

# ENZYMOLOGIE 2

## I) Cinétique enzymatique (Michaelis & Menten)

- 1) Les enzymes michaeliennes
- 2) Evolution des concentration de P, S, E et ES au cours du temps
- 3) Etude de la vitesse de réaction
- 4) Expression de la  $V_i$  (vitesse initiale)
- 5) Etude cinétique de la réaction enzymatique
- 6) Représentation graphique de Lineweaver et Burk
- 7) Influence de la concentration d'enzyme
- 8) Influence de la concentration de substrat
- 9) Expression de l'activité enzymatique

## II) Contrôle de l'activité enzymatique

- 1) Notion d'isoenzymes et macroenzymes
- 2) Influence du pH et de la température sur l'activité enzymatique
- 3) Influence de processus NON physico-chimique sur l'activité enzymatique

## III) Les enzymes allostériques

- 1) Définition
- 2) Caractéristiques structurales
- 3) Les états des protomères

## IV) Les effecteurs allostériques

- 1) Effet allostérique homotrope
- 2) Effet hétérotrope positif
- 3) Effet hétérotrope négatif

## V) Les modèles de coopérativité

- 1) Modèle concerté
- 2) Modèle séquentiel, hypothèse de Koshland

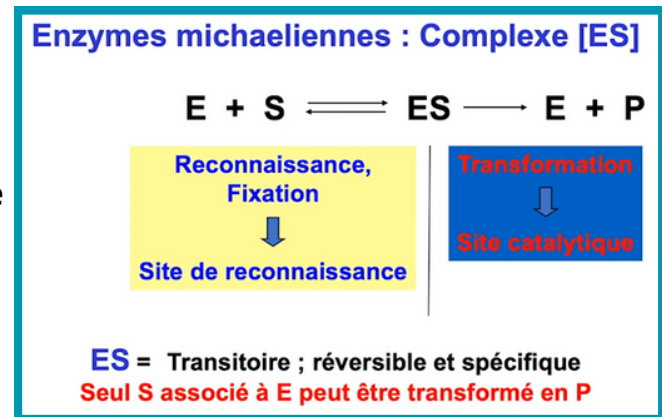
Deuxième partie du cours sur l'enzymologie, ne vous inquiétez pas il y a beaucoup moins de chose à apprendre par cœur, et cette fois pas trop d'exemple. C'est surtout un cours de compréhension, donc si y'a un problème => go forum !!

# I) Cinétique enzymatique (Michaelis & Menten)

## 1) Les enzymes michaeliennes

La cinétique enzymatique de Michaelis et Menten s'applique aux **enzymes michaeliennes** qui fonctionnent selon le modèle suivant :

- Un **substrat (S)** s'associe avec une molécule d'**enzyme (E)** pour donner un intermédiaire : le **complexe enzyme-substrat (ES)**.
- Le complexe ES est un état **transitoire, réversible** et **spécifique**.
- Ce complexe/intermédiaire se **dissocie** ensuite pour donner un **produit (P)** avec régénération de notre **enzyme**.
- Seul le substrat **S** associé à **E** peut être transformé en **P** (*c'est à dire que tous les autres substrat autour qui ne sont pas associés à une enzymes ne feront pas la transformation en produit spontanément*)



Chaque mécanisme (*ce qu'on vient de voir juste au-dessus*) se traduit par des caractéristiques cinétiques spécifiques (=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**).

À partir de ses mesures, on peut tracer des courbes représentant la cinétique des réactions ce qui permet de déterminer certaines valeurs caractéristiques. *Si vous n'avez rien compris c'est pas grave le plus important c'est ce qui arrive après*

## 2) Evolution des concentration de P, S, E et ES au cours du temps

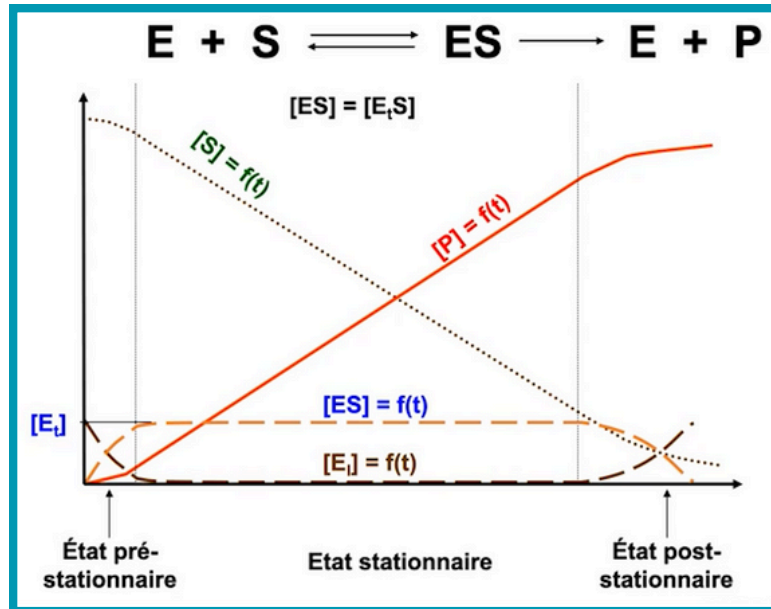
On considère la réaction de transformation d'un substrat S en produit P avec l'**enzyme E** et on étudie les **variations de concentrations** de P, S, E et du complexe ES en fonction du temps.

On va pouvoir distinguer **3 phases** :

- Une phase **pré-stationnaire**
- Une phase **stationnaire**
- Une phase **post-stationnaire**



*Le tableau suivant est giga important. Il résume cette première partie de cours !*



### Phase pré-stationnaire

### Phase stationnaire

### Phase post-stationnaire

**Évolution de la concentration en produit = [P]**

Rapide **augmentation** de [P]

**Augmentation** de [P] **constante** = variation négligeable

[P] tend vers une concentration **constante/maximale**

**Évolution de la concentration en substrat = [S]**

Rapide **diminution** de [S]

**Diminution** de [S] **constante** = variation négligeable

[S] tend vers une concentration **quasiment nul** car tous les substrat ont été consommés

**Évolution de la concentration en Enzyme associé au substrat = [ES]**

Rapide **augmentation** de [ES]

[ES] tend vers un plateau quasiment **égal à la concentration initial en enzyme** car pratiquement toutes les enzymes sont associés à un S

[ES] **diminue** car il y a épuisement du substrat

**Évolution de la concentration en Enzyme = [E]**

Rapide **diminution** de [E]

[E] tend vers une concentration **quasiment nul** car toutes les enzymes disponible ont été associés à un substrat

[E] **augmente** car il y a épuisement du substrat

**Remarque :** la phase pré-stationnaire est une phase très courte qui dure que quelques millisecondes et qui correspond à la formation du complexe ES.

Alors maintenant on va commencer les maths, accrochez vous il va y avoir des démonstrations je vais essayer d'être le plus clair possible !

### 3) Etude de la vitesse de réaction

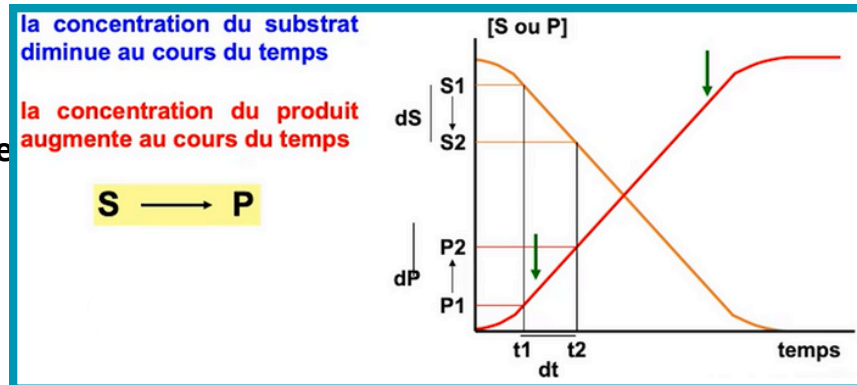
Pour mesurer l'activité d'une réaction enzymatique n'ayant qu'un seul type de substrat et qu'un seul type produit dans un milieu défini, on observe les concentrations de substrat et de produit en fonction du temps passé :

- 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 **t1** et **t2** séparés par un délai **dt** :

- **S1**=[substrat] à **t1** et **P1**=[produit] à **t1**
- **S2**=[substrat] à **t2** et **P2**=[produit] à **t2**

La **différence** entre les concentrations de substrat (**dS**) **est l'opposée** de la **différence** de concentration des produits (**dP**). *Logique comme à chaque fois on transforme un substrat en produit, on a donc -1 d'un côté et +1 de l'autre*



On appelle la **vitesse de réaction** le rapport  $V = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt}$

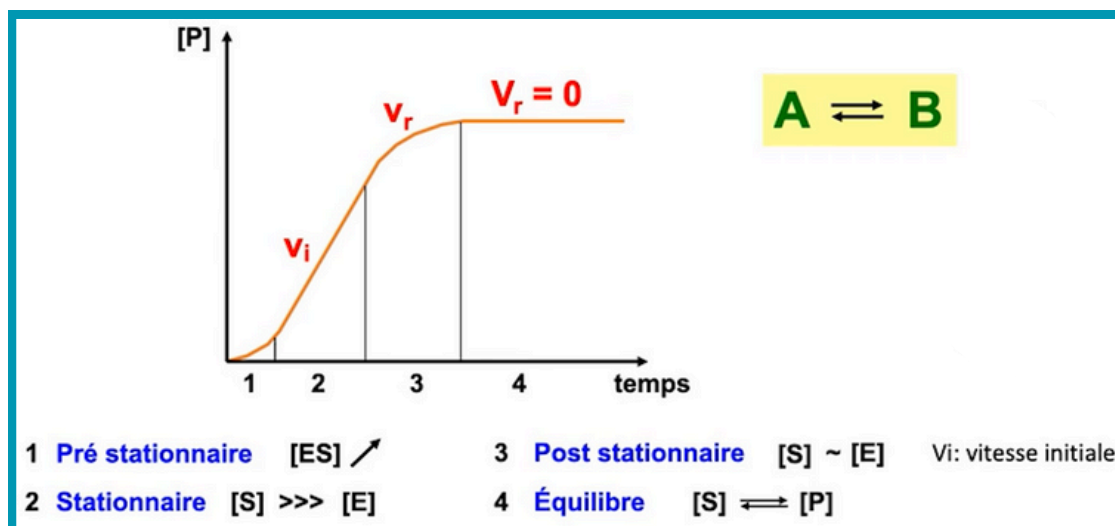
*Pour faire simple la vitesse de réaction = vitesse de consommation de substrat ou synthèse de produit*

**La vitesse de réaction est le 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** de la concentration en produits en fonction du temps :

- A **t0**, on peut observer, dans un milieu qui ne contient que des molécules d'**enzymes** ou de **substrat**, que la réaction se déroule de manière non uniforme. *J'avoue j'ai pas trop compris, mais la suite est le plus important*

*Pas la place de tout mettre dans cette page donc voici le graphique que l'on va étudier, explication page suivante*



*Regardez le graphe en même temps, c'est plus simple pour comprendre*

**1 ) Pré stationnaire** : première phase très brève au cours de laquelle la **vitesse de réaction** est **croissante**. Pendant cette phase, les molécules de substrat **se lient** avec l'enzyme donc la **[complexe ES] augmente**.

**2 ) Stationnaire** : Lorsque **toutes** les molécules d'**enzyme** sont occupées par des 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**.

Pendant cette phase stationnaire, la vitesse est **constante** : c'est la **vitesse initiale**, c'est une phase où un nombre maximal de molécules d'enzyme sont liées à des molécules de substrat. Le rapport  $\frac{E_{\text{liée}}}{E_{\text{totale}}}$  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.

**3 ) Post stationnaire** : Lorsque **[P] augmente**, la **réaction inverse** commence à concurrencer celle qu'on mesurait. La vitesse de réaction ( $V_r$ ) **diminue**.

**4 ) Équilibre** : Enfin dans une phase tardive, la vitesse de transformation **inverse** (de **B à A**) devient égale à la vitesse de réaction de **départ** (de **A en B**). Les concentrations ne changent plus et la réaction a atteint son équilibre.

**Pour la suite du cours on va s'intéresser à cette vitesse initiale ( $V_i$ )**

*C'est parti ! j'espère que vous êtes chaud !*

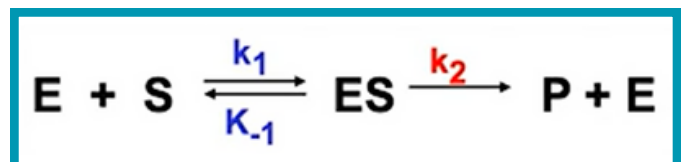


La modélisation mathématique de la **cinétique de la réaction** catalysée par une **enzyme michaelienne** se base sur 2 termes :

- Les **concentrations** des différentes molécules (S, P, E) ou complexes de molécules (ES)
  - Les **constantes d'association** et de **dissociation** ( $k_1, k_{-1}$  ou  $k_2$ ) de ces molécules entre elles
- on va voir ça tout de suite*

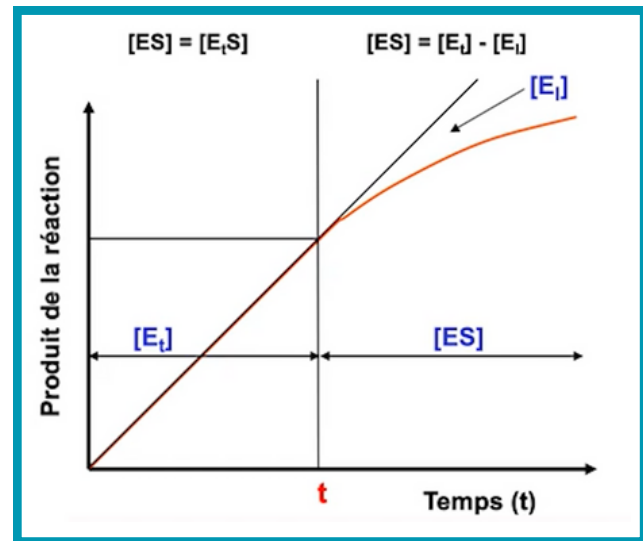
Ces différents paramètres se retrouvent dans l'équation de la réaction :  $E + S \rightarrow S + P$

- **$k_1$**  est la constante d'**association** de E et de S
- **$k_{-1}$**  est la constante **dissociation** de ES
- **$k_2$**  est 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 tangente de la courbe à l'instant t.
- On constate que juste après  $t_0$ , 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** (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** qui sera 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** ( $v_i$ ).



*Bref j'espère que vous avez compris en général, c'est beaucoup de blabla et un peu de répétitions. On continue bon courage !*

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 car :

- Soit la réaction est **totale** et il n'y a plus de substrat disponible car il est **épuisé**
- Soit la réaction a atteint un **équilibre** (autant de réactions dans le **sens 1** que dans le **sens 2**)



## 4) Expression de la $V_i$ (vitesse initiale)

**Rappel** : La vitesse initiale est la vitesse de réaction durant la phase stationnaire, c'est à dire quand il y a le **plus de complexe ES** possible

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 **[S]** très supérieur à la **[E]**. On obtient cette condition en choisissant des quantités adaptées d'enzymes et de substrats.
  - Une **absence ou casi-absence** de **produit** (pour pouvoir négliger la réaction inverse). On remplit cette condition en réalisant la mesure assez rapidement pour que la concentration de produits formé par la réaction soit négligeable.

À partir du moment où ces conditions sont réunies, on peut faire les approximations suivantes :

- La **[produit]** est **nulle** ou **faible** donc on peut négliger la vitesse de dissociation de P en complexe ES. *réaction inverse*
- 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. La concentration en substrat totale **[St]** sera donc **égale** à la concentration de substrat libre **[Sl]** (*on néglige les substrat liés aux enzyme [ES]*)

$$\begin{array}{l} [E_t] = [ES] + [E_l] \\ [S_t] = \cancel{[ES]} + [S_l] \end{array}$$

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

Le point de départ est  **$V_i$**  qui est donné par le produit entre la valeur de  **$k_2$**  (constante de réaction de ES en E et P (= *le temps qu'il faut pour retrouver une E libre*)) et de la concentration du complexe ES :

$$V_i = k_2 [ES]$$

- **[Complexe ES], [Enzyme libre] ou [Substrat libre]** sont des valeurs qui ne sont **pas fixées** par l'expérimentateur et qui ne peuvent **pas être mesurées**.
- **[Enzyme total] ou [Substrat total]** sont eux **mesurables**.
- Ici on cherche **[ES]** qui n'est donc **pas mesurable en lui même**. 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 correspond aux **conditions définies** par l'expérimentateur
  - Soit qu'elles peuvent **être mesurées**

Avant d'entrer dans les calculs, 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**. *Petit rappel :  $V_i$  = vitesse de réaction à l'état stationnaire lorsqu'il y a le plus de complexe ES*

Lorsque  **$[ES] = [Enzyme\ totale]$**  c'est-à-dire lorsque **tous** les sites actifs sont saturés, on atteint la **vitesse maximal** possible, on ne peut pas avoir plus de réactions. À ce moment là  **$V_i = V_{max}$**

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

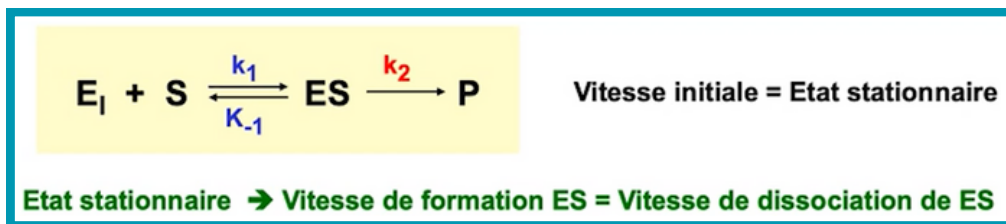
Donc pour résumé  **$V_m$**  est une  **$V_i$**  particulière qui correspond à la  **$V_i$  maximal** que l'on peut atteindre dans les condition que l'on a définies.

**$V_{max}$  : vitesse maximale de catalyse pour une concentration donnée en enzyme, elle est obtenue à saturation complète de l'enzyme, c'est-à-dire 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. *(pour être sûr qu'absolument toutes les enzymes sont liées à un S)*

*Maintenant on va essayer de déterminer la  $V_i$  réel de nos réaction  $\neq V_{max}$*

## 5) 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** du complexe.
- Il n'y a **qu'une seule réaction** = celle de formation du complexe ES (*car produit négligeable on ne fait pas la réaction inverse*) donc la vitesse dépend de :
  - La valeur de  **$k_1$**  ( $E + S \rightarrow ES$ )
  - 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**. *Quand la réaction est réversible  $P \Rightarrow S$ , on répète beaucoup*

En théorie si on a un **maximum de complexe ES** on atteint la  **$V_m$**  sauf qu'en réalité des réaction vont avoir pour conséquence de **diminuer  $[ES]$**  et donc **diminuer  $V_i$**  : *ça ne sera donc plus la  $V_m$*

- La **dissociation** ( $ES \Rightarrow E + S$ ) dont la vitesse dépend de la **concentration de ES** et de  **$k_{-1}$**
- La **transformation enzymatique** proprement dite dépendant de la **concentration du complexe ES** et de la valeur de  **$k_2$**

À partir de ces données on va calculé une nouvelle **constante spécifique à chaque enzyme** (*que vous avez déjà vu*) la **constante de Michaelis et Menten : le  $K_m$**



Après plusieurs transformations mathématiques, on arrive à une expression simplifiée de  $K_m$  :

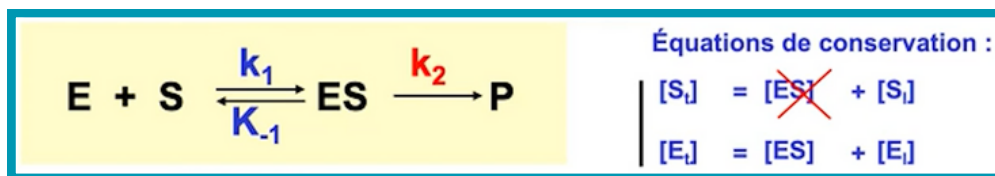
$$\begin{array}{c} \text{Vitesse de formation ES} \\ k_1 ([E][S]) = (k_{-1} + k_2) [ES] \Rightarrow \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} = \frac{([E][S])}{[ES]} = K_m \\ \text{Vitesse de dissociation de ES} \end{array}$$

La constante de Michaelis et Menten ( $K_m$ ) :

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

- en **mol/L**
- indicateur de l'**affinité de l'enzyme pour le substrat**, **inversement proportionnel** (*plus l'enzyme est spécifique, plus elle liera le substrat facilement et donc plus [ES] sera élevé par rapport à [E] et [S] et donc  $K_m$  sera bas*)

Maintenant qu'on a notre  $K_m$  on va pouvoir déterminer la  **$V_i$  réel** de nos réaction enzymatique :



Selon les équations de conservation de masse : **[Substrat total] = [S associé à E : complexe ES] + [Substrat Libre]**

Or **[ES]** est négligeable car elle est dépendante de la quantité d'enzyme qui est en **très faible** concentration par rapport à celle du substrat. ( $[E] \ll [S]$  : Rappel Conditions Michaelis-Menten)

D'autre part, **[Enzymetotal] = [ES] + [E libre]**

$$\begin{array}{l} K_m = \frac{([E][S])}{[ES]} \\ K_m [ES] = [E] \times [S] \Rightarrow K_m [ES] = ([E] - [ES]) \times [S] \\ [ES] = \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \end{array}$$

*Que des maths pour le coup pas grand chose à expliquer, c'est pas très compliqué mais si vous n'y arrivez pas c'est pas très grave, on vous demandera jamais la démonstration à l'examen*

On peut comme ça trouver **[ES] réel** en fonction de l'**affinité de l'enzyme pour le substrat !**

Mais si vous vous souvenez bien on a vu que de manière général :  **$V_i = k_2 [ES]$**

Donc si on multiplie tout (*formule de [ES]*) par  **$k_2$**  on retrouve la  **$V_i$**  :

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

On se rappelle :  **$V_{max}$**  ou Vitesse maximale de réaction = Vitesse obtenue lorsque tous les sites actifs de l'enzyme sont saturés par le substrat et donc  **$V_m$**  dépend de la **concentration en enzyme totale** avec :  **$V_m = k_2 [E]$**

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

On peut le remplacer dans notre équation :

On arrive à l'expression qu'on appelle l'**équation de Michaëlis et Menten** qui permet de calculer la  **$V_i$**  en fonction de la **concentration de substrat** et de **2 constantes caractéristiques** d'une réaction enzymatique : la  **$V_m$**  et la **constante de Michaëlis et Menten ( $K_m$ )**.

En étudiant cette fonction, on observe qu'elle est univoque :

- La **Vi est nulle** si la **concentration de substrat est nulle**.
- Lorsque **[S]** tend vers l'infini, le terme : **[S] / Km + [S]** tend vers **1**. (*Km devient alors négligeable par rapport à [S] et on se retrouve avec [S]/[S] = 1, à ce moment là : Vi = Vm x [S] / [S] = Vm*)
- Lorsque **Km = [S]**, la **Vi** devient égale à la moitié de la **Vm** *Si Km = [S] alors Vi = Vm x [S] / [S] + [S] = Vm x [S] / 2 x [S] = Vm / 2*

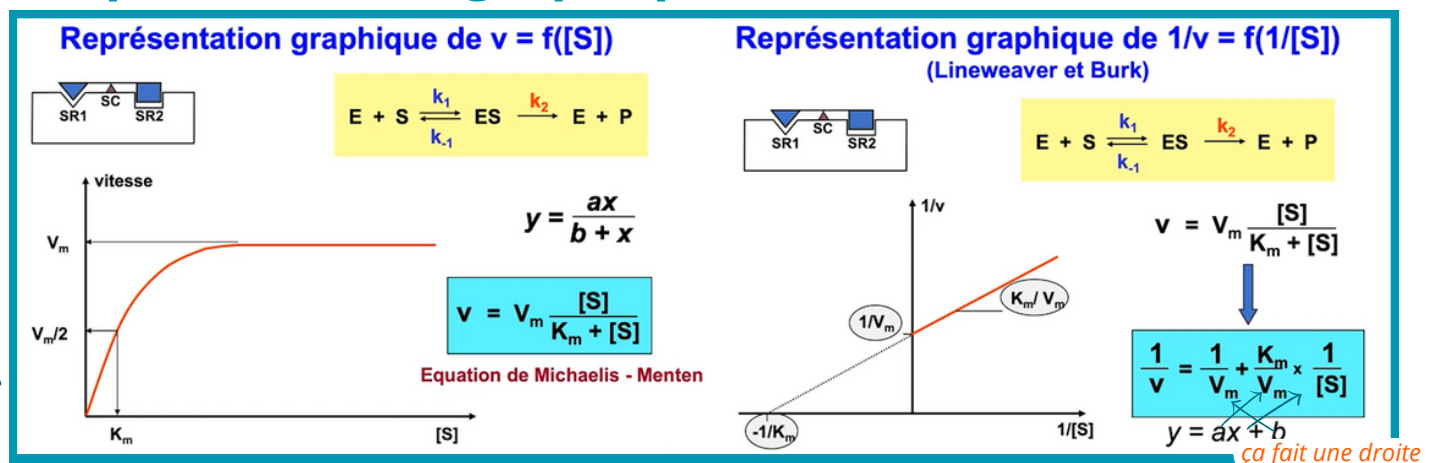
*Donc pour finir (on se répète mais c'est important quand même) :*

**Km (constante de Michaelis) : Concentration de substrat permettant une Vi de la réaction enzymatique égale à la moitié de la vitesse maximum. Elle rend compte de l'affinité enzyme/substrat (inversement proportionnel)**

**Vm (vitesse maximale) : Vi 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 occupés par le substrat et donc la Vm rend compte de la vitesse de transformation du substrat associé à l'enzyme dans le complexe ES en produit de réaction.**

## 6) Représentation graphique de Lineweaver et Burk

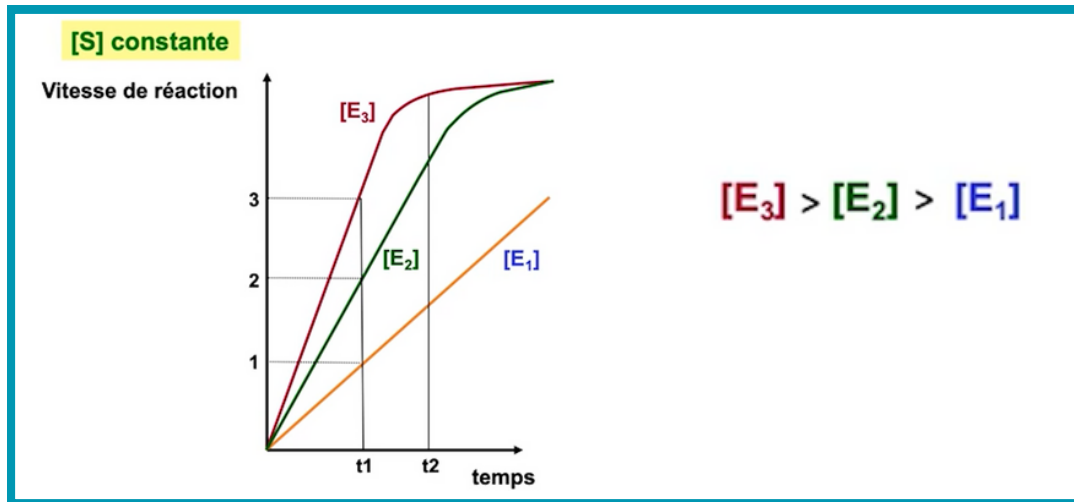


On peut représenter, dans un graphique linéaire, les inverses des variables de l'**hyperbole** (premier graphique). À savoir l'**inverse de la vitesse de réaction** (1/v) en fonction de l'**inverse de la concentration de substrat** 1/[S].

Cette droite est facile à tracer à partir des mesures expérimentales 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 Km et Vm. Cette représentation linéaire est appelée la **représentation de Lineweaver et Burk**.



## 7) Influence de la concentration d'enzyme



Si on réalise plusieurs expériences en utilisant des concentrations **croissantes d'enzyme**. On s'aperçoit qu'au bout d'un moment, à **t<sub>1</sub>**, il y a d'autant **plus de substrat transformé en produit** qu'il y a d'**avantage d'enzyme présente**.

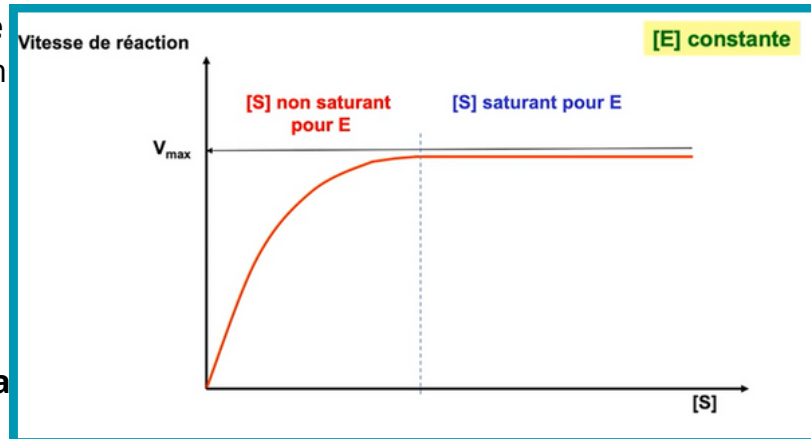
**La vitesse de réaction est plus importante avec une concentration plus élevée d'enzyme.**

A condition d'être dans la partie rectiligne de la courbe donc de mesurer les **Vi** dans chaque expérience. Par contre au temps **t<sub>2</sub>**, il n'y a **plus de proportionnalité** entre la vitesse de réaction et la concentration en enzyme. Ces expériences sont réalisées en **concentration constante de substrat**.

## 8) 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 pour des valeurs élevées de la concentration de S : il **n'y a plus d'augmentation de vitesse**. On **atteint la V<sub>m</sub> limitée par la concentration en E**.



*Et enfin la dernière partie de ce début de cours :*

## 9) Expression de l'activité enzymatique

L'expression de l'activité enzymatique peut prendre **plusieurs unités** dont :

**L'unité internationale = U.I**  
(la plus utilisée)

Correspond à la quantité d'enzymes capable de transformer **1 µmole de substrat/min**, dans les conditions standards de l'expérimentation.

**Le Katal**

Correspond à la quantité d'enzymes capable de transformer **1 mole de substrat/seconde**, dans les conditions standards de l'expérimentation.

**L'Activité Molaire  
Spécifique = A.M.S**

Correspond au nombre de **moles de substrat transformées par mole d'enzyme/seconde**.

**L'Activité Spécifique = A.S**

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 :



**La formation d'un complexe ES est un intermédiaire essentiel de la réaction enzymatique**

**Pour étudier la cinétique enzymatique, l'enzyme est présent en large excès par rapport au substrat et on suppose qu'on est dans un état stationnaire : dans ces conditions la concentration du complexe (ES) est constante**

**K<sub>m</sub>, constante de Michaelis : Concentration du substrat permettant une vitesse initiale de la réaction enzymatique égale à la moitié de la vitesse maximum**

**V<sub>m</sub>, vitesse maximale : Vitesse initiale théorique d'une réaction enzymatique obtenue quand toutes les molécules d'enzymes sont saturées par le substrat (concentration saturante en substrat)**

## II) Contrôle de l'activité enzymatique

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

Nous allons d'abord voir les **processus physico-chimiques** :

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** (facteur physique)
  - **Cofacteurs** (ions, coenzymes)
  - **Concentration en substrat** (cinétique + inhibition par excès de [S])

## 1) Notion d'isoenzymes et macroenzymes

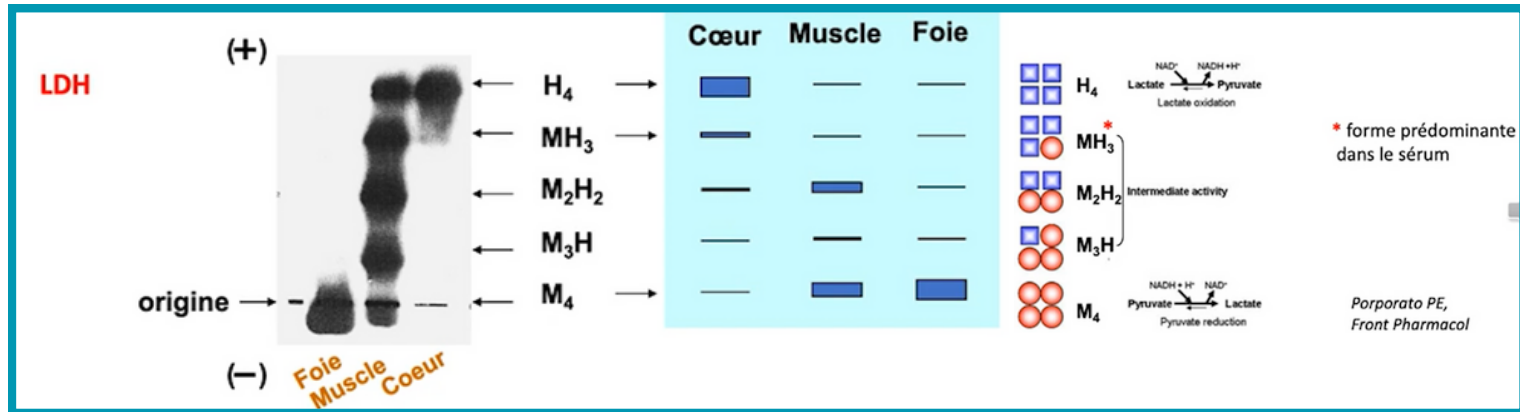
Les isoenzymes :

- Représentent des **formes différentes** d'une **même enzyme** qui **catalysent la même réaction**
- Sont issus de **gènes différents**, expression **tissu-spécifique différente**
- Possèdent donc des **propriétés chimiques et physiques différentes** : mobilité électrophorétique, composition en Aa, propriétés cinétiques...

**Exemple** *ça faisait longtemps* d'**isoenzyme** : la **LDH** (lactate déshydrogénase)

La LDH est **tétramétrique** (4 sous-unités). Chez les mammifères, chaque sous-unité est soit de **type H (Heart)**, soit de **type M (Muscle)**. En fonction du type d'assemblage, il y a **5 différents isotypes** de LDH :

- La LDH de type **M4** a **4 sous unités M** et est caractéristique du foie
- La LDH de type **H4** a **4 sous-unités H** et est caractéristique du cœur
- **Intermédiaires** de différentes quantités de H et de M qui caractérise par exemple 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 relative de ces chaînes est plus ou moins importante selon les organes.

La molécule **LDH M4** est **abondante dans le muscle** :

- Elle va avoir une **forte affinité** pour le **pyruvate** (son Km est faible pour le pyruvate), elle est donc très efficace pour la **fermentation lactique**. *pyruvate en lactate*
- On dit que la **Vm est forte** dans le sens **pyruvate => lactate**.
- **Pas d'inhibition par le pyruvate**

La molécule **LDH H4** est **abondante dans le cœur** :

- Elle a une **forte affinité** pour le **lactate** (son Km est faible pour le lactate).
- On dit que la **Vm est forte** dans le sens **lactate => pyruvate**. *dans l'autre sens par rapport à LDH M4*
- De plus, H4 est **inhibé par des concentrations élevées en pyruvate**. *logique car c'est la molécule qu'elle produit, et si il y en a trop cette même molécule l'inhibe pour arrêter sa propre production. Le cœur va utilisé le lactate pour produire de l'énergie en le transformant en pyruvate.*

Le cœur est bien oxygéné donc utilise **moins la fermentation** que les autres muscles.

### Les macroenzymes :

Ce sont des **complexes de haut poids moléculaire** (HPM) formés par liaison entre une **enzyme** et une **macromolécule sérique** (= *qu'on retrouve dans le serum donc le sang*)

2 conséquences pour les enzymes :

- **Ralentissement** de leur **clairance /élimination**
- **Élévation artéfactuelle** de l'**activité enzymatique correspondante**



Il existe **2 types** de macroenzymes :

**Type 1 (plus fréquent) : lipase, amylase, phosphatase alcaline...**

Dans ces complexes, l'enzyme est associée à une **immunoglobuline** de type IgG, plus rarement IgA ou IgM.

Ces complexes n'ont en général aucune signification pathologique, bien qu'ils puissent être associés à des pathologies auto-immunes.

**Type 2 : créatine kinase,  $\gamma$ -glutamyltransférase...**

Elles sont dues à une association entre l'enzyme et une autre **macromolécule** :

- Soit une molécule d'**enzyme** elle-même dans un processus d'**auto-polymérisation**
- Soit une molécule de **médicament**
- Soit une **lipoprotéine**.

À l'exception des médicaments, ces macroenzymes signent le plus souvent l'**existence d'une pathologie** hépato-biliaire.

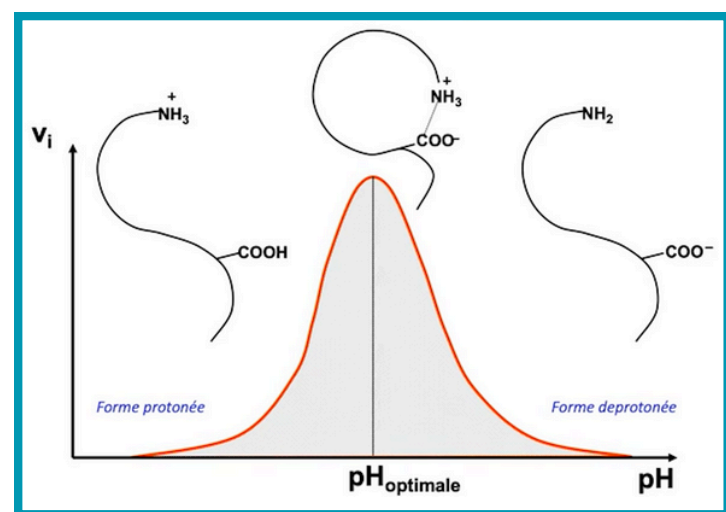
## 2) Influence du pH et de la température sur l'activité enzymatique

### Influence du pH (facteur physique environnemental) :

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** ( $\text{NH}_3^+$  et  $\text{COO}^-$ ) qui composent l'enzyme :

- À **pH très acide** : La plupart des fonctions ionisables de ces radicaux sont sous la **forme protonée** : **COOH** pour la fonction acide carboxylique et  **$\text{NH}_3^+$**  pour la fonction amine. Pas de liaisons de types électrostatiques.
- A **pH proche de la neutralité** : Un très grand nombre de radicaux à fonction ionisable sont **chargés** facilitant les liaisons E-S ou enzyme-coenzyme de type électrostatique.
- Au **pH plus alcalin** : Les fonctions ionisables de ses radicaux sont sous **forme déprotonée**  **$\text{COO}^-$**  pour acide carboxylique et  **$\text{NH}_2$**  pour la fonction amine. Pas de liaisons de types électrostatiques.





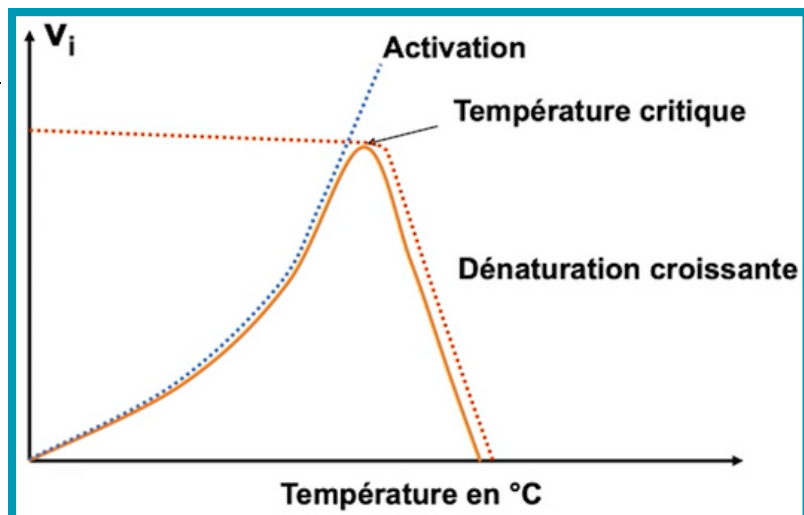
Il existe donc un pH du milieu réactionnel où les charges électriques du radicaux du site actif de l'enzyme seront **plus favorables à la liaison E-S** => C'est le **pH optimal** de la réaction enzymatique en question. Le **pH optimal varie beaucoup** en fonction des enzymes :

- Le pH optimal peut être **très acide**. **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 : **Par exemple** l'activité de la **cholinestérase** augmente en fonction du pH jusqu'à atteindre un maximum d'activité autour d'un **pH de 7**.

### Influence de la température (facteur physique) :

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** :

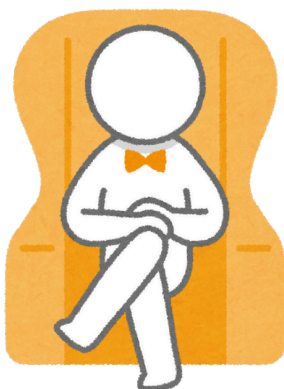
- Dans les zones à **basse température** : la vitesse augmente avec l'augmentation de la température. Ceci peut s'expliquer par une **formation plus importante du complexe actif ES** lorsqu'on ajoute de l'**énergie sous forme thermique**.
- Puis au-delà d'une certaine température (qui varie selon les 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**.



*Mesdames et messieurs, nous sommes arrivés à la moitié de cette magnifique fiche.*

*Je vous propose de faire une petite pause et d'aller vous délecter de la boisson de votre choix.*

### 3) Influence de processus NON physico-chimique sur l'activité enzymatique

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

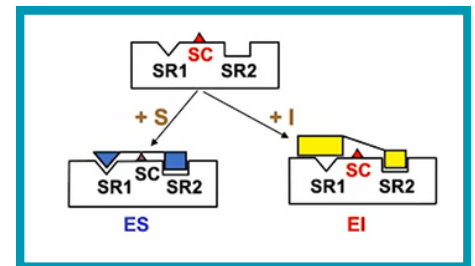
- Les **agents modulateurs** qui peuvent induire ou diminuer l'activité enzymatique on parle d'**activateurs** ou d'**inhibiteurs**, ils agissent par divers mécanismes
- La **protéolyse ménagée** (contrôle de manière irréversible)
- Les **modifications covalentes** (contrôle de manière réversible)

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

#### Les agents modulateurs : Les différents types d'inhibiteurs :

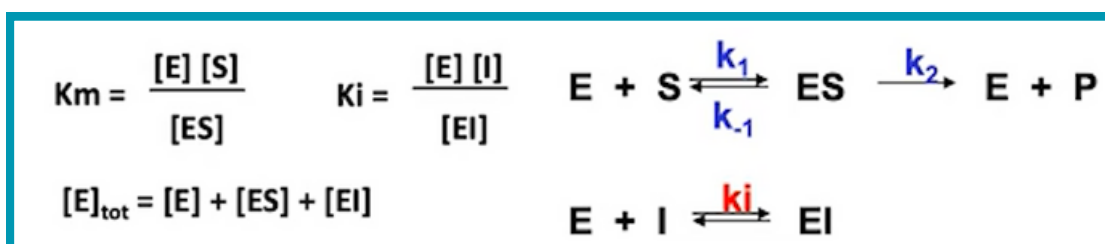
##### 1) Les inhibiteurs compétitifs :

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 du substrat**. Dans ce cas, l'inhibiteur a une **structure semblable à celle du substrat** et il se lie au niveau du **même site actif**.



En parallèle de la liaison enzyme-substrat, on a donc la formation d'une liaison **enzyme-inhibiteur** aboutissant à la formation d'un **complexe enzyme-inhibiteur inactif**.

La **constante de dissociation** de ce complexe Enzyme-Inhibiteur soit **Ki** est défini par rapport aux concentrations de l'enzyme libre, de l'inhibiteur et du complexe Enzyme-Inhibiteur. *Comme pour Km mais avec l'inhibiteur*



Dans l'équation de la **conservation de l'enzyme**, il apparaît une autre forme de l'enzyme c'est-à-dire l'enzyme associée dans le **complexe Enzyme-inhibiteur**.

L'équation de la **vitesse de réaction** qui ne dépend **QUE du complexe ES** reste **inchangé** puisque le complexe **enzyme-inhibiteur est inactif**.

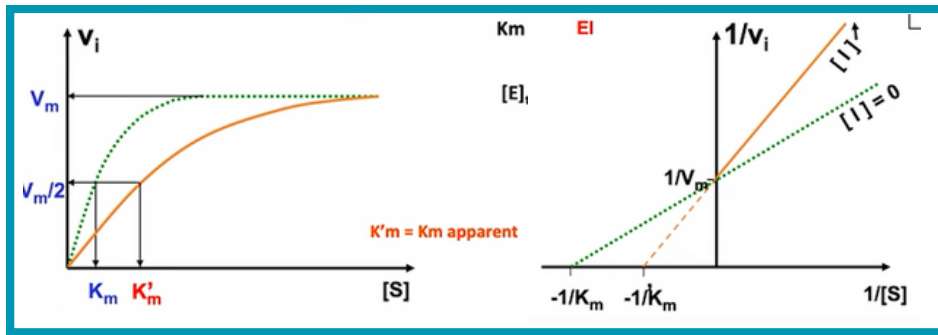
Des calculs conduisent à l'équation de Michaelis et Menten dans laquelle le **facteur Km est affecté** d'un coefficient qui dépend de :

- La **concentration de l'inhibiteur**
- L'**inverse de la constante Ki** = affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur.

Donc ce complexe **Enzyme-inhibiteur** ne va **pas modifier la Vm** mais va **influencer le Km** *logique : il prend la place du substrat donc on aura moins de complexe ES pour le même nombre d'E, le Km augmente et la Vi diminue*

$$v = V_m \frac{[S]}{K'_m + [S]}$$

$$K'_m = K_m \left[ 1 + \frac{[I]}{K_i} \right]$$



Comme on prend l'**inverse** de la vitesse c'est logique que la courbe avec l'inhibiteur soit plus élevée. La vitesse avec inhibiteur est diminué donc son **inverse** est augmenté.

Le graphique en double inverse montre :

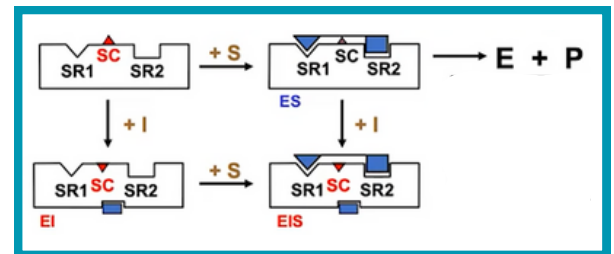
- Une droite représentant la situation **sans inhibiteur ( $i=0$ )**
- Une droite représentant l'effet d'une **concentration donnée d'inhibiteur**

L'**inverse de la le complexe Enzyme-Inhibiteur-Substrat** maximum (qui est inchangée) représente le point commun de ces droites. Ceci est une 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  $K_m$** . *à gauche*

## 2) Les inhibiteurs non compétitifs :

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



L'inhibiteur, en se liant, rend la molécule d'**enzyme incapable de catalyser la réaction** : on parle d'**inhibition non compétitive**. Toutes les molécules d'enzyme peuvent être en liaison avec l'inhibiteur ce qui fait que 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 après inhibiteur). Tous 2 sont bien sûr **inactifs**.

La constante  **$K_m$**  de l'**enzyme vis-à-vis du substrat** représente **toujours la constante de dissociation du complexe ES** mais aussi celle du **complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur** en Enzyme-Inhibiteur + Substrat libre. *Elle ne change pas*

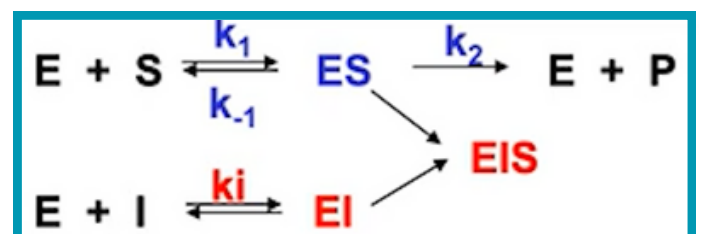
La constante  **$K_i$**  de l'enzyme vis-à-vis de l'inhibiteur représente toujours la constante de **dissociation du complexe Enzyme-Inhibiteur** mais aussi celle du complexe **Enzyme-Substrat-Inhibiteur** en Enzyme-Substrat + Inhibiteur libre.

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

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

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**
- le complexe **Enzyme-Inhibiteur-Substrat**



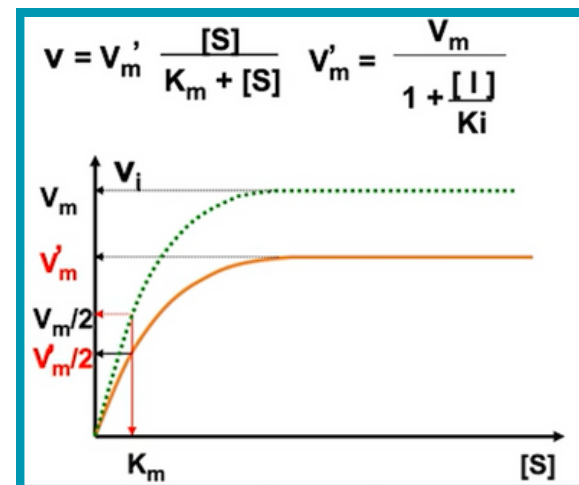
L'équation de la vitesse de réaction ne dépend **QUE du complexe ES** qui reste **inchangée** puisque le complexe Enzyme-Inhibiteur et Enzyme-Inhibiteur-Substrat sont inactifs. Des calculs conduisent à une équation de Michaelis et Menten dans laquelle la **V<sub>m</sub>** est **affectée d'un coefficient (la V<sub>m</sub> change !)** qui dépend de la **concentration de l'inhibiteur** et de **l'inverse de la constante K<sub>i</sub>** (=affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur). La constante **K<sub>m</sub>**, au contraire, reste la même que dans le cas général.

Le graphique représentant la **V<sub>i</sub>** 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 diminue** à cause des molécules d'enzymes liées à l'inhibiteur l'inactivant, même à concentration infinie de substrat.

La moitié de cette V<sub>m</sub> 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 :

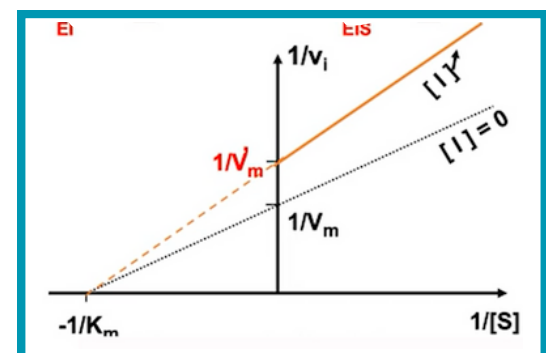
- une droite représentant la situation **sans inhibiteur : i=0**
- une droite représentant l'effet d'une présence **d'inhibiteur (trait plein)**.

L'**inverse** de la **V<sub>m</sub> augmente** avec la présence d'inhibiteur de même que la pente de la droite. **V<sub>m</sub> diminue**

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 qui est l'inverse du K<sub>m</sub>**. **K<sub>m</sub> reste inchangé**

Le point commun de toutes ces droites est situé à gauche de l'axe des Y dans une partie du graphe 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<sub>m</sub>** 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**. *#explication de la prof*



### Les inhibiteurs in(un)compétitifs : *On s'accroche c'est le dernier, un mix des deux*

Les inhibiteurs **incompétitifs** ont la caractéristique de se fixer sur le complexe ES sur un site qui est **différent du Site Actif** de l'enzyme : Formation du complexe **Enzyme-Inhibiteur-Substrat inactif**.

La présence d'un inhibiteur in(un)compétitifs va modifier la **Km** et la **Vm**.

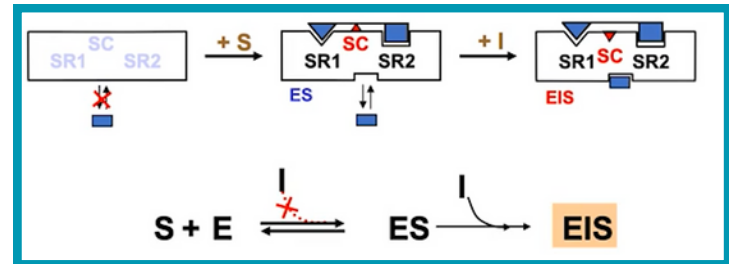
**Km diminue** : on **favorise** la formation du complexe ES pour **former le complexe EIS**. Dans ces conditions pour un même degré de saturation de l'enzyme, il faut une **concentration plus faible en substrat**.

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

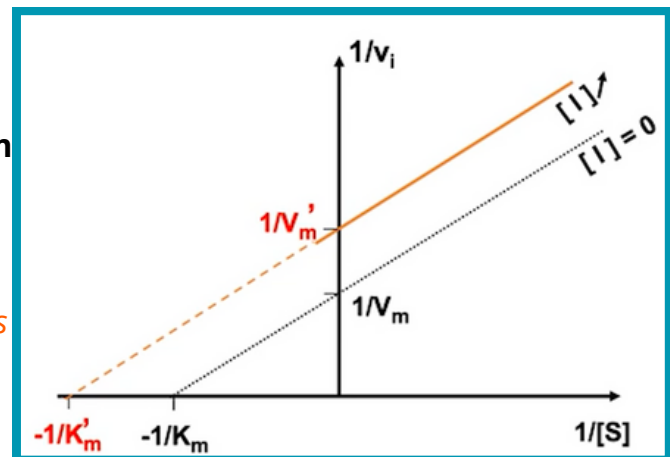
Le graphique en double inverse d'une réaction en absence ou en présence d'inhibiteur incompétitif sera caractérisé par la présence de **2 droites parallèles**.

En effet, dans ces situations de présence d'inhibiteur incompétitif, il y a à la fois une **modification** de la **Vm** de la réaction mais également une **modification** de la **Km**.

*Tout ça c'est relou les maths et tout... on est en santé pas en prépa mais pas d'inquiétude avec le tableau qui vient après vous pourrez perfect tous les qcms sur ces inhibiteur !*



$$v = V'_m \frac{[S]}{K'_m + [S]} \quad \left\{ \begin{array}{l} V'_m = \frac{V_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \\ K'_m = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \end{array} \right.$$



- **Levée** = Levée de l'inhibition par ajout en **excès du substrat**
- De façon générale, les effets des inhibiteurs vont dépendre de la concentration d'inhibiteur mais également de la **ki** : **affinité entre l'inhibiteur et E**.
- Les inhibiteurs **non compétitifs** et **incompétitifs** ne peuvent pas être levées par un ajout en excès de substrat.

### Les différents types d'inhibition enzymatique

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

Inhibition élevée si  $\left\{ \begin{array}{l} [I] \uparrow \\ K_i \downarrow \end{array} \right.$



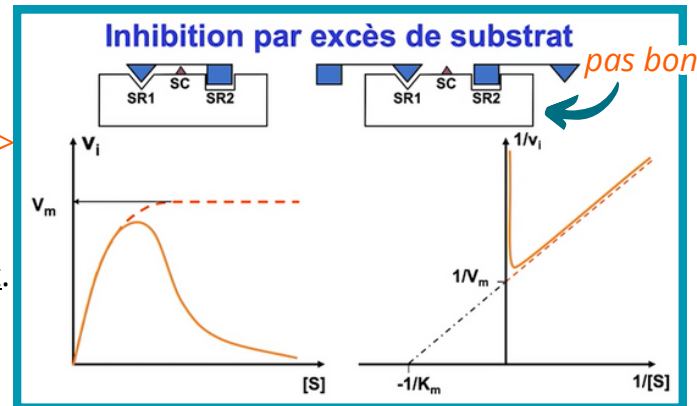
### Inhibition par excès de substrat :

Lorsque la [substrat] est faible, **chaque** partie du substrat interagit avec le **sous-site** qui lui est **dédié**. 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** chacune fixant une partie du substrat.

Le substrat peut se loger dans le Site Actif avec une **orientation anormale** interdisant à la réaction de se faire correctement. *comme au dessus des graphes=>*

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**.



### Modifications IRREVERSIBLES par protéolyse ménagée :

Un certain nombre d'enzymes sont synthétisées sous forme de **précurseurs inactifs** appelés **ZYMOGENES** 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 donc une **modification de conformation spatiale** de l'enzyme qui présente ainsi son SA. Ce sont des modifications de **type irréversible**.

### Modifications REVERSIBLES par modification covalente :

L'activité des enzymes peut aussi être modifiée par des **modifications covalentes** qui peuvent soit **activer** ou **inhiber** l'activité enzymatique en modifiant la valeur de la  $K_m$ .

**Exemple** de modification covalente est la **phosphorylation** :

- C'est une modification **post-traductionnelle** de l'enzyme cible.
- Modification **covalente, réversible**
- 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 une séquence consensus de l'enzyme. En général, il s'agit de thréonine, tyrosine, sérine.
- La réaction de phosphorylation est catalysée par une **protéine kinase**
- La réaction de déphosphorylation est réalisée par une **protéine phosphatase**
- Très fréquemment, ce processus de régulation se produit en réponse à un **stimulus extérieur** : **hormone** ou **facteur de croissance**

**2 EXEMPLES : LA PKA ET LE GLUCAGON** *Parce que ça faisait longtemps*



## La PKA :

Parmi les protéines kinases à régulation covalente, 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**.

Après l'interaction d'un **ligand** (comme une hormone) avec son récepteur au niveau de la membrane cellulaire, les enzymes à régulation covalente sont impliquées dans la transduction du signal :

- Ce messenger primaire (hormone) en agissant avec son récepteur entraîne une augmentation de l'AMPc activant la PKA
- PKA activée phosphoryle et active Enzyme 1
- Enzyme 1 activée peut être aussi une protéine kinase différente de PKA qui à son tour active par phosphorylation une autre Enzyme 2
- Enzyme 2 activée peut être aussi une protéine kinase différente de PKA et ENZYME 1 qui à son tour agit sur un autre ENZYME 3

*La phosphorylation peut aussi inactiver un enzyme,*

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 membrane cellulaire vers l'intérieur de la cellule où a lieu la réaction métabolique. *vous avez déjà vu ça dans plein d'autre cours, ne vous y attardez pas trop*

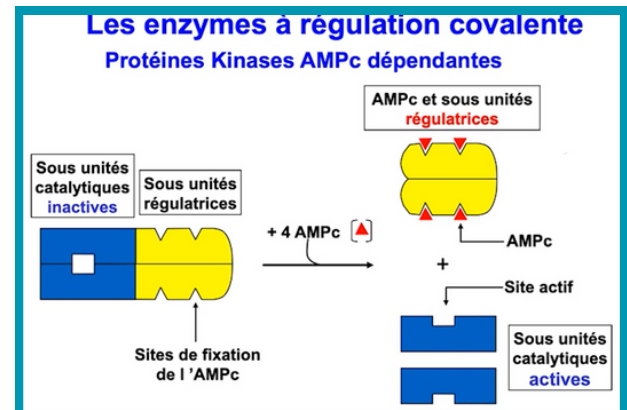
## Le Glucagon :

Le GLUCAGON interagit avec ses récepteurs exprimés au niveau hépatique activant L'ADENYLATE 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.

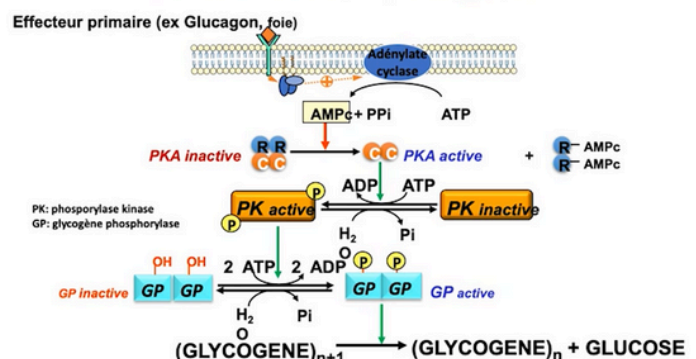
La PKA maintenant active va à son tour phosphoryler la phosphorylase kinase en la rendant active.

La phosphorylase kinase maintenant active va à son tour phosphoryler et activer la glycogène phosphorylase entraînant la dégradation du glycogène et la libération de glucose.

*bref vous reverrez dans d'autre cours*



## Les enzymes à régulation covalente : implication dans la transduction du signal



## III) Les enzymes allostériques

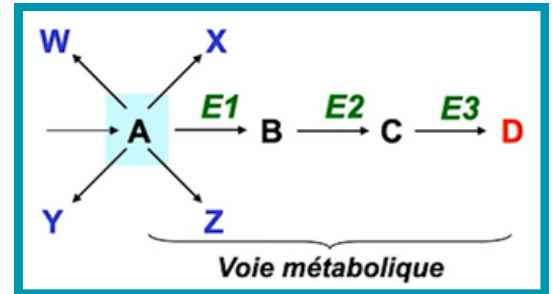
*Dernière partie de cette fiche, prenez une pause, bon courage c'est presque fini*

### 1) Définition

Les réactions enzymatiques permettent à notre organisme de faire la synthèse/transformation de molécules biologiques dont il a besoin. Cette synthèse/transformation s'effectue à partir de composés simples souvent d'origine alimentaire.

Soit le composé A : substrat de réactions conduisant vers des transformations variées, cela constitue un carrefour métabolique.

Chacune de ces voies de synthèse va s'effectuer en plusieurs étapes constituant ainsi les voies métaboliques. D'ailleurs, chaque étape est catalysée par une enzyme spécifique (E1,E2,E3) *Vous connaissez déjà tout ça*



La vitesse de synthèse du dernier produit de la réaction (D) **dépend de la vitesse la plus lente des réactions qui le précède.**

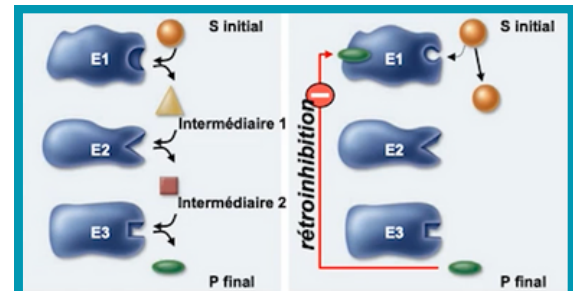
- Si le produit final est en quantité **insuffisante**, il faut que l'enzyme 1 soit activée.
- Si au contraire le produit final est en quantité **suffisante**, l'enzyme 1 sera inhibée pour empêcher l'entrée du carrefour métabolique dans la voie.

Pour que les composés intermédiaires ne s'accumulent pas, il faut que l'enzyme la plus lente (celle qui doit être régulée) soit celle qui catalyse la **première des réactions** conduisant au produit final.

Dans cet ensemble enzymatique, l'enzyme E1 catalysant la transformation de A en B (1ère étape de la synthèse) est celle qui doit être régulée par des effecteurs permettant de réguler la vitesse de l'ensemble.

Donc, la transformation du substrat initial est indépendante de la concentration des intermédiaires (1,2..)

et le produit final est indépendant des autres enzymes (E2,E3...). En excès de produit final, on aboutit à l'inhibition de la 1ère étape : constituant la rétro-inhibition.



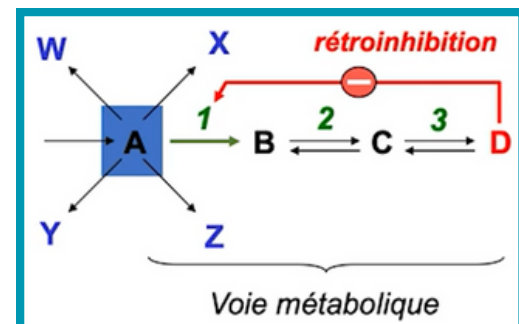
### Enzyme Clé :

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

C'est habituellement la **1ère des enzymes** de la voie, elle catalyse **l'étape d'engagement**.

En fonction des besoins, 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 **rétroinhibition**.



**Les enzymes clés sont TOUTES des enzymes allostériques contrôlées par de multiples facteurs**

## Enzymes allostériques :

Les **ENZYMES ALLOSTÉRIQUES** fonctionnent grâce à la présence :

- D'un **site Actif** qui est responsable de la **transformation du substrat en produit**
- D'un **site Régulateur, différent** du **SA**, permettant 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 site actif ce qui provoque :

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

## Allostérie :

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 (comme la modification de l'activité de l'enzyme).

L'allostérie s'explique par la mise en place d'**effets coopératifs**. Ce concept n'est 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...

## 2) Caractéristiques structurales

Les enzymes allostériques sont des **protéines complexes** qui possèdent **plusieurs sous-unités** organisées de façon à présenter un axe de symétrie.

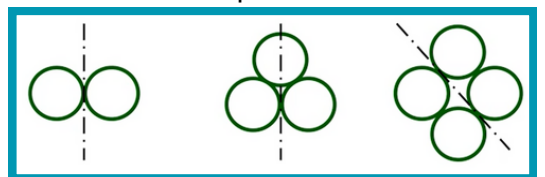
Les enzymes allostériques ont toujours une structure **QUATERNAIRE** composée de plusieurs chaînes d'AA formant des sous-unités ou protomères identiques entre elles.

### **PROTOMERE : Sous-unité d'enzyme allostérique**

Les protéines allostériques sont donc des oligomères où les protomères occupent une disposition équivalente. L'arrangement est donc **symétrique**.

Les protomères sont arrangés dans l'espace de façon à ce que chacun d'entre eux aient les mêmes liaisons avec les autres : Axe de symétrie.

La protéine est donc un oligomère de 2 ou 4 sous-unités. C'est le cas de deux protomères d'une paire ou de 4 protomères placés aux 4 sommets d'un tétraèdre.



Les protéines allostériques exercent un **rôle essentiel** dans la **régulation du métabolisme**. Elles sont caractérisées par une structure **QUATERNAIRE** et une cinétique **ALLOSTERIQUE**.

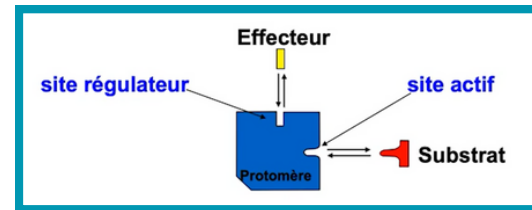
La variation de conformation de la protéine dépend du taux d'occupation des sites de liaison.

Il existe **2 types** d'enzymes allostériques :

- Les enzymes du **système K**
  - La régulation se traduit par une **variation de l'affinité** ( $K_m$ ) du substrat pour l'enzyme
- Les enzymes du **système V**
  - La régulation se traduit par une **variation de la vitesse** de réaction ( $V_m$ )

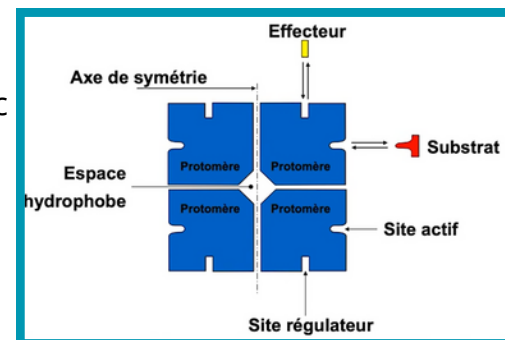
Généralement, **chaque protomère** (d'une enzyme allostérique) possède :

- 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). La fixation se fait par une **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** car chaque protomère a des liaisons avec les autres protomères de l'enzyme (liaison 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.



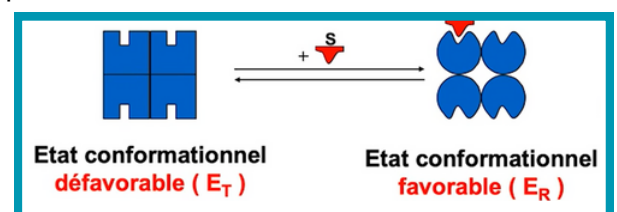
Chaque ligand d'une enzyme allostérique, à savoir un effecteur ou un substrat a un site sur chaque protomère. *on retrouve un site régulateur et un site actif sur chaque protomère*

Les sites de liaison existent donc de façon **identique** sur chaque protomère.

### 3) Les états des protomères

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

- Etat **TENDU** ou contraint : T (**inactif** car le coco est Tendu) *pas comme lui*
  - **Augmentation** de l'énergie interne d'un protomère par la modification des liaisons avec un modulateur → Passage à un état Tendu
- Etat **RELÂCHÉ** : R (actif car il est Reaaaaadyyyy)
  - **Diminution** de l'énergie interne d'un protomère par la modification des liaisons avec un modulateur → Passage à un état Relâché



Les **affinités des sites de fixation du protomère aux ligands ( $K_m$ )** et la  **$V_{max}$**  dépendent du protomère. Donc les changements d'énergie interne se traduisent par :

- Des modifications de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat
- ou
- 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 effecteurs allostériques

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

L'effecteur peut être :

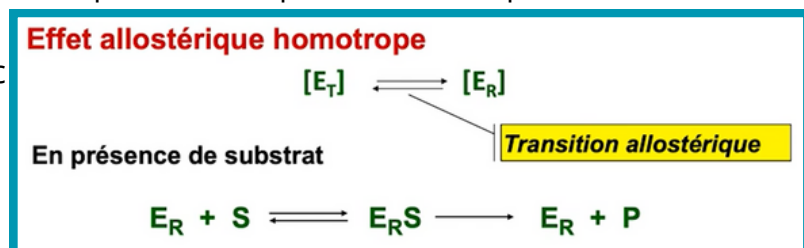
- Une molécule de substrat différente de celle qui participe à la réaction enzymatique, on parle d'effet allostérique **homotrope** (*c'est 2 molécule de substrat identique, dont une va sur le site actif et l'autre sur le site régulateur*)
- Une molécule différente du substrat, on parle d'effet allostérique **hétérotrope**.

### 1) Effet allostérique homotrope

L'enzyme allostérique dans l'état T (tendu) est dans une forme inactive alors qu'en forme R (relâchée), l'enzyme est sous forme active.

Lorsque le substrat agit comme effecteur allostérique homotrope, il se fixe de préférence sur l'enzyme ayant la forme R.

- Le complexe **enzymeR-substrat** va donc **augmenter**
- La concentration de l'**enzyme libre** dans la **forme R** va donc **diminuer**



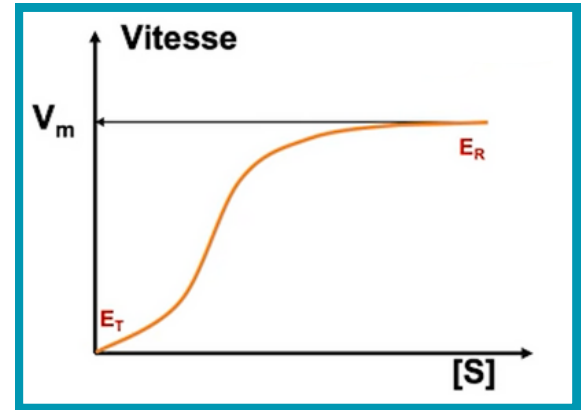
On observe une transition allostérique de l'enzyme de la forme tendue vers la forme relâchée afin de **rétablir** les concentrations de l'enzyme libre sous forme relâchée. C'est le principe même de la **loi d'action de masse**.

**Lorsque le substrat joue un rôle allostérique, il exerce toujours un effet homotrope positif. Les effets allostériques homotropes présentent donc toujours une coopérativité positive.**



Le graphe représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat. Pour une **enzyme allostérique** ce n'est **pas** une hyperbole comme celui observé pour une enzyme michaelienne.

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.



### COURBE SIGMOÏDE = ALLOSTERIE

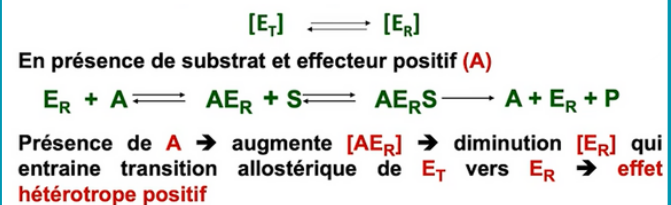
Sur ce graphe, on a représenté la **vitesse initiale** d'une réaction allostérique en fonction de la **concentration de substrat** qui lui-même exerce un effet sur l'enzyme tendant à diminuer  $K_m$  donc à augmenter l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

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.

## 2) Effet hétérotrope positif

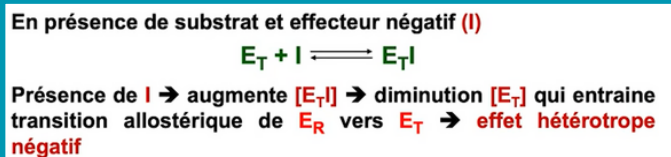
Lorsqu'un effecteur allostérique **HETEROtrophe** est un **effecteur positif** (A), la présence de A va entraîner l'augmentation du complexe enzyme relâchée-A se qui provoque une diminution de l'enzyme relâchée libre qui entraîne une transition allostérique de l'état tendu vers l'état relâché de l'enzyme.



On observe donc un effet **hétérotrope POSITIF** (exactement comme l'effet homotrope)

## 3) Effet hétérotrope négatif

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

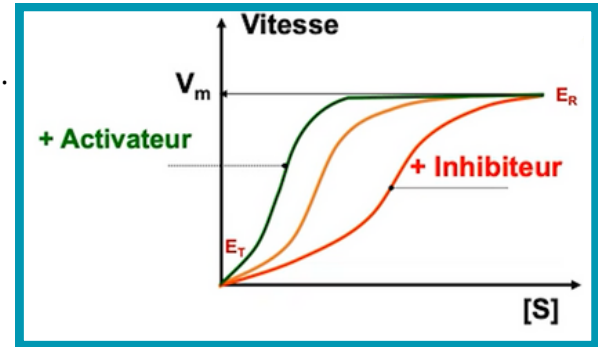


*Mesdames et messieurs, dernière ligne droite.  
je suis de tout coeur avec vous.*



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 (=allostérie) qui est obtenue à l'état basal.

Si on rajoute une molécule activatrice c'est-à-dire 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**.

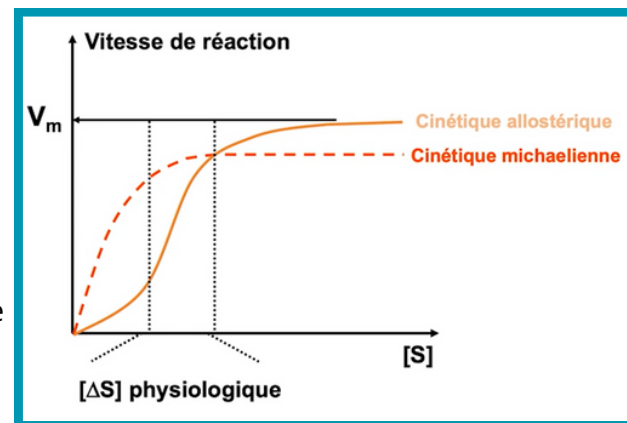


En revanche, si on réalise la même réaction en présence d'un **inhibiteur** (courbe la plus basse) on observe une **diminution de la vitesse de réaction** et donc un **effet anti coopératif**.

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 la courbe suivante, on a représenté la vitesse initiale d'une réaction allostérique (courbe en trait plein) en fonction de la concentration de substrat. Par comparaison, la courbe en tirets représente la même réaction en cinétique Michaelienne sans cet effet allostérique.

- **HYPERBOLE = MICHAELIS-MENTEN**
- **SIGMOÏDE = ALLOSTERIE**
- Pour des **petites concentrations** de substrat, la cinétique allostérique est plus lente que la cinétique Michaelienne.
- Mais pour des **concentrations plus grandes**, elle devient plus rapide.



Au environ 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 graphe 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 **ALLOSTERIQUE** à cinétique **MICHAELIENNE** en désensibilisant l'enzyme. Mais on ne peut **PAS** passer de cinétique **Michaelienne** à **Allostérique**.

Cette désensibilisation peut se faire par :

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

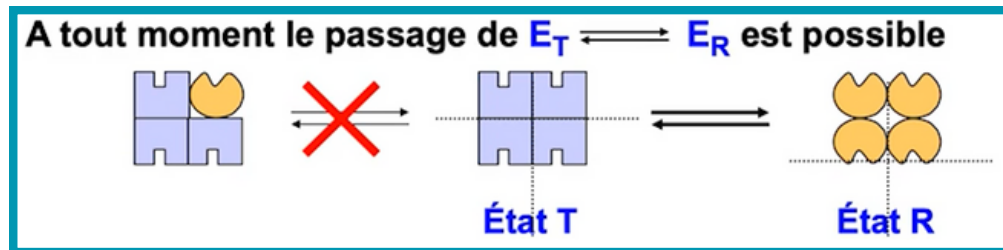
Cette désensibilisation va entraîner une perte de la sensibilité des enzymes aux effecteurs allostériques. Par conséquent, **SEUL** le **site allostérique** sera détruit et il y aura une perte du phénomène de coopérativité.

## V) Les modèles de coopérativité

Il y a 2 différents modèles pour justifier la transition allostérique :

### 1) 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.



### 2) Modèle séquentiel, hypothèse de Koshland

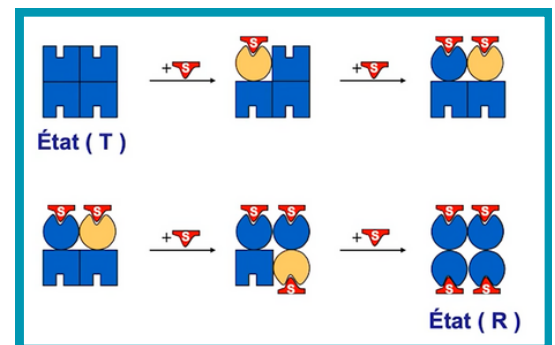
Chaque protomère a la possibilité d'être sous forme R ou T, indépendamment des autres protomères. L'enzyme est ainsi constituée d'un mélange de protomères sous forme T et de protomères sous forme R.

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 ont une structure quaternaire formée de protomères identiques**

**En plus du site actif ces enzymes possèdent 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
- une molécule différente du substrat : on parle d'effet allostérique hétérotrope (positif ou négatif)

**Les effets allostériques homotropes présentent toujours une coopérativité positive**

*C'est bon !!!! Vous êtes enfin au bout de cette fiche !!  
C'est looonnng et pas très facile parfois, si vous avez des questions go fofo !*

*Maintenant place aux!!!!????*

*Et coucou les louloussss c'est de nouveau moi Caryocinèse (Virgilou me laisse le contrôle de ses dédis)*

*Pour commencer bravo à vous petit p1 d'avoir fini une fiche de bioch 🦋🦋🦋!!!!!! surtout de l'enzymo quoi l'ennuiiiiiieeeeeee .....*

*Pour commencer je fais une grosse dédi au petit Virgile qui m'a autorisé à faire ses dédis (bon ok il a surtout la flemme de les faire mais quand même !!)*

*Grosses dédis à Anto qui joue plus qu'il ne travaille depuis qu'il est en p2 ! C'est pour ça les gars donnez-vous à fond pour finir comme anto ! la p2 c'est « cooollll »*

*Evidemment grosse dédi à mon copain qui travail dur <33*

*Dédis à Emma et Juju qui se donnent à fond ! on est tous derrière vous on vous aime !*

*N'oubliez pas que vous êtes incroyablement courageux et forts de faire une LAS 2 <33*

*Dédis à Florine, Caro et Maewen qui vont certainement très bien réussir ! les filles je crois en vous ! Je vous aime <33*

*J'en profite donc pour faire une grosse dédis à tous les LAS 2 qui lisent cette fiche (à l'exception de Corentin toi pas de dédis !!!)*

*Dédis à tous vos incroyables tuteurs et chefs tut qui effectuent un travail monstre !*

*Dédis à Ellycase encore car il a vraiment été un parrain incroyable sauf le fait qu'il ne m'a jamais donné son t-shirt Metallica ! je l'attends toujours ELLY ! après si tu préfères me donner ton pull pas de soucis ! oui j'essaie de raquetter mon parrain en direct hihi !*

*Et pour finir dédis à vous les petits p1 on vous aime ! vous êtes très courageux de vous lancer dans un cursus compliqué mais incroyable ! alors je vous envoie pleins d'amours et de courages vous allez réussir cette année !*

*Bisouss les loulousss !!!*

