

ENZYMOLOGIE 2

I) Cinétique enzymatique (Michaelis & Menten).

- 1) Les enzymes michaeliennes
- 2) Evolution des concentrations 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) Notions d'isoenzyme et macroenzyme
- 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

C'est parti pour la deuxième partie de l'enzymologie (pour votre plus grand plaisir). Ne vous inquiétez pas il y a moins de chose à apprendre par cœur, et 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 :

Enzymes michaeliennes : Complexe [ES]



ES = Transitoire ; réversible et spécifique
Seul S associé à E peut être transformé en P

1) Un substrat (**S**) s'associe avec une molécule d'enzyme (**E**) pour donner un intermédiaire : le complexe enzyme-substrat (**ES**). *suivez sur le schéma*
 Le complexe ES est un état **transitoire**, réversible et **spécifique**.

2) Ce complexe/intermédiaire se **dissocie** ensuite pour donner un produit (**P**) avec régénération de notre enzyme. (*-> reste intacte on se rappelle*)
Seul le substrat S associé à E peut être transformé en P (*c'est à dire que tous les autres substrats autour qui ne sont pas associés à une enzymes ne feront pas la transformation en produit spontanément*)

Chaque mécanisme 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).

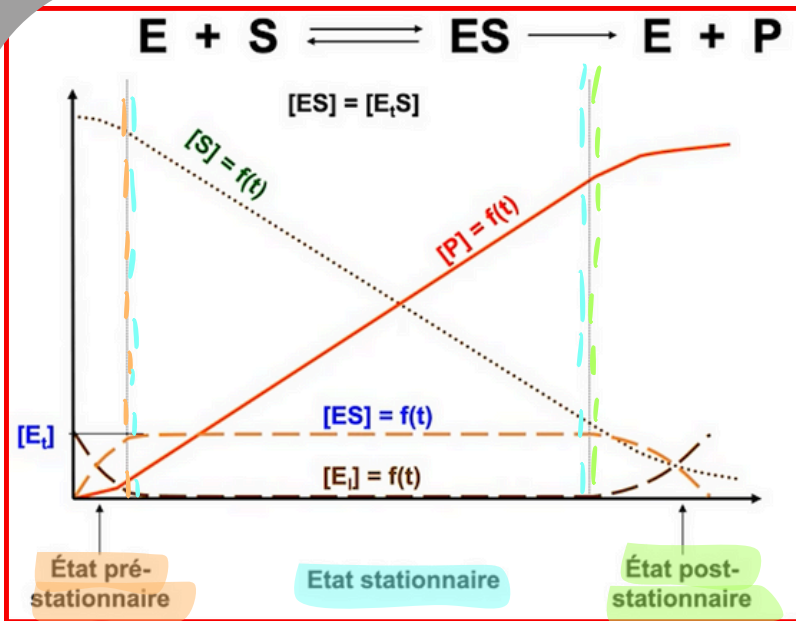
À partir de ses mesures, on peut tracer des **courbes** représentant la cinétique des réactions ce qui permet de déterminer certaines valeurs caractéristiques. *Si vous n'avez rien compris c'est pas grave, là c'est l'introduction de se qu'on va voir ensemble par la suite*

2) Evolution des concentrations 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. Si on étudie les variations des concentrations de P, S, E et du complexe ES en fonction du temps, nous remarquons qu'on va pouvoir distinguer **3 phases** :

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

Cf le tableau page suivante



Le tableau suivant est giga important. Il résume tout ce qu'on va dire ! Perso je le redessiner à chaque fois quand je faisais mon cours ça m'aidait dans la visualisation est en vrai c'est logique vous allez voir

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

	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 nulle car toutes les enzymes disponibles ont été associés à un substrat	[E] augmente car il y a épuisement du substrat

Alors maintenant on va commencer les maths, accrochez vous il va y avoir des démonstrations je vais essayer d'être la plus claire 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 leurs concentrations en fonction du temps passé :

- La concentration du **substrat diminue** au cours du temps
 - La concentration du **produit augmente** au cours du temps
- jusqu'ici c'est logique : le substrat est consommé (diminue) pour être transformé en produit (augmente)*

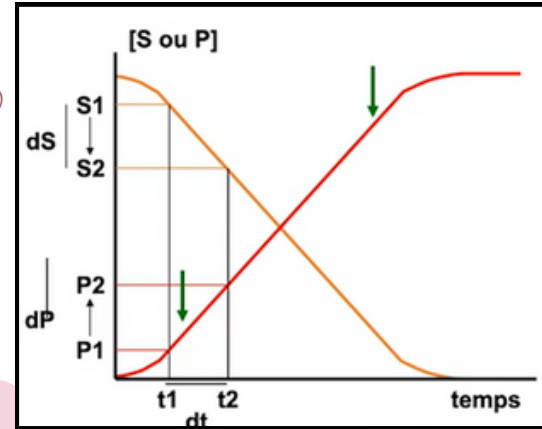
Lorsqu'on fait des mesures à des temps t_1 et t_2 séparés par un délai dt :

- $S_1 = [\text{substrat}] \text{ à } t_1$ et $P_1 = [\text{produit}] \text{ à } t_1$
- $S_2 = [\text{substrat}] \text{ à } t_2$ et $P_2 = [\text{produit}] \text{ à } t_2$

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

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

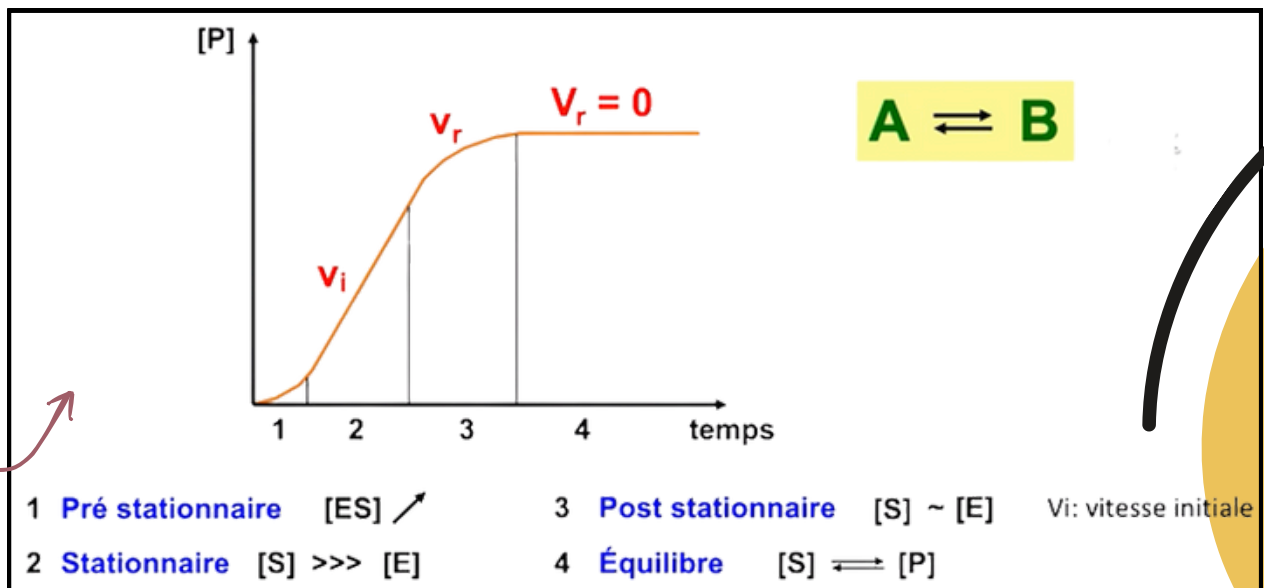


La **vitesse de réaction (V)** est le rapport :

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.

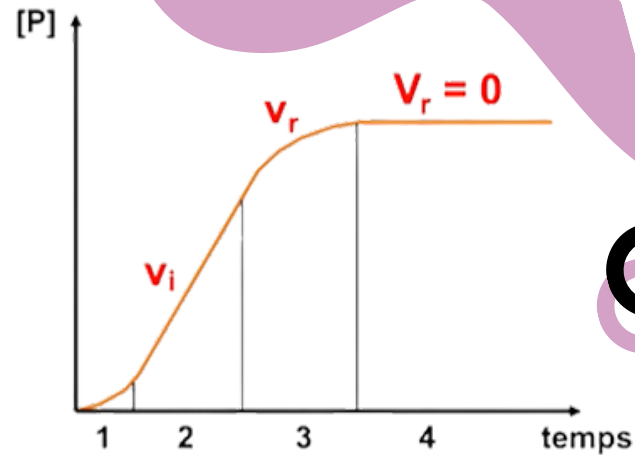
Si on étudie les variations de la concentration en produits en fonction du temps : A t_0 , on observe dans un milieu qui ne contient que des molécules d'enzymes ou de substrat, que la réaction se déroule de manière non uniforme. *un peu ambiguë cette phrase mais en gros c'est au début le temps que le complexe ES se forme*

Ce schéma il est top, vraiment la légende en bas c'est ++++ elle résume tout le blabla qu'on va dire. Si y'a des éléments à retenir c'est dedans



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]** (= concentration complexe ES) **augmente**.

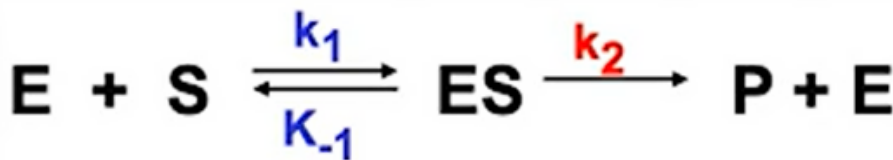
2) Stationnaire : Lorsque toutes les molécules d'enzyme sont occupées par des molécules de substrat, la vitesse de réaction est maximale et reste constante tant que la concentration de substrat est grande et celle du produit petit. C'est ce qu'on observe lors des premières mesures. Pendant cette phase stationnaire, la vitesse, dite initiale (v_i) est constante. Un nombre maximal de molécules d'enzyme sont liées à des celles de substrat. Le rapport $E_{liée} / E_{totale}$ est maximum. Dans ces conditions, l'enzyme atteint son efficacité catalytique maximale, et v_i représente la vitesse la plus élevée mesurable.



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 : 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.

On va maintenant s'intéresser un peu à la vitesse initiale (v_i)



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

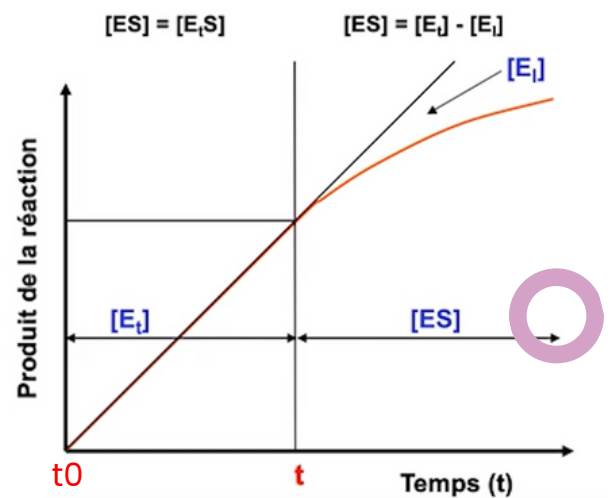
- Les concentrations des molécules (S, P, E) ou complexe de molécule (ES)
- Les constantes d'association et de dissociation (k_1 , k_{-1} ou k_2) de ces molécules entre elles *on va voir ça tout de suite*

Ces 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**

En traçant un graphique de la concentration du produit formé lors d'une réaction chimique catalysée par une enzyme de type Michaelis-Menten 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**. Cela 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. 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).



Petite *explication*, je trouvais cette partie peu claire : lors de l'état stationnaire, la concentration du produit formé est dite négligeable, car on se place au début de la réaction, quand le substrat est largement excédentaire. Cela évite que la réaction inverse ($P \rightarrow S$) interfère, ce qui permet d'analyser la vitesse initiale uniquement dans le sens substrat \rightarrow produit.

Cette période est **importante** puisqu'elle permet de **déterminer** la vitesse de réaction qui 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 dépend de la quantité de substrat introduit au début et des constantes cinétiques de la réaction qui conditionnent le point d'équilibre qui sera atteint.

Au **cours du temps**, la quantité de Substrat (S) diminue et de Produit (P) augmente. Cela 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 2)

Voilà pour ce graphique, c'est beaucoup de blabla et un peu de répétitions. Mais si vous avez compris (c'est logique avec ce qu'on a appris dans la partie 1), pas besoin d'apprendre par cœur... On continue bon courage !

4) Expression de la V_i (= vitesse initiale)

Tut'rappel : La **vitesse initiale** est la vitesse de réaction durant la **phase stationnaire**.

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 $[E]$.
- Une absence (ou quasi-absence) de produit (\rightarrow 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.

RECAP des 2 conditions (*c'est important*) : **1) $[S] \gg \gg [E]$**
2) $[P] \approx 0$

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

- La **$[P]$ est nulle** (ou faible) donc on peut **négliger la vitesse de dissociation** de P en complexe ES. (*réaction inverse*)
- **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**. *c'est logique : + il y a d'enzyme, + on peut utiliser de substrat, + on forme de complexe ES. Puis une fois que ce complexe a fait son job (= faire P) il se dissocie. Donc tant qu'on a pas de P, il reste constant.*
- Comme la $[S] \gg \gg [E]$, alors la **concentration maximale du complexe ES** est **limitée** par la concentration de **l'enzyme**. Il sera toujours négligeable par rapport à la concentration de substrat libre même à saturation de tous les sites actifs (*vu que le $[S] \gg \gg [E]$*). Ainsi, la concentration en substrat totale $[S_t]$ sera égale à la concentration de substrat libre $[S]$ (*on néglige les substrats liés aux enzyme $[ES]$*)



Une fois ces conditions préalables établies, on peut procéder à une **analyse mathématique** de la **cinétique** des réactions.

Le point de départ est **V_i** qui est donné par le produit entre la valeur de k_2 et de la concentration du complexe ES.

k_2 est la constante de réaction de ES en E et P (= le temps qu'il faut pour retrouver une E libre)

$$V_i = k_2 [ES]$$

- Les **valeurs non fixées par l'expérimentateur**, celles qui ne peuvent donc **pas être mesurées** sont : $[ES]$, $[E \text{ libre}]$ ou $[S \text{ libre}]$.

- Néanmoins, nous pouvons **mesurer** les $[E \text{ total}]$ ou $[S \text{ total}]$.

Si on **cherche $[ES]$** (qui n'est donc pas mesurable), il faut trouver une expression de la concentration de complexe ES qui utilise des valeurs connues. Ces valeurs sont connues car elles sont soit mesurables, soit définies initialement par l'expérimentateur.

Avant d'entrer dans les calculs, il est nécessaire de distinguer V_i et V_{max} .

Petit rappel : V_i = vitesse de réaction à l'état stationnaire lorsqu'il y a le plus de complexe ES.

V_i dépend de la **concentration** du complexe **ES** et celle-ci ne peut pas dépasser la concentration de l'enzyme totale. *logique* : plus d'enzyme = pas de formation ES

Lorsque $[ES] = [E_{totale}]$ cela veut dire que **tous les sites actifs** sont **saturés**, on atteint la vitesse maximal possible, (=on ne peut pas avoir plus de réactions). C'est à ce moment que **$V_i = V_{max}$** .

Donc en gros V_{max} est une V_i particulière qui correspond à la

V_i maximale que l'on peut atteindre dans les condition que l'on a défini.

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

On répète pour être sûr que t'as compris : **V_{max}** = vitesse maximale de catalyse pour une concentration donnée en enzyme. Elle est obtenue à saturation complète de l'enzyme (=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)

logique si on a bcp + de substrat que d'enzyme alors on aura bcp + de chance que notre enzyme rencontre un substrat (la rencontre est plus rapide)

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

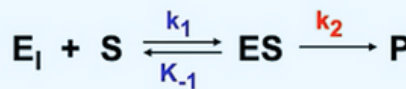
5) Etude cinétique de la réaction enzymatique

Pendant la **phase stationnaire**, la concentration de **ES** est **constante** :

- Cela signifie que **vitesse de formation ES = vitesse dissociation ES**
- 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 **[E libre]**
- La **[Substrat]**



Vitesse initiale = Etat stationnaire

Etat stationnaire \rightarrow Vitesse de formation ES = Vitesse de dissociation de ES

Etant donné qu'on se trouve dans des **conditions stationnaires**, on peut **négliger** la réaction de **dissociation du P en ES**. *je vous conseille de suivre avec le schéma au dessus.. s'il y a des doubles flèches c'est réversible sinon c'est irréversible*

En théorie si on a un maximum de complexe ES on atteint la V_m , sauf qu'en réalité d'autres réactions vont interagir et vont diminuer $[ES]$ et par conséquence diminuer V_i qui ne sera donc plus la V_m .

- La dissociation : **$ES \rightarrow E+S$** a une vitesse qui dépend de la concentration de **ES** et de **k_{-1}**
- La transformation enzymatique proprement dite est elle dépendante de la concentration du complexe **ES** et de la valeur de **k_2**

À partir de ces données, on va calculer une nouvelle constante spécifique à chaque enzyme : la constante de Michaelis et Menten : le K_m

Après plusieurs transformations mathématiques, on arrive à une **expression simplifiée de Km** :

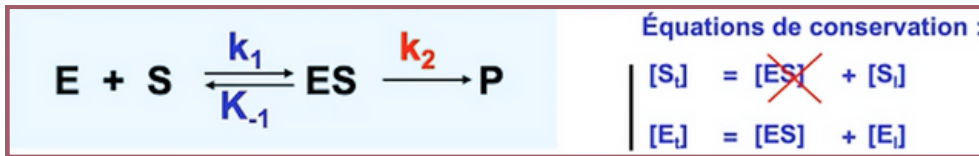
$$\frac{\text{Vitesse de formation ES}}{k_1 ([E_i][S])} = \frac{\text{Vitesse de dissociation de ES}}{(k_{-1} + k_2) [ES]} \Rightarrow \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} = \frac{([E_i][S])}{[ES]} = K_m$$

La constante de Michaelis et Menten (Km) :

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

- en mol/L
- indicateur de l'affinité de l'enzyme pour le substrat, inversement proportionnel (+ l'enzyme est spécifique, + elle liera le substrat facilement. Ainsi, + [ES] sera élevée par rapport à [E] et [S] + Km sera bas)

Avec notre Km on va pouvoir déterminer la Vi réel de nos réactions enzymatiques :



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

Or [ES] est négligeable. *je vous laisse essayer de deviner pourquoi...* car elle est dépendante de la quantité d'enzyme qui est en très faible concentration par rapport à celle du substrat. (Cf Conditions Michaelis-Menten)

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

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

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

ça c'est que des maths, il n'y a 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] réelle en fonction de l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

Souvenez vous, on a vu que de manière général : **Vi = k2 x [ES]**

Donc si on multiplie tout (formule de [ES]) par k2 on retrouve la Vi :

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

Tut'rappel : Vmax (=Vm) = Vitesse obtenue lorsque tous les sites actifs de l'enzyme sont saturés par le substrat et donc Vm dépend de la concentration en enzyme totale :

$$V_m = k_2 [E_t]$$

On peut le remplacer dans notre équation :

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

On arrive à l'expression de 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).

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

- La **Vi** est **nulle** si la **[S]** 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.

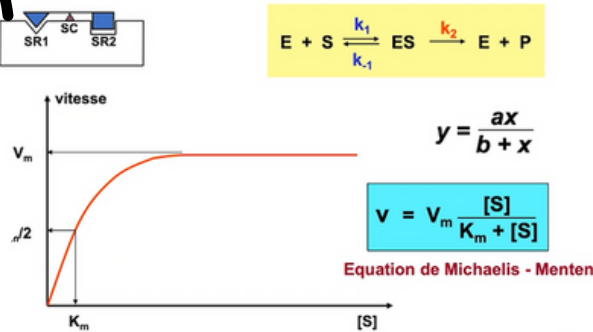
On obtient : $V_i = V_m \times [S] / [S] + [S] = V_m \times [S] / 2 \times [S] = V_m / 2$

Tu t'appelles, essayez de vous souvenir avant de lire la suite... on l'a répété bcp de fois : Km est ? **Km (constante de Michaelis)** : [S] qui permet une Vi de la réaction enzymatique égale à la moitié de la vitesse maximum. Elle rend compte de l'affinité enzyme/substrat (inversement proportionnel)

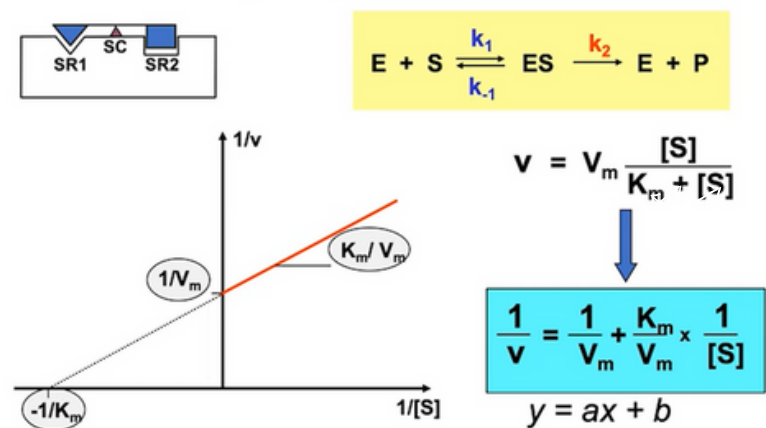
Et Vm ? **Vm (vitesse maximale)** : Vi théorique d'une réaction enzymatique obtenue quand toutes les molécules d'enzyme sont saturés par le substrat (=concentration saturante en substrat). A ce moment-là tous les sites actifs (SA) de l'enzyme sont occupés par le substrat et donc la Vm rend compte de 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

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



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

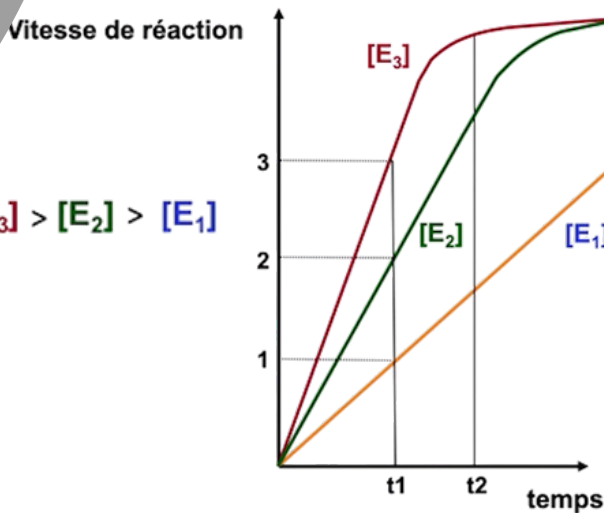


On peut représenter, (à **droite**) dans un graphique linéaire, les **inverses des variables** de l'**hyperbole** (premier graphique). À savoir l'**inverse** de la vitesse de réaction ($1/v$) en fonction de l'**inverse** de la concentration de substrat $1/[S]$.

Il est simple de tracer cette droite en utilisant des mesures expérimentales, à condition d'exprimer les résultats en fonction des inverses des vitesses initiales par rapport aux inverses des concentrations de substrat sélectionnées. Cette extrapolation permet de déterminer graphiquement les valeurs cherchées de Km et Vm.

Cette représentation linéaire est appelée celle de **Lineweaver et Burk**.

7) Influence de la concentration d'enzyme



Ce graphique illustre plusieurs expériences où nous utilisons des **concentrations croissantes d'enzyme**. On s'aperçoit qu'au bout d'un moment, à **t1**, plus il y a d'enzyme, plus le substrat est transformé en produit.

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).

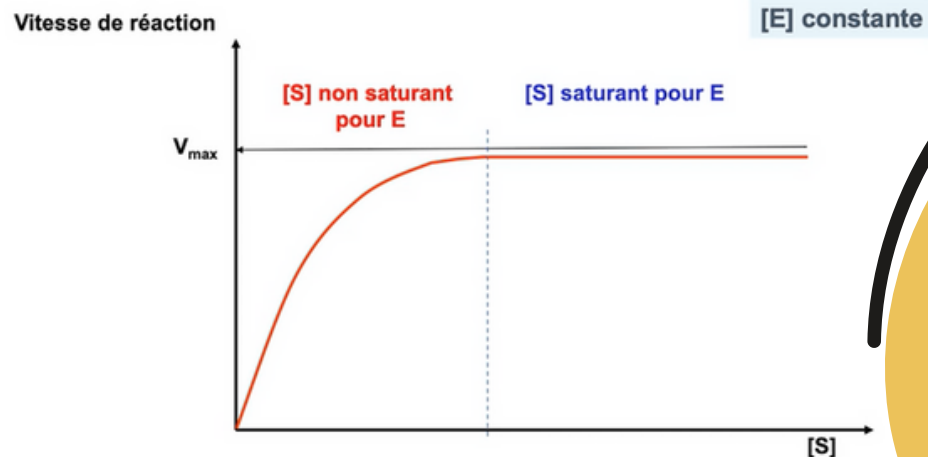
Au temps **t2**, la **vitesse de réaction n'est plus proportionnelle** à la **concentration en enzyme**.

Ces expériences sont réalisées en concentration constante de substrat.

8) Influence de la concentration de substrat

Si la concentration **d'enzyme** reste **constante** et que la concentration du **substrat S** est **modifiée** :

- 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_m limitée par la concentration en E**.



En gros une fois la concentration en substrat équivalente à celle d'enzyme ça limite la progression qui atteint un seuil (c'est la phase de plateau que vous voyez en bleu).

Aller dernière sous-partie de cette grande partie les amis, courage

9) Expression de l'activité enzymatique

L'expression de l'**activité enzymatique** peut prendre **plusieurs unités**. On le détaille dans le tableau page suivante. C'est important que vous les distinguez, pcq le prof peut facilement vous piéger en échangeant les unités entre elles. Je vous ai mis mes mnémotechniques, ils sont pas fous mais ils sont là si ça peut aider...

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

Correspond à la quantité d'enzymes capable de transformer **1 μ mole de substrat/min**, dans les conditions standards de l'expérimentation. *je voyais un peu un u dans le μ*

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 **Mole de Substrat** transformé par **mole d'Enzyme/seconde**. *je trouvais que les lettres ressemblaient au nom (si on écrit Anzyme lol)*

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. *lui était grv différent des autres donc je me disais AS \approx HS*

C
O
N
C
L
U
S
I
O
N

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_m, constante de Michaelis : Concentration du substrat permettant une vitesse initiale de la réaction enzymatique égale à la moitié de la vitesse maximum

V_m, 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)

Je vous ai mis le diapo de la prof, mais il y a une **petite errata** * c'est bien le substrat qui est en excès et non l'enzyme

Je vais vérifier quand vos cours vont sortir sur Moodle s'il y est tjrs prévenir la prof (*merci Rania d'avoir relevé l'erreur*)

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

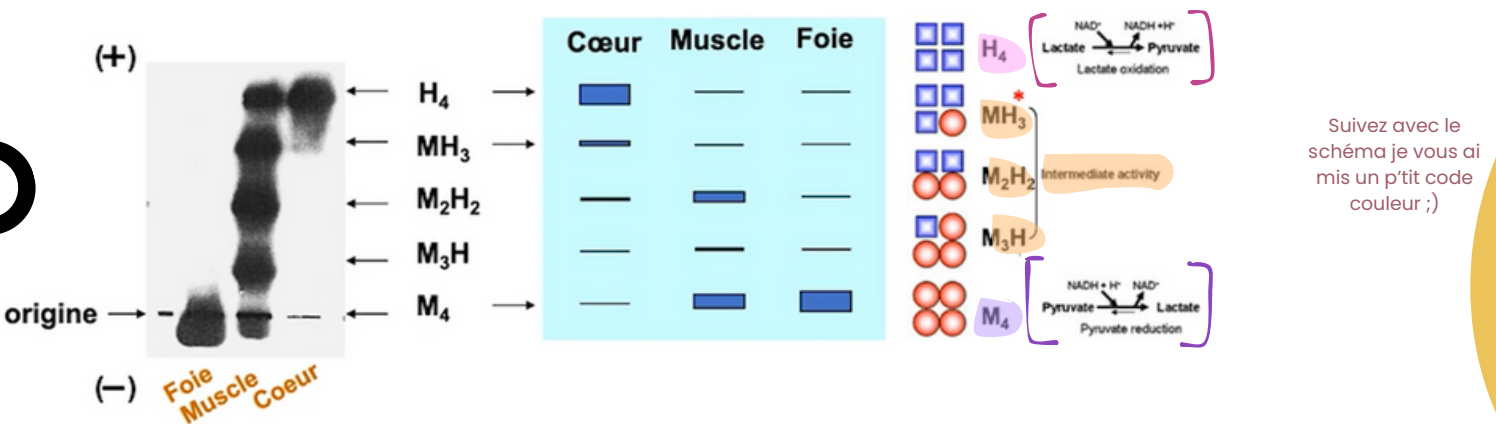
Les isoenzymes = des **formes différentes** d'une **même enzyme** qui **catalysent la même réaction**.

!! Elles sont issues de **gènes différents** => expression **tissu-spécifique différent**. Ainsi, ils possèdent donc des **propriétés chimiques et physiques différentes** (ex : mobilité électrophorétique, composition en AA, propriétés cinétiques...)

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

La LDH est **tétramérique** (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
- **D'autres** intermédiaires de différentes quantités de H et de M qui caractérise par exemple le **muscle**



Sur le plan fonctionnel, les **5 isoenzymes** de la LDH **diffèrent** pour leur **affinité** pour le **lactate** ou le **pyruvate**. En effet la synthèse relative de ces chaînes est + ou - 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 très efficace pour la **fermentation lactique**. On dit que la Vm est forte dans le sens pyruvate => lactate.
- **Pas d'inhibition** par le pyruvate

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

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.
- 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.

Les macroenzymes = complexes de haut poids moléculaire (HPM) formés par **liaison** entre une **enzyme** et une **macromolécule sérique** (=qu'on retrouve dans le sérum 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...

Type 2 : créatine kinase, γ -glutamyltransférase...

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.

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 signalent le plus souvent l'existence d'une **pathologie hépato-biliaire**.

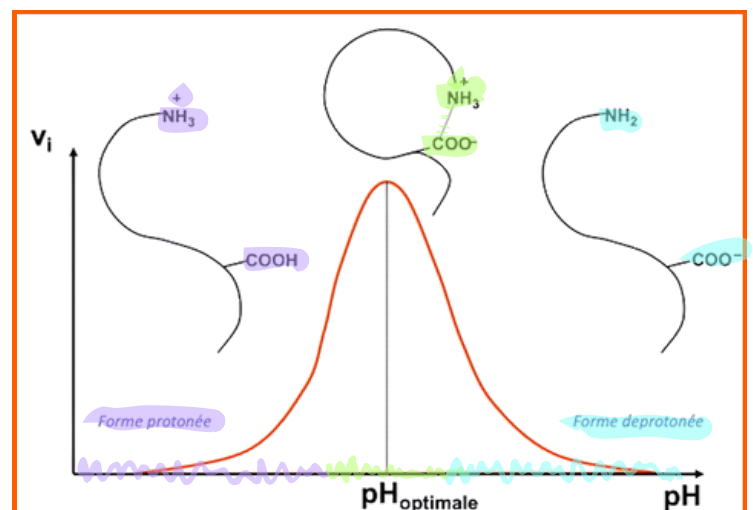
2) Influence du pH et de la température sur l'activité enzymatique

Influence du pH (facteur physique environnemental) :

Le pH est l'un des facteurs environnementaux qui peuvent influencer l'activité enzymatique. Les **variations de pH** peuvent avoir des **effets** soit sur **l'enzyme** soit sur le **substrat**. *Par exemple, cela peut modifier 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** (NH_3^+ et COO^-) qui composent l'enzyme : *ça c'est important pour comprendre*

- À **pH très acide** : Les fonctions ionisables des radicaux sont sous forme **protonée** : COOH pour la fonction acide carboxylique et NH_3^+ , la fonction amine. Pas de liaisons de types électrostatiques.
- A **pH proche de la neutralité** : Les radicaux à fonction ionisable sont **chargés** facilitant les liaisons E-S ou E-coenzyme de type électrostatique.
- A **pH plus alcalin** : Les fonctions ionisables des radicaux sont sous forme **déprotonée** : COO^- pour acide carboxylique et NH_2 pour la fonction amine. Pas de liaisons de types électrostatiques.



• Le pH optimal

Il existe un **pH optimal** du milieu réactionnel où les charges électriques des radicaux du site actif de l'enzyme favorisent le mieux la liaison $E-S \Rightarrow C$. Ce **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**. Cela correspond à l'environnement où elle agit (à savoir les sucs gastriques : fortement acides).

- Le **pH optimal** peut aussi être **basique**.

Exemple : la **trypsine** qui est une enzyme digestive du suc pancréatique (=milieu alcalin) et de l'intestin grêle. Son but est de digérer des protéines.

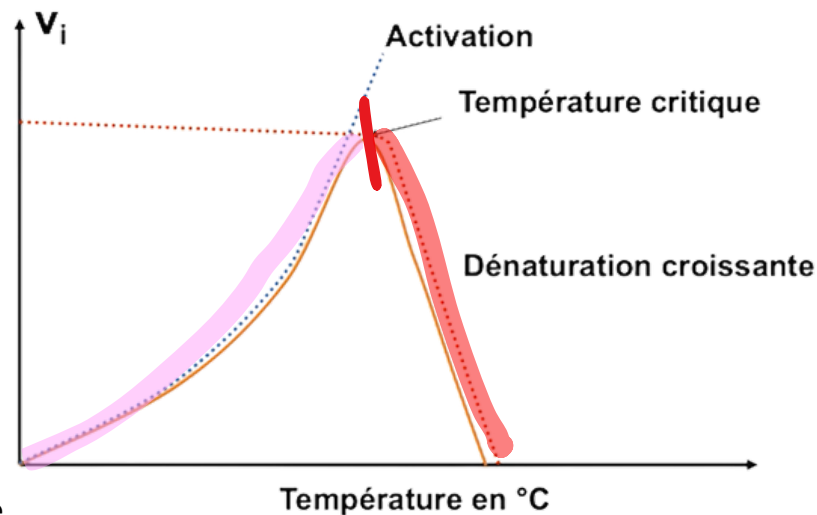
- La **majorité** des enzymes ont un pH optimal qui avoisine la **neutralité** entre **6 et 8**

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 :

- Dans les **zones à basse température** : la **vitesse augmente avec l'augmentation de la température**. Cela s'explique par la formation du complexe actif ES lorsqu'on ajoute de l'énergie sous forme thermique.
- Au-delà d'une **certaine température** (qui **varie** selon les enzymes), on assiste à une **dénaturation** de la protéine enzymatique. (= se casse)



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**. En général, la majorité des enzymes ont une température optimale avoisinant les **37°C**.

On arrive à la moitié de cette fiche, yeayyyy.

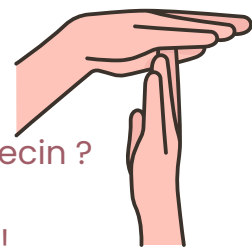
On vient de voir les influences physico-chimique et avant de faire la suite, une petite pause s'impose.

Allez vous prendre un p'tit goûter, une ptite boisson, un café (mais molo pépito sur la conso hein...).

Et une ptite blague pour la route ;)

Pourquoi le stéthoscope est l'ami du médecin ?

→ Parce qu'il est toujours à l'écoute !



TIME FOR A
BREAK



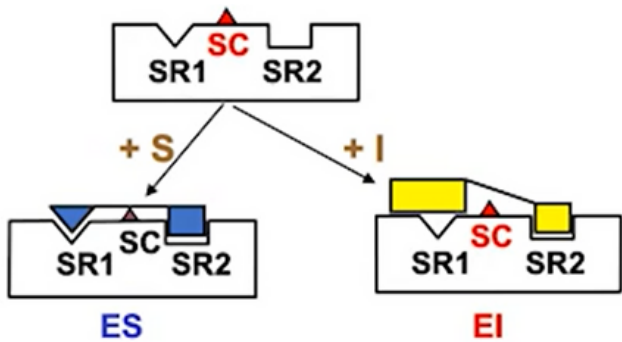
3) Influence de processus NON physico-chimique sur l'activité enzymatique

L'activité enzymatique peut être modifiée par des processus non physico-chimique comme :

- 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)

NB : plusieurs modes de contrôle peuvent être associés pour réguler l'activité d'une enzyme

Les agents modulateurs : Les différents types d'inhibiteurs :



1) Les inhibiteurs compétitifs :

On parle d'inhibition compétitive vis-à-vis du substrat, lorsque la liaison d'un inhibiteur sur l'enzyme a pour effet d'empêcher la liaison Enzyme-Substrat. Dans ce cas, l'inhibiteur à une structure semblable à celle du substrat et il se lie au niveau du même site actif. *il l'imité pour pouvoir se lier à sa place*

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 (=Ki) est définie par rapport aux concentrations de l'enzyme libre, de l'inhibiteur et du complexe Enzyme-Inhibiteur.

Comme pour Km mais avec l'inhibiteur

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

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



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

Dans l'équation de conservation de l'enzyme, une autre forme de l'enzyme apparaît : l'enzyme liée dans le **complexe Enzyme-inhibiteur**.

L'équation de la vitesse de réaction, qui **dépend uniquement du complexe ES**, reste **inchangée** car 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.

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

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

Ainsi, 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*

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 (=affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur).

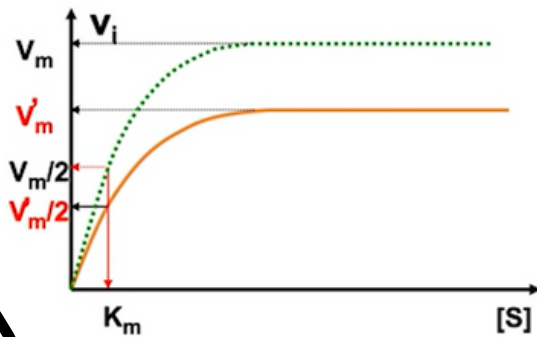
La constante **K_m** , au contraire, **reste la même** que dans le cas général.

C'est bcp d'infos mais essayez de comprendre un max et après je vous fais un bog recap (perso j'avais appris le recap par cœur c'était largee suffisant)

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

Ce graphique représente 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**.



La vitesse maximale (**V_m**) **varie** avec la **concentration de l'inhibiteur**, car la concentration de l'enzyme diminue lorsque les molécules d'enzyme se lient à l'inhibiteur, l'inactivant, même à une concentration infinie de substrat.

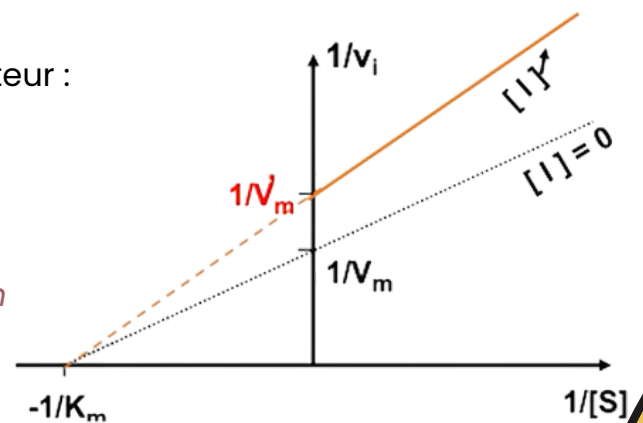
La moitié de cette V_m est atteinte pour des concentrations de substrat toujours égales puisque l'inhibiteur n'affecte pas la liaison entre l'enzyme et le substrat.

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**.

L'inverse de la V_m augmente avec la présence d'inhibiteur de même que la pente de la droite. **V_m diminue**

Pour chaque droite, le point dont l'ordonnée est le double de l'ordonnée initiale a toujours la même abscisse, qui est l'inverse de K_m . **K_m reste inchangé.**



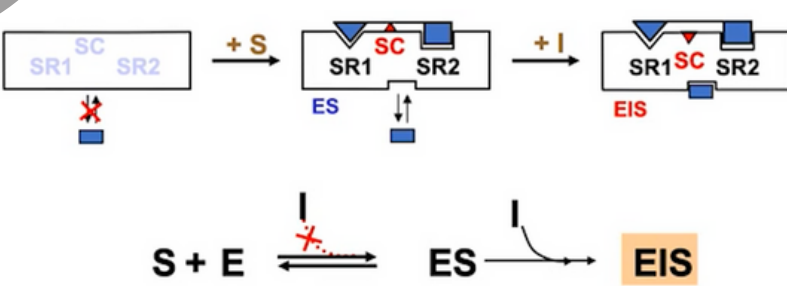
Le point commun de toutes ces droites est situé à gauche de l'axe des Y dans une partie du graphe qui n'a pas de sens physique puisqu'on est au-delà d'une concentration infinie du substrat.

Mais le calcul de cette abscisse montre qu'elle est d'une valeur équivalente à $-1/K_m$ 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.

#explication de la prof

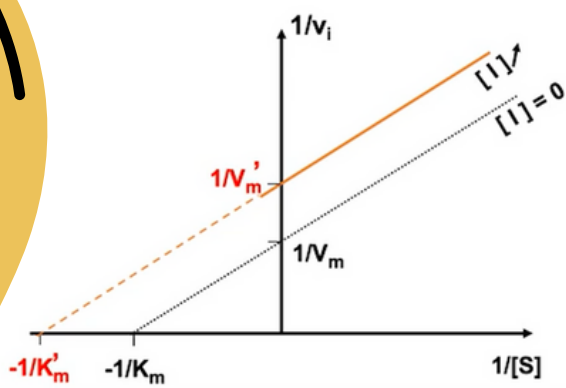
3) Les inhibiteurs in(un)compétitifs :



On s'accroche c'est le dernier, un p'tit mixte 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)compétitif modifie 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.

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



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

Bon maths et graphiques c'est pas le plus intéressant mais ça démontre ce qui est résumé dans ce tableau. Si vous le connaissez bien, vous pourrez perfect tous les qcms sur les inhibiteurs !

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)
- Les effets des inhibiteurs vont dépendre de la $[I]$ mais aussi de la k_i (=affinité entre I et E.)
- Les inhibiteurs non compétitifs et incompétitifs ne peuvent pas être levés par un ajout en excès de substrat.

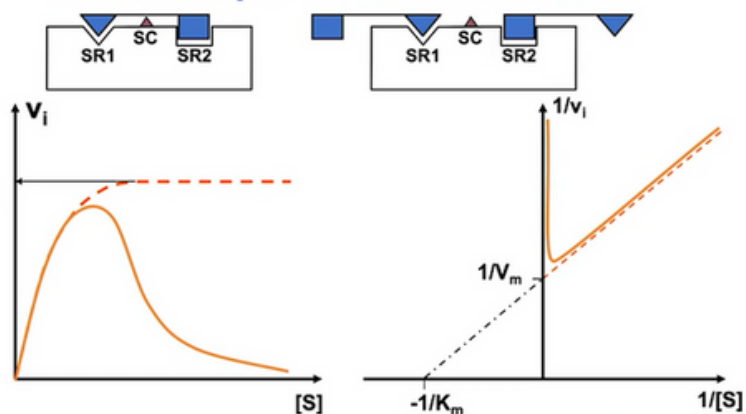
Inhibition par excès de substrat :

Lorsque la concentration du substrat est faible, chaque partie du substrat se lie à son sous-site dédié. Cependant, une inhibition par le substrat lui-même peut se produire à **très haute concentration**. Dans ce cas, le site de fixation du substrat sur l'enzyme est généralement grand et comporte plusieurs sous-sites, chacun fixant une partie du substrat.

Le **substrat** peut s'installer dans le Site Actif avec une **orientation incorrecte**, empêchant la réaction de se dérouler correctement. (regardez les schémas au dessus des graphes)

On observe parfois un **comportement anormal de l'enzyme** lors de la mesure de la cinétique en présence d'une concentration élevée de substrat. Dans un modèle de Michaelis et Menten, la **vitesse** atteint un **maximum** à mesure que la **concentration du substrat augmente**, puis **diminue au lieu de se stabiliser** à la vitesse maximale.

Inhibition par excès de substrat



Modifications IRREVERSIBLES par protéolyse ménagée :

Un certain nombre **d'enzymes** sont synthétisées sous forme de **précurseurs inactifs** appelés **ZYMOGENES (=PROENZYMES)**. Exemples : 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 irréversibles**.

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** .

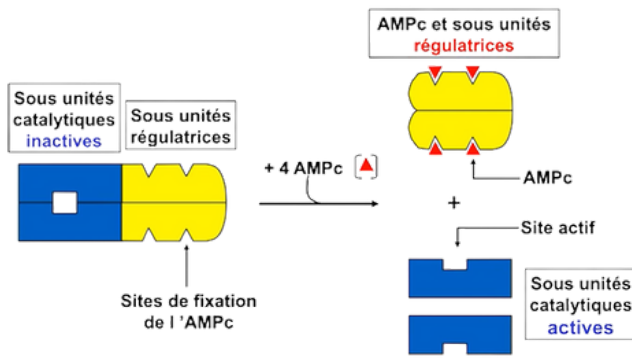
Exemple de modification covalente → la **phosphorylation** :

- C'est une modification **post-traductionnelle** de l'enzyme cible.
- Modification **covalente, réversible**
- Dans le cas de la phosphorylation, un **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 derniers exemples (page suivante) : LA PKA ET LE GLUCAGON

Les enzymes à régulation covalente

Protéines Kinases AMPc dépendantes



La PKA :

Parmi les protéines kinases à régulation covalente, on peut citer la Protéine Kinase AMPc dépendante (PKA). Elle est constituée de **4 sous-unités** : 2 sous-unités catalytiques + 2 sous-unités régulatrices.

Après l'interaction d'un ligand, (ex : une hormone), avec son récepteur à la membrane cellulaire, les enzymes à régulation covalente jouent un rôle dans la transduction du signal. Pour cela une cascade a lieu :

1. Le récepteur du messenger primaire (hormone) entraîne une augmentation de l'AMPc **activant la PKA**
2. PKA activée **phosphoryle** et **active Enzyme 1**
3. Enzyme 1 activée peut être aussi une protéine kinase (différente de PKA) qui à son tour **active** par **phosphorylation** une autre **Enzyme 2**
4. 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.

À la fin de la cascade, l'enzyme régulatrice de la voie métabolique est phosphorylée en réponse au messenger primaire.

NB : La phosphorylation peut aussi désactiver une enzyme.

Cet ensemble de **phosphorylations séquentielles et ordonnées** régule la voie métabolique, (comme le métabolisme du glycogène). Elles permettent le **transfert du message** de la membrane cellulaire vers l'intérieur de la cellule, où se déroule la réaction métabolique.

Le Glucagon :

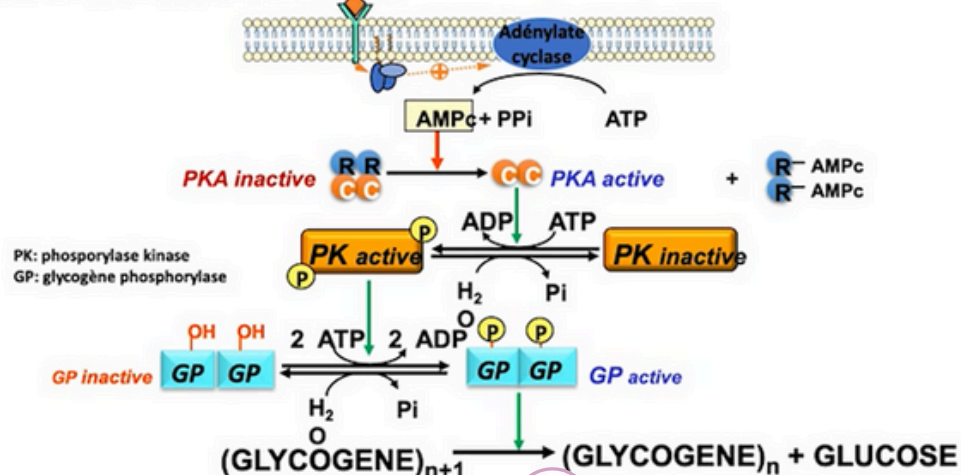
Le GLUCAGON interagit avec ses récepteurs exprimés au niveau **hépatique** activant **L'ADENYLATE CYCLASE** induisant la production **d'AMPc** à partir d'ATP. L'AMPc va activer la **PKA** en permettant la dissociation des sous-unités régulatrices et des sous-unités catalytiques de la PKA. (ça on l'a vu juste au dessus)

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**.

vous allez revoir ça dans un autre cours, mais en gros c'est une cascade

Effecteur primaire (ex Glucagon, foie)

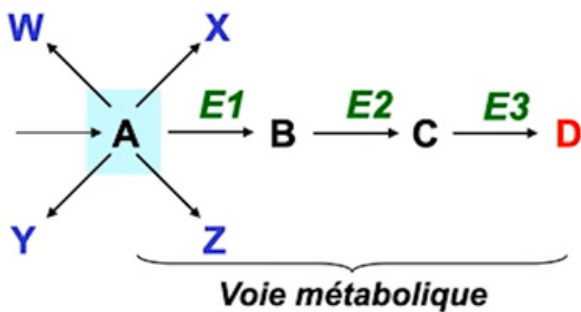


III) LES ENZYMES ALLOSTÉRIQUES

1) Définitions

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

Sur le schéma, si on prend le substrat de réactions A il nous conduit vers des transformations variées : c'est un carrefour métabolique. *ex : G6P du métabo glucidique*
Chaque voie de synthèse se déroule en plusieurs étapes, formant ainsi les voies métaboliques. Chaque étape est catalysée par une enzyme spécifique (E1, E2, E3).

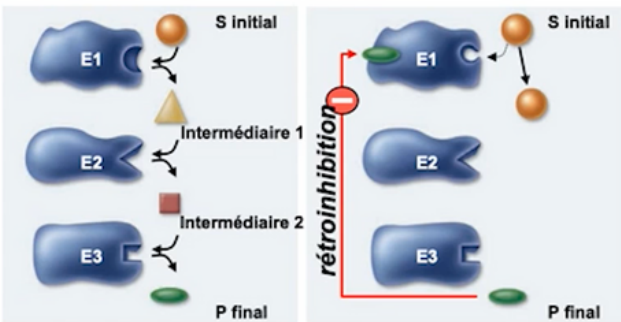


La vitesse de formation du produit final (D) est déterminée par la réaction la plus lente qui le précède :

- Si le **produit final est insuffisant**, l'enzyme 1 (E1) doit être **activée**. (*pour continuer à en faire jusqu'à ce qu'il y en ai assez*)
- Si le **produit final est suffisant**, l'enzyme 1 (E1) sera **inhibée** pour bloquer l'accès au carrefour métabolique dans la voie. (=rétro inhibition)

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 réaction** conduisant au produit final. Dans notre exemple au dessus, c'est l'enzyme E1 catalysant la transformation de A en B (1ère étape de la synthèse) 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.



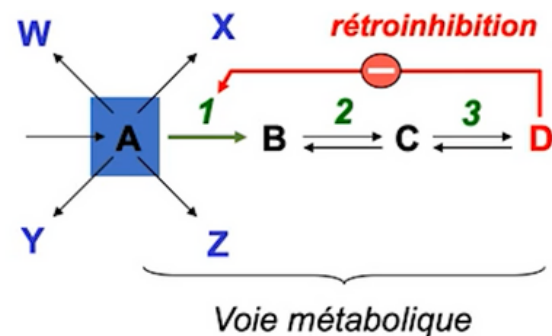
Enzyme Clé :

Dans une voie métabolique, l'enzyme qui a la **vitesse de réaction la plus lente** (*ce qu'on vient de voir au dessus, celle qui est régulée*) 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 (*cf les deux points*), cette enzyme-clé est inhibée pour diminuer la synthèse de produit final ou au contraire activée pour l'augmenter.

Les enzymes clés sont TOUTES des enzymes allostériques.



Enzymes allostériques :

Elles fonctionnent grâce à la présence :

- D'un **site Actif** (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. Ce changement de conformation du site actif provoque :
 - Une **augmentation** (activateurs allostériques) de l'activité enzymatique
 - Une **diminution** (inhibiteurs allostériques) de l'activité enzymatique

Allostérie :

Du grec : « *allos* » = autre et « *stereos* » = forme. Ainsi, l'allostérie est la **variation 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. (→ **Parce qu'il faut plusieurs sous-unités interconnectées pour que le changement de conformation d'une partie de la protéine influence les autres**)

L'allostérie concerne des protéines douées d'activité telles que : Les Enzymes, Transporteurs (hémoglobine), Canaux/pompes, Récepteurs, Protéines contractiles....

BIG RECAP de ces définitions : Toutes les enzymes clés de nos voies métaboliques sont des enzymes allostériques. Elles ont pour rôle de contrôler l'activité des voies métaboliques. Elles possèdent deux types de sites :

- un site actif, où se fixe le substrat et où a lieu la réaction
- un site régulateur, où se fixent des effecteurs (activateurs ou inhibiteurs).

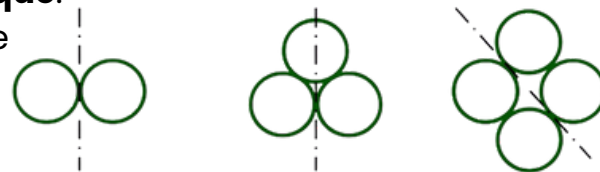
La fixation d'un effecteur sur le site régulateur provoque un changement de conformation de l'enzyme, ce qui entraîne soit une augmentation, soit une inhibition de l'activité enzymatique selon les besoins de la cellule.

2) Caractéristiques structurales

Les enzymes allostériques sont des protéines complexes qui possèdent **plusieurs sous-unités** organisées de façon à présenter un axe de symétrie. Elles ont toujours une structure **QUATERNAIRE** composée de plusieurs chaînes d'AA formant des sous-unités (= protomères) identiques entre elles.

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 (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.

Systemes et conformations des protomeres

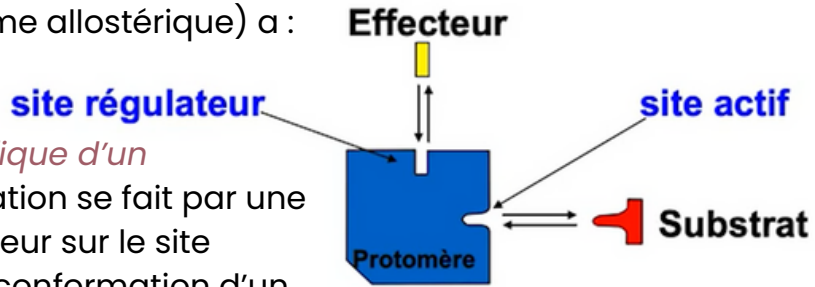
La variation de conformation de la protéine dépend du **taux d'occupation** des sites de liaison. (Ex : *hémoglobine a 4 sites de liaisons pour O2*)

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

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

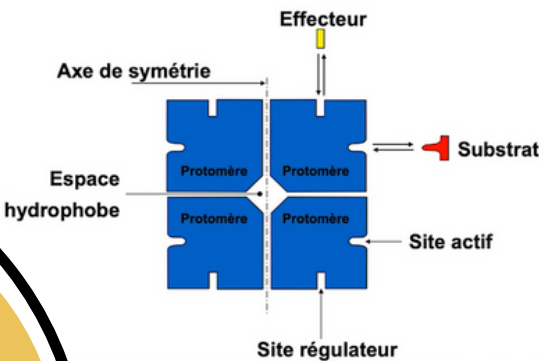
Généralement, **chaque protomère** (de l'enzyme allostérique) a :

- 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 de l'effecteur sur le site régulateur entraînant un changement de conformation d'un protomère.



La **conformation** de chaque **protomère** est **contrainte par celle des autres** car chaque protomère a des liaisons avec les autres protomères de l'enzyme (liaison le plus souvent de type électrostatique).

Ce type de liaison entre les protomères modifie la structure secondaire et tertiaire ainsi que l'énergie interne de l'enzyme. Par conséquent, un **changement de conformation** dans un protomère **affecte également les autres** protomères. *ils tombent un a un comme des dominos*

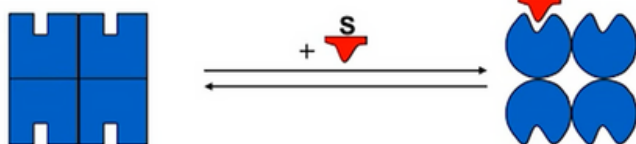


Chaque ligand d'une enzyme allostérique, (un effecteur ou un substrat) a un site régulateur et un SA sur chaque protomère. Les **sites de liaison** existent donc de façon **identique** sur **chaque protomère**.

3) Les états des protomeres

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

- **Etat TENDU** ou **contraint** : T (*inactif car le coco est Tendu*)
 - **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 Reaaaadyyyy*)
 - **Diminution de l'énergie interne** d'un protomère par la modification des liaisons avec un modulateur → Passage à un état **Relâché** 😎



Etat conformationnel défavorable (E_T)

Etat conformationnel favorable (E_R)

Les affinités des sites de fixation du protomère aux ligands ($=K_m$) et la **Vmax dépendent** du **protomère**. 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. *les fameux dominos*

IV) LES EFFECTEURS ALLOSTÉRIQUES

on en a déjà un peu parlé tout à l'heure, on va faire des rappels :

Nature : Les effecteurs allostériques sont des **ligands** dont le **site de fixation site régulateur est différent du SA**. L'effecteur peut être :

- Un **substrat**. Celui-ci est différent de celui qui participe initialement à la réaction enzymatique. On appelle cela **effet allostérique homotrope** => deux molécules de substrats identiques interagissent : une se lie au site actif et l'autre au site régulateur.
- Une molécule **différente du substrat**, on parle d'effet **allostérique hétérotrope**.

1) Effet allostérique homotrope

Effet allostérique homotrope



Transition allostérique

En présence de substrat



L'enzyme allostérique dans l'état **T** est dans une forme **inactive** alors qu'en forme **R**, elle est **active**. Lorsque le substrat agit comme **effecteur allostérique homotrope**, il se fixe de **préférence** sur l'enzyme sous forme **R**.

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

logique notre substrat va vers l'enzyme R (diminue) et crée son complexe (augmente)

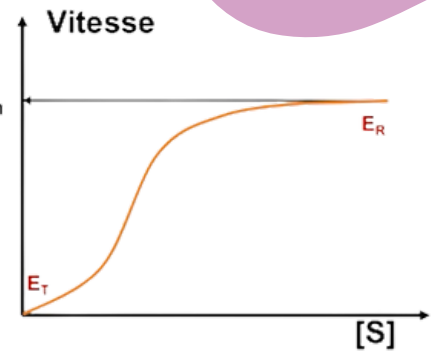
Mais, on observe une **transition** allostérique de l'enzyme de la forme tendue à relâchée pour rétablir les concentrations de l'enzyme libre sous forme relâchée, conformément au **principe de la loi d'action de masse**.

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

Voici un graphe qui représente la Vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat. Ce substrat exerce un effet sur l'enzyme afin de diminuer son K_m et donc d'augmenter l'affinité de l'enzyme. Attention V_m pour une **enzyme allostérique** ce n'est **PAS** une hyperbole comme celui observé pour une enzymes michaelienne.

Les constantes de vitesse et d'affinité des enzymes allostériques changent avec les ligands, ce qui donne à la courbe une **forme sigmoïde** typique de la coopération entre les protomères.

COURBE SIGMOÏDE = ALLOSTERIE



Dans l'**allostérie homotrope**, la liaison d'une molécule de substrat à un protomère provoque un **changement de conformation** de **ce protomère et** des protomères **adjacents**, ce qui facilite la liaison du substrat aux autres protomères. On dit qu'il y a un **effet coopératif positif** lorsque la fixation d'un substrat sur un protomère augmente l'activité des autres protomères.

nos dominos on repèteeeee

2) Effet hétérotrope positif

Lorsqu'un **effecteur allostérique HETEROTrope** est un **effecteur positif (A)**, la présence de A va entraîner l'**augmentation** du complexe enzyme relâchée-A.

On a une diminution de l'enzyme relâchée libre qui entraîne une transition allostérique de l'état tendu vers l'état relâché de l'enzyme.

et donc une augmentation du complexe enzyme relâchée-substrat

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



En présence de substrat et effecteur positif (A)

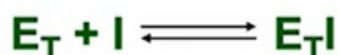


Présence de A → augmente $[AE_R]$ → diminution $[E_R]$ qui entraîne transition allostérique de E_T vers E_R → **effet hétérotrope positif**

3) Effet hétérotrope négatif

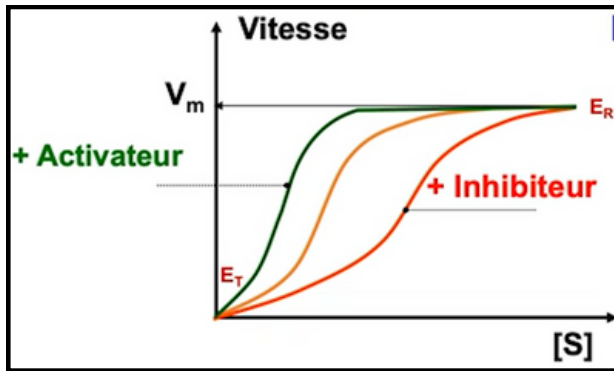
La présence de I (**effecteur négatif**) va **augmenter** le **complexe état tendu-I** ce qui va entraîner une diminution de l'enzyme à l'état tendu provoquant une transition allostérique de l'enzyme libre de l'état R à l'état T. On observe ainsi un **effet hétérotrope NÉGATIF**.

En présence de substrat et effecteur négatif (I)



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

Action des modulateurs sur la vitesse de réaction :



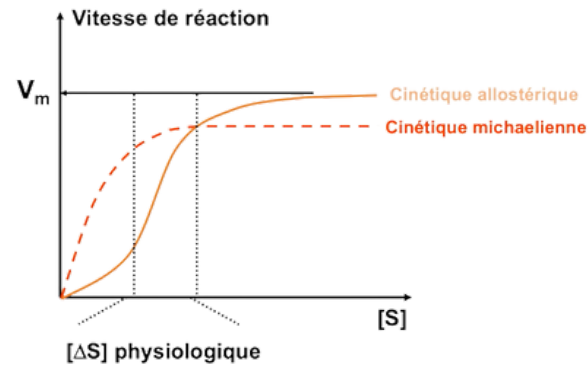
Ce graphique représente la vitesse de réaction en fonction de la concentration de substrat pour les enzymes allostériques. On observe en orange (courbe du milieu), une courbe sigmoïde (=allostérie) qui est obtenue à l'état basal.

- 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 et donc un effet **coopératif positif**.
- Si on réalise la même réaction en présence d'un **inhibiteur** 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.

Comparaison des cinétiques :

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.

ce qu'il faut retenir : pour des petites concentrations de substrat, les enzymes Michaeliennes sont plus rapides (courbe en pointillé au dessus) alors que pour de plus grandes c'est celles allostériques

Changement de cinétique :

On peut passer de cinétique **ALLOSTERIQUE** à cinétique **MICHAELIENNE** en **désensibilisant** l'enzyme.

Cette désensibilisation peut se faire par :

- Des agents **physiques** (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 (**régulateur**) sera détruit et il y aura une perte du phénomène de coopérativité. (Seul le SA reste)

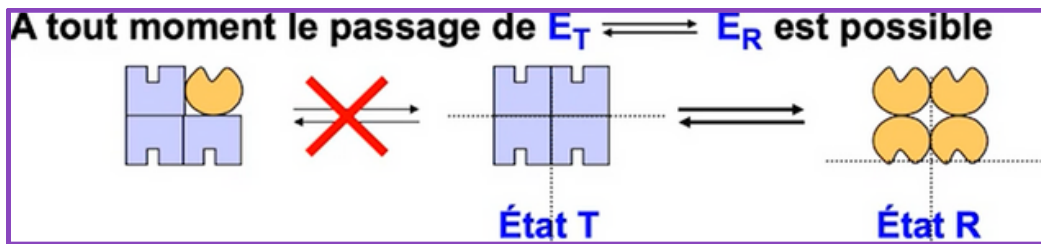
Mais **ATTENTION** : on ne peut **PAS passer de cinétique Michaelienne à Allostérique. +++**

Dernière petite partie, courageeeee

V) LES 2 MODÈLES DE COOPÉRATIVITÉ

1) Modèle concerté

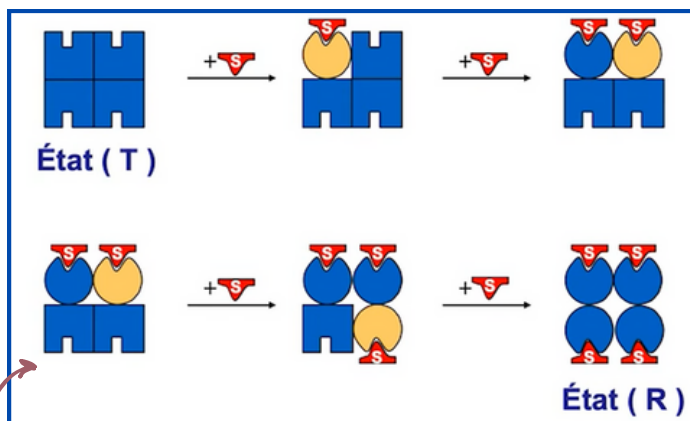
Au cours de la transition allostérique, il doit y avoir une **conservation de l'axe de symétrie** des protomères. Dans ce cas, c'est **l'ensemble des protomères** qui subissent la transition allostérique et donc l'ensemble des protomères qui composent l'enzyme doivent se retrouver soit dans un état relâché soit dans un état tendu.



*je me disais
l'union fait la
force : si y'en a un
qui change de
conformation, les
autres aussi*

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).

Le rond jaune c'est le nouveau changement de conformation (puis il devient bleu). Vous voyez bien que c'est progressif et que dans les étapes intermédiaires l'axe de symétrie n'est pas respecté.

- C** Les enzymes allostériques ont une structure quaternaire formée de protomères identiques
- O** En plus du site actif ces enzymes possèdent un site régulateur où se fixe l'effecteur allostérique
- n**
- c** 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)
- u**
- s** Les effets allostériques homotropes présentent toujours une coopérativité positive
- i**
- o**
- n**

ça y'est c'est officiellement fini pour l'enzymologie !!!!

Je sais que ça paraît interminable mais je vous sors au plus vite une big fiche recap de ce qu'il y a de plus important selon moi à retenir (et vous verrez que c'est pas si long).

Si vous avez n'importe quelle question : je suis là pour ça alors venez me spam
Y'A PAS DE QUESTIONS DEBILES !! +++++

C'est parti pour les dédiiiiis

Dédi à vous, les LAS1 j'espère que vous trouverez rapido votre rythme et les LAS2 et LAS3 gros big up à vous, vous êtes tellement forts de refaire une année d'enfer, je vous envoie toute ma force

Dédi à photoroulette, branchez vous sur ce jeu les gars c'est les meilleurs fous rires (et la meilleure façon de découvrir la vie cachée de vos proches)

Dédi à Julien qui m'avait fait ce cours l'année d'avant, grâce à lui j'ai grave réussi à le dégrossir et à l'apprendre (j'espère ma fiche recap vous aidera pour ça)

Dédi à mes fillots : Anna, Diyaeddine, Amandine et Kaoutar. Vous êtes les meilleurs, je crois en vous !!!

Dédi de Lucas : "trop deg que vous me connaissiez pas encore mais on se retrouve au S2 pour la meilleure des matières ! J'aimais bien la bioch donc j'approuve vos tuteurs d'amour (promis j'ai pas été contraint de marquer ça)"

Dédi à la journée du handicap (vraiment les cours de P2 ça commence fort...). Je vous mets une petite photo ici de ça. Vous avez un coucou de Michela, Chloé et Lucas



Et enfin Dédiii à mes ptites sœurs d'amour. Romy, je suis trop fière que tu sois en médecine. Accroches toi, t'as toute la force, le courage et la persévérance pour t'approprier les compétences pour réussir. Je sais que tu peux le faire, et toujours là si tu as besoin. Je t'aime fort girrrl

Voilà les zouzousss c'est tout pour moi. Je vous envoie que du love