

**CORRECTION TD ENZYMOLOGIE**

**SÉANCE 1 :**

**1. Définissez « enzyme »**

Une enzyme est un **catalyseur biologique** de nature **protidique**. C'est-à-dire une protéine qui permet **d'augmenter la vitesse d'une réaction chimique**, qui serait possible sans elle, mais qui se ferait alors à une vitesse faible, incompatible avec les exigences des phénomènes vivants. Les réactions catalysées sont  **$10^3$  à  $10^7$  fois plus rapides** qu'elles ne le seraient sans l'enzyme.

Une enzyme se retrouve non modifiée à la fin de la réaction, elle ne fait donc pas partie du bilan réactionnel. De plus, se retrouvant **intacte** en fin de réaction, elle est alors disponible pour catalyser une nouvelle réaction, ce qui explique qu'elle soit **active à faible concentration**.

**2. Comment nomme-t-on les réactifs d'une réaction enzymatique ?**

Les substrats.

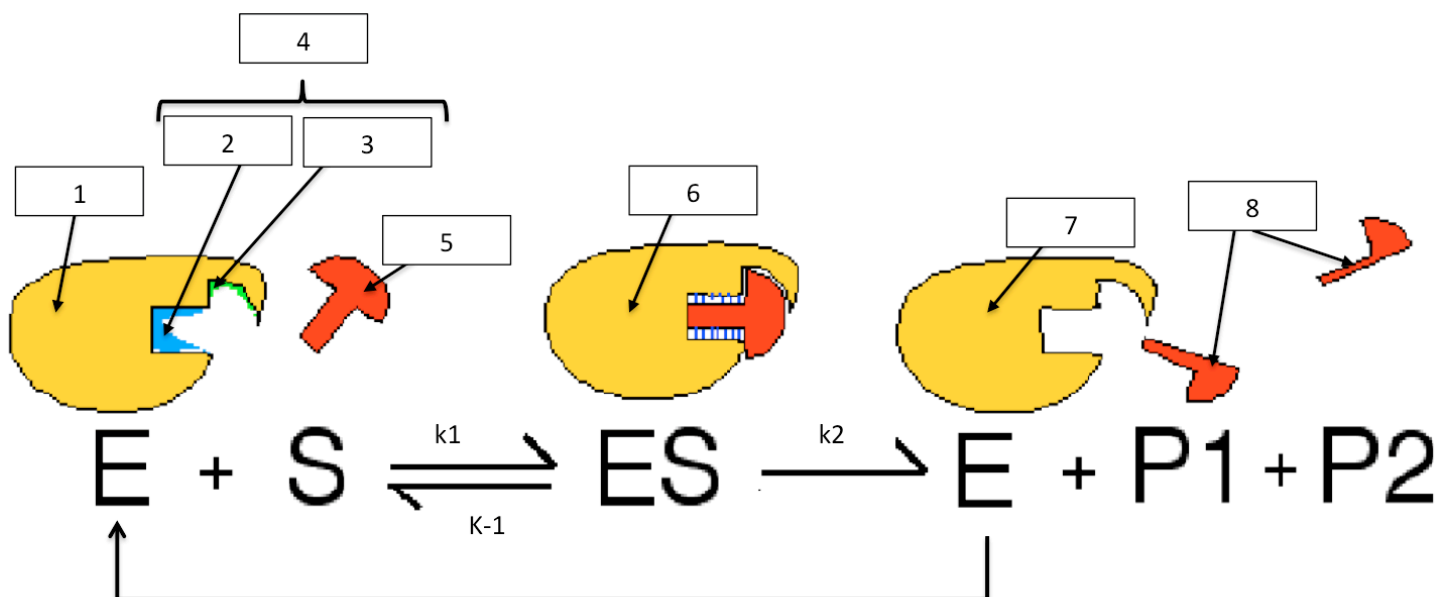
**3. Comment nomme-t-on les composés résultant de la réaction enzymatique ?**

Les produits.

**4. Comment nomme-t-on l'action de l'enzyme ?**

La catalyse enzymatique.

**5. Titrez et légendez la figure suivante. Puis, décrivez la structure n°4. Enfin, décrivez les différentes étapes de la réaction illustrée.**



**Titre : Les différentes étapes de la réaction enzymatique.**

- 1 : enzyme
- 2 : site catalytique
- 3 : site de reconnaissance
- 4 : site actif
- 5 : substrat
- 6 : complexe enzyme-substrat
- 7 : enzyme intacte
- 8 : produits.

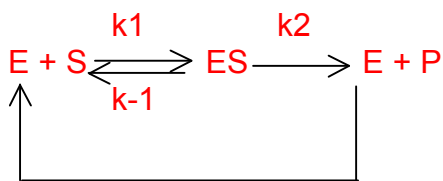
La structure n°4 est le **site actif** de l'enzyme, région précise de l'enzyme où son substrat vient se fixer, est reconnu et catalysé. Celui-ci correspond à un repliement spatial de la protéine montrant une **complémentarité spatiale avec le substrat**. Ce site actif est constitué :

- D'un **site de fixation ou site de reconnaissance**, fixant le substrat. Les groupements entre substrat et enzyme établissent des **liaisons faibles** (Liaison hydrogènes, hydrophobes et ioniques) maintenant un **contact étroit**. Il n'y a **pas de gêne stérique** : le **substrat** est parfaitement **complémentaire** d'un point de vue spatial au site actif de l'enzyme (comme une clé et sa serrure). **La fixation du substrat à ce site va induire un léger changement de conformation du site actif qui devient apte à catalyser la réaction**. Cette reconnaissance dynamique est nommée **adaptation induite**.
- D'un **site catalytique**, n'exécutant qu'un seul type de transformation du substrat en produit.

La réaction enzymatique peut se diviser en **3 étapes** :

1. La **formation du complexe ES** : L'enzyme (E) et le substrat (S) s'associent.
2. Le complexe ES subit un **réarrangement interne** qui va permettre la transformation du substrat en produit (P) => **adaptation induite**.
3. L'enzyme libère le **produit**, et retrouve son état initial (et, peut donc repartir dans une nouvelle réaction enzymatique).

L'équation de cette réaction est :



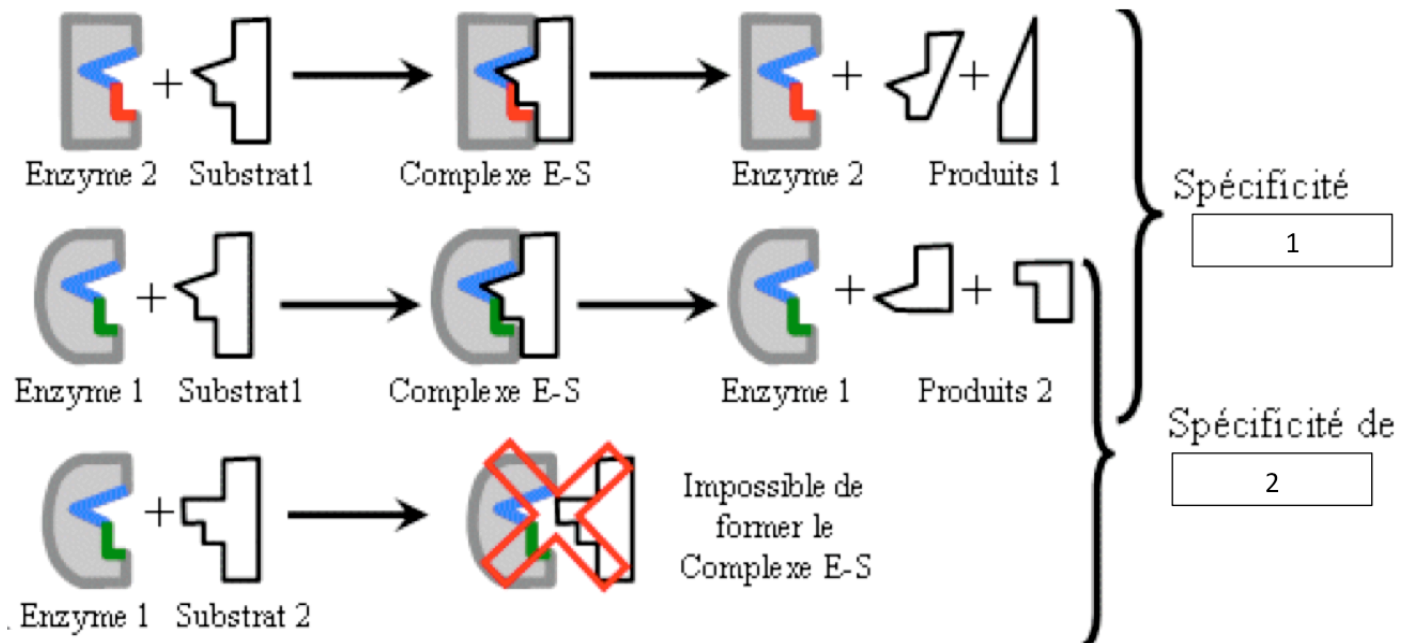
avec  $k$  = constante de vitesse.

$k1$  = constante de vitesse de formation du complexe ES

$k-1$  = constante de vitesse de dissociation du complexe ES

$k2$  = constante de vitesse de formation de P = « Turn over » = nombre de cycles catalytiques par seconde.

6. Après avoir titré et légendé la figure suivante, expliquez ce qu'elle présente.



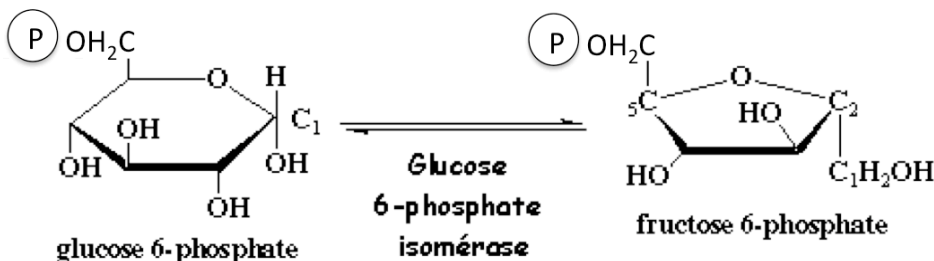
Titre : la double spécificité enzymatique

1 : d'action

2 : de substrat.

La **double spécificité enzymatique** découle en fait de la **constitution du site actif**. Cette fixation, au niveau du site de reconnaissance, est basée sur une **stricte complémentarité tridimensionnelle entre l'enzyme et son substrat**. De ce fait, il existe une spécificité de l'enzyme pour son substrat ; on parle de **spécificité de substrat**. D'autre part, le site catalytique d'une enzyme ne catalyse qu'un seul type de réaction. Il s'agit ici d'une **spécificité d'action**.

7. À partir de la figure suivante, expliquez la nomenclature sur le nom d'une enzyme.



Le **nom de la plupart des enzymes** est basé sur sa **double spécificité**. Il est construit sur le modèle suivant :

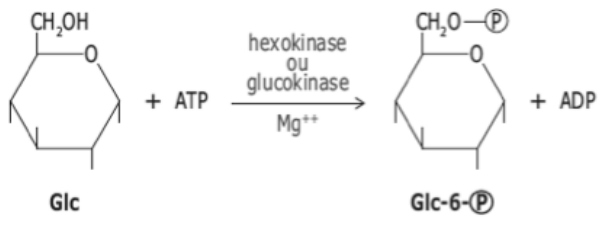
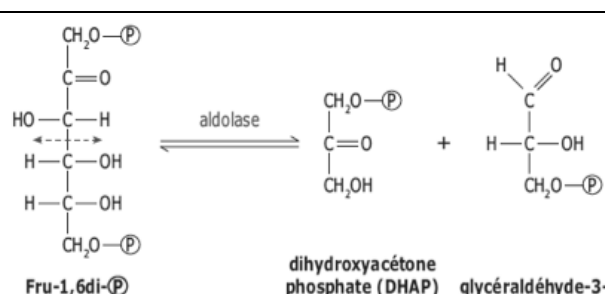
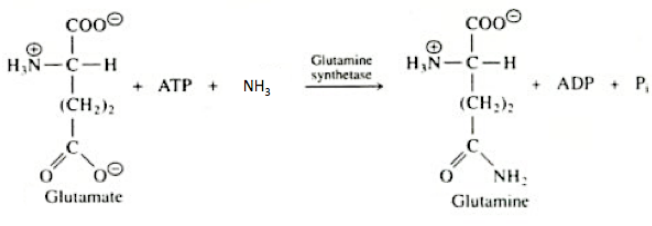
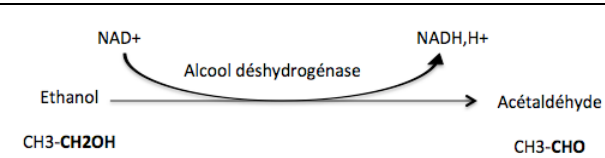
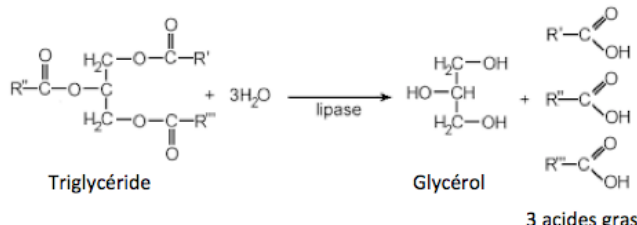
**Nom du substrat-----Type de réaction-----ase**

Ex : Glc-6-P -----isomér-----ase

Glc-6-P isomérase

Certaines enzymes sont néanmoins désignées par leur **nom usuel**, comme par exemple la pepsine, une endo-peptidase digestive qui hydrolyse les liaisons peptidiques des protéines.

**8. Complétez le tableau suivant présentant la nomenclature EC basée sur la spécificité d'action des enzymes.**

Réaction catalysée :	Description :	Exemple :	Spécificité d'action :	Classe de l'enzyme (EC)
$A-X + B - > A + B-X$	Transfert d'un atome ou d'un groupement d'atomes.	 <p style="text-align: center;">Glc + ATP <math>\xrightarrow[\text{Mg}^{++}]{\text{hexokinase ou glucokinase}}</math> Glc-6-P + ADP</p>	Transférases	2
$A-B \rightarrow A + B$	Réaction lytique (de dégradation, de rupture d'une liaison covalente) non hydrolytique (sans H <sub>2</sub> O) et non oxydante (sans oxydoréduction).	 <p style="text-align: center;">Fru-1,6di-P <math>\xrightleftharpoons{\text{aldolase}}</math> dihydroxyacétone phosphate (DHAP) + glycéraldéhyde-3-P</p>	Lyases	4
$A + B \rightarrow A-B$	Condensation, ie formation d'une liaison covalente. Cette réaction nécessite de l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP.	 <p style="text-align: center;">Glutamate + ATP + NH<sub>3</sub> <math>\xrightarrow{\text{Glutamine synthetase}}</math> Glutamine + ADP + P<sub>i</sub></p>	Ligases	6
$A^- + B^- \rightarrow A + B^-$	Oxydoréduction, ie transferts d'électrons (e-) et de protons (H+)	 <p style="text-align: center;">Ethanol <math>\xrightarrow{\text{Alcool déshydrogénase}}</math> Acétaldéhyde CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>OH <math>\rightarrow</math> CH<sub>3</sub>-CHO</p>	Oxydoréductases	1
$A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$	Hydrolyse, ie, clivage, rupture d'une liaison covalente. Cette réaction nécessite la présence de l'eau dans les substrats.	 <p style="text-align: center;">Triglycéride + 3H<sub>2</sub>O <math>\xrightarrow{\text{lipase}}</math> Glycérol + 3 acides gras</p>	Hydrolases	3

<p>A -&gt; B, isomère de A</p>	<p>Réaction d'isomérisation, des remaniements intramoléculaires.</p>	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2\text{OH} \\    \\  \text{C}=\text{O} \\    \\  \text{CH}_2\text{OPO}_3^{2-} \\  \text{Dihydroxyacetone} \\  \text{phosphate}  \end{array}  \xrightleftharpoons[\text{isomérase}]{\text{Triose phosphate}}  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{C}=\text{O} \\    \\  \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\    \\  \text{CH}_2\text{OPO}_3^{2-} \\  \text{Glyceraldehyde} \\  \text{3-phosphate}  \end{array}  $	<p>isomérase</p>	<p>5</p>
----------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------	----------

**SÉANCE 2 :**

9. Qu'est-ce qu'une cinétique enzymatique ?

La cinétique enzymatique **traduit l'activité d'une enzyme.**

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes de la réaction enzymatique, en **étudiant leur vitesse c'est-à-dire leur évolution en fonction du temps.**

Elle permet de **décrire quantitativement les propriétés catalytiques des enzymes et les mécanismes mis en place pour leur régulation.**

10. Lorsqu'on effectue une cinétique enzymatique, que signifie « se placer en concentration de substrats **saturante**, condition **non limitante** » ?

C'est-à-dire que le **substrat est en excès**. Sa concentration **ne limitera pas la réaction enzymatique**. Autrement dit, **[S] >> [E]**.

11. Lorsqu'on effectue une cinétique enzymatique, que signifie « se placer en concentration d'enzymes **non saturante**, condition **limitante** » ?

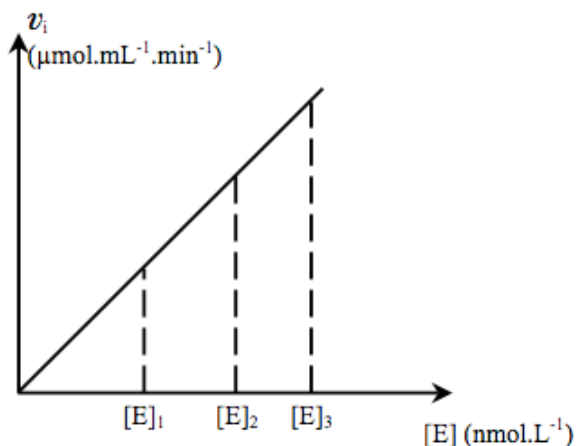
C'est-à-dire que la **concentration d'enzymes est fixe**. Cette concentration va **limiter la réaction enzymatique**.

12. Que mesure-t-on pour déterminer la vitesse de la réaction enzymatique à un temps donné ?

On mesure la **quantité de produit formé** (On peut aussi mesurer la **quantité de substrat disparu**) à l'instant  $t$ .

Puis, on **calcule la vitesse** de la réaction à un temps donné, avec  **$V = d(P)/dt$**

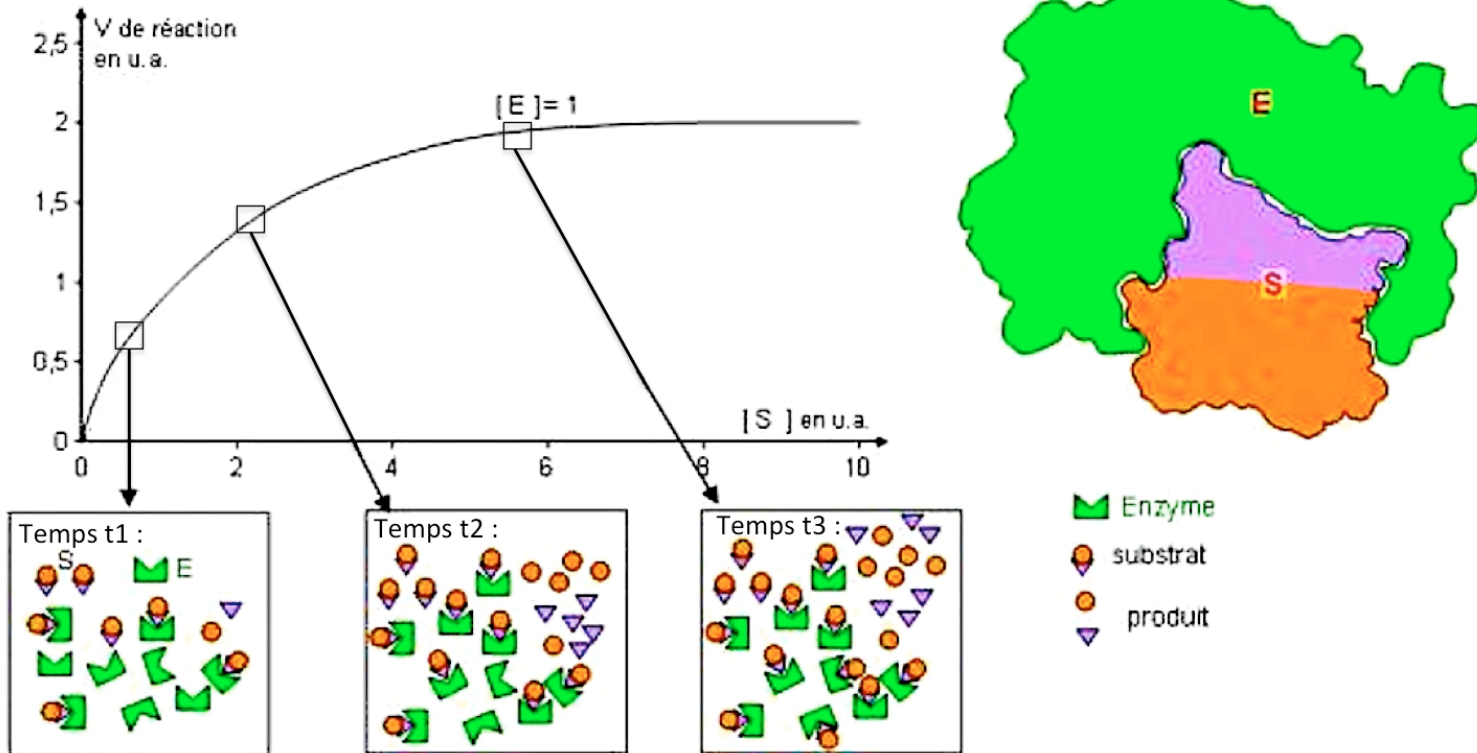
13. Que traduit le graphique ci-dessous ? Dans quelles conditions expérimentales a-t-il été réalisé ?



Ce graphique traduit **l'effet de la concentration en enzyme sur la cinétique enzymatique**. Plus la concentration en enzyme est importante, plus la vitesse augmente.

Conditions expérimentales : **[S] limitante, non saturante et [E] non limitante et saturante.**

14. À partir de la figure ci-dessous, expliquez dans quelles conditions expérimentales a été effectué cette cinétique d'une enzyme michaelienne ou non allostérique. Quelle est l'allure de la courbe ? Puis, décrivez les différentes étapes expliquant l'allure de cette courbe.



Conditions expérimentales : **[E] limitante, non saturante et [S] non limitante et saturante.**

Allure de la courbe : **hyperbole.**

Dans un premier temps (**temps t1**), la **vitesse augmente proportionnellement à la concentration en substrat.**

Dans un deuxième temps (**temps t2**), la **vitesse tend vers un plateau de saturation.**

Lorsque la **vitesse des réactions enzymatiques n'augmente plus** alors qu'il y a de plus en plus de substrat (**temps t3**), on a atteint la **vitesse maximale de la réaction (Vmax)**, car tous les sites catalytiques des enzymes sont occupés. On dit que **l'enzyme est saturée en substrat.**

15. Définissez la Vmax.

Lorsque la vitesse des réactions enzymatiques n'augmente plus alors qu'il y a de plus en plus de substrat, on a atteint la **Vmax, vitesse maximale.**

**Tous les sites catalytiques des enzymes sont occupés.** On dit que **l'enzyme est saturée en substrat** ; on a atteint le **plateau de saturation.**

La **Vmax s'exprime en unités internationales** (1 UI = 1 μmol de produit formé par minute) ou en **kat** (1 kat = 1 μmol de produit formé par seconde).

16. Définissez le Km.

**Km est la constante de Michaelis**

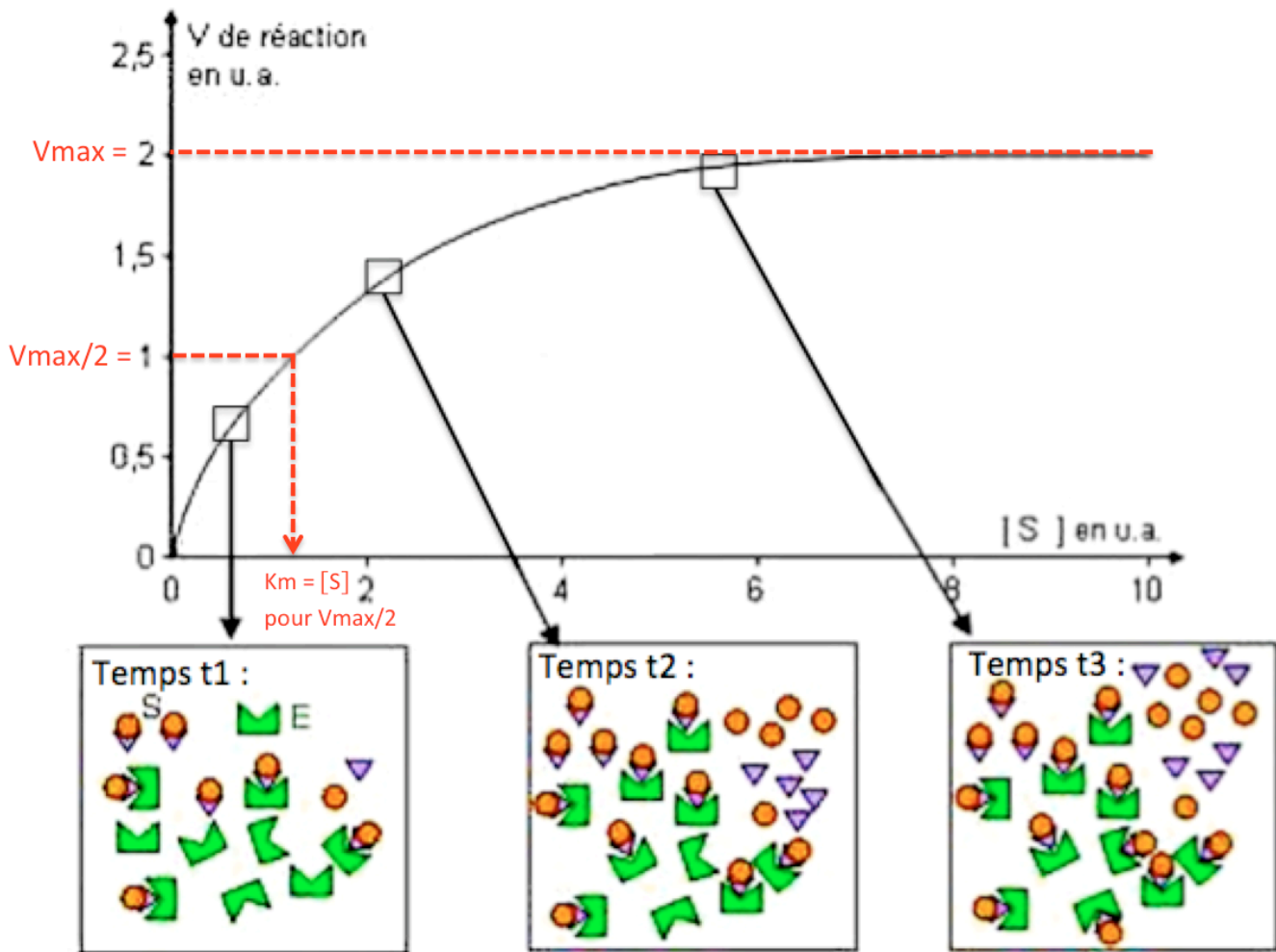
Il s'agit de la **constante d'équilibre de dissociation du complexe ES**.

Elle traduit l'affinité de l'enzyme pour son substrat. L'affinité représente la facilité qu'à un substrat de se lier à une enzyme.

Ainsi, plus le Km est grand, plus le complexe ES a tendance à se dissocier, et donc moins l'enzyme a d'affinité pour le substrat. Le **Km est donc inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat**.

Le Km peut également être défini comme **la concentration en substrat pour laquelle  $V = V_{max}/2$** .

17. Déterminez les 2 paramètres cinétiques sur la cinétique de la question 14. Quel est leur intérêt ?



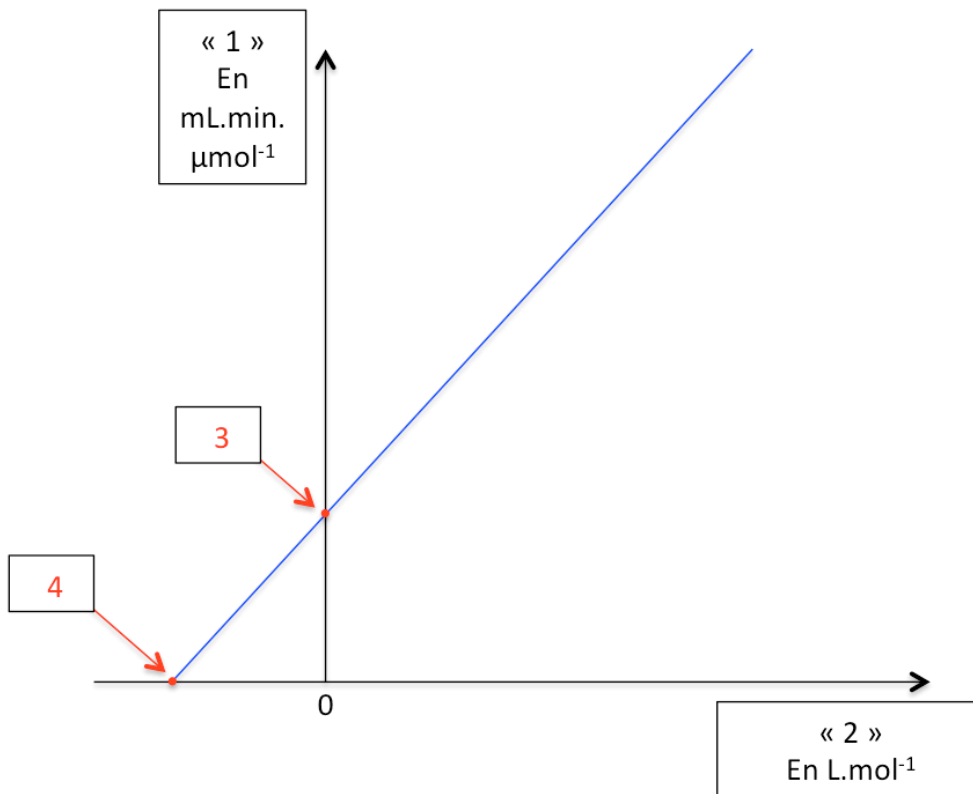
D'où  $V_{max} = 2$  u.a.  
Et  $K_m =$  environ 1,3 u.a.

L'activité d'une enzyme pour un substrat donné est déterminée par la **Vmax** et le **Km**, les deux principaux paramètres cinétiques.



**SÉANCE 3 :**

18. Titrez et légendez le graphique suivant. Puis, donnez les calculs pour déterminer les 2 paramètres cinétiques.



Titre : Représentation de la cinétique enzymatique **en double inverse**, représentation de **Lineweaver-Burk**.

- 1 :  $1/V$
- 2 :  $1/[S]$
- 3 :  $1/V_{max}$
- 4 :  $-1/K_m$

La droite coupe l'axe des abscisses en  $-1/K_m$  et l'axe des ordonnées en  $1/V_{max}$  permettant de déterminer rapidement ces deux paramètres cinétiques, et donc **l'activité de l'enzyme**.

**Calcul pour trouver la  $V_{max}$  :**

$$1/V_{max} = X \text{ mL.min.}\mu\text{mol}^{-1}$$

$$\text{D'où } V_{max} = 1/X \mu\text{mol/mL/min}$$

**Calcul pour trouver le  $K_m$  :**

$$-1/K_m = -Y \text{ L.mol}^{-1}$$

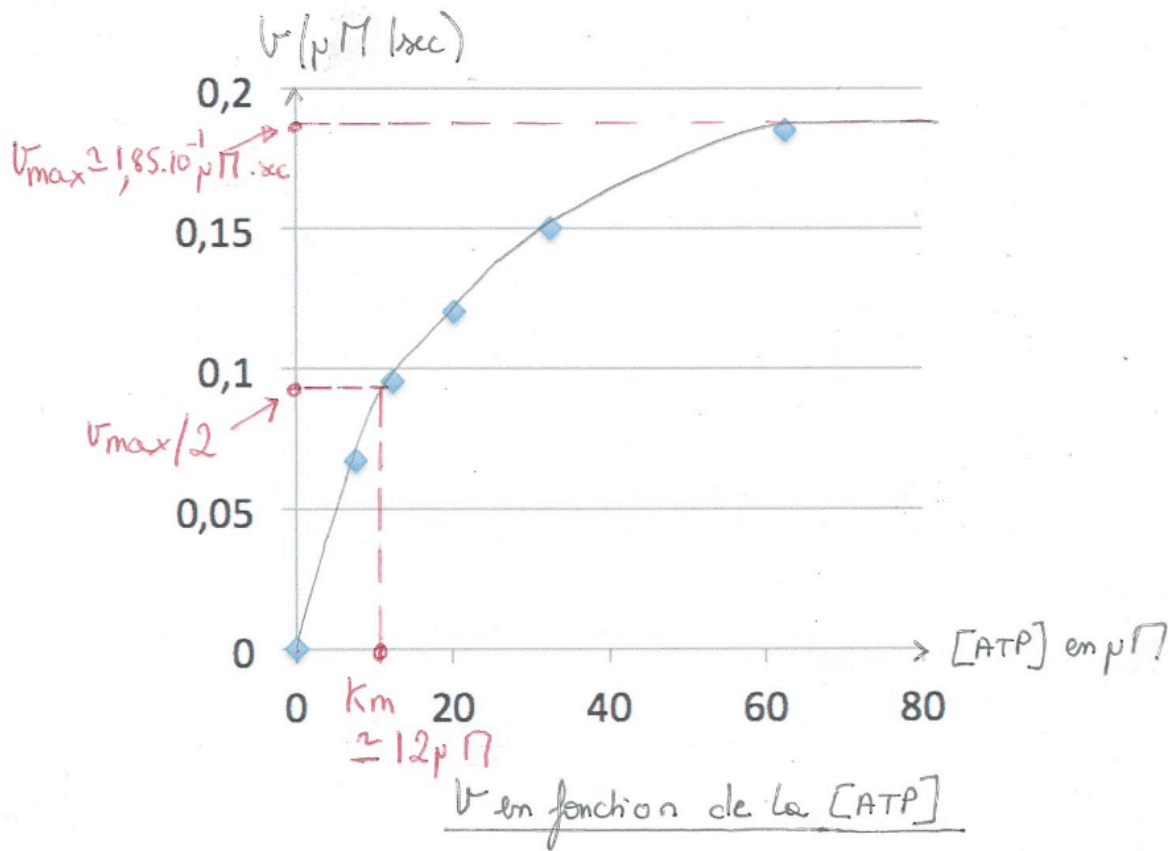
$$\text{D'où } 1/K_m = Y \text{ L.mol}^{-1}$$

$$\text{D'où } K_m = 1/Y \text{ mol/L}$$

19. L'étude de la déphosphorylation d'un substrat par un enzyme, expérience réalisée à température constante et pH donné, et avec une concentration d'ATP non limitante devant la concentration d'enzyme, donne les résultats suivants :

[ATP] $\mu\text{M}$	7,5	12,5	20,1	32,5	62,5
v ( $\mu\text{M/s}$ )	0,067	0,095	0,12	0,15	0,185

- Tracez le graphique V en fonction de la [ATP].
- Reportez les 2 paramètres cinétiques,  $V_{\text{max}}$  et  $K_m$ , sur votre graphique.



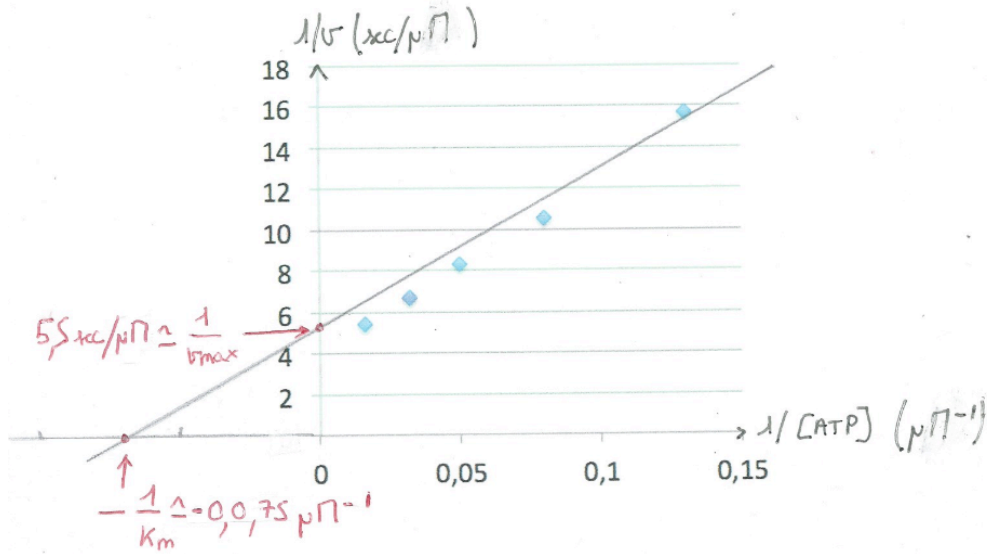
- Réalisez la représentation en double inverse.

Après calcul, on trouve :

$1/[\text{ATP}]$ en $\mu\text{mol}^{-1}$	0,13	0,08	0,05	0,032	0,016
$1/V$ en $\text{sec}/\mu\text{mol}$	15,63	10,52	8,33	6,66	5,4

D'où :

Représentation de Lineweaver-Burk.  
 $1/v$  en fonction de  $1/[ATP]$



d. Reportez les 2 paramètres cinétiques,  $V_{max}$  et  $K_m$ , sur votre graphique, puis déterminez-les par le calcul.

**Calcul pour trouver la  $V_{max}$  :**

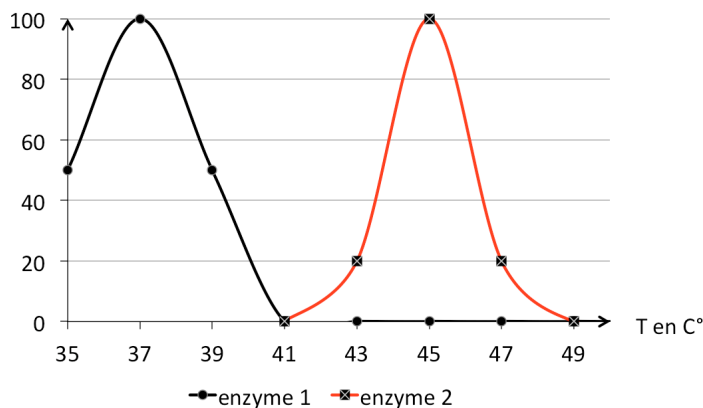
$1/V_{max} = 5,5 \text{ sec} \cdot \mu M^{-1}$   
D'où  $V_{max} = 1/5,5 \mu M/\text{sec}$   
D'où  $V_{max} = \text{environ } 1,8 \cdot 10^{-1} \mu M/\text{sec}$

**Calcul pour trouver le  $K_m$  :**

$-1/K_m = -0,075 \mu M^{-1}$   
D'où  $1/K_m = 0,075 \mu M^{-1}$   
D'où  $K_m = 1/0,075 \mu M$   
D'où  $K_m = \text{environ } 13 \mu M$

20. Expliquez l'effet de la température sur l'activité enzymatique des enzymes 1 et 2.

Activité enzymatique (en %)



Dans un premier temps, L'activité enzymatique augmente en même temps que la température car **l'agitation thermique** créée par l'augmentation de température favorise la rencontre de l'enzyme et de son substrat et donc, la formation du complexe ES.

La **température optimale est celle où l'activité de l'enzyme est optimale** (100% d'activité enzymatique).

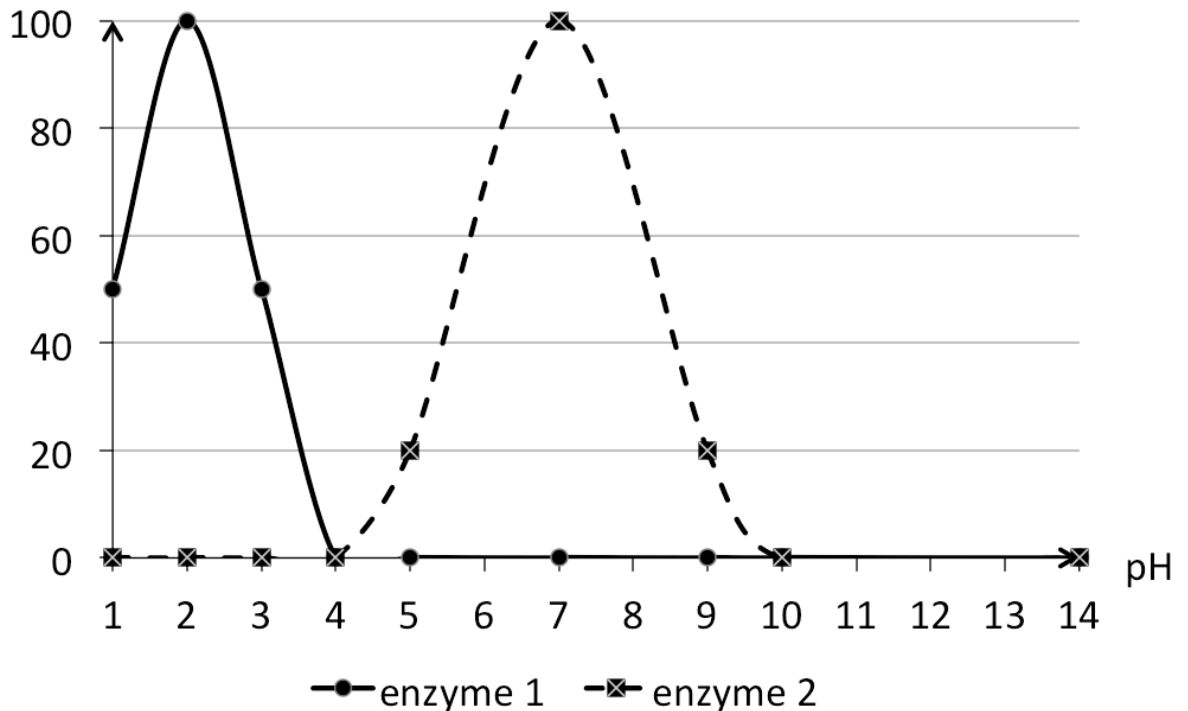
Puis, dans un deuxième temps, la vitesse de la réaction chute rapidement pour devenir nulle. L'enzyme **perd son activité catalytique** car elle est **dénaturée** ; elle **perd sa conformation spatiale par perte des liaisons faibles**.

Dans le **cas de l'enzyme 1**, sa **température optimale est à 37°C**. Elle peut être une enzyme humaine, par exemple.

Dans le **cas de l'enzyme 2**, sa **température optimale est à 45°C**.

**21.** Expliquez l'effet du pH sur l'activité enzymatique des enzymes 1 et 2.

Activité enzymatique  
(en %)



De la même manière que pour la température, **lorsqu'on atteint 100% d'activité enzymatique**, le pH correspondant est le **pH optimal**.

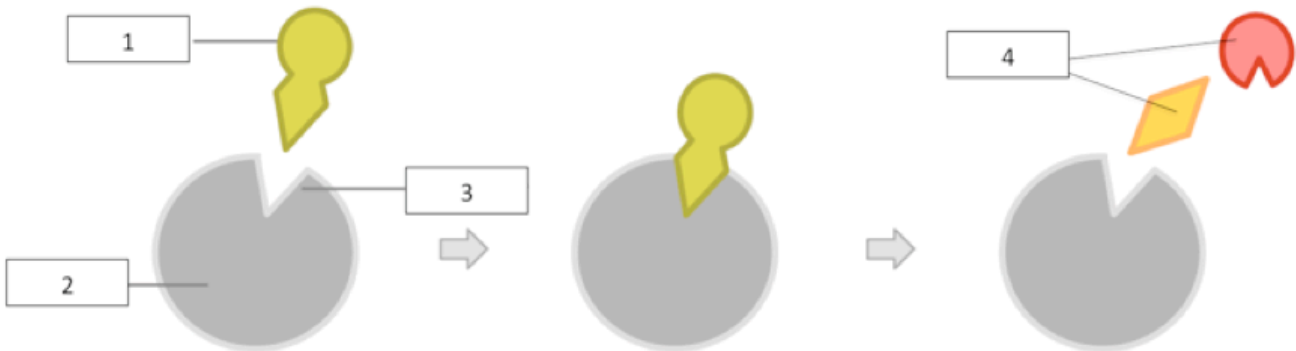
**Lorsque l'on s'éloigne de ce pH optimal**, l'activité enzymatique diminue très vite. Ceci est dû au fait que l'enzyme possède des **groupements ionisés dans son site actif** nécessaire à son activité catalytique, et que la **stabilisation du complexe ES** est due en partie à la **formation de liaisons ioniques**. **Les changements de pH** vont changer l'ionisation des AA du site actif, et faire **perdre ces liaisons ioniques**.

Dans le **cas de l'enzyme 1**, son **pH optimal est à 2**. Elle peut être une enzyme gastrique par exemple.

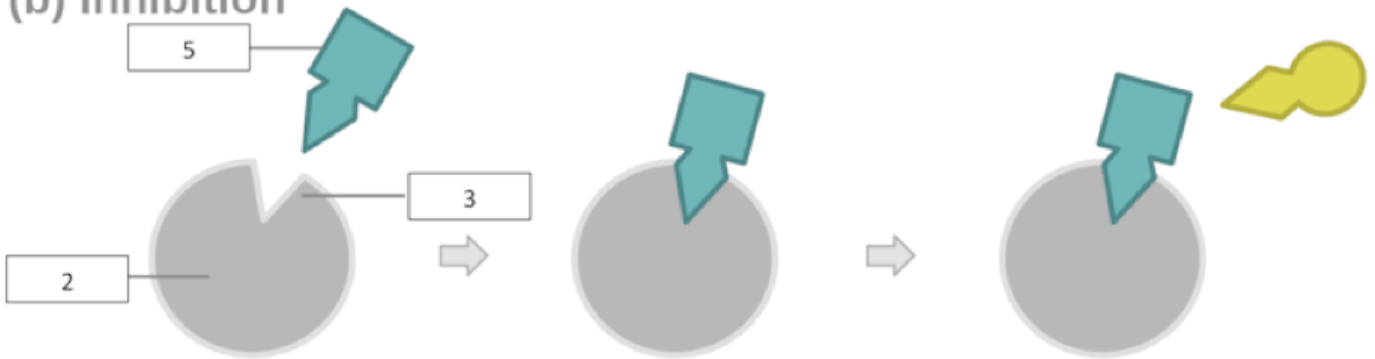
Dans le **cas de l'enzyme 2**, son **pH optimal est à 7**. Elle peut être une enzyme pancréatique par exemple.

22. Légendez la figure suivante :

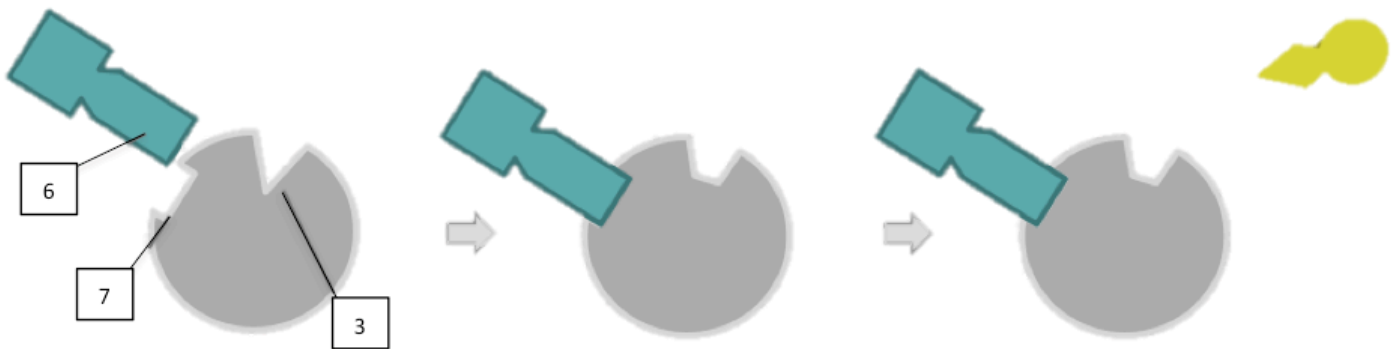
**(a) Reaction**



**(b) Inhibition**

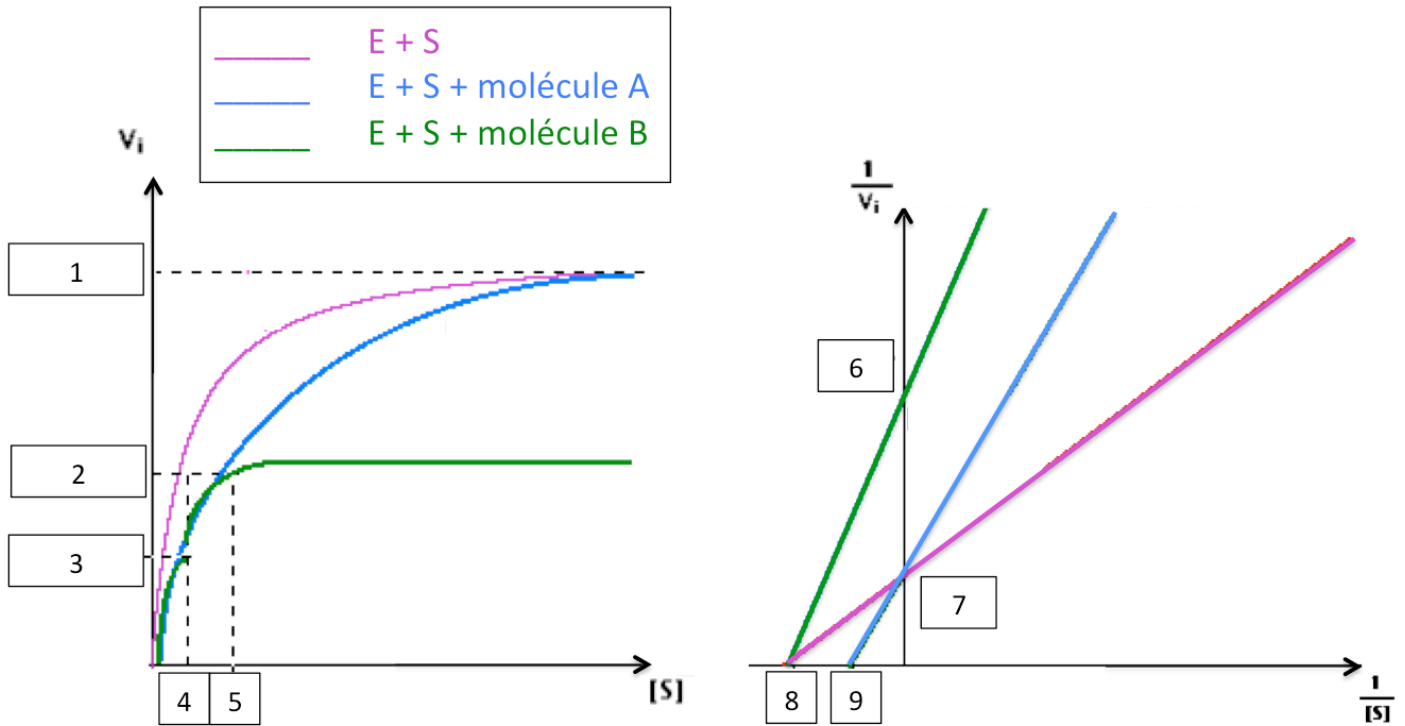


**(c) Inhibition**



- 1 : Substrat
- 2 : enzyme
- 3 : site actif
- 4 : produits
- 5 : inhibiteur compétitif (analogue structural su substrat, fixation réversible)
- 6 : inhibiteur non compétitif (aucune analogie avec le substrat, en général. Fixation irréversible).
- 7 : Site de fixation de l'inhibiteur non compétitif.

23. Après avoir légendé les graphiques ci-dessous, analysez-les et interprétez sur l'effet des molécules A et B. Vous l'expliquerez en détails (notamment avec des équations).



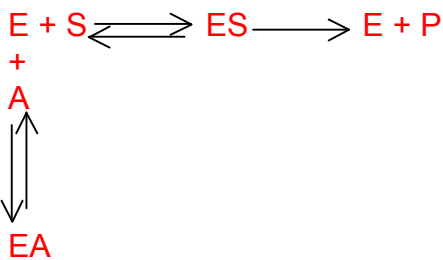
- 1 :  $V_{max} = V_{max} A$
- 2 :  $V_{max}/2 = V_{max} A/2$  et  $V_{max} B$
- 3 :  $V_{max} B/2$
- 4 :  $K_m = K_m B$
- 5 :  $K_m A$
- 6 :  $1/V_{max} B$
- 7 :  $1/V_{max} = 1/V_{max} A$
- 8 :  $-1/K_m = -1/K_m B$
- 9 :  $-1/K_m A$

**En présence de la molécule A :**

Le  **$K_m$  est augmenté** ( $K_m A > K_m$ ), l'**affinité** de l'enzyme pour le substrat est donc **diminuée en présence de la molécule A**. La **réaction** est par conséquent **plus lente**.

La  **$V_{max}$  est inchangée** ( $V_{max} A = V_{max}$ ). Mais, elle est plus longue à atteindre.

Ces résultats sont caractéristique **d'un inhibiteur compétitif** tel que :



L'occupation du site actif par l'inhibiteur n'est pas définitive. La **formation du complexe EA est réversible**.

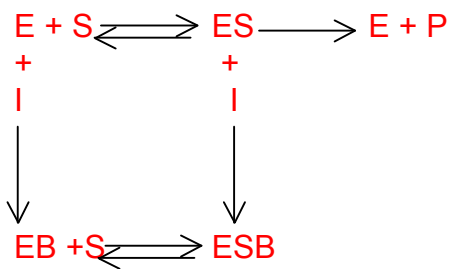
En effet, un **inhibiteur compétitif** est un **analogue structural** du substrat, c'est-à-dire que ces deux composés présentent une analogie structurale. De ce fait, le site actif de l'enzyme le reconnaît comme un substrat, mais ne peut pas le transformer. La molécule A rentre donc en compétition avec le substrat pour l'occupation du site actif, d'où son nom. Cette fixation est **réversible**.

**En présence de la molécule B :**

Le **Km est inchangé** ( $K_m B = K_m$ ), l'**affinité** de l'enzyme pour le substrat reste donc la **même en présence de la molécule B**.

La **Vmax est diminuée** ( $V_{max B} < V_{max}$ ) en présence de la molécule B.

Ces résultats sont caractéristique **d'un inhibiteur non compétitif** tel que :



La fixation du substrat au site actif n'étant pas perturbée, la formation du complexe ES n'est pas modifiée.

La Vmax correspond à la vitesse atteinte lorsque toutes les molécules d'enzyme sont sous la forme du complexe ES. Or, le nombre de complexes ES diminue à la faveur des complexes EB.

En effet, un **inhibiteur non compétitif** n'a, en général, **aucune analogie avec le substrat**. Le substrat peut donc se fixer au site actif, il n'y a pas de compétition. Par contre, l'inhibiteur non compétitif se combine avec l'enzyme de manière **irréversible**, covalente et stable, et cette fixation **dénature le site actif**. Contrairement à l'inhibiteur compétitif, il induit donc une **inactivation définitive de l'enzyme**.

24. Complétez le tableau suivant :

	<b>Inhibiteur compétitif :</b>	<b>Inhibiteur non compétitif :</b>
<b>Fixation avec l'enzyme :</b>	En compétition avec le S, mais <b>réversible</b> .	Pas de compétition avec le S, mais <b>irréversible</b> .
<b>Km :</b>	Augmenté.	Inchangée.
<b>Affinité de l'enzyme pour son substrat :</b>	Diminuée.	Inchangée.
<b>Vmax :</b>	Inchangée.	Diminuée.

**SÉANCE 4 :**

25. Quelles sont les trois manières d'activer une enzyme ?

- Lorsqu'elle synthétisée sous forme inactive (**pro-enzyme ou zymogène**), **clivage du peptide qui l'inactive**.
- Par **ajout d'un groupement chimique** : **phosphorylation** (ajout d'un groupement phosphate, ce qui selon l'enzyme peut l'activer ou l'inhiber), **acylation** (ajout d'un groupement acyle, ce qui selon l'enzyme peut l'activer ou l'inhiber) ou **alkylation** (ajout d'un groupement alkyle, ce qui selon l'enzyme peut l'activer ou l'inhiber).
- Grâce à la présence d'un **co-facteur ou co-enzyme** => molécule se liant à l'enzyme, nécessaire à son activité.

26. Quelle est la principale différence entre les co-enzymes libres (également nommé co-substrats) et les co-enzymes liés ?

Le **co-enzyme libre se lie de manière transitoire** à l'enzyme, par des **liaisons faibles**. Il peut donc être dissocié de son enzyme.

Alors que le **co-enzyme liée reste tout le temps** lié à l'enzyme, par des **liaisons covalentes**. Il ne peut donc pas être dissocié de son enzyme.

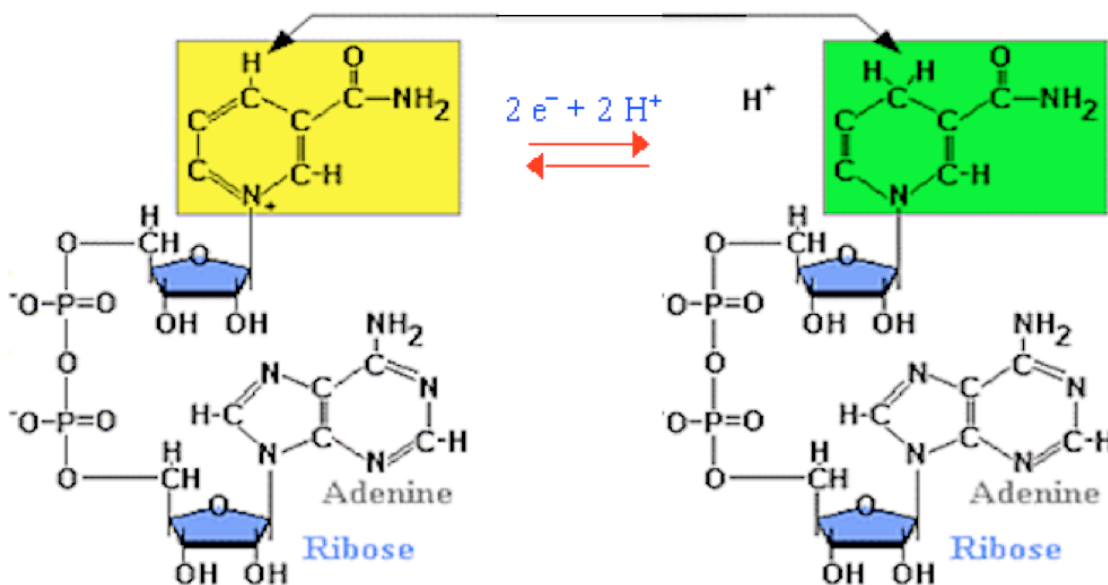
27. Définissez « co-enzyme d'oxydo-réduction » et « co-enzyme de transfert ».

Les **coenzymes d'oxydoréduction** permettent **l'échange d'électrons** (Une réaction d'oxydo-réduction est une réaction chimique au cours de laquelle se produit un échange d'électrons).

Les **coenzymes de transfert** permettent le **transfert de groupements fonctionnels** carbonés ou non (éléments aminés, éléments carbonés, phosphate, nucléotide, hydrogène).

28. Retrouvez les co-enzymes correspondant aux formules chimiques suivantes. Dites à quelle vitamine hydrosoluble il correspond, ou dont il dérive :

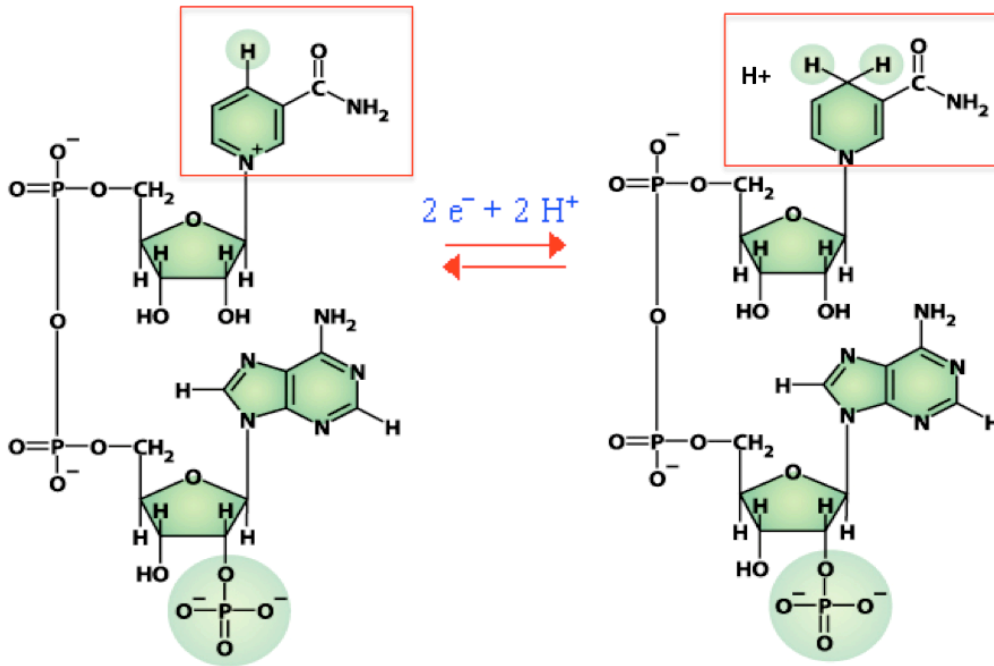
A.



⇒ **NAD<sup>+</sup> (forme oxydée)/NADH, H<sup>+</sup> (forme réduite)**, dérive de la **Vit B3** (ou PP), ou niacine.

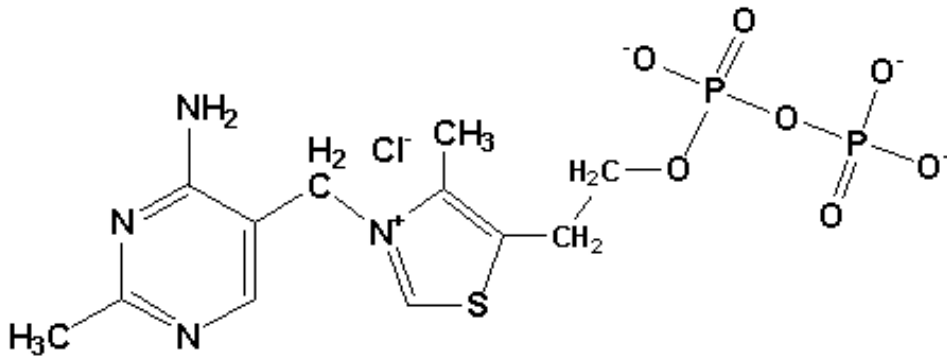


B.



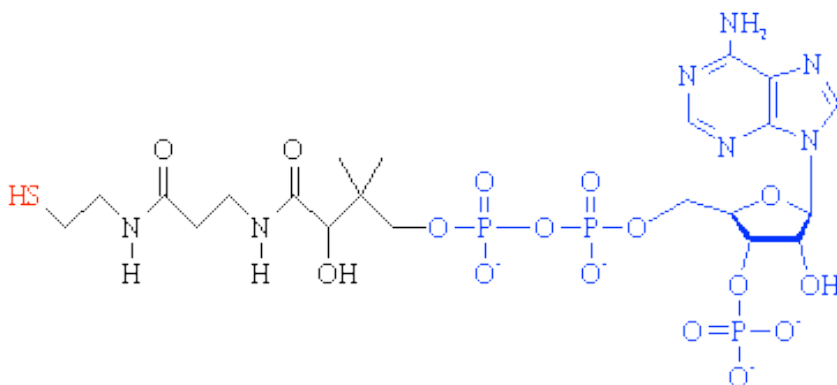
⇒ **NADP<sup>+</sup> (forme oxydée)/NADPH, H<sup>+</sup> (forme réduite)**, dérive de la **Vit B3** (ou PP), ou niacine.

C.



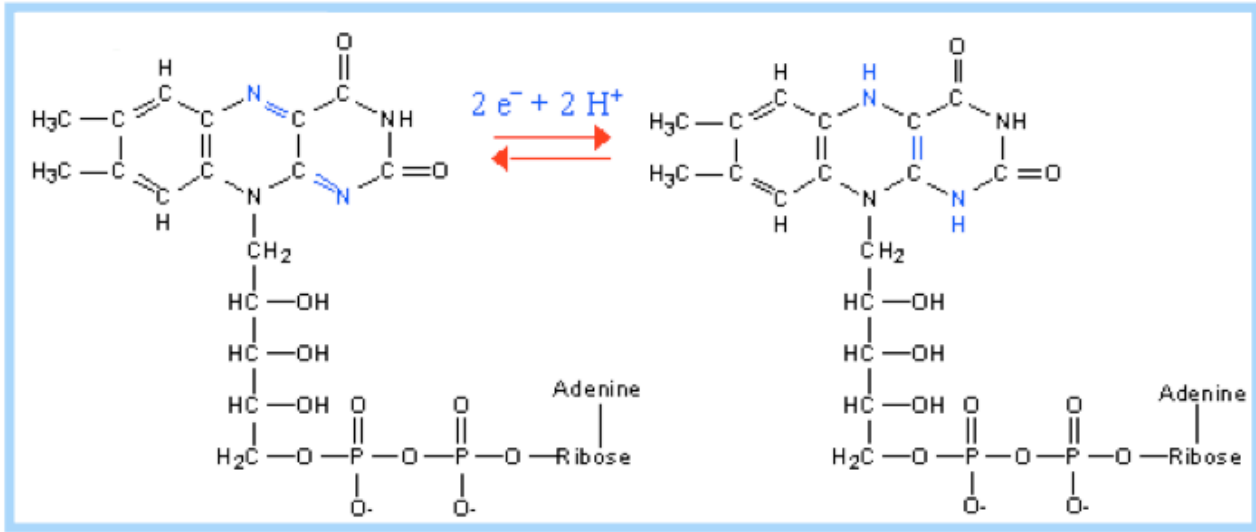
⇒ **TPP** (Thiamine pyrophosphate), dérive de la thiamine, **Vit B1**.

D.



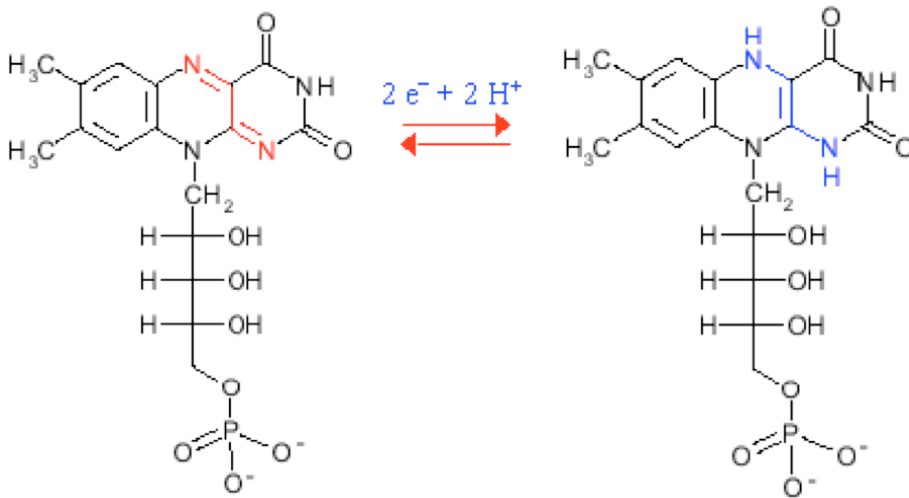
⇒ **Co-enzyme A** (CoA-SH quand il est libre, X-CoA lorsqu'il est lié à la molécule X), dérive de l'acide pantothénique, **Vit B5**.

E.



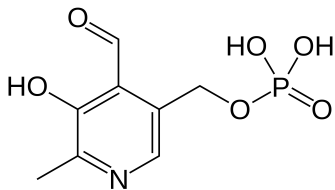
⇒ **FAD (forme oxydée)/FADH<sub>2</sub> (forme réduite)**, dérive de la riboflavine, **Vit B2**.

F.



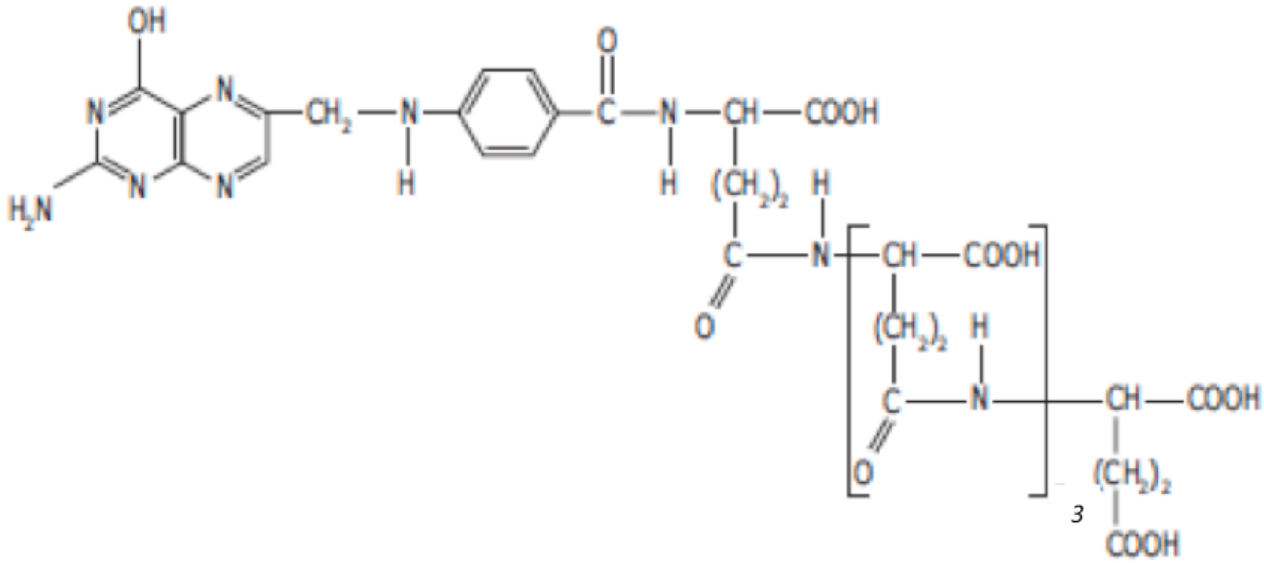
⇒ **FMN (forme oxydée)/FMNH<sub>2</sub> (forme réduite)**, dérive de la riboflavine, **Vit B2**.

G.



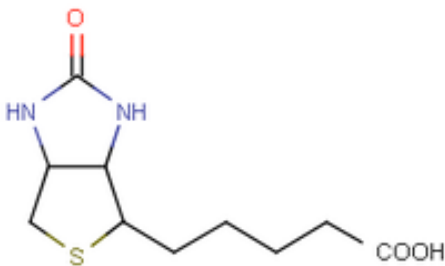
⇒ **Phosphate de pyridoxal, Vit B6** (sous sa forme phosphorylée).

H.



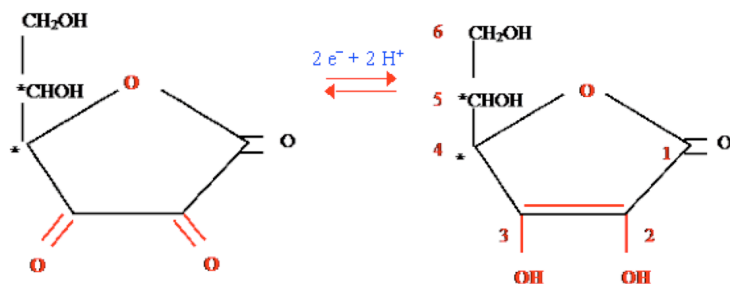
⇒ Acide folique (ou **folate**) **polyglutamate** (penta-glutamate), dérive des folates, **Vit B9**.

I.



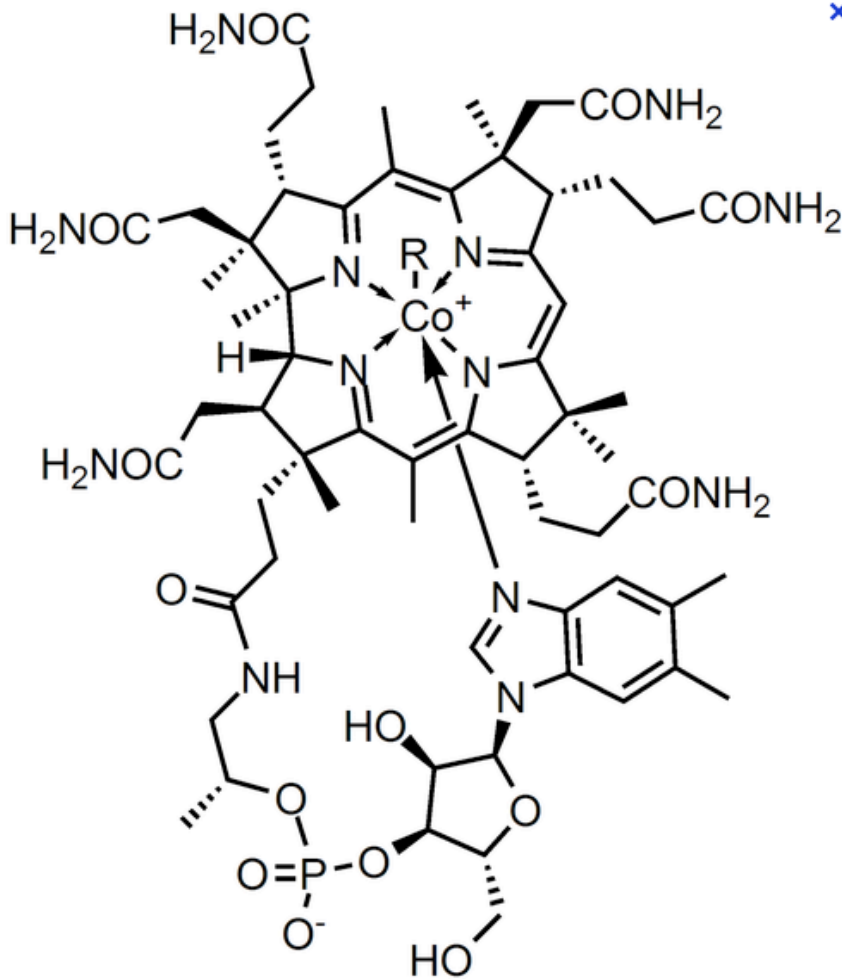
⇒ **Biotine, Vit B8**

J.



⇒ **Acide déshydroascorbique (forme oxydée)/ Acide ascorbique (forme réduite), Vit C.**

K.



⇒ **Cobalamine, Vit B12**

29. Complétez le tableau suivant en vous inspirant de la première ligne.

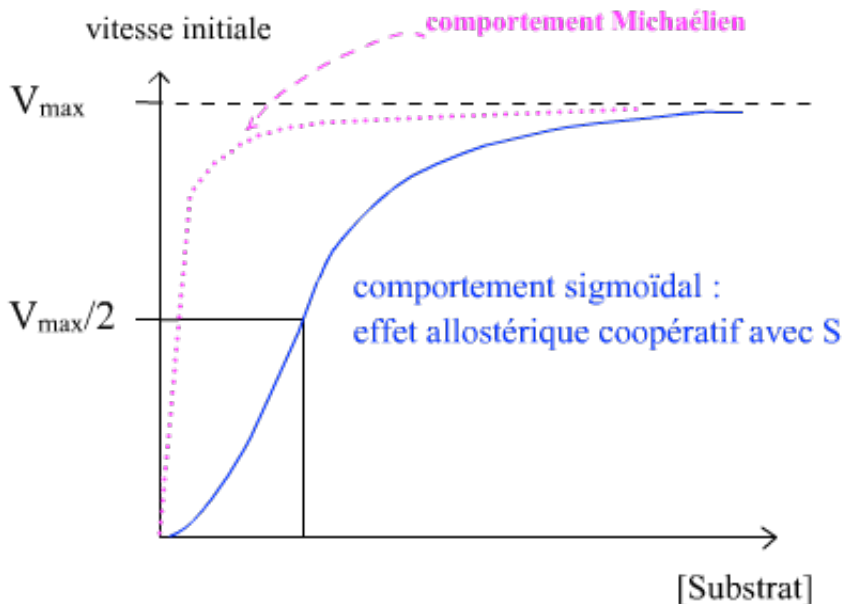
Co-enzyme	Dérive de la Vit :	Classification :	Source endogène et/ou stockage :	Apports exogènes (aliments) :	Absorption intestinale :	Cellules consommatrices	Elimination :
TPP	B1	Lié et de transfert (décarboxylation)	Pas de stockage. Source endogène insuffisante (flore colique)	Végétale : Thiamine Animale : TPP	TPP déphosphorylé dans intestin, Thiamine Absorbée, puis transportée via Le sang jusqu'aux cellules consommatrices	Hépatiques, Rénales, Cardiaques Nerveuses. => Thiamine phosphorylée pour redonner TPP	Par voie Urinaire, sous forme de métabolites.

<b>FAD/FADH2</b>	<b>B2</b>	Lié et d'oxydo-réduction Forme oxydée : FAD Forme réduite : FADH2	Pas de stockage. Source endogène insuffisante (flore colique)	Végétale : riboflavine  Animale : FAD/FADH2	FAD/FADH2 et FMN/FMNH2 hydrolysés dans intestin, Riboflavine Absorbée par transport actif, Dans entérocyte, Une partie Phosphorylée En FMN, puis transportée via Le sang par l'albumine jusqu'aux cellules consommatrices	Hépatiques, Rénales, Cardiaques => riboflavine phosphorylée en FMN, qui sera à son tour en grande partie transformé en FAD.	Par voie Urinaire, sous forme libre.
<b>FMN/FMNH2</b>	<b>B2</b>	Lié et d'oxydo-réduction Forme oxydée : FMN Forme réduite : FMNH2					
<b>NAD+/NADH, H+</b>	<b>B3</b>	Libre et d'oxydo-réduction Forme oxydée : NAD+ Forme réduite : NADH, H+	Stockage dans foie et hématies. Source endogène : Synthèse à partir du TRP (mais AA essentiel)	Sous forme de NAD+/NADH, H+ Et NADP+ /NADPH, H+	NAD+/NADH, H+ Et NADP+ /NADPH, H+ Hydrolysés Dans Intestin, Forme libre Absorbée par Transport Facilitée puis transportée via Le sang par l'albumine jusqu'aux cellules consommatrices	Toutes => forme libre transformée en NAD+ et NADP+.	Par voie Urinaire, sous forme de métabolites.
<b>NADP+/NADPH, H+</b>	<b>B3</b>	Libre et d'oxydo-réduction Forme oxydée : NADP+ Forme réduite : NADPH, H+					
<b>Coenzyme A</b>	<b>B5</b>	Libre et de transfert (acylation) Libre : CoA-SH Lié à une Molécule X : X-CoA	Stockage dans foie muscles et cœur.	Sous forme de Coenzyme A.	Coenzyme A Hydrolysé Dans Intestin, Forme libre Absorbée par Transport actif puis transportée via Le sang jusqu'aux cellules consommatrices	Toutes => forme libre transformée en Coenzyme A.	Par voie Urinaire, sous forme libre.
<b>Phosphate de pyridoxal</b>	<b>B6</b>	Lié et de transfert (décarboxylation ou transamination)	Stockage très limité dans muscles striés.	Végétale : pyridoxamine  Animale : Phosphate de pyridoxal	Phosphate de pyridoxal déphosphorylé dans intestin Puis Absorbée, et transportée via le sang jusqu'aux cellules consommatrices	Toutes => forme libre phosphorylée en Phosphate de pyridoxal.	Par voie Urinaire, sous forme de métabolites.

<b>Vit B8 ou biotine</b>	/	Lié et de transfert (carboxylation)	Stockage Limité dans foie. Source endogène insuffisante (flore colique)	sous forme liée à son enzyme	Liaison avec son enzyme hydrolysée dans intestin par la biotinidase Puis Absorbée, et transportée via le sang par une protéine spécifique jusqu'aux cellules consommatrices	Toutes	Par voie Urinaire, sous forme libre.
<b>THF</b>	B9 / folates	Lié et de transfert (élément monocarboné)	Stockage Dans foie Sous forme De Tétra-hydrofolate.	Sous forme Ac. Folique polyglutamate	Ac. Folique Polyglutamate Transformée En Monoglutamate Par protéases Digestives Puis Absorbée, et transportée via le sang jusqu'au foie qui la convertit en Tétrahydrofolate, Qui sera transportée via le sang par l'albumine jusqu'aux cellules consommatrices.	Toutes	Par voies Urinaire Et biliaire (selles)
<b>Vit B12 ou cobalamine</b>	/	Lié et de transfert (méthylation ou isomérisation)	Stockage dans foie. Source endogène insuffisante (flore colique)	Animale : Lié à des Protéines.	Libérée dans la Cavité gastrique Grâce à l'HCl Et à la pepsine. Puis, se lie au Facteur Intrinsèque. Ce complexe sera Reconnu par les Entérocytes et la Vit B12 sera absorbée. Puis transportée Via le sang, via La trans-Cobalamine, Jusqu'au foie.	hépatique	Par voie biliaire (selles)
<b>Ac. ascorbique/ Déshydroascorbique Vit C</b>	/	Lié et d'oxydo-réduction Forme oxydée : Ac. Déshydro-ascorbique Forme réduite : Ac. ascorbique	Pas de stockage	Principalement D'origine Végétale. Plus rarement, D'origine animale	Absorbée par Transport actif et transportée via le sang jusqu'aux cellules consommatrices	Toutes	Par voie Urinaire.

**SÉANCE 5 :**

30. À partir de l'analyse des graphiques ci-dessous, expliquez les différences de cinétique entre les enzymes allostériques et les non allostériques, les michaeliennes.



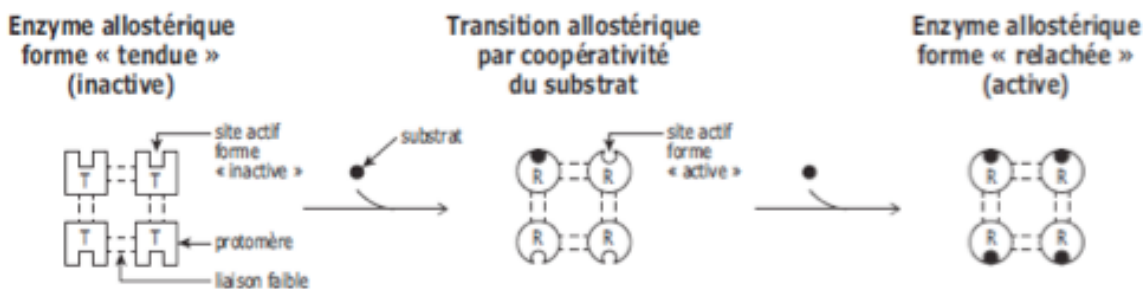
Contrairement à la cinétique des enzymes **michaeliennes**, la cinétique enzymatique des enzymes **allostériques** ne présente pas une allure **hyperbolique**, mais **sigmoïde**.

Cette différence **s'explique par la structure d'une enzyme allostérique**. Cette enzyme possède en fait une **structure quaternaire** avec plusieurs **protomères** (sous-unité d'une protéine multimérique) associés entre eux par des liaisons faibles ; elle est donc **oligomérique**. **Chaque protomère possédant un site actif**, une enzyme allostérique possède **plusieurs sites actifs**.

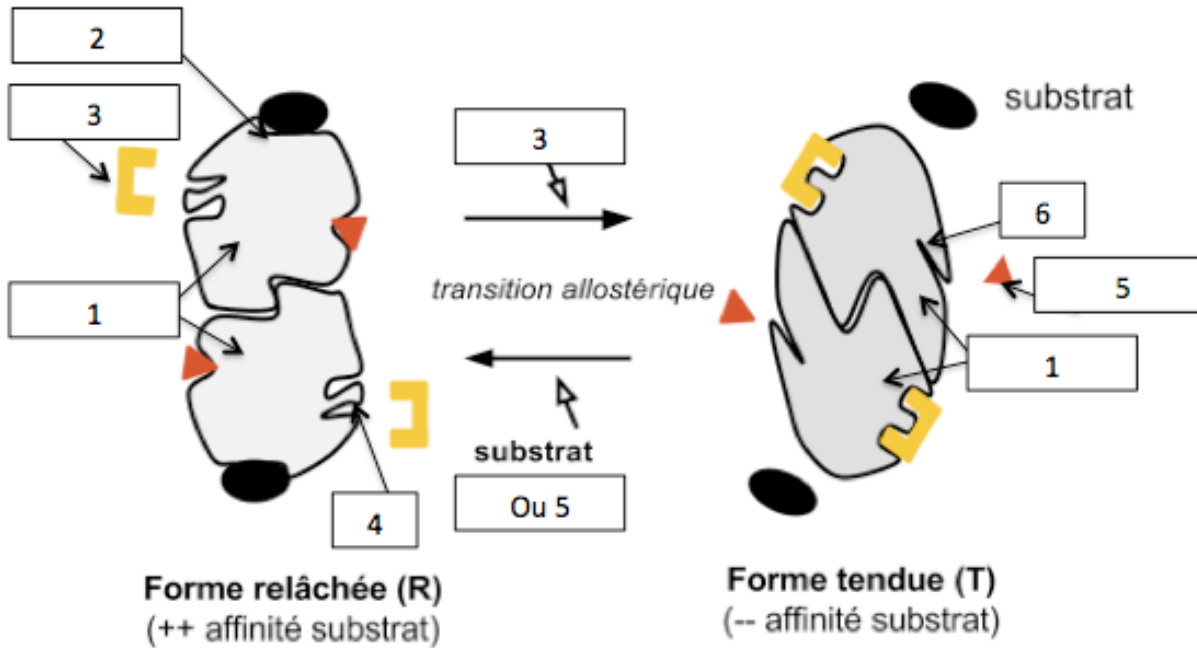
**Comment expliquer cette allure sigmoïde ? Ces enzymes existent en fait sous deux formes :**

- Une forme dite « **tendue** », notée « **T** », **inactive**, où les protomères montrent **peu d'affinité pour le substrat**,
- Une forme dite « **relâchée** », notée « **R** », **active**, où les protomères montrent une **forte affinité pour le substrat**.

L'explication vient en fait de la **coopérativité du substrat**. 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. Le passage de la forme T à la forme R porte le nom de **transition allostérique**.



31. Titrez et légendez la figure suivante :

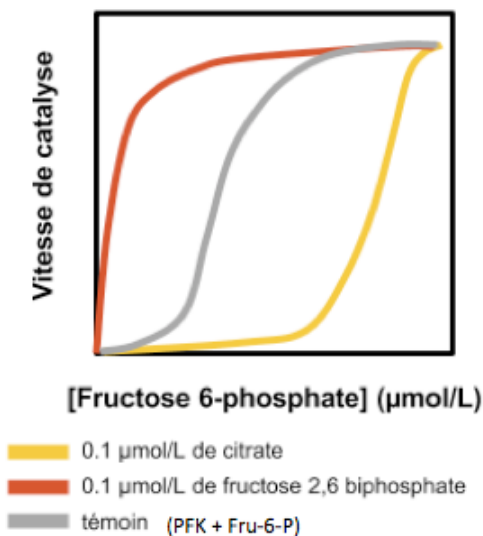


Titre : transition allostérique induite par des effecteurs allostériques.

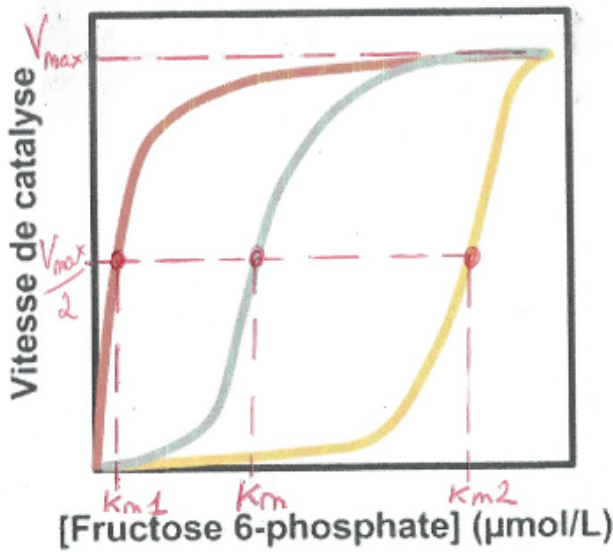
- 1 : protomères de l'enzyme allostérique
- 2 : site actif d'un protomère
- 3 : Inhibiteur allostérique (permet la transition de R vers T)
- 4 : Site allostérique inhibiteur
- 5 : Activateur allostérique (permet la transition de T vers R)
- 6 : Site allostérique activateur

32. Après avoir reporté les paramètres cinétiques sur le graphique, analysez et interprétez les données apportées par ce graphique.

**Effecteurs allostériques (ex. de la PFK)**





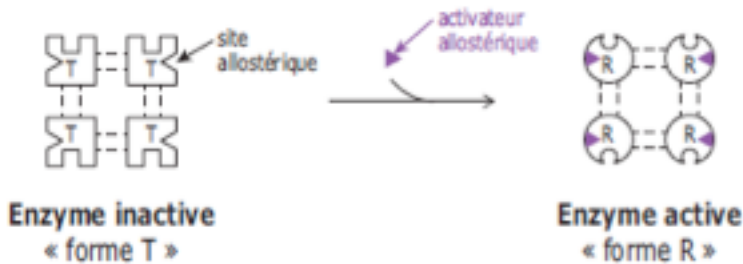


- 0.1 µmol/L de citrate
- 0.1 µmol/L de fructose 2,6 biphosphate.
- témoin (PFK + Fru-6-P)

**En présence de Fru 2,6 biP :**

**Vmax inchangée et Km diminuée** ( $K_{m1} < K_m$ ). L'affinité de la PFK (enzyme) pour le Fru-6-P (substrat) paraît donc **augmentée**.

=> Le Fru 2,6 biP est donc un **activateur allostérique** de la PFK. Sa fixation sur ses sites allostériques activateurs permet la **transition allostérique** de l'enzyme dans le **sens T vers R**, ce qui l'**active**.



**En présence de citrate :**

**Vmax inchangée et Km augmentée** ( $K_{m2} > K_m$ ). L'affinité de la PFK (enzyme) pour le Fru-6-P (substrat) paraît donc **diminuée**.

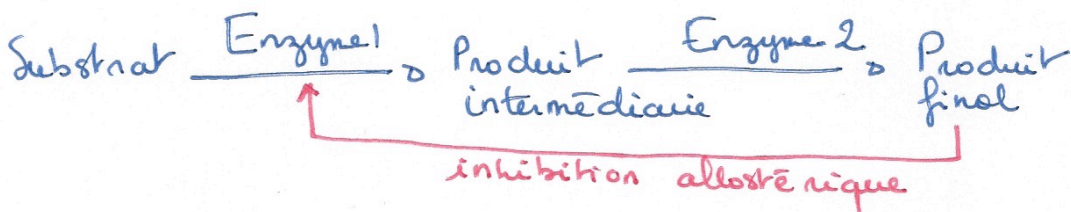
=> Le citrate est donc un **inhibiteur allostérique** de la PFK. Sa fixation sur ses sites allostériques inhibiteurs permet la **transition allostérique** de l'enzyme dans le **sens R vers T**, ce qui l'**inactive**.



**33. Quels sont les trois moyens de réguler l'activité d'une enzyme dans une cellule ?**

Les trois moyens de réguler l'activité d'une enzyme dans une cellule :

- Grâce à la **biodisponibilité du substrat ou du coenzyme** : Une quantité importante de substrat va stimuler l'activité de l'enzyme. Sans sa coenzyme, une enzyme reste inactive ; il faut donc qu'elle soit disponible.
- Par **régulation allostérique**, grâce aux effecteurs allostériques : Par exemple, dans une voie métabolique, plusieurs réactions enzymatiques se succèdent. Un des produits de cette chaîne de réactions peut se comporter comme inhibiteur allostérique, et inactiver une des enzymes participant à la chaîne des réactions. Dans ce cas, on parle de rétro-inhibition ou rétrocontrôle.



- Par **régulation hormonale** : une hormone peut **par exemple induire la phosphorylation** d'une enzyme provoquant son **activation**, ou encore sa **déphosphorylation**, provoquant son **inactivation**, ou inversement. Les hormones sont également **capables d'induire la biosynthèse d'enzymes**. Elles peuvent activer la transcription de gènes codant pour ces enzymes. Par exemple, l'insuline active la transcription du gène codant la glucokinase (catalyse la formation de glucose 6-phosphate à partir de glucose) dans les cellules hépatiques.

**Exercice**

Le glucose est dégradé dans l'organisme par la voie de la glycolyse. La première réaction de cette voie est une phosphorylation du glucose qui peut être catalysée par deux enzymes différentes : la glucokinase ou l'hexokinase.

On se propose d'étudier les caractères cinétiques de ces deux enzymes vis-à-vis de leur substrat commun, le glucose. La vitesse initiale de la réaction a été mesurée pour des concentrations différentes en substrat à 20 °C et à pH 7. La concentration en enzyme utilisée pour les deux séries d'expériences est la même. Les résultats expérimentaux sont reproduits dans le tableau ci-dessous.

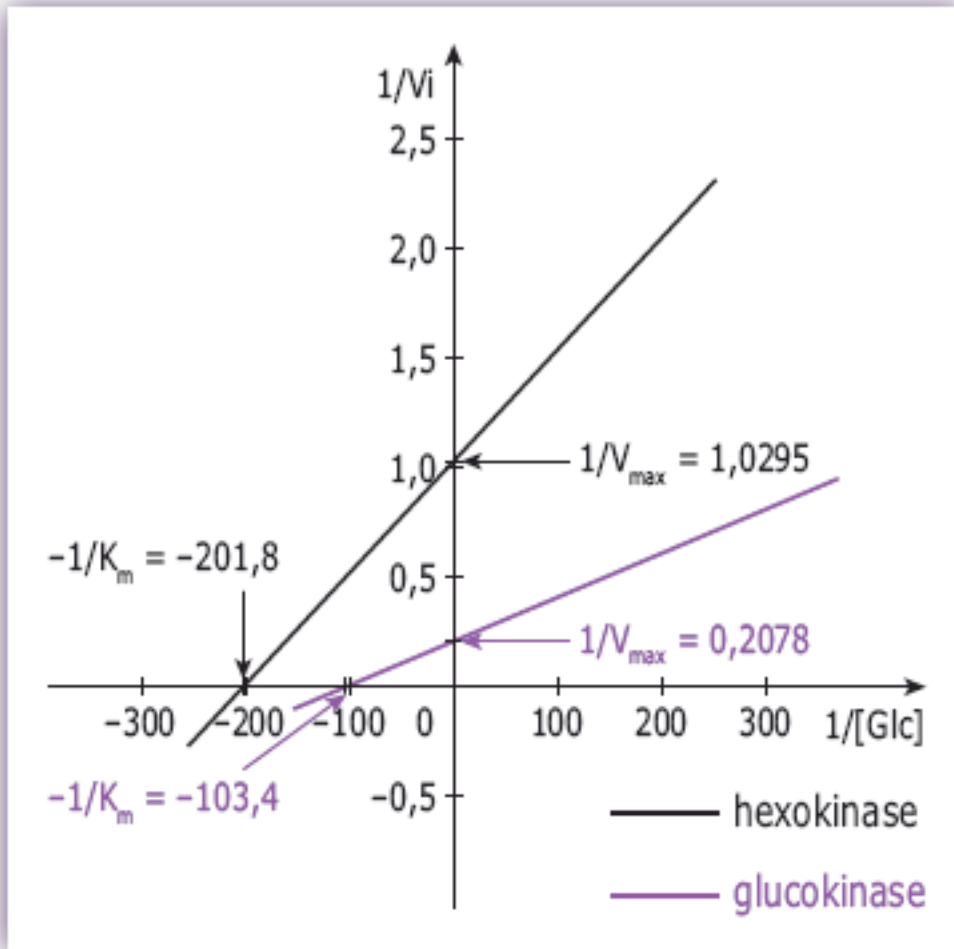
[Glucose] en mol/L	$V_i$ avec la glucokinase en $\mu\text{mol/L/min}$	$V_i$ avec l'hexokinase en $\mu\text{mol/L/min}$
$5,0 \cdot 10^{-3}$	1,61	0,490
$6,7 \cdot 10^{-3}$	2,00	0,575
$10,0 \cdot 10^{-3}$	2,67	0,607
$20,0 \cdot 10^{-3}$	2,93	0,806
$50,0 \cdot 10^{-3}$	4,17	0,893

1 Déterminer les valeurs de  $K_m$  et de  $V_{max}$  pour ces deux enzymes.

Afin de déterminer rapidement les  $K_m$  et  $V_{max}$ , on utilise la **représentation en double inverse**, la représentation de Lineweaver et Burk. Pour cela, il vous faut avant tout, recalculer les paramètres tels que :

$1/[\text{Glucose}]$	$1/V_i$ avec la glucokinase	$1/V_i$ avec l'hexokinase
200	0,621	2,041
1 150	0,500	1,739
100	0,375	1,674
50	0,341	1,241
20	0,240	1,120

D'où la représentation de Lineweaver et Burk :



**Pour la glucokinase :**

**Calcul de la Vmax :** lorsque  $1/[Glucose] = 0$ ,  $1/V_i = 1/V_{max}$ ,  
d'où  $1/V_{max} = 0,2078$ ,  
d'où  $V_{max} = 4,81 \mu\text{mol/L/min}$ .

**Calcul du Km :** lorsque  $1/V_i = 0$ ,  $1/[Glucose] = -1/K_m$ ,  
d'où  $-1/k_m = -103,4$ ,  
d'où,  $K_m = 9,62 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ .

**Pour l'hexokinase :**

Avec le même principe de calculs, on trouve :  
 $V_{max} = 0,97 \mu\text{mol/L/min}$  et  
 $K_m = 4,95 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ .

**2** Comparer les deux Km, et conclure.

Le Km est un paramètre cinétique qui indique l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus il est petit, plus cette affinité est grande.  
D'après les résultats, on en déduit que l'hexokinase a plus d'affinité pour le glucose que la glucokinase.

**3** Comparer les deux  $V_{max}$ , et conclure.

La  $V_{max}$  est un paramètre cinétique qui indique la vitesse maximale de la réaction enzymatique, lorsque toutes les enzymes sont saturées en substrats.

La  $V_{max}$  de la glucokinase, est ici, plus importante que celle de l'hexokinase.

**4** Sachant que la glycémie normale est d'environ 5 mmol/L, indiquer si chacune de ces deux enzymes agit dans les conditions d'obtention de la vitesse maximale.

Une glycémie normale est d'environ 5 mmol/L, soit aux alentours du  $K_m$  de l'hexokinase. Le  $K_m$  étant égale à la concentration en substrats pour  $V_{max}/2$ , dans ces conditions, la vitesse de réaction serait environ de  $V_{max}/2$ .

De même, cette valeur est très inférieure au  $K_m$  de la glucokinase. Ceci nous permet d'en déduire, que ces enzymes fonctionnent « au ralenti » dans ces conditions physiologiques.

**5** Quelle serait l'influence d'une augmentation importante de la glycémie ?

Si la glycémie augmente de manière importante, la vitesse de réaction devrait se rapprocher de la  $V_{max}$ .

De plus, le  $K_m$  de la glucokinase étant élevé, cela montre qu'elle agit de manière significative lorsque la concentration en glucose augmente.