

ENZYMOLOGIE

Pr Layachi CHABRAOUI

Pr Wafae KABBAJ

Cours 1^{ère} Année Médecine

Rabat 2011-2012

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).

Introduction

Les organismes vivants sont le siège d'innombrables réactions biochimiques. Ces réactions constituent le métabolisme c'est à dire la biosynthèse et 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 des **enzymes**

Sans la présence des enzymes, la vie serait impossible

Les enzymes ont donc un rôle vital

Contenu du cours

- **Structure et propriétés des enzymes**
- **Cinétique enzymatique**
- **Mécanisme de la réaction enzymatique**

Chapitre 1

Structure des enzymes

Objectifs: à l'issu de l'enseignement l'étudiant doit être en mesure de:

- Expliquer les différents types de classifications des enzymes et dresser les différents groupes
- Décrire la structure des enzymes et des coenzymes
- Expliquer le mode d'action des enzymes
- Citer les facteurs qui influencent la cinétique enzymatique
- Expliquer le mode d'action des différents facteurs influençant la cinétique enzymatique

1- Définitions

1.1- Les enzymes

Des protéines spécialisées dans la catalyse de réactions.

⇒ **Catalyseurs biologiques** très puissants

Elles augmentent la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier l'équilibre.

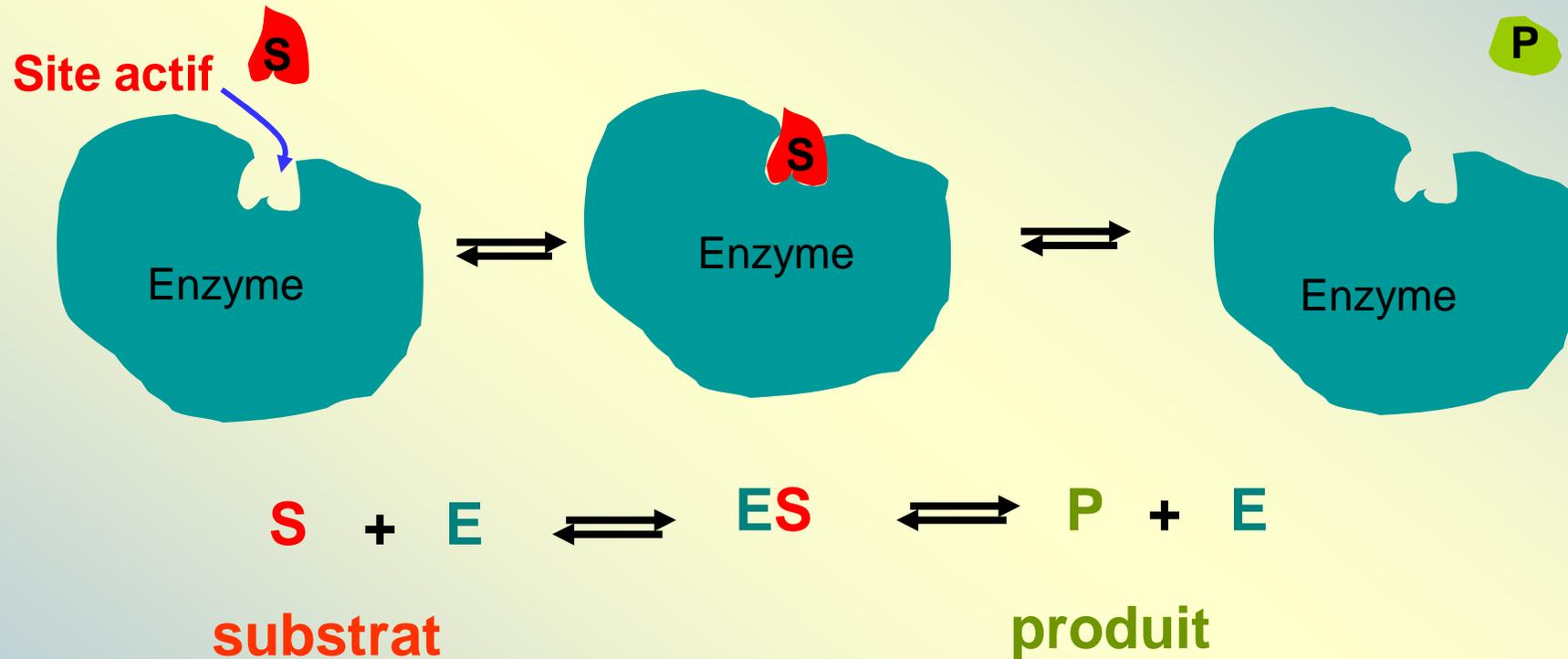


Les protéines enzymatiques sont synthétisées par des êtres vivants. Cette synthèse est déterminée génétiquement.

Chaque **enzyme** est le produit d'expression d'**un gène**
Parfois **2 gènes**

1.2- Un substrat (S): est la molécule qui est transformée sous l'action de l'activité de l'enzyme

1.3- Un produit (P): est la molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par l'enzyme

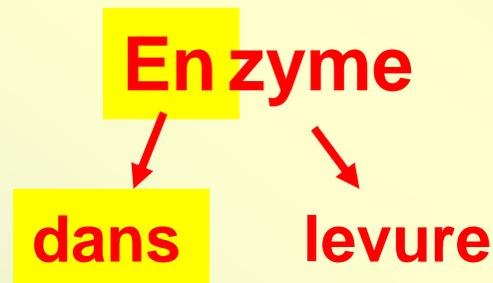


1.4- Le site actif : la partie de l'enzyme qui fixe le substrat.

2- 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



1897: Buchner a extrait de la levure les premières enzymes

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



Depuis, plus de 3000 enzymes sont décrites

3- PROPRIÉTÉS ET CARACTÉRISTIQUES DES ENZYMES

3.1- Agissent en très faible quantité:

une molécule de catalase peut hydrolyser 5 millions de molécules d'H₂O₂ en une min dans des conditions de pH et de température physiologiques

3.2- Ne sont pas consommées au cours de la réaction:

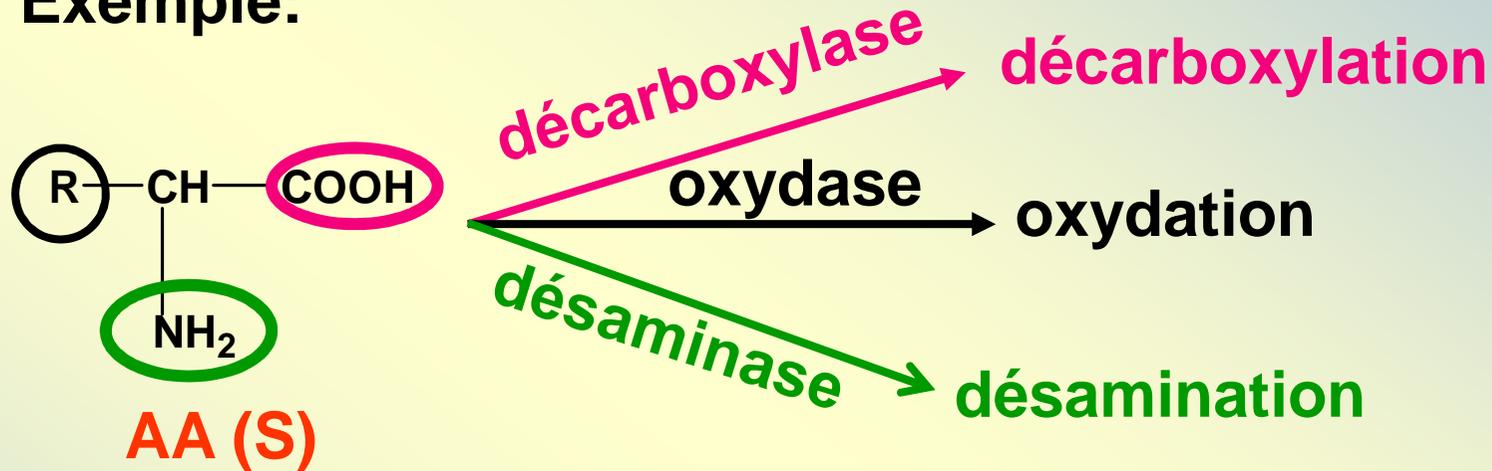
comme les catalyseurs chimiques, elles se retrouvent intactes à la fin de la réaction

3.3- Sont spécifiques:

Une enzyme transforme un S donné (spécificité de substrat**) grâce à une réaction donnée (**spécificité de réaction**)**

Spécificité liée à la réaction : Spécificité étroite

Exemple:



Spécificité vis à vis du substrat: HK et GK

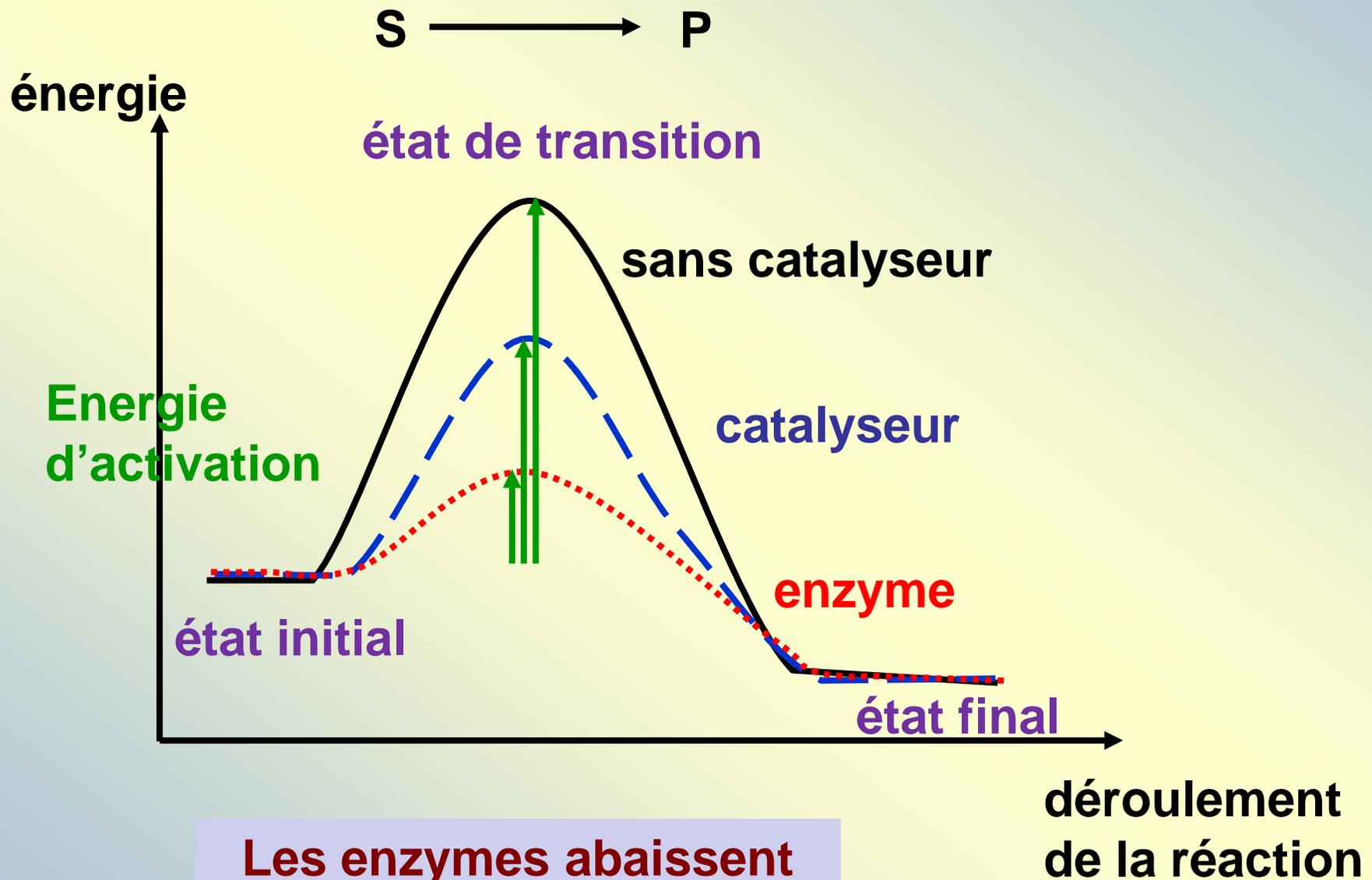
Spécificité étroite

Certaines E peuvent distinguer entre la forme D et L
ou entre la forme α et β = stéréospécificité

Spécificité large HK, PAL



3.4- Mode d'action des enzymes



exemple



Sans catalyseur : 18 kcal/mole d'H₂O₂

Catalyseur chimique (le platine) : 11,7 kcal/mole d'H₂O₂

Enzyme (catalase) : 2 Kcal/mole d'H₂O₂

Les enzymes abaissent l'énergie d'activation

Elles ne modifient pas l'équilibre

Elles augmentent la vitesse de réaction

3.5- Les enzymes sont régulables

L'activité catalytique de nombreuses enzymes varie en réponse à des signaux métaboliques (inhibiteurs, activateurs)

4- Structure des enzymes

- Enzymes entièrement protéiques



ex:
Chymotrypsine

holo / **protéines**

totalité

- Enzymes formées de deux parties

hétéroprotéines



cofacteur

apoenzyme

Une partie protéique: apoenzyme

Une partie non protéique: **cofacteur**

- ion métallique

- coenzyme, groupement
prosthétique

Apoenzyme: intervient dans la spécificité, thermolabile

Cofacteur: effectue la réaction chimique, thermostable

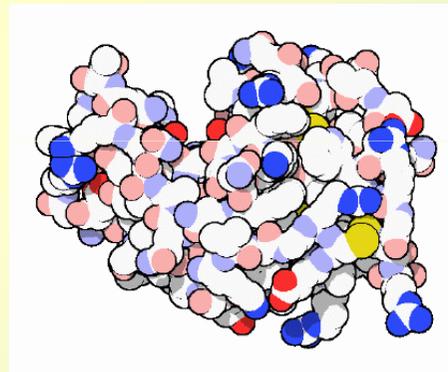
4.1- Les enzymes holoprotéiques:

Les enzymes sont des protéines globulaires.

Elles peuvent être formées:

- d'une seule chaîne polypeptidique

Exemple: le lysozyme



- de plusieurs chaînes identiques ou différentes

Exemples: Isoenzymes (LDH, CPK)

enzymes allostériques

4.1.1- Le site actif

- **Définition:** = acides aminés qui entrent en contact avec le S

site actif {
- le site de fixation qui se combine au substrat
- le site catalytique qui agit sur le substrat pour lui faire subir la réaction chimique.

- **Constitution:** serine, cystéine, histidine, tyrosine



- **Mise en évidence des AA du site actif:**

a- Utilisation des composés qui se fixent spécifiquement à un AA

Diisopropylfluorophosphate (DFP): Serine

Parachloromercuribenzoate: Cystéine

Dérivés arsenicaux: Cystéine

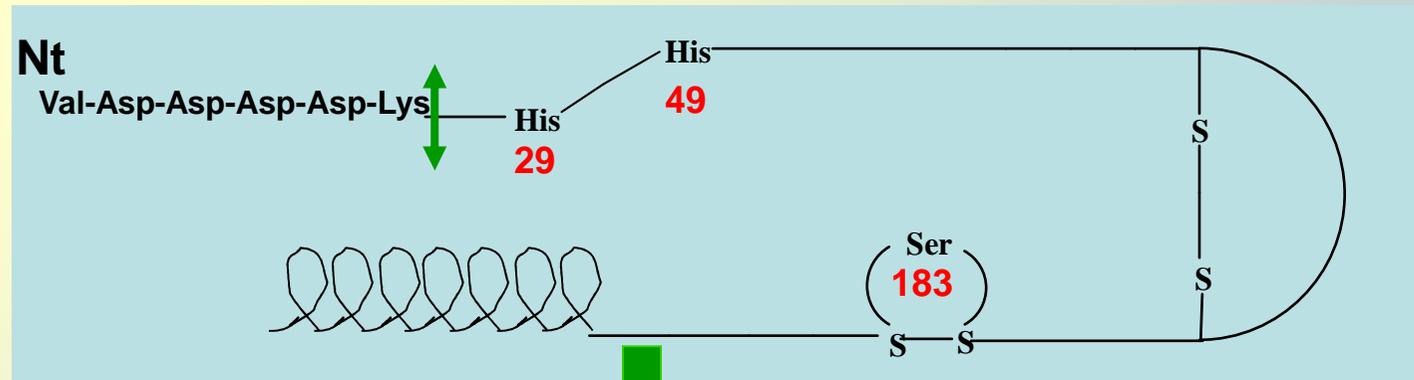
b- Méthodes de génie génétique

4.1.2- Relation entre la structure spatiale et la fonction catalytique

Exemple : la trypsine: enzyme pancréatique

Zymogène

Trypsinogène
(inactif)

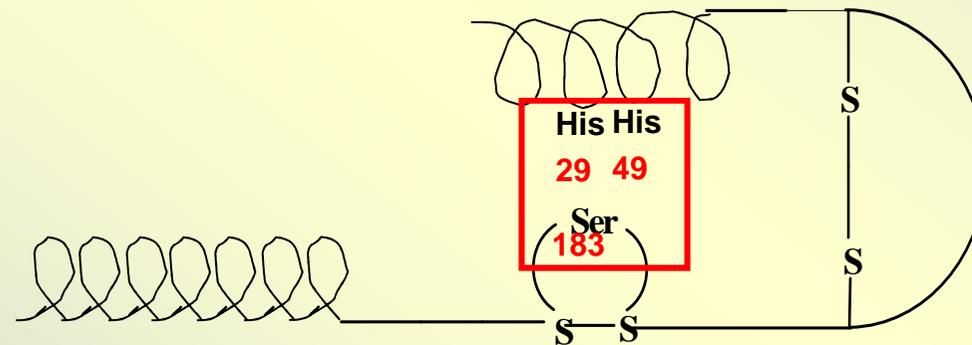


entérokinase : E intestinale

Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys +

Site actif

Trypsine
(active)



Le départ de l'hexapeptide, **fortement chargé (-) par les 4 Asp**, modifie la conformation de la protéine, en favorisant la formation d'hélice α .

4.1.3- forme du site actif

1890: Fischer a proposé que la forme du substrat est complémentaire de la forme du site actif de l'enzyme

= modèle de la clé et de la serrure

1958: Koshland a proposé que l'enzyme et le substrat adaptent mutuellement leurs formes respectives

Une molécule d'enzyme n'est pas rigide mais flexible

= modèle de l'ajustement induit

(comme la main et le gant)

4-2 Enzymes hétéroprotéiques: à Cofacteurs

- de nature inorganique: les ions métalliques,
- de nature organique: **les coenzymes**
 - Lorsque le coenzyme se lie à la protéine enzymatique par une liaison covalente, on parle de **groupement prosthétique**

- Lorsque la liaison est faible on parle de **cosubstrat**



4-2-1 Ions métalliques

Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ...

Exemples: Fer: les cytochromes

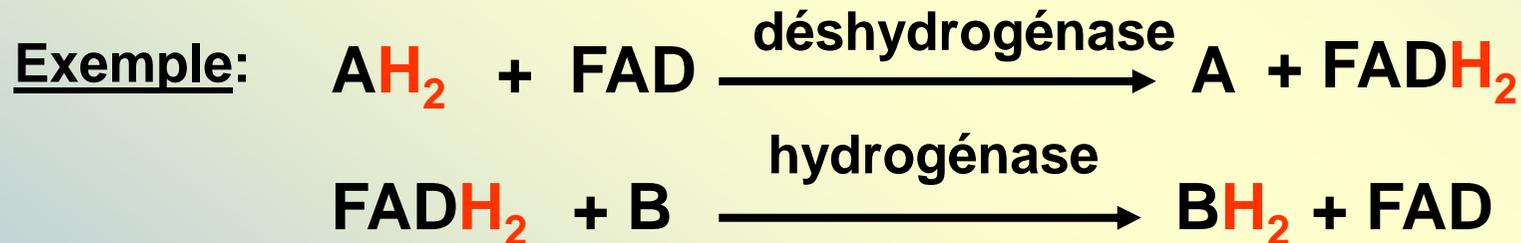
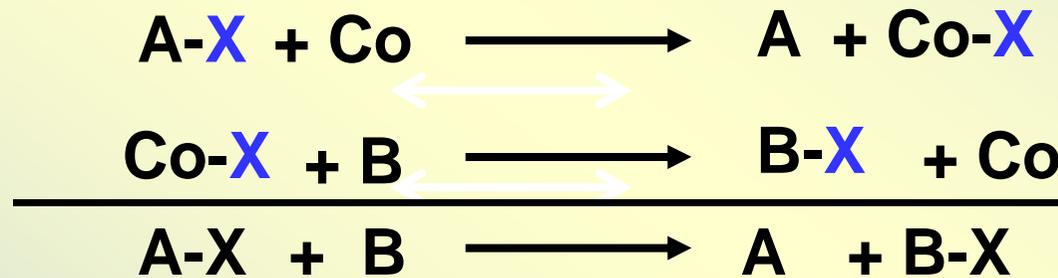
Zn^{2+} dans l'alcool déshydrogénase forme un pont entre l'enzyme et son substrat

4-2-2 Coenzyme

Molécule indispensable à la réaction enzymatique. La **réaction** se produit avec le coenzyme et non avec la protéine (coenzyme = **site catalytique**)

L'apoenzyme intervient dans la **spécificité (site de fixation)**

Mode d'action des coenzymes



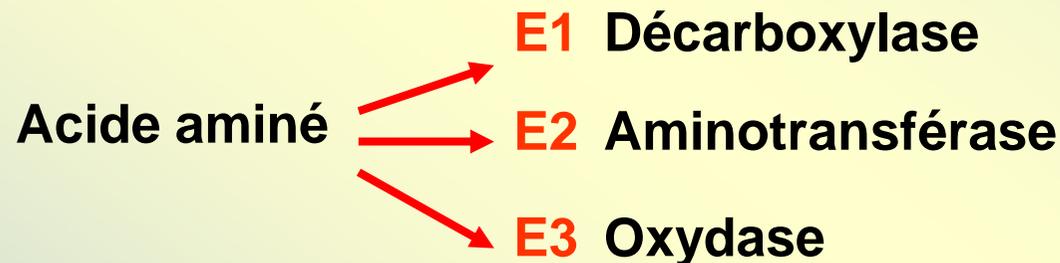
Le coenzyme n'est pas spécifique: plusieurs enzymes différentes peuvent avoir le même coenzyme

certaines enzymes ont besoin d'un ion métallique et d'un groupement prosthétique: cas des cytochromes: noyau porphyrrique + Fe^{2+}

5- 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

5.2- Les transférases

catalysent le transfert de groupement autre que l'hydrogène entre deux substrats

nécessitent un coenzyme



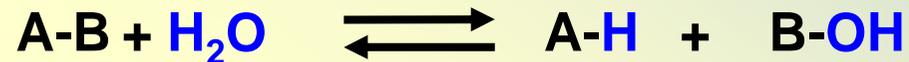
- les transaminases: transfèrent les radicaux aminés $-NH_2$ d'un AA à un acide cétonique accepteur. Le coenzyme est le phosphate de pyridoxal.
- les phosphokinases ou kinases: transfèrent un P sur une molécule d'ADP. L'ion Mg^{++} est indispensable.



- 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 tetrahydrofolique.

5.3- Les hydrolases

Catalysent la rupture d'une liaison avec fixation des éléments d'une molécule d'eau.



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



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

- Les osidases: hydrolysent les osides

glucosidase, galactosidase

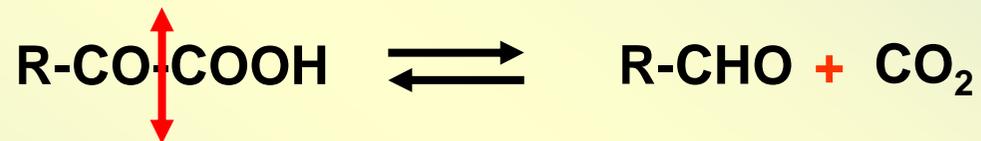
- Les enzymes protéolytiques: hydrolysent les liaisons peptidiques



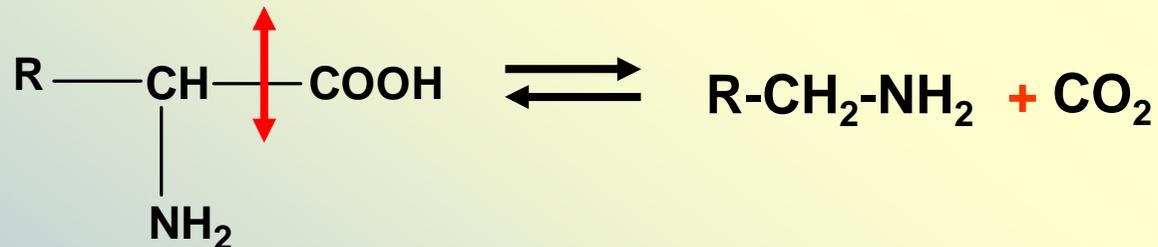
5.4- Les lyases

catalysent la rupture des liaisons C-C, C-N, C-O, C-S

- décarboxylase d'acide cétonique: le coenzyme est la thiamine pyrophosphate (TPP)



- décarboxylase d'acides aminés: le coenzyme est le phosphate de pyridoxal



**Cas de la pyruvate déshydrogénase: 5 coenzymes
TPP, NAD⁺, FAD, Coenzyme A et Lipoate**

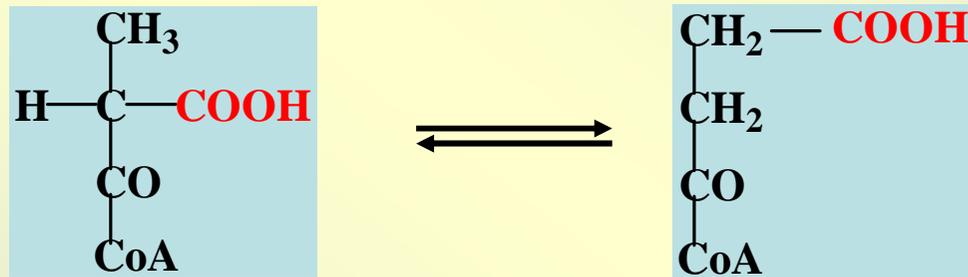
5.5- Les isomérases

catalysent le déplacement de groupes à l'intérieur d'une molécule sans que la formule brute varie

Epimérases: provoquent des interconversions d'oses



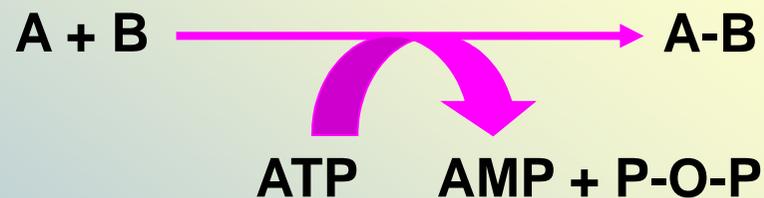
Mutases: catalysent le transfert d'un radical d'une partie d'une molécule à une autre



Methyl malonyl CoA

Succinyl CoA

5.6- Les ligases: catalysent la condensation de 2 molécules.



6- PRINCIPAUX COENZYMES

Origine des coenzymes

1- métabolisme (ATP, S adénosyl méthionine)

2- Vitamine (= amine vitale)

Un certain nombre de coenzymes dérivent de vitamines, notamment de vitamines hydrosolubles et en particulier les vitamines du groupe B

- Coenzymes intervenant dans les réactions d'oxydoréduction
(4 coenzymes)

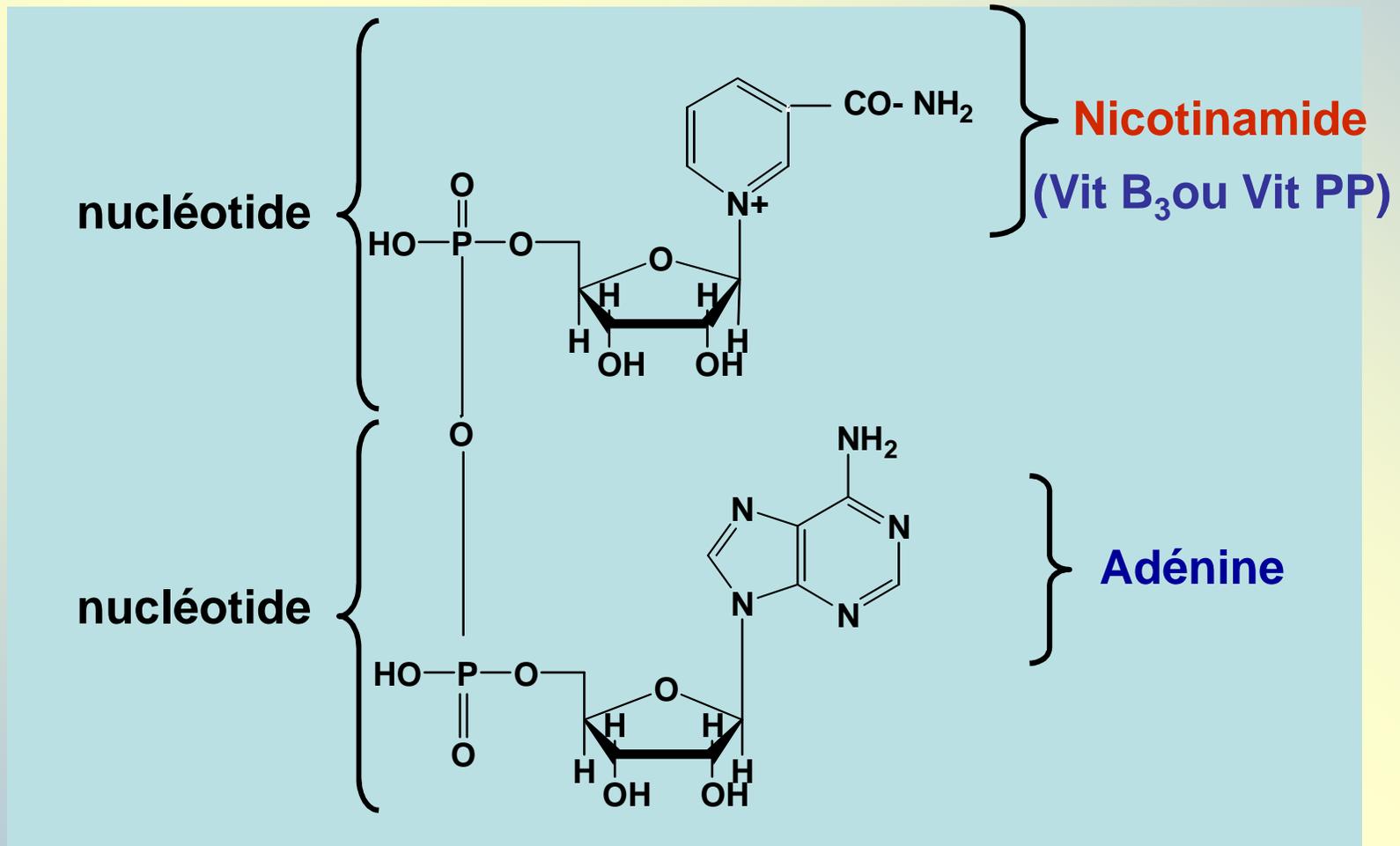
- Coenzymes intervenant dans le transfert de groupement
(6 coenzymes)

6.1- Coenzymes intervenant dans les réactions d'oxydoréduction

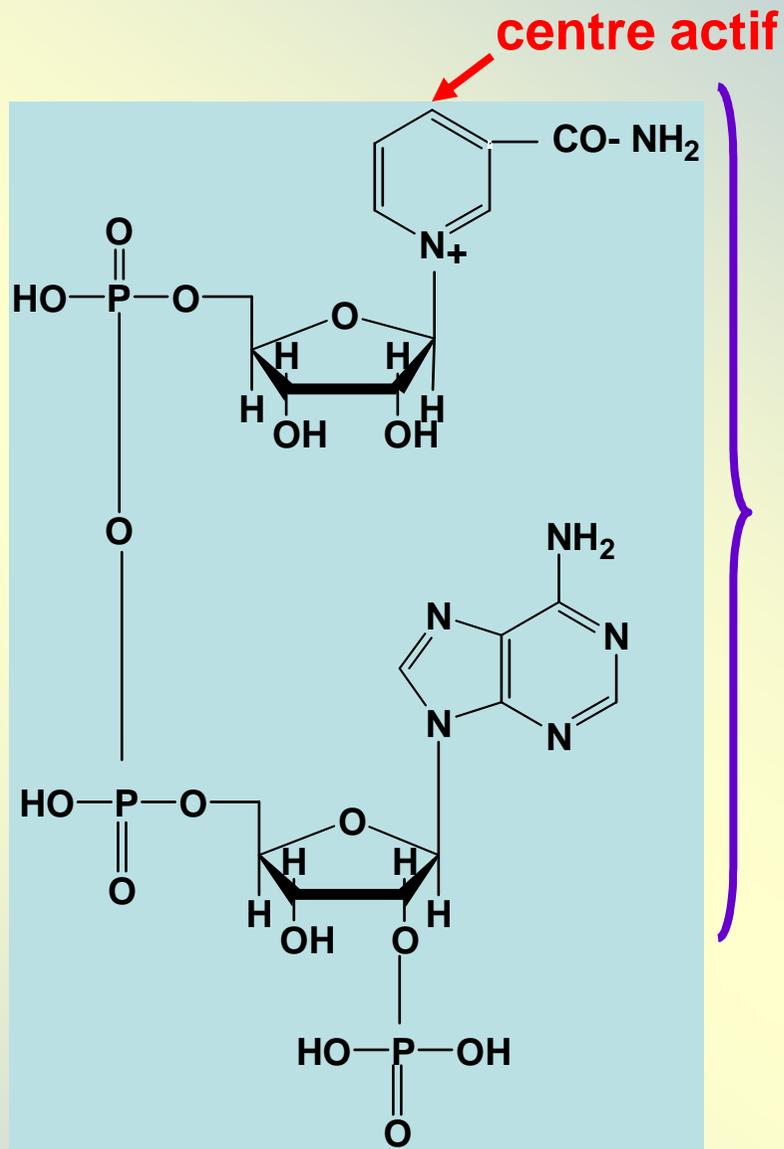
6.1.1- *Nicotinamide adénine dinucléotide* (NAD⁺) et NADP⁺

- Structure

NAD⁺

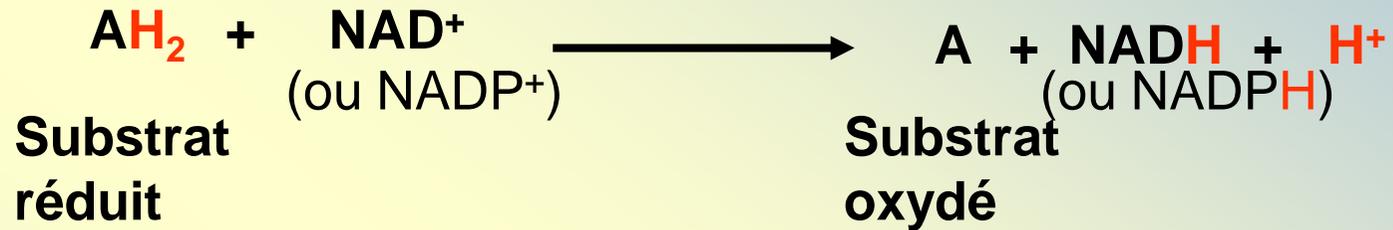


NADP⁺



NAD⁺

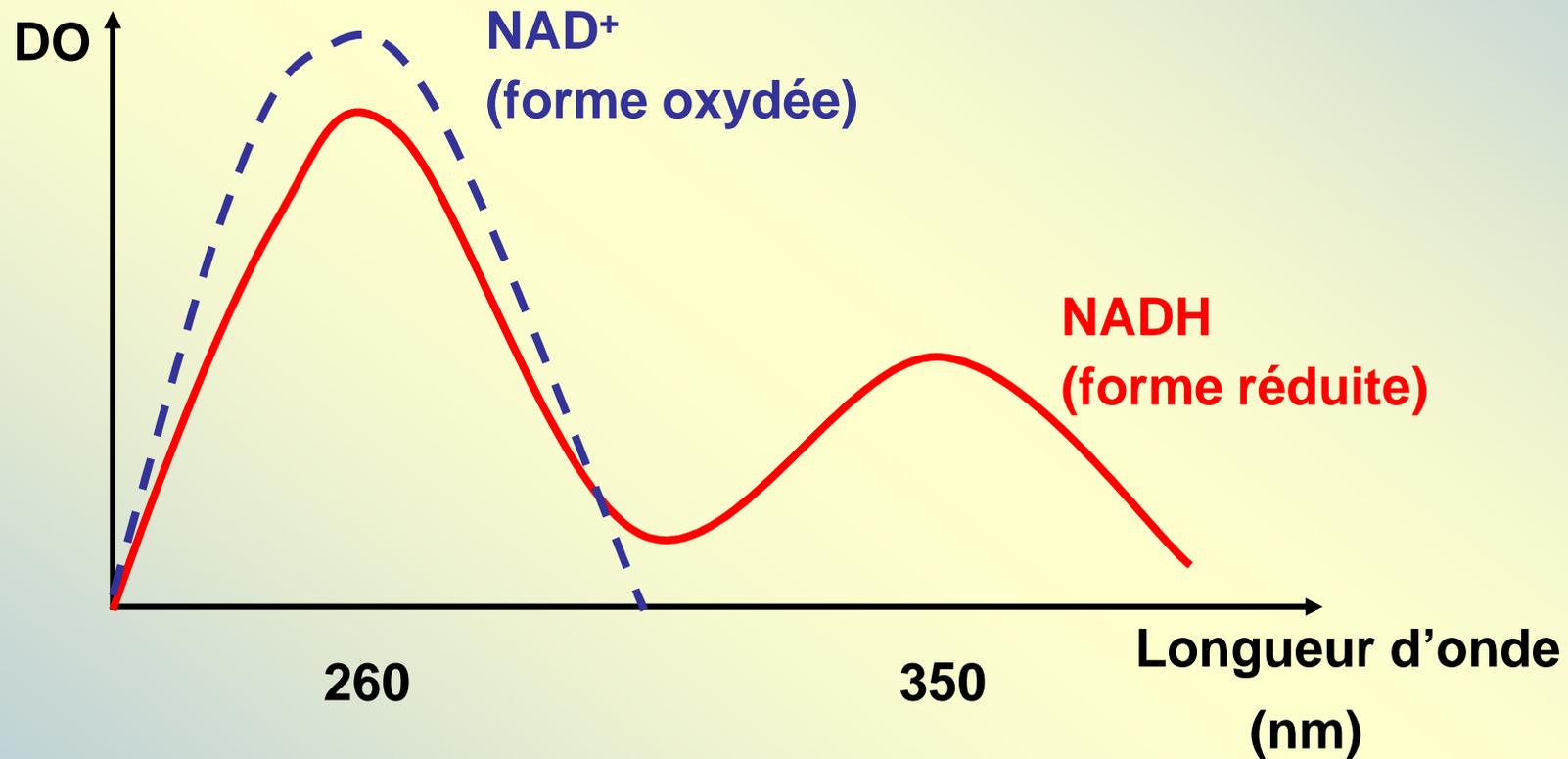
• Mécanisme réactionnel



Ce sont des coenzymes de
type **Cosubstrats**

● Spectre d'absorption

Mesure de la densité optique en fonction de λ



⇒ dosage des enzymes à NAD⁺ ou à NADP⁺

Exemple: **LDH**

- **Spécificité**

NAD⁺

Localisation mitochondriale

Coenzyme d'oxydation

NADP⁺

Localisation cytoplasmique

Coenzyme d'hydrogénation, de biosynthèse



La plupart des enzymes sont spécifiques soit du NAD⁺ soit du NADP⁺ sauf qq exceptions comme la glutamate déshydrogénase

- **Origine**

Le NAD⁺ et le NADP⁺ s'apparentent à la vitamine B₃ ou

PP

(pellagre preventive)

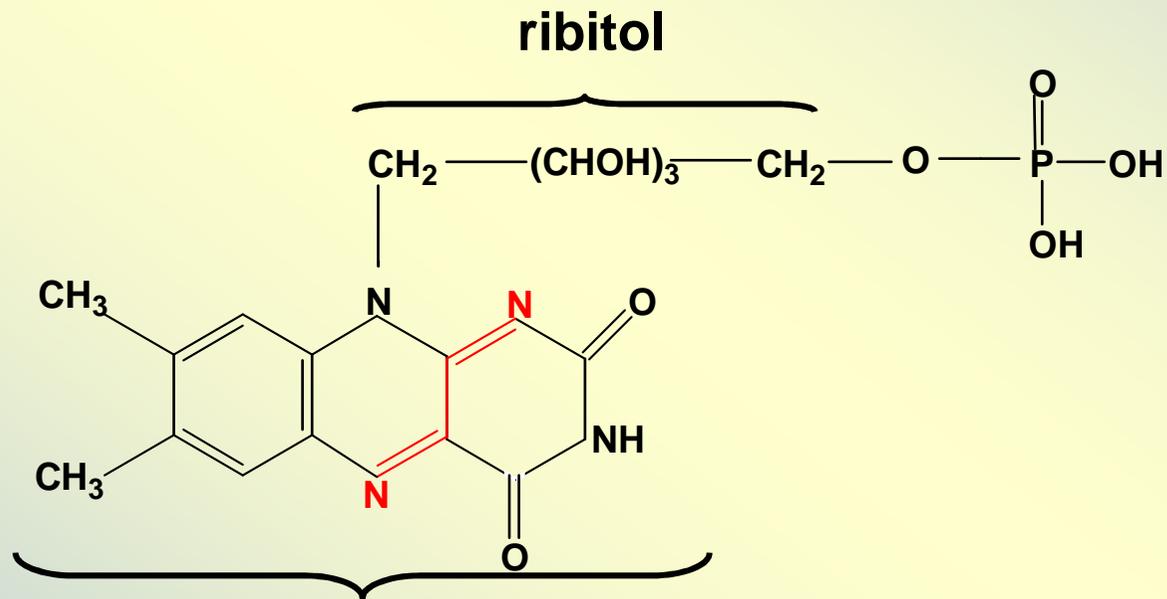
L'avitaminose PP entraîne une maladie appelée pellagre

6.1.2- Flavine mononucléotides (FMN) et Flavine adénine dinucléotide (FAD)

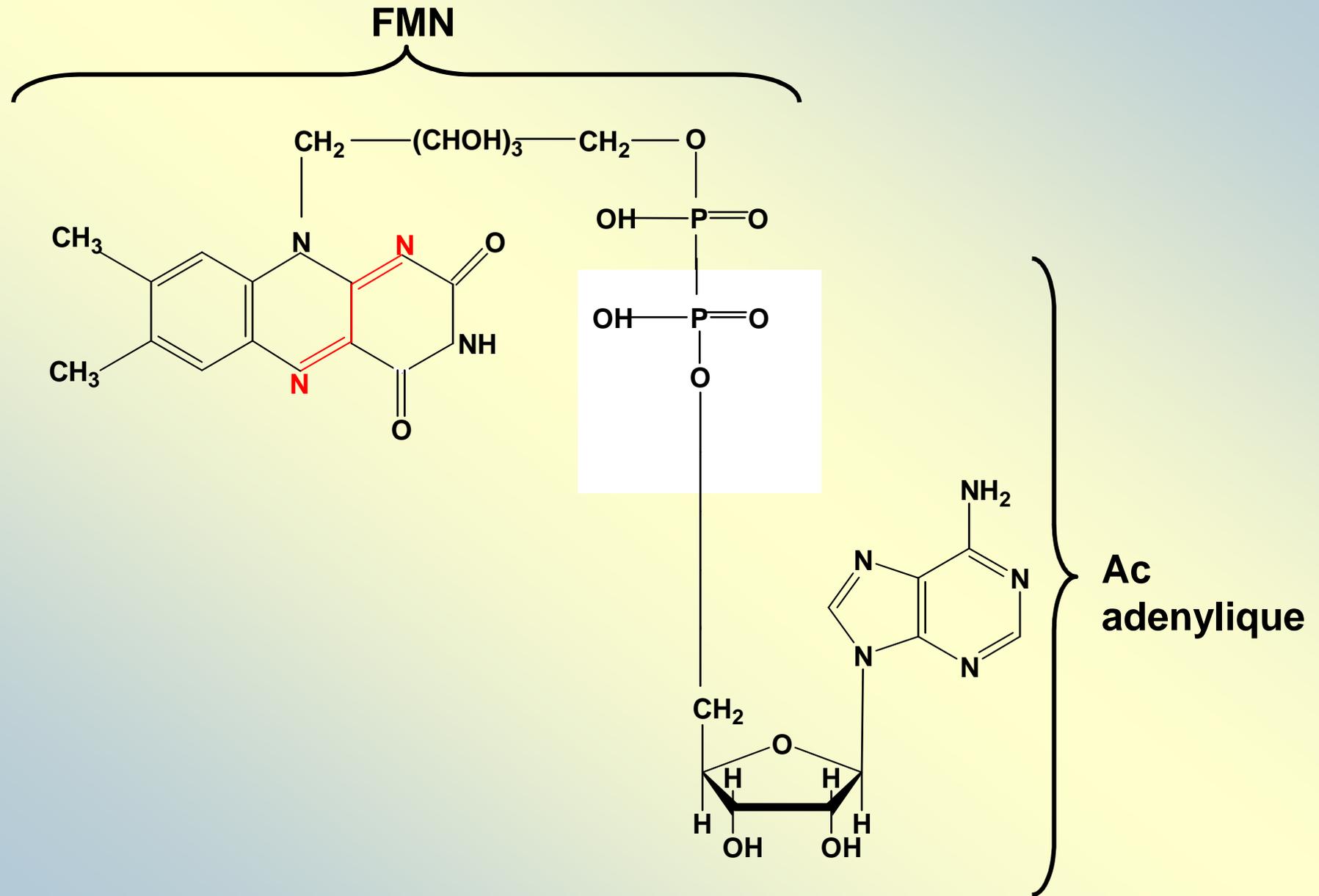
- Structure

Flavine mononucléotides:

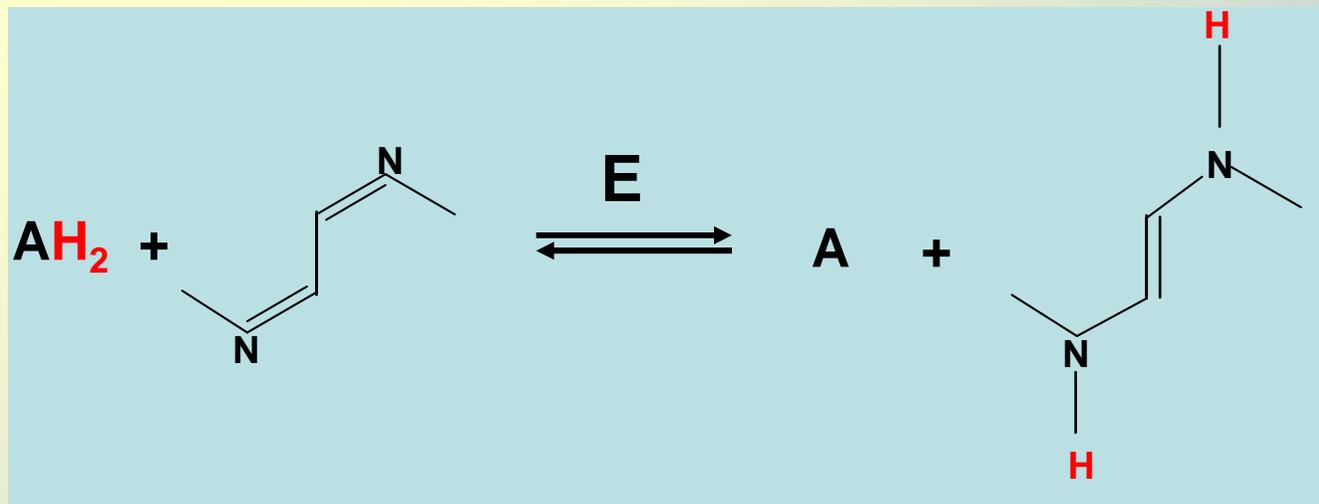
FMN



Flavine Adénine Dinucléotide: **FAD**



- Mécanisme réactionnel



FAD ou

FMN

jaunes

FADH₂ ou

FMNH₂

incolors

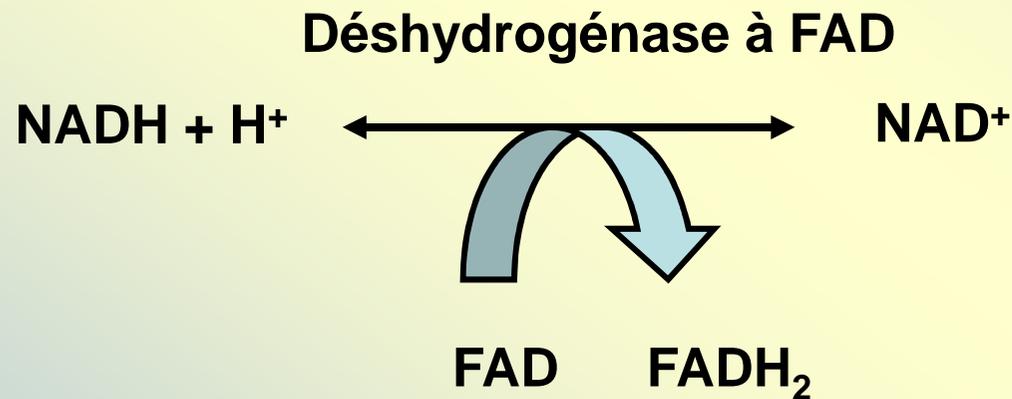
Les FMN et FAD sont appelés ferments jaunes

FMN et FAD sont liés à l'enzyme: **groupements prosthétiques**

- Origine

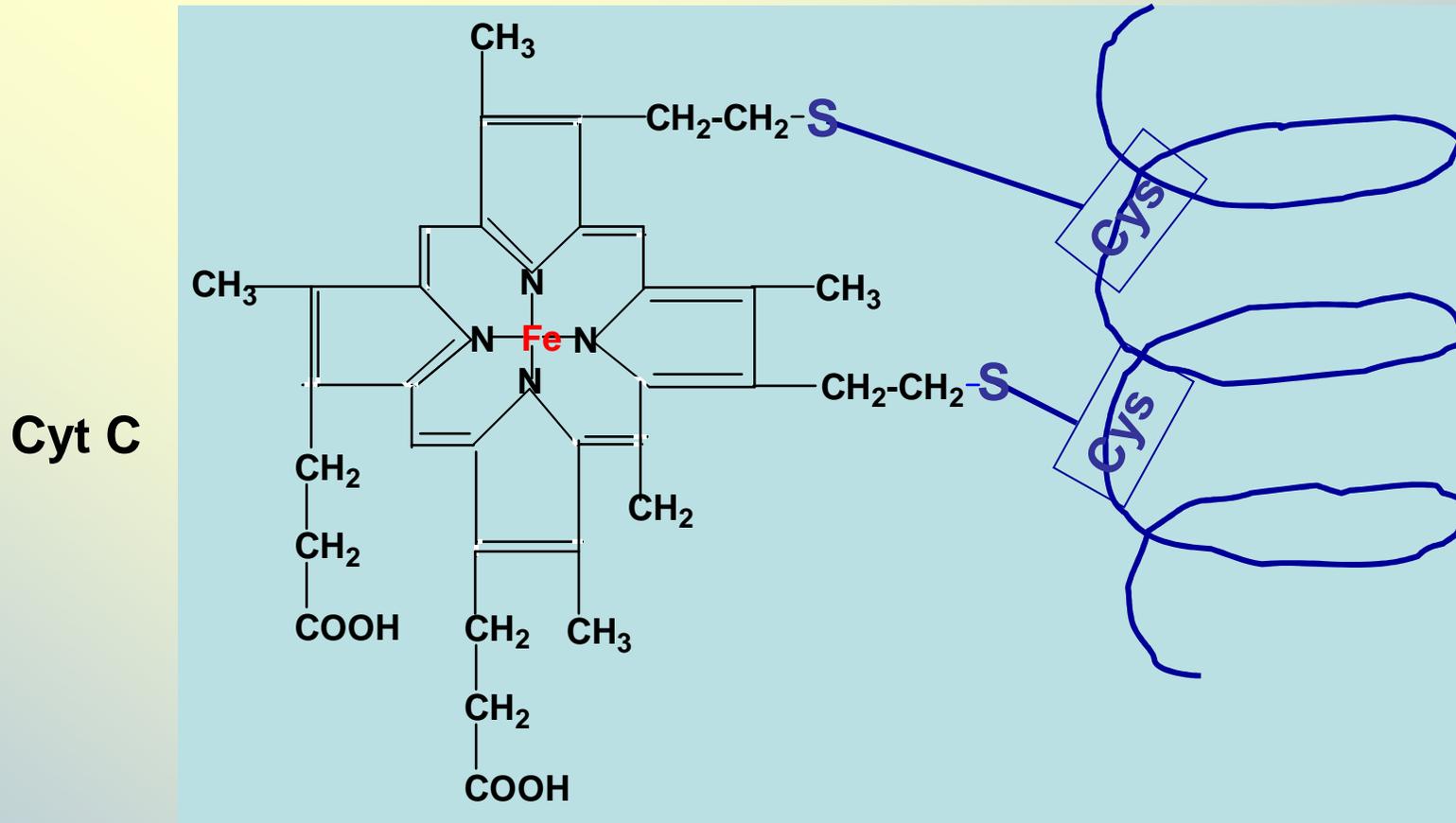
Le FAD et le FMN dérivent de la flavine ou vitamine B₂

Les déshydrogénases à FAD les plus importantes sont les NADH déshydrogénases qui permettent la réoxydation du NADH



6.1.3- Les ferroporphyrines: Coenzymes associés aux cytochromes grpt prosthétique + Fe

- Structure



- Rôle

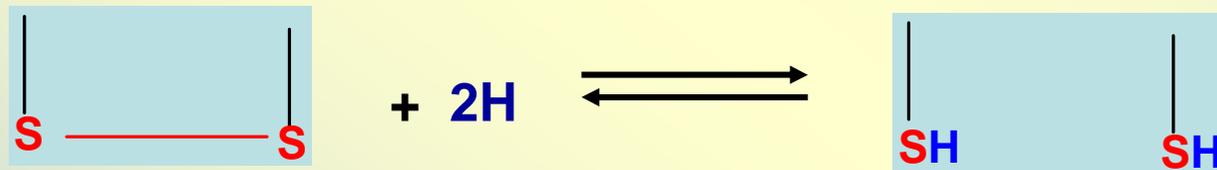
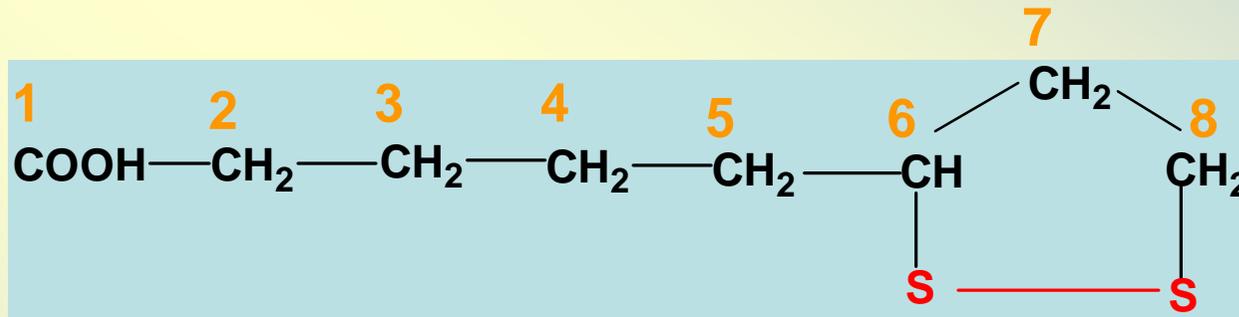
Jouent un rôle important dans le transfert d'électron



6.1.4- Acide lipoïque

- Structure

Ce coenzyme a la structure d'un Acide gras saturé à 8 C avec un pont disulfure entre C6-C8.



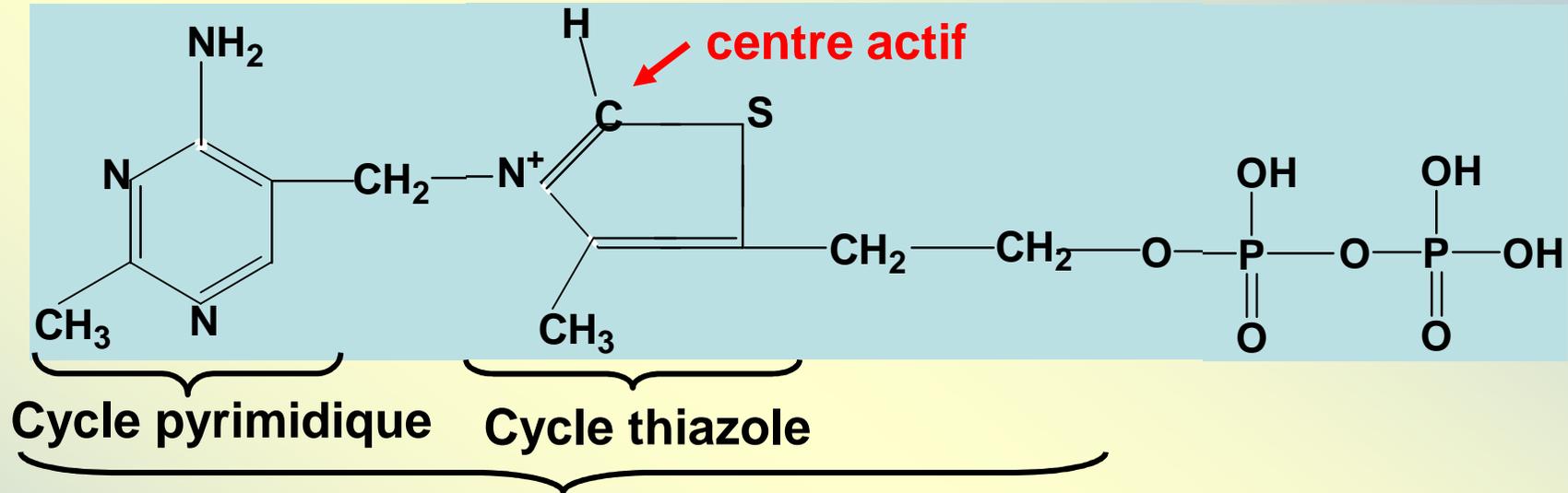
- Rôle: Transporteur d'H₂

L'acide lipoïque est attaché par covalence à l'enzyme par son carboxyle à un reste lysine de l'enzyme : **groupement prosthétique**

6.2- Coenzymes intervenant dans le transfert de groupement

6.2.1- Thiamine pyrophosphate (TPP)

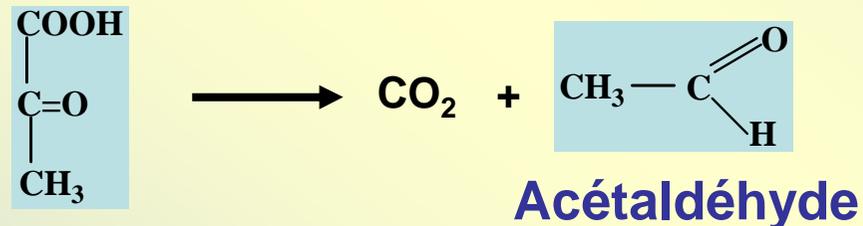
- Structure: dérivé de la vitamine B₁ ou thiamine



Thiamine = vitamine B₁

- Rôle: Transporteur d'acétaldéhyde dans les réactions de décarboxylation

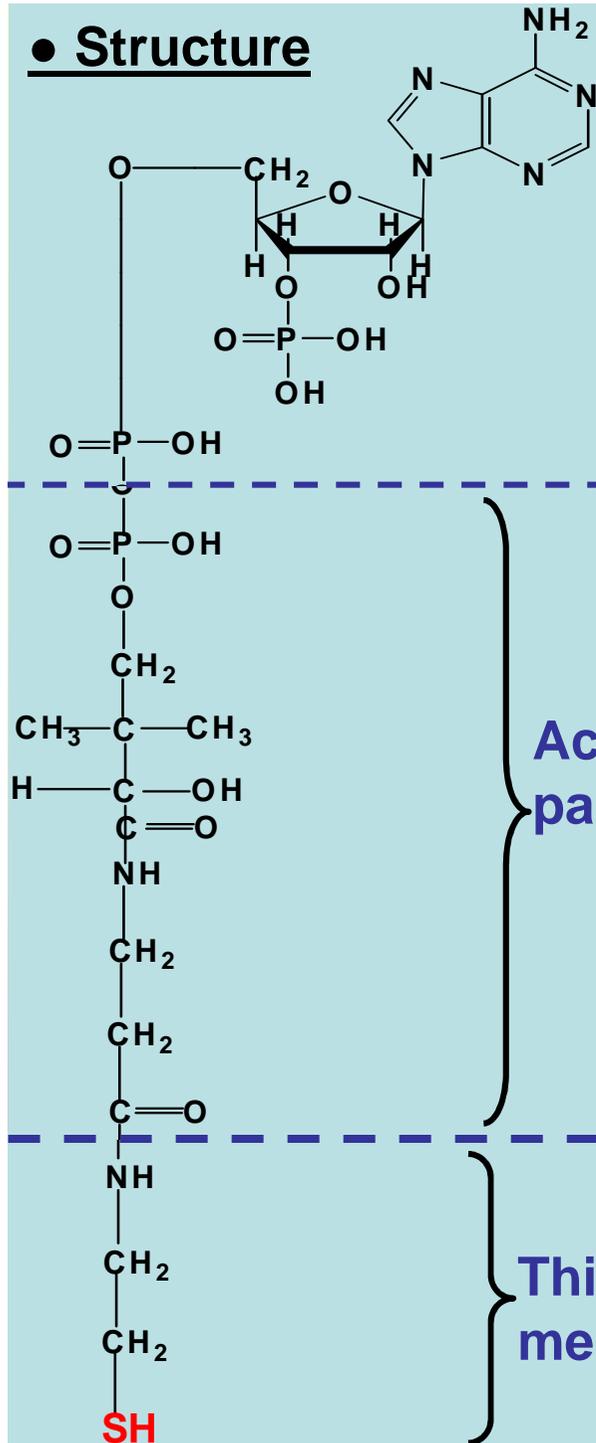
Ex: Pyruvate DH



Ac. pyruvique

La carence en vitamine B₁ entraîne une maladie : le Béri-béri

● **Structure**

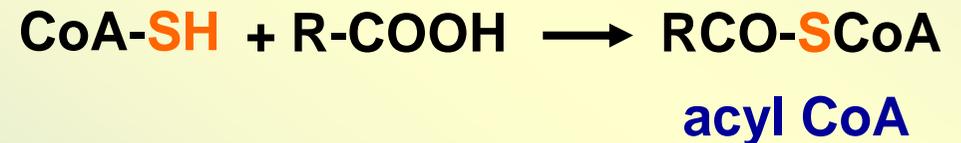
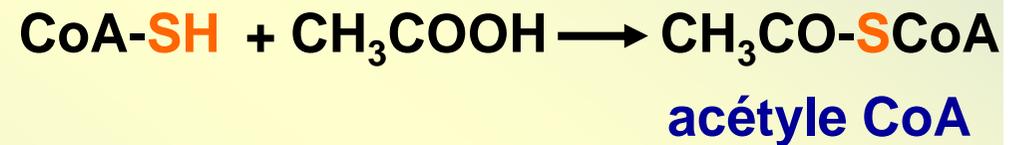


**6.2.2- Coenzyme A (CoA-SH) ou
Coenzyme d'Acylation**

Dérive d'une vit amine du
groupe B: ac pantothénique

● **Rôle**

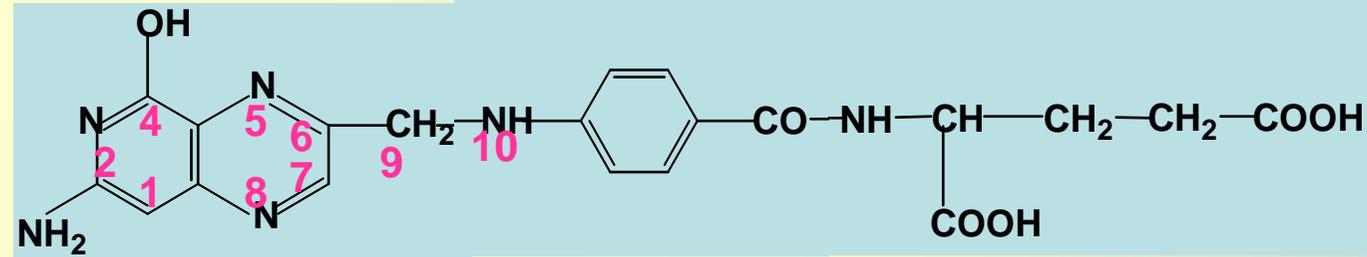
Transporteur d'acétyle et
d'acide gras



6.2.3- Acide tetrahydrofolique (FH₄)

- Structure: dérive de la vitamine B9: acide folique

Acide folique

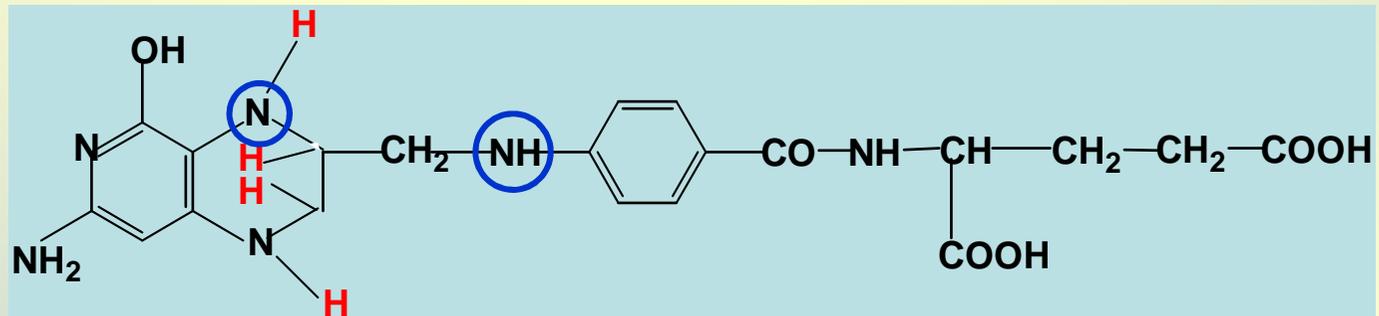


N. pteridine

Ac. Para amino
benzoïque

Glu

FH₄

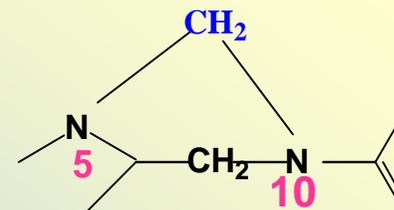


- Rôle : transporteur d'unités à un C (CH₃)

Sur N5

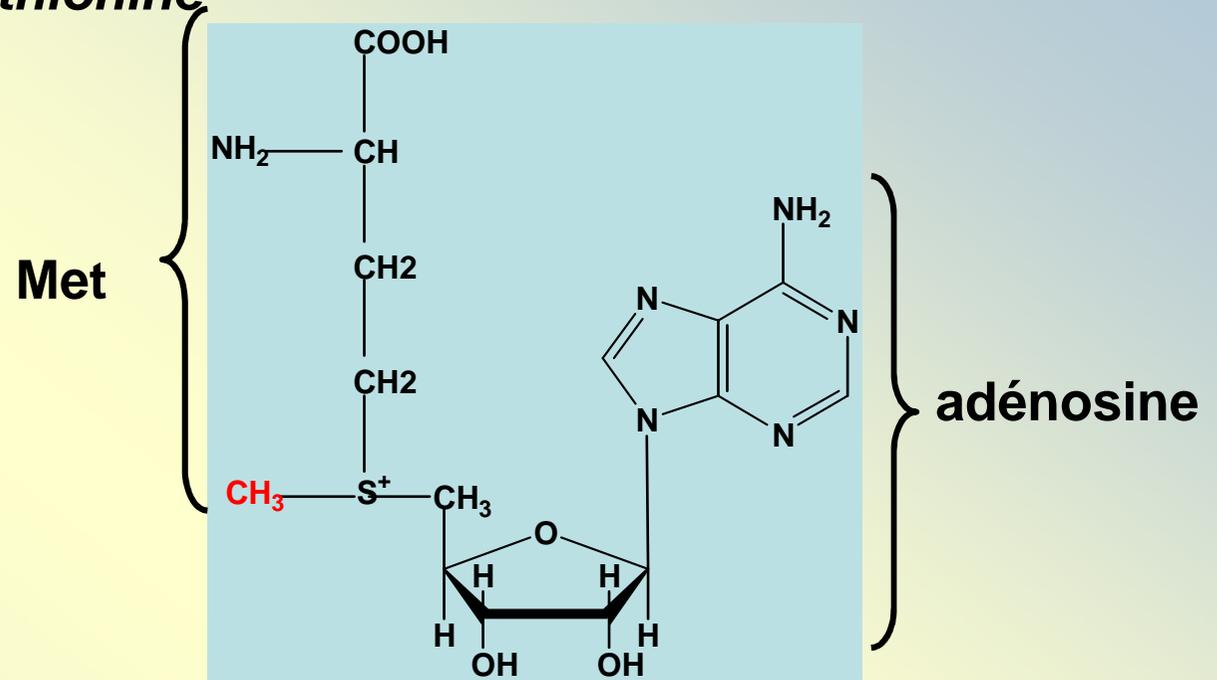
Sur N10

entre N5 et N10



6.2.4- S adénosyl méthionine

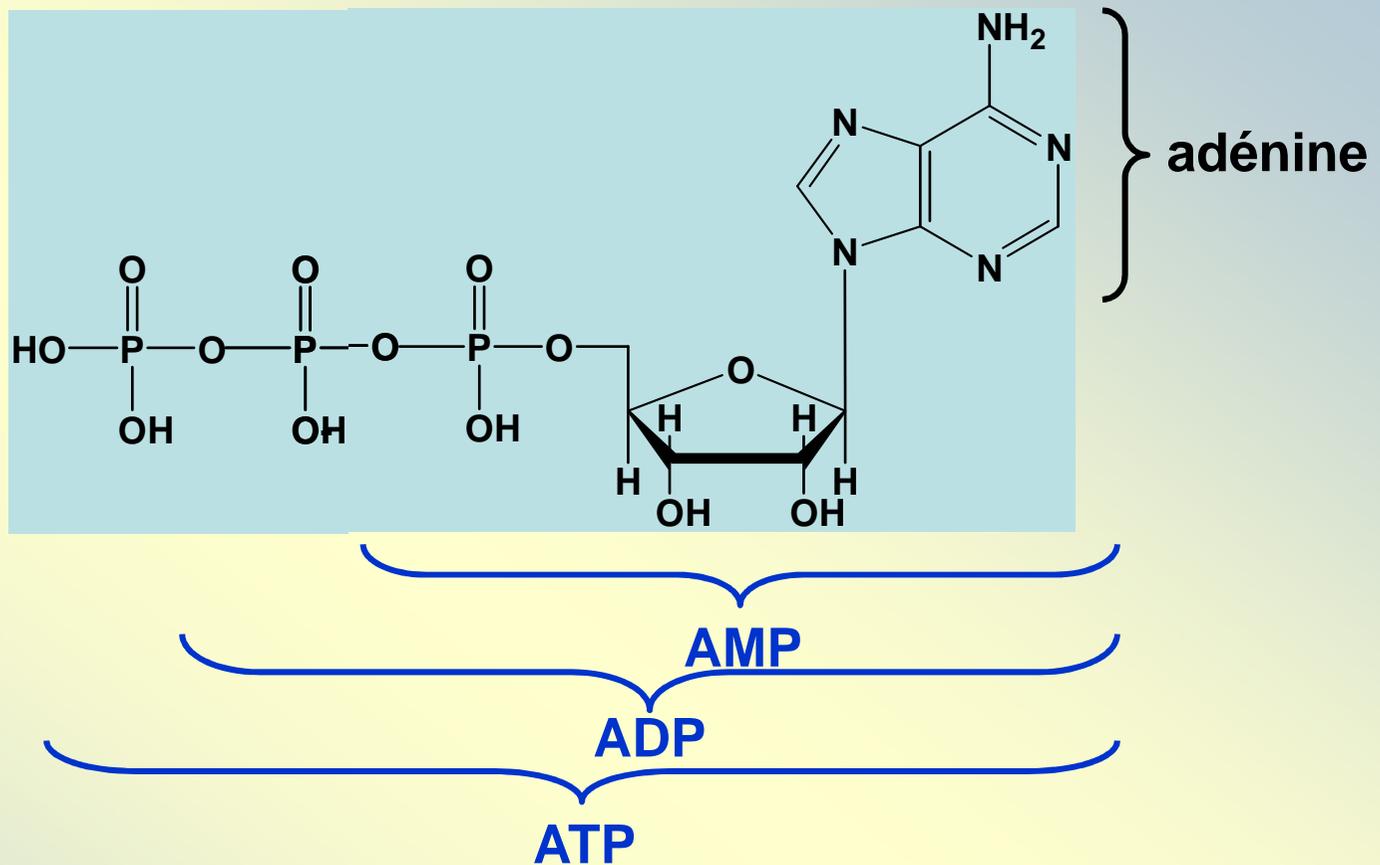
- Structure:



- Rôle: transporteur de radicaux méthyles (donneur)

6.2.5- Adénosine 5' triphosphate

- Structure:

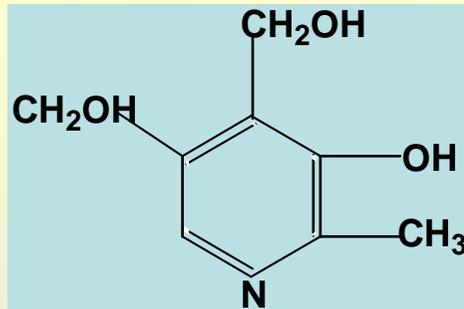


- Rôle: transfert de groupements



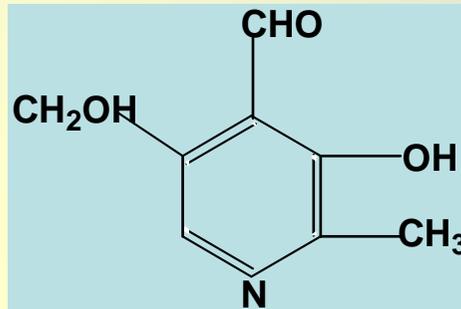
6.2.6- Phosphate de pyridoxal dérive de la vit B6

- Structure:

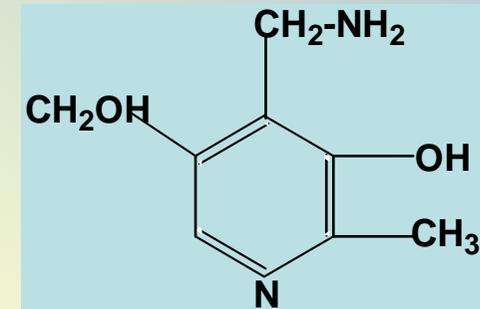


pyridoxine

= vit B₆



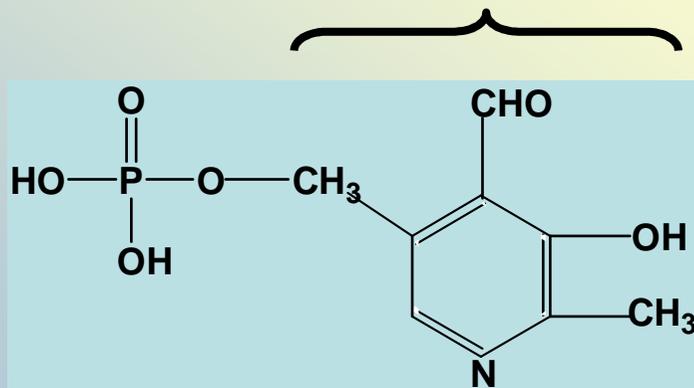
pyridoxal



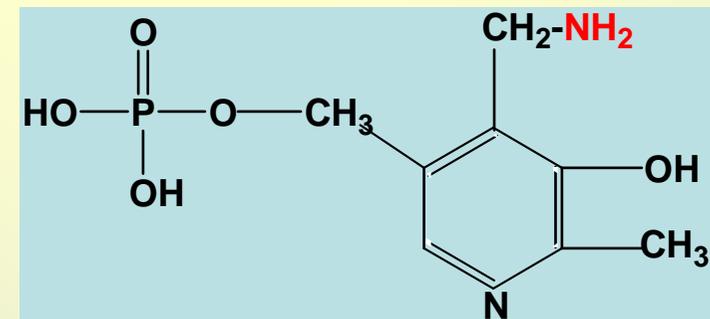
pyridoxamine

- Rôle: Transport de groupement aminé: **NH₂**

Pyridoxal = vit B₆



Phosphate de pyridoxal

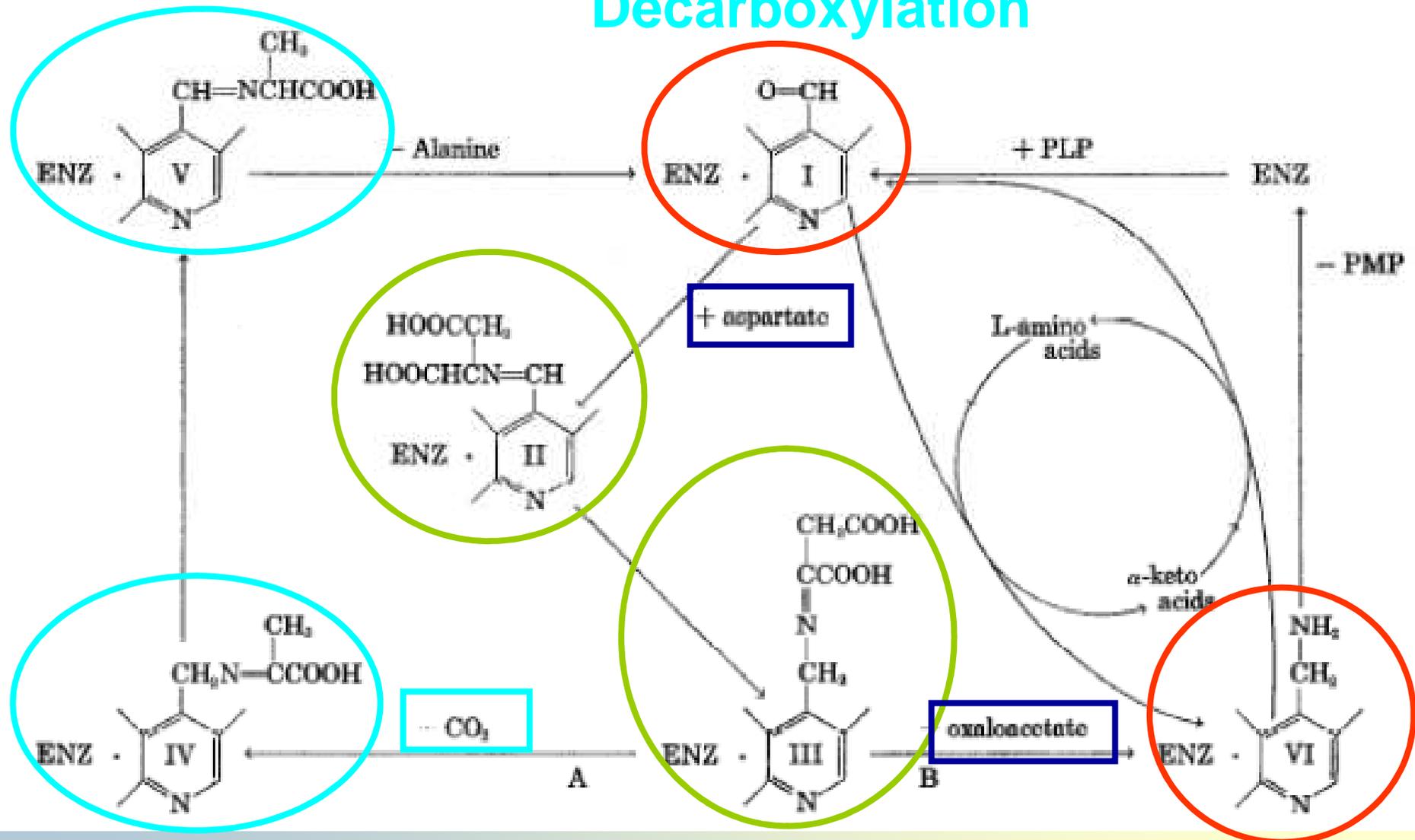


Phosphate de pyridoxamine

Phosphate de Pyridoxal

Transamination

Décarboxylation



Chapitre 2: La cinétique enzymatique

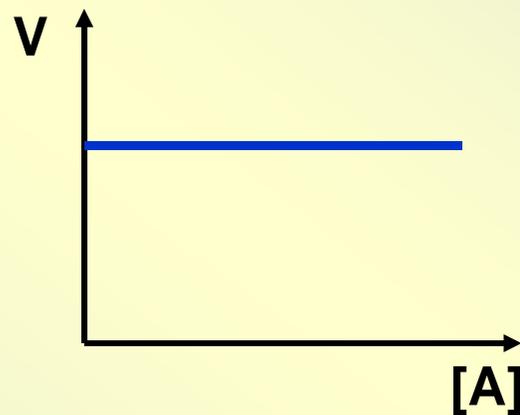
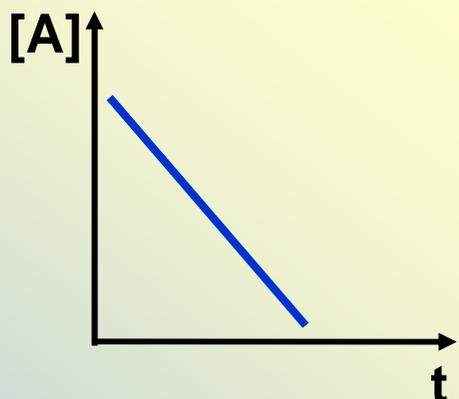
Objectifs:

- Reconnaître la cinétique d'une enzyme
- Définir la vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_M)
- Représenter graphiquement la cinétique d'une enzyme en fonction des différentes variables

1- RAPPEL DE L'ORDRE D'UNE REACTION

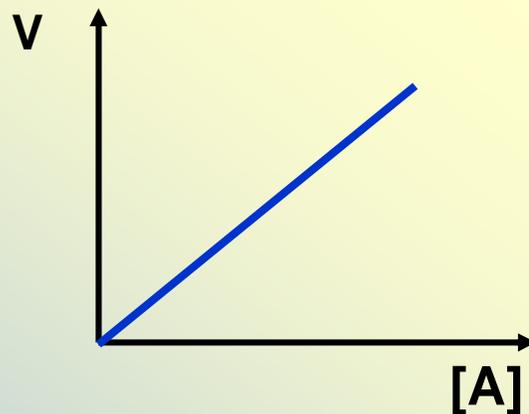
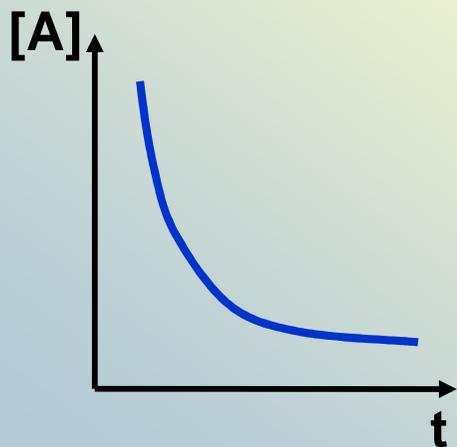


A- réaction d'ordre 0



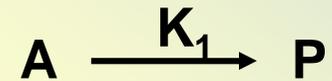
$$v = \frac{-d[A]}{dt} = k$$

B- réaction d'ordre 1

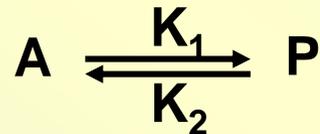


$$v = \frac{-d[A]}{dt} = k[A]$$

Rappel de calcul de la vitesse d'une réaction



$V = V$ de disparition de A (d'apparition de P): $V = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = K_1[A]$

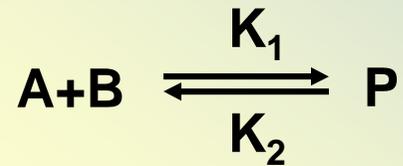


V de l'allée = V de disparition de A (apparition de P) $V = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = K_1[A]$

V de retour = V d'apparition de A (disparition de P): $V = -\frac{d[P]}{dt} = \frac{d[A]}{dt} = K_2[P]$

équilibre $K_1[A] = K_2[P]$

$$K_{eq} = \frac{K_1}{K_2} = \frac{[P]}{[A]}$$

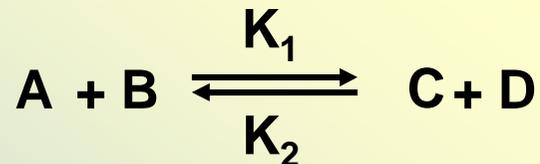


V de l'allée= V de disparition de A et B (apparition de P): $V = K_1[A][B]$

V de retour= V d'apparition de A et B (disparition de P): $V = K_2[P]$

équilibre $K_1[A][B] = K_2[P]$

$$K_{eq} = \frac{K_1}{K_2} = \frac{[P]}{[A][B]}$$



V de l'allée= V de disparition de A et B (apparition de C et D): $V=K_1[A][B]$

V de retour= V d'apparition de A et B (disparition de C et D): $V=K_2[C][D]$

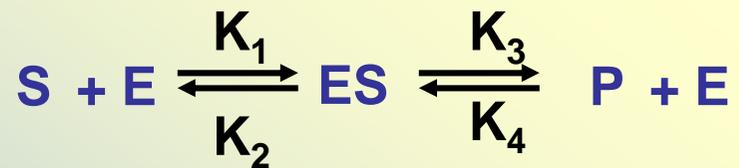
$K_1[A][B] = K_2[C][D]$

$$K_{eq} = \frac{K_1}{K_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

2- CINETIQUE DES REACTIONS ENZYMATIQUES

Ce qui est fondamental dans les réactions enzymatiques, c'est la combinaison E-S.

Après formation du complexe, le substrat est transformé en produit et l'enzyme retrouve sa structure initiale.



La V de la réaction enzymatique est influencée par:

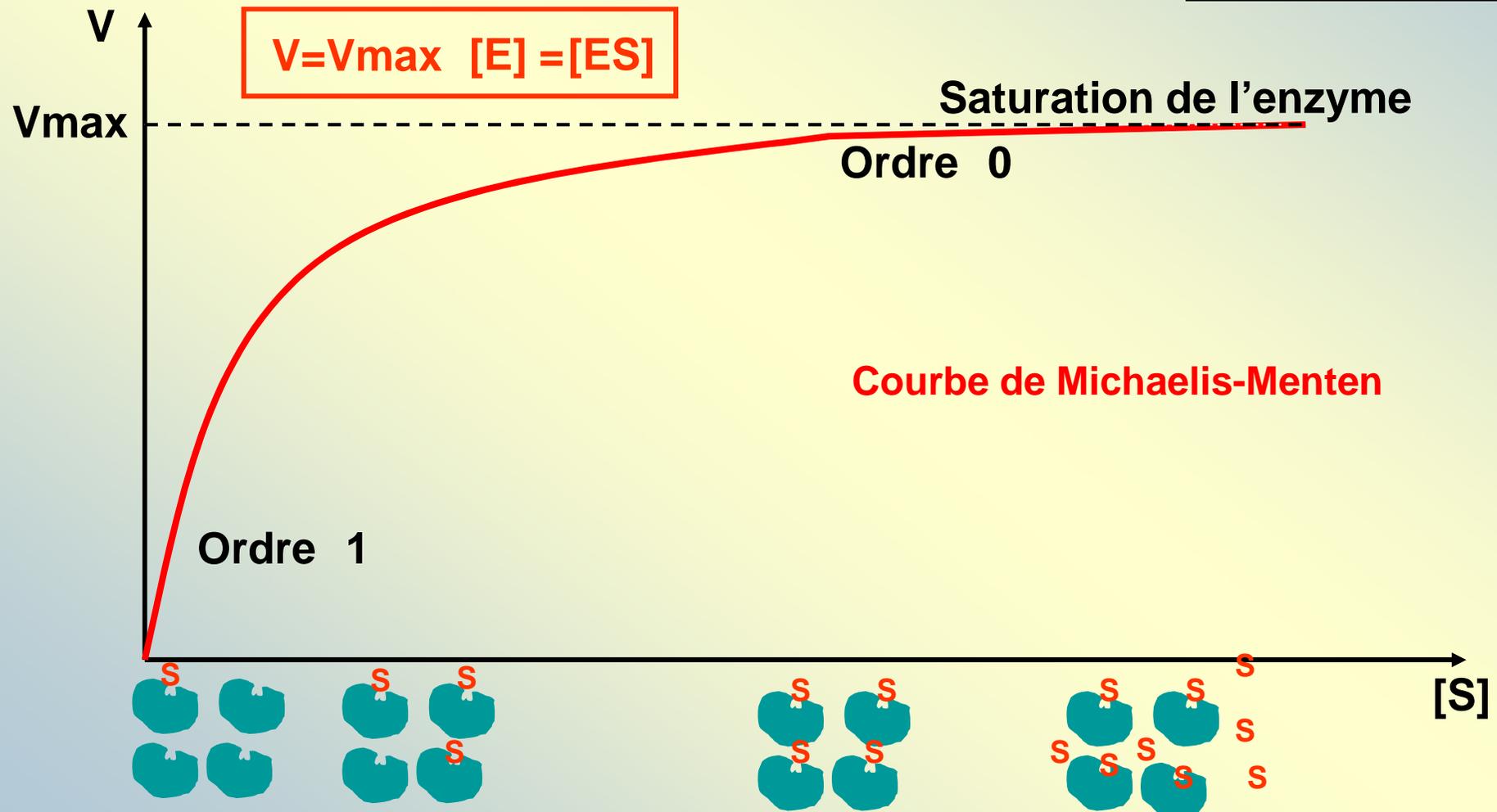
[S], [E], température, pH, effecteurs.

2.1- V de la réaction en fonction de [S]

L'étude de la cinétique enzymatique a été réalisée essentiellement par Michaelis et Menten en 1913.

2.1.1 Courbe de Michaelis-Menten

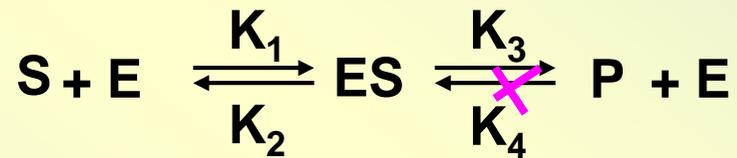
[E] fixe et faible



Interprétation de la courbe de MM

- Aux faibles conc de substrat, la vitesse de la réaction est proportionnelle à celle du substrat (**réaction d'ordre 1**)
- Lorsque la conc de S augmente, la vitesse ne s'accroît plus dans les mêmes proportions (**réaction d'ordre mixte**)
- Aux fortes conc de S la vitesse devient constante, indépendante de cette concentration (**réaction d'ordre 0**): l'enzyme est saturée par son substrat. Ce phénomène est particulier à la cinétique enzymatique.

1.1.2- Détermination de l'équation de Michaelis-Menten $V = f([S]) ?$



Conditions initiales



$[E]$ = concentration totale de l'enzyme
 $[ES]$ = concentration du complexe Enz-Sub
 $[E]_L$ = concentration de l'enzyme libre



$$[E] = [E]_L + [ES] \implies [E]_L = [E] - [ES]$$

$$V = K_3[ES]$$

$$\text{Vitesse de formation de } [ES] = \frac{d[ES]}{dt} = K_1[E]_L[S] = K_1([E] - [ES])[S]$$

$$\text{Vitesse de disparition de } [ES] = -\frac{d[ES]}{dt} = K_2[ES] + K_3[ES] = [ES](K_2 + K_3)$$

$$\text{Etat stationnaire: } V \text{ de formation de } [ES] = V \text{ de disparition de } [ES]$$

$$K_1([E] - [ES])[S] = [ES](K_2 + K_3)$$

$$K_1([E]-[ES])[S] = [ES] (K_2+ K_3)$$

$$\frac{([E]-[ES])[S]}{[ES]} = \frac{(K_2+K_3)}{K_1} = K_M$$

$$[E][S] - [ES][S] = [ES] K_M$$

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

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M+[S]}$$

Or, $V = K_3[ES]$

$$V = K_3 \frac{[E][S]}{K_M+[S]}$$

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

$$V_{max} = K_3 [E]$$

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

Equation de M-M

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

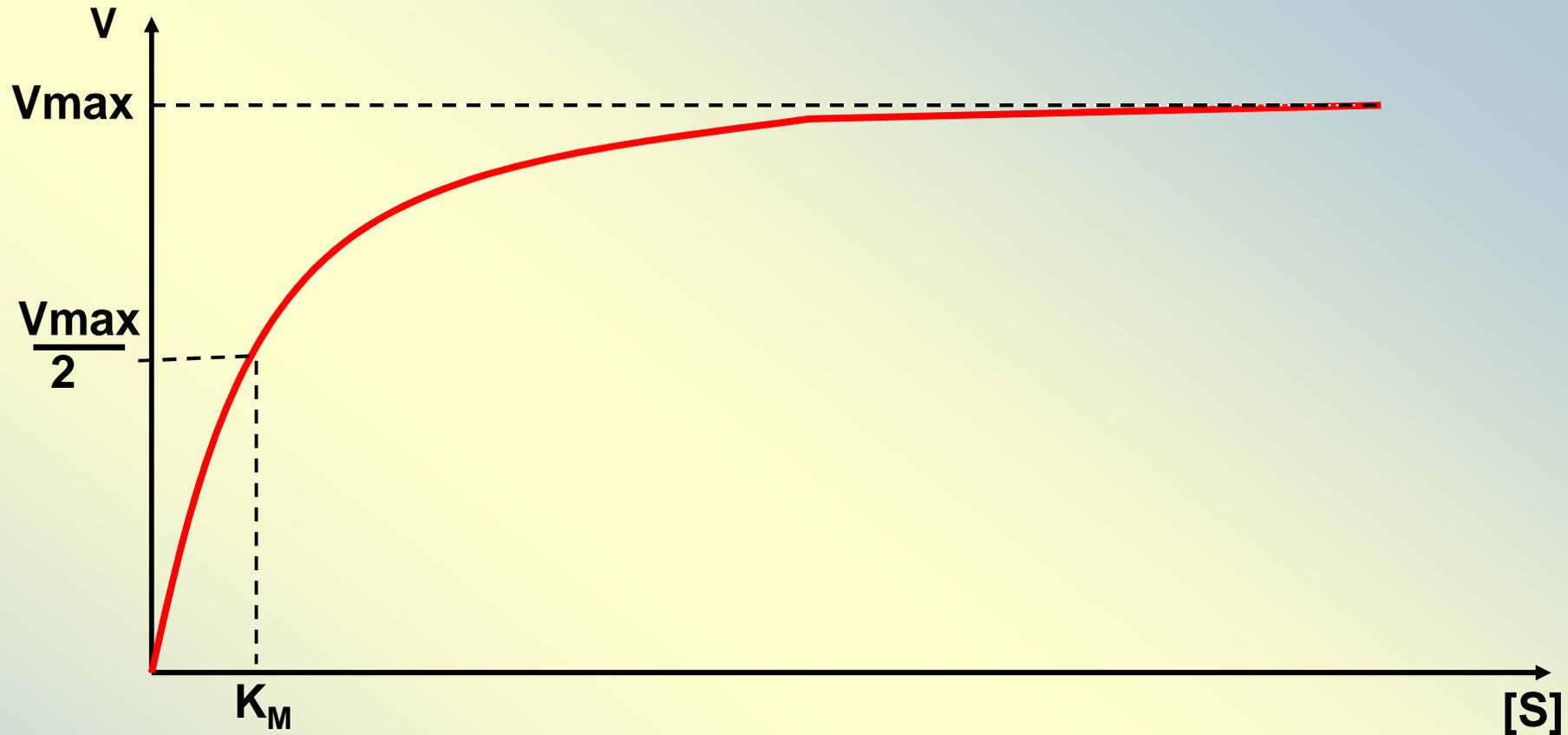
Cas particulier

$$\text{Si } v = \frac{V_{\max}}{2}$$

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

$$2[S] = K_M + [S]$$

$$K_M = [S]$$



1.1.3- Signification de V_{max} et de K_M

V_{max} est atteinte lorsque toute l'enzyme est saturée par le substrat

K_M est la valeur de S pour laquelle la vitesse de la réaction est $V_{max}/2$

K_M est une grandeur expérimentale qui peut varier avec la structure du S, le pH, la température. **Chaque enzyme a un K_M caractéristique pour un S**

K_M indique l'affinité de l'enzyme pour le S

K_M ↗

↘ affinité

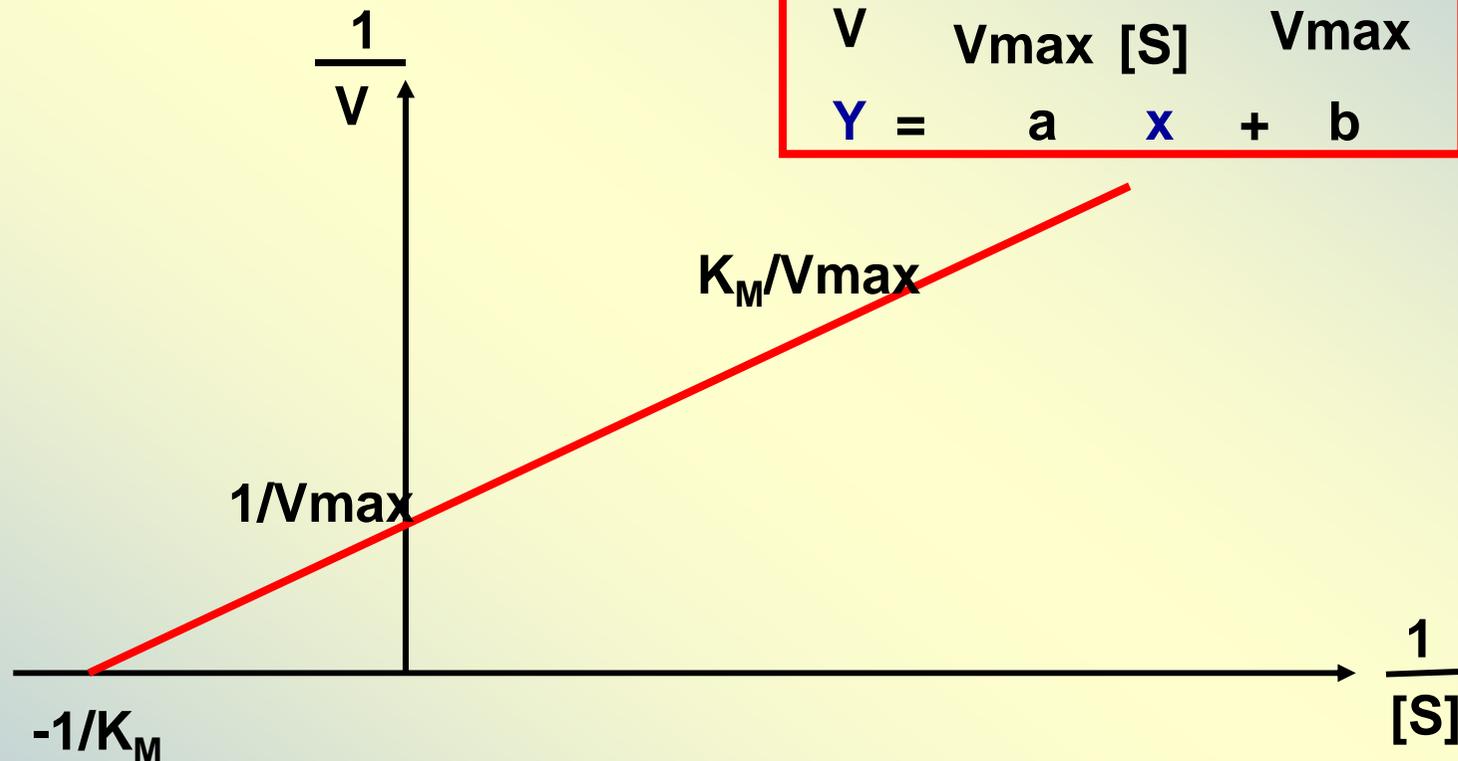
1.1.4- Représentation de Linweaver et Burk

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

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]}$$

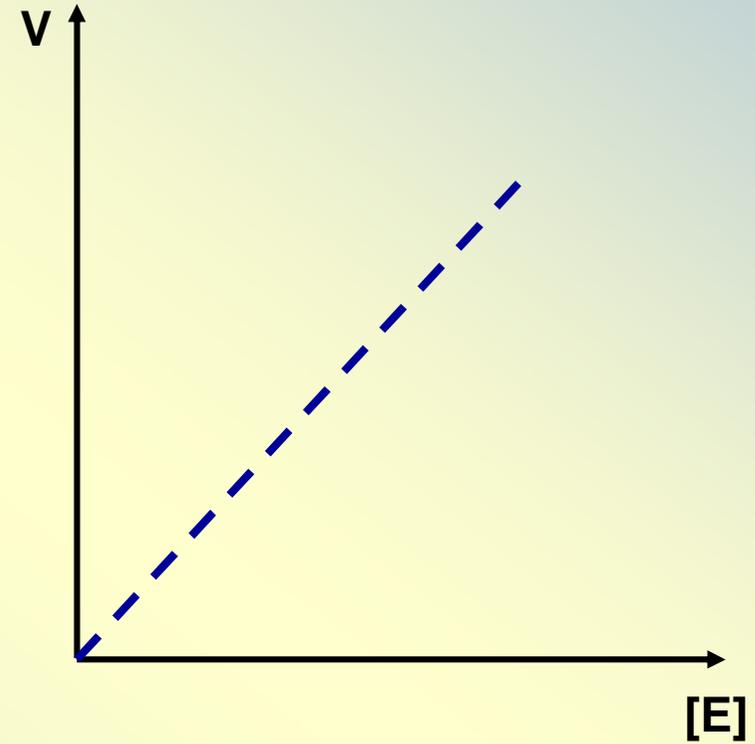
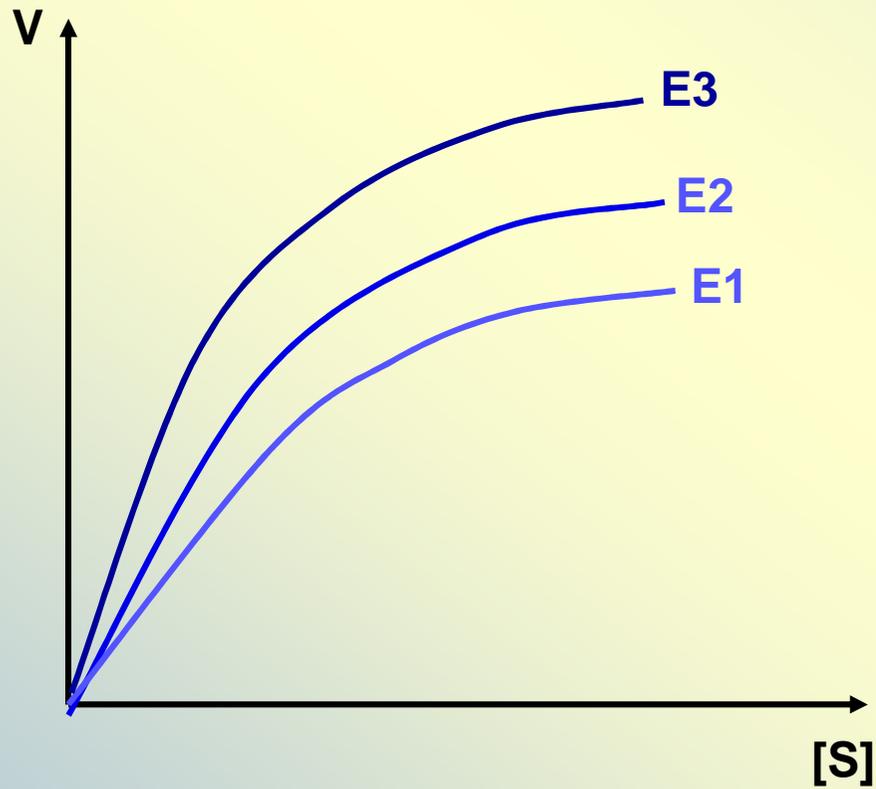
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$Y = a x + b$



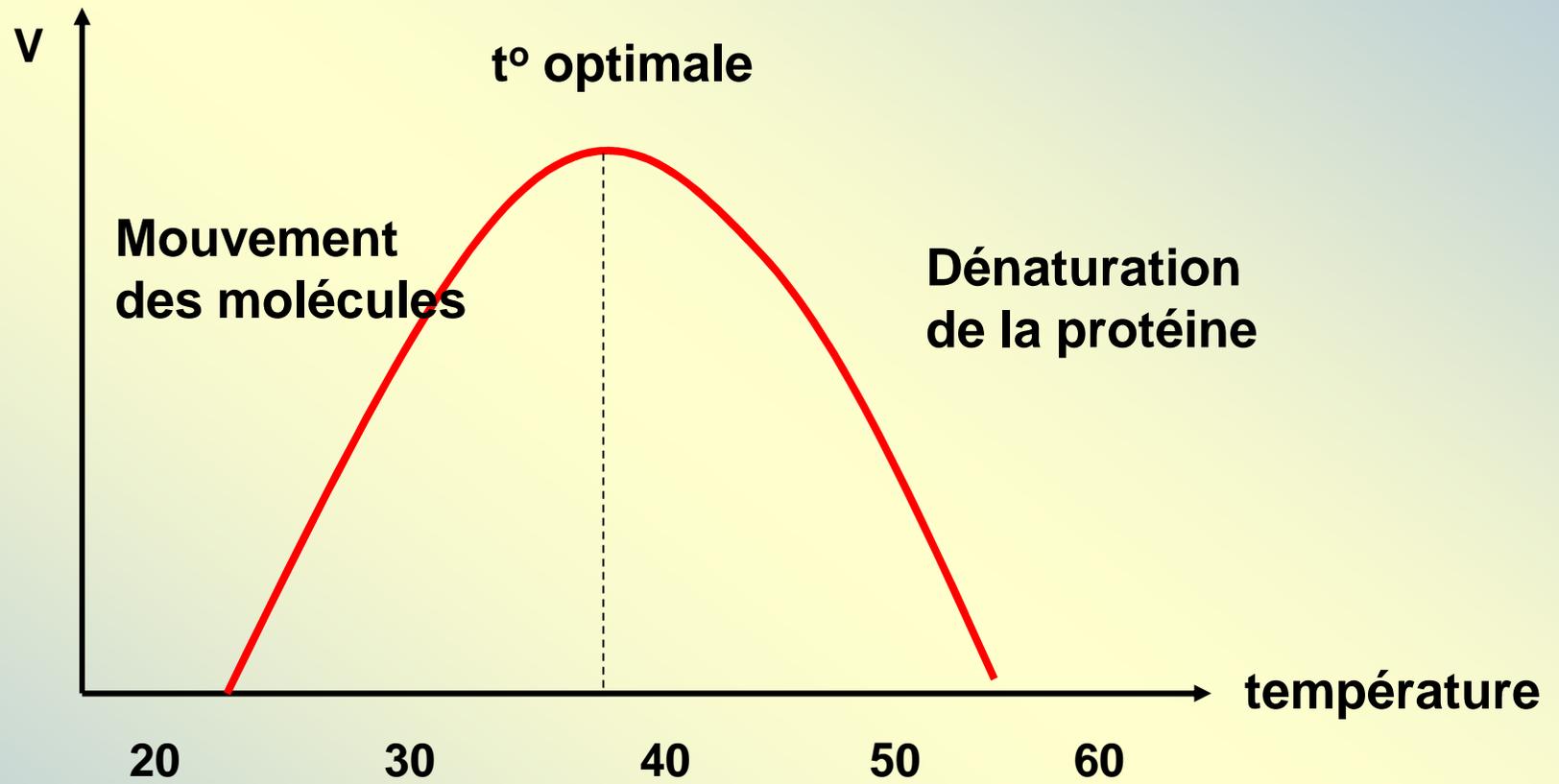
Cette représentation offre l'avantage de permettre la détermination plus précise de K_M et V_{\max} . De plus, étant une droite, elle nécessite moins de points expérimentaux.

1.2- Influence de la concentration en enzyme



La vitesse d'une réaction est proportionnelle à la quantité d'enzyme

1.3- Influence de la température

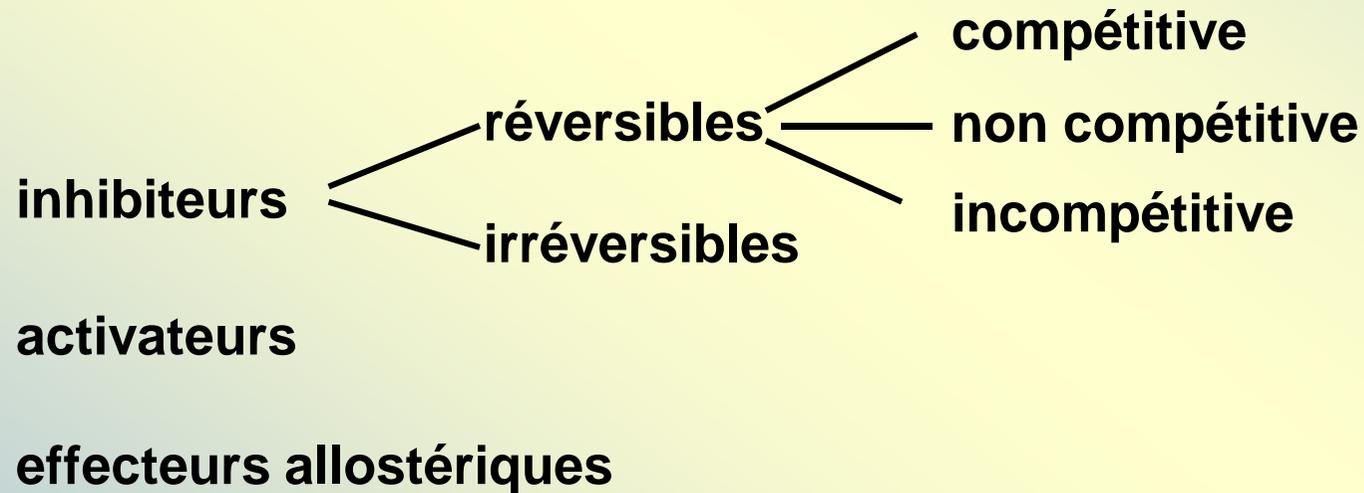


1.5- Effet des effecteurs

Rôle des effecteurs:

Physiologique: Régulation du métabolisme cellulaire

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

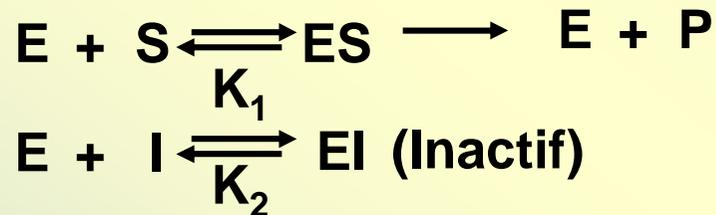


1.5.1- Inhibiteurs

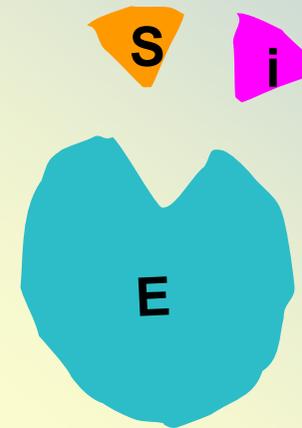
1.5.1.1- Inhibition réversible

1.5.1.1.1- Inhibition compétitive

Exercée par un composé dont la structure ressemble à celle du S



$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad [EI] = \frac{[E][I]}{K_I}$$



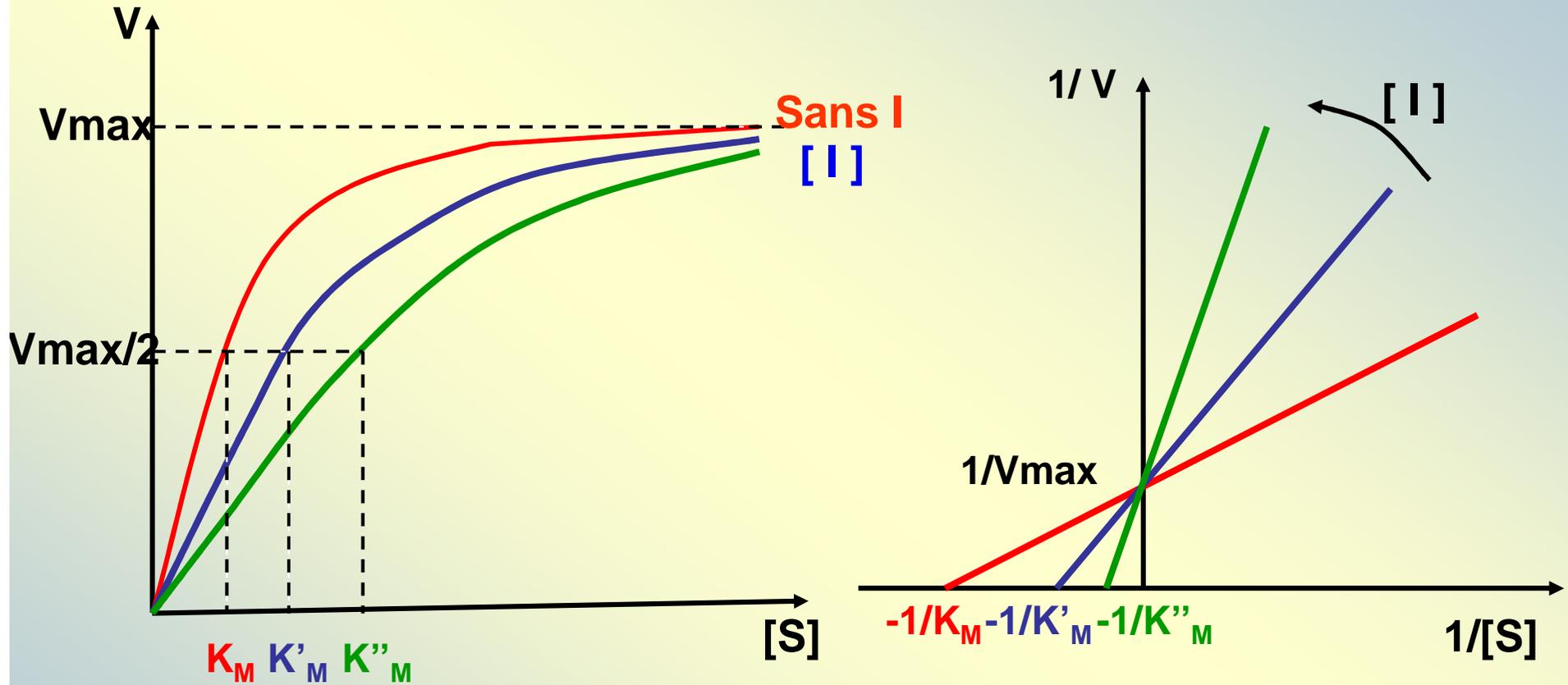
$$[E] = [E]_L + [ES] + [EI]$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{\underbrace{K_M(1+[I]/K_I)}_{K'_M} + [S]}$$

$$K'_M = K_M(1+[I]/K_I)$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M(1+[I]/K_I) + [S]}$$

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

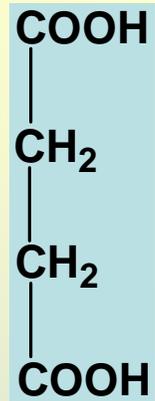


K_M ↗ affinité ↘

Quand $[S]$ augmente, l'effet de l'inhibiteur disparaît:
L'inhibition compétitive est levée par un excès de substrat
 V_{\max} n'est pas modifiée

Exemples:

La succinate déshydrogénase



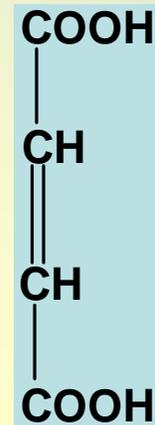
succinate

Succinate déshydrogénase



FAD

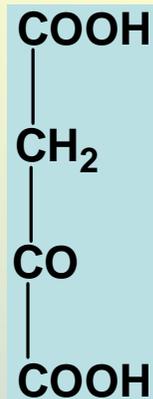
FADH₂



Fumarate



malonate



oxaloacétate

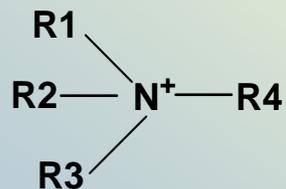
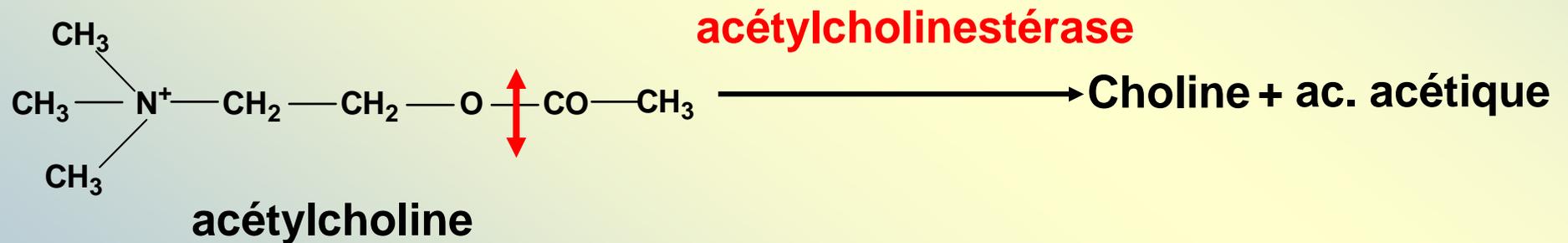
Inhibiteurs compétitifs de la succinate déshydrogénase

Inhibition par le produit de la réaction



Les amines quaternaires

sont des inhibiteurs compétitifs de la cholinestérase



Amines quaternaires

Antimétaboliques

En s'introduisant dans l'organisme, ils donnent naissance à des composés anormaux et ralentissent certains métabolismes.

fluorouracile
2-amino adénine

Action anti-cancéreuse

La sulfamide

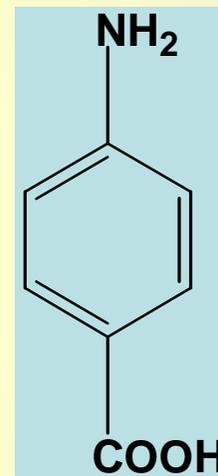
bactérie

N-ptéridine + Ac. para
amino-benzoïque + Glu

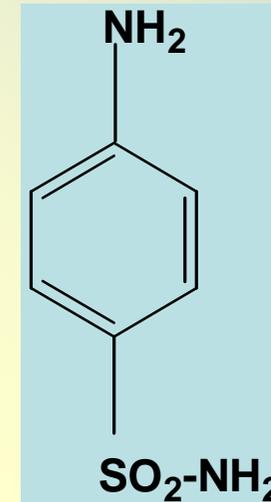
↓ E

Ac. folique

X des bactéries



Ac. para amino-
benzoïque

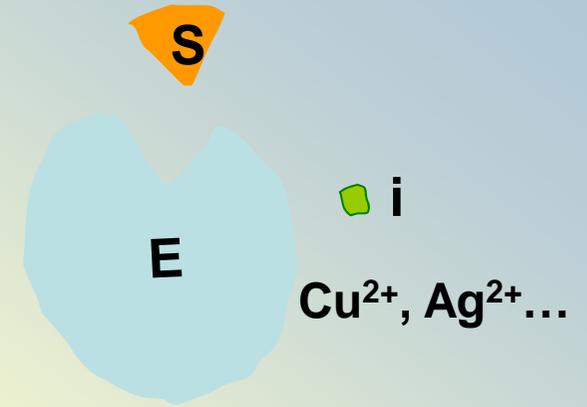


sulfamide
Action anti-
bactérienne

1.5.1.1.2- Inhibition non compétitive



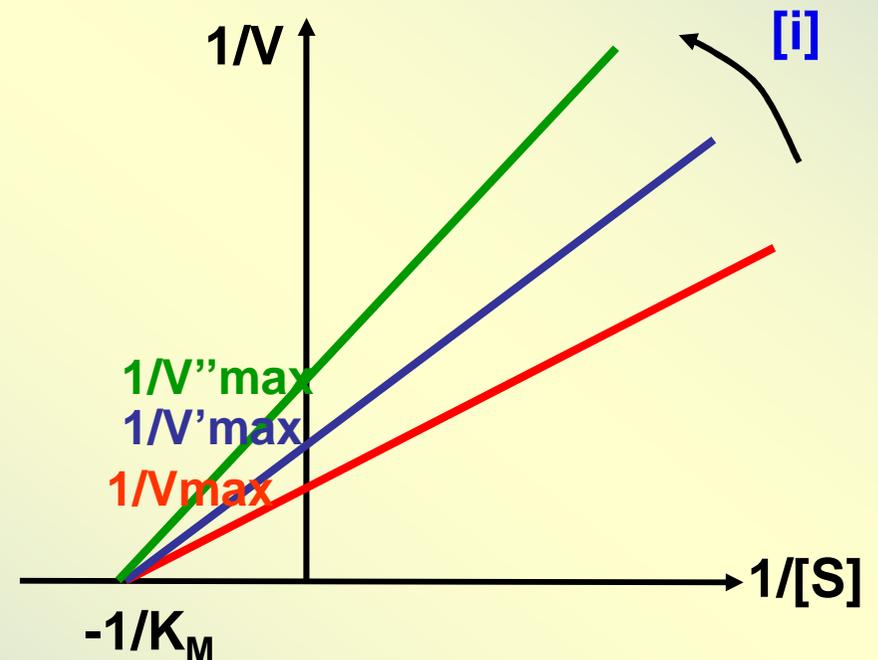
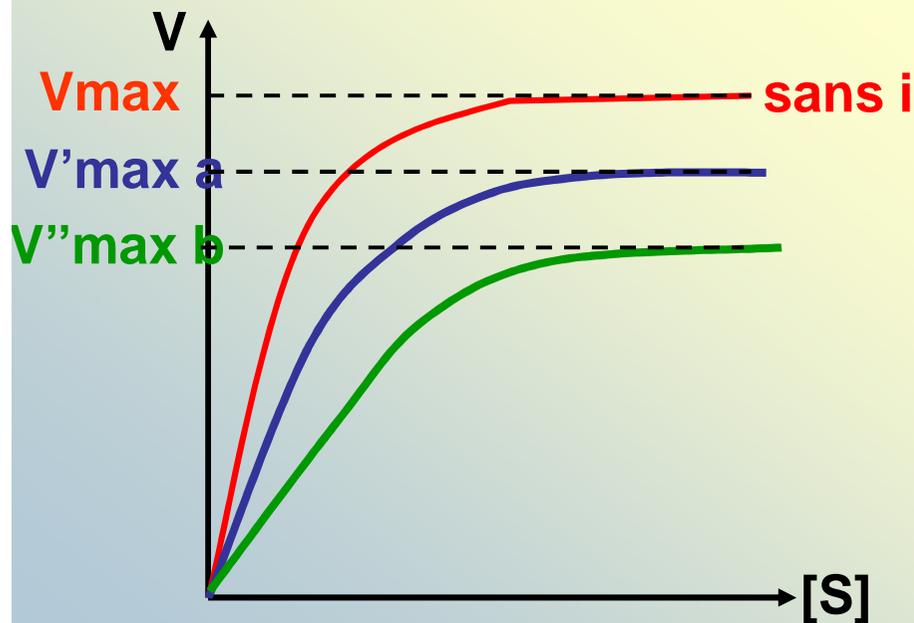
$$[E] = [E]_t + [ES] + [EI] + [ESI]$$



V'max

$$V = \frac{\frac{V_{\max}}{1 + [I]/K_I} [S]}{K_M + [S]}$$

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



Ce type d'inhibition n'est pas levé par un excès de substrat

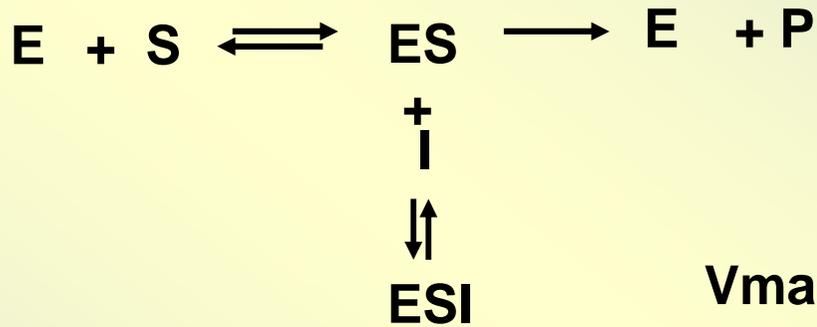
K_M est inchangé, l'affinité de E pour S n'est pas affectée

V_{max} est diminuée par l'inhibiteur

Le type le plus courant de cette inhibition se produit avec des réactifs capables de se combiner réversiblement avec les groupement SH des radicaux Cys indispensables à l'activité enzymatique comme les métaux lourds (Cu^{2+} , Ag^{2+} , Hg^{2+})

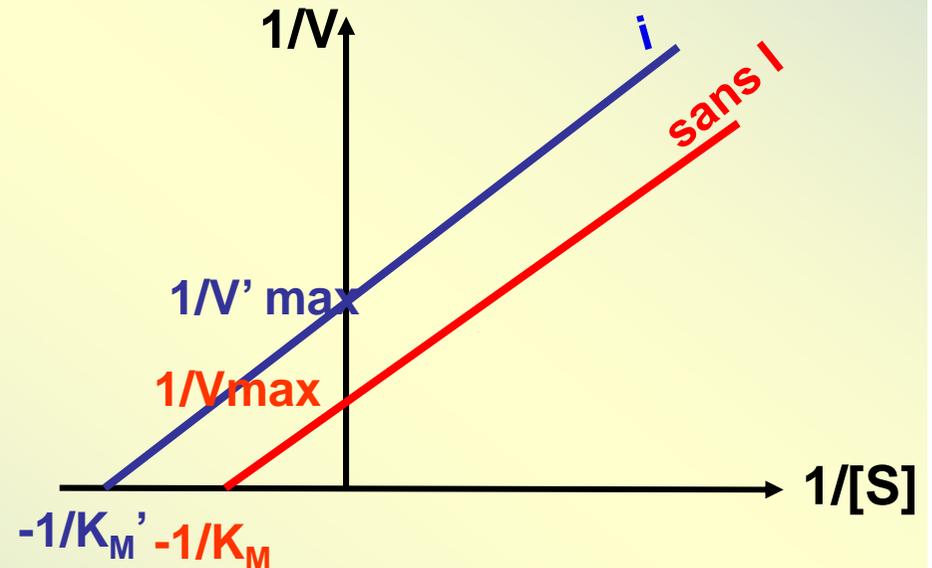
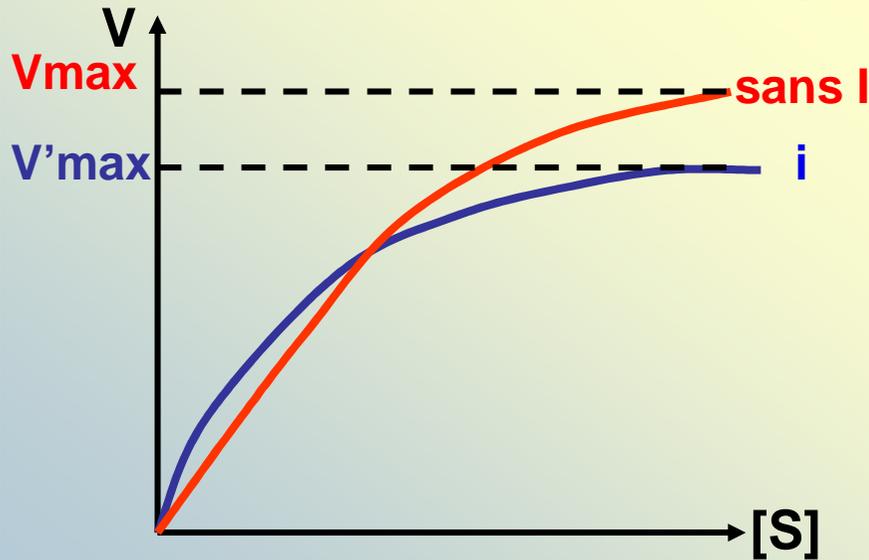
Certaines enzymes par contre, ont besoin de certains ions comme Mg^{2+} , cet ion peut être chélaté par EDTA (éthylène diamine tétra acétique).

1.5.1.1.3- Inhibition incompétitive l'inhibiteur ne se lie que sur ES



$$[E] = [E]_L + [ES] + [ESI] \quad V = \frac{V_{max} [S]}{\frac{K_M}{1 + [I]/K_I} + [S]}$$

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



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

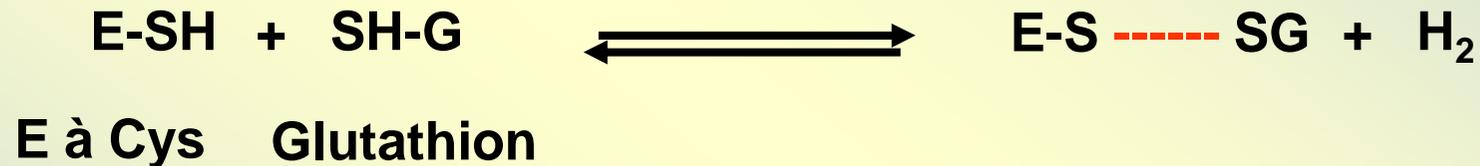
Tableau récapitulatif des inhibitions réversibles

	K_M	Vmax	Pente
Compétitive			
Non compétitive			
Incompétitive			

1.5.2- Activateurs

1.5.2.1- Activation par protection de l'enzyme

Des composés qui protègent les enzymes contre les oxydations dans les enzymes à Cys se comportent comme des activateurs



1.5.2.2- Activation par les ions

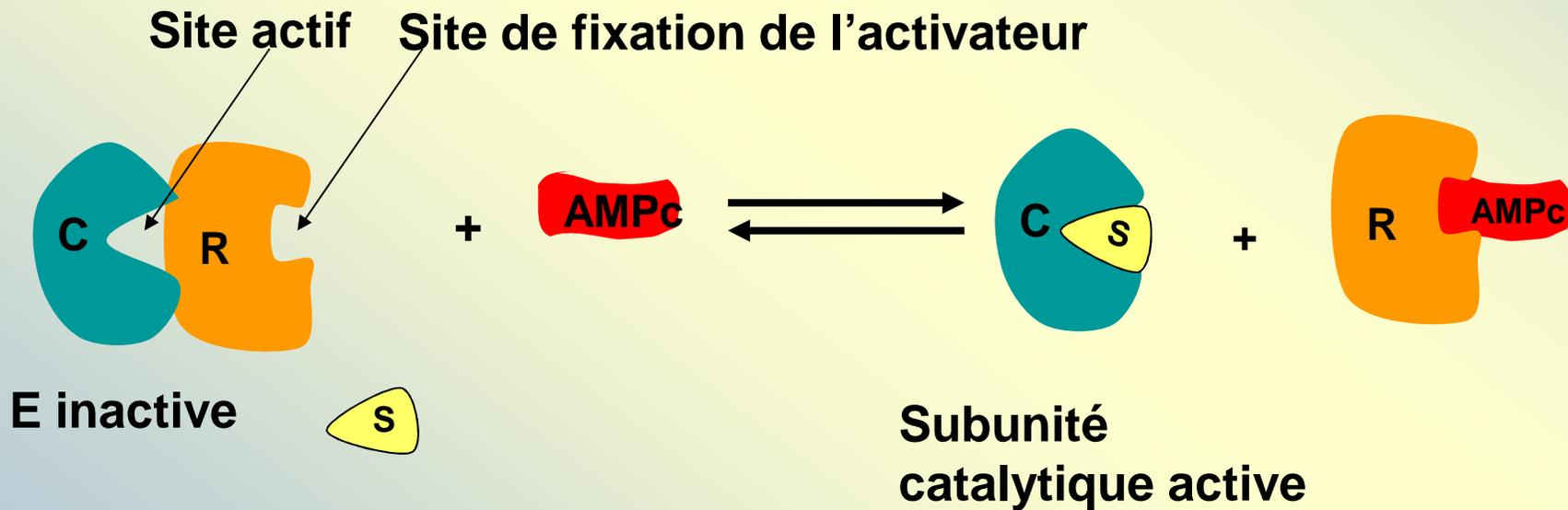
Concerne les enzymes qui nécessitent des ions pour leur activité

Exemple: Mg^{2+} est un activateur des kinases

1.5.2.3- Activation par action sur les subunités enzymatiques



Les protéines kinases sont activées par l'AMPc

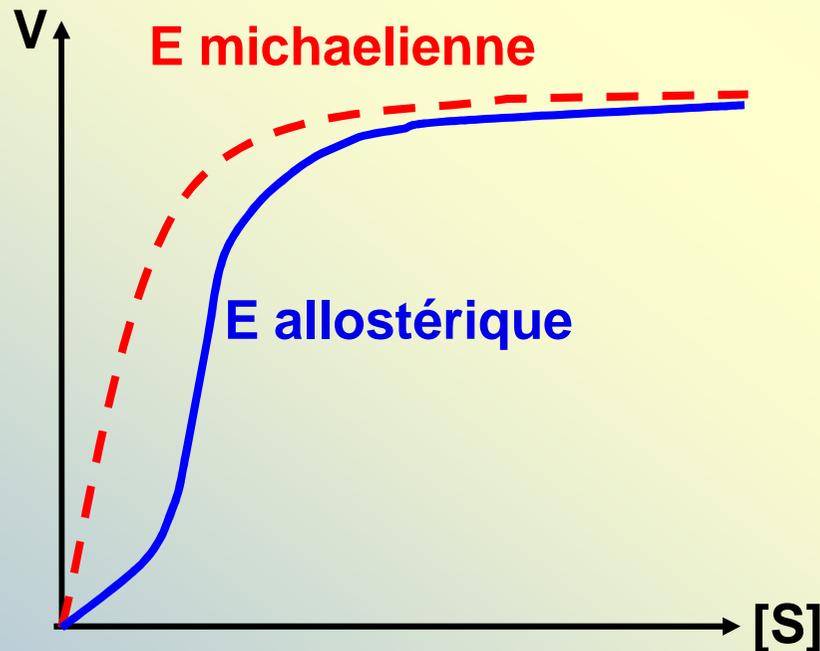


3- ENZYMES ET EFFECTEURS ALLOSTERIQUES

3.1- Cinétique des E allostériques

3.1.1- *V en fonction de [S]*

Interprétation de la courbe des E allostériques

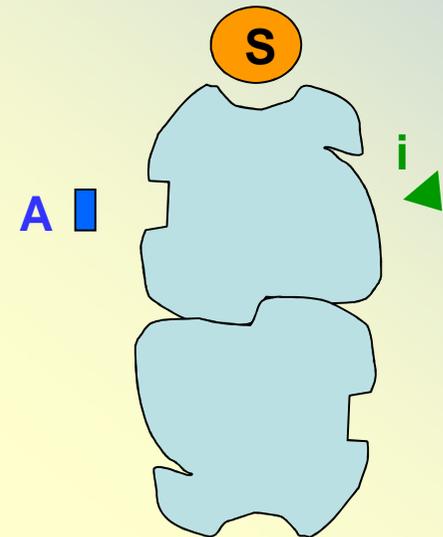


- Les petites quantités de substrat sont transformées lentement
- La vitesse augmente à partir d'un seuil
- Effet coopératif

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

ont une structure quaternaire, formées d'un nombre pair de sous unités.

La fixation de S au 1^{er} site entraîne un changement de conformation des autres sites, ce qui modifie l'affinité 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**).

Ces effecteurs n'ont aucune analogie structurale avec le substrat.

2.2- Action des effecteurs allostériques

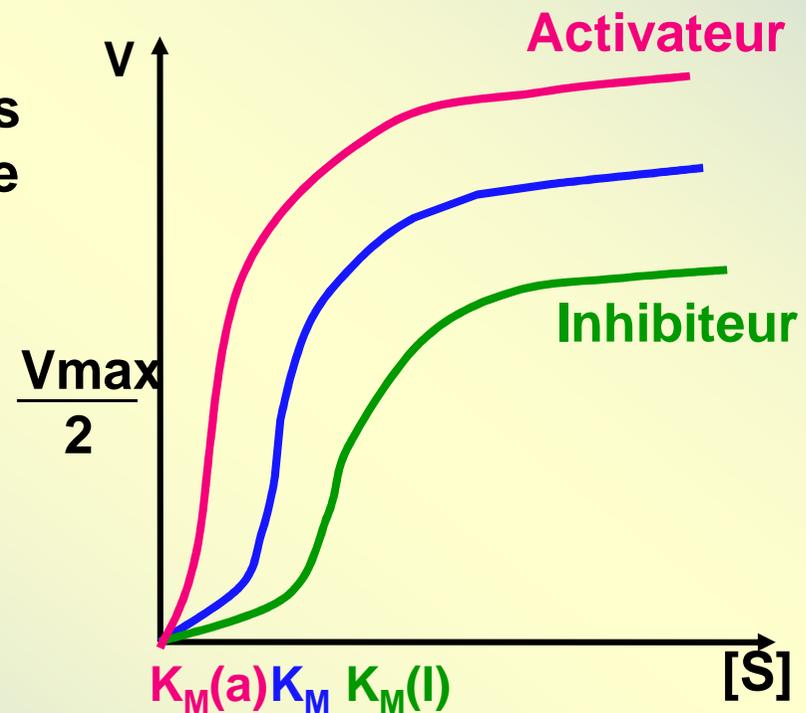
Ce sont des substances qui agissent comme activateurs ou inhibiteurs en modifiant la conformation des sites de liaison au substrat, ce qui change l'affinité pour le substrat

Activateurs allostériques

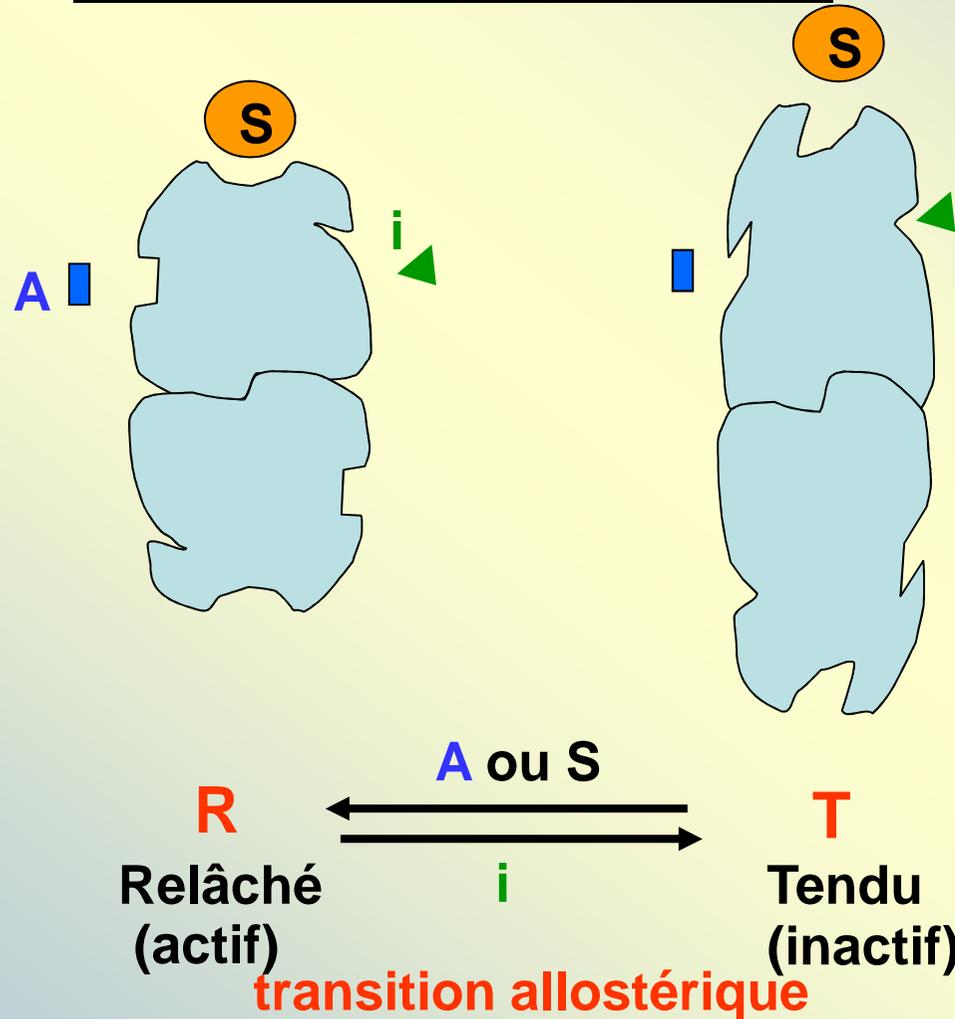
Augmentent l'affinité de l'enzyme pour le substrat, lui permettant d'agir à de faible concentration en substrat

inhibiteurs allostériques

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



2.3- Model des E allostériques



Model de Monod Wyman et Changeux (MWC)

- 1- possèdent 2 sites: site actif et des sites régulateurs (activateur et inhibiteur)
- 2- formées de plusieurs sous unités identiques (= protomères)
- 3- existent sous 2 états en équilibre: état catalytique R et état inhibé T

Allo/stérie
Autre forme

- 4- effet coopératif: du à la présence de plusieurs sous unités (protomères)

la fixation d'une molécule de S sur un protomère déplace l'équilibre vers la forme active

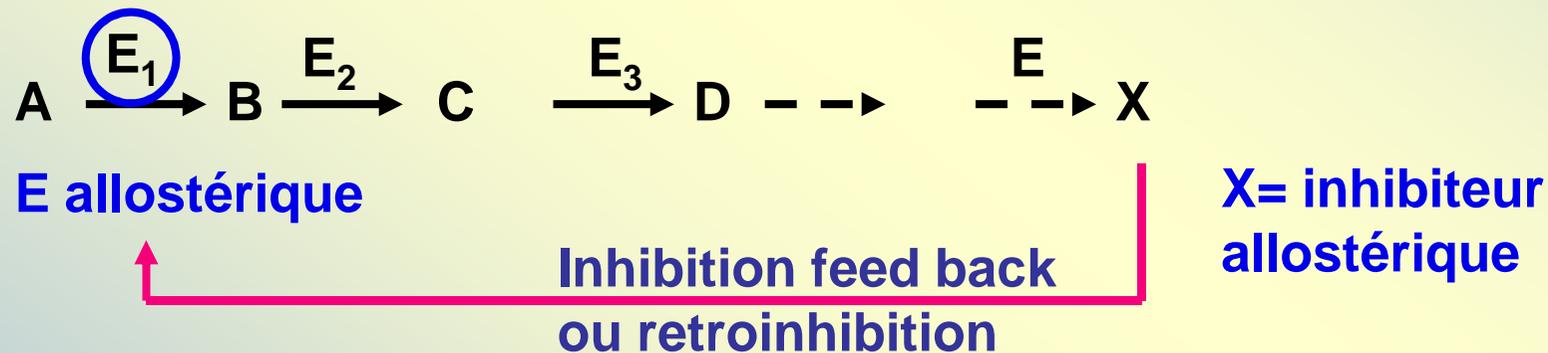
2.4- Importance des enzymes allostériques

Ont un rôle de régulation très important dans la cellule:

Permettent l'adaptation du métabolisme au besoin de la cellule

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

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

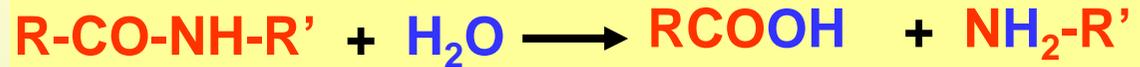


Les effecteurs allostériques ont une action spécifique sur les enzymes allostérique, en se fixant sur leur sites allostériques

MECANISME DE LA REACTION ENZYMATIQUE

1- Chymotrypsine:

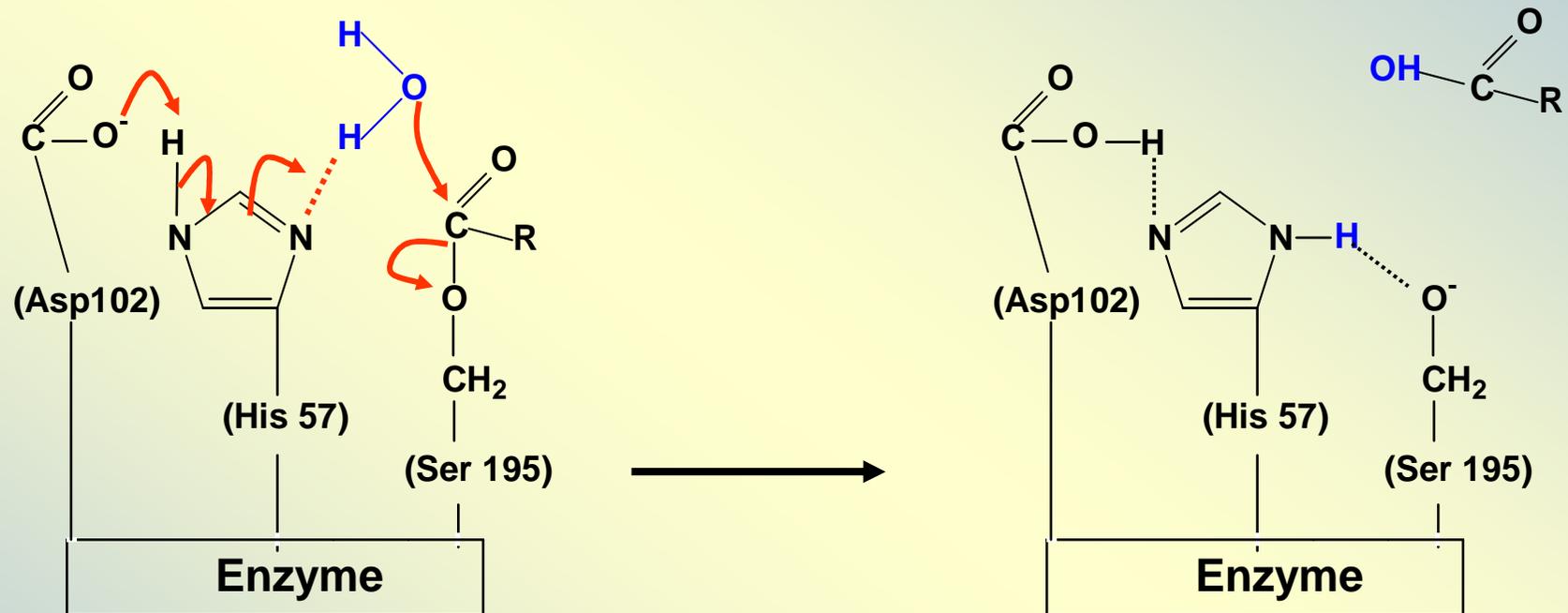
hydrolyse les peptides au niveau de la Tyr et de Phe



Le site actif :

His 57, Asp 102 et Ser 195

2^{ème} étape: désacylation



acylchymotrypsine

2- Acétylcholinestérase

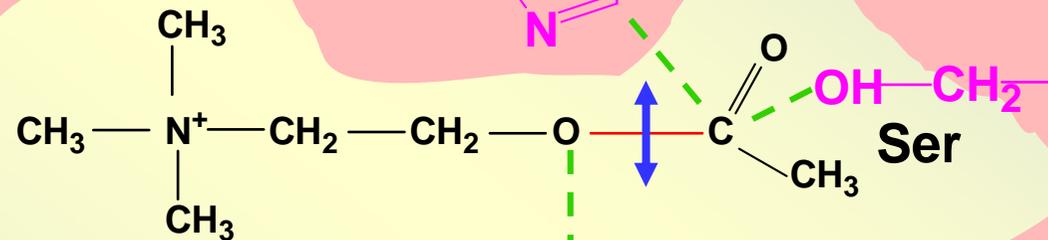
enzyme

Site anionique

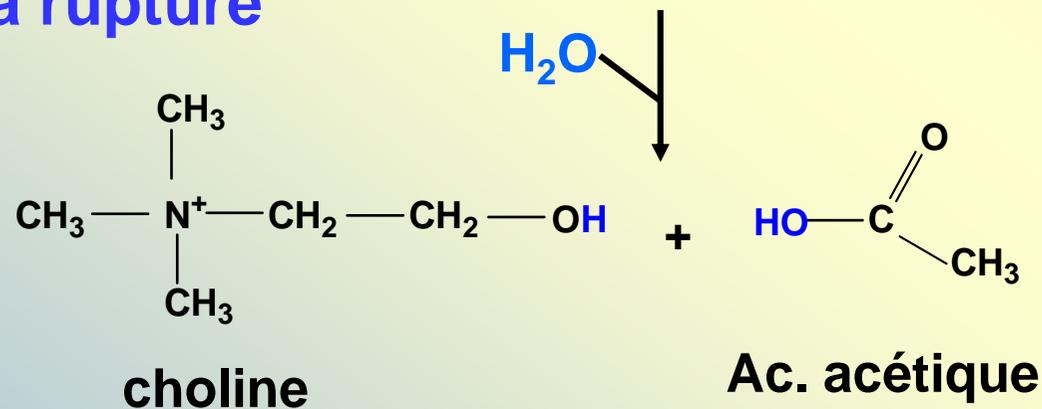
His

Site estérasique

acétylcholine



un déplacement d'électron va fragiliser la liaison ester et provoquer sa rupture

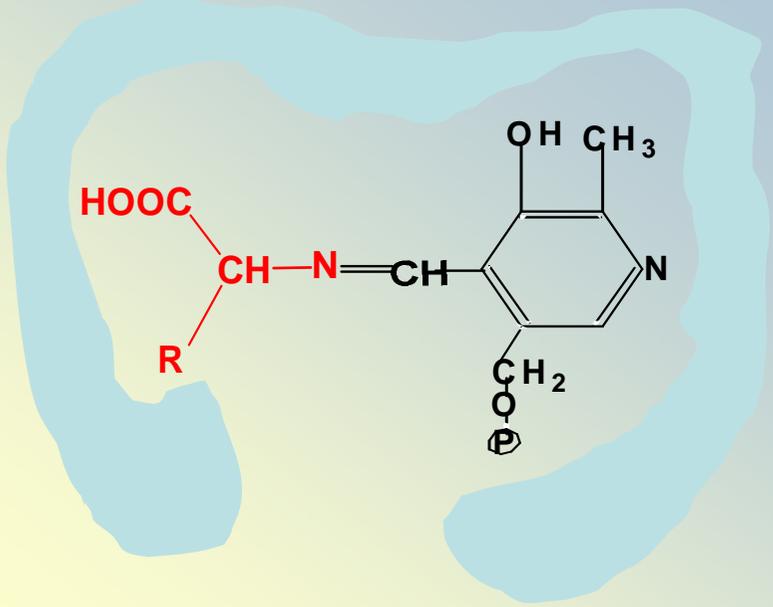
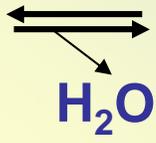
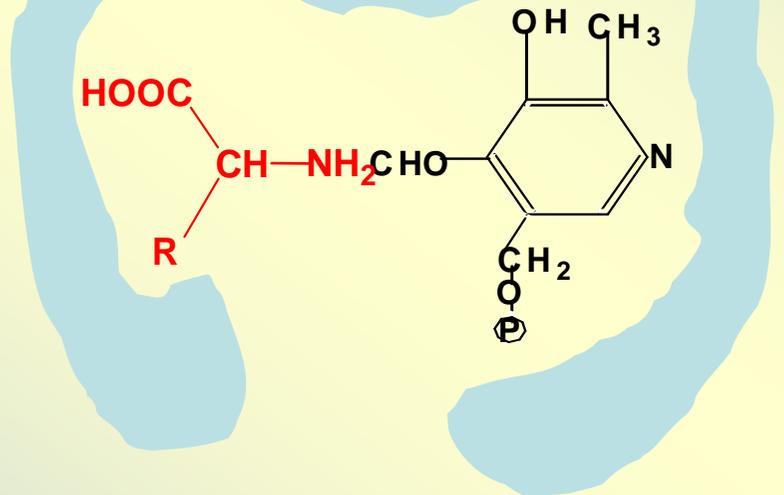


3- Transaminases

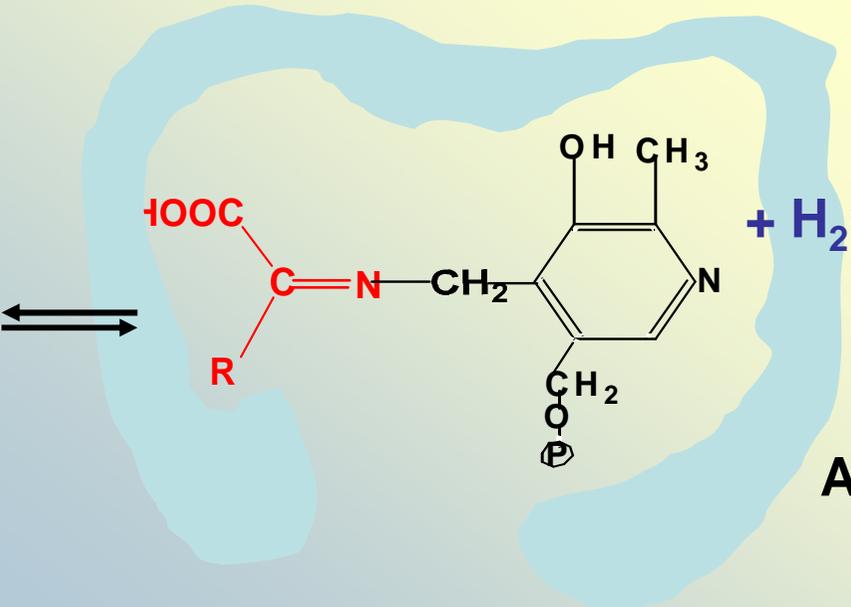
Permettent le transfert réversible du groupement amine d'un AA à un acide α cétonique.

Le coenzyme des transaminases est le phosphate de pyridoxal

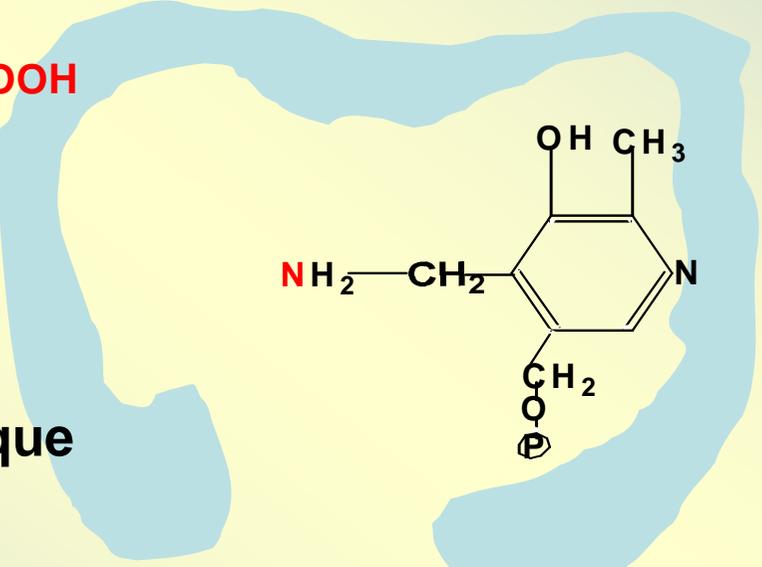
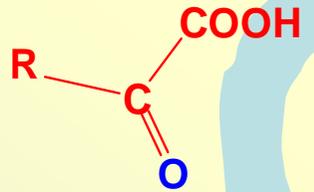
Site actif d'une transaminase



Base de schiff



Ac. α cétonique



Phosphate de pyridoxamine

DOSAGE DES ENZYMES

La quantité d'enzyme peut être mesurée par son activité enzymatique



Pour déterminer l'activité enzymatique, il faut connaître:

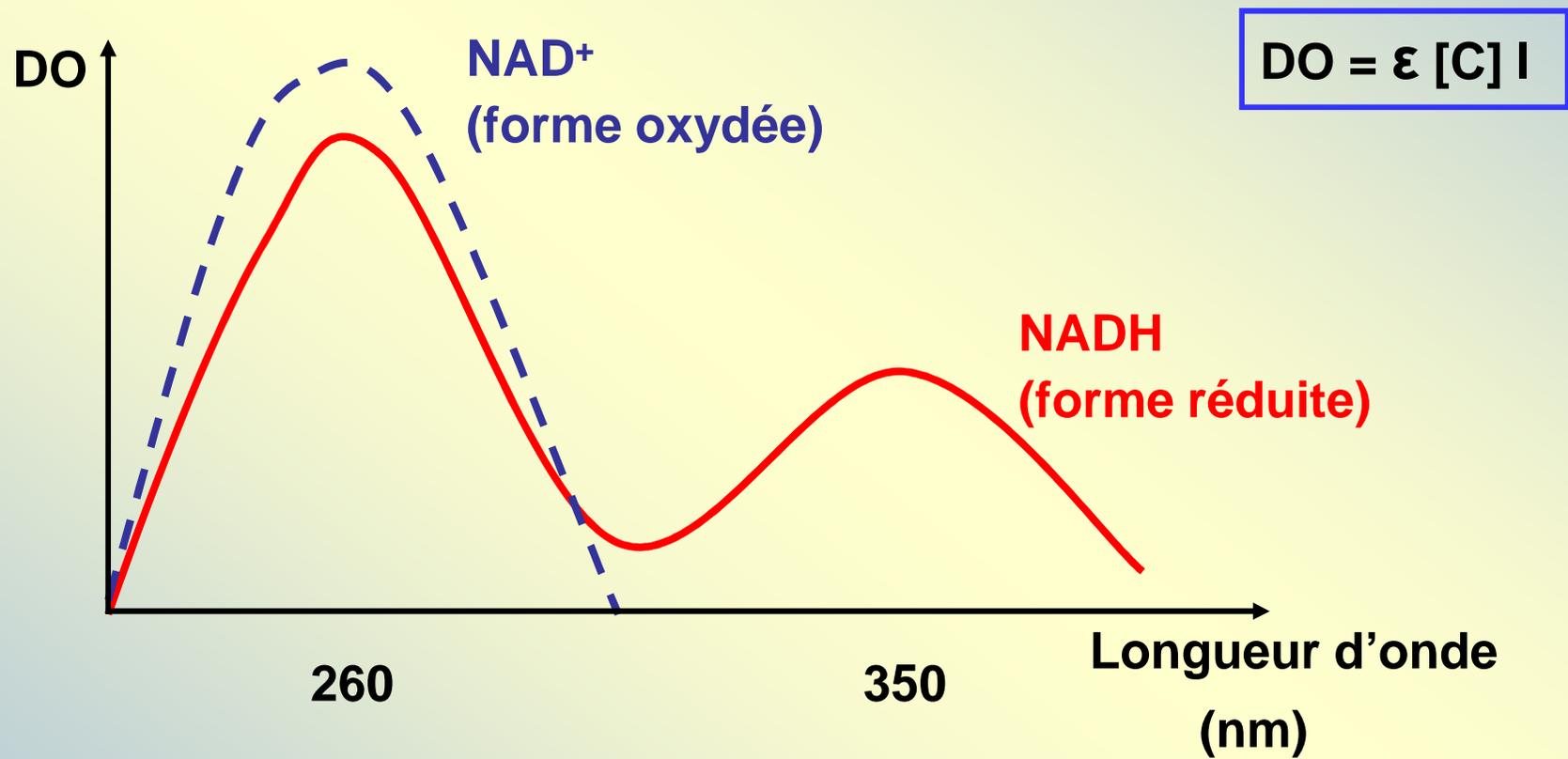
- 1- la stœchiométrie de la réaction
- 2- les besoins de l'enzyme en cofacteurs
- 3- K_M
- 4- le pH optimum de l'enzyme
- 5- la gamme de température où l'enzyme est stable
- 6- une méthode analytique permettant la détermination de la concentration du substrat qui disparaît ou du produit obtenu

1- Unité de l'activité enzymatique

Unité internationale (UI) = la quantité d'enzyme qui produit la transformation d'une micromole (μ mole) de S par min à 25°C

Le katal (kat) = la quantité d'enzyme transformant une mole de substrat par sec

Activité spécifique = le nombre d'UI par mg de la protéine enzymatique



2- Intérêt de dosage des enzymes

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

Dosage des enzymes dans les liquides biologiques et les tissus révèle des anomalies pathologiques:

↑ Phosphatase acide dans le sérum → Cancer de la prostate

La présence de certaines enzymes dans le sérum est le signe d'une nécrose tissulaire

Mais dans certains cas la même activité enzymatique peut être due a les enzymes différentes selon leur origine tissulaires.

C'est le cas des isoenzymes

L'électrophorèse des isoenzymes permet de localiser l'origine de la nécrose

3- Les isoenzymes

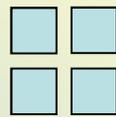
Ce sont des enzymes qui ont la même propriété catalytique mais qui diffèrent par leur propriétés physicochimique. Les isoenzymes peuvent différer d'un tissu à un autre.

Ex.: Lactate déshydrogénase (LDH): $\text{Ac. lactique} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Ac. pyruvique}$

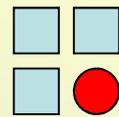
LDH: 4 sous unités de 2 types, H et M

□ Forme H (coeur)

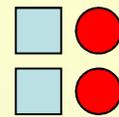
● Forme M (muscle et foie)



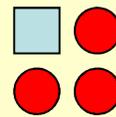
1



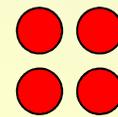
2



3



4



5



dépôts

1
Coeur

2

3

4

5
Muscle
et foie



En plus de ces anomalies, il existe des déficits héréditaires de certaines enzymes qui sont à l'origine de maladies métaboliques graves:

<u>Ex:</u>	<u>maladie</u>	<u>Enzyme altérée</u>
	Albinisme:	Tyrosine hydroxylase
	Phénylcétonurie:	Phénylalanine hydroxylase
	Homocystinurie:	Cystathionine β synthétase