

Pour qu'une réaction chimique puisse se produire, il faut que les réactifs :

Soient les uns à côté des autres	Atteignent un certain niveau d'énergie appelé énergie d'activation
----------------------------------	--

La réaction a lieu lorsque les réactifs se percutent avec une certaine quantité d'énergie c'est-à-dire suffisamment vite.

## Présentation des enzymes

L'enzyme se fixe à un des réactifs ce qui modifie le chemin de la réaction et diminue l'énergie d'activation. La réaction a lieu plus souvent.

En générale, la conformation des protéines n'est pas rigide mais elle oscille subtilement entre un ensemble de formes très proche. Lorsque le substrat se lie au site actif de l'enzyme, les interactions moléculaires modifient légèrement leur structure spatiale et abaissent l'énergie d'activation de la réaction.

**Site actif** site de l'enzyme qui se lie au substrat. Elle est composée au maximum de 10 acides aminés.

L'enzyme

- Orienter le substrat
- Faciliter le rapprochement entre plusieurs substrats.
- Stabiliser l'état de transition en modifiant la forme du substrat.

D'autres molécules peuvent participer à l'action des enzymes comme :

- **Cofacteur** substance non protéique dont ont besoin les enzymes pour fonctionner.
- **Coenzyme** cofacteur non protéique mais d'origine organique.

**Apoenzyme** nom donné à l'enzyme sans son coenzyme.

**Rmq :** Pour les réactions anaboliques, il faut fournir de l'énergie pour que la réaction ait lieu en brisant les molécules d'ATP.

## Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs naturels qui fonctionnent dans des conditions particulières (souvent dans les conditions physiologiques du corps). Ce sont en générale des protéines (mais aussi des ARN) impliquées dans le métabolisme c'est-à-dire qui ont une activité :

Anabolisme (synthèse)	Catabolisme (dégradation)
-----------------------	---------------------------

Elles sont caractérisées par :

Leur efficacité	Leur spécificité vis-à-vis du substrat
-----------------	--

Les enzymes sont réutilisables. En moyenne, chacune est capable de transformer 1 000 substrats en produit par seconde.

Les enzymes modifient la vitesse de réactions. Elles l'accélèrent en moyenne de  $10^3$  à  $10^6$  et jusqu'à  $10^{12}$ .

**Catalyseur** substance qui augmente la vitesse d'une réaction chimique sans participer ou modifier la réaction.

## Exemples des enzymes impliquées dans la digestion

La première étape de la digestion consiste à dénaturer les protéines grâce à la mise en place d'un milieu avec un pH 2. Elles sont ensuite dégradées par deux types d'enzymes de type catabolique qui agissent simultanément :

Les exopeptidases (coupent aux extrémités)	Les endopeptidases (coupent à l'intérieur)
--	--

### Les endopeptidases

Spécificité de...	Trypsine	Chymotrypsine	Endonucléase
...réaction	Hydrolyse	Hydrolyse	Hydrolyse
...liaison	Peptidique	Peptidique	Phosphodiester
...reconnaissance	Lysine, arginine	Trp, Phe, tyr	Palindrome (AG)

...position de la réaction	C-term	C-term	Oxygène et phosphore
Stéréospécificité	L	L	D

**Palindrome** séquence dont le sens est indépendant du sens de lecture.

### Les exopeptidases

Spécificité de...	Aminopeptidase	Carboxypeptidase
...réaction	Hydrolyse	Hydrolyse
...liaison	Peptide	Peptide
...reconnaissance	N-term	Carboxyle
...position de la réaction	N-term	C-term
Stéréospécificité	L	L

### Vitesse de réaction

On définit la vitesse de réaction comme la quantité de substrat se transformant en produit durant une certaine unité de temps.

La vitesse consiste à mesurer l'ampleur de la variation de concentration du produit pour une petite variation de temps.

Pour une réaction de type :  $A \rightarrow B$

$v = \frac{d[B]}{dt} = \frac{-d[A]}{dt}$	[B] est la concentration en Mol (ou mol.L <sup>-1</sup> ). $v$ vitesse en mol.L <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
--	---

On se rend compte que la vitesse d'apparition du produit est proportionnelle à la quantité de produit présent qui disparaît :

$v = k[A]$	$k$ constante de vitesse en s <sup>-1</sup>
------------	---

Cela signifie qu'à chaque instant  $k\%$  du produit A se transforme en B.

Type de réaction	$A + B \rightarrow C$	$2A \rightarrow C$	$A + \text{solvant} \rightarrow B$
Vitesse	$v = k[A][B]$	$v = k[A]^2$	$v = k[A][\text{sol}]^0$

**NB :** Dans le cas où un des réactifs est le solvant, la réaction ne change pas car sa concentration reste la même. Il y aura en revanche une diminution du volume.

### Équilibre chimique

Dans le cadre d'un équilibre chimique, c'est-à-dire de  $A + B \rightleftharpoons C + D$ .

### Réaction chimique avec catalyseur enzymatique

L'enzyme forme un complexe avec le substrat avec des liaisons :

Hydrogène	Van der Val
$[E] + [S] \rightleftharpoons [ES] \rightarrow [E] + [P]$	

Ainsi, la réaction a pour vitesse :  $v = k_2[ES]$

Dans cette réaction enzymatique, lorsque le complexe enzyme-substrat se forme, il est soit immédiatement :

Transformé en produit	(ou) Dissocié
$k_2[ES]$	$k_{-1}[ES]$

D'où la vitesse de formation du complexe ES est égale à :  $k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

### Constante et équation de Michaelis-Menten

$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$	$K_m$ constante d'état stationnaire en mol.L <sup>-1</sup>
--	--

Pour déterminer la vitesse, car on est incapable de mesurer la concentration de [ES]. L'astuce de Michaelis-Menten est d'écrire  $v = k_2[ES] \frac{[E_0]}{[E_0]}$  et d'exprimer  $[E_0]$  en fonction de [ES] :

$[E_0] = [E] + [ES]$	$[E] = K_m \frac{[ES]}{[S]}$
----------------------	------------------------------

On obtient alors pour la vitesse (équation de) :

$$v = \frac{k_2[E_0][S]}{K_m + [S]}$$

On peut déduire de l'équation :

Information	Idée	Mesure
Vitesse max	Quantité de substrat qui tend vers l'infini	On a alors $K_m \ll [S]$ d'où $v_{max} = \lim_{[S] \rightarrow +\infty} v = k_2[E_0]$ On a alors $k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E_0]}$
Efficacité de l'enzyme	Plus la vitesse est grande	Plus $k_2$ est grand
Reconnaissance	Correspond à la proportion $\frac{[E]}{[ES]}$	Plus $\frac{[E]}{[ES]}$ est petit, d'où $K_m = \frac{[E]}{[ES]}[S]$ petit.

NB : Pour  $[S] = K_m$ , on a également  $v = \frac{1}{2}v_{max}$ .

Rmq :  $V_{max}$  est atteint lorsque tous les sites actifs des enzymes sont occupés. On dit alors que la solution est saturée en substrat.

NB :  $K$  correspond à l'équilibre et  $k$  au coefficient de vitesse.

Rappel : l'absorbance est reliée à la concentration par la formule suivante :

$$A = \epsilon \cdot [C] \cdot l$$

## Linéarisation

La vitesse peut être facilement linéarisée en posant :  $\frac{1}{v}$

Pour

$[S] = 0 \rightarrow v = \frac{1}{v_{max}}$	$v_i = 0 \rightarrow \frac{1}{[S]} = \frac{-1}{K_m}$
---	--

Point méthode :

- Pour savoir si la réaction enzymatique de type Michaelis-Mentens, on vérifie que  $f\left(\frac{1}{[S]}\right) = \frac{1}{[P]}$  est une droite.
- On détermine les constantes  $v_{max}$  et  $K_m$  d'après le graphique.

## Les inhibiteurs de l'activité enzymatique

Les inhibiteurs permettent à la cellule de contrôler la vitesse de réaction pour s'adapter à ses besoins métaboliques en modulant l'activité enzymatique.

Les inhibiteurs peuvent se lier fortement ou temporairement à l'enzyme.

Rmq : Une partie des toxines et des poisons agissent comme des inhibiteurs.

Il existe deux grands types d'inhibition :

	Compétitive	Non compétitive
Site bloqué par l'inhibiteur	Reconnaissance	Catalyse
Modifie	Équilibre entre enzyme et substrat	Efficacité de l'enzyme
Affinité enzyme-inhibiteur	$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$	$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$
$[E_0] =$	$[E] + [EI] + [ES]$	$[E] + [EI] + [EIS] + [ES]$
Rmq	$v_{max}$ ne change pas	$K_m$ ne change pas

NB : Il existe d'autres inhibiteurs hybrides.

## Inhibiteur compétitif

L'inhibiteur compétitif se lie sur le site réactionnel de l'enzyme à la place d'une substrat. Cela se traduit par une diminution de l'affinité du substrat avec l'enzyme.

$$v_i = \frac{v_{max}[S]}{K_m(1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]} = \frac{v_{max}[S]}{K_{mI} + [S]}$$

Remarque : On modifie la reconnaissance  $K_m < K'_m = K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})$

La constante d'inhibition :

$$K_i = \frac{K_m \cdot [I]}{K_{mI} - K_m}$$

$K_i$  est la quantité d'inhibiteurs nécessaire pour complètement arrêter la réaction. L'inhibition peut être levée en ajoutant du substrat.

### Inhibiteur non compétitif

$$v_{maxI} = \frac{v_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Remarque : L'inhibiteur rend l'enzyme moins efficace (efficacité catalytique) ( $v_{max}$  plus petit).

$$v_i = \frac{v_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \times \frac{[S]}{K_m + [S]} = \frac{v_{maxI}[S]}{K_m + [S]}$$

$$K_i = \frac{v_{maxI} \cdot [I]}{v_{max} - v_{maxI}}$$

### Effet du pH et de la température

Les enzymes sont sensibles aux conditions de l'environnement notamment à cause de leur structure moléculaire, une enzyme possède des AA

Chargés et polaires en périphérie	Apolaires au centre
-----------------------------------	---------------------

Un organisme fabrique plusieurs enzymes légèrement différentes qui répondent au même besoin mais dont les conditions optimales de fonctionnement sont différentes. On parle d'isoenzyme.

**Isoenzyme** enzyme qui fonctionne de manière optimale dans des conditions physicochimiques différentes.

### Effet du pH

Le changement de pH modifie l'activité de l'enzyme car cela modifie les AA polaires notamment la cystéine et les AA chargés impliqués sur le site reconnaissance et de catalyse.

Rappel : Si le  $pH > pK_a + 1$  alors l'espèce sera déprotonée à 90%.

Rmq : On peut modifier le pH pour déterminer les AA impliqués dans la reconnaissance et la catalyse.

### Effet de la température

L'augmentation de la température a deux effets antagonistes sur les enzymes :

- Elle augmente la rencontre entre les molécules ce qui a tendance à accélérer la réaction.
- Elle provoque une dénaturation de l'enzyme et une diminution de son affinité avec le substrat en provoquant la cassure des liaisons hydrogènes et de Van der Waal.

### Mécanisme de protection

Les enzymes sont stabilisées par :

- Le complexe qu'elles forment avec le substrat grâce aux liaisons hydrogènes et de Van Der Waal.
- Grâce à des petits cations bivalents avec deux charges comme  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  qui entrent dans la structure moléculaire et la stabilisent via des liaisons ioniques. Par opposition, les métaux lourds comme le plomb  $Pb^{2+}$  et le mercure  $Hg^{2+}$ , qui sont beaucoup plus gros, auront tendance à distordre la structure des enzymes.

NB : les métaux lourds sont des inhibiteurs toxiques.

## Interaction ligand récepteur

On considère le ligand comme la molécule qui se déplace et qui interagit avec une autre molécule, appelée récepteur, qui se trouve souvent à l'intérieur de la cellule.

### Les ligands en biologie

En biologie, les ligands sont soit de type :

	Liposoluble	Hydrosoluble
Position du récepteur	A l'intérieur de la cellule	À l'extérieur de la cellule

Rmq : le récepteur est parfois appelé site de reconnaissance.

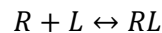
Les principaux récepteurs en biologie sont :

- Les kinases (protéine capable de phosphoryler).
- Les récepteurs couplés aux protéines G.
- Les facteurs de transcription.

En fonction du type d'action que provoque le ligand, on dit qu'il est :

Agoniste lorsqu'il active/déclenche	Antagoniste lorsqu'il bloque l'activité
-------------------------------------	---

### Formalisation de l'interaction ligand récepteur



On note :

Association	Dissociation
$v_{ass}$ vitesse	$v_{diss}$ vitesse
$k_a$ constante d'association	$k_d$ constante de dissociation

À l'équilibre la vitesse d'association est égale à celle de dissociation. Les concentrations des différentes espèces chimiques n'évoluent plus. On a :

La constante d'affinité à l'équilibre	La quantité de récepteur
---------------------------------------	--------------------------

$$K_d = \frac{k_{diss}}{k_{ass}} = \frac{[L][R]}{[RL]}$$

$$[R_0] = [R] + [RL]$$

On obtient alors :

Concentration de [RL]	Proportion de [RL]
$[RL] = \frac{R_0 \cdot [L]}{K_d + [L]}$	$\frac{[RL]}{[R_0]} = \frac{[L]}{K_d + [L]}$

Rmq : lorsque  $RL = \frac{R_0}{2}$  on a  $K_d = L$ .

### Linéarisation

On utilise la linéarisation pour déterminer :

- $B_{max}$  nombre de sites récepteurs total ou capacité fixatrice.
- $R_0$  concentration de récepteurs (en Mol).
- $N = \frac{B_{max}}{[R]}$  nombre de sites par mol.

$$\text{On a : } \frac{[RL]}{[L]} = \frac{-1}{K_d} [RL] + \frac{R_0}{K_d}$$

En ordonné, on a la quantité de ligand liée par rapport à celle libre.

Les points remarquables obtenus sont :

Pour $[RL] = 0$ on a $y = B_{max}$	$a = \frac{-1}{K_d}$	Pour $y = 0$ on a $[RL] = R_0$
------------------------------------	----------------------	--------------------------------

Attention : on ne s'intéresse qu'au ligand : lié et libre.

**Dialyse** méthode de purification pour isoler certains composés en fonction de leur taille. On les sépare grâce à une membrane qui ne laisse passer que les molécules inférieures à une certaine taille.

Point méthode : dans le TD, on utilise les deux points les plus éloignés pour déterminer les coefficients de la droite.

### Protocole expérimental

La quantité de ligands et de récepteurs initiale est connue. Pour mesurer les nombres l'association des deux composées, on fait interagir les deux

composés en solution. Pour connaître la quantité de ligands récepteurs, on utilise un filtre qui est imperméable au récepteur et perméable au ligand non lié. On peut alors mesurer la concentration de ce dernier et déduire les autres.

### **Ligand non spécifique**

Certains ligands ne sont pas spécifiques c'est-à-dire qu'en plus d'être d'interagir avec les parties spécifiques du récepteur, ils sont capables de se lier avec des régions non spécifiques du récepteur ou d'autres molécules. Dans le cas, il faut réaliser une seconde expérience pour connaître le nombre de liants non spécifiques.

On reprend la solution de départ et on la sature en ligands non marqués. Le liant marqué spécifiquement lié est alors remplacé par du non marqués mais la quantité de liant marqué non spécifique n'est pas modifiée.

Expérience A : Ligand marqué non lié

Expérience B : Ligand marqué spécifique + ligand marqué non lié

La différence des concentrations permet d'obtenir le liant non spécifique.