

# Enzymologie – Partie II

Beaucoup de blabla dans ce cours et de diapos donc n'ayez pas peur du nombre de pages ... encore... svp ☺  
Ce que je vous conseille c'est de peut-être le diviser en 2 pour qu'il vous semble moins long !

## I/ Cinétique enzymatique (Michaelis & Menten)

$[x]$  = concentration de x

Cette partie ne passez pas 2h à apprendre les formules ou les courbes, priorisez les 3 phases et les phrases importantes

Il existe plusieurs enzymatiques différents selon l'enzyme considérée  
(soit **Michaelienne** soit **Allostérique**)

Nous allons voir maintenant la cinétique des enzymes qui répondent aux lois de Michaelis et Menten  
(en définissant la notion de vitesse de réaction, vitesse initiale ( $V_i$ ), etc)

### A) Vitesse de réaction, vitesse initiale

Les enzymes Michaeliennes fonctionnent selon le modèle suivant :

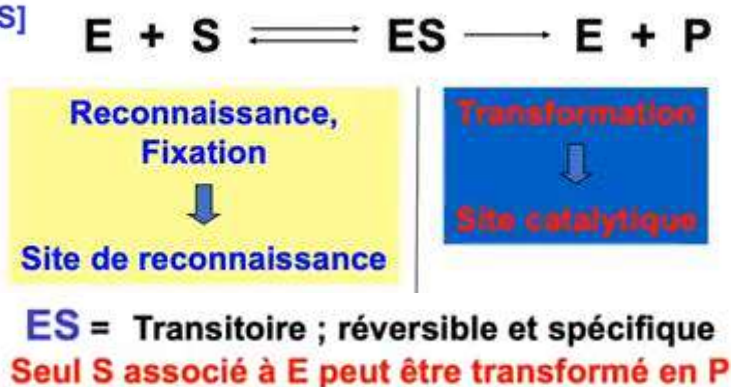
- Un **substrat** (S) s'associe avec une molécule **d'enzyme** (E) pour donner un intermédiaire : le **complexe enzyme-substrat** (ES).
- Ce complexe/intermédiaire se dissocie pour donner un **produit** (P) avec régénération de l'enzyme. *#EnzymeIntacte*
- Le **complexe ES** est un état **transitoire, réversible, spécifique**
- Seul le **substrat** S associé à **E** peut être transformé en **P**

#### Enzymes michaeliennes : Complexe [ES]

Chaque mécanisme se traduit par des caractéristiques cinétiques spécifiques c'est-à-dire 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.



MOOOOOOH



## B) Evolution des concentration de P, S, E au cours du temps <sup>++++</sup>:

cette partie c'est +++++

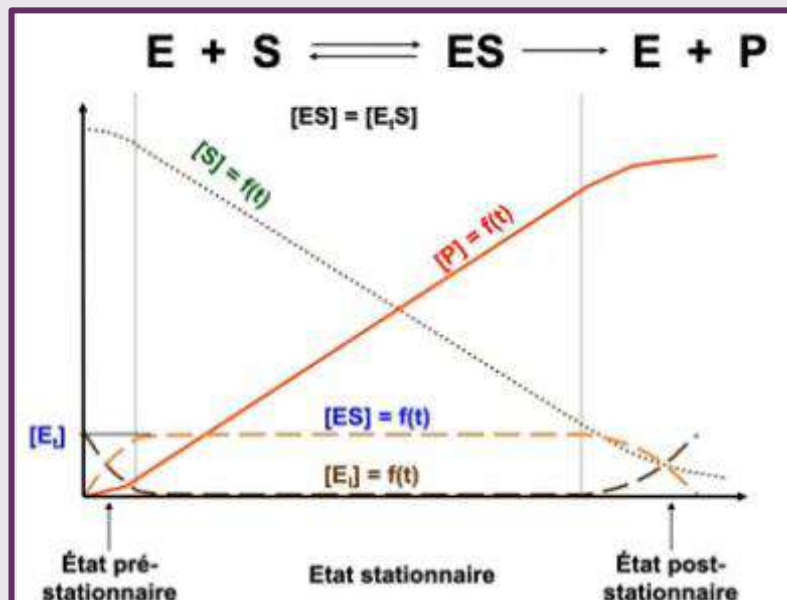
On considère la réaction de transformation d'un **substrat S** en **produit P** avec l'**enzyme E** et on étudie les variations de concentrations de P, S et E en fonction du temps.

On peut distinguer 3 phases :

1. **Pré-stationnaire**
2. **Stationnaire**
3. **Post-stationnaire**

(Rappel Bioénerg :

Etat stationnaire dans la réaction  $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow$   
 $[A]$  diminue,  $[C]$  augmente,  $[B]$  constante à ne pas confondre avec état d'équilibre où  $[A], [B], [C]$  constantes  $\neq$  égales !!!!!)



### 1. Evolution des concentrations de produit

Au début, au cours de la **phase pré-stationnaire** : [produit] augmente rapidement

A la phase **stationnaire** : [produit] atteint une constance (*constamment en augmentation je pense*)

A la phase **post-stationnaire** : [produit] tend à être constante

### 2. Evolution de la concentration de substrat

*qui subit une variation opposée au produit*

Au cours de la **phase pré-stationnaire** : [substrat] diminue rapidement

A la phase **stationnaire** : [substrat] reste constante (*constamment en diminution encore je pense*)

A la phase **post-stationnaire** : [substrat] atteint un plateau car tout le substrat a été épuisé et a été transformé en produit.

### 3. Variations de concentration en enzyme associée au substrat ES

A la phase **pré-stationnaire** : [complexe ES] augmente de manière très rapide

A la phase **stationnaire** : [ES] est constante et est égale à la concentration totale de l'enzyme puisque que toutes les enzymes se sont associées au substrat : toutes les enzymes sont dans un complexe ES.

A la phase **post-stationnaire** : [ES] diminue car il y a épuisement du substrat (*car totalement transformé*)

Remarque <sup>+++</sup> : la phase pré-stationnaire est une phase très courte qui dure que quelques millisecondes et qui correspond à la formation du complexe ES

## 4. Evolution de la concentration de l'enzyme libre (El) *càd l'enzyme non associée au substrat*

A l'état **pré-stationnaire** : [Enzyme Libre] diminue à cause de la formation du complexe ES

A l'état **stationnaire** : [Enzyme Libre] est quasiment nulle car toutes les enzymes sont associées avec le substrat dans le complexe ES.

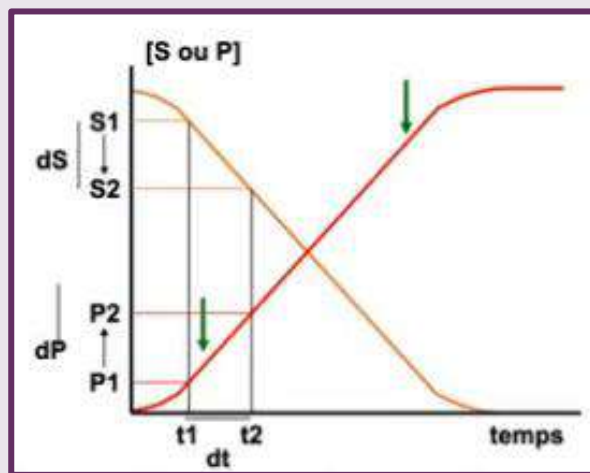
A l'état **post-stationnaire** : [Enzyme Libre] réaugmente car tout le substrat a été transformé.

Pour mesurer l'activité d'une réaction enzymatique n'ayant qu'un substrat et qu'un produit dans un milieu défini, on observe les concentrations de substrat ou de produit qui 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 un délai  $dt$  :  $S_1$  = [substrat] à  $t_1$  et  $P_1$  = [produit] à  $t_1$  puis  $S_2$  = [substrat] à  $t_2$  et  $P_2$  = [produit] à  $t_2$ .

La différence entre les concentrations de substrat ( $dS$ ) est l'opposée de la différence de concentration des produits ( $dP$ )



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

(d'où le signe - , parce qu'ils évoluent inversement au cours du temps :)

## C) Etude de la vitesse de réaction

On appelle la **vitesse de réaction** le rapport :

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

(en gros la vitesse de consommation du substrat ou de synthèse du produit)

\***La 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 :

- A  $t_0$ , 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.

- 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 → **[complexe ES] augmente.**

*Apprends-bien ça*

- 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.

Durant 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  $\frac{V_i}{V_{\text{totale}}}$  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.**

- Lorsque [produit] augmente, la réaction inverse commence à concurrencer celle qu'on mesurait. La vitesse de réaction ( $V_R$ ) diminue.
- Enfin dans une phase tardive, la vitesse de réaction inverse (càd de B à A) devient **égale** à la vitesse de réaction de départ (càd de A en B). Les concentrations ne changent plus et la réaction a atteint son **équilibre**.

⇒ Dans la suite de ce cours la vitesse étudiée sera toujours la vitesse initiale

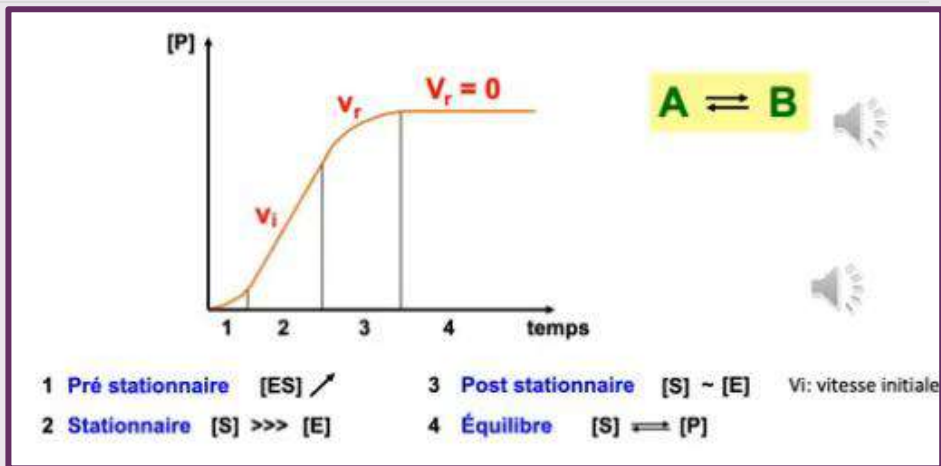
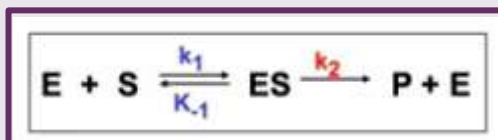
La modélisation mathématique de la cinétique de la réaction catalysée par une enzyme michaelienne se base sur 2 termes :

- o Les **concentrations** des différentes molécules ou complexes de molécules
- o Les **constantes d'association et de dissociation** ( $k_1, k_{-1}$  ou  $k_2$ ) de ces molécules entre elles

Ces différents paramètres se retrouvent dans l'équation de la réaction

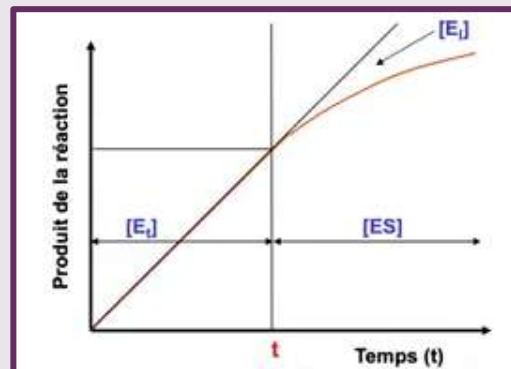


- $k_1$  comme constante d'association de E et de S
- $k_{-1}$  la constante dissociation de ES
- $k_2$  la constante de réaction de ES en E et P



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 : *#dérivationmathématique*

- On peut observer que la vitesse de réaction à l'instant  $t$  correspond à la dérivée de la courbe à l'instant  $t$ .  
*ok madame si vous voulez on est en méd pas en maths mais ok*  
Graphiquement cela revient à mesurer la pente de la tangente de la courbe à l'instant  $t$ . *#maths #okok*



- 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 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 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 ( $v_i$ ).

**$V_i$  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**

*Bref, beaucoup de blabla pour décrire la courbe et ce qui se passe mais c'est logique en vrai sinon go forum mes loulous*

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 :

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



## D) 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 + de complexe ES*

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** supérieure à  $[E]$
- une **absence** ou casi-absence de produit
- ➔ **Ce sont les conditions de Michaelis et Menten**

o La **première** condition est obtenue en choisissant des **quantités adaptées** d'enzyme et de substrat à introduire dans le milieu réactionnel.

o La **2nde**, en réalisant des **mesures suffisamment rapides** pour que la quantité de substrat transformée en produit soit faible donc négligeables.

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

- **La [produit] 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.

*Tant qu'on a peu de produit on va continuer à produire le complexe ES pour produire P*

- 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 :  $[\text{substrat total}] = [\text{substrat libre}]$

Équations de conservation :

$$[E_t] = [ES] + [E]$$

$$[S_t] = [\cancel{ES}] + [S]$$

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  $k_2$  (*Rappel : constante de réaction de ES en E et P*) et de la concentration du complexe ES (*ou  $E_{tot}$  vu que  $E_{tot} = ES$  parce que  $[S] \gg [E]$* ) :

$$V_i = k_2 [ES]$$

- [Complexe ES], [Enzyme libre] ou [Substrat libre] sont des valeurs qui ne sont pas fixées par l'expérimentateur et qui ne peuvent être mesurées.
- [Enzyme total] ou [Substrat total] sont eux 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 :
  - o Soit qui correspond aux conditions définies par l'expérimentateur
  - o 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 ( $V_i = \text{la vitesse de réaction durant la phase stationnaire c\`ad quand il y a le + de complexe ES}$ ) 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  $[ES] = [\text{Enzyme totale}]$  c\`ad lorsque tous les sites actifs sont saturés : la vitesse de réaction ne peut être + supérieure pour cette concentration en enzyme, à ce moment-là  $V_i = V_{max}$

$$V_i = k_2 [ES]$$

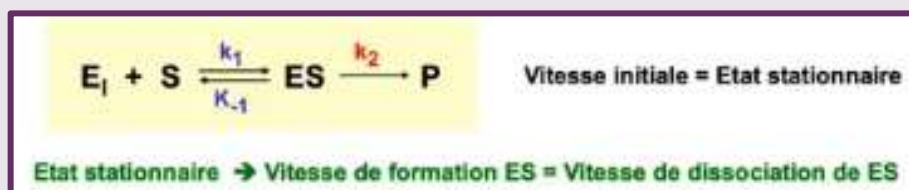
Si  $[S] \gg [E]$  :

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

**$V_{max}$  : vitesse maximale de catalyse** pour une concentration donnée en enzyme, **elle est obtenue à saturation complète de l'enzyme**, c\`ad 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

## E) 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<sup>\*\*\*\*\*</sup>
- ❖ Il n'y a qu'une **seule** réaction : celle 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 (*je comprends pas je pense qu'elle voulait dire dissociation de ES en P*)

Il y a 2 réactions qui vont diminuer la concentration du complexe ES :

1. La dissociation dont la vitesse dépend de la concentration de ES et de  $k_{-1}$
2. La transformation enzymatique proprement dite dépendant de la concentration du complexe ES et de la valeur de  $k_2$  (*Rappel :  $k_2 = \text{constante de transformation}$* )





**\*Vmax** ou **Vitesse maximale de réaction** : Vitesse obtenue **lorsque tous les SA** de l'enzyme sont **saturés par le substrat** et donc Vm dépend de la concentration en enzyme totale.\*\*\*\*\* \*

Si on effectue *encore* des transformations mathématiques, on arrive à l'expression qu'on appelle **l'équation de Michaëlis et Menten** qui permet de **calculer la Vi** en fonction de la concentration de substrat et de 2 constantes caractéristiques d'une réaction enzymatique : la Vm et la constante de Michaëlis et Menten (Km).

Rappel : 
$$Vi = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E] [S]}{K_m + [S]}$$
 Or 
$$Vm = k_2 [E]$$
 DONC 
$$Vi = \frac{Vm [S]}{K_m + [S]}$$

**Équation de Michaelis et Menten**

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

la Vi est nulle si la concentration de substrat est nulle et que lorsque [S] tend vers l'infini ,

le terme :  $\frac{[S]}{K_m + [S]}$  tend vers 1.

*(pourquoi 1 ? c'est une histoire de limite #Maths, je vous le mets là JUSTE pour votre compréhension pour que ça soit + logik = pas à apprendre !  $\frac{[S]}{K_m + [S]} = \frac{[S] \times 1}{[S] \times (\frac{K_m}{[S]} + 1)} = \frac{1}{\frac{K_m}{[S]} + 1}$  or Km est un nombre négligeable devant [S] qui tend vers l'infini donc la limite de  $\frac{K_m}{[S]}$  lorsque [S] tend vers l'infini est de 0 #RègleDeMaths #MinhNhatEstGéniale #Faites-luiSavoir donc on se retrouve avec  $\frac{1}{1+0} = \frac{1}{1} = 1$ )*

*Bref* Tout cela entraîne le fait que la vitesse initiale tend vers la Vm (*parce que  $1 \times Vm = Vm$*

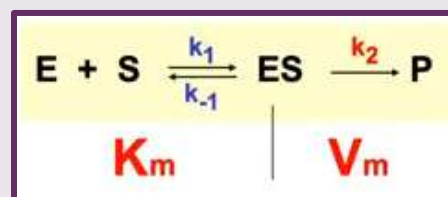
*#LesMathsCTroCompliqué*) et enfin que lorsque Km = [S], **la Vi devient égale à la moitié de la Vm.**

→ Si Km = [S] alors 
$$Vi = \frac{Vm \times [S]}{[S] + [S]} = \frac{Vm \times [S]}{2 \times [S]} = \frac{Vm}{2}$$

**\*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 \*\*\*\*\* \*



**\*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 saturés 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. \*\*\*\*\* \*

*Courage je sais que cette partie est assez dense avec plein de formules et tout, moi j'ai réussi à apprendre les formules qu'elle répétait beaucoup du style Km, Vi, Vm parce qu'on sait jamais et les définitions ++++++ Dernière courbe puis on passe à une partie + intéressante ET QUI TOMBE*

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

$f(1/v[S])$

(secret entre nous, je crois que la prof s'est gourrée et a skip une partie de son cours mais chuuuut on va rien dire, ça fait moins de travail pour nous, je vous mets la diapo qu'elle a next comme déco →)

On peut représenter dans un graphique linéaire les inverses des variables de l'hyperbole précédente (l'hyperbole qu'elle a oublié d'enregistrer 😊).

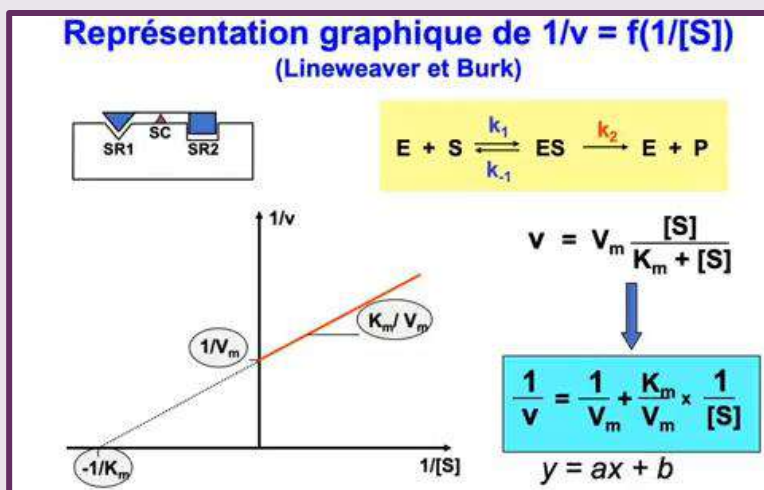
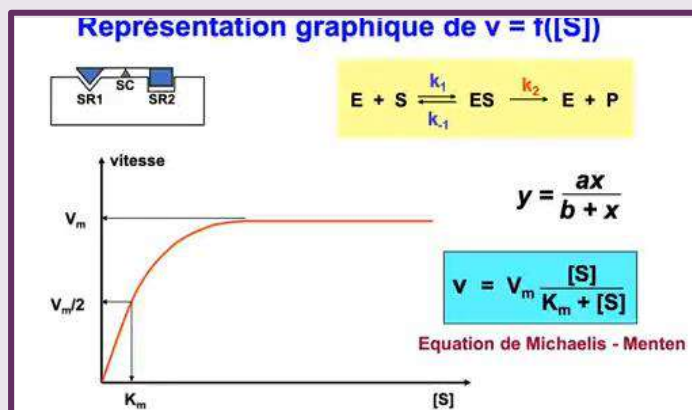
A savoir l'inverse de la vitesse de réaction ( $1/v$ ) en fonction de l'inverse de la concentration de substrat  $1/[S]$ .

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.

*bref tout est à l'inverse*

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.



## G) Influence de la concentration d'enzyme

Si on réalise plusieurs expériences en utilisant des concentrations croissantes d'enzyme.

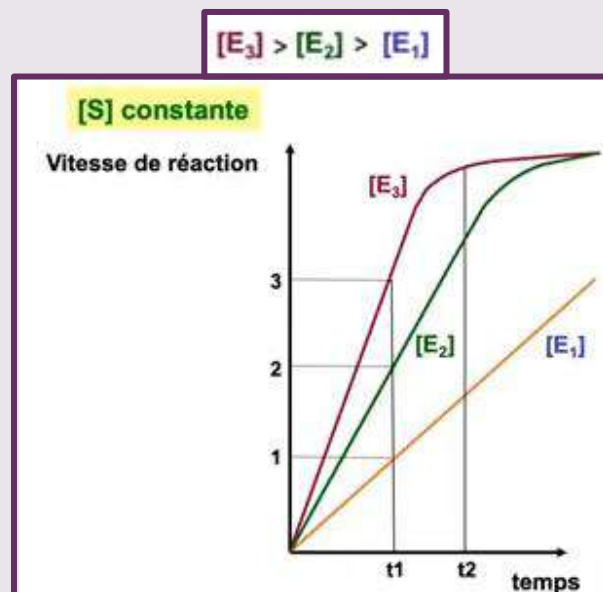
On se rend compte qu'au bout d'un moment, à  $t_1$  il y a d'autant plus de substrat transformé en produit qu'il y a d'avantage d'enzyme présente #logik.

**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.

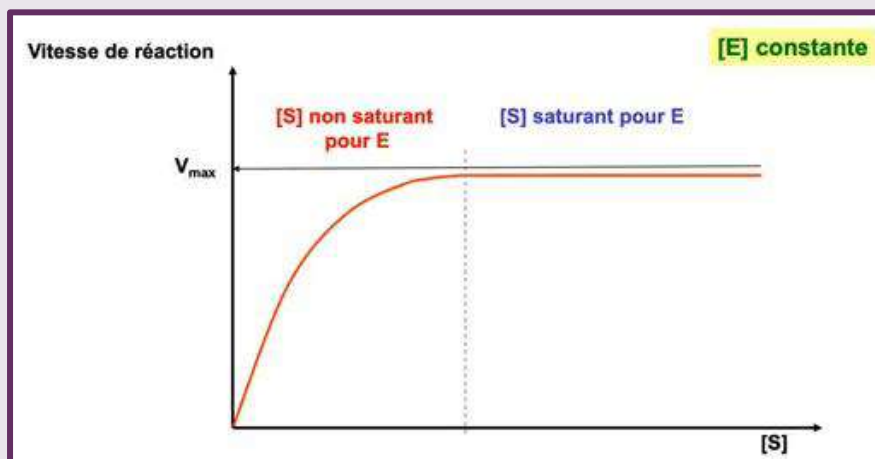


## H) Influence de la concentration de substrat

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

o On remarque d'abord une **augmentation rapide** de la vitesse de réaction

o 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.

*Finito pipo toute la partie courbe et blabla ! le vrai cours intéressant vient ! Checkpoint 1/3 du cours fait !*

## I) Expression de l'activité enzymatique

Elle peut prendre plusieurs unités dont :

1. L'unité internationale = U.I (+ utilisée)
2. Le Katal
3. L'Activité Molaire Spécifique = A.M.S
4. L'Activité Spécifique = A.S



### Expression de l'activité enzymatique

<b>U.I. :</b>	Correspond à la quantité d'enzyme capable de transformer <b>1 µmole de substrat par minute</b> , dans les conditions standards de l'expérimentation
<b>Katal :</b>	Correspond à la quantité d'enzyme capable de transformer <b>1 mole de substrat par seconde</b> , dans les conditions standards de l'expérimentation
<b>A.M.S. :</b>	activité molaire spécifique ; Correspond au nombre de <b>moles de substrat</b> transformées par <b>mole d'enzyme et par seconde</b>
<b>A.S. :</b>	activité spécifique ; Correspond au rapport de l' <b>activité enzymatique</b> , en U.I. ou katal, par la <b>quantité totale de protéine (en mg)</b> dans le milieu réactionnel

*TKT petit P1, ça vient ça vient*

*Mnémono ? U.I ou Katal ?*

*Katal ~ Qatar : ils voient les choses en grand : des MOLE par seconde*

*Jamais 2 m ensemble :  
µmole avec Minute  
Mole avec seconde*

TransaMinhNhase

## Conclusion finale sur cette partie & *Rappel* <sup>+++</sup>

- 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 ( ??? je vais lui demander si c'est une erreur) et on suppose qu'on est dans un état **stationnaire** : état où **la concentration de complexe (ES) est constante**.
- **Km ou constante de Michaelis** = concentration du substrat permettant une vitesse initiale de la réaction enzymatique égale à la moitié de la vitesse maximale.
- **Vm = Vitesse maximale** = Vi théorique d'une réaction enzymatique obtenue quand toutes les molécules d'enzyme 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 :

### D'abord les processus physico-chimiques

L'activité d'une enzyme dépend de :

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

## A) Notion d'isoenzymes et macroenzymes

### 1. Les Isoenzymes

Les isoenzymes représentent :

- Des **formes différentes d'une MEME enzyme** (*iso=même*)
- Qui **catalysent la MEME réaction**
- Et sont issus de gènes différents<sup>+++</sup>, expression tissu-spécifique différente
- Possèdent des propriétés chimiques et physiques différentes : mobilité électrophorétique, composition en Aa, propriétés cinétiques...

*DONC : Même enzyme mais différente forme, différent gène et différentes propriétés chimiques et physiques*

**EXEMPLE** d'isoenzyme : la LDH (lactate déshydrogénase)

La LDH est tétramétrique = 4 sous-unités : Soit de type **H** (Heart) soit de type **M** (Muscle).

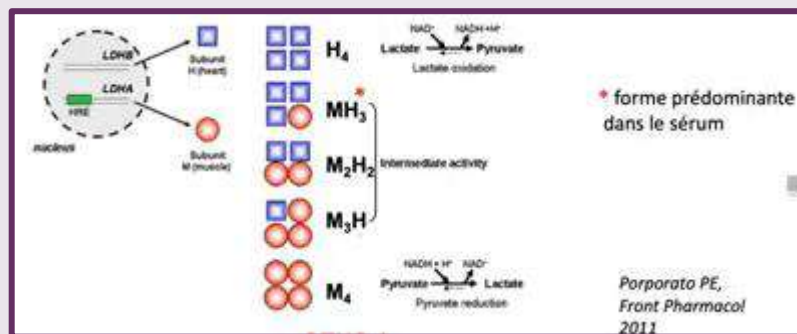


En fonction du type d'assemblage, il y a 5 différents isotypes de LDH.

o La LDH de type **M4** = a 4 sous-unités M est caractéristique du **foie**

o La LDH de type **H4** = a 4 sous-unités H est caractéristique du **cœur**

o Intermédiaires de différentes quantités de H et de M par exemple dans le muscle



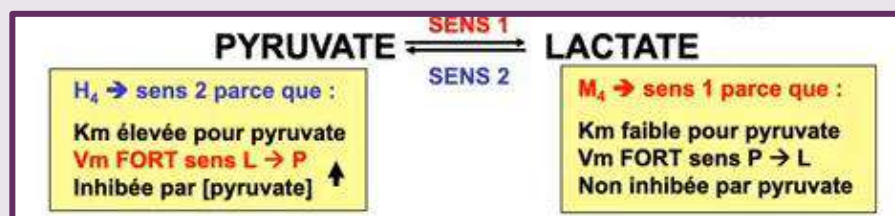
Sur le plan fonctionnel, les différentes isoenzymes de la LDH diffèrent pour leur affinité pour le lactate ou le pyruvate, en effet la synthèse relative de ces chaînes est plus ou moins importante selon les organes.

- La molécule **LDH M4** est abondante dans le **muscle**
  - ➔ Elle va avoir une **forte affinité** pour le **pyruvate** (son  $K_m$  est faible pour le pyruvate *#Rappel*), elle est donc très efficace **pour** la fermentation lactique.
  - ➔ On dit que la **Vm** est **forte** dans le **sens pyruvate → lactate**.
  - ➔ Pas d'inhibition

*(l'enzyme LDH M4 a une forte affinité pour le pyruvate donc ils vont se lier facilement pour donner du lactate)*

- La molécule **LDH H4** est abondante dans le **cœur**
  - ➔ Elle a une **forte affinité** pour le **lactate** (son  $K_m$  est faible pour le lactate *#Rappel*).
  - ➔ On dit que la **Vm** est **forte** dans le **sens lactate → pyruvate**.
  - ➔ De plus, **H4 est inhibé** par des concentrations élevées en pyruvate.

*(l'enzyme LDH H4 a une forte affinité pour le lactate donc ils vont se lier facilement pour donner du pyruvate)*



*Comment retenir qui aime qui ?*

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

*(Rappel GL : La fermentation lactique se fait qu'en ANAÉROBIE donc c'est normal que le cœur (organe bien oxygéné) a une Vm forte pour le sens lactate → pyruvate DONC il a une forte affinité pour le lactate)*

## 2. Les Macroenzymes

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

Conséquences pour les enzymes :

- Ralentissement de leur clairance (élimination *parce-qu'ils sont gros pelos*)
- élévation artéfactuelle de l'activité enzymatique correspondante

*(ils occupent une plus gros volume donc logiquement + d'enzymes → EH BAH NOOON)*



### Deux types de macroenzymes:

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

Liaison avec une immunoglobuline (Ig) de type IgG, plus rarement IgA ou IgM

Elles n'ont en générale aucune signification pathologique, parfois associées à des pathologies auto-immunes

**Type 2 :** (creatine kinase, gamma-glutamyltransferase,...)

Association avec une autre macromolécule:

autopolymérisation, médicament, lipoprotéines

A l'exception des médicaments, elles signalent le plus souvent l'existence d'une pathologie hépatobiliaire

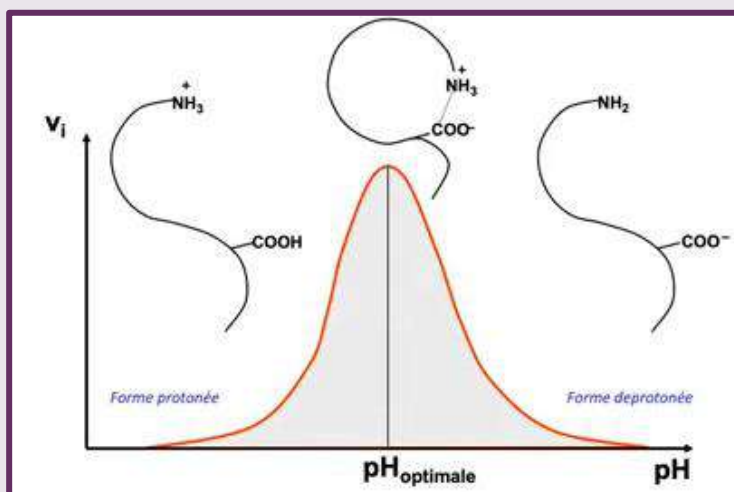
## B) Influence du pH et de la température sur l'activité enzymatique (processus physico-chimique)

### 1. 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 qui composent l'enzyme.

- **A pH très acide** (inf.7) : La plupart des fonctions ionisables de ces radicaux sont sous la forme protonée cad COOH pour la fonction acide carboxylique et NH<sub>3</sub><sup>+</sup> pour la fonction amine  
(cf pharmacologie)
- **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** (sup.7) : Les fonctions ionisables de ses radicaux sont sous forme déprotonée COO<sup>-</sup> pour acide carboxylique et NH<sub>2</sub> pour la fonction amine.

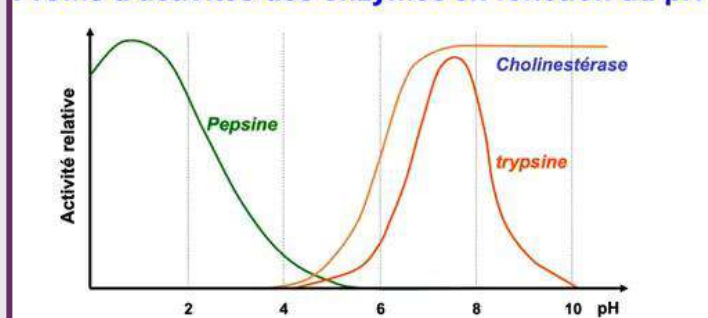
Il existe donc un pH du milieu réactionnel où les charges électriques du radicaux du SA de l'enzyme seront plus favorables à la liaison E-S → **C'est le pH optimal** de la réaction enzymatique en question.

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.

#### Profils d'activités des enzymes en fonction du pH



fonction du pH jusqu'à atteindre un maximum d'activité autour d'un pH de 7.

❖ 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

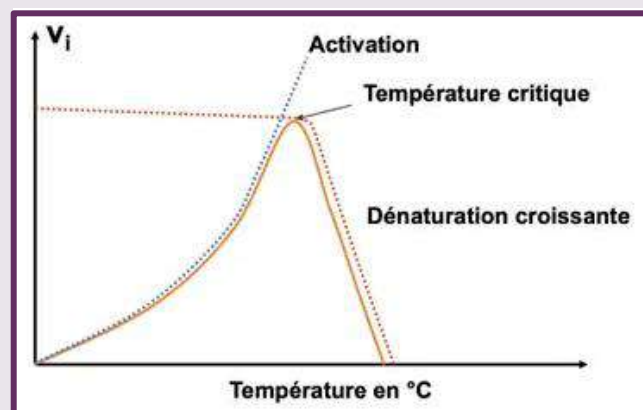
## 2. Influence de la température (facteur physique)

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 :

1. Une courbe **d'activation**
2. 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.

## C) 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.**

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

alors là les gars il y aura mais alors beaucoup trop de blabla mais le plus important est d'apprendre le tableau de synthèse et de comprendre comment les inhibiteurs marchent

## ❖ Les inhibiteurs compétitifs

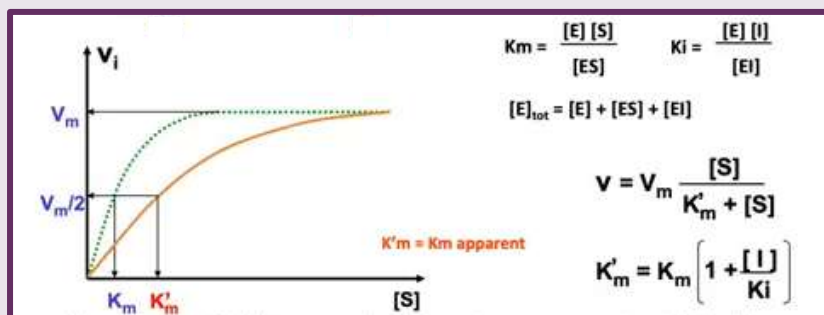
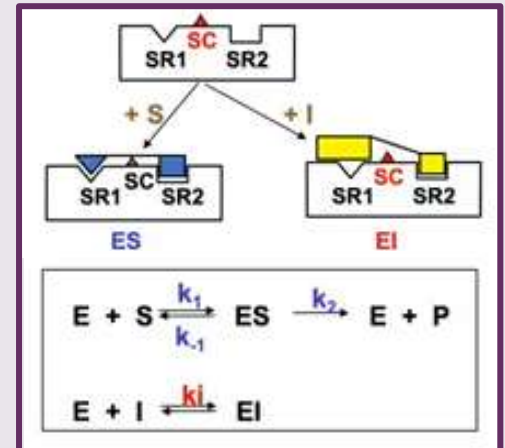
Lorsque la liaison d'un Inhibiteur sur l'enzyme a pour effet **d'empêcher la liaison Enzyme-Substrat**, on parle de l'inhibition compétitive vis-à-vis du substrat.

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.

Dans l'équation de la conservation de l'enzyme, il apparaît une autre forme de l'enzyme c'est 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 c'est-à-dire de l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur.

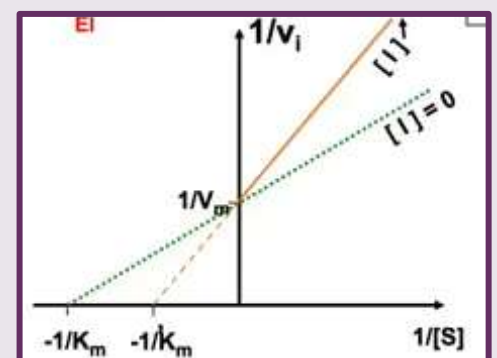
Le graphique en double inverse montre :

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

L'inverse de la **vitesse 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.

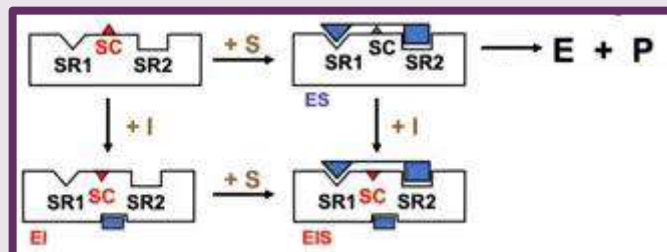
On peut en revanche observer une **variation** de la valeur de la **Km**.



## ❖ Les inhibiteurs non compétitifs

Lorsque la liaison de l'inhibiteur sur 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 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 (+ 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.

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.

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

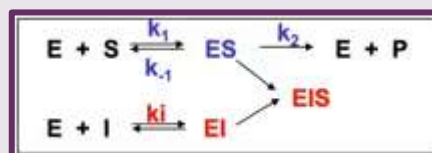
$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

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

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

Dans l'équation de la conversion de l'enzyme, il apparaît deux autres formes d'enzymes (en plus d'enzyme-substrat) :

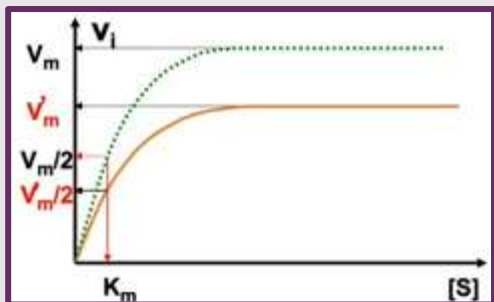
1. le complexe Enzyme-Inhibiteur
2. le complexe Enzyme-Inhibiteur-Substrat



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  **$V_m$**  est **affectée d'un coefficient** (la  $V_m$  change !) qui dépend de la concentration de l'inhibiteur et de l'inverse de la constante  $K_i$  (càd de l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur)

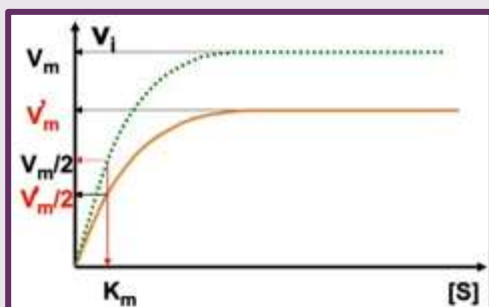
La constante  **$K_m$** , au contraire, **reste la même** que dans le cas général.



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.



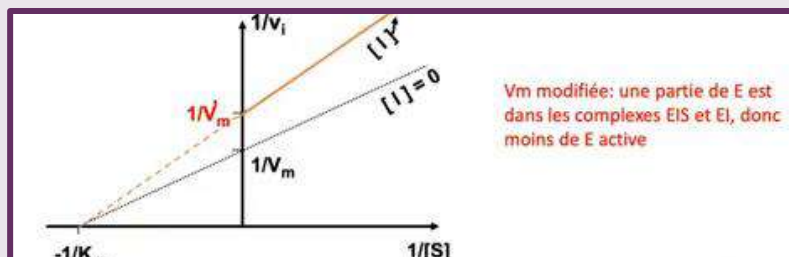


On observe que la **vitesse maximale change** en fonction de la concentration d'inhibiteur puisque la concentration de l'enzyme diminue à cause des molécules d'enzymes liées à l'inhibiteur l'inactivant, même à concentration infinie de substrat.

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 :

- 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  $V_m$  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 qui est 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 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  $-1/K_m$  ce qui permet une détermination graphique facile de cette constante.

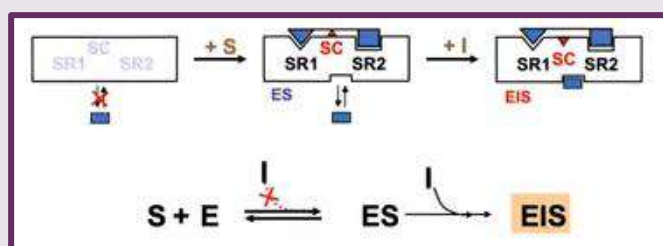
La rencontre de ces droites en ce point de l'axe des X est caractéristique des graphiques en double inverse en présence d'un inhibiteur non compétitif.

*Bon, j'avoue, les 3 derniers paragraphes, c'est roue libre, je suis désolée.. ON NEXT si question je la pose à la prof -> fofo*

## ❖ 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.

➔ Formation du complexe Enzyme-Inhibiteur-Substrat **inactif**.



**La présence d'un inhibiteur in(un)compétitifs va modifier la  $K_m$  et la  $V_m$**

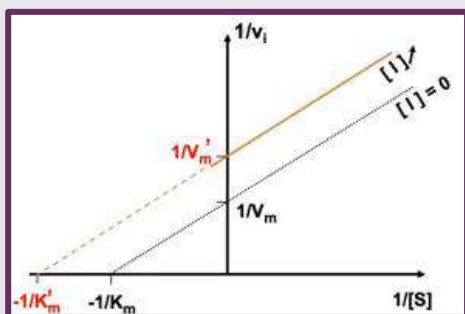
**$K_m$  diminue** : on favorise la formation du complexe ES pour former le complexe EIS. Dans ces conditions pour un même degré de saturation de l'enzyme, il faut une concentration plus faible en substrat.

La vitesse maximale ( **$V_m$** ) **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.

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





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  $K_m$** .

*Minh Nhat je suis au bout de ma vie, j'ai rien compris, en plus cette partie elle tombe souvent, je suis nulle en Maths, les dérivations j'ai jamais rien compris de ça, je vais pas avoir ma P1.*

*STOP Arrête de t'apitoyer sur ton sort et apprends moi ce tableau récapitulatif qui te sauvera le QCM d'enzymo :*

Moment apprentissage de MN :

Tu retiens

- Compé
- Non Compé
- In(un)Compé (l'ordre du cours)

Tu retiens :  $V_m$ ,  $K_m$  dans cet ordre  
Et tu te rends compte que c'est hyper visuel.

Je visualisais ce bonhomme :

non je ne suis pas folle



## Les différents types d'inhibition enzymatique

	$V_m$	$K_m$	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  $\left\{ \begin{array}{l} [I] \uparrow \\ K_i \downarrow \end{array} \right.$

\*Levée = Levée de l'inhibition par ajout en excès du substrat

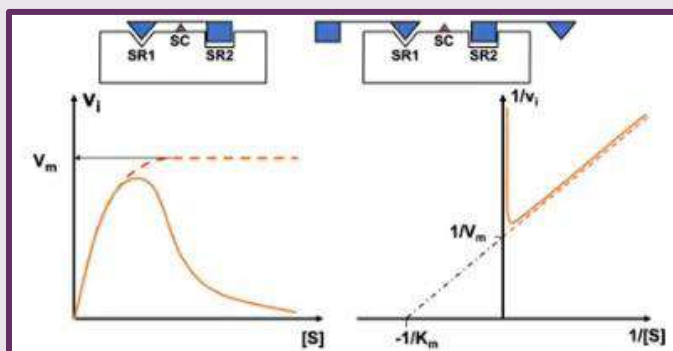
Logik, dans le compétiteur, si on ajoute + de substrat, on a plus de chance que le substrat se lie au SA que l'inhibiteur

## ❖ 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 (*le SA quoi*) 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.

## 2. 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.

**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

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

## 3. Modifications REVERSIBLES par modification covalente

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

- ✓ Covalentes, réversibles
- ✓ Qui peuvent soit activer ou inhiber l'activité enzymatique en modifiant la valeur de la  $K_m$
- ✓ 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. *STY #Rappel*
- ✓ C'est une modification post-traductionnelle de l'enzyme cible.
- ✓ La réaction de phosphorylation est catalysée par une protéine kinase *#Rappel*
- ✓ La réaction de déphosphorylation est réalisée par une protéine phosphatase *#Rappel*
- ✓ 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

#### *LA PKA*

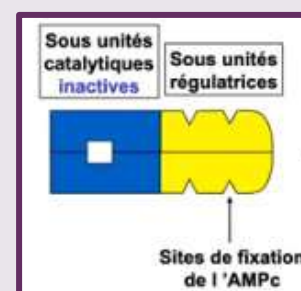
#### *#RappelDeLaRégulation*

Parmi les protéines kinases à régulation covalente, on peut citer la **Protéine Kinase AMPc dépendante (PKA)**

La PKA est constituée de 4 sous-unités :

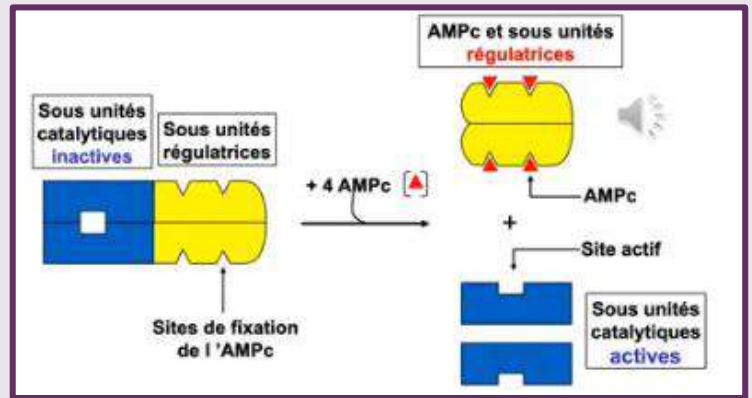
2 sous-unités **catalytiques** + 2 sous-unités **régulatrices**.

À l'état basal, 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 **catalytiques** ; **catalytiques** qui deviennent **actives** pour aller phosphoryler d'autres enzymes impliquées dans les voies métaboliques.

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 **#Biocell**



- ✓ Ce messager primaire (hormone) 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....

*Mais on est bien d'accord qu'une déphosphorylation peut activer une enzyme.*

*Exemple : la glycogène synthase qui se fait déphosphoryler par la PP1 mais qui devient active !*

En fin de cascade, l'enzyme impliquée dans la régulation de la voie métabolique est à son tour phosphorylée en relation avec le messager 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.

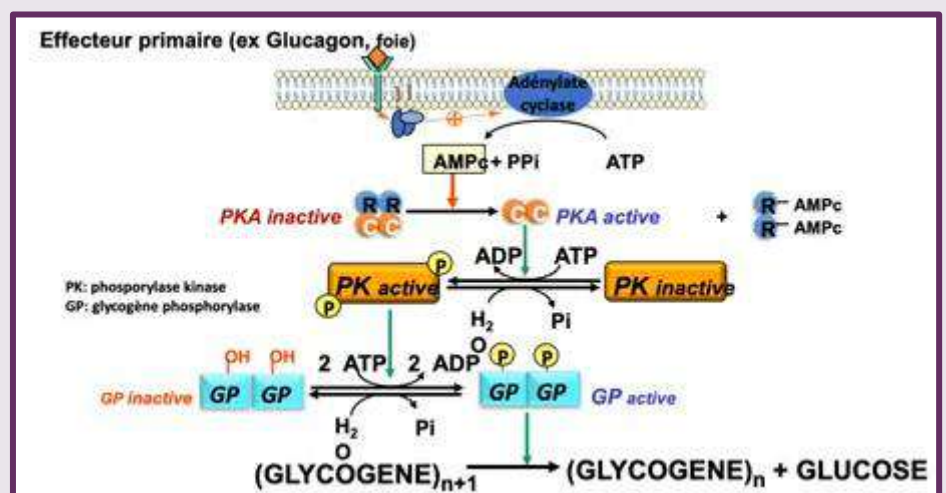
## LE GLUCAGON

**#Rappel**

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 **GLYCOGENE PHOSPHORYLASE** entraînant la dégradation du glycogène et la libération de glucose.

*Glucagon → Adénylate cyclase → AMPc → PKA → Phosphorylase kinase → Glycogène phosphorylase*



Pourquoi la prof s'attarde sur ces 2 exemples ? Idk man...

D'ailleurs dédicace à Noémie qui m'a reconnue vers Valrose, non tu ne m'as fait pas peur 😊 ça m'a fait plaisir

## Conclusion /Récacap

Plusieurs processus contrôlent l'activité d'une enzyme :

- Processus physico chimiques :
  - o Sa concentration
  - o Sa localisation (tissulaire, cellulaire, intra/extracellulaire)
  - o 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
  - o Protéolyse ménagée (irréversible)
  - o Modifications covalentes (réversibles, ex : phosphorylation)

Plusieurs modes de contrôle peuvent être associés. +++

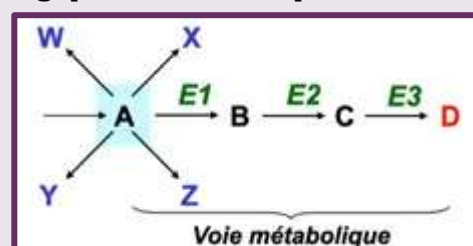
## III/ Les enzymes allostériques+++

### 1. Définitions

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

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

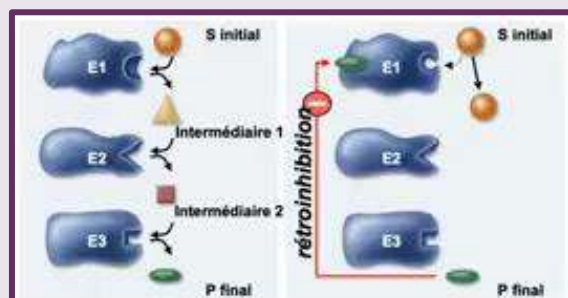
Chacune de ces voies de synthèse va s'effectuer en plusieurs étapes constituant ainsi les voies métaboliques. D'ailleurs, chaque étape est catalysée par une enzyme spécifique (E1, E2, E3)



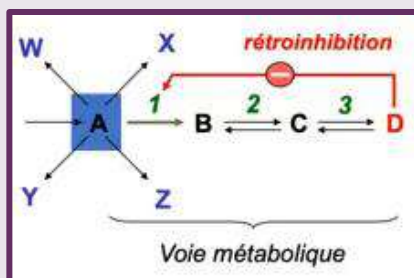
La vitesse de formation du dernier produit de la voie (D) dépend de la vitesse la plus lente des réactions.

- Si le produit final est en quantité **insuffisante**, il faut que l'enzyme 1 soit activée.
- Si au contraire le produit final est en quantité **suffisante**, l'enzyme 1 sera inhibée.

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







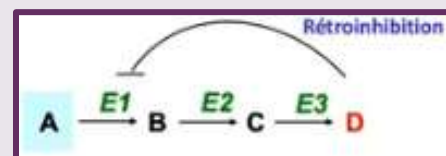
L'enzyme E1 catalysant la transformation de A en B, 1<sup>ère</sup> étape de la synthèse est celle qui doit être régulée par des effecteurs permettant de réguler la vitesse de l'ensemble.

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 1<sup>ère</sup> étape : constituant la **rétro-inhibition**.

### a) 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 1<sup>ère</sup> des enzymes de la voie, elle catalyse l'étape d'engagement

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.

### b) Enzymes allostériques

Les ENZYMES ALLOSTERIQUES fonctionnent grâce à la présence :

- D'un site **Actif** 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 :

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

### c) Allostérie (du grec : « allos » = autre / 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**.

Concept valable uniquement si la protéine est sous forme **oligomérique** (*on va le développer après*)

**L'allostérie** concerne des protéines douées d'activité :

- |                               |                          |
|-------------------------------|--------------------------|
| ❖ Enzymes                     | ❖ Récepteurs             |
| ❖ Transporteurs (hémoglobine) | ❖ Protéines contractiles |
| ❖ Canaux/pompes               | ❖ Etc...                 |



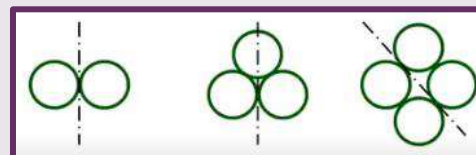
## 2. Caractéristiques structurales

### a) Les ENZYMES allostériques

Les ENZYMES ALLOSTERIQUES 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

La protéine est donc un oligomère de 2 ou 4 sous-unités.



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

C'est le cas de deux protomères d'une paire ou de 4 protomères placés aux 4 sommets d'un tétraèdre.

### b) Les PROTEINES allostériques

Les protéines allostériques exercent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme

Elles ont une structure **QUATERNAIRE** et une cinétique **ALLOSTERIQUE**

(donc pas de cinétique enzymatique Michaelienne *on le détaille après*)

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

## 3. Caractéristiques cinétiques

### a) 2 types d'enzymes allostériques

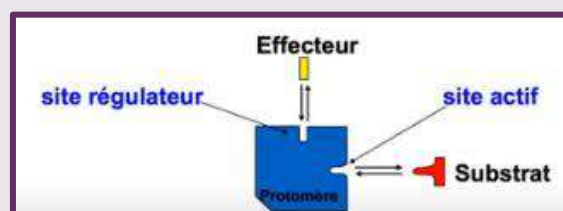
Les enzymes du système **K**

⇒ La régulation se traduit par une **variation de l'affinité** ( $K_m$ ) du substrat pour l'enzyme

Les enzymes du système **V**

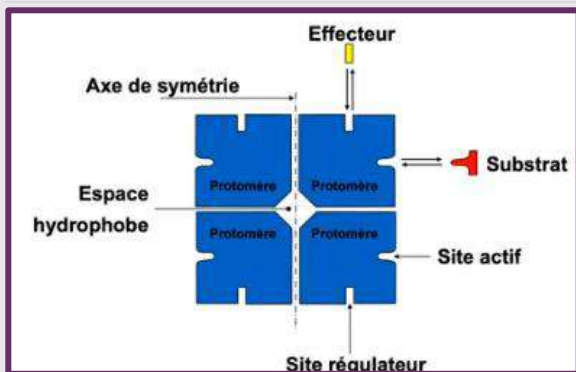
⇒ La régulation se traduit par une **variation de la  $V_m$**

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 car chaque protomère a des liaisons avec les autres protomères du système (liaison le plus souvent de type électrostatiques).<sup>++</sup> Sa structure secondaire et tertiaire ainsi que son énergie interne sont modifiées par ce type de liaison (entre les protomères).<sup>++</sup>



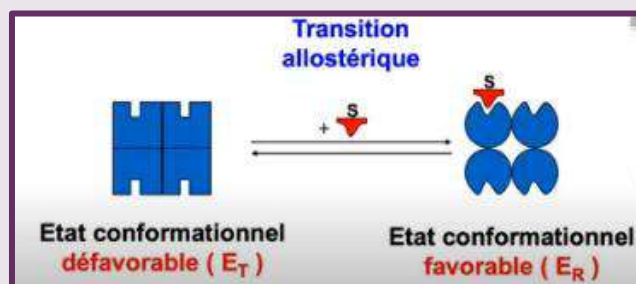
⇒ Donc le changement de conformation qui a lieu sur un protomère vont se répercuter sur les autres protomères de l'enzyme.<sup>++</sup>

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.

## b) Les états des protomères

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

- o Etat tendu ou contraint : T *(inactif car le coco est Tendu 😞)*
- o État relâché : R *(actif car il est Reaaaaadyyyyy)*
- Augmentation de l'énergie interne d'un protomère par la modification des liaisons avec un modulateur → Passage à un état Tendu
- Diminution de l'énergie interne d'un protomère par la modification des liaisons avec un modulateur → Passage à un état Relâché



L'état du protomère modifie :

- Les Affinités des sites de fixation du protomère aux ligands
- La Vmax

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** *(en fait t'as 2 molécules de substrat : un qui se lie au SA et l'autre au SR)*
- Une molécule **différente du substrat**, on parle d'effet allostérique **hétérotrope**

*Miaou, c'est bientôt la fin*



# 1. Effet allostérique HOMOtrophe

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

Lorsque le substrat agit comme **effecteur allostérique homotrope**, il se fixe de préférence sur la forme R.

→ Le complexe enzymeR-substrat va donc augmenter

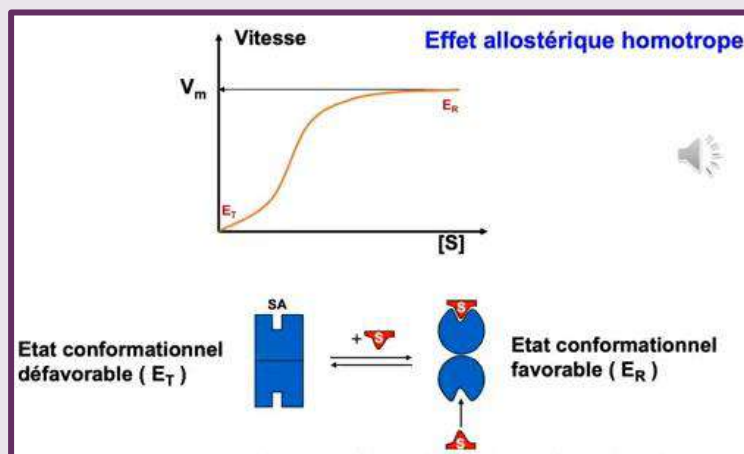
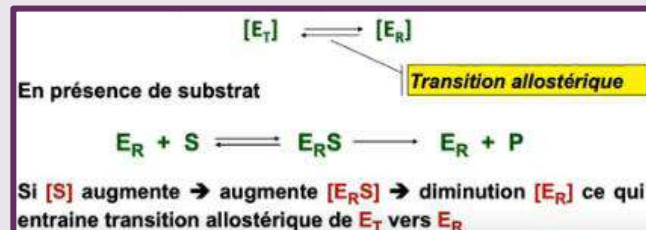
→ La concentration de l'enzyme **libre** dans la forme R va donc diminuer (*normal + d'enzymeR-Substrat*)

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.

*(T se transforme en R pour compenser les R qui ont été liés au substrat : l'enzyme est + Readyyyy)*

→ 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**.



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

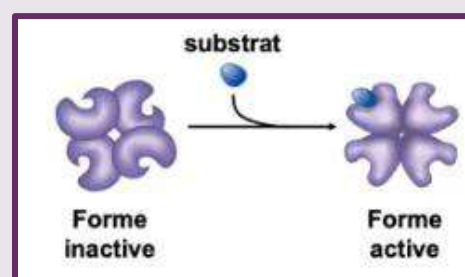
Les constantes de vitesse et d'affinité des enzymes allostériques varient en fonction des ligands de telle sorte que **la courbe prend une forme sigmoïde** qui est caractéristique de la coopération entre les protomères.

## COURBE SIGMOÏDE = ALLOSTERIE

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.

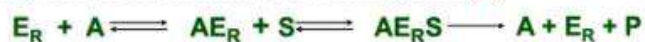


## 2. Effet HETEROtrophe POSITIF (coopératif):

Lorsqu'un effecteur allostérique **HETERO**trophe 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 hétérotrophe positif** (*exactement comme l'effet homotrophe*)

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 hétérotrophe positif**

## 3. Effet HETEROtrophe NEGATIF (anti-coopératif):

La présence de I (effecteur **néga**tif), va augmenter le complexe état tendu-I 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**.

(*pour compenser les enzymes T qui ont été liés à l'inhibiteur*)

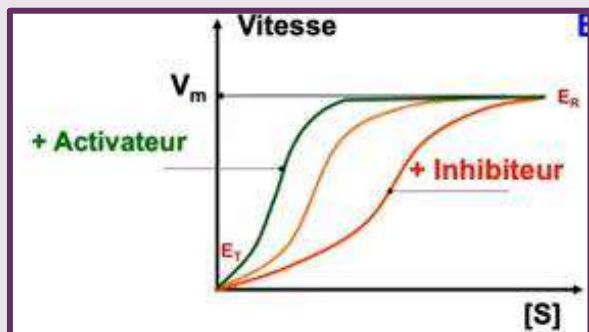
⇒ On observe ainsi un **effet hétérotrophe négatif**.

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 hétérotrophe négatif**

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

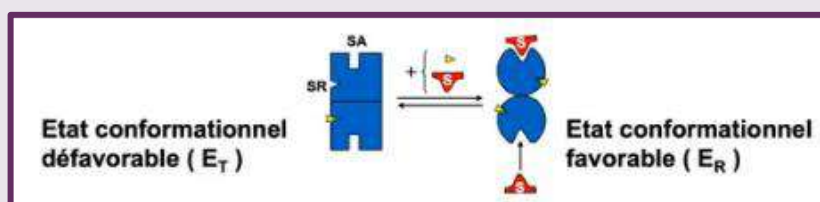


On observe en orange (courbe du milieu), une courbe **sigmoïde (=allostérie)** qui est obtenue à l'état basal.

Si on rajoute une molécule **activatrice** c'est-à-dire un effecteur allostérique qu'il soit homotrophe ou hétérotrophe positif, on observe une **augmentation de la vitesse de réaction** (courbe la plus haute) et donc un effet coopératif **positif**.

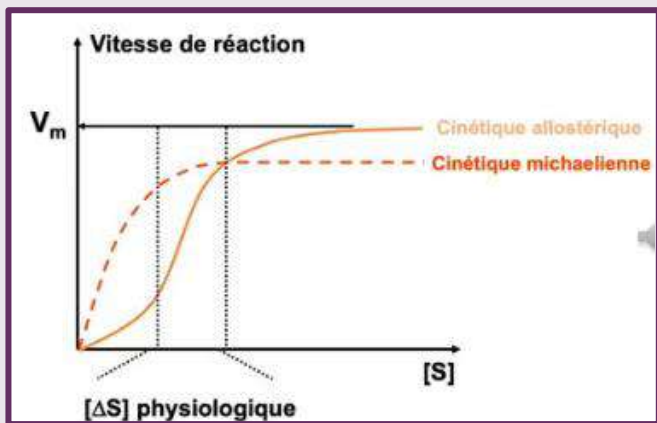
En revanche, si on réalise la même réaction en présence d'un **inhibiteur** (courbe la plus basse) on observe une **diminution de la vitesse de réaction** et donc un effet **anti coopératif**. #Duh #Facile

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. En 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 **+ lente** que la cinétique Michaelienne.

Mais pour des concentrations **+ grandes**, elle devient **+ 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**.

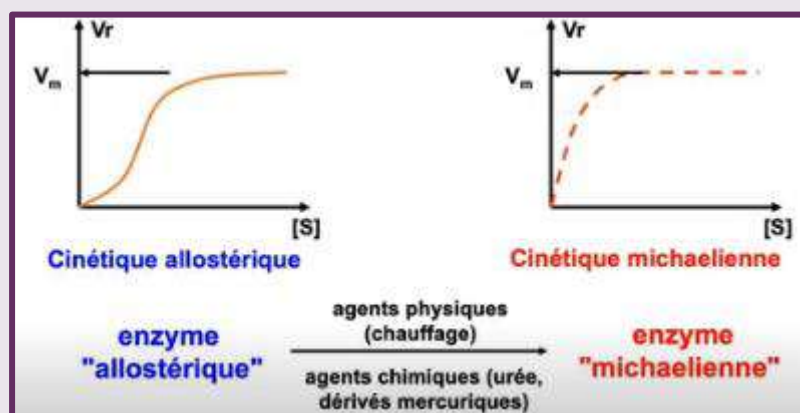
Cette propriété de coopérativité des protomères donne un **avantage** au système allostérique par rapport aux enzymes à cinétiques michaelienne pour la régulation de la vitesse des réactions enzymatiques.

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

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. *#Répétition*

On peut passer de cinétique **ALLOSTÉRIQUE** 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**.

*ALLEZZZZ CHAMPIONNN IL RESTE UNE SEULE PAGE*



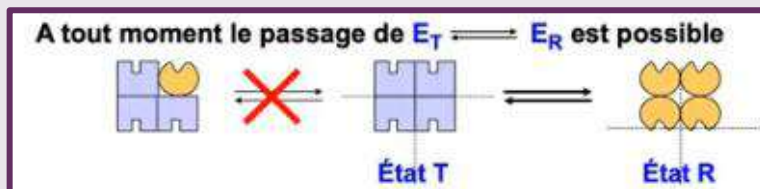
# V/ Les modèles de coopérativité

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.



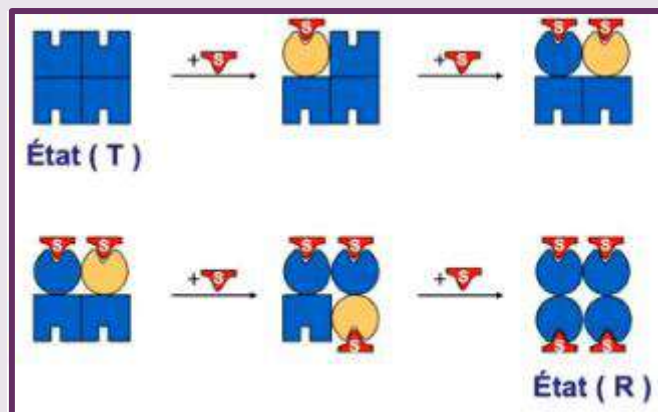
## 2. Modèle séquentiel, hypothèse de Koshland :

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 *enfin*

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

Chaque protomère possède, en plus du SA, un site **régulateur** où se fixe l'effecteur allostérique. L'effecteur peut être:

- o Une molécule de **substrat** différente de celle qui participe à la réaction enzymatique : on parle d'effet allostérique **homotrope** (positif seulement)

- o 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**.

## Finito Pipo !

*Toujours cette histoire du nombre de pages pair*

*Alors oui, certains vont me dire c'est la première et dernière fois que je vois enzymo 2 gngngn c'est chiant gngngn ce à quoi je réponds :*

*Tenez une petite blague pour vous détendre de cette baffé :*

LE DIRECTEUR D'UN HOPITAL RATTRAPE UN PATIENT PIED NU QUI SORT EN COURANT DE SON ETABLISSEMENT :

- MAIS ENFIN MR, POURQUOI VOUS ETES VOUS ENFUI DU BLOC OPERATOIRE ?

- C'EST PARCE QUE L'INFIRMIERE A DIT : « ALLONS, SOYEZ COURAGEUX, CE N'EST QU'UNE APPENDICITE, C'EST SIMPLE COMME OPERATION ! »

- ET ALORS ? ELLE A DIT ÇA POUR VOUS RASSURER !

- CE N'ETAIT PAS A MOI QU'ELLE LE DISAIT MAIS AU CHIRURGIEN !



*Que des LOL ici génial ! Non plus sérieusement SELECTIONNEZ vos infos à apprendre par cœur, soyez malins et sachez prendre l'information essentielle d'un paragraphe de 20 lignes, ce cours c'est soit de la logique, soit des simplifications mathématiques soit des répétitions sous différentes manières, ne paniquez pas, oui le cours est long mais bien moins long que toutes vos ronéos de physio (keur keur la physio).*

*On est presque début Octobre, c'est le moment de vous **chauffer** et d'être + que jamais **motivés** : la machine est lancée, on avance quoi qu'il arrive ! Allez à la BU ou au Co AVEC UN MASQUE SVP, le covid rôde et croyez-moi l'avoir c'est pas cool...*

Je vous laisse avec un **to learn list** pour vérifier que vous connaissez les points importants :

**ça veut pas dire qu'on impasse les autres infos attention ! grrrrrr**

- ✚ Caractéristiques des 3 états (surtout l'état **stationnaire** tombé en 2021)
- ✚ Conditions Michaelis-Menten
- ✚ Définitions de  $V_i$ ,  $V_{max}$  et  **$K_m$**  (tombé en 2021)
- ✚ Les 4 unités (item tombé en 2019)
- ✚ Définition isoenzymes + exemple LDH (item tombé en 2019)
- ✚ Définition macroenzymes + 2 types (item tombé en 2019)
- ✚ Relation différents inhibiteurs et  $K_m$  +  $V_m$
- ✚ Protéolyse ménagée
- ✚ Modification covalente
- ✚ Définition Enzyme-clé, enzymes allostériques, protéines allostériques
- ✚ Effet homo et hétéro
- ✚ Désensibilisation

*Je vous sors un DM au plus vite promis ! Je vous laisse avec cette photo : Ah oui le premier qui dit que ma fiche n'est pas complète je le ~~tue~~ on ne menace pas les P1 Minh Nhat ...*

*Je me base sur la ronéo ET je me retape les vidéos de la prof donc*

**TOUT Y EST**  
*Peace out*

