









www.medatice-grenoble.fr



Biochimie

Chapitre 3

Les enzymes

Professeur Bertrand TOUSSAINT

Année universitaire 2009/2010

Université Joseph Fourier de Grenoble - Tous droits réservés.

Les Enzymes : plan du cours

Enzymes, principes Cinétique chimique Cinétique enzymatique Eléments de Catalyse enzymatique Régulation des enzymes et du métabolisme Les enzymes marqueurs de pathologie

Les Enzymes : plan du cours

Enzymes, principes
Cinétique chimique
Cinétique enzymatique
Eléments de Catalyse enzymatique
Régulation des enzymes et du
métabolisme
Les enzymes marqueurs de
pathologie

Préambule

- Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques très diverses.
- Ces réactions s'effectuent dans des conditions « douces » où, normalement, elles seraient très lentes.
- Si elles ont lieu, c'est parce qu'elles sont catalysées par des macromolécules biologiques : les enzymes.

1) Glucose +
$$6O_2$$
 \Rightarrow $6CO_2$ + $6H_2O$
 $\Delta G^{\circ} = -2885 \text{ kJ/mol}$

2) Saccharose +
$$H_20$$
 \Rightarrow Glucose + Fructose $\Delta G^{\circ} = -29.3 \text{ kJ/mol}$

Ces réactions sont fortement exergoniques et donc spontanées selon les lois de la thermodynamique.

Les réactions ne se feront pas à moins qu'on fournisse une source de chaleur des catalyseurs

Un enzyme est une protéine qui agit comme catalyseur biochimique, un agent qui change la vitesse d'une réaction mais qui ne change pas avec la réaction.

Historique

- Découverte très progressive de la notion d'enzyme en tant que seul catalyseur des réactions chimiques qui se déroulent dans les organismes vivants.
- 1833 : La première découverte d'un enzyme est attribuée à Anselme Payen et Jean-François Persoz qui ont traité un extrait aqueux de malt à l'éthanol puis précipité une substance labile à la chaleur qui hydrolysait l'amidon.
 - « diastase » = « séparation » en Grec, puisque cette fraction séparait le sucre soluble de l'amidon insoluble. On sait maintenant que cette préparation était une solution non purifiée d'amylase.
- concept de catalyse provient de l'observation de l'action de la diastase sur l'amidon ou de la levure sur le sucre pendant la fermentation : dans tous les cas, une "substance était changée en une autre« sous l'influence d'un agent actif : le catalyseur.

- •1878 : Kühne proposa le nom d'enzyme (*in zymo* signifiant : "dans la levure") pour qualifier ces ferments.
- •Le suffixe" ase « fût proposé par Duclaux en 1898 et toujours appliqué pour nommer tous les enzymes.
- •1902 : V. Henri et Adrian Brown suggérèrent indépendamment que la formation d'un complexe enzyme - substrat est un intermédiaire obligatoire de la réaction enzymatique
 - -accord avec le concept de reconnaissance enzyme substrat du type"clé - serrure« proposé par Emil Fisher en 1894.
 - -Henri fût donc le premier à décrire l'équation mathématique reliant l'effet de la concentration du substrat à la vitesse de catalyse

1913 : Leonor Michaelis et Maud Menten redécouvrirent l'équation de V. Henri et établirent la relation que l'on connaît actuellement sous le nom d'équation de Michaelis - Menten

Le fait que les enzymes sont des protéines ne fût accepté qu'à partir de la fin des années 20.

1950 Linus Pauling : élucidation du mécanisme enzymatique

Années 60 : La première séquence d'une enzyme (la ribonucléase)

2000 : premiers enzymes recombinants pour la thérapie

Le mécanisme de base de la catalyse enzymatique

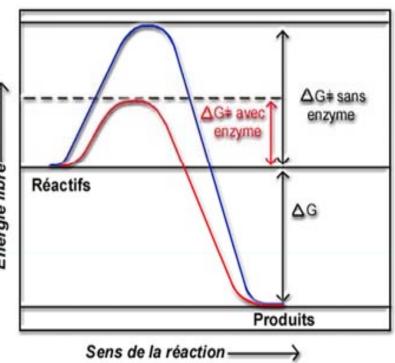
- L'enzyme accélère la réaction sans modifier l'état d'équilibre
- Les enzymes abaissent l'énergie d'activation du substrat
- La première étape implique la formation d'un complexe enzyme-substrat
- Spécificité d'un substrat par des interactions/adaptation réciproque via des liaisons de faibles énergies
- Les enzymes stabilisent aussi l'état de transition
- Transformation du substrat en produit, libéré avec l'enzyme

Les enzymes abaissent l'énergie d'activation

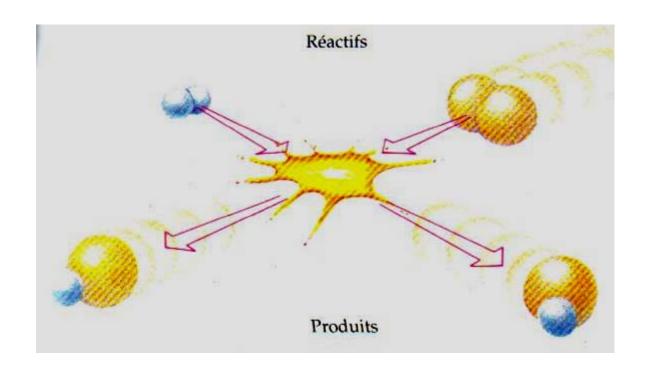
L'énergie d'activation ou l'énergie libre d'activation (ΔG_A) est l'énergie qui doit être absorbée par les réactifs pour que leurs liaisons soient brisées.

Les réactifs doivent atteindre un état de transition instable dans lequel les liaisons sont plus fragiles et plus faciles à briser.

Même une réaction exergonique, où le ∆G est négatif, requiert l'absorption d'énergie pour atteindre l'état de transition.



L'état de transition est atteint en ajoutant de l'énergie thermique (chaleur) de l'environnement, ce qui stimule plus de collisions entre les molécules de réactifs.



La réaction ne se fera que si les réactifs se heurtent avec suffisamment de force pour libérer de l'énergie capable de rompre les liaisons

L'énergie d'activation est une barrière essentielle puisqu'elle prévient la dégradation spontanée des macromolécules cellulaires riches en énergie (telles que les graisses, les protéines et les polysaccharides).

Pour que le métabolisme se fasse dans une cellule il faut toujours que l'état de transition soit atteint, autrement on ne pourrait jamais dégrader les macromolécules pour en retirer l'énergie dont on a besoin.

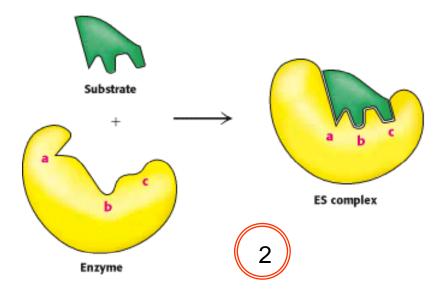
- •La chaleur, une source typique d'énergie d'activation, serait évidement nocive à une cellule et toutes les réactions se feraient tout le temps, sans contrôle (d'ou la régulation très fine de la température)
- •Les enzymes ont la capacité d'abaisser l'énergie d'activation pour des réactions spécifiques pour que ces réactions puissent se faire à la température normale de la cellule.

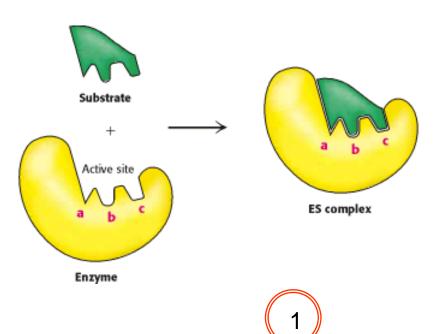
Formation d'un complexe enzymesubstrat

Linus Pauling; 1948

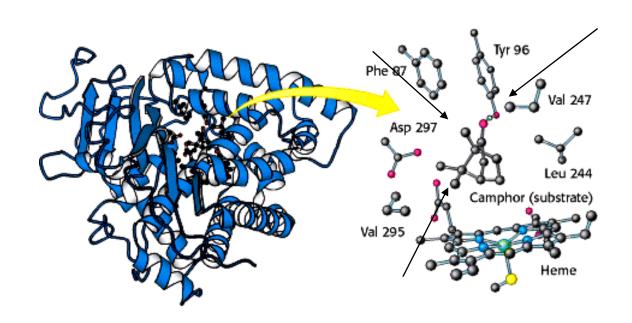
· « Je pense que les enzymes sont des molécules dont la structure est complémentaire de celle des complexes activés des réactions qu'ils catalysent, c'est-à-dire de la configuration moléculaire intermédiaire entre celles des substrats et celles des produits de réactions des processus catalysés. L'attraction de la molécule d'enzyme pour le complexe activé conduirait ainsi à une diminution de son énergie et, par conséquent, à une diminution de l'énergie d'activation de la réaction et à une augmentation de la vitesse de réaction. »

- •Ce site est complémentaire à la forme du substrat, on utilise souvent l'analogie d'une clé et d'une serrure.
- •Quand le substrat est lié, l'enzyme change de forme pour adopter sa forme induite qui améliore sa capacité de catalyser la réaction.

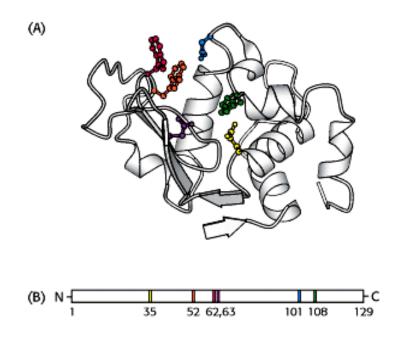


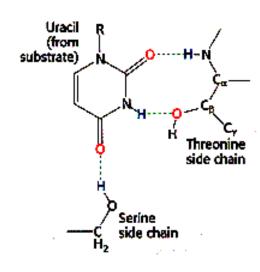


- •Leur spécificité pour un substrat (réactif) particulier est déterminée par la forme unique de chaque enzyme.
- •Les enzymes sont des protéines qui ont une forme tridimensionnelle caractéristique.
- •Le substrat se lie temporairement sur le site actif de l'enzyme, un « sillon » retrouvé à la surface des enzymes

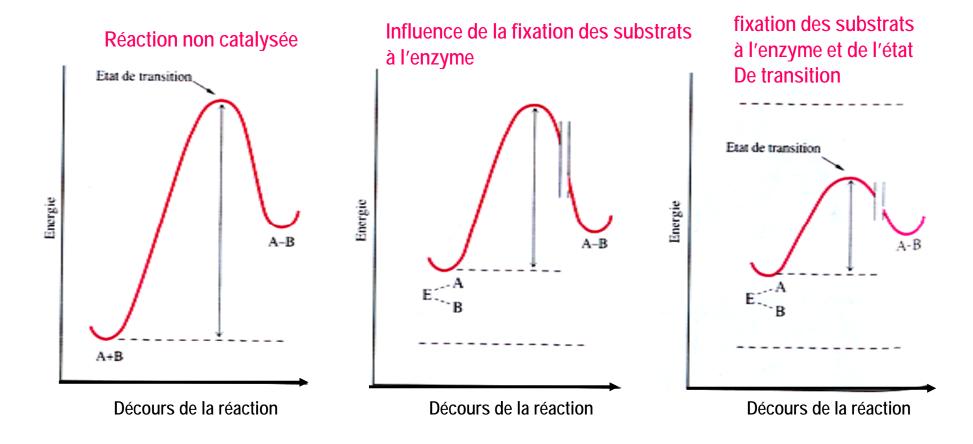


Le substrat se lie à l'enzyme par des liaisons hydrogène ou covalentes, et forme le complexe Enzyme-Substrat (ES).



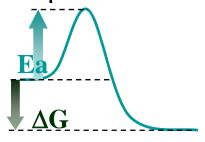


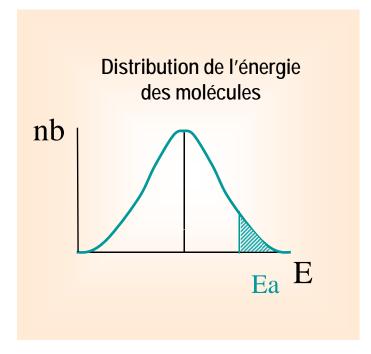
L'essence de l'efficacité de la catalyse enzymatique repose sur l'affinité de l'enzyme pour ses substrats d'une part et pour les états de transition d'autre part.



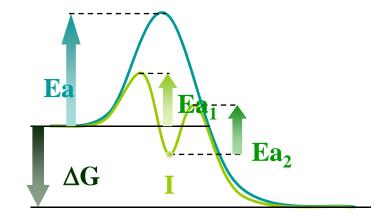
Réaction non catalysée

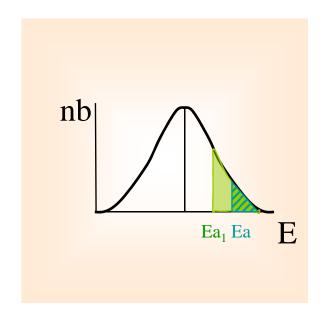
Pour réagir, les molécules doivent posséder suffisamment d'énergie pour franchir une barrière de potentiel





Réaction catalysée



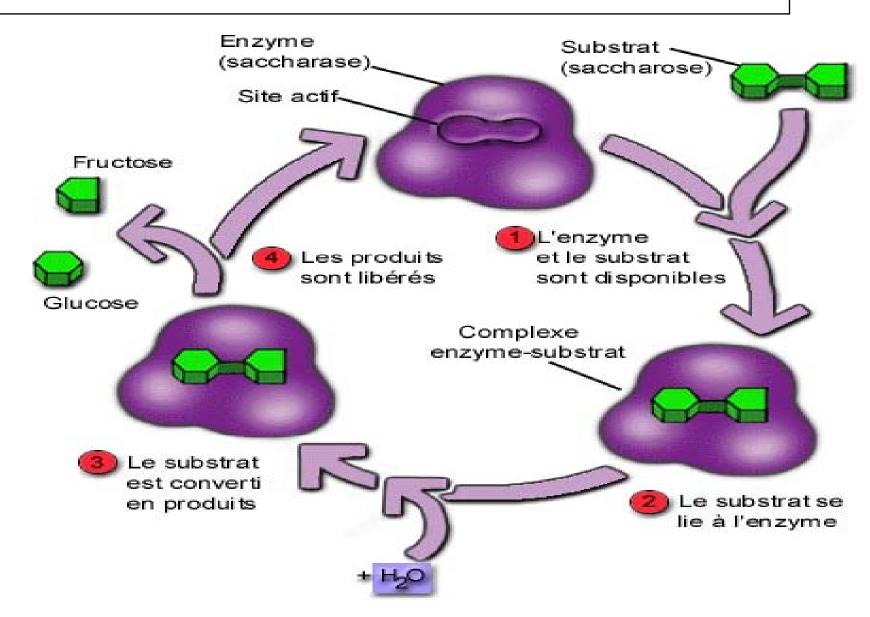


Saccharose + H₂0



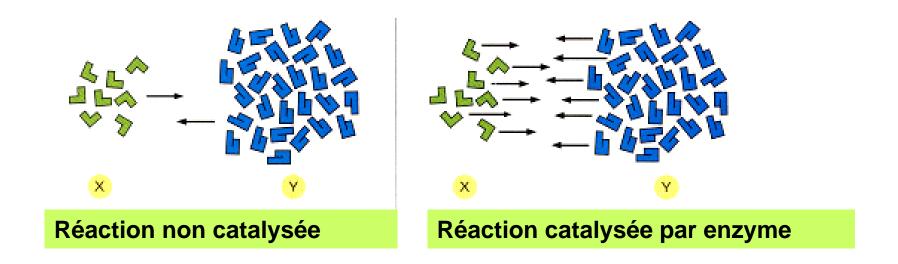
Glucose + Fructose

 $\Delta G = -29.3 \text{ Kj/mol}$



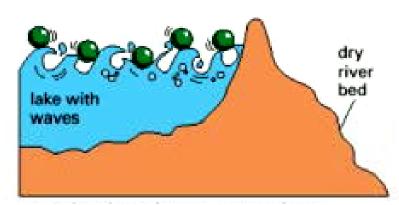
Le cycle de conversion du substrat se fait rapidement; un enzyme peut catalyser 10³ à 10¹⁷ réactions par seconde.

Enzyme anhydrase carbonique : vitesse * 5.106

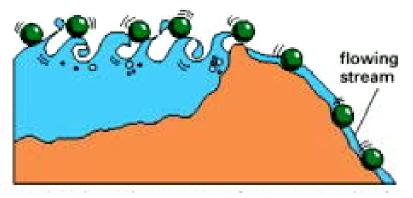


•Les enzymes ne changent pas le ΔG de la réaction, ils ne font qu'augmenter la vitesse d'une réaction qui autrement se ferait très lentement.

Les enzymes permettent d'accroitre le flux en produit d'une réaction

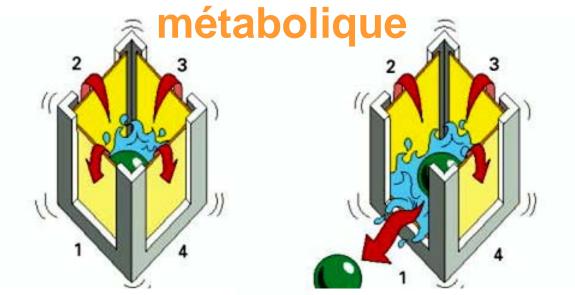


Réaction non catalysée les vagues ne sont pas suffisamment grandes pour franchir la digue



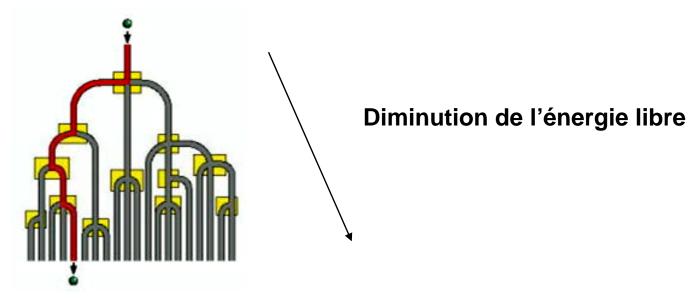
Réaction catalysée les vagues surmontent facilement la digue et le flux continu s'établie

Les enzymes permettent le choix de la voie



1) Sans catalyse enzymatique





Les Enzymes : plan du cours

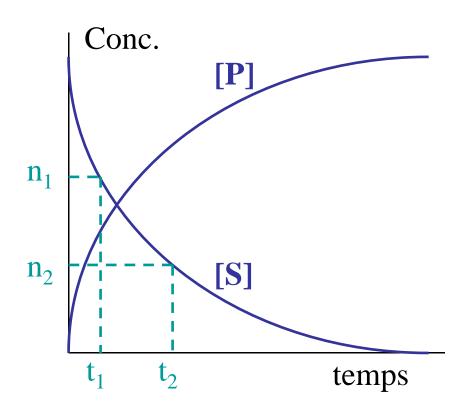
Enzymes, principes
Cinétique chimique
Cinétique enzymatique
Eléments de Catalyse enzymatique
Régulation des enzymes et du
métabolisme
Les enzymes marqueurs de
pathologie

Cinétique des réactions chimiques

Δ G° informe sur la possibilité pour une réaction de se dérouler mais ne donne aucune indication sur la vitesse ou le mécanisme de la réaction.

$$S \longrightarrow P$$
Substrat Produit

$$\mathbf{v} = -\frac{\mathbf{d}[\mathbf{S}]}{\mathbf{d}t} = \frac{\mathbf{d}[\mathbf{P}]}{\mathbf{d}t}$$



Facteurs influençant la vitesse d'une réaction

- > température
- > concentration des réactifs
- > contact entre les réactifs
- > nature du solvant
- présence de catalyseurs
- > lumière

Cinétique descriptive

$$aA + bB \longrightarrow pP$$

La vitesse d'une réaction dépend de l'énergie d'activation, de <u>la température</u> et de la <u>concentration des réactifs</u>.

v = k f(concentrations A et B)

Variation en fonction de la température :

Dans tous les cas, sans exception, on remarque que la vitesse des transformations chimiques augmente lorsque l'on augmente la température. Cette dépendance semble être spécifique à chaque réaction : elle est tantôt grande, tantôt nettement plus faible.

La loi d'Arrhénius

- « Une réaction nécessite, un amorçage »
- loi qui contient deux paramètres indépendants de la température :

L'énergie d'activation E_A exprimée en kJ-mol⁻¹ Le facteur de fréquence A appelé aussi facteur pré-exponentiel dont l'unité est celle de k:

$$\mathbf{k} = \mathbf{A} \cdot \mathbf{e}^{(-\mathbf{E}_{\mathbf{A}}/\mathbf{RT})}$$

Cinétique : ordre des réactions

L'ordre d'une réaction décrit les variations de la vitesse en fonction de la concentration des réactants.

$$aA + bB \longrightarrow pP$$

La réaction a un ordre si $v = k [A]^{\alpha} \times [B]^{\beta}$

 $\alpha + \beta$ = ordre total de la réaction

 α = ordre partiel de la réaction par rapport à A

k = constante de vitesse de la réaction

Étude de l'ordre des réactions

$$\mathbf{v} = \mathbf{k} \ [\mathbf{A}]^{\alpha} \times [\mathbf{B}]^{\beta}$$

Les réactions n'ont pas toujours un ordre.

Quand une étape est limitante, elle impose son ordre

Étude en fonction des concentrations:

mesure de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration d'un réactif. (ordre partiel)

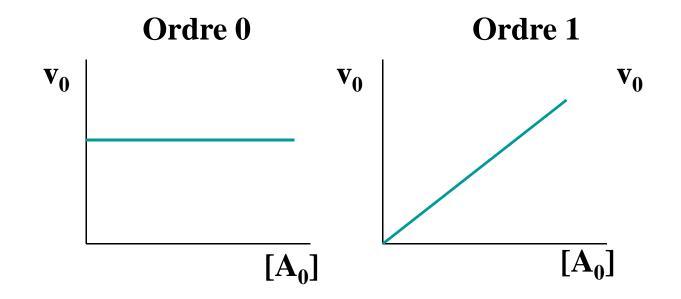
Étude en fonction du temps:

mesure de l'évolution de la concentration d'un réactif en fonction du temps (ordre global)

Ordre des réactions: étude en fonction des concentrations

- Détermination de l'ordre partiel pour chacun des réactifs
- Mesure des vitesses initiales: $\mathbf{v_0} = \mathbf{k_{\alpha}}[\mathbf{A_0}]^{\alpha}$

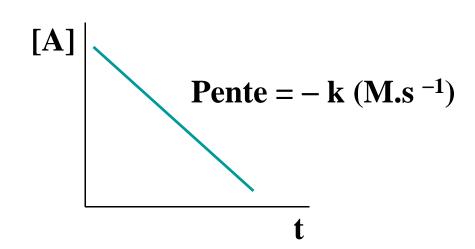
$$lnv_0 = k_{\alpha} + \alpha ln[A_0]$$



Ordre des réactions: étude en fonction du temps

Étude de l'ordre global de la réaction. Ne s'applique qu'aux ordres entiers et simples, permet le calcul du $t_{1/2}$ et de la concentration des réactifs à un temps donné.

Ordre 0



$$-\frac{dA}{dt} = v = k$$
$$[A] = [A_0] -kt$$

$$t = ([A_0] - [A])/k$$

$$\mathbf{t}_{1/2} = \frac{[\mathbf{A}_0]}{2 \times \mathbf{k}}$$

Réactions d'ordre 1

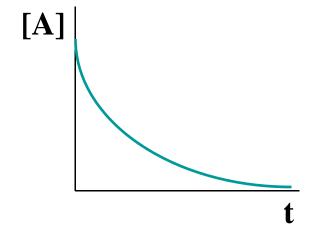
$$\mathbf{v} = - \frac{\mathbf{dA}}{\mathbf{dt}} = \mathbf{k} [\mathbf{A}]$$

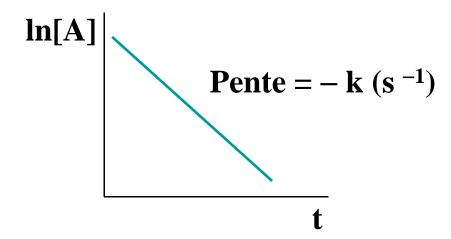
$$- \mathbf{k.dt} = \frac{\mathbf{dA}}{[\mathbf{A}]}$$

$$Ln[A] = ln[A_0] - kt$$

$$[A] = [A_0] e^{-kt}$$

$$ln \frac{[A_0]}{[A]} = kt$$



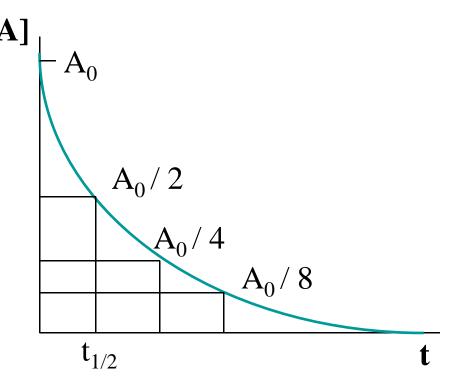


Réactions d'ordre 1: calcul du t_{1/2}:

$$\ln \frac{[A_0]}{[A_0]/2} = \ln 2 = kt_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

 $t_{1/2}$ est indépendant de $[A_0]$, ne dépend que de k (donc de T°)



Les Enzymes : plan du cours

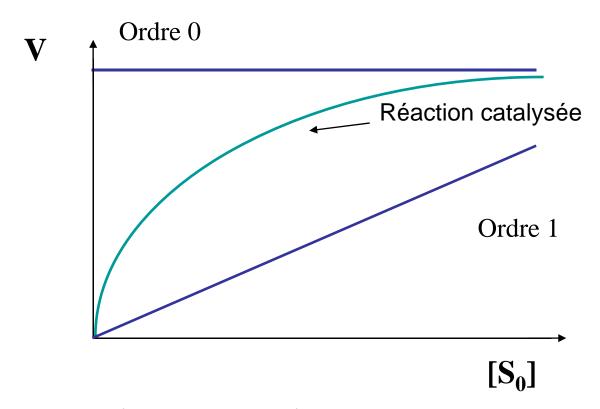
Enzymes, principes Cinétique chimique

Cinétique enzymatique cinétique Michaélienne

facteurs influençant la vitesse inhibiteurs

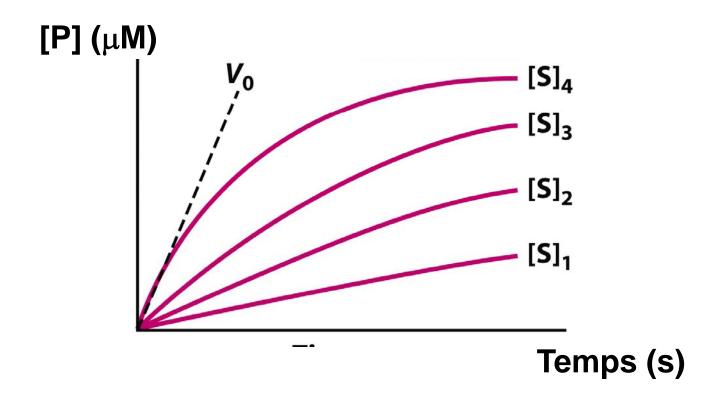
Eléments de Catalyse enzymatique Régulation des enzymes et du métabolisme Les enzymes marqueurs de pathologie

Cinétique enzymatique: le modèle de Michaelis - Menten

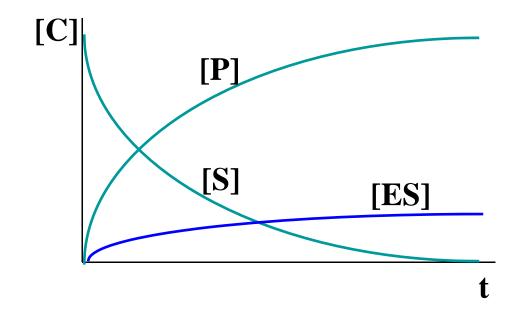


Il explique la relation hyperbolique entre la concentration en substrat et la vitesse de la réaction.

Méthode de mesure de la vitesse



La réaction se déroule dans une cuve de spectrophotomêtre



$$\mathbf{E} + \mathbf{S} \xrightarrow{k_1} \mathbf{E} \mathbf{S} \xrightarrow{k_2} \mathbf{P} + \mathbf{E}$$

le modèle de Michaelis - Menten

$$\mathbf{E} + \mathbf{S} \xrightarrow{\mathbf{k}_1} \mathbf{E} \mathbf{S} \xrightarrow{\mathbf{k}_2} \mathbf{P} + \mathbf{E}$$

Vitesse de réaction: $V = k_2$ [ES]

vitesse de formation de ES: $= k_1$ [E] [S] vitesse de dissociation de ES $= (k_{-1} + k_2)$ [ES] à l'état stationnaire: [ES] = Cste

[ES] =
$$\frac{[E][S]}{(k_{-1} + k_2) / k_1}$$
Km

Vitesse de réaction: $V = k_2$ [ES]

$$[E] = [E_T] - [ES]$$
 si $[S] >> [E]$

$$[ES] = \frac{([E_T] - [ES]) [S]}{Km}$$

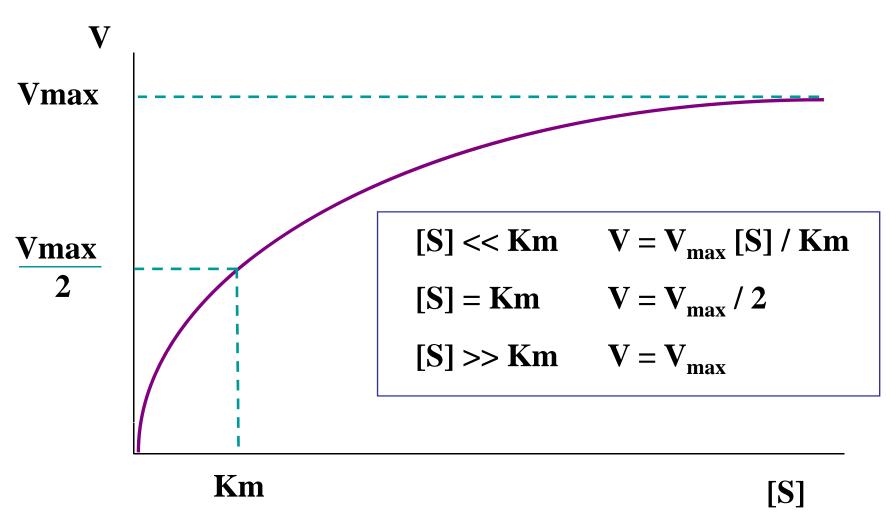
$$[ES] = [E_T] - [ES] + Km$$

$$\mathbf{V} = \mathbf{k}_2 \ [\mathbf{E}_{\mathbf{T}}] \ \frac{[\mathbf{S}]}{[\mathbf{S}] + \mathbf{K}\mathbf{m}}$$

$$\mathbf{V} = \mathbf{V}_{\text{max}} \frac{[\mathbf{S}]}{[\mathbf{S}] + \mathbf{Km}}$$

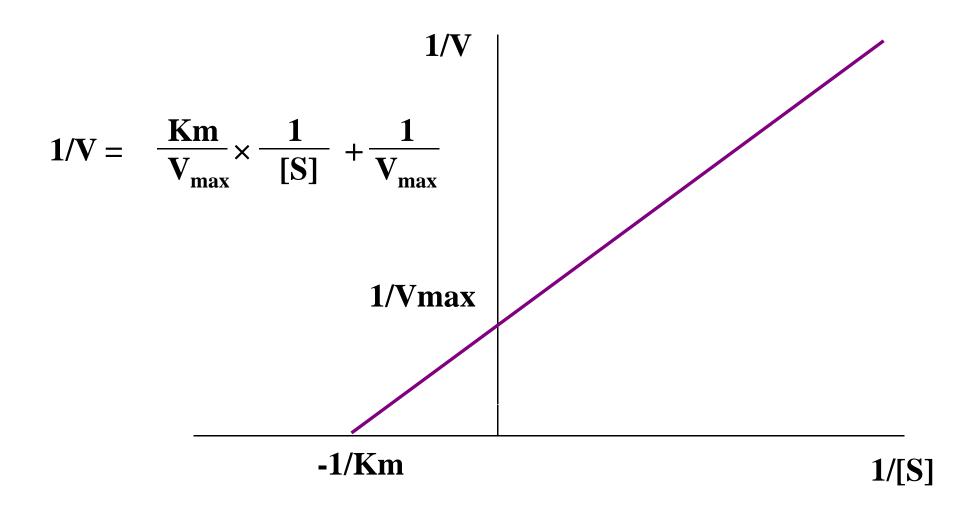
Représentation graphique

$$V = V_{\text{max}} \frac{[S]}{[S] + Km}$$

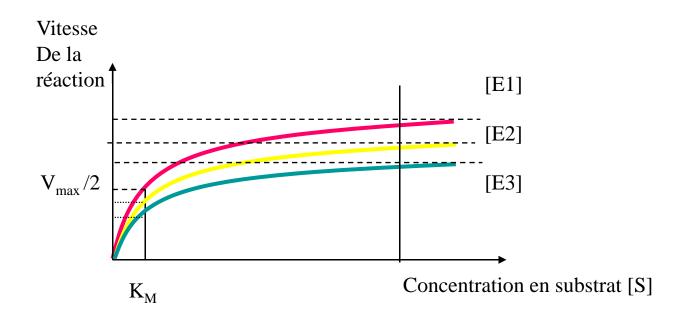


Analogie : vente de billets pour un concert. S'il n'y a pas de file d'attente, le nombre de billets vendus par heure dépend du nombre de clients. S'il y a une file d'attente en permanence, il ne dépend que de la dextérité du vendeur

Représentation en double inverse (Lineweaver - Burk)



Expression de l'activité d'une enzyme



Augmentation de la quantité d'enzyme Vmax augmente K_M est constant

Mesure de l'efficacité catalytique : Nombre de Turn-over

« Turnover » de l'enzyme k_{cat} (seconde⁻¹)

[Et] connue
$$V_{max} = k_{cat}$$
 [Et] $k_{cat} = \frac{V_{max}}{[Et]}$

 \mathbf{k}_{cat} est une constante de vitesse du premier ordre (unité s-1), c'est une fréquence

Fréquence à laquelle l'enzyme établit l'acte catalytique (nombre de fois par seconde) lorsqu'il est saturé par le substrat

1/k_{cat} est la durée, en s de l'acte catalytique.

k_{cat} donne la mesure de l'efficacité de la catalyse par l'enzyme

Les Enzymes : plan du cours

Enzymes, principes Cinétique chimique

Cinétique enzymatique

cinétique Michaélienne

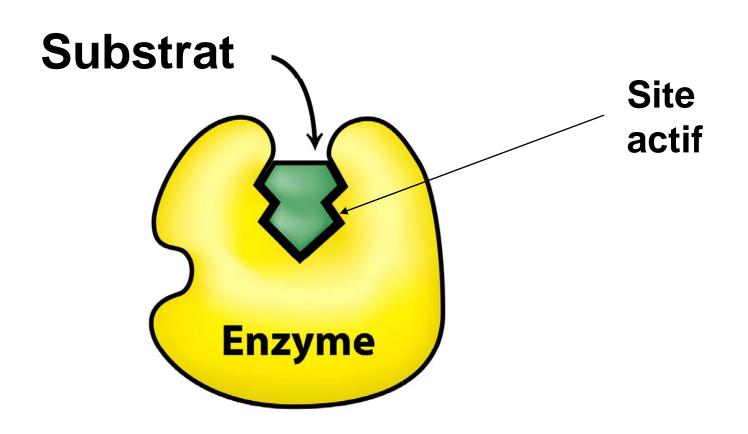
facteurs influençant la vitesse

inhibiteurs

Eléments de Catalyse enzymatique Régulation des enzymes et du métabolisme Les enzymes marqueurs de pathologie

Facteurs influençant la vitesse de réaction

- ☐ Le pH (et la force ionique)
- **□** La température
- **□** Cofacteurs
- **□** Activateur / inhibiteurs



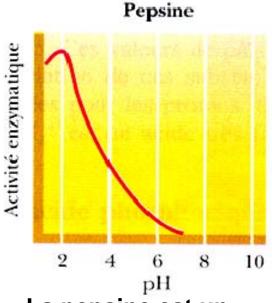
pH et force ionique

- Fixation du substrat entraine la mise en jeu d'acides aminés polaires : centre catalytique excluant l'eau
- pKa varie dans la protéine, influence du pH sur la réaction enzymatique

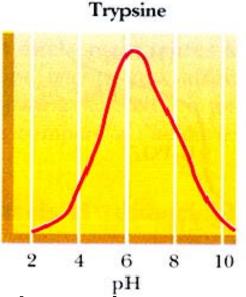
Acide aminé	Groupe réactionnel	Charge(pH 7)	Fonctions
aspartate	-COO-	-1	fixation de cations, transfert protons
glutamate	-C00-	-1	fixation de cations, transfert protons
histidine	imidazole	(0)	transfert protons
cystéine	-S ⁻	(0)	liaison covalente de groupes acyle
Tyrosine	-OH	0	liaison H avec ligands
Lysine	-NH3+	+1	fixation d'anions
arginine	guanidinium	+1	fixation d'anions
Sérine	-CH₂OH	(0)	liaison covalente de groupes acyle

Le maintien du pH est vital pour toutes les cellules

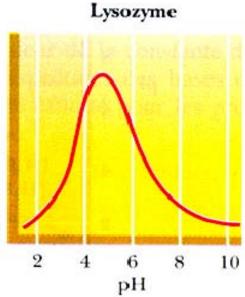
Le pH optimum d'un enzyme est l'une de ses plus importantes caractéristiques.



La pepsine est un enzyme de la digestion des protéines, elle est active dans le suc gastrique.



La trypsine est également un enzyme protéolytique mais elle agit dans le milieu plus alcalin de l'intestin grêle.



Le lysozyme digère les parois bactériennes; il est présent dans les larmes.

Un changement de pH intracellulaire ou extracellulaire perturberait très sérieusement le métabolisme.

Les organismes disposent d'une grande variété de mécanismes pour maintenir constant le pH des fluides intra- et extra- cellulaires, mais la protection primaire est assurée par des systèmes tampons.

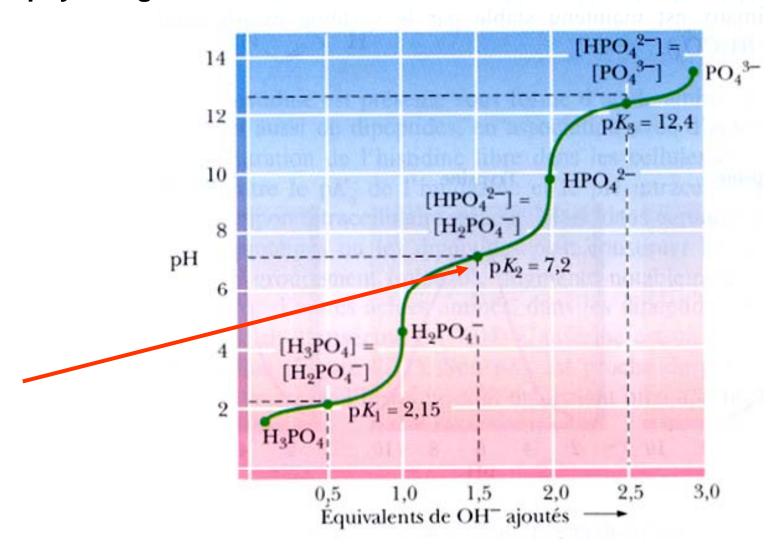
Les systèmes biologiques sélectionnés proviennent de la nécessité d'une valeur du pKa, voisin de 7 et de la compatibilité des composants du tampon avec le métabolisme cellulaire.

Deux systèmes tampons contribuent au maintien du pH intracellulaire pratiquement constant(le système phosphate $(HP0_4^{2-}/H_2PO_4^{-})$ et le système histidine.

Le pH des fluides extracellulaires qui baignent les cellules et les tissus des animaux est maintenu stable par le système bicarbonate / acide carbonique $(HCO_3^-/H2CO_3)$

Système phosphate

système phosphate : stabilité du pH des fluides intracellulaires au pH physiologique car pK₂ est proche de cette valeur.



Par exemple, si la concentration cellulaire totale en phosphate est 20 mM (millimolaire) et que le pH est 7,4 la distribution des principaux ions phosphate est donnée par les relations suivantes:

$$pH = pK_2 + \log_{10} \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^{-}]}$$

$$7,4 = 7,20 + \log_{10} \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^{-}]}$$

$$\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^{-}]} = 1,58$$
Donc si $[HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^{-}] = 20 \text{ mM}$, alors
$$[HPO_4^{2-}] = 12,25 \text{ mM et } [H_2PO_4^{-}] = 7,75 \text{ mM}$$

Le système tampon bicarbonate du sang

L'important couple bicarbonate / acide carbonique forme le système tampon du plasma

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Le pKa intéressant est le pKa, de l'acide carbonique, d'une valeur de 3,77 à 25'C et de 3,57 à 37'C très loin du pH normal du plasma sanguin (7,4).

À pH 7,4, la concentration de H ₂CO ₃ n'est qu'une infime fraction de celle de HCO3⁻ et donc en apparence le plasma sanguin serait mal protégé contre un influx d'ions OH⁻.

$$pH = 7,4 = 3,57 + log_{10} \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$
$$\frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = 6761$$

Si par exemple [HC03⁻] = 24 mM, alors H₂CO₃ est seulement de 3,55 x 10-6 M, et l'addition d'une quantité équivalente d'ions OH⁻ submergerait le système tampon, provoquant une dangereuse augmentation du pH.

Comment donc ce système bicarbonate peut-il être fonctionnel ?

Le système tampon bicarbonate fonctionne, et même bien, car la concentration de H_2CO_3 est maintenue relativement constante, en équilibre avec le CO_2 , dissous provenant du métabolisme cellulaire, et sa disponibilité à partir du réservoir de CO_2 gazeux présent dans les poumons.

L'anhydride carbonique $C0_2$ gazeux ($CO_2(g)$) des tissus et des poumons, est symbolisé par $C0_2(d)$ lorsqu'il est dissous dans le plasma sanguin et par H_2CO_3 sous sa forme hydratée.

$$CO_2(g) \rightleftharpoons CO_2(d)$$
 (1)
 $CO_2(d) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$ (2)
 $H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$ (3)

Donc la concentration de H₂CO₃ est elle-même tamponnée par le CO₂ disponible. L'hydratation de CO₂ est catalysée par un enzyme très actif, **l'anhydrase** carbonique, qui facilite l'équilibre de la réaction:

$$CO_{2}(g) \rightleftharpoons CO_{2}(d) \qquad (1)$$

$$CO_{2}(d) + H_{2}O \rightleftharpoons H_{2}CO_{3} \qquad (2)$$

$$H_{2}CO_{3} \rightleftharpoons H^{+} + HCO_{3}^{-} \qquad (3)$$

Il y a hyperventilation lorsque la fréquence de la respiration est plus rapide que nécessaire pour l'élimination du $C0_2$ produit par l'organisme, ce qui réduit anormalement [CO2(g)] dans le sang.

Certains troubles du système nerveux comme la méningite, l'encéphalite, ou l'hémorragie cérébrale, stress, ainsi que certaines substances ou hormones qui induisent des changements physiologiques peuvent provoquer l'hyperventilation.

Puisque $[CO_2(g)]$ chute par une exhalation trop importante, $[H_2co_3]$ dans le plasma sanguin diminue, avec pour conséquence une baisse de [H+I] et de [HCO3-].

Le pH du sang s'élève dans les 20 s qui suivent le début de l'hyperventilation et atteint un plafond en 15 min.

[H⁺] passe de 40 nM à 18nM : pH 7.74 : alcalose respiratoire

$$CO_2(g) \rightleftharpoons CO_2(d)$$
 (1)

$$CO_2(d) + H_2O \Longrightarrow H_2CO_3$$
 (2)

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$
 (3)

L'hypoventilation est le contraire de l'hyperventilation, elle est caractérisée par l'impossibilité d'évacuer assez rapidement le C0₂ selon les nécessités physiologiques.

Les narcotiques, les sédatifs, les anesthésiques, les médicaments dépresseurs peuvent provoquer l'hypoventilation et aussi les maladies pulmonaires.

l'hypoventilation aboutit à l'acidose respiratoire, l'accumulation de C0₂(g) étant suivie de la formation de H₂CO₃ qui se dissocie en H⁺ et HCO₃⁻

Température

- Agit de 2 manières
 - Augmentation de la vitesse de réaction (selon la loi d'Arrhénius)
 - Déstabilisation de la structure de l'enzyme
- Comme pour le pH il y a un optimum de température, en général c'est 37°C
- Mécanismes de maintien de la température corporelle sophistiqués

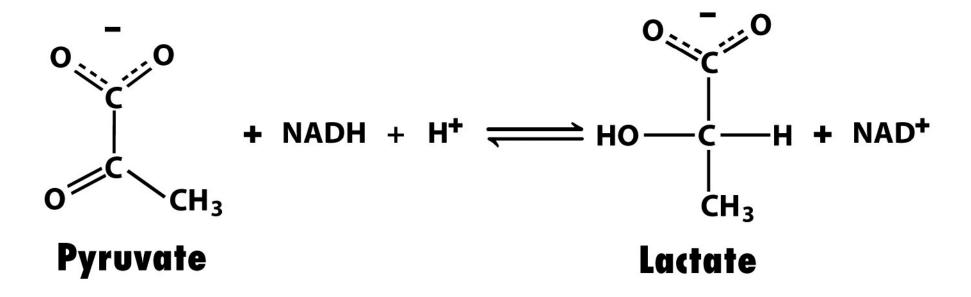
Cofacteurs

Les enzymes ont souvent besoin de cofacteurs qui sont indispensable pour le déroulement de la réaction

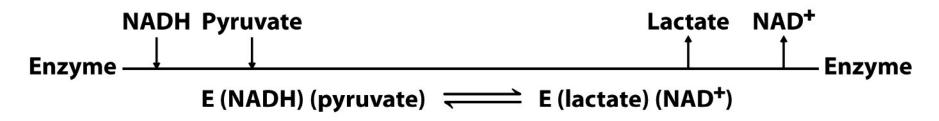
Ils jouent un rôle dans le site actif

Sont souvent issus des vitamines

Qualité de l'alimentation : des carences provoquent des maladies



Enzyme : lactate déhydrogénase



Unnumbered figure pg 223b

Biochemistry, Sixth Edition

© 2007 W. H. Freeman and Company

Principaux cofacteurs enzymatiques

cofacteur	Enzyme

Coenzyme

Thiamine pyrophosphate
Flavin adenine nucleotide
Nicotinamide adenine dinucleotide
Pyridoxal phosphate
Coenzyme A (CoA)
Biotin

Biotin
5'-Deoxyadenosyl cobalamin
Tetrahydrofolate

Pyruvate dehydrogenase Monoamine oxidase Lactate dehydrogenase Glycogen phosphorylase Acetyl CoA carboxylase Pyruvate carboxylase Methylmalonyl mutase Thymidylate synthase

Metal

Zn²⁺
Zn²⁺
Mg²⁺
Mg²⁺
Ni²⁺
No
Se
Mn
K⁺

Carbonic anhydrase
Carboxypeptidase
EcoRV
Hexokinase
Urease
Nitrate reductase
Glutathione peroxidase
Superoxide dismutase
Propionyl CoA carboxylase

Les Enzymes : plan du cours

Enzymes, principes Cinétique chimique

Cinétique enzymatique

cinétique Michaélienne facteurs influençant la vitesse

inhibiteurs

Eléments de Catalyse enzymatique Régulation des enzymes et du métabolisme Les enzymes marqueurs de pathologie

Inhibition enzymatique

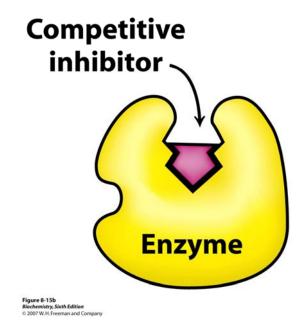
- La plupart des enzymes peuvent être inhibés : mode de contrôle important des systèmes biologiques.
- De nombreux médicaments ou toxiques agissent comme inhibiteurs
- Informations sur le mode de catalyse enzymatique
- Analogue de l'état de transition : excellent inhibiteurs.

Mode d'inhibition

- Irréversible (liaison covalente ou très forte)
 - Pénicilline, aspirine

 Réversible : dissociation rapide du complexe enzyme/inhibiteur

Inhibition compétitive



Pas de complexe ESI

I ressemble à S et l'empêche de se fixer

Diminition du nombre de ES

Levée par augmentation de S

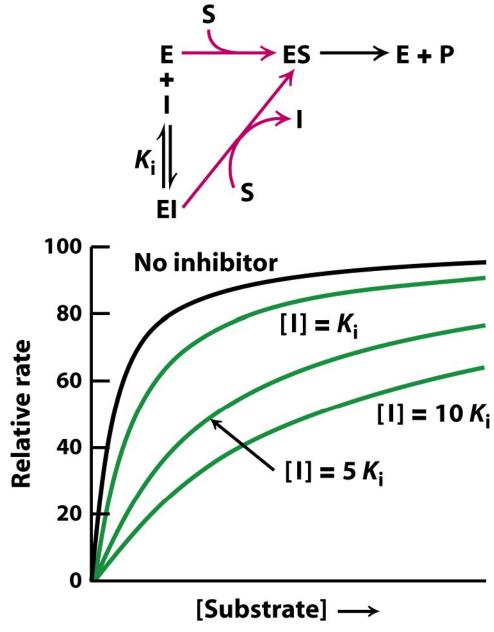


Figure 8-17
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Représentation graphique en double inverse : inhibiteur compétitif

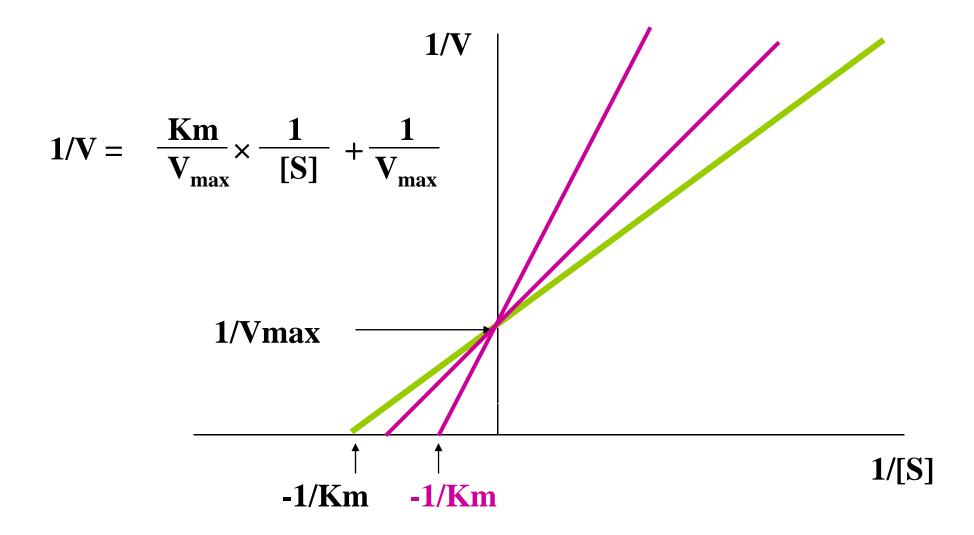


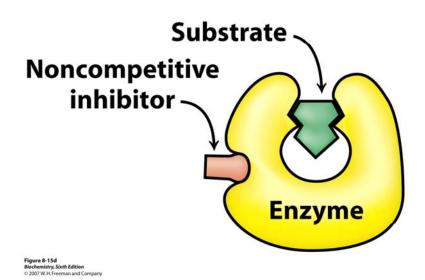
Figure 8-16

Biochemistry, Sixth Edition

© 2007 W. H. Freeman and Company

Methotrexate : 1000* plus de fixation que le DHF sur la DHF reductase (métabolisme des purines et pyrimidines) : chimiothérapie

Inhibition non compétitive



Comme si on a une baisse de E fonctionnel

Donc baisse de Vmax mais Km idem

Non levée par augmentation de S

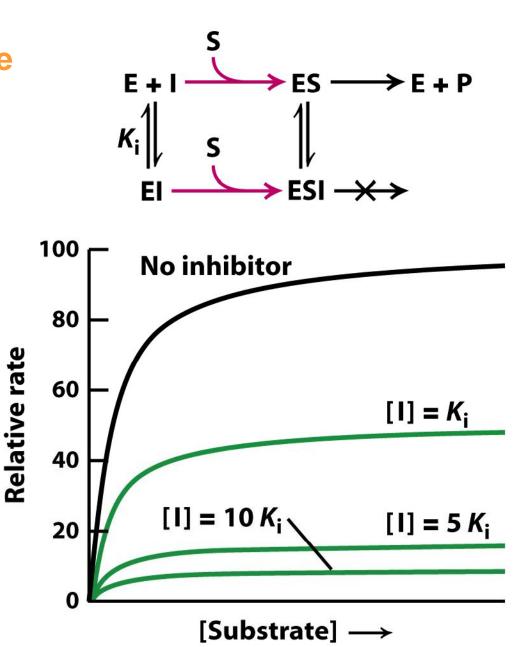
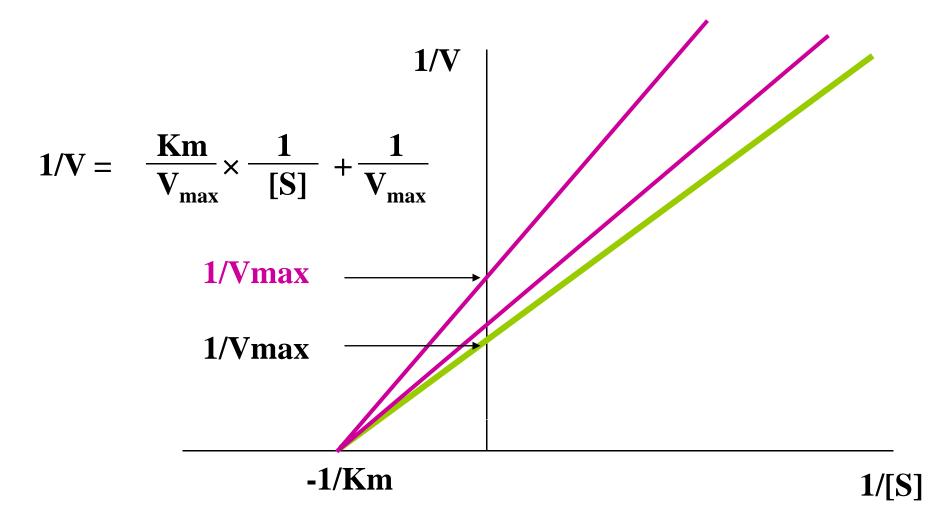
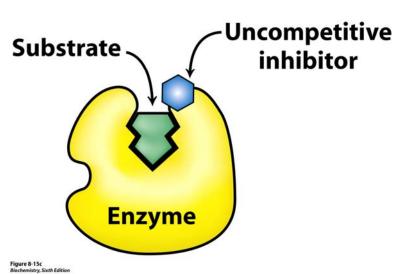


Figure 8-19
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Représentation graphique en double inverse : inhibiteur non compétitif



Inhibition uncompétitive



Baisse de Vmax et

augmentation de Km



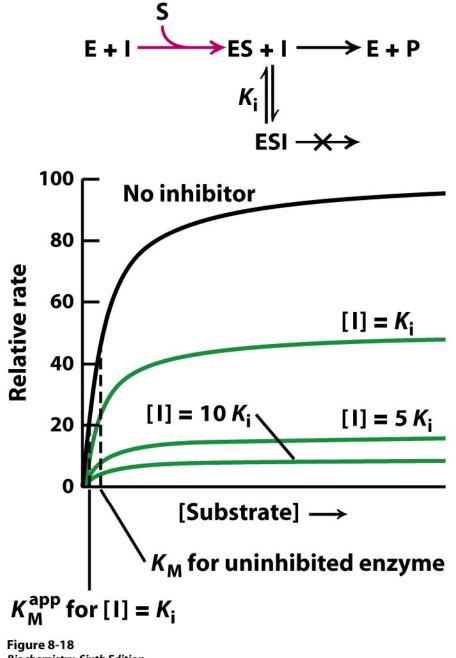


Figure 8-18
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Inhibition Irréversible exemple 1 : aspirine

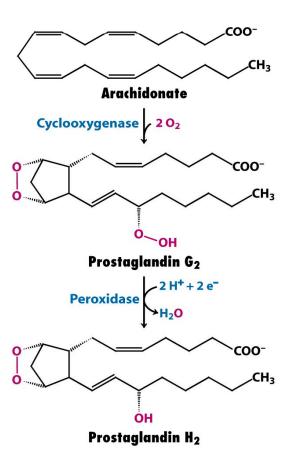


Figure 12-22

Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

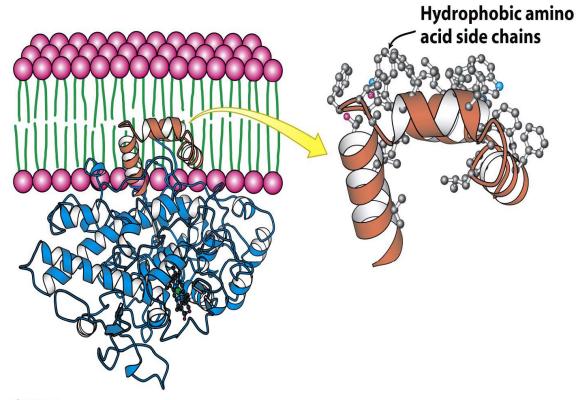


Figure 12-23

Biochemistry, Sixth Edition

© 2007 W.H. Freeman and Company

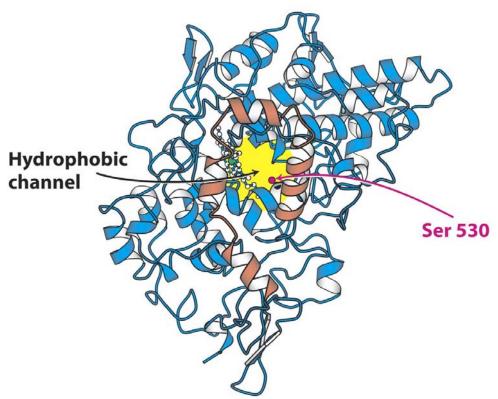
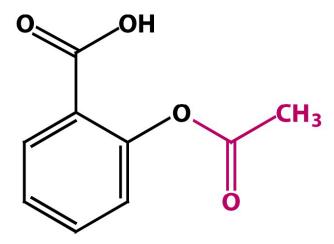


Figure 12-24

Biochemistry, Sixth Edition

© 2007 W.H. Freeman and Company



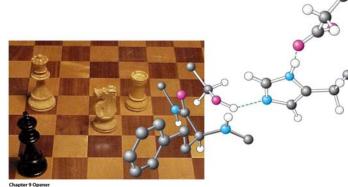
Aspirin (Acetylsalicyclic acid)

Figure 12-25 Biochemistry, Sixth Edition © 2007 W. H. Freeman and Company

Les Enzymes : plan du cours

Enzymes, principes Cinétique chimique Cinétique enzymatique Eléments de Catalyse enzymatique

Régulation des enzymes et du métabolisme Les enzymes marqueurs de pathologie



- Classification des enzymes selon le type de réaction catalysée
 - Les 6 types de réactions
 - Nomenclature internationale des enzymes
 - Catalyse générale acidobasique :
 - Catalyse covalente
 - Catalyse métallique
- Applications

Classes d'enzymes d'après les réactions qu'ils catalysent

- (1) Oxydo-réductases :oxydo-réduction
 - Déshydrogénases, oxydases, peroxydases, oxygénases, réductases

Lactate déshydrogénase : oxydation du lactate (alcool) en pyruvate (cétone)

$$\begin{array}{c} COO^{\bigodot} \\ HO - \stackrel{|}{C} - H + NAD^{\textcircled{\oplus}} & \longrightarrow & \stackrel{COO^{\bigodot}}{\stackrel{|}{C} + O} + NADH + H^{\textcircled{\oplus}} \\ CH_{3} & & CH_{3} & & & & & \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{c} COO^{\bigodot} \\ \downarrow \\ CH_{3} & & & & & \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{c} COO^{\bigodot} \\ \downarrow \\ CH_{3} & & & & \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{c} CH_{3} & & & \\ \end{array}$$

$$\begin{array}{c} CH_{3} & & & \\ \end{array}$$

Coenzyme : NAD+ : nicotinamide adénine dinucléotide

(2) Transférases : réactions de transfert de groupe, nécessite un coenzyme Soit l'enzyme soit le coenzyme sont substitués par covalence avec un groupe du substrat

Alanine aminotransferase (transaminase) : transfert de groupe aminé

L-alanine α -cetoglutarate pyruvate L-glutamate

Coenzyme : phosphate de pyridoxal (PLP), dérivé de la vitamine B6

(3) Hydrolases : réactions d'hydrolyse

Classe particulière de transférase, l'eau étant l'accepteur du groupe transféré Protéases : trypsine hydrolyse des liaisons Lys-x ou Arg-x ou x=Pro

Pas de coenzyme, parfois un cofacteur ion métallique

- (4) Lyases : réactions d'élimination non hydrolytiques non oxydantes ou lyse
- (5) Isomérases : réactions d'isomérisation

Simples car un seul substrat, un seul produit À l'origine de la compréhension de la cinétique enzymatique

(6) Ligases (synthétases) : union (ligation) de 2 substrats avec apports d'énergie d'un nucléoside triphosphate, ATP

Glutamine synthétase : synthèse ATP dépendante de la L-glutamine

$$\begin{array}{c} CO0^{\scriptsize \scriptsize \bigcirc} \\ H_3N - C - H \\ \hline \\ COEnzyme : ATP \\ \hline \\ COEnzyme : ATP \\ \hline \\ COO^{\scriptsize \scriptsize \bigcirc} \\ \hline \\ (CH_2)_2 \\ \hline \\ COO^{\scriptsize \scriptsize \bigcirc} \\ + ATP + NH_4^{\scriptsize \scriptsize \bigcirc} \\ \hline \\ (CH_2)_2 \\ \hline \\$$

Nomenclature internationale des enzymes

```
EC 1
        Oxidoreductases
        EC1.1,....
        Transferases
EC 2
EC 3
        Hydrolases
        EC 3.1 Acting on ester bonds
        EC 3.2 Glycosylases
        EC 3.3 Acting on ether bonds
        EC 3.4 Acting on peptide bonds (peptidases)
                EC 3.4.1
                EC 3.4.21 Serine endopeptidases
                        EC 3.4.21.1 chymotrypsin
        EC 3.5 Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds
        EC 3.6 Acting on acid anhydrides
        EC 3.7 Acting on carbon-carbon bonds
EC 4
       Lyases
EC 5
       Isomerases
EC 6
       Ligases
```

Méthodes d'étude du mécanisme

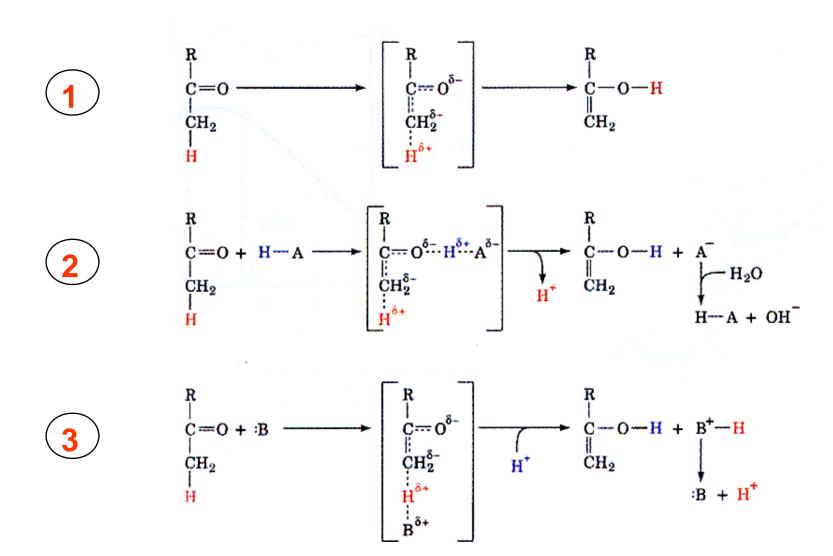
- Étude cinétiques
 - Analogues de substrats
 - Inhibiteurs
- Mutagénèse dirigée des enzymes et influence sur la cinétique
- Modélisation moléculaire (études structurales, RX, RMN,...)
- Dynamique des protéines

6 classes de mécanismes catalytiques

- Catalyse acido-basique
 - ARNase A, anhydrase carbonique
- Catalyse covalente
 - Chymotrypsine, Protéases à sérine
- Catalyse par ion métallique
 - Anhydrase carbonique, enzymes de restricition
- Catalyse électrostatique
- Catalyse par effet de proximité
- Catalyse par liaison préférentielle au complexe de l'état de transition

Catalyse acido-basique

Catalyse générale acide : processus par lequel le transfert de proton depuis un acide de Bronsted abaisse l'énergie libre de l'état de transition d'une réaction : tautomérisation d'une cétone en énol



Catalyse par ions métalliques

1/3 des enzymes!!

```
métalloenzymes : ions métalliques fortement liés Fe<sup>2+</sup> ; Fe<sup>3+</sup> ; Cu<sup>2+</sup> ; Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>.
```

enzymes activés par des métaux : liaison faible à des ions métalliques en solution : Na+ ; K+ ; Mg²⁺ ; Ca²⁺

3 modalités de catalyse

-liaison au substrat : orientation correcte dans le site catalytique

-participation à des transferts d'électron : réaction d'oxydoréduction avec changement d'état d'oxydation du métal

-stabilisation électrostatique de charges négatives, activation de l'eau.

Anhydrase carbonique

$$\begin{array}{c}
O \\
C \\
C \\
O
\end{array}$$
+ H₂O $\xrightarrow{k_1}$
+ H₂O $\xrightarrow{k_1}$
HO

OH

Acide carbonique ion bicarbonate

Réaction naturellement pas lente k= 0.15s⁻¹

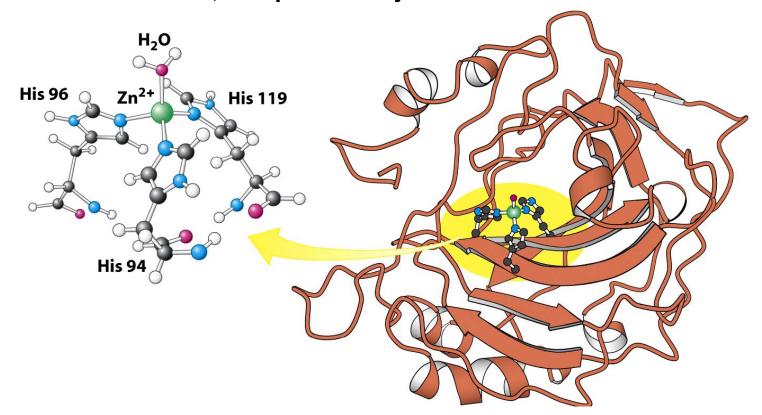
Besoin d'être nettement accélérée pour les besoins de l'organisme humain élimination du CO₂ lorsque le sang traverse les poumons synthèse rapide du bicarbonate dans l'humeur aqueuse de l'œil ..

Mutation anhydrase carbonique : osteopetrose, anémie, retard mental,...

$$k_{cat} 10^6 s^{-1}$$

9 enzymes différentes chez l'homme

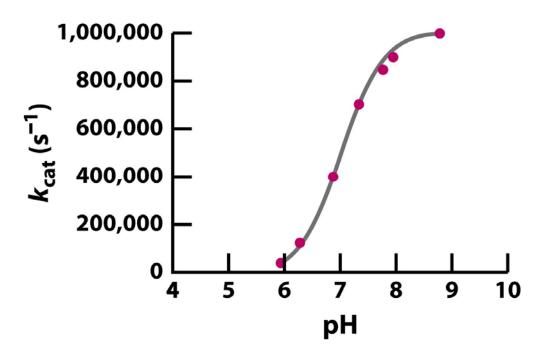
L'anhydrase carbonique contient un ion zinc lié essentiel à l'activité. Structure de AC 2, composant majeur des GR



Ion zinc fixé aux « cycles imidazole (his) et à une molécule d'eau (ou OH-selon pH).

Charge globale +2

Dans une fente près du centre de l'enzyme.



Transition vers ph7 suggérant qu'un groupe qui perd un proton à pH 7 (pKa 7) joue un rôle important.

His ?? Non car ligand du Zinc H2O ?

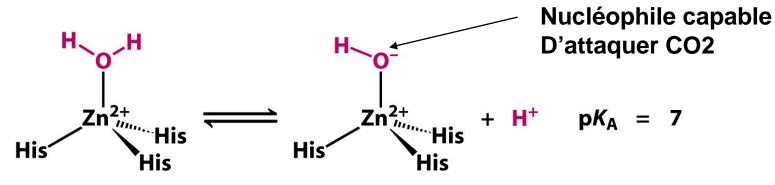


Figure 9-24
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

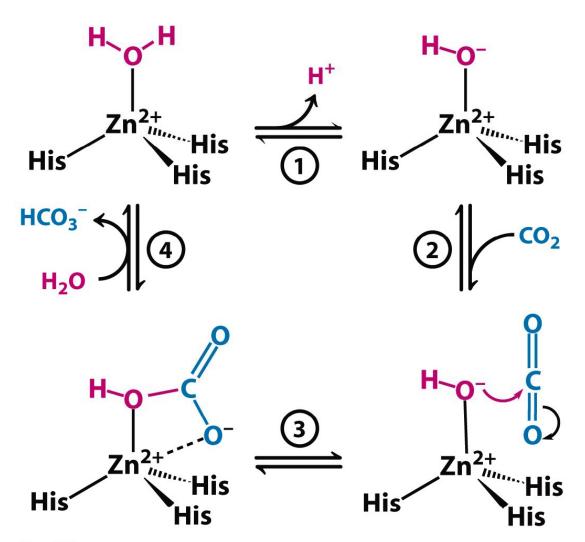


Figure 9-25
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

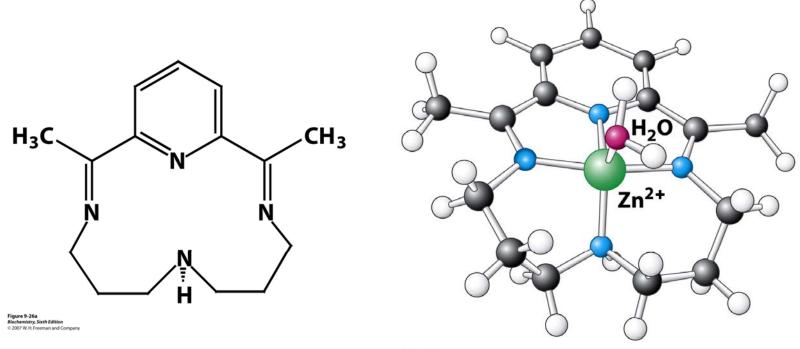


Figure 9-26b
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Vitesse * 100

Catalyse covalente

L'accélération de la réaction implique la formation transitoire d'une liaison covalente entre l'enzyme et le substrat,

Apport par l'enzyme d'un atome fortement nucléophile qui va partager ses électrons avec le substrat pour établir une liaison covalente, peu stable.

Exemple : les protéases
$$R_1$$
 R_2 R_2 R_3 R_4 R_4 R_5 R_4 R_5 R_4 R_5 R_4 R_5 R_6 R_6 R_8 R_8 R_8 R_8 R_8 R_8 R_9 R_9

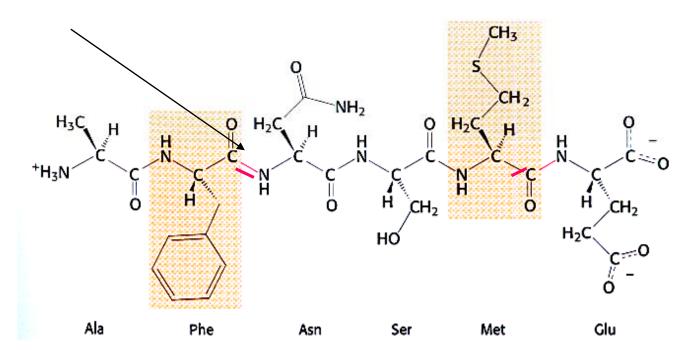
turnover des protéines, acides aminés assimilation des protéines alimentaires activation de proenzyme (coagulation,)

$$\begin{array}{c} O \\ R_1 \end{array} \stackrel{Q}{\longleftarrow} \begin{array}{c} C \text{ moins \'electrophile} \\ R_1 \end{array} \stackrel{Q}{\longleftarrow} \begin{array}{c} C \\ R_2 \end{array} \stackrel{R}{\longleftarrow} \begin{array}{c} C \\ R_1 \end{array} \stackrel{R}{\longleftarrow} \begin{array}{c} C \\ R_2 \end{array}$$

Mécanisme catalytique de la chymotrypsine

Chymotrypsine : protéase à sérine du système digestif
Clive les peptides en C-terminal des acides aminés volumineux hydrophobes
tryptophane, phénylalanine, tyrosine, méthionine

Utilisation d'un puissant nucléophile pour l'attaque du carbone du groupe carbonyle peu réactif, avec liaison temporaire au substrat



Quel nucléophile ??

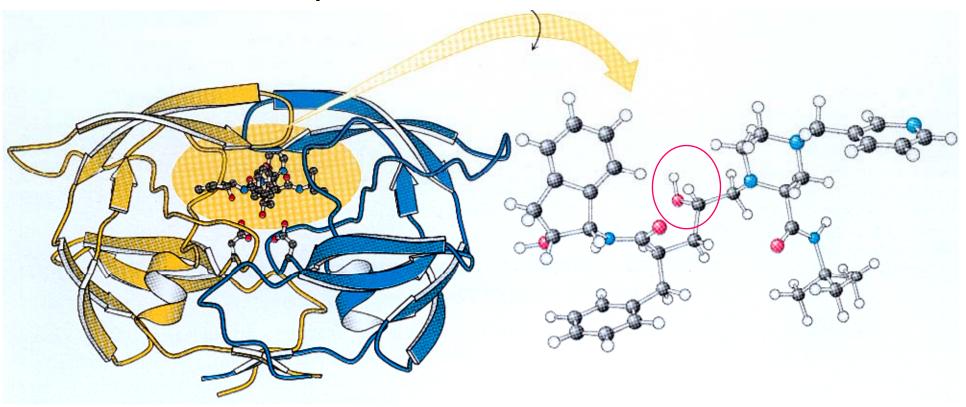
1ère indication : La chymotrypsine possède un résidu sérine extrêmement réactif

découverte par **l'utilisation d'inhibiteur** de la famille de organofluorophosphates capables d'inhiber totalement l'enzyme.

diisopropylfluorophosphate

La compréhension du mécanisme catalytique des protéases permet le développement d'inhibiteurs spécifiques utilisable en thérapie.

Ces médicaments sont des analogues non hydrolysables des substrats ou des intermédiaires tétraédriques



Protéase (à aspartates) du VIH et son inhibiteur (crixivan)

Conclusions (1)

La stabilisation de l'état de transition par les atomes du site actif de l'enzyme est la base de la catalyse enzymatique

La catalyse enzymatique fait appel à des mécanismes de base analogues à ceux de la catalyse chimique.

Le transfert de proton, l'attaque nucléophile, la stabilisation électrostatique en constitue les fondements

Le pH de l'environnement aqueux est un paramètre qui influe sur tous les mécanismes ci-dessus

L'eau est souvent partie prenante de ces mécanismes sauf dans le cas ou l'hydrolyse doit être évitée, le site actif sait alors comment exclure l'eau

Le coenzyme participe à la catalyse en stabilisant l'intermédiaire réactionnel

La compréhension fine de ces mécanismes fait appel à l'étude structurale, cinétique, mutagénèse dirigée

La conception de médicaments inhibiteurs spécifiques devient alors possible

Les Enzymes : plan du cours

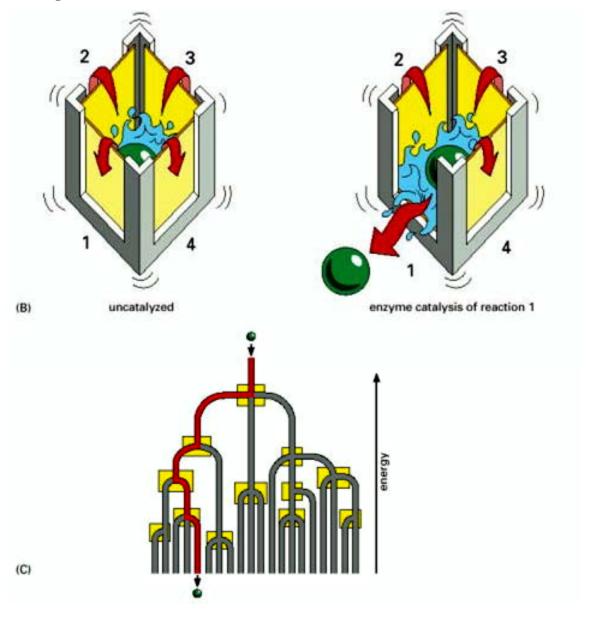
Enzymes, principes
Cinétique chimique
Cinétique enzymatique
Eléments de Catalyse enzymatique
Régulation des enzymes et du
métabolisme

Les enzymes marqueurs de pathologie



Chapter 10 Opener part 1 Vochemistry, Sixth Edition

Les enzymes permettent le choix de la voie métabolique



Exemple : Régulation de la biosynthèse des acides aminés

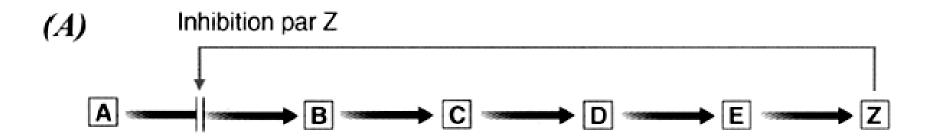
[aa] en harmonie avec l'activité métabolique de la cellule : donc régulation très fine par contrôle de l'activité des enzymes

Rétroinhibition : la première réaction irréversible (étape d'engagement) est inhibée par le produit final de la voie

La première enzyme est **allostérique**, constituée de plusieurs sous-unités dont chacune possèdent un domaine régulateur et un domaine catalyseur ; la liaison du produit Z au domaine régulateur diminue le Vmax de l'enzyme)

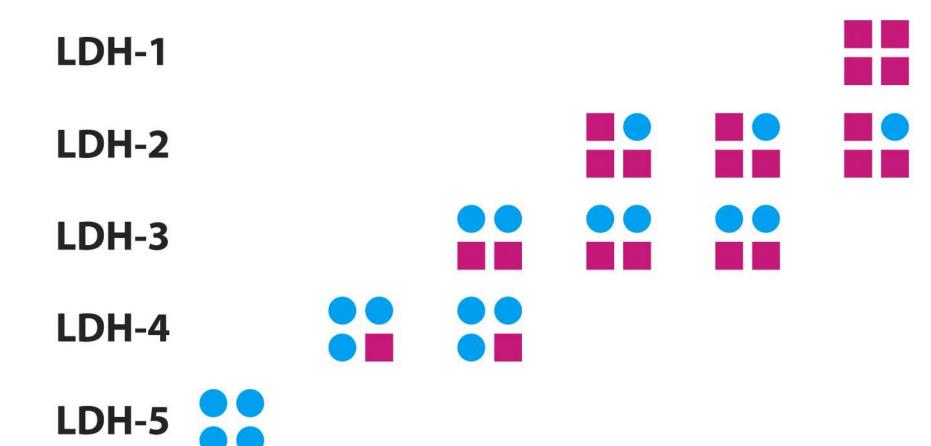
Lorsque l'aminoacide est abondant dans la cellule, l'activité enzymatique s'arrête mais l'élément précurseur de la synthèse est conservé et l'équilibre métabolique est respecté.

La voie peut être réactivée rapidement.



Isoenzymes

- Issus de gènes différents
- Exprimés dans des cellules ; tissus; temps différents
- Catalysant la même réaction
- N'ayant pas les même attributs :
 - Mode de régulation
 - Spécificité de substrat



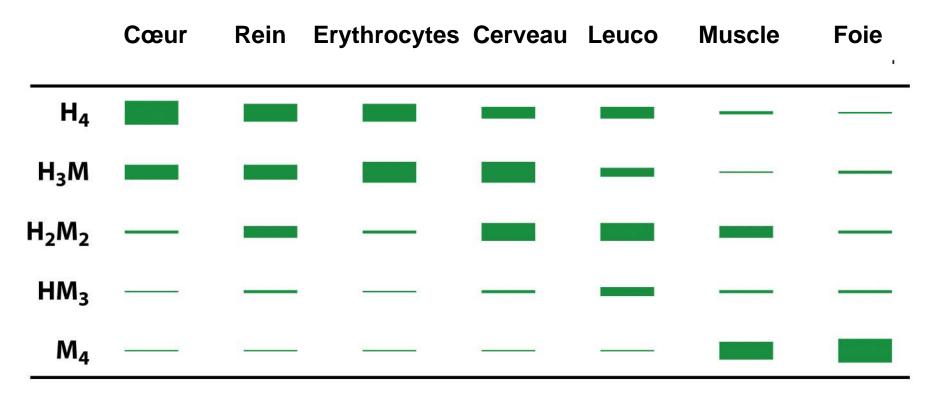


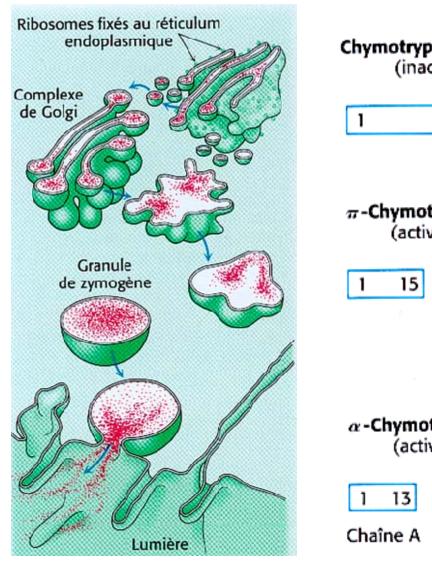
Figure 10-16b

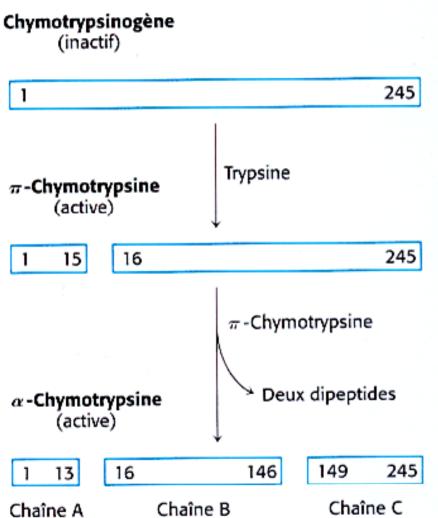
Biochemistry, Sixth Edition

© 2007 W. H. Freeman and Company

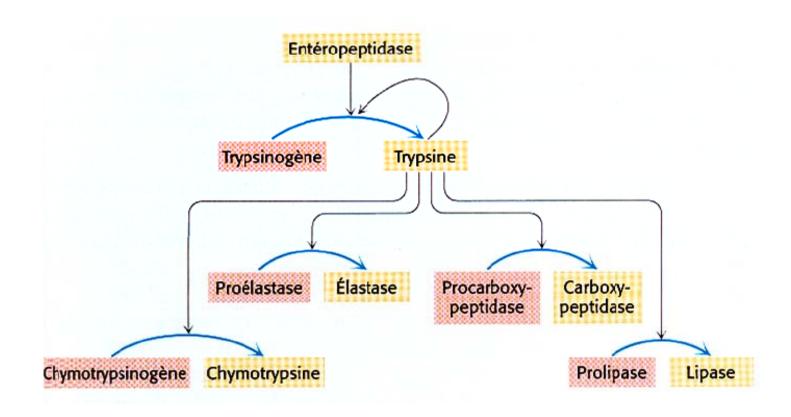
Régulation des enzymes

- □ Activation par protéolyse limitée
- ☐ Activation par fixation d'une protéine régulatrice
- ☐ Contrôle par modification covalente
 Phosphorylation / déphosphorylation
- ☐ Régulation allostérique
- **☐** Contrôle transcriptionnel





Activation en cascade des zymogènes.

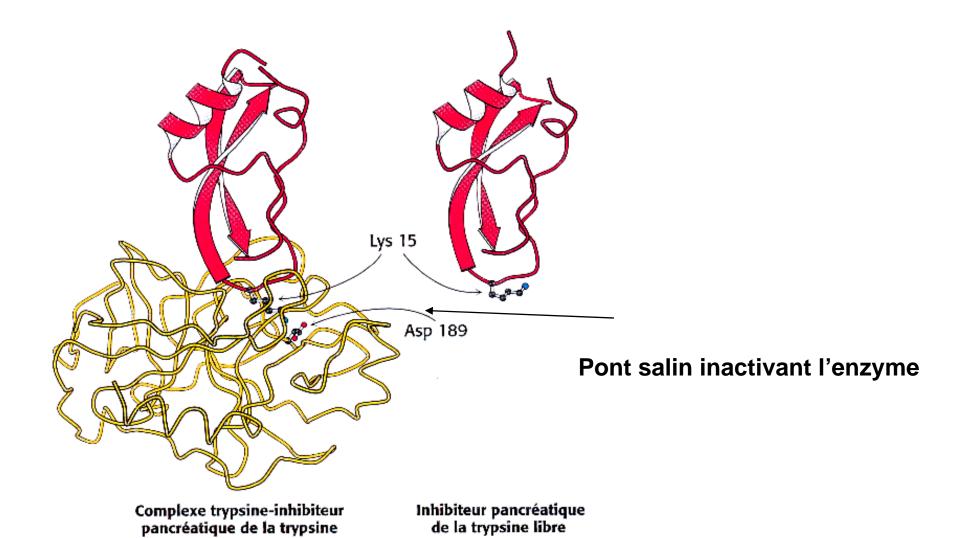


Contrôle de la suractivité de la trypsine par l'inhibiteur pancréatique

Régulation des enzymes

□ Activation par protéolyse limitée

- □ Activation par fixation d'une protéine régulatrice
- ☐ Contrôle par modification covalente
 Phosphorylation / déphosphorylation
- ☐ Régulation allostérique
- **☐** Contrôle transcriptionnel



α 1-antitrypsine (anti-elastase des neutrophiles)

Mutation type Z

homozygote: 15% d'inhibiteur résiduel: emphysème

hétérozygote : fumeur !!

Oxydation de la méthionine 358 en sulfoxide : absence de reconnaissance de l'elastase par l'inhibiteur

Action du comportement humain sur la biochimie!!

Régulation des enzymes

- □ Activation par protéolyse limitée
- ☐ Activation par fixation d'une protéine régulatrice
- ☐ Contrôle par modification covalente
 Phosphorylation / déphosphorylation
- ☐ Régulation allostérique
- **☐** Contrôle transcriptionnel

Modifications covalentes courantes

Modification	Donneur	Exemple	Fonction
phosphorylation	ATP	Glycogène phosphorylase	Homéostasie glucose
Acétylation	Acetyl-CoA	Histones	Transcription
Myristilation	Myristil-CoA	Src	Transduction signal
γ-carboxylation	HCO ₃ -	thrombine	coagulation
ubiquitination	ubiquitine	Cycline autres	Cycle cellulaire Présentation antigène

Phosphorylation : moyen très courant de réguler l'activité d'enzymes

550 protéines kinases chez l'homme

Transfert groupe phosphoryle en γ de l'ATP sur OH sérine, thréonine, tyrosine.

2 charges négatives ajoutées

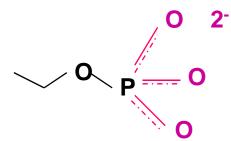
3 liaisons hydrogènes

Apport de 24kJ/mol à la protéine phosphorylée : modification de la constante d'équilibre

Rapide et stable

Amplification

Substrat courant : ATP : énergie dans la cellule



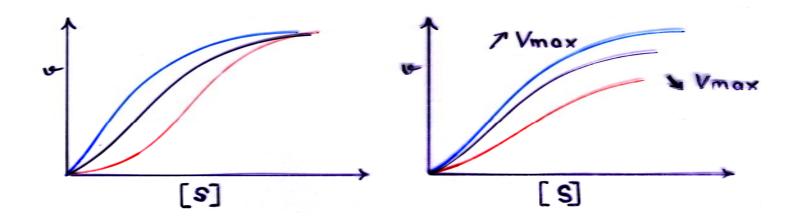
Régulation des enzymes

- □ Activation par protéolyse limitée
- ☐ Activation par fixation d'une protéine régulatrice
- ☐ Contrôle par modification covalente
 Phosphorylation / déphosphorylation
- ☐ Régulation allostérique
- **☐** Contrôle transcriptionnel

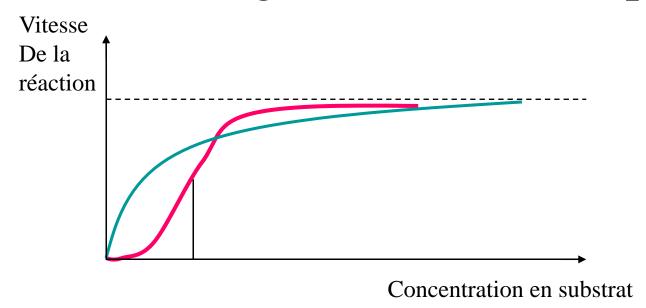
ENZYMES ALLOSTERIQUES

Existence d'un site autre que le site catalytique (allos). Cet autre site peut fixer un ligand allostérique de façon réversible

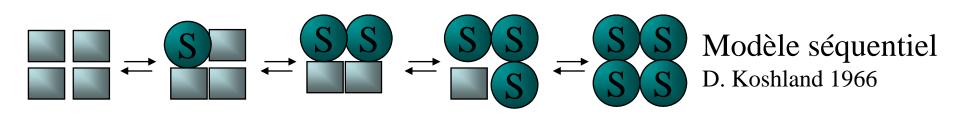
- 1. Structure quaternaire
- 2. Comportement non michaélien
- 3. Changement conformationnel sans perte d'activité
- 4. Fonction régulatrice dans le métabolisme
- 5. 2 Classes de systèmes allostériques Système K Système V

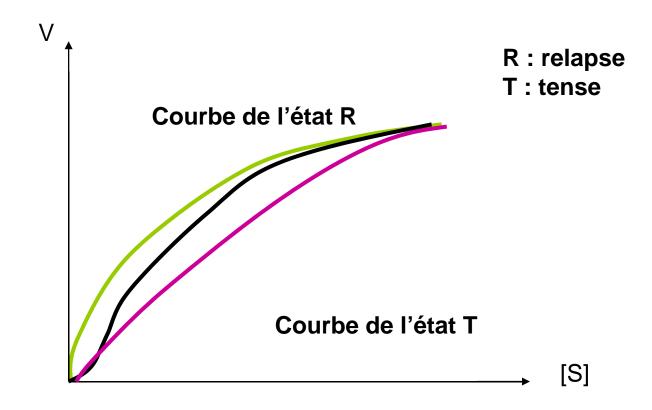


Régulation allostérique









Enzyme allostérique « système K » = mélange de 2 enzymes type M et M

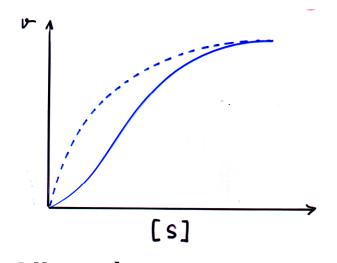
État T : forte valeur du K_M Etat R : faible valeur du K_M

La fixation du substrat favorise la transition vers l'état R

La fixation de régulateurs favorise un état plutôt qu'un autre

LA CINETIQUE ALLOSTERIQUE

« cinétique coopérative »



$$V = \frac{Vmax}{\frac{Km}{[S]^n}}$$

n > 1

- Oligomères
 chaque s/s unité possède un site actif
 s/s unité = protomère (ou monomère)
- Les protomères interagissent enzyme allostérique = coopératif
- Courbe sigmoide
 à faible concentration de S la proportion de forme
 active de E est faible. Elle augmente quand S
- La coopérativité peut être détruite par une légère dénaturation = désensibilisation

Exemple : Régulation des réserves en glucides

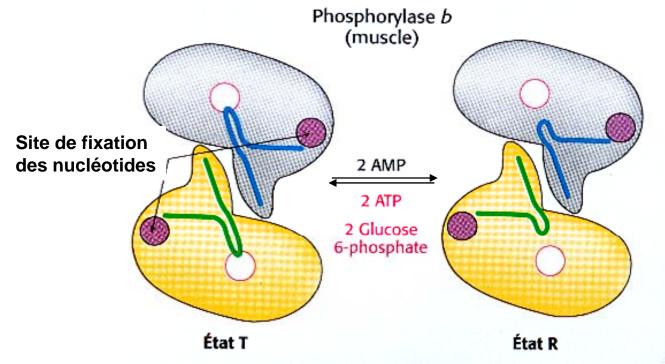
- Le glucose, principale source d'énergie dans la cellule
- Stocké dans différents types de cellules
 - Foie, Muscle
- Stockage sous forme polymérisée : le glycogène (équivalent de l'amidon des féculents)

glycogène phosphorylase glucose

Régulation de l'activité de la phosphorylase : en fonction des besoins de la cellule, des organes, ou de l'organisme

- Point d'impact de la régulation du métabolisme du glycogène
- Effecteurs allostériques : état énergétique de la cellule
- Mod. Post-traductionnelle : phosphorylation / (Adrenaline,glucagon : état énergétique de l'organisme)
- Muscle : utilise l'énergie pour lui-même
- Foie : maintient de l'homéostasie du glucose pour l'organisme

Phosphorylase a Phosphorylase b Site actif 2 ATP 2 ADP État R Phosphorylation sérine 14 par phosphorylase kinase Boucle au niveau du site actif 2 ATP 2 ADP État T



Muscle au repos : majorité de phosphorylase « b » : inactive

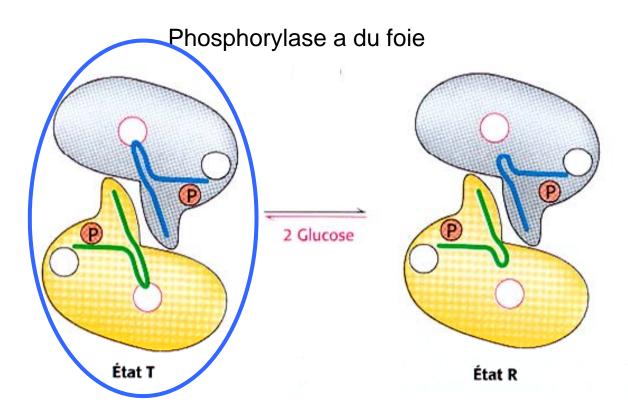
Début d'exercice : AMP : activation de la forme « b »

Prolongation : libération adrenaline : généralisation de la forme « a » pleinement active

Excés de glucose 6-phosphate : retour à la forme T

Régulation de la phosphorylase musculaire : objectif : fournir du G 6-P au muscle au cours de l'effort

La phosphorylase du foie est régulée pour le maintient de la glycémie



90 % de similarité de séquence avec la phosphorylase musculaire Forme a sensible à la transition entre état R et état T Transition vers T par fixation de glucose Insensible à l'AMP, hépatocytes peu soumis aux variations de charge énergétique Intérêt des isoenzymes

Régulation des enzymes

□ Activation par protéolyse limitée

- ☐ Activation par fixation d'une protéine régulatrice
- ☐ Contrôle par modification covalente
 Phosphorylation / déphosphorylation
- ☐ Régulation allostérique
- **☐** Contrôle transcriptionnel

Les Enzymes : plan du cours

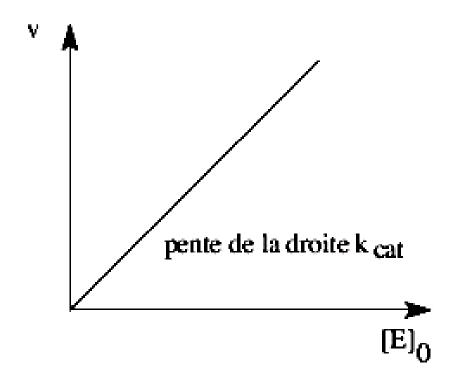
Enzymes, principes
Cinétique chimique
Cinétique enzymatique
Eléments de Catalyse enzymatique
Régulation des enzymes et du
métabolisme

Les enzymes marqueurs de pathologie

Activité enzymatique

$$[S] \gg Km$$
 $V = V_{max} = k_{cat}[Et]$

La vitesse mesurée est la vitesse maximum et elle est proportionnelle à la concentration totale d'enzyme. C'est donc la méthode qui peut être utilisée pour doser la concentration et par suite la quantité d'enzyme présente dans la solution.



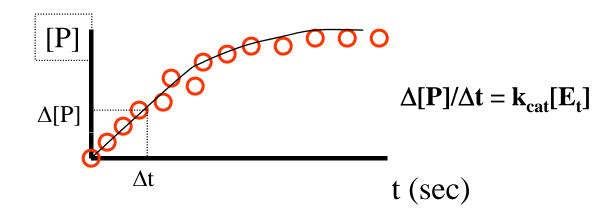
Activité enzymatique 2

Cette unité a été définie pour estimer la quantité de l'activité catalytique d'une préparation ou d'un échantillon biologique

1 unité enzymatique (U.I. ou U.E.) = quantité d'enzyme qui produit la transformation d'une micromole de substrat par minute à 25°C (μmole min⁻¹)

Dans les conditions ou [S]>> [E] et [S]>> Km l'activité permet de doser les quantités d'enzyme présentes dans les échantillons.

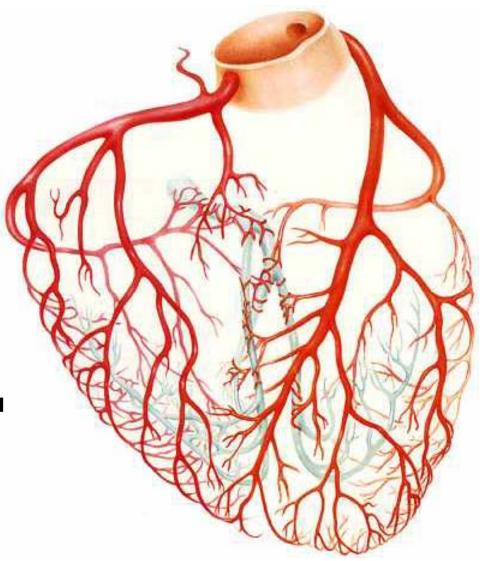
Rem : Dans le système international l'unité officielle est le katal (kat) : q. d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 mole de substrat par sec. Biochimistes : $1U.I = 0,0166 \mu kat$.

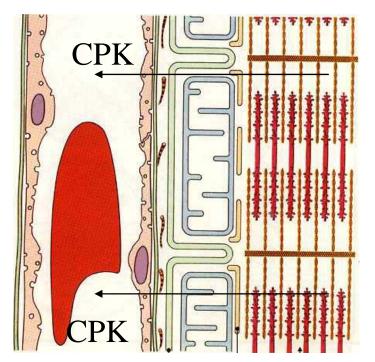


Activité enzymatique : exemple en pratique m

La définition OMS de l'infarctus de Septembre 2000 repose sur:

- a. Critère principal
 - •Une élévation suivie d'une décroissance de la créatine phosphokinase (CK-MB) ou de la troponine.
- b. Critères associés :
 - •Une douleur thoracique ou une modification du tracé ECG évocatrice de nécrose.

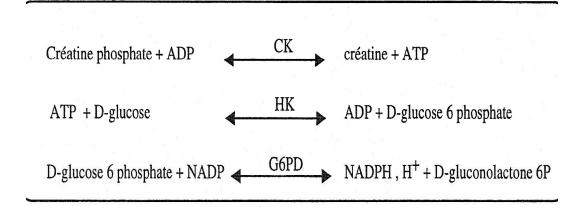




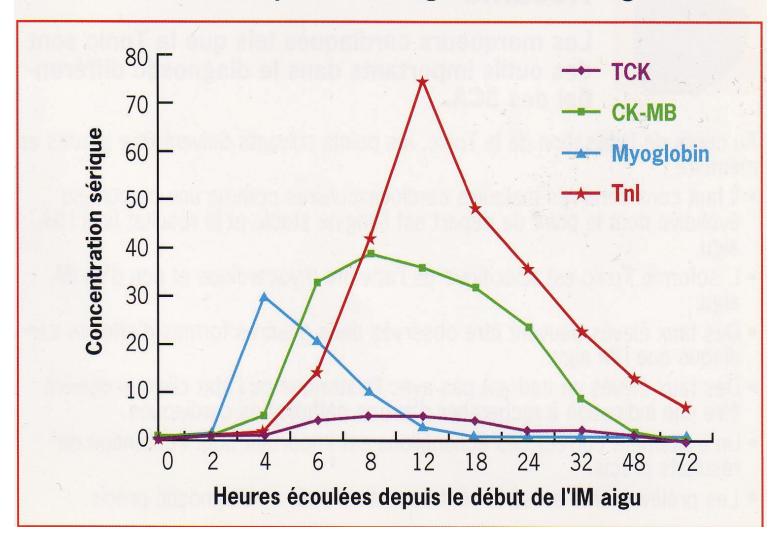
Lésions nécrotiques : libération d'enzyme de l'intérieur des cellules vers le sang

Technique de dosage

Technique classique : mesure de l'ATP avec une enzyme auxiliaire : l'hexokinase et une enzyme indicatrice la G6PDH



Apparition des marqueurs cardiaques après le début des douleurs de poitrine - Diagnostic de l'IM aigu



Les Enzymes : les points clés

- Protéines capables d'interagir spécifiquement avec un type de molécule
- Stabilisation état de transition et diminution de l'énergie d'activation
- Cinétique Michaelienne, ni d'ordre 1 ni d'ordre 0
- Les inhibiteurs enzymatiques
- Régulation des enzymes par 5 modes principaux
 - Protéolyse, protéines inhibitrices, modifications covalentes, allostérie, contrôle de l'expression des gènes
- L'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration en enzyme : utilisation clinique en dépistage de lésion d'organe











Mentions légales

L'ensemble de ce document relève des législations française et internationale sur le droit d'auteur et la propriété intellectuelle. Tous les droits de reproduction de tout ou partie sont réservés pour les textes ainsi que pour l'ensemble des documents iconographiques, photographiques, vidéos et sonores.

Ce document est interdit à la vente ou à la location. Sa diffusion, duplication, mise à disposition du public (sous quelque forme ou support que ce soit), mise en réseau, partielles ou totales, sont strictement réservées à l'université Joseph Fourier de Grenoble.

L'utilisation de ce document est strictement réservée à l'usage privé des étudiants inscrits en 1ère année de Médecine ou de Pharmacie de l'Université Joseph Fourier de Grenoble, et non destinée à une utilisation collective, gratuite ou payante.