

Chapitre 12

Les enzymes et la catalyse des réactions

Cours

PLAN DU CHAPITRE

- 1 Les enzymes : des biocatalyseurs
- 2 Les enzymes : des protéines qui se lient au substrat
- 3 Les enzymes : des biocatalyseurs contrôlables
- 4 Équipement enzymatique et spécialisation des cellules ou organites

ZOOM

- 1 Complémentarité spatiale enzyme-substrat
- 2 Énergie d'activation et cinétique d'une réaction

INTRODUCTION

Un catalyseur est une substance qui accélère une réaction, sans être consommée par cette réaction : il n'apparaît donc pas dans l'équation-bilan. Les enzymes sont des protéines jouant le rôle de catalyseur. En général, une enzyme ne catalyse qu'une seule réaction, à partir d'un seul substrat, contrairement aux catalyseurs chimiques qui peuvent en catalyser plusieurs.

- ➔ Pourquoi les enzymes sont-elles spécifiques d'un substrat et d'une réaction, contrairement aux catalyseurs chimiques ?
- ➔ Comment une cellule peut-elle contrôler et orienter les réactions qui s'y déroulent ?

1 Les enzymes : des biocatalyseurs

1.1 Des catalyseurs saturables

► Définitions

Un **réactif** d'une réaction catalysée par une enzyme est appelé **substrat**.

La **vitesse d'une réaction chimique** correspond à la quantité de réactif consommé ($-d[R]/dt$) ou de produit formé ($d[P]/dt$) par unité de temps. Elle se mesure en $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ (ou en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).

Lorsque l'on étudie la cinétique d'une réaction en présence d'une enzyme, on constate que l'on atteint une vitesse maximale de réaction (V_{max}) au-delà d'une certaine concentration en substrat (figures 12.3 et 12.4). Une telle asymptote ne s'observe pas avec un catalyseur chimique. On peut conclure de ce constat que le mécanisme de catalyse enzymatique fait intervenir la formation d'un complexe enzyme-substrat (ES). La catalyse enzymatique se déroule donc en deux temps (figure 12.1).

Voir TP 8, § 1

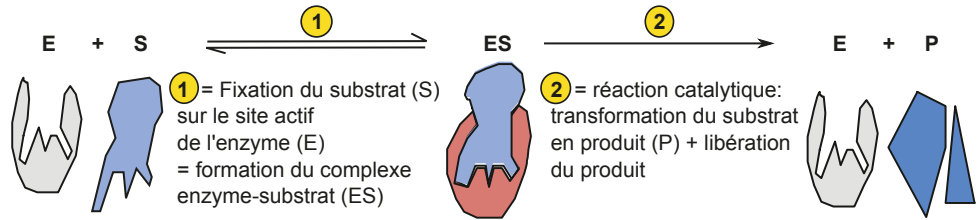


Figure 12.1 Les étapes de la catalyse enzymatique.

À partir d'une certaine concentration en substrat, toutes les enzymes sont liées à un substrat (sous forme de complexe ES) : l'augmentation de la concentration en substrat n'augmente donc plus la vitesse de réaction car il n'y a plus d'enzyme libre.

1.2 Des protéines jouant le rôle d'agents de couplage entre deux réactions

L'hexokinase catalyse simultanément la réaction de phosphorylation du glucose et la réaction d'hydrolyse de l'ATP (figure 12.2). L'enzyme joue ici le rôle d'agent de **couplage** entre les deux réactions : l'énergie libérée par la seconde réaction (exergonique) permet donc de réaliser la première (endergonique). Il s'agit ici d'un couplage chimio-chimique.

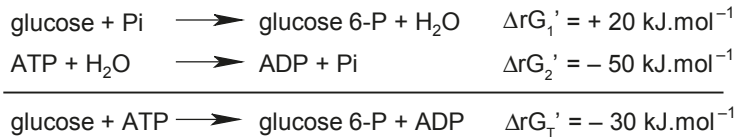


Figure 12.2 Couplage chimio-chimique réalisé par l'hexokinase.

Les enzymes peuvent ainsi permettre des couplages énergétiques (faisant souvent intervenir l'ATP), mais elles peuvent aussi coupler deux réactions redox grâce à l'intervention d'une **coenzyme** d'oxydo-réduction (comme $\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$) ou coupler deux réactions avec transfert d'une chaîne carbonée grâce à l'intervention de la coenzyme A.

1.3 Deux types de cinétique selon les enzymes

Pour étudier la cinétique d'une enzyme donnée, on peut tracer la courbe $V_i = f([S]_0)$, où V_i = vitesse initiale de la réaction ; $[S]_0$ = concentration initiale en substrat.

La vitesse initiale de la réaction (V_i) correspond à la vitesse de la réaction au moment où l'on injecte l'enzyme. À ce moment, le substrat est en excès par rapport à l'enzyme et la vitesse est constante (brève phase stationnaire, avant une diminution de la concentration en substrat et donc de la vitesse de réaction).

a) Enzyme michaelienne

Pour certaines enzymes (dont la peroxydase, catalysant l'oxydation d'un réactif par le peroxyde d'hydrogène dont la cinétique est étudiée au TP8), la courbe $V_i = f([S]_0)$ présente une allure hyperbolique (figure 12.3). Dans le modèle proposé en 1913 par Michaelis et Menten, un complexe transitoire enzyme-substrat (ES) est très vite en équilibre avec substrat (S) et enzyme (E) ($E + S \leftrightarrow ES$). Ce modèle permet d'aboutir à l'équation de Michaelis-Menten (courbe en rouge sur la figure 12.3) :

$$V_i = V_{\max} \times [S]_0 / (K_M + [S]_0) \quad (12.1)$$

où V_{\max} = Vitesse maximale ; K_M = constante de Michaelis (en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Pour une enzyme comme la peroxydase, il y a une très bonne adéquation entre les données expérimentales obtenues et la courbe hyperbolique prévue par le modèle. On peut donc considérer

Voir chapitre 10, § 1.2

Voir TP 8, § 1.2

Voir TP 8, § 1.3

que, pour de telles **enzymes** dites **michaéliennes**, le modèle de Michaelis-Menten est validé; on parle pour celles-ci de **cinétique michaélienne**.

Les **paramètres cinétiques** d'une **enzyme michaélienne**, V_{\max} et K_M , peuvent être déterminés expérimentalement ; on peut lire ici sur la **figure 12.3a** que :

$$V_{\max} \approx 0,75 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1} \text{ et } K_M \approx 0,45 \text{ mmol.L}^{-1}$$

Voir TP 8, § 1.3

Un tracé en double inverse ($1/V_i = f(1/[S]_0)$) permet une détermination précise de ces paramètres grâce à une linéarisation (**figure 12.3b**).

D'après (eq. 12.1), quand $[S]_0 \rightarrow +\infty$ alors V_i tend vers V_{\max} , la **vitesse maximale** que peut atteindre la réaction (pour cette concentration en enzyme). Il s'agit de la vitesse atteinte lorsque toutes les enzymes sont liées à un substrat : V_{\max} dépend donc du nombre de molécules de substrat transformées par une molécule d'enzyme en une seconde, nombre donné par la constante catalytique k_{cat} (qui correspond à $V_{\max}/[E]$). Sur l'exemple de la **figure 12.3** (où $[E] = 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$), $k_{\text{cat}} = 0,75/10^{-3} = 750 \text{ min}^{-1} = 12,5 \text{ s}^{-1}$. Cela signifie que chaque molécule d'enzyme transforme 12,5 molécules de substrat en une seconde.

D'après (eq. 12.1), quand $[S]_0 = K_M$ alors $V_i = V_{\max}/2$: K_M , la **constante de Michaelis** (en mol.L^{-1}), correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale est égale à la moitié de la V_{\max} . Il s'agit donc de la concentration pour laquelle la moitié des enzymes sont liées à un substrat. Le K_M est **inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour son substrat** : un K_M élevé signifie qu'il faut une grande concentration en substrat pour que la moitié seulement des enzymes s'y fixent.

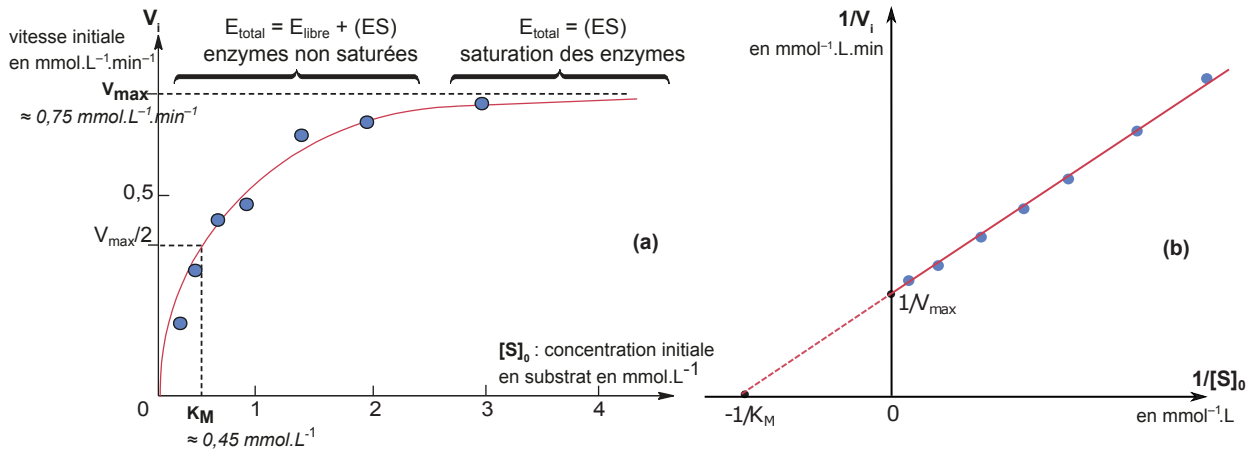


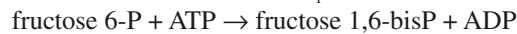
Figure 12.3 Cinétique d'une enzyme michaélienne.

On mesure la vitesse initiale V_i d'une réaction pour des concentrations croissantes de substrat, à concentration enzymatique constante $[E] = 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$. **(a)** représentation $V_i = f([S]_0)$; **(b)** représentation en double inverse. La courbe en rouge correspond à la modélisation.

b) Enzyme allostérique, à comportement coopératif

Paramètres cinétiques

Les **enzymes** dites **allostériques**, comme la phosphofruktokinase 1 (PFK₁), présentent des cinétiques avec une **allure sigmoïde** (**figure 12.4**). La PFK₁ catalyse la troisième étape de la glycolyse :



À partir du tracé $V_i = f([S]_0)$, on peut déterminer les paramètres cinétiques d'une **enzyme allostérique** :

- V_{\max} correspond là aussi à la vitesse maximale de la réaction (quand les enzymes sont saturées) ;
- $K_{0,5}$ correspond, comme le K_M d'une enzyme michaélienne, à la concentration en substrat pour laquelle $V_i = V_{\max}/2$

Voir chapitre 11, § 3.2

Voir chapitre 9, § 4.3

Effet coopératif et cinétique sigmoïde

La PFK₁, comme la quasi-totalité des enzymes allostériques, est une protéine oligomérique : elle est constituée de 4 sous-unités identiques, chacune possédant un site actif où se fixent les 2 substrats : le fructose 6-P (F6P) et l'ATP. La PFK₁ peut alors basculer entre 2 structures quaternaires : une forme tendue (T) à faible affinité pour le substrat et une forme relâchée (R) à forte affinité. Le passage de la forme T à la forme R (et inversement) est appelé **transition allostérique**.

L'analyse de la courbe de cinétique montre que, pour de faibles concentrations en substrat F6P, la vitesse est très faible. Par contre, autour du $K_{0,5}$, une petite augmentation de [F6P] provoque une forte augmentation de la vitesse. Cette allure sigmoïde est interprétée comme un **effet coopératif** entre les sous-unités : à partir de la forme T, la fixation du F6P sur l'une des sous-unités provoque un changement de conformation de la protéine aboutissant à la transition allostérique vers la forme R. Les 3 autres sous-unités ont alors une affinité beaucoup plus forte pour le substrat et fixent donc le F6P. On parle d'**allostérie** : la fixation d'un ligand sur un site au niveau d'une sous-unité a une influence sur la fixation d'un ligand sur un site d'une autre sous-unité.

La fixation de différents ligands (AMP, ATP...) sur la PFK₁ modifie l'équilibre entre forme T et forme R, ce qui permet un contrôle précis de l'activité de l'enzyme (voir § 3.3.b).

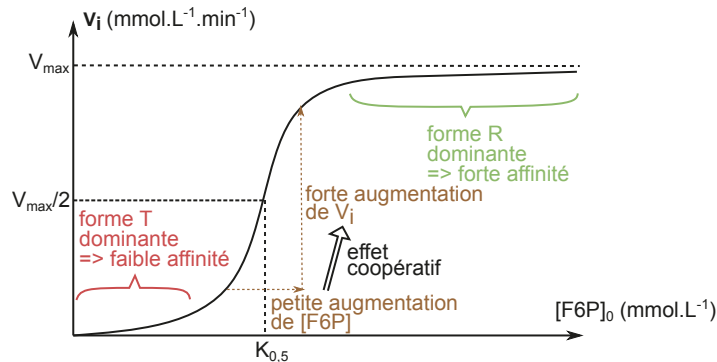


Figure 12.4 Cinétique d'une enzyme allostérique, la PFK₁.

2 Les enzymes : des protéines qui se lient au substrat

La catalyse enzymatique passe par une étape de fixation du substrat au niveau du site actif (formation du complexe enzyme-substrat), suivie de la réaction catalytique où le substrat est transformé en produit. Le site actif est donc à la fois site de liaison et site catalytique.

2.1 Le site actif : un site liant spécifiquement le substrat

On suit expérimentalement la phosphorylation du glucose par l'hexokinase, en présence de l'un ou l'autre des nucléotides tri-phosphate (ATP, GTP, UTP...). On constate alors que la réaction n'est catalysée qu'en présence de l'ATP. Le GTP ou l'UTP, bien que très similaires à l'ATP, ne sont pas substrats de l'hexokinase. D'où vient cette spécificité de substrat ?

a) Le site actif : une cavité de la structure tertiaire où se fixe le substrat

Nous étudierons ici la notion de site actif sur l'exemple de la triose phosphate isomérase (enzyme catalysant l'étape 5 de la glycolyse : isomérisation du glyceraldéhyde-3P (Gal3P) en dihydroxyacétone-P (DHAP)).

La structure tertiaire des enzymes leur confère une forme globulaire, de quelques nanomètres, au sein de laquelle une cavité (poche ou crevasse) constitue le site actif où se fixe(nt) le(s) subs-

Voir chapitre 11, figure 11.4

Voir chapitre 9, § 4

trat(s). Cette cavité est bordée par les radicaux d'acides aminés qui peuvent être très éloignés dans la séquence de la protéine (Glu165, Lys 12 et His 95 sur la [figure 12.5](#)).

La forme de cette cavité est relativement complémentaire de la forme du substrat : l'emboîtement du substrat et du site actif participe donc à la reconnaissance moléculaire.

Par ailleurs, une fois le substrat positionné, des résidus complémentaires du substrat et de certains radicaux du site actif (groupements avec charges de signes opposés par exemple) se retrouvent à proximité. Ils établissent alors entre eux des liaisons faibles (liaison ionique dans l'exemple de la [figure 12.5](#)) qui stabilisent fortement le complexe enzyme-substrat.

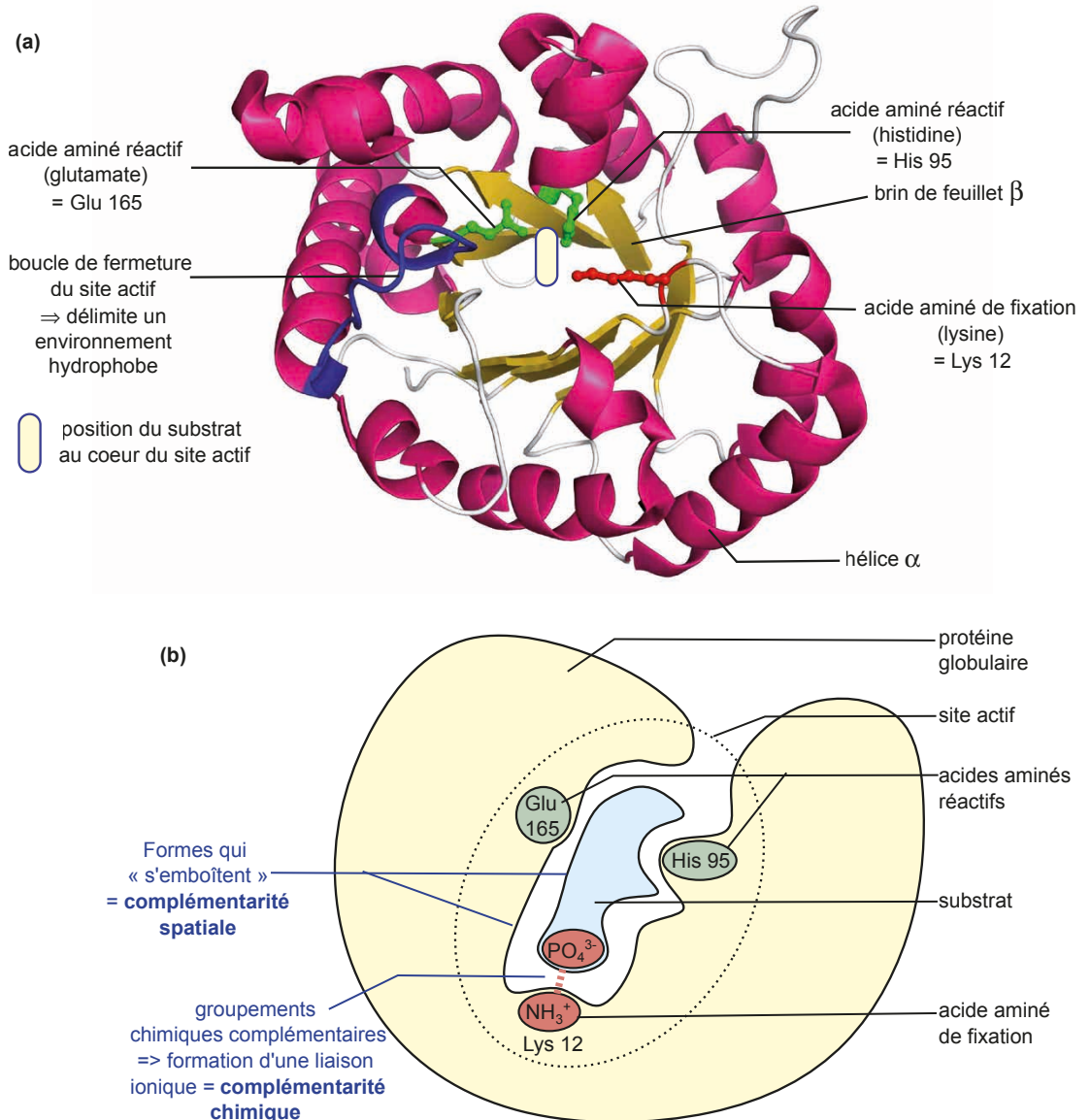


Figure 12.5 Structure 3D de la triose phosphate isomérase et de son site actif.

(a) Modèle 3D (Image fournie par Lionel Mourey, Insitut de pharmacologie et de biologie structurale (IPBS), Toulouse) ; (b) Schématisation du complexe enzyme-substrat.

b) Une affinité plus ou moins grande entre enzyme et substrat

Une double complémentarité est responsable de la **spécificité de substrat** de l'enzyme : **complémentarité spatiale** (formes complémentaires du substrat et du site actif) et **complémentarité chimique** (proximité de groupements complémentaires permettant l'établissement de liaisons faibles).

ZOOM 1

Complémentarité spatiale enzyme-substrat

Plus ces complémentarités (spatiale et chimique) sont fortes, plus le complexe ES est stable : l'enzyme possède alors une grande **affinité** pour son substrat, ce qui se traduit par un K_M faible (voir § 1.3, signification du K_M).

2.2 Le site actif : un site catalytique spécifique d'une réaction

a) Acides aminés réactifs et mécanisme catalytique

Une fois fixé au site actif, le substrat réagit avec les radicaux des **acides aminés réactifs** ce qui provoque sa transformation en produit : c'est la réaction catalytique, seconde étape de la catalyse enzymatique ($ES \rightarrow E + P$).

La **figure 12.6** présente un **mécanisme catalytique** sur l'exemple de la triose phosphate isomérase. On constate ici que les radicaux des acides aminés réactifs (glutamate 165 et histidine 95) échangent provisoirement des atomes d'hydrogène avec le substrat mais se retrouvent inchangés à la fin de la réaction.

Les transferts de H^+ et d'électrons permettent ainsi le passage par un intermédiaire réactionnel (énediol sur la **figure 12.6**), ce qui diminue l'énergie d'activation (E_A) et accélère la réaction.

ZOOM 2

Énergie d'activation et cinétique d'une réaction

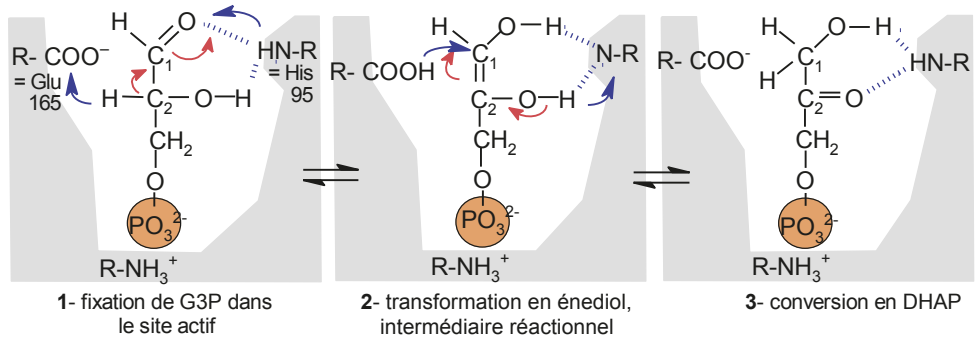


Figure 12.6 Mécanisme catalytique de la triose phosphate isomérase.

Les flèches bleues désignent les transferts de protons, les flèches rouges les transferts d'électrons, les pointillés bleus les liaisons H. la partie protéique du site actif est en grisé.

! Attention !

Il est faux de dire que « l'enzyme ne participe pas à la réaction » puisqu'elle échange transitoirement des atomes et des électrons avec le substrat. En revanche, en tant que catalyseur, elle est inchangée à la fin de la réaction et n'apparaît donc pas dans l'équation-bilan.

b) Spécificité de réaction

Les phosphofruktokinases 1 et 2 (PFK_1 et PFK_2) ont les mêmes substrats : le fructose-6-P et l'ATP. Cependant, la PFK_1 catalyse la phosphorylation au niveau du carbone 1 (formant ainsi du fructose-1,6-bisP), tandis que la PFK_2 catalyse la phosphorylation au niveau du carbone 2 (formant donc du fructose-2,6-bisP). Chaque enzyme catalyse, en général, une réaction précise : c'est la **spécificité de réaction**.

Voir chapitre 11, § 3.1

En résumé, la structure tertiaire d'une enzyme permet donc l'existence d'un site actif, cavité où se lie spécifiquement un substrat, grâce à la complémentarité spatiale et chimique. Différents radicaux d'acides aminés bordent cette cavité dont certains stabilisent le complexe ES en établissant des liaisons faibles avec le substrat, tandis que d'autres réagissent avec le substrat au cours de la réaction catalytique.

3 Les enzymes : des biocatalyseurs contrôlables

L'activité d'une cellule dépend des réactions chimiques qui s'y déroulent. En contrôlant l'activité enzymatique, les cellules peuvent donc orienter leur métabolisme. Nous verrons ici les différents mécanismes permettant ce contrôle.

3.1 Un contrôle par la quantité d'enzyme

Plus la quantité d'enzyme est grande, plus la réaction est rapide ($V_{\max} = k_{\text{cat}} \times [\text{enzyme totale}]$). La cellule peut donc contrôler la vitesse d'une réaction en ajustant la quantité de l'enzyme correspondante par :

- contrôle de la synthèse (niveau d'expression du gène) et de la destruction de l'enzyme (par le protéasome) ;
- modification de la localisation de l'enzyme via le processus d'adressage.

3.2 Un contrôle par les conditions physico-chimiques

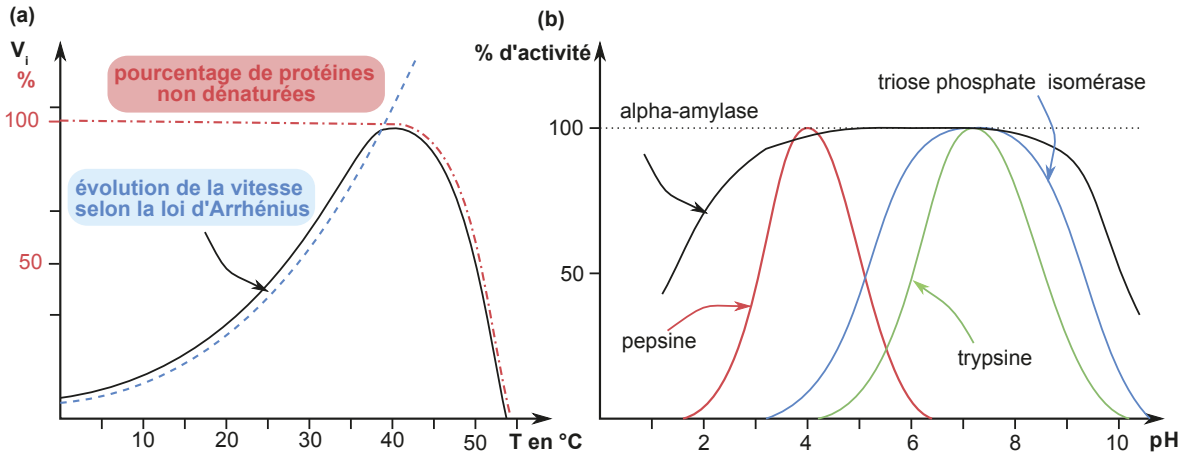


Figure 12.7 Influence de la température (a) et du pH (b) sur l'activité enzymatique.

a) Influence de la température

La température optimale pour une réaction enzymatique se situe autour de 40 °C (figure 12.7). En deçà de 40 °C, la vitesse de la réaction augmente avec la température selon la loi d'Arrhénius : une agitation moléculaire plus importante facilite le passage de la barrière énergétique. Au-delà de 45 °C, l'agitation moléculaire trop intense casse les liaisons faibles et l'enzyme est dénaturée : cette perte de la structure tertiaire fait disparaître le site actif et donc l'effet catalyseur de l'enzyme.

Chez les homéothermes, le maintien d'une température interne autour de 37 °C permet une activité enzymatique optimale, indépendamment de la température du milieu extérieur.

Voir chapitre 9, § 4.1

b) Influence du pH

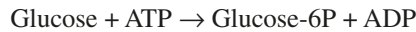
Les enzymes présentent un optimum d'action sur une gamme de pH plus ou moins large. En dehors de cet intervalle de pH, les radicaux des acides aminés portant une fonction carboxyle (Asp, Glu) ou une fonction amine (Lys, Arg, His) peuvent subir une modification acido-basique (ajout ou perte d'un H^+), ce qui peut faire disparaître/apparaître une liaison faible et ainsi changer la structure tertiaire de l'enzyme. Le site actif est alors modifié d'où la perte d'efficacité de l'enzyme.

Le pH optimal diffère selon les enzymes et dépend de leur lieu d'action (figure 12.7). Ainsi, une enzyme agissant dans un milieu acide (comme la pepsine dans l'estomac ou les enzymes lysosomiales) a un pH optimal faible tandis que les enzymes actives dans le cytosol (milieu proche de la neutralité) ont un pH optimal autour de 7.

3.3 Un contrôle par fixation d'un ligand

a) Les inhibiteurs des enzymes michaéliennes

L'hexokinase est une enzyme michaélienne qui catalyse la première étape de la glycolyse :



La figure 12.8 montre l'effet du Glucose-6P (G6P), produit de la réaction, sur la cinétique. La présence du G6P :

- diminue la vitesse maximale de la réaction (augmentation de $1/V_{\max}$) : tout se passe comme si moins de molécules d'enzymes réagissaient ;
- ne modifie pas le K_M : l'affinité de l'enzyme pour le substrat n'est pas modifiée.

Le G6P est donc un **inhibiteur non compétitif** de l'hexokinase. Il se fixe sur un site effecteur, différent du site actif, ce qui modifie la conformation du site actif et neutralise l'enzyme (figure 12.8). Cette fixation par des liaisons faibles est réversible : une fois libérée du G6P, l'hexokinase retrouve une activité normale.

Un **inhibiteur non compétitif** neutralise donc une partie des enzymes du milieu, ce qui provoque une diminution de la V_{\max} , mais n'entre pas en compétition avec le substrat pour l'accès au site actif : le K_M reste donc inchangé.

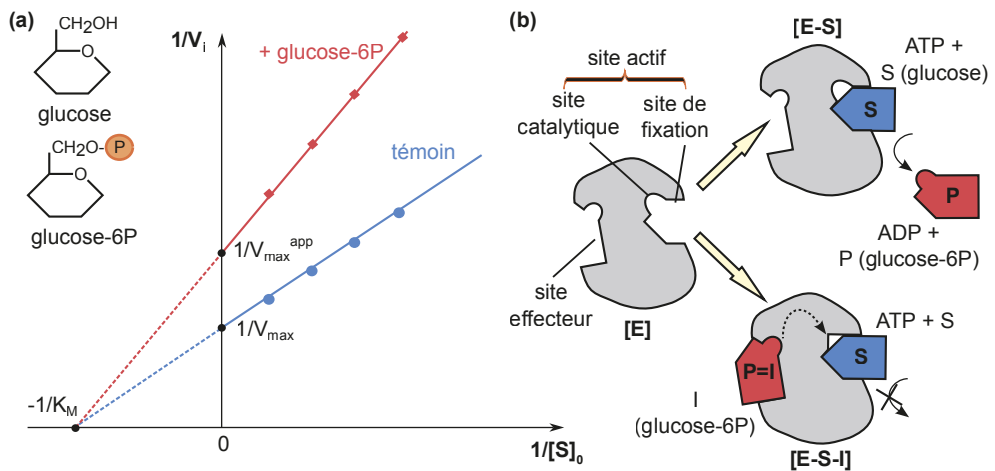


Figure 12.8 Inhibition de l'hexokinase par fixation d'un ligand.

- (a) Cinétique de la réaction en présence (+glucose-6P) ou non (témoin) du glucose-6P ;
 (b) Interprétation moléculaire de l'inhibition non compétitive. S = substrat ; P = produit ;
 I = inhibiteur.

Voir chapitre 11, § 3.2

Voir TP 8, § 2

DÉCOUVERTE 1

Inhibiteurs enzymatiques utilisés en pharmacologie

Le contrôle de l'hexokinase par le produit de la réaction est une **inhibition par excès de produit**. D'un point de vue fonctionnel, ce contrôle permet d'ajuster la consommation de glucose selon les besoins de la cellule. Par exemple, si la concentration en ATP dans la cellule est élevée, la glycolyse est inhibée (essentiellement par inhibition de la PFK₁) : le G6P est moins utilisé et l'augmentation de sa concentration provoque une inhibition de cette étape de phosphorylation du glucose. L'accumulation de glucose dans la cellule fait diminuer le gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule : l'entrée de glucose via la perméase est alors réduit. Il existe également des **inhibiteurs compétitifs** qui se fixent au niveau du site actif : ils entrent donc en « compétition » avec le substrat, ce qui rend plus difficile la formation du complexe ES et augmente le K_M (diminution de l'affinité). Dans le TP 8, on verra comment distinguer inhibiteurs compétitifs et non compétitifs à partir des données cinétiques.

b) Les effecteurs allostériques des enzymes allostériques

Une enzyme allostérique comme la PFK₁ peut être contrôlée par différents **effecteurs allostériques** dont la fixation sur l'enzyme déplace l'équilibre entre **forme T** et **forme R**.

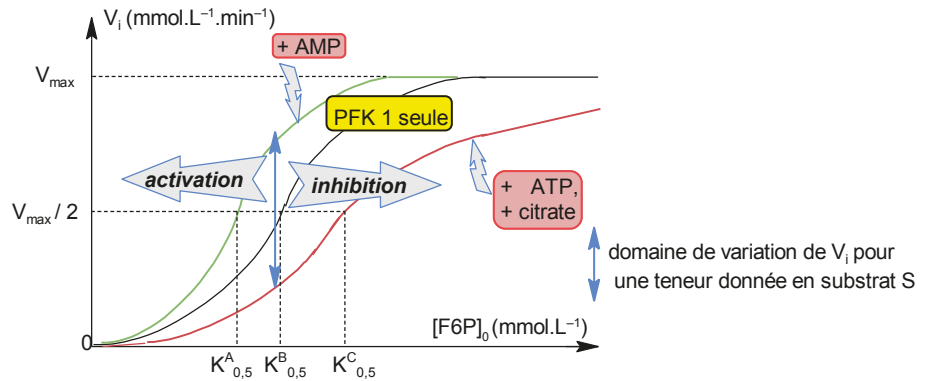


Figure 12.9 Effet de quelques effecteurs allostériques sur la cinétique de la PFK₁.

Effecteurs allostériques et transition allostérique

La figure 12.9 montre qu'en présence de certains ligands, la courbe de cinétique de la PFK₁ peut être décalée :

- vers la gauche : dans ce cas, le ligand est un **activateur** (comme l'AMP) qui stabilise la forme R et augmente l'activité de l'enzyme ;
- vers la droite : dans ce cas, le ligand est un **inhibiteur** (comme l'ATP) qui stabilise la forme T et diminue donc l'activité de l'enzyme.

De tels ligands, dont la fixation sur l'enzyme modifie l'équilibre entre forme T et forme R, sont appelés **effecteurs allostériques**. Parmi eux, on distingue :

- les effecteurs à **effet homotrope** : leur fixation sur un site de l'enzyme modifie l'affinité d'autres sites **pour ce même ligand** ; ainsi le F6P se fixe sur le site actif d'une sous-unité et augmente l'affinité des sites actifs des autres sous-unités pour le F6P ;
- les effecteurs à **effet hétérotrope** : leur fixation sur un site de l'enzyme modifie l'affinité d'autres sites **pour un autre ligand** ; ainsi l'AMP se fixe sur un site régulateur (différent du site actif) et augmente l'affinité des sites actifs pour le F6P (substrat).

Contrôle de la glycolyse au niveau de la PFK1

Parmi les effecteurs allostériques de la PFK₁, l'ATP occupe une place particulière car il est à la fois substrat et inhibiteur. Chaque sous-unité de la PFK₁ possède 2 sites de liaison à l'ATP : l'un à forte affinité, au niveau du site actif, où l'ATP est substrat, l'autre à plus faible affinité

Voir chapitre 11, § 3.2

est un site régulateur où l'ATP joue le rôle d'effecteur allostérique. Ainsi, à [ATP] faible, l'ATP ne se fixe que sur le site actif : la PFK_1 est active et le flux glycolytique important permet une grande synthèse d'ATP. Au contraire, à forte [ATP], l'ATP se fixe aussi sur le site régulateur ce qui provoque le basculement en forme T de la PFK_1 : le flux glycolytique chute et la synthèse d'ATP aussi. Le contrôle de la PFK_1 par les effecteurs allostériques permet donc un ajustement des voies cataboliques aux besoins cellulaires en ATP.

Les **enzymes-clés** qui contrôlent les voies métaboliques sont en général des enzymes allostériques qui peuvent être finement contrôlées par différents facteurs allostériques.

3.4 Un contrôle par modification covalente

Une **modification covalente** consiste en l'ajout d'un groupement sur la chaîne polypeptidique, via une liaison covalente. Ainsi, la **phosphorylation** d'un radical (ajout d'un groupement phosphate) peut changer les charges et l'encombrement stérique : cela modifie la structure tertiaire de l'enzyme, donc la conformation de son site actif et, par conséquent, son activité. La cellule peut ainsi activer ou inactiver une enzyme en la phosphorylant à partir de l'ATP, grâce à une protéine-kinase. La glycogène-phosphorylase (GPase) est une enzyme allostérique catalysant la dépolymérisation du glycogène : son activation (associée à l'inactivation de l'enzyme antagoniste, la glycogène-synthase) aboutit à l'utilisation des réserves glucidiques dans la cellule animale (figure 12.10). En situation de besoins en glucose dans la cellule musculaire ou sous l'action d'une hormone, le glucagon, une protéine-kinase provoque la phosphorylation de la GPase, ce qui la fait passer sous sa forme active : l'action de la GPase permet alors la libération de Glucose-1P. Au contraire, après un repas par exemple, sous l'effet d'une autre hormone, l'insuline, une protéine-phosphatase provoque la déphosphorylation de la GPase, ce qui inactive l'enzyme : le glucose n'est plus déstocké. L'enzyme antagoniste, la glycogène-synthase (GS) est elle aussi contrôlée par phosphorylation/déphosphorylation. Mais, dans le cas de la GS, la phosphorylation provoque une inactivation de l'enzyme et la déphosphorylation provoque son activation.

Ces modifications covalentes permettent ainsi à la cellule de contrôler très rapidement l'activité des enzymes et donc d'orienter son métabolisme selon la situation physiologique.

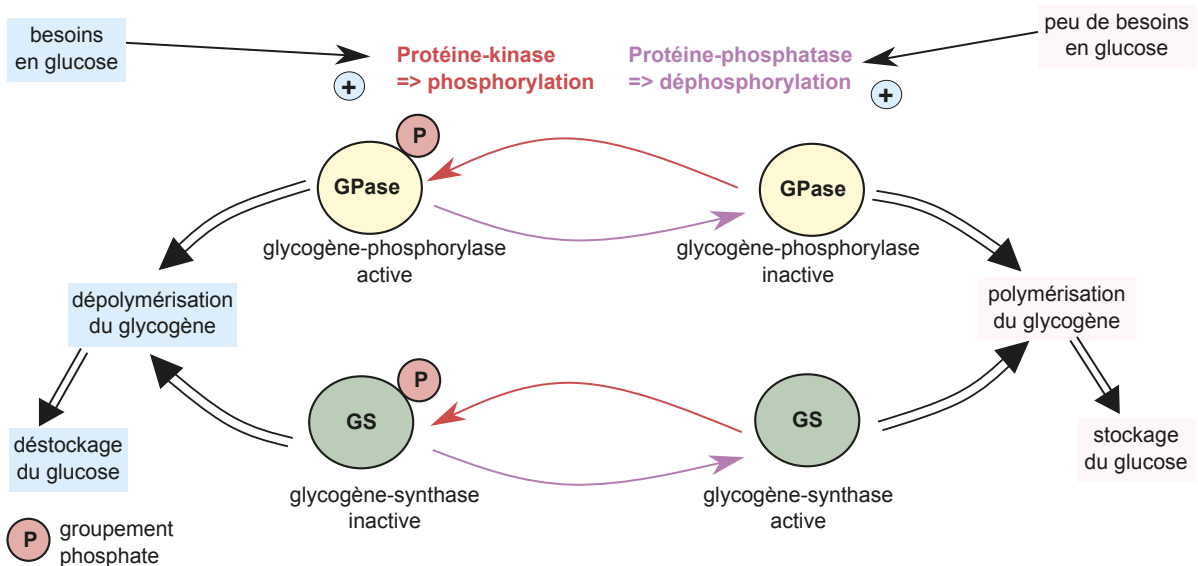


Figure 12.10 Contrôle du métabolisme du glycogène par phosphorylation/déphosphorylation.

GPase = glycogène-phosphorylase ; GS = glycogène-synthase.

4 Équipement enzymatique et spécialisation des cellules ou organites

Les réactions qui se déroulent dans un milieu réactionnel, comme un compartiment cellulaire, dépendent des catalyseurs enzymatiques présents.

4.1 Un équipement enzymatique des cellules spécialisées, conséquence d'un contrôle de l'expression génétique

Dans un organisme pluricellulaire, la diversité des **protéomes** cellulaires est la conséquence de l'expression génétique différentielle. Par exemple, seuls les hépatocytes (cellules du foie) expriment les gènes de certaines enzymes du cycle de l'urée, ce qui rend ces cellules capables de convertir les déchets cellulaires azotés en urée. La spécialisation de la cellule est donc une conséquence de son équipement enzymatique.

Voir chapitre 15, § 1.1a

4.2 Un équipement enzymatique des organites, conséquence de l'adressage des protéines

Les organites d'une cellule eucaryote ne possèdent pas tous les mêmes enzymes (figure 12.11). Par exemple, les enzymes du cycle de Krebs présentes dans la matrice mitochondriale permettent à la mitochondrie d'oxyder la matière organique tandis que les hydrolases des lysosomes leur permettent de digérer différentes molécules. L'équipement en enzymes d'un compartiment est donc responsable de sa spécialisation. Il est la conséquence de l'adressage des enzymes vers tel ou tel compartiment, selon la séquence-signal portée.

Voir chapitre 6, § 1.2

Voir chapitre 14, § 4

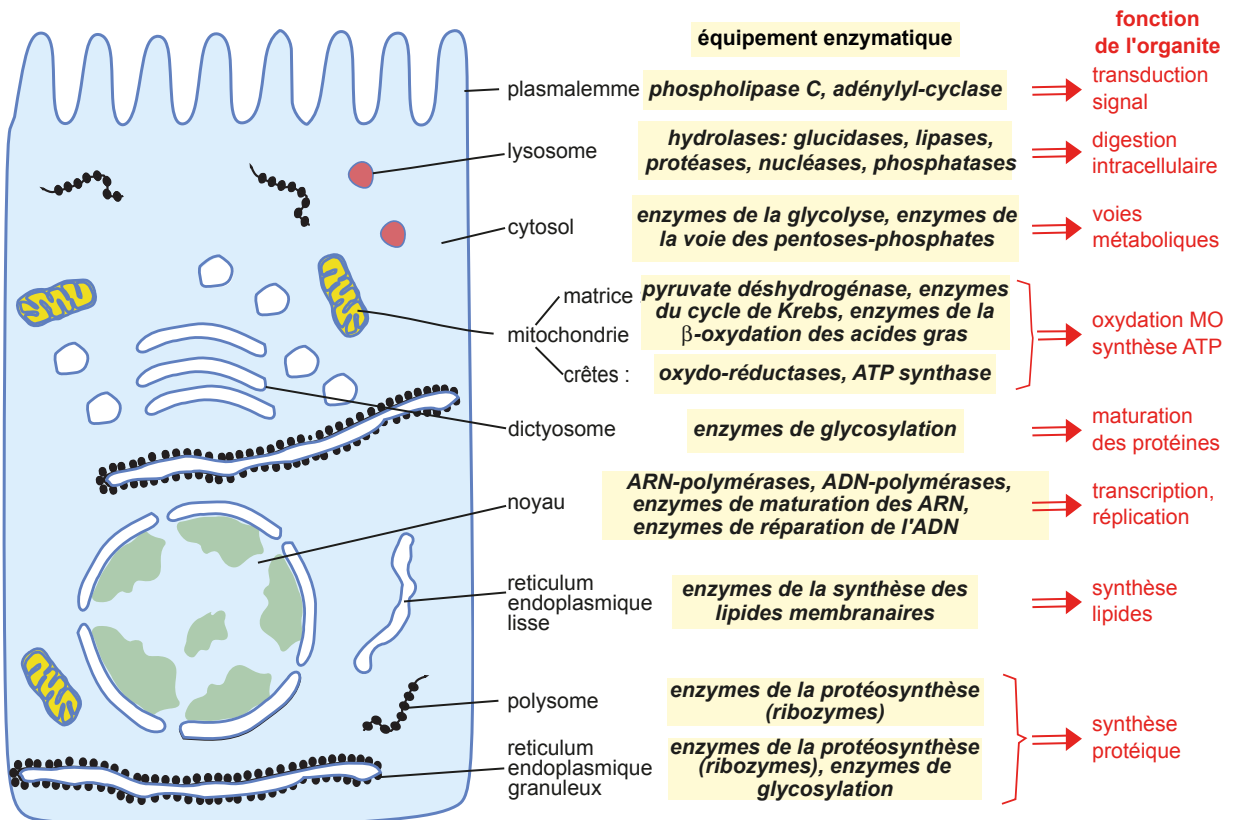


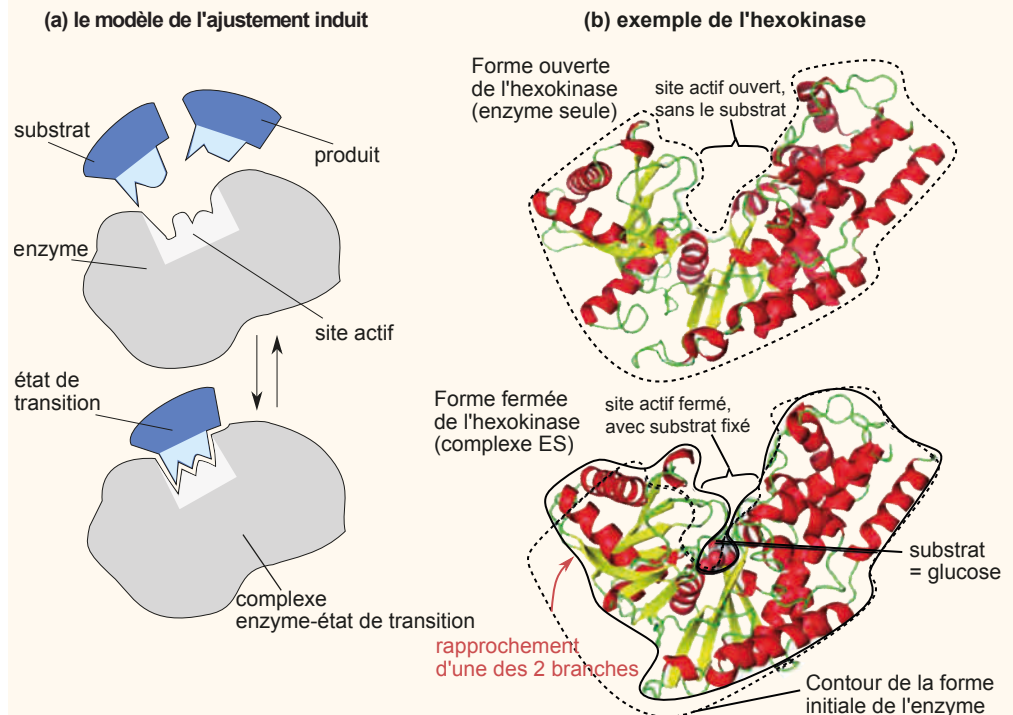
Figure 12.11 Équipement enzymatique et spécialisation des organites dans un entérocyte.

ZOOM 1

Complémentarité spatiale enzyme/substrat

La spécificité de substrat d'une enzyme repose notamment sur la complémentarité spatiale entre le site actif et le substrat. Selon le **modèle clé-serrure**, premier modèle historiquement proposé, site actif et substrat ont des formes complémentaires et « s'emboîtent » au cours de la formation du complexe ES, comme une clé dans une serrure. Cette idée s'appuie notamment sur le fait que les inhibiteurs compétitifs, qui se fixent eux aussi sur le site actif, ont une forme analogue à celle du substrat.

Cependant, des observations par cristallographie, montrant un changement de conformation de l'enzyme suite à la fixation du substrat, ont amené à proposer un **modèle d'ajustement induit**. La figure ci-dessous présente l'exemple de l'hexokinase. Lorsque le substrat (le glucose) se fixe sur le site actif, les 2 « branches » de part et d'autre de la cavité se rapprochent. C'est donc la formation de liaisons faibles avec le substrat qui modifie les liaisons faibles responsables de la structure tertiaire de l'enzyme aboutissant alors à ce changement de conformation. La complémentarité entre substrat et site actif n'est donc pas parfaite avant la formation du complexe ES. C'est le changement de conformation induit par le substrat qui permet une complémentarité optimale : il y a donc eu **ajustement induit par la fixation du substrat**.



Modèle d'ajustement induit.

(a) Ce modèle montre une complémentarité optimale entre le site actif et l'état de transition ; (b) exemple de l'hexokinase (une seule des 2 sous-unités est représentée).

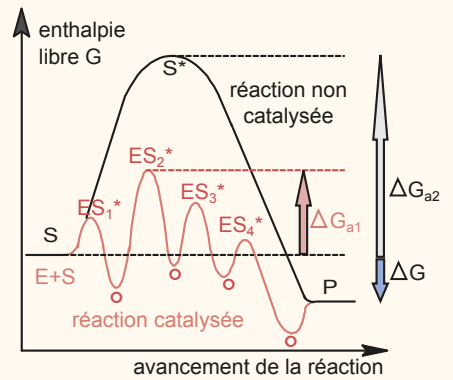
ZOOM 2

Énergie d'activation et cinétique d'une réaction

La figure ci-contre présente l'évolution de l'enthalpie libre au cours d'une réaction exergonique en absence et en présence d'une enzyme.

La réaction étant exergonique, le ΔG total de la réaction est négatif : la réaction est donc spontanée. Cependant, la réaction passe par un état de transition (S^*) à enthalpie libre élevée : il y a donc une grande **barrière énergétique** à franchir (ΔG_{a2}) nécessitant une grande **énergie d'activation**. L'énergie d'activation provient de l'agitation moléculaire : plus la température est élevée, plus les chocs entre molécules permettent de « franchir » des barrières énergétiques importantes : c'est la **loi d'Arrhénius**. En absence d'enzyme et à des températures biologiques ($< 40\text{ }^\circ\text{C}$), l'agitation moléculaire est insuffisante pour franchir la barrière énergétique (ΔG_{a2}) : la vitesse de la réaction est donc presque nulle bien que la réaction soit spontanée.

La présence de l'enzyme fait passer la réaction par différents états de transition (ES_x) : chaque barrière énergétique pour atteindre ces états de transition est réduite. L'agitation moléculaire liée à la température suffit dans ce cas à passer ces barrières énergétiques et la réaction se déroule alors rapidement. C'est donc en réduisant l'énergie d'activation que les enzymes augmentent la vitesse des réactions.



ES_x^* : états de transition \circ : intermédiaires

Profil de l'évolution de l'enthalpie libre au cours d'une réaction, catalysée (en rouge) ou non (en noir) par une enzyme.

DÉCOUVERTE 1

Inhibiteurs enzymatiques utilisés en pharmacologie

Certains médicaments visent à modifier l'activité cellulaire : leur mécanisme d'action peut alors passer par l'activation ou l'inhibition de certaines enzymes.

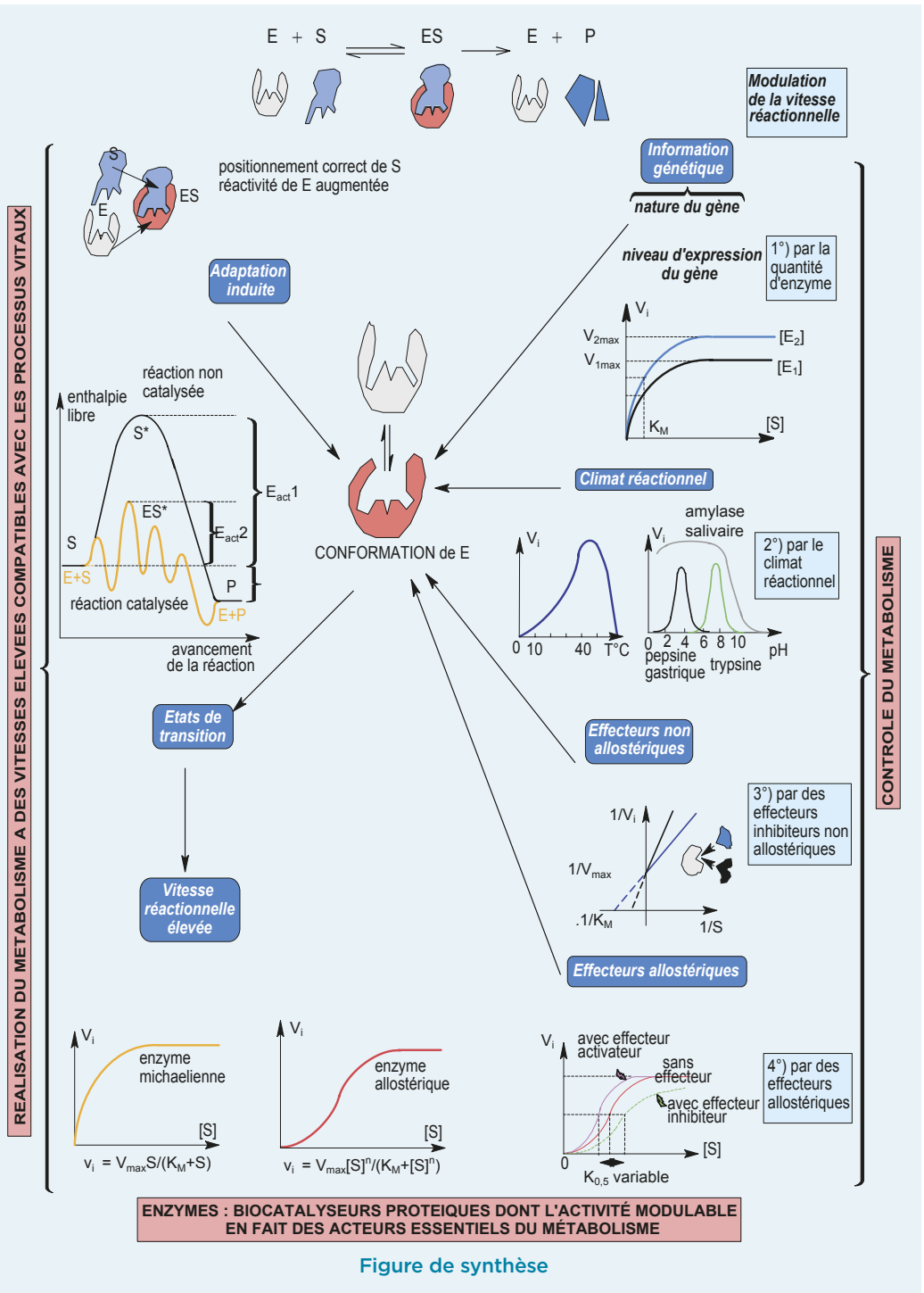
- **Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) : traitement de l'hypertension artérielle**
Plusieurs médicaments très largement utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle (lisinopril, énalapril...) sont des IEC. Ils inhibent l'**enzyme de conversion de l'angiotensine** (ECA) qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II. Cette angiotensine II a un effet vasoconstricteur (diminution du diamètre des artéioles) et un effet anti-diurétique (diminution du volume d'urine produite) : elle provoque ainsi une augmentation de la pression artérielle. Les IEC présentent des similitudes structurales avec l'angiotensine I : ils agissent donc comme des **inhibiteurs compétitifs** de l'ECA et réduisent ainsi la formation d'angiotensine II. Il en résulte une moindre vasoconstriction et une plus grande production d'urine, ce qui permet donc de réduire la pression artérielle du patient.

- **Les statines : traitement anti-cholestérol**

Les statines sont une famille de médicaments fortement utilisés dans le monde pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Ce sont des **inhibiteurs compétitifs** d'une enzyme clé de la synthèse de cholestérol (la HMG-CoA réductase). Leur action aboutit à une diminution du taux de cholestérol sanguin, ce qui réduit alors les risques d'accident vasculaire cérébral (AVC).

Voir ouvrage de
2^e année

Réviser



Résumé

La nature protéique des enzymes leur confère plusieurs particularités par rapport à un catalyseur chimique. Les enzymes sont **saturables** car la catalyse passe par la formation d'un complexe enzyme-substrat. Elles montrent une **spécificité de substrat et de réaction** liées à la géométrie tridimensionnelle du site actif et des radicaux d'acides aminés qui le bordent. Elles sont **dénaturables** et **contrôlables** car un changement de la structure tertiaire de l'enzyme, stabilisée par des liaisons faibles, peut modifier la conformation du site actif. Par ailleurs, la spécialisation d'un compartiment et, à plus grande échelle, d'une cellule (et donc d'un organe) dépend de son équipement enzymatique.

Attention

- Savoir tracer la cinétique d'une enzyme ($V_i = f([S]_0)$) et en déduire s'il s'agit d'une enzyme michaelienne (allure hyperbolique) ou d'une enzyme allostérique (allure sigmoïde).
- Pour déterminer les paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne (V_{\max} et K_M), il est préférable d'utiliser la linéarisation en double-inverse.
- Les enzymes-clés, au niveau des points de contrôle d'une voie métabolique, sont en général des enzymes allostériques, ce qui permet un contrôle très fin.
- Les enzymes sont des protéines : pensez à utiliser des exemples d'enzymes dans des sujets de colle sur les protéines (par exemple, pour montrer le lien entre conformation et fonction d'une protéine ou pour montrer l'importance fonctionnelle des changements de conformation).
- Une enzyme n'agit que sur la cinétique : elle accélère une réaction mais elle ne modifie pas l'équilibre de la réaction, qui lui dépend de la thermodynamique (ΔrG).

S'entraîner

QCM de connaissances

- 1 La spécificité de substrat d'une enzyme :
 - a. Signifie qu'elle ne peut catalyser qu'une seule réaction.
 - b. Découle d'une complémentarité spatiale et chimique entre enzyme et substrat.
 - c. Est liée à la conformation du site actif.
 - d. Peut être supprimée par un inhibiteur compétitif.
- 2 Un changement de conformation d'une enzyme :
 - a. Ne peut pas être la conséquence de la fixation du substrat.
 - b. Peut être la conséquence de la fixation d'un ligand sur le site actif ou sur un site régulateur.
 - c. Est en général lié à un changement de la structure primaire de l'enzyme.
 - d. Peut permettre de contrôler l'activité d'une enzyme.
- 3 Un effecteur allostérique :
 - a. Modifie l'équilibre entre forme R et forme T d'une enzyme allostérique.
 - b. Peut permettre d'inhiber une enzyme michaelienne.
 - c. Peut entrer en compétition avec le substrat pour l'accès au site actif.
 - d. Peut être soit un activateur (quand il favorise la forme R) soit un inhibiteur (quand il favorise la forme T).

- 4 Le K_M , constante de Michaelis :
- a. Est d'autant plus grand que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est petite.
 - b. Est d'autant plus grand que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est grande.
 - c. Correspond à la quantité d'enzyme pour laquelle la vitesse initiale = $V_{\max}/2$.
 - d. Correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale = $V_{\max}/2$.

QCM à partir de documents

(D'après sujet biologie G2E 2006)

L'hexokinase et la glucokinase catalysent la même réaction (phosphorylation du glucose en glucose-6-P) : ce sont des isoenzymes. Du fait de la différenciation cellulaire, les cellules du foie expriment majoritairement le gène de la glucokinase, tandis que les autres cellules de l'organisme (notamment les cellules musculaires) expriment uniquement celui de l'hexokinase. Cette dernière, contrairement à la glucokinase, est inhibée par le glucose-6-P.

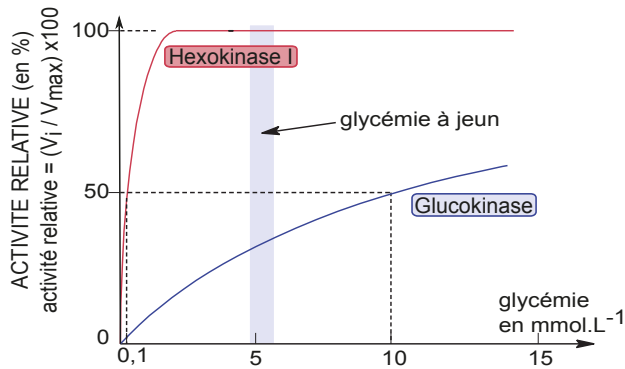


Figure 12.12 Cinétiques de deux isoenzymes, l'hexokinase I et la glucokinase.

- 1 Parmi les affirmations ci-dessous, lesquelles sont exactes :
- a. Le K_M de la glucokinase est de 10 mmol.L^{-1}
 - b. L'affinité de la glucokinase pour le glucose est supérieure à celle de l'hexokinase
 - c. À jeun, les 2 enzymes sont à saturation.
- 2 L'absorption du glucose par une cellule est proportionnelle au gradient de concentration de glucose entre cytosol et milieu extracellulaire. La phosphorylation du glucose dans le cytosol permet de maintenir un gradient élevé. Dans une cellule musculaire :
- a. En activité, la forte activité de l'hexokinase permet une absorption maximale de glucose.
 - b. Au repos, l'activité de l'hexokinase est maximale et permet le stockage de glucose.
 - c. L'hexokinase est inhibée par le glucose-6-P quelle que soit l'activité de la cellule.
- 3 Au cours de la digestion, la glycémie peut atteindre $12 \text{ à } 15 \text{ mmol.L}^{-1}$ dans la veine porte-hépatique qui conduit le sang de l'intestin au foie. Dans une cellule du foie :
- a. L'absorption du glucose est maximale quelle que soit la situation physiologique.
 - b. À jeun, le glucose est peu phosphorylé du fait de la faible affinité de la glucokinase pour le glucose.
 - c. Après un repas, le stockage du glucose est favorisé par le fait que la glucokinase n'est pas inhibée par le glucose-6-P.

Question de synthèse courte

Relation entre nature moléculaire et fonction des enzymes protéiques.

Caractérisation d'une enzyme

Activités pratiques

PLAN DU CHAPITRE

- 1 Cinétique de la peroxydase : étude de l'efficacité d'une enzyme
- 2 Effet des inhibiteurs compétitifs et non compétitifs

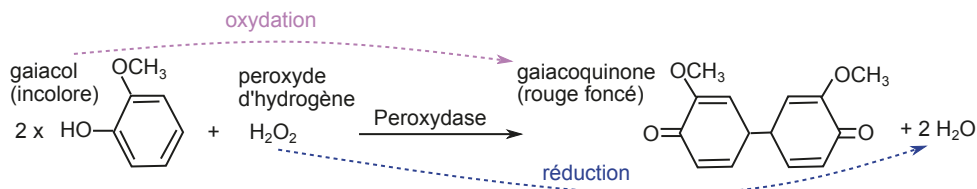
INTRODUCTION

En tant que catalyseur protéique spécifique, une enzyme accélère une réaction donnée. Voir chapitre 12. Grâce à un suivi de la vitesse de réaction, on cherchera ici à évaluer l'efficacité d'une enzyme michaelienne, la peroxydase, en déterminant ses paramètres cinétiques (V_{\max} et K_M). On montrera aussi comment reconnaître expérimentalement un inhibiteur compétitif ou non compétitif.

1 Cinétique de la peroxydase : étude de l'efficacité d'une enzyme

1.1 Suivi de la réaction par spectrophotométrie

La peroxydase catalyse l'oxydation de différents réactifs par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elle permet d'éliminer des cellules les peroxydes, molécules toxiques formées lors d'un stress oxydatif. Dans ce TP, on a choisi de travailler sur l'oxydation du gaïacol car elle aboutit à la formation d'un produit coloré, la gaïaquinone, quantifiable par colorimétrie.



On peut suivre l'apparition du produit coloré grâce à un spectrophotomètre qui mesure l'absorbance de la solution à 470 nm. La **loi de Beer-Lambert** permet alors de calculer la concentration du produit :

$$A_{470} = \epsilon_{470} \cdot L \cdot C$$

avec A_{470} l'absorbance à 470 nm (sans unité) ; ϵ_{470} le coefficient d'extinction moléculaire de la gaïaquinone ($2,66 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) ; L la longueur de la cuve du spectrophotomètre (1 cm ici) ; C la concentration de la gaïaquinone ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

1.2 Tracé de la courbe $V_i = f([S]_0)$

a) Protocole expérimental

On cherche à mesurer la vitesse de la réaction (en $\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$), c'est-à-dire la vitesse de disparition du substrat ($-\text{dS}/\text{dt}$) ou la vitesse d'apparition du produit (dP/dt). Or cette vitesse dépend de la concentration en enzyme et en substrat. On fixe ici la concentration totale en peroxydase ($[E_T] = 5,8 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol.L}^{-1}$). Les substrats étant consommés au cours de la réaction, la vitesse de la réaction diminue au cours du temps. On mesure la vitesse initiale (V_i) au moment où l'on injecte l'enzyme dans une solution avec une concentration initiale en substrat ($[S]_0$) connue. Pour cela, on trace, sur le graphe de suivi du produit, la tangente à l'origine dont la pente correspond à la variation initiale d'absorbance, ΔA_i , en s^{-1} (figure TP8.1). On obtient ensuite V_i en $\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ grâce à la loi de Beer-Lambert.

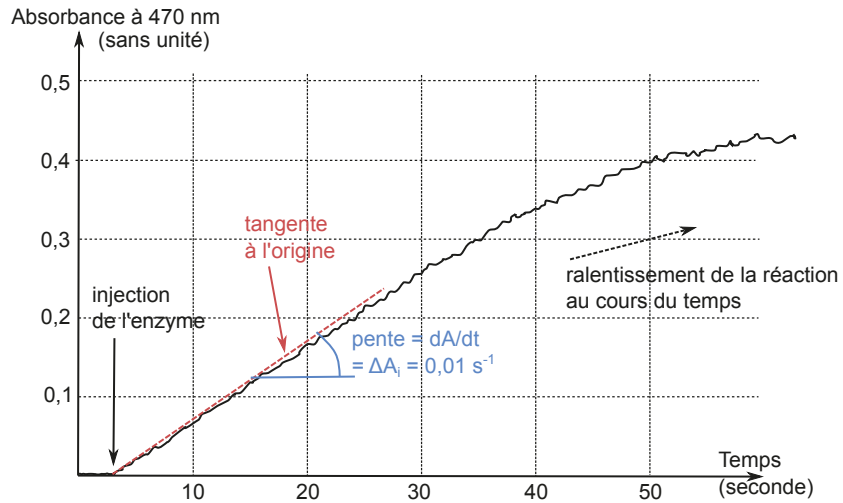


Figure TP8.1 Suivi de la formation du produit (gaïaquinone) pour $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 33,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Grâce à la loi de Beer-Lambert ($\Delta C = \Delta A / \epsilon_{470} \cdot L$), on déduit de cet enregistrement que $V_i = 0,38 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

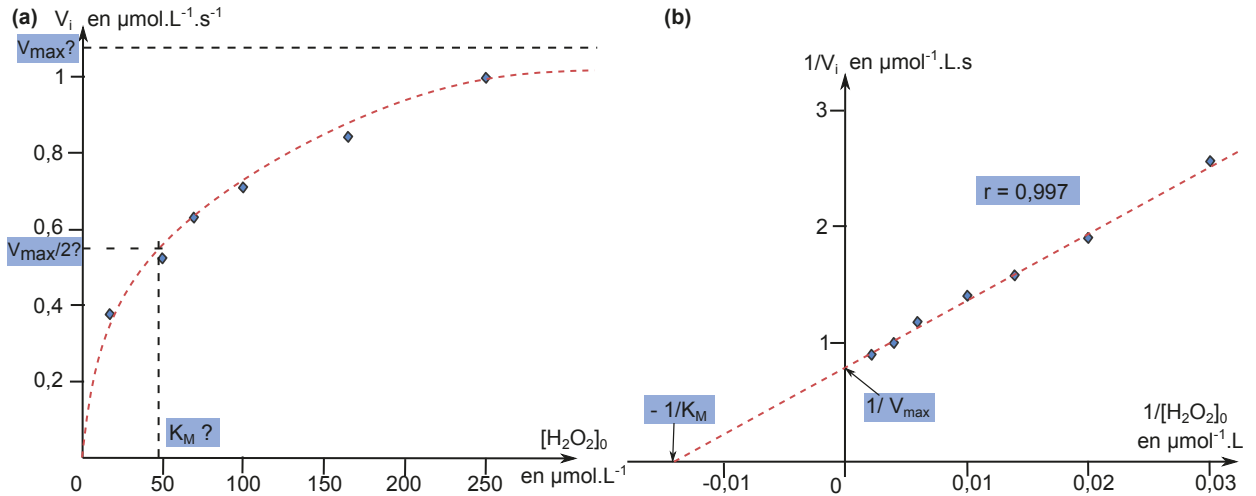
On cherche à déterminer la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat, c'est-à-dire à construire la courbe : $V_i = f([S]_0)$. Ici, on fixe à 1 g.L^{-1} la concentration du premier substrat, le gaïacol (largement en excès) et on fait varier la concentration initiale du deuxième substrat, le peroxyde d'hydrogène ($[\text{H}_2\text{O}_2]_0$). Pour chaque $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ testée, on trace le graphe de formation du produit (figure TP8.1) et on calcule V_i : on obtient ainsi un point de la courbe $V_i = f([S]_0)$. Les résultats des 6 concentrations testées sont donnés dans le tableau TP8.1.

b) Résultats

Tableau TP8.1 Mesures de V_i en fonction de la concentration initiale en H_2O_2 .

Concentration initiale en H_2O_2 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	33,3	50	71,4	100	166,7	250
V_i en $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$	0,38	0,53	0,62	0,71	0,83	1,0

À partir des résultats obtenus, on peut tracer la courbe $V_i = f([S]_0)$ (figure TP8.2a) : la vitesse initiale augmente avec la concentration en substrat, et tend vers une vitesse maximale (notée V_{max}) pour de fortes concentrations en substrat.


Figure TP8.2 Cinétique de la peroxydase.

(a) Représentation $V_i = f([S]_0)$; (b) représentation en double-inverse.
 Les tracés en pointillés rouges correspondent au modèle de Michaelis-Menten.

1.3 Modélisation et détermination des constantes

a) Modèle de Michaélis-Menten

Dans le modèle de Michaelis et Menten, proposé en 1913, la vitesse initiale est donnée par :

$$V_i = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad \text{eq. TP8.1}$$

Cette équation (dite de Michaelis-Menten) est celle d'une hyperbole telle que tracée sur la [figure TP8.2a](#).

V_{\max} (en $\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$) désigne la vitesse maximale que peut atteindre la réaction, pour cette concentration en enzyme ($[E_p] = 5,8.10^{-4} \mu\text{mol.L}^{-1}$) : elle correspond à l'asymptote de la courbe $V_i = f([S]_0)$. Le K_M (en mol.L^{-1}) correspond à la concentration en substrat pour laquelle $V_i = V_{\max}/2$. Il est inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

b) Linéarisation et tracé en double-inverse (Lineweaver-Burk)

Le tracé hyperbolique ne permettant pas une détermination précise des paramètres cinétiques (V_{\max} et K_M), on linéarise l'équation de Michaelis-Menten (eq. TP8.1) en exprimant $1/V_i$:

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad \text{eq. TP8.2}$$

Cette équation est celle d'une droite ($y = b + a.x$). La représentation en double-inverse (ou représentation de Lineweaver-Burk) permet alors de réaliser une régression linéaire (droite rouge sur la [figure TP8.2](#)). Cette représentation permet de tester si la réaction enzymatique suit le modèle de Michaelis-Menten. Ici, le r (coefficient de corrélation de la régression) proche de 1 permet d'affirmer que la peroxydase est une enzyme michaélienne. Cette droite de régression permet aussi de déterminer précisément les paramètres cinétiques de l'enzyme :

- elle coupe l'axe des ordonnées ($1/[S]_0 = 0$) au point $1/V_i = 1/V_{\max}$;
- elle coupe l'axe des abscisses ($1/V_i = 0$) au point $1/[S]_0 = -1/K_M$;

Voir chapitre 12, § 1.3

À partir de la lecture de la [figure TP8.2b](#), on peut en déduire :

$$\begin{aligned} 1/V_{\max} &\approx 0,8 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s} &\Rightarrow & V_{\max} \approx 1,25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \\ -1/K_M &\approx -0,014 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} &\Rightarrow & K_M \approx 71 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \end{aligned}$$

c) Efficacité catalytique

La V_{\max} est une mesure relative puisqu'elle dépend de la concentration totale en enzyme. Elle ne permet donc pas de comparer l'efficacité de 2 enzymes, au contraire de la **constante catalytique**, k_{cat} , qui est une valeur intrinsèque à l'enzyme. Cette constante est définie par :

$$k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E_T]$$

On vient de déterminer V_{\max} ($1,25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ molécules de gâicol oxydées) et on a fixé la concentration totale en enzyme, $[E_T]$, à $5,8 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. On peut ainsi calculer la constante catalytique de la peroxydase : $k_{\text{cat}} \approx 2150 \text{ s}^{-1}$. Cette constante catalytique a la dimension d'une fréquence (en s^{-1}) : elle mesure le **nombre de molécules de substrat transformées par une molécule d'enzyme en une seconde**, dans les conditions de saturation. Chaque molécule de peroxydase oxyde ainsi 2150 molécules de gâicol chaque seconde, soit 1075 molécules de peroxyde d'hydrogène transformées chaque seconde. La constante catalytique est très différente selon les enzymes, de 0,5 liaison osidique hydrolysée par seconde et par enzyme pour le lysozyme à 1 million de molécules de CO_2 transformées par seconde et par enzyme pour l'anhydrase carbonique. La peroxydase présente donc une constante catalytique intermédiaire.

On peut aussi mesurer l'**efficacité catalytique** d'une enzyme avec le rapport k_{cat}/K_M qui prend en compte à la fois l'affinité de l'enzyme pour le substrat ($1/K_M$) et l'efficacité de la réaction catalytique (k_{cat}). Le rapport k_{cat}/K_M ($1,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans le cas de la peroxydase et du peroxyde d'hydrogène) permet donc d'évaluer l'efficacité d'une enzyme pour une faible concentration en substrat.

Remarque

Selon les auteurs, les termes utilisés pour désigner les paramètres k_{cat} et k_{cat}/K_M peuvent varier.

2

Effet des inhibiteurs compétitifs et non compétitifs

L'activité des enzymes est contrôlable, notamment par des inhibiteurs capables de se fixer de façon réversible sur l'enzyme. On étudie ici des inhibiteurs d'une enzyme michaelienne, l'ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine I). L'ECA est une peptidase qui clive l'angiotensine I en angiotensine II, vasoconstricteur responsable d'une augmentation de pression artérielle. Différents médicaments contre l'hypertension artérielle sont des inhibiteurs de l'ECA.

On étudie ici expérimentalement l'effet de 2 inhibiteurs de l'ECA : le PT (un peptide de 21 acides aminés) et l'AEO (un oligosaccharide). On mesure les vitesses initiales (V_i) pour différentes concentrations initiales en substrat ($[S]_0$), en absence et en présence de chacun des 2 inhibiteurs. La [figure TP8.3](#) donne les résultats en représentation double-inverse.

On constate qu'en présence du AEO, la V_{\max} n'est pas modifiée tandis que le **K_M est augmenté** (diminution de $1/K_M$). On en déduit que l'inhibiteur diminue l'affinité de l'enzyme pour le substrat, c'est-à-dire qu'il perturbe la formation du complexe ES. On peut alors proposer que l'inhibiteur soit un analogue structural du substrat, capable de se fixer réversiblement au site actif à la place du substrat (interprétation moléculaire sur la [figure TP8.4a](#)) : c'est donc une **inhibition compétitive**. Quand la concentration en substrat est largement supérieure à celle en inhibiteur, les enzymes sont toutes liées à une molécule de substrat : ceci est cohérent avec l'invariance constatée de V_{\max} .

Voir chapitre 12, § 3.3

Voir chapitre 12,
Découverte 1

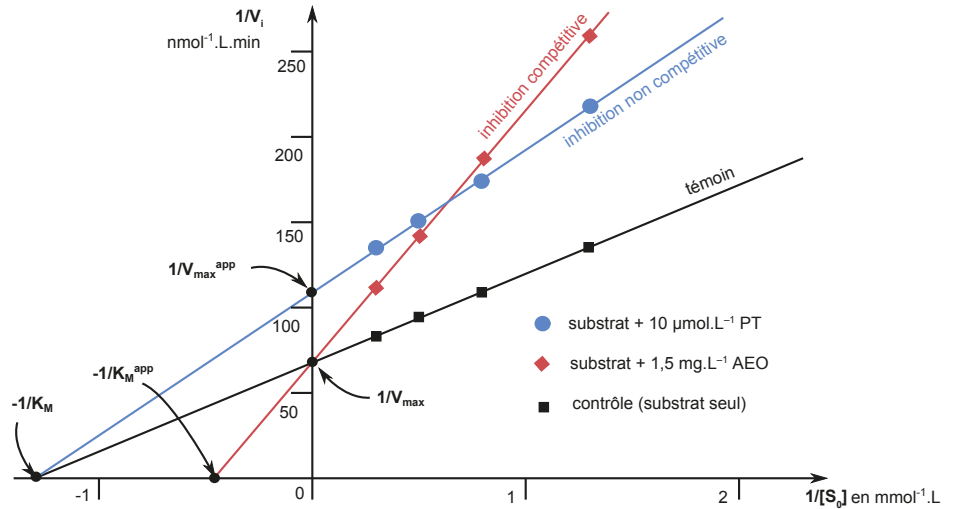


Figure TP8.3 Effets de 2 inhibiteurs (PT et AEO) sur la cinétique de l'ECA.

K_M^{app} désigne le K_M apparent en présence de l'inhibiteur, V_{max}^{app} , la V_{max} apparente.

On constate qu'en présence du PT, le K_M n'est pas modifié tandis que la V_{max} est diminuée (augmentation de $1/V_{max}$). On en déduit que l'inhibiteur ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour son substrat : il ne se fixe donc pas sur le site actif. La diminution de V_{max} signifie que moins de molécules d'enzymes sont actives. On peut alors proposer que la fixation de l'inhibiteur sur un site autre que le site actif provoque un changement de conformation inactivant l'enzyme (interprétation moléculaire sur la figure TP8.4b) : c'est donc une **inhibition non compétitive**.

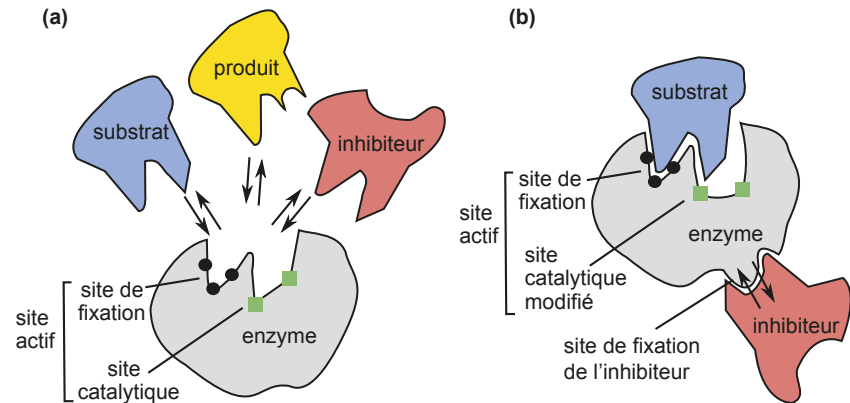


Figure TP8.4 Interprétations moléculaires des inhibitions réversibles compétitive (a) et non compétitive (b).

Cercles noirs et carrés verts représentent les radicaux essentiels du site actif.

! Attention !

- Dans les exercices d'enzymologie, la représentation en double inverse permet de déterminer :
 - si une enzyme est ou non michaélienne (régression linéaire) ;
 - la V_{max} et le K_M de l'enzyme (croisement de la droite de régression avec les axes) ;
 - si une molécule est un inhibiteur compétitif (modification du K_M) ou non compétitif (modification de la V_{max}).

S'entraîner

QCM à partir de documents

L'hexokinase est une enzyme michaélienne catalysant la phosphorylation d'hexoses (glucose ou fructose) grâce à l'ATP. Les K_M respectifs de ces 2 substrats sont : 0,14 mmol.L⁻¹ pour le glucose et 1,4 mmol.L⁻¹ pour le fructose ; la V_{max} est considérée identique pour ces deux substrats. En présence du glucose-6P, le K_M reste inchangé, tandis que la V_{max} diminue.

- 1 Parmi les affirmations suivantes, lesquelles sont justes :
 - a. L'hexokinase présente une spécificité de substrat absolue.
 - b. L'hexokinase a une plus grande affinité pour le fructose.
 - c. Le glucose-6P est un inhibiteur non compétitif de l'hexokinase.
 - d. Le glucose est le substrat préférentiel de l'hexokinase.
- 2 La vitesse initiale de la réaction est égale ou proche de :
 - a. $V_{max}/2$ pour $[\text{fructose}]_0 = 1,4 \text{ mmol.L}^{-1}$.
 - b. $0,9.V_{max}$ pour $[\text{glucose}]_0 = 14 \text{ mmol.L}^{-1}$.
 - c. $0,09.V_{max}$ pour $[\text{fructose}]_0 = 0,14 \text{ mmol.L}^{-1}$.
 - d. $0,9.V_{max}$ pour $[\text{glucose}]_0 = 1,4 \text{ mmol.L}^{-1}$.
 - e. $0,99.V_{max}$ pour $[\text{fructose}]_0 = 14 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Sujet sur documents (analyse et mise en relation)

(D'après sujet biologie G2E 2006)

Il existe différentes formes d'hexokinases (appelées isoenzymes). Certaines sont présentes dans le tissu hépatique (glucokinase, hexokinase II notée HKII ici) ou dans le muscle squelettique (hexokinase I notée HKI ici). On cherche à déterminer les paramètres cinétiques (V_{max} et K_M) de deux de ces isoenzymes. À cette fin, on détermine les vitesses initiales de réaction de ces deux enzymes pour différentes concentrations en glucose. Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous.

[glucose] ₀ (mM)		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	2,0	3,0
V_i (mmol.min ⁻¹)	HK I	5,0	6,7	7,5	8,0	8,3	8,6	8,7	8,9	9	9,1	9,5	9,7
	HK II	0,2	0,4	0,6	0,7	0,9	1,1	1,2	1,4	1,5	1,7	2,9	3,7

- 1 Quel type de cinétique ont les enzymes étudiées ? Justifiez votre réponse et déterminez les paramètres cinétiques de ces deux enzymes ?
- 2 Mettez en relation les résultats obtenus avec la physiologie. Vous réfléchirez par exemple à la manière dont ces enzymes se comportent à faible ou forte concentration et vous relierez ces observations au cas du muscle ou du foie (on rappelle que la glycémie à jeun est autour de 5,5 mM).

L'activité d'une hexokinase de cerveau de rat a été étudiée en présence de concentrations variables en ATP et en glucose 1,6-bis-phosphate.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

[ATP] (mM)	v_0	v_{100}	v_{167}
0,357	4	3	2,6
0,714	5,78	4,65	4
1,430	7,14	6,25	5,5
2,860	8,33	7,70	7,14

Les vitesses (en $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$) sont données pour les concentrations en glucose 1,6-bis-phosphate suivantes :

- v_0 : [glucose 1,6-bis-phosphate]₀ = 0 μM
- v_{100} : [glucose 1,6-bis-phosphate]₀ = 100 μM
- v_{167} : [glucose 1,6-bis-phosphate]₀ = 167 μM

- 3 Représentez graphiquement ces résultats.
- 4 Déduisez des nouveaux paramètres cinétiques, l'action du glucose 1,6-bis-phosphate sur l'hexokinase de cerveau de rat.

! Attention !

Ne pas oublier les unités dans les réponses sur les paramètres cinétiques V_{max} et K_M .