

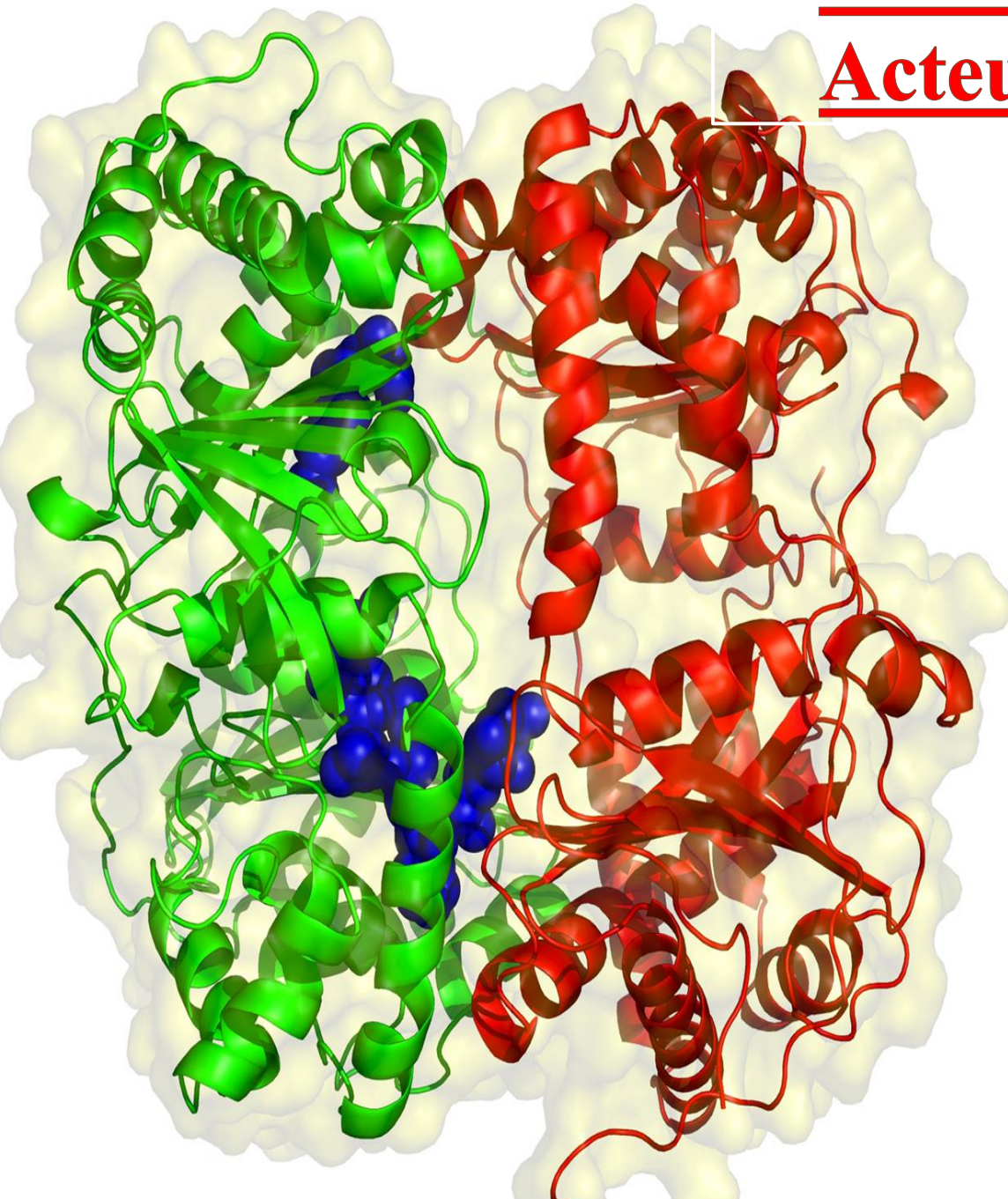
ENZYMOLOGIE

DOCTEUR DJENANE NADIA Née BENZIDANE

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

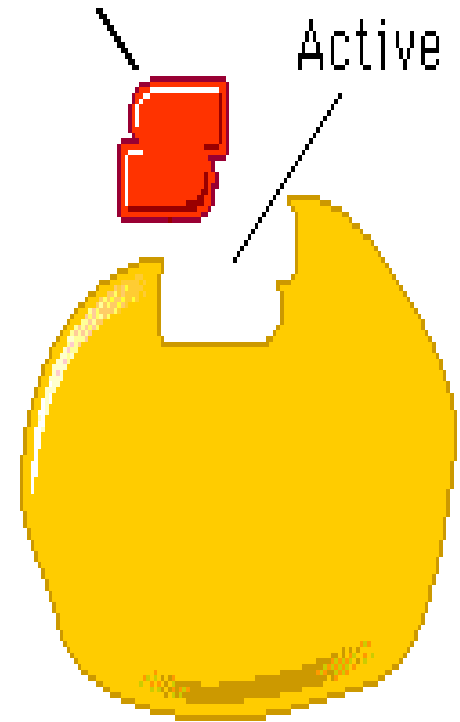
Les enzymes

Acteurs de métabolisme



Substrate

Active site



Schematic model
of an enzyme

Introduction

Les organismes vivants sont le siège d'innombrables réactions biochimiques.

Ces réactions constituent le métabolisme c'est à dire la biosynthèse ou anabolisme et dégradation ou le catabolisme d'un grand nombre de molécules biologiques.

Ces réactions se déroulent dans des conditions physiologiques (pH:7,4 et température: 37°C) grâce à la présence de catalyseurs: enzymes

Sans la présence des enzymes, la vie serait impossible

Les enzymes ont donc un rôle vital

Le métabolisme

- Correspond à l'ensemble des réactions biochimiques d'un organisme.
- Son rôle est de gérer les ressources énergétiques et matérielles de la cellule, et donc de l'organisme.

Les voies métaboliques

1. Voies cataboliques

→ libèrent de l'énergie

Molécules complexes → Molécules simples + Énergie

2. Voies anaboliques

→ consomment de l'énergie

Molécules simples + Énergie → Molécules complexes

ENZYMOLOGIE?

L'enzymologie est la partie de la biochimie qui étudie les propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes.

Elle s'intéresse aussi à décrire la vitesse des réactions catalysées par les enzymes (cinétique enzymatique).

Historique:

1730: La digestion est un phénomène plus chimique que mécanique

1850: Pasteur démontra que la fermentation du sucre en alcool par la levure est catalysée par une substance qui existe dans la levure

Enzyme : **en** = dans, **zyme**: levure

1897: Buchner a extrait de la levure les premières enzymes

1929: La 1ère enzyme purifiée et cristallisée est l'uréase

Urée $\xrightarrow{\text{uréase}}$ $\text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$

Depuis, plus de 3000 enzymes sont décrites

Définition d'une enzyme :

Biomolécule de nature **protéine** (cas particulier: les ribozymes ARN catalytiques) ayant un pouvoir **catalytique** élevé et douée de **spécificité**.



Protéines globulaires de poids moléculaire élevé .
Existence de protéines enzymatiques de structures tertiaires,
D'autres de structures quaternaires.
Dans tous les cas grande importance de la structure spatiale Native (notion de site actif).

Biomolécule de nature **protéique** ayant un pouvoir **catalytique** élevé et douée de **spécificité** et peut être **régulée**.

Notion du catalyseur :

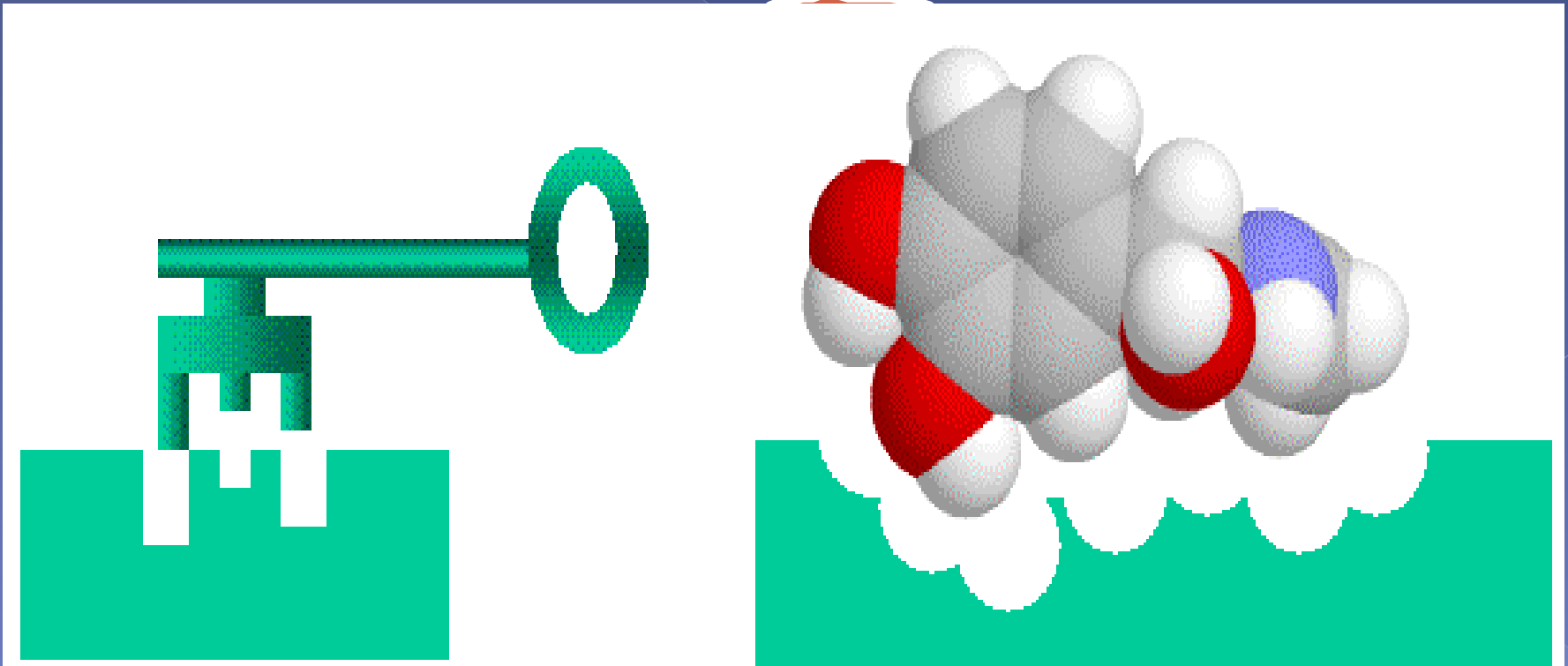
- 1. Il augmente la vitesse de la réaction** (jusqu'à plusieurs millions de fois)
- 2. Il ne modifie pas l'état final d'équilibre de la réaction** ($K_{eq} \text{ sans Enz} = K_{eq} \text{ avec Enz}$)
- 3. Il n'est pas modifié lors de la réaction** (on le retrouve intacte à la fin de réaction)
- 4. Il agit à des concentrations très faibles**

PROPRIÉTÉS ET CARACTÉRISTIQUES DES ENZYMES

- Spécificité réactionnelle : chaque enzyme ne catalyse qu'une seule réaction (ou un groupe de réactions du même type).
- Spécificité de substrat : « reconnaissance » du substrat par l'architecture spatiale de l'enzyme.

La Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme.

Toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement modifiées sont appelées substrats.



Produit

Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme.

La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation est appelée produit.

Ligand

Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une enzyme

Toutes les molécules ayant une liaison spécifique avec une protéine sont appelées ligands.

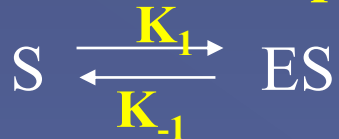
Pour chaque ligand, il existe au moins un site de fixation sur la protéine qui le reçoit.

Mécanisme général d'une enzyme

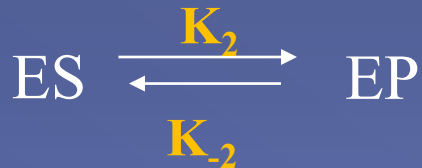


Une enzyme (E) transforme un substrat (S) en produit (P).

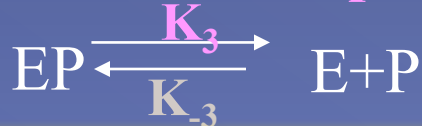
-Première étape: Le substrat se fixe sur l'enzyme



-La deuxième étape: la catalyse . Le substrat est transformé en produit



-Troisième étape: Le produit est relâché



Si il y a plusieurs substrats. La réaction se fera étape par étape (et non simultanément) pour être efficace et à travers un site désigné actif.

Le site actif est une cavité composée d'un ensemble d'AA qui entrent en contact avec le Substrat

Le complexe enzyme substrat

SUBSTRAT

Liaisons faibles

Sites catalytiques

Liaisons faibles

Sites de reconnaissance, fixent le substrat

Sites de reconnaissance fixent le substrat

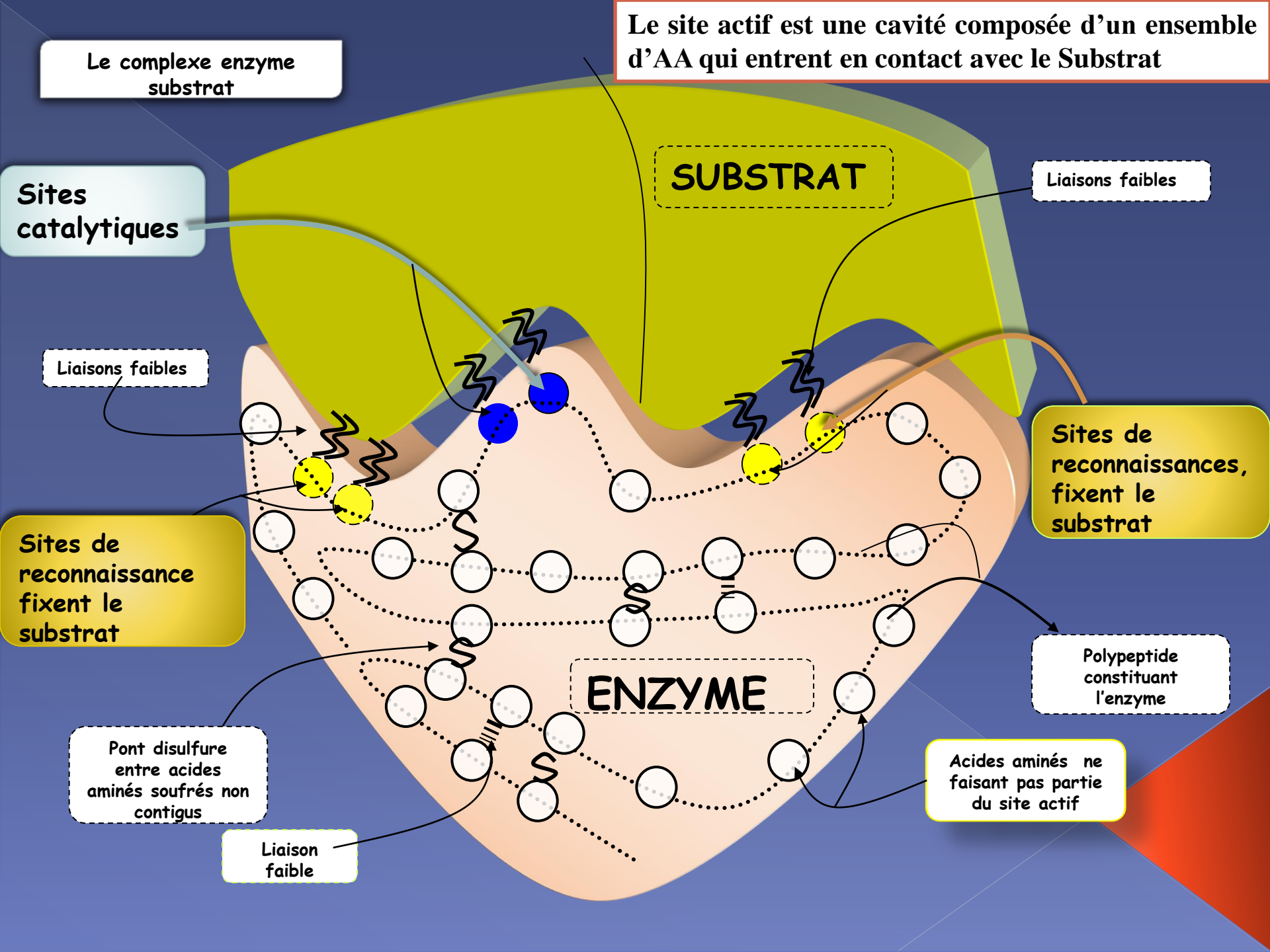
Polypeptide constituant l'enzyme

Pont disulfure entre acides aminés sulfurés non contigus

Acides aminés ne faisant pas partie du site actif

Liaison faible

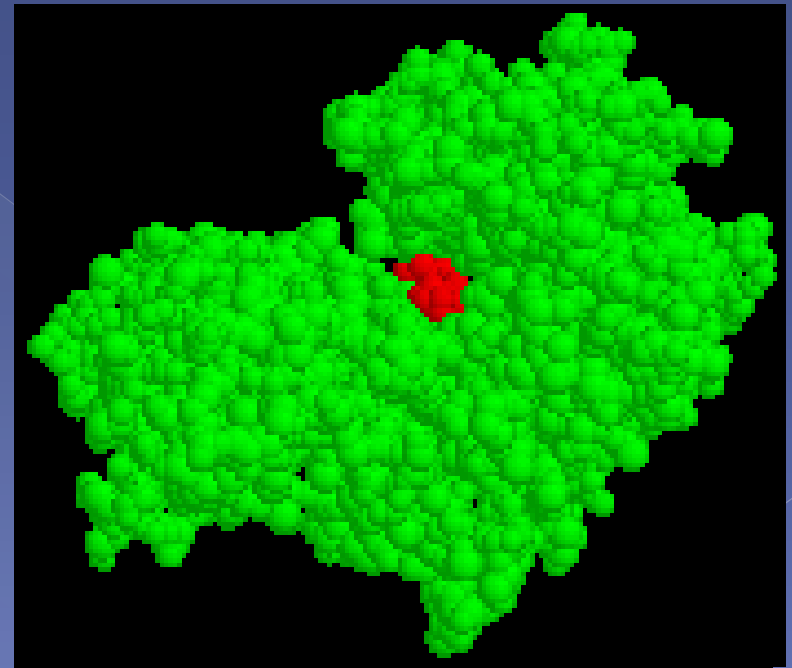
ENZYME



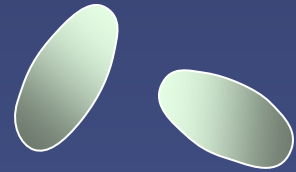
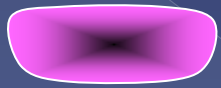
Site actif est une poche profonde enfoui

Il s'agit d'une poche magique

Au lieu de cela, le site actif de l'enzyme reconnaît également le substrat, mais fait de manière Complémentaire et pour Correspondre à l'état de transition et le stabiliser.

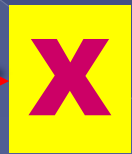
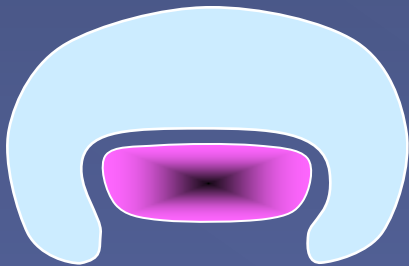


Substrat

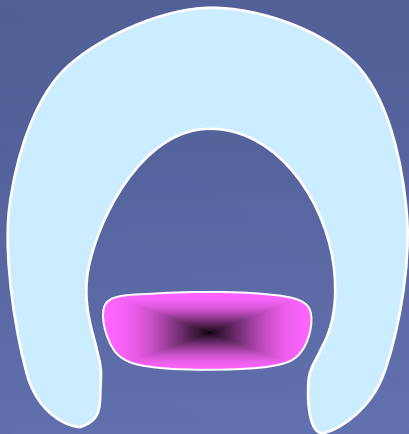


L'état de transition

Produit



Si l'enzyme se lie seulement au substrat alors il n'y aura aucune autre réaction



L' Enzyme ne reconnaît pas seulement le substrat, mais induit également la formation de l'état de transition

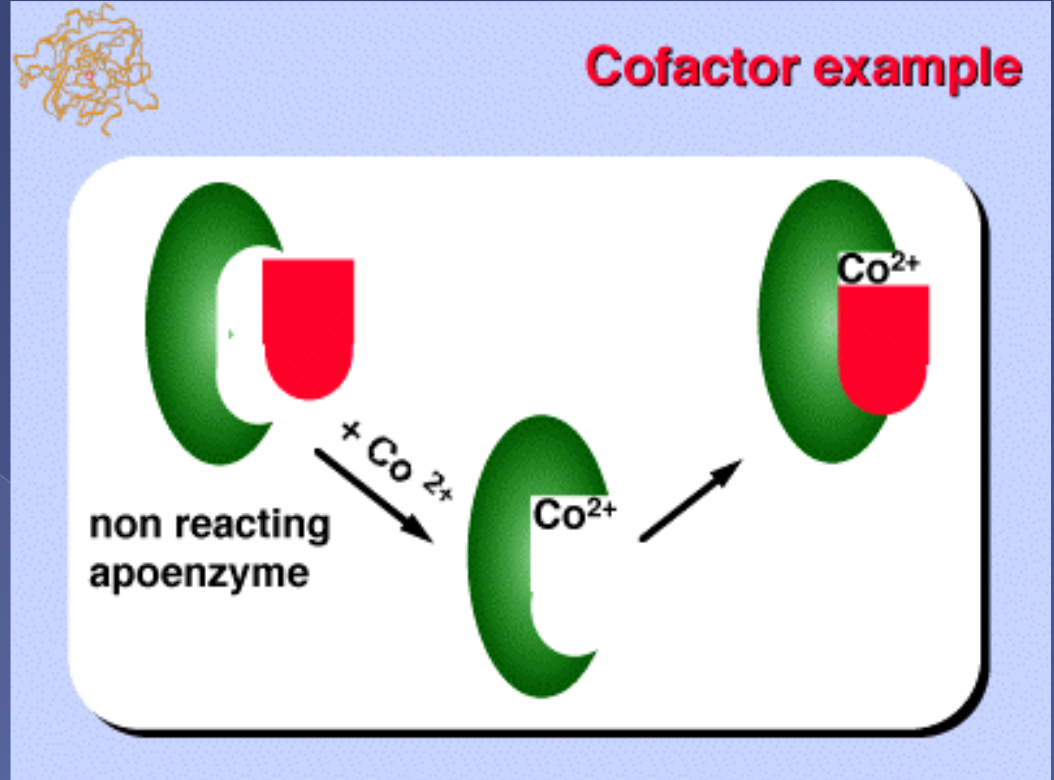
Structure des enzymes

- Enzymes entièrement protéiques = holoprotéines
 - Enzymes formées de deux parties = hétéroprotéines
- Une partie protéique: apoenzyme
- Une partie non protéique: cofacteur ou coenzyme
- holoenzyme = apoenzyme + cofacteur (ion métallique
 - coenzyme, groupement prosthétique)

Apoenzyme: intervient dans la spécificité, thermolabile
Cofacteur: effectue la réaction chimique, thermostable

Cofacteurs

de nature inorganique: les ions métalliques telles que Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ... ; sont parfois nécessaires à l'activité enzymatique dans la structure tridimensionnelle de l'enzyme



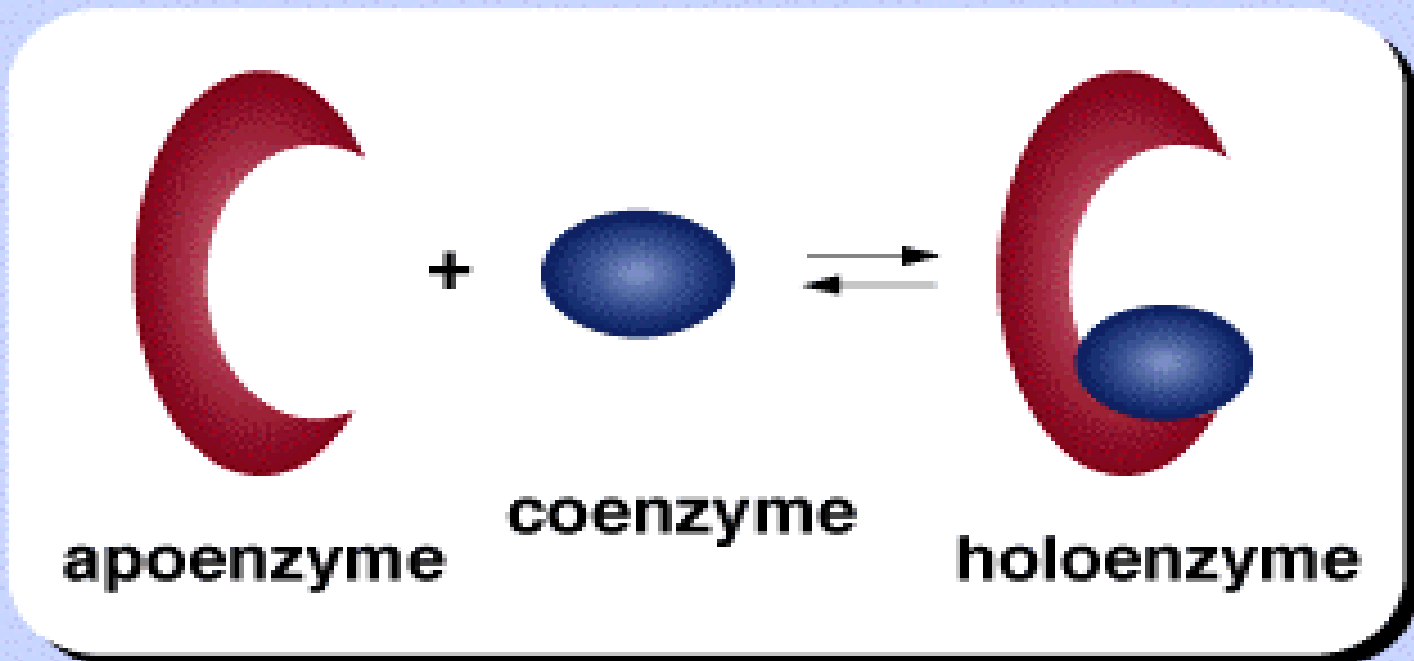
On appelle un groupement prosthétique le cofacteur qui est fortement lié à l'enzyme (parfois avec une liaison covalente).

Lorsque la liaison est faible on parle de cosubstrat

Les coenzymes

Les **coenzymes** sont des molécules organiques qui sont indispensables à la réaction permettant soit le transport du substrat, soit en participant à la structure de l'enzyme.

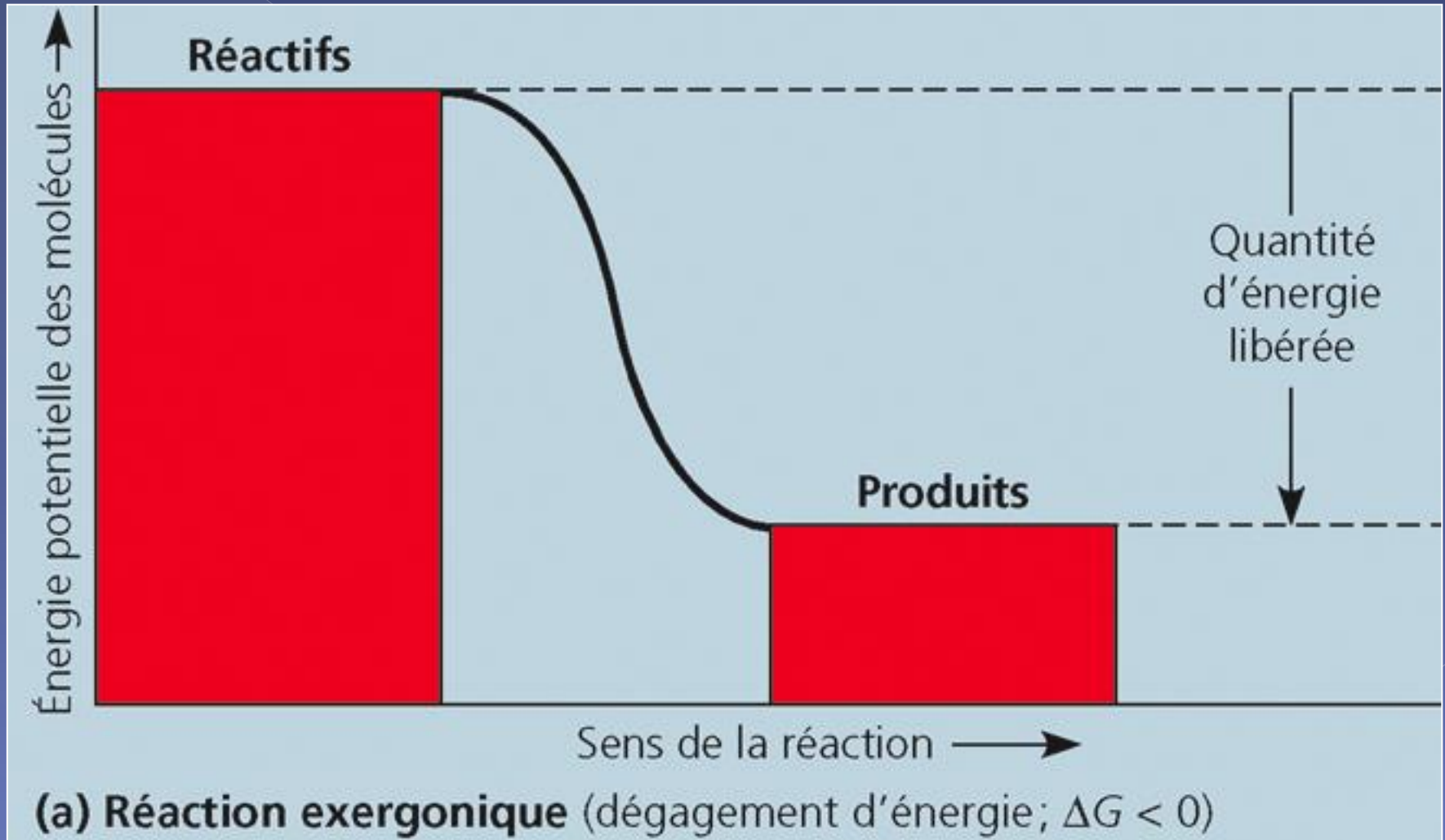
- Dérivent en général de vitamines



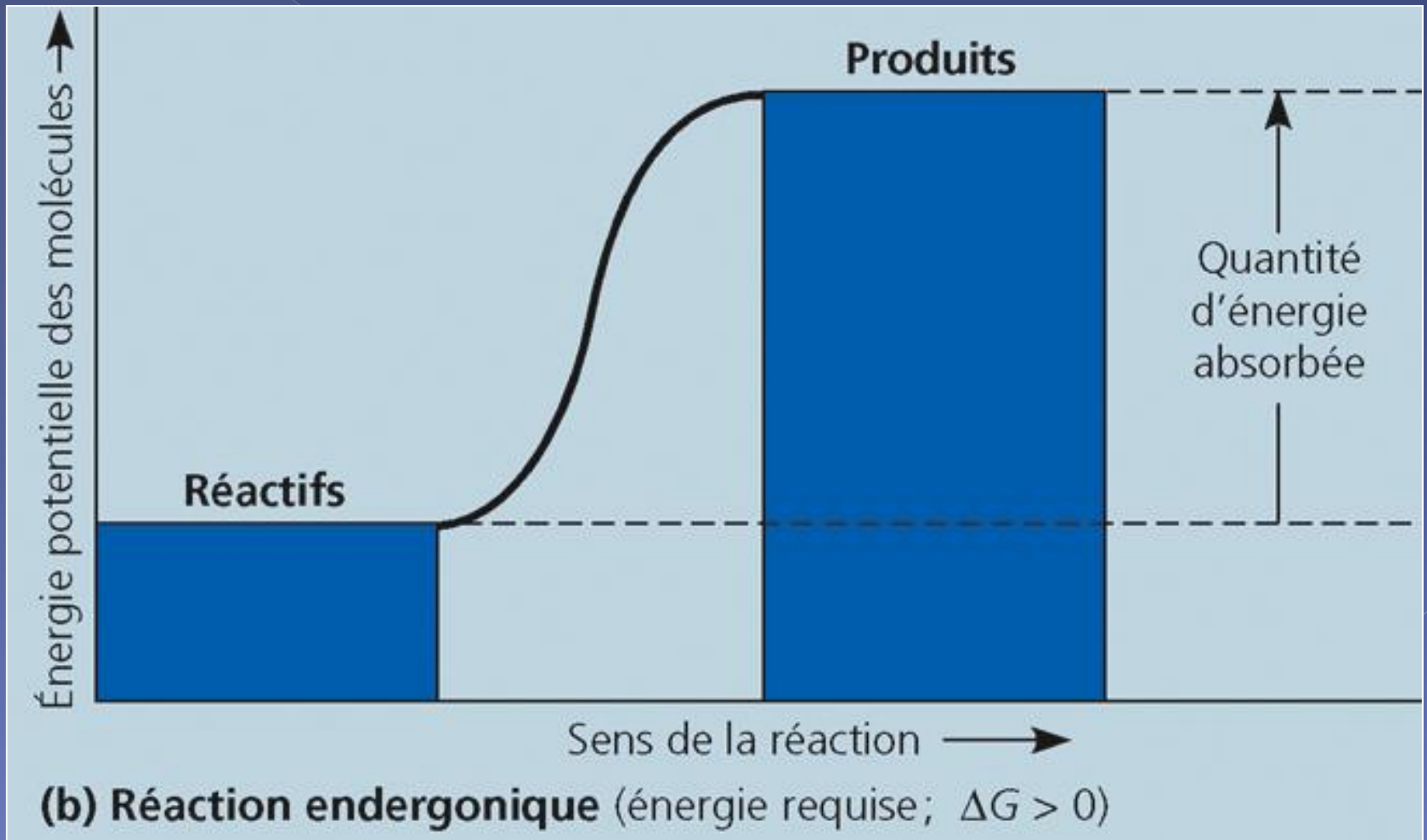
1. Réactions exergoniques
→ dégagent de l'énergie libre

2. Réactions endergoniques
→ nécessitent de l'énergie libre de son environnement

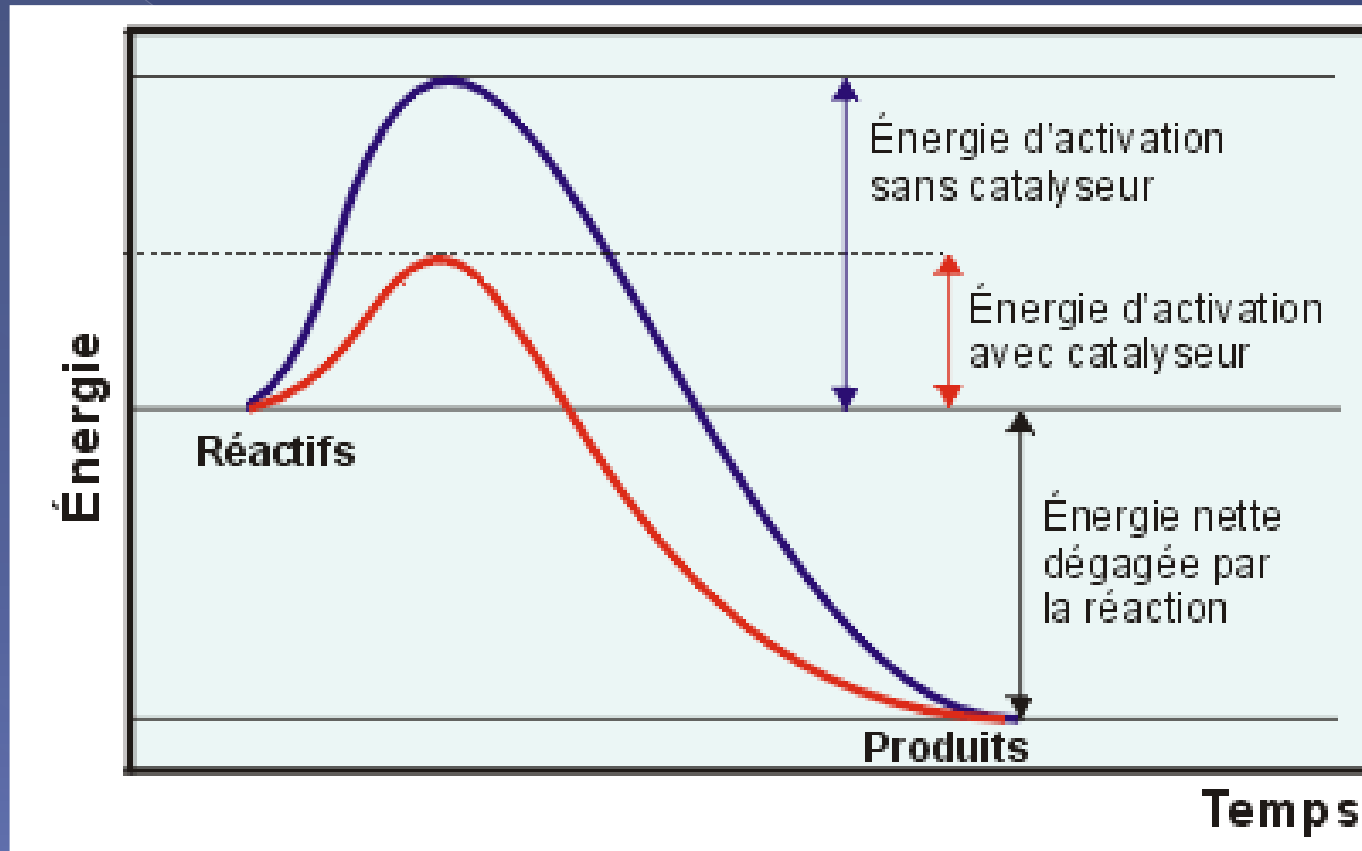
Réactions exergoniques



Réactions endergoniques



La plupart du temps, une enzyme agit comme un catalyseur



Elle abaisse l'énergie d'activation nécessaire pour déclencher une réaction.

NOMENCLATURE ET CLASSIFICATION DES ENZYMES

Avant 1961: les enzymes ont été dénommées selon le nom du S sur lequel elles agissent en ajoutant le suffixe "ase"

Exemple:	<u>Substrat</u>	<u>Enzyme</u>
	amidon	amylase
	urée	uréase

1961 l'union internationale de biochimie (UIB) : nouvelle classification des enzymes selon le type de réaction catalysée
6 classes d'enzymes

- Identification des enzymes par 4 chiffres précédés de EC

1er chiffre : classe de l'enzyme (type de réaction catalysée)

2ème chiffre : sous-classe (mécanisme de réaction)

3ème chiffre : nature des molécules impliquées

4ème chiffre : numéro d'ordre de l'enzyme

1 - Oxydoréductase

2 - Transférase

3- Hydrolase

4- Lyase

5- Isomérase

6- Ligase

7- Translocase

Classe 1. Les oxydoréductases

Ce sont des enzymes qui catalysent des réactions d'oxydation ou de réduction. Existence de plusieurs sous-groupes (déshydrogénase, oxydase, peroxydase, hydroxylase et catalase)

Nécessitent un coenzyme (NAD, NADP, FAD ou FMN)



Hydroxylases:(=monooxygénases) catalysent la fixation d'un atome d'oxygène



Déshydrogénases:



par lactate déshydrogénase

Les Cytochromes: ont un coenzyme héminique avec un ion, qui présente 2 états d'oxydation, ce qui en fait un transporteur d'électrons.



Classe 2. Les transférases

Ces enzymes qui transfèrent un groupement X (autre que H) d'un substrat A sur un substrat B :



les transaminases: transfèrent les radicaux aminés $-NH_2$ d'un AA à un acide cétonique accepteur. Le coenzyme est le phosphate de pyridoxal.

Les phosphokinases ou kinases: transfèrent un P sur une molécule d'ADP. L'ion Mg^{++} est indispensable.

Ex : EC 2.7.1.2 Glucokinase (= ATP:D-glucose 6-phosphotransférase)



Les transacétylases: transfèrent les radicaux acétyles ($-CH_2COOH$), le coenzyme est CoA

Les transméthylases: transfèrent les radicaux méthyles ($-CH_3$), d'une molécule à une autre, le coenzyme est l'acide tétrahydrofolique.

Classe 3. Les hydrolases

Ces enzymes qui hydrolysent (par addition d'une molécule d'eau) différentes liaisons chimiques.

Exemples : les phosphatases, les peptidases (ex: carboxypeptidases, aminopeptidases), les protéinases (ex : pepsine, trypsine..)

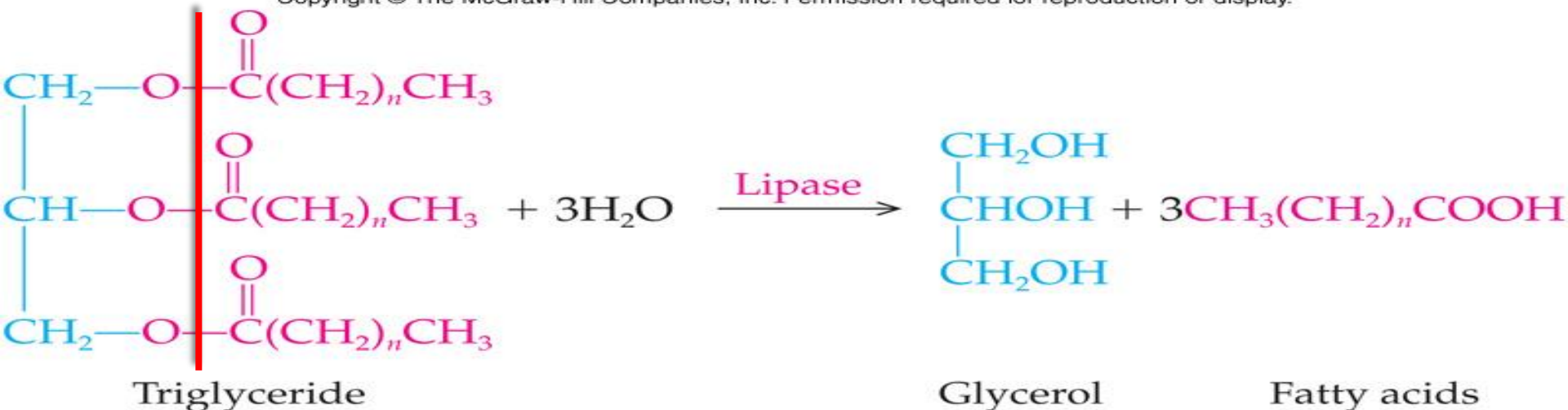


Les estérases: hydrolysent les esters en acides gras et en alcool

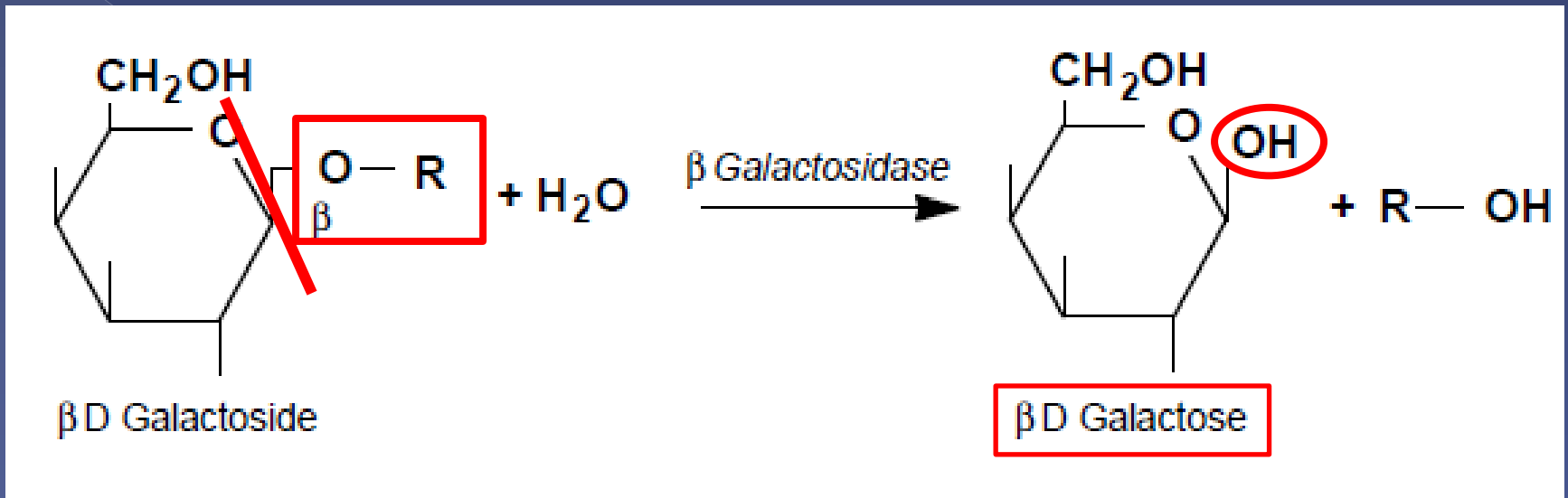


Les lipases : hydrolysent les glycérides en glycérol et en acides gras

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Les osidases: hydrolysent les osides exp. glucosidase, galactosidase



Les enzymes protéolytiques: hydrolysent les liaisons peptidiques





La saccharase est une enzyme capable de catalyser la réaction d'hydrolyse d'un **substrat**, le **saccharose**, en **produits** simples, le **glucose (G)** et le **fructose (F)**



Le **saccharose** est un **diholoside** constitué d'une molécule de **glucose (G)** liée à une molécule de **fructose (F)** par une **liaison osidique**





La saccharase peut-elle hydrolyser n'importe quel diholoside comme le maltose ?



Le **maltose** est un **diholoside** constitué de deux molécules de glucose unies par une **liaison osidique**



Classe 4. Les lyases

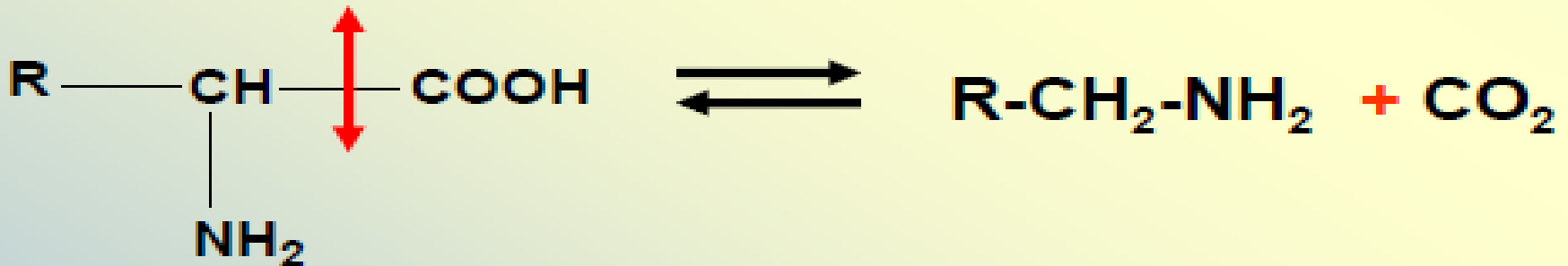
Ce sont des enzymes qui détachent certains groupements par d'autres mécanismes que l'hydrolyse ou forment de nouvelles liaisons indépendamment hydrolyse ATP exemple : les décarboxylases



Les décarboxylases d'acide cétonique:



Les décarboxylases d'acide aminé :



Classe 5 . Les isomérases ou mutases

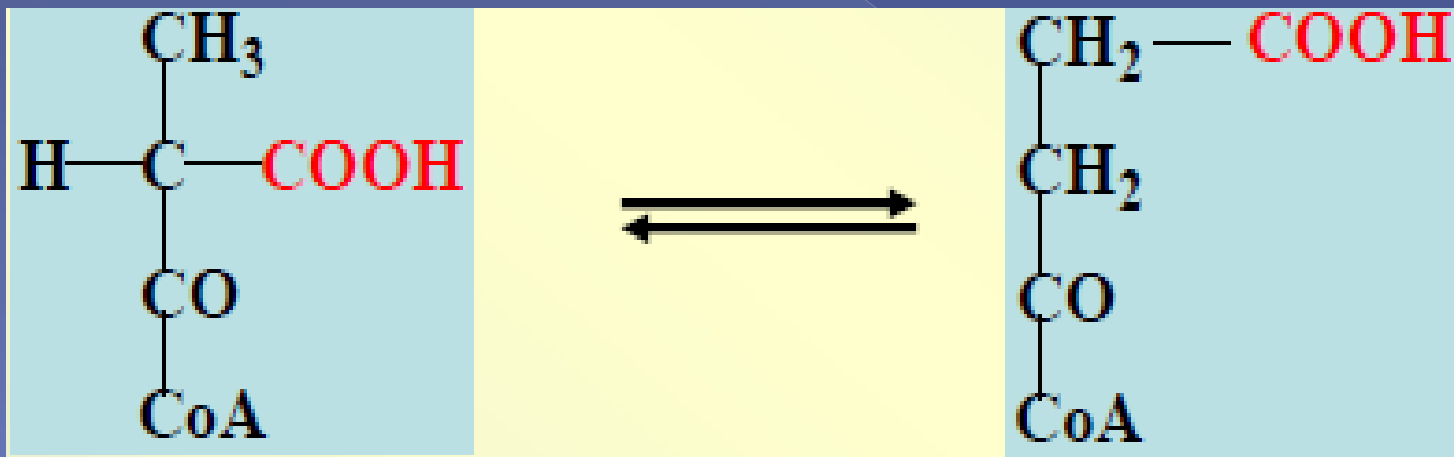
Elles permettent le transfert d'atomes ou de groupements dans une même molécule.



Les épimérases: provoquent les interconversions des oses

Galactose \rightleftharpoons Glucose

Les mutases: catalysent le transfert d'un radical d'une partie d'une molécule à une autre



Methyl malonyl CoA

Succinyl CoA

Classe 6. Les ligases ou synthétases



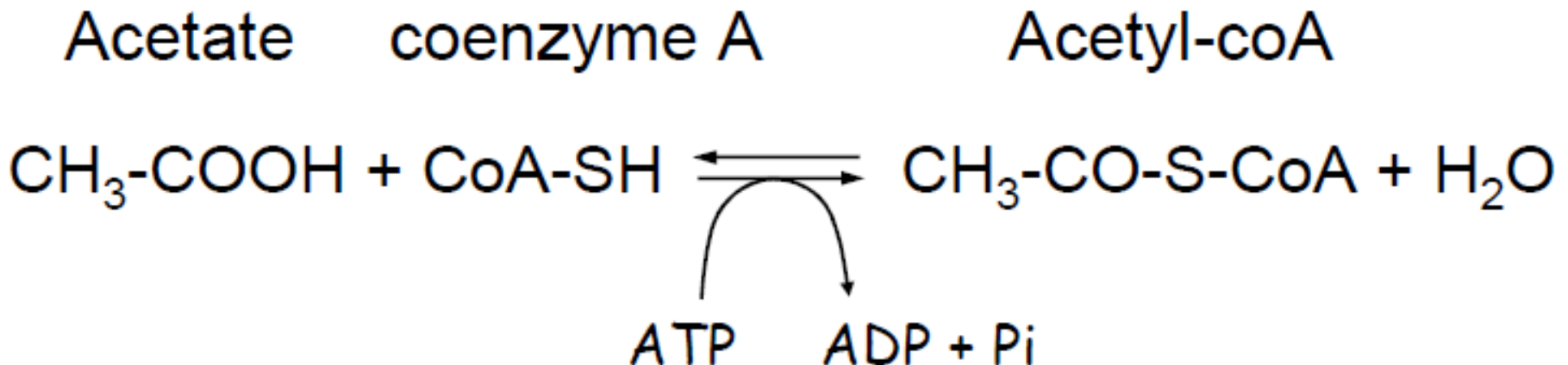
enzymes qui participent aux réactions de synthèse entre :

C-O : les aminoacyl-ARNt synthétases

C-S : acétyl CoA synthétase

C-N : amide synthétase comme la glutamine synthétase

C-C : carboxylase à biotine comme la pyruvate carboxylase qui catalyse la formation d'oxalo-acétate à partir du pyruvate + CO₂ + ATP.



Class7, les translocases

C'est la petite dernière des classes, apparue très récemment, en aout 2018 à ma connaissance ... Les translocases catalysent le transfert d'ions ou de molécules depuis la face "1" vers la face "2" d'une membrane. Une translocase fameuse est l'ATP synthase, de nomenclature la plus officielle H⁺-transporting two-sector ATPase, **EC 7.1.2.2**. Une autre célébrissime, le complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale qui transloque des protons en couplage à une réaction redox, l'oxydation du NADH et la réduction de l'ubiquinone ; nom le plus systématique = NADH: ubiquinone reductase (H⁺-translocating), **EC 7.1.1.2**.

Les sous-classes des transférases désignent les types de composants transférés et les sous-sous-classes indiquent les processus de réaction qui fournissent la force motrice pour la translocation:

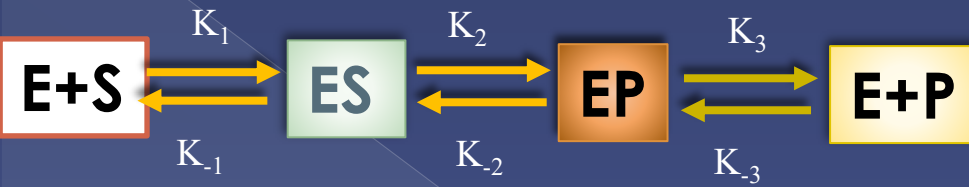
- EC 7.1 - catalyser la translocation des ions H^+ .
- EC 7.2 - catalyser la translocation des cations inorganiques.
- EC 7.3 - catalyser la translocation des anions inorganiques et de leurs chélates.
- EC 7.4 - catalyser la translocation des acides aminés et des peptides.
- EC 7.5 - catalyser la translocation des glucides et de leurs dérivés.
- EC 7.6 - catalyser la translocation d'autres

La cinétique enzymatique

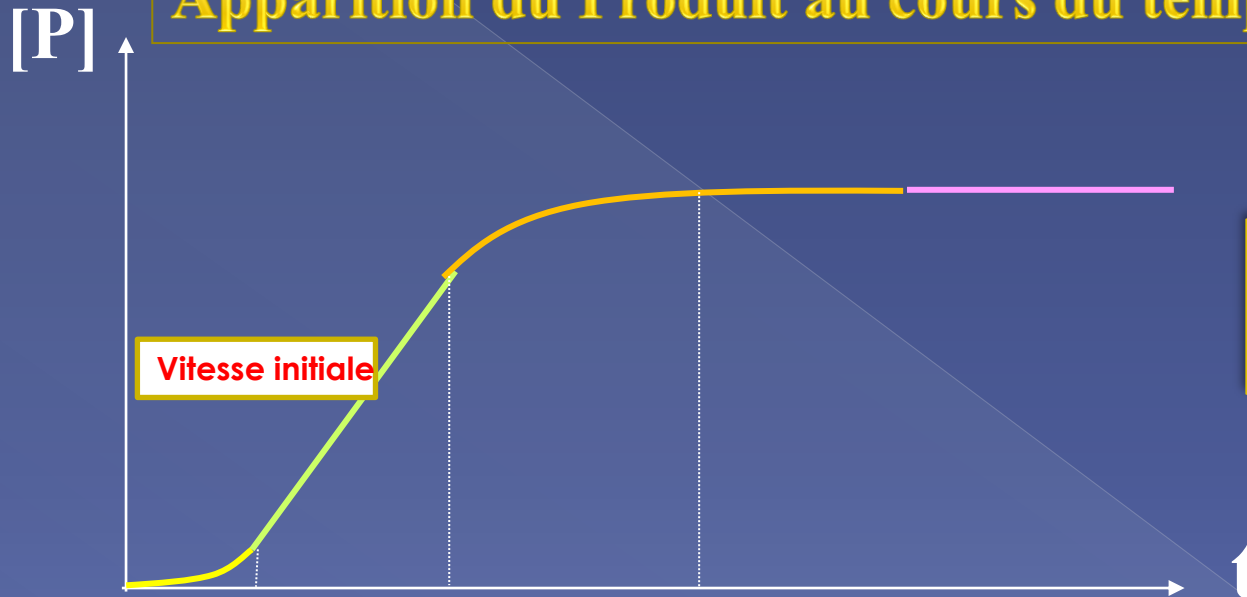
la cinétique enzymatique, c'est l'étude des variations des vitesses de la réaction en fonction de la concentration du substrat

- A quoi ça sert ?
- Elle permet de déterminer :
 - **Modélisation de l'activité enzymatique**
 - **Équation de la vitesse**
 - **Paramètres cinétiques et leurs significations**
 - **Etudes en présence d'inhibiteurs, conditions optimales...**

Cinétique d'une enzyme au cours du temps



Apparition du Produit au cours du temps



La vitesse peut être mesurée avec l'apparition du produit: $v = dP/dt$

<p>Phase préstationnaire</p> <p>$[\text{ES}]$</p> <p>L'enzyme se charge</p>	<p>Phase stationnaire</p> <p>$[\text{S}] \gg [\text{E}]$</p> <p>La vitesse est constante.</p>	<p>Effet du produit</p> <p>$[\text{EP}] \nearrow$</p> <p>Le produit qui s'accumule ralentit la réaction</p> <p>Plus il y a de substrat, plus l'enzyme est rapide.</p> <p>C'est la loi d'action de masse.</p>	<p>équilibre</p> <p>$[\text{ES}] \rightleftharpoons [\text{EP}]$</p> <p>La concentration du produit reste constante</p>
--	--	--	--

En enzymologie classique, on s'intéresse à la phase stationnaire (linéaire) en mesurant la vitesse initiale.

Cinétique michaélienne, affinité et efficacité catalytique

Mesure des constantes cinétiques

Cinétique (phase stationnaire)
en fonction de la concentration du
substrat

$$[P] = f(t)$$

- au début : réaction d'ordre 1
($dP/dt = \text{cste}$)
- puis dP/dt diminue \rightarrow devient nul
- Arrêt de la réaction ($dP/dt = 0$) dû
à :
 - épuisement de **S**
 - réversibilité de la réaction
 - inhibition par P ...

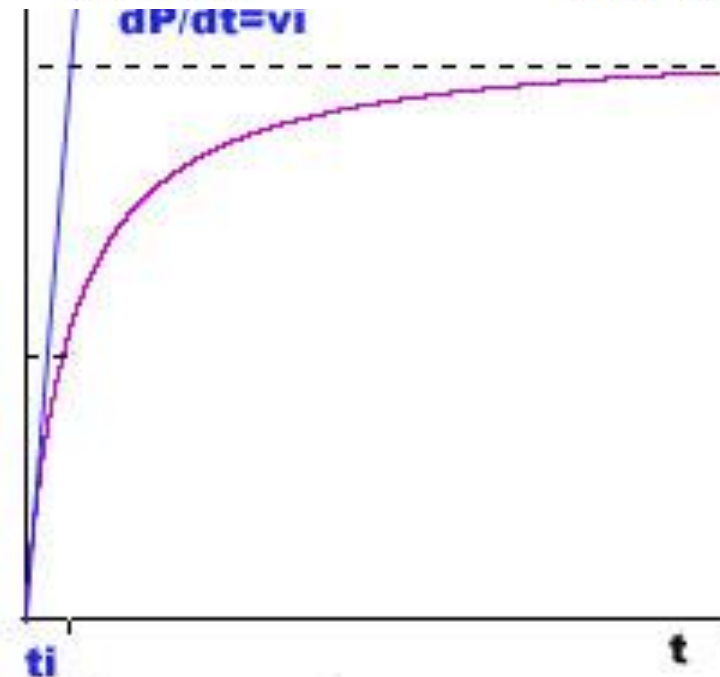
**La V de la réaction enzymatique
est influencée par: [S], [E],
température, pH, effecteurs.**



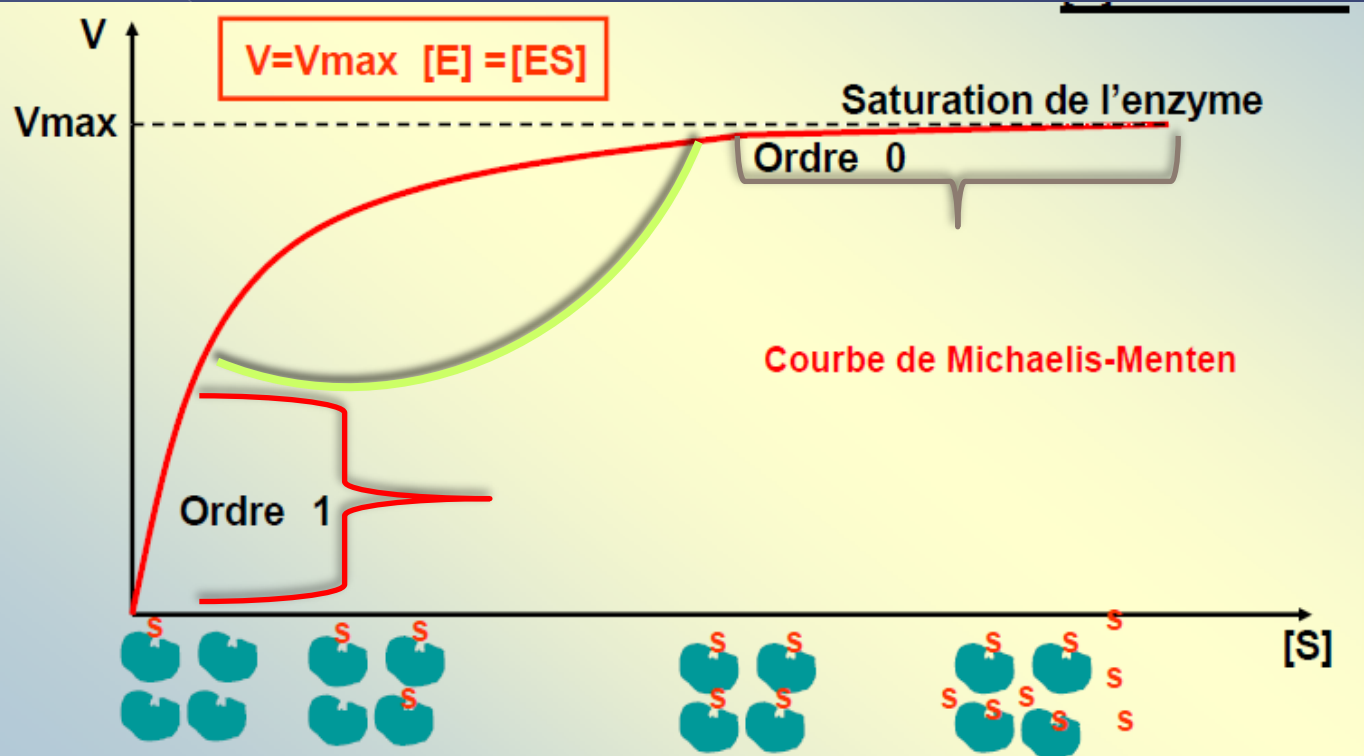
Leonor MICHAELIS
1875-1949



Maud MENTEN
1879-1960



Cinétique en fonction de la concentration du substrat

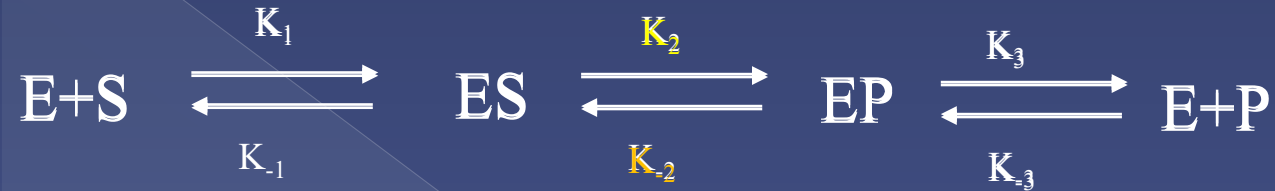


Aux faibles $[S]$, la vitesse de la réaction est proportionnelle à celle du substrat (réaction d'ordre 1)

Lorsque $[S]$ augmente, la vitesse ne s'accroît plus dans les mêmes proportions (réaction d'ordre mixte)

Aux fortes $[S]$, la vitesse devient constante, indépendante de cette concentration (réaction d'ordre 0): l'enzyme est saturée par son substrat.

Traitement mathématique des cinétiques



Conditions

- 1- On travaille à de très faible concentration de substrat $[\text{S}] \gg [\text{P}]$
- 2- Il y a beaucoup plus de substrat que d'enzyme que $[\text{S}] \gg [\text{E}]$
- 3- les formes libres de l'enzyme et de l'enzyme liée au substrat sont en équilibre (rapide).

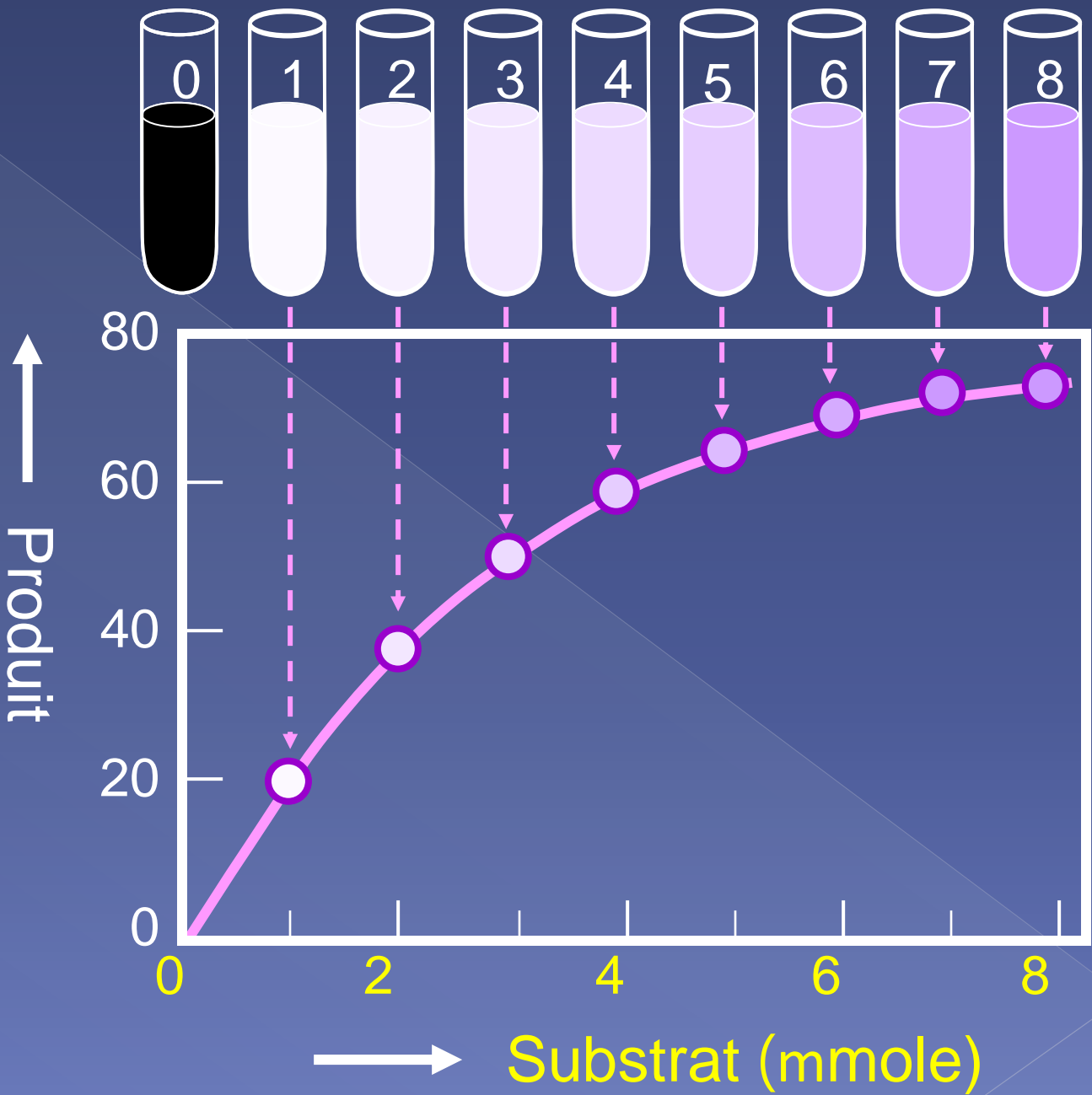
Avec ces conditions, on peut simplifier la réaction

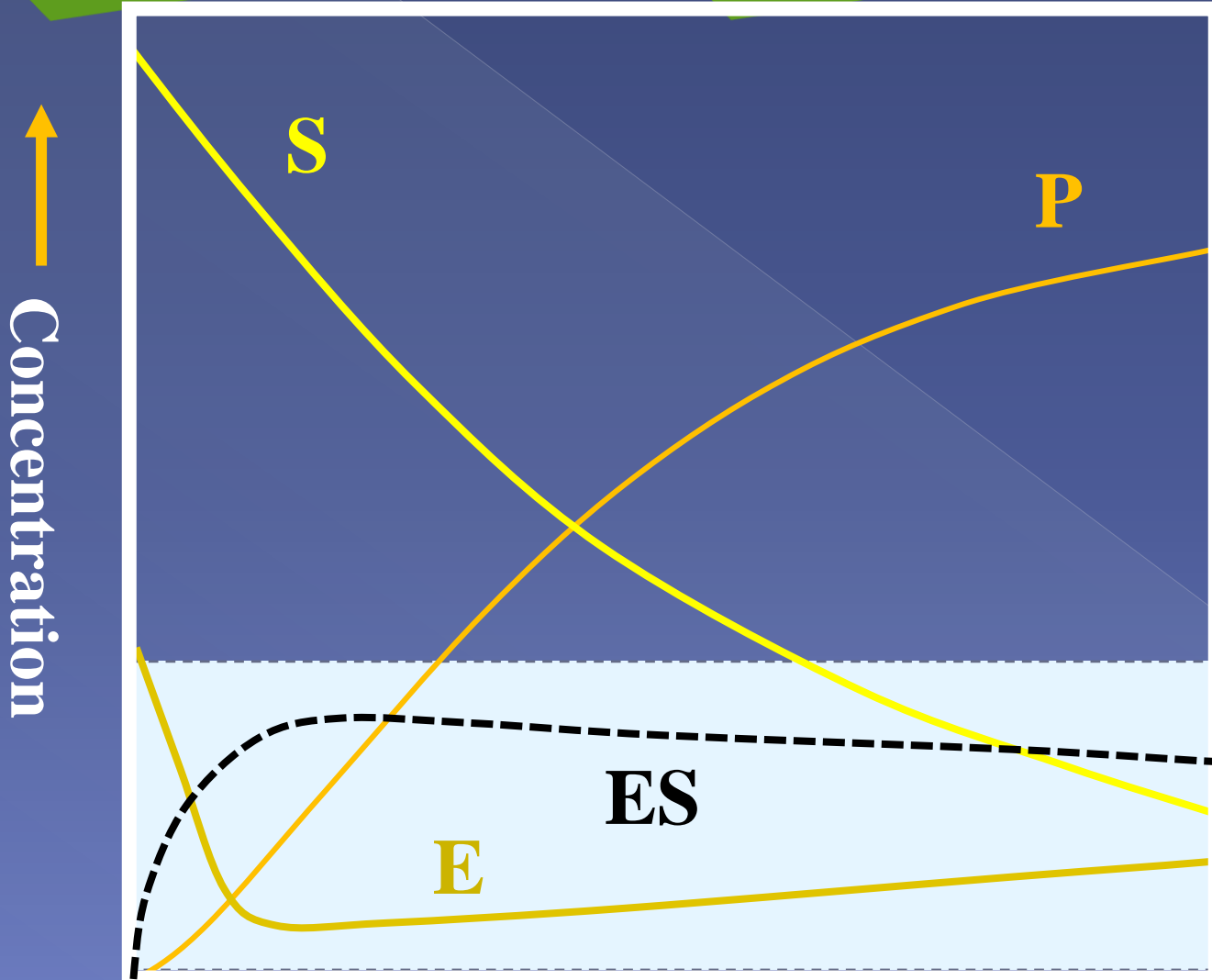


Comme, il y a peu de produit le retour k_{-2} est négligeable,

$k_2 = k_{\text{cat}}$ est la constante catalytique

Augmentation de la concentration du substrat

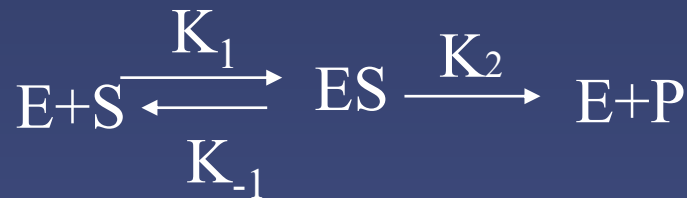




ES se forme vite et est détruit lentement

Temps de réaction

À l'équilibre



$$[E] = [E]L + [ES]$$

Vitesse de formation de [ES]:

$$d[ES]/dt = K_1[E]L[S] = K_1([E]-[ES])[S]$$

Vitesse de disparition de [ES]:

$$-d[ES]/dt = K_{-1}[ES] + K_2[ES] = [ES](K_{-1}+K_2)$$

Etat stationnaire: V de formation de [ES] = V de disparition de [ES]

$$K_1([E]-[ES])[S] = [ES](K_{-1}+K_2)$$

$$K_1([E]-[ES])[S] = [ES](K_{-1}+K_2)$$

$$([E]-[ES])[S]/[ES] = (K_{-1}+K_2)/K_1 = K_m$$

$$[E][S] = [ES](K_m+[S])$$

$$[ES] = [E][S]/K_m+[S]$$

$$\text{Or, } V = K_2 [ES]$$

$$V = (K_2 [E]) [S]/ K_m+[S]$$

$$V_{\max} = K_2 [E]$$

$$V = V_{\max} \leftrightarrow [E]=[ES]$$

$$V_i = V_{\max} [S]/ K_m+[S]$$

$$v_i = v_{\max} [S] / K_m + [S] \quad \text{équation de Michaelis-Menten}$$

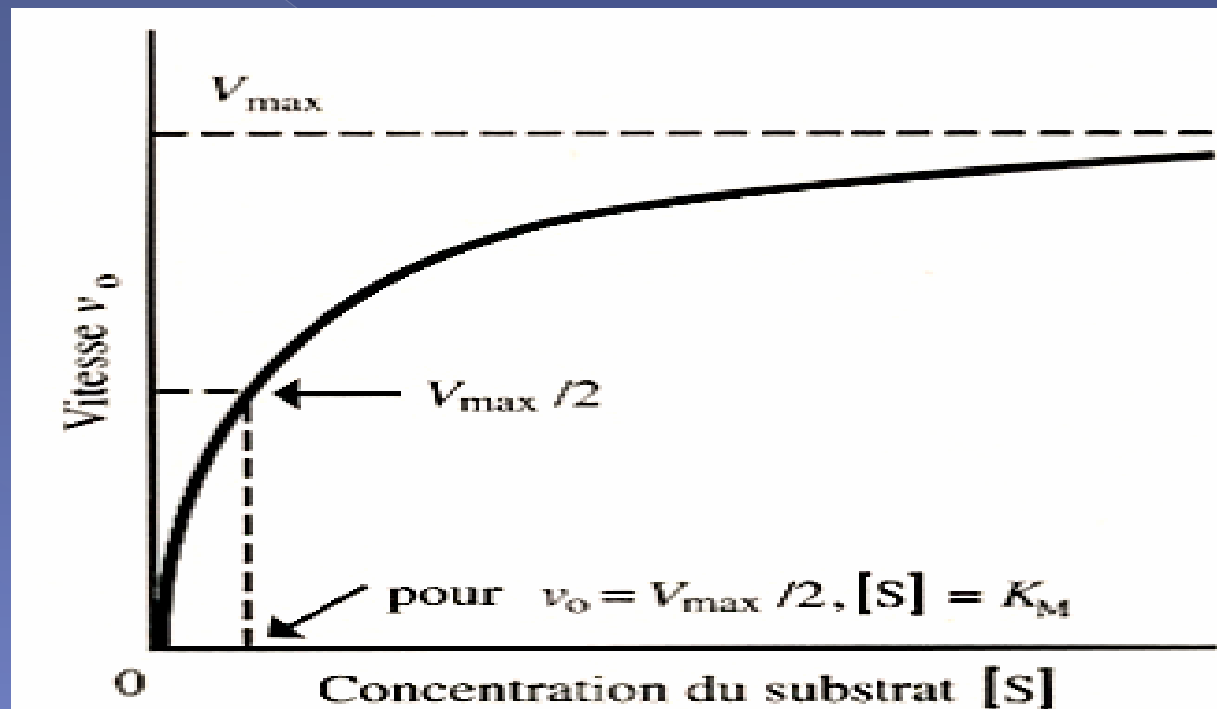
v_{\max} vitesse de réaction à saturation de l'enzyme.

K_m est une constante fondamentale pour les enzymes (constante de dissociation ES exprimée en moles/L), est un index de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus K_m est petit, plus l'affinité est grande et inversement.

Si K_m faible, cela signifie que l'enzyme est étroitement associée au S car atteint v_{\max} rapidement

C'est une constante opérationnelle qui représente [S] lorsque

$$v_o = v_{\max} / 2$$



K_m : Affinité avec le substrat

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

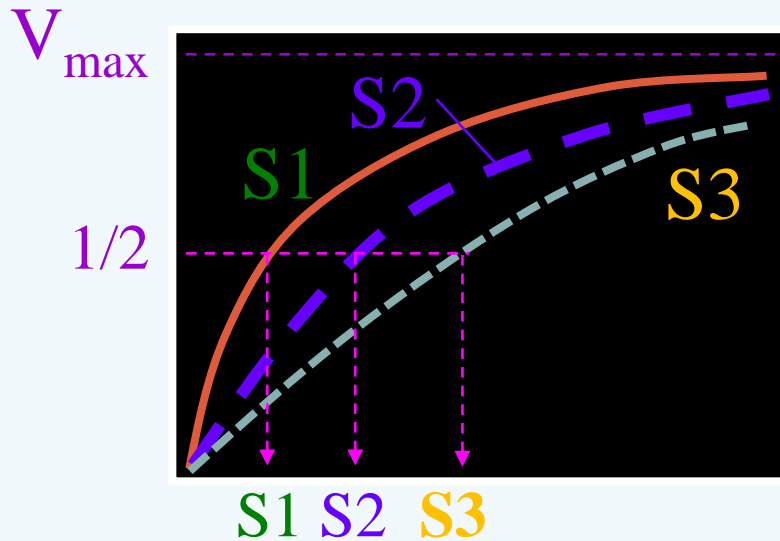
si $v_o = \frac{V_{\max}}{2}$

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m + [S] = 2 [S]$$

$$K_m = [S]$$

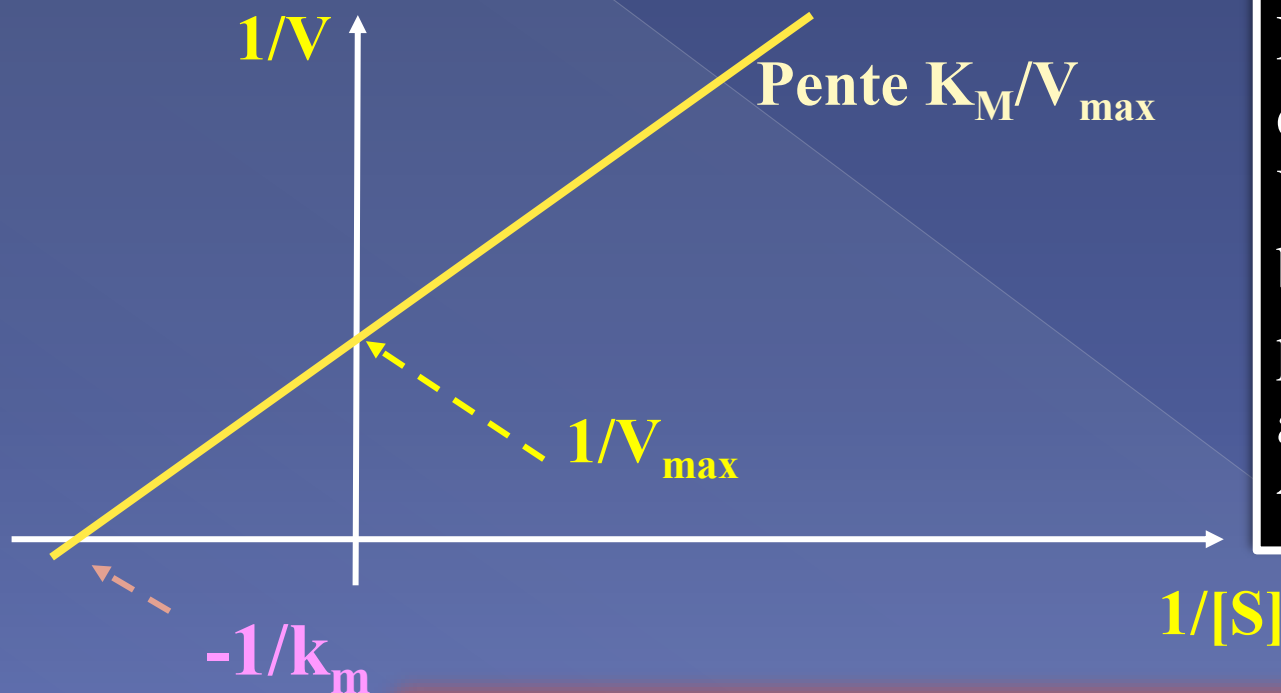
Lors de l'utilisation de substrats différents



K_m L' affinité change

Représentation de Lineweaver-Burk

La transformation de l'équation de Michaelis-Menten proposée par Lineweaver et Burk consiste à prendre les inverses de ses deux membres. En effectuant quelques opérations mathématiques simples, l'équation devient celle d'une fonction linéaire de type $y = a.x + b$.



En réalité, il est difficile de mesurer V_{max} car il faut beaucoup de substrat pour vraiment atteindre V_{max} (en théorie $[S]=\infty$)

$$1/v_0 = 1/v_{max} + K_m/v_{max} \cdot 1/[S]$$

Unité de l'activité enzymatique



$$v_o = [P] / \text{min}$$

L'unité internationale (U.I)

C'est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mmole de substrat par minute

A.S: rapporte le nombre d'unités enzymatiques au poids (mg) de protéine purifiée.

A. M: est le nombre de moles de substrat transformé (ou de produit formé) par moles d'enzyme par mn.

K cat (K₂) Constante catalytique qui représente le nombre de moles de P formé par seconde et par mole d'enzyme. Si l'enzyme possède plusieurs sites catalytiques, l'unité change et s'exprime par mole de sites. $K_{cat} = V_{max} / \text{mole}$

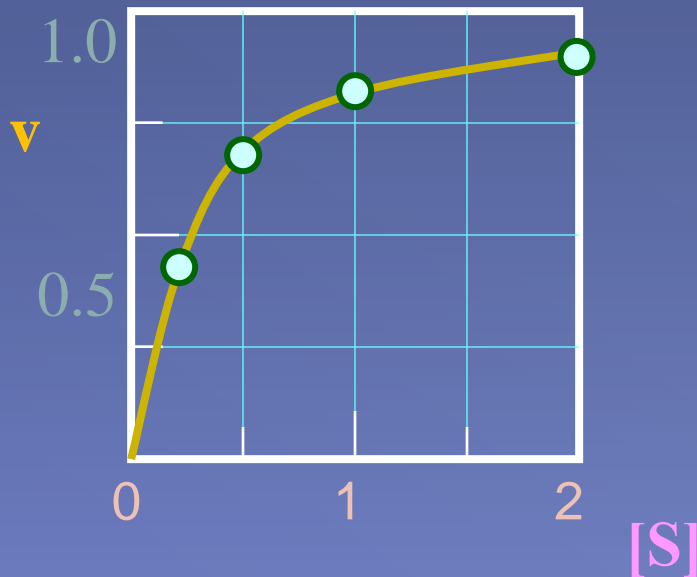
Un exemple réel de la cinétique enzymatique

Données

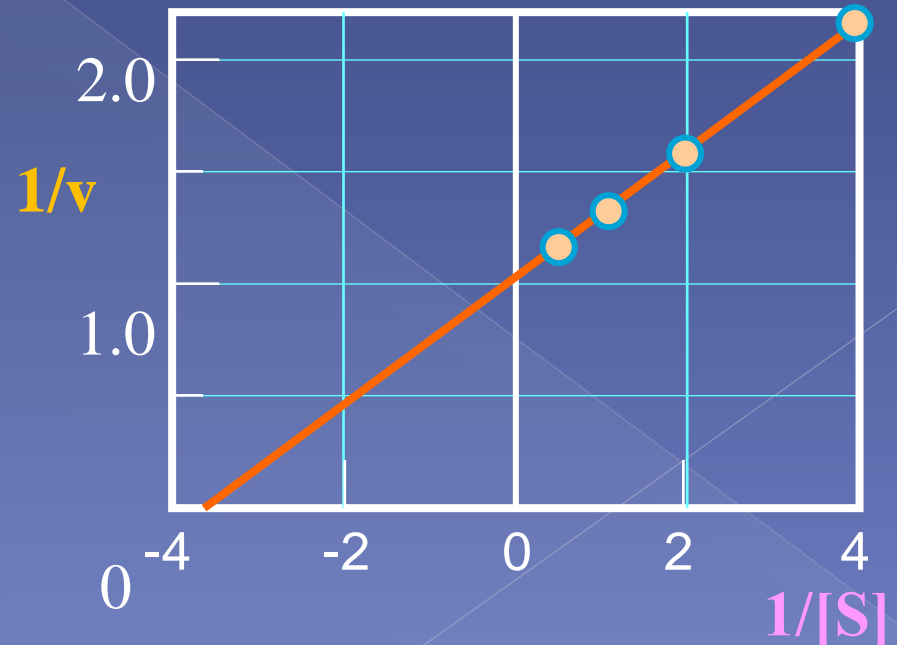
	Substrat	Produit	Vitesse	Double réciproque	
<i>no</i>	[S]	Absorbance	v (mmole/min)	1/S	1/v
1	0.25	0.21	→ 0.42	4	2.08
2	0.50	0.36	→ 0.72	2	1.56
3	1.0	0.40	→ 0.80	1	1.35
4	2.0	0.46	→ 0.92	0.5	1.16

- (1) Le produit a été mesuré par spectroscopie à 600 nm pour 0,05 par μ mole
- (2) Le temps de réaction a été 10 min

tracé directe



Double réciproque



Qu'est ce qui influence l'activité enzymatique?

De nombreux facteurs modulent l'activité des enzymes

1. Les conditions de l'environnement

Paramètres physico-chimiques : température, pH, force ionique,

Paramètres chimiques : les métaux, agents dénaturants, modifications covalentes, protéolyse

2. Cofacteurs et Coenzymes

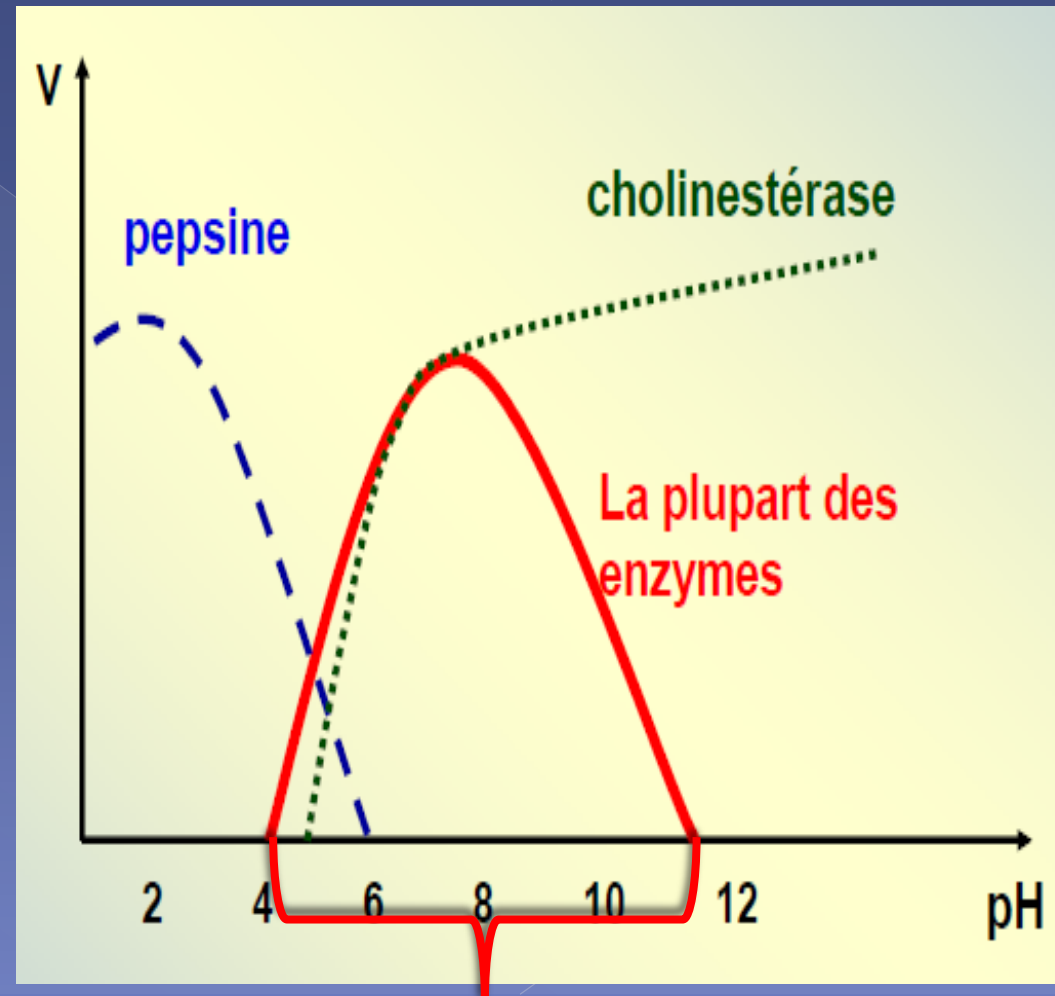
3. Des inhibiteurs d'enzymes

Effet du pH

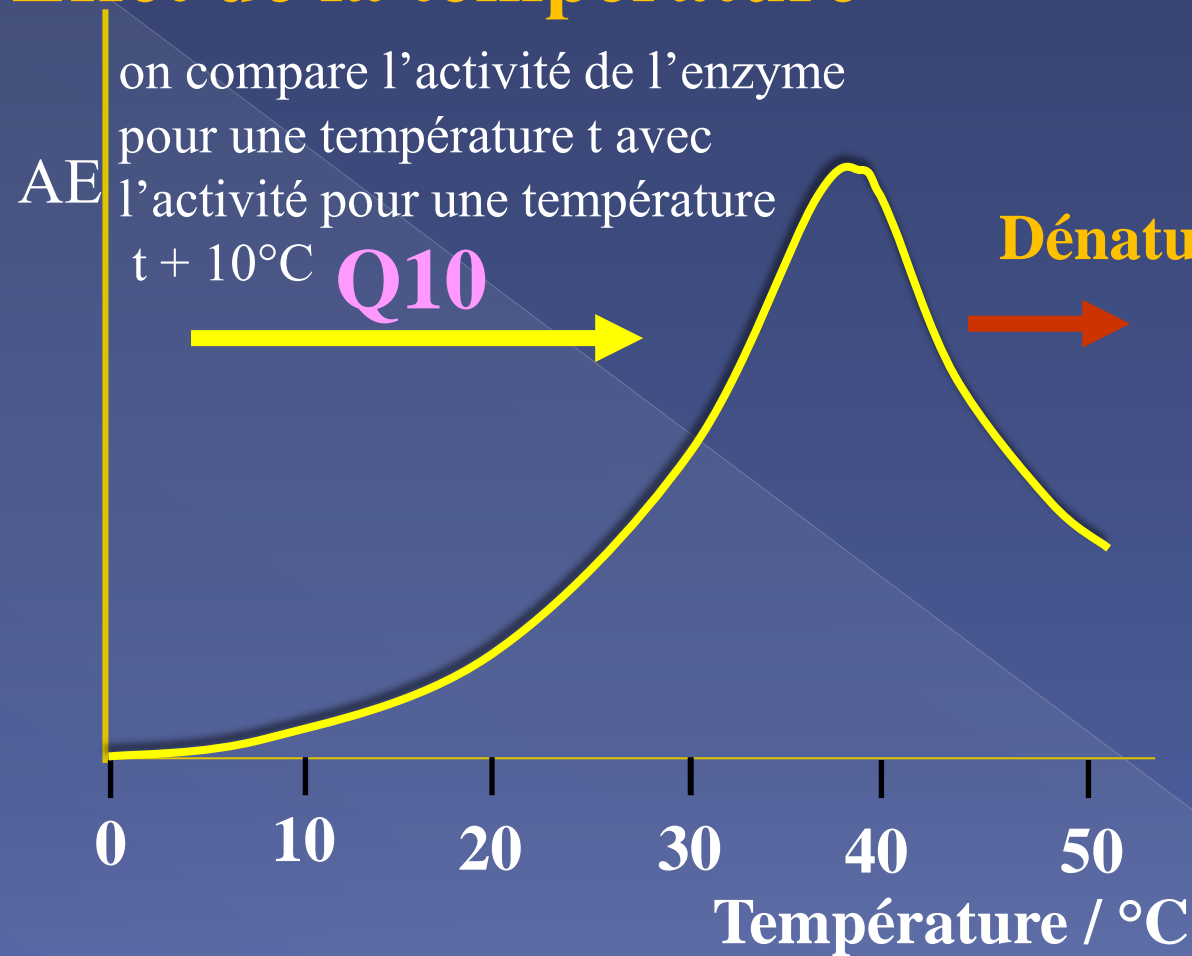
Les enzymes sont sensibles aux variations du pH du milieu. De fait, quand le pH change, l'état d'ionisation des groupements chargés, aussi bien dans le site actif de l'enzyme (en fonction du pKa propre à chaque résidu chargé participant à la constitution du site actif) varie.

• Exemples :

- la pepsine au niveau de l'estomac fonctionne mieux à pH acide.
- la lipase du suc pancréatique à un pH optimal compris entre 7 et 7.5
- les phosphatases alcalines osseuses ou hépatiques ont un pH optimal entre 8.6 et 9.1.



Effet de la température



Quand la T augmente, il se produit une inactivation «dénaturation» progressive de l'enzyme

Généralement, la dénaturation est négligeable en dessous de 30°C et commence à être appréciable au-delà de 40°C . Quelques enzymes gardent une activité importante à des températures bien supérieures à 40°C cas des enzymes des bactéries thermophiles.

Effecteurs enzymatiques:

Physiologique: Régulation du métabolisme cellulaire

Biochimique: Permettre de mieux comprendre le mode d'action des enzymes.

Les activateurs

Les inhibiteurs

Les régulateurs (**allostériques**)

Les **inhibiteurs** sont des substances qui inactivent les enzymes;

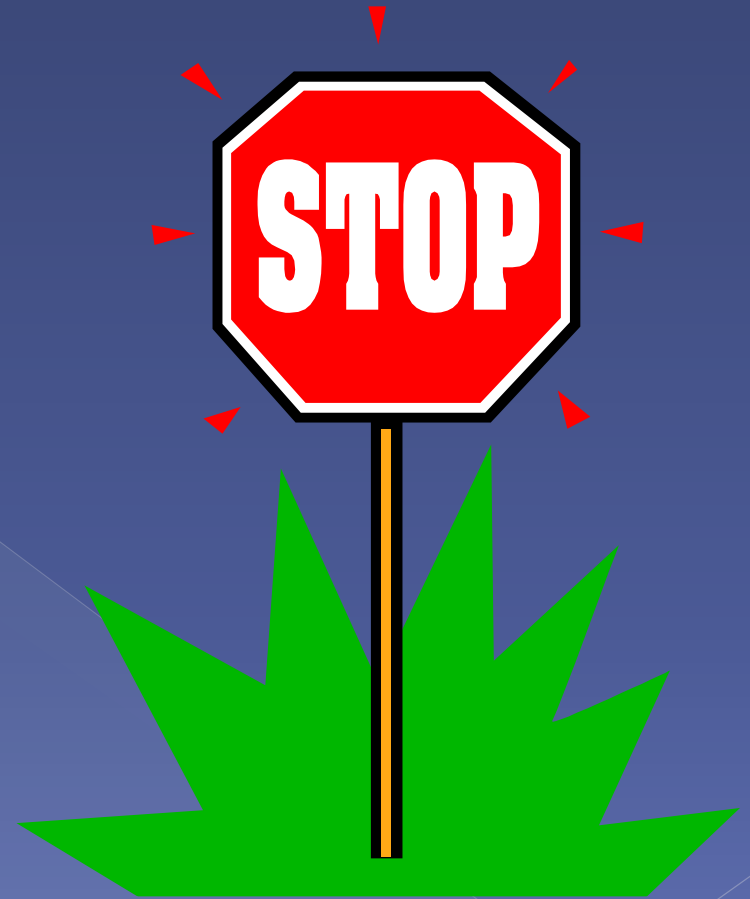
Il existe deux principaux types d'inhibition:

Inhibition réversible des enzymes: l'activité enzymatique peut être retrouvée en enlevant l'inhibiteur .

Inhibition irréversible des enzymes: l'inhibiteur lie l'enzyme de manière covalente, inactivant ce dernier de façon irréversible.

L'inhibition réversible

- **Compétitive**
- **Non Compétitive**
- **InCompétitive**



Inhibition réversible des enzymes

1- Inhibition compétitive

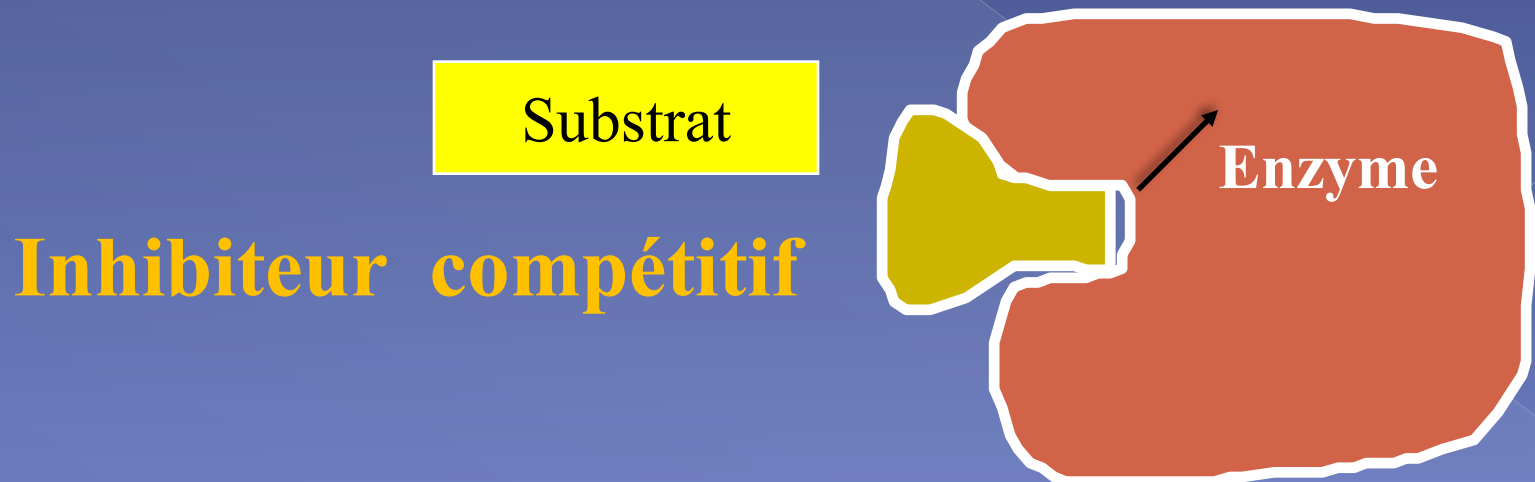
Type d'inhibition rencontrée le plus fréquemment;

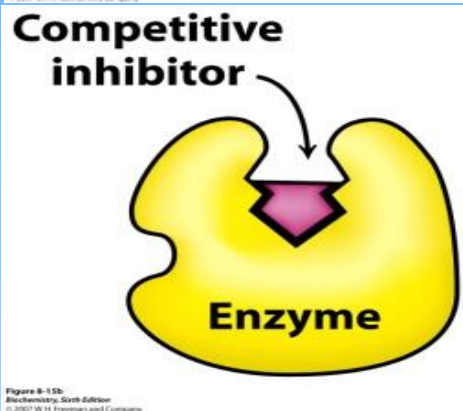
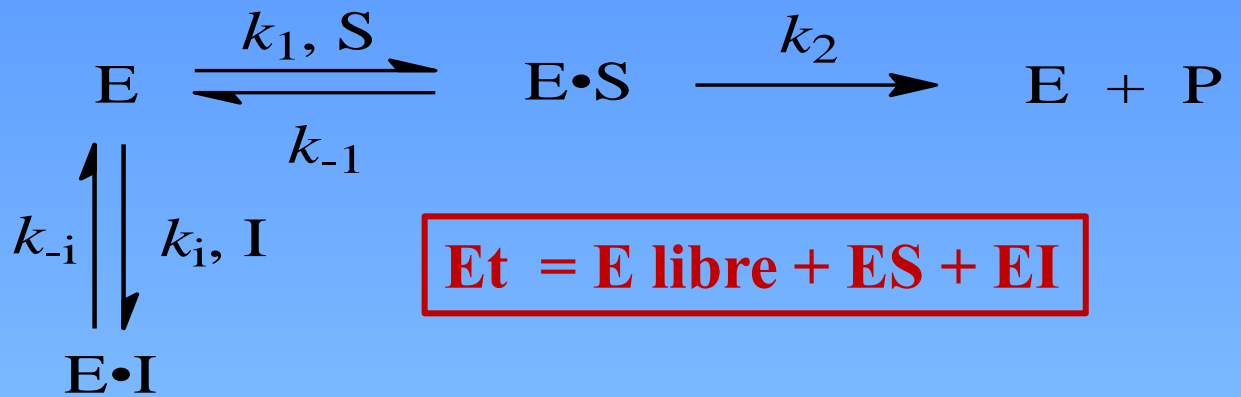
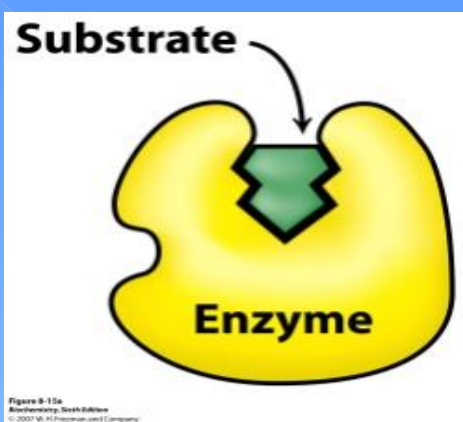
I est très similaire à S (structure analogue)

I et S sont en compétition pour le même site de liaison sur l'enzyme: le site actif;

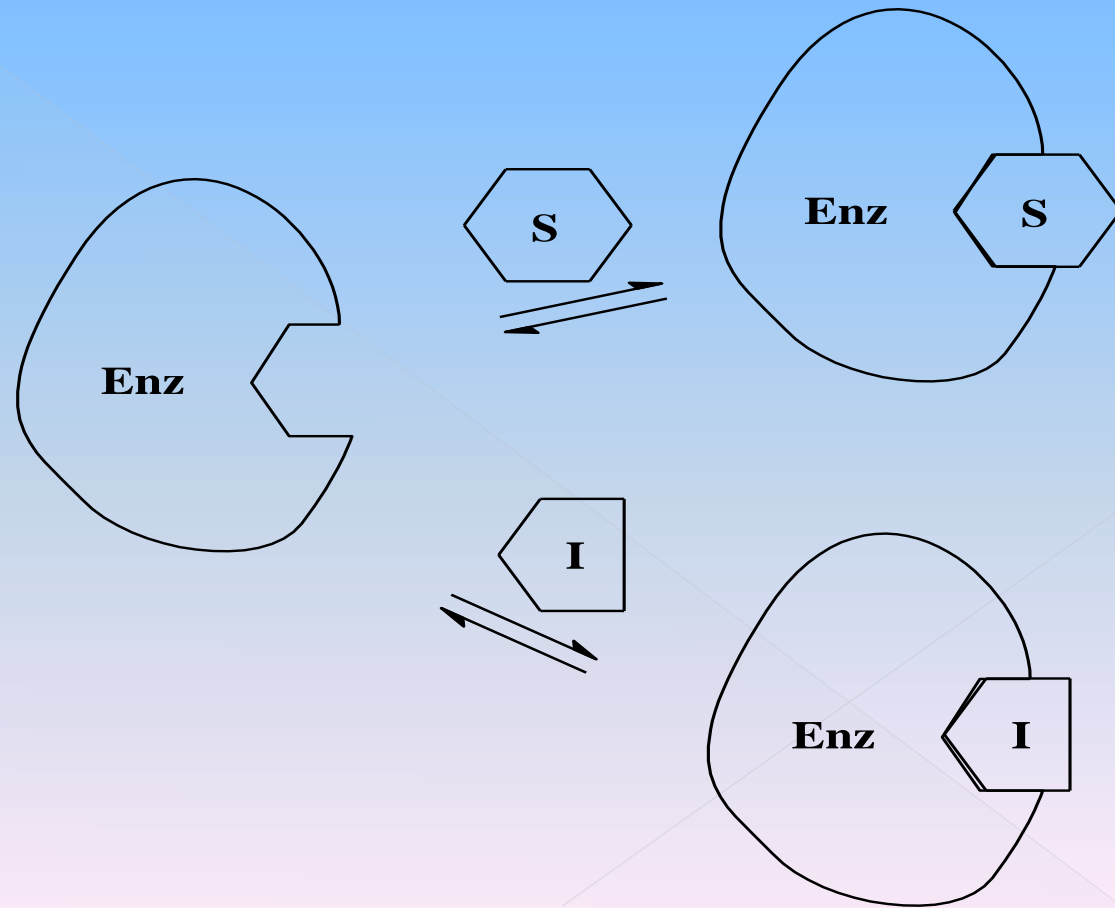
V_{max} ne change pas: à des $[S]$ très élevées, I devient négligeable;

K_m est modifiée (K_m' ou K_m^{app})





Le complexe EI (enzyme-inhibiteur) n'a pas d'activité

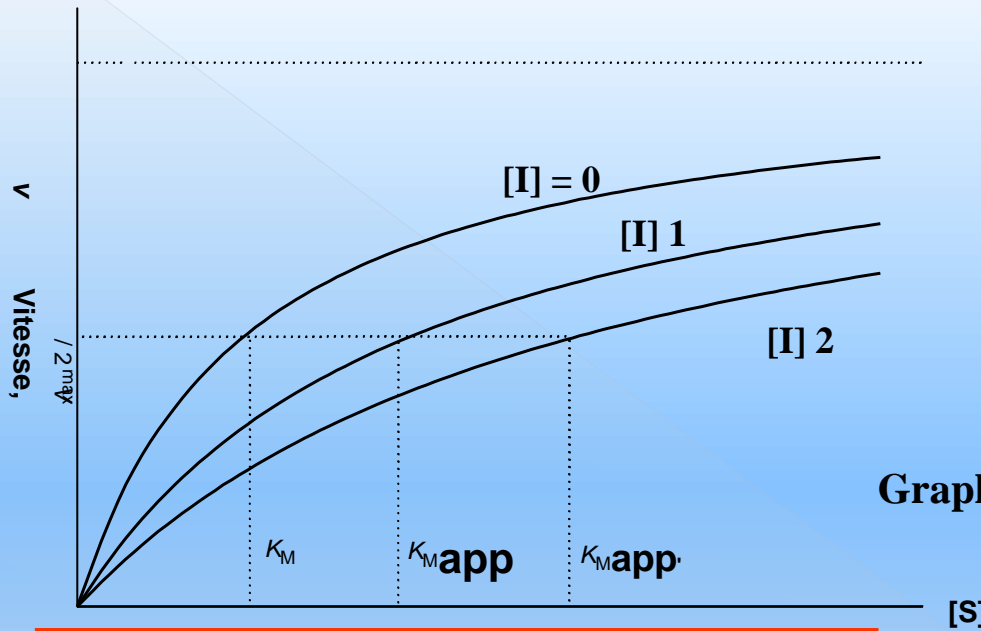


K_i (la constante de dissociation de l'inhibiteur):

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

K_i est une mesure de l'**affinité** de I pour E: plus K_i est **petit**, plus l'inhibiteur est **puissant**.

Graphique Michaelis-Menten d'inhibition compétitive



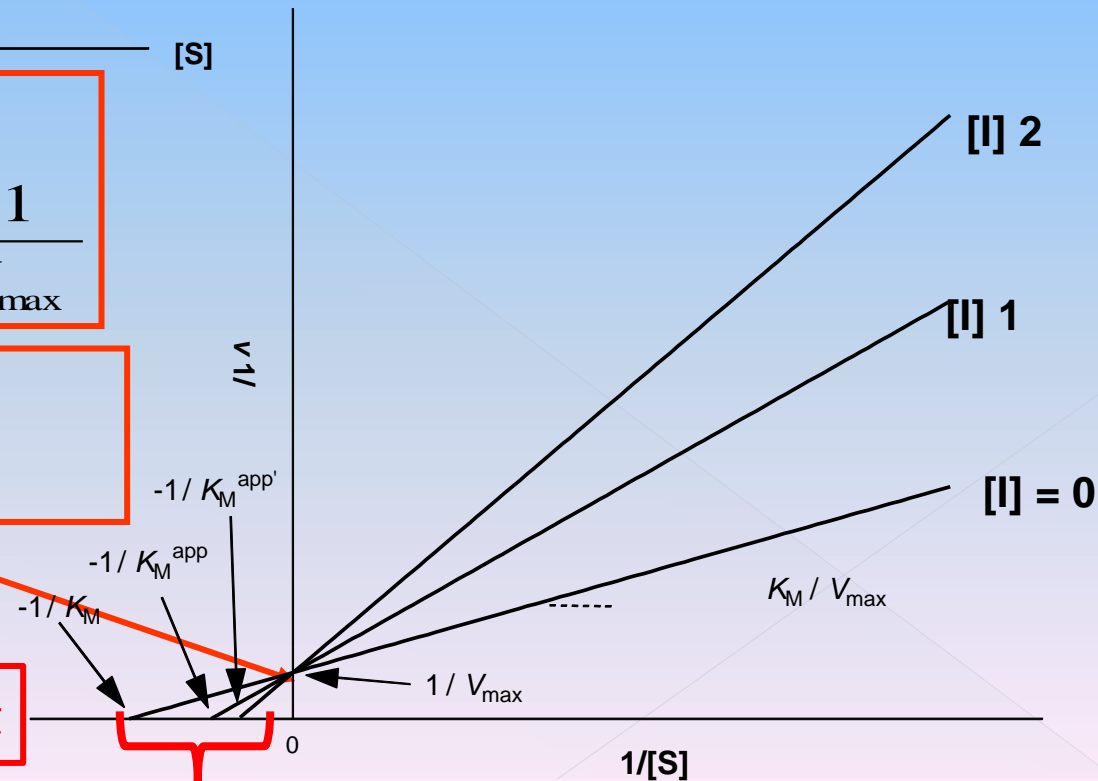
$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

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

Graphique Lineweaver-Burk d'inhibition compétitive

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Les lignes se croisent sur l'axe des y ($1/V_{max}$)



Km changent

Inhibition Competitive

Product

Substrate

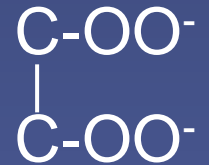
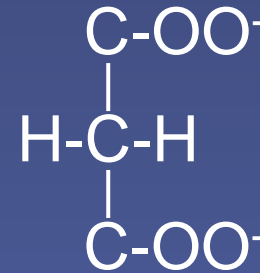
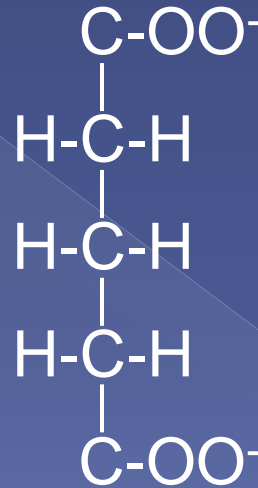
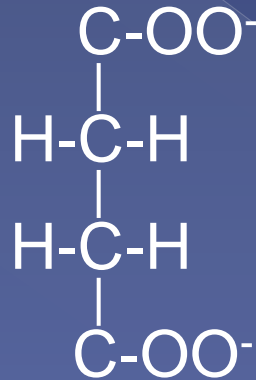
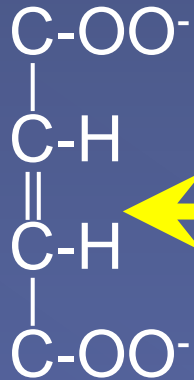
Competitive Inhibitor

Succinate

Glutarate

Malonate

Oxalate



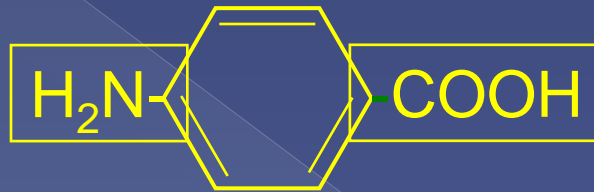
Succinate Dehydrogenase

Sulfamide est un inhibiteur compétitif



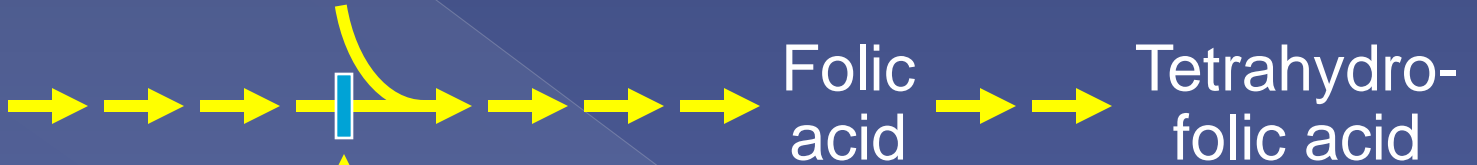
Domagk (1939)

Para-aminobenzoic acid (PABA)



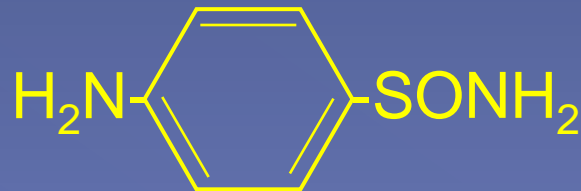
Les bactéries ont besoin PABA pour la biosynthèse de l'acide folique

Précurseur



Folic acid

Tetrahydro-folic acid



Sulfanilamide

Sulfa drug (anti-inflammation)

Sulfamides ont une structure similaires avec PABA, et inhibent la croissance des bactéries

2. Inhibition non compétitive

On parle d'inhibiteur non-compétitif lorsque l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme E et sur le complexe enzyme substrat ES en compétition avec le substrat.

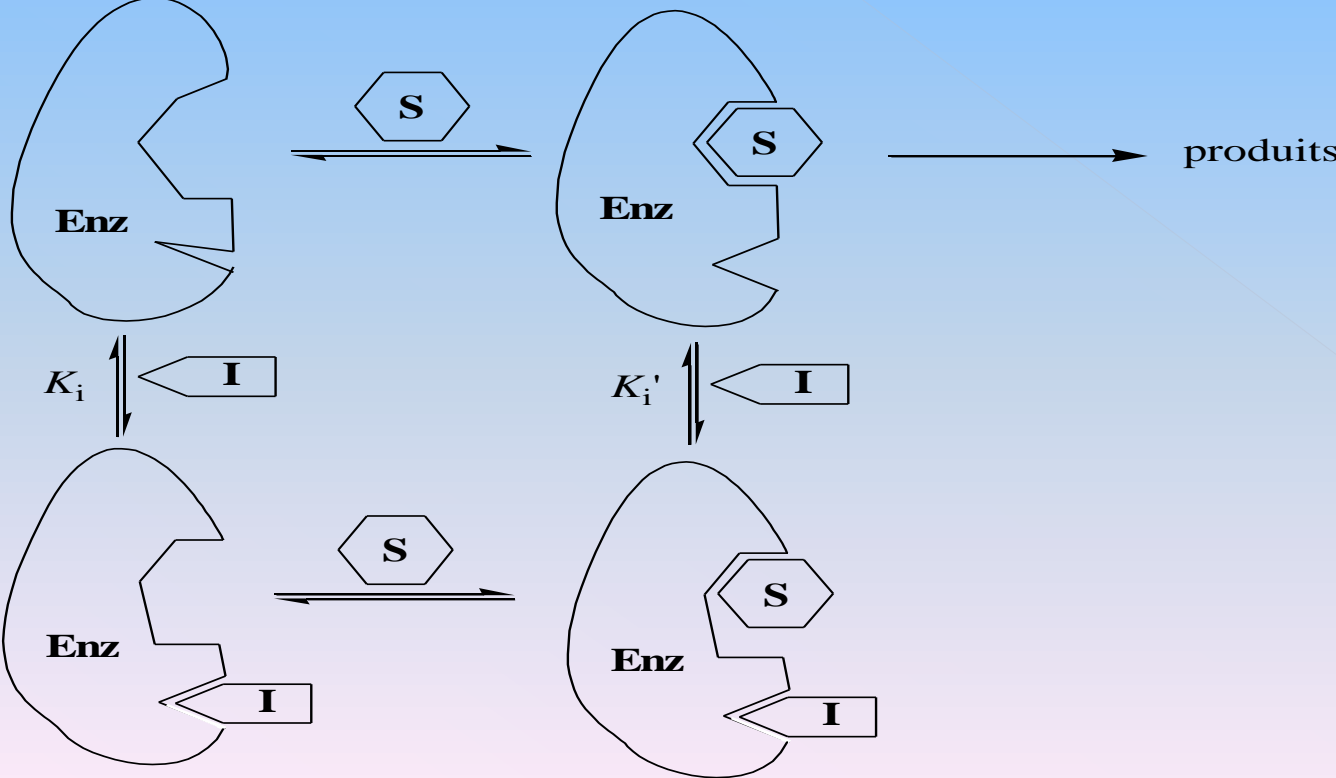
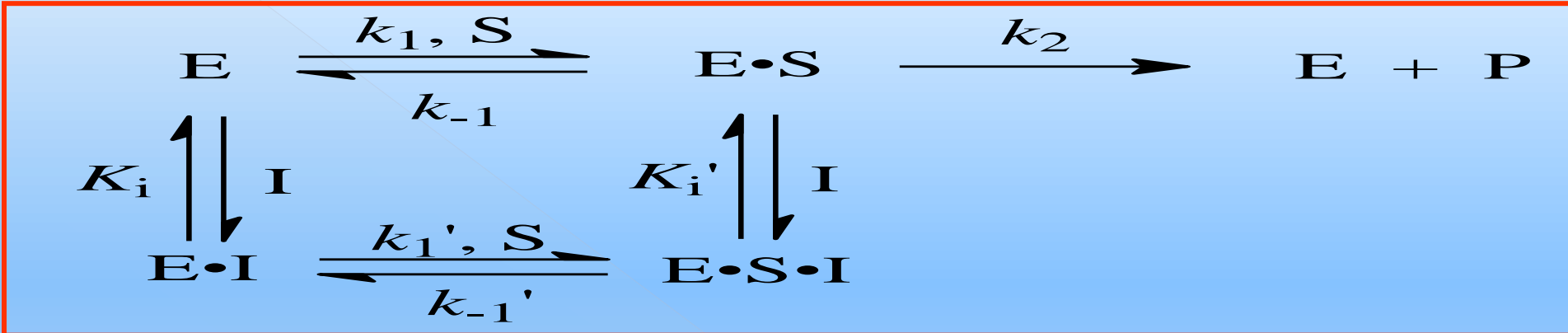
L'inhibiteur non-compétitif se fixe sur un site totalement différent du site actif de l'enzyme → pas de compétition entre le substrat et l'inhibiteur.

Il se produit une diminution de la vitesse maximale sans **aucune modification du Km car il n'y a pas de compétition** entre le substrat et l'inhibiteur pour le site actif

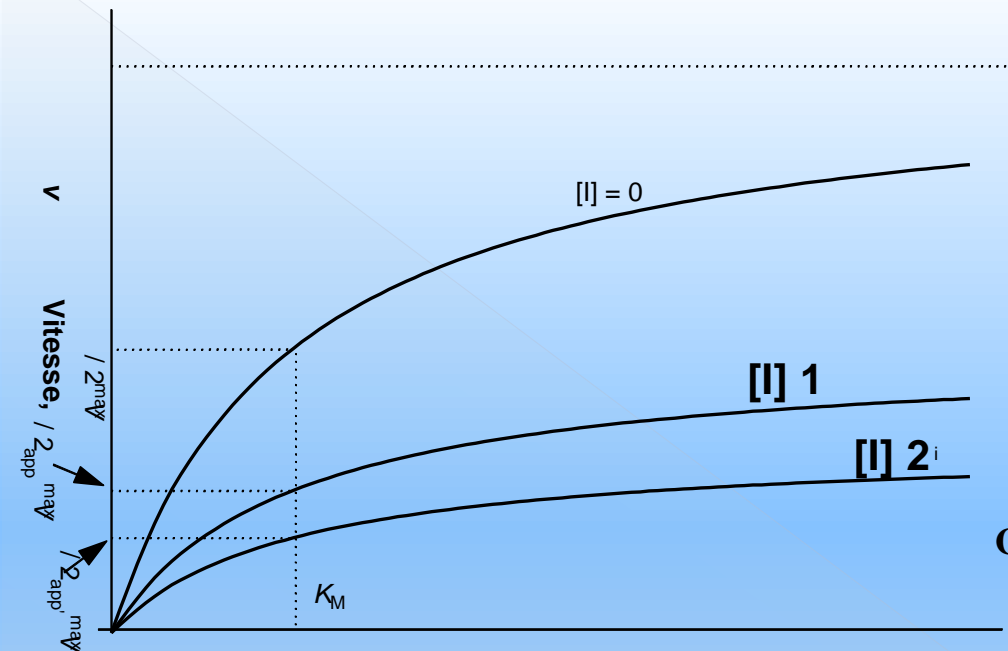


Cet inhibiteur déplace l'équation, K_m n'est pas modifiée. Une partie de ES reste bloquée sous forme ESI, donc V_{max} est diminuée

$$[E] = [E]L + [ES] + [EI] + [ESI]$$



Graphique Michaelis-Menten d'inhibition non compétitive

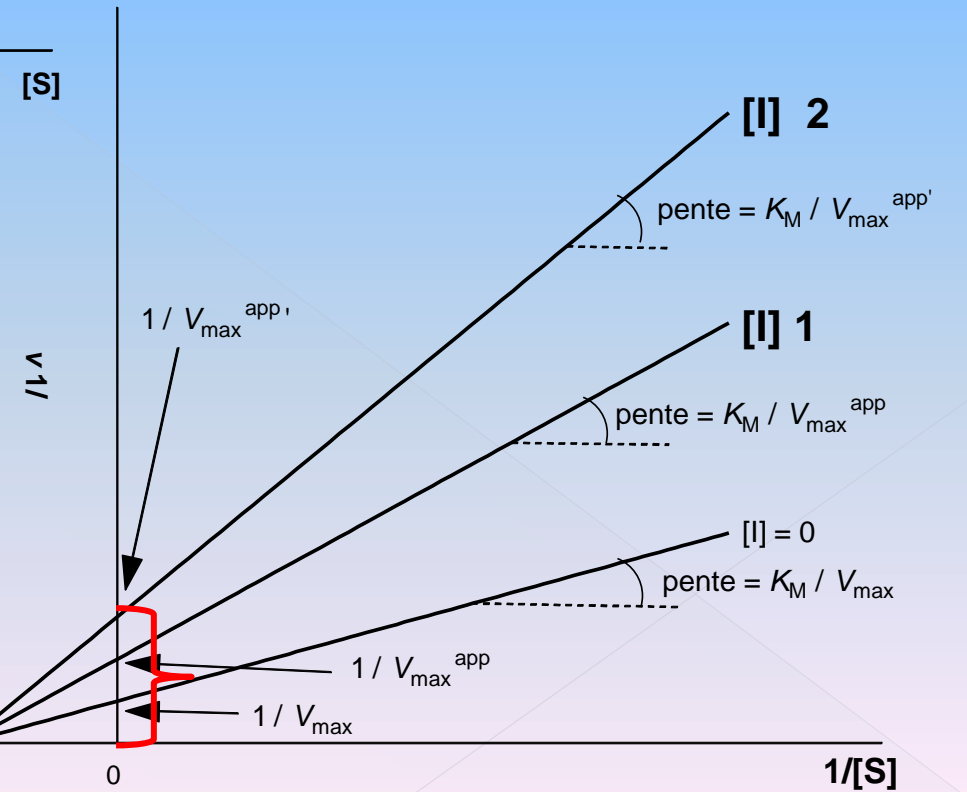


$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

$$1/V_m' = 1/V_{\max} / (1 + [I]/K_i)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Graphique Lineweaver-Burk d'inhibition non compétitive

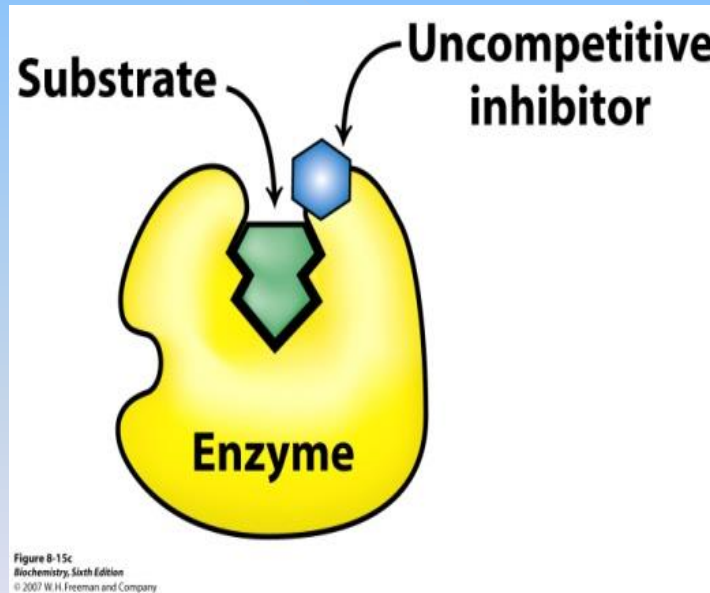


lignes se croisent sur l'axe des x (-1/K_M)

V_{max} changent

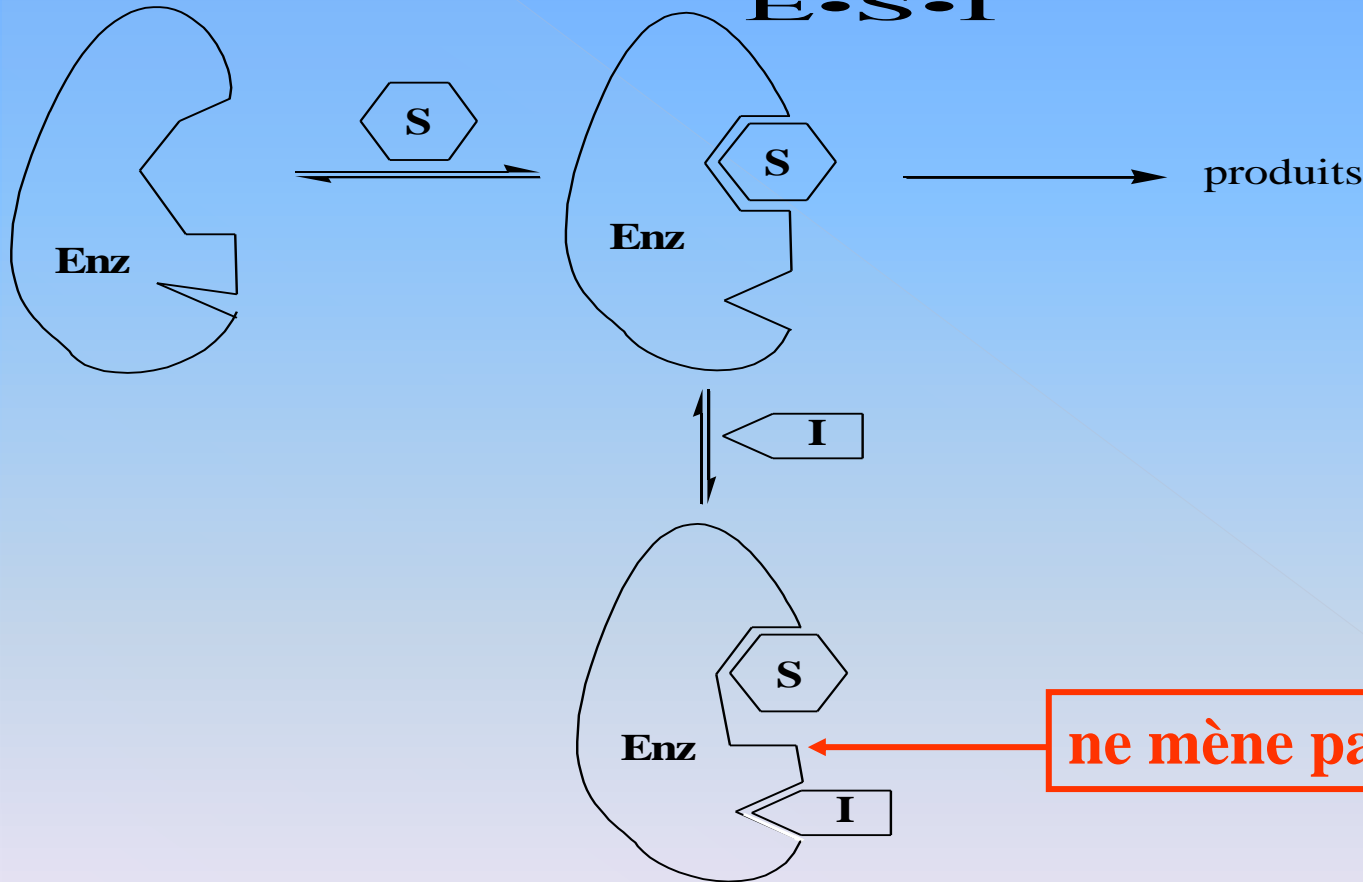
3. Inhibition incompétitive

L'inhibiteur **incompétitif** ne se fixe jamais à l'enzyme libre mais seulement à ES et empêche la formation des produits. La liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de l'enzyme, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme, et empêche la réaction.



l'inhibiteur est lié par le complexe E•S

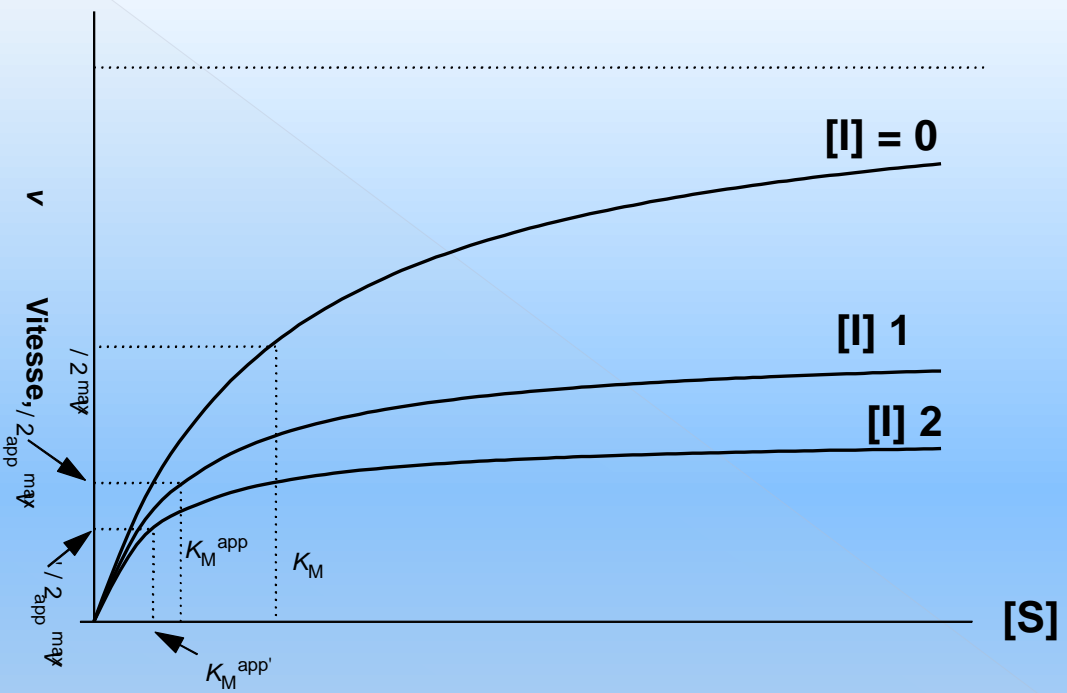
$$[E]_0 = [E] + [E \cdot S] + [E \cdot S \cdot I]$$



ne mène pas aux produits

Cet inhibiteur déplace l'équation, abaisse K_m . Une partie de ES reste bloquée sous forme ESI, donc V_{max} est diminuée

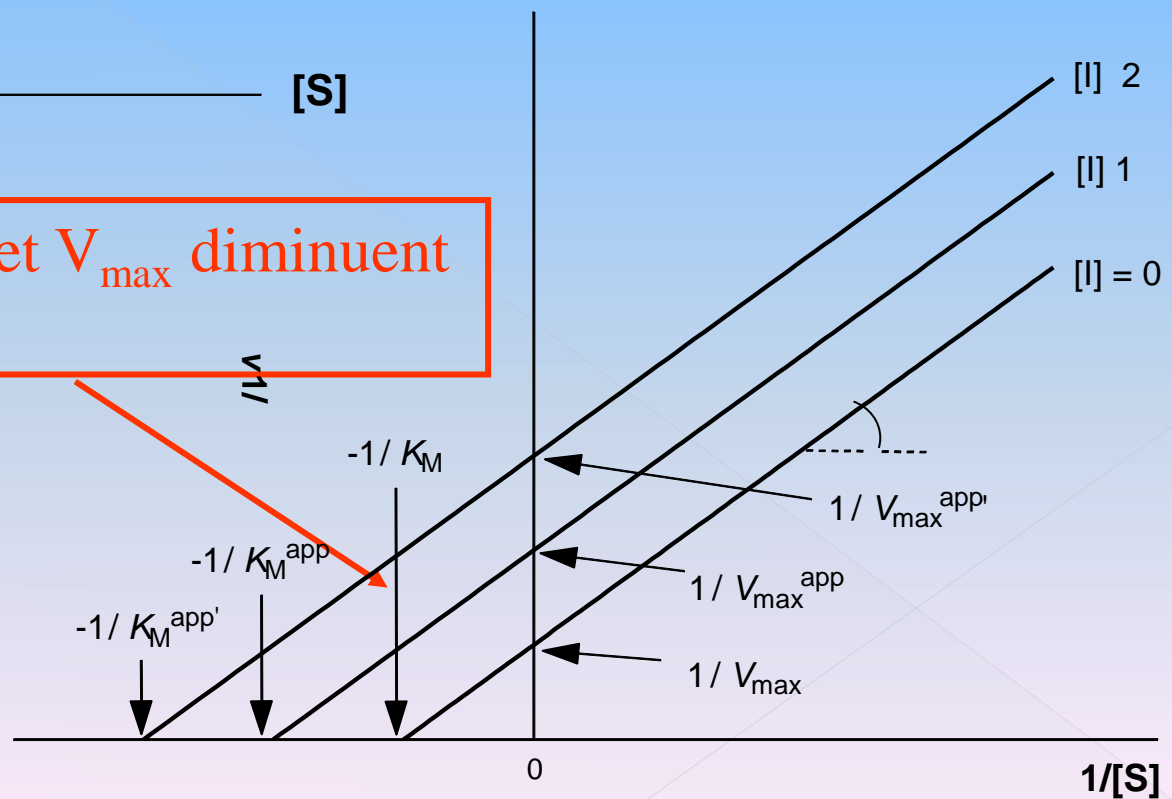
Graphique Michaelis-Menten d'inhibition incompétitive



$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

Les lignes parallèles, K_M et V_{\max} diminuent

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$



Mécanisme d'inhibition enzymatique

	▶ Compétitive	▣ Non compétitive	◩ Incompétitive
Modèle réactionnel	<p>Substrat Inhibiteur Compétition v.s.v du site actif</p>	<p>Site différent</p>	
Equation d'équilibre	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ <p>+ I ↑ ↓ EI</p>	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ <p>+ + ↑ I ↑ I ↓ ↓ EI + S → EIS</p>	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ <p>+ ↑ I ↕ EIS</p>
Equation	<p>[I] lie [E] libre et entre en compétition avec [S]</p>	<p>[I] lie [E] libre ou le complexe [ES] : <u>pas de compétition</u> entre le substrat et l'inhibiteur</p>	<p>[I] lie le complexe [ES] et empêche la formation des produits.</p>

Représentations graphiques des inhibitions

	▶ Compétitive	▣ Non-compétitive	◀ Incompétitive
Cinétique MM	<p>v_0 vs $[S], \text{mM}$. V_{\max} unchanged, K_m modified to K_m'.</p>	<p>v_0 vs $[S], \text{mM}$. V_{\max} diminished to V_{\max}', K_m unchanged.</p>	<p>v_0 vs $[S], \text{mM}$. V_{\max} and K_m both diminished to V_{\max}' and K_m'.</p>
Représentatiol LB	<p>Intersection à l'axe des Y. $1/v_0$ vs $1/[S]$. $-1/K_m$ and $1/V_{\max}$ marked.</p>	<p>Intersection à l'axe des X. $1/v_0$ vs $1/[S]$. $-1/K_m$ and $1/V_{\max}$ marked.</p>	<p>Deux lignes parallèles. $1/v_0$ vs $1/[S]$. $-1/K_m$ and $1/V_{\max}$ marked.</p>

Enzymes allostériques

Certaines enzymes ne décrivent pas de relation hyperbolique entre V_i et $[S]$ mais sigmoïdale

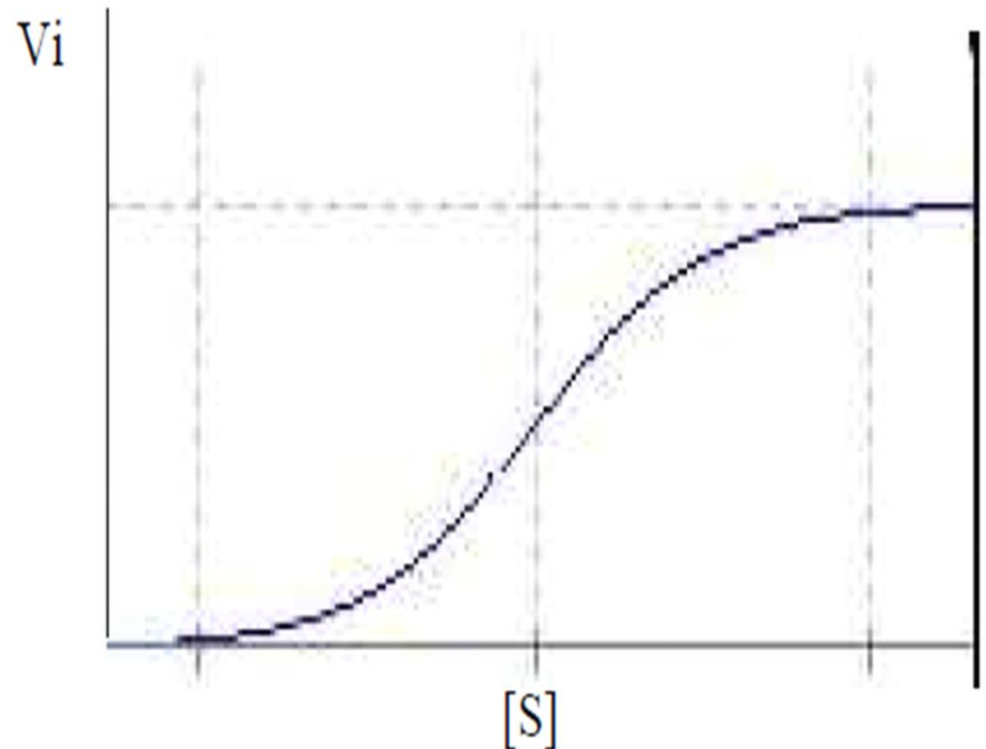
Contrairement aux enzymes michaeliennes, les enzymes allostériques n'exercent leur action qu'à des concentrations en substrat élevées

Les petites quantités de substrat sont lentement transformées.

1- La vitesse augmente à partir d'un seuil

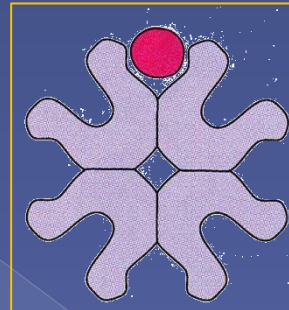
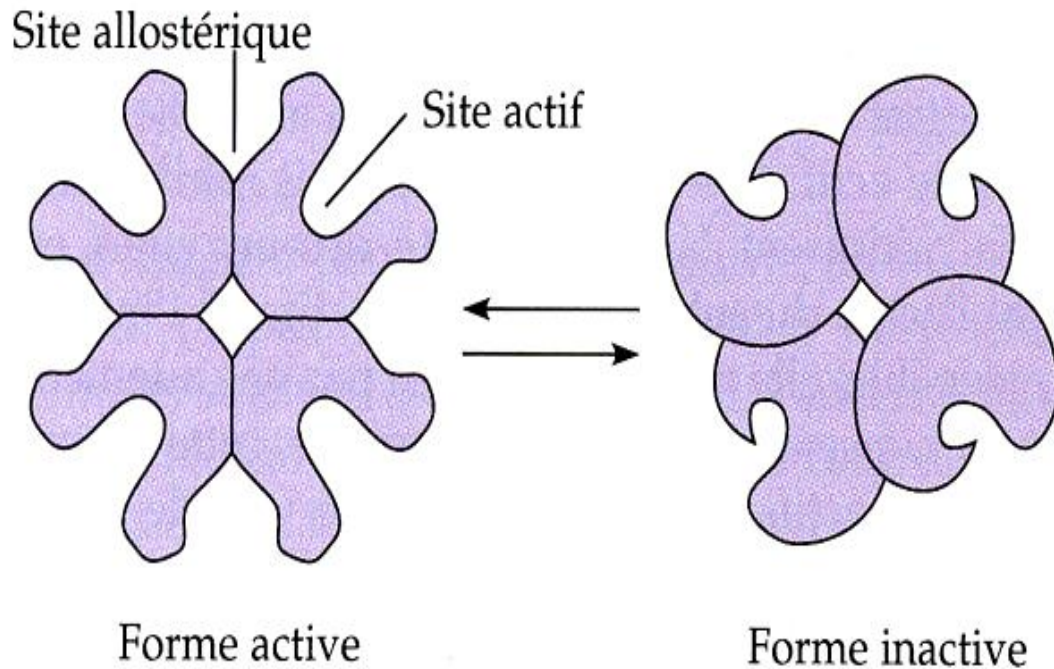
2 - Les petites quantités de substrat sont transformées lentement.

3 - Effet coopératif

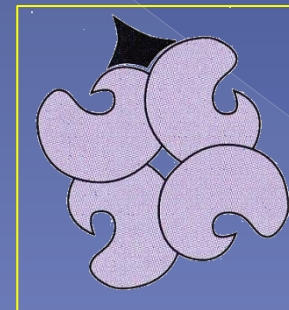


Régulation de l'activité enzymatique:

Le contrôle allostérique est défini comme étant la fixation d'une molécule (substrat, produit ou effecteur) à une sous-unité de l'enzyme, plus précisément au niveau d'un site allostérique autre que le site catalytique, ce qui entraîne une modification de la conformation et par la suite de l'activité de l'enzyme.



**Un activateur
allostérique
stabilise la
forme active**



**Un inhibiteur
allostérique
stabilise la
forme inactive**

Propriétés générales des enzymes allostériques

- Structure quaternaire formées d'un nombre pair de sous unités.
- Cinétique non-Michaelienne
- Changement de conformation en fonction de la liaison avec le substrat, ce qui modifie l'affinité de E pour le S. On dit qu'il y a un effet coopératif.
- En plus du site actif où se fixe le substrat, l'enzyme possède un ou plusieurs sites allostériques où peuvent se fixer des effecteurs allostériques (activateurs ou inhibiteurs)

Importance des enzymes allostériques

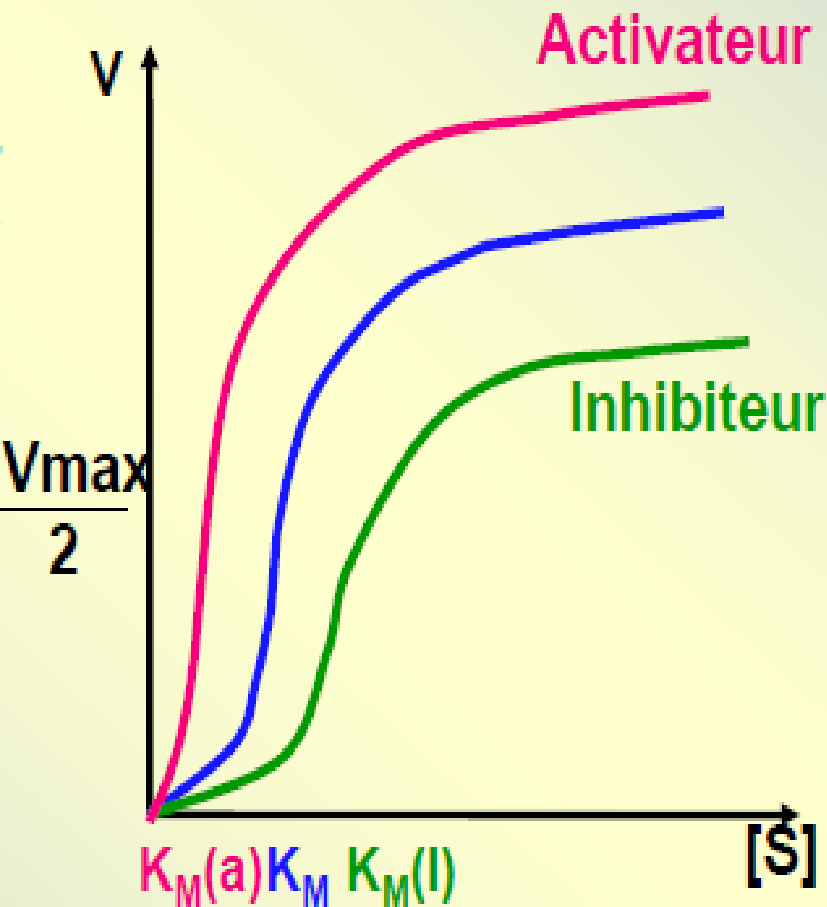
Ont un rôle de régulation très important dans la cellule:

En général l'enzyme allostérique catalyse la 1ère réaction, limitante d'une voie métabolique.

Son activité peut être contrôlée par des activateurs ou inhibiteurs appartenant à cette voie métabolique.

Action des effecteurs allostériques

Ce sont des substances qui agissent comme activateurs ou inhibiteurs en modifiant la conformation des sites de liaison au substrat, ce qui change l'affinité pour le substrat



Activateurs allostériques

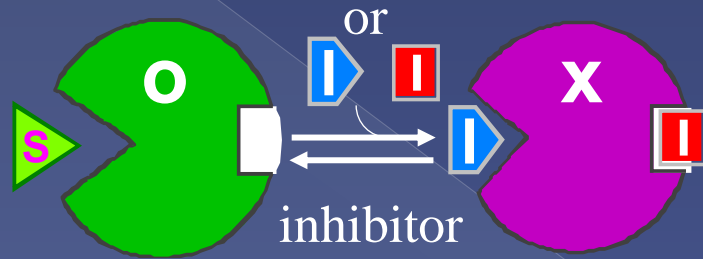
Augmentent l'affinité de l'enzyme pour le substrat, lui permettant d'agir à de faible concentration en substrat.

Inhibiteurs allostériques

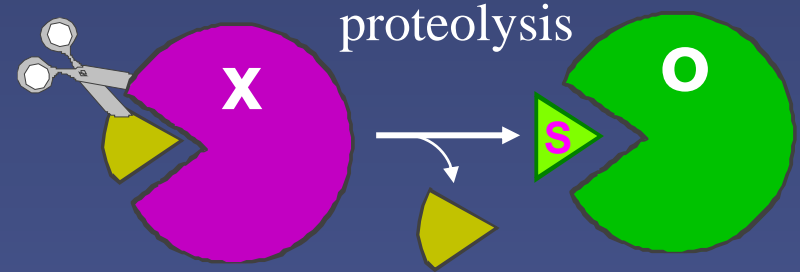
Comme les inhibiteurs compétitifs diminuent l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

Regulation of Enzyme Activity

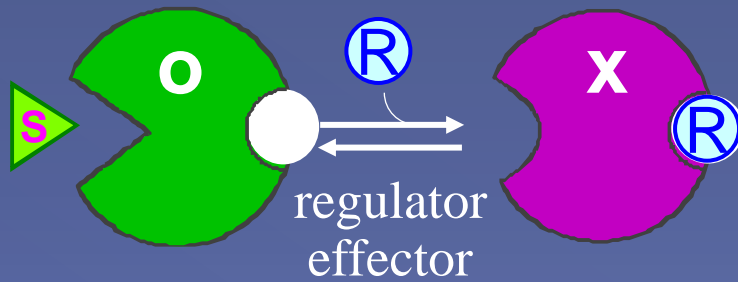
Inhibitor



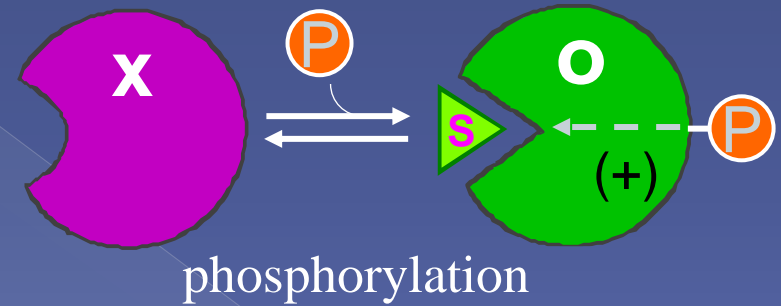
Proteolysis



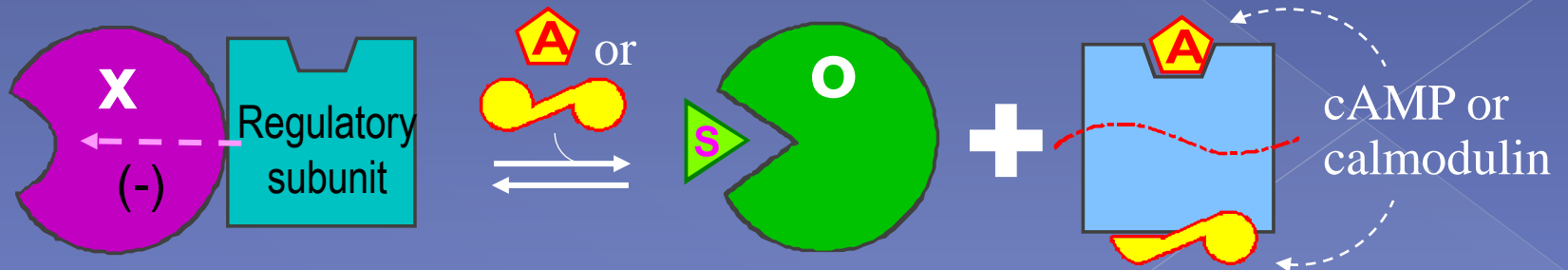
Feedback regulation



Phosphorylation



Signal transduction



Cofacteur

Corps chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique :

- pour transporter ou compléter un substrat ;
- pour accepter un produit ;
- comme participant à la structure de l'enzyme.
- Les cofacteurs peuvent être des ions
- Certains cofacteurs sont des molécules plus complexes synthétisées par les cellules : nous les appellerons coenzymes.

Coenzymes

Molécule biologique intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction :

- les coenzymes libres interviennent dans la réaction de manière stoechiométrique ;**
- les coenzymes liés interviennent dans la réaction de manière catalytique.**

Exemples de coenzymes :

- La biotine (vitamine H), un cofacteur de carboxylases. Elle joue un rôle dans la néoglucogenèse. La biotine est fabriquée par des bactéries de la flore intestinale.
- la cobalamine (vitamine B12) : fabriquée par des bactéries, des champignons et des algues, elle est indispensable à la formation des cellules sanguines. Les végétaliens peuvent manquer de vitamine B12 car cette vitamine se trouve dans les viandes, poissons, œufs, laitages.
- Le coenzyme A, dérivé de la vitamine B5 (acide pantothénique). Dans l'organisme, le coenzyme A est souvent associé à un groupement acétyl pour former l'acétyl-coenzymeA ou acétyl-CoA. L'acétyl-coA produit de la glycolyse anaérobie ; c'est un intermédiaire important dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines.

- Le coenzyme Q10 ou ubiquinone : ce coenzyme joue un rôle important dans la formation d'ATP dans la mitochondrie. Le coenzyme Q10 existe sous forme de compléments alimentaires, utilisés par les sportifs, mais aussi contre des troubles cardiovasculaires. Antioxydant, il est aussi présent dans des crèmes anti-âge.
- Les coenzymes nicotinamide NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et **NADP** (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), deux cofacteurs de réactions d'oxydoréductions. NAD^+ est un agent d'oxydation et NADH (associé à proton H^+), un agent de réduction. Le système NADH/H^+ a pour fonction de transférer des électrons. Ces coenzymes dérivent de la vitamine B3 Nicotinamide
- Le FAD (flavine adénine dinucléotide), FMN (flavine mononucleotide) qui dérive de la riboflavine (vitamine B2).

Enzymes et pathologie

Le fonctionnement normal de l'organisme vivant est le résultat de l'action harmonieuse de tous les systèmes enzymatiques

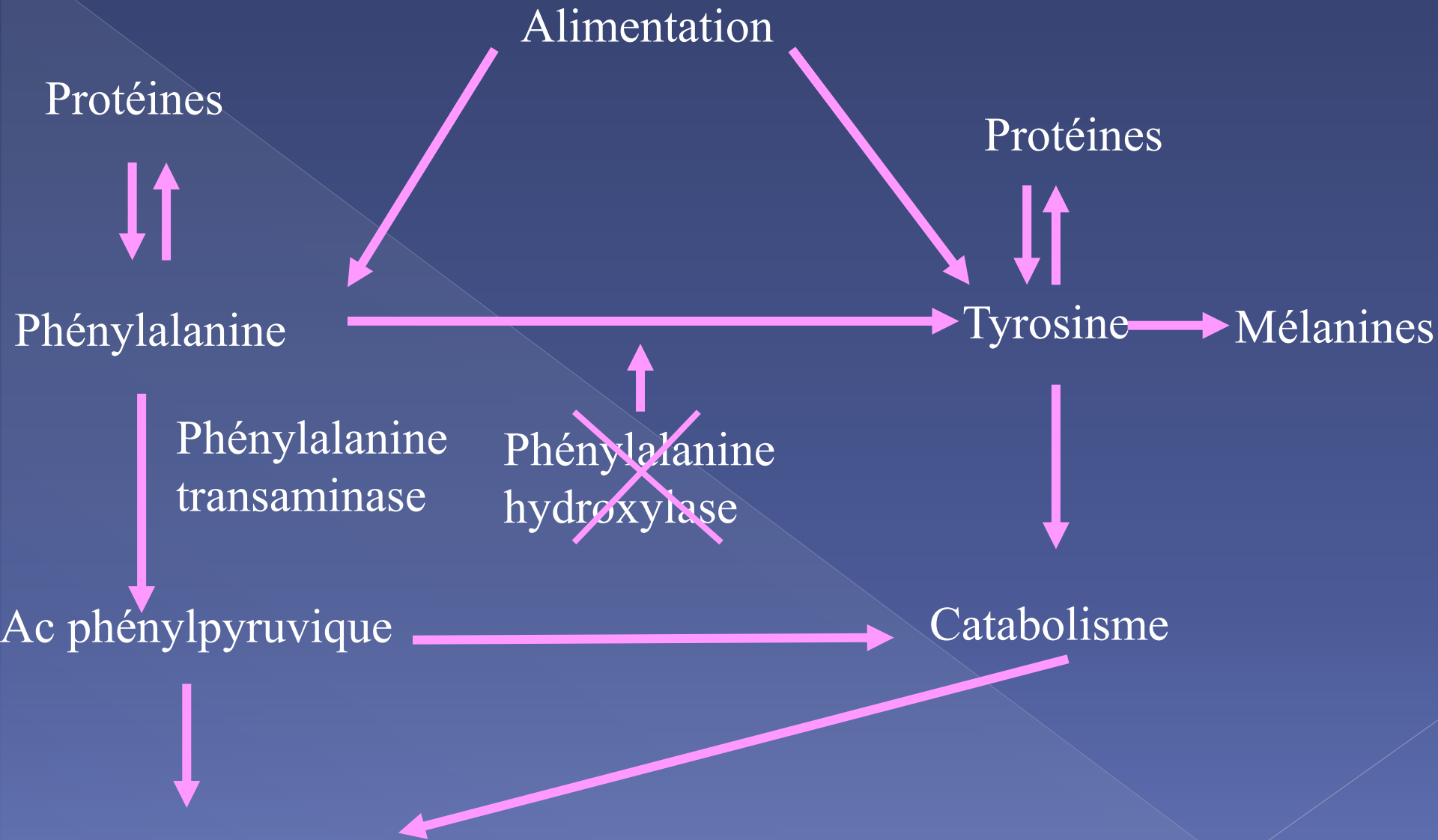
L'enzymologie s'est d'abord introduite en clinique par le biais de l'analyse des enzymes dans les humeurs, les sécrétions et même les tissus ce qui révèle parfois des anomalies pathologiques

Une activité phosphatasique acide dans le sérum sanguin est caractéristique du cancer de la prostate et l'abondance d'amylase signe la pancréatite hémorragique aigue

La présence dans certains enzymes dans le sérum est le signe d'une nécrose tissulaire importante : l'identification de ces enzymes permettra de localiser la nécrose et surtout leur dosage permettra d'en mesurer l'étendue :

Dans l'infarctus du myocarde, il y a une augmentation de la glutamate-oxaloacétate-transaminase, de la créatine-phosphokinase et de la lactate-déshydrogénase

Dans l'hépatite virale il y a augmentation des activités des glutamate-pyruvate et glutamate-oxaloacétate transaminase, de la phosphatase alcaline et de la leucine aminopeptidase.



Métabolisme de la phénylalanine expliquant les perturbations biochimiques de la phénylcétonurie

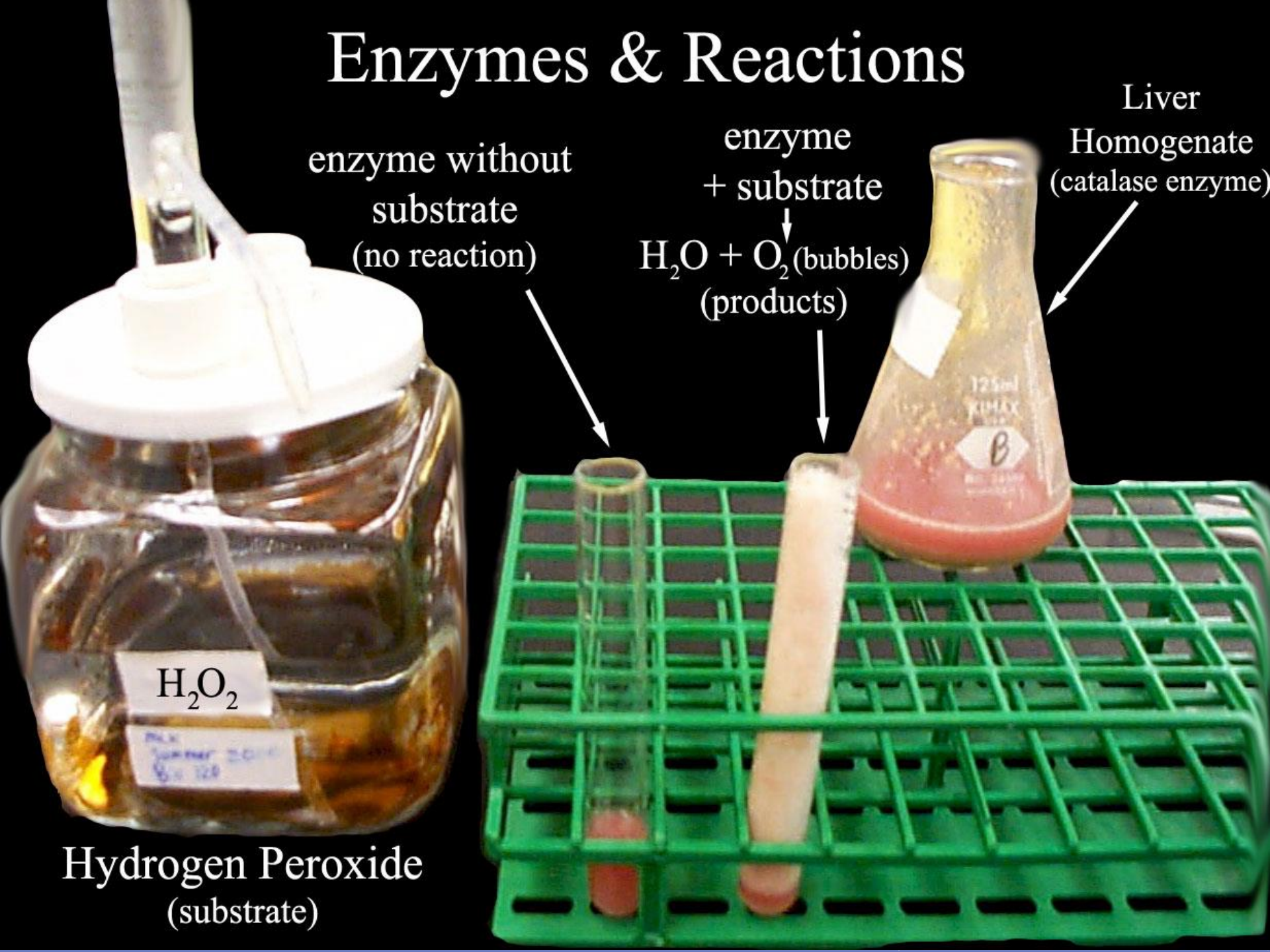
Conclusion:

Les enzymes sont des protéines douées de propriétés de catalyseurs des réactions biochimiques du métabolisme.

Pour chaque enzyme, on peut définir une réaction chimique associée et le plus souvent un substrat caractéristique.

Ces propriétés sont la clé qui permet aux enzymes d'accomplir une grande partie du métabolisme des organismes vivants en réalisant les réactions

Enzymes & Reactions



enzyme without
substrate
(no reaction)

enzyme
+ substrate
↓
 $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (bubbles)
(products)

Liver
Homogenate
(catalase enzyme)

H_2O_2

Hydrogen Peroxide
(substrate)

Des questions??

