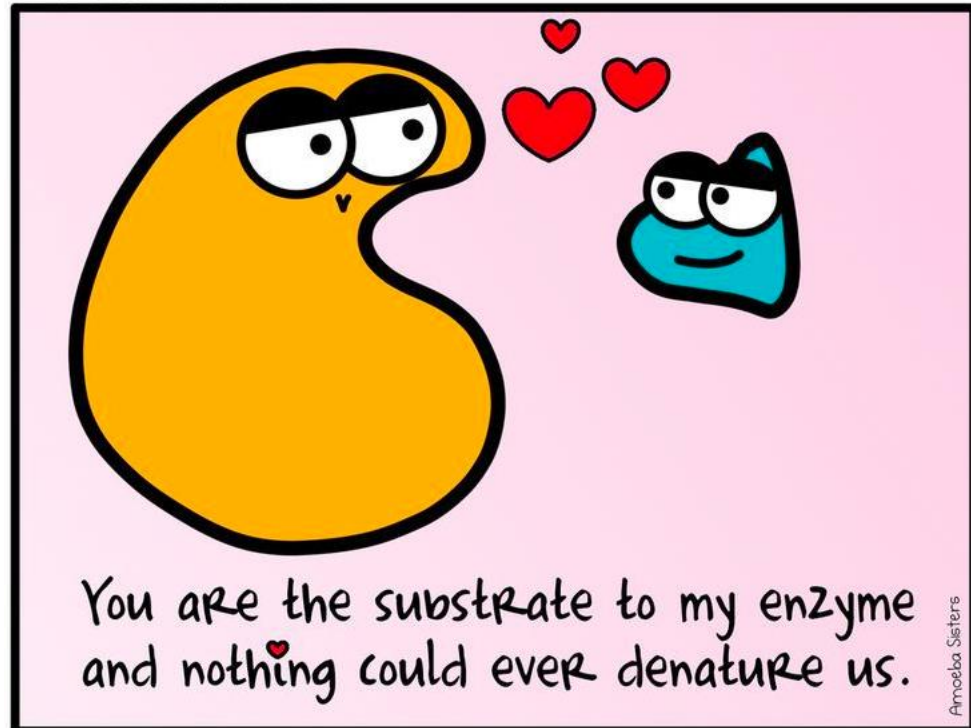


ENZYMOLOGIE

Pr Jonathan LOPEZ

PASS – UE2

Paramecium Parlor



0 Posez vos questions pendant le cours



- 1 Allez sur wooclap.com
- 2 Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement
RKAZOG

0 Préambule

- **ENZYMES = catalyseurs des réactions chimiques** qui se déroulent chez les êtres vivants

- **Protéines (ou ARN)**

- **Spécificité d'action élevée**

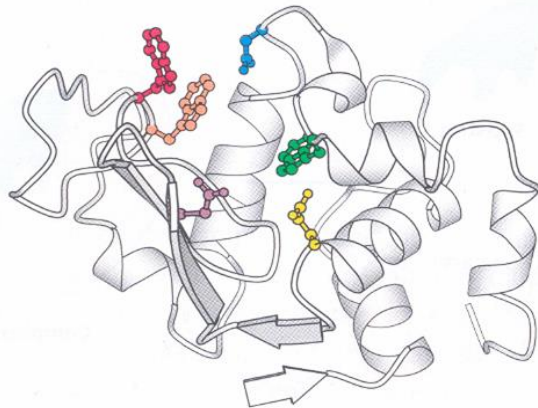
- **Accélération de la vitesse**

- **Spécificité de substrat**

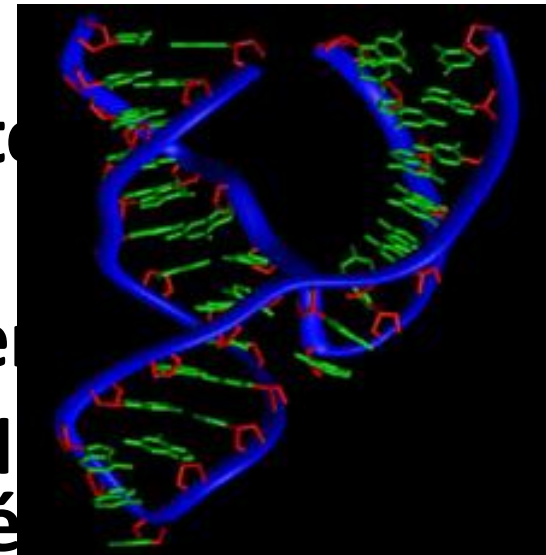
- **Spécificité de réaction**

- **Spécificité de localisation**

favorisée sur le plan énergétique



Protéine enzymatique



Ribozyme

0 OBJECTIFS PEDAGOGIQUES

- CONNAÎTRE le MECANISME de la **CATALYSE ENZYMATIQUE**
- SAVOIR CALCULER les **paramètres CINETIQUES** d'une réaction enzymatique
- SAVOIR différencier les **INHIBITEURS compétitifs et non compétitifs**
- COMPRENDRE le principe d'**ALLOSTERIE**
- SAVOIR EXPLIQUER le principe du **dosage d'un SUBSTRAT ou d'une ENZYME**

0 PLAN

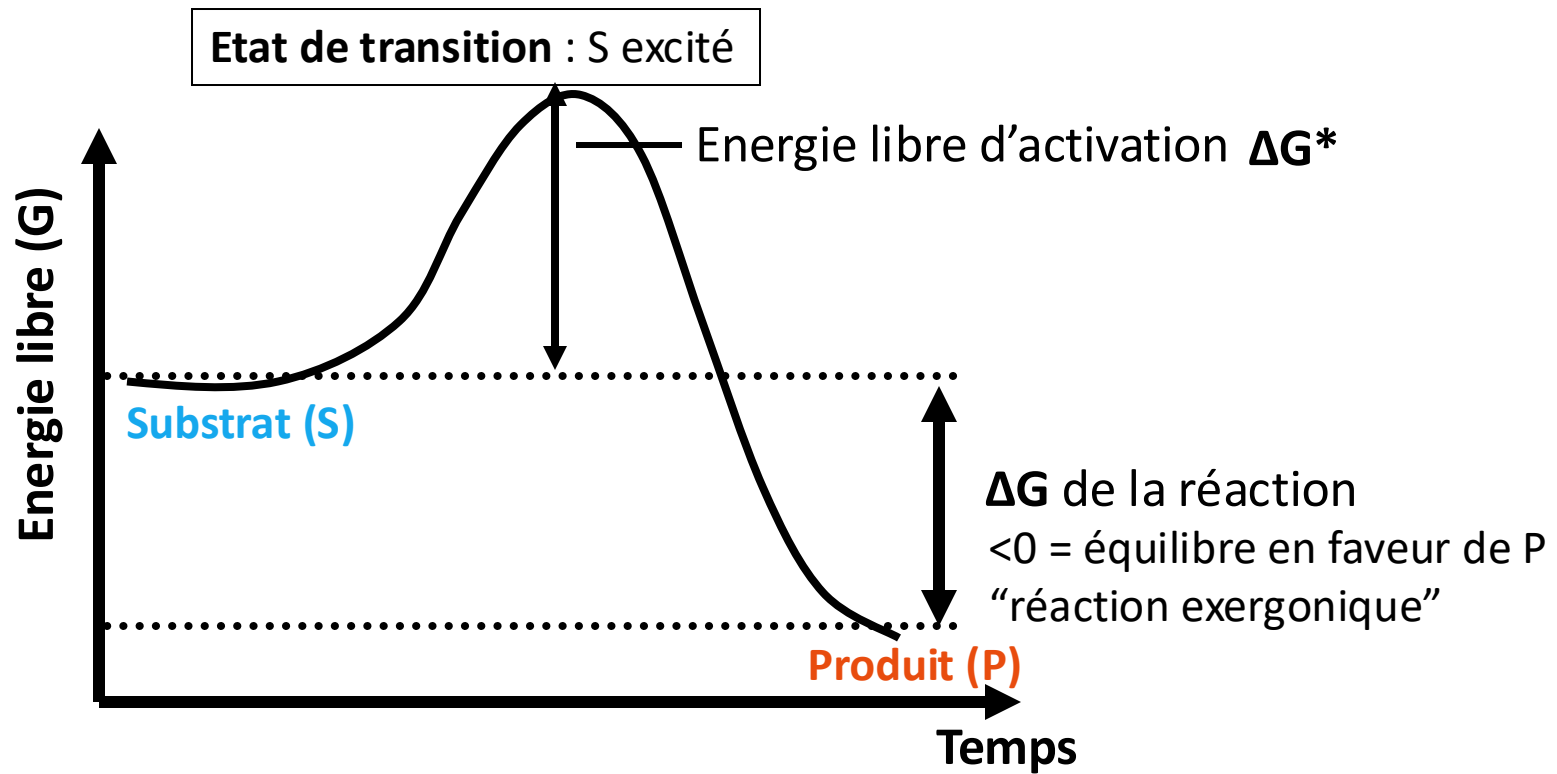
- **Pouvoir catalytique des enzymes**
- **Cinétiques enzymatiques**
- **Inhibiteurs enzymatiques**
- **Allostérie**

1 Notion de catalyse

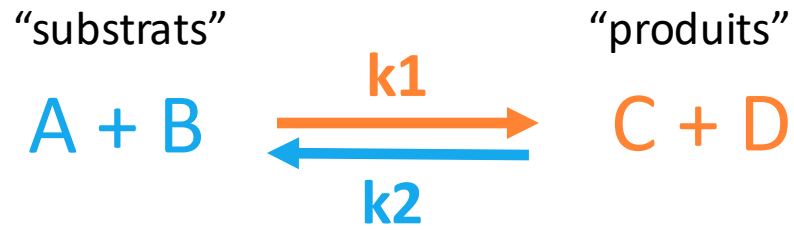
- Une réaction enzymatique obéit aux **lois de la chimie**
- Possible que si :
 - Réactifs = **Substrats (S) en contact proche**
 - Collision entre les substrats selon une **orientation adéquate**
 - Substrats possèdent une **énergie d'activation suffisante**
- **ENZYMES orientent correctement les substrats** ⇒ **diminue l'énergie d'activation**
⇒ **augmente la vitesse de réaction**

1 Etat de transition

Variation de l'énergie libre au cours de la réaction



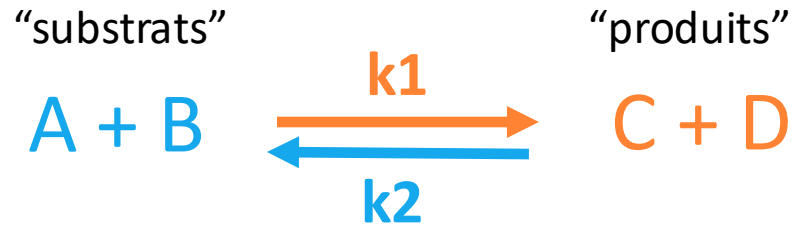
① ΔG d'une réaction



A l'équilibre, on a :

$$K_{\text{éq}} = \frac{[C][D]}{[A][B]} = \frac{k_1}{k_2}$$

① ΔG d'une réaction



$$\Delta G = \Delta G^{0'} + RT \cdot \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

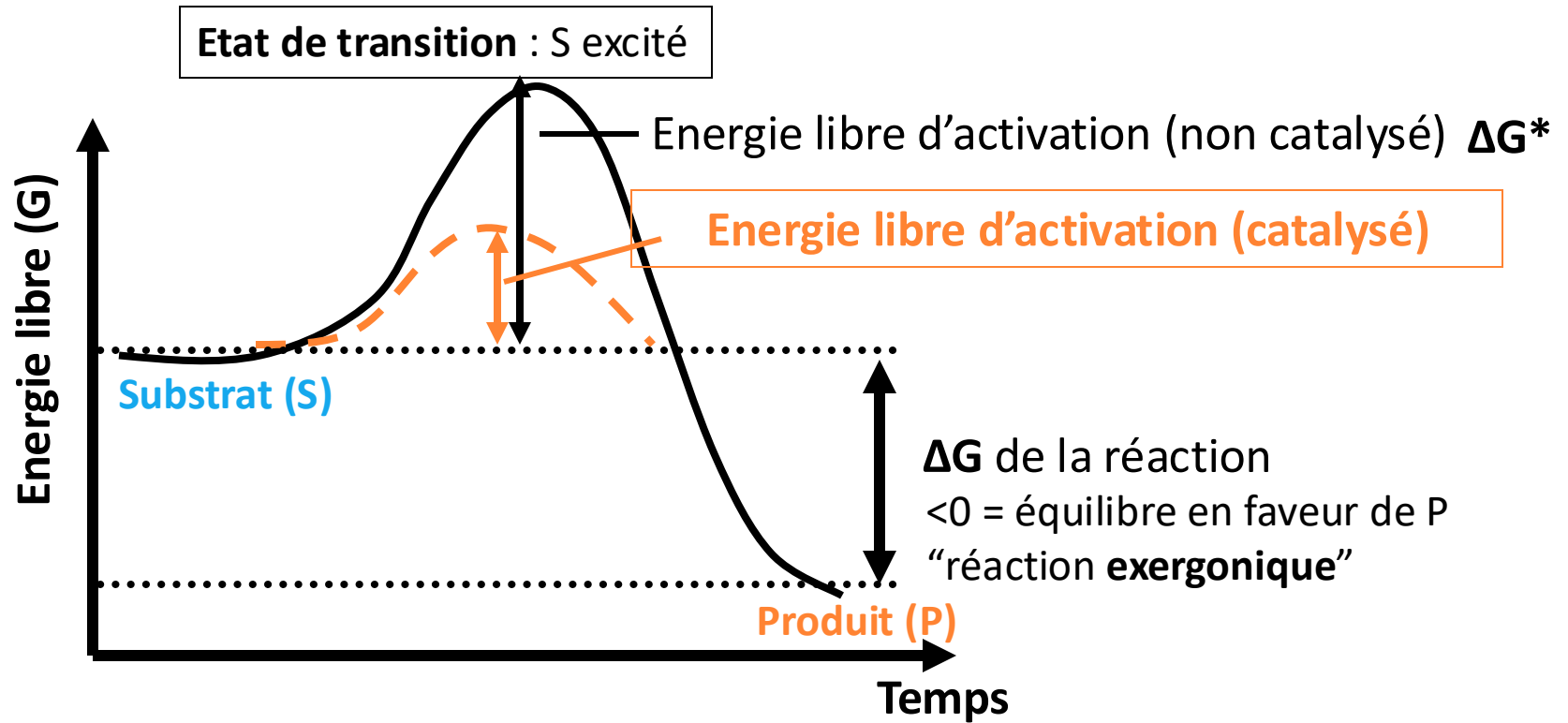
Variation d'énergie libre standard

à $T=25^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,0$, concentrations A, B, C et D = 1 mol.L⁻¹

- ⇒ ΔG dépend des conditions physiologiques de la réaction
- ⇒ $\Delta G^{0'}$ indique sens et intensité de la réaction

1 Etat de transition

Variation de l'énergie libre au cours de la réaction

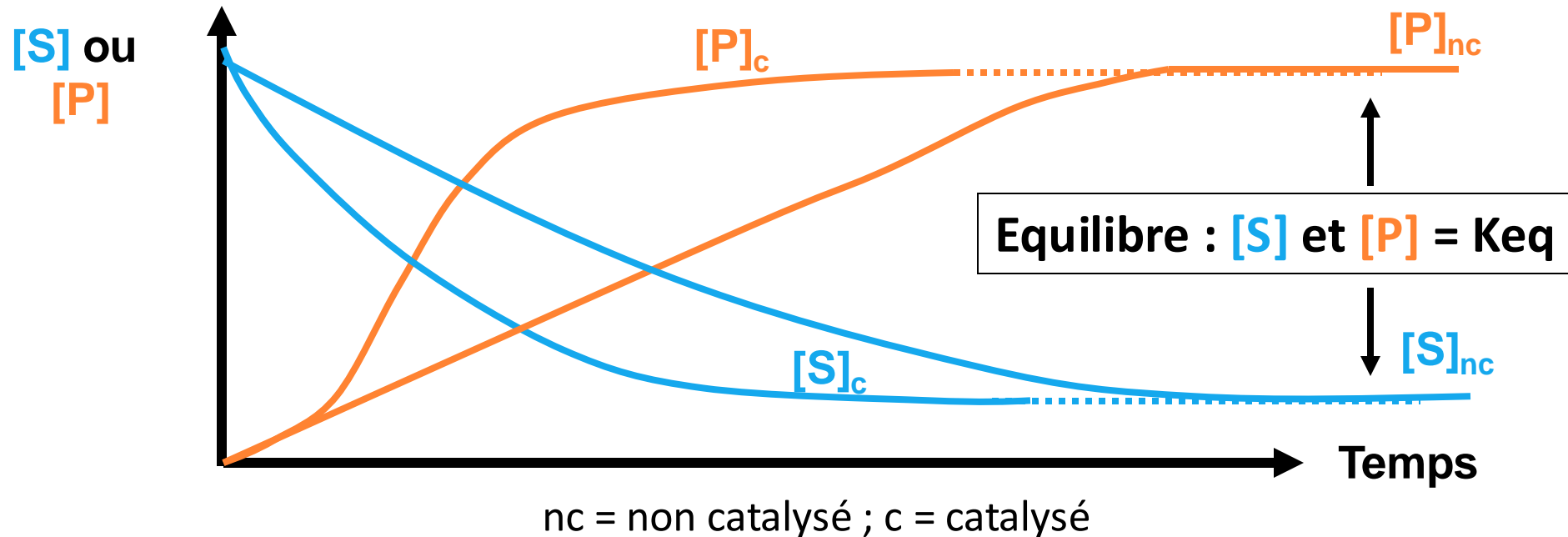


1 ΔG d'une réaction

- Les enzymes **ne peuvent pas** rendre possible une réaction **endergonique** ($\Delta G > 0$)
- Plus l'énergie d'activation ΔG^* est **élevée** plus la **réaction est lente**
- Les enzymes **accélèrent** les réactions chimiques en abaissant ΔG^* **mais ne déplace pas l'équilibre** de la réaction (concentrations de S et P à l'équilibre) qui ne dépend que de ΔG .

1 Notion de catalyse

Enzyme \Rightarrow plus vite à l'équilibre



Constante catalytique K_{cat} (s^{-1})

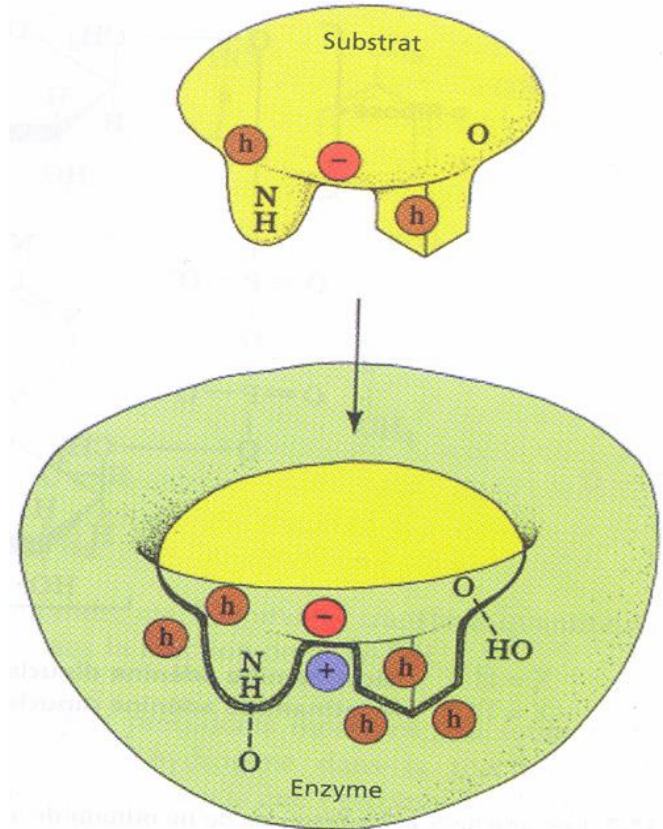
nb de moles de S transformées par mole d'E par sec

1

Complexe enzyme-substrat : notion de site actif

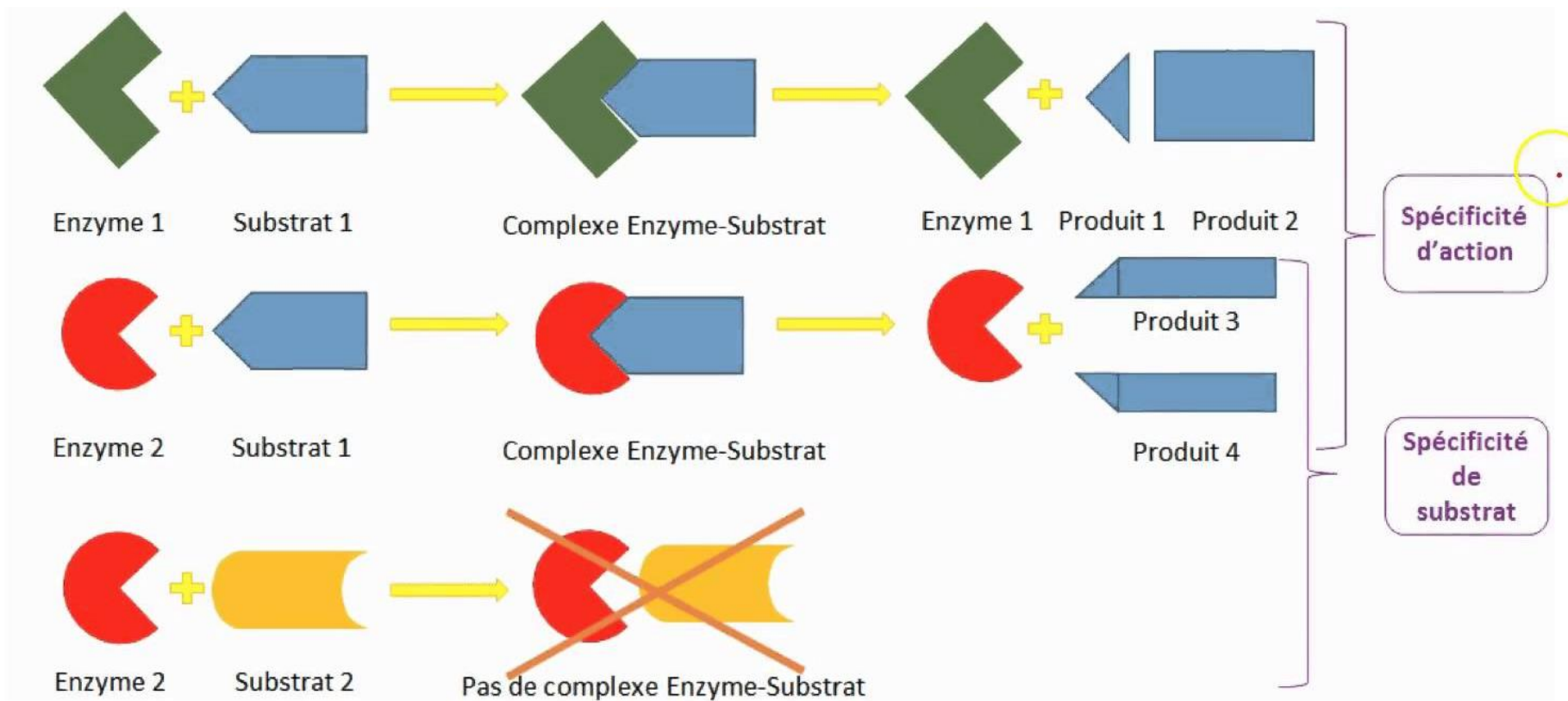
- Interaction entre E et S :
slt quelques AA = **site actif de l'enzyme**
- **Complémentarité** entre le site actif de E et S
 - **spatiales** (formes 3D)
 - **physiques** (liaisons entre groupements voisins)

⇒ **spécificité +++**



① Spécificité enzymatique

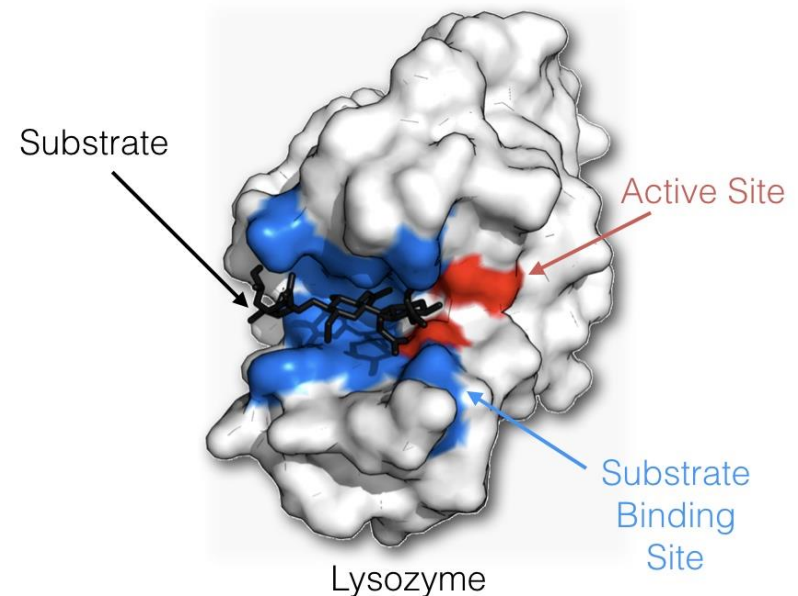
■ Double spécificité : d'action et de substrat



1

Complexe enzyme-substrat : notion de site actif

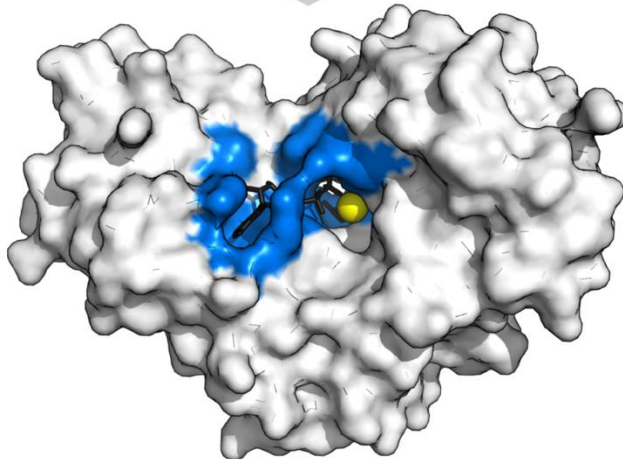
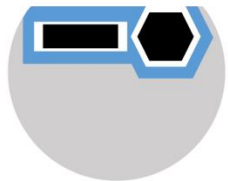
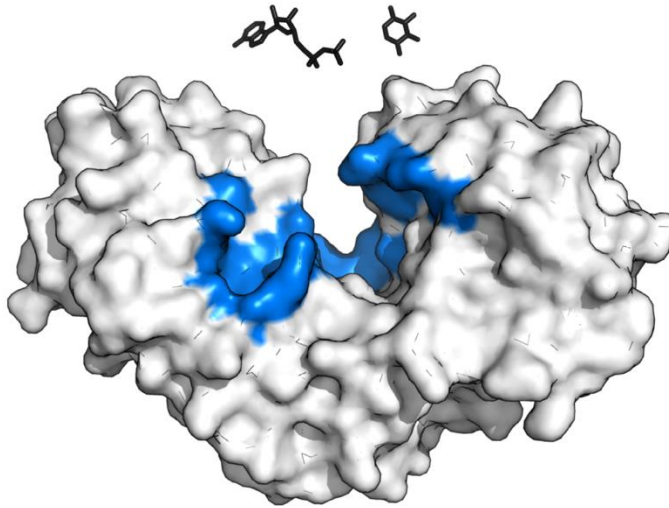
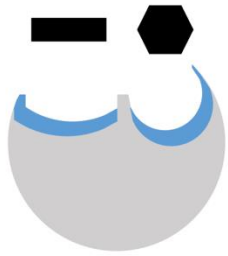
- 2 groupes d'AA dans le site actif
 - **Site de fixation :**
reconnaissance spatiale du substrat et établissement de liaisons faibles $\Rightarrow \Delta G^*$
 - **Site catalytique :**
transformation chimique de S en P



Site de fixation + site catalytique = site actif

1

Complexe enzyme-substrat : modèles d'interaction E-S

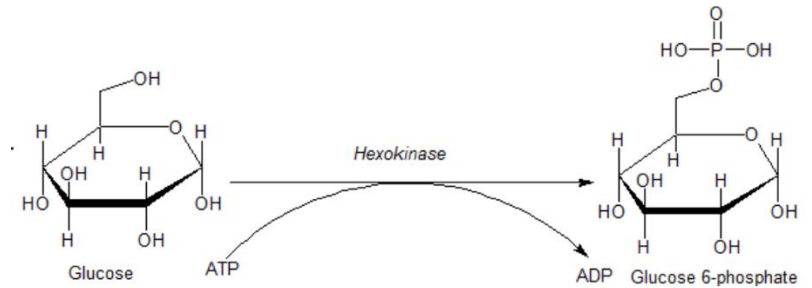


Enzyme : Hexokinase

Substrat : Glucose

Co-substrat : ATP

Cofacteur : Mg^{2+}



① Notion de cofacteur

- **Cofacteur : non protéique**
 - Liaison sur un **site spécifique différent de celui de fixation des substrats**
 - **Indispensables** à l'activité et/ou à la structuration de l'enzyme
 - **Retrouvent leur état initial en fin de réaction** alors que le substrat est transformé

① Notion de cofacteur

- Cofacteur : **non protéique**
 - Ions métalliques (Zn^{2+} , Mg^{2+} ...)
 - Groupements prosthétiques ou **coenzymes liés**
⇒ **régénération en fin de réaction**
 - Coenzymes mobiles ou **libres**
⇒ **liaison à une autre enzyme pour se régénérer**

1 Cofacteurs : ions métalliques

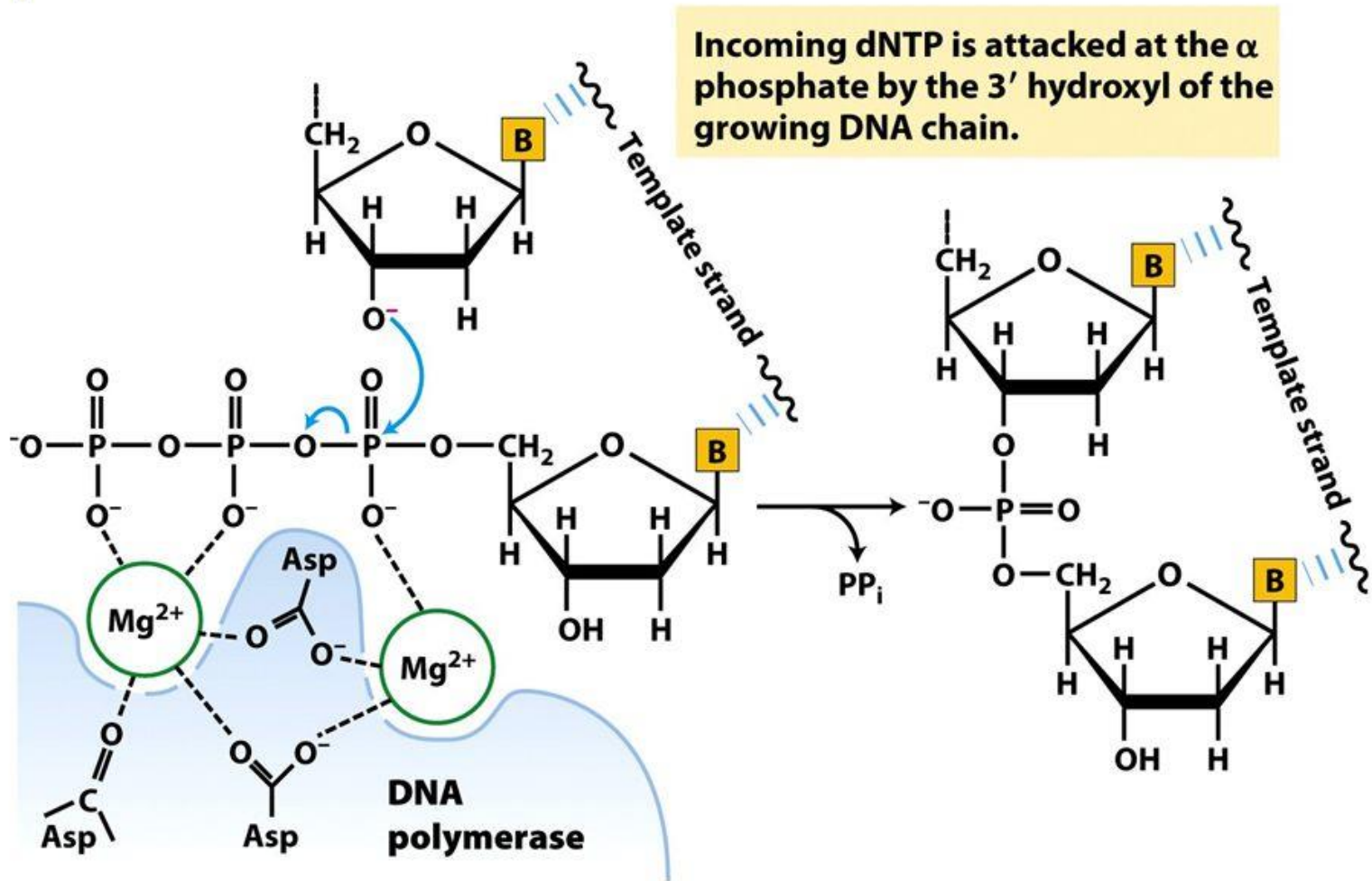
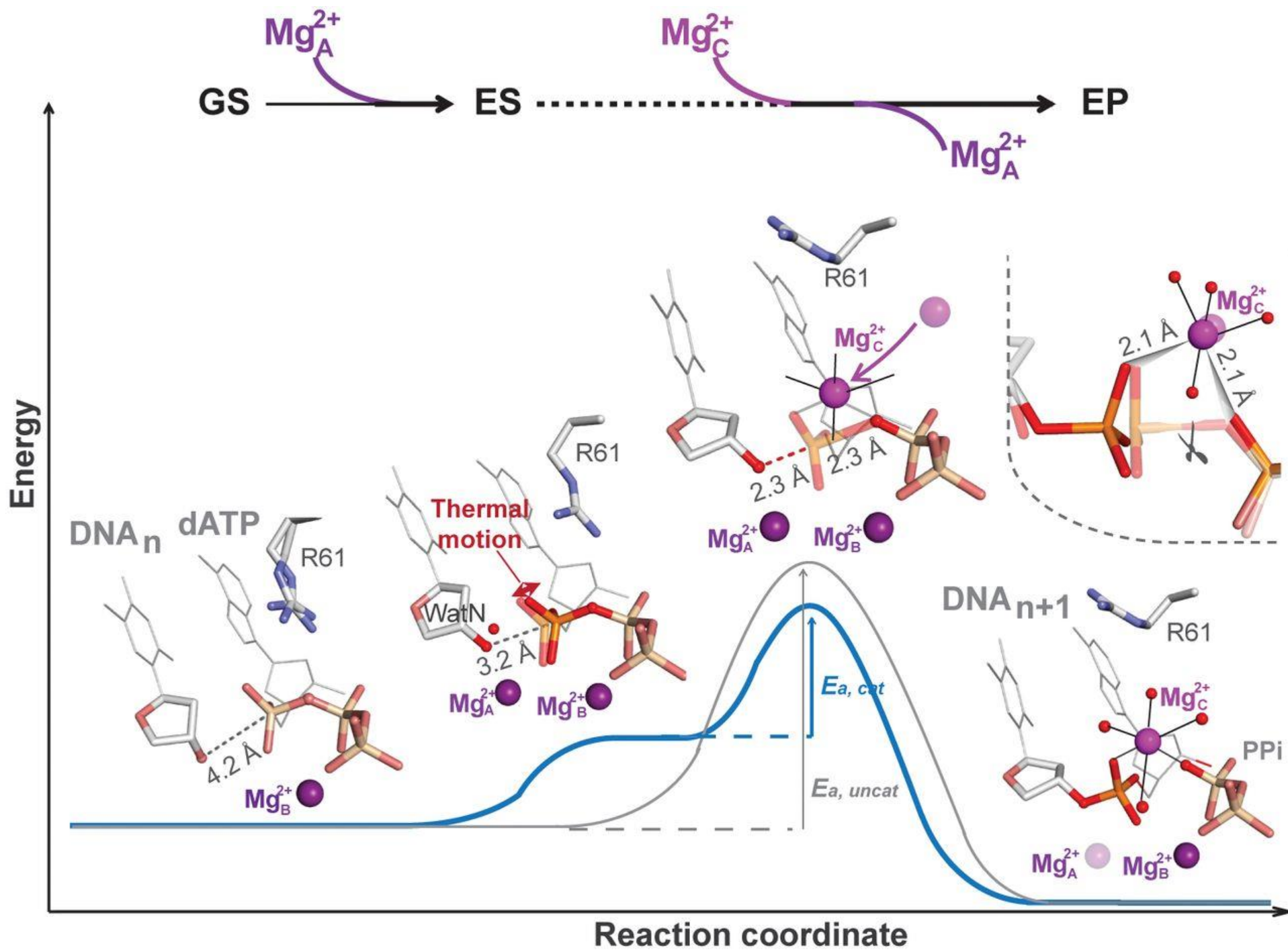
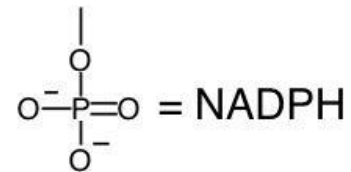
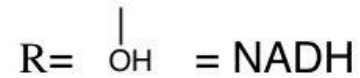
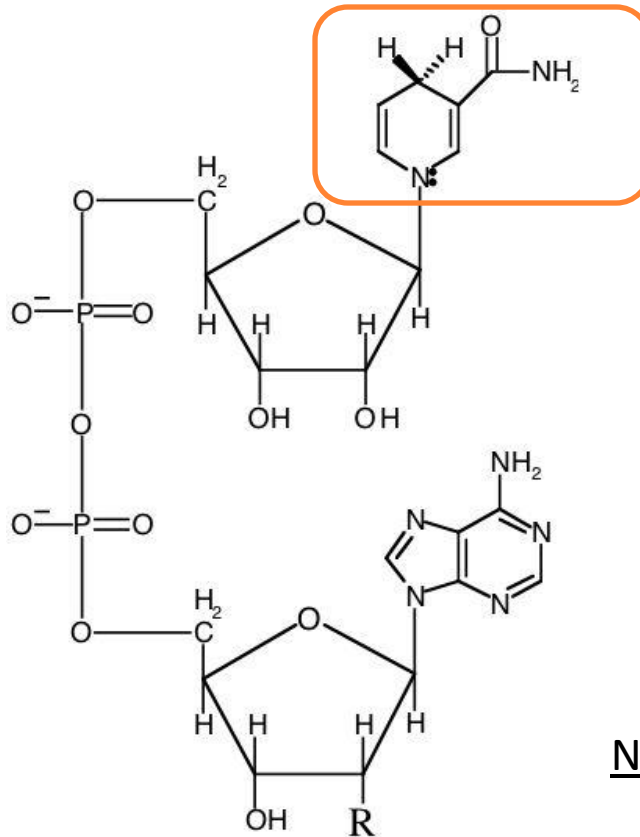


Figure 25-5b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



1 Cofacteurs : coenzymes libres

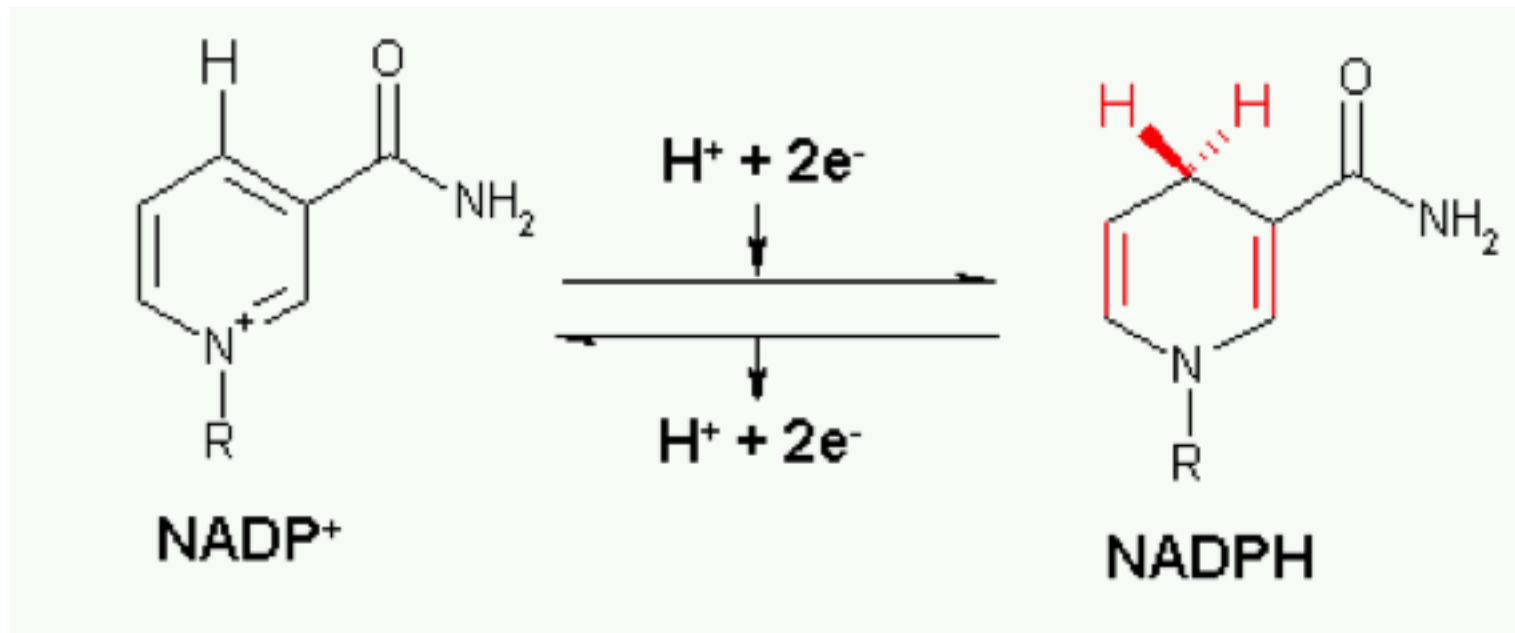
■ Coenzymes libres (**non régénérés** en fin de R)



Nicotinamide Adénine Dinucléotide

① Cofacteurs : coenzymes libres

■ Coenzymes libres



OXYDÉ

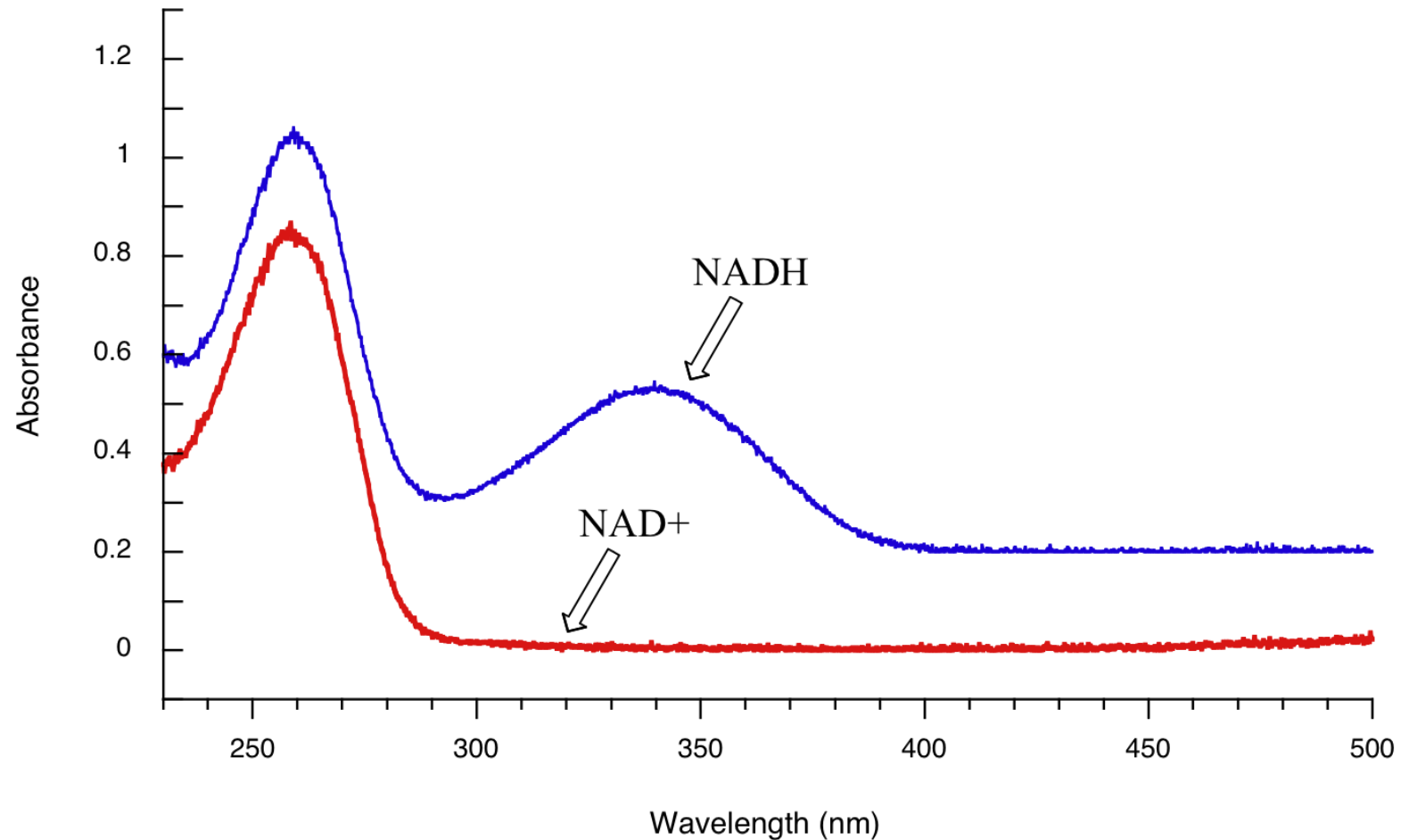
RÉDUIT

N'absorbe PAS à 340nm

ABSORBE à 340nm

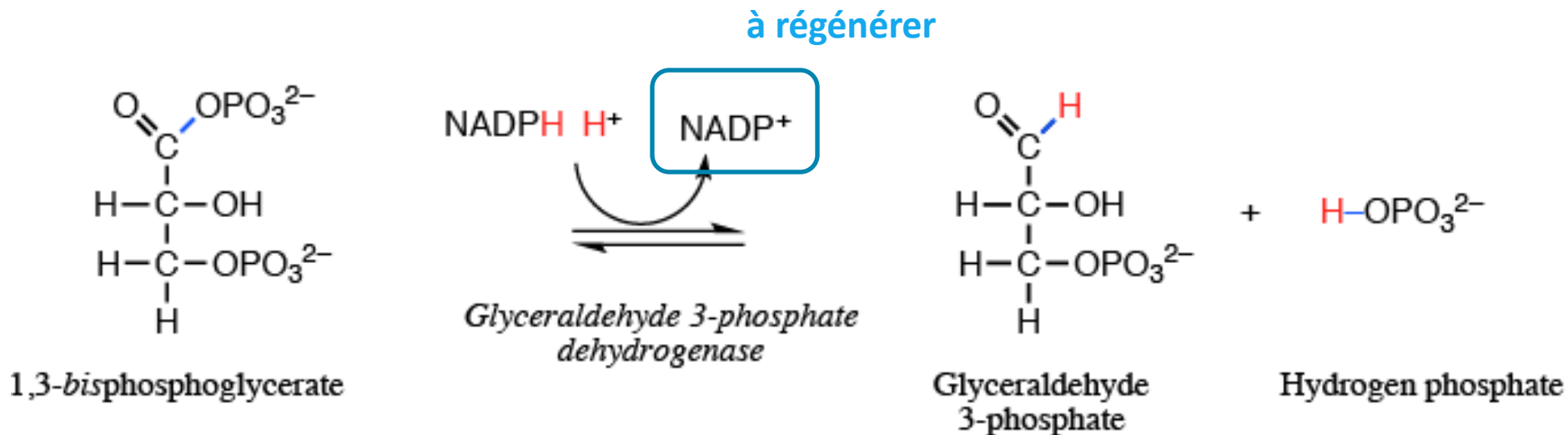
1 Cofacteurs : coenzymes libres

■ Coenzymes libres



① Cofacteurs : coenzymes libres

■ Coenzymes libres



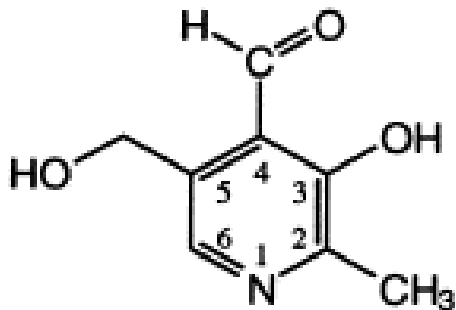
Suivi de la cinétique de cette réaction ?

Diminution de A(340nm)

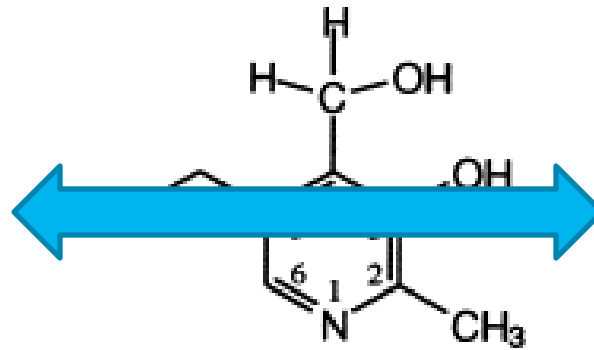
1 Cofacteurs : coenzymes liés

■ Coenzymes liés (**régénérés** en fin de R)

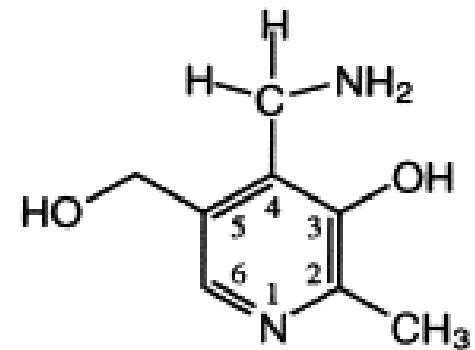
Pyridoxal



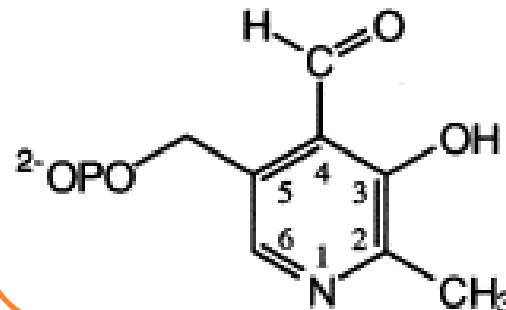
Pyridoxine (vit B6)



Pyridoxamine



Pyridoxal 5'-Phosphate

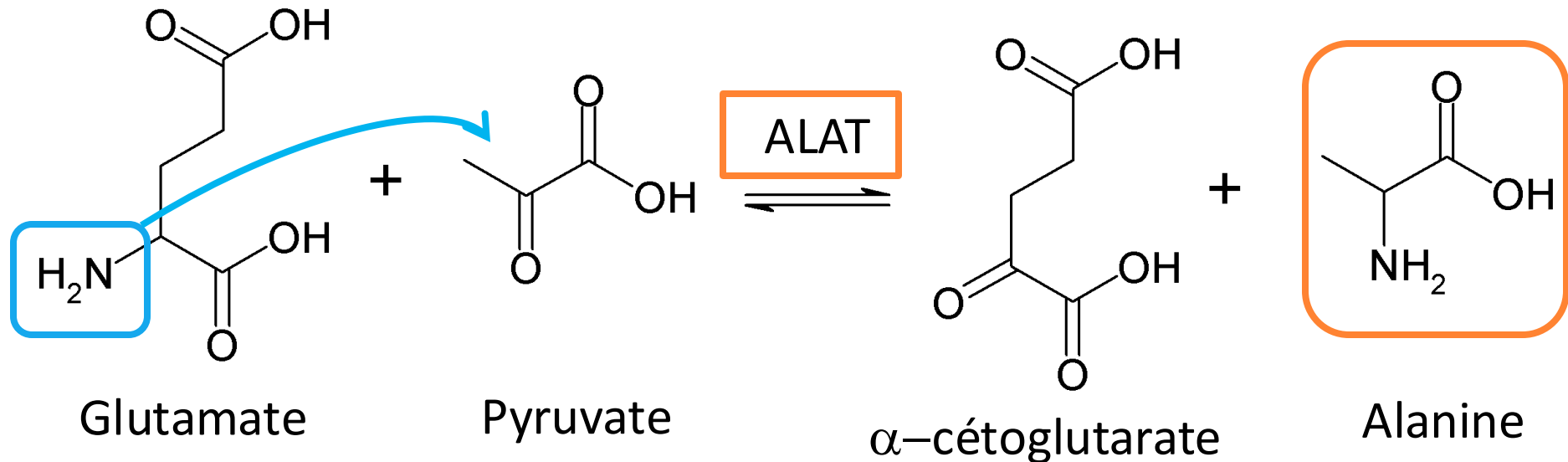


Transfert de
groupements
NH₂

1 Cofacteurs : coenzymes liés

■ Coenzymes liés : mécanisme PING-PONG

Transaminase Glutamate-pyruvate (TGP)
= Alanine aminotransférase (ALAT)



① Cofacteurs : coenzymes liés

■ Coenzymes liés : mécanisme PING-PONG

Transaminase Glutamate-pyruvate (TGP)
= Alanine aminotransférase (ALAT)

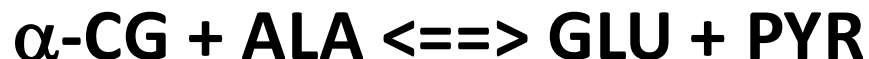
Sens PING :



Sens PONG :



Cycle complet « PING-PONG »:



0 Posez vos questions pendant le cours



- 1 Allez sur wooclap.com
- 2 Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement
RKAZOG

0 PLAN

- Pouvoir catalytique des enzymes
- **Cinétiques enzymatiques**
- Inhibiteurs enzymatiques
- Allostérie

2 Cinétique enzymatique

- Etude de la **vitesse des réactions catalysées** par les enzymes
- Applications +++ en biologie médicale
 - Mesure de la **concentration d'un substrat** dans un milieu biologique
 - Mesure de **l'activité d'une enzyme**
 - **Automatisation +++**



② Cinétique enzymatique

- Vitesse réactionnelle (v)

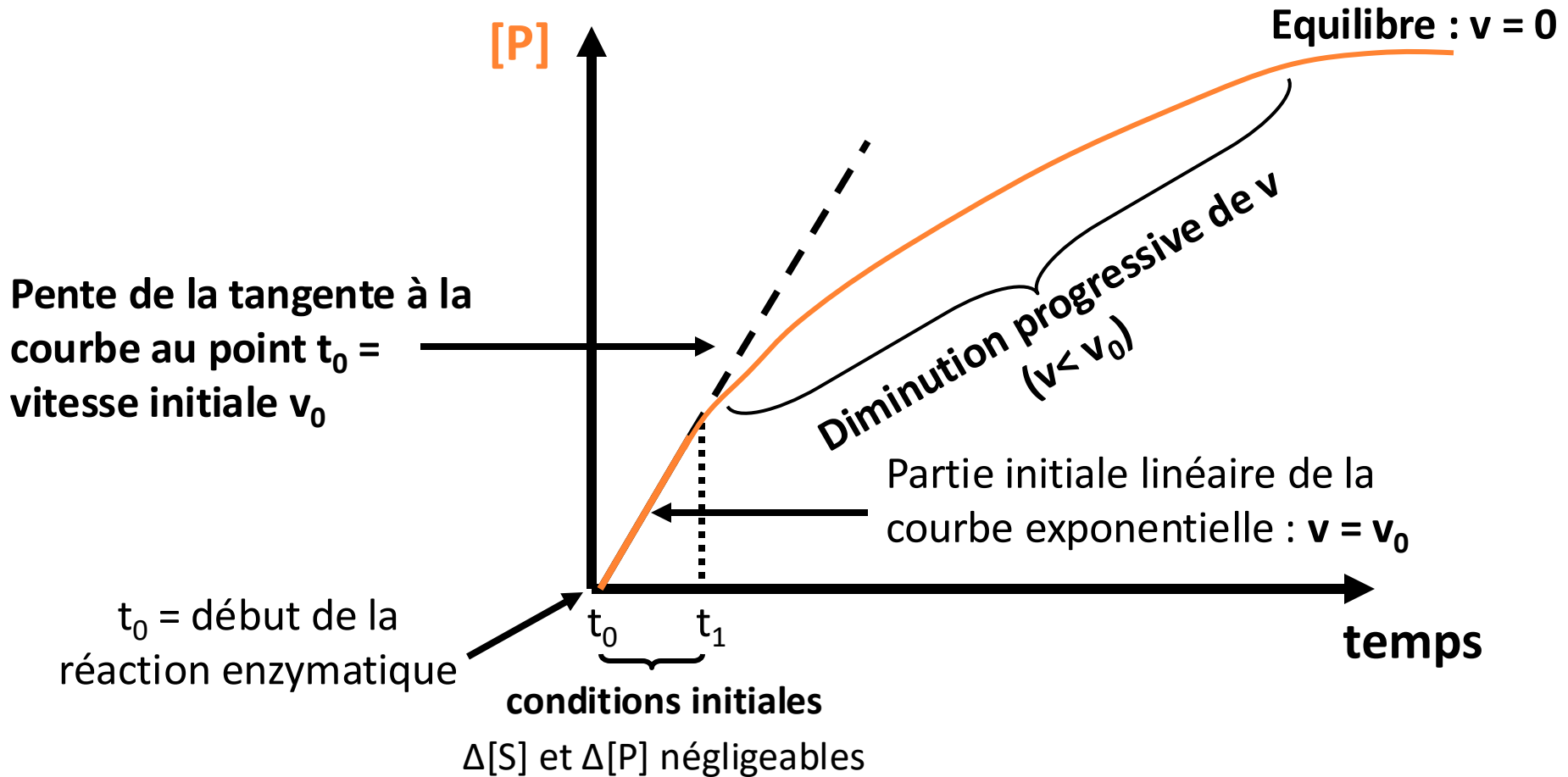
$$v = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_t$$

- Vitesse initiale (v_0)

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{t_0}$$

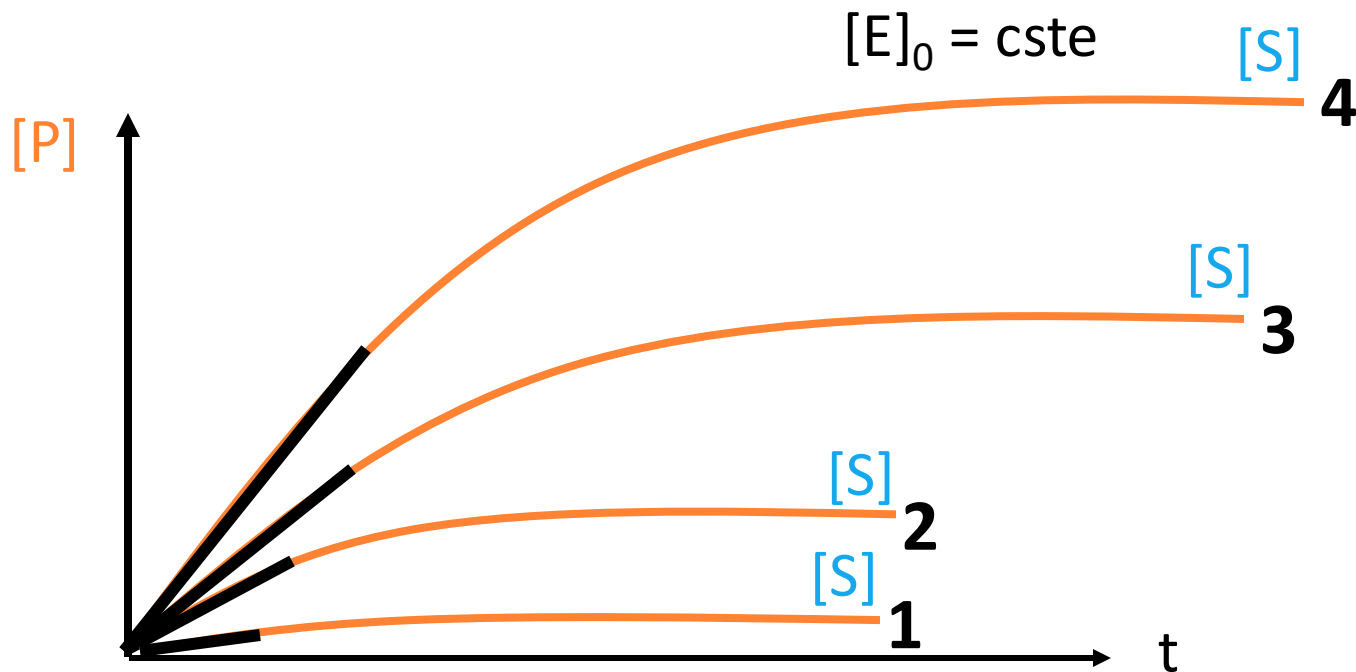
2 Cinétique enzymatique

Evolution de la vitesse de réaction enzymatique en fonction du temps



2 Cinétique enzymatique

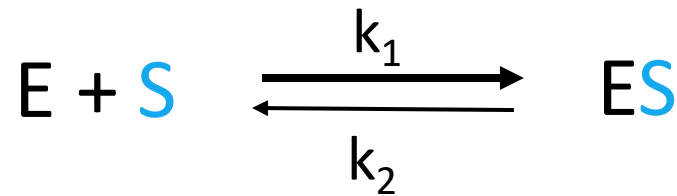
Influence de la concentration de substrat $[S]$
sur la vitesse de la réaction pour $[E]_0 = \text{constante}$



V_0 augmente avec la concentration initiale en substrat jusqu'à une valeur limite (V_{max}) = saturation de E par S

② Equation de Michaelis-Menten

- 1^{ère} étape = formation du complexe intermédiaire **ES** (essentiel à la catalyse)



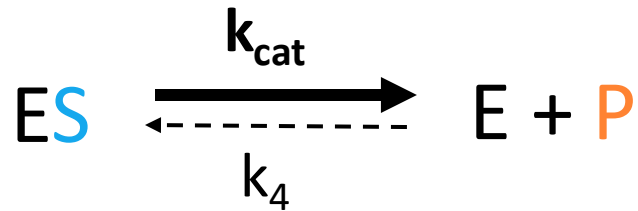
$$k_1/k_2 = K_{\text{aff}} = 1/K_d$$

K_{aff} : constante d'affinité

K_d : constante de dissociation

② Equation de Michaelis-Menten

- 2^{ème} étape = catalyse



Rappel : K_{cat} (s^{-1}) = nb de moles de S transformées par mole d'E par sec

E retrouve toujours son état initial à la fin de la réaction et peut donc catalyser une nouvelle réaction

2 Equation de Michaelis-Menten

■ Ensemble du processus



$$[ES] = \frac{k_1}{k_2 + k_{\text{cat}}} [E][S]$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_{\text{cat}}}{k_1}$$

constante de Michaelis (mol.L⁻¹)

② Equation de Michaelis-Menten

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

Relation entre la vitesse de la réaction et la concentration en substrat
pour les enzymes "michaeliennes"

2 Signification de K_m

$$K_m = \frac{k_2 + k_{cat}}{k_1}$$

- **[S] pour avoir $v = v_{max}/2$**
- **Caractéristique d'un couple enzyme-substrat**
- **Dépend des conditions expérimentales (pH, température...)**
- **Souvent compris entre 10^{-1} et 10^{-7} M**

2 Signification de K_m

Rappel : $k_1/k_2 = K_{\text{aff}} = 1/K_d$

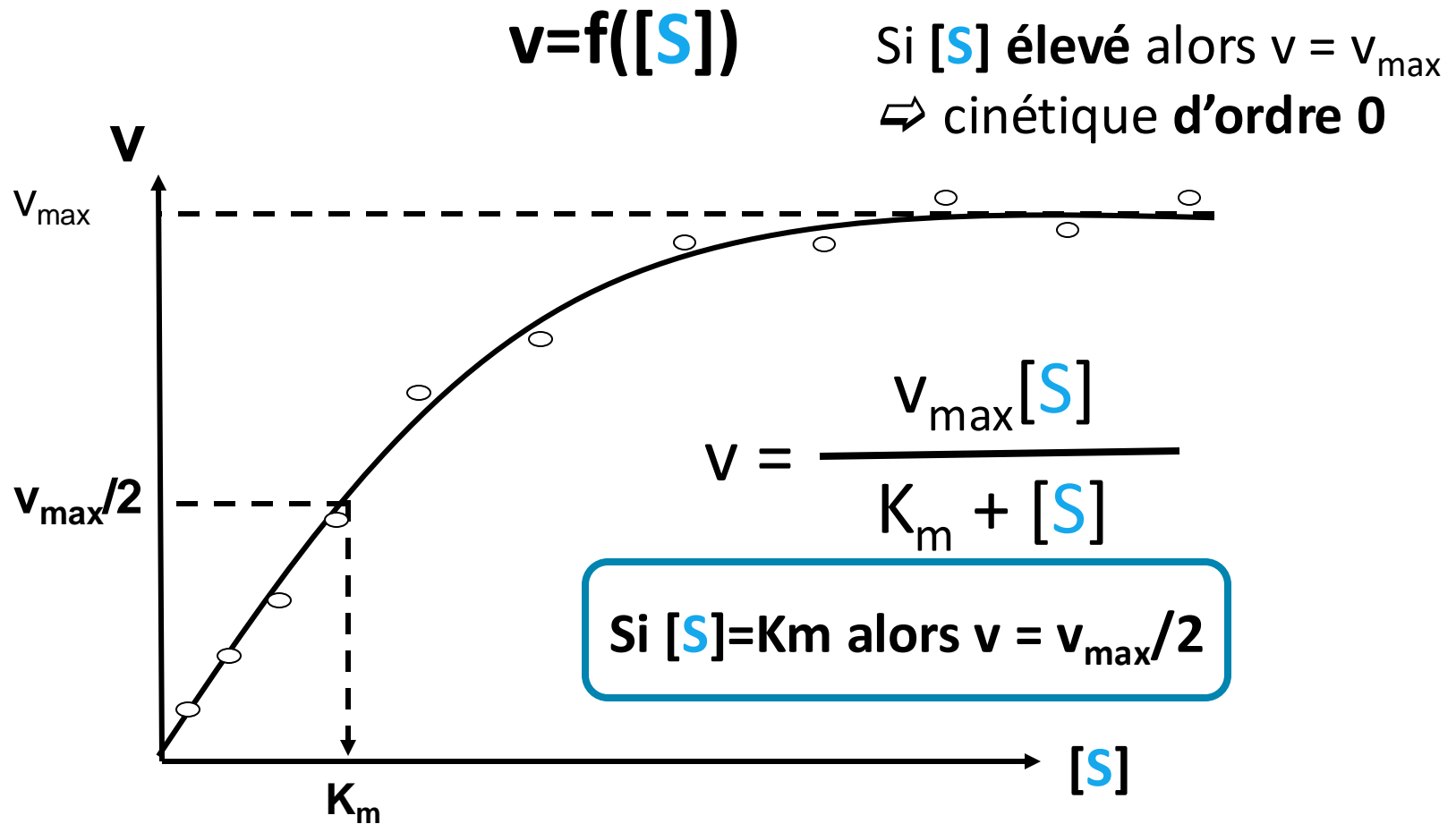
$$K_m = \frac{k_2 + k_{\text{cat}}}{k_1} = \frac{k_2}{k_1} + \frac{k_{\text{cat}}}{k_1} = \frac{1}{K_{\text{aff}}} + \frac{k_{\text{cat}}}{k_1}$$

$k_{\text{cat}} \ll k_1$ donc $k_{\text{cat}}/k_1 \neq 0$

donc $K_m \neq 1/K_{\text{aff}} \neq K_d$

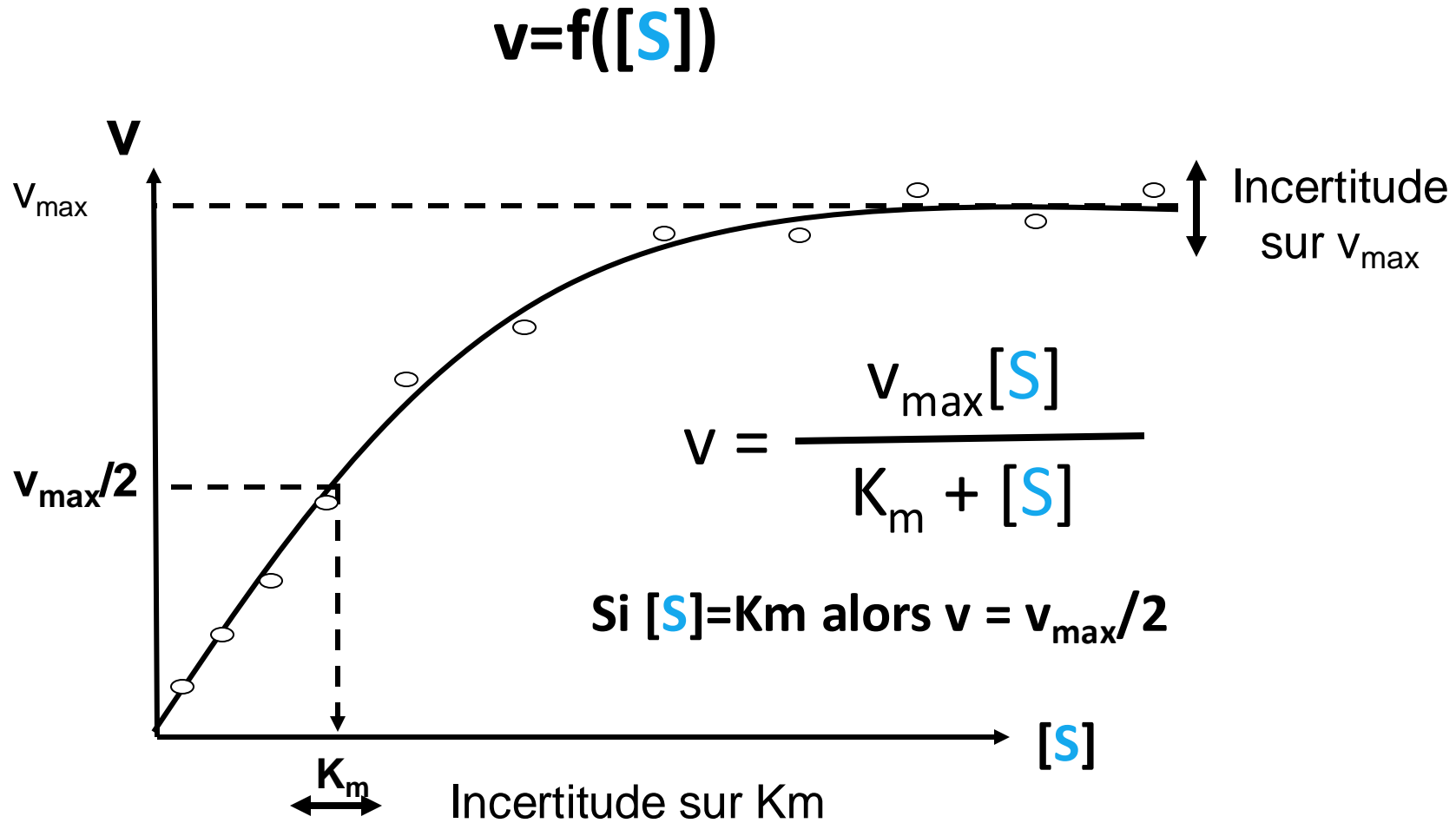
K_m est inversement proportionnelle à l'affinité d'une enzyme pour un substrat donné

2 Représentation de Michaelis-Menten



Si $[S]$ faible alors $v = (v_{\max}/K_m) * [S] \Rightarrow$ cinétique d'ordre 1

2 Représentation de Michaelis-Menten



v_{\max} et K_m ne sont pas déterminés avec précision

② Représentation de Lineweaver-Burk

$$1/v = f(1/[S])$$

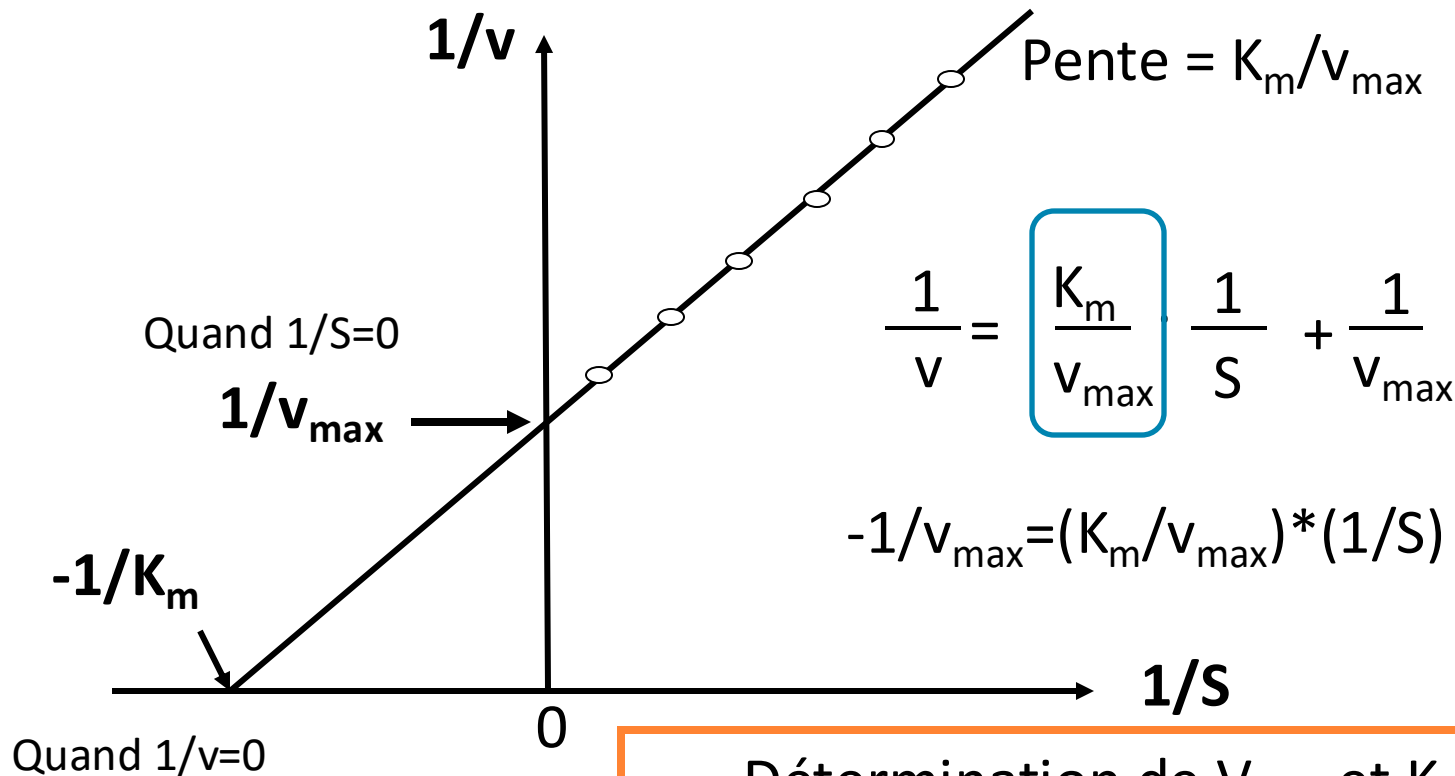
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{v_{\max} [S]} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

$$Y = aX + b$$

2 Représentation de Lineweaver-Burk

$$1/v = f(1/[S])$$



Détermination de V_{\max} et K_m
avec plus de précision

2 Représentation de Eadie-Hofstee

$$v/[S]=f(v)$$

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

donc

$$V_{\max} = \frac{v^*(K_m + [S])}{[S]}$$

donc

$$V_{\max} = \frac{v^*K_m}{[S]} + v$$

donc

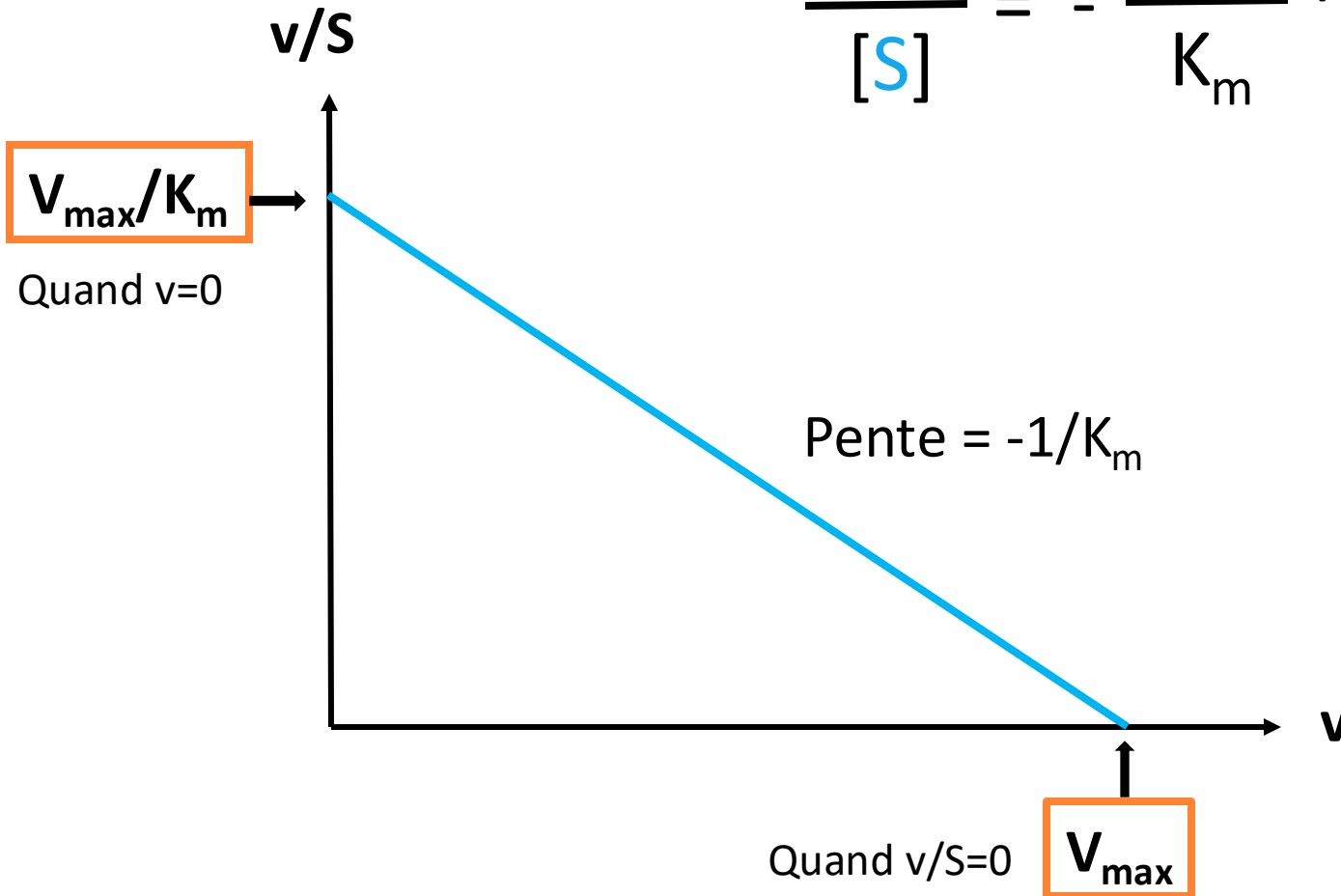
$$V_{\max} - v = \frac{v^*K_m}{[S]}$$

$$\frac{v}{[S]} = -\frac{1}{K_m} * v + \frac{V_{\max}}{K_m}$$

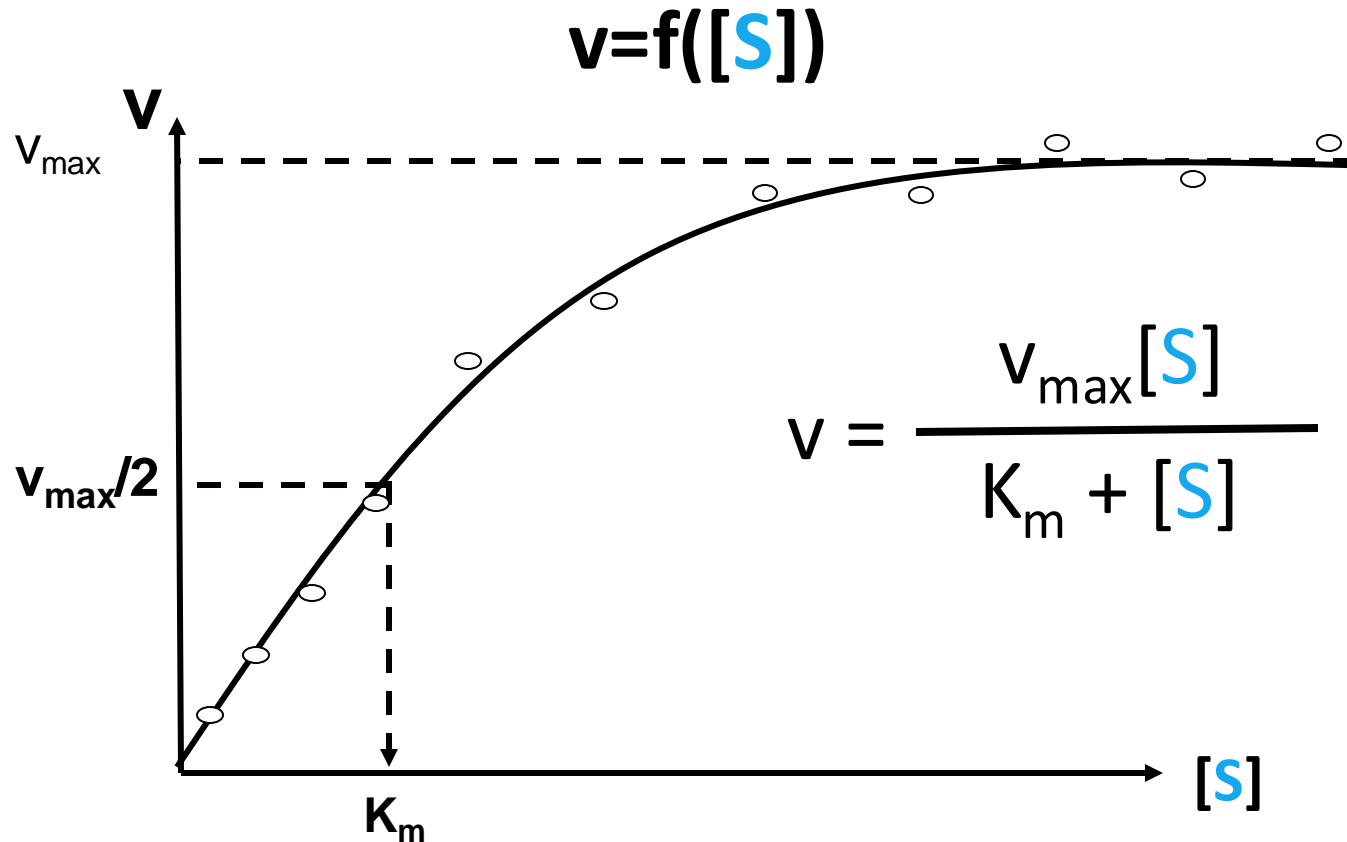
$$Y=aX+b$$

2 Représentation de Eadie-Hofstee

$$\frac{v}{[S]} = -\frac{1}{K_m} * v + \frac{V_{\max}}{K_m}$$



2 Mesure de [S]



Si $[S] \ll K_m$ alors $v = (v_{\max}/K_m) * [S] \Leftrightarrow$ cinétique d'ordre 1

Mesure de la concentration d'un substrat

2 Mesure de [S]

Glucose RTU™

Dosage enzymatique du glucose dans urines, sérum et plasma humains.

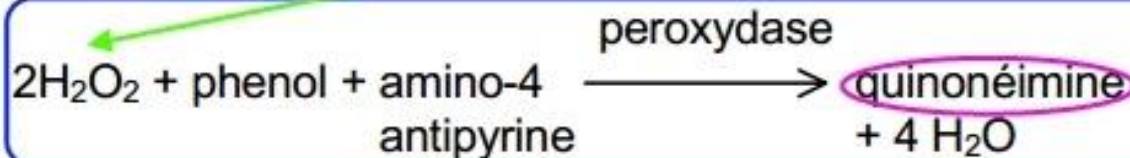
PRINCIPE

Le glucose est dosé en utilisant la séquence
glucose oxydase – peroxydase – chromogène :

glucose oxydase



L'eau oxygénée formée est dosée selon la réaction de
TRINDER (2).



L'intensité de la coloration (quinonéimine), mesurée à
505 nm, est proportionnelle à la quantité de glucose
présente dans l'échantillon.

2 Mesure de [S]

PRESENTATION ET COMPOSITION DU COFFRET (Réf. 61 269 : 400 tests - Réf. 61 270 : 1000 tests)

Glucose RTU™ - Réf. 61 269 : 4 x 100 ml (liquide) - Réf. 61 270 : 4 x 250 ml (liquide)	Tampon phosphate pH 6,6	225 mmol/l
	Amino-4-antipyrine	0,3 mmol/l
	Phénol	8,5 mmol/l
	EDTA	5 mmol/l
	Peroxydase	≥ 300 U/l
	Glucose oxydase	≥ 10 000 U/l

ECHANTILLONS

Nature des échantillons (3, 4)

- Sérum ou plasma recueilli sur anticoagulant + antiglycolytique : EDTA + fluorure de sodium ou héparinate de lithium + fluorure de sodium.
Conserver de préférence dans la glace jusqu'au moment de la centrifugation puis centrifuger à 1000 x g minimum pendant 10 minutes dans les meilleurs délais (1 heure au maximum après le prélèvement) pour limiter la glycolyse.
Utiliser de préférence le plasma.
- Urines de 24 heures pures ou diluées, si nécessaire, dans l'eau déminéralisée.

Réalisation du test

Longueur d'onde : _____ 505 nm (492 à 550 nm)
Zéro de l'appareil : _____ blanc réactif

	Blanc réactif	Etalon	Dosage
Etalon	-	10 µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Réactif	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger.

Photométrer après une incubation de :

- 10 minutes à 37°C.
- 20 minutes à 20-25°C.

Stabilité de la coloration : _____ 1 heure à 20-25°C

Stabilité de l'étalonnage : Effectuer un étalonnage à chaque série de dosages.

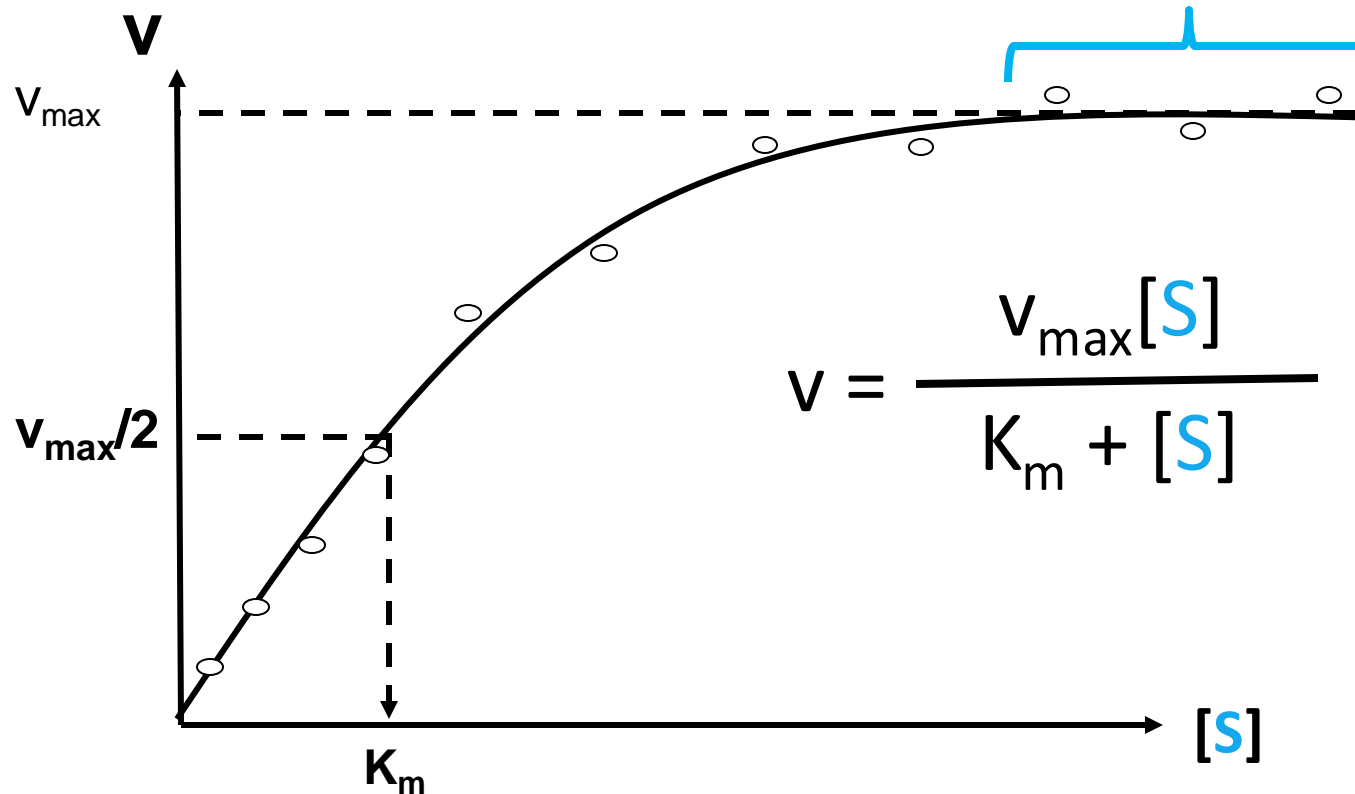
2 Mesure d'une activité enzymatique

Si $[S] \gg K_m$ alors $v = v_{\max}$

\Rightarrow cinétique d'ordre 0

dépend de [E]

$$v = f([S])$$



2 Mesure d'une activité enzymatique

- Mesure d'absorbance : [P] ou [coS]
- Mesure en cinétique (+s mesures par minute)

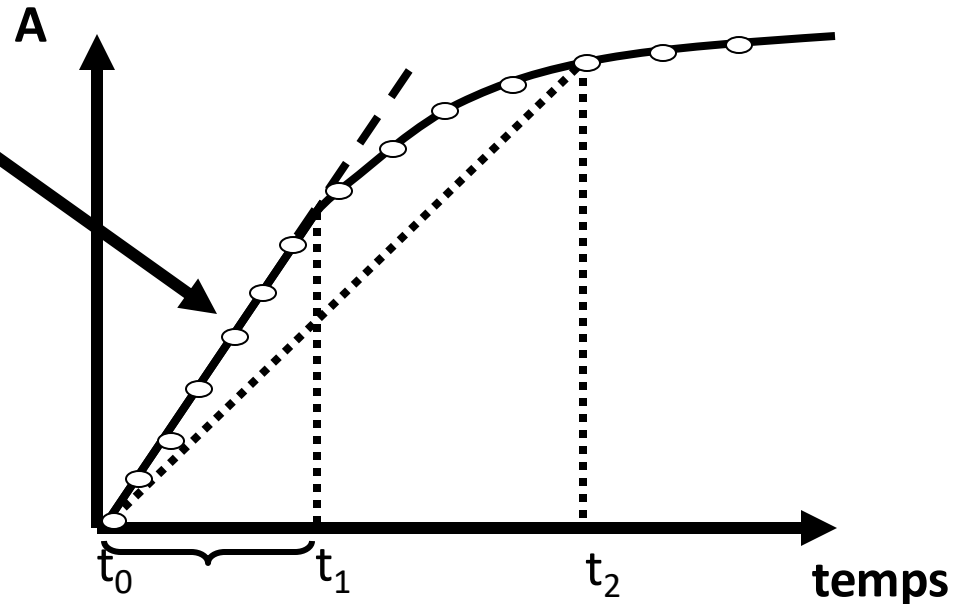
Calcul de la pente = $\Delta A / \Delta t$

Loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon l [P]$

$$\Delta A / \Delta t = \epsilon l \Delta [P] / \Delta t$$

$$[\Delta A / \Delta t] / \epsilon l = \Delta [P] / \Delta t$$

$$v_0 = [\Delta A / \Delta t] / \epsilon l$$



Avec $\Delta A / \Delta t$ en min^{-1} , ϵ en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, l en cm

Donc v_0 exprimé en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

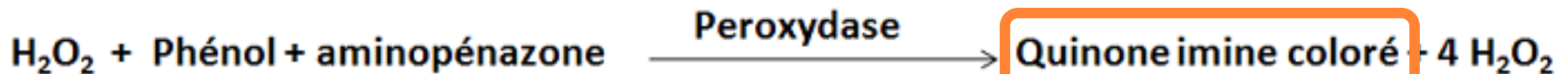
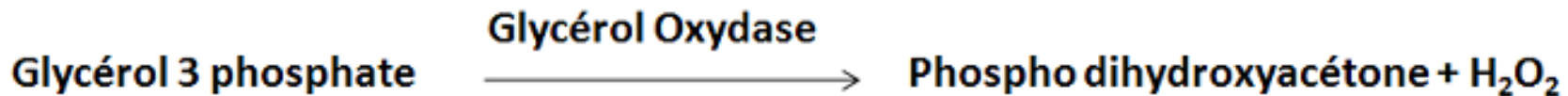
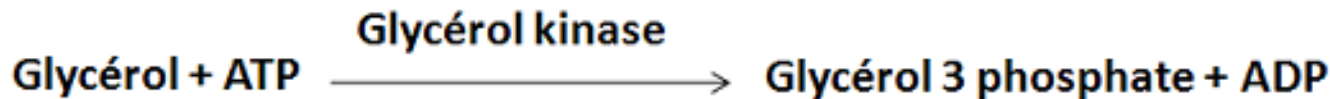
② Mesure d'une activité enzymatique

- Unités d'activité enzymatique
 - **Ex unités internationales (UI) :**
1 UI = quantité d'enzyme catalysant la transformation d'**1 micromole de S par minute.**
 - **Katal** (unité du SI) = quantité d'enzyme catalysant la transformation d'**1 mole de S par seconde.**
 - 1 UI = 16,6 nKat
- Expression des résultats : nKat/L ou **UI/L**
 - = **concentration d'activité enzymatique** en $\mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
 - = **vitesse initiale**

2 Mesure d'une activité enzymatique

EXAMPLE

- Exemple : Lipase et pancréatite aigüe



Réactions
secondaires

Coloration finale dépendante de la quantité de
LIPASE présente dans le sang du patient

0 Posez vos questions pendant le cours



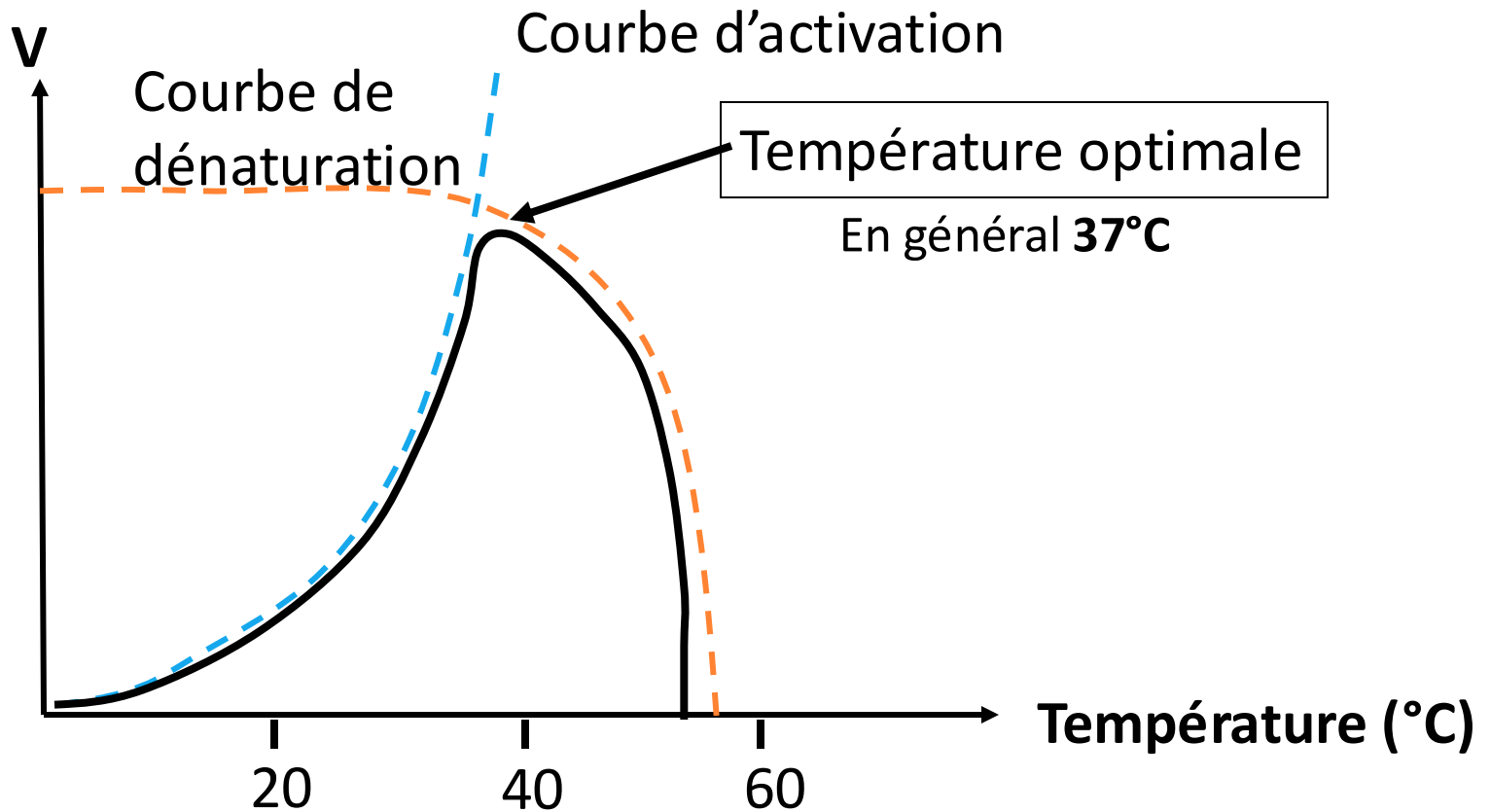
- 1 Allez sur wooclap.com
- 2 Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement
RKAZOG

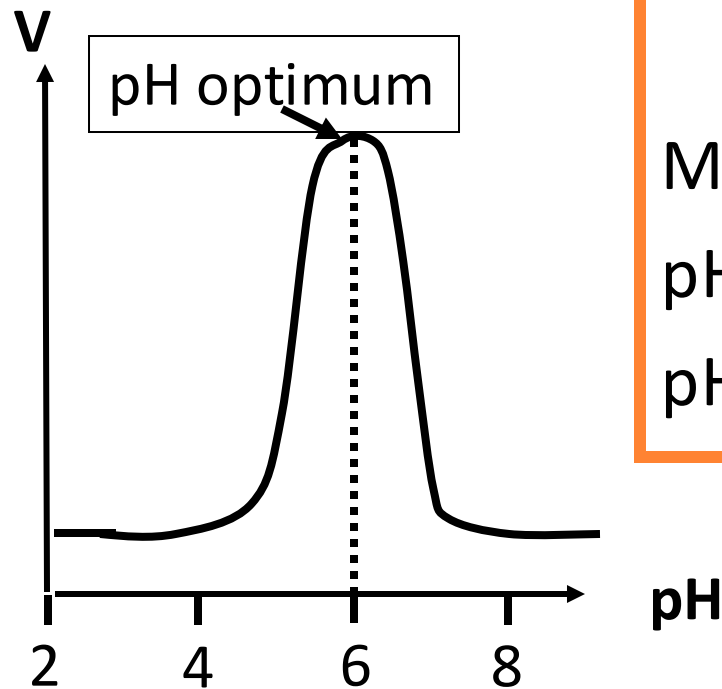
0 PLAN

- Pouvoir catalytique des enzymes
- Cinétiques enzymatiques
- **Inhibiteurs enzymatiques**
- Allostérie

3 Influence de la température



3 Influence du pH



Pour la plupart des enzymes :
pH optimum est proche de la neutralité (entre 6 et 8)

Mais :

pH optimum pepsine = 1,5-2

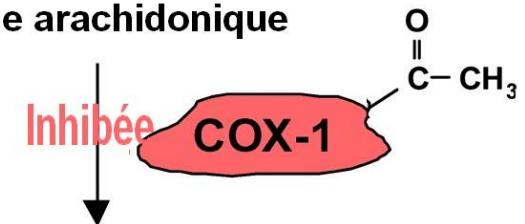
pH optimum arginase = 9,5-10

3 Inhibiteurs pharmacologiques

- Réversibles vs Irréversibles
- Inhibiteurs irréversibles
⇒ Perte des propriétés catalytiques de l'enzyme
- Modification de la conformation de E
- Blocage du site actif de E
- **Aspirine**, pénicilline, agents alkylants, ...

Prise d'aspirine entre 75mg et 325mg par jours:

Acide arachidonique

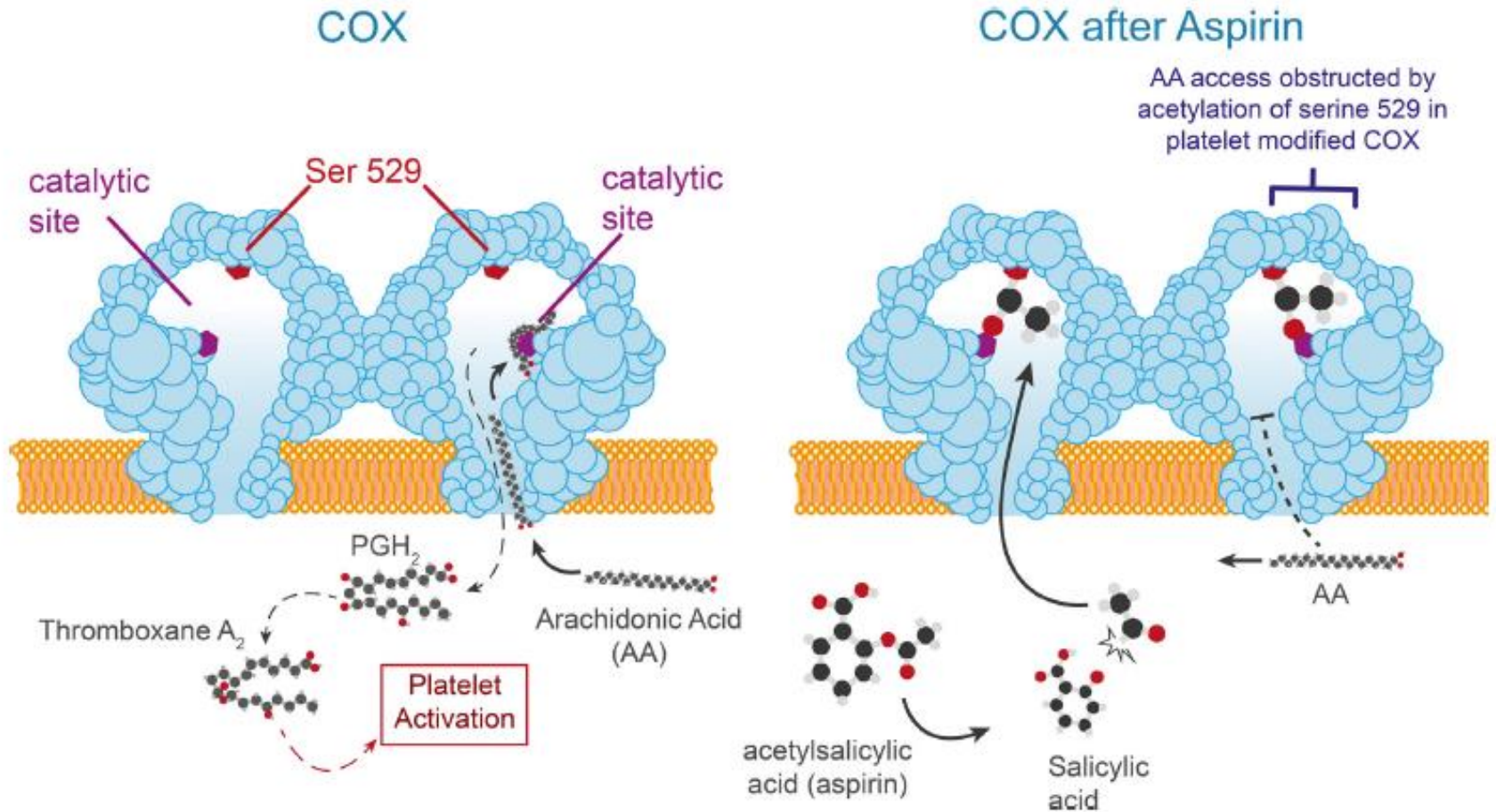


~~Prostaglandine~~

~~Thromboxane-A-Synthétase~~
Inactive

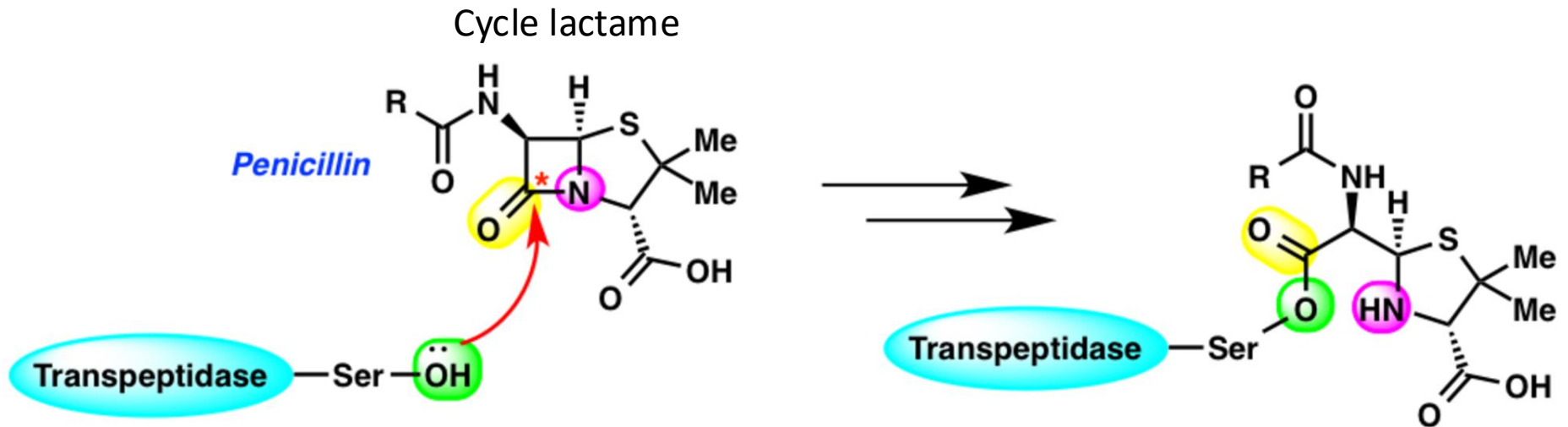
~~Thromboxane = Vasoconstriction~~
Pas d'agregation plaquettaire

3 Inhibiteurs irréversibles



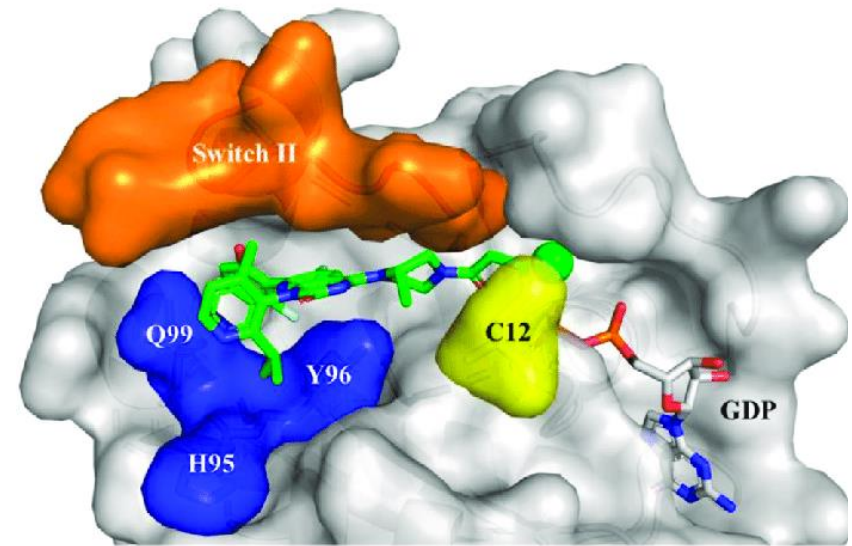
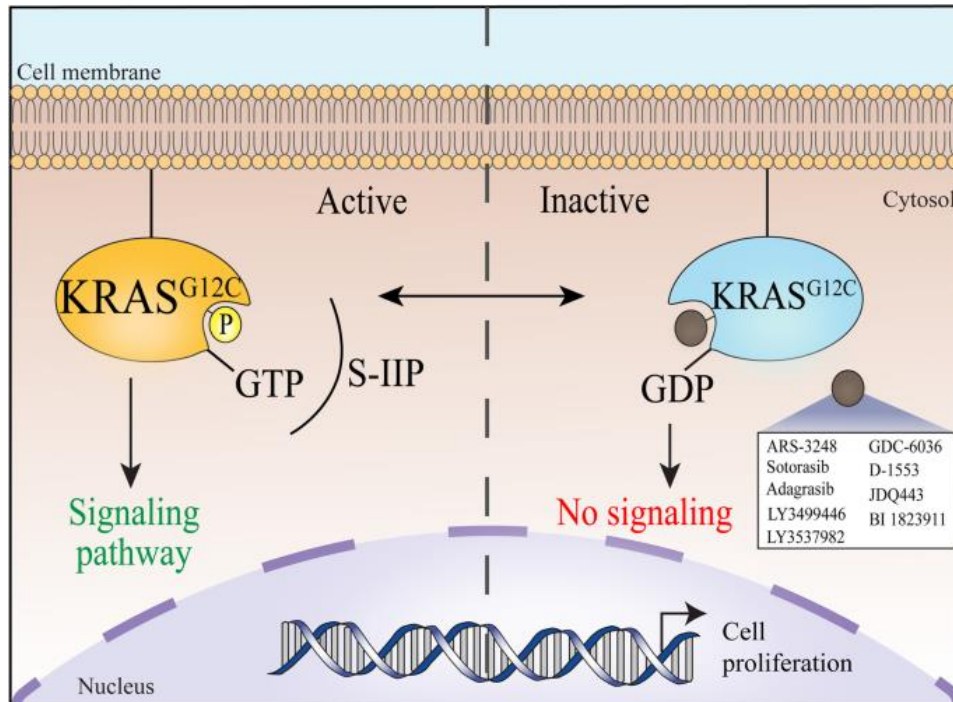
Acétylation de la Ser 529 ⇒ blocage de l'entrée de l'AA

3 Inhibiteurs irréversibles



Pénicilline = **substrat suicide** de la glycopeptide transpeptidase bactérienne

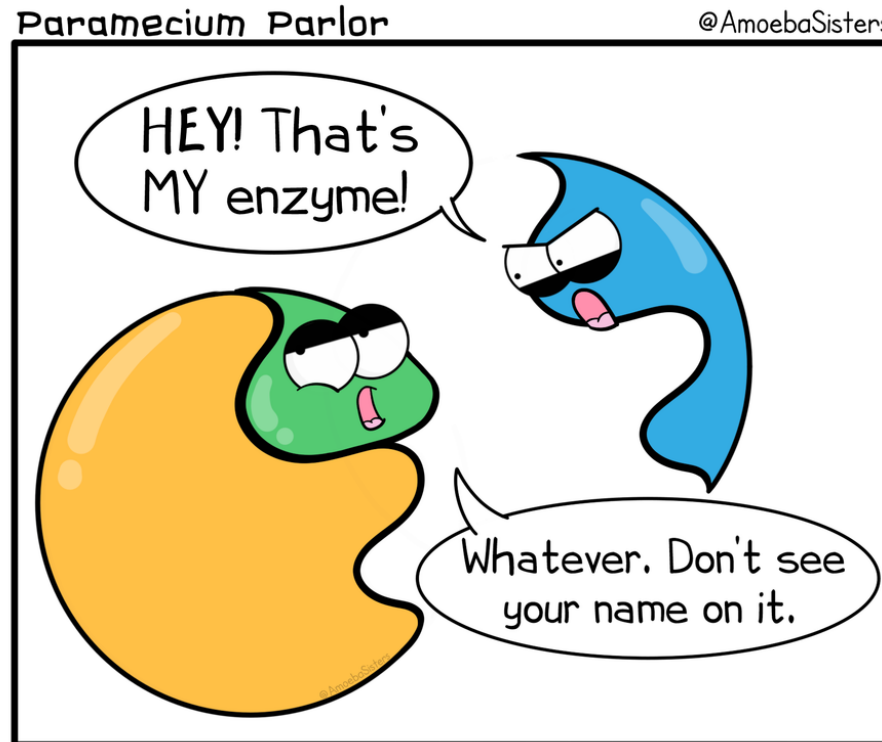
3 Inhibiteurs irréversibles



Inhibiteurs de KRAS G12C

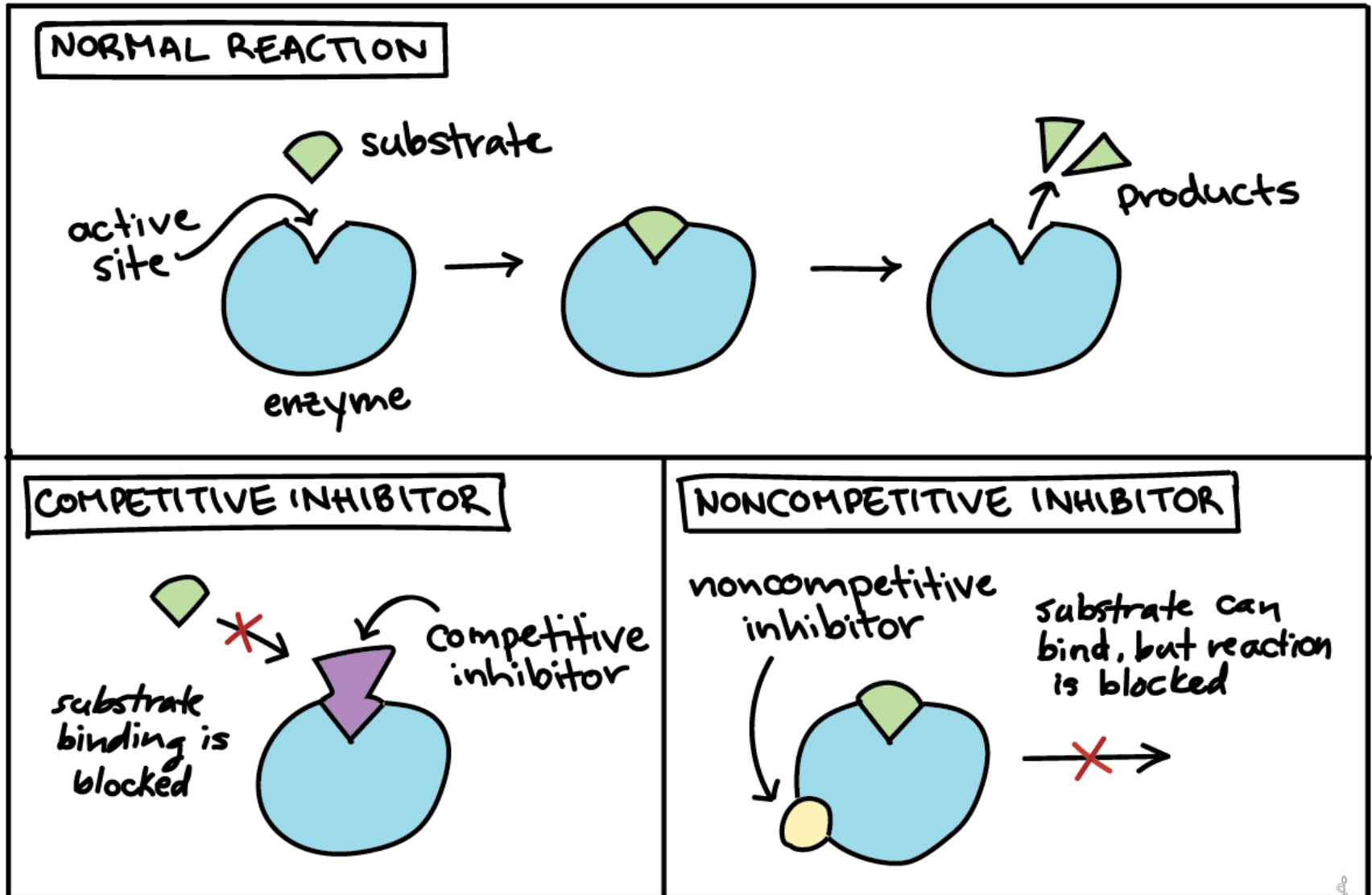
3 Inhibiteurs réversibles

- Dissociation rapide du complexe ES
- **COMPETITIFS vs NON COMPETITIFS**

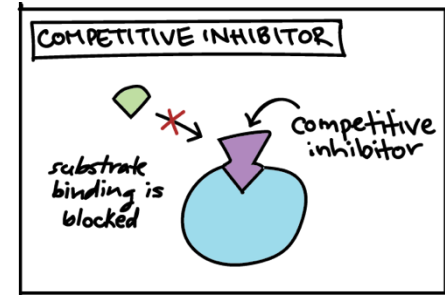


Competitive Inhibitors: If it fits, it sits.

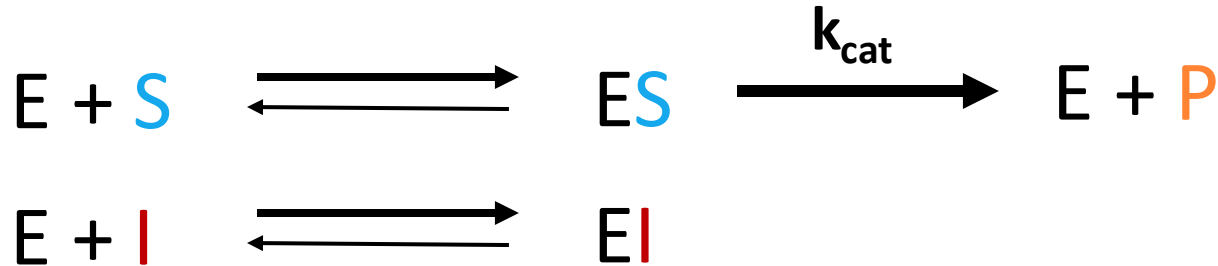
3 Inhibiteurs réversibles



3 Inhibiteurs compétitifs



- Fixation réversible sur le site actif de E empêchant la fixation de S

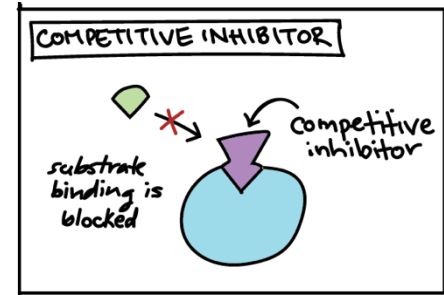


$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

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

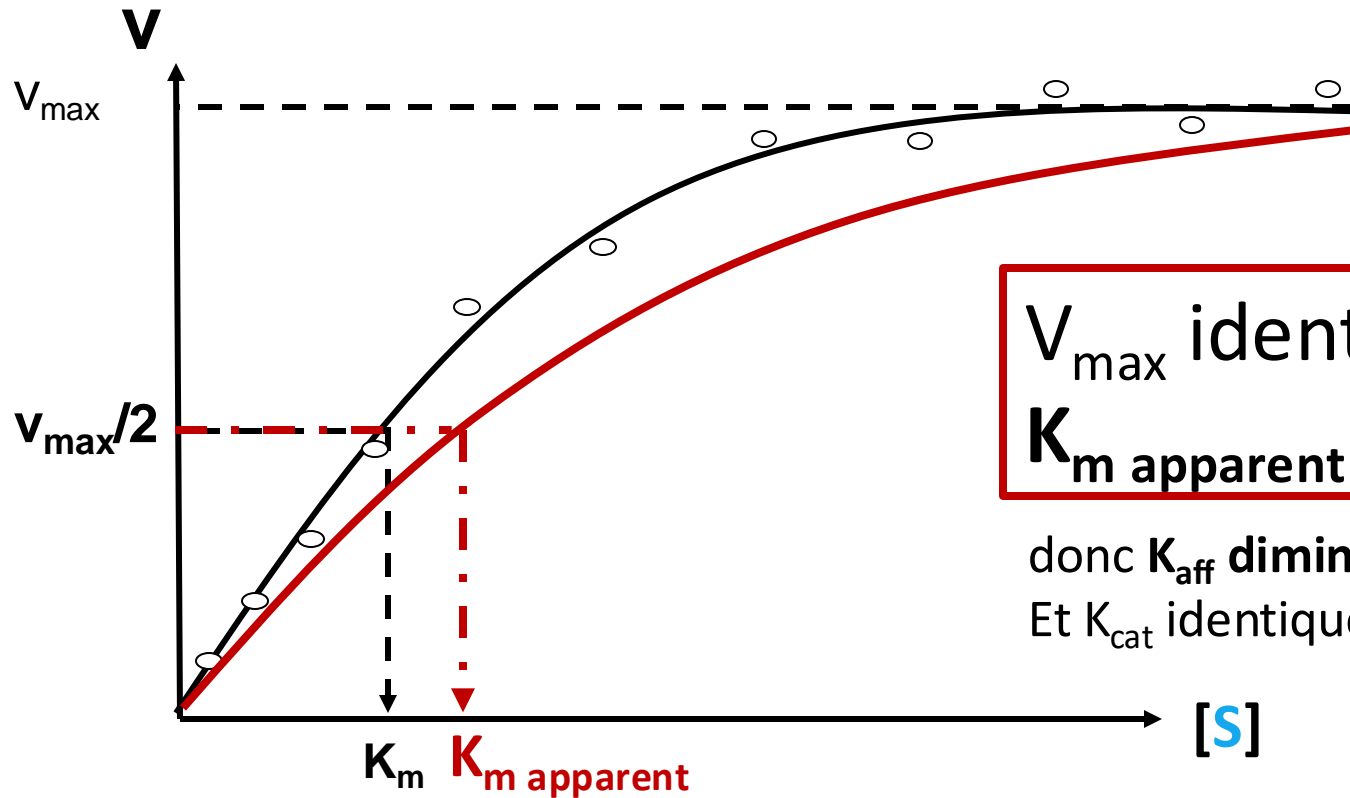
$$[E]_t = [E] + [ES] + [EI]$$

3 Inhibiteurs compétitifs



$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m (1 + [I]/K_i) + [S]}$$

“ K_m apparent”



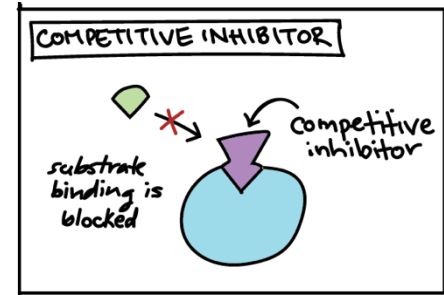
V_{\max} identique

K_m apparent $>$ K_m

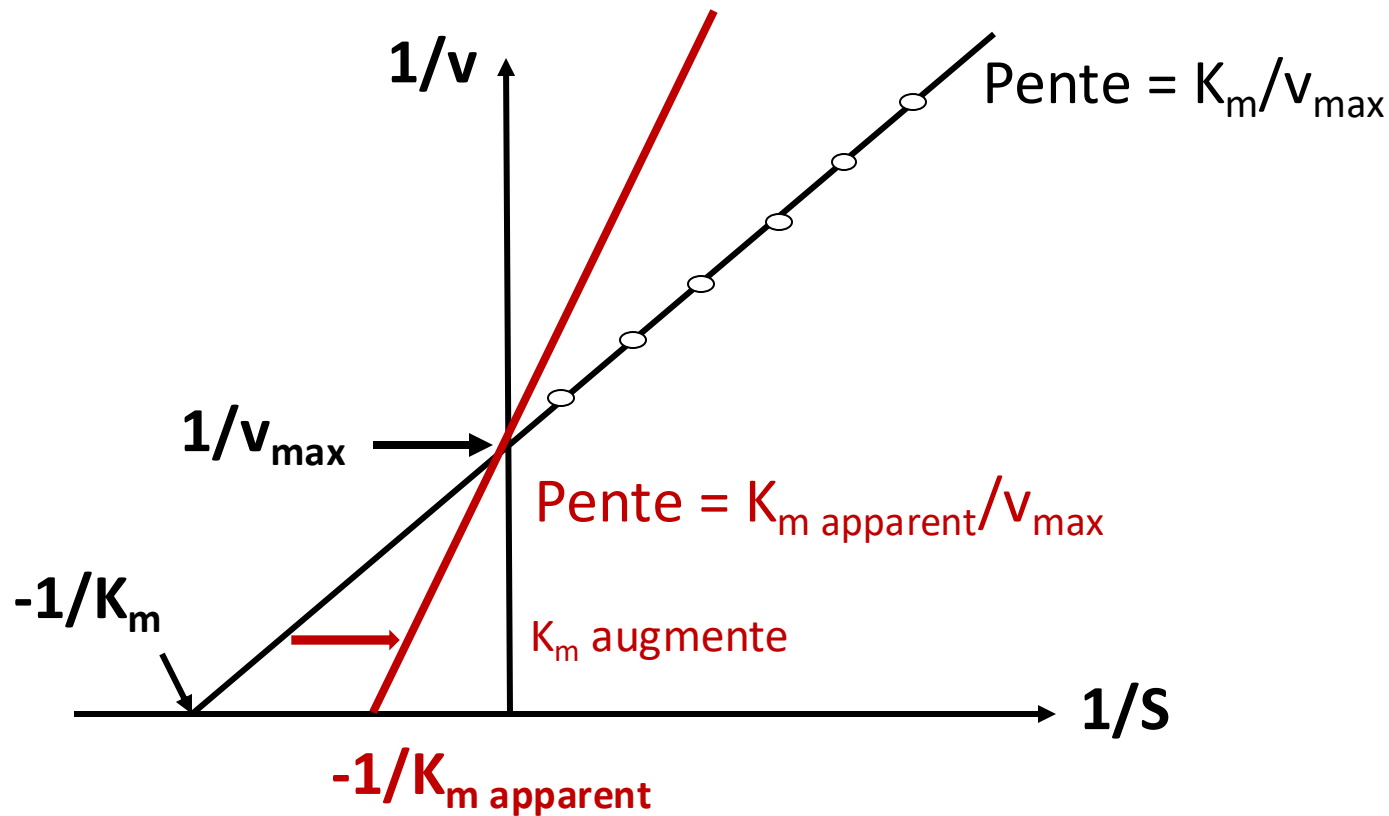
donc K_{aff} diminuée

Et K_{cat} identique

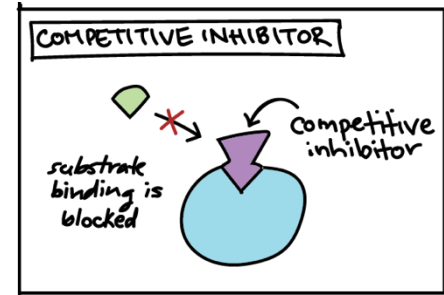
3 Inhibiteurs compétitifs



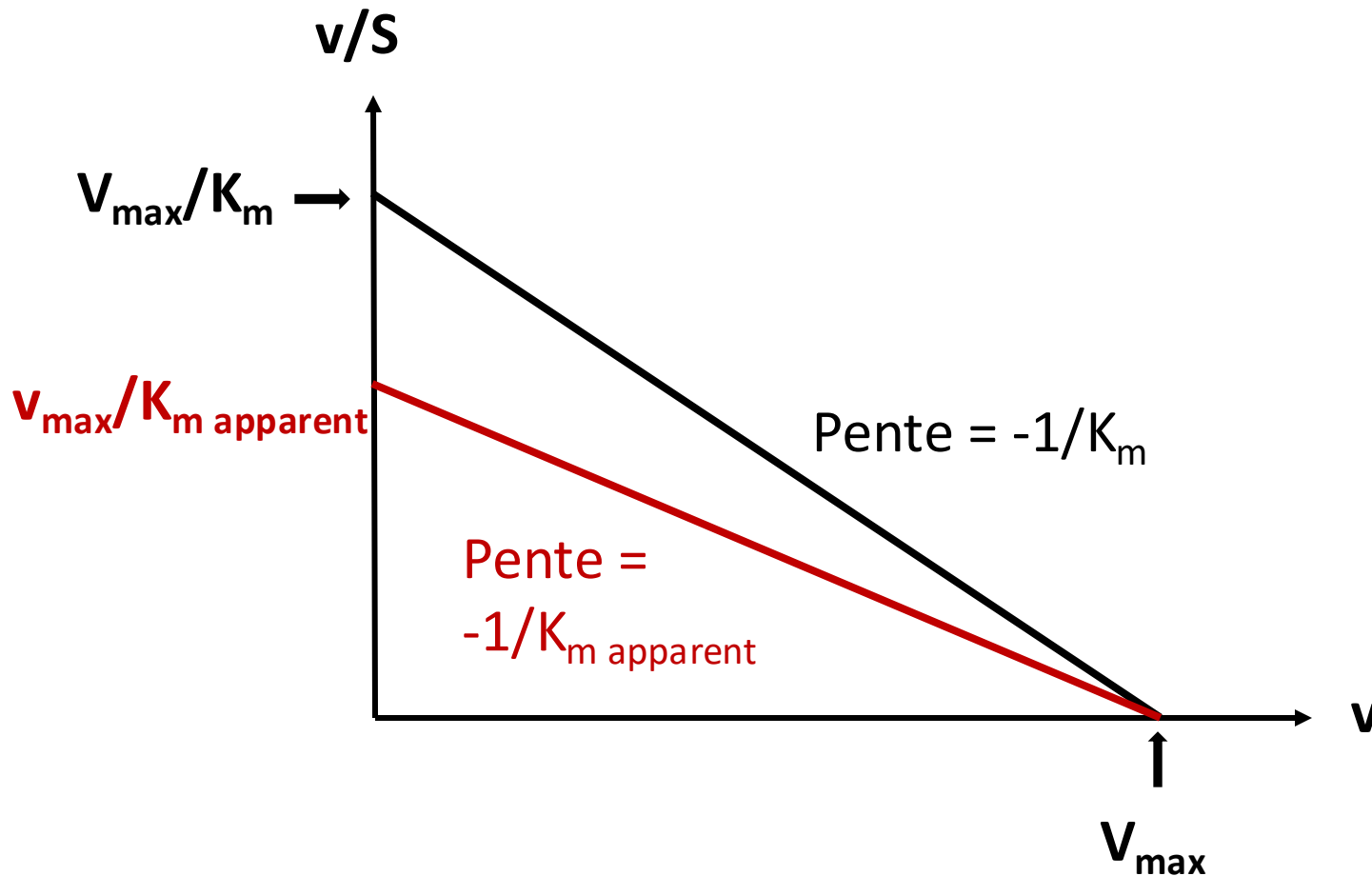
Lineweaver-Burk



3 Inhibiteurs compétitifs

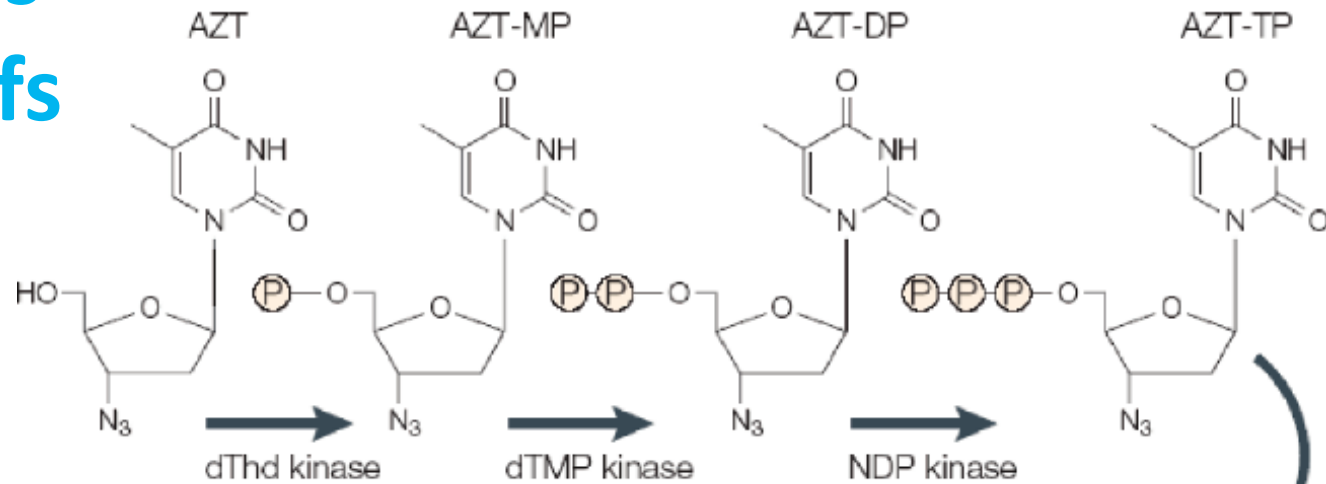


Eadie-Hofstee

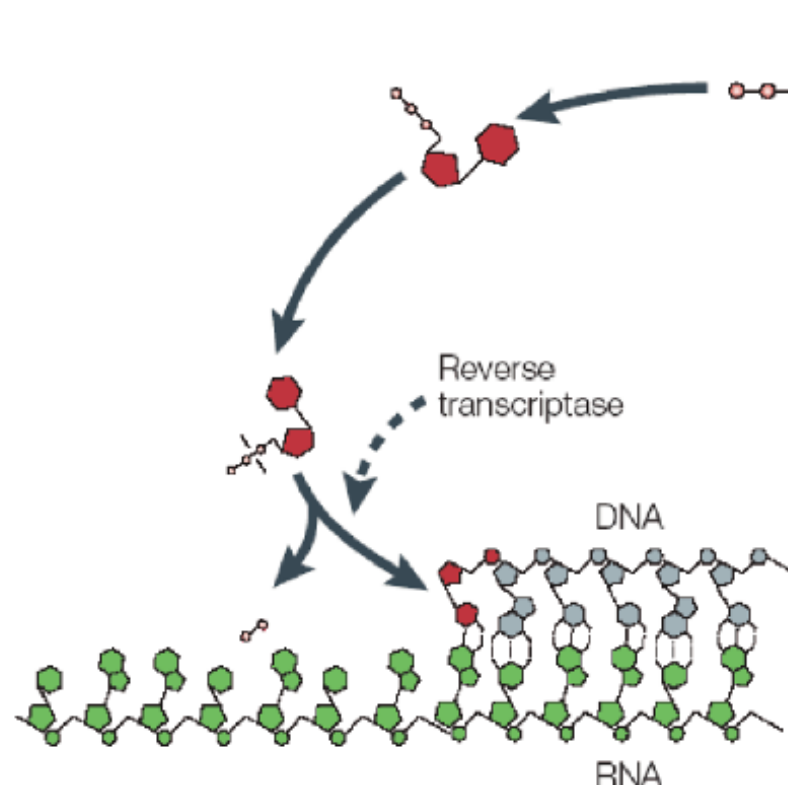


3

Inhibiteurs compétitifs



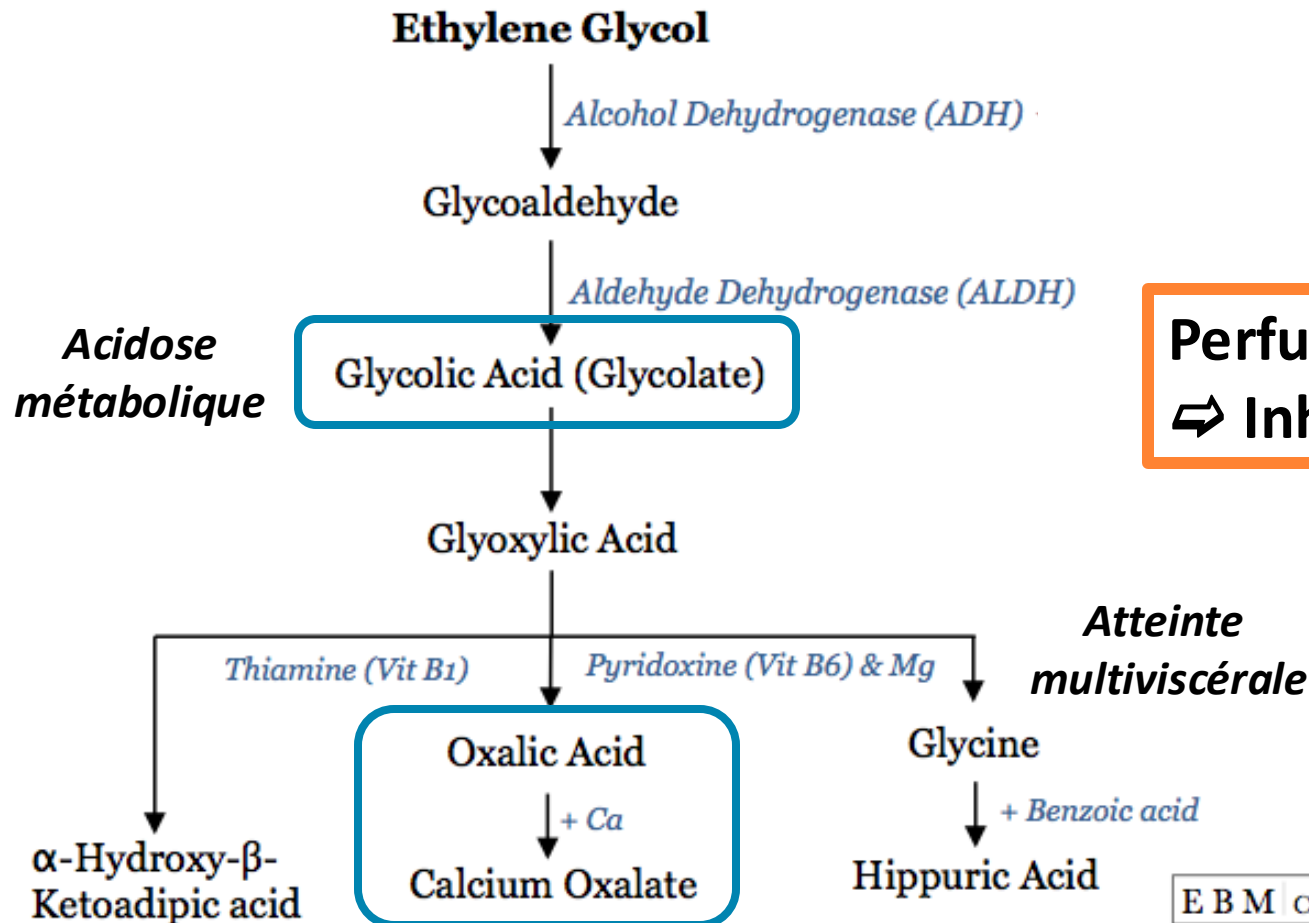
AZT=analogue de la thymidine
avec N₃ en 3'OH
⇒ STOP élongation par la rétrotranscriptase du HIV



3 Inhibiteurs compétitifs



■ Intoxication par l'éthylène glycol

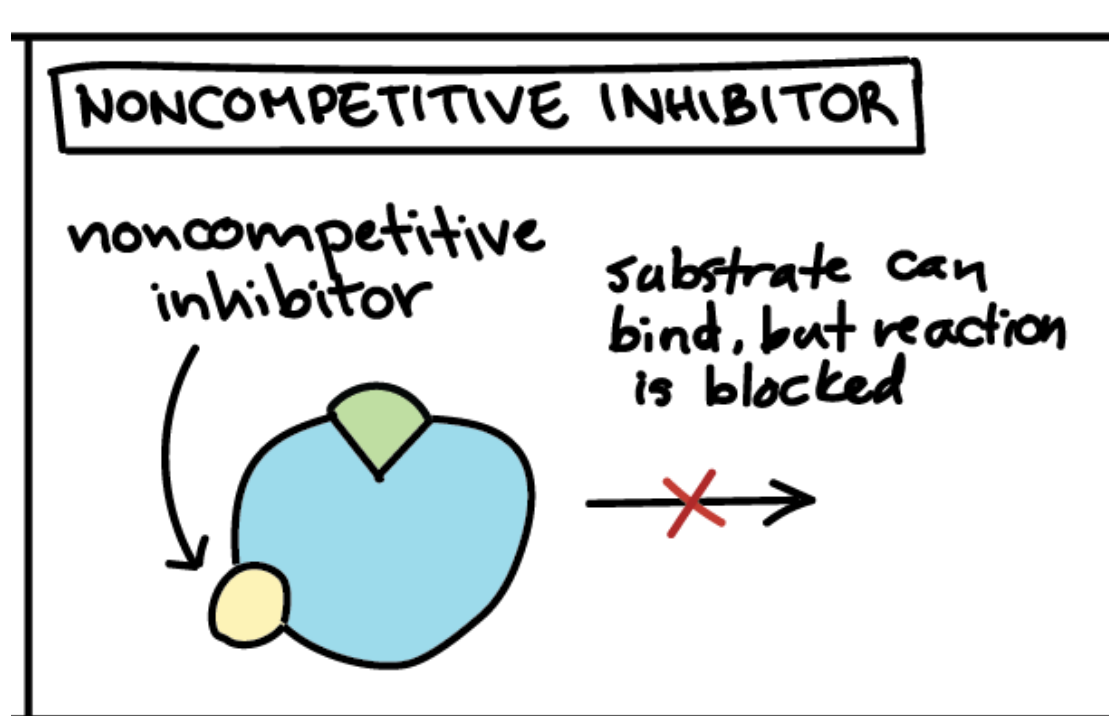


**Perfusion IV d'éthanol
⇒ Inhibition de l'ADH**

EBM CONSULT®

3 Inhibiteurs non compétitifs

- Fixation réversible en dehors du site actif
⇒ blocage de l'activité de E (mais pas de la fixation de S)



3 Inhibiteurs non compétitifs

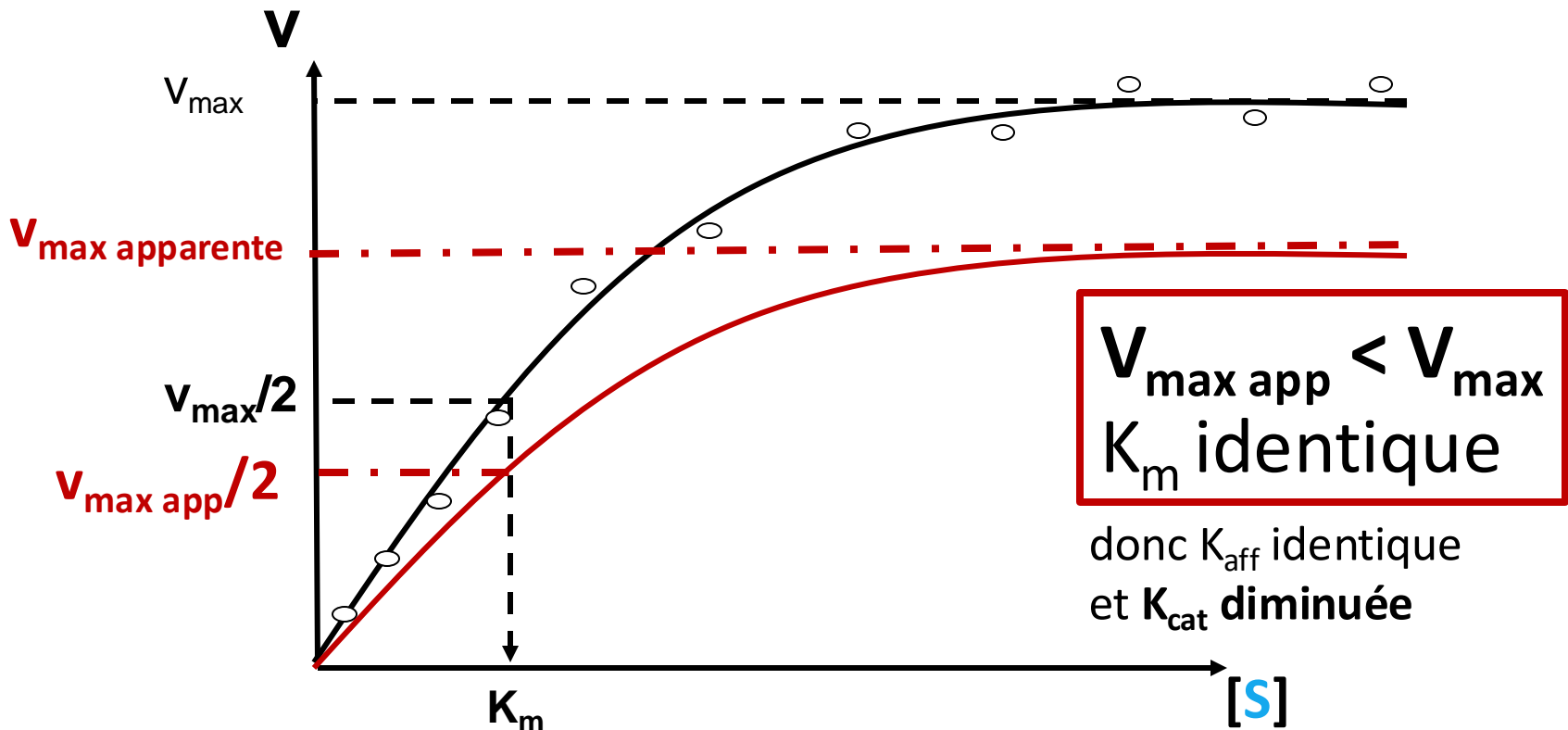
- Fixation réversible en dehors du site actif
⇒ blocage de l'activité de E (mais pas de la fixation de S)



3 Inhibiteurs non compétitifs

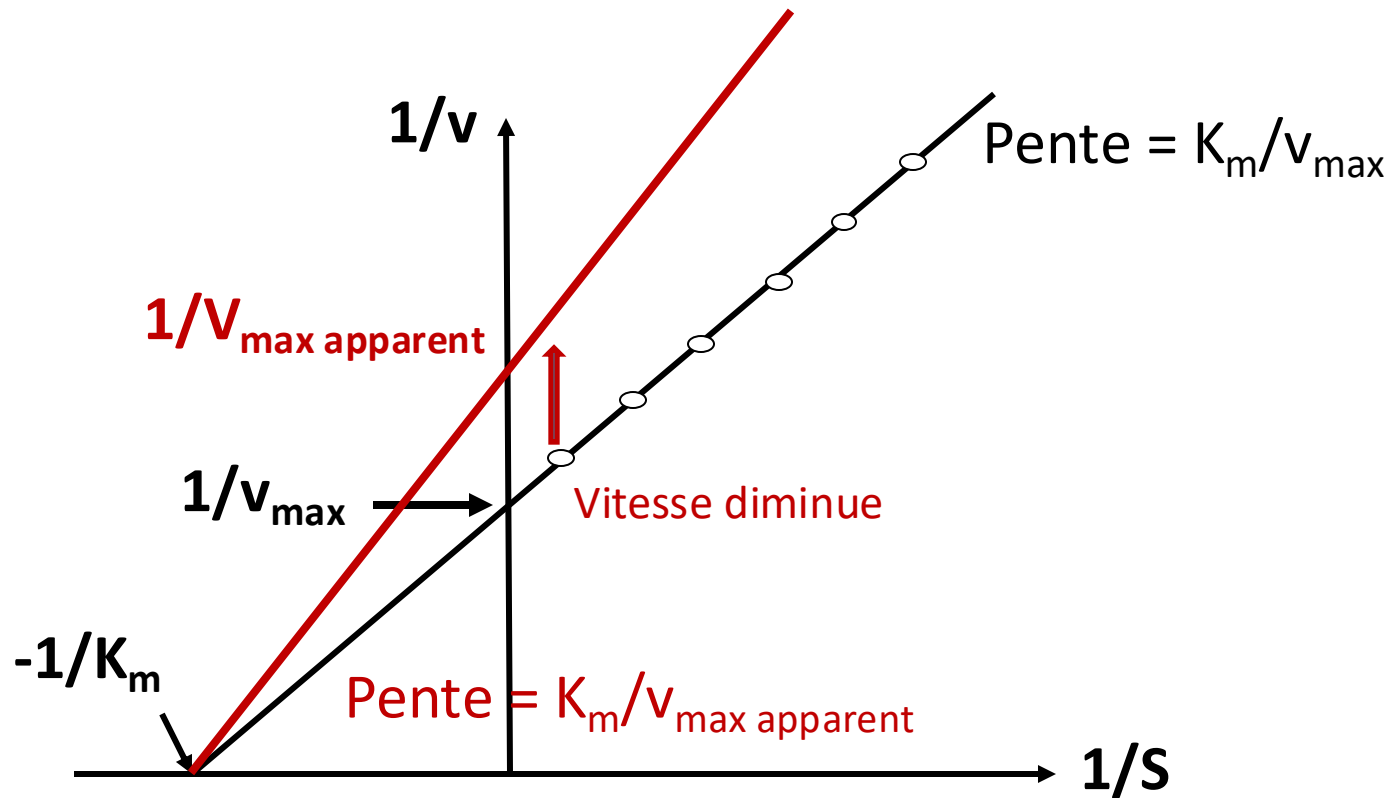
$$v = \frac{V_{\max} * [S]}{(K_m + [S]) * (1 + [I]/K_i)}$$

“ V_{\max} apparente”



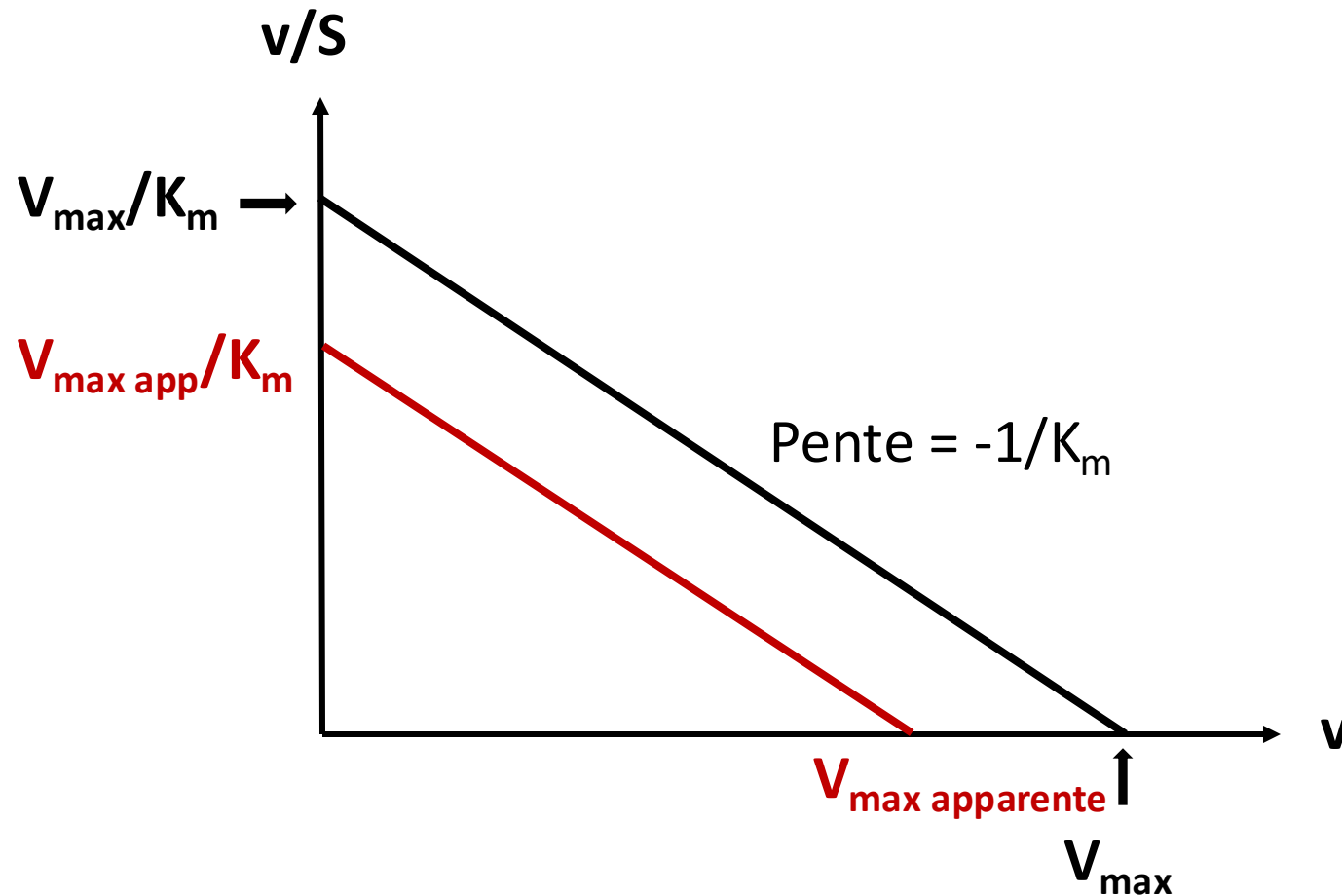
3 Inhibiteurs non compétitifs

Lineweaver-Burk



3 Inhibiteurs non compétitifs

Eadie-Hofstee



3 Inhibiteurs non compétitifs

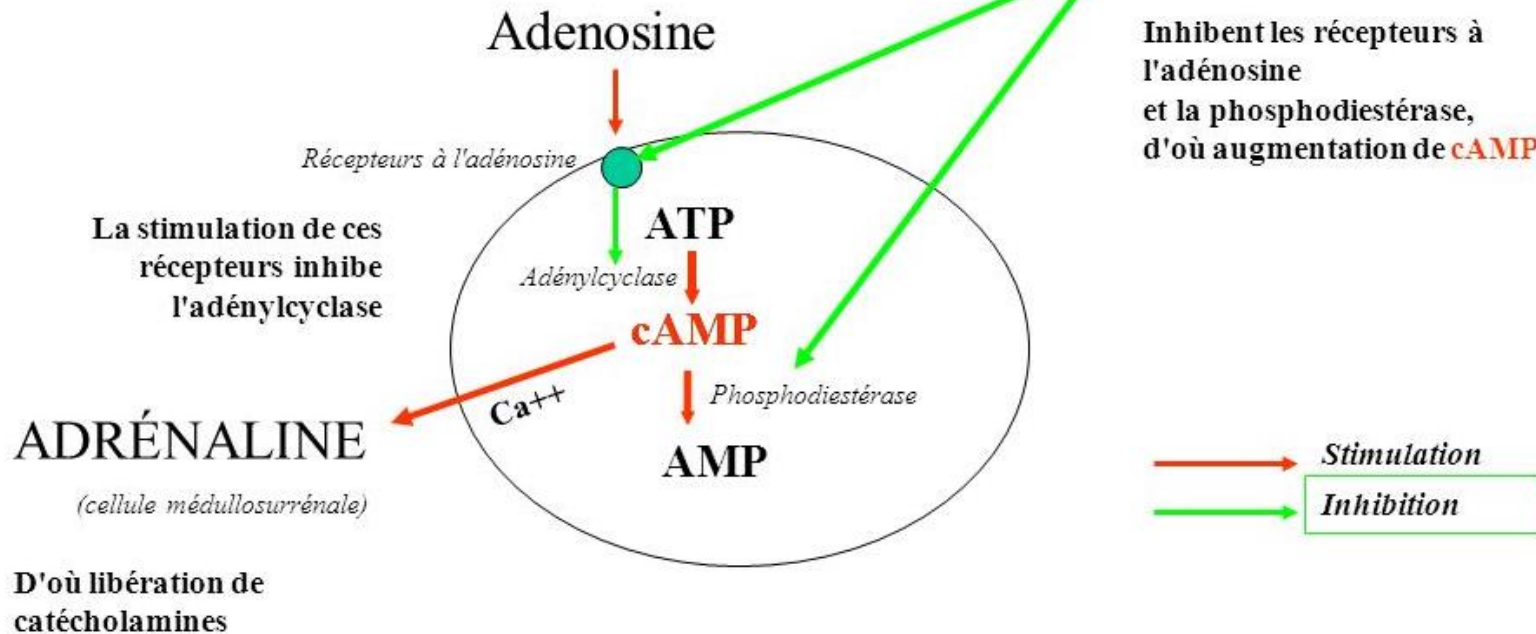
Caféine : inhibiteur non compétitif
de la **phosphodiesterase**

⇒ bloque la dégradation de l'**AMPc**



CAFÉINE
THÉOPHYLLINE

Inhibent les récepteurs à l'adénosine et la phosphodiesterase, d'où augmentation de **cAMP**



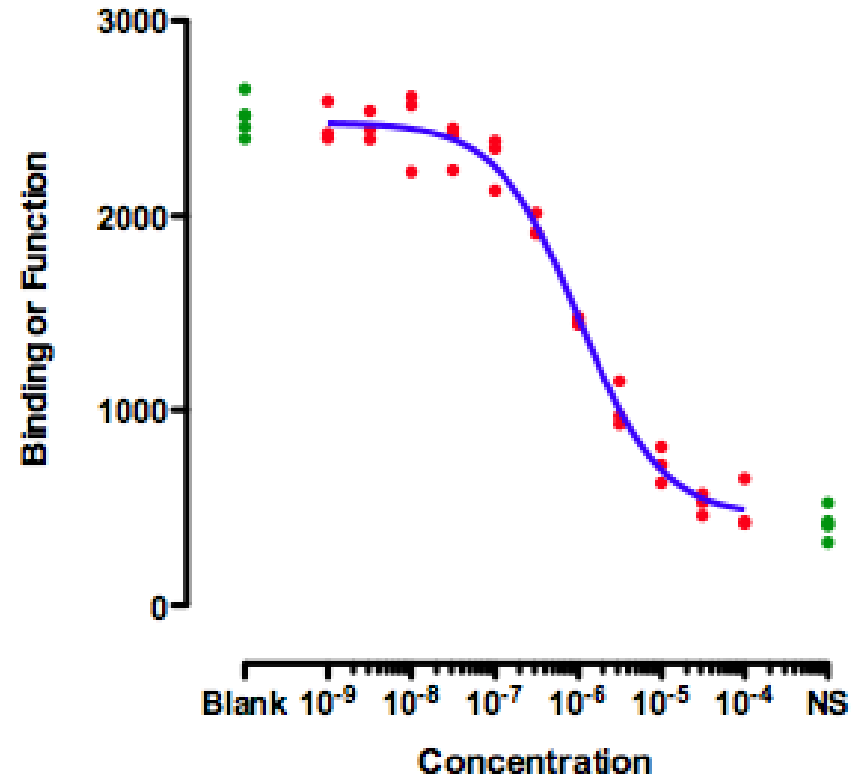
3 Inhibiteurs réversibles : synthèse

Inhibition	K_m		V_{max}	
Compétitive	Augmente (affinité \searrow)	$K_m \cdot (1 + [I]/K_i)$	Inchangée	V_{max}
Non compétitive	Inchangée	K_m	Diminuée	$V_{max} / (1 + [I]/K_i)$



3 IC50

- **Concentration inhibitrice 50**
→ valeur expérimentale
- Liaison ou activité biologique
→ calcul de la dérivée maximale
- **+ l'IC50 est faible**
+ l'inhibiteur est puissant
- en clinique de l'ordre du nM



0 Posez vos questions



- 1 Allez sur wooclap.com
- 2 Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

Code d'événement
RKAZOG

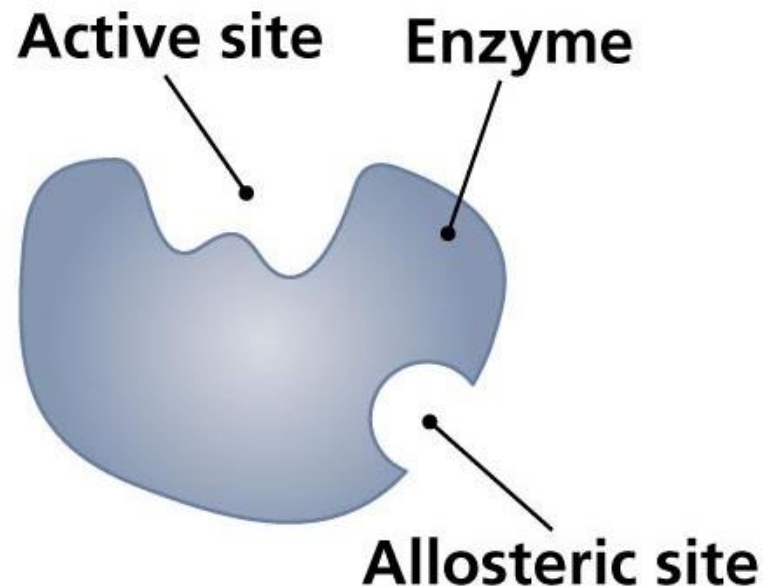
0 PLAN

- Pouvoir catalytique des enzymes
- Cinétiques enzymatiques
- Inhibiteurs enzymatiques
- **Allostérie**

4 Régulation par allostérie

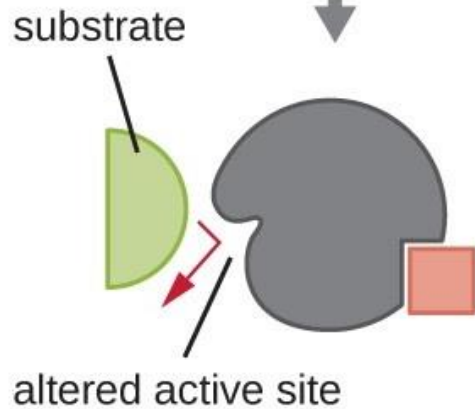
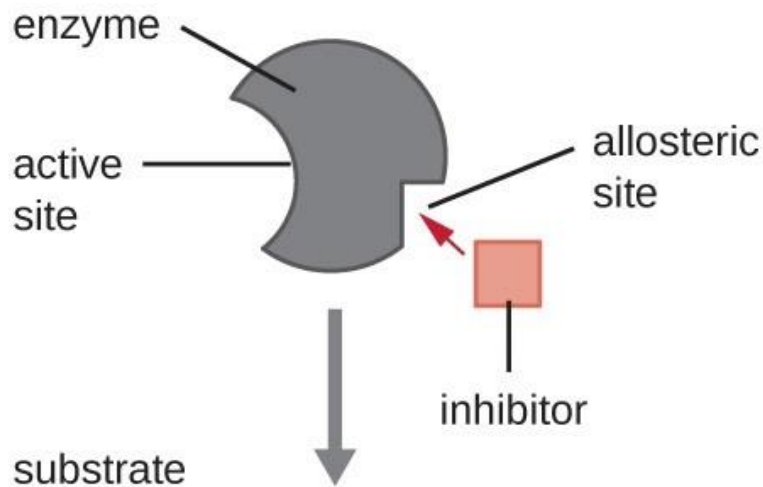
■ Enzymes allostériques

- Structure **quaternaire** oligomérique
- E sous la dépendance d'effecteurs se fixant au niveau d'un **site allostérique différent du site actif**

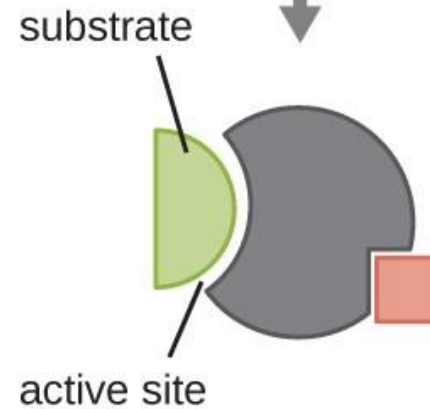
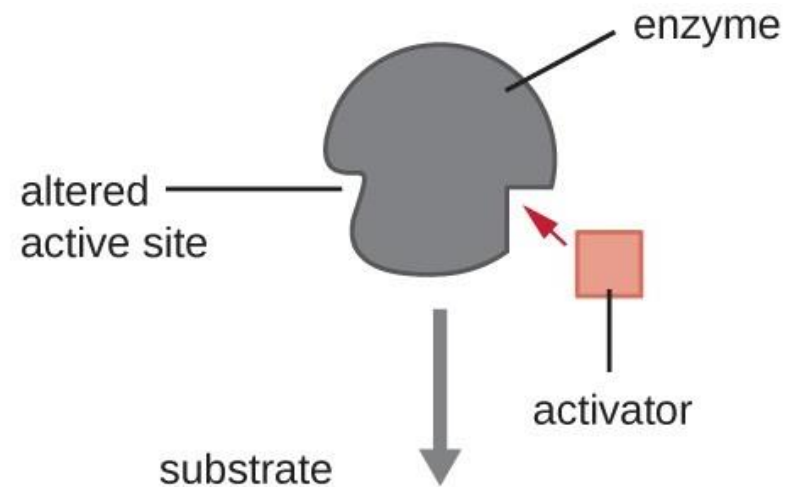


4 Régulation par allostérie

■ Activation ou Inhibition allostérique



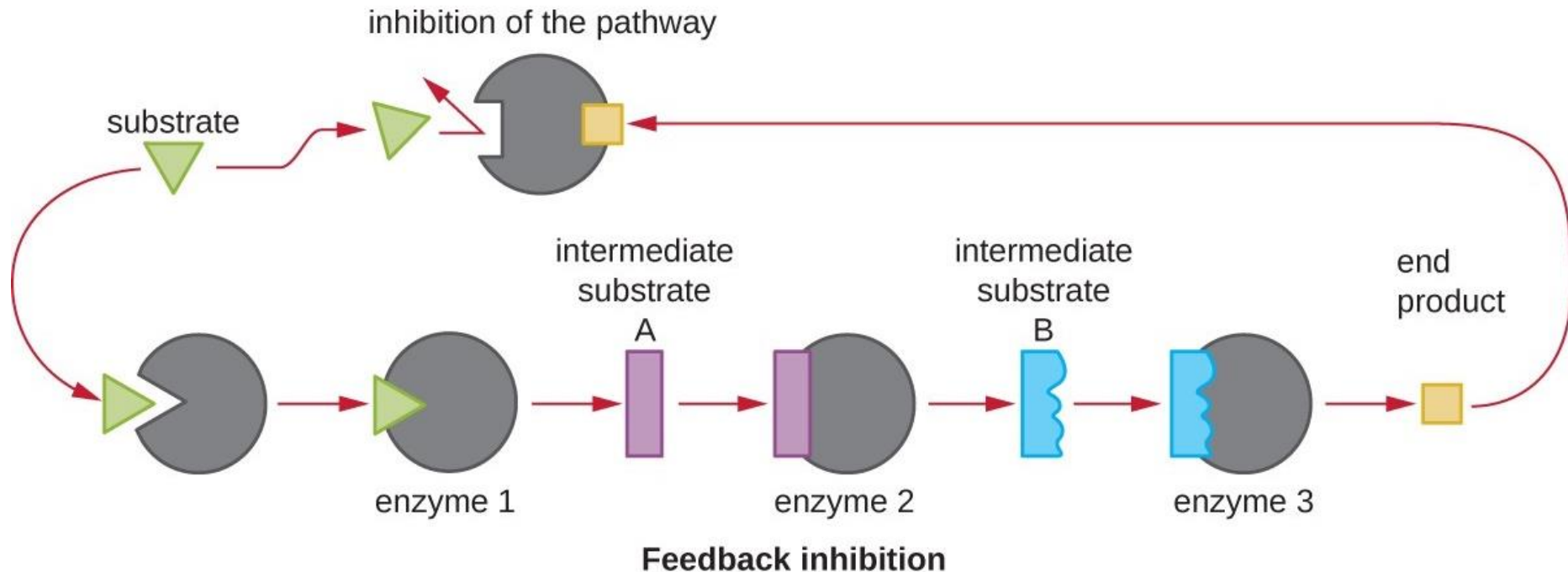
Allosteric inhibition



Allosteric activation

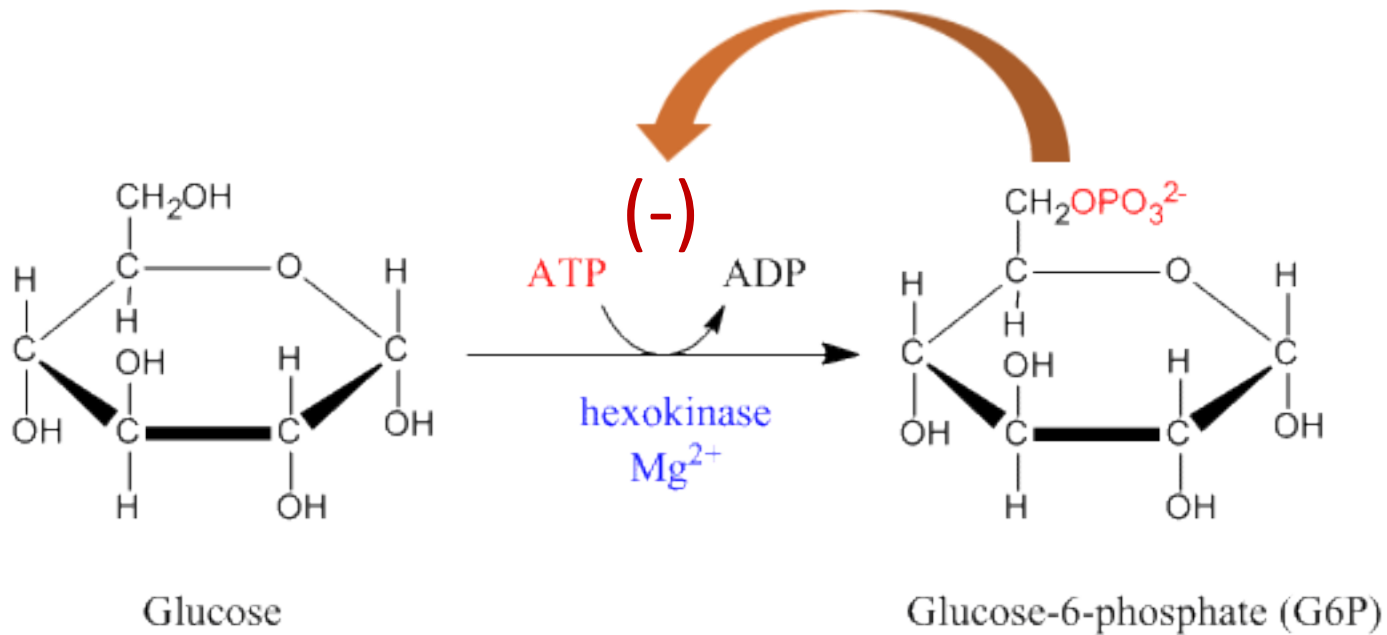
4 Régulation par allostérie

■ Rétrocontrôle négatif par P



4 Régulation par allostérie

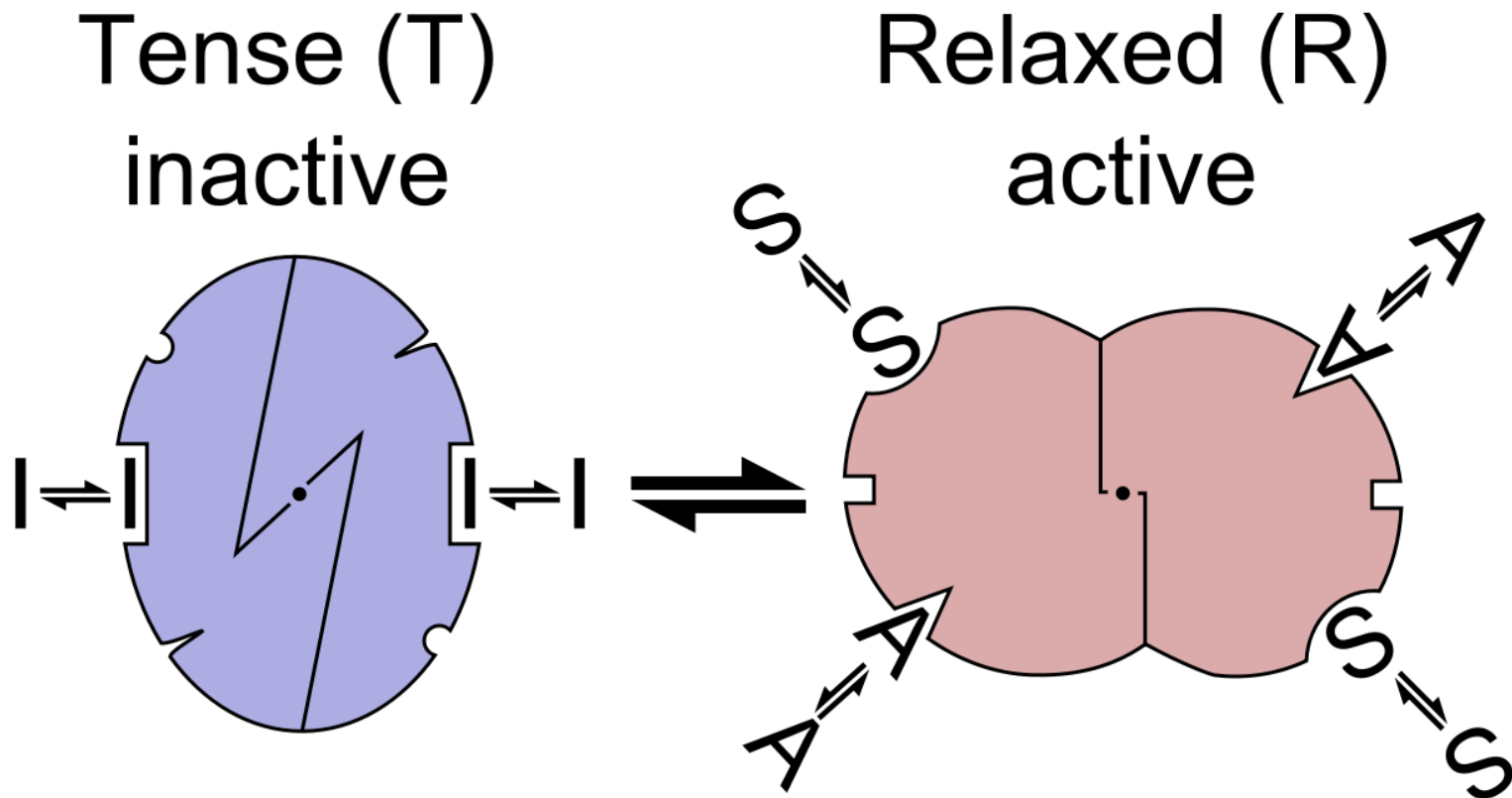
■ Rétrocontrôle négatif par P



$[\text{glucose}]_{\text{sang}} \gg K_m(\text{hexokinase}) \Rightarrow$ fonctionne à V_{max}
 \Rightarrow Augmentation $[\text{G6P}] \Rightarrow$ **rétrocontrôle négatif**

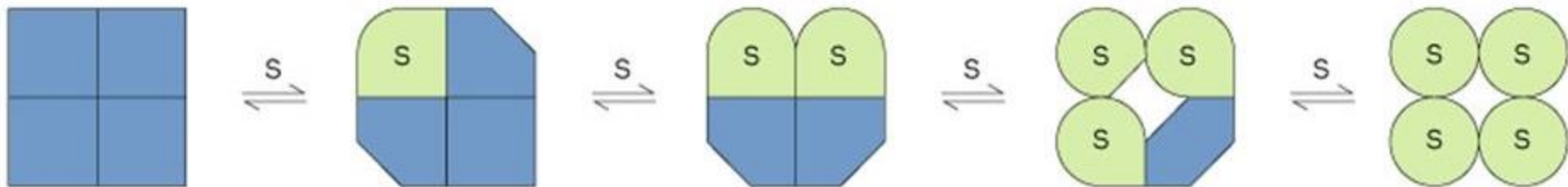
4 Régulation par allostérie

- L'enzyme peut exister sous 2 conformations distinctes : R ou T



4 Régulation par allostérie

- **Transition allostérique : coopération entre sous-unités de l'hémoglobine**
 - Fixation d'une molécule d'O₂ ⇌ **changement de conformation T>R**
 - 1^{er} changement est le plus difficile
 - Séquence avec augmentation de l'affinité pour O₂

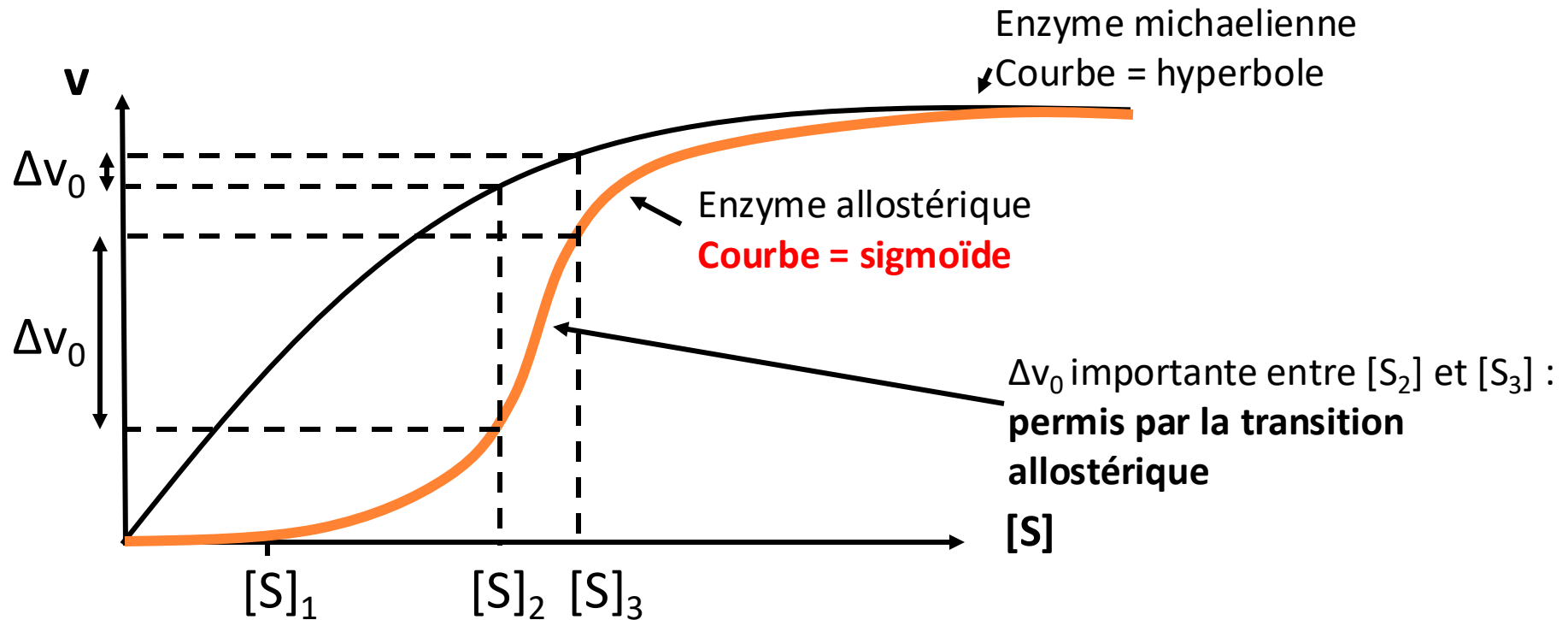


Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Modèle séquentiel de Koshland

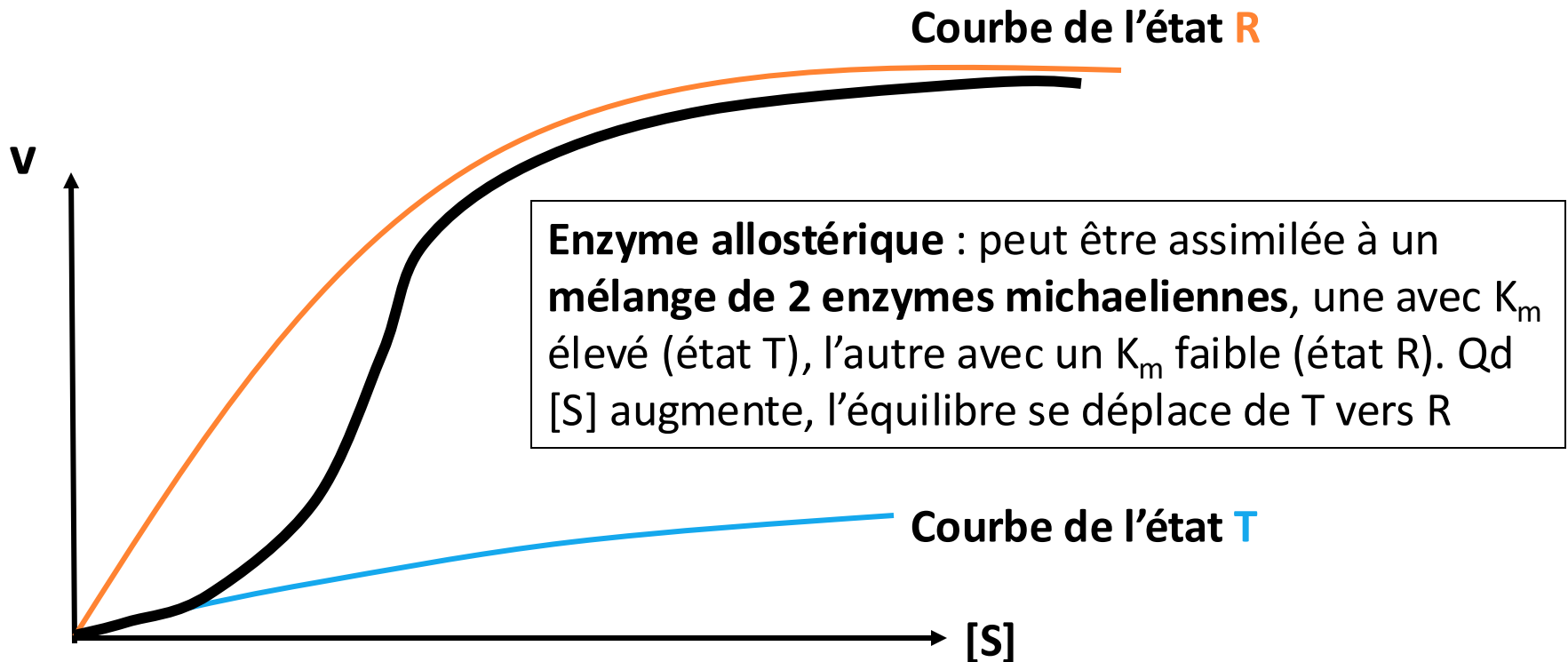
4 Régulation par allostérie

■ Cinétique enzymatique **non michaelienne**



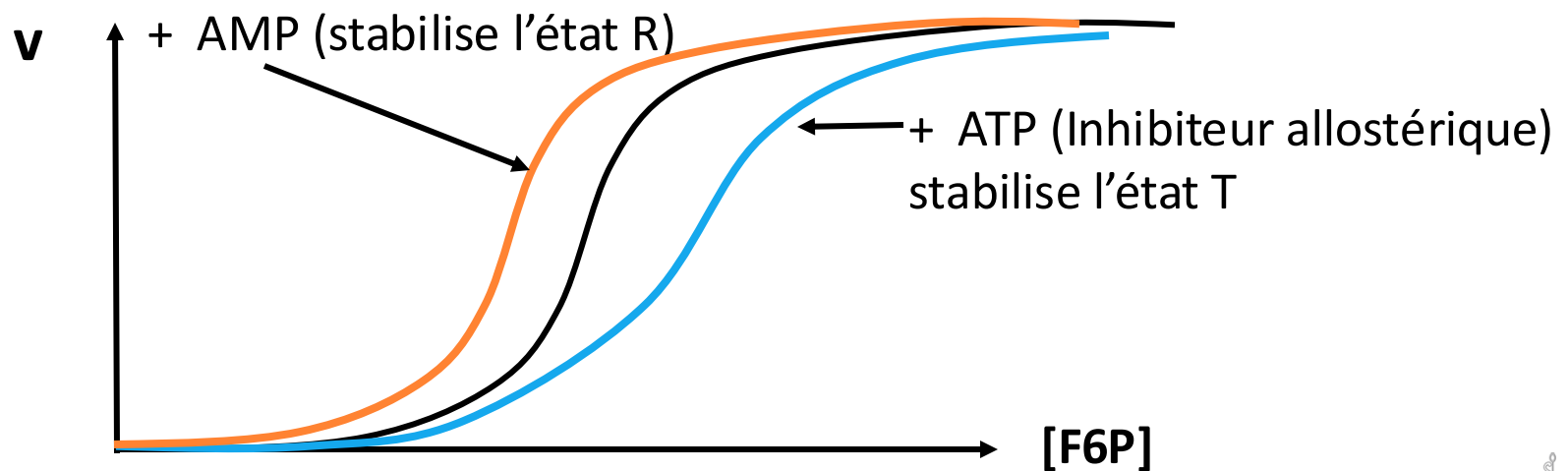
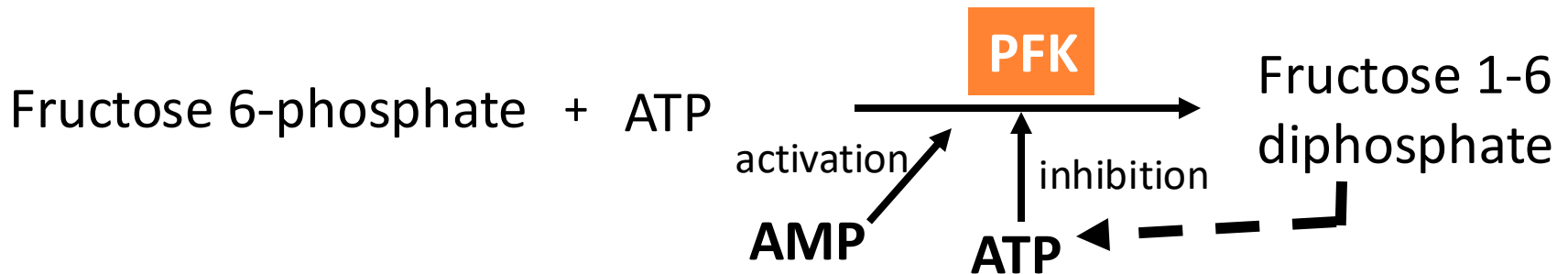
4 Régulation par allostérie

■ Cinétique enzymatique **non michaelienne**



4 Régulation par allostérie

■ Régulation allostérique de la PhosphoFructo Kinase



0 Points-clés

- ENZYMES = **catalyseurs** = accélèrent la vitesse des réactions sans modifier leur équilibre
- Grande spécificité d'action
- Constante de Michaelis $K_m = 1/K_{aff}$
- De nombreux **inhibiteurs** peuvent être utilisés en thérapeutique
- **Dosages**
 - des **enzymes** dans des conditions où $v=v_{max}$
 - des **substrats** dans les conditions où $[S] \ll K_m$



UNIVERSITÉ
DE LYON