synthèse du cytidine triphosphate (CTP) ; elle est inhibée par ce dernier. La thréonine désaminase intervient dans la première réaction de la voie conduisant de la thréonine à l'isoleucine ; elle est inhibée par cette dernière.

2.5.1 Enzyme Aspartate trans carbamylase (ou ATCase)

L'Aspartate trans carbamylase (ou ATCase, enzyme multimérique à régulation allostérique), est formé de 2 trimères qui constituent les sous unités catalytiques et trois dimères qui sont les sous unités régulatrices (six sous unités régulatrices). L'agencement de ces sous unités permet à cette enzyme de présenter une très forte régulation allostérique par rapport à ses substrats. L'ATCase catalyse la première réaction de la voie de biosynthèse qui conduit aux nucléotides pyrimidiques. Elle catalyse la carbamylation du groupement α -aminé de l'aspartate par le carbamylphosphate, première étape de cette voie de biosynthèse. L'aspartate et le carbamyl-phosphate sont les deux substrats et proviennent du métabolisme cellulaire ; les deux produits sont le carbamyl-aspartate et le phosphate



La cytidine triphosphate (CTP) , produit final de la voie de synthèse des nucléotides pyrimidiques en se fixant sur l'enzyme va maintenir l'enzyme sous forme T : le CTP est donc un effecteur allostérique inhibiteur . Le CTP est un rétro-inhibiteur et il bloque l'activité de L'ATCase lorsque les concentrations de pyrimidines sont élevées (figure 27).

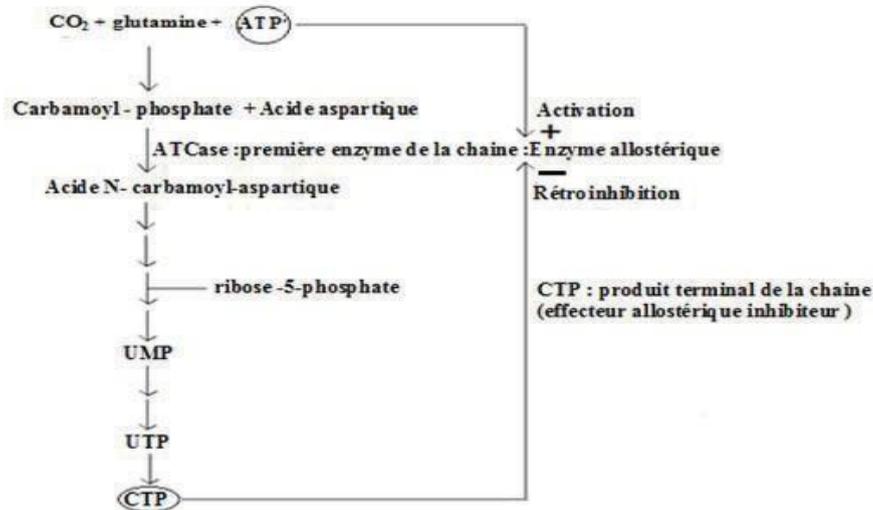


Figure 27 : Régulation allostérique de l'enzyme Aspartate trans carbamylase (ou ATCase).

Par contre l'ATP, produit final de la voie de synthèse des nucléotides puriques, se fixe lui aussi sur l'aspartate transcarbamylase sur le même site que le CTP et va maintenir l'enzyme sous forme R.

L'ATP est donc un effecteur allostérique activateur, active l'enzyme lorsque les concentrations de purine sont élevées et qu'il faut des pyrimidines pour s'apparier avec elles lors de la synthèse des acides nucléiques.

Le CTP et l'ATP sont impliqués dans la régulation.

L'enzyme aspartate transcarbamylase est donc régulée par le rapport ATP/CTP de la cellule (figure 28).

F6P L'inhibiteur la diminue.

La PFK possède deux sites de liaison à l'ATP, en tant que substrat (effet homotrope) quelle que soit la conformation et un autre site en tant qu'effecteur comme inhibiteur allostérique (effet hétérotrope) que si l'enzyme se trouve en état T. L'autre substrat de la PFK, le F6P, se lie préférentiellement à l'état R. Par conséquent, à fortes concentrations, l'ATP se comporte comme un effecteur allostérique négatif hétérotrope de la PFK en se fixant à l'état T.

Cette fixation de l'ATP, diminue l'affinité du site actif pour le fructose 6-phosphate. Il en résulte un ralentissement de la vitesse de réaction.

L'effet inhibiteur de l'ATP est levé par AMP. De cette façon, l'activité de l'enzyme croît avec le ratio $[AMP]/[ATP]$, ce qui permet de stimuler la glycolyse lorsque la charge énergétique de la cellule diminue (figure 29).

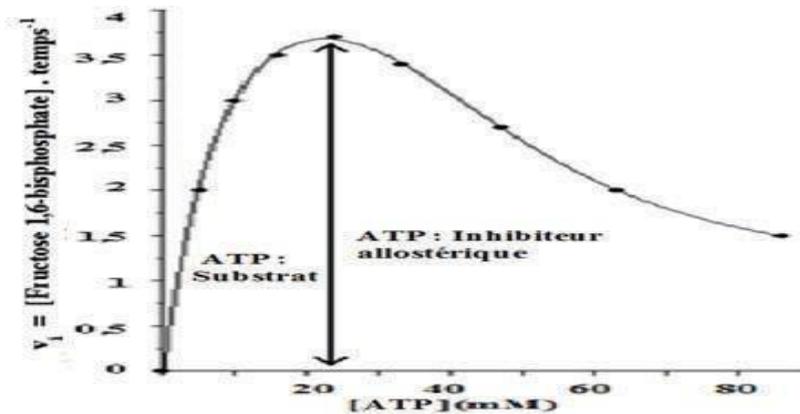


Figure 29 : la vitesse de la réaction catalysée par la phosphofructokinase 1 (PFK-1) en fonction de la concentration d'ATP

Le citrate, tout comme l'ATP inhibe la PFK en se fixant au même site allostérique.

La fixation du citrate sur ses sites allostériques inhibiteurs permet la transition allostérique de l'enzyme dans le sens R vers T, ce qui l'inactive (figure 30).

Le NADH, au cours de la glycolyse, le NADH est produit par la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase. Une concentration élevée de NADH signifie une forte synthèse d'ATP (donc une glycolyse et un cycle de Krebs intenses) et en conséquence, un niveau énergétique de la cellule élevé. Il est inutile pour la cellule d'augmenter ce niveau énergétique (figure 30).

A forte concentration, le NADH inhibe l'activité de la PFK-1. La PFK-1 est moins active tant qu'il n'y a pas suffisamment de NAD réoxydé.

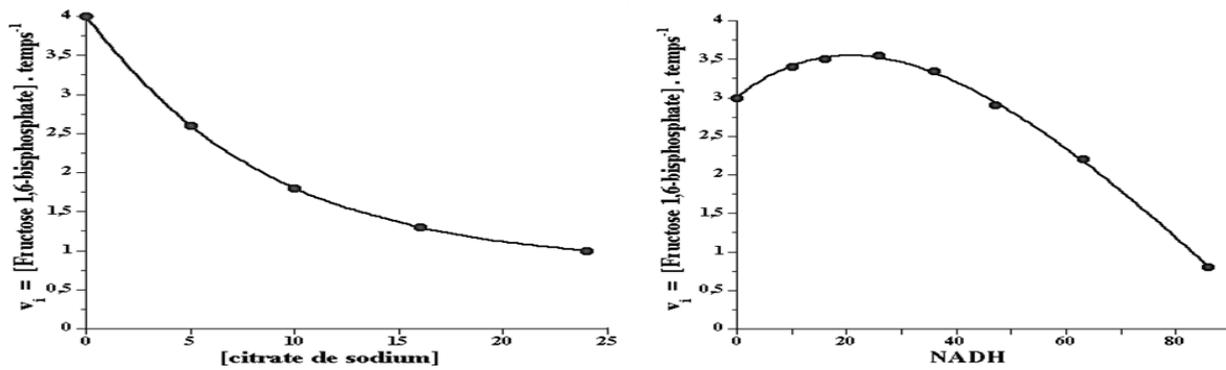


Figure 30 : la vitesse de la réaction catalysée par la phosphofructokinase 1 (PFK-1) en fonction de la concentration de citrate et du NADH

Activateurs allostériques de la phosphofructokinase: ADP, AMP, fructose-2,6-bisphosphate(F2,6P) , etc . Ils se fixent tous au même site que l'ATP et l'empêchent d'avoir son effet inhibiteur, permet la transition allostérique de l'enzyme dans le sens T vers R, ce qui l'active. L'effecteur le plus puissant de la PFK est le fructose -2,6 –biphosphate.

CHAPITRE 03
CINETIQUE ENZYMATIQUE A DEUX
SUBSTRATS

1 Introduction

Dans la cellule, les réactions qui mettent en jeu un seul substrat sont peu nombreuses. En fait, la plupart des réactions biochimiques catalysées par un enzyme mettent en jeu deux ou plusieurs substrats, ce qui conduit à l'apparition de plusieurs produits.

Les réactions enzymatiques à 2 substrats et 2 produits sont souvent des réactions de transfert de groupements chimiques d'une molécule à l'autre. L'étude cinétique de ces réactions enzymatiques à deux substrats a pour but de déterminer l'ordre de fixation des substrats, les constantes cinétiques caractérisant la fixation de chacun d'eux en présence et en absence de l'autre ainsi que la vitesse maximale de la réaction qui est mesurée quand les deux substrats sont à concentration saturante.

Réactions a deux substrats catalysées par : oxydoréductases , transférases , ligases.

2 Etude des vitesses initiales de la réaction

2.1 Etude descriptive

Les mécanismes séquentiels (ou à simple déplacement) qui se subdivisent en mécanisme séquentiel ordonné ou mécanisme séquentiel au hasard

- Séquentiel : la réaction enzymatique n'intervient qu'après formation d'un complexe entre l'enzyme et les deux substrats (complexe ternaire).

-Non séquentiel : système où un produit est relargué entre les additions successives des substrats exemple : système à double déplacement dit "ping-pong"

2.2 Nomenclature des systèmes

Les réactions sont classées : Uni, Bi, Ter ou Quad en fonction du nombre de substrats ou de produits.

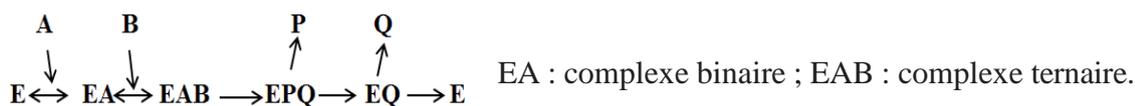
Bi-Bi : système impliquant 2 substrats et 2 produits.

Bi Uni (ou Uni Bi) : système impliquant 2 substrats et 1 produit (ou l'inverse). Exemple : Bi-Bi ordonné.

Iso : système impliquant une isomérisation de l'enzyme (changement de conformation $E \rightleftharpoons E'$). Exemple : Iso ping-pong.

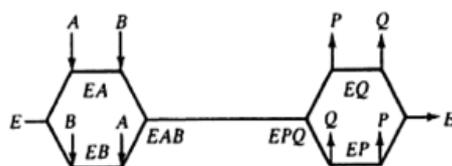
2.3 Mécanismes séquentiels

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

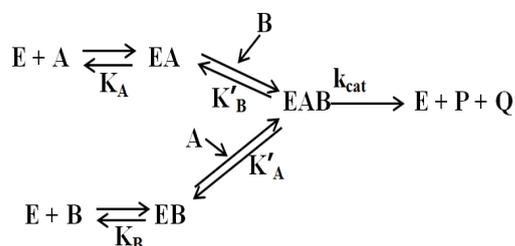


2.3.1 Fixation au hasard

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).



Représentation de Cleland



Le schéma et les constantes qui permettent de rendre compte des cinétiques s'écrivent E-A et E-B sont appelés les complexes binaires et E-A-B le complexe ternaire. On peut définir les deux constantes d'équilibre caractérisant les complexes binaires :

On dénomme ces constantes d'équilibre K_A et K_B sont les constantes de formation des complexes EA et EB, K'_A et K'_B sont les constantes de dissociation.

$-K_A$ et K_B étant les constantes d'équilibres définies précédemment entre l'enzyme libre et les substrats.

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

Et

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

$-K'_A$ et K'_B sont les constantes de Michaelis des substrats A et B, c'est à dire les [substrat] pour lesquelles la vitesse (mesurée à concentration saturante de l'autre substrat) est égale à la moitié de la vitesse maximale. Si l'on peut faire l'hypothèse du quasi-équilibre pour la fixation des substrats et s'il n'existe qu'une seule étape cinétique pour la transformation de E-A-B en E + P + Q; K_a est égale à la constante de dissociation de l'équilibre



Linéarisation

Les représentations des $1/V$ en fonction de l'inverse de l'un des substrats (ex: $1/[A]$), la concentration de l'autre étant maintenue constante, sont linéaires lorsque l'enzyme est Michaelien. On les appelle les représentations primaires. Les droites obtenues dans une représentation primaire sont concourantes pour les mécanismes séquentiels

Si on écrit l'équation en double inverse :

L'abscisse du point d'intersection de concours des droites de la représentation primaire en fonction de $1/ -\frac{1}{K_A}[A]$ est égale à $-\frac{1}{K_A}$ (figure 31).

-On parle de fixation indépendante, si $K'_A=K_A$, et $K'_B = K_B$, dans ce cas, le substrat A et B se fixent sur l'enzyme libre et l'enzyme complexée avec la même affinité. Cela signifie que la fixation d'un substrat sur son site enzymatique ne modifie pas la fixation ultérieure de l'autre substrat sur son site. Les droites se coupent sur l'axe des abscisses dans le cas d'une fixation indépendante (figure 31) ;

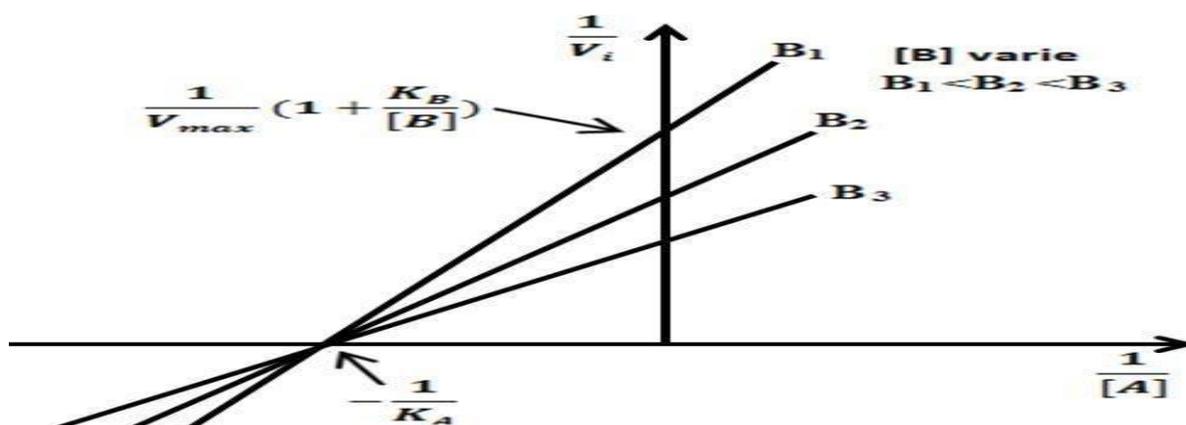


Figure 31 1 Représentation primaire de la fixation au hasard indépendante

Figure 31 : Représentation Primaire de la fixation au hasard indépendante

Et de fixation dépendante : $K_A \neq K'_A$ et $K_B \neq K'_B$, dans ce cas, le substrat n'a pas la même affinité pour l'enzyme libre et pour l'enzyme complexé. Cela signifie que la fixation d'un substrat sur son site enzymatique modifie la fixation ultérieure de l'autre substrat sur son site. Les droites se coupent au-dessus de l'axe des abscisses dans le cas d'une fixation dépendante (figure 32).

-L'intersection avec l'axe des ordonnées des droites obtenues dans les représentations primaires varie avec la concentration de l'autre substrat.

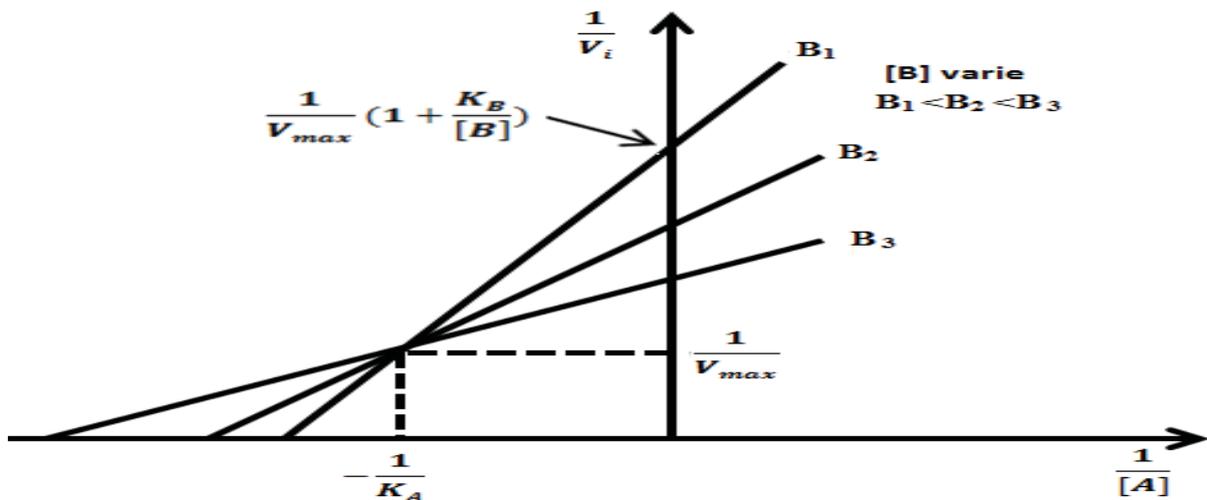
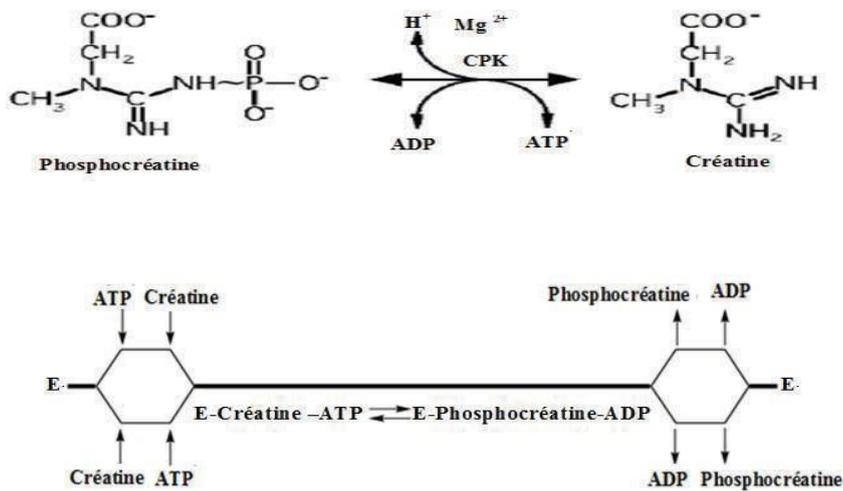


Figure 31 2 Représentation primaire de la fixation au hasard dépendante

Exemple de bibi aléatoire : la créatine Phosphokinase (CPK) :

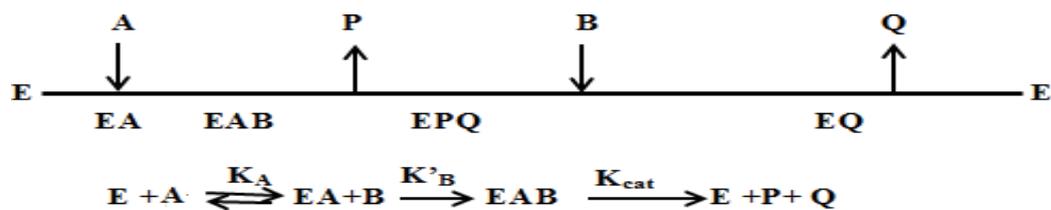
La créatine phosphokinase (CPK), catalyse le transfert d'un radical phosphoryl du substrat, le phosphate de créatine, vers un coenzyme transporteur, l'ADP.

- L'affinité de l'enzyme pour ces deux corps chimiques étant voisine, la liaison de l'enzyme avec chacun d'entre eux se fait dans un ordre qui dépend uniquement des concentrations



2.3.2 Fixation ordonnée

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



Représentation de Cleland

Les constantes de vitesse :

$$K_A = \frac{(E)(A)}{EA}$$

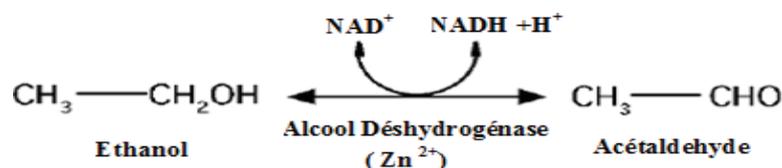
$$K_B = \frac{(EA)(B)}{EAB}$$

Si A est le substrat qui se fixe le premier, la constante K_B est infinie (B n'a aucune affinité pour l'enzyme libre) et $K'_A = 0$ (A ne pouvant se dissocier du complexe E-A-B, la constante d'équilibre de dissociation est nulle).

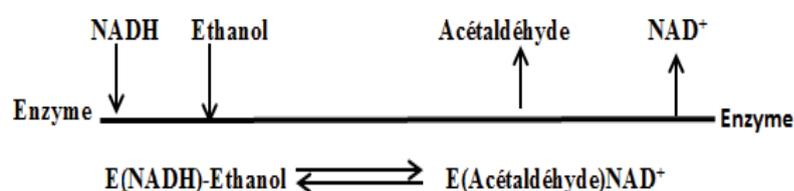
$k_B = 0$ et $K'_A = 0$ cela signifie que B ne peut se fixer sur son site enzymatique que si A se trouve déjà fixé.

Exemple de bibi ordonné : l'Alcool Déshydrogénase :

L'alcool déshydrogénase est une enzyme, catalyse l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde en réduisant simultanément un coenzyme NAD^+ en $NADH$.

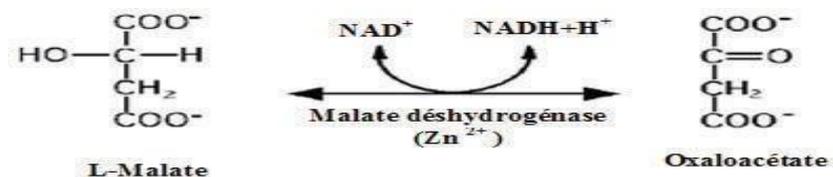


Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour l'alcool si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD^+ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme- NAD^+ -Ethanol se transforme en un Complexe Enzyme- $NADH$ -Acétaldéhyde ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'acétaldéhyde puis le NAD réduit

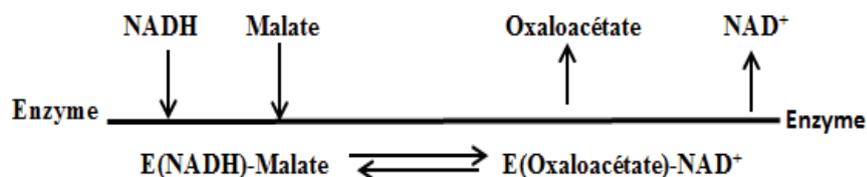


Exemple de bibi ordonné : la Malate déshydrogénase :

La Malate déshydrogénase est une enzyme, catalyse l'oxydation du Malate en Oxaloacétate en réduisant simultanément un coenzyme NAD^+ en NADH .



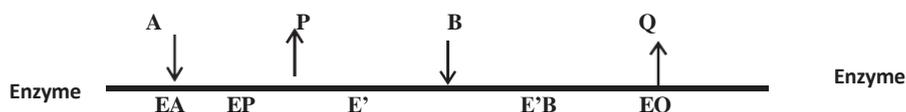
Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour le Malate si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD^+ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme- NAD^+ -Malate se transforme en un complexe Enzyme- NADH -Oxaloacétate ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'Oxaloacétate puis le NAD réduit.



2.4 Mécanisme ping-pong

Si la réaction enzymatique ne nécessite pas la formation d'un complexe ternaire, l'enzyme, après avoir fixé un des substrats, le transforme et libère le produit correspondant.

L'enzyme ensuite fixe l'autre substrat, le transforme et libère le second produit. Dans ce cas, il apparaît un intermédiaire constitué d'une forme modifiée de l'enzyme. C'est le mécanisme de double déplacement dit Ping-Pong qui se distingue des précédents par le fait qu'il intervient, entre les étapes de fixation des deux substrats, une étape irréversible en absence des produits de la réaction.



Présentation graphique

Les représentations primaires de $1/V = f(1/[A])$ ou $f(1/[B])$ sont des droites parallèles. Comme précédemment, les intersections avec l'axe des ordonnées correspond à $1/V_a$ ou $1/V_b$; l'inverse de la vitesse mesurée à concentration saturante du substrat considéré (figure 33).

L'étude des variations de V_a en fonction de $[B]$ permet de déterminer la constante de Michaelis de B et la vitesse maximale de la réaction, celle mesurée lorsque les deux substrats sont saturants.

$$1/V = f(1/[A])$$

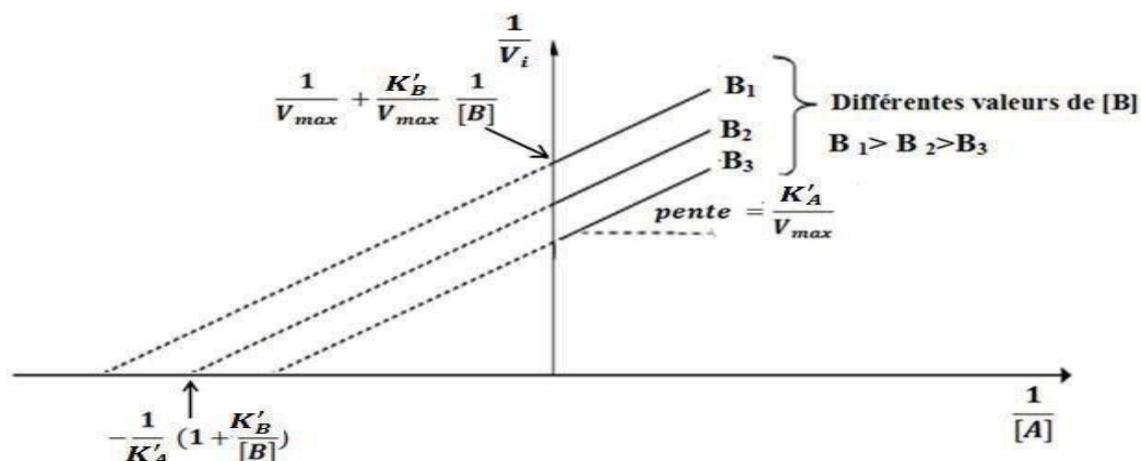


Figure 31.3 Représentation primaire $1/V=f(1/A)$

Figure 33 : Représentation Primaire : $1/V = f (1/A)$

Pour le substrat A : K'_A ou K_{MA} , est calculé à partir de la représentation primaire : $\text{tg}\alpha$ (pente) = K'_A / V_{max}

Représentation secondaire

$1/V_i = f(1/B)$, intersection avec axe des y : $1/V_{\text{max}} = 1/K_{\text{cat}}$, et avec l'axe des x : $-1/K_B$ (K_{MB} pour le substrat B), figure 34 .

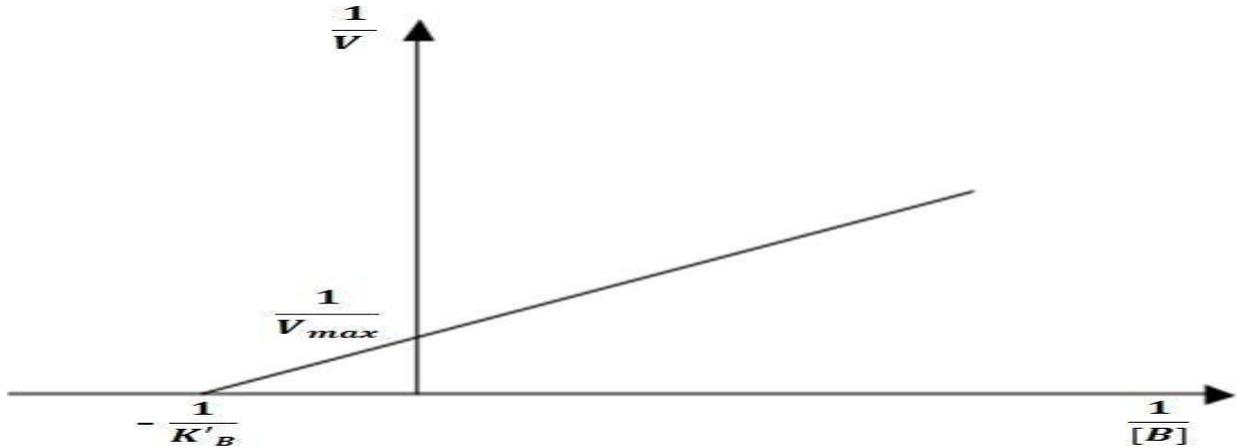


Figure 34 : Représentation Secondaire Exemple de ping-pong : l’alanine amino transférase = ALAT

L’ALAT catalyse le transfert de la fonction amine de l’alanine vers l’ α -Cétoglutarate qu’elle transfo

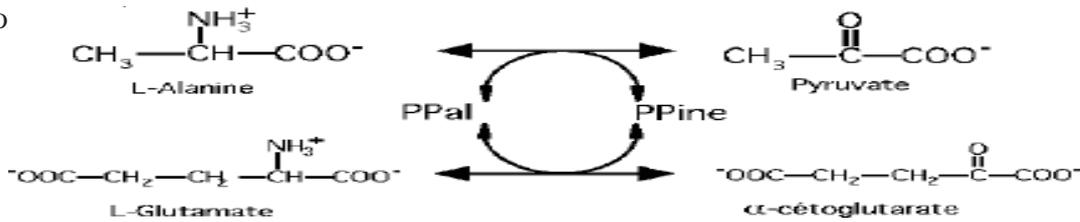
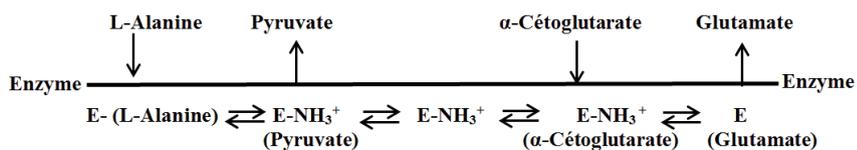


Figure 31 4 Représentation secondaire

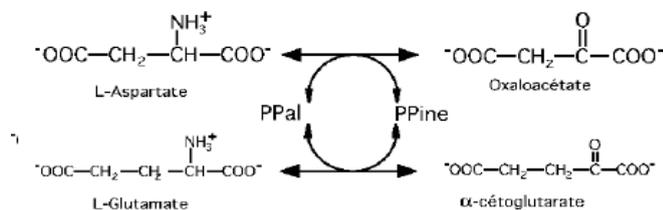
Dans un premier temps, l’ALAT se lie à l’alanine puis transfère la fonction amine sur un coenzyme lié : le phosphate de pyridoxal qui devient phosphate de pyridoxamine sans cesser d’être lié à l’enzyme. L’enzyme se dissocie alors du pyruvate.

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



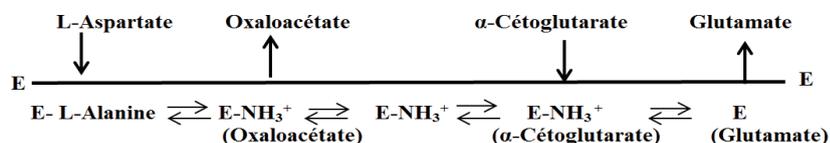
Exemple 2 : Aspartate amino transférase = ASAT

L'ASAT catalyse le transfert de la fonction amine de l'aspartate vers l' α -Cétoglutarate qu'elle transforme en glutamate.



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

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



2.5 Etude des inhibiteurs

L'existence de schémas différents, donnant des équations de vitesse à dépendance similaire vis-à-vis des concentrations des substrats, oblige à compléter l'étude pour analyser le mécanisme cinétique des réactions.

L'une des méthodes cinétiques souvent utilisée est l'étude des effets des inhibiteurs sur la vitesse de la réaction soit d'analogues des substrats, soit des produits de la réaction.

2.5.1 Utilisation des analogues de substrats

Une des approches permettant de déterminer l'ordre de fixation des substrats consiste à étudier le type d'inhibition par les analogues de substrats.

Les analogues structuraux du substrat, se fixent de façon non covalente au site actif de l'enzyme à la place du substrat. Ils diminuent l'affinité de l'enzyme pour le substrat, donc augmentent la K_M mais ne modifient pas la V_{max} puisque l'inhibiteur peut être déplacé du complexe ES par un excès de substrat.

Exemple :

L'inhibition du succinate déshydrogénase par le malonate un analogue structural du succinate illustre l'inhibition compétitive par un analogue du substrat. La succinate déshydrogénase, une enzyme à FAD catalyse la déshydrogénation de l'acide succinique en acide fumarique et elle est inhibée de manière compétitive par l'acide malonique, un analogue structural du substrat, acide succinique. Le succinate et son analogue structural, le malonate peuvent tous deux se fixer au site actif de la Succinate déshydrogénase pour former respectivement des complexes ES et EI.

Ces substances se comportent souvent comme inhibiteurs compétitifs des substrats dont ils sont analogues. Mais ils peuvent se comporter vis à vis de l'autre substrat comme des inhibiteurs de types différents.

-On observe un effet inhibiteur à forte [S] lorsque le substrat et l'inhibiteur sont présents ensemble sur au moins une forme d'enzyme. On l'observe aussi même lorsque l'inhibiteur et le substrat ne sont jamais présents ensemble, chaque fois que l'excès de substrat ne peut empêcher la fixation de l'inhibiteur.

-On observe un effet inhibiteur à faible [S] si l'inhibiteur se fixe sur au moins une forme d'enzyme présente lorsque la [S] tend vers 0.

L'inhibiteur est de type compétitif lorsque l'effet inhibiteur disparaît à forte [S], de type un-compétitif lorsqu'il n'y a pas d'effet inhibiteur à faible [S], et de type non compétitif lorsque l'effet inhibiteur existe aussi bien à forte qu'à faible [S].

Prenons l'exemple du mécanisme ping pong :

-Un analogue de A est compétitif vis-à-vis de A, incompétitif vis-à-vis de B (la forme d'enzyme sur laquelle il se fixe devient très minoritaire lorsque la [B] tend vers 0).

Un analogue de B est incompétitif vis-à-vis de A, compétitif vis-à-vis de B.

2.5.2 Inhibition par les produits

Des études d'inhibition par le produit de réaction complètent ces analyses cinétiques afin de faire la distinction entre les réactions Bi-Bi de type ordonné ou aléatoire. Par exemple, dans une réaction Bi-Bi à ordre aléatoire, chaque produit sera un inhibiteur compétitif en l'absence de ses coproduits indépendamment du substrat choisi pour avoir une concentration variable. Par contre, dans le cas d'un mécanisme séquentiel, seul le produit Q permettra d'obtenir un schéma indiquant une inhibition compétitive lorsque A est le substrat en concentration variable. Inversement seul le produit P produira ce schéma lorsque l'on fait varier la concentration du substrat B. Les autres combinaisons de choix de produit comme inhibiteur et de substrat en concentration variable aboutiront à des formes d'inhibition non compétitive complexes.

Les modes d'inhibition sont définis suivant les règles de Cleland (1963) indiquant les

types d'inhibitions par les produits de la réaction ajoutés au départ au milieu réactionnel

-Règle n°1 : un produit qui se fixe sur la même forme enzymatique qu'un substrat se comporte comme un inhibiteur compétitif (C) de ce substrat

Règle n°2 : un produit qui ne se fixe que sur une autre forme enzymatique que celle qui fixe un substrat se comporte comme un inhibiteur : Mixte (M) si toutes les réactions qui existent entre les deux formes enzymatiques sont réversibles. Incompétitif (ou conditionnel), lorsque le produit et le substrat considéré se lient à des formes différentes de l'enzyme et séparées par une étape irréversible.

Règle n°3 : Une suite de réactions théoriquement réversible sera en fait irréversible si elle est d'un des 2 types : présence d'une concentration saturante du 2° substrat qui se fixe après le 1° substrat qui est considéré. présence d'une concentration nulle du 1° produit qui se libère avant le 2° produit qui est considéré .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références

ANTONIOTTI .S, cours de biocatalyse ,2007

-Auto Dock based incremental docking protocol to improve docking of large ligands, Ankur Dhanik , John S Mc Murray and Lydia Kavraki,2012.

-BAUDIN.B Méthodes de mesure des activités enzymatiques,2013, Biophysique, chimie organique et chimie analytique, 4280_ Page 923 ,2013 3

-BECKER H ; Eléments de biochimie : Notions d'enzymologie ,
<http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/enseignement/Hubert.html>.

-BENDAVID .C,2009, Enzymes et coenzymes .

-BOULANGER.P ,POLONOVSKI.J ,TAYEAU.F, MANDEL .P, BISERTE.G,1969,
Biochimie médicale , Enzymes et Métabolisme ,Masson et C^{ie}, Editeurs (Paris ,France)

-COLLAS .Ph : Enzymologie théorique (genet.univ-tours.fr)

-CORNISH-BOWDEN.A,JAMIN.M et SAKS.V,2005,Cinétique enzymatique, Collection Grenoble Sciences , EDP Sciences, 2005 (France).

-DAUBENFELD.T , Etude de complexes protéiques non covalents par spectrométrie de masse FT-ICR., Thèse de Doctorat , Ecole polytechnique, France , 2006

-DE KATHLEEN ,BOTHAM.M,WEIL.A,RODWELL.V.W, KENNELLY.P.J,BENDER.D.A,
Biochimie de Harper, 2017,de Boeck Supérieur, Paris (France)

-DELAHAYE .A, Enzymologie, <http://www.arnobio2.com>

-DOMENJOUR.L, Biochimie, 2016, De Boeck Supérieur s.a., Paris , 2016

-FÉREY.N . BOUYER.G , MARTIN.C, DRIF .A, BOURDOT.P ,AMMIM, NELSON .J,
BURKHART .JM ,AUTIN.L, 2008,Docking de protéines en Réalité Virtuelle :une approche hybride et multimodale, RSTI,
(<https://www.researchgate.net/publication/220575235>(<http://www.revuesonline.com>))

-GARETT et GRISHAM ,2000, Biochimie ,Edts De Boeck Université s.a (Paris, France).-

HORTON.H.R, MORAN.L.A, OCHS.R.S , RAWN.J.D ET SCRIMGEOUR.K.G,
1994 principes de biochimie , Ed. DeBoeck Universités

-KARP, 2004 , biologie cellulaire &moléculaire , Edts De Boeck& Larcier s.a Université (Bruxelles , Belgique)

KEILLOR .J.W,2004,Inhibitiondes réactions enzymatiques , Université de Montréal (Canada)-

-MARIE. A.L, 2015, Electrophorèse capillaire couplée ou non à la spectrométrie de masse pour l'évaluation ou le contrôle qualité de protéines à visée thérapeutique », Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay (France).

- MOUSSARD .C, 2020,Biochimie et bilologie moléculaire,Edts De Boeck Supérieur s.a,Paris

(France)

-PAPY –GARCIA .D et GARRIGUE ANTAR .La cinétique enzymatique

--RAISONNIER .A, 2002,Enzymologie élémentaire, Université Paris-VI

-RINGE .P ,2009 ,structure et fonction des protéines, Edts De Boeck, Université de Bruxelles(Belgique)

-SIMONSON.S, Ingénierie des Bio Molécules Module Bioinformatique Structurale Novembre 2013

-SUTTON,ROCKETT,SWINDELL.S,2010, Chimie pour les étudiants en médecine, traduction de la 2^{ème} édition américaine Par Paul Depovere , Editions De Boeck Université (Bruxelles ,Belgique)

-TOUSSAINT B., Les enzymes,2011

-VAN DE WEGHE .P 2013 , les interactions protéine –ligand « règles de Lipinski et drugabilité

-VOET.D et VOET.J.G, 2005, Biochimie , Edts Boeck&Larcier s.a (Bruxelles , Belgique)

-WEINMAN.S, MEHUL.P, 2004, Toute la biochimie, ©Dunod,Paris (France).