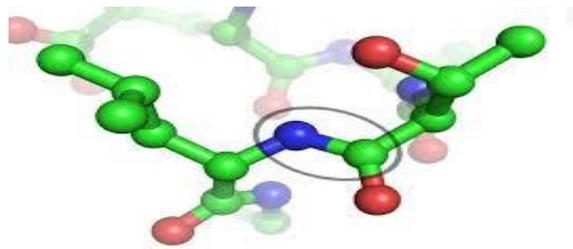




République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministre de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université Larbi Tébessi-Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la
Vie
Département de biologie appliquée

Matière

Enzymologie fondamentale



Support pédagogique destiné aux étudiants
de niveau Master 1

Spécialité «Pharmacotoxicologie».

Fait par *Dr.Nadia DJERMANE*



Année universitaire : 2022-2023

Contenu de la matière

Contenu de la matière

Introduction

Liste de tableaux et de figures

Chapitre 1 : Structure et propriétés des enzymes

1.1. Définitions.....	01
1.1.1. L'enzymologie.....	01
1.1.2. Les enzymes.....	01
1.2. Structure des enzymes.....	02
1.2.1. Structure primaire.....	02
1.2.2. Structure secondaire.....	02
1.2.3. Structure tertiaire.....	03
1.2.4. Structure quaternaire.....	03
1.3. Propriétés générales des enzymes.....	04
1.4. Classification des enzymes.....	05
1.5. Site actif des enzymes.....	07
1.6. Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat.....	08
1.6.1. Modèle de Fischer : Clef –serrure.....	09
1.6.2. Modèle de Koshland.....	09
Evaluation	10

Chapitre 2 : Cinétique enzymatique à un substrat

2.1. Définition de la cinétique enzymatique.....	12
2.2. Les phases de la réaction enzymatique.....	12
2.3. La vitesse d'une réaction enzymatique.....	13
2.3.1. La vitesse d'une réaction dépend de l'enzyme.....	13
2.3.2. La vitesse d'une réaction dépend de substrat.....	14
2.4. Cinétique michaelienne (Hypothèse de Michaelis et Menten).....	15
2.4.1. La constante de Michaelis-Menten (K_m).....	16
2.4.2. L'équation de Michaelis-Menten.....	17
2.4.3. Analyse de la courbe définie par l'équation de Michaelis-Menten.....	18
2.4.4. Méthode de détermination de la constante de Michaelis et Menten.....	19
2.4.4.1. Méthode arithmétique.....	19
2.4.4.2. Méthode graphique.....	20
a.Méthode graphique de Line weaver et Burk.....	20

b.Méthode graphique d'Eadie Hofstee.....	20
c.Méthode graphique de DIXON.....	21
2.5. Définition des unités enzymatiques.....	21
2.6. Les facteurs influençant la réaction enzymatique.....	22
2.6.1. Les facteurs physiques.....	22
2.6.1.1. Le PH.....	22
2.6.1.2. La température.....	22
2.6.2. Les inhibiteurs.....	23
2.6.2.1. Définition.....	23
2.6.2.2. Intérêts.....	23
2.6.2.3. Types des inhibiteurs.....	23
a.Inhibiteur irréversibles.....	23
b.Inhibiteur réversibles.....	24
b.1.Inhibiteur compétitif.....	24
b.2.Inhibiteur non compétitif.....	25
b.3.Inhibiteur incompétitif.....	27
<i>Evaluation</i>	29
<i>Chapitre 3 : Les enzymes allostériques</i>	
3.1. Définitions.....	33
3.1.1. L'allostérie.....	33
3.1.2. Les enzymes allostériques.....	33
3.2. Propriétés générales des enzymes allostériques.....	33
3.3. Importances des enzymes allostériques.....	34
3.4. Régulation de l'activité enzymatique.....	34
3.5. Action des effecteurs allostériques.....	35
3.6. Cinétiques des enzymes allostériques.....	36
a. Le modèle concerté de J.Monod.....	37
b. Le modèle séquentiel de D.koshland.....	37
<i>Evaluation</i>	38
<i>Chapitre 4 : Cinétique enzymatique à deux substrats</i>	
4.1. Caractéristiques.....	41
4.2. Classes.....	41
4.2.1. Réactions à simple déplacement.....	41
4.2.1.1. Mécanisme bibi ordonné.....	42

4.2.1.2. Mécanisme bi-bi aléatoire.....	44
4.2.2. Réactions à double déplacement.....	50
4.2.2.1. Mécanisme Ping-Pong.....	50
4.2.2.2. Cas où le substrat ne forme pas de complexe avec l'enzyme.....	53
Evaluation	55
Chapitre 5 : Applications des enzymes en biotechnologie	
5.1. Définition de la biotechnologie.....	57
5.2. Applications des biotechnologies.....	57
5.2.1. Biotechnologie rouge.....	57
5.2.1.1. Définition.....	57
5.2.1.2. Applications des enzymes dans la biotechnologie rouge.....	58
5.2.2. Biotechnologie verte.....	58
5.2.2.1. Définition.....	58
5.2.2.2. Applications des enzymes dans la biotechnologie verte.....	58
5.2.3. Biotechnologie jaune.....	60
5.2.3.1. Définition.....	60
5.2.3.2. Applications des enzymes dans la biotechnologie jaune	60
5.2.4. Biotechnologie Blanche.....	61
5.2.4.1. Définition.....	61
5.2.4.2. Applications des enzymes dans la biotechnologie blanche.....	61
5.2.5. Biotechnologie bleue : ou biotechnologie marine.....	62
5.2.5.1. Définition.....	62
5.2.5.2. Applications des enzymes dans la biotechnologie marine.....	62
Références	64

Introduction

Introduction

Les organismes vivants sont le siège de nombreuses réactions biochimiques très diverses. Ces réactions s'effectuent dans des conditions physico-chimiques ($T = 37\text{ °C}$, $\text{pH} = 7$) telles que, sans l'intervention de certaines macromolécules, elles ne s'effectueraient pas dans une échelle de temps compatible avec les processus biologiques, donc avec la vie de la cellule.

Ces processus biologiques extrêmement complexes ont malgré tout lieu très rapidement. En effet, les réactions biochimiques qui sont les éléments de base de ces processus sont catalysées par des macromolécules biologiques aux propriétés particulières : les enzymes (**Jaspard.E., 2019**). Ils ont un pouvoir catalytique de 10^6 à 10^{12} fois supérieur aux réactions spontanées et interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction. Les catalyseurs enzymatiques ne sont pas consommés et sont restitués en fin de réaction. Ce sont toujours des macromolécules protéiques associées éventuellement à des cofacteurs de petite taille (**Benkahoul.M., 2017**).

Ce cours, qui contient plusieurs figures, tableaux, encadrés, et schémas réactionnels, décrit les aspects fondamentaux de la cinétique enzymatique. La plupart de ces notions sont illustrées à la fin par des exercices.

Objectifs de l'enseignement :

- Acquérir des connaissances sur les principaux termes d'enzymologie : enzyme, substrat, produit, coenzyme, Site actif, activateur, inhibiteur, réaction enzymatique, vitesse initiale, vitesse maximum, constante de MICHAELIS...
- Etudier la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration de l'enzyme, et de la concentration du substrat, en représentation normale ou en double inverse.
- Etudier la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du pH et de la température.
- Etudier la cinétique enzymatique en présence d'un inhibiteur en expliquant les effets de cet inhibiteur sur les paramètres de la réaction.
- Etudier les modes de régulation de l'activité enzymatique, en particulier l'allostérie et la fixation coopérative d'effecteurs.
- Etudier la cinétique enzymatique à deux substrats.

- Donner des exemples sur l'application des enzymes en biotechnologie, en particulier dans le domaine pharmaceutique.

Liste de tableaux et de figures

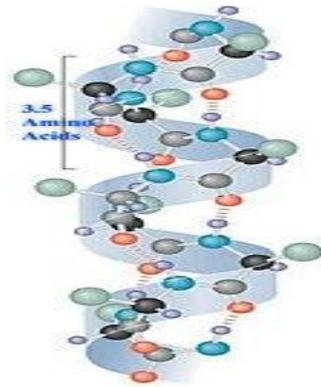
Liste de tableaux

N°	Titre	Page
01	Classe des enzymes	06
02	La nomenclature de quelques enzymes	06
03	Valeurs de Km pour quelques enzymes	17
04	Quelques utilisations des enzymes dans la production alimentaire	59

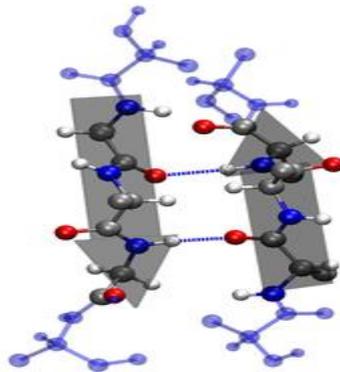
Liste de figures

N°	Titre	Page
01	La glycogène phosphorylase	01
02	La glucose-6-phosphate isomérase	02
03	Structure primaire	02
04	Structure secondaire	02
05	Structure tertiaire	03
06	Structure quaternaire	03
07	Exemple de cofacteur	04
08	Site actif de trypsine	07
09	Représentation schématique des parties du principe actif	07
10	Représentation schématique du principe actif	08
11	Représentation du Mécanisme d'action E-S (Modèle de Fischer)	09
12	Représentation du Mécanisme d'action E-S (Modèle de Koshland)	09
13	Les étapes de la réaction enzymatique	12
14	Variation de la concentration en produit en fonction du Temps	13
15	Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'Enzyme	14
16	La concentration du produit formé en fonction de la concentration de l'enzyme	14
17	Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat	15
18	La concentration du produit formé en fonction de la concentration du substrat	15
19	Schéma d'action-enzymatique sur un substrat	16
20	Dépendance de la vitesse initiale vis-à-vis de la concentration S pour une réaction obéissant à l'équation de Michaelis-Menten	19
21	Graphique de $1/V_i$ en fonction de $1/S$ (Représentation de LINEWEAVER-BURK)	20
22	Graphiques V_i en fonction de V/S (Représentation d'EADIE-HOFSTEE)	20
23	Graphiques S/V_i en fonction de S (Représentation de DIXON)	21
24	Influence du PH sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique	22
25	Influence de la température sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique	23
26	Inhibiteur compétitif	24
27	Représentation de la cinétique enzymatique en présence d'un inhibiteur compétitif (selon LINEWEAVER-BURK)	25
28	Inhibiteur non compétitif	26
29	Représentation de la cinétique enzymatique en présence d'un inhibiteur non compétitif (selon LINEWEAVER-BURK)	27

30	Inhibiteur incompétitif	27
31	Représentation de la cinétique enzymatique en présence d'un inhibiteur incompétitif (selon LINEWEAVER-BURK)	28
32	Modèle de régulation des enzymes allostériques	35
33	Courbe sigmoïde caractéristique d'un enzyme allostérique	35
34	Types de cinétique de saturation des enzymes par le substrat	36
35	Modèle concerté de J.Monod	37
36	Modèle séquentiel de D.koshland	38
37	Schéma d'action-enzymatique sur deux substrats	41
38	La malate déshydrogénase	42
39	Cinétique enzymatique selon le mécanisme ordonné ou séquencé (bi-bi- ordonné).	43
40	Cinétique enzymatique selon le mécanisme ordonné ou séquencé (bi-bi- ordonné).	44
41	La créatine phosphokinase	45
42	Cinétique enzymatique selon le mécanisme au hasard ou non ordonné (bi-bi aléatoire) avec fixation dépendante (Représentation $1/V=(1[B])$)	46
43	Cinétique enzymatique selon le mécanisme au hasard ou non ordonné (bi-bi aléatoire) avec fixation dépendante (Représentation $1/V=(1[A])$)	47
44	Représentation primaire $1/V=f(1/A)$	48
45	Représentation primaire $1/V=f(1/B)$	49
46	Représentation secondaire $1/V=f(1/B)$	49
47	Alanine aminotransférase	50
48	Représentation secondaire $1/V_A=f(1B)$	52
49	Représentation secondaire $1/V_A=f(1B)$	52
50	Représentation primaire $1/V=f(1/B)$	53
51	Représentation secondaire $1/V_B=f(1/A)$	53
52	Les cinq couleurs des biotechnologies	57



Chapitre I : Structure et propriétés des enzymes



1.1. Définitions

1.1.1. L'enzymologie

L'Enzymologie n.f (1890, d'enzyme, et du gr. logos, discours). (Enzymology) Branche de la biochimie qui étudie les propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes. Elle s'intéresse aussi à décrire la vitesse des réactions catalysées par les enzymes, c'est-à-dire la cinétique enzymatique (**Forêt.R., 2018**).

1.1.2. Les enzymes

Les enzymes sont des substances qui catalysent des réactions biochimiques du métabolisme de l'être vivant qui les produits (Biocatalyseurs), en agissant en quantité infime et sans être modifiées par la réaction. Il s'agit de protéines globulaires douées d'activité catalytique spécifique. (**Forêt.R., 2012**).

Exemples :

Exp1. Phosphorylase : fixe l'acide phosphorique sur les sucres

La glycogène phosphorylase : phosphorylase de la glycogénolyse responsable de la dégradation du glycogène en Glu-1-phosphate, première étape de la transformation du glycogène en glucose :

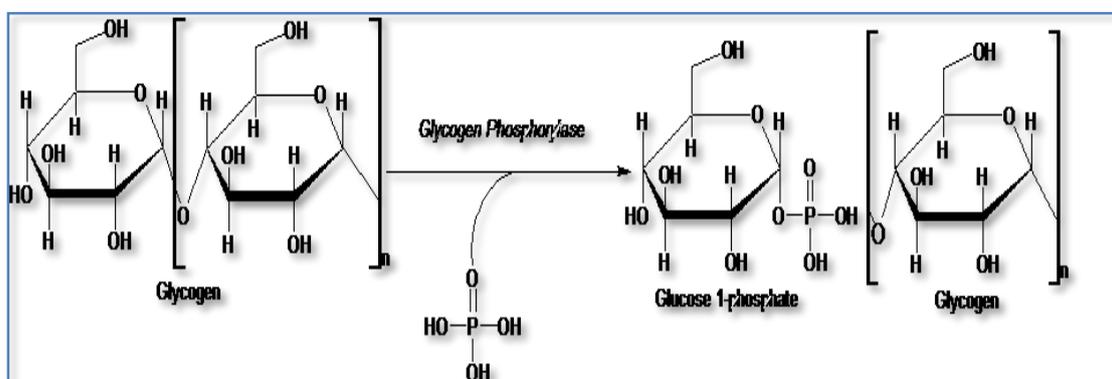


Figure 1 : La glycogène phosphorylase (**Ghouali.MA., 2017**)

Exp2. Isomérase : Transforment une molécule en son isomère

La glucose-6-phosphate isomérase (GPI) : Isomérase qui catalyse la réaction de réarrangement intramoléculaire entre le D-glucose-6-phosphate et le D-fructose-6-phosphate.

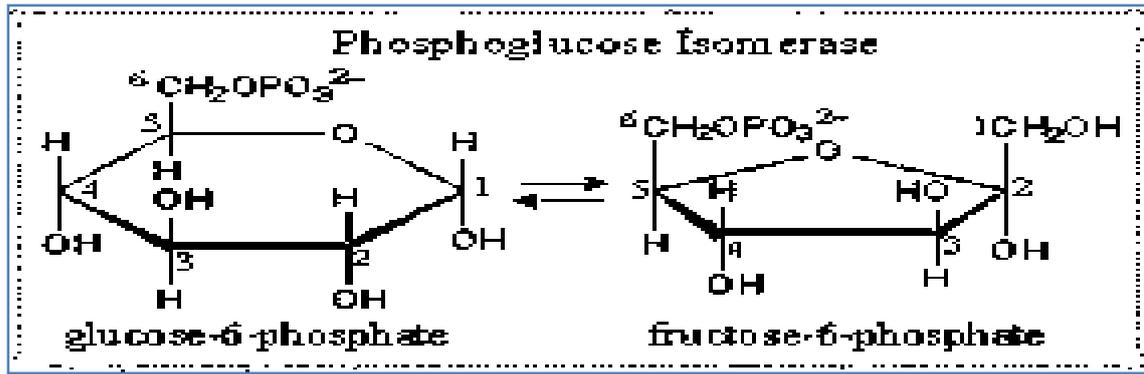


Figure 2 : La glucose-6-phosphate isomérase (Ghouali.MA., 2017)

1.2. Structure des enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires, elles adoptent plusieurs degrés d'organisation :

1.2.1. Structure primaire : se définit par la séquence en acides aminés

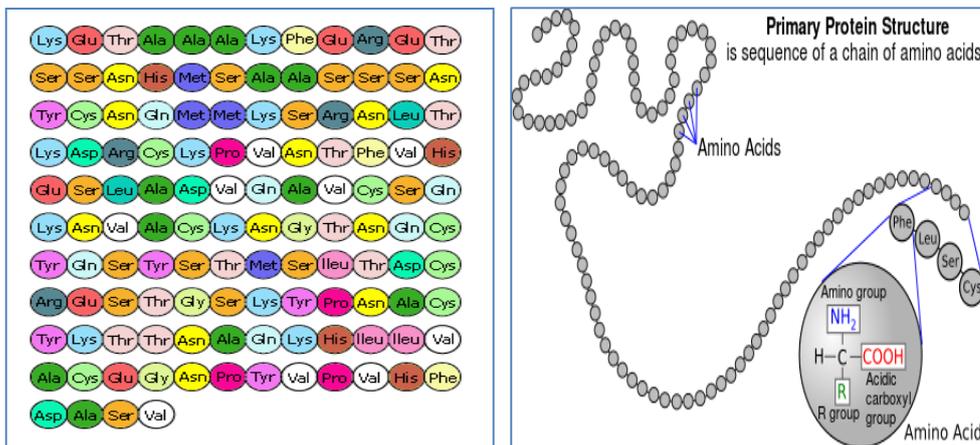
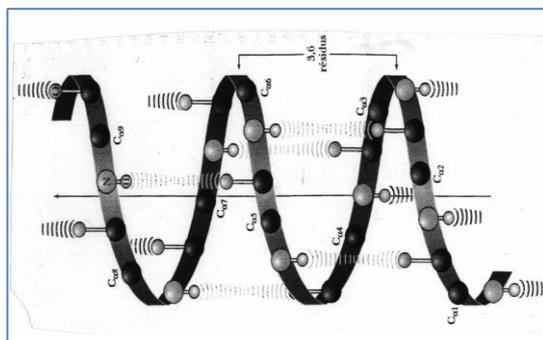


Figure 3 : Structure primaire

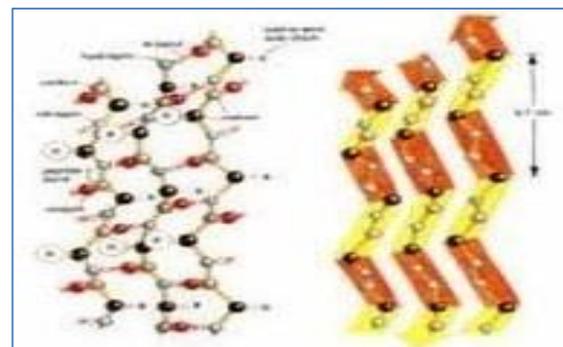
(<https://www.maxicours.com/se/cours/la-structure-des-enzymes/>)

https://en.wikiversity.org/wiki/Enzyme_structure_and_function

1.2.2. Structure secondaire : La séquence en acides aminés subit des repliements pour former des motifs (hélices α feuillet β)



Forme d'hélices α



Forme de feuillet β

Figure 4: Structure secondaire (Ghouali.MA., 2017)

Chapitre 1 : Structure et propriétés des enzymes

1.2.3. Structure tertiaire : Former par l'association de plusieurs motifs, donnant une forme spatiale à la protéine.

Cette organisation entraîne une localisation :

- Des acides aminés polaires en surface externe
- Les acides aminés non polaires vers l'intérieur de la molécule (zone hydrophobe interne)

C'est au niveau de cette zone que se situe le site actif d'une enzyme

Pour qu'une enzyme soit fonctionnelle, il faut qu'elle adopte une structure tertiaire.

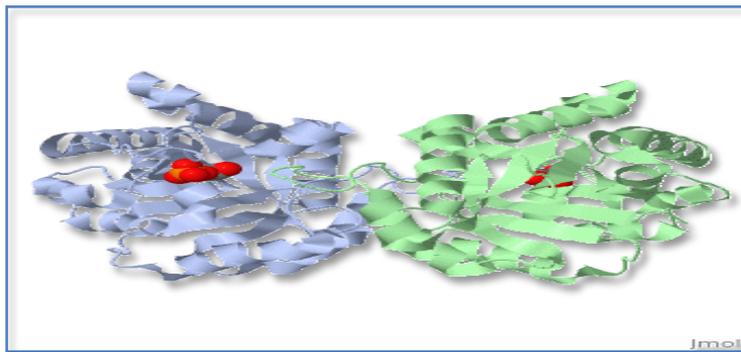


Figure 5 : Structure tertiaire-Dimère de Triose-phosphate isomérase-
https://proteopedia.org/wiki/index.php/Triose_Phosphate_Isomerase

1.2.4. Structure quaternaire : Association de plusieurs chaînes protéiques

- Une chaîne : monomère
- Plusieurs chaînes : oligomère

Cette structure est adoptée par les enzymes régulatrices

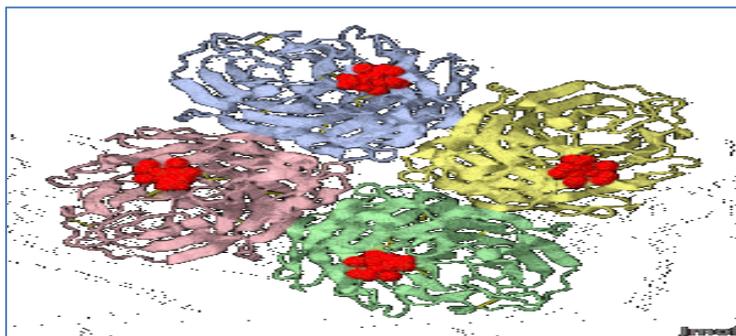


Figure 6 : Structure quaternaire- Avian Influenza Neuraminidase-
https://proteopedia.org/wiki/index.php/Main_Page

Certaines enzymes sont actives par eux-mêmes, sans autre groupes fonctionnels ; d'autres au contraire nécessitent la présence d'un composé non protéique : Co-facteur

Le co-facteur est soit :

- Un ion métallique appelé activateur (Fe^{+2} , Mg^{+2}).
- Molécule organique : appelée co-enzyme

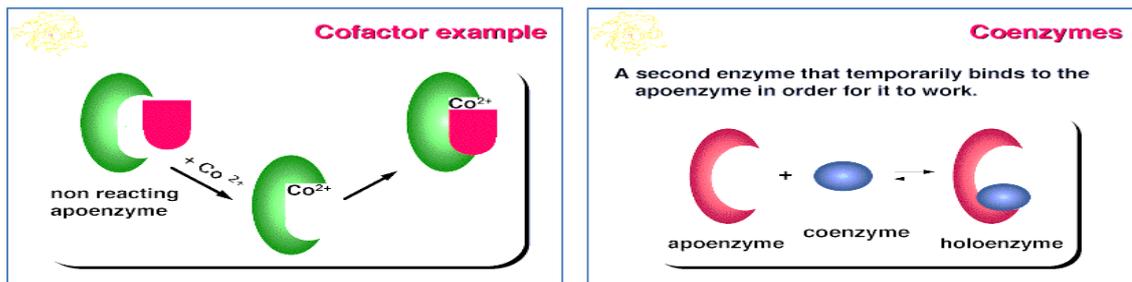


Figure7 : Exemple de cofacteur (DJENANE N, 2019)

1.3. Propriétés générales des enzymes

Les enzymes possèdent des caractéristiques qui les rendent uniques (Tripathi.A.D., 2022) :

- Toutes les enzymes sont des protéines
- Les protéines enzymatiques sont des catalyseurs, c'est-à-dire qu'en agissant à des concentrations très petites, elles augmentent la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat.
- A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée.
- La spécificité de substrat est variable,
 - ✓ Certaines enzymes ont une spécificité **absolue** ; transformant un substrat unique en un produit unique par exemple : **Glucokinase** : phosphoryle que le glucose
 - ✓ D'autres ont une spécificité **plus large**, transformant le substrat d'une classe de substrat en autant de produits par exemple : **Hexokinase** : phosphoryle divers hexoses, dont le glucose
- Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes corps chimiques initiaux, par exemple :
 - ✓ **Kinases** : Ne catalysent que les réactions de phosphorylation en présence d'ATP
 - ✓ **Décarboxylases** : catalysent la décarboxylation des molécules contenant un groupement carboxyle
- Régulation de leurs activités catalytique: L'activité d'une enzyme est contrôlée par des modulateurs Ce qui permet d'ajuster la vitesse globale d'un métabolisme au besoin cellulaire.
 - ✓ Les activateurs augmentent l'activité.

Chapitre 1 : Structure et propriétés des enzymes

✓ Les inhibiteurs la diminuent.

Exemple : La phosphofructokinase est activée par l'AMP et inhibée par l'ATP.

- Cette modulation active ou inhibe la glycolyse selon que la charge énergétique est faible ou élevée.
- Les protéines enzymatiques sont synthétisées par des êtres vivants. Cette synthèse est déterminée génétiquement : sa conservation dans le génome est favorisée par le besoin qu'éprouve cet être vivant de faire cette réaction.

1.4. Classification des enzymes

Le nom des premiers enzymes rappelait l'organe ou ils avaient été découverts (exp : *pepsine*, de pepsis « digestion»). Puis, comme un organe recèle plusieurs enzymes et qu'un enzyme se trouve dans plusieurs organes, on a formé leur nom sur celui du substrat de la réaction catalysée, suivi de la désinence *ase*, comme diastase (*peptidase*). Puis, comme un substrat est commun à plusieurs enzymes, on a formé leur nom sur celui du substrat et du type de réaction catalysée, suivi de la désinence *ase* (exp : *Lactate déshydrogénase*).

Plus de 2000 enzymes plus tard, en 1961, l'Union internationale de biochimie, décidée à mettre fin à la confusion de ce que l'on appelé la «phénoménase nomenclature», a édicté les règles de classification et de dénomination des enzymes, tenant compte de leur spécificité d'action et de leur spécificité de substrat.

A chaque enzyme est attribué un nom systématique qui identifie substrat et réaction catalysée, et un numéro de classification à quatre chiffres précédé de la mention EC (Enzyme commission). (**Moussard.C., 2020**).

A chaque enzyme est attribué un numéro à 4 chiffres et un nom systématique qui identifie la réaction catalysée

Le premier chiffre signe l'appartenance à l'une de 6 classes d'enzymes (**Tableau1**).

Chapitre 1 : Structure et propriétés des enzymes

Tableau 1: Classe des enzymes

Classe (N°)	Classe (Nom)	Mécanisme réactionnel
EC1	Oxydoréductase	assure une oxydoréduction
EC2	Transférase	assure un simple transfert
EC3	Hydrolase	assure une hydrolyse
EC4	Lyase	assure une addition sur une double liaison
EC5	Isomérase	assure une réaction d'inter conversion d'isomères
EC6	Ligase ou synthétase	catalyse les réactions de création de liaisons (C-C/ C-N / C-S)

Le second chiffre signe l'appartenance à une sous-classe 1, la sous-classe indique la nature du donneur d'électrons : groupement -C-OH (sous-classe 1), groupement -CHO ou -CO (sous-classe 2), etc. Dans la classe 2, la sous classe indique la nature du groupement transféré. Dans la classe 3, la sous-classe indique la nature de la liaison hydrolysée. Dans la classe 4, la sous classe indique la nature de la liaison coupée. Dans la classe 5, la sous-classe indique le type d'isomérisation. Dans la classe 6, la sous-classe indique la nature de la liaison créée.

Le troisième chiffre signe l'appartenance à une sous-sous classe. Par exemple dans la classe 1 et la sous classe 1, la sous-sous classe 1 indique la nature de l'accepteur d'électrons.

Le quatrième chiffre est un numéro d'ordre dans la sous-sous classe considérée. (Moussard.C., 2020).

Exemple :

Tableau2: La nomenclature de quelques enzymes (Tripathi.A.D., 2022)

Common name of an enzyme	EC number
Hexokinase	EC 2.7.1.1.
Lactase déshydrogénase	EC 1.1.1.27
Alpha-amylase	EC 3.2.1.1
Pectinase	EC 3.2.1.15
Lipase	EC 3.1.1.3
Invertases	EC 3.2.1.26
Xylanase	EC 3.2.1.8
Alcohol déshydrogénase	EC 1.1.1.1
Maltase	EC 3.2.1.20

1.5. Site actif des enzymes

Le site actif est une zone privilégiée, qui a la forme d'une cavité, situé dans la zone hydrophobe de la protéine, au niveau de laquelle s'exerce électivement le pouvoir catalytique de l'enzyme.

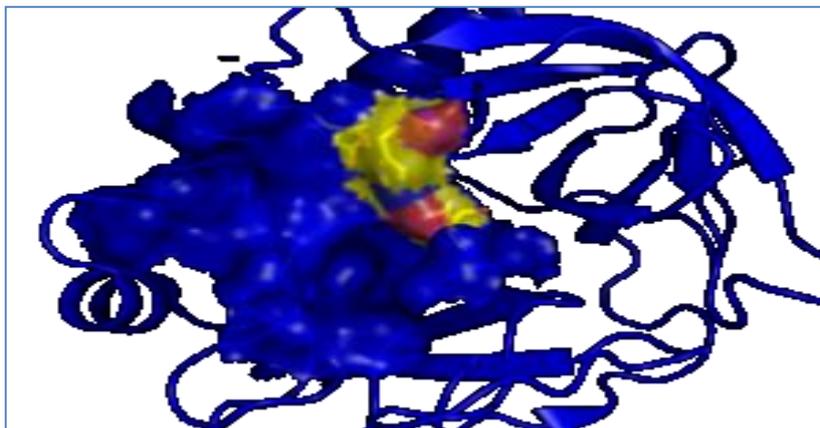


Figure 8: Site actif de trypsine

https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Fichier:Trypsin_active_site.png

Le site actif est subdivisé en 2 parties :

a.Site de liaison, fixation, et reconnaissance :

Reconnait la complémentarité de forme avec un substrat spécifique de l'enzyme

b.Site catalytique :

Permet la réaction transformant le substrat en produit (Ghouali.MA., 2015)

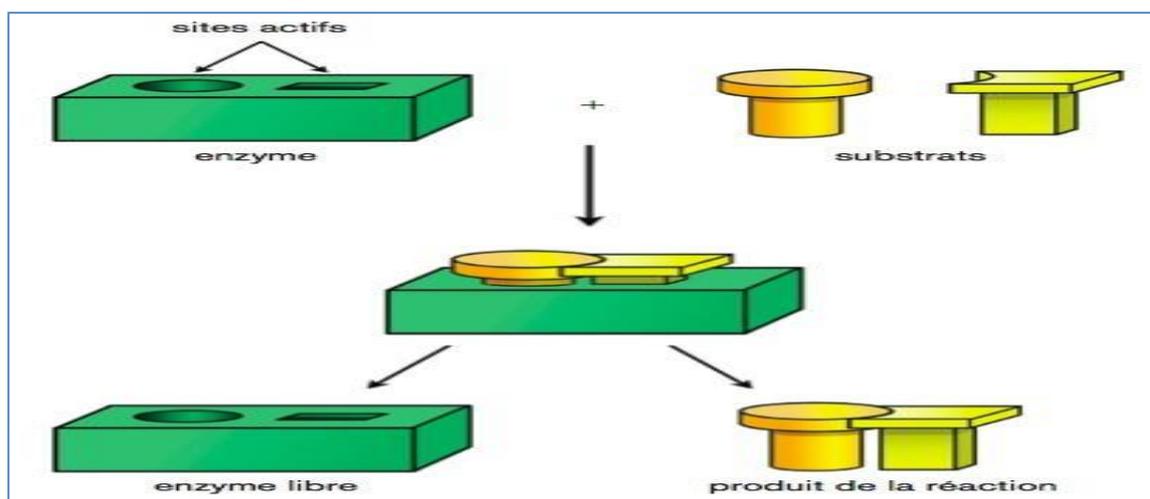


Figure 9: Représentation schématique des parties du principe actif

<https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=54284#>

Il comprend 3 types d'acides aminés :

a. Acides aminés contributeurs :

Chapitre 1 : Structure et propriétés des enzymes

Permettent à la protéine enzymatique d'adopter une conformation spatiale pour que le ligand puisse s'adapter à la protéine

b. Acides aminés auxiliaires :

Assurent la mobilité des zones situées au voisinage du centre actif.

c. Acides aminés de contact :

Lieu de la réaction enzymatique

Fait intervenir des groupements particuliers de ces acides aminés de contact, qui interagissent avec un ou plusieurs groupements particuliers du substrat.

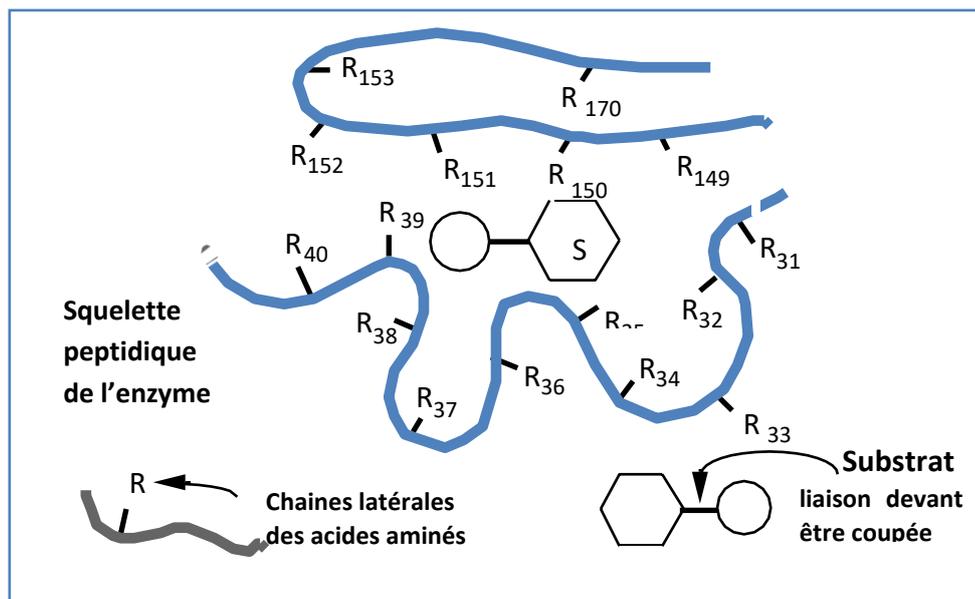


Figure 10: Représentation schématique du principe actif (Denis.M, 2007).

1.6. Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat

La réaction enzymatique fait appel à la fixation du substrat au site actif, ce dernier doit être dans une conformation spatiale telle que, le substrat puisse s'y fixer, il existe différents types de modèle de fixation par exemple :

1.6.1. Modèle de Fischer : Clef –serrure

Dans ce modèle, la formation du complexe Enzyme-substrat (ES) nécessite une interaction entre un ou plusieurs groupes fonctionnels ou domaines du substrat avec les motifs de la cavité enzymatique

Ce modèle explique la spécificité de l'enzyme pour son substrat et non pas les effets des effecteurs.

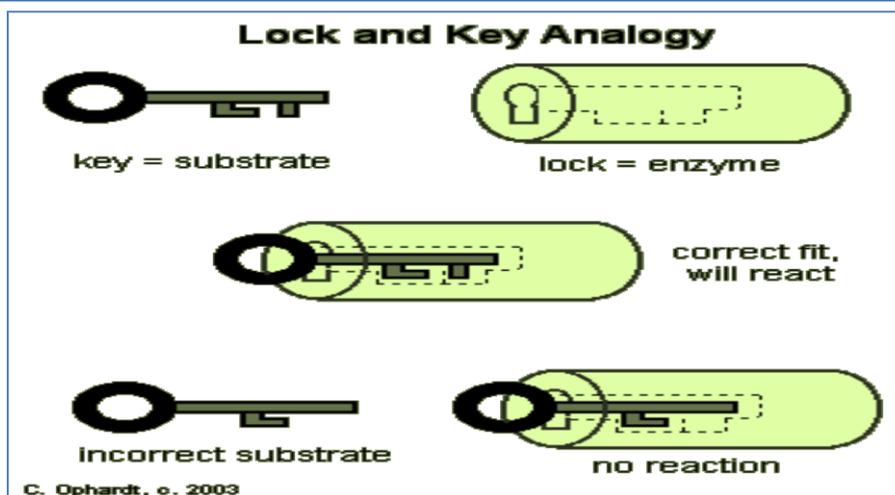


Figure11 : Représentation du Mécanisme d'action E-S (Modèle de Fischer) (Ghouali.MA, 2017)

1.6.2.Modèle de Koshland

Ce modèle est connu sous le nom d'ajustement induit (induced-fit, et est illustrée dans la figure, l'ajustement induit l'association enzyme-substrat et permet après une modification de la conformation de l'enzyme induite par l'entrée partielle du substrat.

Dans ce modèle, l'enzyme est sélectionnée spécifiquement pour son substrat, non sur la base d'une complémentaire statique entre l'enzyme et le substrat, mais en agissant comme des pinces qui renferment pour piéger le substrat. L'enzyme devient actif uniquement dans sa forme fermée impliquant une régulation de l'activité par la fixation du substrat. (Cornish-Bowden et al., 2004).

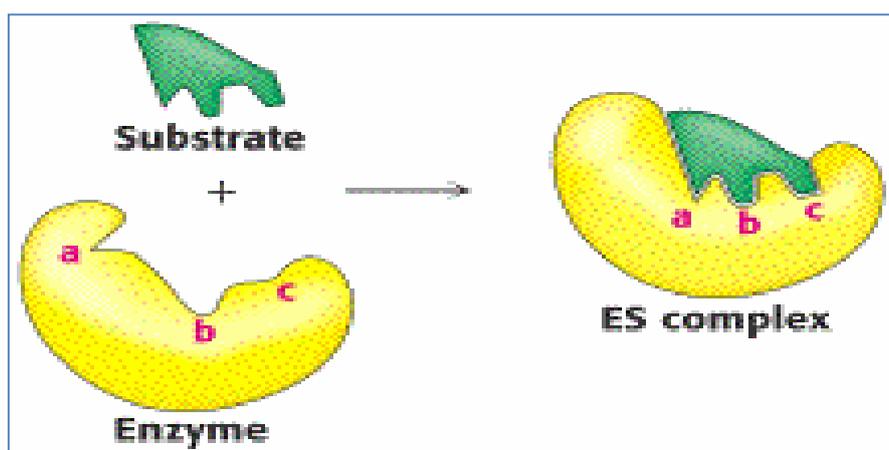


Figure 12 : Représentation du Mécanisme d'action E-S (Modèle de Koshland) (MA.GHOUALI., 2017).

Evaluation

Questions

1. Cochez la définition vraie se rapportant aux enzymes

- a) Les enzymes sont des transporteurs des molécules
- b) Les enzymes sont des catalyseurs de réactions

2. Les enzymes sont:

- a) Des glucides
- b) Des lipides
- c) Des protéines

3. Les enzymes ont toujours une structure protéique

- a) Vrai
- b) Faux

4. La catalyse biologique est assurée exclusivement par des enzymes-protéines catalytiques

- a) Vrai
- b) Faux

5. Les enzymes sont modifiées (ou détruites) par la réaction de transformation d'un substrat en produit

- a) Vrai
- b) Faux

6. Le site actif des enzymes est nécessairement spécifique d'un seul substrat

- a) Vrai
- b) Faux

7. Le site actif des enzymes est constitué de quelques acides aminés rapprochés par le repliement.

- a) Vrai
- b) Faux

8. La fixation du substrat sur les acides aminés du site actif des enzymes est réalisée par des liaisons faibles

- a) Vrai
- b) Faux

9. Une enzyme qui a une spécificité large:

- a) produit différents produits à partir d'un même substrat

- b) reconnaît de nombreux substrats
- c) catalyse différents type de réactions chimiques

10. Le site de fixation du substrat est responsable:

- a) de la masse de l'enzyme.
- b) de la capacité de catalyse de l'enzyme
- c) de la spécificité de l'enzyme

11. Le site de fixation:

- a) Contient des acides aminés capables de reconnaître le substrat.
- b) Copie la forme du substrat pour le reconnaître.
- c) Est complémentaire du substrat.

12. Le site catalytique est:

- a) Différent du site de fixation.
- b) Capable de reconnaître le substrat pour assurer la catalyse.
- c) Regroupe une grande partie des acides aminés de l'enzyme

13. Le site de fixation du substrat est responsable de :

- a) La masse de l'enzyme.
- b) La capacité de catalyse de l'enzyme
- c) La spécificité de l'enzyme

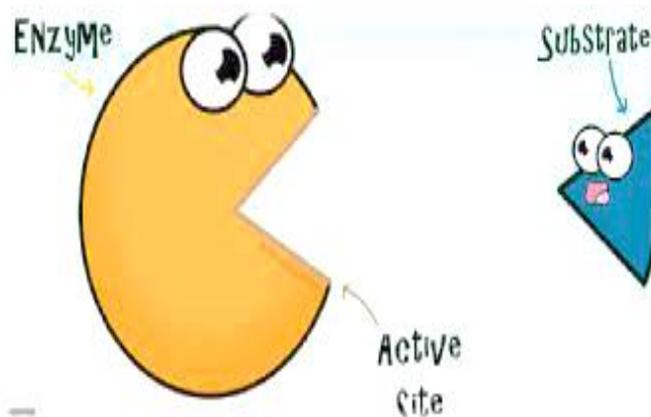
14. Le site de fixation du substrat:

- a) Prend une grande proportion de l'enzyme.
- b) Représente une petite zone de l'enzyme.
- c) Est formé par des acides aminés éloignés sur la structure primaire de l'enzyme

15. Les acides aminés qui ne composent pas les sites catalytiques et de liaison sont:

- a) Impliqués dans une partie de la catalyse.
- b) Sont responsable de la bonne conformation des sites de l'enzyme.
- c) Sont inutiles.

Chapitre2. Cinétique enzymatique à un substrat



2.1. Définition de la cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique c'est une branche de la cinétique chimique et, par conséquent elle obéit aux mêmes lois. (De Donald Voet et Judith G. Voet, 2016).

C'est l'étude des vitesses de réactions et de leurs modifications, en réponse aux changements des conditions expérimentales (Arhab.R., 2009).

2.2. Les phases de la réaction enzymatique

La réaction enzymatique peut se diviser en trois principales phases :

2.2.1. Phase Prés- stationnaire (t_0-t_1)

Caractéristique :

- ✓ Enzyme mise en présence d'excès de substrat
- ✓ Combinaison E-S très rapide

2.2.2. Phase Stationnaire (t_1-t_2) ou phase de la vitesse initiale

Caractéristique :

- ✓ Enzyme saturée par le substrat
- ✓ Combinaison ES est à concentration maximale constante
- ✓ Vitesse de la réaction est constante : **Vitesse initiale** (Reste constante tant que le substrat est à concentration saturante de l'enzyme)

2.2.3. Phase Post-stationnaire (t_2-t_∞)

Caractéristique :

- ✓ Diminution de S de manière significative au bout d'un temps plus au moins long selon l'enzyme.

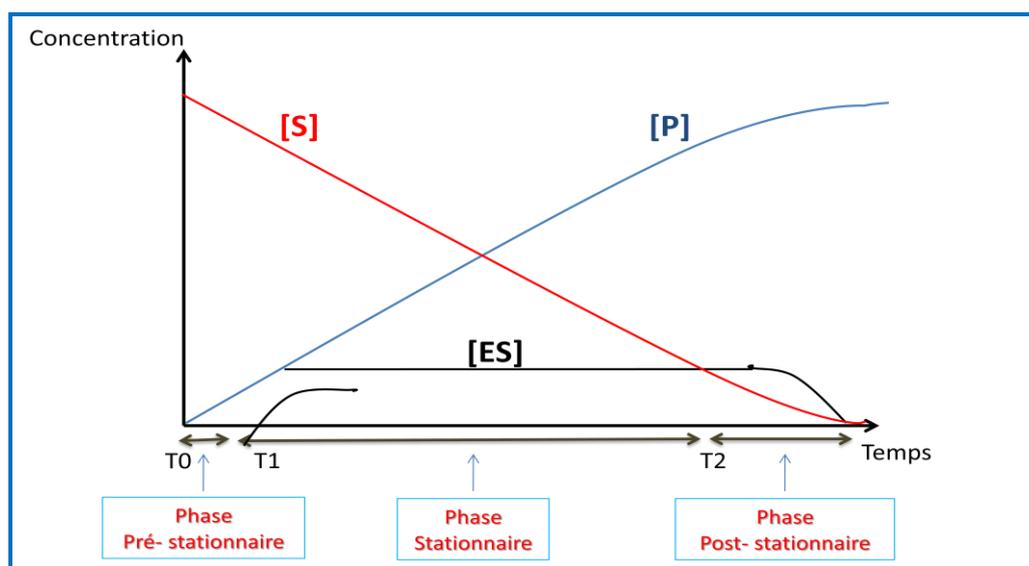


Figure 13 : Les étapes de la réaction enzymatique (Gouali.MA., 2017)

2.3. La vitesse d'une réaction enzymatique

L'étude cinétique d'une réaction enzymatique consiste en l'étude de **la vitesse de réaction** et de l'influence de différents paramètres susceptibles de la modifier.



S'exprime par :

La quantité de substrat métabolisé par unité de temps ou par la quantité de produit formé par unité de temps.

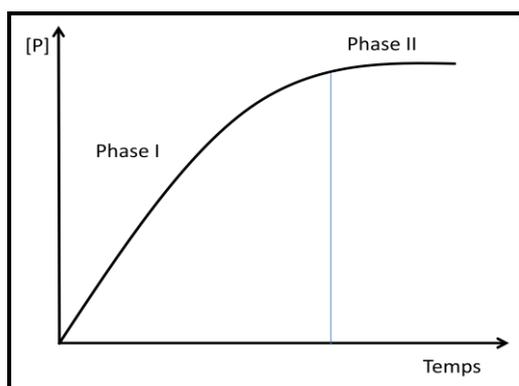
V : Vitesse de la réaction

$$V = - ds/dt = dp/dt = K [S]$$

K : constante de vitesse

[S] : Concentration de substrat

Dans les conditions optimales



Phase I: $V_0 = dP/dt$

Phase II: Inflexion de la droite par:

- Epuisement du substrat
- Inactivation de l'enzyme
- Formation d'une grande quantité de produits, susceptible de donner la réaction inverse

Figure14 : Variation de la concentration en produit en fonction du Temps

2.3.1. La vitesse d'une réaction dépend de l'enzyme

Si la concentration de substrat [S] est constante

Dans ces conditions, l'efficacité catalytique de l'enzyme est la plus grande, donc **la vitesse initiale** est la plus grande de toutes les vitesses qu'on peut mesurer en fonction des phases de la réaction.

NB : Durant la phase stationnaire, la vitesse est constante : on l'appelle vitesse initiale (**V_i** : vitesse de la réaction enzymatique au cours de la phase stationnaire ou le rapport **Concentration du complexe ES/Concentration totale de l'enzyme**, est maximum).

V_i est proportionnelle à la [E] dans un premier temps, puis elle demeure constante pour des concentrations enzymatiques plus élevées.

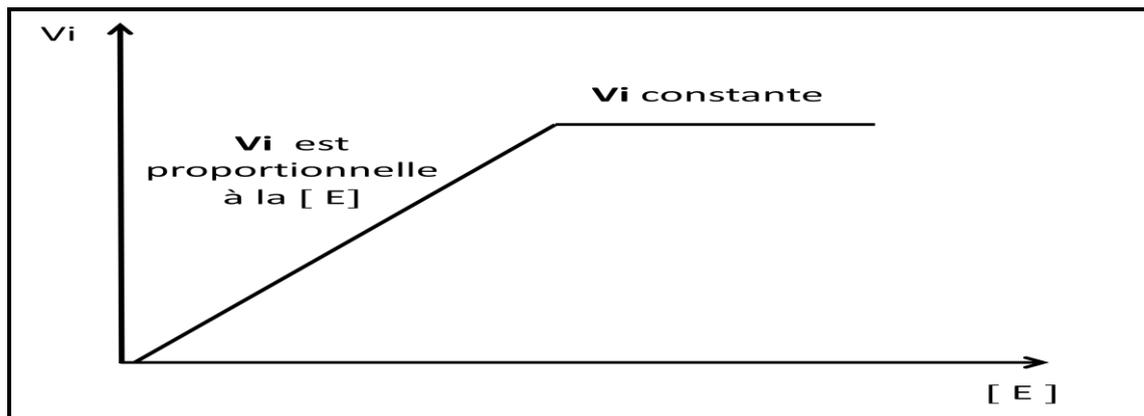


Figure 15: Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'Enzyme

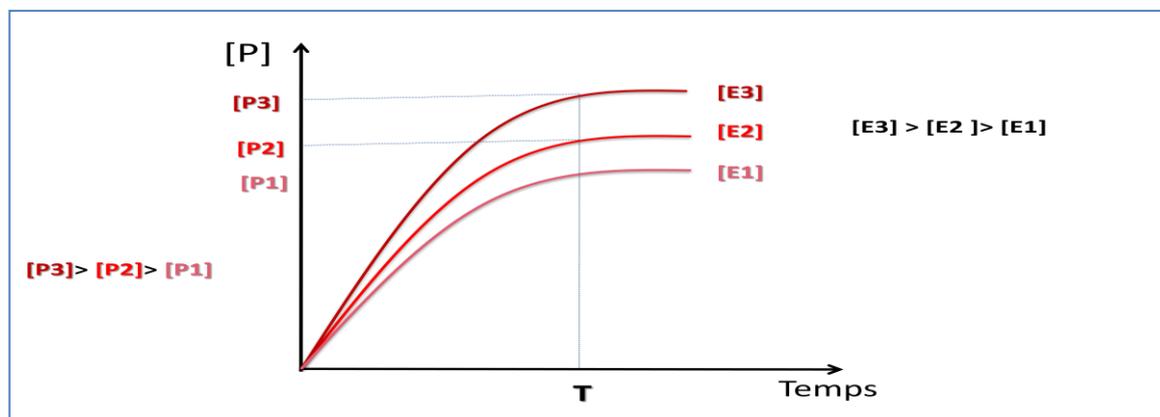


Figure 16: La concentration du produit formé en fonction de la concentration de l'enzyme

2.3.2. La vitesse d'une réaction dépend de Substrat

Si la concentration de l'enzyme $[E]$ est constante

Dans ces conditions, Les mesures de la concentration du produit en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations de substrat essayées. Lorsque la concentration du substrat est grande (par exemple S3) la vitesse initiale est plus grande que lorsque la concentration du substrat est petite (par exemple S1).

- On peut mesurer ces vitesses initiales en calculant la différence de concentration de produit au cours d'un temps donné, pour chaque concentration du substrat.

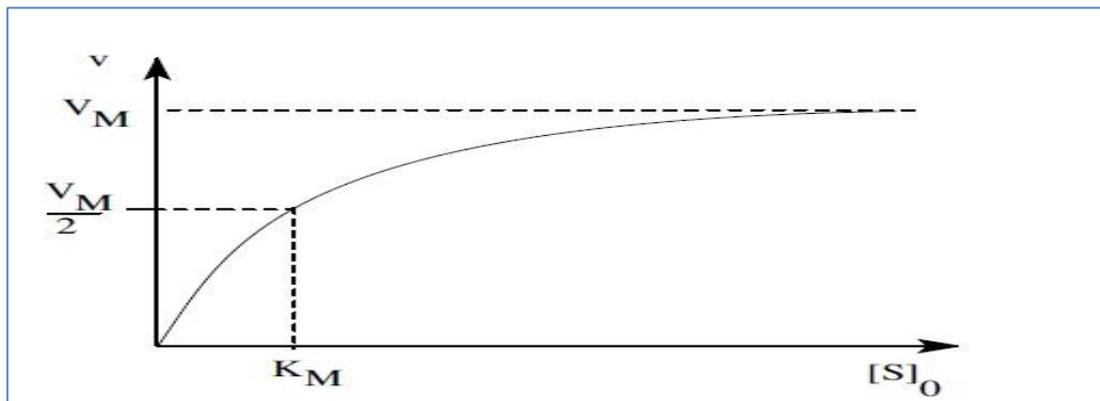


Figure 17: Variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat

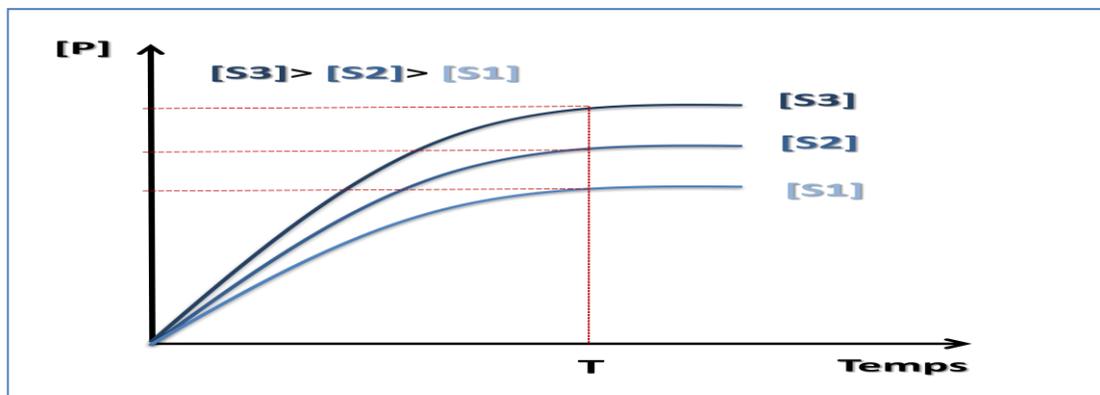


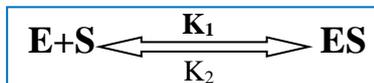
Figure 18: La concentration du produit formé en fonction de la concentration du substrat

2.4. Cinétique michaélienne (Hypothèse de Michaelis et Menten)

En 1913, MICHAELIS et MENTEN ont établi l'équation d'une réaction enzymatique.



Etape1 : Formation du complexe ES : (Etape rapide est réversible)



Etape2 : Dissociation du complexe ES : (Etape irréversible, Disparition de S, Apparition de P, Régénération de E)



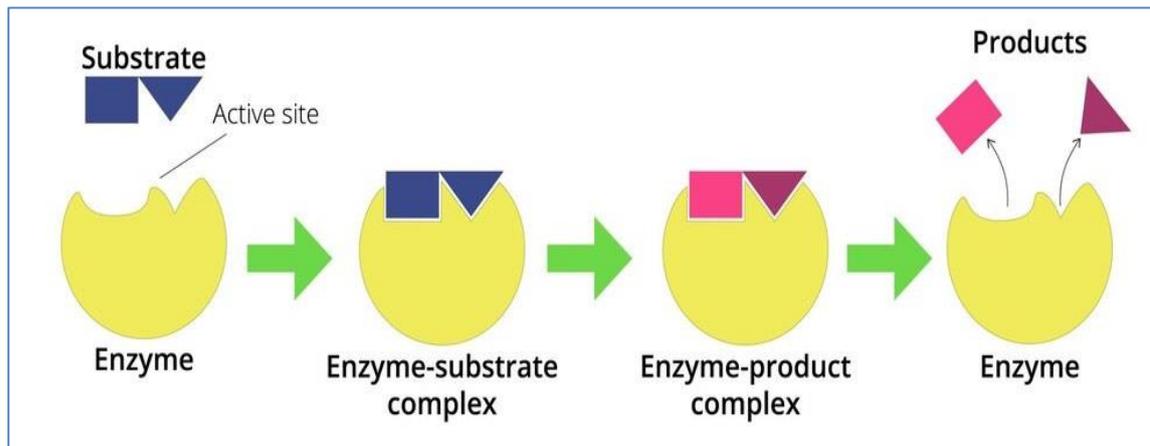


Figure19 : Schéma d'action-enzymatique sur un substrat

https://fr.freepik.com/vecteurs-premium/schema-action-enzymatique-substrat-illustration-vectorielle-illustration-didatique_29211803.htm

2.4.1. La constante de Michaelis-Menten (K_m)

Concentration du substrat pour laquelle la vitesse initiale (V_i) d'une réaction enzymatique est atteinte la moitié de la vitesse maximum (V_m).

- ✓ K_m est spécifique pour chaque enzyme
- ✓ Elle représente la traduction de l'affinité de l'enzyme pour le substrat.
- ✓ Elle est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Suivant la réaction enzymatique :

La vitesse de disparation de substrat et égale à la vitesse de l'apparition de produit.

$$-dS/dt = dP/dt$$

D'après la loi d'action des masses on a :

$$V_1 = k_1 [E][S]$$

$$V_2 = k_2 [ES]$$

$$V_3 = K_3 [ES] = dP/dt \text{ (vitesse d'apparition de produit)}$$

$$V_1 - V_2 = -dS/dt \text{ (vitesse de disparation de substrat)}$$

$$V_1 - V_2 = V_3$$

Donc : $V_1 = V_2 + V_3$

$$k_1 [E].[S] = (k_2 + k_3).[ES]$$

$$K_1 [E] [S] = [ES] [K_2 + K_3]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{K_2 + K_3}{K_1} = K_m$$

Chapitre 2. Cinétique enzymatique à un substrat

K_m c'est la constante de dissociation du complexe [ES], appelée constante de Michaelis-Menten (exprimée en mole/litre).

Tableau 3: Valeurs de K_m pour quelques enzymes (Donald Voet et Judith G. Voet, 2016)

Enzyme	Substrat	K_m (Mole)
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	$9,5 \cdot 10^{-5}$
Anhydrase carbonique	CO ₂	$1,2 \cdot 10^{-2}$
	HCO ₃ ⁻	$2,6 \cdot 10^{-2}$
Catalase	H ₂ O ₂	$2,5 \cdot 10^{-2}$
Chymotrypsine	Ester éthylique N-acétylglycine	$4,4 \cdot 10^{-1}$
	Ester éthylique N-acétylvaline	$8,8 \cdot 10^{-2}$
	Ester éthylique N-acétyltyrosine	$6,6 \cdot 10^{-4}$
Fumarase	Fumarate	$5,0 \cdot 10^{-6}$
	Malate	$2,5 \cdot 10^{-5}$
Superoxyde dismutase	Ion superoxyde	$3,6 \cdot 10^{-4}$
Uréase	Urée	$2,5 \cdot 10^{-2}$

2.4.2. L'équation de Michaelis-Menten

Leonor Michaelis et Maud Menten ont déduit en 1913 une équation qui prédit la vitesse initiale (de formation de P) en fonction de la concentration du substrat (Neuhaus.J.M., 2003).



L'enzyme est soit sous forme libre E, soit complexé au substrat ES:

$$\text{La concentration totale de l'enzyme } [E_t] = [E] + [ES] \implies [E] = [E_t] - [ES]$$

$$\text{Donc : } K_m = ([E_t] - [ES])[S] / [ES] = ([E_t] - [S]) / [ES] - [S]$$

$$[ES] = [E_t][S] / k_m + [S]$$

La vitesse de la réaction enzymatique V_i est égale à V_3 , vitesse de la réaction la plus lente : $V_i = V_3 = K_3[ES]$.

$$V_i = K_3[E_t][S] / k_m + [S]$$

La vitesse est maximale lorsque [ES] sera la plus grande possible } $[E_t] = [ES]$
 Lorsque la totalité de l'enzyme sera combiné au substrat

$$V_{\max} = K_3[E_t]$$

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

Donc : C'est l'équation de Michaelis-Menten

Interprétation et intérêts :

1-Lorsque la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse max $K_m = [S]$

$$V_i = V_{max}/2$$

$$V_{max}/2 = V_{max} [S] / (K_m + [S])$$

$V_{max}(K_m + [S]) = 2V_{max}$ Donc : $K_m = [S]$

2-Quand la concentration initiale en substrat est très supérieure à K_m (K_m négligeable)

$$V_i = V_m = k_{cat} \cdot [Et]$$

k_{cat} : L'efficacité catalytique

3-Quand la concentration initiale en substrat est très inférieure à K_m ($[S]$ négligeable)

$$V_i = k_{cat} / k_m \cdot [Et][S]$$

k_{cat}/K_m : La constante de spécificité

- K_m est fonction des constantes de vitesse de chacune des étapes de la catalyse:

$$K_m = (k_2 + k_3) / k_1$$

- Si $k_2 > k_3$: dissociation de ES est plus rapide que la formation de E et P :

$$K_m = k_2 / k_1$$

Constante de dissociation K_s

2.4.3. Analyse de la courbe définie par l'équation de Michaelis-Menten

La courbe définie par l'équation de Michaelis-Menten et représentée dans la figurea la forme d'une hyperbole rectangulaire passant par l'origine et ayant les asymptotes suivantes : $S = -K$ et $V_i = V_{max}$

En fonction de la concentration de substrat, trois situations expérimentales peuvent être distinguées qui vont définir trois régions dans le graphique de V en fonction de S

❖ Situation où $S \ll K_m$

Pour des faibles valeurs de S , largement inférieures à K_m , en d'autre terme, S est négligeable par rapport à K_m et la vitesse V_i est directement proportionnelle à S :

$$\begin{aligned} V_i &= V_{max} \cdot [S] / K_m \\ &= k_{cat} / k_m \cdot [Et][S] \end{aligned}$$

Le paramètre k_{cat}/K_M est appelé la constante de spécificité

❖ Situation où $S=K_M$

Pour des valeurs de S est égale à K_M , l'équation de Michaelis-Menten est simplifiée et donne :

$$V_i = V_{max}/2$$

Cette équation fournit une définition opérationnelle de K_M , qui s'applique quel que soit le mécanisme cinétique auquel l'équation de Michaelis-Menten est appliquée ; notamment, K_M représente la concentration de substrat pour laquelle la vitesse est égale la moitié de la vitesse limite.

❖ Situation où $S \gg K_M$

Pour des valeurs élevées de S , largement supérieures à celle de K_M , en d'autre terme, K_M est négligeable par rapport à S . l'équation de Michaelis-Menten est simplifiée et donne :

$$V_i = V_{max} \\ = k_{cat} \cdot [E_t]$$

Dans ce cas, la réaction est approximativement d'ordre zéro en S car l'enzyme est saturé en substrat. Ce résultat est à l'origine de la dénomination de vitesse limite pour V_m . (Cornish-Bowden et al., 2004).

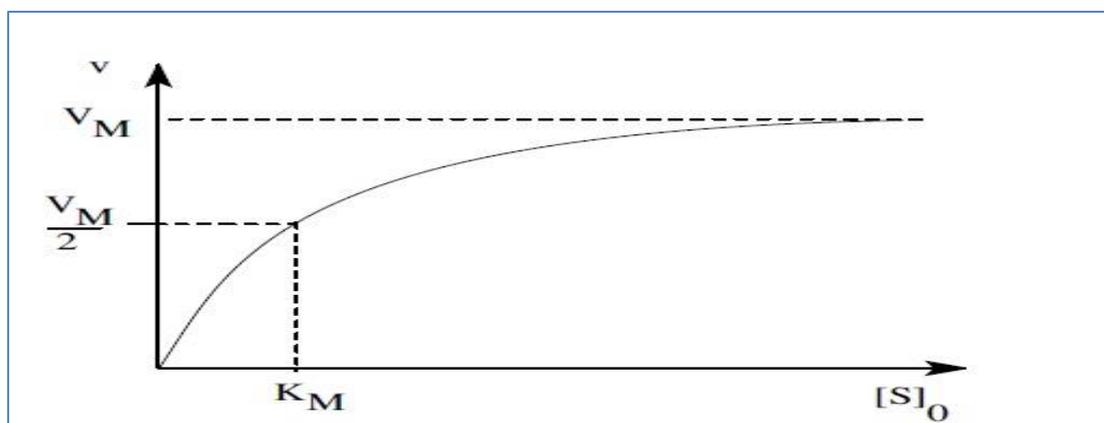


Figure 20: Dépendance de la vitesse initiale vis-à-vis de la concentration S pour une réaction obéissant à l'équation de Michaelis-Menten (Ghouali.MA, 2017).

2.4.4. Méthode de détermination de la constante de Michaelis et Menten

2.4.4.1. Méthode arithmétique

$$V = V_{max}/2 \quad K_M = [S]$$

2.4.4.2. Méthode graphique

a. Méthode graphique de Line weaver et Burk

C'est la représentation graphique la plus courante. Elle est déduite de l'inverse de chacun de côtés de l'équation de MICHAELIS-MENTEN.

$$\frac{1}{V} = \left[\frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} \right] + \frac{1}{V_m}$$

Cette équation montre qu'un graphique de $1/V_i$ en fonction de $1/S$ est une droite dont la pente vaut K_m/V_m , dont l'ordonnée à l'origine vaut $1/V_m$, et dont l'insertion avec l'axe des abscisses vaut $-1/K_m$. Ce graphique, illustré dans la figure..., est connu sous le nom de graphique de LINEWEAVER-BURK ou sous le nom de graphique en double inverse.

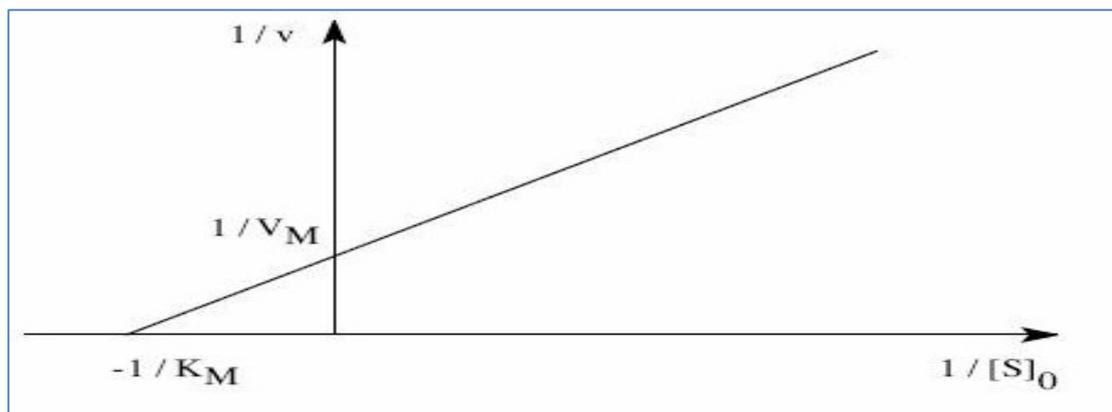


Figure 21: Graphique de $1/V_i$ en fonction de $1/S$ (Représentation de LINEWEAVER-BURK)

b. Méthode graphique d'Eadie Hofstee

Elle s'obtient de l'équation de LINWEAVER-BURK en multipliant les deux termes de l'équation par V_i

$$V_i = V_{max} - K_m \cdot \frac{V_i}{[S]}$$

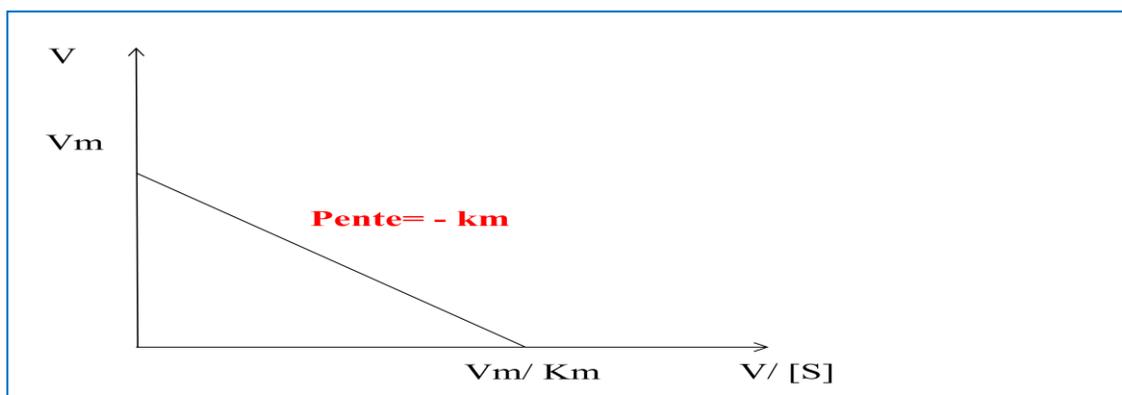


Figure 22: Graphiques V_i en fonction de V/S (Représentation d'EADIE-HOFSTEE)

Chapitre 2. Cinétique enzymatique à un substrat

Cette équation montre qu'un graphique de V_i en fonction de V_i/S est une droite dont la pente vaut $-K_m$, dont l'ordonnée à l'origine vaut V_m , et dont l'insertion avec l'axe des abscisses vaut V_m/K_m .

c.Méthode graphique de DIXON

Elle est déduite de multiplier l'équation de MICHAELIS-MENTEN à l'inverse de concentration de substrat $1/[S]$.

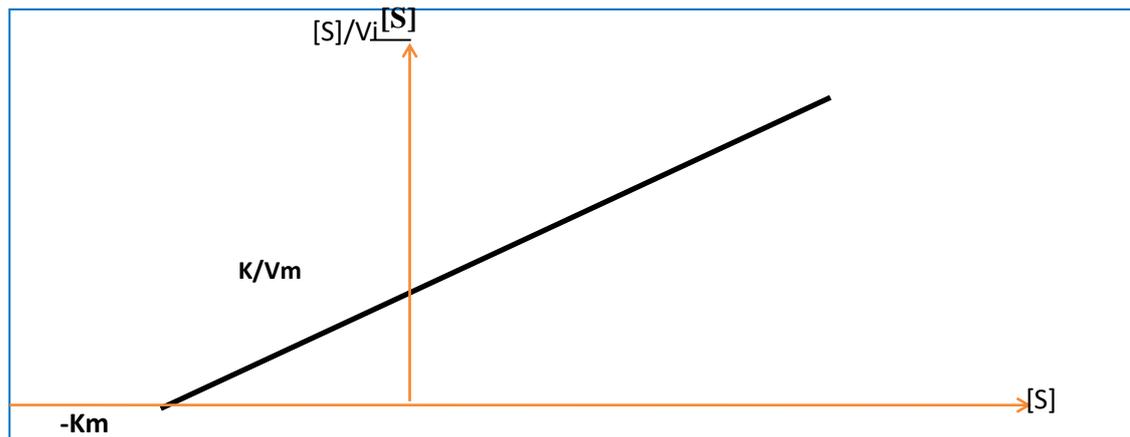


Figure 23: Graphiques S/V_i en fonction de S (Représentation de DIXON)

Cette équation montre qu'un graphique de S/V_i en fonction de S est une droite dont la pente vaut $1/V_i$, dont l'ordonnée à l'origine vaut K_m/V_m , et dont l'insertion avec l'axe des abscisses vaut $-K_m$. (Cornish-Bowden et al., 2004, Arhab, 2009)

2.5. Définition des unités enzymatiques

L'activité d'un enzyme est obtenue par une mesure de la vitesse de la réaction qu'il catalyse dans des conditions définies. Puisque la vitesse de la réaction varie avec la concentration de l'enzyme, il est souvent utile de définir une unité d'activité catalytique. Différents systèmes d'unités peuvent être utilisés. (Cornish-Bowden et al., 2004).

- **Unité officielle : katal** (kat), quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 mole de substrat par seconde. Le katal n'est jamais utilisé, car beaucoup trop grand. On doit utiliser des sous-unités comme les μkat (10^{-6} katal), nkat (10^{-9} katal).
- **Unité internationale** (IU, International Unit), utilisée par la plupart des biochimistes. Elle correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 μmole de substrat par minute. ($\text{UI} = \mu\text{mol}/\text{min}$).

2.6. Les facteurs influençant la réaction enzymatique

2.6.1. Les facteurs physiques

2.6.1.1. Le PH

Les réactions enzymatiques sont sensibles aux pH, il a deux effets sur la réaction enzymatique :

- A des pH extrêmes la vitesse de réaction est nulle.

Aux valeurs intermédiaires, il influe sur l'activité en modifiant l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés du site actif et du substrat.

La résultante de ces deux effets se traduit par une courbe en « cloche » (gaussienne) passant par une valeur maximale pour un pH dit optimal.

Le Ph optimum varie beaucoup selon les enzymes, il peut être très acide (entre 1,5 et 2 pour la pepsine), ou très basique (entre 9,5 et 10) pour l'arginase) mais le plus souvent il est voisin de la neutralité (entre 6 et 8) (Belkacem, 2017)

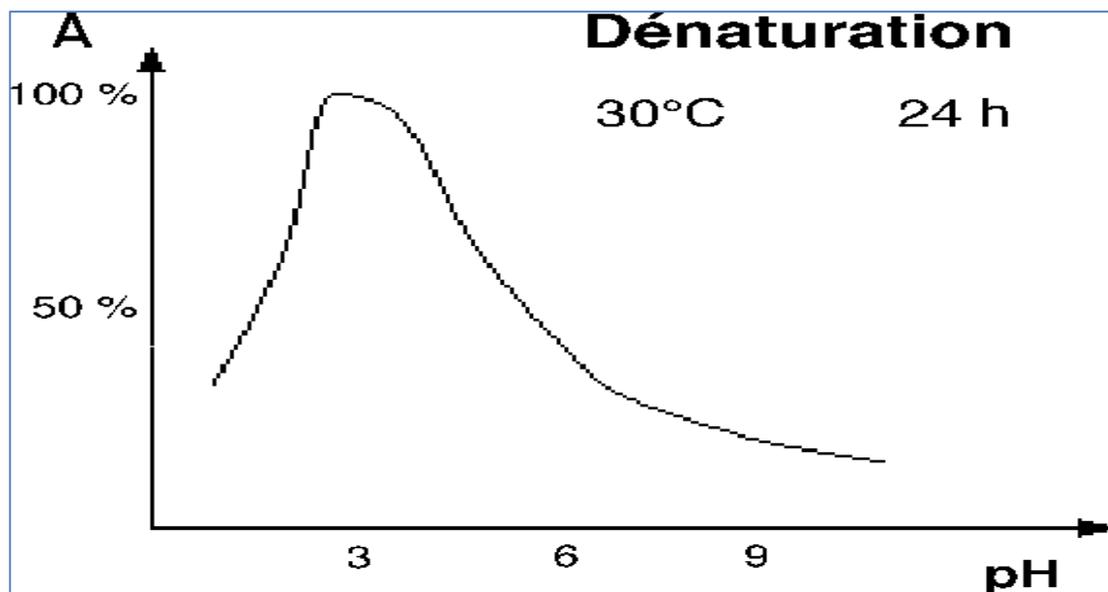


Figure 24: Influence du PH sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique (**Raisonnier.A., 2002**)

2.6.1.2. La température

Les enzymes sont sensibles à la température.

Dans la zone des températures les plus basses (entre 0 et 40°C environ): on observe une augmentation de la vitesse de réaction si la température augmente, qui s'explique par une augmentation du complexe activé lorsqu'on fournit plus d'énergie sous forme thermique au système en réaction.

Chapitre 2. Cinétique enzymatique à un substrat

Puis au-delà d'une certaine température qui varie selon les enzymes (45°C environ) : on observe inactivation de l'enzyme : dénaturation thermique
--> globalement la température augmente la vitesse de réaction jusqu'à une certaine limite. (Belkacem, 2017)

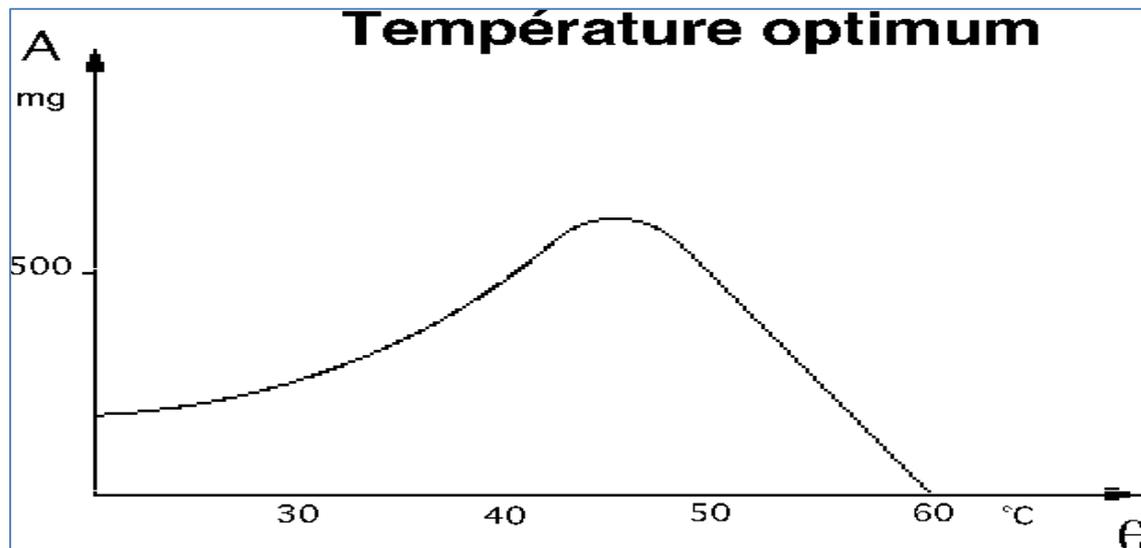


Figure 25: Influence de la température sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique (Raisonnier.A., 2002)

2.6.2. Les inhibiteurs

2.6.2.1. Définition

Est tout effecteur, qui par sa liaison avec l'enzyme **ralentit** la vitesse de la réaction enzymatique.

2.6.2.2. Intérêt

- Mécanisme essentiel de contrôle des systèmes biologiques
- Source d'information sur le mécanisme d'action des enzymes

2.6.2.3. Les types des inhibiteurs

L'inhibition affecte la cinétique de différentes façons

a. Les inhibiteurs irréversibles

- ✓ Se lient de façon irréversible avec l'enzyme
- ✓ Agissent brutalement en dénaturant l'enzyme

Exemple: 5Fluoro-uracile utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse

- ✓ Inhibe la **thymidilate synthase**; enzyme qui intervient dans la synthèse de la thymine (ADN)
- ✓ Arrêt de la multiplication des cellules tumorales

Chapitre 2. Cinétique enzymatique à un substrat

b. Les inhibiteurs réversibles

- ✓ Perturbent la cinétique et peuvent stopper la réaction
- ✓ permettent une étude très fine des mécanismes moléculaire de la catalyse.

b.1. Inhibiteur compétitif

Caractéristiques :

- ✓ Comportent une analogie structurale avec le substrat
- ✓ Entre en compétition avec les molécules de substrat pour se lier au site actif
- ✓ Se lie de façon réversible
- ✓ Diminue la vitesse de catalyse en abaissant la proportion de molécules d'enzyme liées au substrat
- ✓ A concentration élevée en substrat, le substrat entre en compétition avec les molécules inhibitrices pour se lier au SA, et les déplacés des centres catalytique

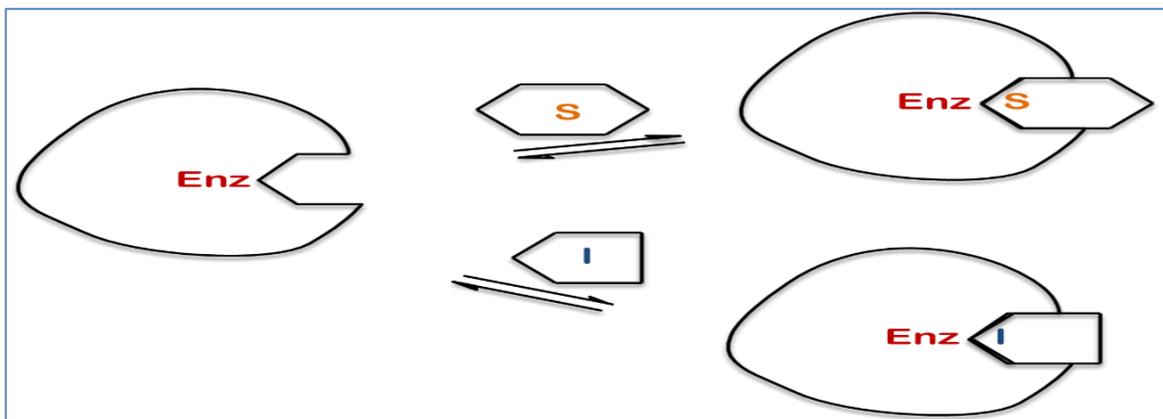
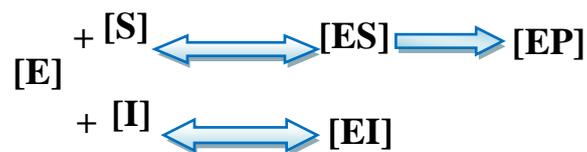


Figure 26: Inhibiteur compétitif (J.W. Keillor, 2014)



$$V_{app} [ES] = V_{app} [EP] \quad \frac{K_2 + K_3}{K_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = K_m \longrightarrow [E] = \frac{[ES] \cdot K_m}{[S]}$$

$$V_{app} [EI] = V_{app} [EI] \quad \frac{K'_2}{K'_1} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} = K_i \longrightarrow [E] = \frac{[E] \cdot [I]}{K_i}$$

$$\longrightarrow [E] = \frac{[E] \cdot [I]}{K_i} = \frac{[ES] \cdot [E]}{[S]} \cdot \frac{K_m}{K_i}$$

$$\begin{aligned}
 [E_{\text{Total}}] &= [E] + [ES] + [EI] \\
 &= \frac{[ES] \cdot K_m}{[S]} + [ES] + \frac{[ES] \cdot [I]}{[S]} \cdot \frac{K_m}{K_i} \\
 &= [ES] \cdot \left(\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[I] \cdot K_m}{[S] \cdot K_i} \right)
 \end{aligned}$$

$$[E_{\text{T}}] = [ES] \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \right)$$

$$V_i = k_3 \cdot [ES] \text{ et } V_{\text{max}} = k_3 \cdot [E_{\text{T}}]$$

$$V_i = V_{\text{max}} \frac{[ES]}{[E_{\text{T}}]}$$

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

Donc l'équation de vitesse s'écrit :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

- ✓ K'_m augmente par rapport à K_m
- ✓ V_{max} ne change pas

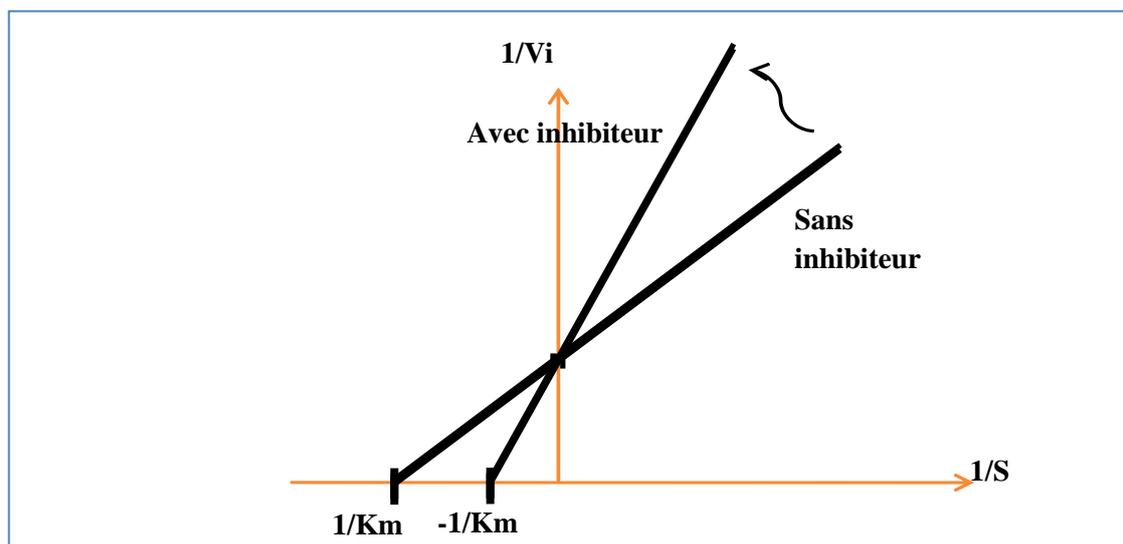


Figure 27: Représentation de la cinétique enzymatique en présence d'un inhibiteur compétitif (selon LINEWEAVER-BURK)

b.2. Inhibiteur non compétitif

Caractéristiques :

- ✓ Se lie de façon réversible à un site autre que le site actif
- ✓ Il provoque une modification de la conformation de l'enzyme

Chapitre 2. Cinétique enzymatique à un substrat

- ✓ L'enzyme peut se lier: à l'inhibiteur, au substrat, à l'inhibiteur et au substrat à la fois
- ✓ L'enzyme est inactivée quand l'inhibiteur est lié, en présence ou non du substrat.
- ✓ L'effet de l'inhibiteur n'est pas inversé par l'augmentation de la concentration en substrat
- ✓ L'inhibiteur diminue la concentration de l'enzyme active en abaissant la vitesse maximale

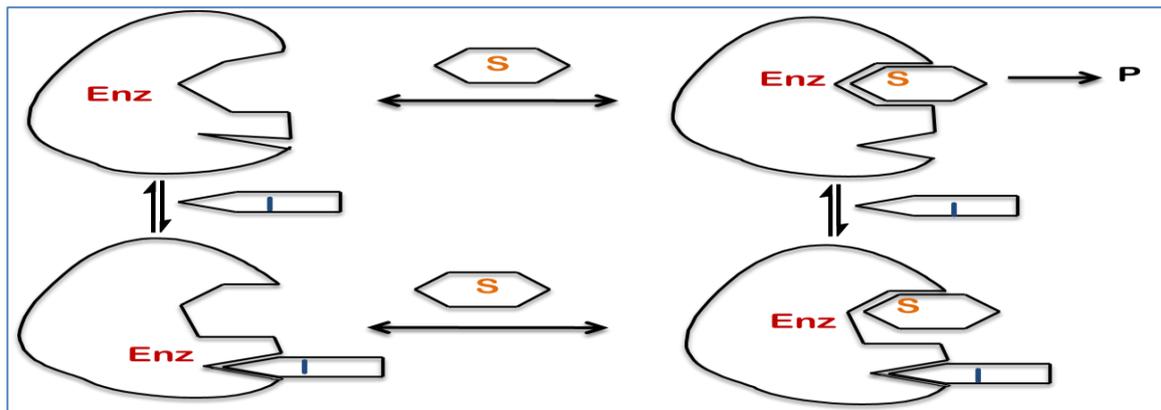
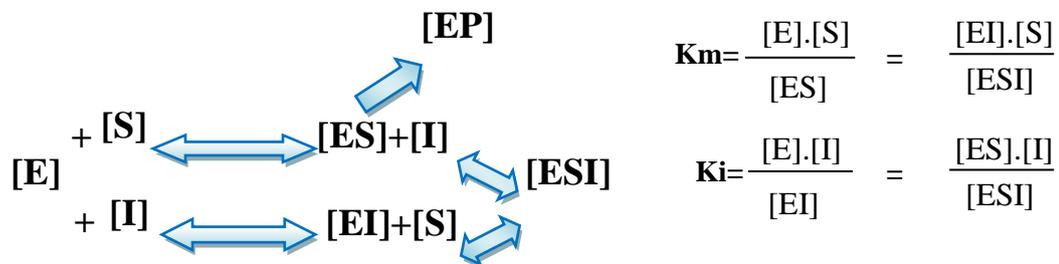


Figure 28: Inhibiteur non compétitif (J.W.Keillor, 2014)



$$[\text{ET}] = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}] + [\text{ESI}]$$

$$v_i = v_{\max} \frac{[\text{ES}]}{[\text{ET}]}$$

$$v_i = \frac{v_{\max}}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right)} \frac{[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

Donc l'équation de vitesse s'écrit :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right) \frac{1}{[\text{S}]} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right)$$

- ✓ **K_m** inchangée
- ✓ **V_{max}** est abaissée

Chapitre 2. Cinétique enzymatique à un substrat

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

Donc l'équation de vitesse s'écrit :

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

K_m est augmenté

V_{\max} est diminuée

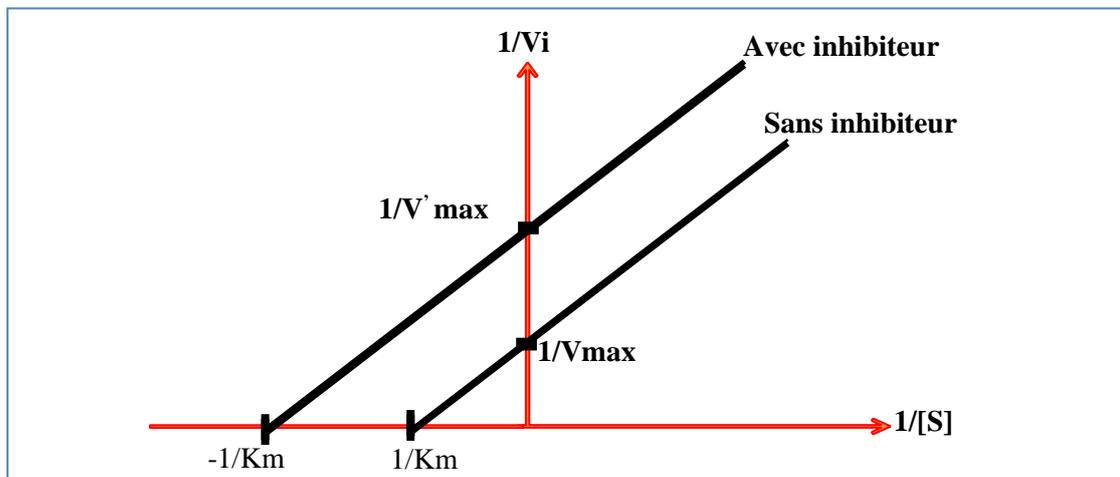


Figure 31: Représentation de la cinétique enzymatique en présence d'un inhibiteur incompétitif (selon LINEWEAVER-BURK)

Evaluation

A. Question

1-La constante de Michaelis K_m rend compte de l'affinité des enzymes pour un substrat

- a) Concentration en enzyme qui donne la moitié de la vitesse maximale
- b) Concentration en substrat qui donne la moitié de la vitesse maximale

2-Le paramètre V_{max} correspond à une vitesse de la réaction ou :

- a) l'enzyme est à concentration plus élevée
- b) Le substrat est à concentration plus élevée

3-La linéarité entre la concentration en enzyme -E- et la vitesse -V- est nécessaire pour la détermination de K_{cat} et K_m

- a) Vrai
- b) Faux

4-L'inactivation des enzymes résulte de l'action de :

- a) Inhibiteur réversible
- b) Inhibiteur irréversible

5. Choisir l'information vraie relative aux enzymes

- a) La vitesse initiale d'une enzyme michaelienne dépend de la concentration en enzyme et en substrat
- b) Les coenzymes participent à la fixation du substrat sur l'enzyme
- c) L'activation des enzymes michaelienne nécessite la présence de cofacteurs
- d) Dans les enzymes michaeliennes il y a les apoenzymes qui nécessitent un cofacteur pour s'activer et les autres qui utilisent des cofacteurs stochiométriques ou qui n'en utilisent pas.

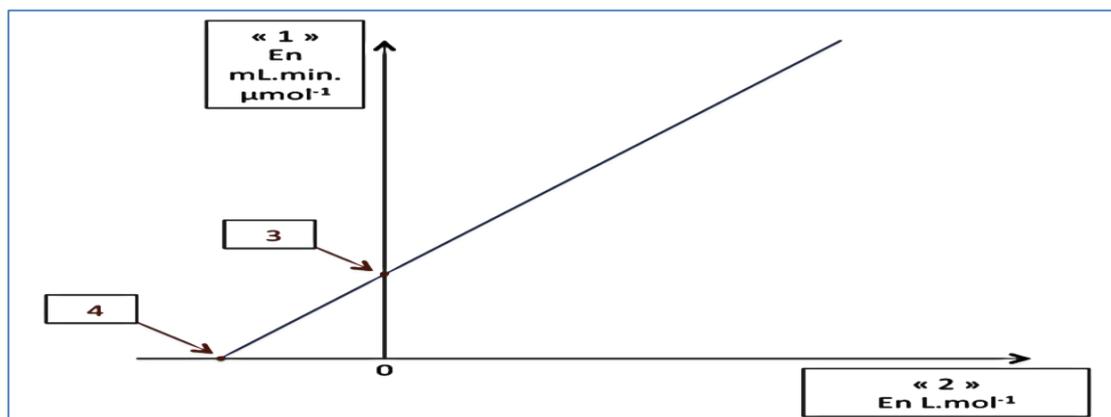
6-Choisir l'information vraie relative à la constante de Michaelis (K_m) des enzymes

- a) La concentration en substrat qui permet d'atteindre la moitié de la vitesse maximale de la réaction représente la constante de Michaelis de l'enzyme
- b) Plus K_m est élevé plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est grande K_m est une grandeur sans unité

B-Exercices

Exercice 1 :

Voici le graphique suivant :



Question 1 : Titrez et légendez le graphique

Question 2 : Donnez les calculs pour déterminer les deux paramètres cinétiques.

Exercice 2 :

On a étudié la constante de Michaelis d'une enzyme à plusieurs substrats de structures voisines. Les résultats sont les suivants :

Substrat	[A]	[B]	[C]	[D]	[E]
K_m	5.10 ⁻⁴ M	3,5.10 ⁻⁴ M	3.10 ⁻³ M	6.10 ⁻² M	5,5.10 ⁻² M

Question : Indiquez dans l'ordre croissant l'affinité de l'enzyme pour chacun des substrats.

Exercice 3 :

Complétez le tableau suivant :

	Inhibiteur compétitif	Inhibiteur non compétitif	Inhibiteur incompétitif
Fixation avec l'enzyme			
Affinité de l'enzyme pour son substrat			
K_m			
V_{max}			

Exercice 4 :

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 :

Question 1 : Tracez le graphique V en fonction de la [ATP].

Question 2 : Reportez les 2 paramètres cinétiques, V_{max} et K_m, sur votre graphique.

Chapitre 2. Cinétique enzymatique à un substrat

Question 3 : Réalisez la représentation en double inverse.

Question 4 : Reportez les deux paramètres cinétiques, V_{max} et K_m , sur votre graphique, puis déterminez-les par le calcul.

Exercice 5 :

Les vitesses initiales d'une réaction enzymatique en fonction de concentration variables en substrat sont données dans le tableau suivant :

Substrat (mmol/L)	125	180	247	402	798
Vitesse ($\mu\text{mol/L/min}$)	33	42	49	62	78

Question 1 : Ecrire et démontrer l'équation de Méchaélis et Menten

Question 2 : Donner la définition des deux paramètres cinétiques K_m et V_{max}

Question 3 : A partir de la représentation graphique de *Linweaver er Burk*, Déterminer les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique.

Question 4 : Calculer la vitesse initiale pour une concentration en substrat égale à $2K_m$

Exercice 6 :

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 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 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 $\text{ml/l} \cdot (10^{-3})$	V_i avec la glycoquinase en $\mu\text{mol/l/min}$	V_i sans glycoquinase en $\mu\text{mol/l/min}$
5.0	1.61	0.490
6.7	2.00	0.575
10.0	2.67	0.607
20.0	2.93	0.806
50.0	4.17	0.893

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

Question 2 : Comparer les deux K_m , et conclure.

Question 3 : Comparer les deux V_{max} , et conclure.

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.

Chapitre 2. Cinétique enzymatique à un substrat

Question 4 : Quelle serait l'influence d'une augmentation importante de la glycémie ?

Exercice 7 :

Les vitesses initiales d'une réaction enzymatique en fonction de concentration variables en substrat [S] et en présence d'un inhibiteur [I] sont données dans le tableau suivant :

Substrat (en mmol)	1.5	2	3	4	16
Vi sans I(en mg/min)	0.21	0.25	0.28	0.33	0.50
Vi avec I(en mg/min)	0.08	0.1	0.12	0.13	0.19

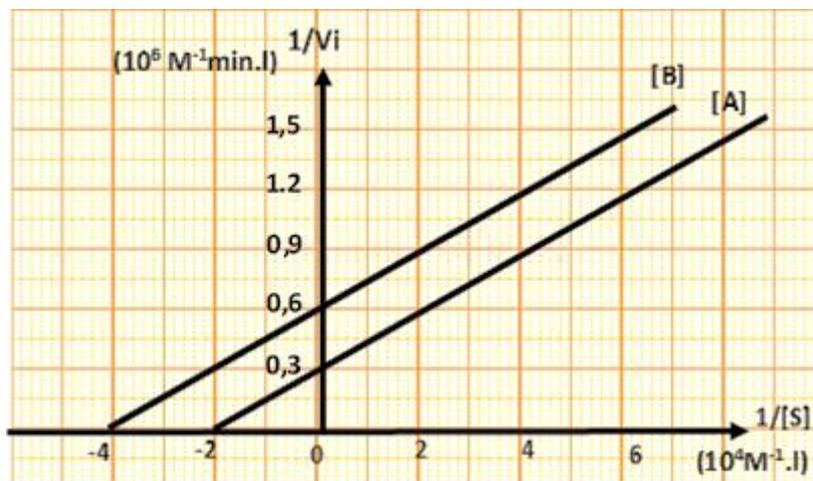
Question 1: Déterminez graphiquement si l'inhibition est compétitive ou non compétitive

Question 2 : Calculez les constantes cinétiques de l'enzyme

Exercice 8 :

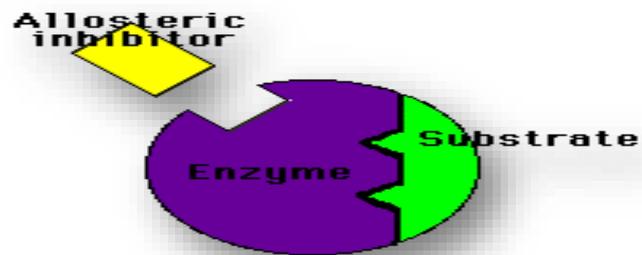
La droite A est une représentation des variations de la vitesse initiale d'une réaction catalysée par une enzyme E en présence de concentrations variables de son substrat S, le reste des conditions opératoires étant parfaitement défini.

Question : Calculer la constante de Michaelis et la vitesse maximale de l'enzyme pour son substrat.



La droite B est une représentation des variations de la Vi de la même réaction dans les mêmes conditions opératoires mais en présence d'un inhibiteur dont la [I] est de $3 \cdot 10^{-5}$ M.

Question : Quel est le type d'inhibition peut-on classer cet I ? (justifier votre réponse).



Chapitre 3 : Les enzymes allostériques



3.1. Définitions

3.1.1. L'Allostérie

L'allostérie, du mot grec, signifie « autre structure ». C'est la propriété de pouvoir exister dans deux états structuraux d'activité différente. L'équilibre entre ces états est modulé par la fixation de ligand. (Gregory A., et al., 2008).

Activateur allostérique : un ligand qui se fixe à un protéine et induit un changement conformation et qui augmente l'activité de celle-ci.

Inhibiteur allostérique : un ligand qui se fixe à un protéine et induit un changement conformation qui diminue l'activité de celle-ci.

3.1.2. Les enzymes allostériques

Les enzymes allostériques (E) sont des enzymes de régulation des chaînes métaboliques. Elles sont caractérisées par des comportements cinétiques différents de ceux des enzymes michaeliennes. (Baazi.M.,2013)

3.2. Propriétés générales des enzymes allostériques

Les enzymes allostériques doivent posséder toutes les caractéristiques suivantes :

Présenter une structure quaternaire, donc être multimérique. Souvent leurs sous unité sont disposées de manière à ce que la molécule ait un axe de symétrie. Chaque sous unité peut fixer une molécule de substrat.

Présenter un ou plusieurs sites allostériques, différents du site catalytique, reconnus par des effecteurs ayant un rôle modulateurs sur l'activité enzymatique.

Présenter deux formes T et R, une transition conformationnelle faisant passer d'une forme à l'autre.

Se distinguent des autres enzymes (dits michaeliens) par leur courbe $V_i=f(S)$ qui n'est pas une branche d'hyperbole équilatère correspondant à l'équation de Michaelis-Menten, mais une courbe sigmoïde (en « S »).

En cinétique michaelienne, quand S augmente, V augmente de moins en moins vite et plafonne à V_{max} . En cinétique allostérique, quand S augmente, V augmente d'abord de plus en plus vite jusqu'au point d'inflexion (correspondant à la K_m mais appeler $K_{0.5}$), puis de moins en moins vite et plafonne à V_{max} .

Le caractère sigmoïde de la courbe s'explique par le fait que la fixation du substrat sur l'enzyme augmente l'affinité de l'enzyme pour le substrat : c'est l'effet coopératif. (Segarra J. et al.,2014 ; Moussard.C, 2020).

3.3. Importances des enzymes allostériques

L'importance de l'allostérie est très grande :

- Elle confère à l'enzyme une grande sensibilité de son activité aux variations de concentration de substrat et d'effecteurs.
- Elle est au premier rang des mécanismes régulateurs des activités enzymatiques, permettant l'adaptation de l'offre métabolique à la demande cellulaire.
- Le plus souvent, l'enzyme catalysant la première réaction limitante d'une voie métabolique est allostérique. Son activité peut être contrôlée par plusieurs positifs ou négatifs appartenant à cette voie (par exemple le produit terminal sera inhibiteur, un précurseur de cette voie sera activateur), ou à d'autre (l'inter régulation de voie métaboliques) (Christian Moussard, 2006).

3.4. Régulation de l'activité enzymatique

La régulation du métabolisme passe par la modulation des activités enzymatiques de différents types. Cinq types de régulations enzymatiques sont à considérer. (Baazi.M., 2013).

a. Régulation à travers la modification de la cinétique d'enzymes michaeliennes :

L'Activité enzymatique changeant en fonction de la concentration en substrat.

b. Régulation à travers les enzymes allostériques :

L'Activité enzymatique modulée par des effecteurs allostériques avec des modifications non covalentes et réversibles (transitions allostériques).

c. Régulation par modification covalente de la structure enzymatique :

Modifications covalentes réversibles par exemple : phosphorylation et déphosphorylation).

d. Régulation par les isoenzymes :

Formes d'une même enzyme catalysant la même réaction mais à des vitesses différentes (V_{max} et K_m différents)).

e. Régulation par changement du taux de synthèse d'enzymes (turn-over) :

Action directe sur la synthèse des protéines (action au niveau du génome par induction ou répression), Actions d'hormones.

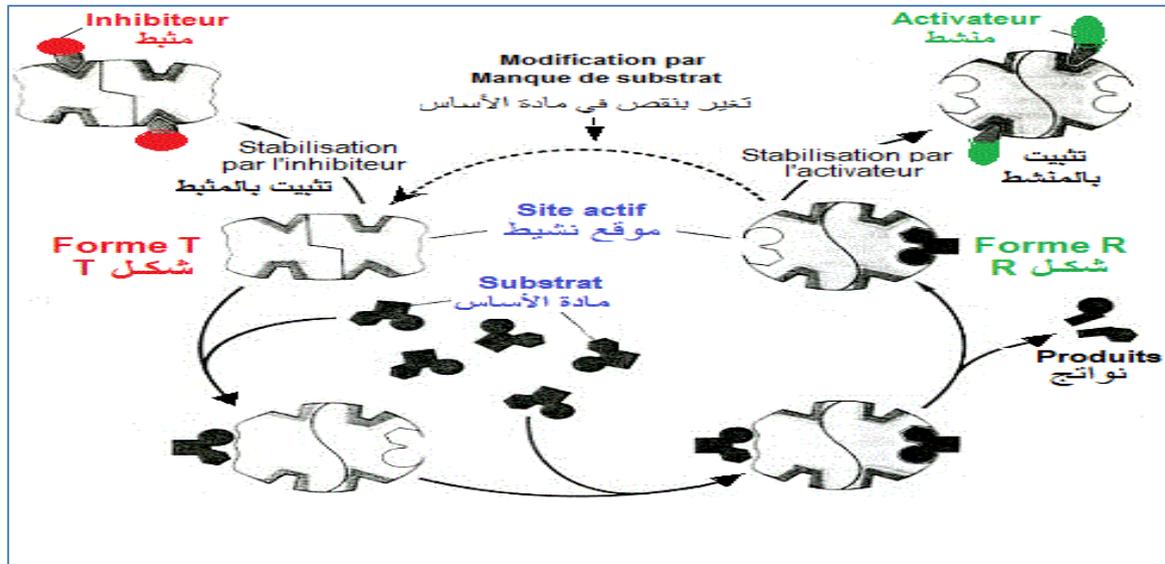


Figure 32: Modèle de régulation des enzymes allostériques (Baazi.M.,2013)

3.5. Action des effecteurs allostériques

Les effecteurs sont des substances qui agissent comme activateurs ou inhibiteurs en modifiant la conformation des sites de liaison au substrat, ce qui change l'affinité pour le substrat.

Il existe deux types d'effecteurs allostériques : Les activateurs qui augmentent l'activité enzymatique et les inhibiteurs qui la diminuent.

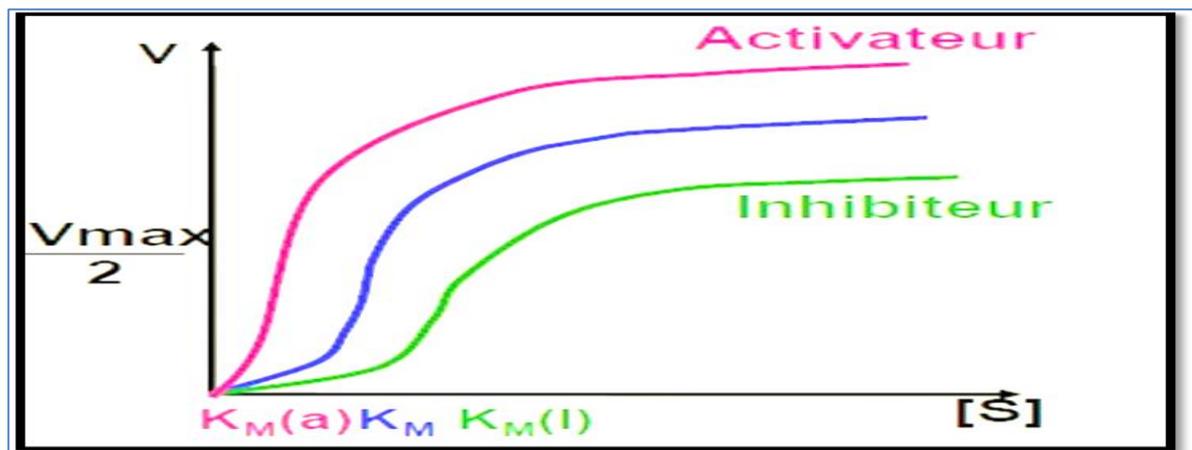


Figure 33: Courbe sigmoïde caractéristique d'un enzyme allostérique. (Eduardo D et al., 1983)

Sous l'action d'un activateur, la courbe devient hyperbolique, tandis qu'un inhibiteur la rend plus sigmoïde.

3.6. Cinétiques des enzymes allostériques

Contrairement aux enzymes michaeliennes (cinétique 'HYPERBOLIQUE'), les enzymes allostériques présentent une cinétique 'SIGMOÏDE'. (Baazi.M., 2013).

On peut distinguer deux étapes dans le fonctionnement de ces enzymes allostériques (Figure 34).

- Première partie : Au départ les enzymes allostériques présentent peu d'affinité pour le substrat.
- Seconde partie : C'est la fixation d'une première molécule de substrat qui facilite la fixation de la seconde et ainsi de suite, on parle de coopérativité positive. (Belkacem.I, 2017) .

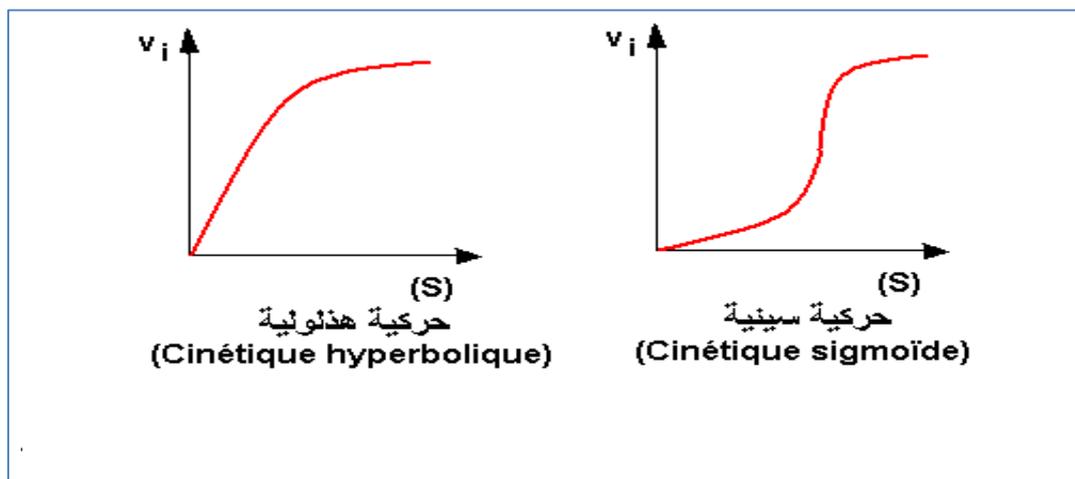


Figure 34 : Types de cinétique de saturation des enzymes par le substrat (Baazi.M., 2013).

Deux modèles ont été proposés pour rendre compte de la coopérativité homotrope :

L'un et l'autre impliquent que l'enzyme a 2 conformations extrêmes, qui diffèrent par leurs structures tertiaire et quaternaire :

- **La conformation T (tendue) :** à faible affinité pour le substrat
- **La conformation R (relâchée) :** à forte affinité pour le substrat

L'augmentation de la concentration du substrat entraîne une augmentation de la proportion des molécules d'enzyme en configuration R. Mais ils s'opposent sur les modalités de transition T→R. (Christian Moussard, 2006).

a. Le modèle concerté de J.Monod

Toutes les sous unités d'une molécule d'enzyme sont soit en conformation T, soit en conformation R, T et R étant en équilibre.

En absence du substrat, l'équilibre est déplacé vers R : Pour une molécule d'enzyme, la transition s'est faite en bloc (comme une rangée de dominos qui tombent tous en même temps). (Christian Moussard, 2006).

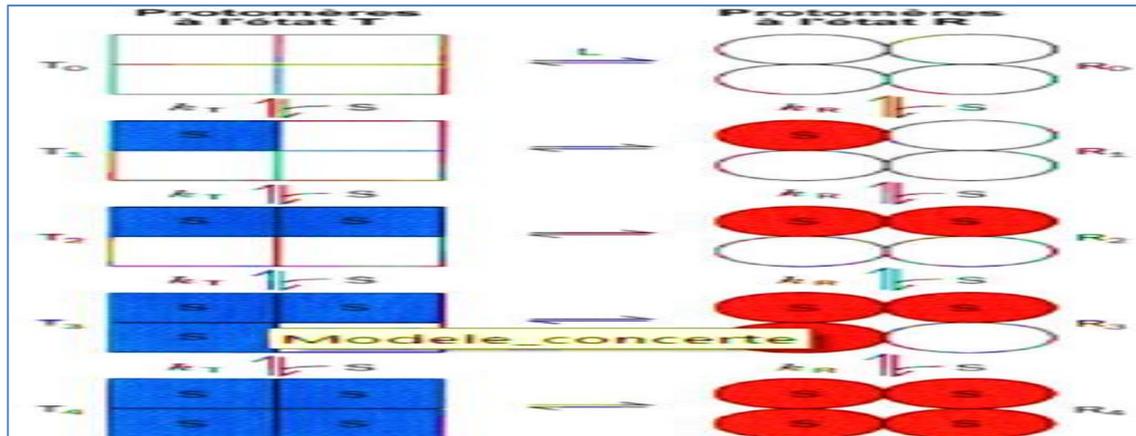


Figure 35: Modèle concerté de J.Monod (Belkacem.I, 2017)

b. Le modèle séquentiel de D.koshland

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

La fixation de la première molécule de substrat induit la transition T**R de la première sous unité, ce qui facilite la transition de T**R de la sous unité voisine et la fixation d'une deuxième molécule de substrat, et ainsi de suite : pour une molécule d'enzymes, la fixation s'est faite sous-unité pour sous-unité (comme une rangée de dominos qui tombent l'un après autre). (Christian Moussard, 2006).

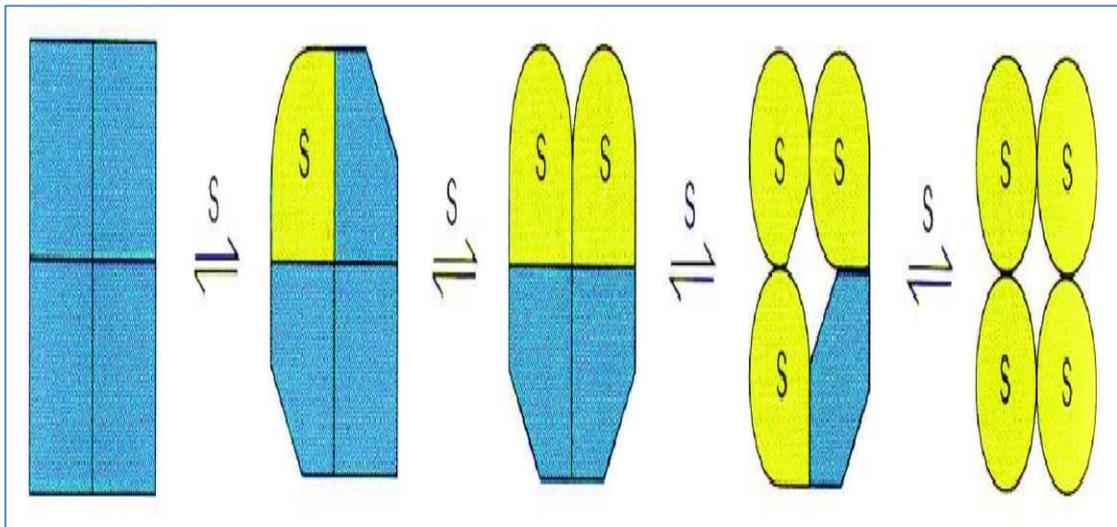


Figure 36: Modèle séquentiel de D.koshland (Belkacem.I, 2017)

Evaluation

Q1. Choisir l'information vraie relative aux enzymes allostériques

- a) Certaines enzymes allostériques peuvent montrer une cinétique michaelienne en présence du substrat S
- b) Les enzymes allostériques ont un nombre de protomère pair
- c) Les enzymes allostériques n'ont pas besoins de cofacteurs, ils utilisent des effecteurs allostériques

Q2. Choisir l'information fausse relative aux enzymes allostériques

- a) Si on détruit le site allostérique d'une enzyme - et uniquement ce site -, cette enzyme se comportera comme une enzyme classique en suivant le modèle michaelien
- b) Les enzymes allostériques catalysent très souvent une étape essentielle d'une voie métabolique
- c) L'allostérie ne concerne que les enzymes, et implique une structure quaternaire

Q3. Parmi les propositions suivantes, laquelle (ou les quelles) est (ou sont) exacte(s)

- a. La cinétique allostérique se caractérise par des courbes $V_i = f[\text{effecteur}]$ d'allure sigmoïde.
- b. Une petite molécule capable d'accéder au site catalytique d'une enzyme allostérique et de bloquer son activité exerce un effet allostérique de type homotrope négatif.
- c. Les effecteurs hétérotopes se fixent sur des sites de régulation spécifiques distincts du site actif.
- d. A concentration saturante d'effecteur hétérotopes négatif, la courbe $V = f(S)$ d'une enzyme allostérique devient une hyperbole décroissante.
- e. Pour exercer un effet de type allostérique, un effecteur doit obligatoirement déplacer l'équilibre en faveur de la forme R de l'enzyme.

Q4. Parmi les propositions suivante, laquelle (ou les quelles) est (ou sont) exacte(s).

- a. Les enzymes allostériques sont toujours retrouvées dans l'entrée des voies métaboliques.
- b. La cinétique des enzymes allostériques est différente de celle des enzymes michaeliennes.
- c. Le substrat d'une enzyme allostérique peut servir d'effecteur hétérotopes de cette même enzyme.

Chapitre 3: Les enzymes allostériques

d. Les activateurs et inhibiteurs allostériques se fixent dans des sites régulateurs différents des sites actifs de l'enzyme.

e. Il faut une forte variation de concentration d'effecteurs pour avoir une forte variation d'activité de l'enzyme.

Q5. Parmi les propositions suivante, laquelle (ou les quelles) est (ou sont) exacte(s).

a. La catalyse des enzymes allostériques est très efficace même en cas de faible concentration en substrat.

b. Si la concentration en activateur est saturante, on observe un changement du type de cinétique d'une enzyme allostérique vers une cinétique michaelienne.

c. L'effet hétérotopique positif entraîne un décalage de la courbe de V_i en fonction de $[S]$ vers la droite.

d. En cas de courbe hyperbolique de cinétique enzymatique alors l'activateur de l'enzyme est allostérique.

e. L'effet hétérotopique négatif entraîne un décalage de la courbe de V_i en fonction de $[S]$ vers la droite.

Q6. Parmi les propositions suivante, laquelle (ou les quelles) est (ou sont) exacte(s).

a. Les enzymes allostériques sont plus sensibles à la variation de concentration en substrat que les enzymes michaeliennes.

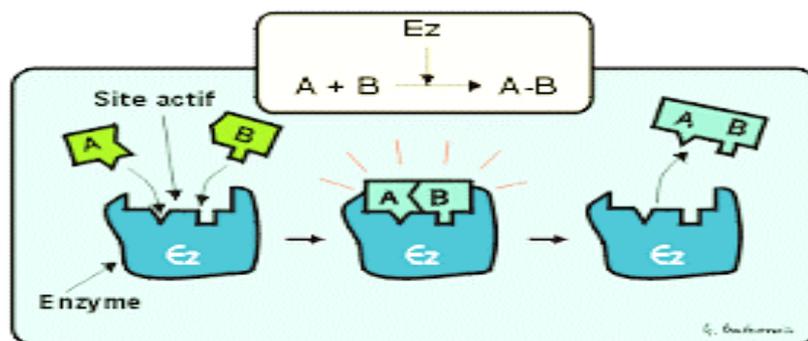
b. Les enzymes allostériques sont forcément multimériques.

c. Les formes R et T des enzymes allostériques possèdent la même affinité pour les différents types d'effecteurs.

d. Le modèle de transition concerté nécessite que l'enzyme soit multimérique.

e. Dans le modèle séquentiel de Koshland, il est possible d'avoir des monomères sous forme R et T.

Chapitre 2. Cinétique enzymatique à deux substrats



4.1. Caractéristiques

- ✓ Elle représente la majorité des réactions enzymatiques ;
- ✓ Ces réactions donnent de cinétique plus complexe que les réactions à un seul substrat
- ✓ L'étude cinétique des réactions enzymatique à deux substrat à pour but de déterminer, l'ordre de fixation des substrats, les constantes cinétique caractérisant la fixation de chacun d'eux en présence et en absence de l'autre, la vitesse maximale de la réaction qui est mesurée quand la concentration des deux substrats est saturante (Arhab.R., 2009).

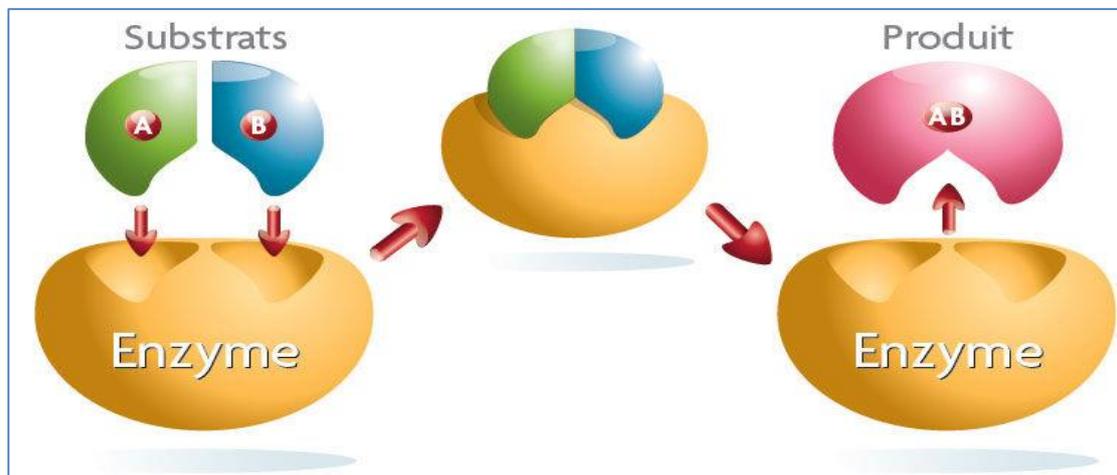


Figure 37 : Schéma d'action-enzymatique sur deux substrats

<http://zenavi.canalblog.com/archives/2010/03/30/17415901.html>

4.2. Classes

La plus part des réactions à deux substrats peuvent être classé selon les combinaisons de l'enzyme dans l'un des deux cas suivants :

- ✓ Réaction à simple déplacement
- ✓ Réaction à double déplacement

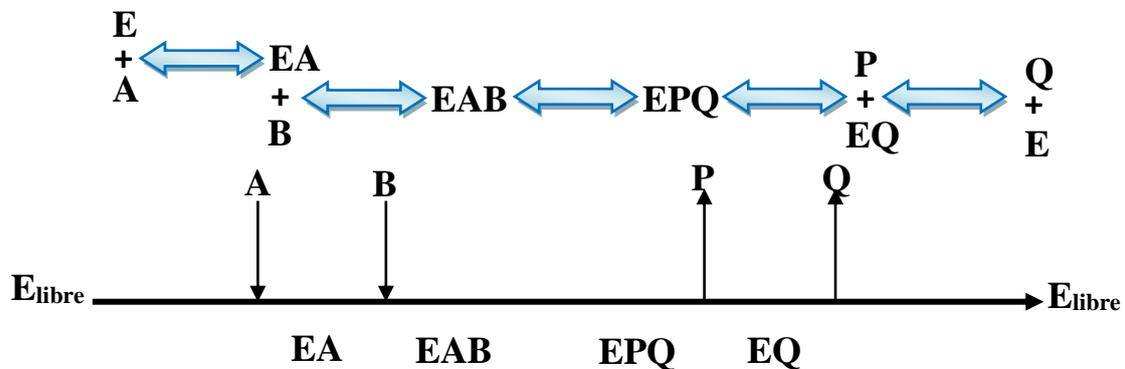
4.2.1. Réactions à simple déplacement

Elles impliquent la formation d'un complexe ternaire. Les conditions expérimentales sont :

- ✓ la réaction reverse est négligée,
- ✓ les deux substrats A et B doivent être présents simultanément,
- ✓ l'association des substrats à l'enzyme peut s'effectuer de différentes manières.

4.2.1.1. Mécanisme bibi ordonné

Dans ce mécanisme, un des substrats s'associe préalablement à l'enzyme pour que la fixation du second soit possible.



Exemple : la malate déshydrogénase

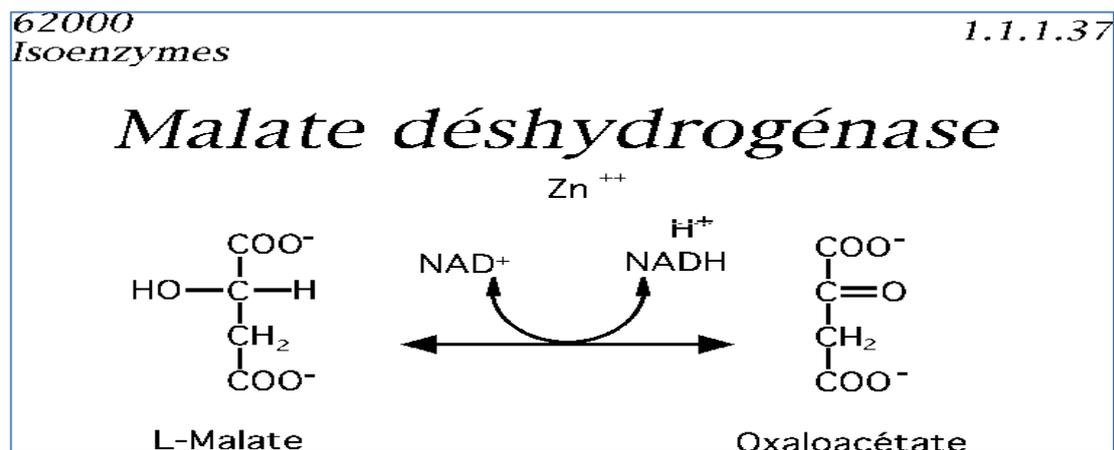


Figure 38 : La malate déshydrogénase

Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour le malate si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD⁺ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme-NAD⁺-Malate se transforme en un complexe Enzyme-NADH-Oxaloacétate ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'oxaloacétate puis le NAD réduit. (**Raisonnier.A., 2002**).

Expressions des vitesses



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

Quasi équilibre ; on a : $V = K_{cat} [\text{EAB}]$

Chapitre 4 : Cinétique enzymatique à deux substrats

$$V_m = K_{cat} [ET] \text{ avec } [ET] = [E] + [EA] + [EAB]$$

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

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

$$\frac{V_i}{V_m} = \frac{[EAB]}{[E] + [EA] + [EAB]} = \frac{[EAB]}{\frac{K_A \cdot K_B [EAB]}{[A][B]} + \frac{K_B [EAB]}{[B]} + [EAB]}$$

$$\frac{V_i}{V_m} = \frac{1}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A \cdot K_B}{[A][B]}} \longrightarrow V_i = \frac{V_m}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A \cdot K_B}{[A][B]}}$$

Ainsi :
$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A \cdot K_B}{[A][B]} \right)$$

Représentations graphiques

On met : $[A] = Cte$ et la représentation graphique se fait en fonction de B

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_m} \cdot \frac{1}{[B]} \left(K_B + \frac{K_A}{[A]} \cdot K_B \right) + \frac{1}{V_m}$$

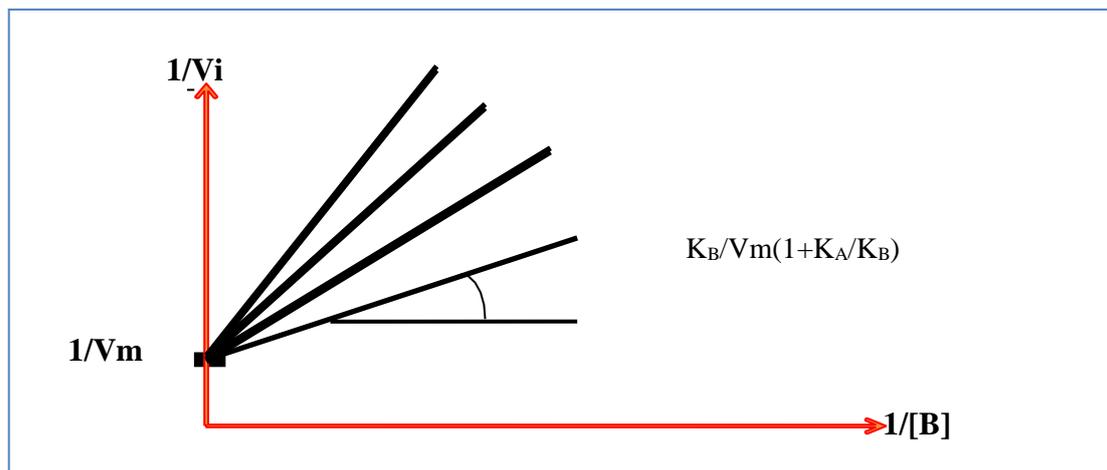


Figure 39. Cinétique enzymatique selon le mécanisme ordonné ou séquentiel (bi-bi-ordonné).

On met : $[B] = Cte$ et la représentation graphique se fait en fonction de A

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{V_m} \cdot \frac{1}{[A]} \left(\frac{K_A \cdot K_B}{[B]} \right) + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K_B}{[B]} \right)$$

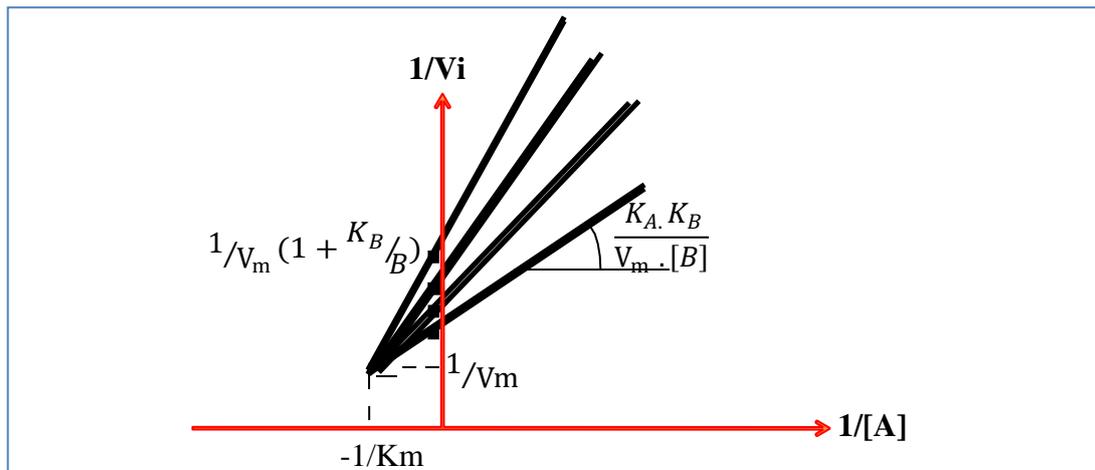


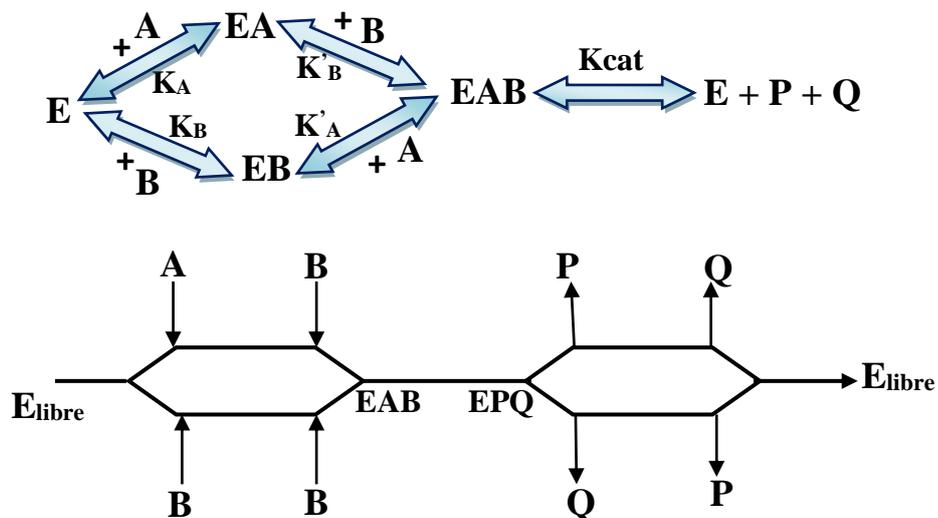
Figure 40. Cinétique enzymatique selon le mécanisme ordonné ou séquencé (bi-bi- ordonné).

4.2.1.2. Mécanisme bi-bi aléatoire (au hasard ou non ordonné)

Dans ce mécanisme, chacun des substrats est susceptible de s'associer à l'enzyme dans n'importe quel ordre.

On distingue deux cas :

- ✓ Ou bien les associations de substrat (A) et de substrat (B) à l'enzyme sont dépendantes, c-à-d que la fixation de A modifier l'affinité de l'enzyme pour fixé B et réciproquement,
- ✓ Ou bien, elles sont indépendantes, c-à-d l'association de l'un des substrats s'effectue de la même manière en présence ou en absence de l'autre substrat.



Exemple : la créatine phosphokinase

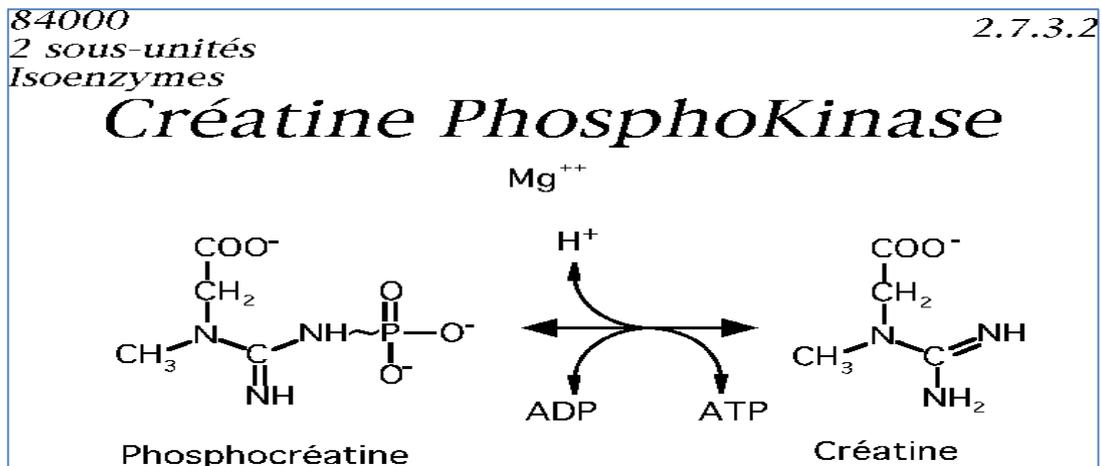


Figure 41: La créatine phosphokinase

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

L'affinité de l'enzyme pour ces deux corps chimiques étant voisine, la liaison de l'enzyme avec chacun d'entre eux se fait dans un ordre qui dépend uniquement des concentrations. (**Raisonnier.A., 2002**).

Expression des vitesses

a. Fixation dépendante

$$V = K_{cat} [EAB]$$

Les constantes d'équilibre du système réactionnel sont données par les équations :

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad K_B = \frac{[E][B]}{[EB]} \quad K'_A = \frac{[E][A]}{[EAB]} \quad K'_B = \frac{[E][B]}{[EAB]}$$

A l'équilibre : $K_A \cdot K'_B = K_B \cdot K'_A$

$$V_m = K[E_T] = K_{cat}([E] + [EA] + [EB] + [EAB])$$

$$\frac{V_i}{V_m} = \frac{[EAB]}{[E] + [EA] + [EB] + [EAB]}$$

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

$$[E] = \frac{K_A \cdot K'_B [EAB]}{[A][B]} \quad \text{et} \quad [EB] = \frac{K'_A [EAB]}{[A]}$$

Chapitre 4 : Cinétique enzymatique à deux substrats

$$\frac{V}{V_m} = \frac{[EAB]}{\left(\frac{K_A K'_B}{[A][B]} + \frac{K'_B}{[B]} + \frac{K'_A}{[A]} + 1 \right) [EAB]} \longrightarrow V = \frac{V_m}{1 + \frac{K'_A}{[A]} + \frac{K'_B}{[B]} + \frac{K_A K'_B}{[A][B]}}$$

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

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

Représentations graphiques

Pour la concentration de [A] = Cte on trace la représentation 1/V=(1[B])

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

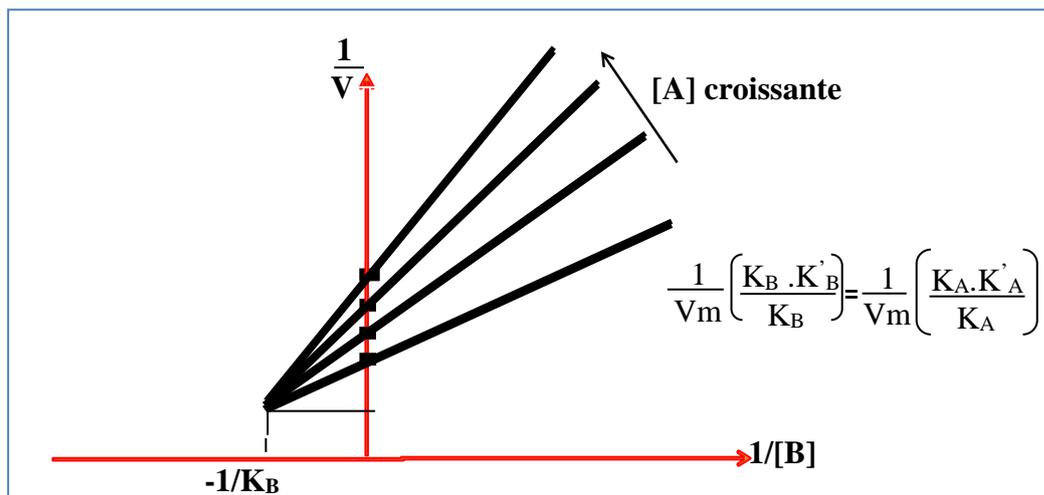


Figure42. Cinétique enzymatique selon le mécanisme au hasard ou non ordonné (bi-bi aléatoire) avec fixation dépendante (Représentation 1/V=(1[B]))

On obtient un faisceau de droites de pente : $\frac{K'_B}{V_m} + \frac{K_A K'_B}{[A] V_m}$

et son intersection avec l'axe des données : $\frac{1}{V_B} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K'_A}{[A]} \right)$

Pour la concentration de [B] = Cte on trace la représentation 1/V=(1[A])

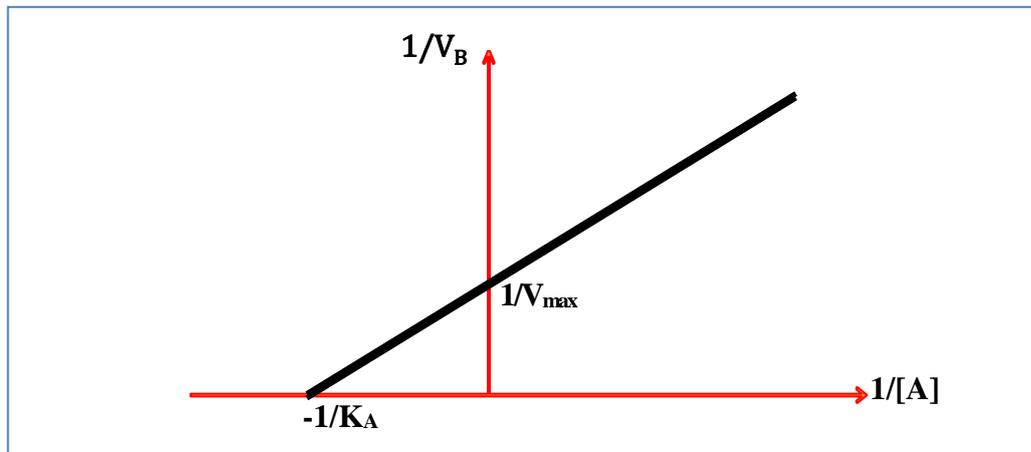


Figure 43. Cinétique enzymatique selon le mécanisme au hasard ou non ordonné (bi-bi aléatoire) avec fixation dépendante (Représentation $1/V=(1/[A])$)

Il ressort que les points d'intersection du faisceau des droites avec l'axe des ordonnées

$$\text{Sont : } \frac{1}{V_m} \left(\frac{K_A + K'_A}{K_A} \right) = \frac{1}{V_m} \left(\frac{K_B + K'_B}{K_B} \right)$$

De cela trois cas se présentent :

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

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

Et donc on obtient **une fixation dépendante facilitant la fixation du 2^{ème} substrat**

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

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

Et donc on obtient **une fixation dépendante gênant la fixation du 2^{ème} substrat.**

-Troisième cas : ordonnées nulles : **fixation indépendante**

b. Fixation indépendante

Dans le cas d'une fixation indépendante, les constantes d'équilibre du système sont équivalentes : $K_A = K'_A$ et $K_B = K'_B$

$$V_m = K_{cat} [E_T] = K_{cat} [[E] + [EA] + [EB] + [EAB]]$$

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

Chapitre 4 : Cinétique enzymatique à deux substrats

Avec : $[EB] = \frac{K_A [EAB]}{[A]}$ $[EA] = \frac{K_B [EAB]}{[B]}$

Donc : $[E] = \frac{K_A [EA]}{[A]} = \frac{K_A \cdot K_B}{[A][B]} [EAB]$

$$\frac{v}{v_m} = \frac{[EAB]}{[E] + [EA] + [EB] + [EAB]} = \frac{[EAB]}{\left(\frac{K_A K_B}{[A][B]} + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} + 1 \right) [EAB]}$$

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

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

Représentations graphiques :

$\frac{1}{v}$ en fonction de $\frac{1}{[A]}$ $\frac{1}{v} = \frac{1}{v_m} \frac{1}{[A]} \left(K_A + \frac{K_A K_B}{[B]} \right) + \frac{1}{v_m} \frac{K_B}{[B]} + \frac{1}{v_m}$

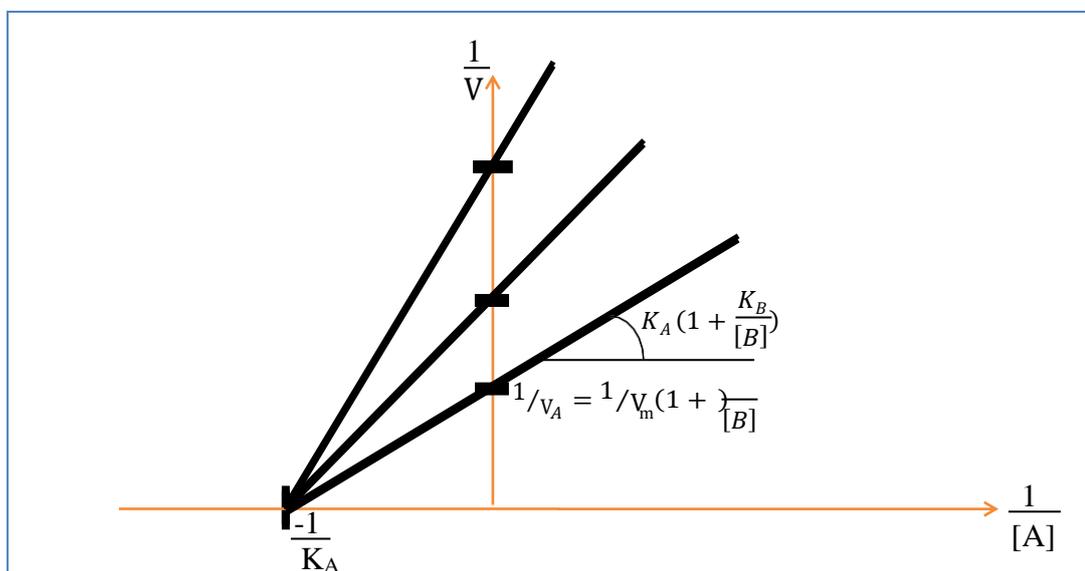


Figure 44: Représentation primaire $1/v = f(1/A)$

$\frac{1}{v}$ en fonction de $\frac{1}{[B]}$ $\frac{1}{v} = \frac{1}{v_m} \frac{1}{[B]} \left(K_B + \frac{K_A}{[A]} \right) + \frac{1}{v_m} \frac{K_A}{[A]} + \frac{1}{v_m}$

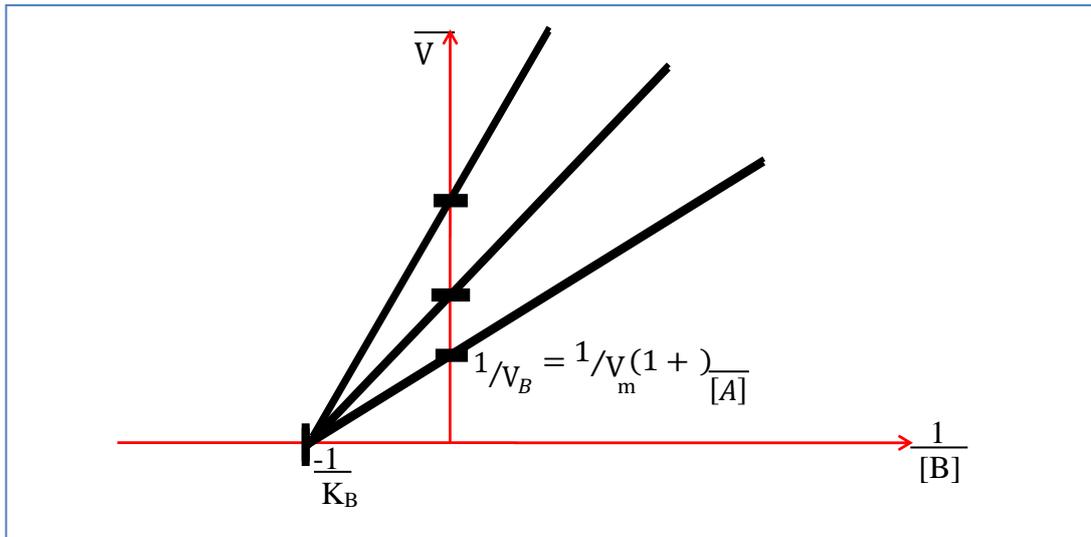


Figure 45: Représentation primaire $1/V = f(1/B)$

Une représentation secondaire est effectuée depuis les points d'intersection avec l'axe des ordonnées et permet de tracer le graphe selon l'équation :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} \cdot \frac{1}{[A]} \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

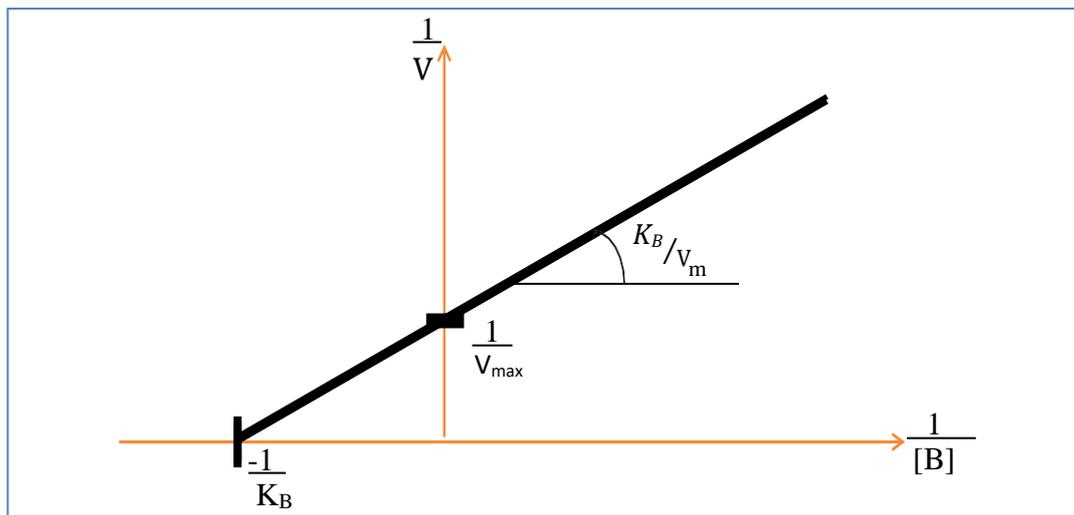


Figure 46: Représentation secondaire $1/V = f(1/B)$

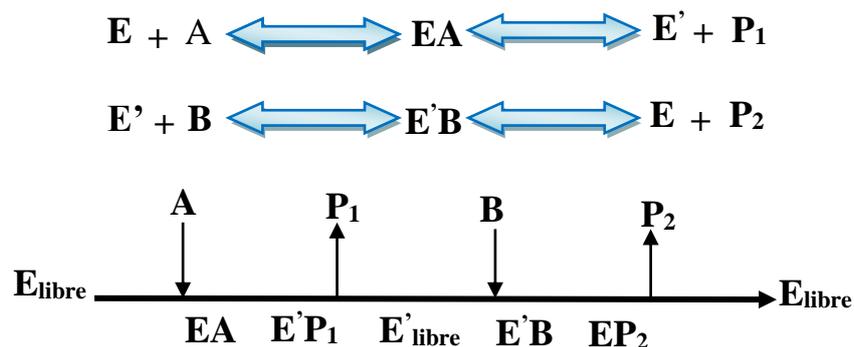
Figure. Cinétique enzymatique selon le mécanisme au hasard ou non ordonné (bi-bi aléatoire) avec fixation indépendante

4.2.2. Réactions à double déplacement

Certaines réactions du métabolisme impliquant deux substrats se produisent sans que la réaction nécessite la formation d'un complexe ternaire. C'est le cas de beaucoup de réaction de transfert de groupes qui mettent en jeu que la formation de complexes binaires. Celles-ci s'expliquent soit par le fait que les deux substrats s'associent à l'enzyme en des temps différents ou que le second substrat ne s'associe en aucun moment à l'enzyme.

4.2.2.1. Mécanisme Ping-Pong

C'est un mécanisme séquencé, l'enzyme se complexe d'abord avec ce 1^{er} substrat qui subit une première transformation avec libération du premier produit (P) puis elle s'effectue la 2^{ème} association de l'enzyme avec le second substrat et le complexe formé est toujours binaire. Le second produit et l'enzyme sont libérés. (Arhab.R.2009)



Exemple : l'alanine aminotransférase = ALAT

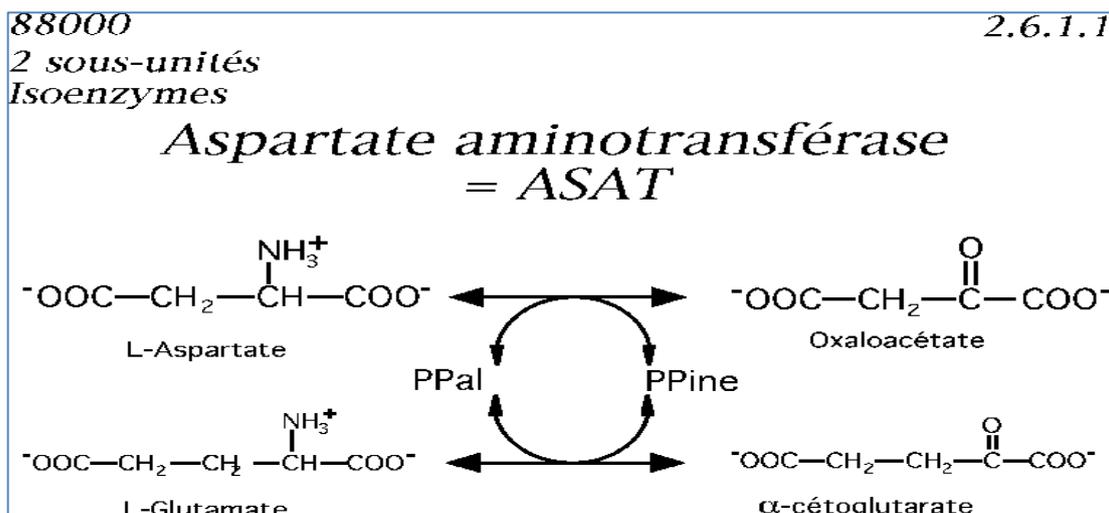


Figure 47: Alanine aminotransférase (Raisonnier.A., 2002).

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

- Dans un premier temps, l'ASAT se lie à l'aspartate puis transfère la fonction amine sur un coenzyme lié : le phosphate de pyridoxal qui devient phosphate de pyridoxamine sans cesser d'être lié à l'enzyme. L'enzyme se dissocie alors de l'oxaloacétate.
- Dans le second temps, l'enzyme liée au phosphate de pyridoxamine, forme un complexe avec l'alpha-cétoglutarate, puis transfère la fonction amine du coenzyme qui redevient phosphate de pyridoxal, vers le second substrat qui est transformé en glutamate. Enfin, le complexe ASAT- glutamate se dissocie : l'enzyme et son coenzyme lié ont recouvré leurs structures initiales. **(Raisonnier.A., 2002).**

Expression de la vitesse

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

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{k_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}}$$

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

$$\frac{dE}{dt} = 0 \quad \frac{1}{V} = \frac{1}{[A]} \frac{k_A}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]} \right)$$

$$\frac{dEB}{dt} = 0 \quad \frac{1}{V} = \frac{1}{[B]} \frac{K_B}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_A}{[A]} \right)$$

Représentations graphiques :

$$\frac{1}{V} \text{ en fonction de } \frac{1}{[A]}$$

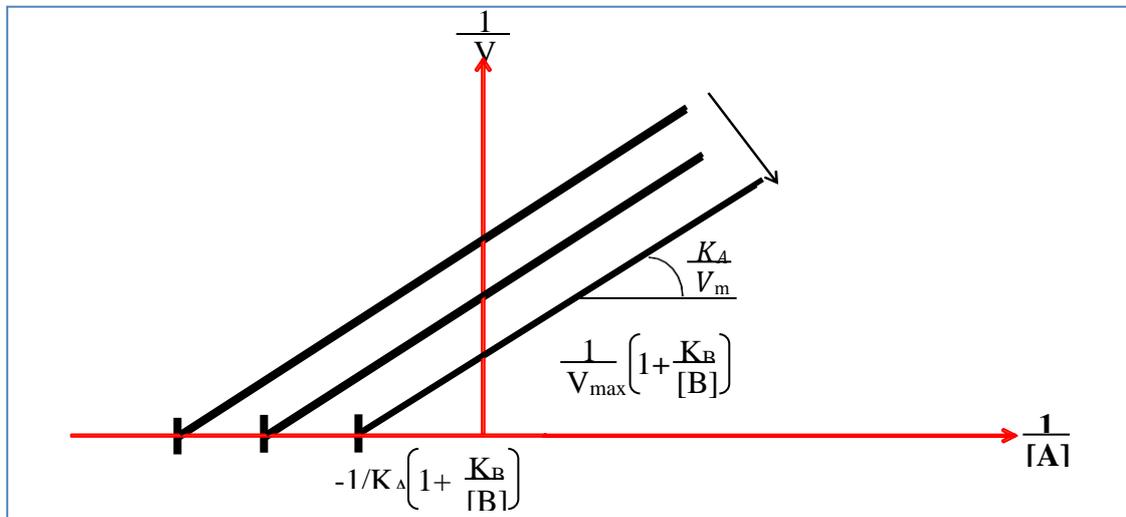


Figure 48: Représentation primaire $1/V=f(1/A)$

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

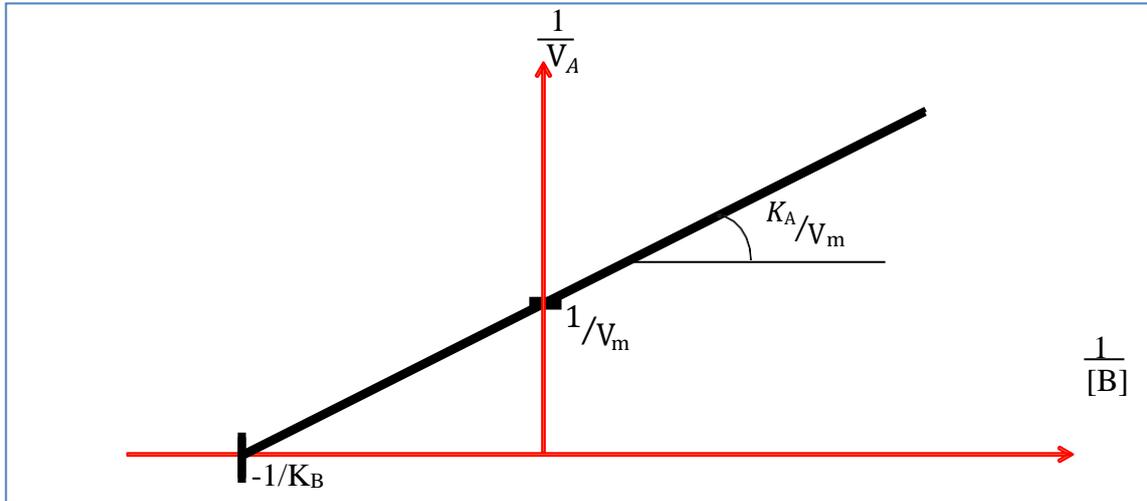


Figure 49: Représentation secondaire $1/V_A=f(1/B)$

$\frac{1}{V}$ en fonction de $\frac{1}{[B]}$

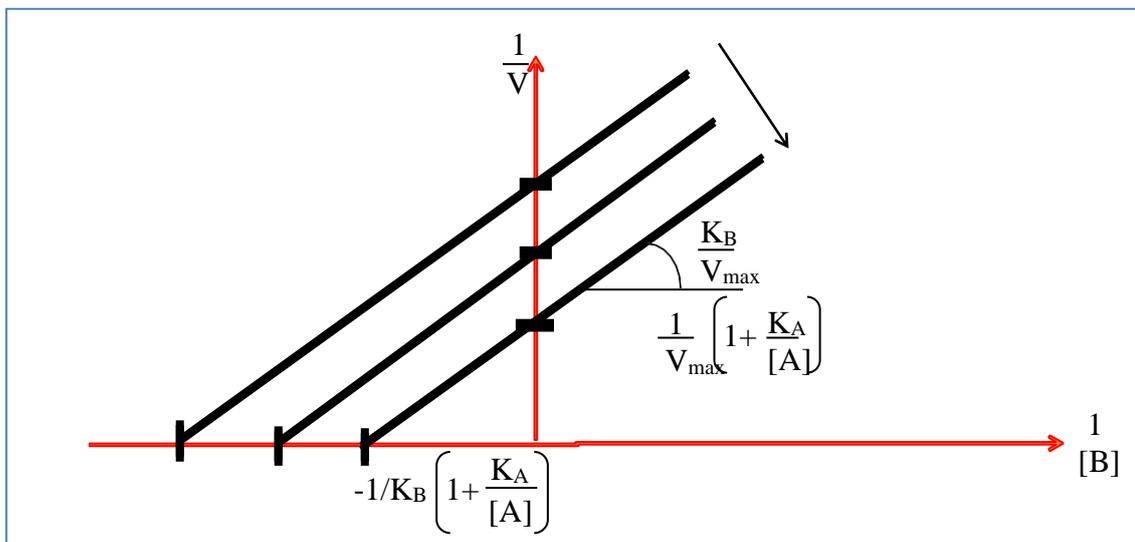


Figure 50: Représentation primaire $1/V = f(1/B)$

Si on porte $1/V_B = f(1/A)$, on obtient la représentation secondaire, celle-ci permet de mesurer : V_{\max} et K_A

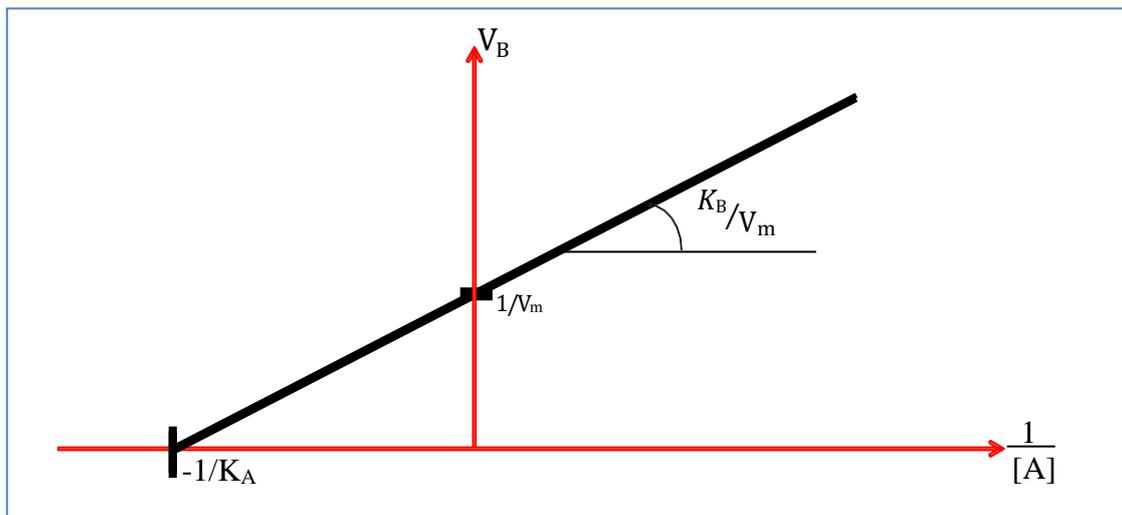


Figure 51: Représentation secondaire $1/V_B = f(1/A)$

4.2.2.2. Cas où le substrat ne forme pas de complexe avec l'enzyme

On peut concevoir que des réactions enzymatiques se produisent entre deux substrats sans que l'un d'eux se complexe de façon définie avec l'enzyme.

Dans ce cas, le second substrat est alors impliqué dans une réaction biomoléculaire avec le complexe de MICHAELIS.

Chapitre 4 : Cinétique enzymatique à deux substrats



$$V = k_2 [EA][B] \quad K_A = \frac{[E][A]}{[EA]}$$

$$\text{Avec } [E_0] = [E] + [EA] \Rightarrow [E] = [E_0] - [EA]$$

$$K_A = \frac{(E_0 - [EA])[A]}{[EA]}$$

$$K_A [EA] = [E_0][A] - [EA][A]$$

$$K_A [EA] + [EA][A] = [E_0][A] \longrightarrow [EA] (K_A + [A]) = [E_0][A] \longrightarrow [EA] = \frac{[E_0][A]}{K_A + [A]}$$

$$V = \frac{k_2 [E_0][A][B]}{K_A + [A]}$$

(structure MICHAELIENNE (réaction d'ordre 1 par rapport à B) (Arhab.R.2009).

Evaluation

Exercice 1 :

L'étude cinétique du glycogène phosphorylase (α -1,4 glucane : orthophosphate glucosyl transférase) est effectuée afin de déterminer le mécanisme de la réaction. Les vitesses initiales de la réaction sont mesurées, exprimées en μmoles de GTP formé par min et par mg de protéine, en fonction de la concentration des deux substrats.

[Phosphate] (mM)	[Glycogène] (mg/ml)				
	3,2	8,0	16,0	24,0	48,0
6	12,0	18,0	21,0	23,0	25,0
15	24,0	35,5	43,0	46,0	49,0
30	35,5	53,0	64,0	68,5	74,0
45	43,0	64,0	77,0	82,0	88,0
60	47,5	71,0	85,0	91,5	98,5

Question : Déterminer le mécanisme de la réaction, la vitesse maximale (V_m) et K_m des deux substrats.

Exercice 2 :

Une enzyme catalyse une réaction selon un mécanisme ordonné. On mesure la vitesse initiale de la réaction pour différentes concentrations de l'un des substrats (X) en maintenant fixe la concentration de l'autre substrat (Y), et inversement. Les résultats, exprimés en $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$, sont les suivants :

[X] (mM)	[Y] (μM)		
	0,33	0,67	5
3	0,017	0,024	0,034
5	0,025	0,033	0,047
10	0,039	0,038	0,061

Question 1 : Déterminer les paramètres cinétiques auxquels vous avez accès en n'utilisant que les deux représentations primaires.

Question 2 : Déterminer l'ordre de fixation des substrats.

Question 3 : De quel paramètre cinétique ne détermine-t-on pas la valeur ?

Chapitre 4 : Cinétique enzymatique à deux substrats

Exercice 3 :

On étudie le mécanisme catalytique du glycogène phosphorylase en mesurant les vitesses initiales de la réaction pour différentes concentrations des 2 substrats (le glycogène et le phosphate). Les résultats, exprimés en $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ sont les suivants :

[phosphate] . 10^3 M	[glycogène] ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	3,2	8	16	24	48
6	12	18	21	23	25
15	24	35,5	43	46	49
30	35,5	53	64	68,5	74
45	43	64	77	82	88
60	47,5	71	85	91,5	98,5

Question 1 : Écrire la réaction catalysée.

Question 2 : Déterminer le mécanisme de la réaction

Question 3 : Déterminer les paramètres cinétiques de cette réaction.

Exercice 4 :

Une enzyme catalyse une réaction entre deux substrats A et B. Afin de déterminer le schéma cinétique de la réaction, les vitesses initiales de la réaction sont déterminées en présence de concentrations variables de substrats. Les résultats obtenus exprimés en $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ sont les suivants :

[A] (mM)	[B] (mM)				
	0,1	0,2	0,5	1	2
0,1	0,05	0,10	0,21	0,33	0,46
0,2	0,09	0,16	0,30	0,43	0,55
0,5	0,14	0,24	0,40	0,52	0,62

Question 1 : Déterminer le mécanisme cinétique de la réaction

Question 2 : Déterminer les différentes constantes cinétiques, la vitesse maximale et les constantes d'affinité.



Chapitre 5 : Applications des enzymes en biotechnologie



5.1. Définition de la biotechnologie

Les biotechnologies sont des procédés servant à produire, conserver ou transformer des matières biologiques d'origine animale, végétale, microbienne ou virale afin d'obtenir des produits présentant une utilité et une valeur industrielles, commerciales, économiques, sociales ou sanitaires. (Joseph H. Hulse.,2008).

Selon la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique-France, La biotechnologie consiste en l'exploitation industrielle des potentialités des microorganismes, des cellules animales et végétales, et des fractions subcellulaires qui en dérivent. (Charles Susanne, 1997).

5.2. Applications des biotechnologies

Les biotechnologies ont des applications dans de nombreux domaines, notamment santé humaine et animale, agriculture, pêche et sylviculture, production alimentaire, procédés industriels, et extraction des ressources naturelles, énergie en particulier. (OECD, 2007)

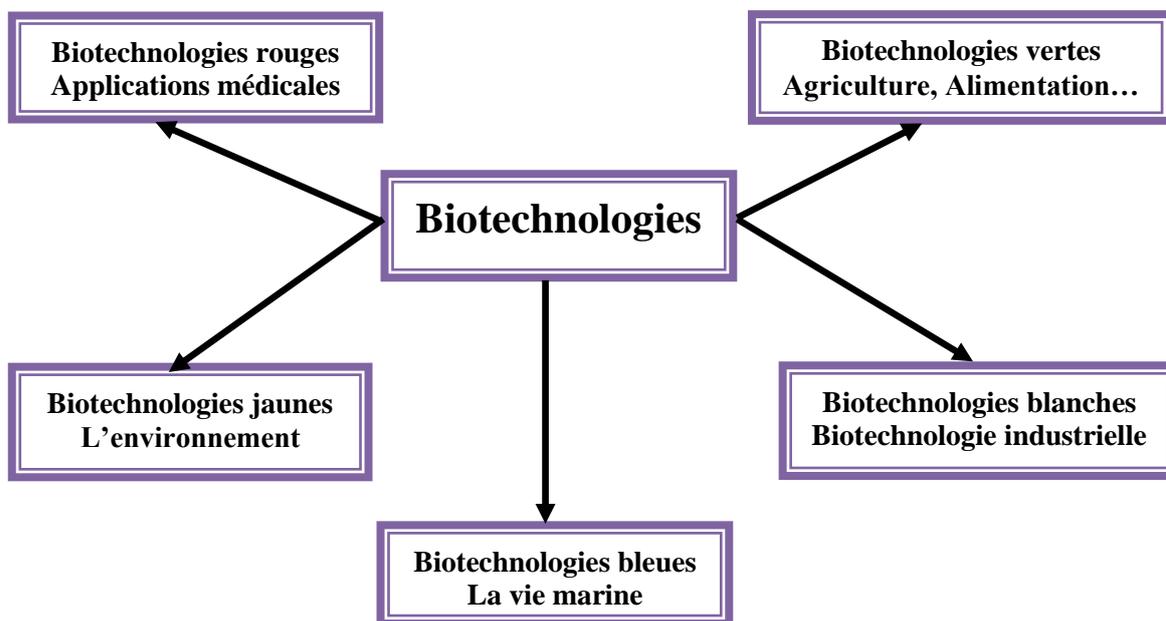


Figure 52: Les cinq couleurs des biotechnologies (Jean Guézennec., 2014)

5.2.1. Biotechnologie rouge

5.2.1.1. Définition

Il s'agit de biotechnologies dont le champ d'application principal est la médecine. Dans ce secteur, la découverte de nouveaux traitements fait de plus en plus appel aux biotechnologies pour chercher les causes des maladies, concevoir, tester et

produire des médicaments spécifiques. Ceci suppose un effort de recherche très important pour comprendre le fonctionnement des organismes et concevoir des médicaments capable d'agir sur d'éventuelles perturbations. (**Guillaume Polycarpe Sika et Amadou Moustapha Bèye., 2016**).

5.2.1.2. Applications des enzymes dans la biotechnologie rouge

Les enzymes sont en relation avec des applications biotechnologiques comme la mise au point de médicaments sur mesure pour bloquer une pathologie ou une infection à travers l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes qui sont souvent des analogues de substrat (ou faux substrats) conduisant à des inhibitions compétitives vis à vis des substrats.

Parmi les enzymes sujets utilisées, on note la cyclooxygénase (COX) et l'action de l'aspirine (acides acétyl-salicylique), et la neuraminidase du virus de la grippe A H1N1 (grippe porcine) ou grippe A N5N1 (grippe aviaire) et l'action de Oseltamivir (Tameflu) (**Baazi.M., 2013**).

5.2.2. Biotechnologie verte

5.2.2.1. Définition

Elle concerne la sélection végétale moderne. Elle utilise des méthodes biotechnologiques pour améliorer de façon ciblée la résistance aux insectes, aux champignons, aux virus, aux herbicides, et à certains stress abiotiques. Il constitue la base permettant de transférer certains gènes d'une espèce de plante à une autre en vue de développer des plantes résistantes à des stress spécifiques. (**Guillaume Polycarpe Sika et Amadou Moustapha Bèye., 2016**).

5.2.2.2. Applications des enzymes dans la biotechnologie verte

Industrie alimentaire :

De très nombreuses enzymes sont utilisées par l'industrie agroalimentaire dans des secteurs aussi variés que les produits laitiers, la panification, l'amidonnerie, les jus de fruits, en générale pour améliorer la qualité des produits obtenus. (**Academie des technologie., 2010**).

Chapitre 5 : Applications des enzymes en biotechnologie

Tableau 4: Quelques utilisations des enzymes dans la production alimentaire
(<https://www.caducee.net/DossierSpecialises/EUFIC/enzymes.asp>)

Marché	Enzyme	But ou Fonction
Produits laitiers	présure (protéase)	coagulant pour la fabrication de fromage
	lactase	hydrolyse du lactose pour obtenir des produits sans lactose
	protéase	hydrolyse des protéines du lactosérum
	catalases	extraction du peroxyde d'hydrogène
Brasserie	cellulases, bêta-glucanases, alpha-amylases, protéases, amylases maltogènes	liquéfaction, clarification ; compléments des enzymes de malt
Production d'alcool	amyloglucosidase	transformation de l'amidon en sucre
Boulangerie	alpha-amylases	décomposition de l'amidon ; production de maltose
	amyloglycosidases	saccharification
	protéase	décomposition des protéines
	pentosanase	décomposition du pentosane, conduisant à une réduction de la production de gluten
	glucose-oxydase	stabilité de la pâte
Vins et jus de fruit	pectinase	augmentation du rendement et de la clarification du jus
	glucose-oxydase	extraction de l'oxygène
Viande	protéase	attendrissage de la viande
Protéines	protéases, trypsine, aminopeptidases	décomposition de différents constituants
Amidon	alpha-amylase, glucoamylases, hémicellulases, amylases maltogènes, pullulanases, glucose-isomérases,	modification et transformation
Inuline	Inulinases	production de sirops de fructose
Alpha-acétolactate décarboxylase Bêta-glucanase	Bière	
Alpha-amylase	Boulangerie-pâtisserie, bière, distillation, amidon	
Catalase	Mayonnaise	
Chymosine	Fromage	
Alpha-glucanotransférase Glucose-isomérase	Amidon	
Glucose-oxydase	Boulangerie-pâtisserie, mayonnaise aux oeufs	
Hémicellulase	Boulangerie-pâtisserie	

5.2.3. Biotechnologie jaune ou grise

5.2.3.1. Définition

Elle comprend le domaine des technologies environnementales. Des procédés biotechnologiques sont utilisés pour l'assainissement des sols, le traitement des eaux, l'épuration des gaz résiduels et de l'air, de même que la réutilisation des déchets et des résidus. **(Guillaume Polycarpe Sika et Amadou Moustapha Bèye., 2016).**

5.2.3.1. Application des enzymes en biotechnologie jaune

L'emploi d'enzymes a rendu de nombreux procédés industriels moins nocifs pour l'environnement. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques; elles sont très efficaces et présentent beaucoup d'avantages sur les catalyseurs non biologiques. Elles ne sont pas toxiques et sont biodégradables, elles travaillent le mieux à des températures modérées et dans des conditions douces ; elles ont moins d'effets secondaires que les méthodes traditionnelles, car elles sont extrêmement spécifiques.

Dans le tannage du cuir, on a introduit des enzymes à la place des substances chimiques agressives traditionnellement utilisées pour nettoyer les peaux. Dans la production textile, les enzymes ont supplanté les substances chimiques de blanchiment, en particulier pour le délavage des jeans.

Quant à l'industrie du papier, l'utilisation d'enzymes pourrait très bientôt considérablement réduire la consommation du chlore utilisé dans la préparation de la pâte à papier.

Les enzymes présentes dans les poudres à lessive diminuent de façon significative la quantité de détergents nécessaire pour un effet de nettoyage donné; leur emploi signifie en outre que la température de lavage peut être abaissée. Or, une baisse de température de 20°C économise plus du tiers de l'énergie utilisée par la machine. Étant donné que, dans de nombreux pays de l'Europe de l'Ouest, jusqu'à 5% de la dépense d'énergie domestique correspond aux lessives, ces molécules ont apporté une contribution intéressante aux économies d'énergie **(FÉDÉRATION EUROPÉENNE DE BIOTECHNOLOGIE, 1999).**

5.2.4. Biotechnologie blanche

5.2.4.1. Définition

Secteur en biotechnologie qui utilise des organismes vivants et des enzymes pour synthétiser des produits facilement biodégradables requérant moins d'énergie et créant moins de déchets lors de leur production. (**Académie des technologies, 2010**)

5.2.4.1. Application des enzymes dans la biotechnologie blanche

Dans le domaine de la biotechnologie blanche, la production d'enzymes est un marché en plein essor pour les industries du textile, du cuir, du biofuel, de la détergence, ect. (**Jean-Pierre Dal Pont et Marie Debacq, 2020**).

Industrie textile :

Les enzymes sont utilisées à plusieurs étapes dans le domaine textile, pour le coton, le chanvre, et le lin par exemple, notamment pour désencoller les fibres de Coton, pour éliminer le peroxyde d'hydrogène (Catalase), et les excès de colorants (peroxydase), pour effectuer du bio polissage (jeans), ect. Ce dernier procédé a pris plus de 60% du marché en rendant les tissus traités beaucoup plus résistants que ce traités à la pierre ponce. On sait que l'industrie textile est une grosse consommatrice d'énergie et d'eau : 100 l d'eau pour chaque kg de textile fabriqué .L'utilisation des enzymes réduit les quantités de produits chimiques, d'eau et d'énergie utilisées ainsi que les temps du traitement. (**Académie des technologies, 2010**).

Industrie du cuir :

Les enzymes sont utilisées dans l'industrie du cuir, les peaux et les dépouilles renferment des protéines et des graisses entre les fibres de collagène. Avant le tannage, ces substances doivent être en partie ou totalement éliminées. Les protéines peuvent être enlevées par des protéases et les graisses par des lipases, ainsi que par des agents tensio-actifs et des solvants. De nos jours, les protéases sont utilisées principalement pour le trempage, le confitage, et l'ébourrage activé par des enzymes. L'utilisation de lipases pour dissoudre et éliminer les graisses en est encore au stage de la recherche.

Lors de la préparation des dépouilles et des peaux, il importe de tremper convenablement la matière première afin d'obtenir un cuir de bonne qualité. Certaines matières premières sont stockées en atmosphère sèche et leur réhydratation à un degré satisfaisant risque d'être difficile et de prendre du temps. L'utilisation des protéases et

Chapitre 5 : Applications des enzymes en biotechnologie

des carbohydratases pour dégrader les protéines et les hydrates de carbones interfibriaires améliore sensiblement l'absorption d'eau et raccourcit l'opération de trempage. (OECD., 1989).

Industrie de la pâte à papier :

L'utilisation des enzymes dans l'industrie papetière est mal connue mais importante. Plusieurs types d'enzymes sont utilisés :

- ✓ Cellulases, hémicelluloses et pectinases pour la mise en pâte
- ✓ Cellulases et xylanases pour le blanchiment permettant la suppression de l'utilisation du chlore et évitant la production de composés organohalogénés absorbables nuisibles pour l'environnement.
- ✓ Lipase pour la réduction des poix
- ✓ Cellulases et hemicellulases pour le désencrage des papiers recyclés

(Académie des technologies., 2010).

5.2.5. Biotechnologie bleue : ou biotechnologie marine

5.2.5.1. Définition

Occupe dans cette classification, une place particulière, elle concerne la valorisation du potentiel incommensurable, et surtout très peu connu, des mers et des océans, un écosystème qui, à lui seul, couvre plus de 70% de notre planète. La connaissance de ce milieu est encore bien moindre que celle du milieu terrestre, donc est tout naturellement source de découvertes.

Il conviendrait peut être également de considérer le milieu marin comme une ressource plus qu'un secteur spécifique des biotechnologies, tant qu'il peut contribuer à tous les autres secteurs des biotechnologies. (Jean Guézennec., 2014).

5.2.5.2. Applications des enzymes dans la biotechnologie marine

Les biomasses marines et leur diversité constituent un ensemble de ressources exploitables et valorisables, utiles pour l'homme. Les secteurs de l'alimentation sont concernés, comme ceux de la santé. Un extraordinaire champ d'applications biotechnologiques est en cours d'ouverture.

Les macromolécules marines exploitables ne se résument pas aux agents de texture. On exploite de plus en plus fréquemment les propriétés fonctionnelles des enzymes, essentiellement des protéases, présentes dans les viscères de poissons. Le choix est immense : avec plus de 20 000 espèces osseuses (téléostéens) et environ 7 000 espèces cartilagineuses (chondrichthyens), les poissons forment le plus important

et le plus diversifié des groupes de vertébrés. En outre, leurs enzymes présentent de nombreux avantages sur celles des sources classiques. Bien que possédant des fonctions catalytiques similaires à celles des protéases d'origine bactérienne, végétale ou animale couramment utilisées dans l'industrie, les enzymes marines se distinguent par leurs conditions optimales d'activité : elles sont fonctionnelles dans des solutions fortement salines, et surtout, pour les espèces d'importance industrielle majeure, possèdent une forte activité catalytique à basse température. Revers de la médaille, elles résistent mal à la chaleur, mais ceci rend leur inactivation plus aisée.

Des enzymes telles que les aminopeptidases de thon ont pu être utilisées pour réduire l'amertume de produits à usage alimentaire. Les protéases de poisson servent également à éliminer les peaux des seiches et de calmars ou les membranes entourant les poches d'œufs de poissons pour la préparation du « caviar » de saumon. Cela évite l'intervention manuelle, trop fastidieuse, ou mécanique, trop destructrice. De même, l'épluchage des crevettes de pêche industrielle est facilité par une action enzymatique préalable. **(Le Gal., 2014)**

Références

Références

(Livres et photocopiés, sites internet, etc).

- [1]. Arhab.R.2009, Enzymologie approfondie. Université Larbi Ben M'hidi, OEB.
- [2]. Baazi.M.,2013 , Sciences de la vie, Biochimie. Protéines et Enzymes', Faculté des Sciences, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Morocco.
- [3]. Belkacem.I., 2017. L'activité enzymatique, Faculté de médecine, Université 3 de Constantine.
- [4]. Benkahoul.M., 2017, Enzymologie fondamentale, Université des Frères Mentouri Constantine.
- [5].Biotechnologies et environnement, 2010. Editions Le Manuscrit, ISBN : 2304233473, 9782304233476
- [6].Charles Susanne.,1997, Les manipulations génétiques: Jusqu'où aller ?, Ed: De Boeck Supérieur, ISBN : 2804124614, 9782804124618, 224 pages.
- [7]. Moussard.C., 2006, Biochimie structurale et métabolique, De Boeck Supérieur, ISBN : 2804152367, 9782804152369, 368 pages.
- [8]. Moussard.C., 2020. Biochimie et biologie moléculaire, De Boeck Supérieur, ISBN : 2807322158, 9782807322158, 344 pages.
- [9]. Cornish-Bowden.A., Jamin.M.,Saks.V., 2004.Cinétique enzymatique, Portland Press,Ltd.London.ISBN 2-86883-742-5
- [10].Blanchet.C., 2022, Biochimie, Éd : Editions Ellipses, ISBN : 2340070619, 9782340070615, 416 pages.
- [11]. Denis.M, 2007, Biochimie structurale, Enzymes ; Co-Enzymes, université de Rennes I.
- [12]. Djenane., N, 2019.Cours enzymologie, Faculté de médecine, université Ferhat Abbas Sétif.
- [13]. Donald Voet, Judith G. Voet, 2016, Biochimie, Éditeur : De Boeck Supérieur, ISBN : 2804171019, 9782804171018, 1784 pages.
- [14]. Eduardo D. P. De Robertis, E. M. F. De Robertis., 1983. Biologie cellulaire et moléculaire, Éd : Presses Université Laval, ISBN : 2763769543, 9782763769547, 758 pages.
- [15]. EFB, 1999 (European Federation of Biotechnology). Biotechnologie Environnementale, Research and Information Services , National Museum of Sciences & Industry, GB-SW7 2DD London

- [16]. Ghouali., MA. 2017, Enzymologie, Faculté de médecine, Université d'Alger.
- [17]. Gregory A. Petsko, Dagmar Ringe, Mme Dominique Charmot, 2008, Structure et fonction des protéines, De Boeck Supérieur, ISBN :2804158888, 9782804158880, 190 pages.
- [18]. Guillaume Polycarpe Sika, Amadou Moustapha Bèye., 2016.Sélection des plantes et technologie semencière, Editions L'Harmattan, 2016, ISBN : 2140021320, 9782140021329, 354 pages.
- [19]. Hallel.S, Enzymologie, <http://univ.ency-education.com>
- [20]. Jean-Pierre Dal Pont,Marie Debacq., 2020. Les industries de procédés 2 : Management industriel et révolution numérique, Volume 2, Éditeur : ISTE Group, ISBN :1784056596, 9781784056599, 282 pages.
- [21]. Jean Guézennec., 2014, Bactéries marines et biotechnologies, Editions Quae, ISBN : 275922144X, 9782759221448, 176 pages
- [22]. Jaspard.E., 2019, Enzymologie fondamentale, ellipses, ISBN : 9782340035157
- [23]. Joseph H. Hulse., 2008. Développement durable : un avenir incertain : avons-nous oublié les leçons du passé?, Ed : IDRC, ISBN : 2763785964, 9782763785967, 393 pages.
- [24]. Keillor., J.W., 2014. Enzymologie (Inhibition enzymatique), Faculté des arts et des sciences. Université de Montréal. <http://www.esi.umontreal.ca/~keillorj>.
- [25].Le Gal, Y. (2004). Biodiversité marine et exploitation biotechnologique des océans. *VertigO-la revue électronique en sciences de l'environnement*, 5(3).
- [26]. Neuhaus.J.-M., 2003. Théorie d'enzymologie, Université de Neuchâtel, Suisse.
- [27]. OECD., 2008. Science, technologie et industrie : : tableau de bord de l'OCDE 2007, Éditeur :OECD Publishing, ISBN :9264037918, 9789264037915 , 232 pages
- [28]. OECD., 1998, La biotechnologie au service de produits et de procédés industriels propres Vers un développement industriel durable : Vers un développement industriel durable, Éditeur : OECD Publishing, ISBN : 9264263403, 9789264263406, 218 pages.
- [29].F., Piètre E., 2014. Biologie BCPST1 - conforme au nouveau programme 2013, Editions Ellipses, ISBN : 2340041635, 9782340041639, 900 pages.
- [30]. Raisonnier.A., 2002, Enzymologie élémentaire, Université Paris-VI.
- [31]. Romaric Forêt., 2012. Dico de Bio, De Boeck Superieur, ISBN : 2804171450, 9782804171452, 1104 pages.

[32]. Romaric Forêt, 2018, Dictionnaire des sciences de la vie, De Boeck Supérieur, 2018, ISBN : 2807306993, 9782807306998, 1424 pages.

[33]. Segarra J., Chauvet E., Colson-Proch C., Huille M., Labrousse M., Louet F., Metz

[34]. Tripathi.A.D., 2022, Novel Food Grade Enzymes: Applications in Food Processing and Preservation Industries, Springer Nature, ISBN: 9811912882, 9789811912887, 487 pages.

[35]. <https://www.maxicours.com/se/cours/la-structure-des-enzymes/>

[36]. <https://www.maxicours.com/se/cours/la-structure-des-enzymes/>

[37]. https://en.wikiversity.org/wiki/Enzyme_structure_and_function

[38]. https://proteopedia.org/wiki/index.php/Triose_Phosphate_Isomerase

[39]. https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Fichier:Trypsin_active_site.png

[40]. <https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=54284#>