

ENZYMO II

I. Mécanisme de la réaction enzymatique

Les études cinétiques déterminent des paramètres qui rendent compte de :

- ❖ La formation du complexe Enzyme-Substrat [ES], renseignée par la **K_m** (constante de Michaelis et Menten)
- ❖ La transformation du substrat associé à l'enzyme pour donner le produit de la réaction, renseignée par la **V_m** (vitesse maximale de la réaction)

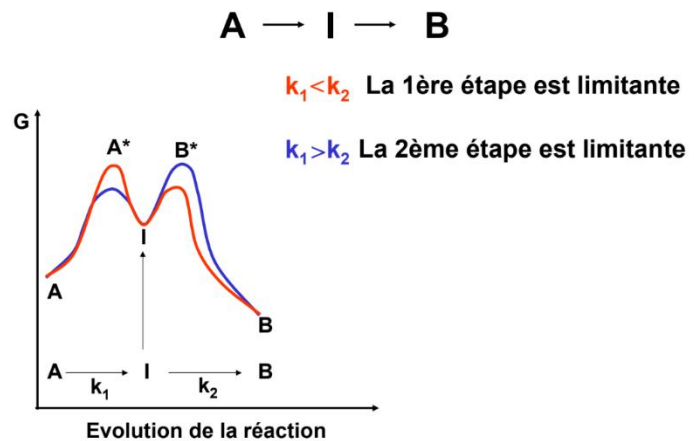
Etude des courbes :

La première « colline » (k_1), représente la vitesse de la **première** réaction : formation de [ES]

La deuxième « colline » (k_2), représente la vitesse de la **seconde** réaction : formation de [E]+[P]

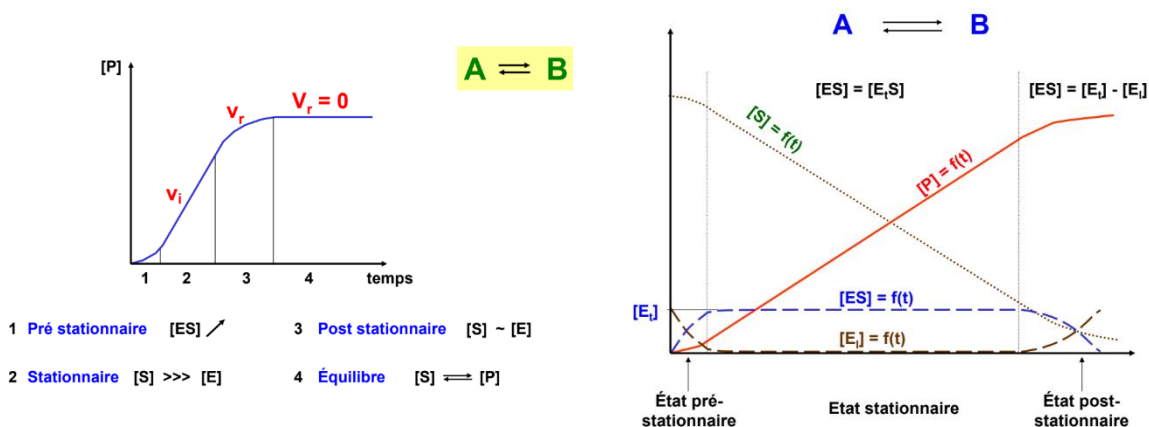
Pour la courbe **rouge** : on voit que la première « colline » est plus **haute** que la deuxième, l'énergie à fournir est plus **grande**, donc la vitesse de la première réaction est plus **lente**.

Pour la courbe **bleue** : on voit que la deuxième « colline » est plus **haute** que la première, l'énergie est plus **haute**, donc la vitesse de la deuxième réaction est plus **lente**.



La vitesse la **moins** importante est **limitante**, c'est elle qui va ralentir et donner la vitesse globale de réaction. Pour la courbe rouge par exemple, la réaction $A \rightarrow I$ est **limitante** car c'est la plus lente.

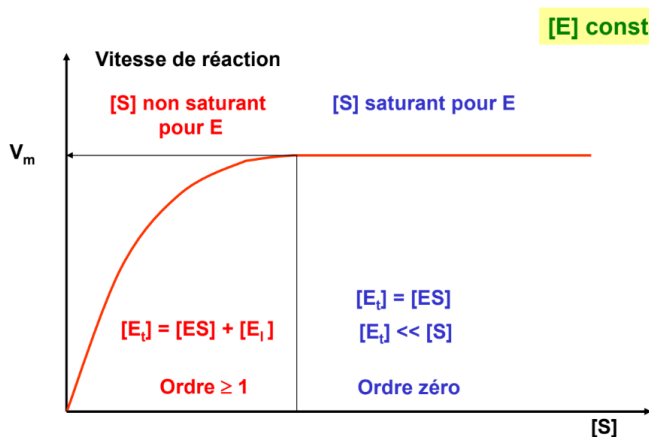
II. Vitesse de Réaction



- 1) **Etat pré-stationnaire** : très **court**, correspond à la formation du complexe [ES].
 - 2) **Etat stationnaire** : Les enzymes sont **saturées** en substrat car celui-ci est en **excès**. Il reste donc du substrat **libre**, qui petit à petit se transforme en **produit**. La concentration du complexe [ES] reste **constante**.
 - 3) **Etat post stationnaire** : Les enzymes ont transformé **tout** le substrat en produit, elles ne sont donc plus saturées **et il n'y a plus de complexe [ES]**. La vitesse **diminue**, et la réaction **inverse** n'est **plus négligeable**.
- On atteint à la fin un état d'équilibre où la réaction se fait **autant dans les deux sens**.

Pour les études cinétiques **on se place dans cet état stationnaire**.

Influence de la Concentration en Substrat :



Lorsque la concentration en substrat est **saturante** pour les enzymes, **toutes** les enzymes sont **occupées** et il n'existe **plus d'E libre**.

Et le fait de **rajouter du substrat** n'accélèrera pas la réaction. C'est pourquoi on parle **d'ordre 0** : c'est une phase **indépendante** de la quantité de substrat, atteignant un **plateau** car toutes les enzymes sont **occupées**.

III. Expression de l'Activité Enzymatique

La capacité intrinsèque d'une enzyme à transformer une quantité de substrat s'exprime de différentes façons :

- ❖ **U.I** : Quantité d'enzyme capable de transformer 1 micromole de substrat par minute
- ❖ **Katal** : Quantité d'enzyme capable de transformer 1 mole de substrat par seconde
- ❖ **AMS (Activité Molaire Spécifique)** : Nombre de moles de substrat transformées par mole d'enzyme et par seconde
- ❖ **AS (Activité Spécifique)** : Rapport de l'activité enzymatique en U.I. ou Katal par la quantité totale de protéine.

IV. Hypothèse de Michaelis et Menten

Il s'agit d'une étude quantitative de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat.

Michaelis et Menten se base sur 2 hypothèses :

- ❖ La formation du complexe [ES] est un intermédiaire **ESSENTIEL**, seul le substrat associé à l'enzyme sera transformé
- ❖ On se positionne dans **l'état stationnaire** avec un **excès** de substrat.

1. Le K_m

Le **K_m** (constante de Michaelis et Menten) est une **constante** qui renseigne sur la **première** partie de la réaction ($E+S \rightarrow ES$). Elle correspond au **rapport** entre la concentration d'enzyme + du substrat et la concentration du complexe [ES]. Elle caractérise **l'affinité** entre le substrat et l'enzyme. La concentration du complexe [ES] est au *dénominateur*, or si notre substrat a beaucoup d'affinité pour son enzyme, la concentration du complexe [ES] va être **important**, et par conséquent, le K_m sera **faible**. Donc **un faible K_m** décrit **une forte affinité** entre l'enzyme et le substrat et inversement.

Définition : Concentration de substrat permettant une vitesse initiale de la réaction enzymatique égale à la **moitié de la vitesse maximum**.

$$K_m = \frac{([E][S])}{[ES]}$$

2. Le V_m

Le **V_m** est une constante qui renseigne sur la **seconde** partie de la réaction ($ES \rightarrow E+P$).

C'est la vitesse à laquelle va être transformé le complexe [ES].

En réalité V_m correspond à une **constante catalytique** représentant la vitesse de la réaction lorsque toutes les enzymes sont **saturées**, donc lorsque tous les sites actifs de l'enzyme sont occupés par le substrat.

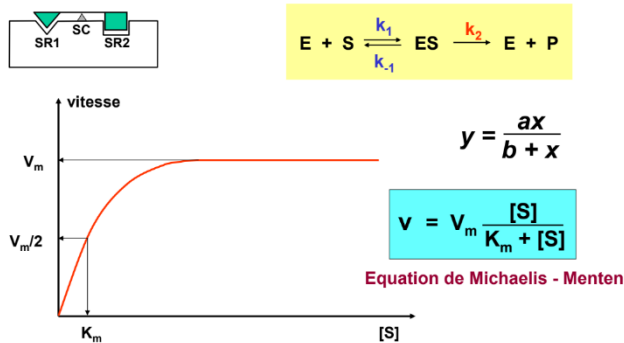
Définition : Vitesse initiale théorique d'une réaction enzymatique obtenue quand toutes les molécules d'enzymes sont saturées par le substrat.

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

Équation de Michaelis et Menten

V. Représentation graphique :

Graphique de la vitesse en fonction de la concentration en substrat :



La méthode du double inverse de **Lineweaver et Burk** :

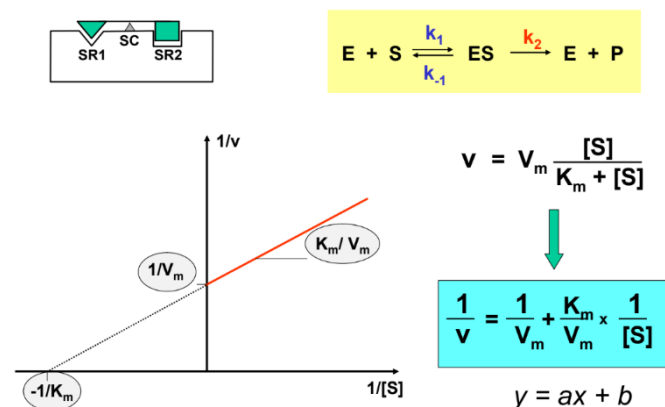
Ici, la représentation graphique se fait sous forme de **droite**. Grâce à cette représentation on pourra davantage observer les variations de V_m et K_m , et mieux déterminer la concentration de substrat qu'avec la courbe hyperbolique.

Ici :

La **pente** de la courbe correspond à K_m/V_m

L'**intersection** entre la courbe et l'axe des **abscisses** correspond à $-1/K_m$

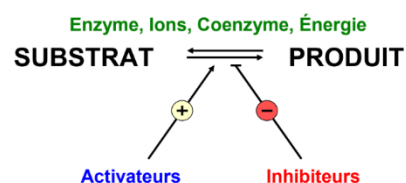
L'**intersection** entre la courbe et l'axe des **ordonnées** correspond à $1/V_m$



VI. La Régulation

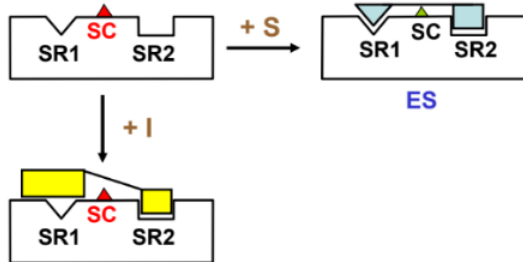
Il existe des facteurs **physico-chimiques** ou non pouvant **influencer** la **vitesse** de réaction et contrôler l'**activité** de l'enzyme.

- S'ils accélèrent la vitesse : **ACTIVATEURS**
- S'ils diminuent la vitesse : **INHIBITEURS**



1. Les inhibiteurs

A. Inhibiteurs compétitifs

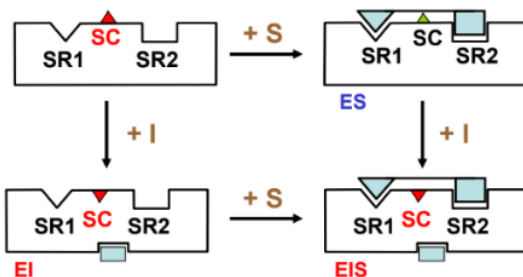


Cet inhibiteur [I] a une structure **similaire** à celle du substrat et peut donc *occuper le site actif* à la place du substrat. Cela formera un complexe [EI] **non fonctionnel**.

En se plaçant sur le site actif, l'**affinité** de l'enzyme pour le substrat **diminue** et K_m augmente. La V_m reste, elle, **inchangée**.

Cette inhibition est **réversible** : il suffit d'ajouter du substrat pour chasser l'inhibiteur du site actif.

B. Inhibiteurs non compétitifs

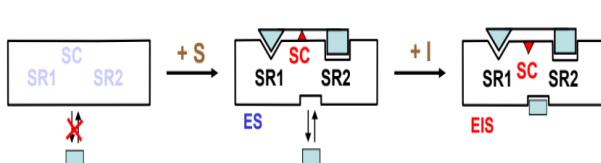


Cet inhibiteur se fixe sur un site **différent** du site actif. Il peut se fixer soit **avant** le substrat (formation du complexe [EI]), soit **après la fixation** du substrat (formation du complexe [EIS]).

L'affinité entre le substrat et l'enzyme (K_m) **ne sera pas modifiée**, mais la V_m va **diminuer** car on a moins de formation du complexe [ES].

Ce type d'inhibition est **irréversible**.

C. Inhibiteurs in(un)compétitifs



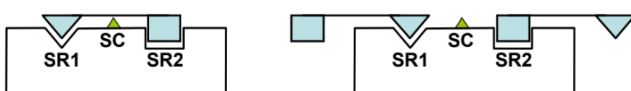
Cet inhibiteur a la particularité de se fixer sur le complexe [ES] **déjà formé**.

Il se fixe aussi sur un site **différent** du site actif.

Ici, la V_m et la K_m vont **diminuer**.

Ce type d'inhibition est aussi **irréversible**.

D. Inhibiteur par excès de substrat



Ce type d'inhibition a lieu quand la molécule de substrat ne se **positionne pas correctement** au niveau du site actif. En effet une molécule mal positionnée **ne pourra pas être transformée en produit**.

2. La protéolyse ménagée

Certaines enzymes sont produites sous formes de **proenzymes** ou **zymogènes** sont des **précurseurs** protéiques permettant le **stockage** des enzymes sous formes **inactives**. L'activation des zymogènes est **irréversible** suite à un **clivage protéolytique** réalisé par des *endopeptidases* (enzymes). C'est un processus **post-traductionnel**.

3. La régulation covalente

Les modifications covalentes sont **réversibles**. Par exemple la **phosphorylation** est un processus permettant *l'activation* ou *l'inhibition* d'une enzyme dans une voie métabolique. C'est aussi une modification **post-traductionnelle** où un Phosphate est transféré à partir d'un ATP (généralement) sur un groupement -OH d'une *Sérine, Tyrosine ou Thréonine*.

Les enzymes responsables de la phosphorylation sont **les Kinases**.

Les enzymes responsables de la déphosphorylation sont **les Phosphatases**.

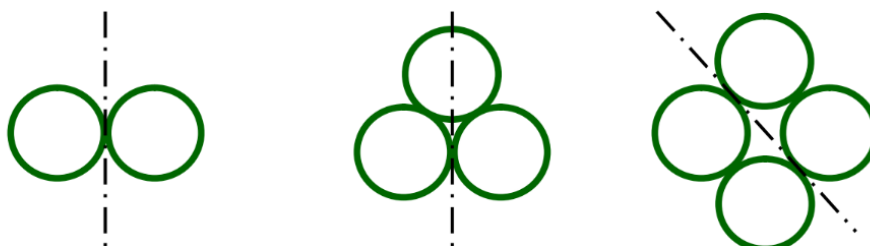
VII. Les Enzymes allostériques

Ces enzymes ne répondent pas aux lois de Michaelis et Menten et possèdent :

- ❖ Un site actif
- ❖ Un site **régulateur** permettant l'activité **réversible** d'un régulateur.

Ces effecteurs régulateurs **ne participent pas** à la catalyse mais peuvent **modifier** la conformation de l'enzyme ce qui influence son action provoquant soit une **augmentation** de l'activité enzymatique (et le régulateur est un **activateur**) soit une **diminution** (et le régulateur est un **inhibiteur**).

L'une des caractéristiques de ces enzymes est l'**effet coopératif**, possible uniquement lorsque l'enzyme est sous forme **oligomérique**, c'est-à-dire qu'elles sont constituées de plusieurs sous unités appelés **protomères** qui seront **identiques** entre eux et disposé selon un axe de symétrie.



Les propriétés d'une protéine allostérique :

- ✓ Leur structure est **quaternaire**
- ✓ Leur variation de conformation dépend du **taux d'occupation** des sites de liaison
- ✓ Leur cinétique enzymatique est **non michaelienne**
- ✓ Leur rôle est **essentiel** dans la **régulation** du métabolisme

Les modulateurs allostériques vont donc se fixer sur le site régulateur par des liaisons **non covalentes** et **réversibles**.

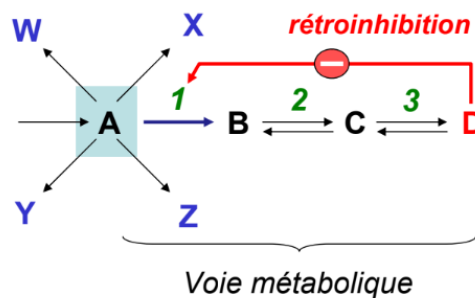
VIII. La rétro-inhibition

Dans ce type de régulation, la concentration du produit final va **contrôler** sa **propre** synthèse.

Si le produit final (D) est en quantité **insuffisante**, l'enzyme 1 est **activée** pour produire ce produit D.

Si le produit final (D) est en quantité **suffisante**, l'enzyme 1 est **inhibée** pour éviter que D s'accumule.

Ce processus de rétro-inhibition est **indépendant** de la concentration des intermédiaires (B,C) de réaction.



Cela nous amène au concept d'**enzyme clé** :

- ✓ Catalyse l'étape d'**engagement** dans une voie métabolique et contrôle cette voie
- ✓ Possède la vitesse de réaction **la plus lente**
- ✓ Est souvent la **première** enzyme de la chaîne
- ✓ S'adapte aux besoins, est **activée** pour augmenter la concentration du produit final ou **inhibée** pour diminuer cette concentration selon le processus de **rétro-inhibition**.