

ENZYMOLOGIE

ENZYMES

Les enzymes sont des **protéines** (synthèse déterminée génétiquement) et sont spécifiques d'une réaction donnée.

CATALYSE : Le rôle d'un catalyseur est **d'abaisser l'énergie d'activation** d'une réaction par la **formation d'intermédiaires réactionnels** ayant chacun une énergie d'activation plus basse.

Un catalyseur :

- Ne provoque pas une réaction
- Ne rend pas possible une réaction chimique thermodynamiquement impossible
- Action sur la vitesse de réaction
- Intact à la fin de la réaction
- Agit à faible concentration
- Sert un grand nombre de fois
- Ne modifie pas l'équilibre de la réaction -> Permet de l'atteindre plus rapidement

SPECIFICITE DES ENZYMES

☛ Spécificité **absolue de réaction**

☛ Spécificité de substrat :

Absolute : vis-à-vis d'un seul isomère ou **d'une seule forme optiquement active** (série D ou L)

De liaisons / de groupement : reconnaissance de la liaison et de son environnement

Large : vis-à-vis d'un groupement fonctionnel

STRUCTURE DES ENZYMES :

SITE ACTIF = SITE DE RECONNAISSANCE + SITE CATALYTIQUE

► La spécificité d'une réaction enzymatique est liée au degré de complémentarité entre la structure du substrat et celle de l'enzyme.

▪ AA INDIFFERENTS :

N'interviennent pas dans la réaction enzymatique

Nombre variable

Localisés aux **extrémités N et C** de la protéine

▪ AA DE CONFORMATION :

N'interviennent pas dans la réaction enzymatique

Stabilisent l'enzyme sous sa forme réactionnelle

▪ AA AUXILIAIRES :

Proches du SA

Pas d'interactions avec le substrat

Rôle essentiel dans le fonctionnement de l'enzyme

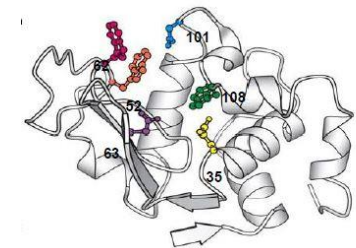
Assurent la **flexibilité du SA**

▪ AA DE CONTACT :

Interactions avec le substrat

< 10 AA

Ils ne se suivent pas forcément dans la séquence protéique



COMPLEXE ES :

SA : faible part du volume total de l'enzyme.

Le site de fixation est composé d'un ensemble de sous sites de fixation.

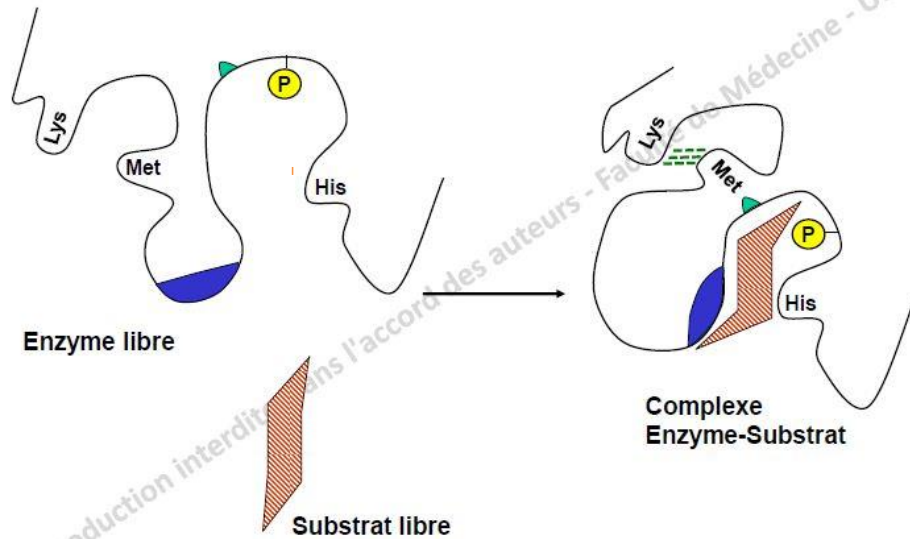
Le substrat s'associe à l'enzyme par de **multiples interactions de faible niveau énergétique** -> Formation du complexe ES.

THEORIE DE FISCHER : Les enzymes, via leur SA, peuvent lier le substrat et permettre sa transformation en produit par stabilisation de l'état de transition.

→ Le substrat et l'enzyme sont sous forme contrainte pour former le complexe ES.

La morphologie du SA est exactement complémentaire de l'état de transition.

► Une partie de l'activité catalytique provient de l'énergie libre générée lors de la formation du complexe ES.



COFACTEURS

APOENZYME + COFACTEUR = HOLOENZYME

► Une apoenzyme est inactive !

Cofacteur = **ion métallique** OU molécule organiques non protéiques (**coenzyme**)

ION :

- Transport du substrat
- Structure de la forme active de l'enzyme

L'apoenzyme reconnaît spécifiquement les cofacteurs dont elle a besoin.

COENZYMES : Molécules biologiques synthétisées à partir **d'intermédiaires métaboliques** OU apport par l'alimentation (**vitamines**)

- Transport d'un intermédiaire réactionnel
- Accepter un produit de la réaction

Coenzyme stœchiométrique = co-substrat

- Lié à l'apoenzyme par des **liaisons faibles**
- Liaison renouvelée à chaque réaction

- Concentration voisine à celle de substrat

→ ROLE DE TRANSPORTEUR

Coenzyme catalytique = prosthétique

- Lié à l'apoenzyme par des **liaisons fortes**
- Liaison définitive
- Concentration voisine à celle en enzyme
- Intervient au niveau du **site catalytique**

→ ROLE D'ACTIVATEUR

Vitamine	Nom	Coenzyme
Vitamine B3	Nicotinamide	NAD / NADP
Vitamine B5	Acide pantothénique	Coenzyme A
Vitamine B6	Pyridoxine	Pyridoxal phosphate
Vitamine B2	Riboflavine	FMN / FAD
Vitamine B1	Thiamine	Thiamine pyrophosphate
Vitamine H	Biotine	Biotine

► COENZYMES D'OXYDOREDUCTION

* NAD

Transport de $2e^- + H^+ = H^•$

Partie réactionnelle = **Nicotinamide**

NAD → Voies cataboliques

Réoxydation au niveau **de la CRM** (conditions aérobie) ou par **fermentation lactique** (anaérobie)

NADPH → Voies anaboliques

Réduction au niveau de **la voie des pentoses phosphates**

- Forme oxydée : structure aromatique, absorption à 280 nm
- Forme réduite : structure quinonique, absorption à 340 nm

* FMN / FAD

Transport de H_2

Partie réactionnelle = noyau **Isoalloxazine**

Flavoprotéines non auto oxydables : appartiennent à la MIM, associées aux transporteurs d'électrons de la CRM

[Les flavoprotéines oxydables (cytoplasmiques) peuvent transférer directement les H qu'elles transportent sur l'oxygène]



* Cytochrome C

Transporte **un électron**

Partie réactionnelle : Noyau **hémique** (Fe^{2+})

* Coenzyme Q = Ubiquinone

Transfert d'**électrons**

Liposoluble

Partie réactionnelle = structure **ubiquinone**

► COENZYMES DE TRANSFERT DE GROUPEMENTS

* TPP

Transfert de **groupements acyls**

Partie réactionnelle = Noyau **thiazole**

* Acide lipoïque

Accepteur de l'**aldéhyde** générée par le TPP (*fonctionnement en complexe avec le TPP*)

Partie réactionnelle = **Noyau 1,2-dithiol**

* Coenzyme A (CoA)

Transport de groupements **acyls et acétyls**

* Biotine

Transport de **groupements méthyl**

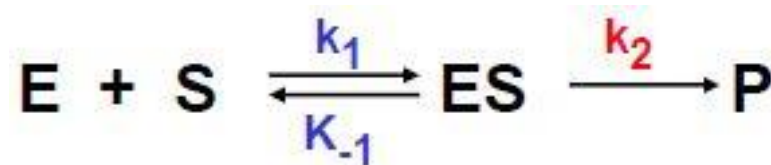
Partie réactionnelle = **groupement NH**

* Pyridoxal Phosphate

Partie réactionnelle = **Fonction aldéhyde**

Coenzyme des transférases

MECANISME DE LA REACTION ENZYMATIQUE



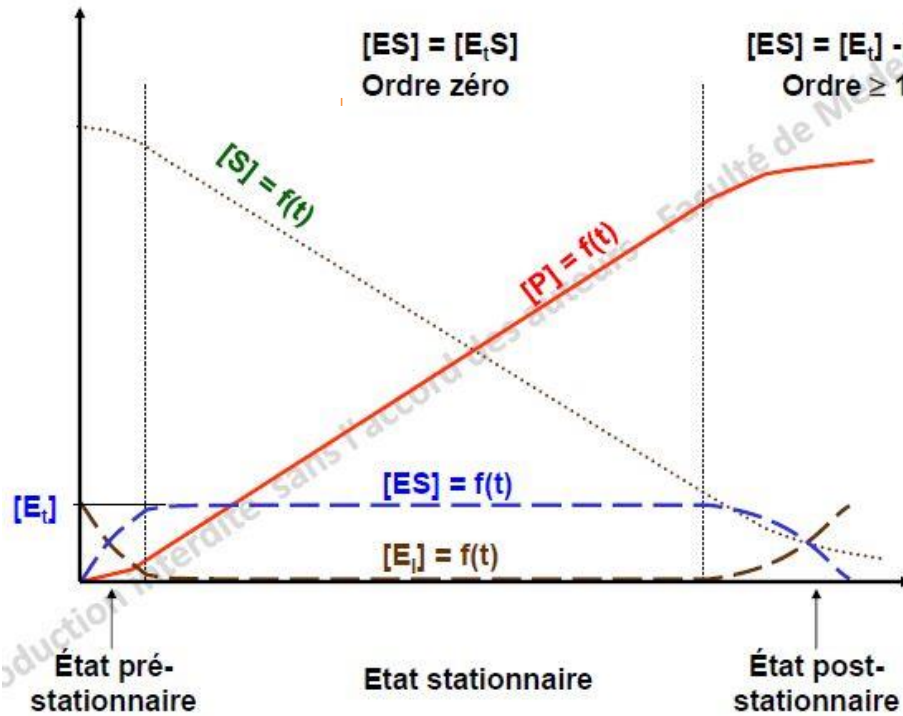
k_1 : Constante de formation du complexe ES

k_{-1} : Constante de dissociation du complexe ES

k_2 : Constante de production du produit

La vitesse d'une réaction chimique est définie par :

$$V = k_2 [ES]$$



Courbe rouge : évolution de la concentration en produit
 Courbe bleue : évolution de la concentration en complexe ES
 Courbe marron : évolution de la concentration en enzyme libre

★ **État pré-stationnaire** : Le substrat se fixe à l'enzyme

- Diminution de la quantité d'enzyme libre
- Augmentation de la quantité de complexe ES
- Augmentation de la quantité de produit formé

★ **État stationnaire = Ordre 0**

- Toute l'enzyme est saturée : Il n'y a plus d'enzyme libre
- La concentration de produit formé évolue linéairement

★ **État post stationnaire**

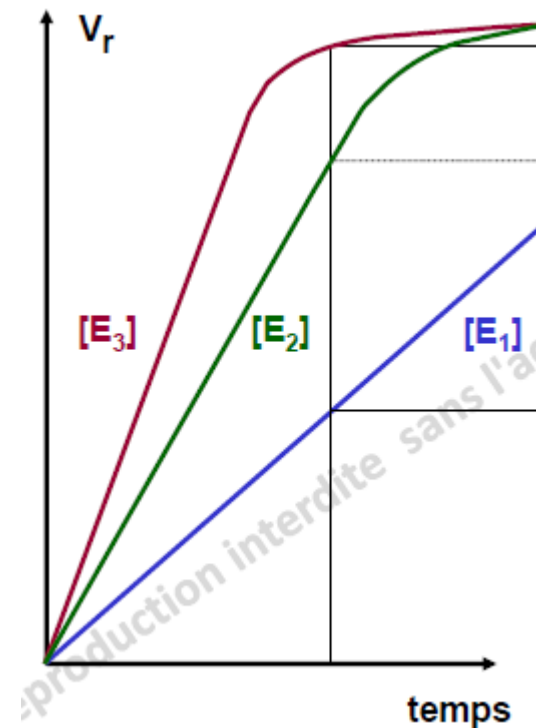
La plupart des molécules de substrat ont été consommées → Le substrat n'est plus saturant → On retrouve des enzymes libres.

Vitesse de réaction en ordre 0 (V_{max}) :

$$V_i = k_2 [E_t]$$

En ordre 0, le substrat est saturant : toute l'enzyme est occupée. Par rapport à la vitesse de réaction à tout moment, on a remplacé $[ES]$ par $[E_t]$ car toutes les enzymes sont liées à une molécule de substrat.

► **INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME :**



$[E_3] > [E_2] > [E_1]$

Moins on a d'enzyme, plus le substrat est saturant longtemps, plus longtemps on est en ordre 0 → L'enzyme fonctionne à V_{max}

► **INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT :**

Si le substrat est saturant

(= $[S] \gg [E]$), on fonctionne en ordre 0.

Si $[S] < [E]$, l'enzyme ne fonctionne pas à V_{max} .

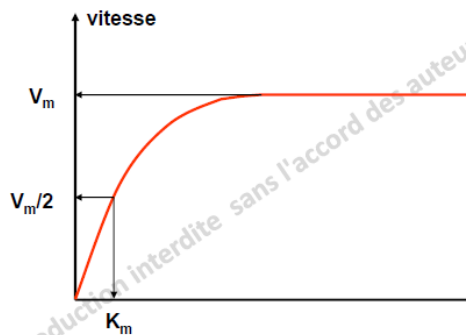
CINETIQUE ENZYMATIQUE

Etat stationnaire : Vitesse de formation du complexe ES = vitesse de dissociation de ES.

Equation de Michaelis et Menten (++)

K_m = Concentration de substrat permettant une vitesse initiale de la réaction enzymatique égale à la moitié de la V_{max}

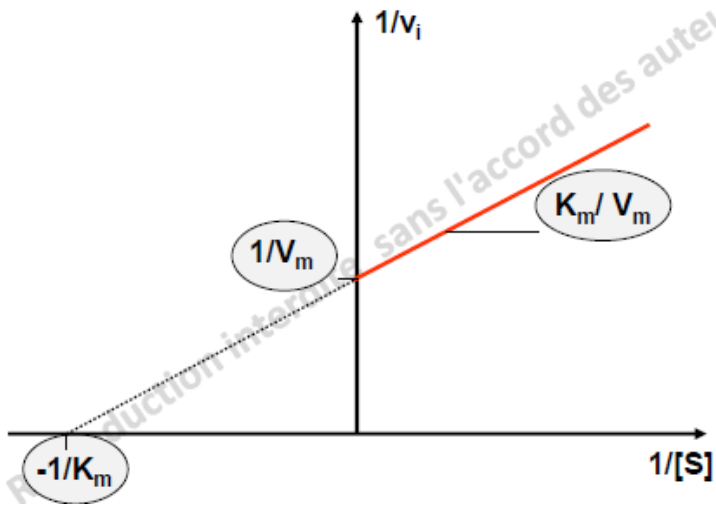
$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$



Si $[S] = K_m$

$$V_r = V_i / 2$$

REPRESENTATION DES DOUBLES INVERSES



Représentation de l'évolution de l'inverse de la concentration en substrat en fonction de l'inverse de la vitesse. On utilise cette représentation car elle se modélise sous forme **d'une droite** et non plus d'une **hyperbole quadrilatère** (plus simple à interpréter).

La droite coupe l'axe des abscisses en $-1/K_m$ → Plus $1/K_m$ est élevé en valeur absolue, plus K_m est faible → plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est grande.

La droite coupe l'axe des ordonnées en $1/V_m$ → Plus $1/V_m$ est faible, plus V_m est élevée.

La pente de la droite représente **l'inverse de l'efficacité catalytique** : K_m/V_m → **L'efficacité catalytique** vaut donc V_m/K_m

EFFECTEURS DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

- **Activateur** : accélère la vitesse de réaction
- **Inhibiteur** : diminue la vitesse de réaction

L'activité enzymatique dépend de :

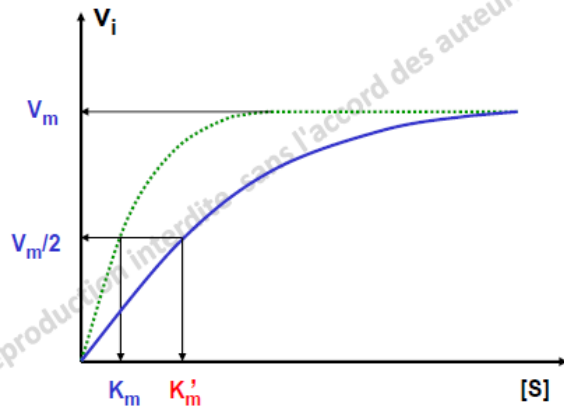
- Sa concentration / sa localisation
- Son environnement (*paramètres physiques*)
- **pH** : les variations de pH entraînent des variations de la conformation de l'enzyme dans l'espace (formation/rupture de liaisons ioniques) → Il existe un pH optimal pour lequel l'enzyme est dans une conformation optimale
- **Température** : influence aussi sur la conformation de l'enzyme dans l'espace

INHIBITEURS

► Inhibiteur compétitif :

Analogie structurale avec le substrat → Même site de fixation

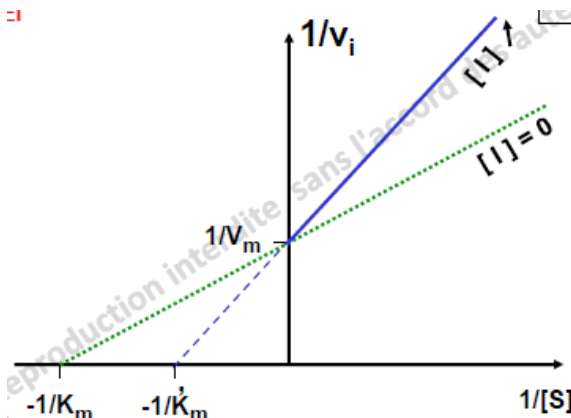
On peut donc observer : Complexes **ES** / Complexes **EI**



Courbe *verte* : enzyme seule
Courbe *bleue* : enzyme +
inhibiteur compétitif

- En présence d'inhibiteur, **Km augmente** → diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat.
- **Vm ne change pas** → elle est seulement atteinte pour une concentration de substrat plus importante.

→ C'est pour ça qu'on parle **d'inhibition réversible par ajout de substrat** !

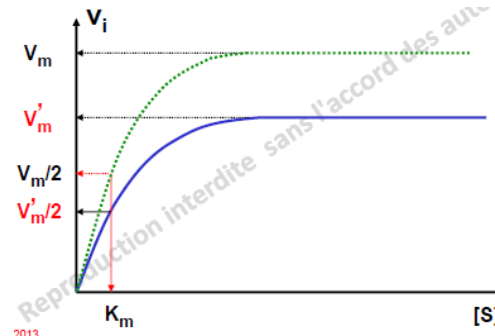


Ici pareil :

- **1/Vm ne change pas** → pas de modification de la vitesse maximale
- **1/Km diminue en valeur absolue** → Km augmente

► Inhibiteur non compétitif :

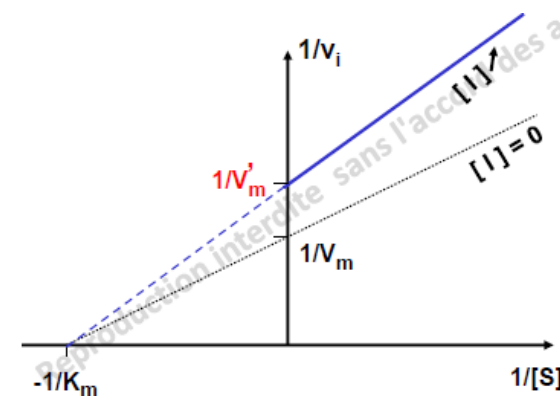
Fixation sur un **site différent** du site de fixation du substrat. La liaison de l'inhibiteur à l'enzyme entraîne une **modification de la structure du site actif** : le substrat ne peut plus être transformé en produit (cependant il peut toujours se fixer à l'enzyme !) → Formation de complexes **ES** / **EI** / **EIS**



Courbe *verte* : enzyme seule
Courbe *bleue* : enzyme + inhibiteur
non compétitif

- En présence d'inhibiteur : **Km n'est pas modifié**
- **Vm diminue** : on n'atteindra jamais la vitesse maximale que l'on a sans inhibiteur

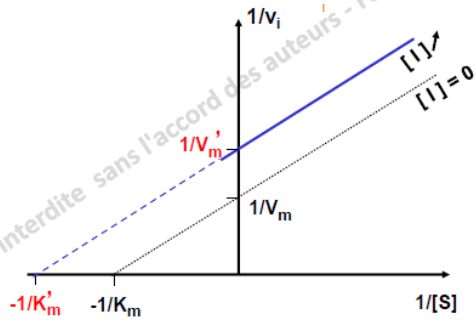
→ L'inhibition n'est **pas réversible par ajout de substrat** !



- **1/Km ne change pas**
- **1/Vm augmente** → Vm diminue

► **Inhibiteur incompétitif :**

Le site de fixation de l'inhibiteur est exprimé une fois seulement que le substrat est fixé à l'enzyme. On observe donc des complexes ES et EIS.



1/V_m augmente → **V_m diminue**

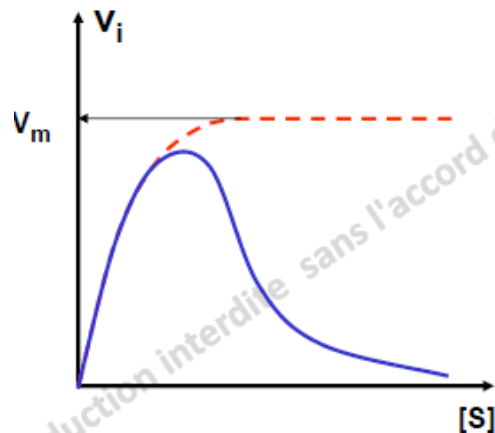
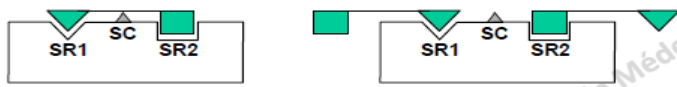
1/K_m augmente en valeur absolue
→ K_m diminue → **L'affinité de l'enzyme pour le substrat augmente**
car on stabilise le complexe EIS !

→ L'inhibition n'est **pas réversible par ajout de substrat** !

Pour toutes les inhibitions, les paramètres sont modifiés d'un facteur

$$1 + \frac{[I]}{K_i}$$

► **Inhibition par excès de substrat :**



A partir d'une certaine concentration de substrats, celui-ci ne se fixe plus correctement sur l'enzyme.

L'enzyme ne peut pas fonctionner à V_{max} !

PROTEOLYSE MENAGEE

Régulation **irréversible** de l'activité de l'enzyme.

L'enzyme se trouve d'abord sous forme de **zymogène** (proenzyme) = précurseur protéique permettant le transport ou le stockage de l'enzyme sous forme inactive.

Activation irréversible grâce au clivage protéolytique du zymogène → **processus post traductionnel** !

MODIFICATIONS COVALENTES

Processus **réversible** d'activation ou d'inhibition d'une enzyme cible impliquée dans la régulation d'une voie métabolique.

Modification post-traductionnelle.

- Enzyme responsable de la phosphorylation = protéine **kinase**
- Enzyme responsable de la déphosphorylation = protéine **phosphatase**

Ces protéines kinases et phosphatases sont activées en réponse à un **signal extracellulaire**.

(ex : *Fixation du glucagon sur son récepteur -> Activation de l'adénylate cyclase -> Augmentation de la concentration intra cellulaire d'AMPC -> Fixation de l'AMPC sur les sous unités régulatrices de la PKA -> libération des sous unités catalytiques de la PKA -> Phosphorylation des enzymes cibles*)

ENZYMES ALLOSTERIQUES

Voie métabolique :

La vitesse de formation du produit dépend de l'étape de la vitesse de la plus lente des réactions. Les composés intermédiaires ne doivent pas s'accumuler → Il faut réguler l'étape la plus lente : étape **en amont** de la voie (= *une des premières réactions*)

RETROINHIBITION

- Si le produit final est en **quantité insuffisante**, l'enzyme soumise à régulation est **activée**.
- Si le produit final est en **quantité suffisante**, l'enzyme soumise à régulation est **inhibée**.

ALLOSTERIE

Variation de la conformation de certaines protéines en réponse à la **fixation d'un substrat ou d'un effecteur** avec acquisition de propriétés particulières qui vont entraîner une **modification de l'activité** dans le cas d'une enzyme

Les enzymes allostériques : possèdent un **site régulateur** différent du site actif.

Ce sont des protéines complexes qui possèdent plusieurs sous unités organisées de façon à présenter un **axe de symétrie** par rapport à chaque **protomère** (*sous unité*).

Propriétés :

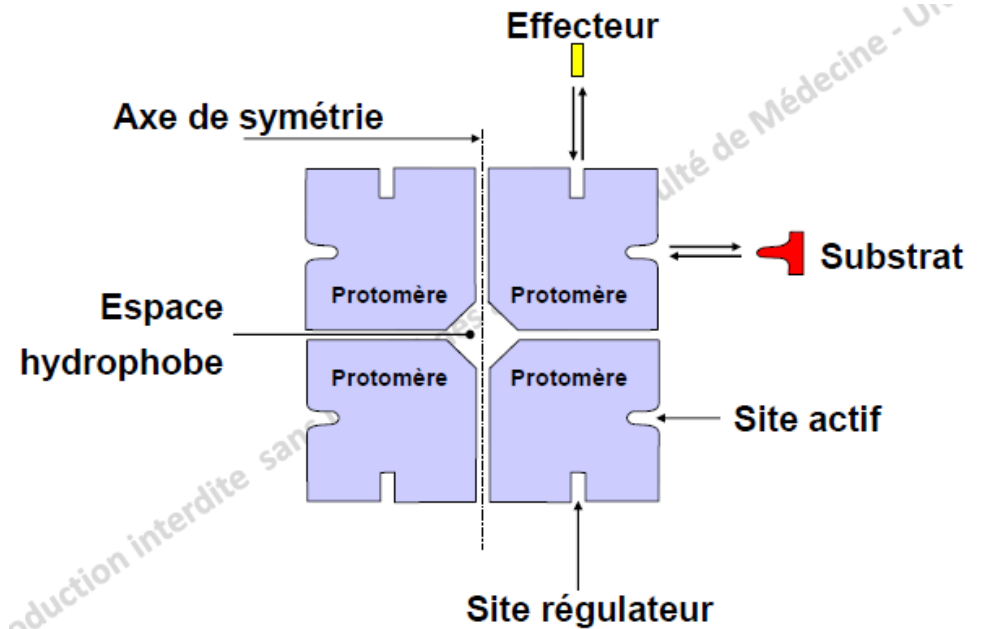
- Structure quaternaire
- La variation de conformation de la protéine dépend du taux d'occupation des sites de liaison
- Cinétique enzymatique non michaelienne

2 types :

- **Système K** = variation de l'affinité de l'enzyme pour le substrat
- **Système V** : Variation de la vitesse maximale

Pour chaque protomère :

- Un site actif
- Un site régulateur
- Liaison réversible, non covalente de l'effecteur



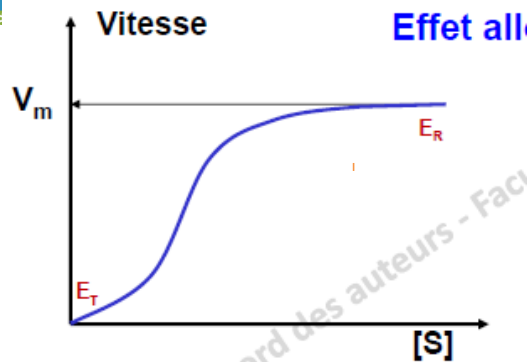
L'enzyme peut se trouver sous deux conformations :

- **Etat tendu E_T**
- **Etat relâché E_R**

EFFET ALLOSTERIQUE HOMOTROPE :

► L'effecteur est une **molécule de substrat**. Il se fixe sur une enzyme à l'état relâché : formation d'un **complexe $E_R S$** . Du coup la concentration en E_R diminue, ce qui favorise la **transition allostérique** d' E_T vers E_R .

Les effecteurs allostérique homotropes présentent toujours une **coopérativité positive** → Le substrat ne peut se fixer sur l'enzyme que si elle est à l'état relâché (*il ne peut donc pas stabiliser la forme tendue et favoriser la transition allostérique vers E_T*)



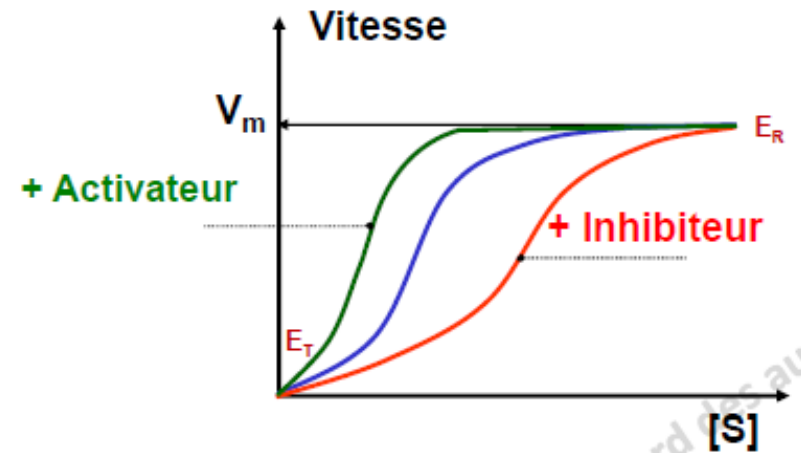
La courbe qui représente cet effet est **une sinusoïde** (due aux **effets coopératifs** entre les protomères : la transition allostérique de l'un favorise celle de ses voisins dans l'espace → La vitesse augmente plus rapidement à partir du moment où un certain nombre de protomères a fixé son effecteur → Retour à une vitesse de catalyse normale lorsque tous les protomères ont fini leur transition allostérique)

- La fixation du substrat sur l'un des protomères favorise la fixation des substrats sur les autres protomères.
- C'est la **coopérativité**: l'activité des autres protomères est augmentée suite à la fixation d'un substrat sur un protomère.

EFFET ALLOSTÉRIQUE HÉTÉROTROPE :

L'effecteur est une **molécule différente du substrat**.

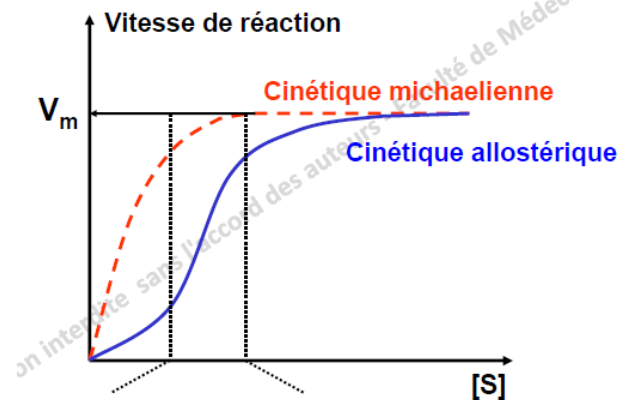
- **Effecteur positif (A)** : Il se fixe à la forme relâchée de l'enzyme (formation du complexe $E_R A$) → diminution de la concentration d' E_R → favorisation de la transition allostérique d' E_T vers E_R
- **Effecteur négatif (I)** : Il se fixe à la forme tendue de l'enzyme (formation du complexe $E_T I$) → diminution de la concentration d' E_T → favorisation de la transition allostérique d' E_R vers E_T .



En présence d'**activateur** : la transition allostérique des protomères est plus rapide → la courbe est décalée vers la gauche.
En présence d'**inhibiteur** : la transition allostérique des protomères est plus longue → la courbe est décalée vers la droite.

CINETIQUE

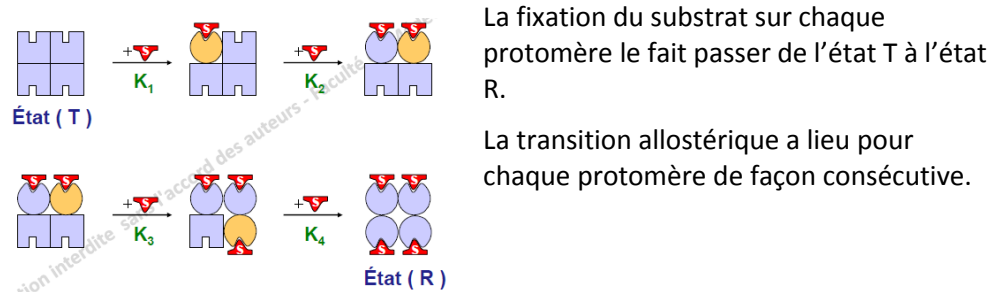
Chaque protomère de l'enzyme a une cinétique michaelienne. C'est l'association des protomères entre eux qui confère à l'enzyme une cinétique allostérique.



Désensibilisation de l'enzyme : perte de la coopérativité des protomères entre eux → cinétique michaelienne.

TRANSITION ALLOSTÉRIQUE

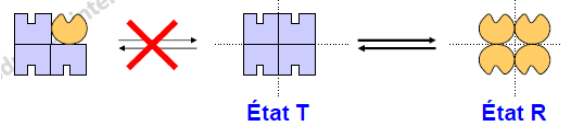
► **Hypothèse de Koshland :**



► **Modèle concerté :**

Les formes R et T de l'enzyme préexistent.

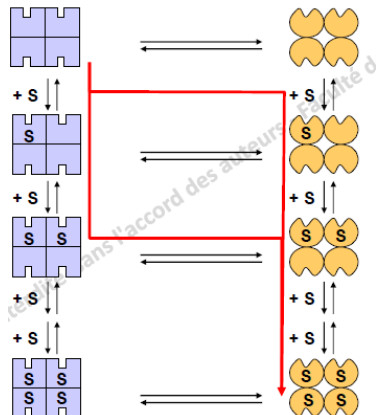
Chaque protomère a un site de fixation pour le substrat.



Les enzymes doivent toujours conserver l'axe de symétrie -> **Au cours de la transition allostérique, l'axe de symétrie est conservé !**

C'est l'ensemble des protomères qui subit la transition allostérique.

► **Hypothèse de Monod, Wyman et Changeux :**



HIERARCHIE DES CONTRÔLES

Niveau	Adaptation aux conditions	Temps nécessaire
[S] et [P]	intracellulaires	immédiat
Effecteurs allostériques	intracellulaires, intégration du métabolisme	immédiat ou très rapide
Contrôles covalents	extracellulaires (signaux hormonaux, nerveux, etc...)	rapide (selon le signal)
Contrôle de l'expression du gène	intra- et extracellulaires	lent