

Enzymologie Partie 2

I- CINETIQUE ENZYMATIQUE (MICHAELIS ET MENTEN)

A) Vitesse de réaction, vitesse initiale

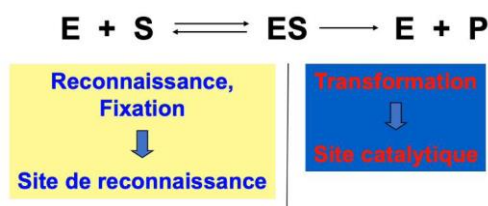
Il existe plusieurs mécanismes enzymatiques différents selon l'enzyme considérée.

Les enzymes michaeliennes fonctionnent selon le modèle suivant :

- ✚ Un **substrat (S)** qui s'associe avec une molécule d'enzyme (E) pour donner un intermédiaire : le complexe enzyme-substrat (ES).
- ✚ Puis cet intermédiaire se dissocie pour donner un **produit (P)** avec **régénération de l'enzyme**.
- ✚ Le complexe ES est un état **transitoire, réversible, spécifique**
- ✚ **Seul le substrat S associé à E** peut être transformé en P
- ✚ Il existe d'autres mécanismes enzymatiques tels que : les enzymes allostériques (revues plus tard)

Chaque mécanisme se traduit par des caractéristiques **cinétiques spécifiques** = l'évolution de la **vitesse** de catalyse en fonction du temps. ++

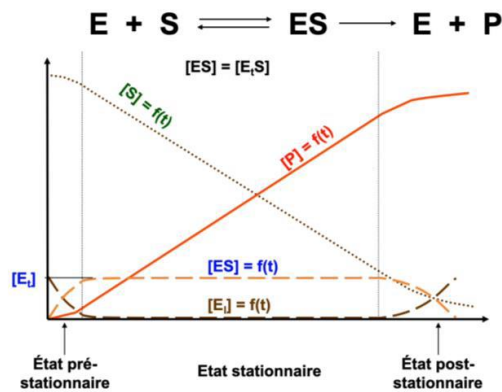
Pour faire une étude cinétique, il faut mesurer la **vitesse instantanée** de réaction à différents **temps** (en ayant choisi avec soin les conditions initiales). A partir de ses mesures on peut **tracer des courbes** représentant la **cinétique des réactions** ce qui permet de déterminer certaines valeurs caractéristiques.



Evolution des concentration de P,S,E au cours du temps :

On considère la réaction de transformation d'un substrat S en produit P avec l'enzyme E et on étudie les variations de concentrations de P, S et E en fonction du temps. On peut distinguer 3 phases :

- Pré-stationnaire
- Stationnaire
- Post-stationnaire



✚ Evolution des concentrations de produit :

- Au début, au cours de la phase pré stationnaire : la concentration de **produit augmente** rapidement.
- Elle atteint une **constance** à l'état **stationnaire**
- Dans la post stationnaire : la concentration de produit tend à être constante.

✚ Evolution de la concentration de substrat (qui subit une variation opposée au produit) :

- Au cours de la phase pré stationnaire la concentration de substrat **diminue** rapidement
- Elle reste **constante** en stationnaire
- En post stationnaire la concentration de substrat atteint un **plateau** car tout le substrat a été épuisé et a été transformé en produit

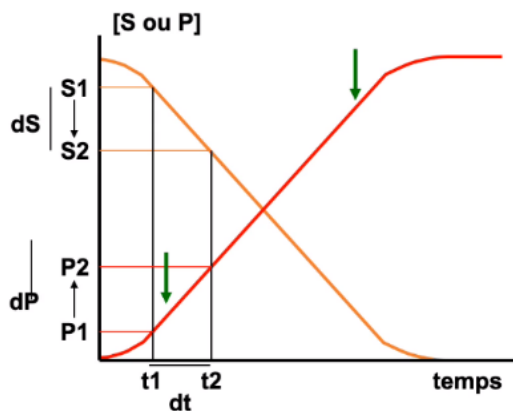
✚ Si on considère les variations de concentration en enzyme associée au substrat :

- La concentration du complexe **ES augmente** de manière très rapide dans la phase pré stationnaire qui est une phase très courte qui dure que quelques millisecondes et qui correspond à la formation du complexe ES
- Puis dans la phase stationnaire la concentration ES est **constante** et est égale à la concentration totale de l'enzyme puisque que toute l'enzyme est associée au substrat dans le complexe ES.
- La concentration en ES **diminue** en post stationnaire car il y a épuisement du substrat

✚ Evolution de la concentration de l'enzyme libre (EI), cad l'enzyme non associée au substrat :

- D'abord sa concentration **diminue** lors de la formation du complexe ES à l'état pré stationnaire
- Puis sa concentration est **quasiment nulle** lors de la phase stationnaire car toute l'enzyme est associée avec le substrat dans le complexe ES.
- En post stationnaire la concentration en enzyme libre **réaugmente** car tout le substrat a été transformé.

Pour mesurer l'**activité** d'une réaction enzymatique pour une réaction n'ayant qu'un substrat et qu'un produit dans un milieu défini. On observe **les concentrations de substrat ou de produit** qui sont en fonction du **temps** passé :



- La concentration du substrat **diminue** au cours du temps
- La concentration du produit **augmente** au cours du temps
- Lorsqu'on fait des mesures à des temps t_1 et t_2 séparés par le temps dt , on appelle S_1 , P_1 la concentration de substrat et de produit au temps t_1 et S_2 , P_2 leur concentration au temps t_2 .
- La différence entre les concentrations de substrat, dS est l'opposée (signe "-") de la différence de concentration des produits, dP :

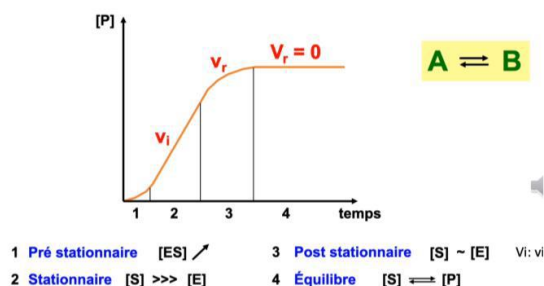
$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt}$$

B) Etude de la vitesse de réaction

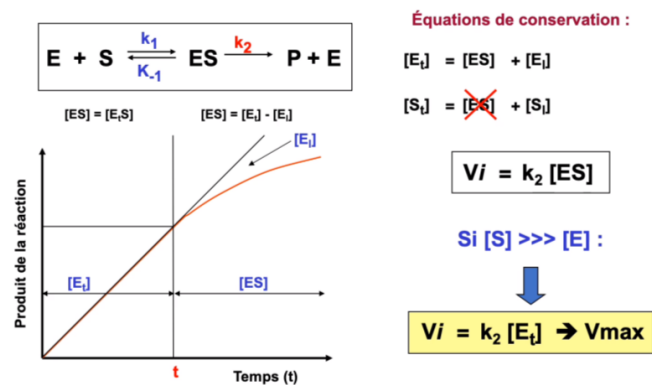
On appelle la vitesse de réaction le rapport $v = -ds/dt = dp/dt$

Vitesse de réaction : nombre de moles de substrat transformées en nombre de moles de produit dans un volume donné et dans un temps donné.

Si on étudie les variations des **concentrations des produits en fonction du temps**, on peut observer au début, dans un milieu où il n'y a au temps 0 que des molécules d'enzyme ou de substrat que la réaction se déroule de manière **non uniforme**.



- On distingue une première phase très brève au cours de laquelle **la vitesse de réaction est croissante** durant cette phase les molécules de substrat se lient avec l'enzyme. La concentration du complexe ES augmente.
- Lorsque toutes les molécules d'enzyme sont occupées par les molécules de substrat, la **vitesse de réaction est maximale** et reste **constante** tant que la concentration de substrat est grande et celle du produit petit. C'est ce qu'on observe lors des premières mesures.
- Lorsque la concentration du produit augmente, **la réaction inverse** commence à concurrencer celle qu'on mesurait. **La vitesse de réaction diminue**.
- Enfin dans une phase tardive, la **vitesse de réaction inverse** cad de produit en substrat devient égale à celle de départ. Les concentrations ne changent plus et la réaction a atteint son **équilibre**.
- Durant la phase stationnaire la **vitesse est constante**, c'est la **vitesse initiale** où un nombre maximal de molécules d'enzyme sont liées à des molécules de substrat. Le rapport $[E_{liée}] / [E_{totale}]$ est maximum. 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 que l'on peut mesurer en fonction des phases de la réaction. (*Dans la suite de ce cours la vitesse étudiée sera toujours la vitesse initiale.*)

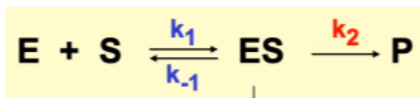


La modélisation mathématique de la cinétique de la réaction catalysée par une enzyme **michaelienne** se base sur 2 termes :

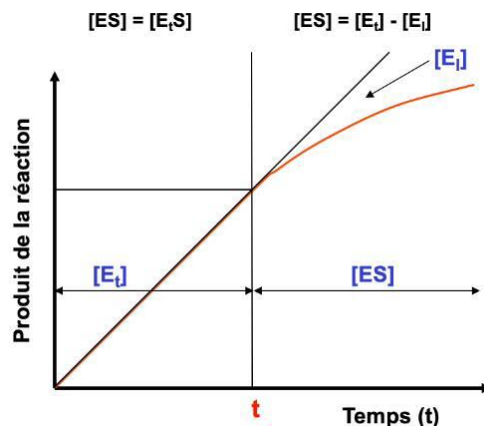
- Les **concentrations** des différentes molécules ou complexes de molécules
- Les **constantes d'association** et de **dissociation** de ces molécules entre elles

Les différents paramètres se retrouvent dans l'équation de la réaction $E + S \rightarrow S + P$; avec :

- k_1 comme constante d'association de **E** et de **S**
- k_{-1} la constante dissociation de **ES**
- k_2 la constante de réaction de **ES** en **E** et **P**



Si on réalise un graphique représentant la concentration en produit apparu au cours d'une réaction chimique catalysée par une enzyme michaelienne en fonction du temps. On peut observer que la **vitesse de réaction à l'instant t** correspond à la **dérivée de la courbe à l'instant t**.



Graphiquement cela revient à mesurer la **pente** de la courbe de la **tangente** de la courbe à l'instant t . On constate que juste après le t_0 la pente de la courbe augmente rapidement donc la **vitesse** de réaction **augmente** rapidement. Cette phase correspond à la mise en place de l'**équilibre** entre la formation et la disparition du complexe ES.

Rapidement la courbe devient **linéaire** ce qui signifie que la vitesse de réaction devient **constante**.

→ On parle alors d'état **stationnaire** durant lequel la quantité de produit formé est **négligeable** donc les conditions de Michaelis sont respectées.

→ La vitesse de réaction déterminée sur cette période correspond donc à la **vitesse initiale**.

Puis on observe un infléchissement de la courbe ce qui correspond à une **diminution** progressive de la vitesse de réaction. Le produit continuant de s'accumuler, la **réaction inverse de consommation de produit** devient **non négligeable**.

A plus long terme la concentration de produit **atteint un plateau**. La quantité maximale de produit pouvant apparaître dépendant de la quantité de substrat introduit au début de l'expérience et des constantes cinétiques de la réaction qui conditionnent le **point d'équilibre atteint**.

Au début de la réaction, il n'y a **pas** de produit P qui s'accumule et donc la réaction inverse de dissociation de P en ES **peut être négligée**. La vitesse de réaction est constante, c'est la vitesse initiale (v_i).

V_i ne dépend QUE des conditions initiales déterminées par l'expérimentateur, à savoir les concentrations de substrat et d'enzyme.

Dans les conditions expérimentales bien standardisées de pH et de température : au cours du temps la quantité de S diminue et de P augmente ce qui va entraîner une **diminution progressive de la vitesse** de catalyse jusqu'à atteindre une **vitesse nulle** :

- Soit la réaction est **totale** et il n'y a **plus de substrat** disponible car épuisé
- Soit la réaction a atteint un **équilibre**

C) Expression de la V_i

L'équation de Michaelis et Menten cherche à établir une expression de la V_i en fonction des grandeurs connues qui sont fixées par l'expérimentateur ou mesurées.

Pour cela il faut se placer dans des conditions particulières : à savoir une concentration de substrat S très supérieure à la concentration de E et une absence ou quasi absence de P :

- La première condition est obtenue en choisissant des **quantités adaptées** d'enzyme et de substrat à introduire dans le milieu réactionnel.
- La 2^{nde}, en réalisant des mesures **suffisamment rapidement** pour que la quantité de substrat transformée en produit soit **faible donc négligeables**.

→ Ce sont les conditions de Michaelis et Menten.

A partir du moment où ses conditions sont réunies on peut effectuer les **approximations suivantes** :

- La concentration en produit P est **nulle et faible** donc on peut **négliger** la vitesse de dissociation de P en complexe ES
- On estime que **l'équilibre** de concentration entre E , S et ES se met en place très **rapidement**. Or une fois cet équilibre atteint, la concentration en complexe **ES reste constante** tant que la concentration de P **est négligeable**.
- Le substrat S étant en concentration bien supérieure à l'enzyme, la concentration maximale du complexe **ES est limitée par la concentration de l'enzyme** il sera donc toujours **négligeable** par rapport à la concentration de substrat libre, même à saturation de tous les sites actifs.

Il en découle donc que la concentration de **substrat total** est égale à la concentration de **substrat libre**. (*car on néglige substrat lié*) et $[enzyme\ totale] = [E\ liée]$.

Ces conditions préalables étant posées on peut commencer à faire un traitement mathématique simple de la **cinétique des réactions** :

$$V_i = k_2 [E_t] \rightarrow V_{max}$$

- Le point de départ est **V_i** qui est donné par le produit entre la valeur de k_2 et la concentration du complexe ES : **ES** est une valeur qui n'est **pas** fixée par l'expérimentateur et qui **ne peut être mesurée**. Pas plus que la concentration en enzyme libre ou en substrat libre.
- Les concentrations **totales** d'enzyme ou totales de substrat sont **mesurables**.

Pour avoir une expression utilisable il faut donc trouver une **expression de la concentration de complexe ES** qui utilise des valeurs qui peuvent être connues :

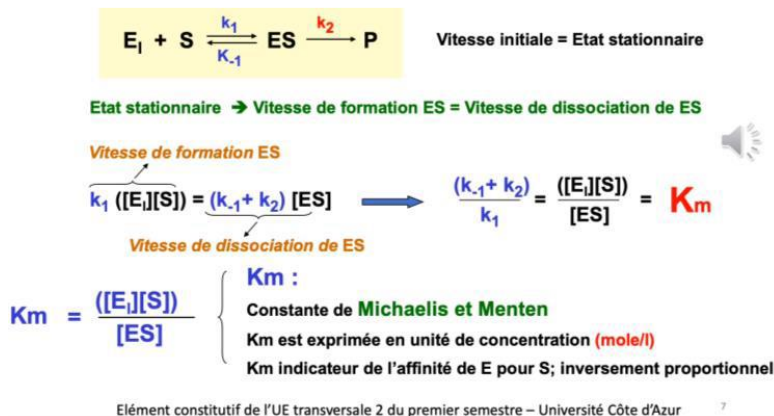
- Soit qui utilise les conditions définies par l'expérimentateur
- Soit qu'elles peuvent être mesurées

Il est nécessaire de distinguer **v_i** et **V_{max}** . En effet V_i dépend de la **concentration du complexe ES** et cette concentration ne peut **pas** dépasser la concentration de l'enzyme totale. Il ne peut **pas** y avoir plus de **complexe** que de molécules **d'enzyme**. Lorsque **$ES =$** à la **concentration totale de l'enzyme** cad lorsque tous les sites actifs sont saturés :

- La vitesse de réaction **ne** peut être supérieure pour cette concentration en enzyme. Donc la **$V_i = V_{max}$**

V_{max} : vitesse maximale de catalyse pour une concentration donnée en enzyme, elle est obtenue à saturation complète de l'enzyme, cad lorsque tous les sites actifs de l'enzyme sont occupés par les molécules de substrat. On obtient cette vitesse maximale quand la concentration totale de substrat est largement supérieure à celle en enzyme.

D) Etude cinétique de la réaction enzymatique



Pendant la phase stationnaire la concentration de **ES est constante**. Cela signifie que la vitesse de **formation** de ce complexe doit être égale à la vitesse de **dissociation** de complexe.

En phase stationnaire il n'y a **qu'une seule** réaction de formation du complexe ES (*car produit négligeable*) donc la vitesse dépend de :

- La valeur de k_1
- La concentration de l'enzyme libre
- La concentration en substrat

En effet, étant donné qu'on se trouve dans des conditions stationnaires on peut **négliger** la réaction de dissociation du **P en ES**.

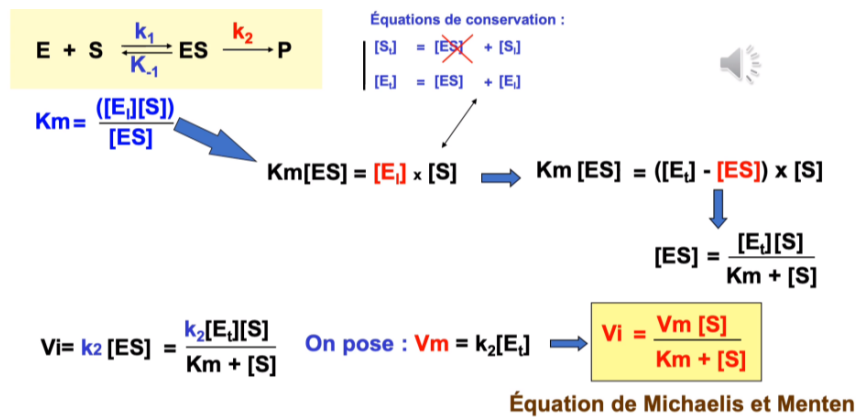
Au contraire, il y a **deux réactions** qui vont diminuer la concentration du complexe ES :

- Une est la **dissociation** dont la vitesse dépend de la concentration de **ES et de k_{-1}**
- L'autre la **transformation** enzymatique proprement dite

→ La vitesse est liée à la concentration du complexe **ES** et de la valeur de **k_2** (cf formule)

On arrive à une expression simplifiée : la constante de Michaelis et Menten, K_m qui est égale : (E_i = Enzyme libre). Elle est exprimée en mole/L. K_m est un indicateur de l'affinité de E pour S et est inversement proportionnel. K_m élevé = faible affinité E-S, K_m faible = forte affinité entre l'enzyme et le substrat.

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



Selon les équations de **conservation de masse** : la concentration totale en substrat est égale à la concentration de substrat associée au complexe ES et la concentration de substrat libre : $[S_t] = [S_{lié}] + [S_{libre}]$.

Or la concentration de substrat associée au complexe ES est négligeable car elle est dépendante de la quantité d'enzyme qui est en très faible concentration par rapport à celle du substrat. ($[E] \ll [S]$). D'autre part la concentration en enzyme est **égale** à la somme de l'enzyme associée au substrat dans le complexe ES et à la concentration l'Enzyme libre ($[E_t] = ([E_{lié}])$)

Or si dans la définition de la K_m on apporte des modifications mathématiques et on remplace la valeur de la concentration de l'enzyme libre avec la différence de la concentration enzyme totale et enzyme associée au substrat. On peut calculer la concentration de ES qui est égale au rapport entre le produit de la concentration en enzyme totale et la concentration en substrat et la valeur de K_m + la concentration en substrat :

$$V_i = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E_t][S]}{K_m + [S]}$$

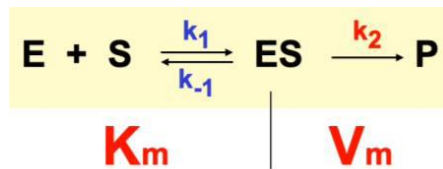
Or, on avait défini la vitesse initiale de réaction comme le produit de la concentration du complexe ES et de la valeur de la constante de réaction k_2 .

Si on effectue les transformations mathématiques avec la concentration d'ES qu'on vient de calculer, on arrive à la formule selon laquelle V_i dépend de la valeur de la k_2 de la concentration en enzyme totale et de la concentration ES divisée par la valeur de la K_m et de la concentration en substrat.

Si on effectue encore des transformations mathématiques on arrive à l'expression qu'on appelle **l'équation de Michaelis et Menten** qui permet donc de calculer la V_i en fonction de la concentration de substrat et de 2 constantes caractéristiques d'une réaction enzymatique : la vitesse maximale et la constante de Michaelis et Menten :

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

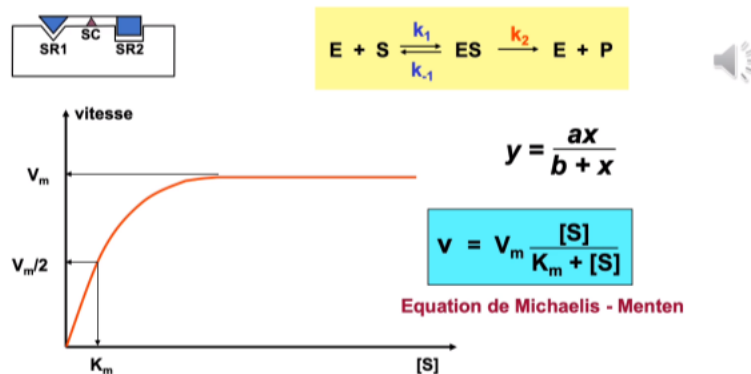
En étudiant cette fonction on observe qu'elle est **univoque** : la V_i est nulle si la concentration de substrat est nulle et que le terme : $S / (K_m + S)$ tend vers 1 lorsque la concentration de S tend vers l'infini. Ce qui entraîne que V tend vers la V_m et enfin que lorsque la concentration K_m est égale à la concentration de S la V_i devient égale à la moitié de la V_m .



K_m (constante de Michaelis) : concentration de substrat permettant une V_i de la réaction enzymatique égale à la moitié de la vitesse maximum. Elle rend compte de l'affinité enzyme/substrat

V_m (vitesse maximale) : V_i théorique d'une réaction enzymatique obtenue quand toutes les molécules d'enzyme sont saturés par le substrat (concentration saturante en substrat). A ce moment-là tous les sites actifs (SA) de l'enzyme sont saturés par le substrat et donc la V_m rend compte de la vitesse de transformation du substrat associé à l'enzyme dans le complexe ES en produit de réaction.*

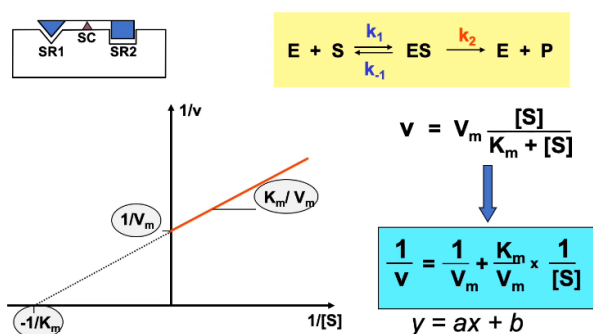
Représentation graphique de $v = f([S])$



Elément constitutif de l'UE transversale 2 du premier semestre – Université Côte d'Azur

10

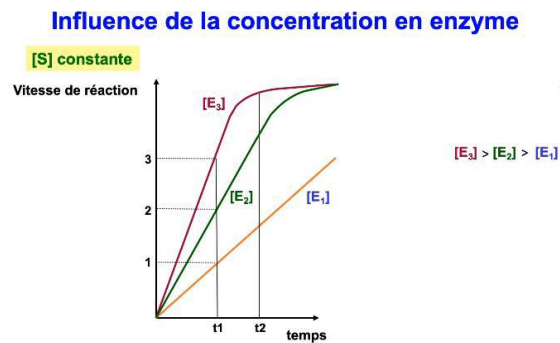
1- Représentation graphique de Lineweaver et Burk : de $1/v = f(1/[S])$:



Pour pallier ce problème on peut représenter dans un graphique linéaire **les inverses** des variables de l'**hyperbole** précédente. A savoir **l'inverse de la vitesse** de réaction en fonction de **l'inverse de la concentration** de substrat. Cette droite est **facile à tracer** à partir des mesures expérimentables pourvu qu'on exprime les résultats à **l'inverse des vitesses initiales** en fonction des inverses des concentrations de substrat choisies. Cette extrapolation permet de déterminer **graphiquement** les valeurs cherchées de K_m et V_m . Cette représentation linéaire est appelée la représentation de **Lineweaver et Burk**.

2- Influence de la concentration d'enzyme :

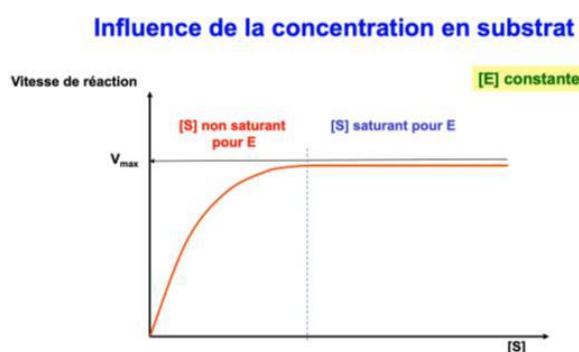
Si on réalise plusieurs expériences en utilisant des **concentrations croissantes d'enzyme**, on se rend compte qu'au bout d'un moment t_1 il y a d'autant plus de **substrat transformé en produit** qu'il y a d'avantage d'enzyme présente. La **vitesse de réaction est plus importante** avec une concentration plus élevée d'enzyme. A condition d'être dans la partie **rectiligne** de la courbe donc de mesurer les V_i dans chaque expérience. Par contre au temps t_2 il n'y a **plus de proportionnalité** entre la vitesse de réaction et la concentration en enzyme. Bien entendu ces expériences sont réalisées en concentration constante de substrat.



3- Influence de la concentration de substrat :

Si la concentration en enzyme est maintenue constante et qu'on fait varier la concentration en substrat S :

- On remarque d'abord une **augmentation rapide de la vitesse** de réaction
- Si S continue d'augmenter, la courbe se fléchit et pour des valeurs élevées de la concentration de S il n'y a **plus d'augmentation** de vitesse. Cette vitesse va tendre asymptotiquement vers une valeur **maximale, la vitesse maximale** qui correspond à la vitesse de réaction lorsque tous les **SA** de l'enzyme sont **saturés** par le substrat.



Expression de l'activité enzymatique

U.I. : Correspond à la quantité d'enzyme capable de transformer **1 μ mole de substrat par minute**, dans les conditions standards de l'expérimentation

Katal : Correspond à la quantité d'enzyme capable de transformer **1 mole de substrat par seconde**, dans les conditions standards de l'expérimentation

A.M.S. : activité molaire spécifique ; Correspond au nombre de **moles de substrat** transformées par **mole d'enzyme et par seconde**

A.S. : activité spécifique ; Correspond au rapport de l'**activité enzymatique**, en **U.I. ou katal**, par la **quantité totale de protéine (en mg)** dans le milieu réactionnel

Conclusion :

Selon la théorie de Michaelis et Menten la formation d'un complexe ES est un intermédiaire essentiel de la réaction enzymatique car seul le substrat associé à l'enzyme peut subir la transformation chimique. Pour étudier la cinétique enzymatique, l'enzyme est présente en large excès par rapport au substrat et on suppose qu'on est dans un état stationnaire : dans ces conditions la concentration de complexe (ES) est constante.

K_m , constante de Michaelis : concentration du substrat permettant une vitesse initiale de la réaction enzymatique égale à la moitié de la vitesse maximale.

V_m , Vitesse maximale : V_i théorique d'une réaction enzymatique obtenue quand toutes les molécules d'enzyme sont saturées par le substrat (concentration saturante en substrat).

II- CONTROLE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

A) Notion d'isoenzymes et macroenzymes

Plusieurs processus sont à la base du **contrôle** de l'activité des enzymes.

1- Processus de contrôle physico-chimiques (*revus plus tard*):

L'activité d'une enzyme dépend de :

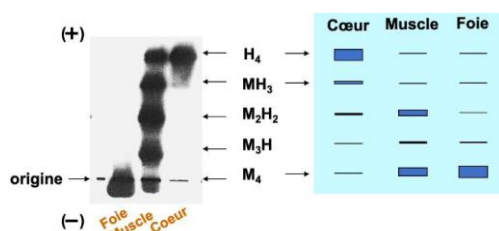
- Sa concentration
- Sa localisation (tissulaire, cellulaire, intra/extracellulaire) cela concerne
- Les fonctions de synthèse et de dégradation des enzymes
- Leur trafic intracellulaire et/ou leur sécrétion
- De son environnement
- Ph (facteur physique)
- Température
- Cofacteurs (ions, coenzymes)
- Concentration en substrat (cinétique + inhibition par excès de [S])

2- Les isoenzymes :

Les isoenzymes représentent des **formes différentes d'une même enzyme**, ils catalysent la **même réaction**, sont issus de **gènes différents**, expression **tissu-spécifique**. Ils ont des propriétés chimiques et physiques **différentes** : mobilité électrophorétique, composition en Aa, propriétés cinétiques.

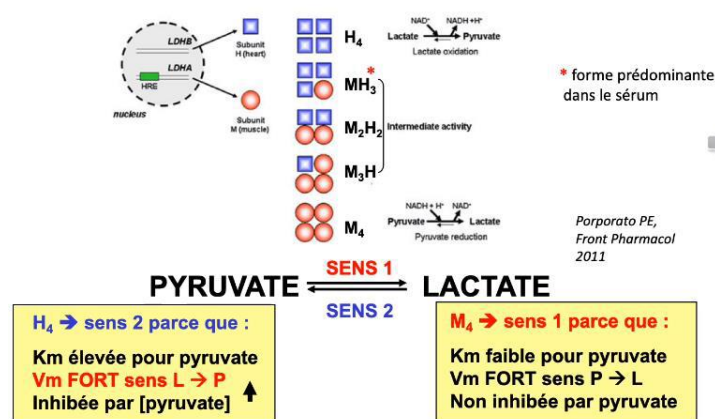
Ex d'isoenzymes :

- La **LDH** (lactate déshydrogénase), tétramérique chaque sous unité soit de type H (Heart) ou M (muscle). En fonction du type d'assemblage il y a **5 différents isotopes de LDH**.
- La LDH de type **M4** a 4 sous unités M est caractéristique du **foie**
- La LDH **H4** composée de 4 sous-unités H est caractéristique du **coeur**
- Intermédiaires de **différentes quantités** de H et de M par exemple dans le **muscle**



Sur le plan fonctionnel les **différentes isoenzymes** de la LDH diffèrent pour leur **affinité pour le lactate ou le pyruvate**, en effet la synthèse de *ces chaines* est plus ou moins importante selon les organes.

- ✚ La molécule **LDH M4**, **abondante dans le muscle** a une forte affinité pour le **pyruvate**, elle est donc très efficace pour la fermentation lactique.
- ✚ La molécule **LDH H4** abondante dans le **coeur** a une forte affinité pour le **lactate**
- ✚ Le **coeur**, bien oxygéné utilise **moins la fermentation** que les autres muscles. La **H4** utilise dans le sens **lactate vers pyruvate** parce que le **K_m pour le pyruvate est élevé** et la **V_m est forte** dans le sens lactate vers pyruvate. Cet H4 est **inhibé** par des concentrations **élevées en pyruvate**.
- ✚ D'autre part la forme **M4** catalyse la réaction **pyruvate vers lactate**. La **K_m est faible** pour le pyruvate et la **V_m est forte** dans le sens **pyruvate vers lactate**. Cet isotype M4 n'est **pas inhibé** par le pyruvate.



3- Les Macroenzymes :

Ce sont des complexes de haut poids moléculaire (HPM) formés par liaison entre **une enzyme et une macromolécule sérique**. (*Sérique=du sang*)

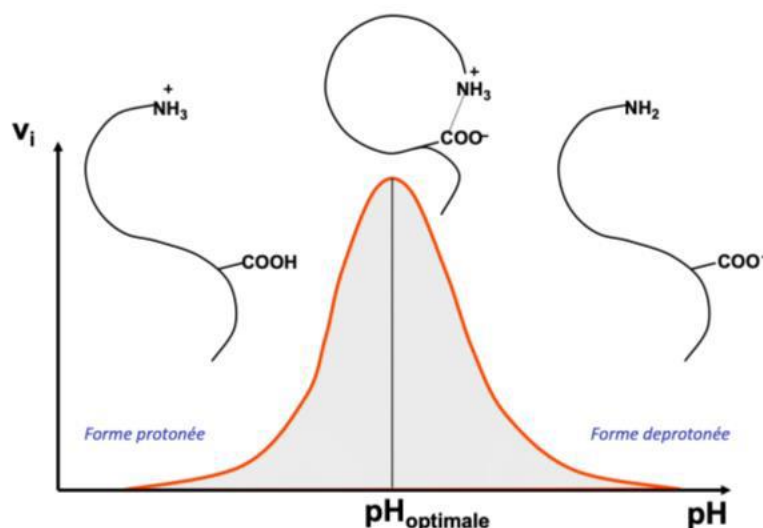
Conséquences pour les enzymes :

- **Ralentissement** de leur clairance (élimination)
- Elévation artéfactuelle de **l'activité enzymatique** correspondante

B) Influence du pH sur l'activité enzymatique

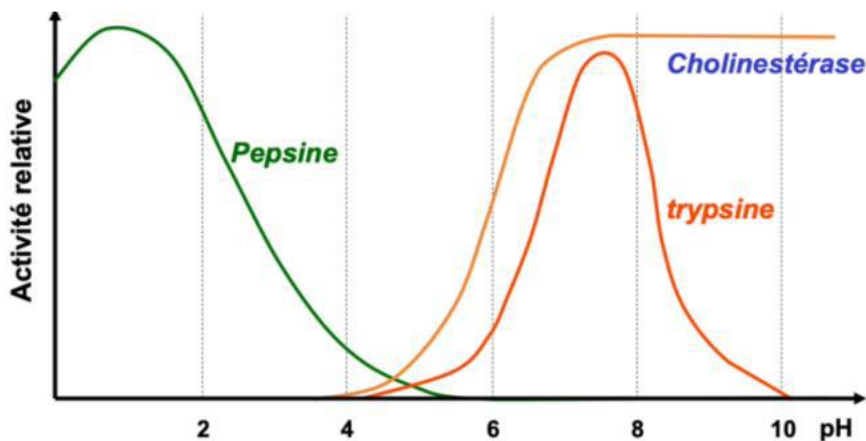
Parmi les facteurs environnementaux qui peuvent influencer l'activité enzymatique il y a le pH. Les variations de pH peuvent avoir des effets **soit sur l'enzyme soit sur le substrat** en changeant par exemple la **charge** et le degré **d'ionisation** de ces 2 molécules. On peut définir un **pH optimal** pour **une** réaction enzymatique d'un substrat dans un milieu donné. Le milieu dans lequel se produit la réaction enzymatique détermine la **charge électrique des radicaux** des Aa qui composent l'enzyme.

- A pH très acide la plupart des fonctions ionisables de ces radicaux sont sous la forme **protonée** cad **COOH** pour la fonction acide carboxylique et **NH₃⁺** pour la fonction amine.
- Au pH plus alcalin les fonctions ionisables de ses radicaux sont sous forme **déprotonée** **COO⁻** pour acide carboxylique et **NH₂** pour la fonction amine.
- A pH proche de la neutralité un très grand nombre de radicaux à fonction ionisables sont **chargés** facilitant les liaisons E-S ou enzyme-coenzyme de type **électrostatique**. Il existe donc un pH du milieu réactionnel où les charges électriques du radicaux du SA de l'enzyme seront **plus favorables** à la liaison E-S, on appelle ce pH le **pH optimal de la réaction enzymatique** en question.



Le pH optimal **varie** beaucoup en fonction des enzymes :

- Il peut être **très acide** par exemple le cas de la **pepsine** avec un pH optimal entre 1,5 et 2 ce qui correspond à l'environnement où elle agit à savoir les sucs gastriques fortement acides.
- D'autres enzymes comme la **trypsine** ont un **pH optimal basique** c'est une enzyme digestive du suc pancréatique (*milieu alcalin*)(et de l'intestin grêle) qui a pour but de digérer des protéines.
- La majorité des enzymes ont un **pH optimal** qui avoisine la **neutralité entre 6 et 8**
- L'activité de la **cholinestérase** **augmente** en fonction du pH jusqu'à atteindre un **maximum d'activité** autour d'un pH de 7.

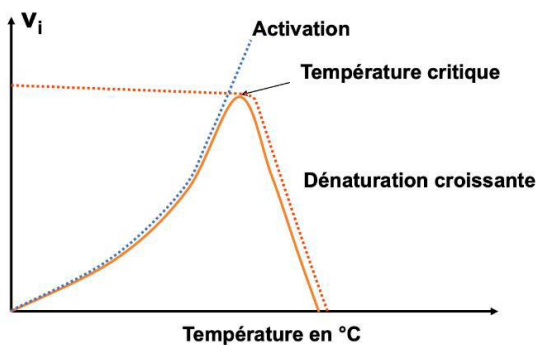


C) Influence de la température sur l'activité enzymatique

L'étude de la V_i d'une réaction en fonction de la température fait apparaître **2 phases distinctes** qui correspondent à 2 phénomènes différents.

→ Dans les zones à basse température la **vitesse augmente** avec l'**augmentation de la température** : ceci peut s'expliquer par une formation **plus** importante du complexe actif **ES** lorsqu'on ajoute de l'énergie sous forme thermique.

Puis au-delà d'une certaine température (qui varie selon les enzymes) on assiste à une **dénaturation** de la protéine enzymatique.



On peut dessiner 2 courbes :

- Une courbe **d'activation**
- Une courbe de la **dénaturation** de l'enzyme

La **température optimale** est celle où les deux phénomènes **s'équilibrent** de façon générale la majorité des enzymes ont une température optimale avoisinant les **37°C**.

D) Processus NON physico-chimiques

L'activité enzymatique peut être modifiée par des processus **non physico-chimique** parmi ces processus on retrouve :

- Les agents modulateurs qui peuvent **diminuer ou induire** l'activité enzymatique on parle d'**activateurs, ou d'inhibiteurs**, ils agissent par divers mécanismes
- Peut être contrôlée de manière irréversible par **protéolyse ménagée**
- Peut être contrôlée de manière réversible par **modification covalente**

Plusieurs modes de contrôle peuvent être associés pour réguler l'activité d'une enzyme donnée.

E) Les différents types d'inhibiteurs

1- Les inhibiteurs compétitifs

Lorsque la liaison d'un **inhibiteur** sur l'enzyme a pour effet d'**empêcher la liaison Enzyme-Substrat** on parle de l'inhibition compétitive vis-à-vis de substrat dans ce cas l'inhibiteur a une **structure semblable** à celle du substrat il se lie au niveau du **même site actif**.

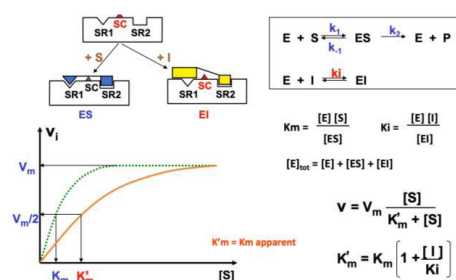
En parallèle de la **liaison E-S** il y a donc la formation d'une liaison **enzyme-inhibiteur** qui aboutit à la formation d'un complexe enzyme-inhibiteur inactif.

La constante de dissociation de ce complexe E-inhibiteur soit **K_i** est défini par rapport aux concentrations de l'**enzyme libre**, de l'**inhibiteur** et du complexe **enzyme-inhibiteur**.

Dans l'équation de la conservation de l'enzyme il apparait une autre forme de l'enzyme cad l'**enzyme associée** dans le complexe **Enzyme-inhibiteur**.

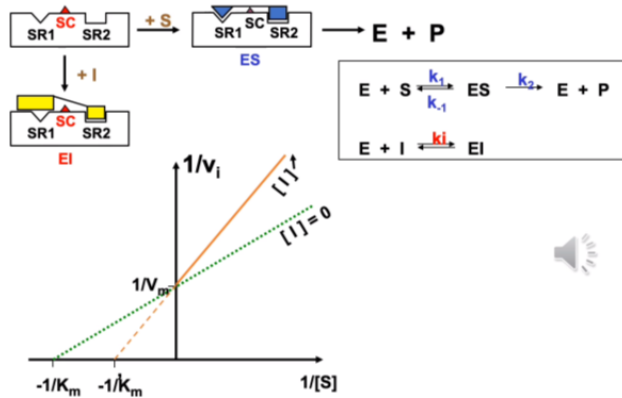
L'équation de la **vitesse** ne dépend QUE du complexe **enzyme-substrat**, puisque le complexe enzyme-inhibiteur inactif **reste inchangé**.

Les calculs conduisent à l'équation de **Michaelis et Menten** dans laquelle le facteur **K_m** est affecté d'un coefficient qui dépend de la **concentration de l'inhibiteur** et de l'**inverse de la constante K_i** cad de l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur.

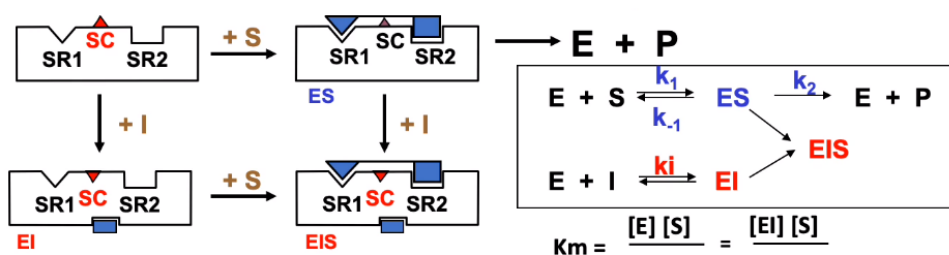


Le graphique en double inverse montre la droite représentant la situation **sans inhibiteur** ($i=0$) et une droite représentant l'effet d'une **concentration donnée d'inhibiteur**. L'inverse de la vitesse maximum, inchangée, représente le point commun de ces droites. Ceci est caractéristique des graphiques en double inverse en présence de **différentes concentrations d'un inhibiteur compétitif**.

On peut en revanche observer une **variation** de la valeur de la K_m .



2- Les inhibiteurs non compétitifs



Lorsque la liaison de l'inhibiteur de l'enzyme se fait sur un site totalement **indépendant** du SA, il y a évidemment **aucune compétition** entre le substrat et l'inhibiteur.

L'inhibiteur en se liant rend la molécule **d'enzyme incapable** de réaliser la réaction on parle d'inhibition **non compétitive**.

Toutes les molécules d'enzyme peuvent être **en liaison avec l'inhibiteur**. Le complexe ES donne un complexe **E-S-inhibiteur inactif**. L'enzyme libre en s'associant avec l'inhibiteur donne un complexe **enzyme-inhibiteur** qui peut lui-même lier une molécule de **substrat** en donnant un complexe **enzyme-substrat-inhibiteur identique** à celui obtenu à partir du complexe enzyme-substrat et bien sûr **inactif**.

La constante K_m de l'enzyme vis-à-vis du substrat représente toujours la **constante de dissociation** du complexe **enzyme-substrat** mais aussi celle du complexe **enzyme-substrat-inhibiteur** en enzyme-inhibiteur et substrat libre.

La constante K_i de l'enzyme vis-à-vis de l'inhibiteur représente toujours la **constante de dissociation** du complexe **enzyme-inhibiteur** mais aussi celle du complexe **enzyme-inhibiteur-substrat** en enzyme- substrat et inhibiteur libre.

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]}$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

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

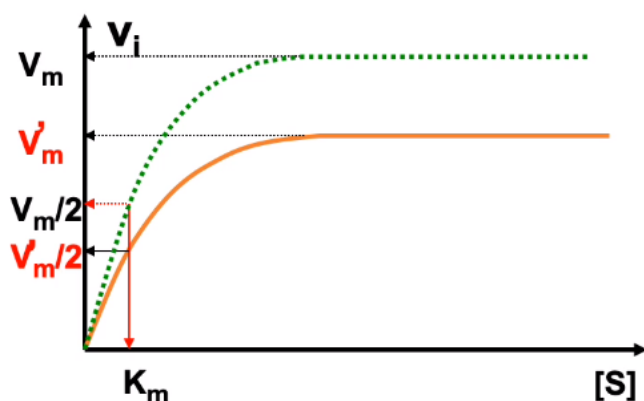
Dans l'équation de la conversion de l'enzyme il apparaît **deux** autres formes d'enzymes (*en plus d'enzyme-substrat*): le complexe **enzyme-inhibiteur** et le complexe **enzyme-substrat-inhibiteur**.

L'équation de la **vitesse** ne dépend **QUE** du complexe **enzyme-substrat** (puisque le complexe enzyme-inhibiteur et enzyme-inhibiteur-substrat sont **inactifs**) reste donc **inchangée**.

$$v = V_m' \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad V_m' = \frac{V_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

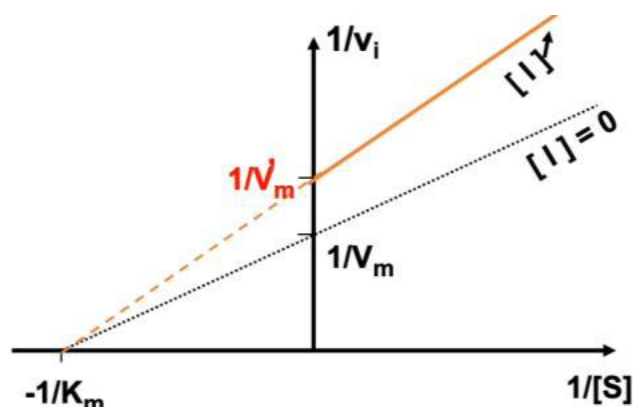
Les calculs conduisent à une équation de **Michaelis et Menten** dans laquelle la V_m est affectée d'un coefficient qui dépend de la concentration de l'inhibiteur et de l'inverse de la constante K_i (cad de l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur).

La constante K_m , au contraire, **reste la même** que dans le cas général.



Le graphique représentant la V_i en fonction de la concentration de **substrat** va donc **dépendre de la concentration de l'inhibiteur**. La courbe en pointillés représente la fonction en **absence** d'inhibiteur. La courbe en trait plein représente la fonction en **présence** d'une concentration **donnée** d'inhibiteur. On observe que la **vitesse maximale change** en fonction de la **concentration d'inhibiteur** puisque la concentration de l'enzyme, même à concentration infinie de substrat se trouve **diminuée** de molécules **d'enzymes** liées à l'inhibiteur devenues **inactives**.

La **moitié de cette V_m** est atteinte pour des concentrations de **substrat toujours égales** puisque l'inhibiteur n'affecte **pas** la liaison entre l'enzyme et le substrat.



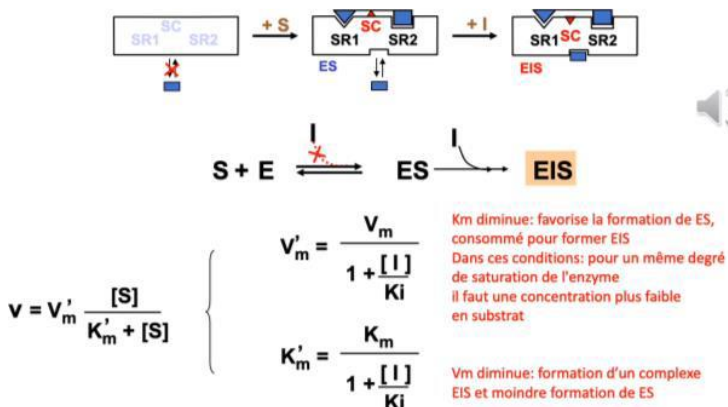
Le graphique en **double inverse** montre la droite représentant la situation sans inhibiteur : $i=0$ et la droite représentant l'effet d'une présence d'inhibiteur (trait plein).

L'inverse de la V_m augmente avec la présence d'inhibiteur de même que la pente de la droite. Pour chacune de ces droites le point qui a pour ordonné le double de l'ordonné à l'origine correspond **toujours** à la même abscisse que **l'inverse du K_m** .

Le **point commun** de toutes ces droites est situé à gauche de l'axe des Y dans une partie du graph qui n'a pas de sens physique puisqu'on est au-delà d'une concentration infinie du substrat. Mais le calcul de cette abscisse montre qu'elle est d'une valeur équivalente à **$-1/K_m$** ce qui permet une détermination graphique **facile** de cette constante.

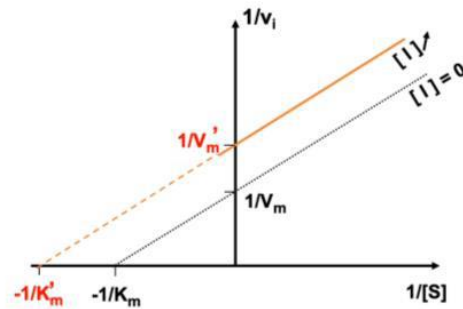
La rencontre de ces droites en ce point de **l'axe des X** est caractéristique des graphiques en double inverse en présence d'un inhibiteur **non compétitif**.

3- Les inhibiteurs in(un)compétitifs



Les inhibiteurs incompétitifs ont la caractéristique de se fixer **sur le complexe ES** sur un site qui est **différent du SA de l'enzyme**. Ça va entraîner la formation du complexe **enzyme-inhibiteur-substrat** qui est **inactif**. La présence d'un inhibiteur in(un)compétitifs va **modifier la K_m et la V_m** . **K_m diminue** on favorise la formation du complexe **ES** consommé pour former le **complexe EIS**. Dans ces conditions pour un même degrés de saturation de l'enzyme il faut une **concentration plus faible en substrat**.

La **vitesse maximale (V_m) diminue** car il y a la formation d'un complexe EIS et une moindre formation du complexe actif ES.



Le graphique en double inverse d'une réaction en absence ou en présence d'inhibiteur incompétitif sera caractérisé par la présence de **2 droites parallèles**. En effet, dans ces situations de présence d'inhibiteur incompétitif il y a à la fois une **modification de la V_m** de la réaction mais également une **modification de la K_m** .

4- Tableau récap +++

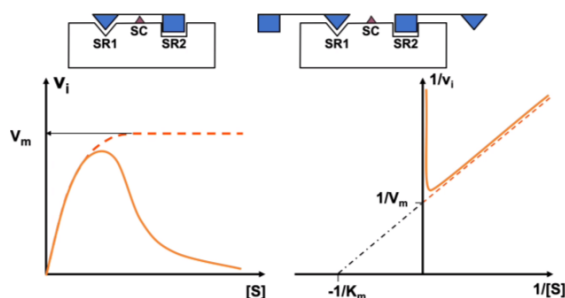
	V_m	K_m	LEVÉE	MODIFICATIONS
IC	→	↑	OUI	$K'_m = K_m * (1 + \frac{[I]}{K_i})$
INC	↓	→	NON	$V'_m = V_m / (1 + \frac{[I]}{K_i})$
I Inc	↓	↓	NON	$K'_m = K_m / (1 + \frac{[I]}{K_i})$ $V'_m = V_m / (1 + \frac{[I]}{K_i})$

Inhibition élevée si $\begin{cases} [I] \uparrow \\ K_i \downarrow \end{cases}$

IC levée par l'ajout d'un excès de substrat contrairement aux INC et I Inc.

De façon générale les effets des inhibiteurs dépendent de leur concentration et de la valeur de la K_i qui correspond à l'affinité entre l'inhibiteur et l'enzyme.

5- Inhibition par excès de substrat



Ce type d'inhibition par le **substrat lui-même** peut avoir lieu quand le substrat est présent en **très grande concentration**. En général le site de fixation du **substrat sur l'enzyme** est dans ce cas de **grande dimension** et contient plusieurs **sous-sites** chacun fixant une partie du substrat.

Le substrat peut se loger **dans le SA** avec une **orientation anormale** interdisant à la réaction de se faire correctement.

Il arrive qu'on observe un comportement **anormal de l'enzyme** lorsque la cinétique est mesurée en présence d'une trop forte concentration en **substrat**.

Dans une représentation de **Michaelis et Menten** on observe que la **vitesse passe par un maximum**, quand la concentration en substrat **augmente puis diminue** au lieu de **tendre vers la vitesse-maximale**.

6- Modification irréversible par protéolyse ménagée

Un certain nombre d'enzymes sont synthétisées sous forme de **précurseurs inactifs** appelés **zymogènes** ou **proenzymes**. C'est le cas des **enzymes digestives** ou des enzymes de la coagulation du sang.

- La transformation en une **enzyme active** se fait par une **protéolyse** limitée ou ménagée, une coupure locale d'une ou plusieurs liaisons peptidiques qui est catalysée par des **endopeptidases**.

- La coupure enzymatique entraîne une **modification spatiale** de l'enzyme qui présente ainsi son **SA**. Ce sont des modifications de **type irréversibles**.

Zymogènes: précurseurs protéiques (enzymes; hormones) permettant leur transport ou leur stockage dans des formes inactives. Ces précurseurs peuvent être facilement convertis en formes actives en réponse à un certain type de signal cellulaire

Activation des zymogènes: activation irréversible suite au clivage protéolytique du zymogène – Processus post-traductionnel

Clivage protéolytique: mécanisme par lequel les niveaux d'une enzyme / d'une hormone active peuvent être rapidement augmentés après action d'une endopeptidase

Exemples de zymogènes: la pro-insuline, enzymes protéolytiques du pancréas: trypsinogène, chymotrypsinogène

7- Modification réversible, covalente

L'activité des enzymes peut aussi être modifiée par des modifications covalentes telles que la phosphorylation :

→ Covalentes, **réversibles**

→ Qui peuvent soit **activer** ou **inhiber** l'activité enzymatique

→ Dans le cas de la phosphorylation, un groupe Phosphate est transféré sur l'enzyme à partir d'un **ATP** sur un groupe **OH** d'un **Aa spécifique** placé dans la séquence consensus de l'enzyme. En général, il s'agit de **thréonine, tyrosine, serine**. C'est une *modification post-traductionnelle*.

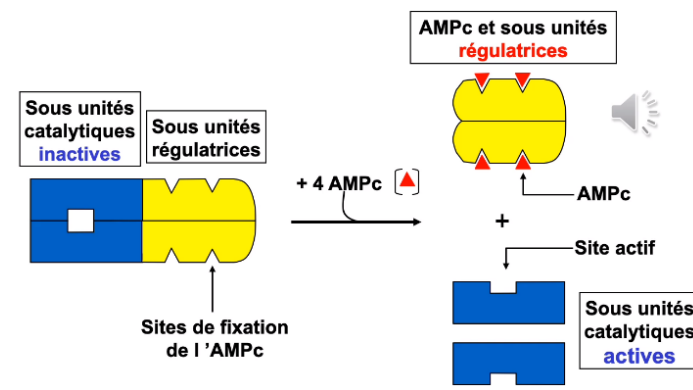
→ La réaction de phosphorylation est catalysée par une **protéine kinase**

→ La réaction de déphosphorylation est réalisée par une **protéine phosphatase**

→ Ce processus de régulation se produit en réponse à un **stimulus extérieur** : hormone ou facteur de croissance

→ La phosphorylation active ou inhibe les enzymes en **modifiant** la valeur de la **K_m**

Les enzymes à régulation covalente, exemple de la PKA :



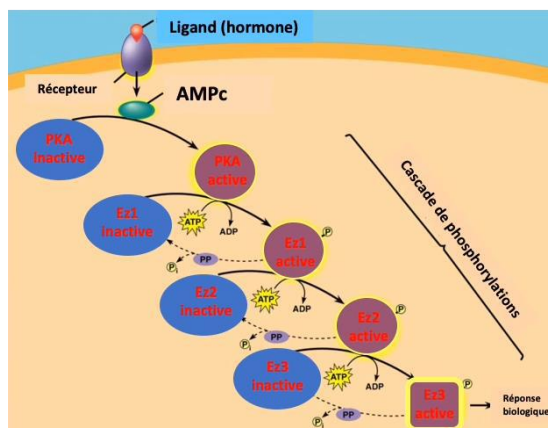
Parmi les protéines kinases on peut citer la protéine kinase AMPc dépendante (PKA)

La PKA est constituée de **4 sous-unités** :

- 2 sous-unités **catalytiques**,
- 2 sous-unités **régulatrices**

A l'état **basale**, ces 4 sous-unités se trouvent dans un état **inactif**. Lorsqu'il y a la fixation de l'**AMPc** sur le site spécifique qui se trouve sur les unités régulatrices de la PKA il y a **dissociation** entre les **sous-unités régulatrices et les sous-unités catalytiques** qui deviennent **actives** pour aller phosphoryler d'autres enzymes impliquées dans les voies métaboliques.

Les enzymes à régulation covalente sont impliquées dans la **transduction du signal** suite par exemple à l'interaction d'un **ligand** qui peut être une hormone avec **son récepteur** au niveau de la membrane cellulaire.



→ Ce messenger primaire entraîne une augmentation de l'AMPc activant la PKA

→ PKA activée phosphoryle Ez1 (active Ez1)

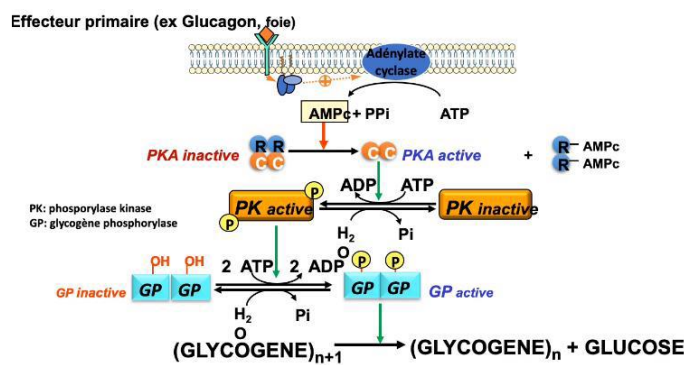
→ Ez1 activée peut être une **protéine kinase différente de PKA** qui à son tour active par phosphorylation une autre Ez2

→ Ez2 activée peut être une **protéine kinase différente de PKA et Ez1** qui à son tour agit sur un autre Ez3....

En fin de cascade l'enzyme impliquée dans la régulation de la voie métabolique est à son tour phosphorylée en relation avec le messenger primaire. Cet ensemble de phosphorylations séquentielles et ordonnées est responsable de la régulation de la voie métabolique (ex : métabolisme du glycogène).

Elles permettent le transfert du message de la mb cellulaire vers l'intérieur de la cellule où a lieu la réaction métabolique.

Les enzymes à régulation covalente sont impliquées dans la transduction du signal : exemple du glucagon :



Le glucagon interagit avec ses Rc exprimés au niveau hépatique activant l'adénylate cyclase induisant la production d'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc va activer la PKA en permettant la dissociation des sous-unités régulatrices et des sous-unités catalytiques de la PKA. La PKA va à son tour phosphoryler la phosphorylase kinase en la rendant active. La phosphorylase kinase va à son tour phosphoryler et activer la glycogène phosphorylase entraînant la dégradation du glycogène et la libération de glucose.

Conclusion :

Plusieurs processus contrôlent l'activité d'une enzyme :

- ➔ Les processus physico chimiques :
 - Sa concentration
 - Sa localisation (tissulaire, cellulaire, intra/extracellulaire)
 - Son environnement
 - Ph (facteur physique)
 - Température
 - Cofacteurs (ions, coenzymes)
 - Concentration en substrat (cinétique + inhibition par excès de [S])
- ➔ Processus NON physico-chimiques : o Présence d'inhibiteurs ou activateurs agissant par divers mécanismes :
 - Protéolyse ménagée (irréversible)
 - Modifications covalentes (réversibles, ex : phosphorylation)

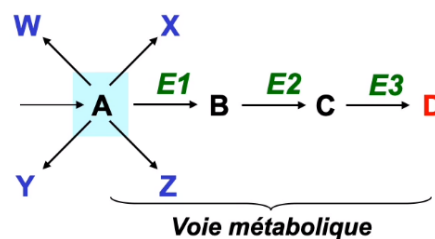
Plusieurs modes de contrôle peuvent être associés. +++

III- LES ENZYMES ALLOSTERIQUES

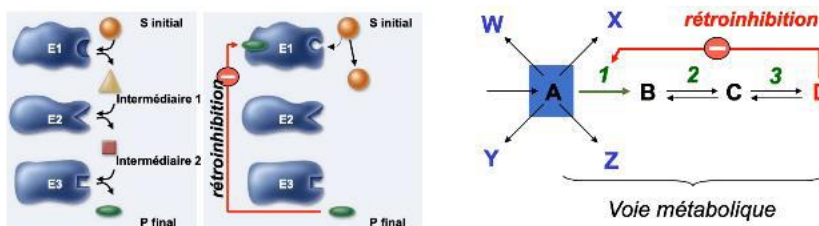
A) Définitions

Les réactions enzymatiques permettent la transformation des molécules biologiques. Cette transformation s'effectue à partir de composés simples souvent d'origine alimentaire.

Soit le composé A, substrat de réactions conduisant vers des transformations variées, il constitue un carrefour métabolique. Chacune des transformations va s'effectuer en plusieurs étapes constituant ainsi les voies métaboliques. Chaque étape est catalysée par une enzyme spécifique (E1, E2, E3).

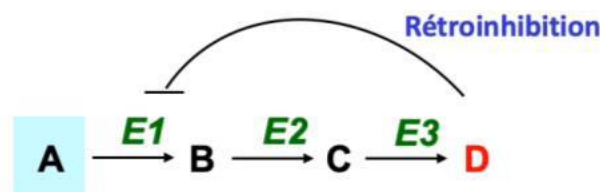


La **vitesse** de formation du **dernier produit** de la voie (D) dépend de la vitesse la plus lente des réactions.



Si le produit final est en quantité insuffisante il faut que **l'enzyme soit activée**. Si au contraire le produit final est en quantité suffisante **l'enzyme sera inhibée**. Pour que les composés **intermédiaires** ne s'accumulent pas il faut que l'enzyme **la plus lente (qui est régulée)** soit celle qui catalyse **la première des réactions** conduisant au produit final. Le produit final est **indépendant** des autres enzymes (E2, E3...). La transformation du substrat initial est **indépendante** de la concentration des intermédiaires (1, 2...).

L'enzyme E1 catalysant la transformation de A en B, **1^{ère} étape** de la synthèse est celle qui **doit être régulée par des effecteurs** permettant de réguler la vitesse de l'ensemble. En excès de produit final on aboutit à **l'inhibition de la 1^{ère} étape** : constituant la **rétro-inhibition**.



1- Enzyme clé

Dans une voie métabolique, l'enzyme qui a la **vitesse la plus lente** et qui par conséquent contrôle la **vitesse de la synthèse** est appelée enzyme clé.

- C'est habituellement la **1^{ère} des enzymes** de la voie, elle catalyse l'étape **d'engagement**
- L'enzyme clé est celle des enzymes de la voie dont la vitesse de réaction est **la plus lente**
- Cette enzyme clé est **inhibée** pour diminuer la synthèse de produit final ou au contraire **activée** pour l'augmenter
- Lorsqu'elle est inhibée par un **excès de produit final**, on parle de **rétro-inhibition**.
- Les enzymes clés sont **TOUTES des enzymes allostériques** contrôlées par de multiples facteurs.

2- Les enzymes allostériques

Les enzymes allostériques fonctionnent grâce à la présence :

- D'un SA qui est responsable de la transformation du **substrat en produit**
- D'un site régulateur qui est différent du SA et qui permet l'interaction **réversible** avec un **métabolite régulateur** appelé **effecteur**.

Une fois associé au site régulateur, ces effecteurs ne participent **PAS** à la catalyse mais conduisent à des **changements de conformation** au niveau d'une partie de l'enzyme qui affecte la conformation globale du SA ce qui provoque :

- Une augmentation (**activateurs** allostériques) de l'activité enzymatique
- Une diminution (**inhibiteurs** allostériques) de l'activité enzymatique

3- Allostérie

Allostérie dérive du grec « allos » : autre et « stereos » : forme. Allostérie signifie donc **variations de conformation** de certaines protéines en réponse à la **fixation d'un substrat ou d'un effecteur**. Ce qui va entraîner l'acquisition de **propriétés particulières** (modification de l'activité de l'enzyme). L'allostérie s'explique par la mise en place **d'effets coopératifs**. Concept valable uniquement si la protéine est sous forme **oligomérique**.

L'allostérie concerne des protéines douées **d'activité** : enzymes, transporteurs (hémoglobine), canaux/pompes, récepteurs, protéines contractiles etc.

B) Caractéristiques structurales

1- Les enzymes allostériques

Les enzymes allostériques ont toujours une **structure quaternaire** composée de plusieurs chaînes d'Aa formant des **sous-unités ou protomères identiques** entre elles. Elles sont composées d'un axe de symétrie. Protomère : chaque sous-unité d'enzyme allostérique. La protéine est donc un **oligomère de 2 ou 4 su**. Les protomères sont arrangés dans l'espace de façon à ce que chacun d'entre eux aient **les mêmes liaisons** avec les autres.

Un tel arrangement, est dit **symétrique** c'est le cas de **deux protomères d'une paire** ou de **4 protomères** placés aux 4 sommets d'un tétraèdre.



2- Les protéines allostériques

- ✚ Structure **quaternaire**
- ✚ Variation de conformation de la protéine dépend du **taux d'occupation** des sites de liaison
- ✚ Cinétique enzymatique **non** Michaelienne mais cinétique **allostérique**
- ✚ Ces protéines exercent un rôle essentiel dans la **régulation** du métabolisme

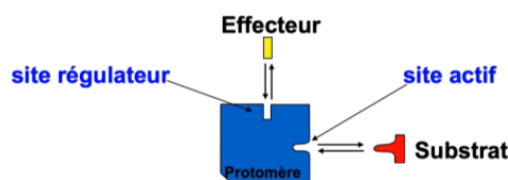
C) Caractéristiques cinétiques

2 Types d'enzymes allostériques :

- Les enzymes **du système K** : la régulation se traduit par une variation de l'**affinité** du substrat pour l'enzyme
- Les enzymes **du système V** : la régulation se traduit par une variation de la **V_m**

Les **protomères** qui composent les enzymes allostériques sont composées :

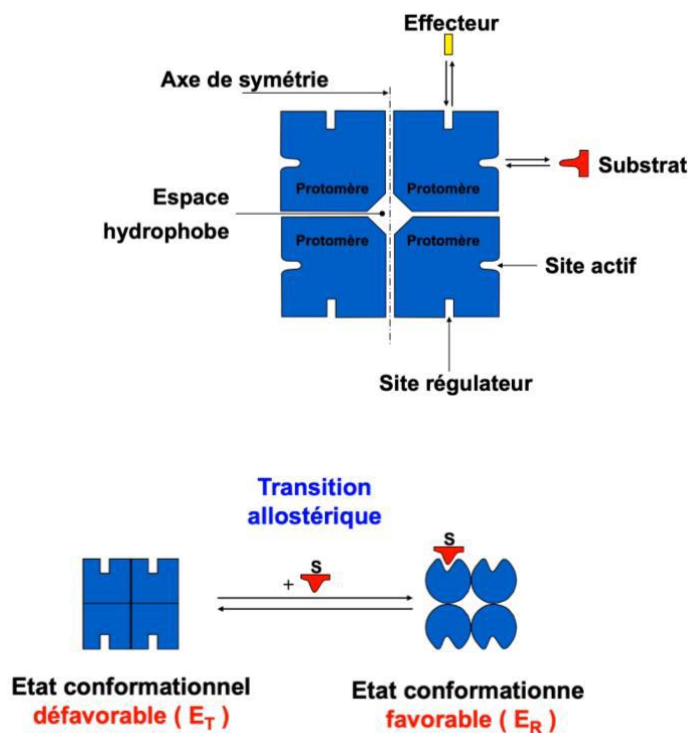
- D'un **site actif** (SA) qui reconnaît le substrat et le transforme en produit de réaction
- D'un **site régulateur** pour la fixation spécifique d'un modulateur allostérique (effecteur)



- ➔ Liaison **réversible, non covalente** d'un effecteur au site régulateur entraînant un changement de conformation d'un **protomère**

La conformation de **chaque protomère est contrainte** par la conformation des autres protomères. Chaque **protomère a des liaisons** avec les **autres protomères du système** (liaisons le plus souvent de type **électrostatiques**) sa structure secondaire et tertiaire ainsi que son énergie interne sont modifiées par ce type de liaison (*entre les protomères*). Donc le changement de conformation qui a lieu sur **un protomère** vont se **répercuter sur les autres protomères** de l'enzyme.

Chaque ligand d'une enzyme allostérique, à savoir un effecteur ou un substrat a **un site sur chaque protomère**. Les sites de liaison existent donc de façon **identique sur chaque protomère**.



Il y a au moins **2 états possibles** par protomère différant par le **niveau d'énergie libre** du protomère :

- Etat tendu ou contraint : T
- État relâché : R

Lorsque l'énergie interne d'un protomère augmente par suite de la modification des liaisons avec le modulateur on dit **qu'il passe à l'état tendu**. Au contraire lorsque les liaisons entraînent une énergie interne diminuée le protomère passe à l'état **relâché**. **Les affinités** des sites de fixation du protomère pour les ligands et la **V_{max}** dépendent de l'état du protomère. Des **changements d'énergie interne** se traduisent par des **modifications de l'affinité** de l'enzyme vis-à-vis du substrat ou encore des modifications de la **vitesse initiale** de la réaction.

Lorsqu'un protomère change d'état, la **symétrie** de la protéine est **conservée**. Le passage d'un protomère de l'état **relâché à l'état tendu** implique en général la transformation de la structure des **autres protomères** dans le même sens pour **maintenir la symétrie** de la structure dans l'ensemble.

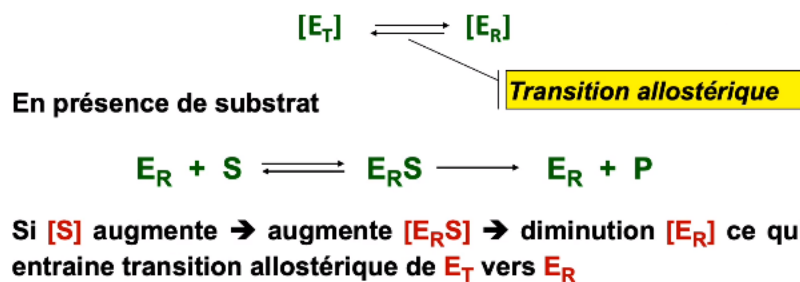
IV- LES EFFESTEURS ALLOSTERIQUES

Les **effecteurs allostériques** sont des **ligands** dont le site de fixation est **différent du SA**.

L'effecteur peut être :

- Une **molécule de substrat** différente de celle qui participe à la réaction enzymatique, on parle d'effet allostérique **homotrope**
- Une molécule **différente du substrat**, on parle d'effet allostérique **hétérotrope**

A) Effet allostérique homotrope



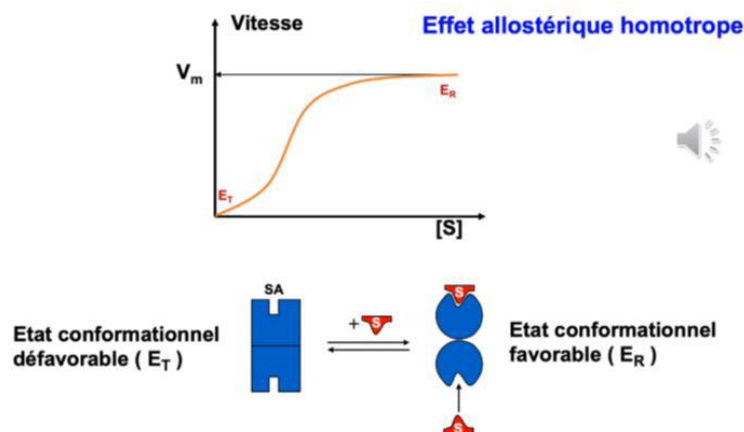
L'enzyme allostérique dans l'état T (tendu) est dans une forme **inactive**. A la forme R (relâchée), l'enzyme est sous forme **active**. Lorsque le substrat agit comme effecteur allostérique **homotrope** il se fixe de préférence dans la **forme R**. Le complexe enzymeR-substrat va donc augmenter.

La concentration de **l'enzyme libre** dans la forme **R** va donc **diminuer**. On observe une transition allostérique de l'enzyme de la forme **tendue vers la forme relâchée** afin de rétablir les concentrations de **l'enzyme libre** sous forme **relâchée**.

C'est le principe même de la loi d'action de masse.

- Lorsque le substrat joue un rôle allostérique, il exerce TOUJOURS un **effet homotrope positif**.

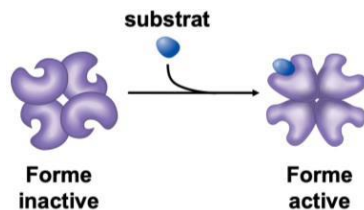
Les effets allostériques homotropes présentent toujours une coopérativité positive.



Le graph représentant la **vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat** pour une enzyme allostérique ce n'est **PAS une hyperbole** comme celui observé dans les enzymes Michaeliennes.

Les constantes de **vitesse et d'affinité** des enzymes allostériques varient en fonction des **ligands** de telle sorte que la courbe prend une **forme sigmoïde** qui est caractéristique de la **coopération** entre les protomères.

Sur cet exemple on a représenté la vitesse initiale d'une réaction allostérique en fonction de la concentration de **substrat** qui lui-même **exerce un effet sur l'enzyme** tendant à **diminuer K_m** donc à **augmenter l'affinité** de l'enzyme pour le substrat.



Dans le cas de l'allostérie homotrope la fixation d'une **molécule de substrat** sur un protomère va entraîner un **changement de conformation** de ce protomère et des protomères avoisinant qui va favoriser la **fixation de substrat** sur les autres protomères.

- On dit qu'il y a un effet **coopératif positif** quand l'activité des autres protomères est **augmentée** suite à la fixation d'un **substrat** sur un protomère.

B) Effet allostérique hétérotrope

1- Effet hétérotrope positif (coopératif)

Lorsqu'un effecteur allostérique hétérotrope est un effecteur positif (A) la présence de A va entraîner l'augmentation du complexe **enzyme relâchée-A** ce qui provoque une diminution de l'**enzyme relâchée libre** qui entraîne une transition allostérique de l'état **tendu vers l'état relâché** de l'enzyme. On observe donc un effet hétérotrope positif.

En présence de substrat et effecteur positif (A)



Présence de **A** → augmente **$[AE_R]$** → diminution **$[E_R]$** qui entraîne transition allostérique de **E_T** vers **E_R** → **effet hétérotrope positif**

2- Effet hétérotrope négatif (anti-coopératif)

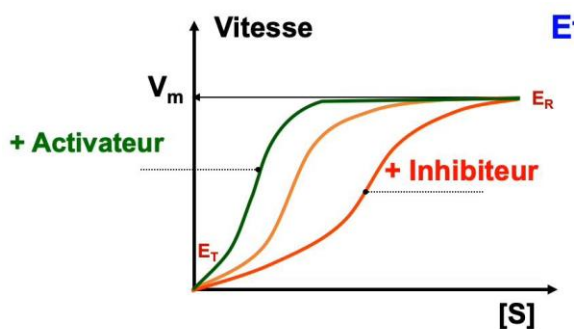
La présence de I (effecteur négatif), va augmenter le complexe **état tendu inhibiteur** ce qui va entraîner une diminution de l'enzyme de l'**état tendu** provoquant une transition allostérique de l'enzyme libre de l'**état R** à l'**état T**. On observe ainsi un effet hétérotope négatif.

En présence de substrat et effecteur négatif (I)



Présence de I → augmente $[E_T I]$ → diminution $[E_T]$ qui entraîne transition allostérique de E_R vers E_T → **effet hétérotrope négatif**

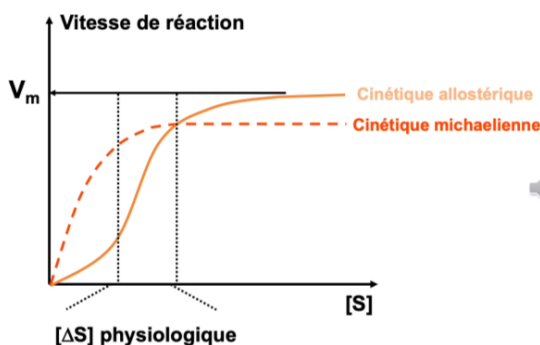
Ce graphique représente la vitesse de réaction en fonction de la concentration de substrat pour les enzymes allostériques.



On observe en orange (courbe du milieu), une courbe sigmoïde qui est obtenue à l'état basale. Si on rajoute une **molécule activatrice** cad un effecteur allostérique qu'il soit homotrope ou hétérotrope **positif** on observe une **augmentation de la vitesse de réaction** (courbe la plus haute) et donc un effet **coopératif positif**.

En revanche, si on réalise la même réaction en présence d'un **inhibiteur** (courbe la plus basse) on observe une **diminution de la vitesse** de réaction et donc un effet **anti coopératif**.

→ Les modulateurs allostériques vont agir sur la **vitesse de réaction** en l'activant ou en l'inhibant parce qu'ils vont changer l'équilibre de la transition allostérique entre l'**état tendu** et l'**état relâché** des différents protomères qui composent l'enzyme.



Sur cet exemple on a représenté la vitesse initiale d'une réaction allostérique (courbe en trait plein) en fonction de la concentration de substrat.

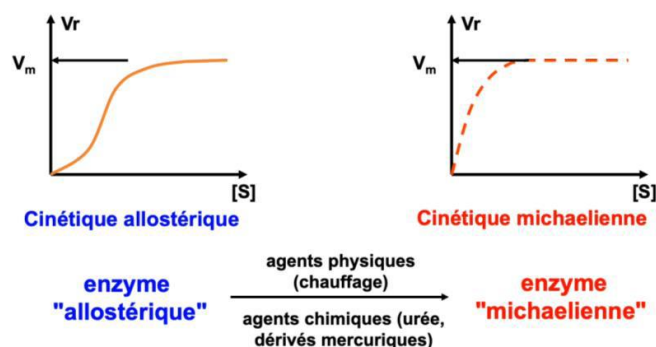
En comparaison, la courbe en tirets représente la même réaction en cinétique **Michaelienne**, sans cet effet allostérique. La cinétique **allostérique est plus lente** que la cinétique Michaelienne pour des **petites** concentrations de substrat et devient **plus rapide au-delà**.

Aux environs du point d'inflexion de cette **sigmoïde** la pente de la courbe est **plus inclinée** ce qui signifie que pour une même différence, entre 2 concentrations de substrat, l'accélération de la réaction sera plus **grande** dans le cas de l'enzyme **allostérique**.

Cette propriété de coopérativité des protomères donne un **avantage au système allostérique** par rapport aux enzymes à **cinétiques michaelienne** pour la régulation de la **vitesse des réactions enzymatiques**.

Le graph représentant la vitesse initiale d'une enzyme allostérique n'est PAS une hyperbole comme pour les enzymes Michaeliennes.

Les constantes de vitesses et d'affinité des enzymes allostériques varient en fonction des ligands de telle sorte que la courbe reprend une forme sigmoïde caractéristique de la coopération entre les protomères.



On peut passer de cinétique allostérique à cinétique michaelienne (NON l'inverse) en **désensibilisant** l'enzyme. Cette désensibilisation peut se faire par :

- Des agents **physique** (chauffage de la protéine)
- Des agents **chimiques** (urée, dérivés mercuriques)

Cette désensibilisation va entraîner une perte de la sensibilité des enzymes aux **effecteur allostériques**. Par conséquent le **site allostérique sera détruit** et il y aura une **perte du phénomène de coopérativité**.

V- LES MODELES DE COOPERATIVITE

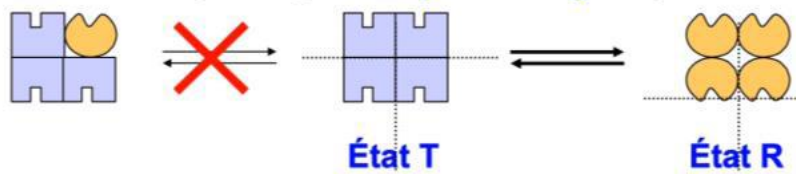
A) Le modèle concerté

Au cours de la transition allostérique il doit y avoir une **conservation de l'axe de symétrie** des protomères.

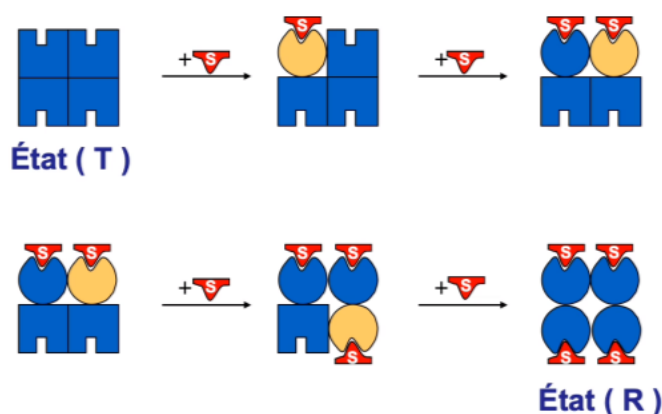
- Dans ce cas c'est **l'ensemble** des protomères qui **subissent la transition** allostérique et donc **l'ensemble** des protomères qui composent l'enzyme doivent se retrouver soit dans un **état relâché** soit dans un **état tendu**.

Chaque protomère possède un site de fixation pour le substrat.

A tout moment le passage de $E_T \rightleftharpoons E_R$ est possible



B) Le modèle séquentiel, hypothèse de Koshland



Chaque protomère a la possibilité d'être sous forme R ou T, indépendamment des autres protomères. L'enzyme est ainsi constituée d'un mélange de protomères sous forme T et de protomères sous forme R.

La liaison d'un premier substrat change la structure du protomère à laquelle il s'est fixé en état R alors que les autres protomères acquièrent une affinité intermédiaire entre celle observée à l'état T et à l'état R.

La liaison du ligand induit donc progressivement des changements conformationnels des protomères. Les changements les plus importants se produisant au niveau des protomères qui ont lié le ligand.

Le couplage entre les protomères n'est pas nécessairement assez fort pour garder la symétrie de l'enzyme (comme c'est le cas dans le modèle symétrique).

Conclusion :

Les enzymes allostériques qui sont impliquées dans la régulation des voies métaboliques ont une structure quaternaire formée de protomères identiques.

Chaque protomère possède, en plus du SA, un site régulateur où se fixe l'effecteur allostérique.

L'effecteur peut être:

- Une molécule de substrat différente de celle qui participe à la réaction enzymatique : on parle d'effet allostérique homotrope (positif seulement).
- Une molécule différente du substrat : on parle d'effet allostérique hétérotrope (positif OU négatif selon si elle augmente ou diminue la vitesse de réaction)

Les effets allostériques homotropes présentent TOUJOURS une coopérativité positive.