

Dr BENS AHLA TALET L

Notions d'enzymologie

Dr BENS AHLA TALET L

Biochimie 2^{ème} année LMD

Université Oran1 Ahmed BENBELLA

Dr BENS AHLA TALET L

Dr BENS AHLA TALET L

Dr BENS AHLA TALET L

1-Définitions

2-Propriétés particulières des catalyseurs

2.1.Nomenclature et classification

3-Specificité

4-Mécanisme de catalyse

4.1. Relation enzyme / substrat.

4.2.Reconnaissance du Substrat.

4.3.Loi cinétique enzymatique

4.4.Loi de Michaelis

4.5.Loi de Lineweaver et Burck

4.6.Les unités

4.7.Haloenzymes et iso-enzymes

4.8.Effet du pH

4.9.Effet de la température

5-Inhibition enzymatique

-Inhibition compétitive

-Inhibition non compétitive

-Inhibition incompétitive

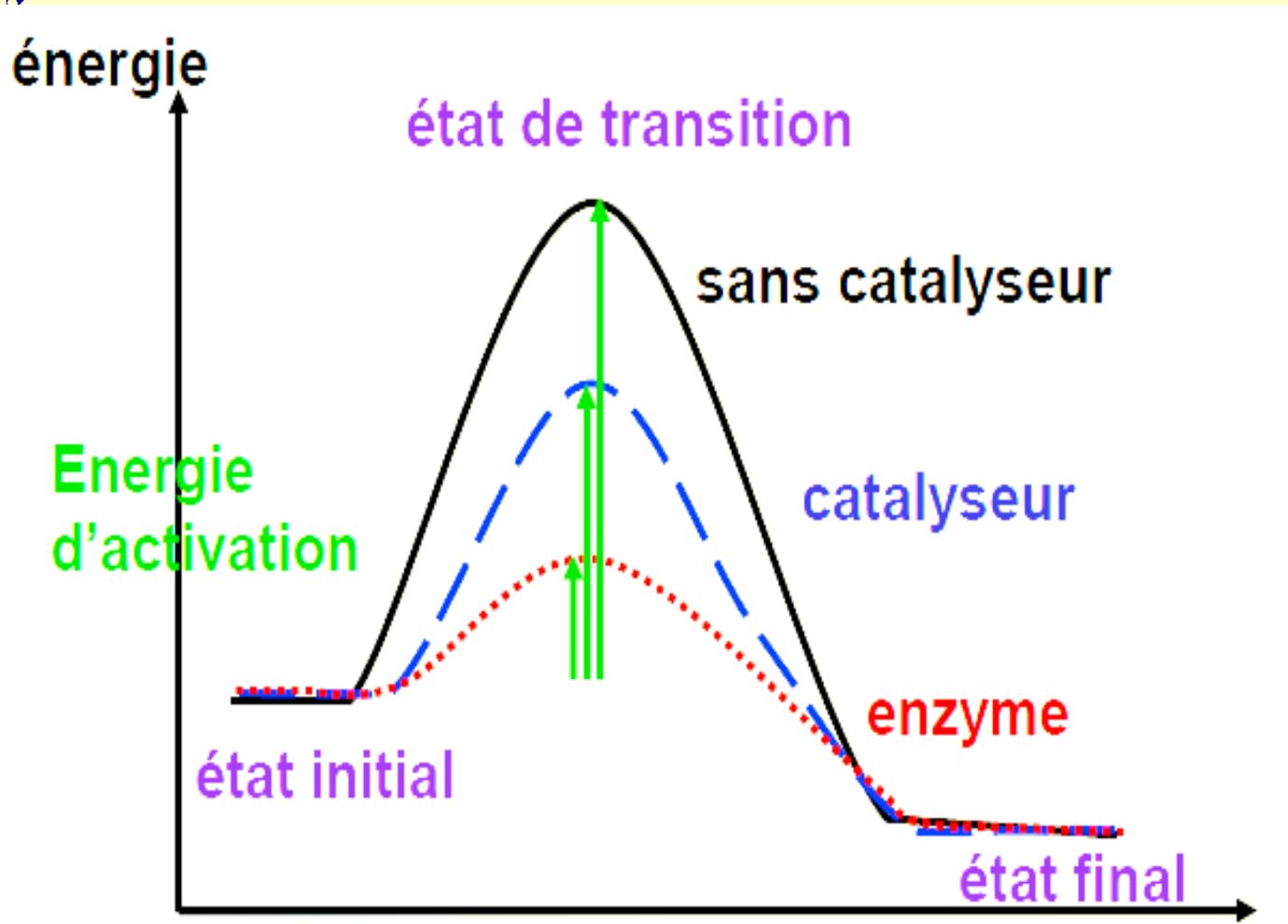
Notions d'enzymologie

1. Définitions

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques diverses. Chez tous les organismes vivants, les réactions chimiques du métabolisme sont catalysées par des molécules de nature protéique que l'on appelle enzymes, (E) . Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes corps chimiques initiaux: Substrat, (S).

2. Propriétés particulières des catalyseurs

Les catalyseurs biologiques sont très puissants , différent des catalyseurs chimiques par leurs propriétés: Leur taux de réaction est plus élevé. Les enzymes ont un pouvoir catalytique de 10^6 à 10^{12} fois supérieur aux réactions non catalysées, et de plusieurs ordres de grandeur supérieur aux réactions catalysées par des réactifs chimiques . La catalase peut hydrolyser 5 millions de molécules d' H_2O_2 en 1 min dans des conditions de pH et de température physiologiques (pH=7,4 et t=37°C).



2. Propriétés des catalyseurs.

Les catalyseurs sont des molécules qui accélèrent la vitesse d'une réaction.

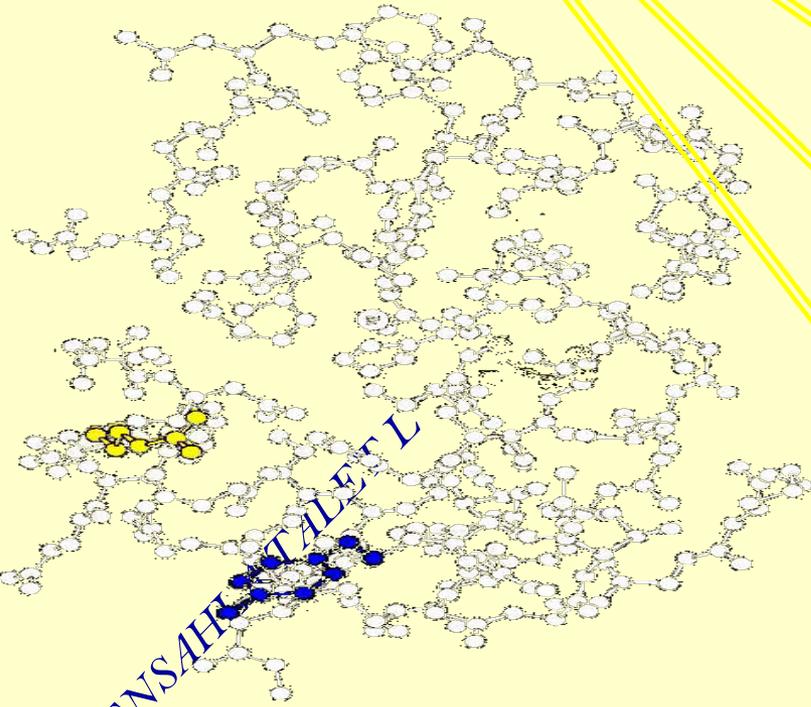
Ils possèdent des propriétés caractéristiques.

- Ils ne subissent pas la réaction. (Ils n'apparaissent pas dans l'équation globale).
- Ils ne modifient pas l'équilibre de la réaction.
- Ils ne modifient pas l'énergie de la réaction.

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques.

- Ce sont des protéines. Cependant, on a mis en évidence chez certains ARN des propriétés catalytiques.

- Ils sont des milliers de fois plus efficaces que les catalyseurs chimiques.



2.1. Nomenclature

Les enzymes sont classifiées selon la réaction qu'ils catalysent. Ils sont désignés par un nom commun (carboxypeptidase A), un nom systématique (peptidyl-L-amino acide hydrolase) et un numéro de classification (EC « Enzyme Commission » 3.4.17.1).

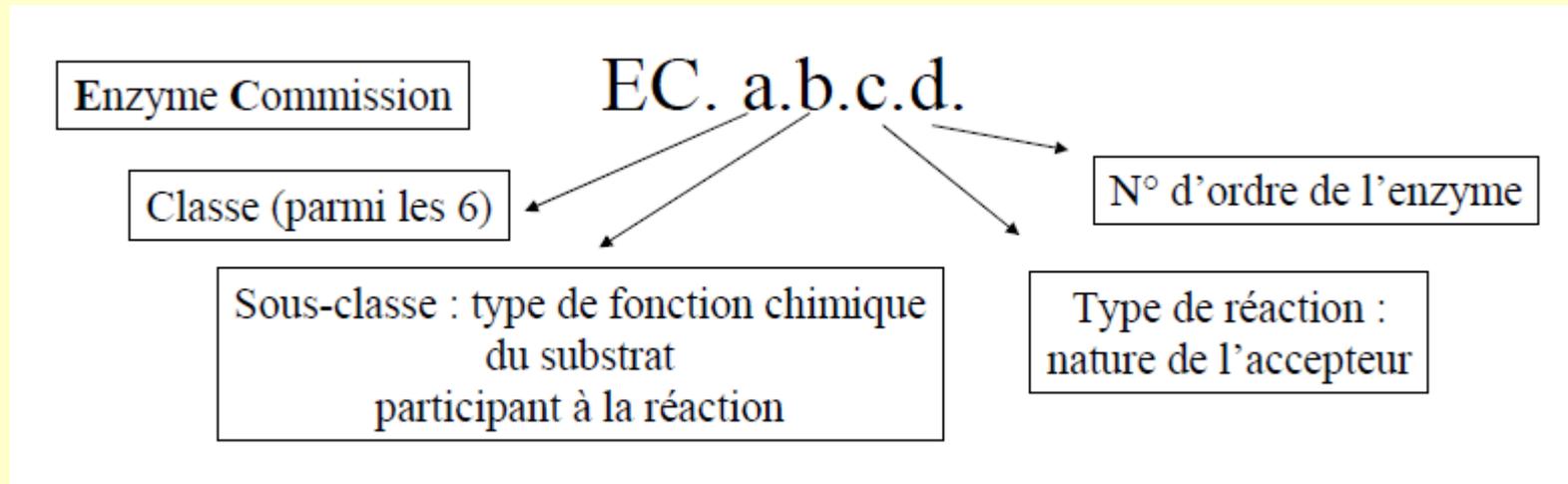
les 6 principales classes , puis les sous-classes et les sous-sous-classes.

- 1 = **Oxydoréductases** Réaction oxydation - réduction
- 2 = **Transférases** Transfère des groupements fonctionnels
- 3 = **Hydrolases** Réactions hydrolytiques
- 4 = **Lyases** Réaction d'élimination pour former des liaisons doubles
- 5 = **Isomérases** Isomérisation (AA-L en AA-D)
- 6 = **Ligases** Formation des liaisons avec hydrolyse ATP (C-C, C-S, C-O et C-N)

Nomenclature

Les enzymes sont classifiés selon la réaction qu'ils catalysent. Ils sont désignés par un nom commun (carboxypeptidase A), un nom systématique (peptidyl-L-amino acide hydrolase) et un numéro de classification (EC « Enzyme Commission

Numérotation conventionnelle:

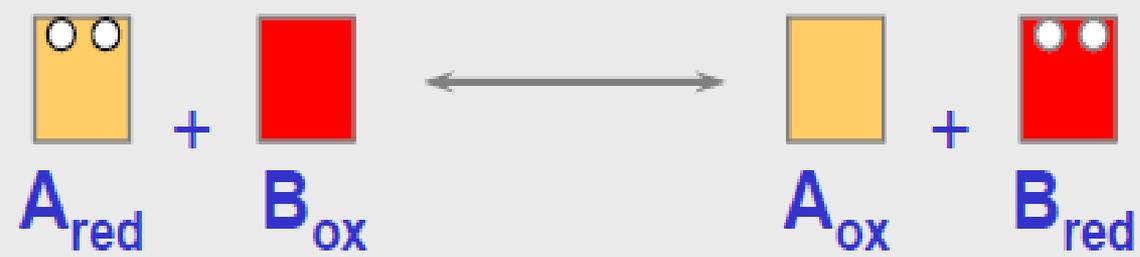


CLASSE

TYPE DE REACTION

EXEMPLES

Oxydo-réductases*

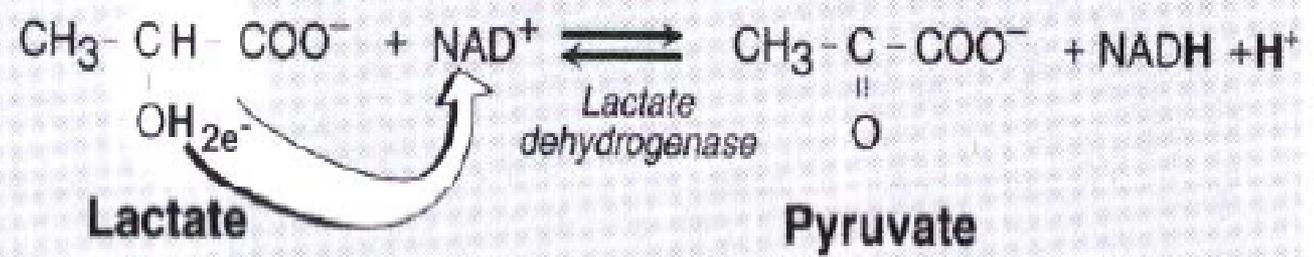


Transferts d'équivalents réducteurs

Déshydrogénases
Oxydases..

1. Oxidoreductases

Catalyse les réactions d'oxydo-réduction



CLASSE

TYPE DE REACTION

EXEMPLES

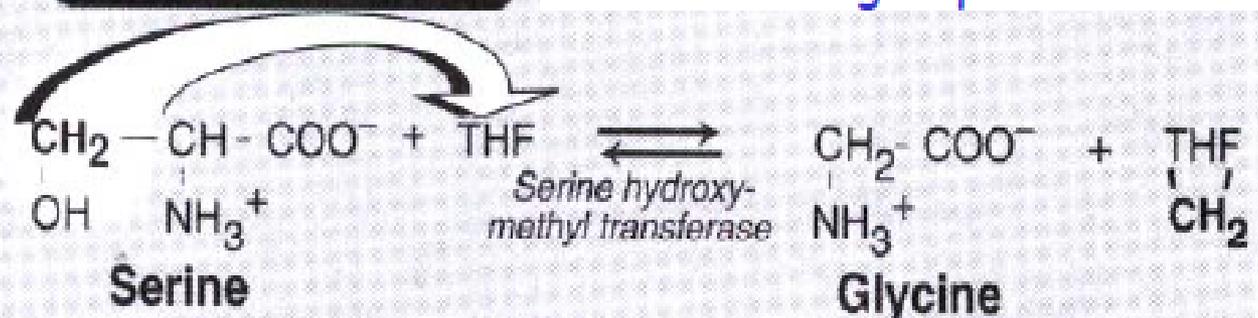
Transférases*



Transfert d'un groupe fonctionnel

2. Transferases

Catalyse les réactions de transfert de groupes



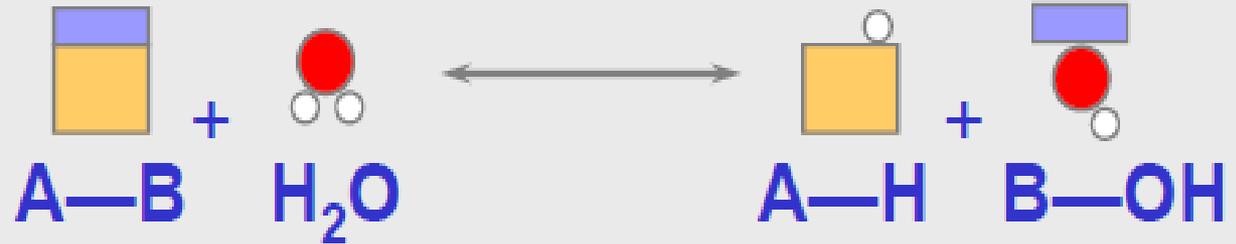
THF : tétra hydro folate

CLASSE

TYPE DE REACTION

EXEMPLES

Hydrolases

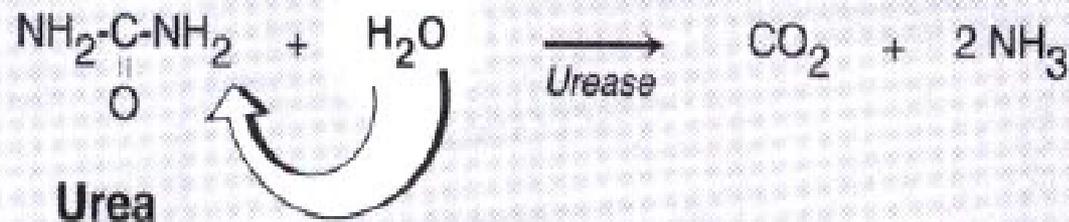


Coupage d'une liaison
par les éléments d'une
molécule d' H_2O

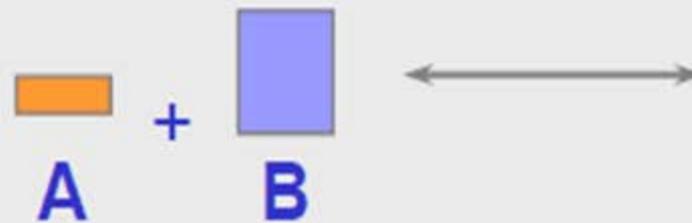
Estérase
Glycosidase
Peptidase
Phosphatase

3. Hydrolases

Catalyse les réactions de
coupure par l'eau



Lyases



Addition d'un groupe fonctionnel sur Δ ou formation d'une Δ (fonctionne surtout dans de sens de la coupure)

sur liaison C=C
sur liaison C=O
sur liaison C=N
Déshydratase

4. Lyases (addition of double bonds)

4.1- —C=C— (alkene)

4.2- —C=O (ketone)

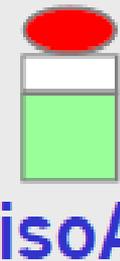
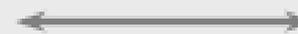
4.3- —C=N— (cyanide)

CLASSE

TYPE DE REACTION

EXEMPLES

Isomérase*



Transfert d'un groupe fonctionnel à l'intérieur d'une molécule

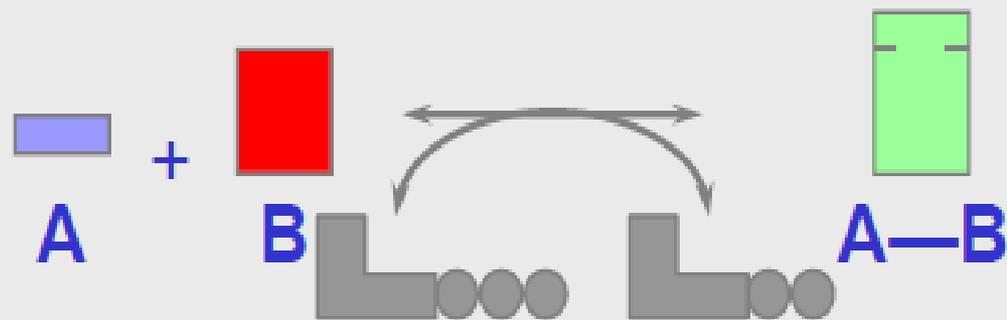
Epimérase
Mutase

5. Isomerases

Catalyse les réactions d'isomérisation



Ligases*

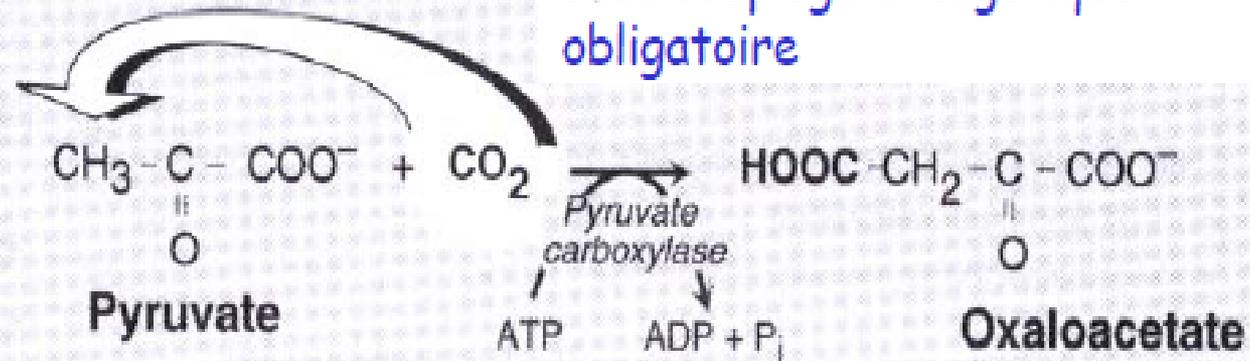


Formation de liaisons
covalentes C-X, couplage
à une réaction → énergie

sur liaison C-C
sur liaison C-O
sur liaison C-N

6. Ligases

Catalyse les réactions de
formation d'une liaison simple
avec couplage énergétique
obligatoire



Les réactions enzymatiques sont très spécifiques, à la fois pour le substrat et pour le type de réaction.

1. Spécificité de substrat

Elle est liée à la structure tridimensionnelle de la molécule de substrat

2. Spécificité de réaction

Pour un substrat donné, une enzyme donnée ne catalyse qu'une seule réaction sur l'ensemble de celle qui est possible.

3. Spécificité de fonction

Elles agissent sur un substrat possédant la même fonction chimique (l'alcool déshydrogénase catalyse la déshydrogénation de l'éthanol mais aussi d'autres alcools). La spécificité enzymatique est due à un complément moléculaire entre le substrat et une région particulière de l'enzyme appelé, le centre actif

4. Mécanisme de catalyse.
4.1. Relation enzyme / substrat.

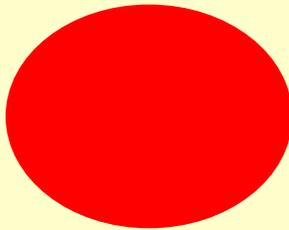
La reconnaissance est la première étape de l'activité enzymatique. Il s'agit de la fixation du substrat sur le *site spécifique* de l'enzyme.

Les deux structures doivent être les plus complémentaires possibles.

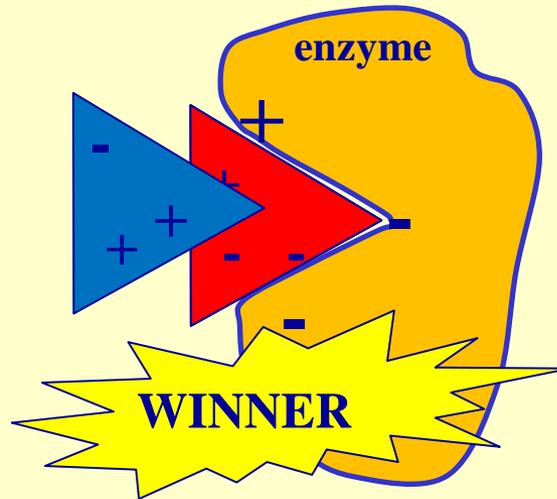
Complémentarité

... de forme

... de charge



Looser!



WINNER

AA non collaborateurs
ne jouent aucun rôle connu sur la conformation du site.

AA de contacts
créent les liaisons avec le substrat

AA auxiliaires
positionnent les AA de contact et forment la structure du site.

AA collaborateurs
AA de la protéines ne faisant pas parti du site mais dont la position influe sur celles des auxiliaires.

AA non collaborateurs
ne jouent aucun rôle connu sur la conformation du site.

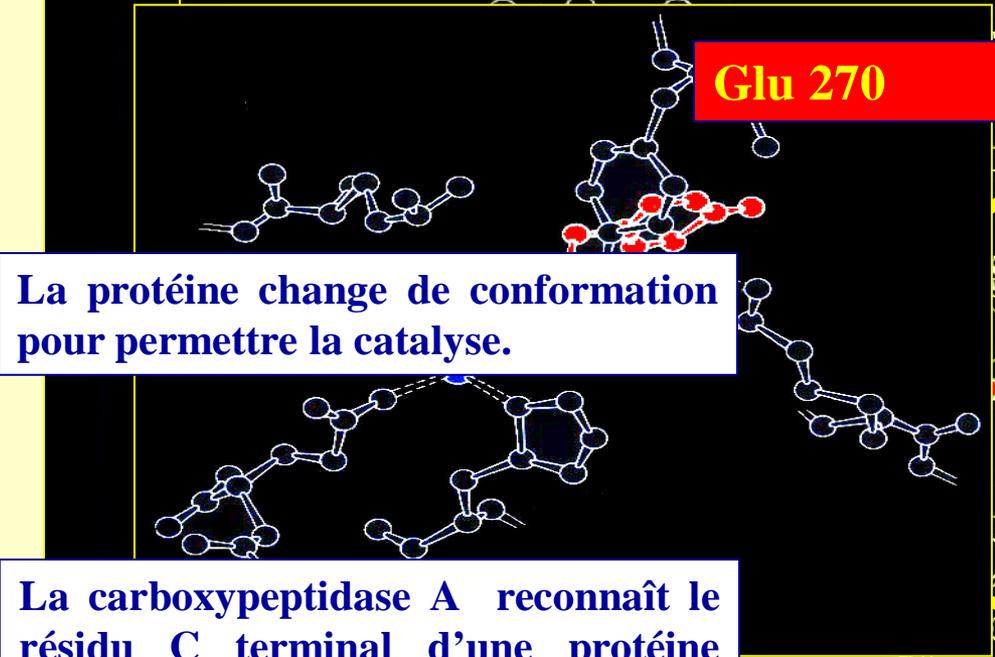
La bonne conformation du site permet la fixation du substrat.

3 classes d'acides aminés participent à la conformation du site de reconnaissance.

AA de contacts
créent les liaisons avec le substrat

AA auxiliaires
positionnent les AA de contact et forment la structure du site.

AA collaborateurs
AA de la protéines ne faisant pas parti du site mais dont la position influe sur celles des auxiliaires.

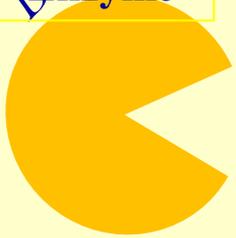


La protéine change de conformation pour permettre la catalyse.

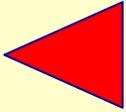
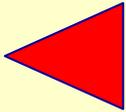
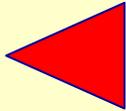
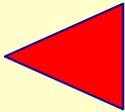
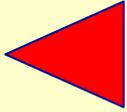
La carboxypeptidase A reconnaît le résidu C terminal d'une protéine possédant un noyau aromatique (ou une chaîne volumineuse)

4.2. Reconnaissance du Substrat.

Enzyme

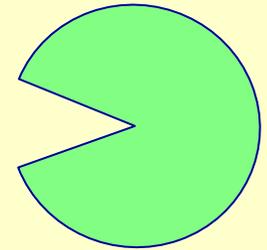
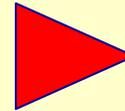
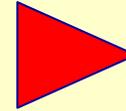
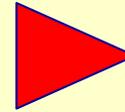
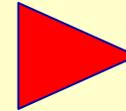
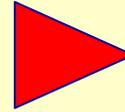
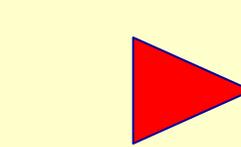


Substrat



Bonne reconnaissance.

La reconnaissance du substrat intervient dans la vitesse de la réaction.



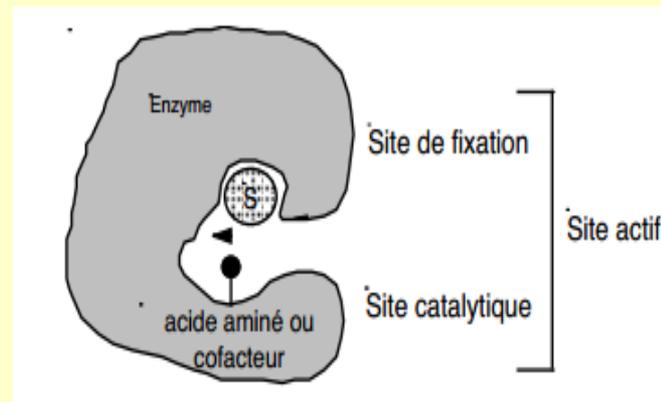
Mauvaise reconnaissance.

Le **site actif** d'une enzyme est la région tridimensionnelle qui se lie au **substrat**, une petite zone privilégiée de la protéine enzymatique dont la géométrie a une importance considérable sur la spécificité, il est situé dans une zone hydrophobe dans la partie interne de la structure. Il assure deux fonctions :

- **fixation du substrat** (site de fixation, de reconnaissance) est constitué de certains Acides aminés qui sont associés avec l'orientation du substrat, et donc, avec la spécificité de l'enzyme, responsable de la stéréospécificité.

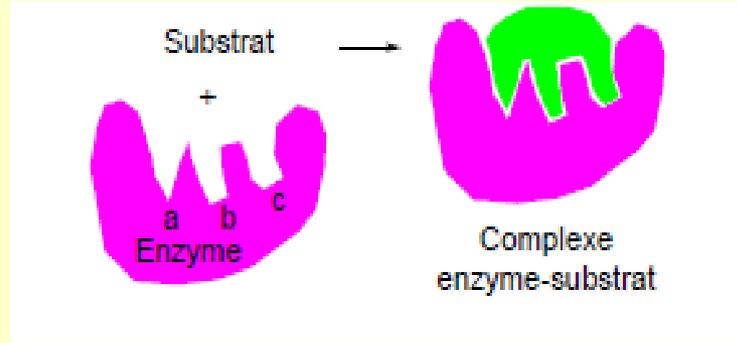
- **transformation du substrat** (site catalytique) est constitué des résidus qui sont *directement* impliqués dans la formation et rupture des liens chimiques. Ces résidus sont souvent localisés dans le fond de la cavité, et dans la majorité des cas, possèdent des chaînes latérales ioniques ou réactives (ex. His, Lys, Cys, Ser, Asp, Glu).

- Les autres AA sont qualifiés **d'auxiliaires**, de collaborateurs ou de non collaborateurs selon leur degrés d'intervention dans l'acte catalytique



Deux modèles pour expliquer la spécificité des enzymes:

La complémentarité stérique entre l'enzyme et son substrat est à l'origine de cette spécificité et que les enzymes et les substrats se reconnaissent comme une clé qui s'adapte dans une serrure

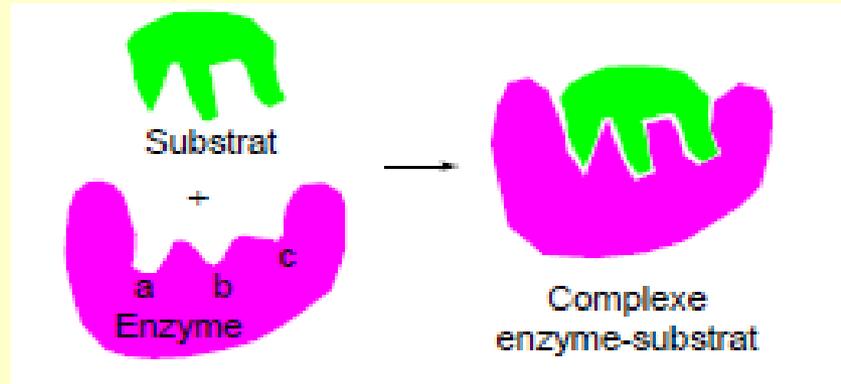


Forme induite: l'enzyme change sa conformation lors de la liaison du substrat

Ajustement induit -----dynamique

-lors de la fixation de substrat, l'enzyme change de conformation

Suppose que l'enzyme a une structure flexible



2. Les paramètres enzymatiques.

2.2. Détermination des paramètres.

2.2.2. Représentation de Michaelis.

Les enzymologistes caractérisent l'efficacité d'une enzyme [E] en fonction de l'effet de la concentration en substrat [S].

C'est pourquoi, l'étude enzymatique débute par la mesure des vitesses initiales des réactions à différentes concentrations.

2. Les paramètres enzymatiques.

2.2.2. Représentation de Michaelis.

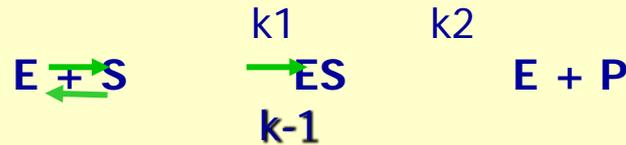
Leonor Michaelis (Berlin, 16 janvier 1875 - New York, 8 octobre 1949) est un biochimiste et médecin allemand, renommé pour son travail avec *Maud Menten* sur la cinétique enzymatique et l'équation de Michaelis-Menten, proposée en 1913.

Wikipédia



4.3. Loi cinétique enzymatique :

Soit la réaction enzymatique:



E : Enzyme

S : Substrat

ES : Complexe enzyme-substrat

P : Produit

La réaction enzymatique obéit à la loi de Michaelis-Menten :

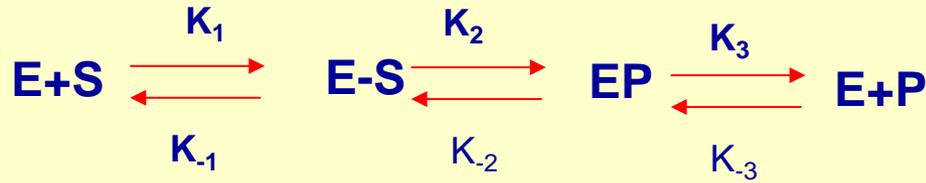
$$V_i = (V_{\max} * [S]) / (K_m + [S])$$

V_i : Vitesse initiale (c'est-à-dire en absence de produit) de la réaction enzymatique pour une concentration de substrat [S].

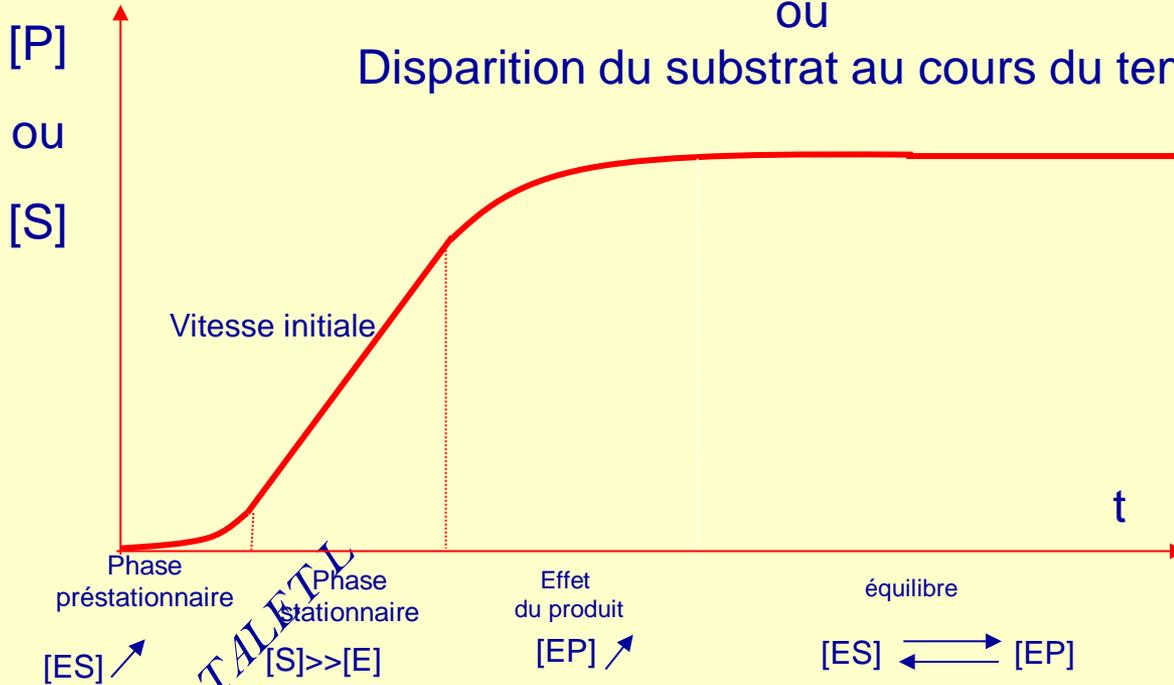
V_{max} : Vitesse initiale maximale mesurée pour une concentration saturante de substrat [S].

[S] : Concentration en substrat.

K_m : Constante de Michaelis spécifique de l'enzyme. C'est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à V_{max}/2.



Apparition du produit au cours du temps
ou
Disparition du substrat au cours du temps



La vitesse peut être mesurée avec l'apparition du produit.

$$v = \frac{d[P]}{dt}$$

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

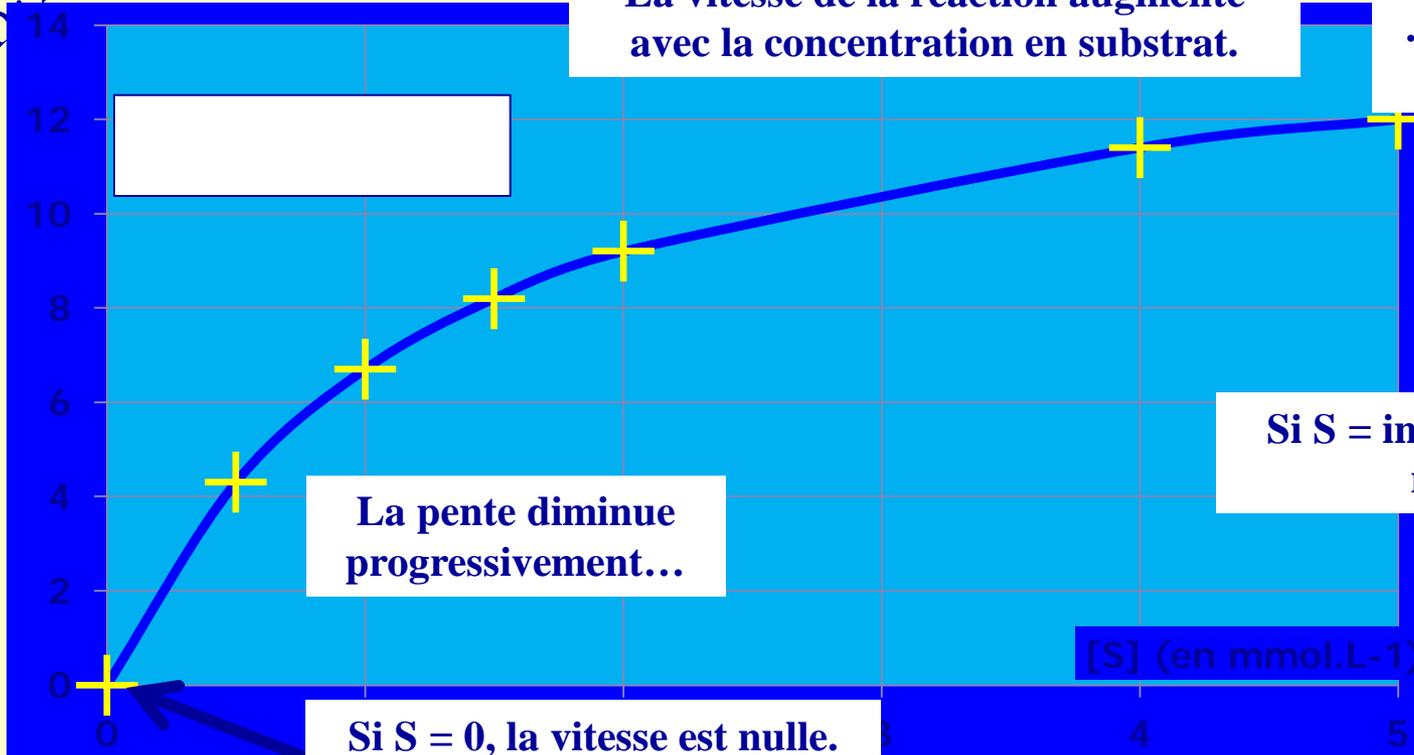
Il y a un maximum d'enzyme liée avec le substrat. D'où la vitesse maximale

4.4. Représentation de Michaelis.

Commenter l'allure du graphe.

La vitesse de la réaction augmente avec la concentration en substrat.

...jusqu'à atteindre un palier.



La pente diminue progressivement...

Si $S = \infty$, la vitesse est maximale.

Si $S = 0$, la vitesse est nulle. C'est logique !

Dr BENSALHA TALET L

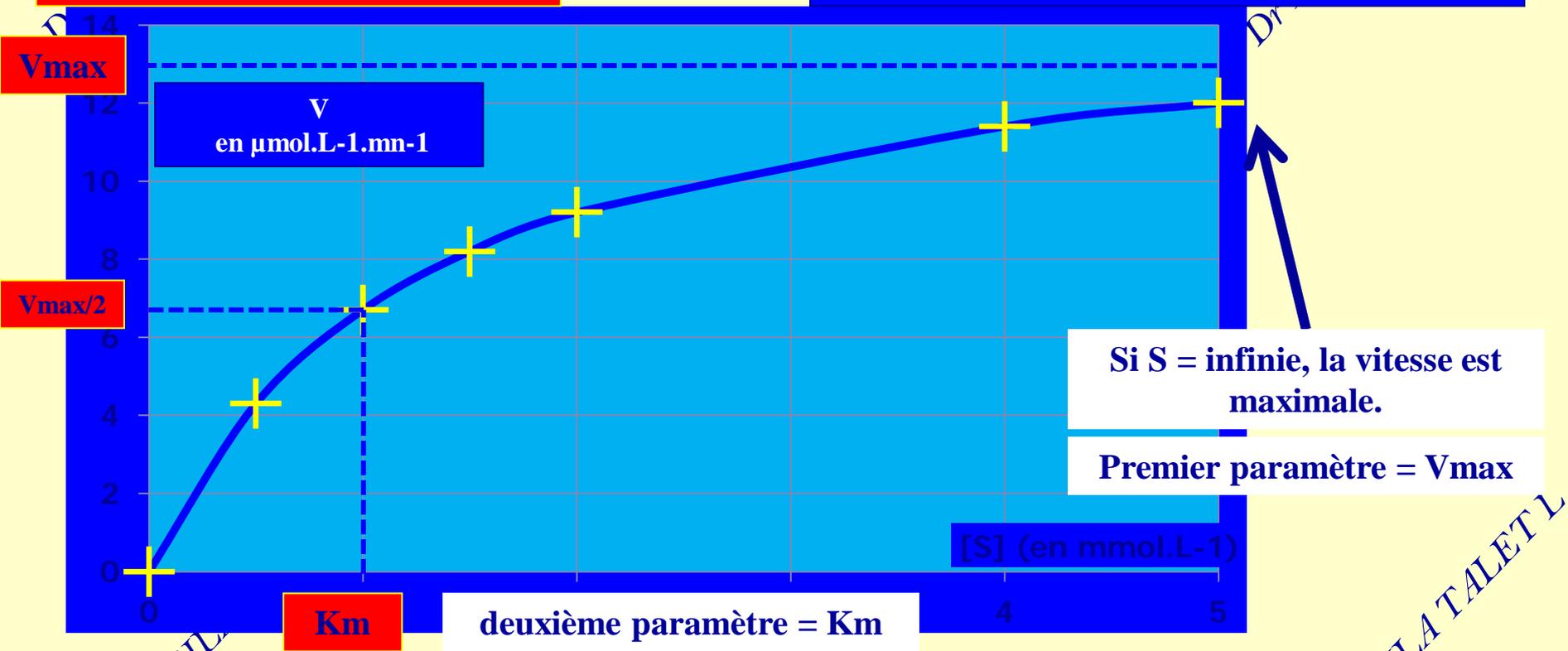
BENSALHA TALET L

4.3. Représentation de Michaelis.

Le calcul des paramètres

V_{max} = valeur de l'asymptote

Plus V_i est grand, plus l'enzyme est efficace.

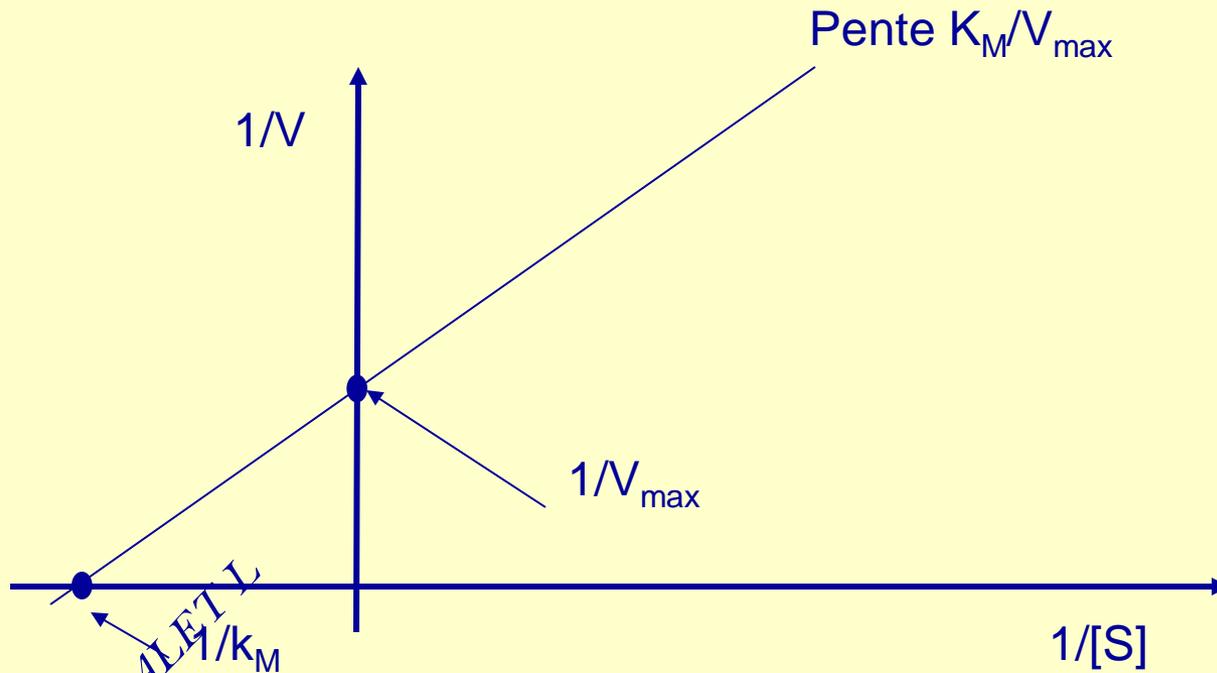


Dr BENSABLA

Dr BENSABLA TALET L

représentation de Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{V} = \frac{k_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_{ini}} + \frac{1}{V_{\max}} \quad Y = aX + B$$

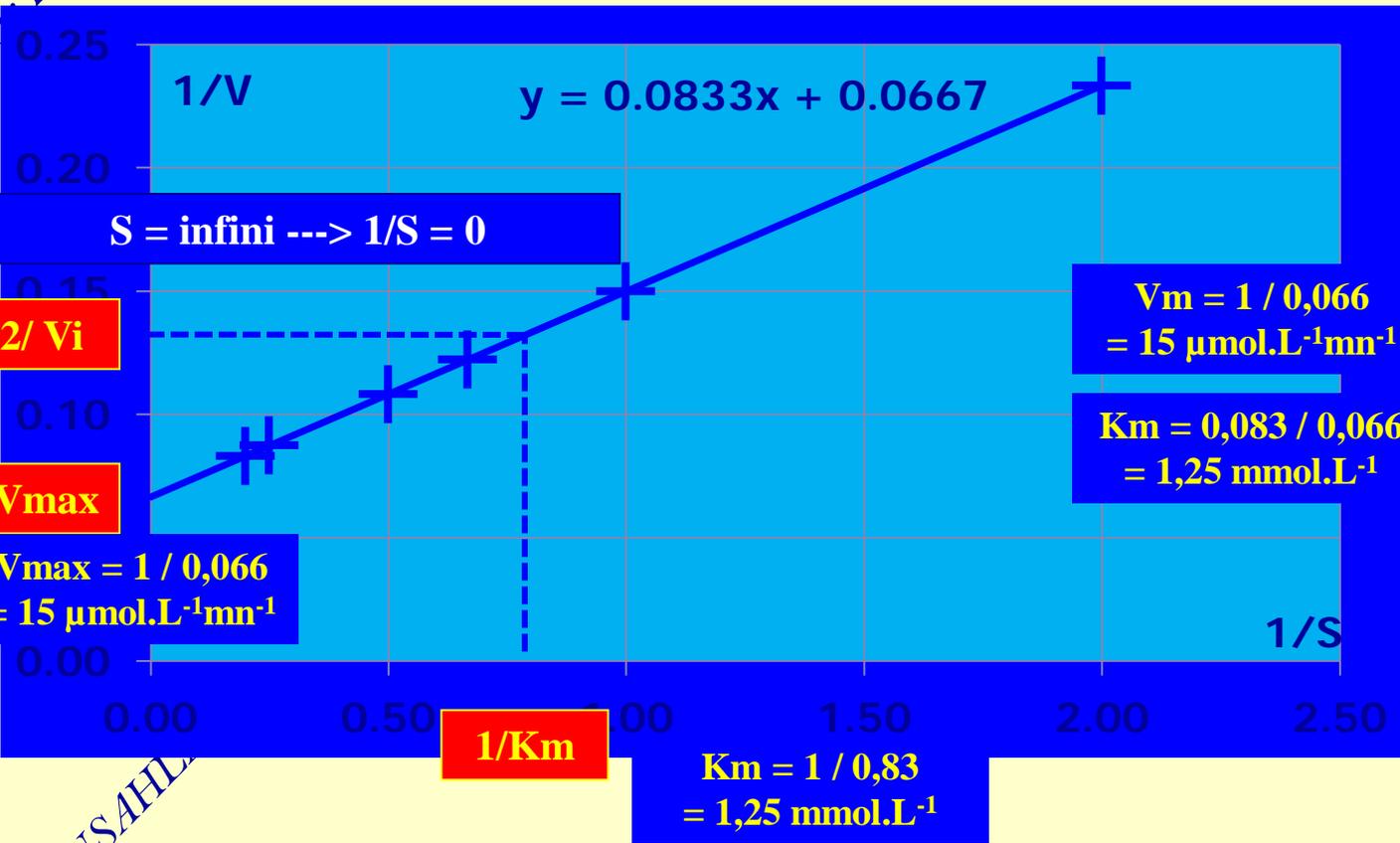


Dans cette représentation,
la droite coupe l'axe des x en $1/K_M$
La droite coupe l'axe des y en $1/V_{\max}$
La pente de la droite est K_M/V_{\max}

4.5. Méthodes de Lineweaver et Burck

Le calcul des paramètres

Méthode graphique



On utilise l'équation de la droite.

$$V_{max} = 1/b$$

$$K_m = a/b$$

4.6. Les unités

1. vitesse de catalyse (k_{cat}):

n de molécules de substrat transformées par seconde.

2. Unité enzymatique (UE):

μ moles de molécules de substrat transformées par minute.

Il existe des unités dérivées.

3. UE par volume de solution ($UE \cdot ml^{-1}$)

UE / volume de solution

4. Activité spécifique ($UE \cdot mg^{-1}$)

UE / masse de protéine

4.7.1. Haloenzymes (Holoenzymes)

Il existe quatre types d'enzymes possibles :

1. Protéine enzymatique seule.
2. Apoenzyme + coenzyme.
3. Apoenzyme + ion.
4. Apoenzyme + coenzyme + ion.

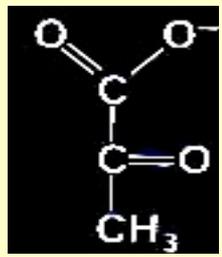
Apoenzyme + Coenzyme = Haloenzyme

Le terme **holoenzyme** :est l'assemblage du cofacteur (qui peut être un ion métallique, ou une molécule organique) et d'une ou plusieurs chaînes protéiques, formant ainsi une enzyme complète et active. L'holoenzyme est donc le complexe enzymatique catalytiquement activé par ses cofacteurs. La partie protéique de l'enzyme est alors nommée **apoenzyme** et la partie non protéique **coenzyme** .

Lorsque la partie non protéique est un ion métallique (oligo-élément) , le complexe est alors nommé **métalloprotéine**.

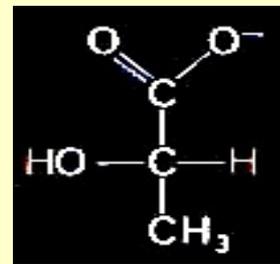
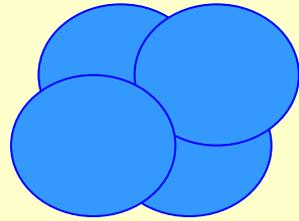
4.7.2. Les iso-enzymes.

Ce sont des enzymes de structures différentes qui catalysent la même réaction.



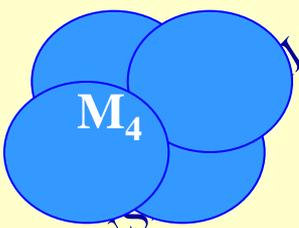
Pyruvate

Lactate déshydrogénase
LDH

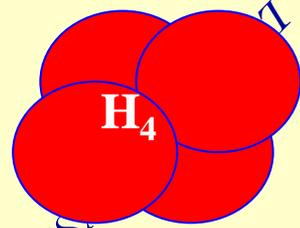
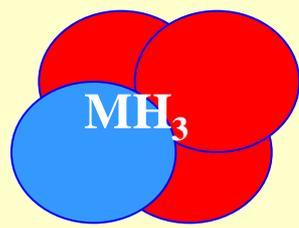
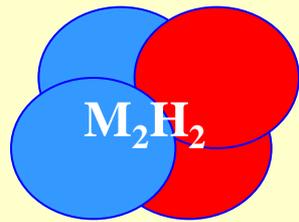
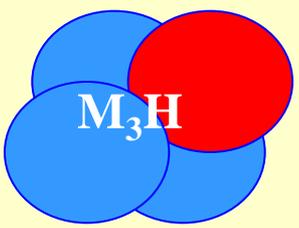


Lactate

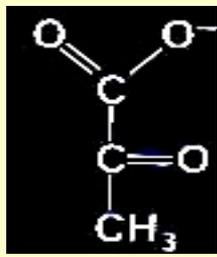
La LDH est un tétramère de sous unités de 35 kD.
Il existe deux types de chaînes appelées M et H qui peuvent former cinq types de tétramères.



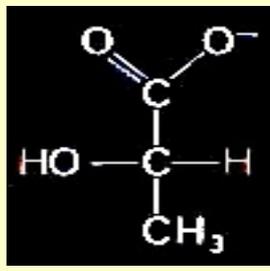
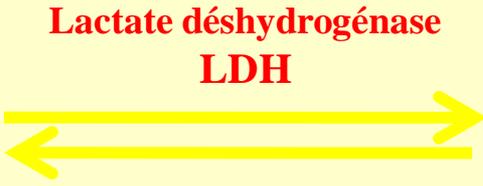
Dr BENS



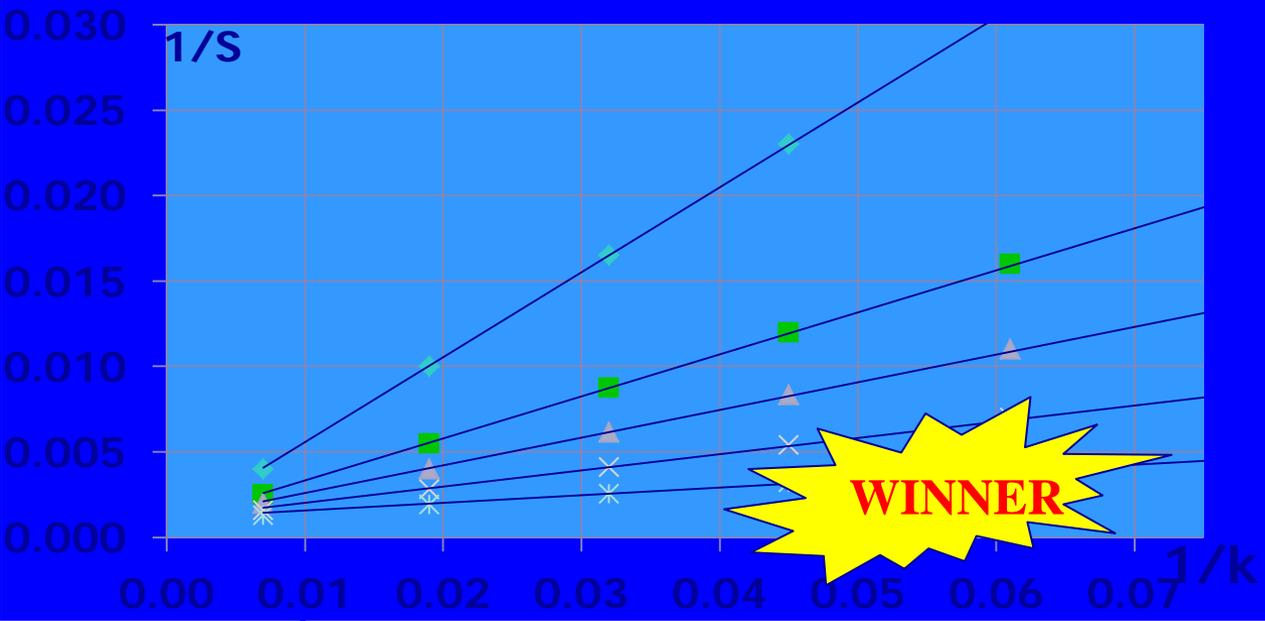
Dr BENS



Pyruvate

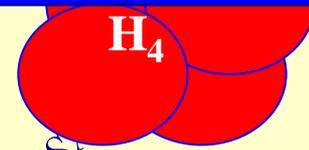
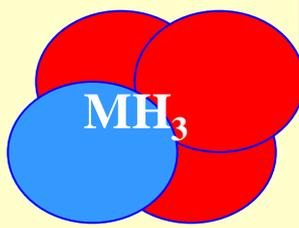
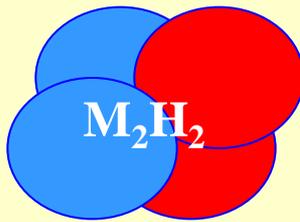
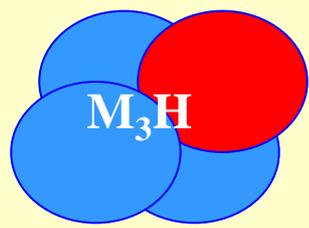
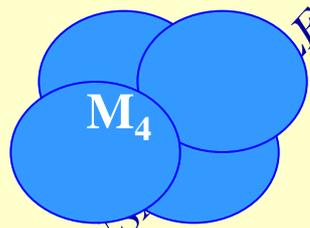


Lactate



	Km $\mu\text{mol.L}^{-1}$
H4	300
MH3	220
M2H2	155
M3H	90
M4	30

k
 mol.s^{-1} 1000



Dr BENSABHA TALET L

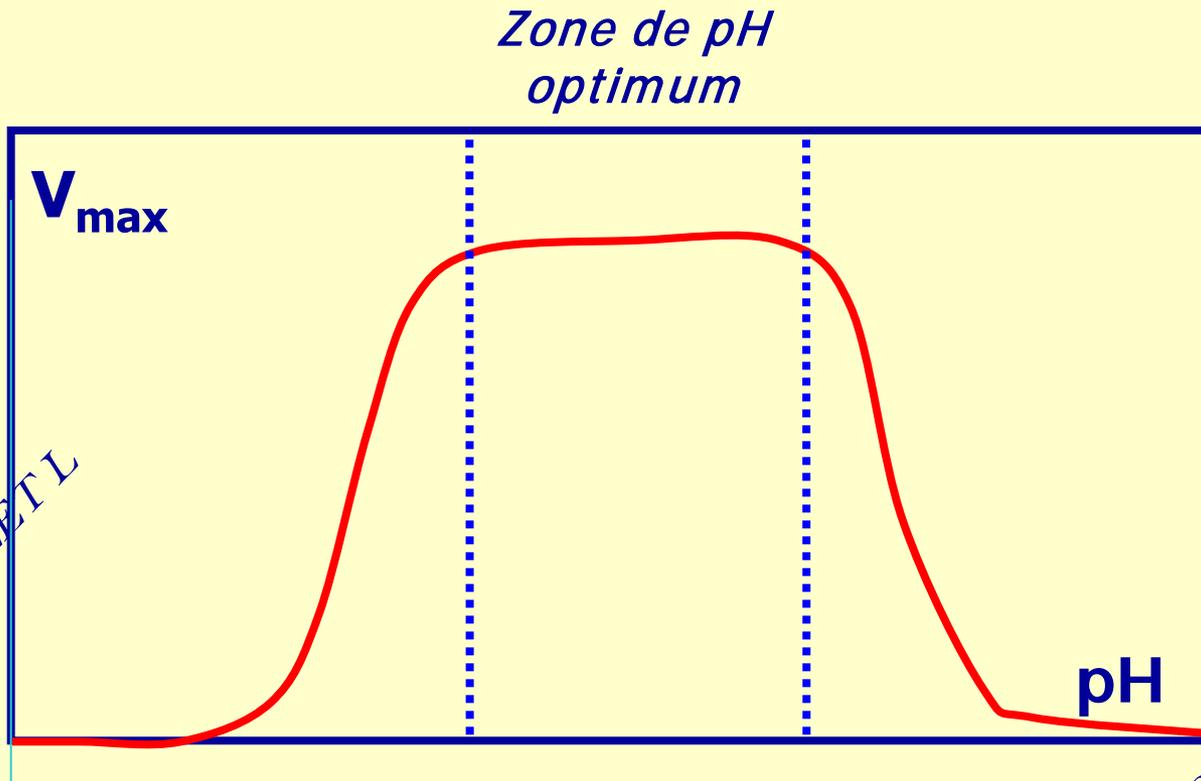
Dr BENSABHA TALET L

Dr BENSABHA TALET L

Dr BENSABHA TALET L

4.8. Effet du pH

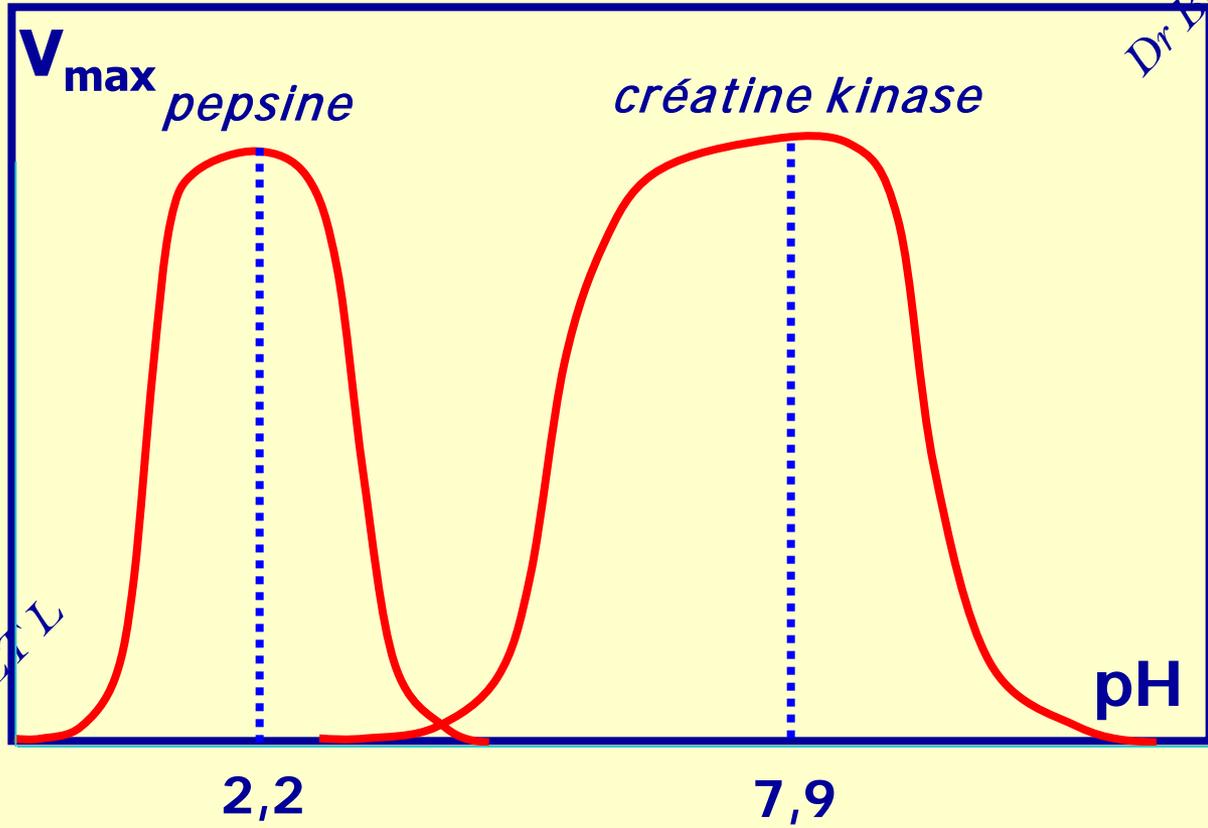
Les enzymes sont des protéines constituées d'acides aminés pouvant porter des fonctions chimiques sensibles aux variations de pH. Ces fonctions chimiques peuvent se protonner ou se déprotonner selon le pH du milieu dans lequel se trouve l'enzyme.



Effet du pH

Dr BENSAPHLA TALET L

Dr BENSAPHLA TALET L

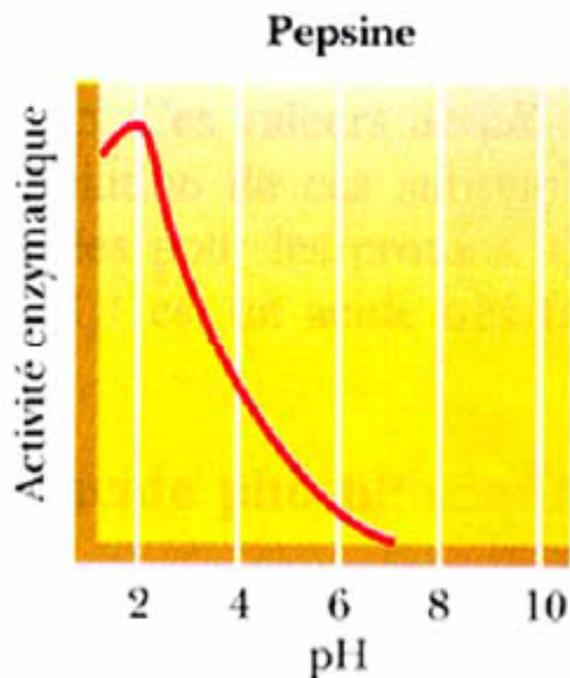


Dr BENSAPHLA TALET L

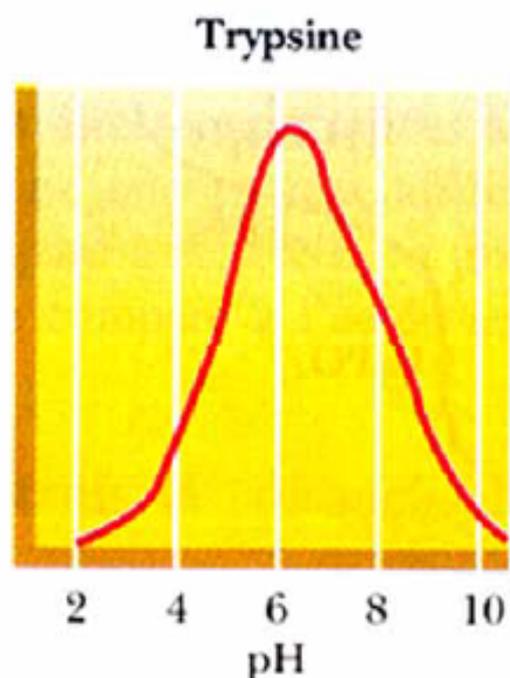
Dr BENSAPHLA TALET L

pH optimum pour chaque enzyme

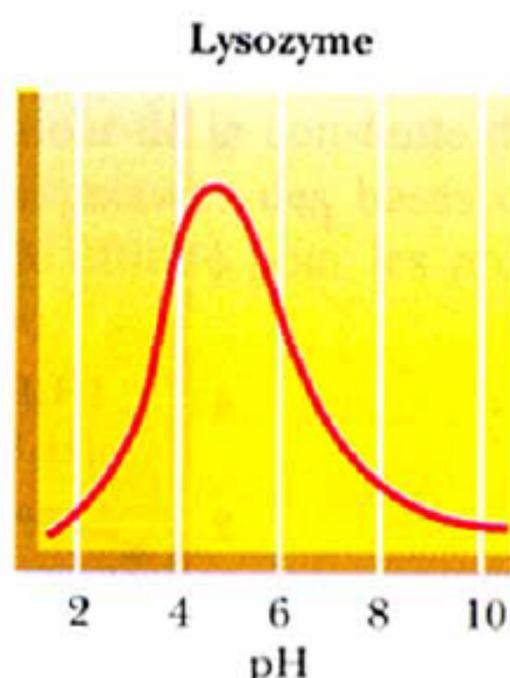
Le pH optimum d'un enzyme est l'une de ses plus importantes caractéristiques.



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



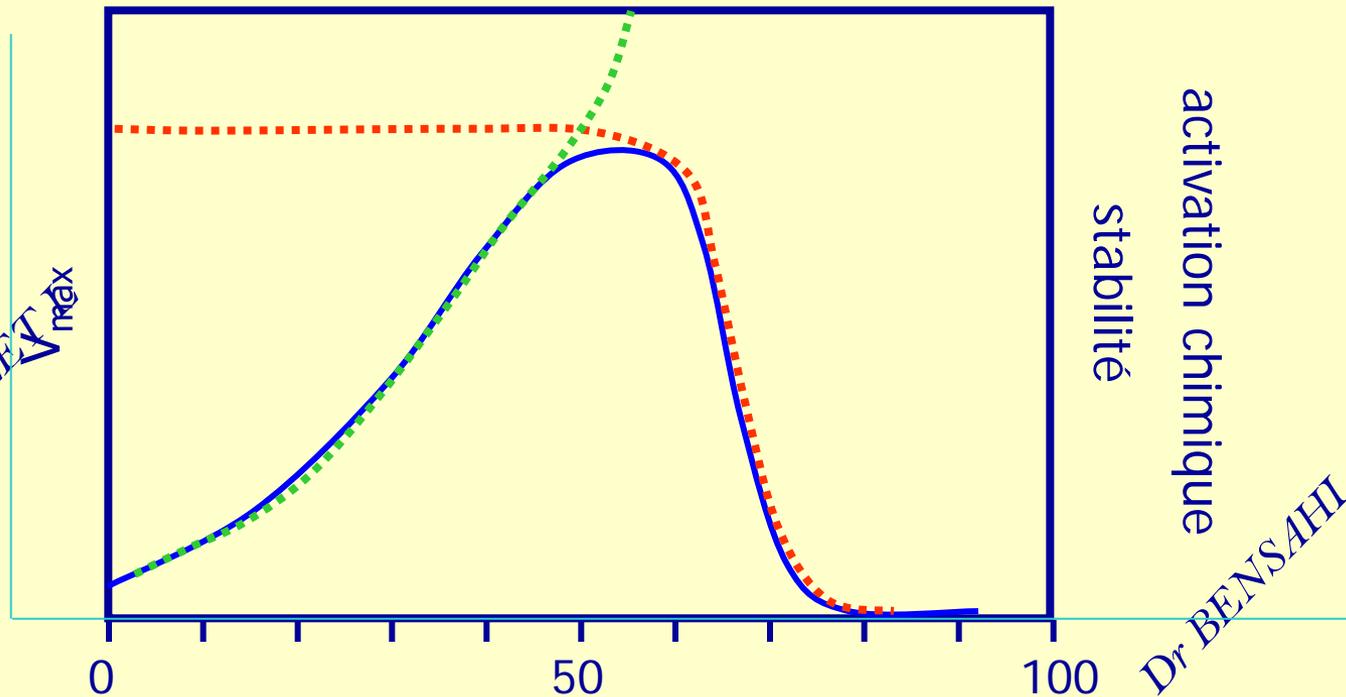
La trypsine est également un enzyme protéolytique mais elle agit dans le milieu plus alcalin de l'intestin grêle.



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

4.9. Effet de la température

- ✓ Augmentation de la probabilité de rencontres entre enzyme et substrat.
- ✓ Augmentation de la vitesse de la phase de transformation du substrat en produit (augmentation de k_{cat}).
- ✓ A températures élevées, fluctuations importantes de la structure 3D de la protéine avec perte de structure tertiaire : dénaturation thermique, souvent irréversible.



5. Inhibition enzymatique

• inactivation d'une enzyme (ralentissement de la réaction enzymatique) par la liaison d'une petite molécule

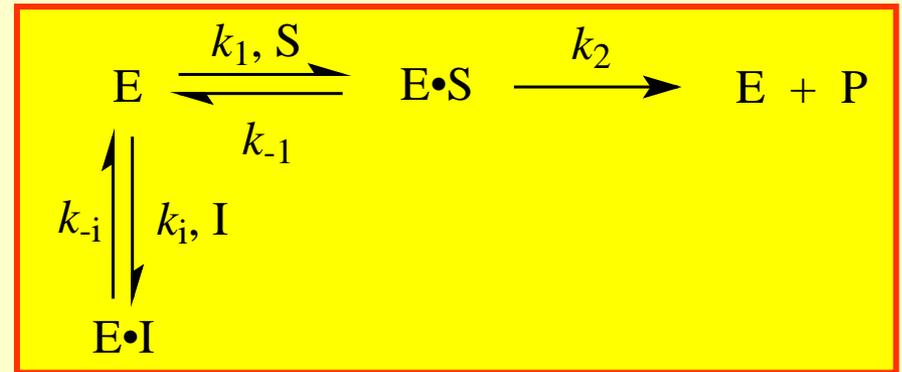
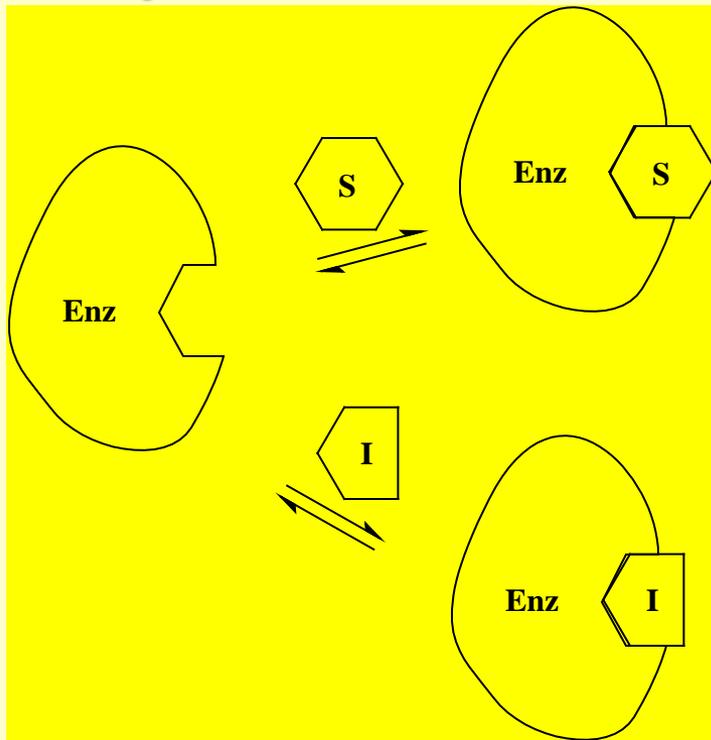
- A ne pas confondre avec la dénaturation

Types d'inhibition

- réversible
 - compétitive
 - Non compétitive
 - incompétitive

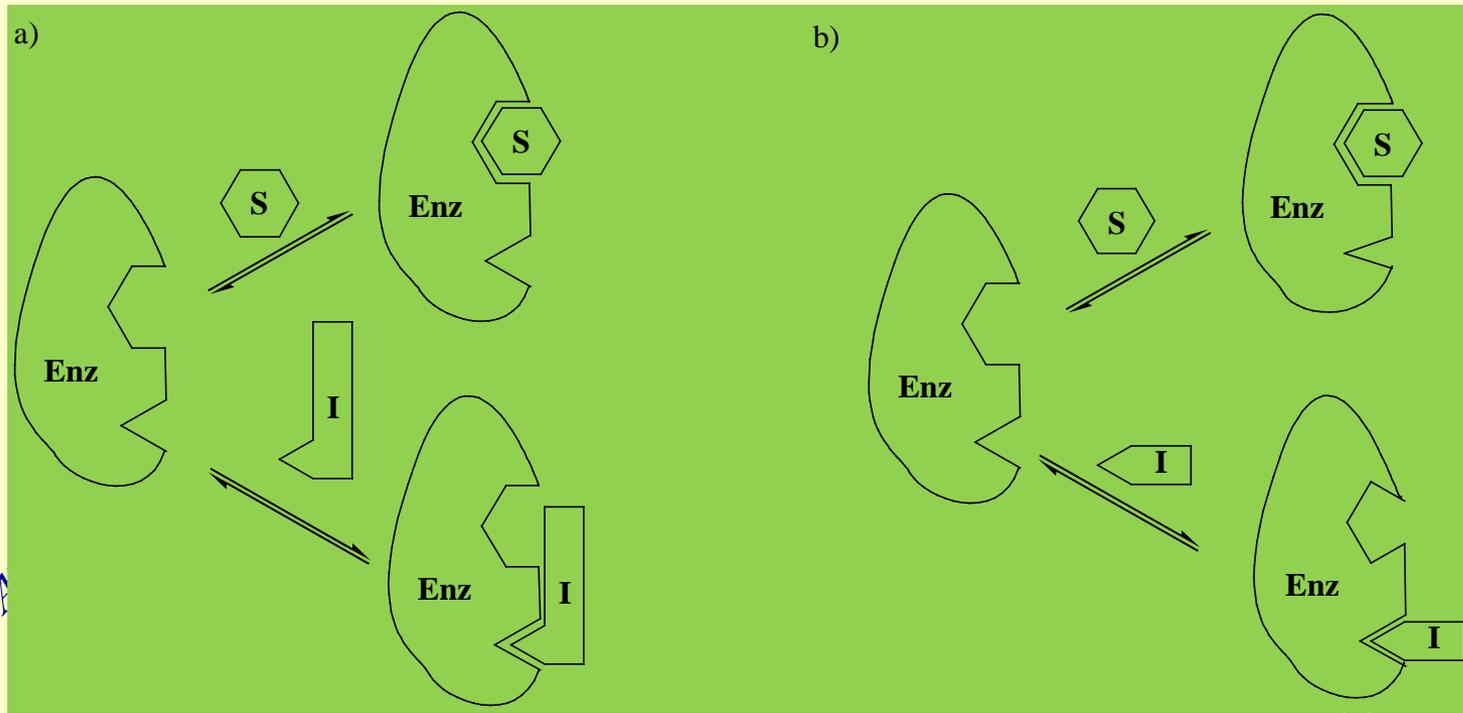
Inhibition compétitive

- la liaison de l'inhibiteur, à l'enzyme libre, empêche la liaison du substrat



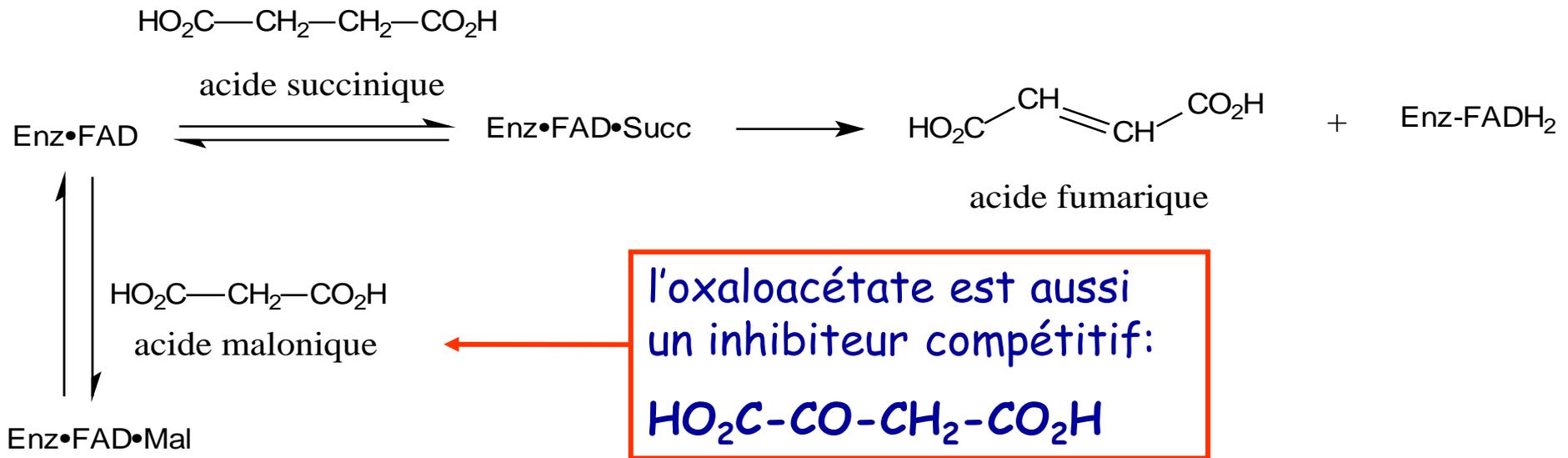
Inhibition compétitive alternative

- la liaison de l'inhibiteur, près du site actif, empêche la liaison du substrat par encombrement stérique
- la liaison de l'inhibiteur, près du site actif, induit un changement conformationnel qui empêche la liaison du substrat



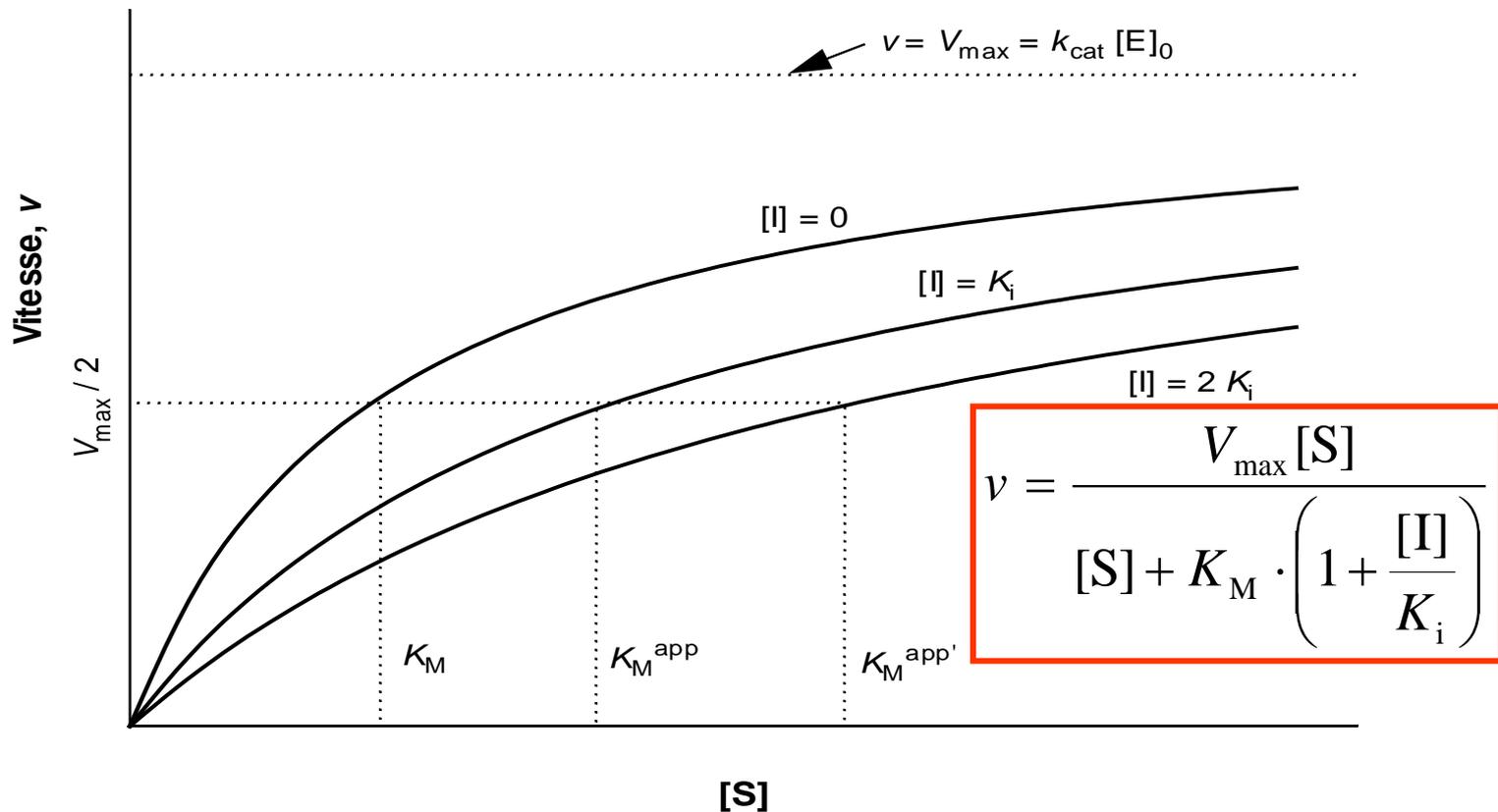
Exemple de l'inhibition compétitive

- l'acide malonique ressemble à l'acide succinique et inhibe la déshydrogénase de succinate lors de sa liaison :



Graphique d'inhibition compétitive

Graphique Michaelis-Menten d'inhibition compétitive



Dr BENSALHA T.

SAHLA T.

Dr BENSALHA

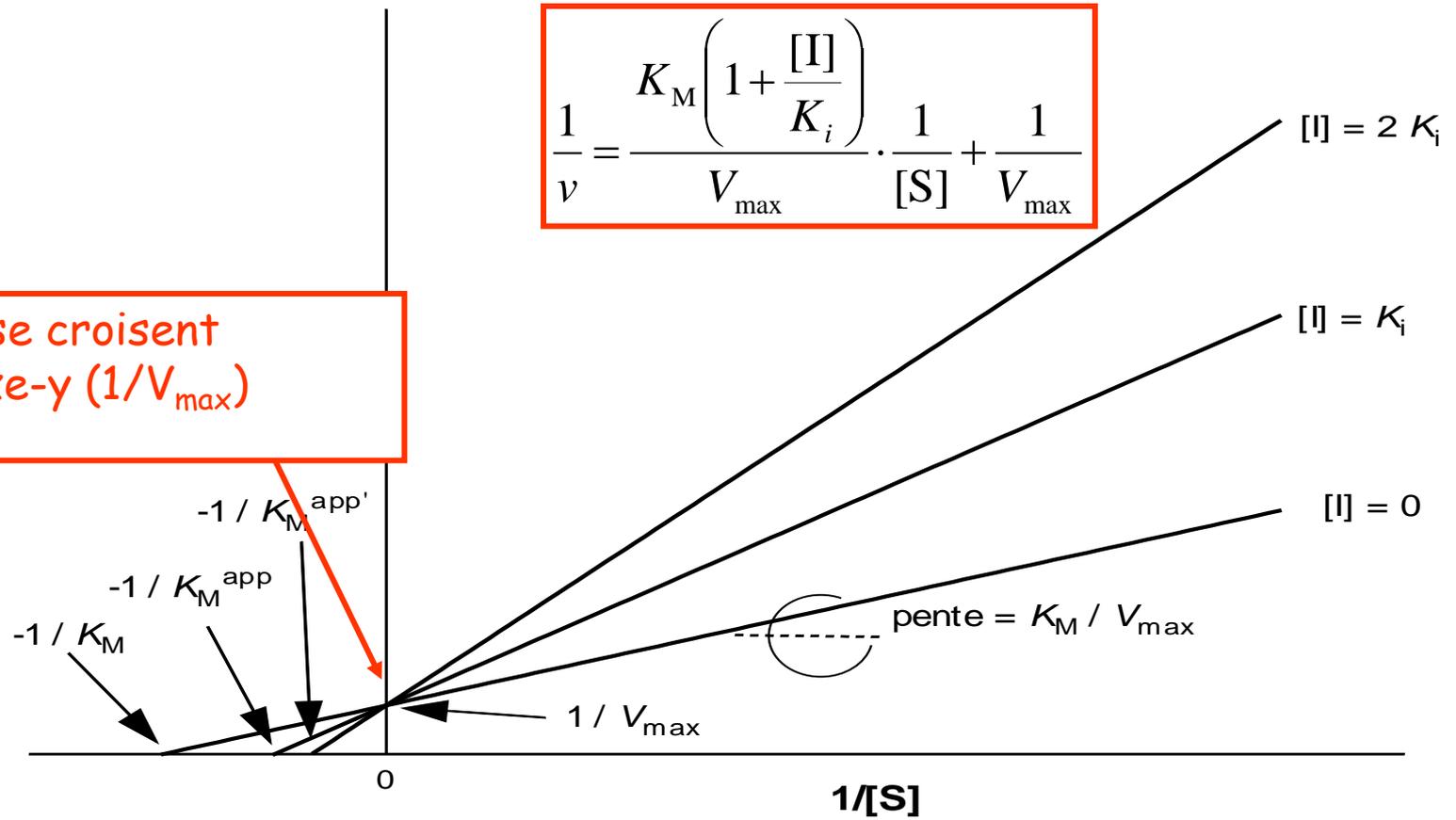
D'

LET L

Graphique Lineweaver-Burk d'inhibition compétitive

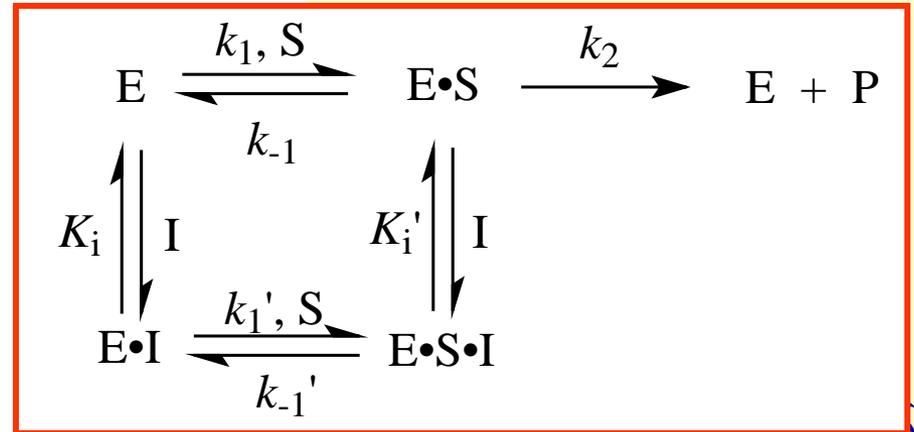
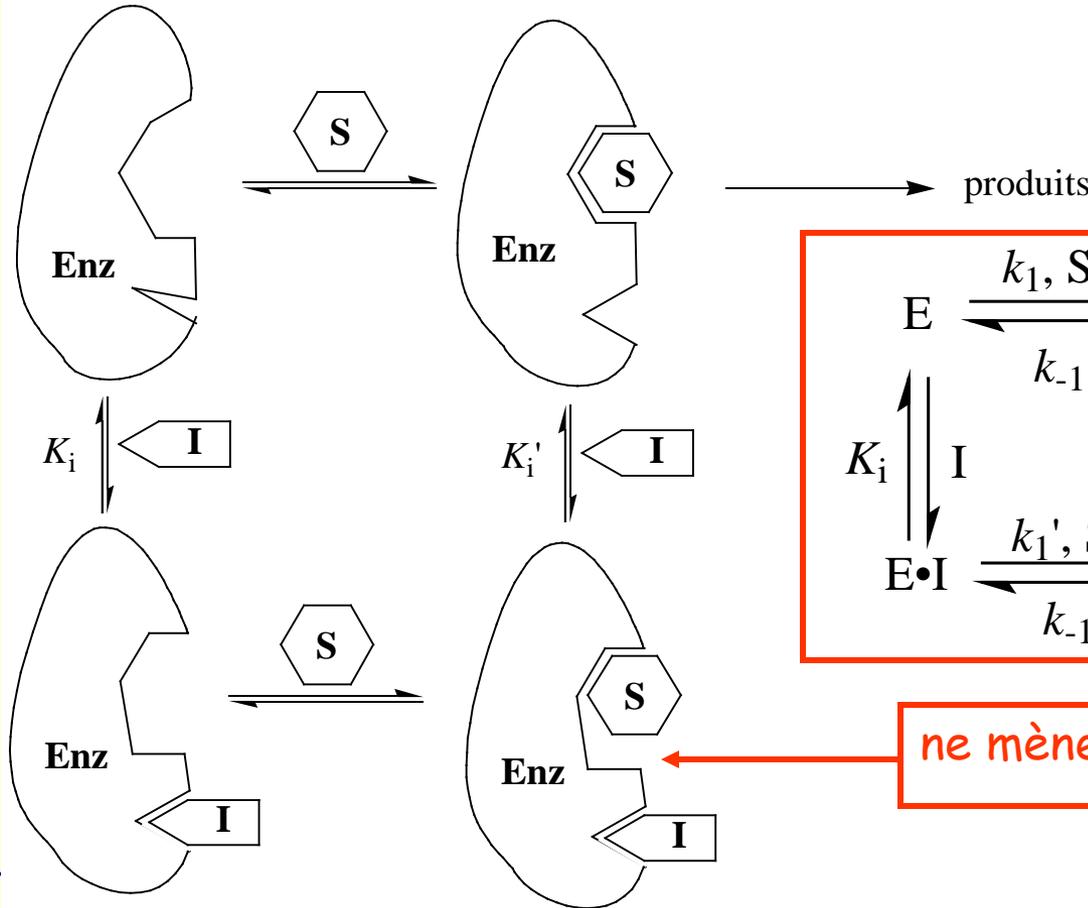
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

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



Inhibition non-compétitive

- L'inhibiteur est lié par l'enzyme libre et par le complexe E•S



ne mène pas aux produits

Dr BENSALHA TALET L

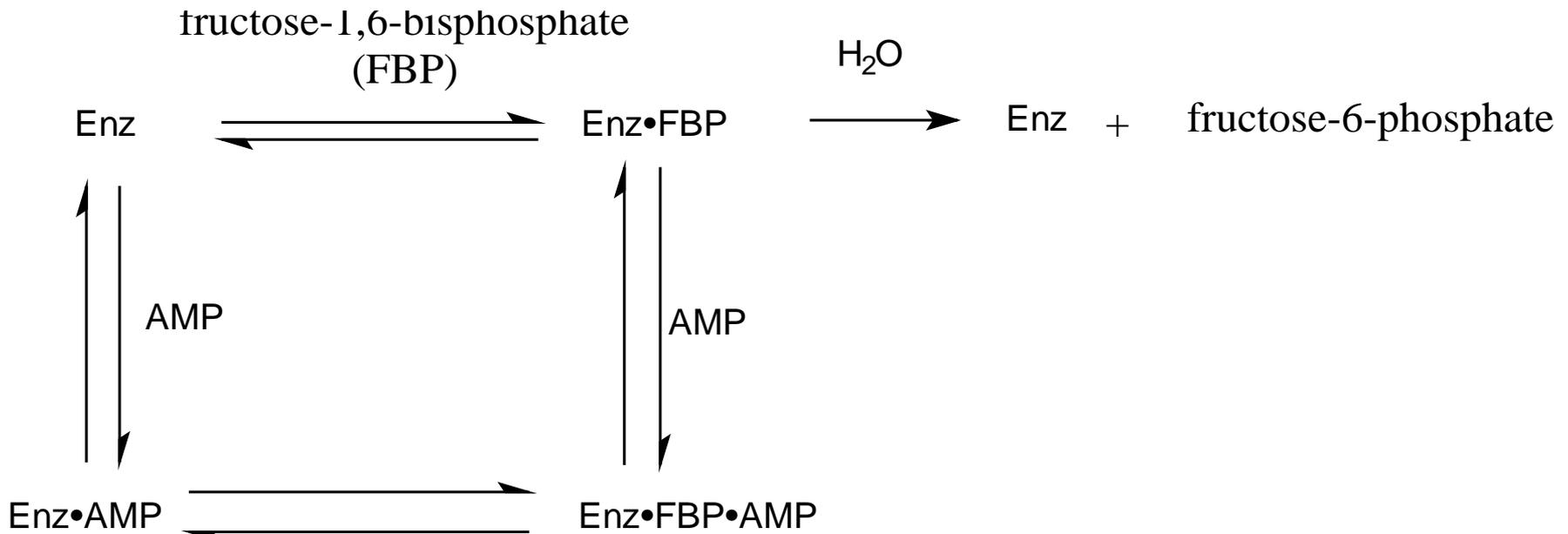
Dr BENSALHA TALET L

Dr BF

Dr BENSALHA TALET L

Exemple de l'inhibition non-comp.

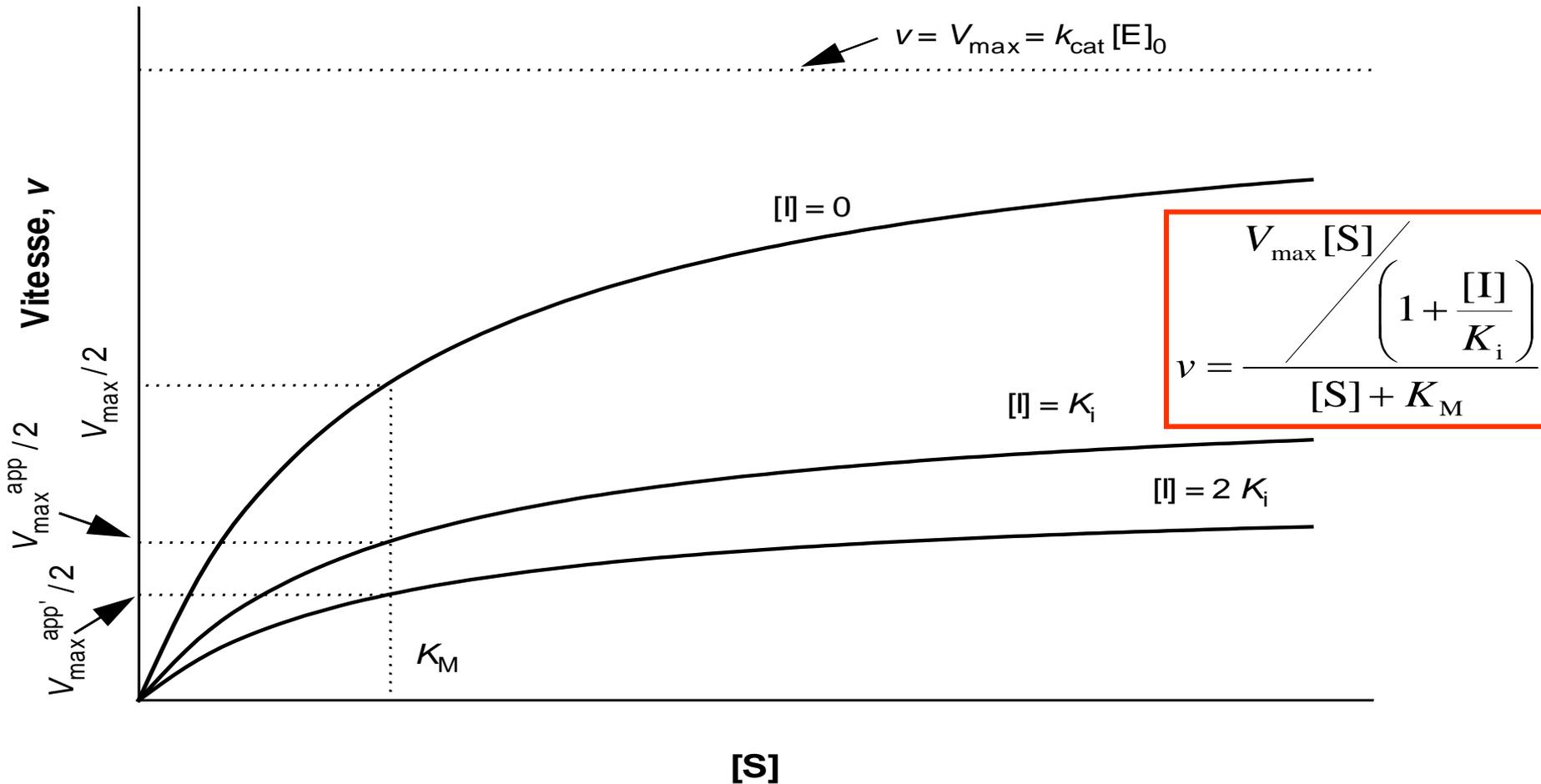
- inhibition de la bisphosphatase de fructose par le AMP :



ne mène pas aux produits

Graphique d'inhibition non-compétitive simple

Graphique Michaelis-Menten d'inhibition noncompétitive simple



Graphique d'inhibition non-compétitive simple

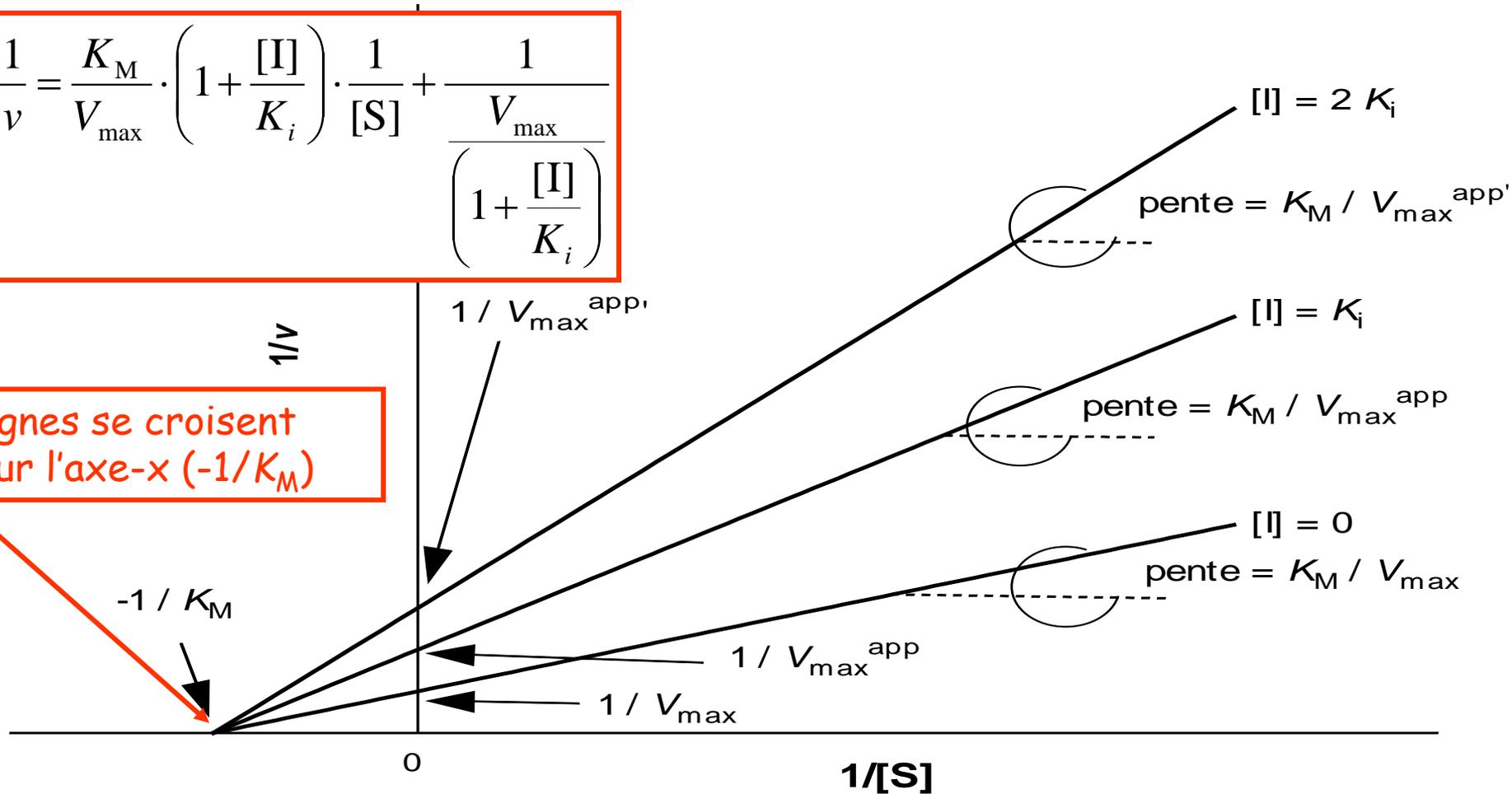
TALET L

TALET L

Graphique Lineweaver-Burk d'inhibition noncompétitive simple

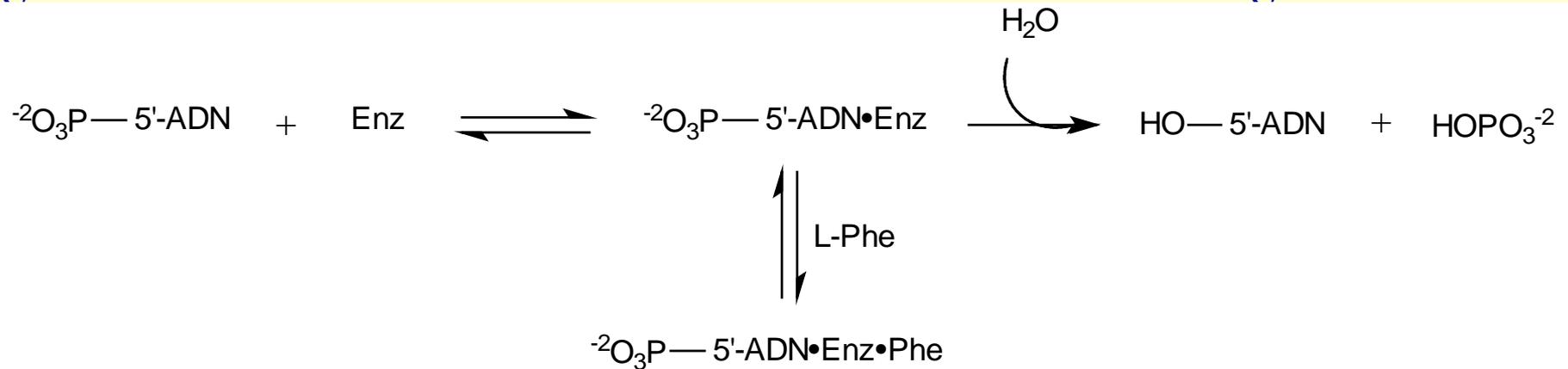
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

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



Exemple de l'inhibition incompétitive

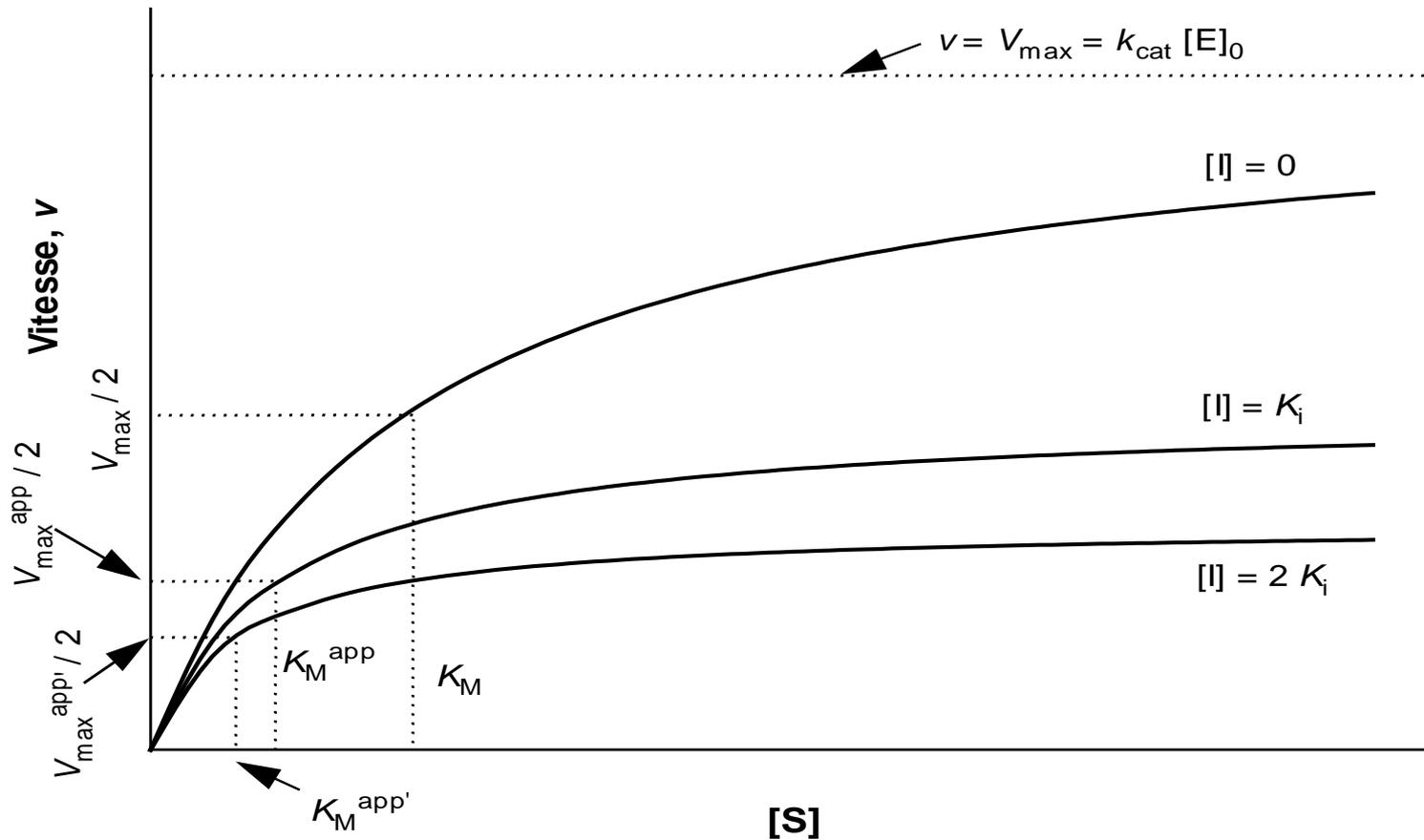
- inhibition de la phosphatase alcaline par la L-phénylalanine:



ne mène pas aux produits

Graphique d'inhibition incompétitive

Graphique Michaelis-Menten d'inhibition incompétitive



Dr BE

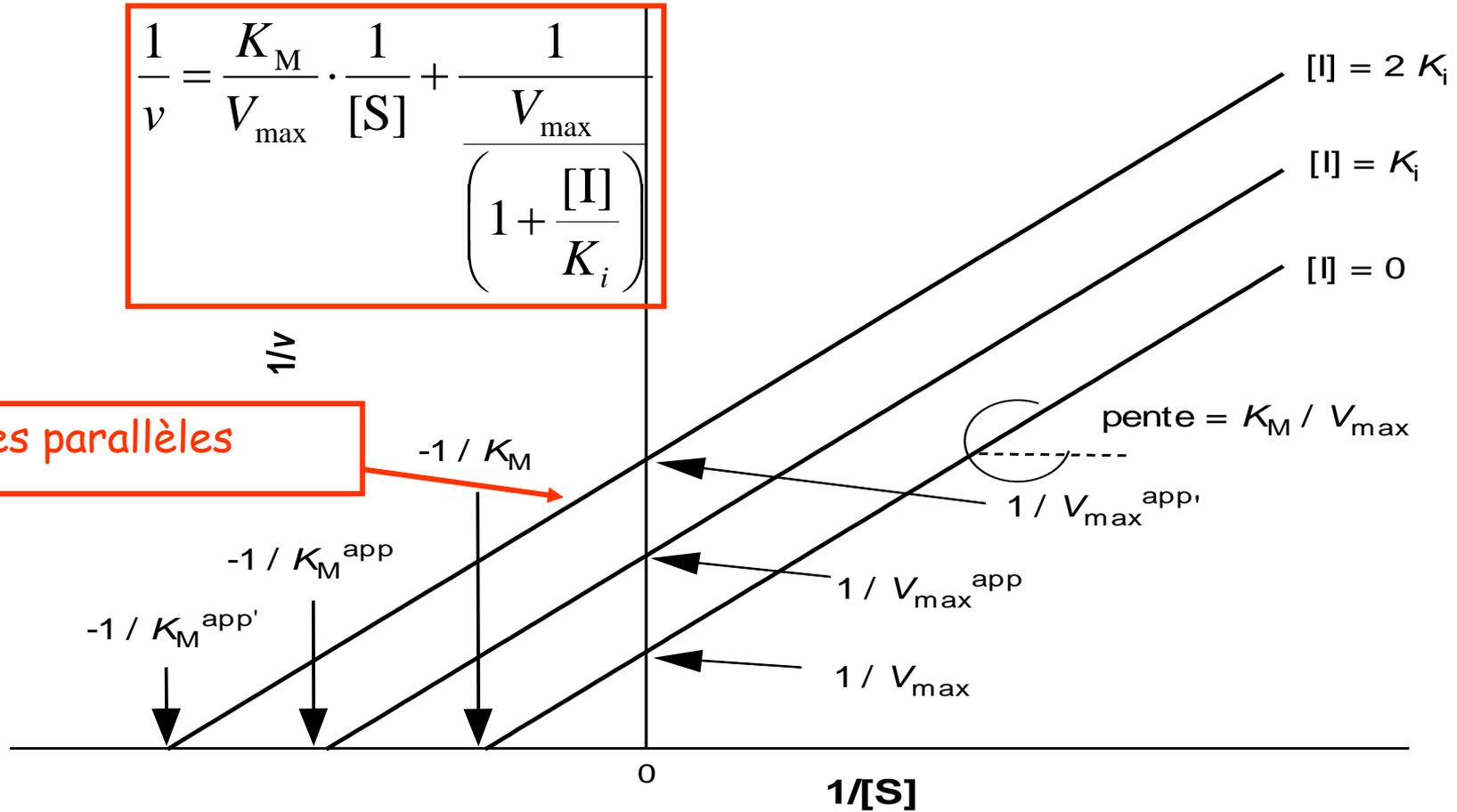
Dr BE

Dr BE

Graphique d'inhibition incompétitive

Graphique Lineweaver-Burk d'inhibition incompétitive

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



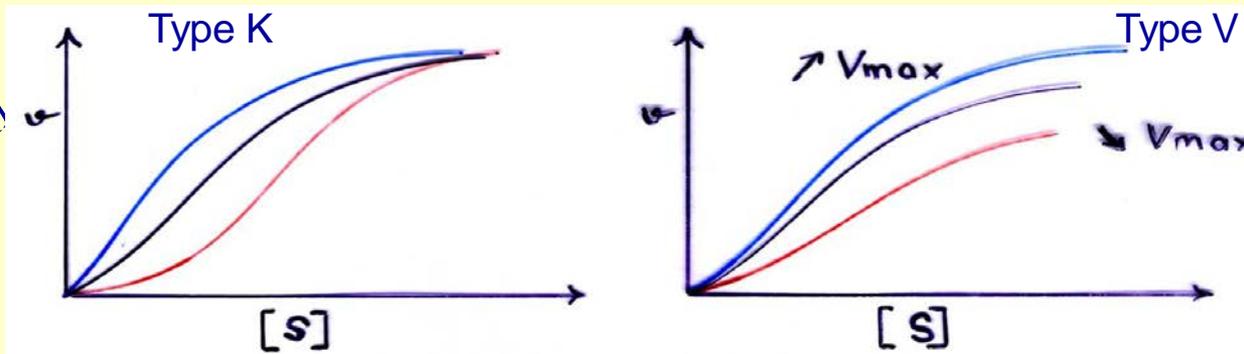
Les enzymes allostériques

- Certaines enzymes dites **allostériques** possèdent, en plus de leur site actif, un site appelé site allostérique. Une substance appelée **effecteur** (on dit aussi **modulateur** ou **regulator** en anglais) peut se fixer sur ce site.
- **Une** enzyme allostérique peut généralement avoir deux formes différentes. Une forme **active** et une forme **inactive**. L'effecteur, en se fixant sur son site allostérique, a pour effet de bloquer l'enzyme dans sa **forme active** ou dans sa **forme inactive** (ça dépend de l'enzyme). On parle alors :
 - effecteur inhibiteur
 - effecteur activateur.

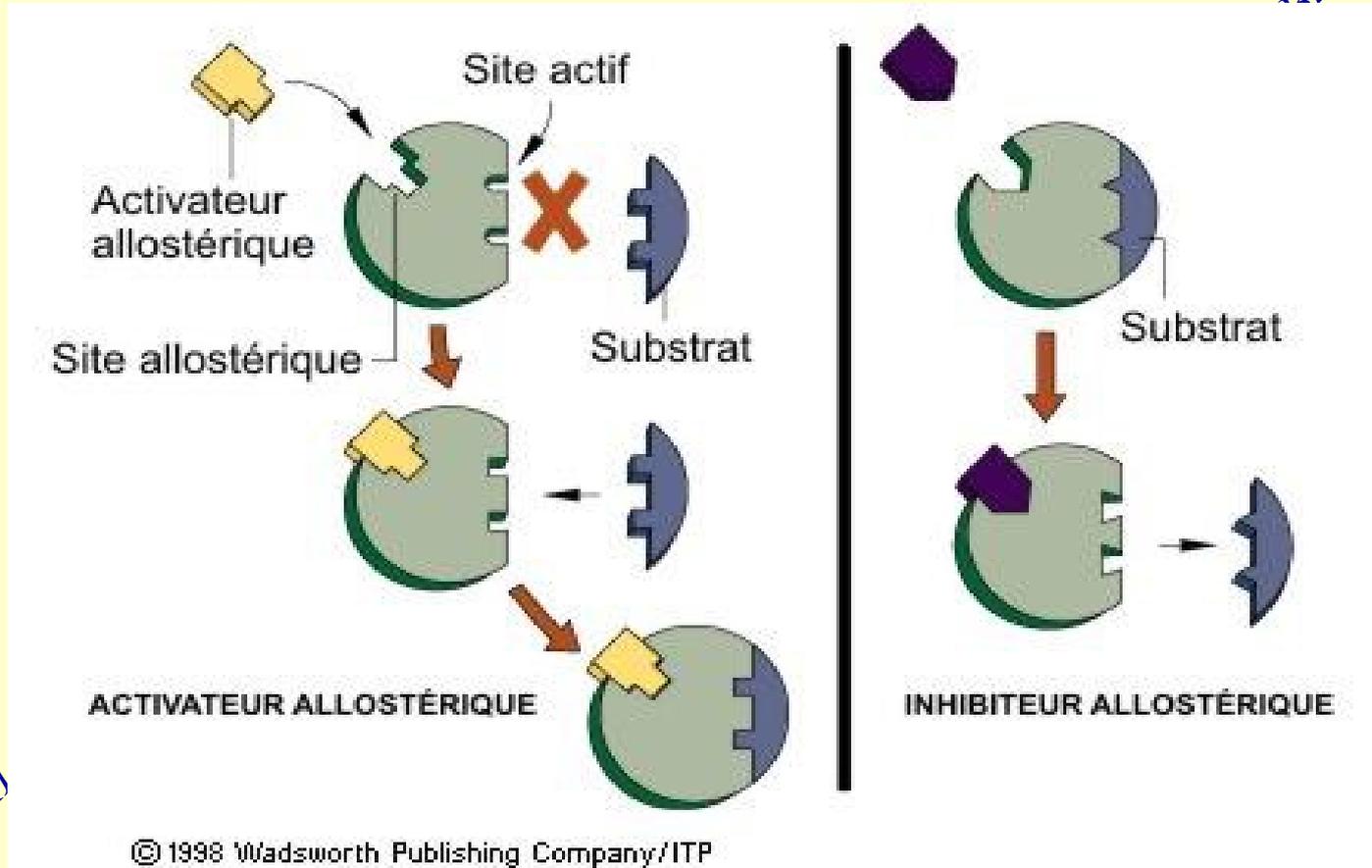
Enzymes allostériques

allos : signifie « autre » : autre site qui fixe un ligand allostérique capable de moduler la vitesse de la réaction

- * plusieurs sous-unités
- * modification de la conformation de l'enzyme par fixation du substrat ou/et des ligands allostériques
- * enzyme de type V : modifie le V_{Max} (au niveau du k_{cat})
- * enzyme de type K : modifie l'interaction enzyme/substrat (au niveau du K_M).



L'inhibition et activation non compétitive :

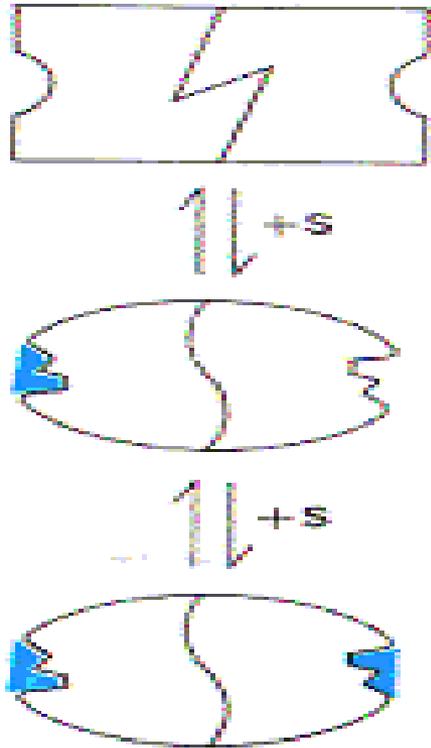


Ces enzymes ont toujours une structure quaternaire composée de plusieurs sous-unités (protomères) identiques ou non entre elles. La protéine est donc un oligomère de 2 ou 4 sous-unités par exemple. Ces enzymes possèdent, outre le **site catalytique** où se fixe le substrat, **un** ou **plusieurs sites allostériques** où peuvent se fixer des **effecteurs allostériques** (activateurs ou inhibiteurs) n'ayant aucune analogie structurale avec le substrat.

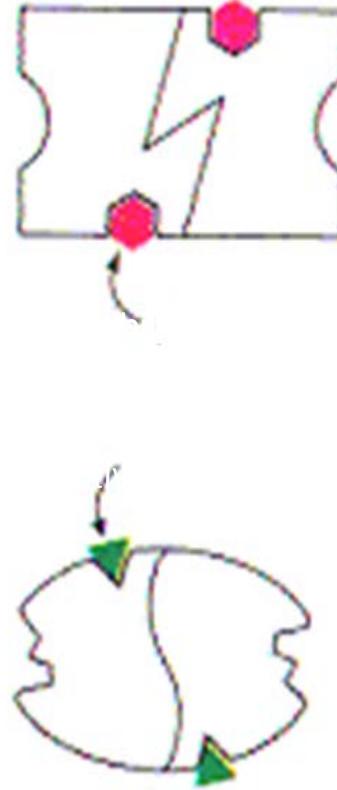
Les protomères d'une enzyme allostérique peuvent exister sous deux conformations (formes) appelées état **R (Relâché/Relapse)** et état **T (tendu/Tense)** dont l'affinité vis à vis du substrat varie. Le passage d'une conformation à une autre est appelé **transition allostérique**.

L'activité des enzymes allostériques est caractérisée par un effet coopératif et par l'action des effecteurs.

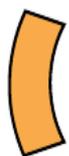
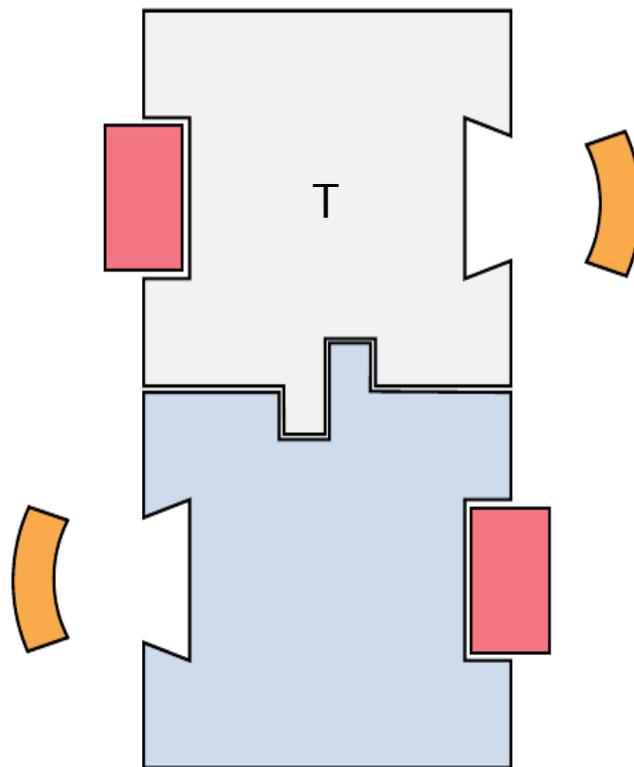
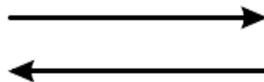
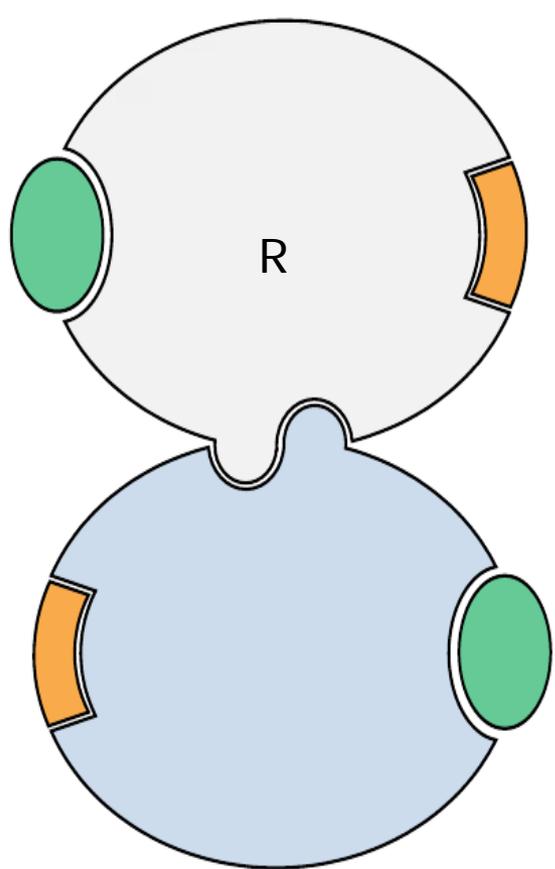
Effet coopératif : la fixation d'une première molécule de substrat sur un protomère facilite la fixation des suivantes sur les autres protomères. (d'où existence d'une sigmoïde)



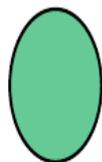
Effet coopératif



Action des effecteurs



substrate



activator



inhibitor

Dr BENG
ETL

ETL

Dr BENG

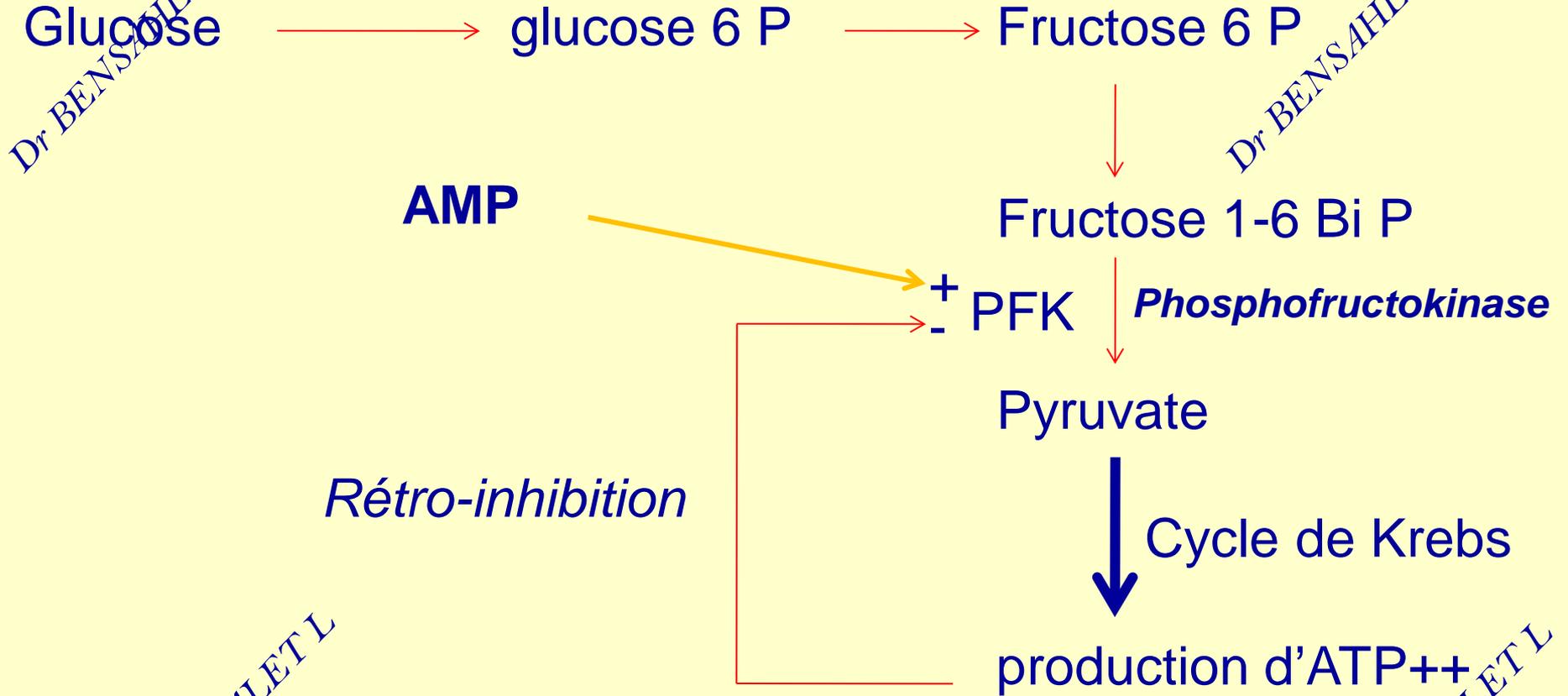
ETL

Dr BENG

Ex : régulation allostérique de la glycolyse

Dr BENSABHLA TALET L

Dr BENSABHLA TALET L



Dr BENSABHLA TALET L

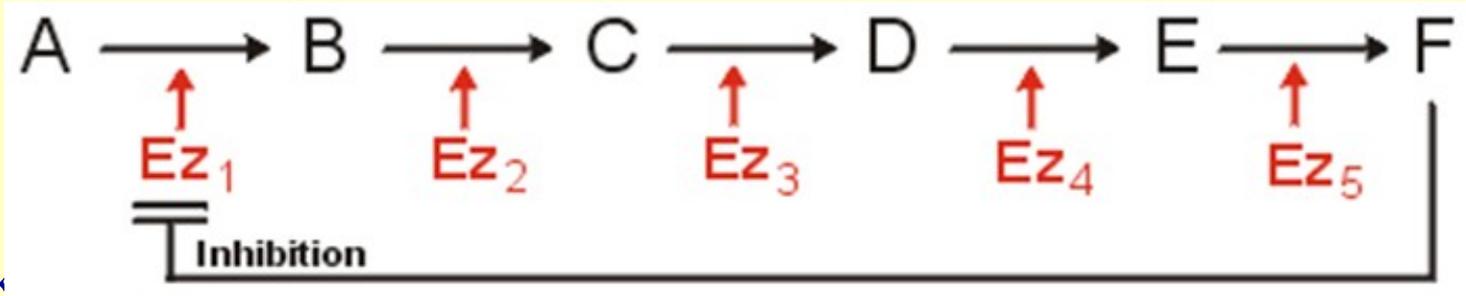
Dr BENSABHLA TALET L

[ATP] \nearrow \Rightarrow glycolyse \searrow

[ATP] \searrow (AMP \nearrow) \Rightarrow glycolyse \nearrow

La rétroinhibition : régule la plus part des voies métaboliques

- Une forme d'inhibition non compétitive car le produit final de la voie métabolique agit comme inhibiteur spécifique à l'enzyme qui déclenche la voie métabolique.
- Une fois encore l'inhibition est non compétitive car le substrat et l'inhibiteur ont chacun des sites de liaisons différentes sur l'enzyme.



Rétro-inhibition
(feedback négatif)