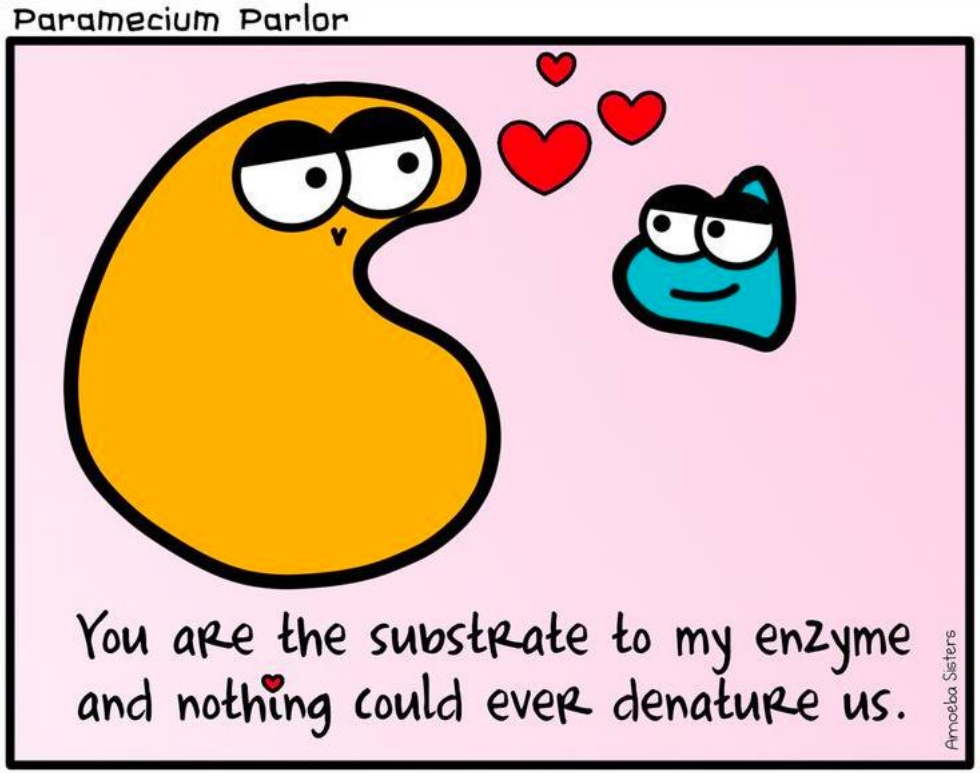
ENZYMOLOGIE

Pr Jonathan LOPEZ

PASS – UE2



0 Posez vos questions pendant le cours

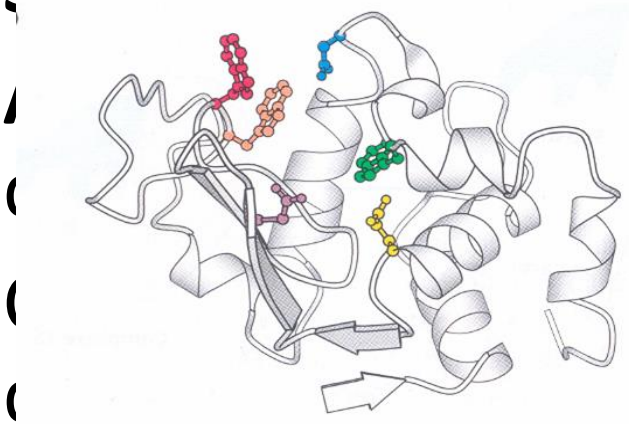
1 Allez sur wooclap.com

2 Entrez le code d'événement dans le bandeau supérieur

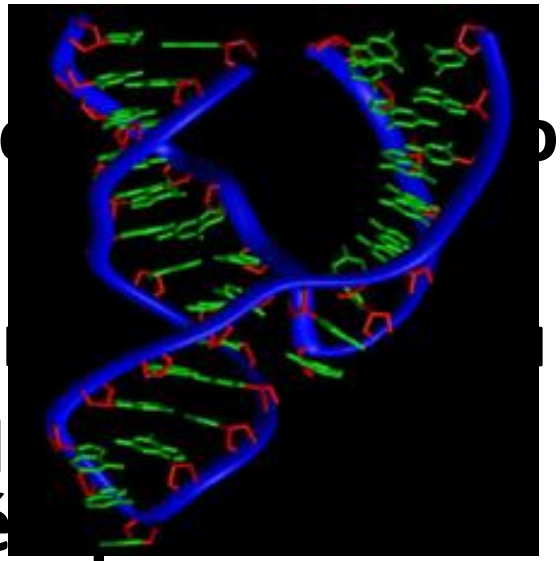
Code d'événement
RKAZOG

0 Préambule

- **ENZYMES = catalyseurs des réactions chimiques** qui se déroulent chez les êtres vivants
- **Protéines** (ou ARN)
- **Spécificité d'action élevée**
- **A de la vit ons**
- **(onneme sein**
- **(n chimiq**
- **favorisée sur le plan énergé**



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**

Faculté de Médecine Lyon Est

0 PLAN

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

Faculté de Médecine Lyon Est

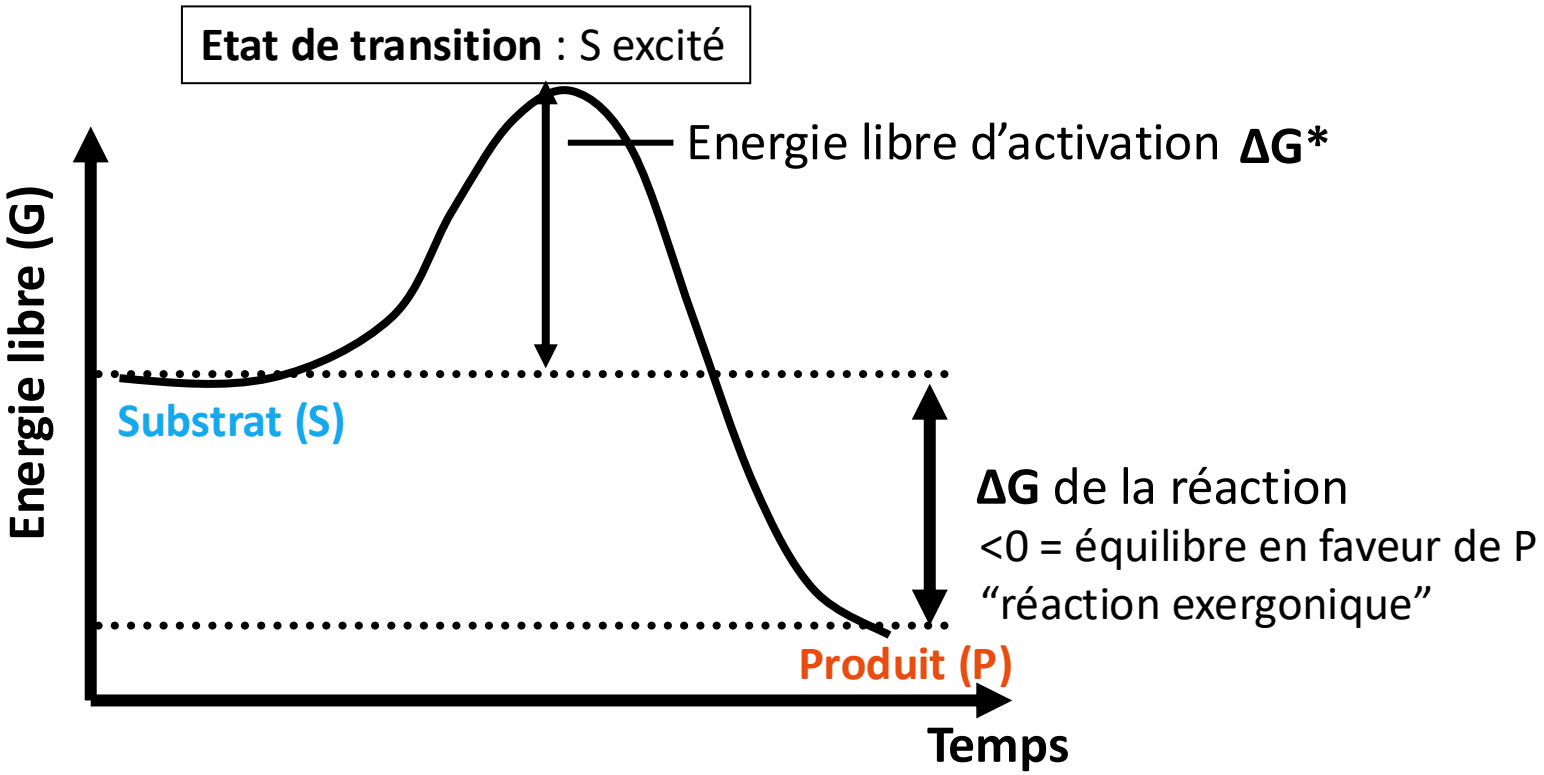
1 Notion de catalyse

- 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**

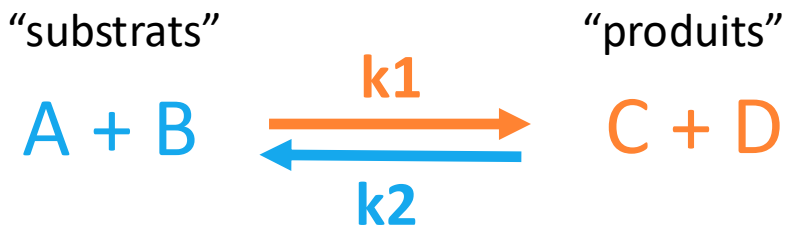
Faculté de Médecine Lyon Est

1 Etat de transition

Variation de l'énergie libre au cours de la réaction



1 ΔG d'une réaction



A l'**équilibre**, on a :

$$K_{éq} = \frac{[C][D]}{[A][B]} = \frac{k1}{k2}$$

1 ΔG d'une réaction

"substrats" "produits"

$$A + B \underset{k2}{\overset{k1}{\rightleftharpoons}} C + D$$

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

Variation d'énergie libre standard

à T=25°C, pH=7,0, concentrations A, B, C et D = 1 $mol.L^{-1}$

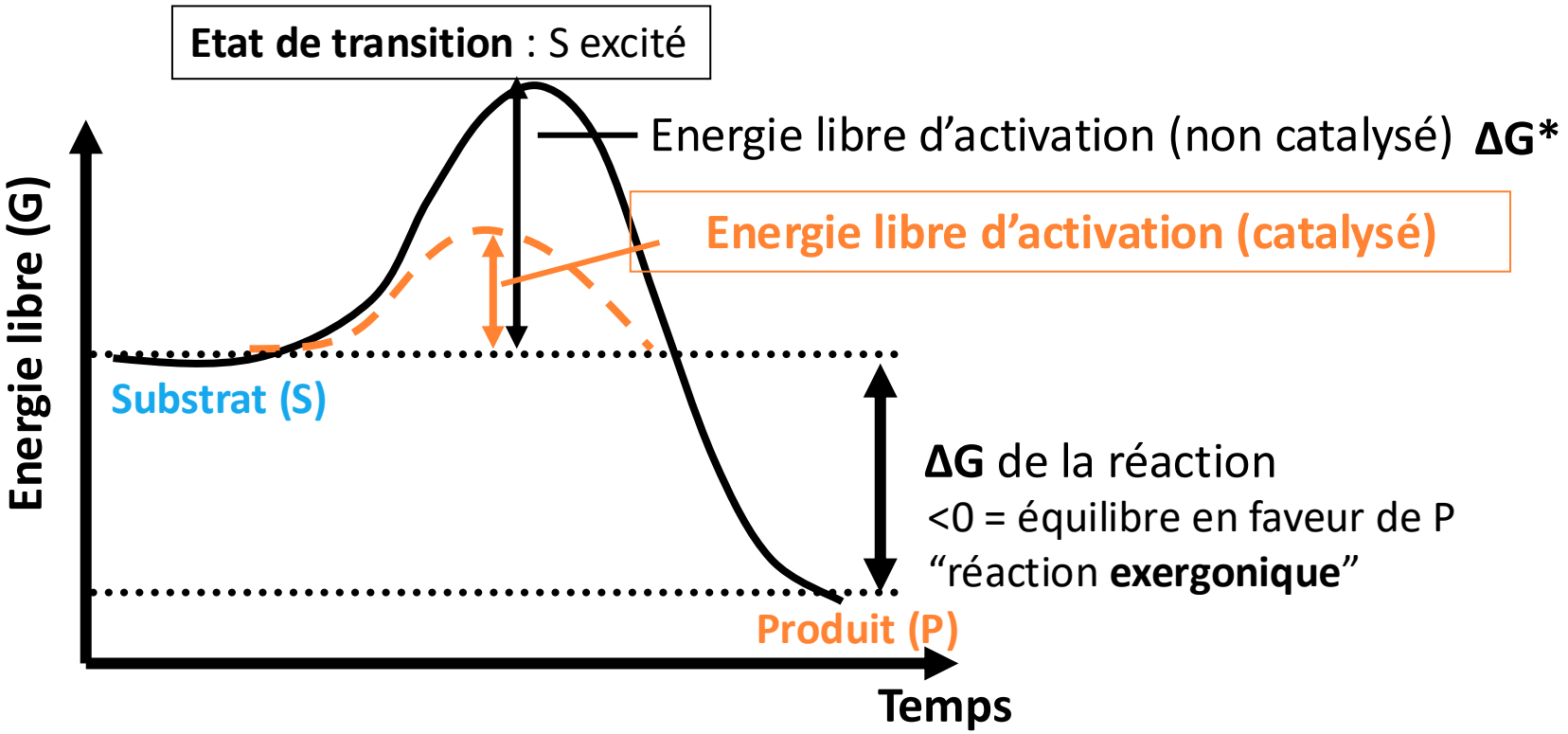
⇨ **ΔG dépend des conditions physiologiques** de la réaction

⇨ $\Delta G^{0'}$ indique sens et intensité de la réaction

Faculté de Médecine Lyon Est

1 Etat de transition

Variation de l'énergie libre au cours de la réaction



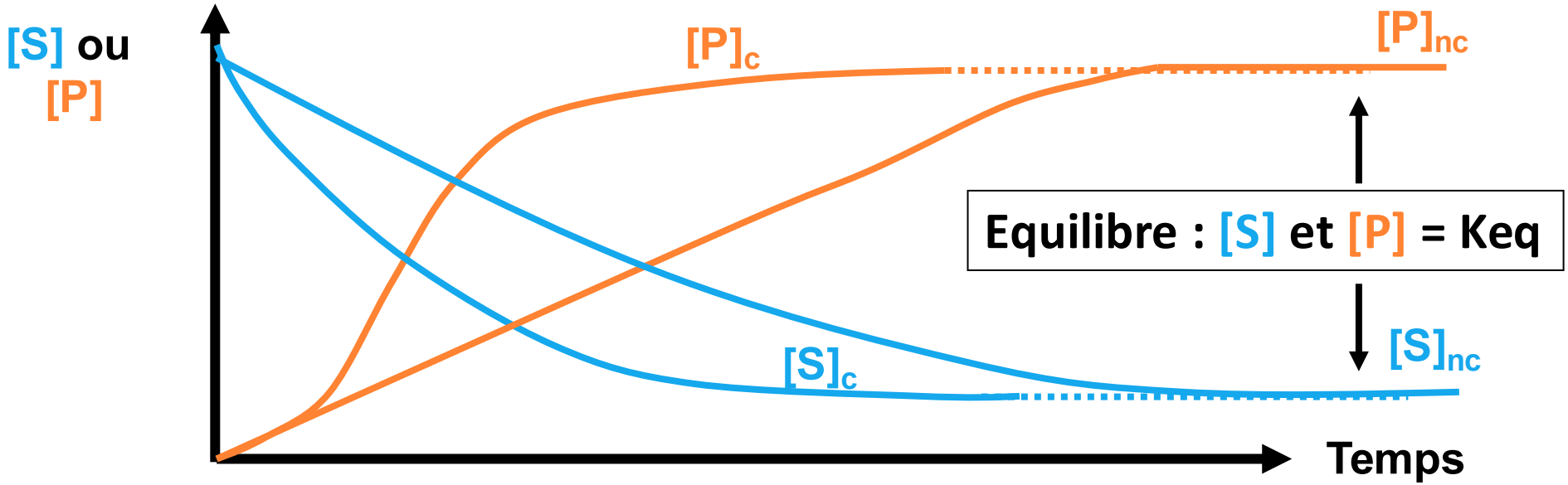
1 ΔG d'une réaction

- Les enzymes **ne peuvent pas** rendre possible une réaction **endergonique** (**ΔG>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.

Faculté de Médecine Lyon Est

1 Notion de catalyse

Enzyme ⇨ plus vite à l'équilibre



nc = non catalysé ; c = catalysé

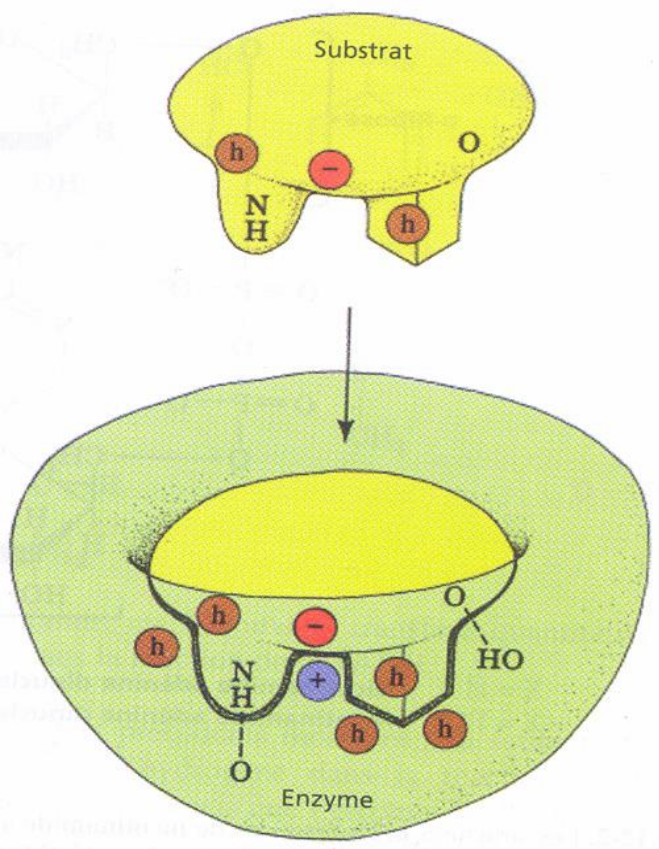
Constante catalytique K_{cat} (s^{-1})

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

1 Complexe enzyme-substrat : notion de site actif

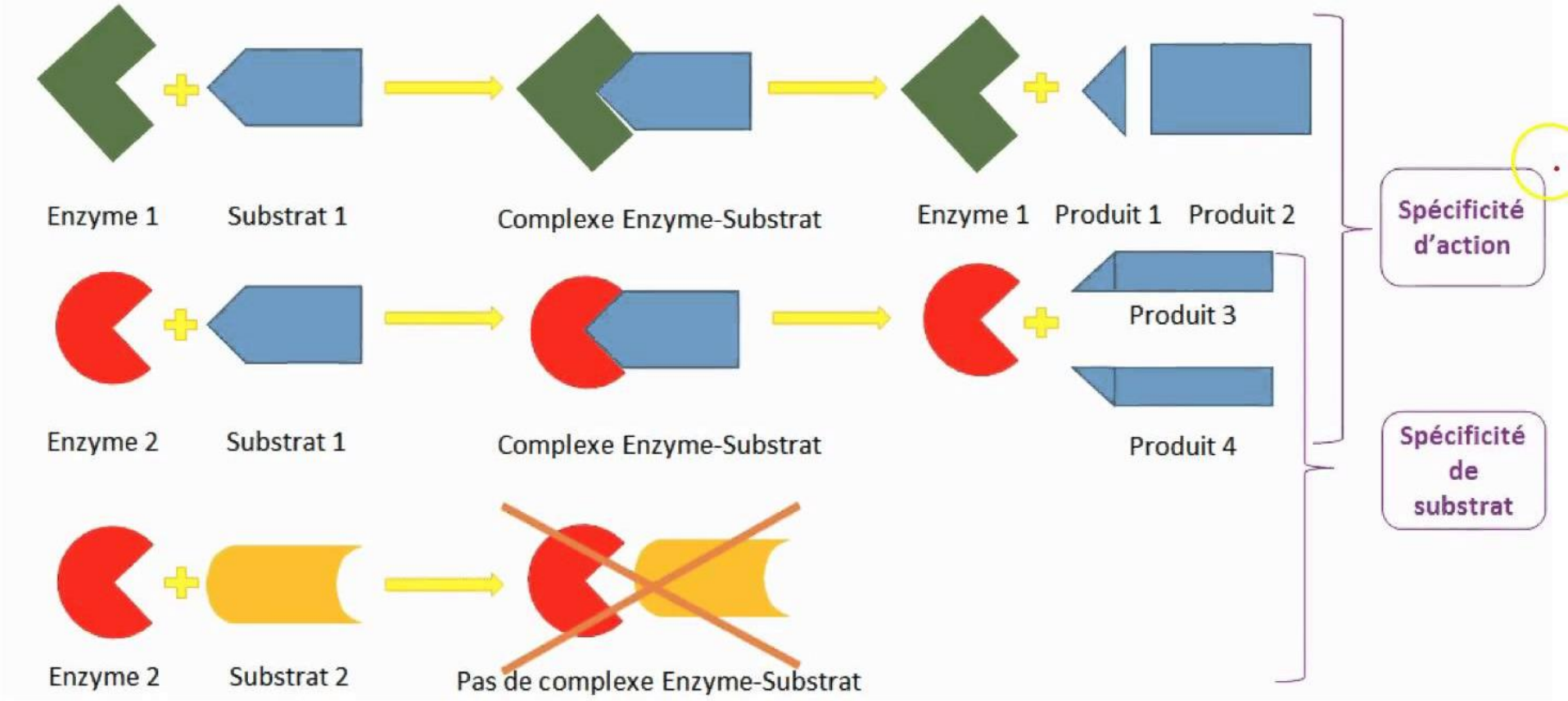
- Interaction entre E et S : slt quelques AA = **site actif de l'enzyme**
- **Complémentarité** entre le site actif de E et S
  - **spatiales** (formes **3D**)
  - **physiques** (liaisons entre groupements voisins)

⇨ **spécificité +++**



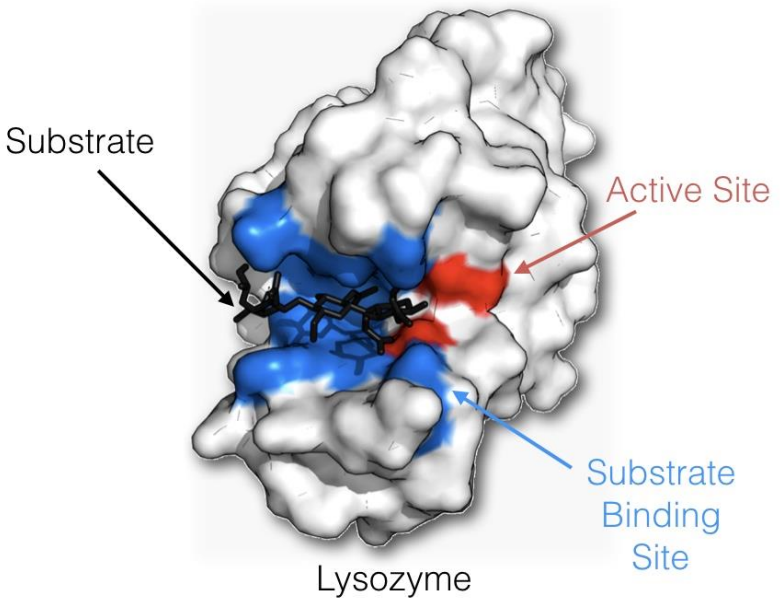
1 Spécificité enzymatique

- **Double spécificité** : d'action et de substrat



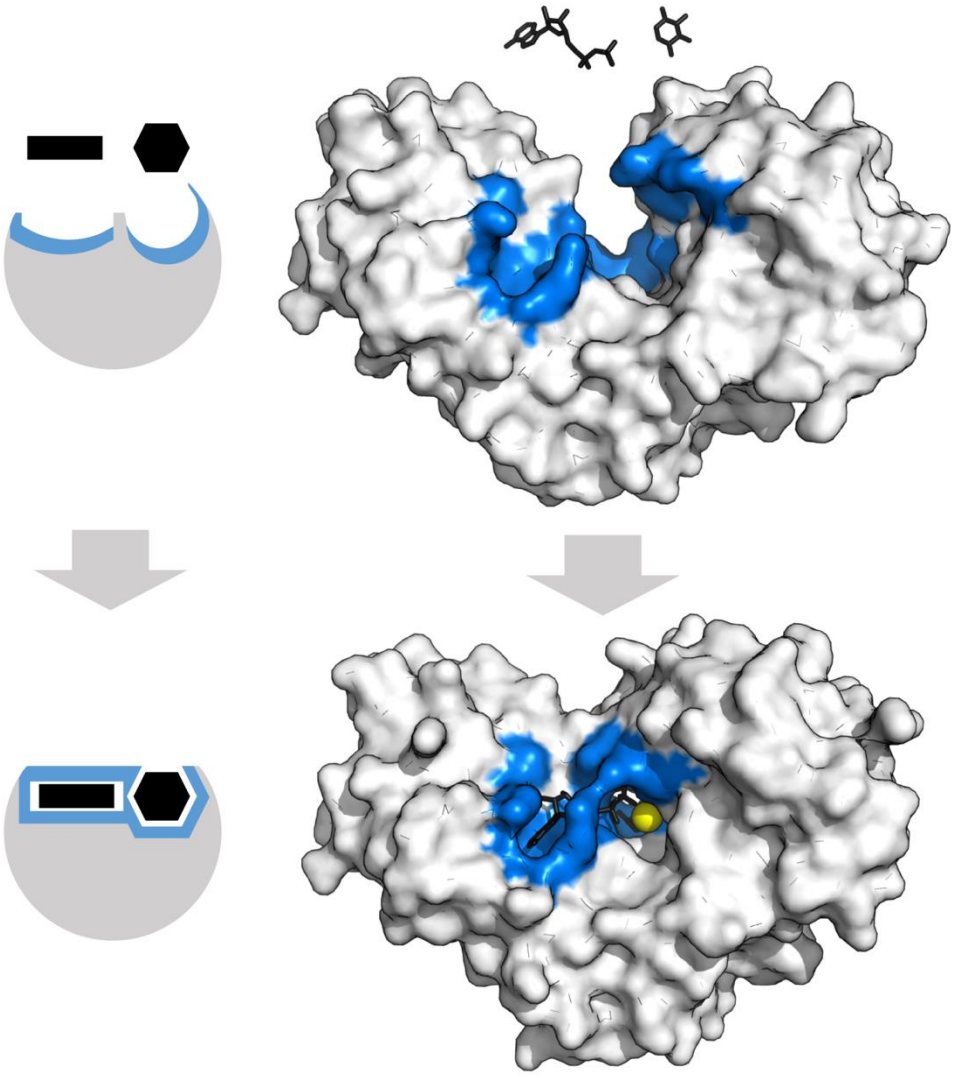
1 Complexe enzyme-substrat : notion de site actif

- 2 groupes d'AA dans le site actif
  - **Site de fixation :** reconnaissance spatiale du substrat et **établissement de liaisons faibles ⇨ ΔG***
  - **Site catalytique :** transformation chimique de S en P

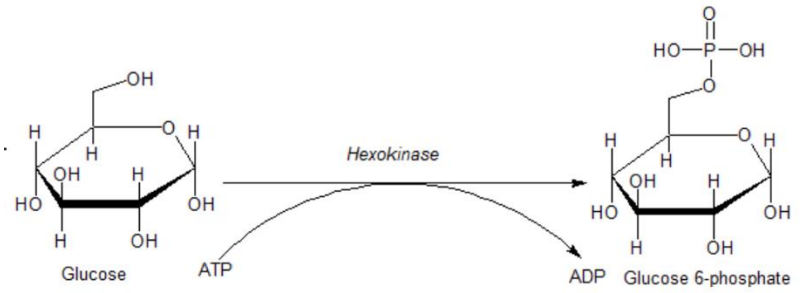


Site de fixation + site catalytique = site actif

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

Faculté de Médecine Lyon Est

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

Faculté de Médecine Lyon Est

1 Cofacteurs : ions métalliques

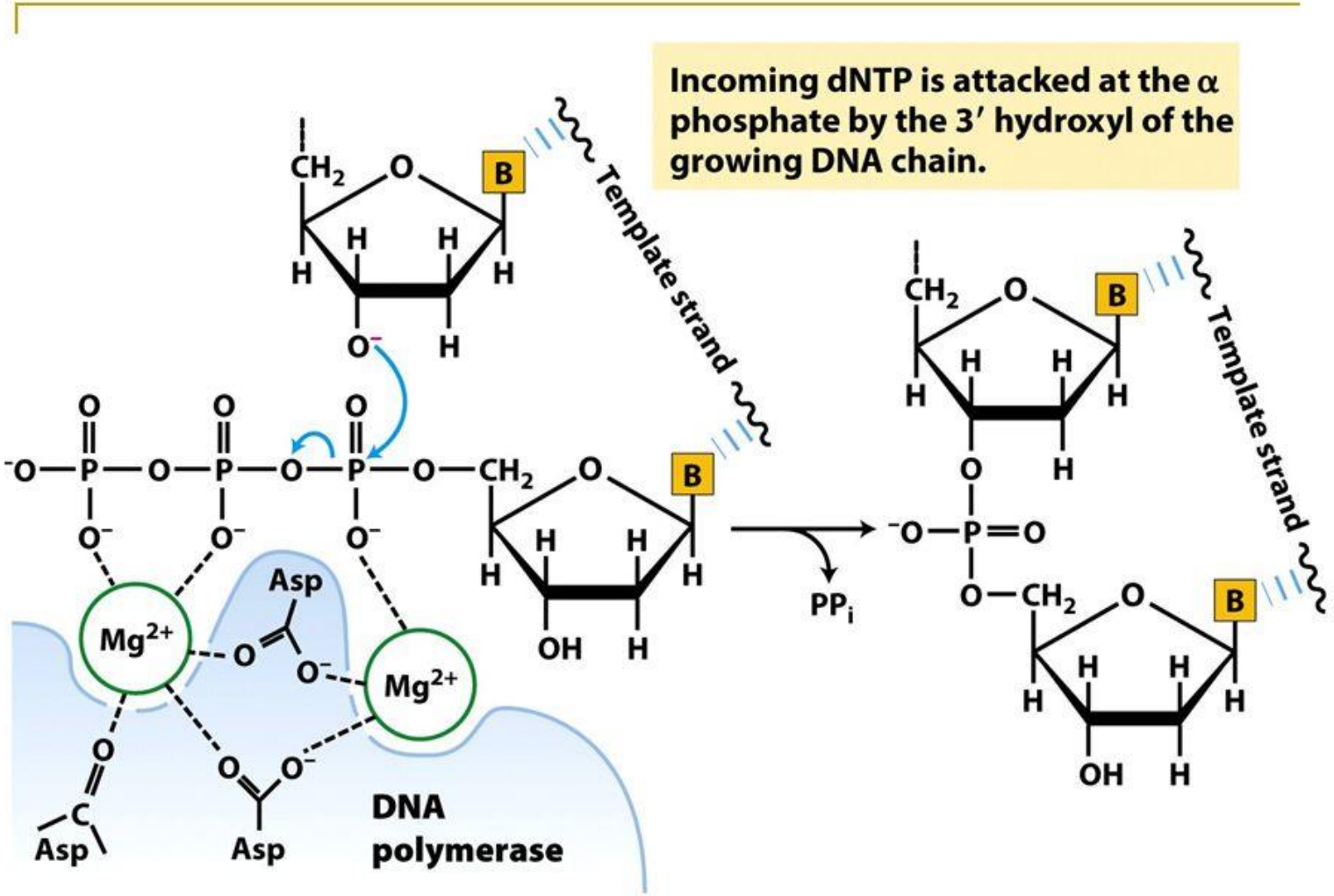
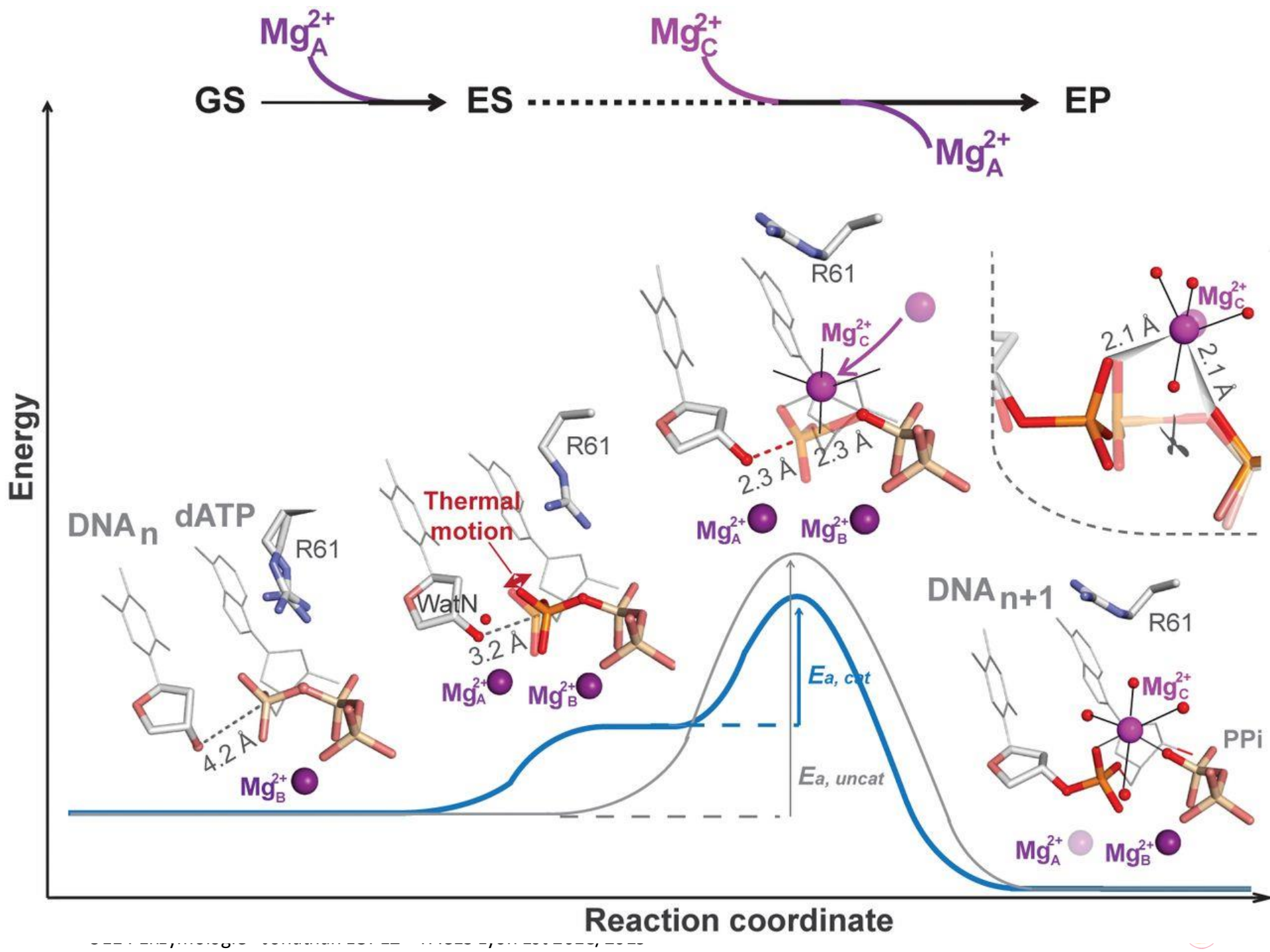
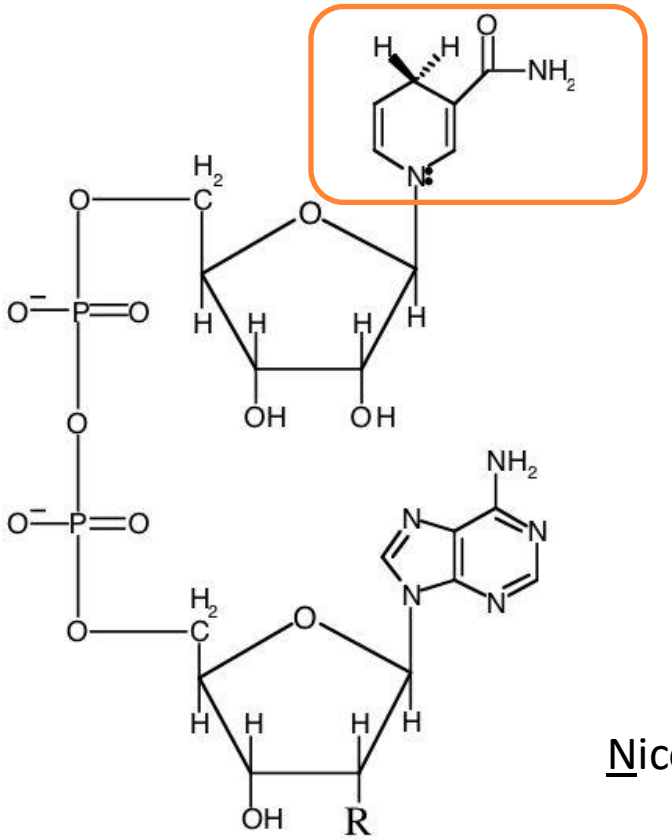


Figure 25-5b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company


Mg_A^{2+}
GS
ES
Mg_C^{2+}
EP
Mg_A^{2+}
Energy
Reaction coordinate
DNA_n
dATP
R61
4.2 Å
Mg_B^{2+}
Thermal motion
WatN
3.2 Å
Mg_A^{2+}
Mg_B^{2+}
R61
Mg_C^{2+}
2.3 Å
2.3 Å
Mg_A^{2+}
Mg_B^{2+}
R61
2.1 Å
2.1 Å
Mg_C^{2+}
$Ea_{, cat}$
$Ea_{, uncat}$
DNA_{n+1}
R61
Mg_C^{2+}
PPi
Mg_A^{2+}
Mg_B^{2+}

1 Cofacteurs : coenzymes libres

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



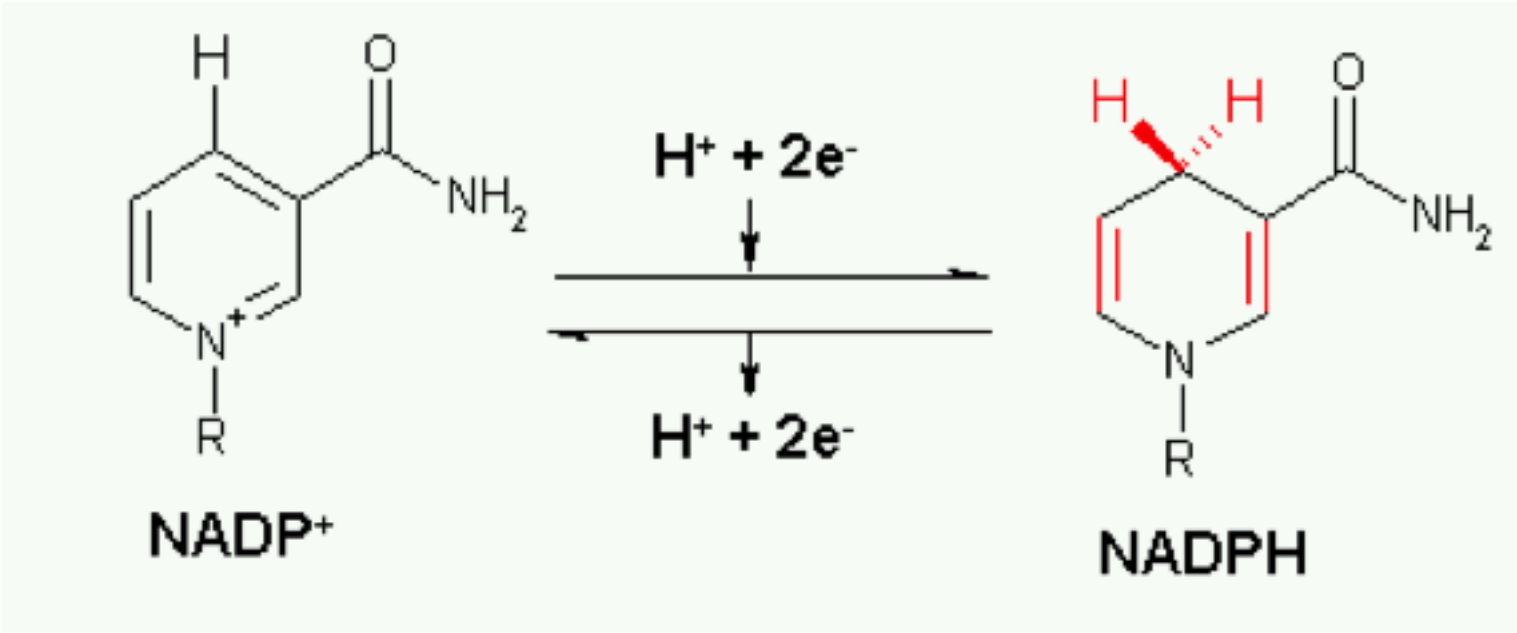
R= OH = NADH

O⁻P=O = NADPH

Nicotinamide Adénine Dinucléotide

1 Cofacteurs : coenzymes libres

Coenzymes libres



OXYDÉ

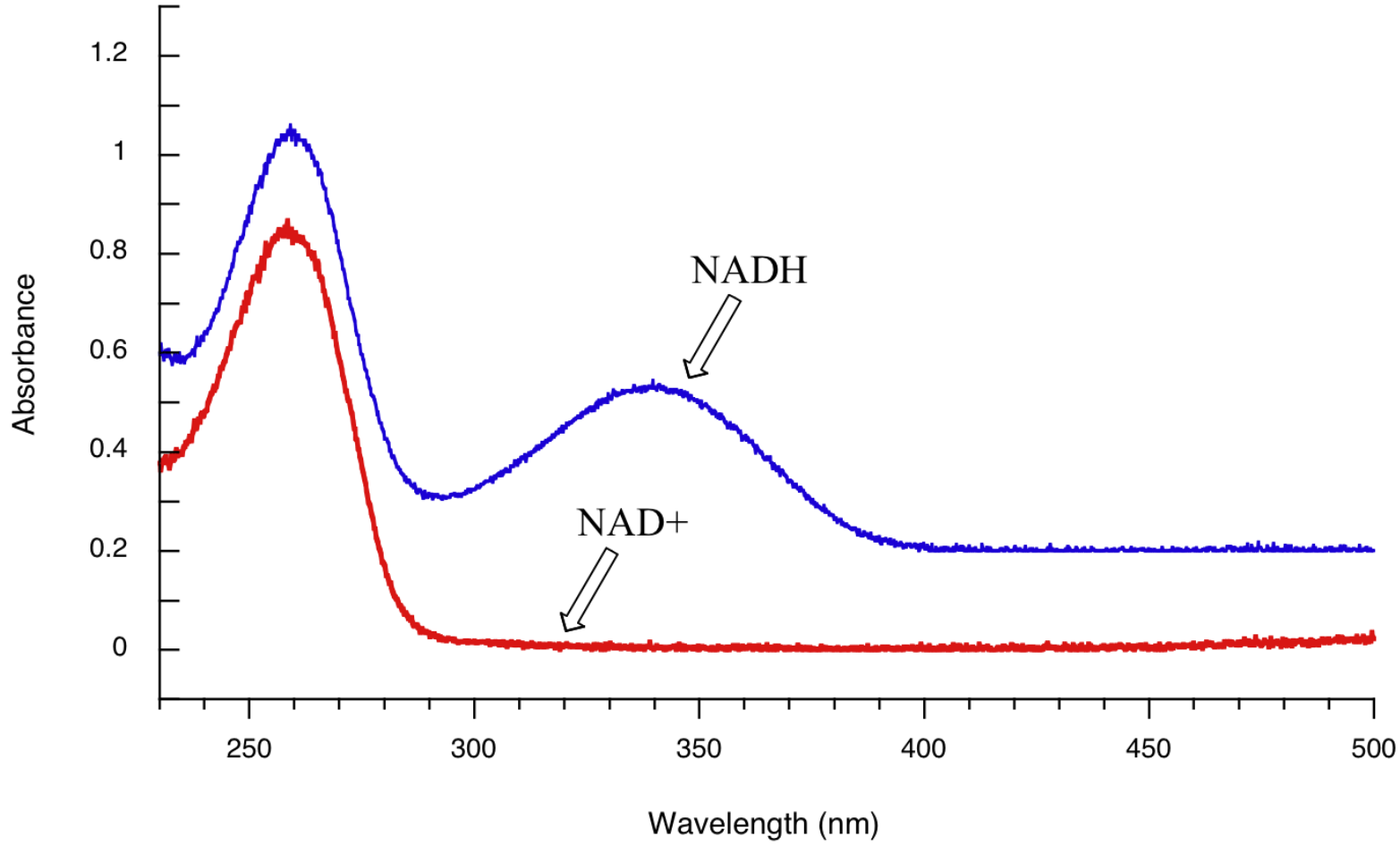
N'absorbe PAS à 340nm

RÉDUIT

ABSORBE à 340nm

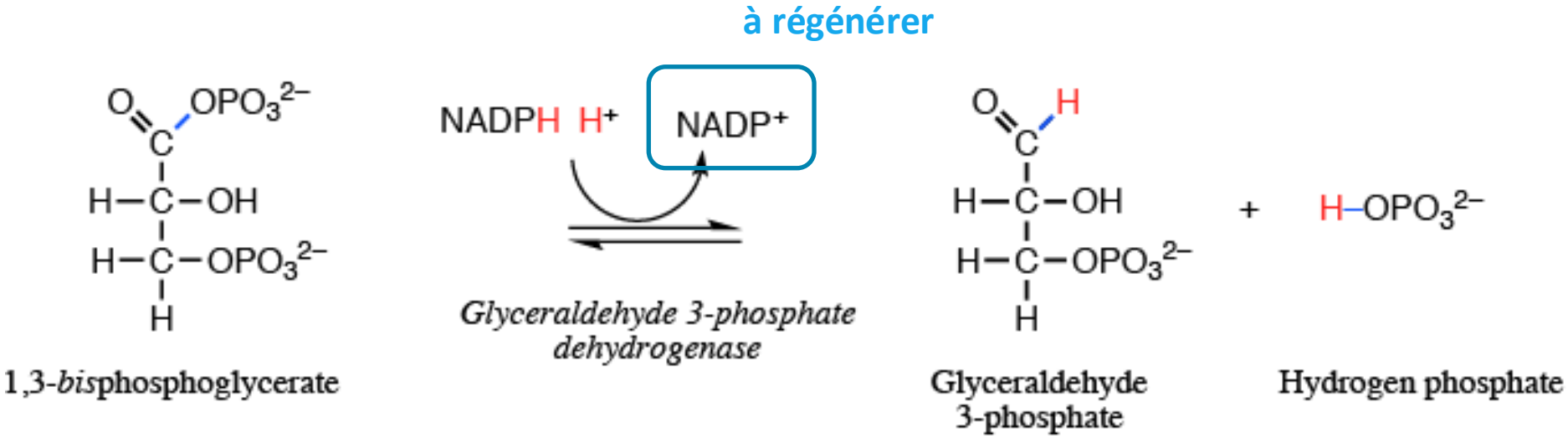
1 Cofacteurs : coenzymes libres

Coenzymes libres



1 Cofacteurs : coenzymes libres

Coenzymes libres

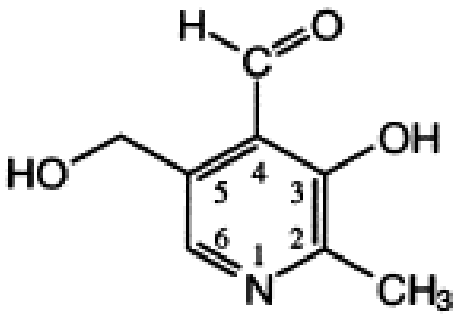


Suivi de la cinétique de cette réaction ? Diminution de A(340nm)

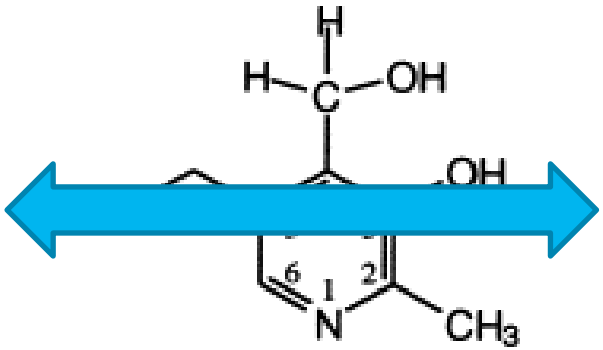
1 Cofacteurs : coenzymes liés

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

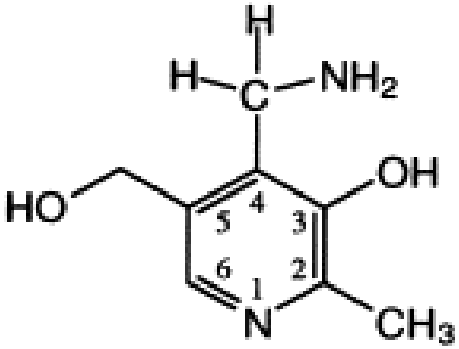
Pyridoxal



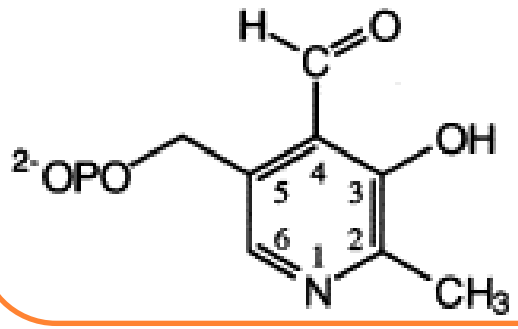
Pyridoxine **(vit B6)**



Pyridoxamine



Pyridoxal 5'-Phosphate

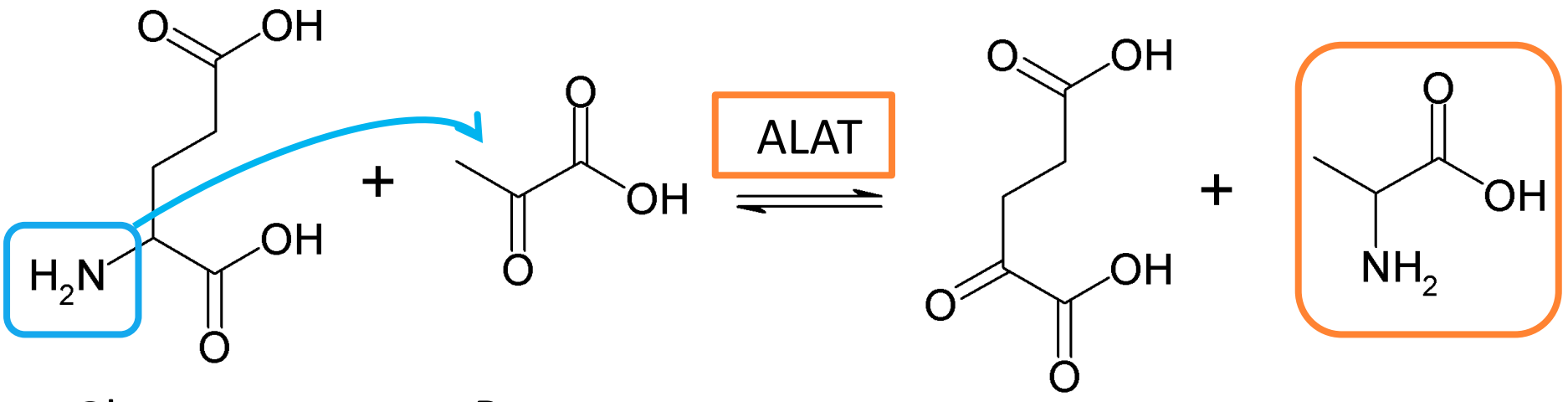


Transfert de groupements NH_2

1 Cofacteurs : coenzymes liés

Coenzymes liés : mécanisme PING-PONG

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



Glutamate Pyruvate α–cétoglutarate Alanine

1 Cofacteurs : coenzymes liés

Coenzymes liés : mécanisme PING-PONG

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

Sens PING :

Ala + **P-pyridoxAL** <=> Pyr + **P-pyridoxamine**

Sens PONG :

α-CG + **P-pyridoxAMINE** <=> Glu + **P-pyridoxAL**

Cycle complet « PING-PONG »:

α-CG + ALA <==> GLU + PYR

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

Faculté de Médecine Lyon Est

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)

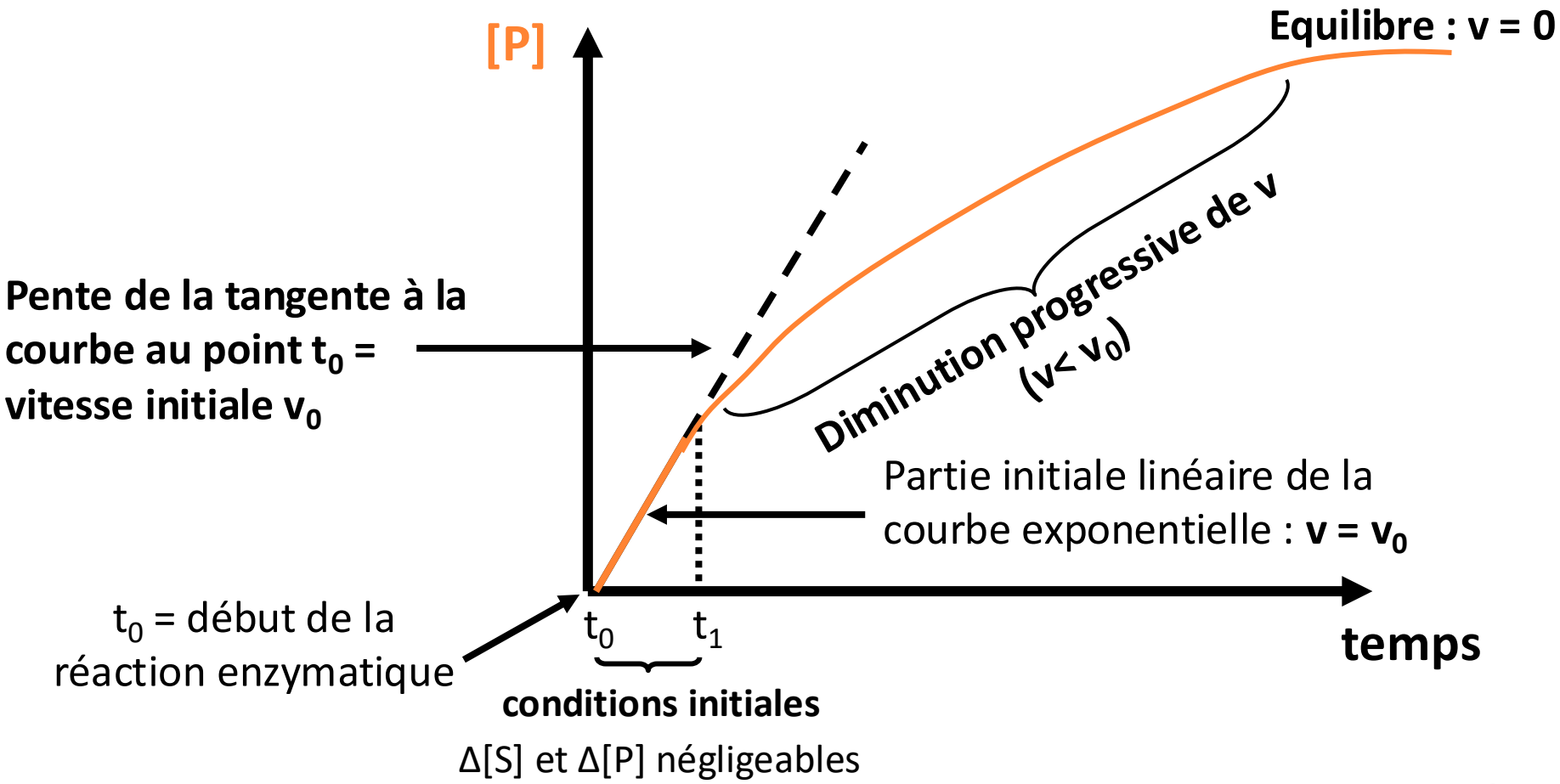
$$v = \left(\frac{d[P]}{dt}\right)_t$$

- **Vitesse initiale (v_0)**

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

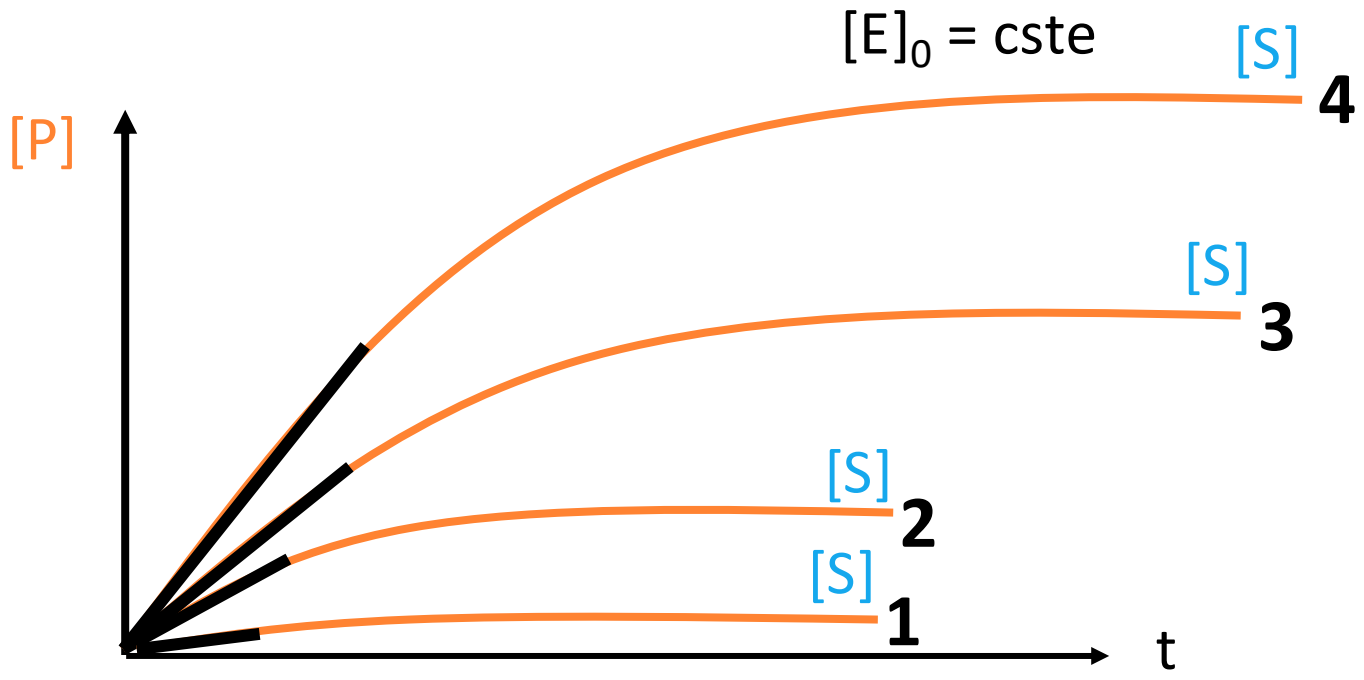
2 Cinétique enzymatique

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 $[E]_0$=constante



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

Faculté de Médecine Lyon Est

2 Equation de Michaelis-Menten

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

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES$$

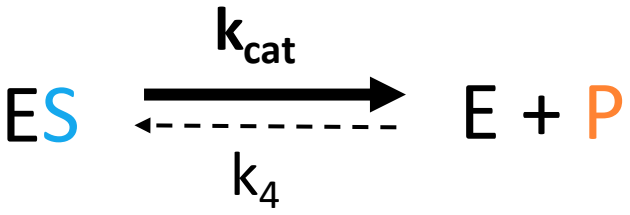
$k_1/k_2 = K_{aff} = 1/K_d$

K_{aff} : constante d'affinité

K_d : constante de dissociation

2 Equation de Michaelis-Menten

- **2ème 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**



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

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

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”

Faculté de Médecine Lyon Est

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

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

$\mathbf{k_{cat} << k_1}$ donc $k_{cat}/k_1 \# 0$

donc $\mathbf{K_m \# 1/ K_{aff} \# K_d}$

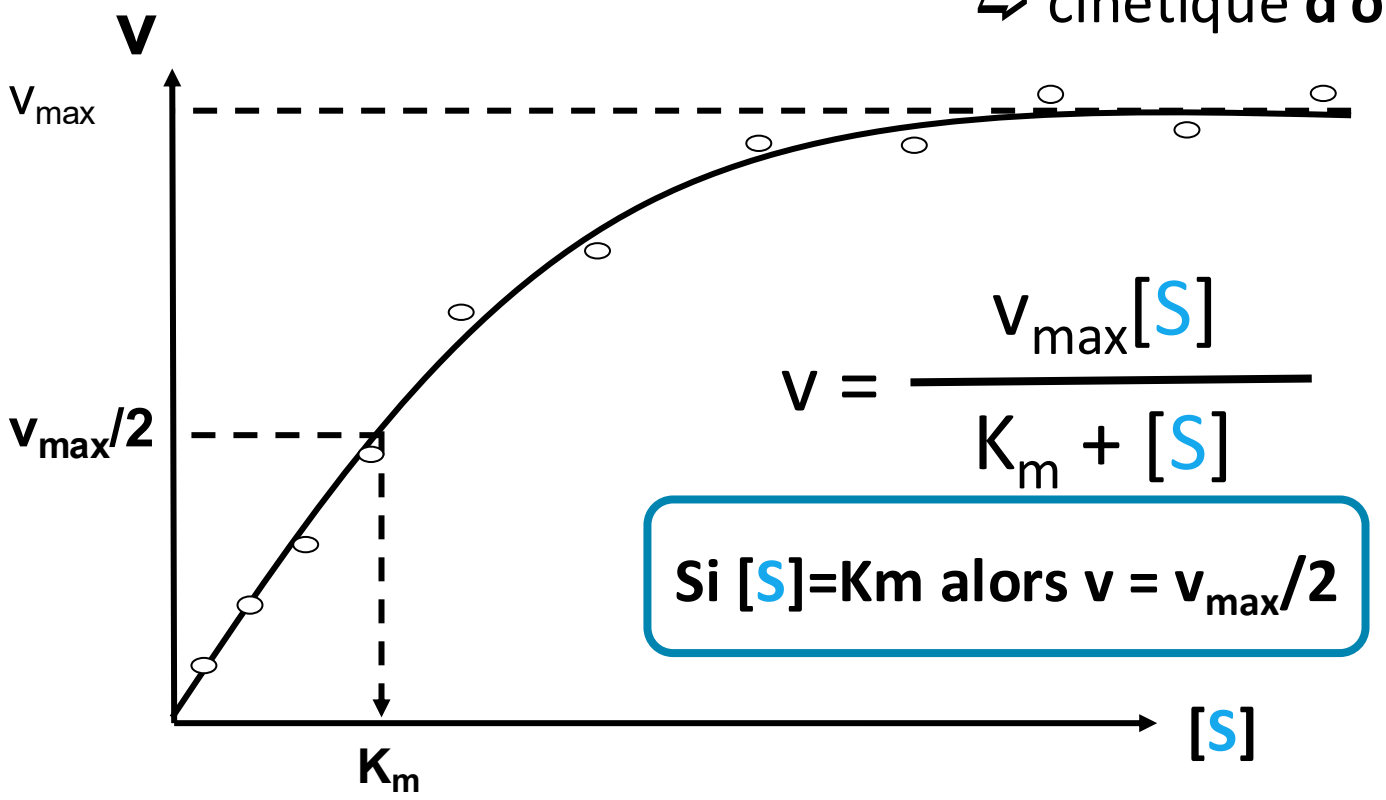
K_m est inversement proportionnelle à l'affinité d'une enzyme pour un substrat donné

2 Représentation de Michaelis-Menten

v=f([S])

Si **[S] élevé** alors $v = v_{max}$

⇨ cinétique **d'ordre 0**



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

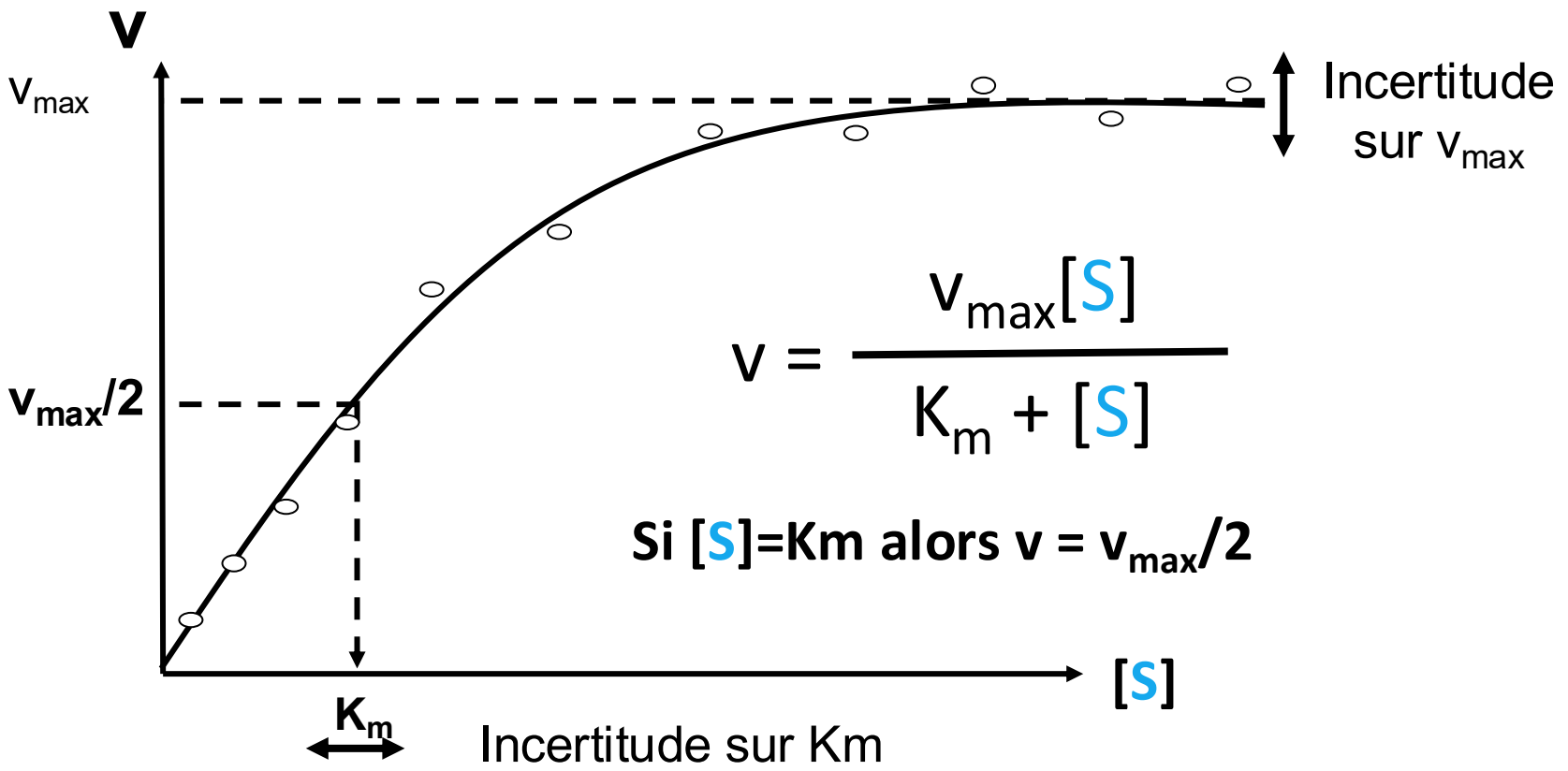
Si [S]=Km alors $v = v_{max}/2$

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

Faculté de Médecine Lyon Est

2 Représentation de Michaelis-Menten

v=f([S])



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

2 Représentation de Lineweaver-Burk

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

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

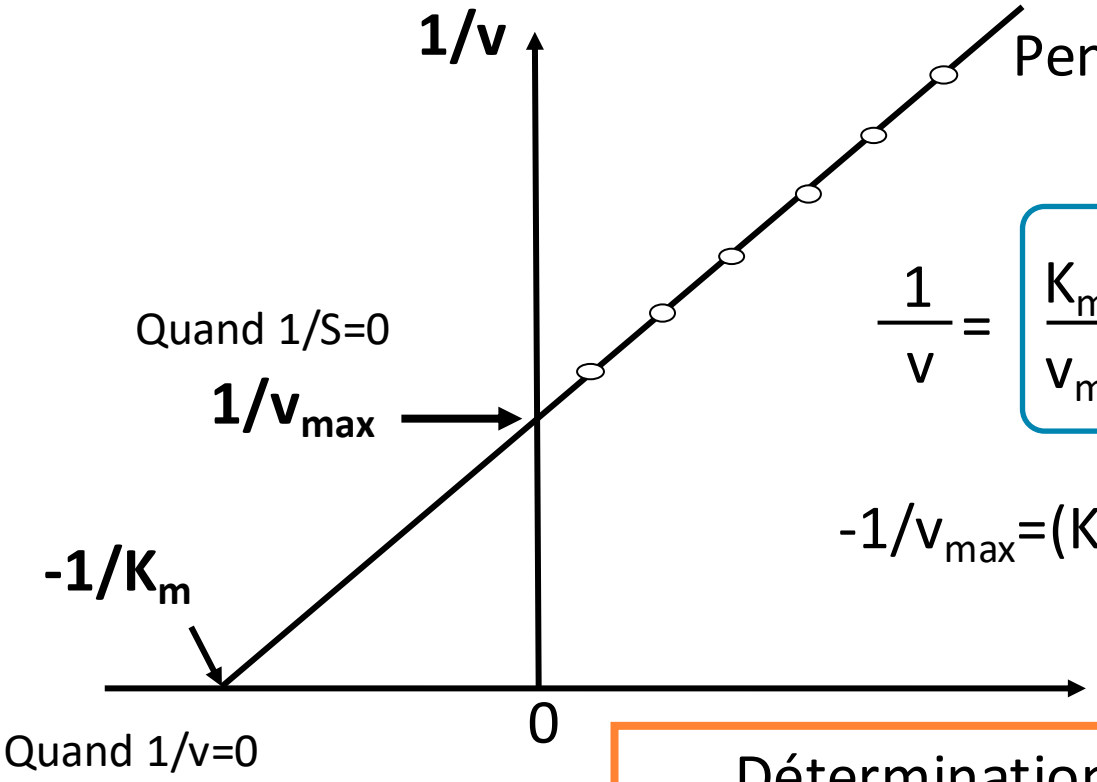
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}}\,\frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Y=aX+b

Faculté de Médecine Lyon Est

2 Représentation de Lineweaver-Burk

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



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

$$-1/v_{max} = (K_m/v_{max}) * (1/S)$$

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

Faculté de Médecine Lyon Est

2 Représentation de Eadie-Hofstee

v/[S]=f(v)

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{donc} \quad v_{max} = \frac{v*(K_m + [S])}{[S]}$$

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

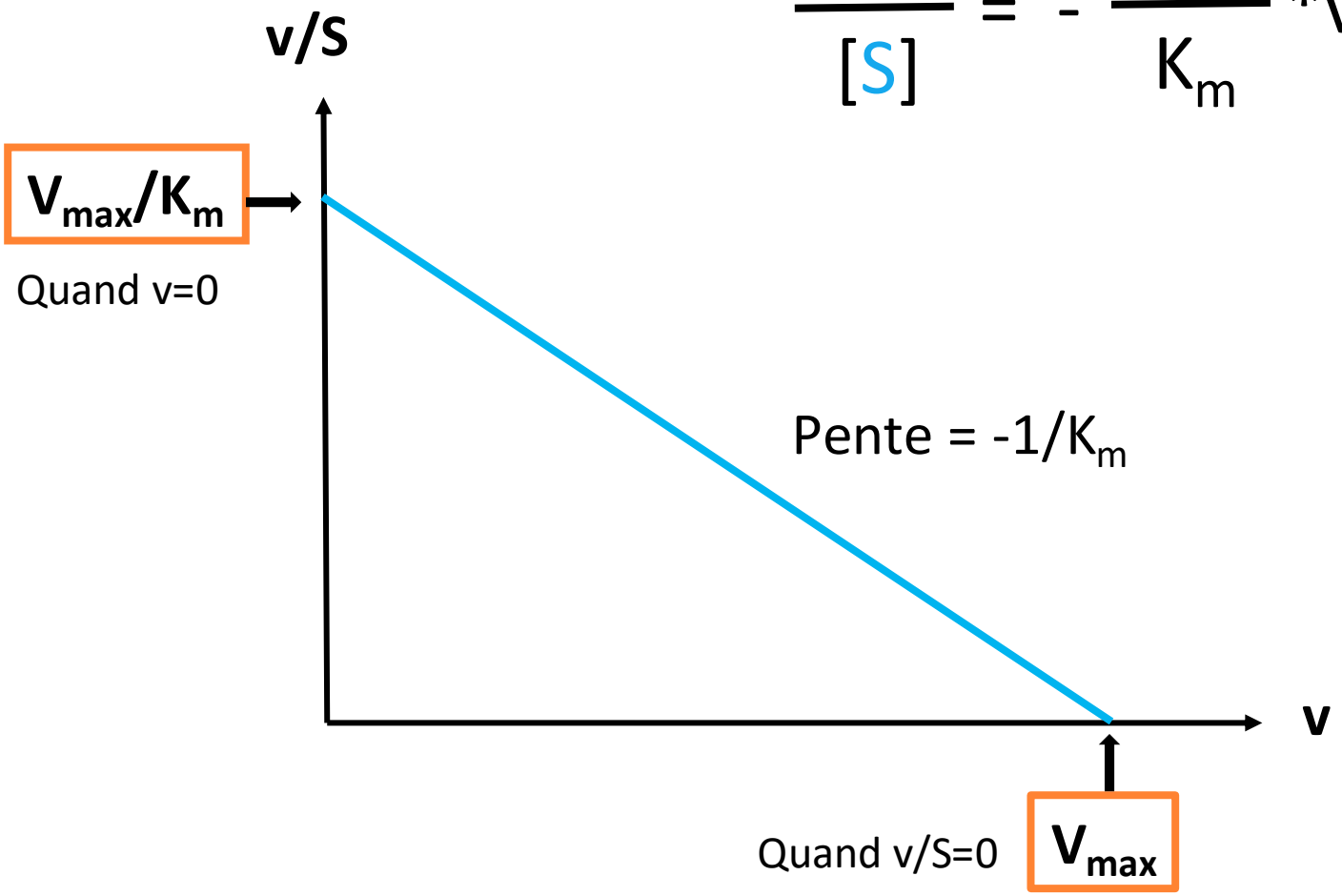
$$\frac{v}{[S]} = -\frac{1}{K_m} * v + \frac{v_{max}}{K_m}$$

Y=aX+b

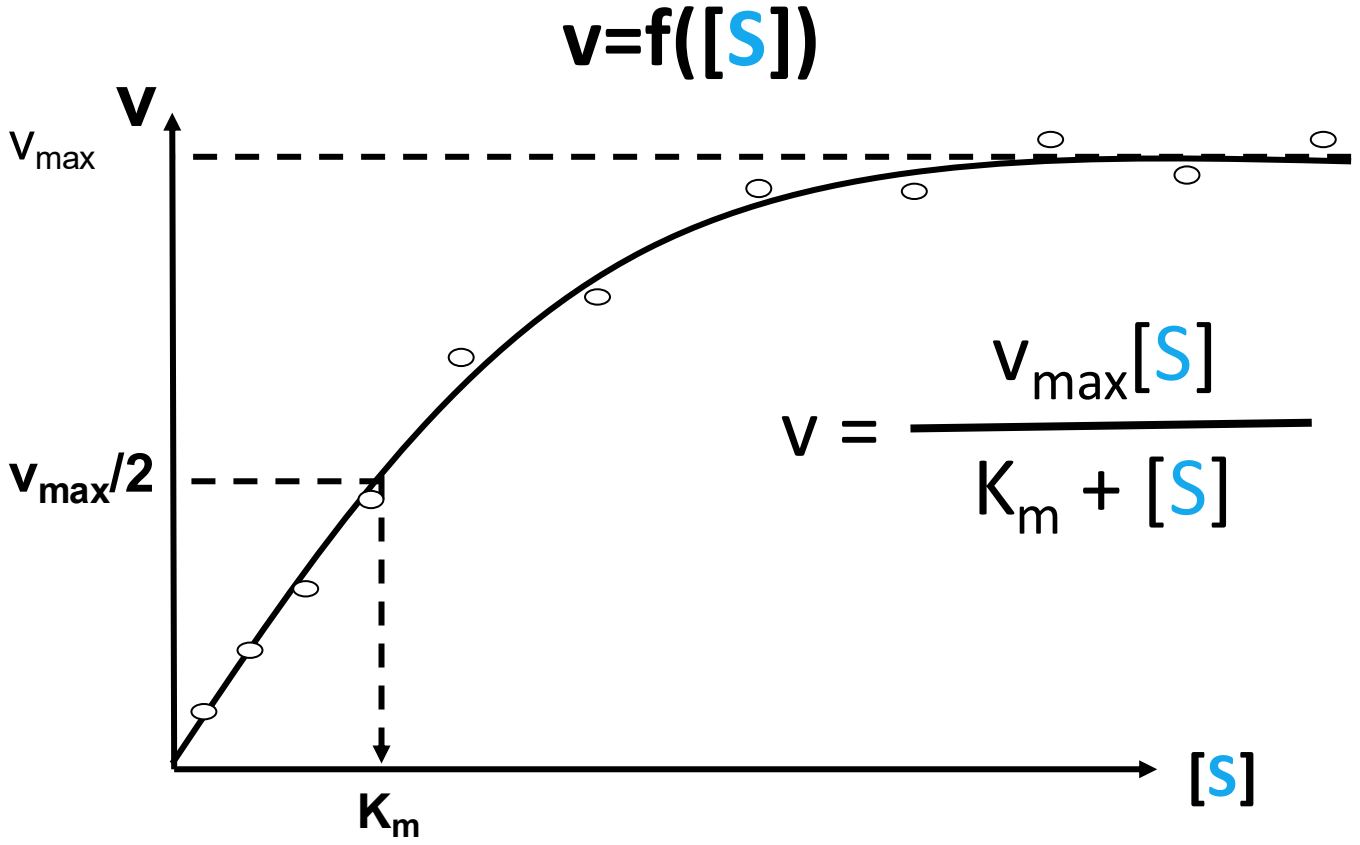
Faculté de Médecine Lyon Est

2 Représentation de Eadie-Hofstee

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



2 Mesure de [S]



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

Mesure de la concentration d'un substrat

❷ 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 :

$$\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{glucose oxydase}} \text{acide gluconique} + H_2O_2$$

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

$$2H_2O_2 + \text{phenol} + \text{amino-4 antipyrine} \xrightarrow{\text{peroxydase}} \text{quinonéimine} + 4\,H_2O$$

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

Faculté de Médecine Lyon Est

❷ 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.

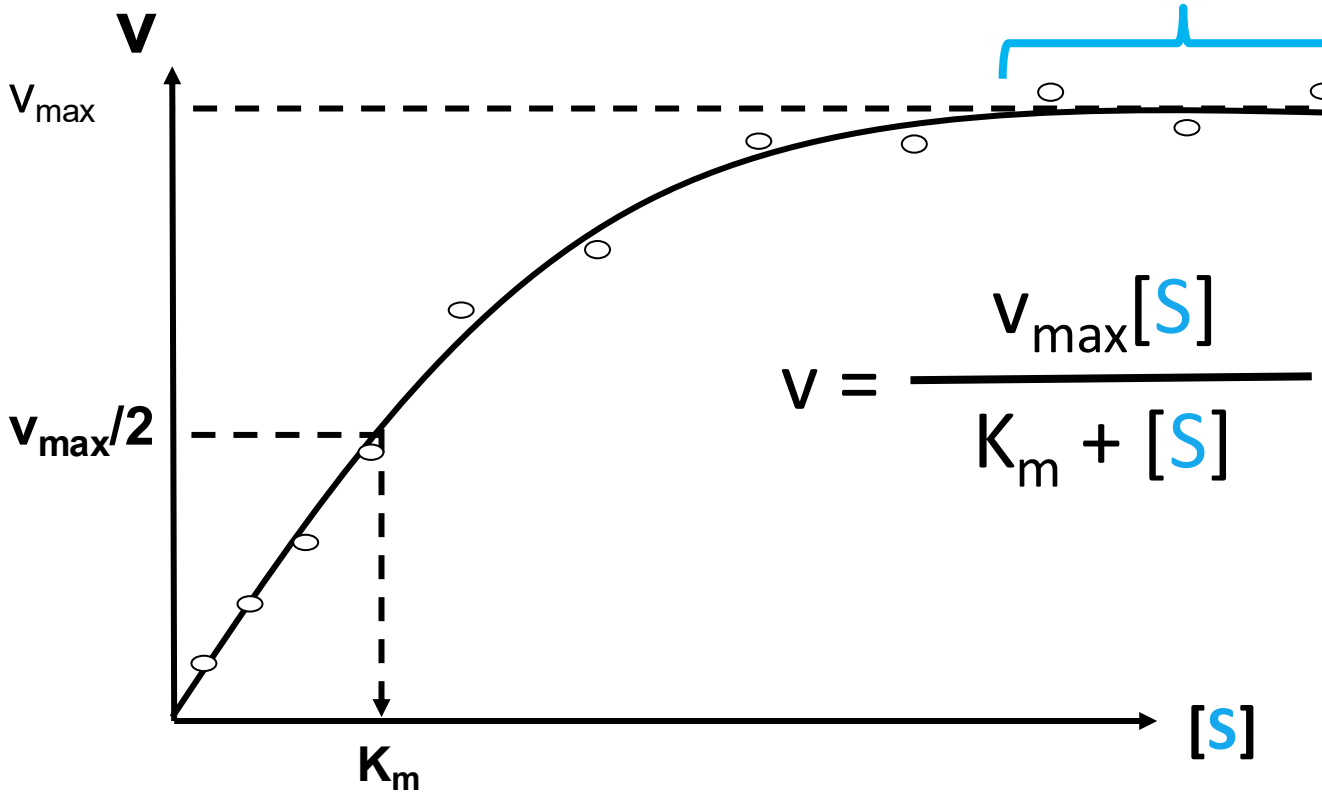
2 Mesure d'une activité enzymatique

Si **[S] >> K_m** alors **v = v_{max}**

⇨ cinétique **d'ordre 0**

v=f([S])

dépend de [E]



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

Faculté de Médecine Lyon Est

❷ Mesure d'une activité enzymatique

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

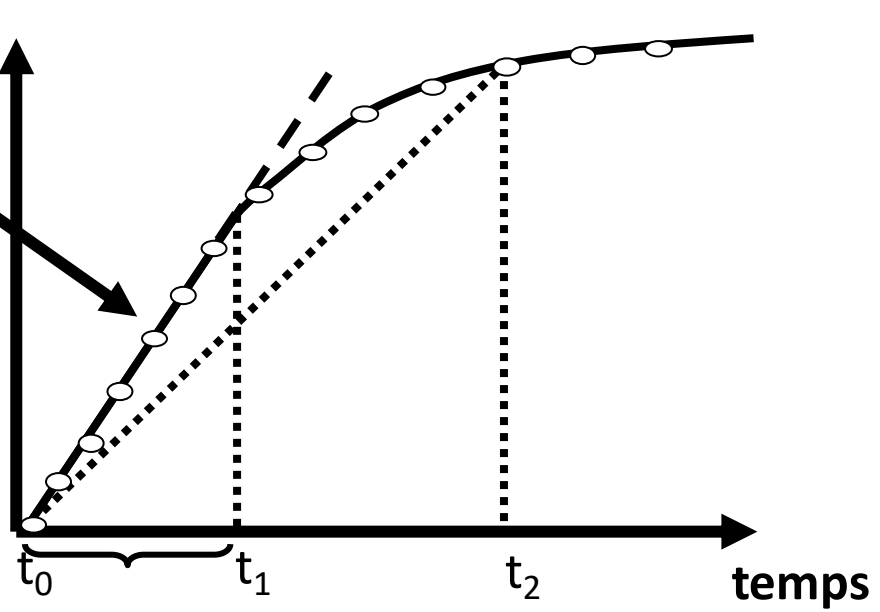
Calcul de la **pente = ΔA/ Δt**

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

$\Delta A/\Delta t = \varepsilon \, l \, \Delta[P]/\Delta t$

$[\Delta A/\Delta t] / \varepsilon \, l = \Delta[P]/\Delta t$

$v_0 = [\Delta A/\Delta t] / \varepsilon \, l$



Avec ΔA/ Δt en min^{-1}, ε en mol^{-1}. L. cm^{-1}, l en cm

Donc **v_0 exprimé en $mol.L^{-1}. min^{-1}$**

2 Mesure d'une activité enzymatique

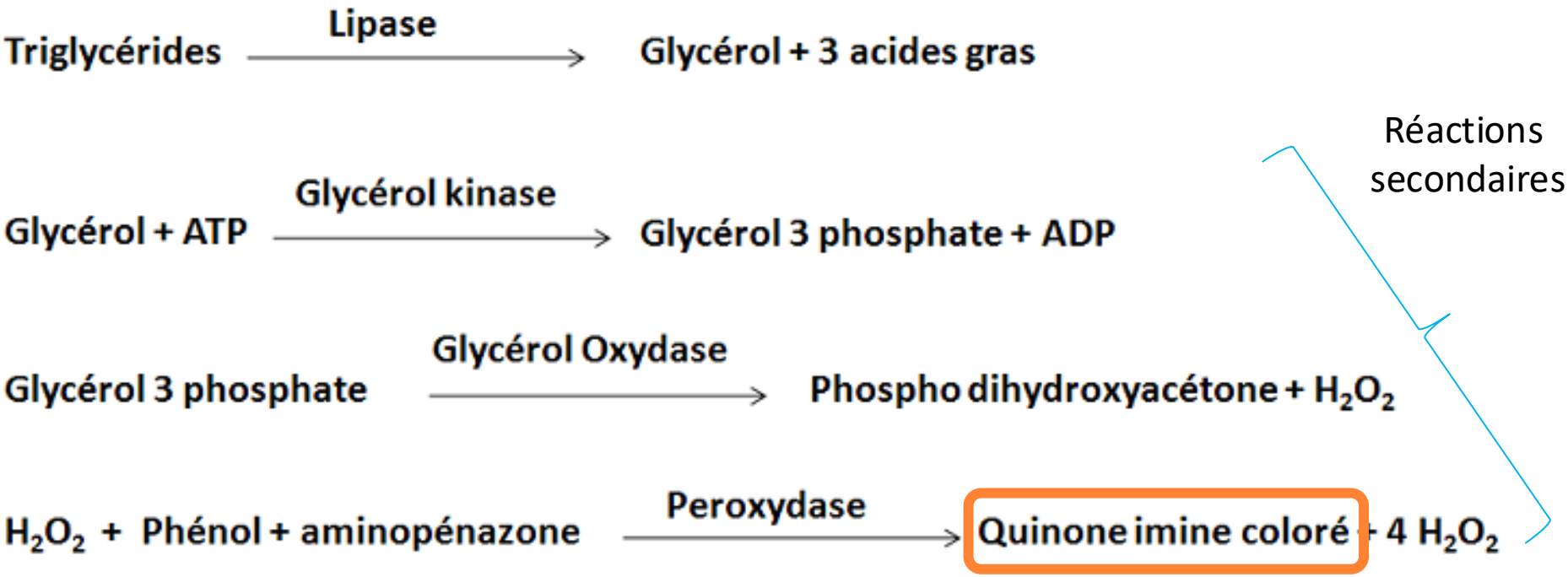
- Unités d'activité enzymatique
  - **Ex unités internationales** (UI) :
    1 UI = quantité d'enzyme catalysant la transformation d'**1 micromole de S par minute**.
  - **Katal** (unité du SI) = quantité d'enzyme catalysant la transformation d'**1 mole de S par seconde**.
  - 1 UI = 16,6 nKat
- Expression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

Faculté de Médecine Lyon Est

2 Mesure d'une activité enzymatique

EXAMPLE

- Exemple : Lipase et pancréatite aigüe



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

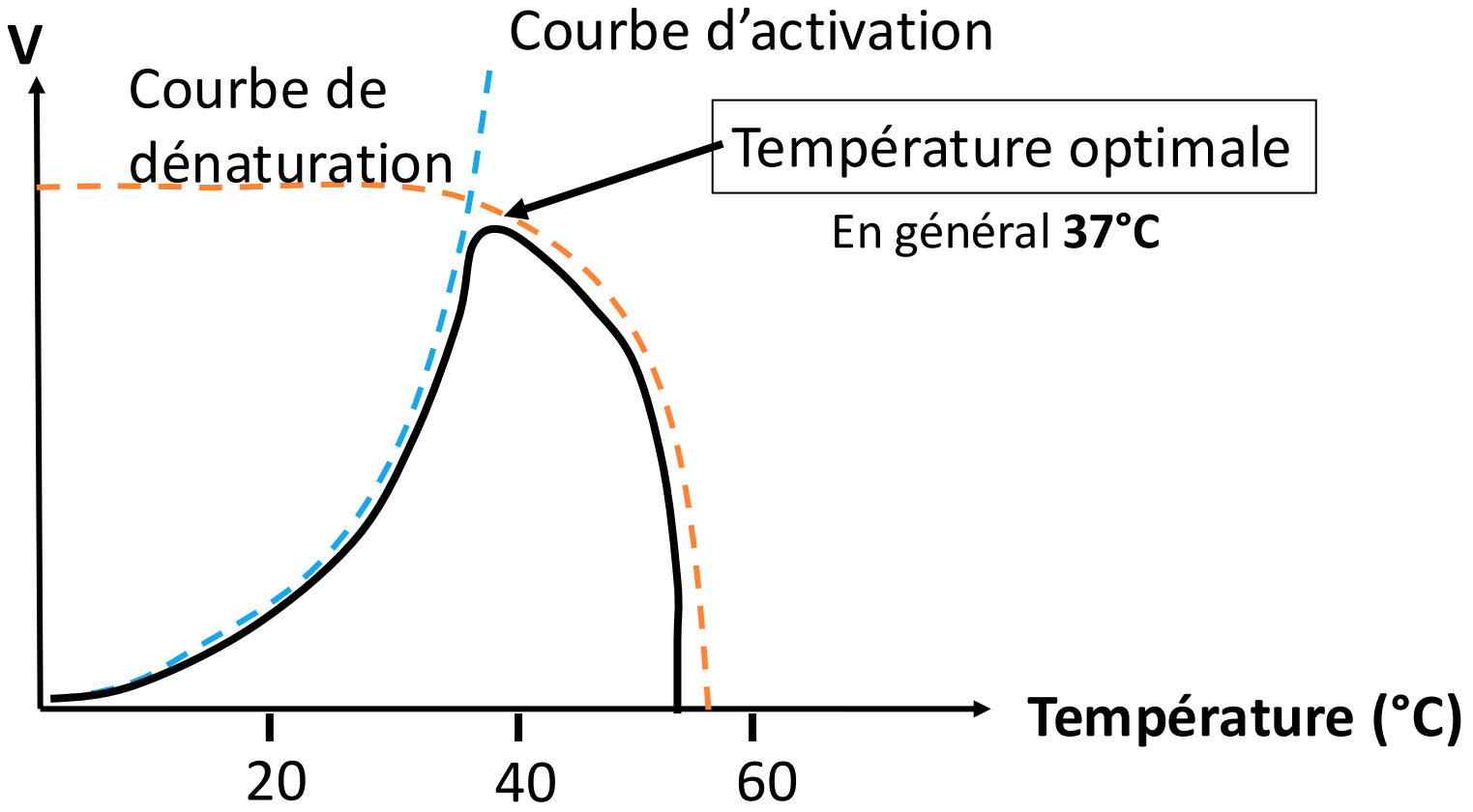
Code d'événement
RKAZOG

0 PLAN

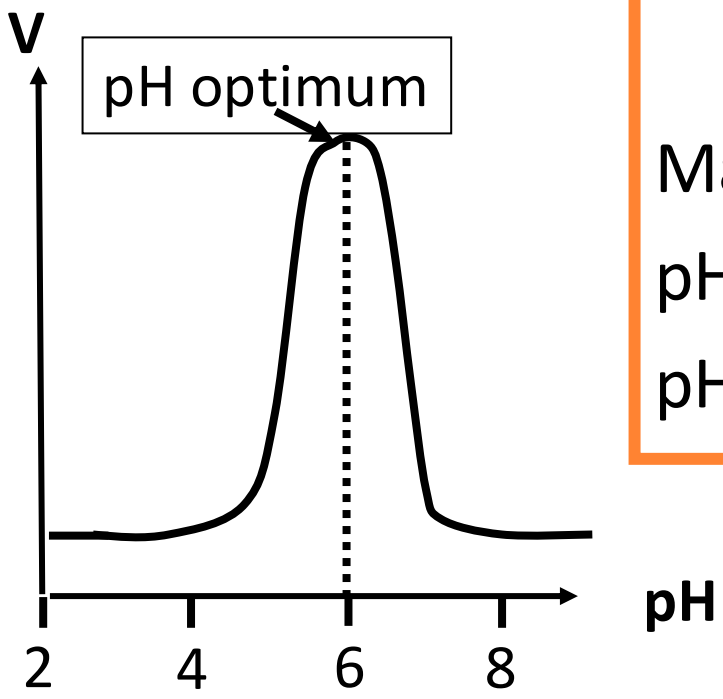
- Pouvoir catalytique des enzymes
- Cinétiques enzymatiques
- **Inhibiteurs enzymatiques**
- Allostérie

Faculté de Médecine Lyon Est

❸ Influence de la température



3 Influence du pH



Pour la plupart des enzymes :

pH optimum est proche de la neutralité (entre 6 et 8)

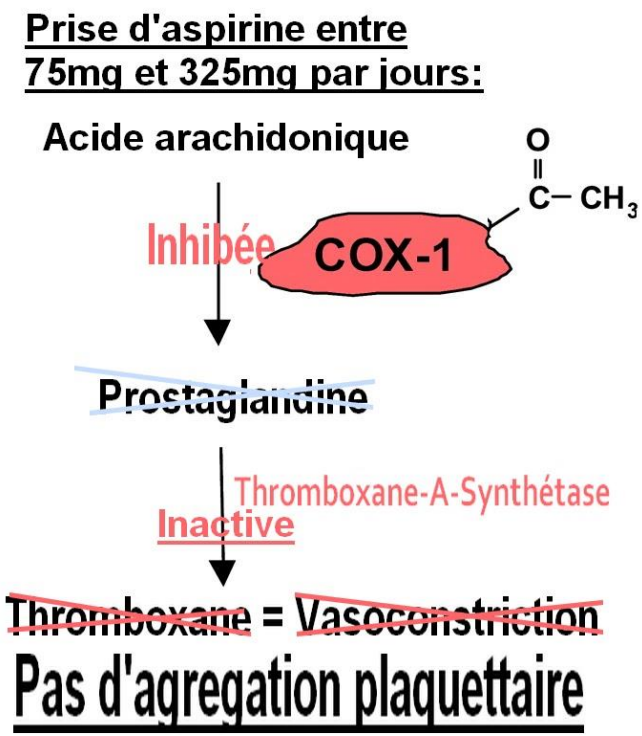
Mais :

pH optimum pepsine = 1,5-2

pH optimum arginase = 9,5-10

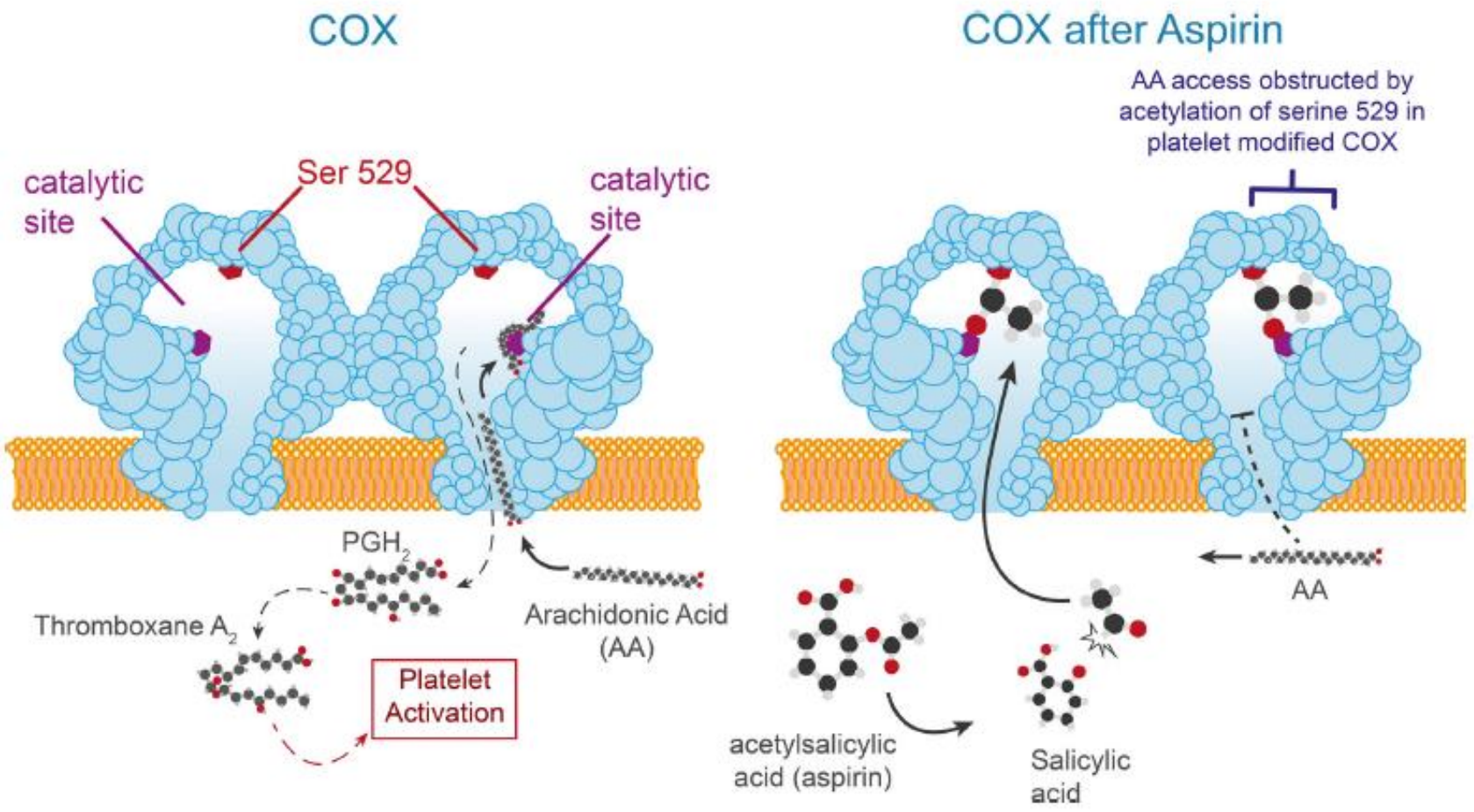
3 Inhibiteurs pharmacologiques

- **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, …



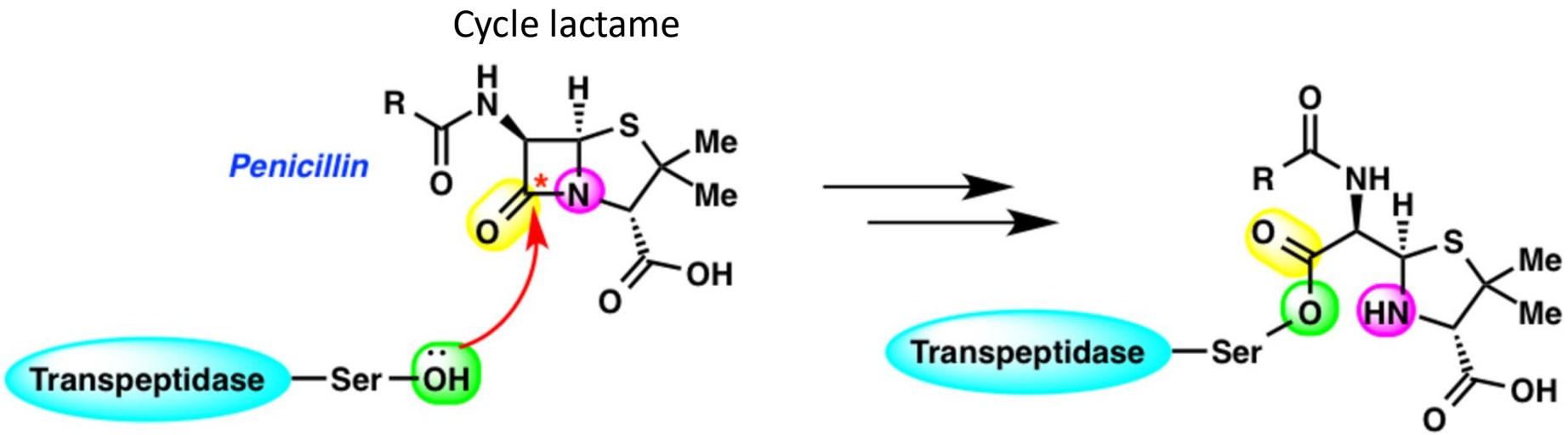
Faculté de Médecine Lyon Est

❸ Inhibiteurs irréversibles



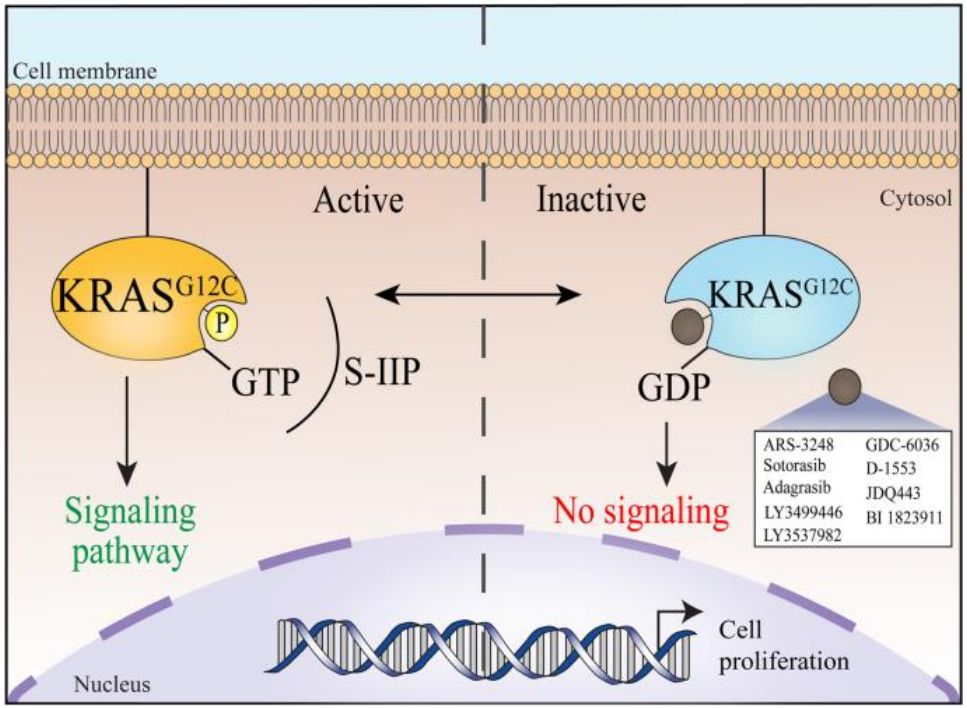
Acétylation de la Ser 529 ⇨ blocage de l'entrée de l'AA

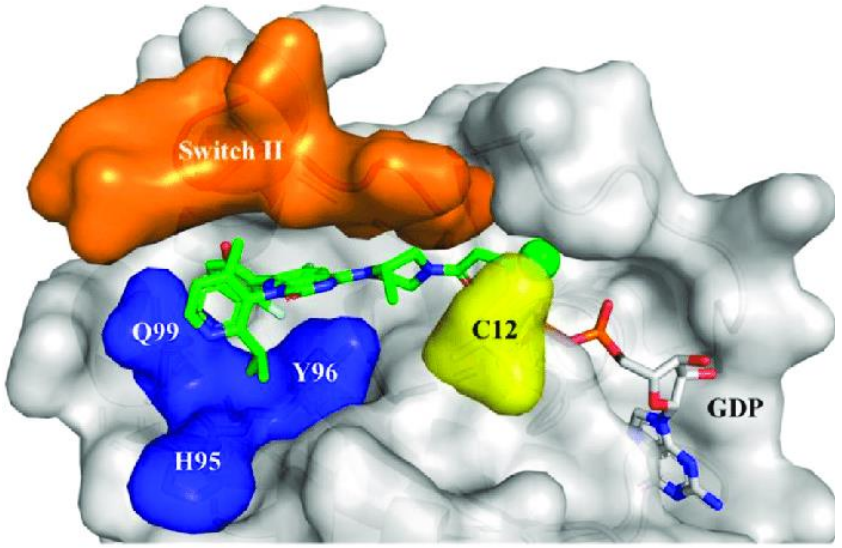
❸ Inhibiteurs irréversibles



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

❸ Inhibiteurs irréversibles

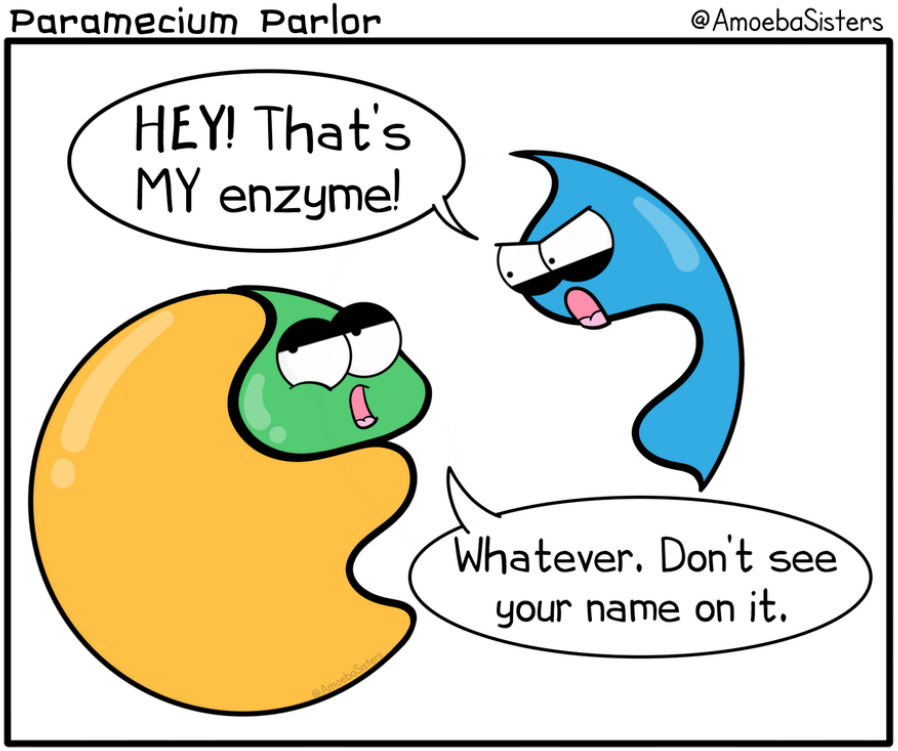




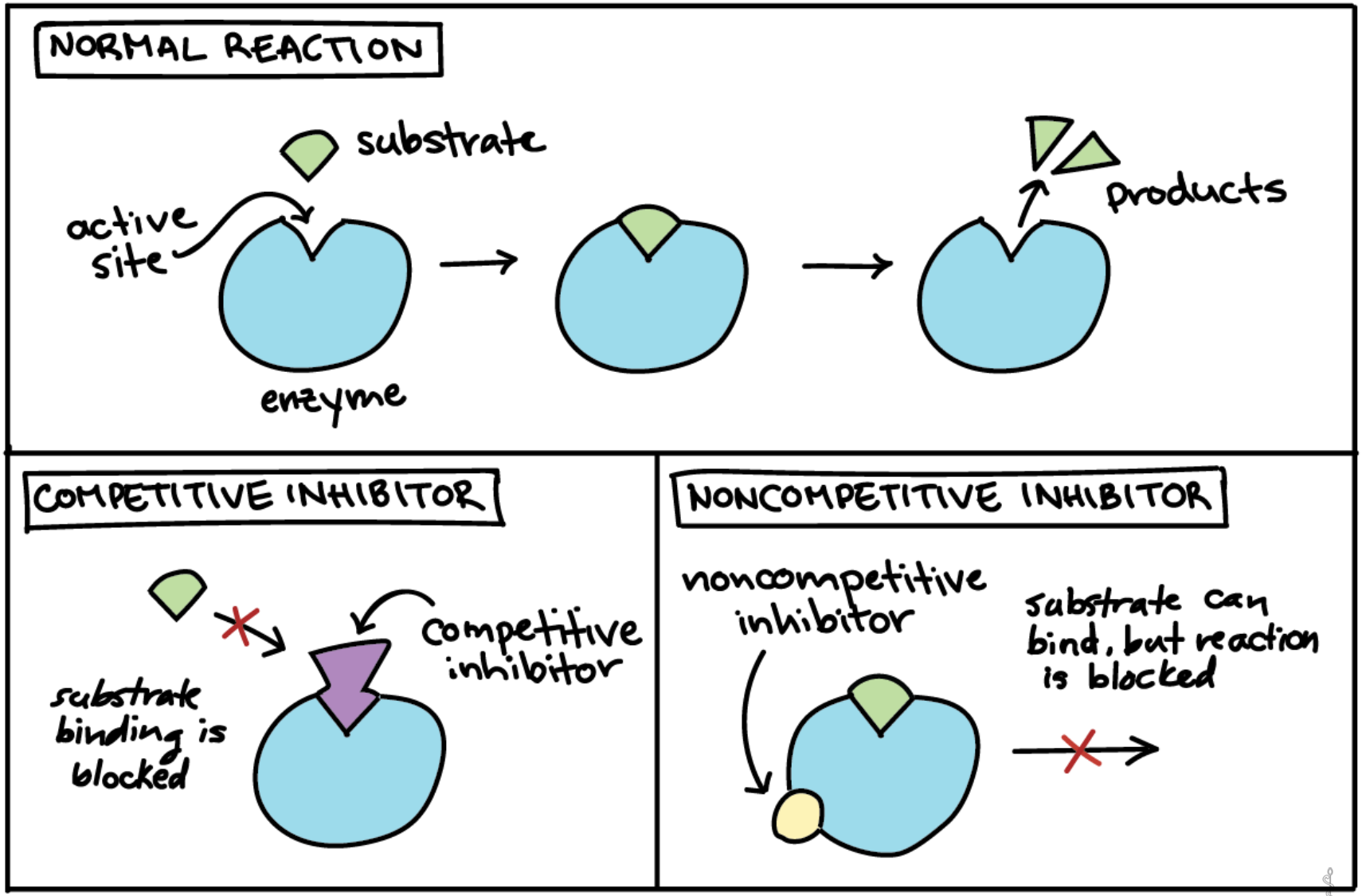
Inhibiteurs de KRAS G12C

3 Inhibiteurs réversibles

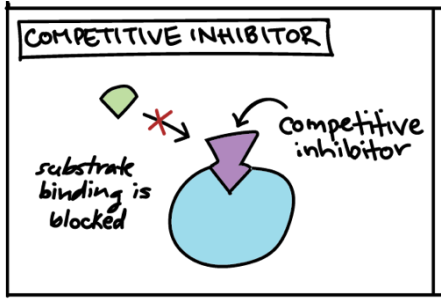
- **Dissociation rapide** du complexe ES
- **COMPETITIFS vs NON COMPETITIFS**



3 Inhibiteurs réversibles



3 Inhibiteurs compétitifs



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

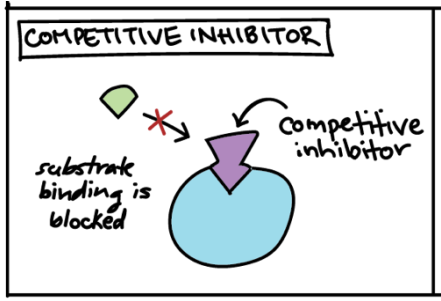
$$E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \qquad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

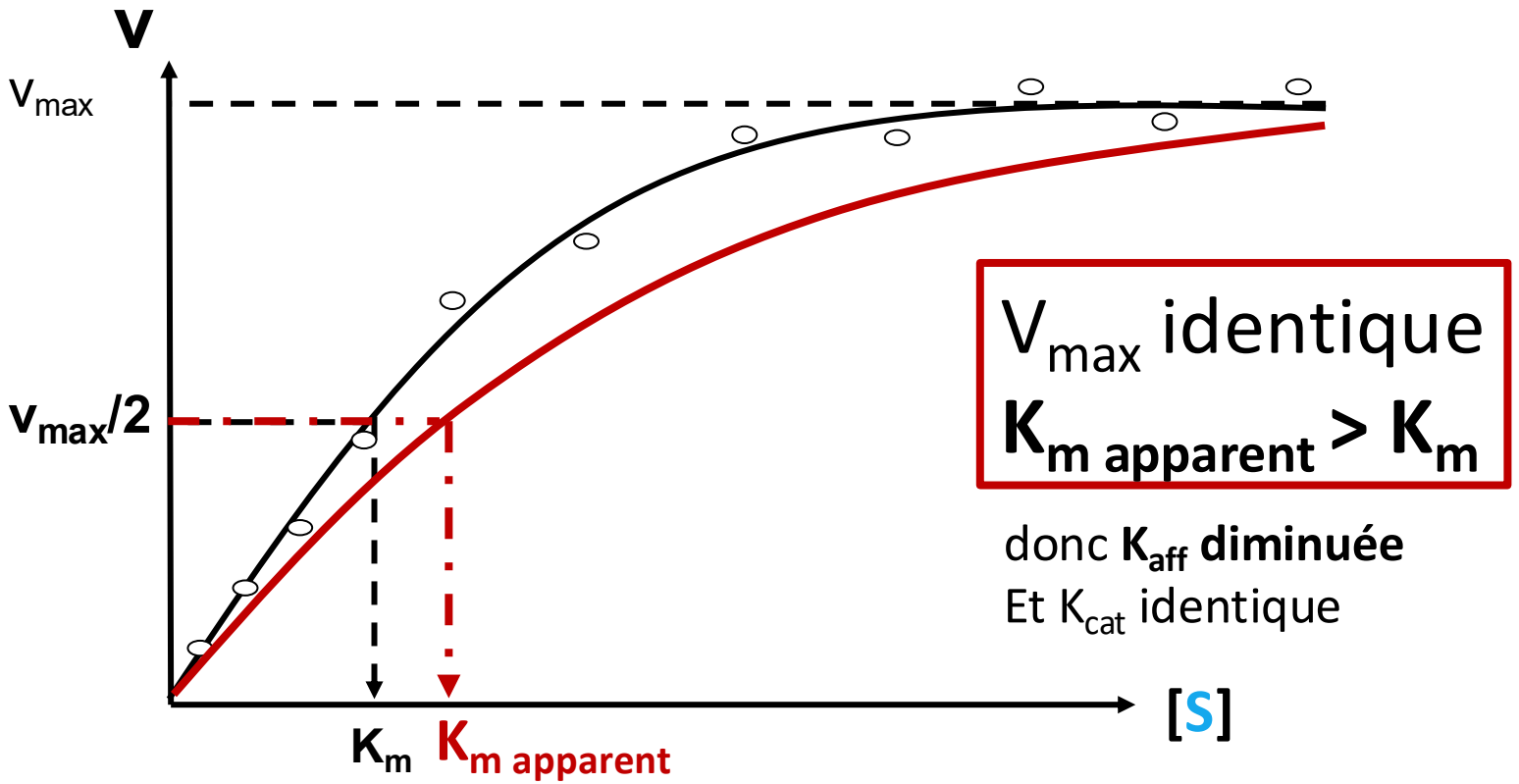
$$[E]_t = [E] + [ES] + [EI]$$

3 Inhibiteurs compétitifs



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

"$K_{m\ apparent}$"



V_{max} identique

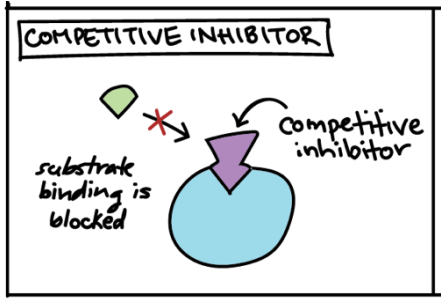
$K_{m\ apparent} > K_m$

donc **K_{aff} diminuée**

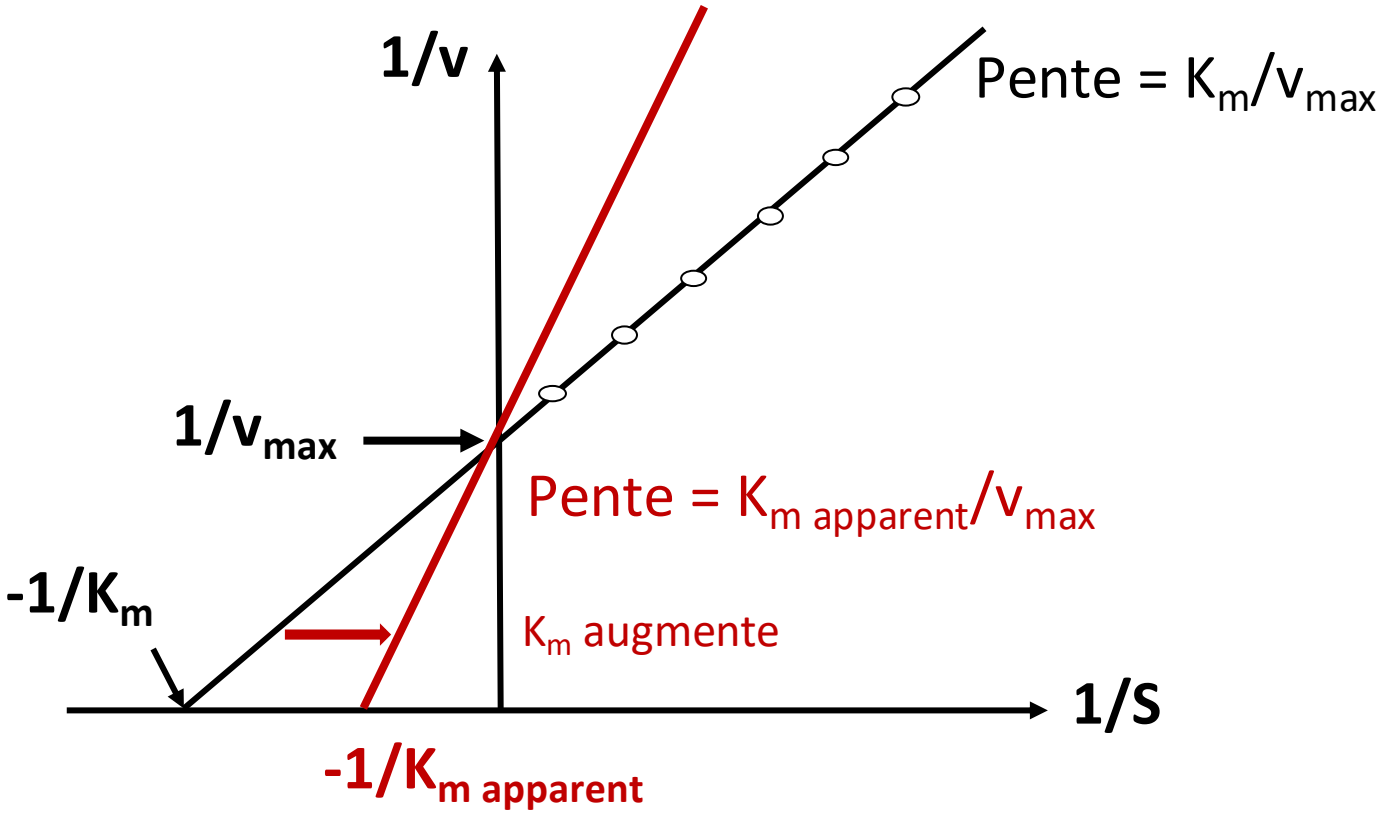
Et K_{cat} identique

Faculté de Médecine Lyon Est

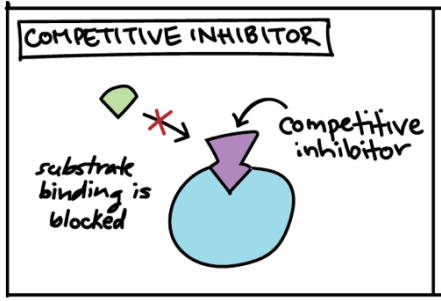
3 Inhibiteurs compétitifs



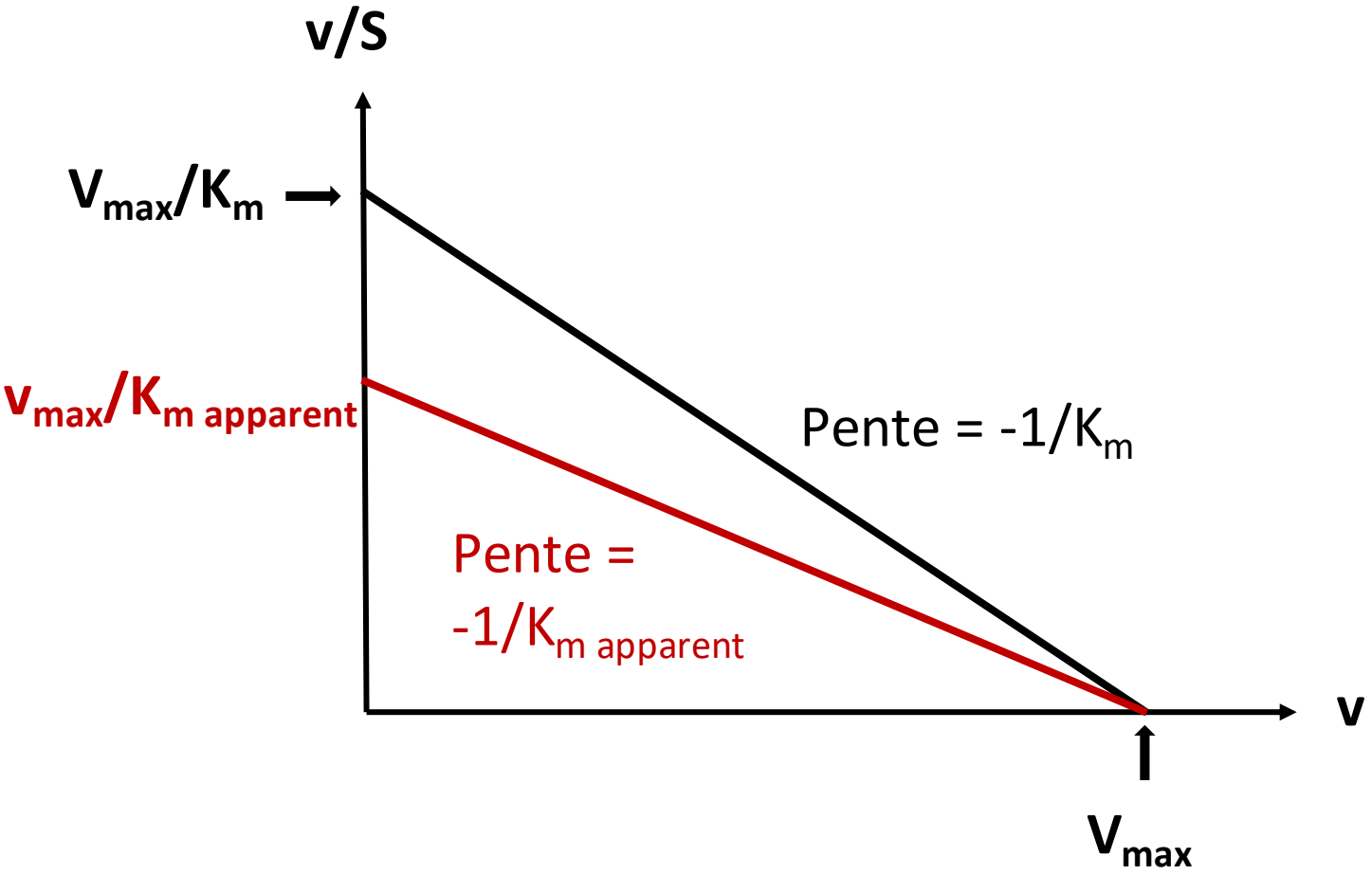
Lineweaver-Burk



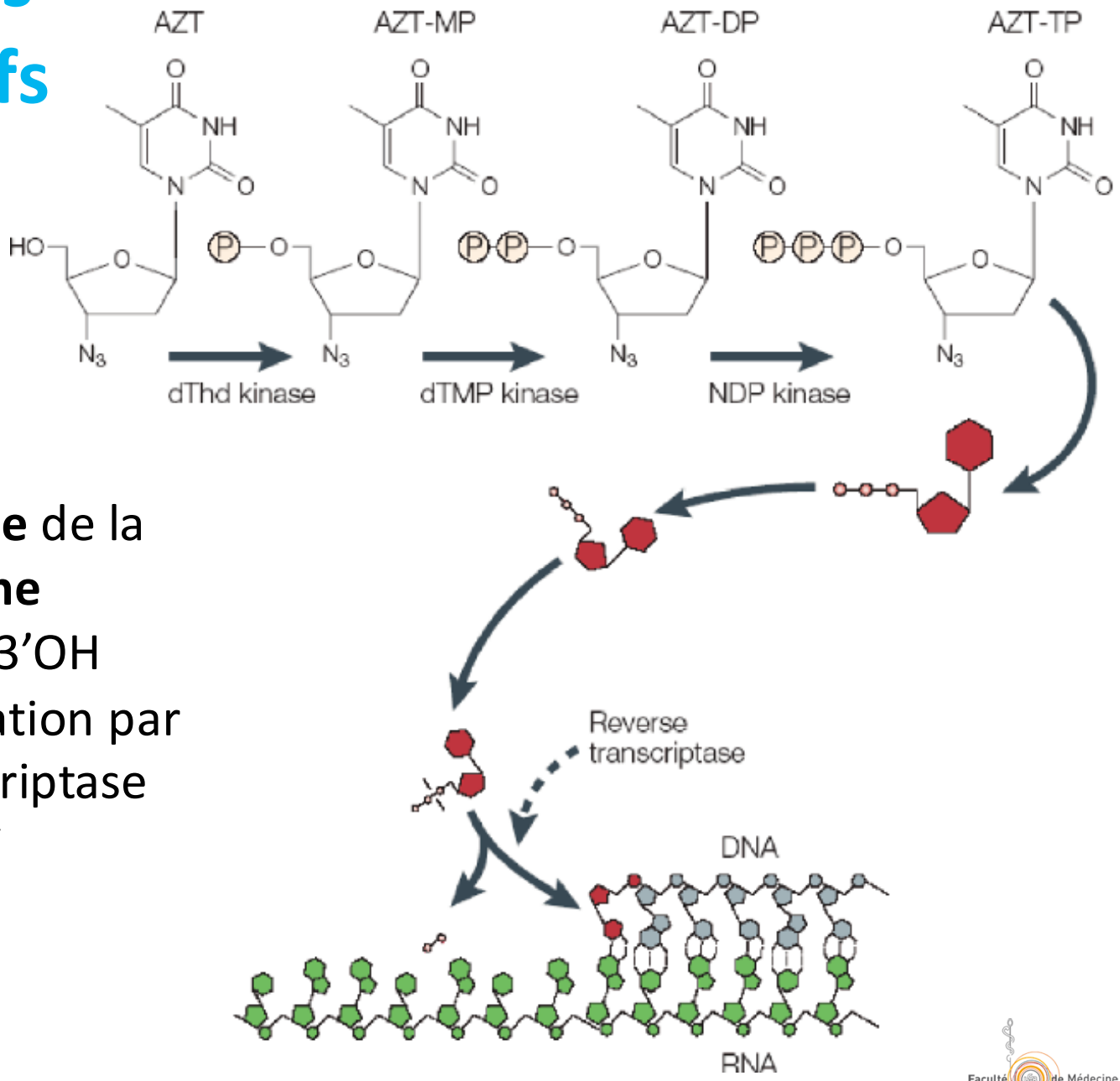
3 Inhibiteurs compétitifs



Eadie-Hofstee



3 Inhibiteurs compétitifs



AZT=analogue de la **thymidine**
avec N_3 en 3'OH
⇨ STOP élongation par la rétrotranscriptase du HIV

3 Inhibiteurs compétitifs



Intoxication par l'éthylène glycol

Ethylene Glycol

↓ *Alcohol Dehydrogenase (ADH)*

Glycoaldehyde

↓ *Aldehyde Dehydrogenase (ALDH)*

Acidose métabolique → Glycolic Acid (Glycolate)

↓

Glyoxylic Acid

↓

Thiamine (Vit B1) → α-Hydroxy-β-Ketoadipic acid

Pyridoxine (Vit B6) & Mg → Oxalic Acid ↓ *+ Ca* → Calcium Oxalate

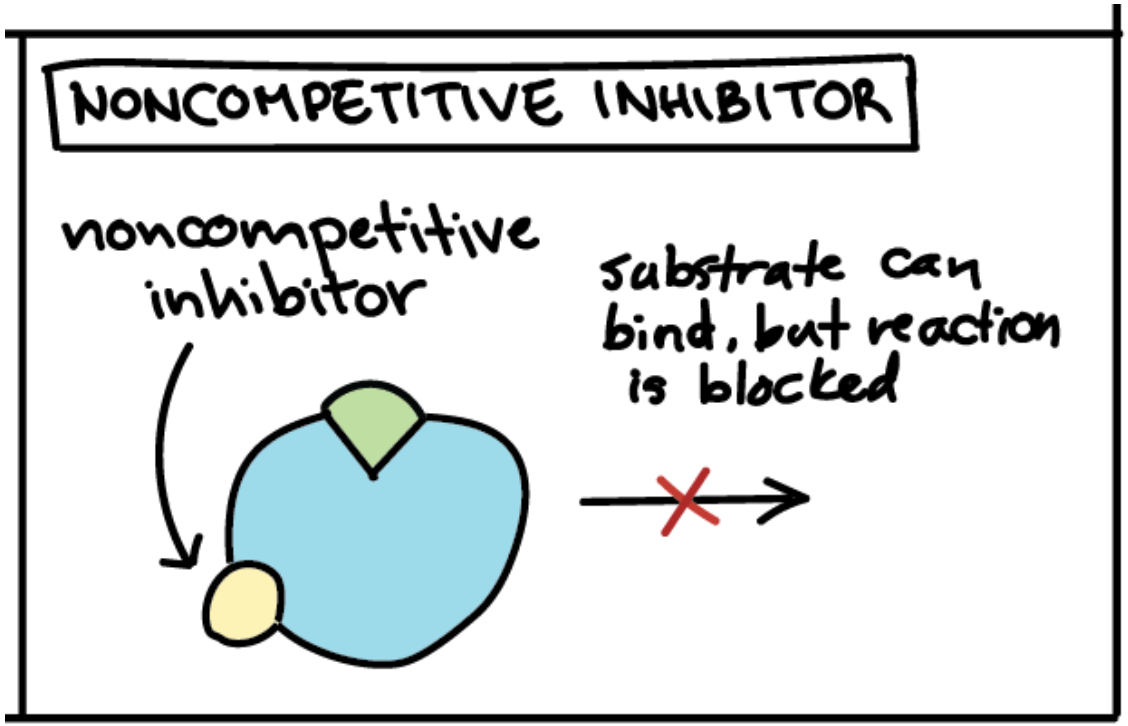
Atteinte multiviscérale → Glycine ↓ *+ Benzoic acid* → Hippuric Acid

Perfusion IV d'ethanol
⇨ Inhibition de l'ADH

EBM CONSULT

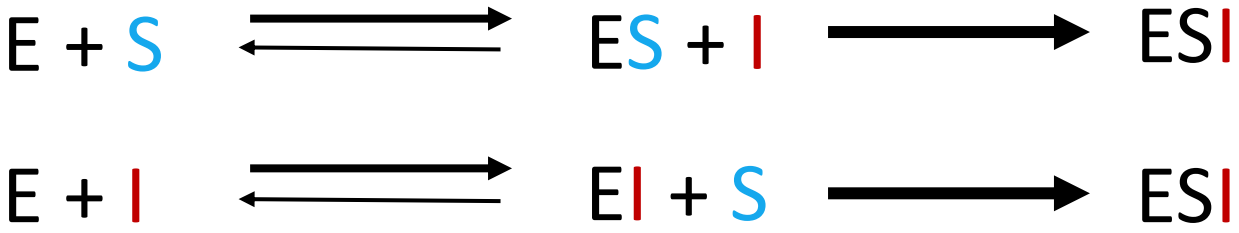
❸ Inhibiteurs non compétitifs

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



❸ Inhibiteurs non compétitifs

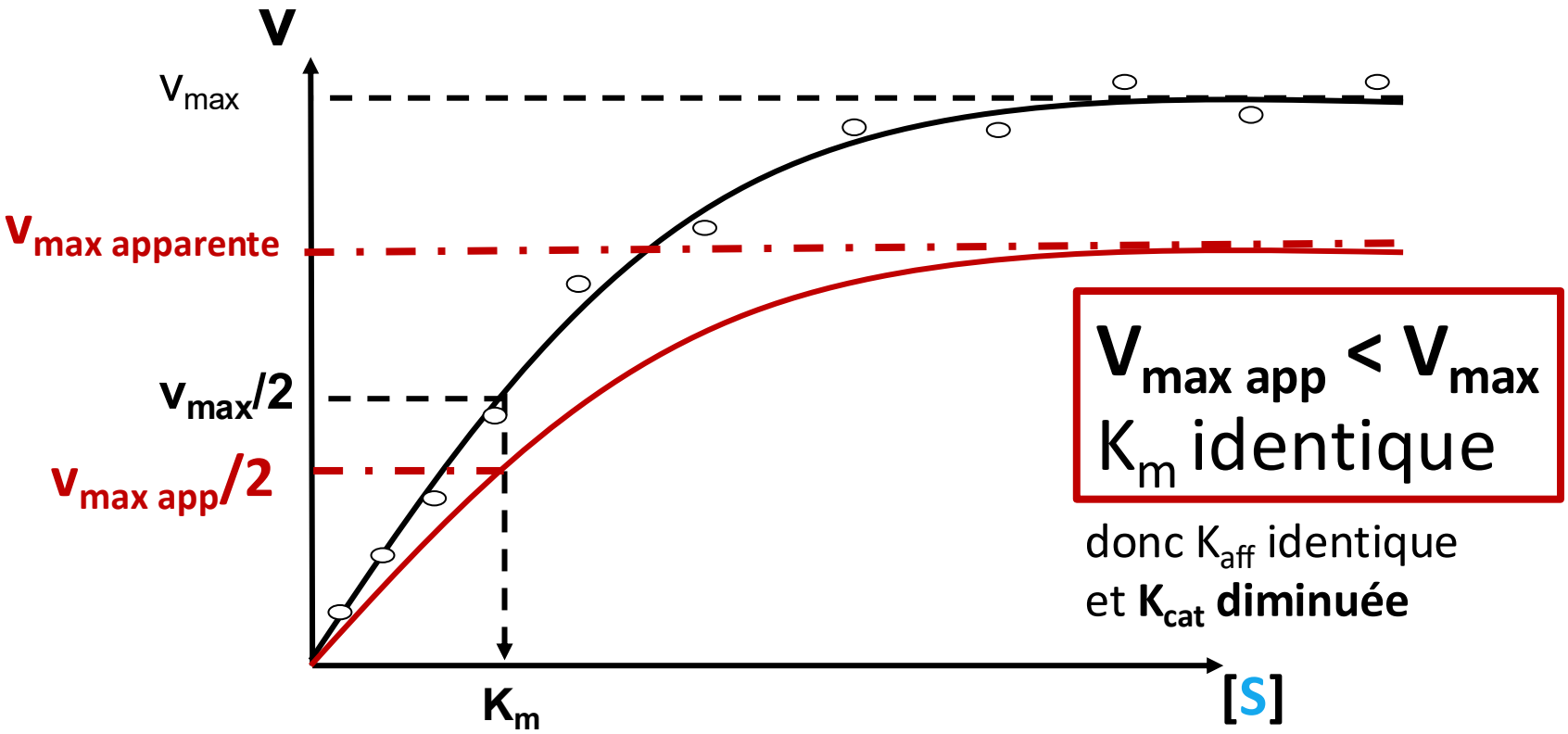
- **Fixation réversible en dehors du site actif ⇨ blocage de l'activité de E** (mais pas de la fixation de S)



3 Inhibiteurs non compétitifs

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

"$V_{max\ apparente}$"



$V_{max\ app} < V_{max}$

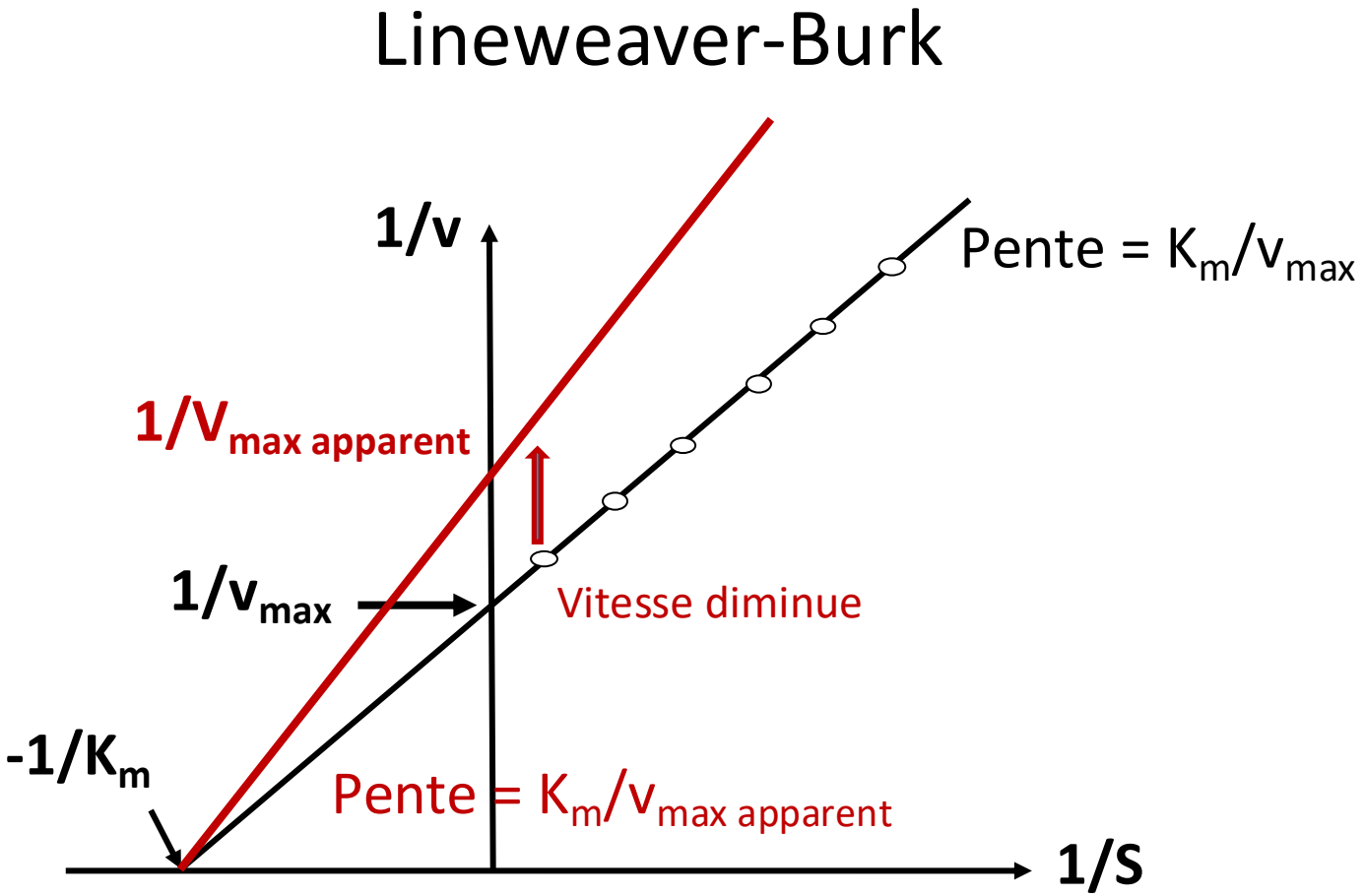
K_m identique

donc K_{aff} identique

et **K_{cat} diminuée**

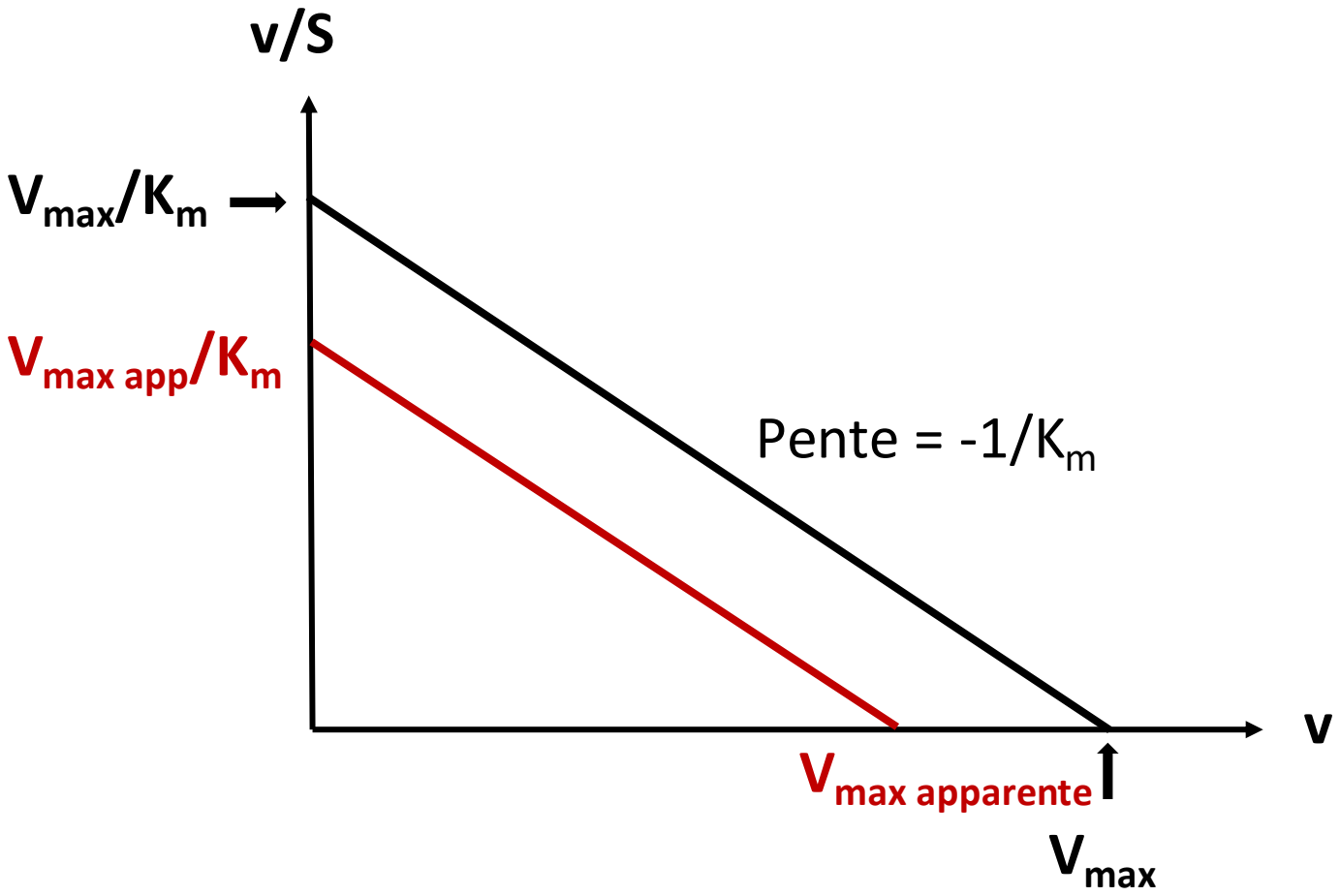
Faculté de Médecine Lyon Est

3 Inhibiteurs non compétitifs



3 Inhibiteurs non compétitifs

Eadie-Hofstee

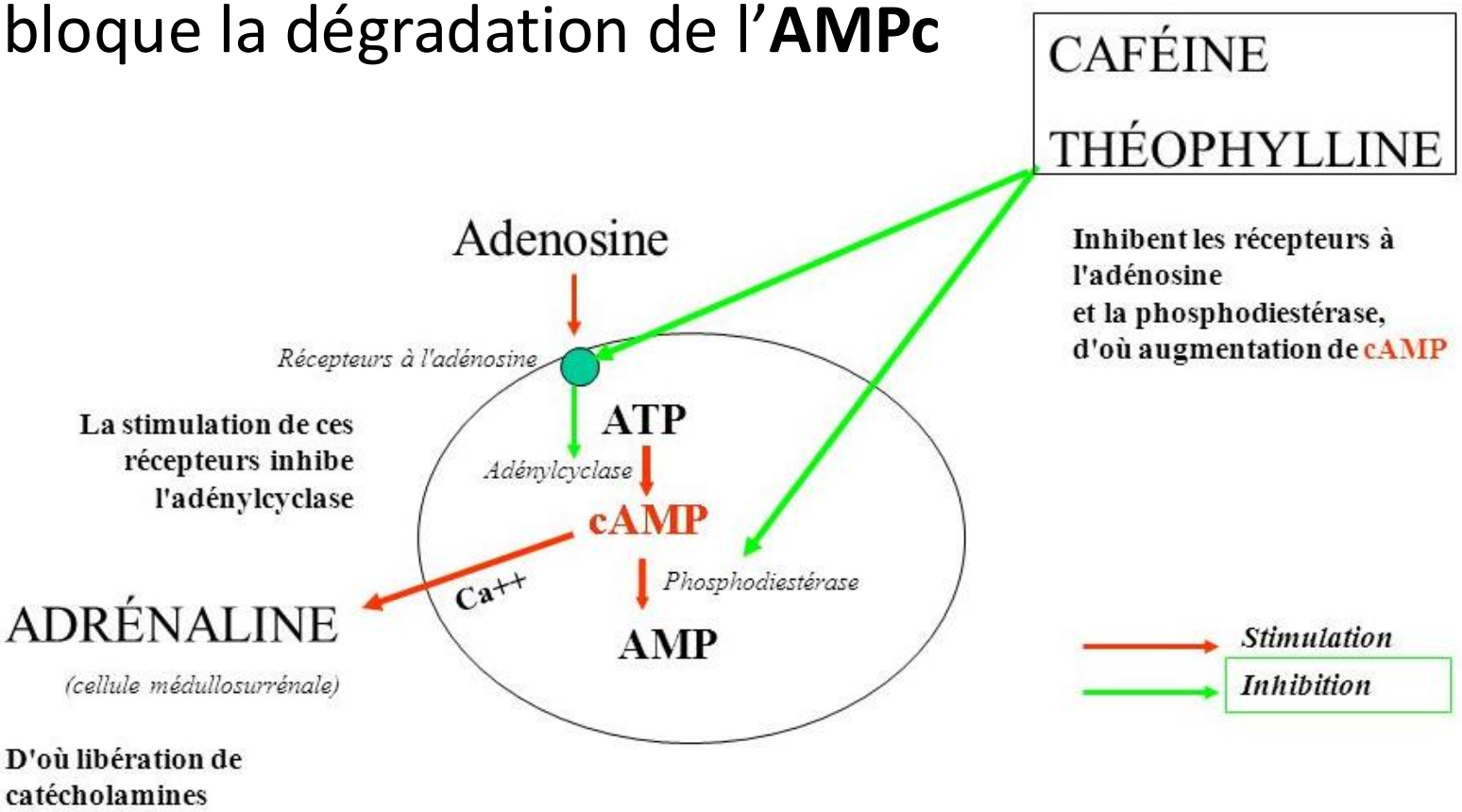


❸ Inhibiteurs non compétitifs



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

⇨ bloque la dégradation de l'**AMPc**



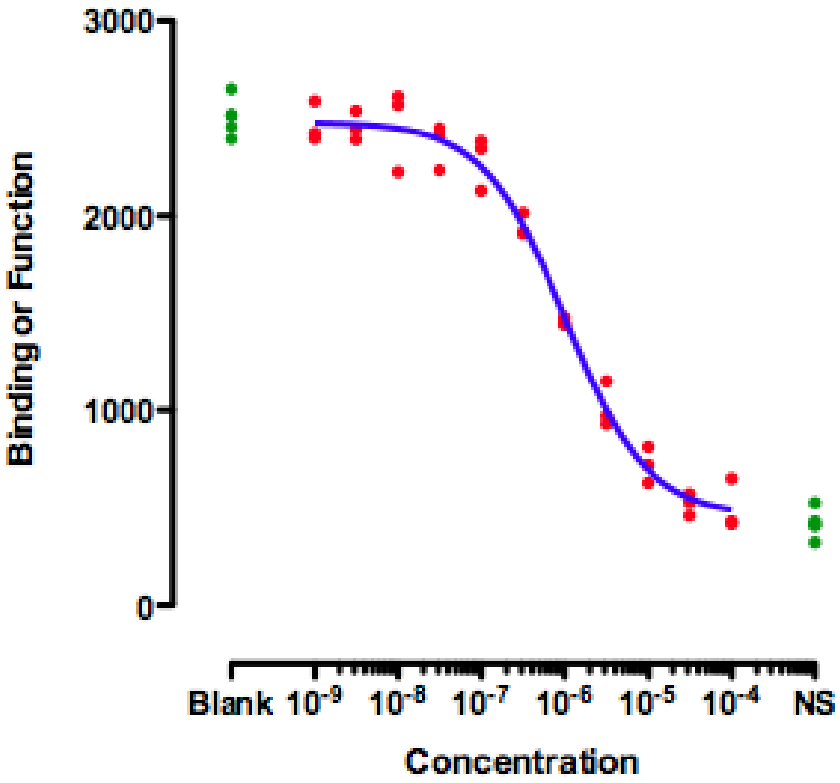
3 Inhibiteurs réversibles : synthèse

Inhibition	K_m		V_{max}	
Compétitive	Augmente (affinité ↘)	$K_m.(1+[I]/K_i)$	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

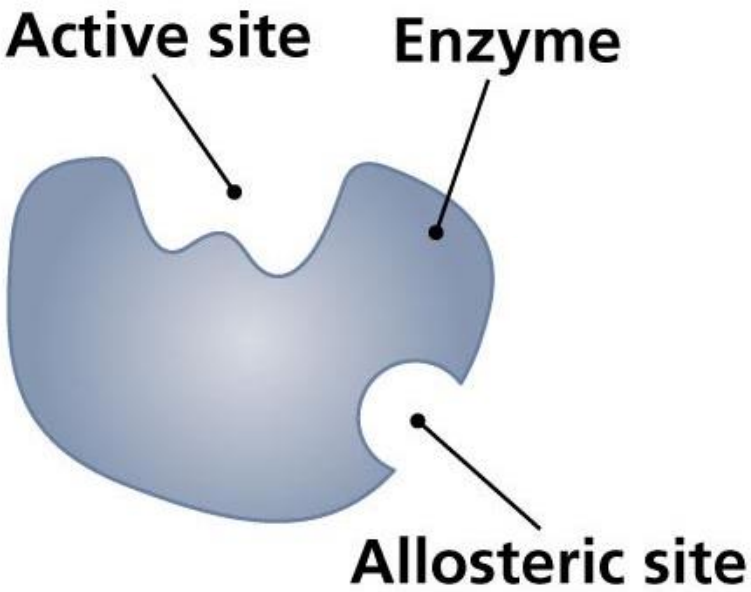
RKAZOG

0 PLAN

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

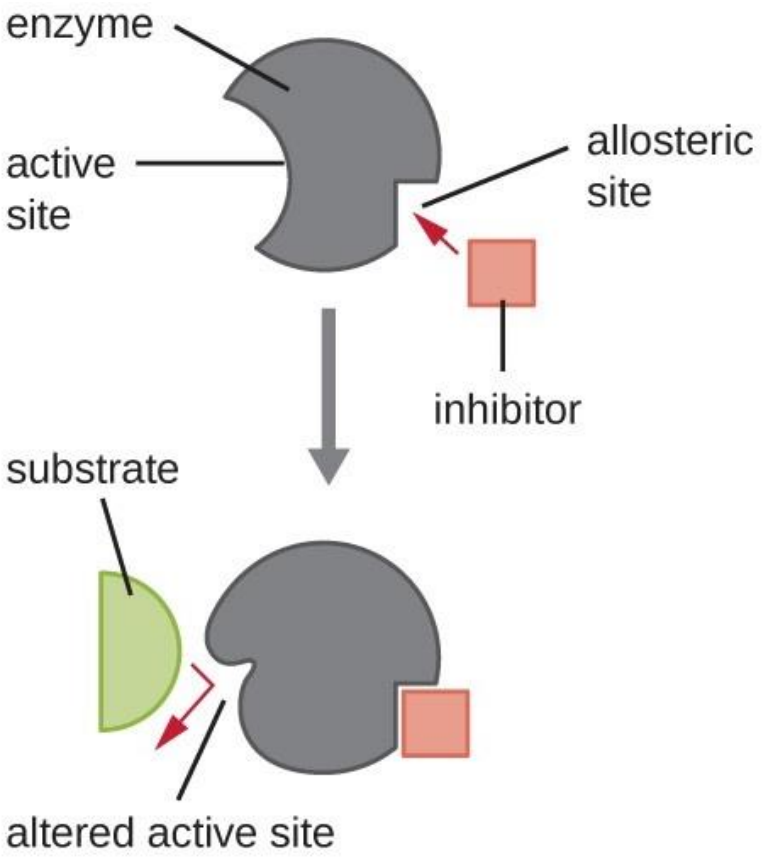
4 Régulation par allostérie

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

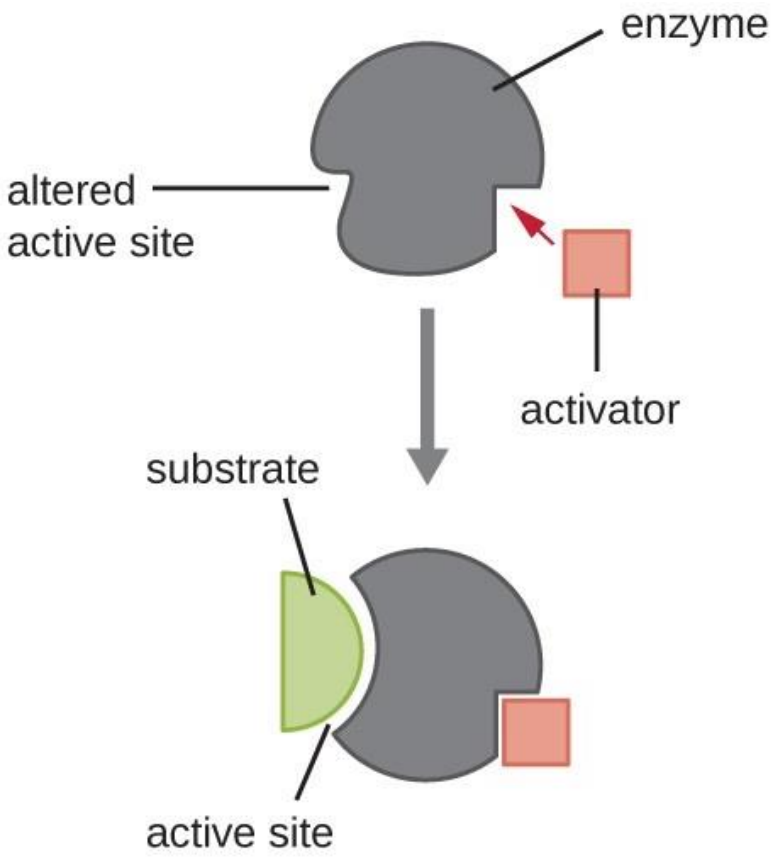


4 Régulation par allostérie

- **Activation ou Inhibition allostérique**



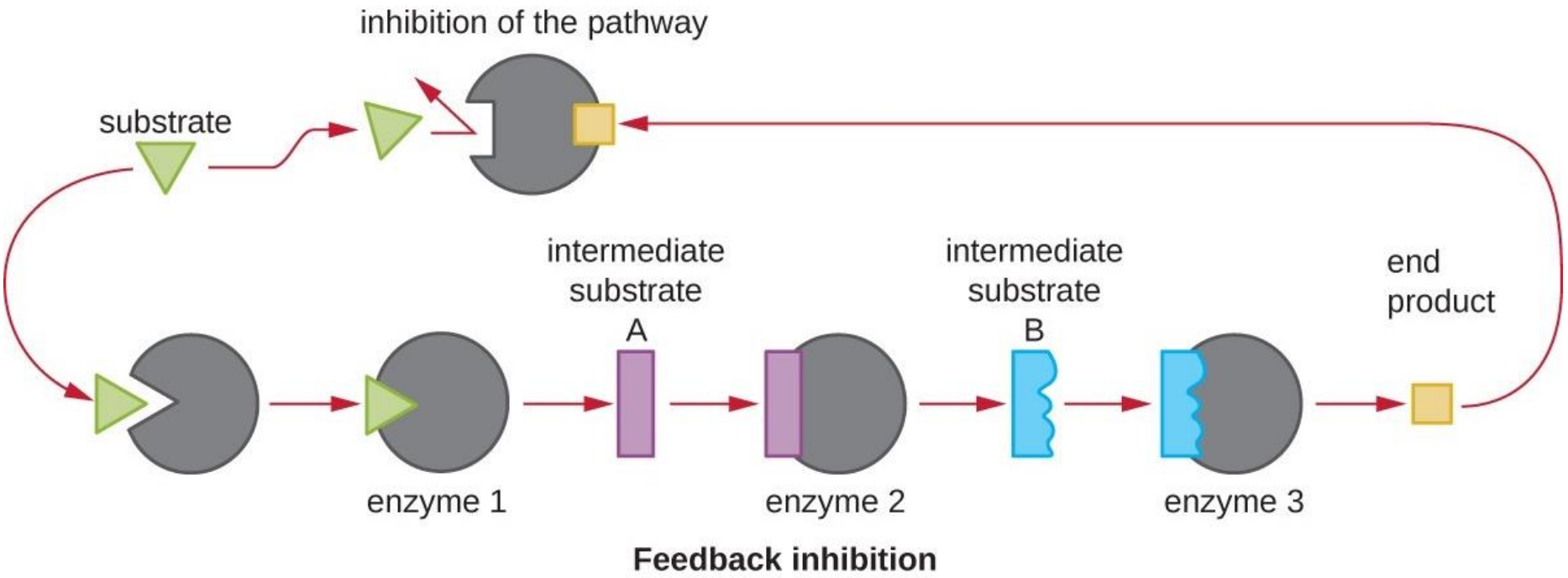
Allosteric inhibition



Allosteric activation

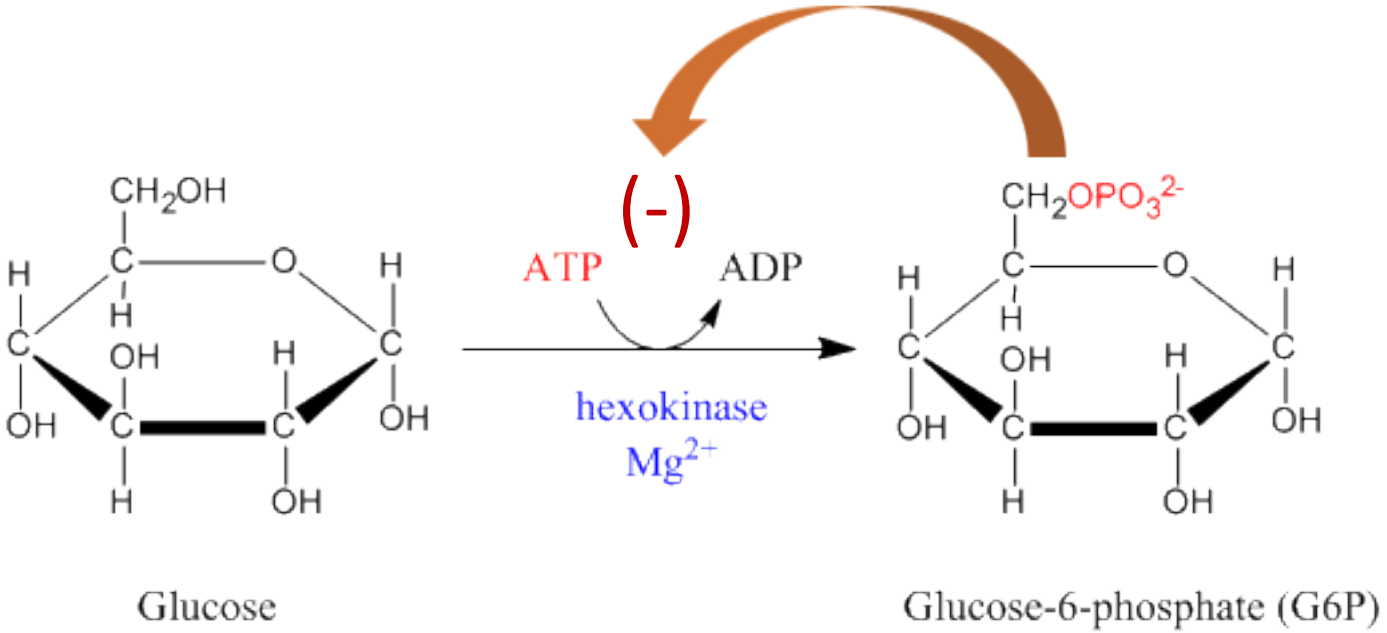
4 Régulation par allostérie

- **Rétrocontrôle négatif par P**



4 Régulation par allostérie

Rétrocontrôle négatif par P

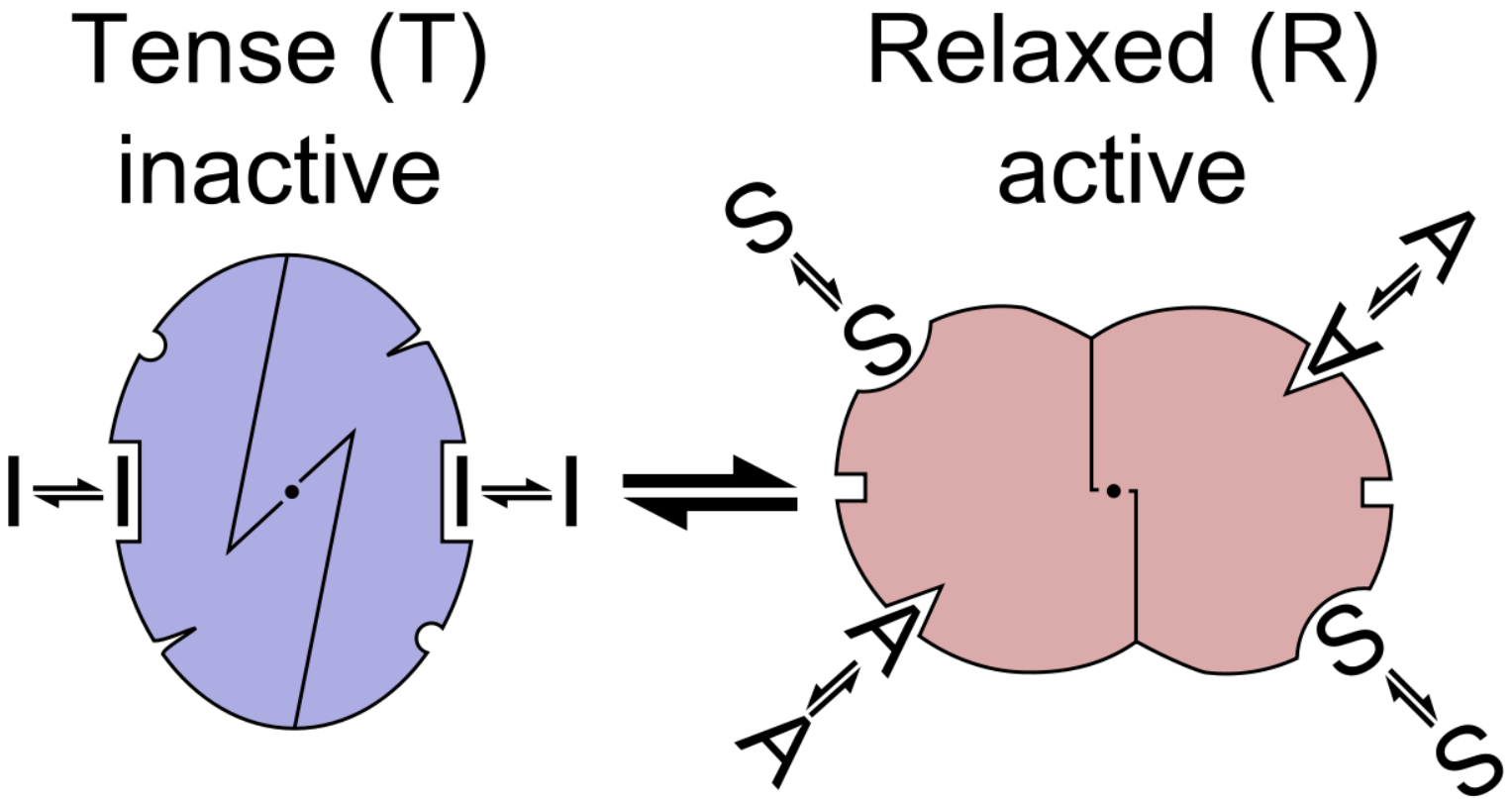


$[glucose]_{sang} >> K_m$(hexokinase) ⇨ fonctionne à V_{max}

⇨ Augmentation [G6P] ⇨ **rétrocontrôle négatif**

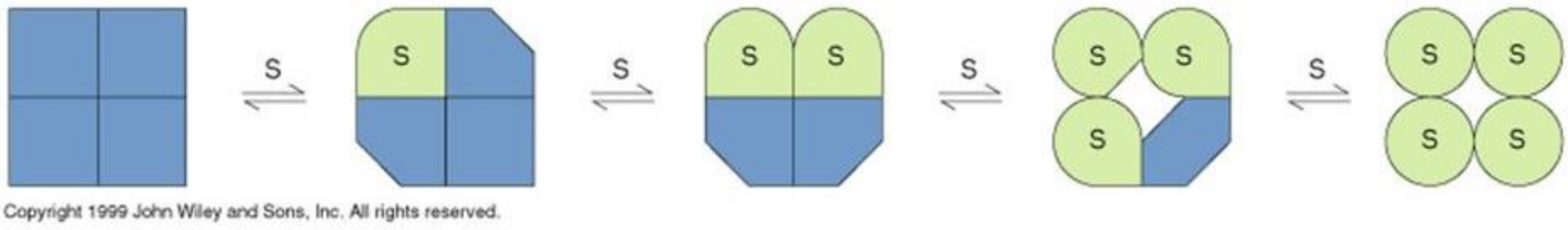
4 Régulation par allostérie

- **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'O_2 ⇨ **changement de conformation T>R**
  - 1er changement est le plus difficile
  - Séquence avec augmentation de l'affinité pour O_2

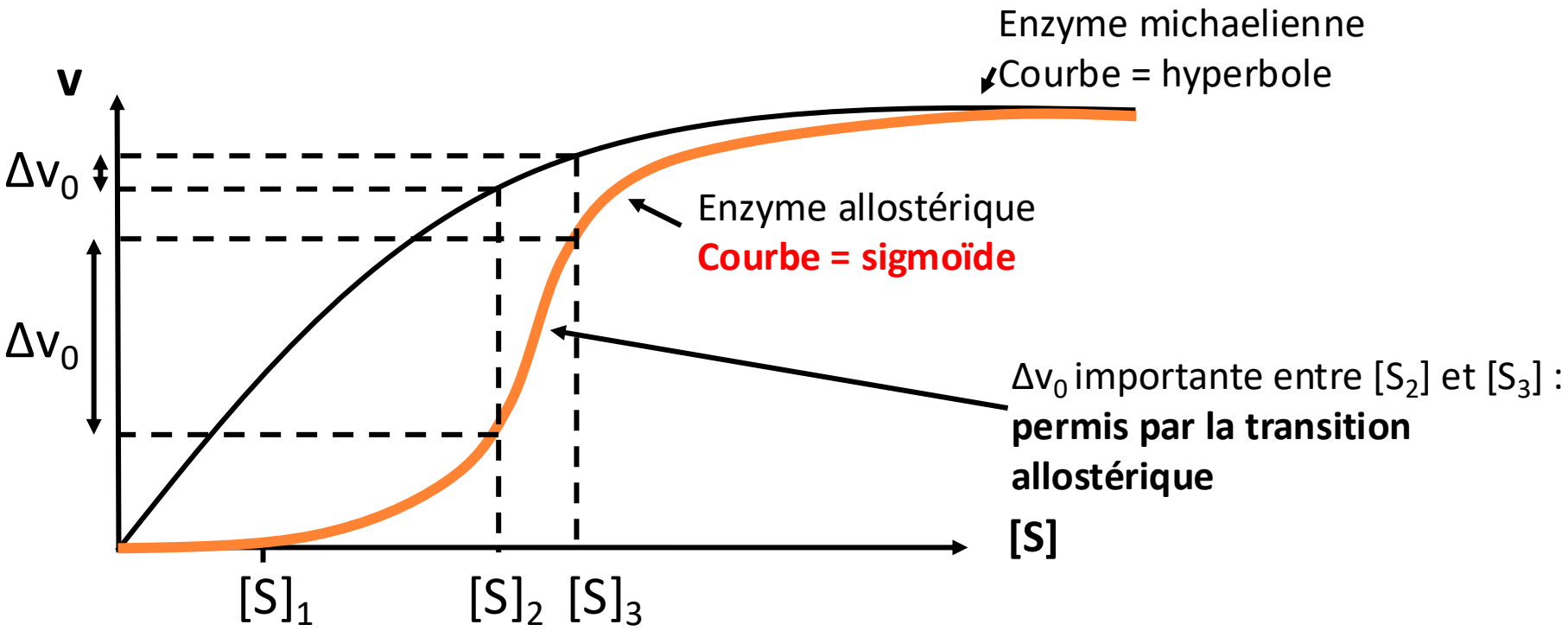


Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Modèle séquentiel de **Koshland**

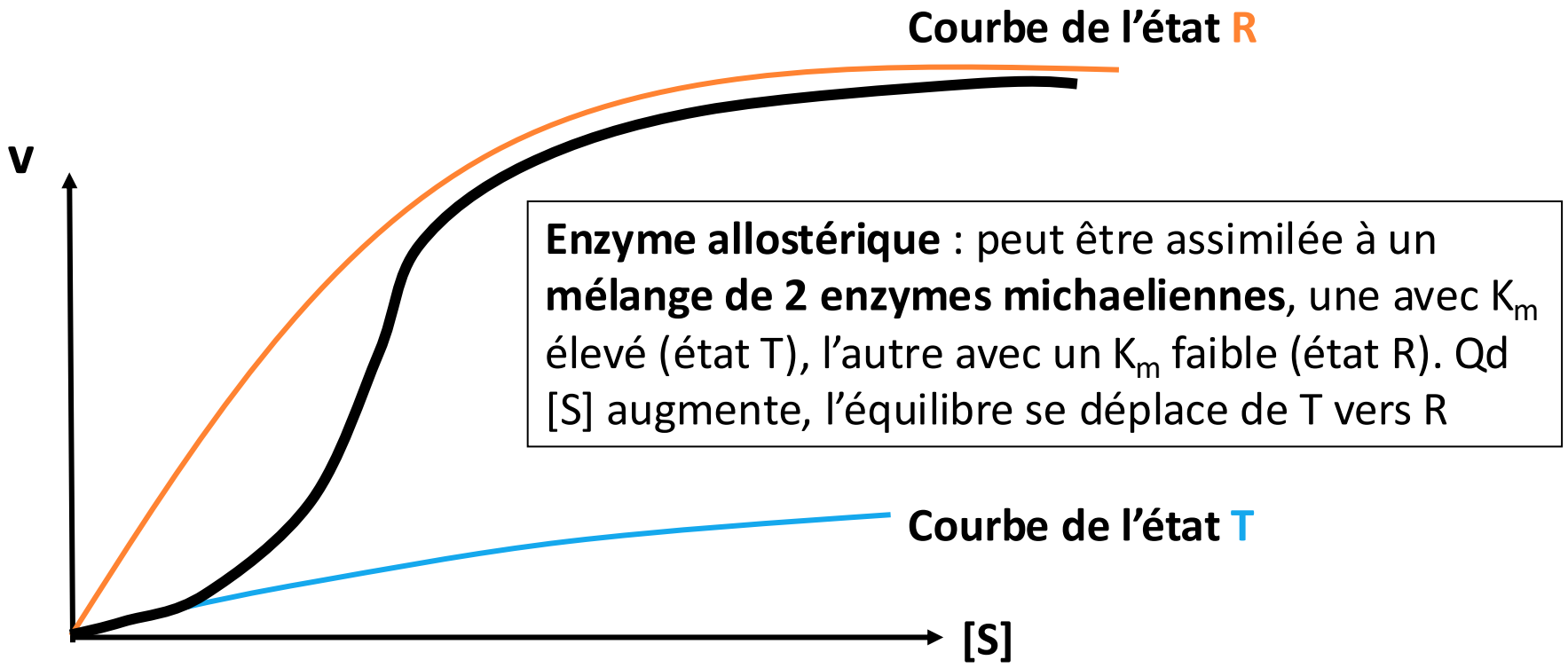
4 Régulation par allostérie

Cinétique enzymatique non michaelienne



4 Régulation par allostérie

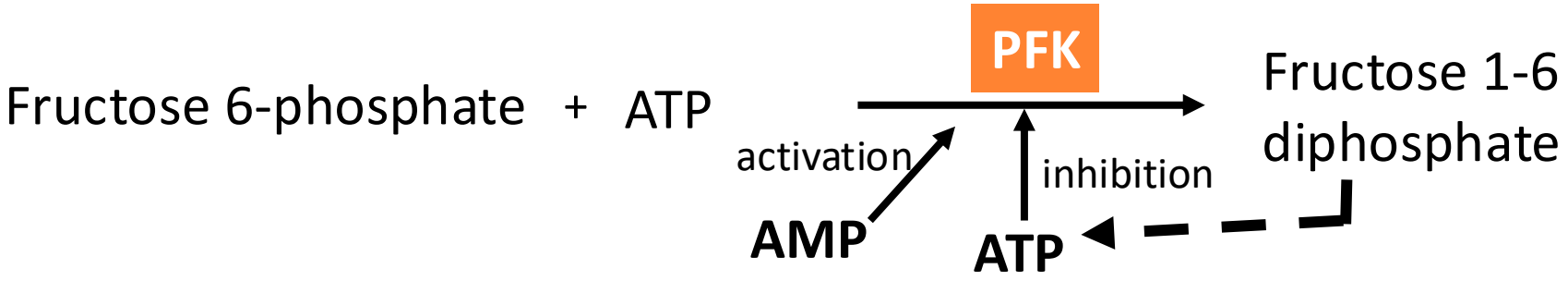
Cinétique enzymatique non michaelienne

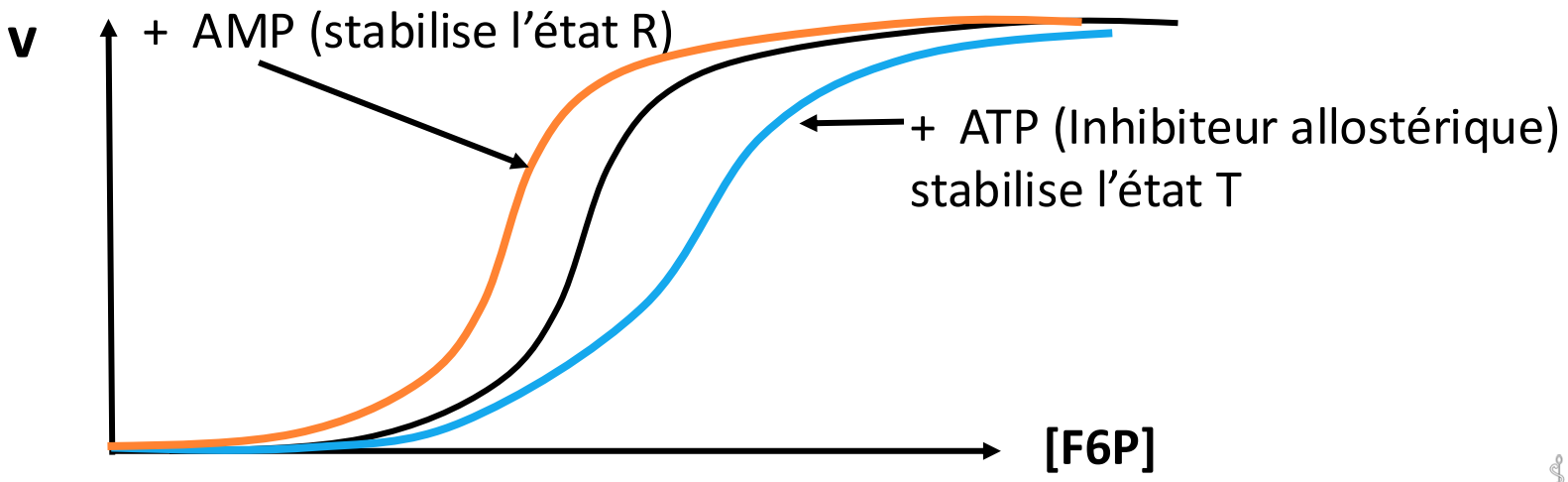


Enzyme allostérique : peut être assimilée à un **mélange de 2 enzymes michaeliennes**, une avec K_m élevé (état T), l'autre avec un K_m faible (état R). Qd [S] augmente, l'équilibre se déplace de T vers R

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 $\mathbf{K_m = 1/K_{aff}}$
- 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] << Km

Faculté de Médecine Lyon Est


UNIVERSITÉ
DE LYON