



ENZYMOLOGIE

2^{ème} année Pharmacie

UE 4 Sciences biologiques 2
Biochimie & Biologie Moléculaire
(4 heures)

2024-2025

Arnaud Bruneel

arnaud.bruneel@universite-paris-saclay.fr
arnaud.bruneel@aphp.fr

Cours Enzymologie n° 1 (1 heure)

(24 septembre 2024)

Plan

I- Rappels - Généralités sur les enzymes

1- Définition

2- Structure et localisation cellulaire

3- Classification - nomenclature - coenzymes

II- Rappels sur la vitesse initiale (v_0)

1- Conditions de V_0 , V_0 , équation de HMM, V_{\max}

2- Représentations graphiques

- Produit formé (ou substrat consommé) en fonction du temps – U et katal
- *(Henri-)Michaelis-Menten* (vitesse initiale en fonction de S) – K_M et V_{\max}
- *Lineweaver-Burk* (doubles inverses) – K_M et V_{\max}
- *Eadie-Hofstee* (V_0 en fonction V_0/S) – K_M et V_{\max}

3- Effets de la température et du pH

Cours Enzymologie n°2 (1 heure)

(30 septembre 2024)

III- Les inhibiteurs enzymatiques

.....

I-Rappels sur les enzymes - Généralités

1- Définition : enzyme (E) = **catalyseur** protéique d'une réaction chimique.

→ **Protéine** : conformation souple et ajustable aux substrats et aux effecteurs (site actif) : complexe ES, liaisons de faible énergie.

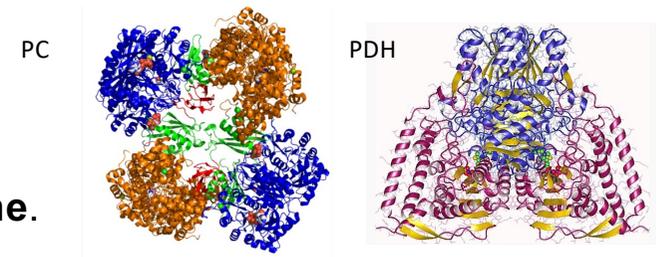
→ **Catalyseur** : augmentation de la vitesse de réaction d'un même facteur (10^6 à 10^{10}) dans les 2 sens. Baisse de l'énergie d'activation de la réaction. L'enzyme **n'est pas consommée** par la réaction.

En absence d'enzyme, la réaction reste possible mais à une vitesse très lente ou dans des conditions non-compatibles avec la vie (température, pH...).

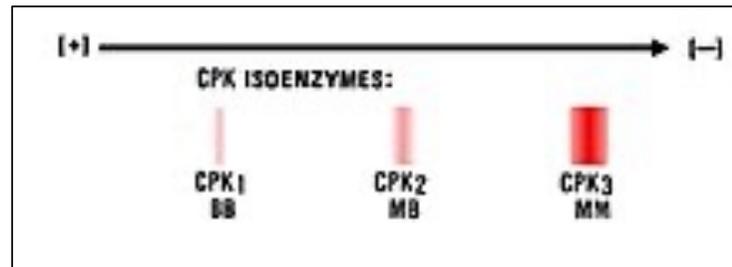
La réaction catalysée transforme des **substrats** en **produits**. Parfois intervention d'un co-catalyseur : **ion métallique** (Fe, Cu, Zn, Mn...) ou molécule organique non-protéique = **coenzyme**. Coenzyme en principe **non-consommé par la réaction** (attention NAD⁺ pour déshydrogénases et ATP pour kinases = substrats).

2- Structure et localisation cellulaire :

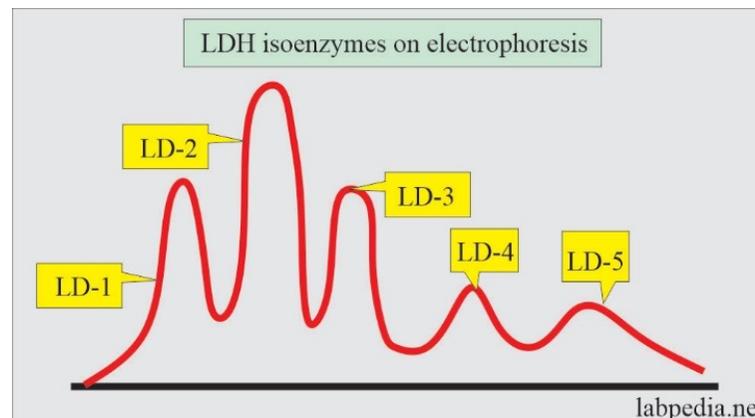
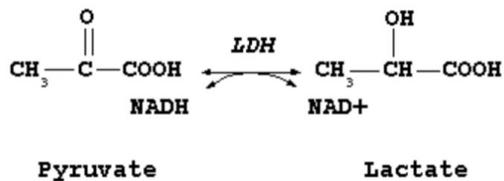
- Protéines (+ « ribozymes » + « abzymes »).
- Monomoléculaire (sans coenzyme) : ex : aldolase.
- Enzyme à coenzyme ou ion métallique ; partie protéique = **apoenzyme**.
- Multi-enzymes (pyruvate carboxylase, pyruvate déshydrogénase).
- Peu d'enzymes dans le secteur extracellulaire (cascade coagulation, activation du complément...)
- La plupart des enzymes sont cellulaires : membranes, cytosol, organites.



- **Concentrations très faibles** ($10^{-7}/10^{-9}$ M)
- **Enzymes constitutives** ou **induites** : induction génique tissu-spécifique (ex : marathonien vs *sprinter*)
- **Isoenzymes** ou **isozymes** : activité identique, différences de structure (visibles par ex par chromatographie ou électrophorèse), **spécificités tissulaires**. Epissages alternatifs, modifications post-traductionnelles...



CPK : créatine phosphokinase



LDH : lacticodéshydrogénase

LDH 1 à 5 (H4 / H3M / H2M2 / HM3 / M4)
 H = *heart*
 M = *muscle*

+ isoPAL...

3- Classification - nomenclature des enzymes - co-enzymes :

Chaque enzyme est identifiée par EC (*enzyme commission*) suivi de 4 chiffres/nombres séparés par un point.

→ 1^{er} chiffre : désigne la classe ou type de réaction. Il varie de 1 à 6

- 1 : oxydoréductases (LDH...)
- 2 : transférases (ASAT, ALAT, kinases, glycosyltransférases...)
- 3 : hydrolases (protéases, glycosidases, amylase, lipase...)
- 4 : lyases
- 5 : isomérases
- 6 : ligases

→ 2^{ème} chiffre : désigne la sous-classe qui précise le type de fonction ou de liaison concerné par la catalyse

→ 3^{ème} et 4^{ème} chiffres : précisent la nature éventuelle du ou des coenzymes, et du ou des substrats.

Exemple :

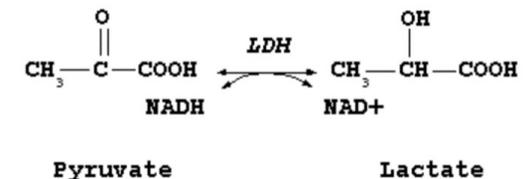
Lactate déshydrogénase (LDH) : EC 1.1.1.27

EC 1. : classe 1 = oxydo-réductases

EC 1.1. : sous-classe 1 : fonction alcool secondaire –CHOH-oxydée

EC 1.1.1. : sous-sous-classe 1 : coenzyme = 2^{ème} substrat = NAD⁺

EC 1.1.1.27 : substrat = lactate



Exemples de co-enzymes importants

- **Coenzymes nicotiniques** : dérivés du nicotinamide ou vit. PP ou vit. B3 (**NAD** = nicotinamide adénine dinucléotide et **NADP**) ; oxydoréduction.
- **Coenzymes flaviniques** : dérivés de la riboflavine ou vit. B2 (**FMN** et **FAD** = flavine adénine dinucléotide) ; déshydrogénases à NAD ou FAD (co-substrats).
- **Coenzymes quinoniques** : ubiquinone (chaîne respiratoire)
- **Coenzymes porphyriniques** : hème des métalloprotéines à fer hémique (cytochromes...)
- Pour les transferts de groupements carbonés : coenzyme A (vit. B5), pyrophosphate de thiamine (vit. B1), phosphate de pyridoxal (vit B6) → transaminases ; biotine (B8), tétrahydrofolate (B9), cyanocobalamine (B12).

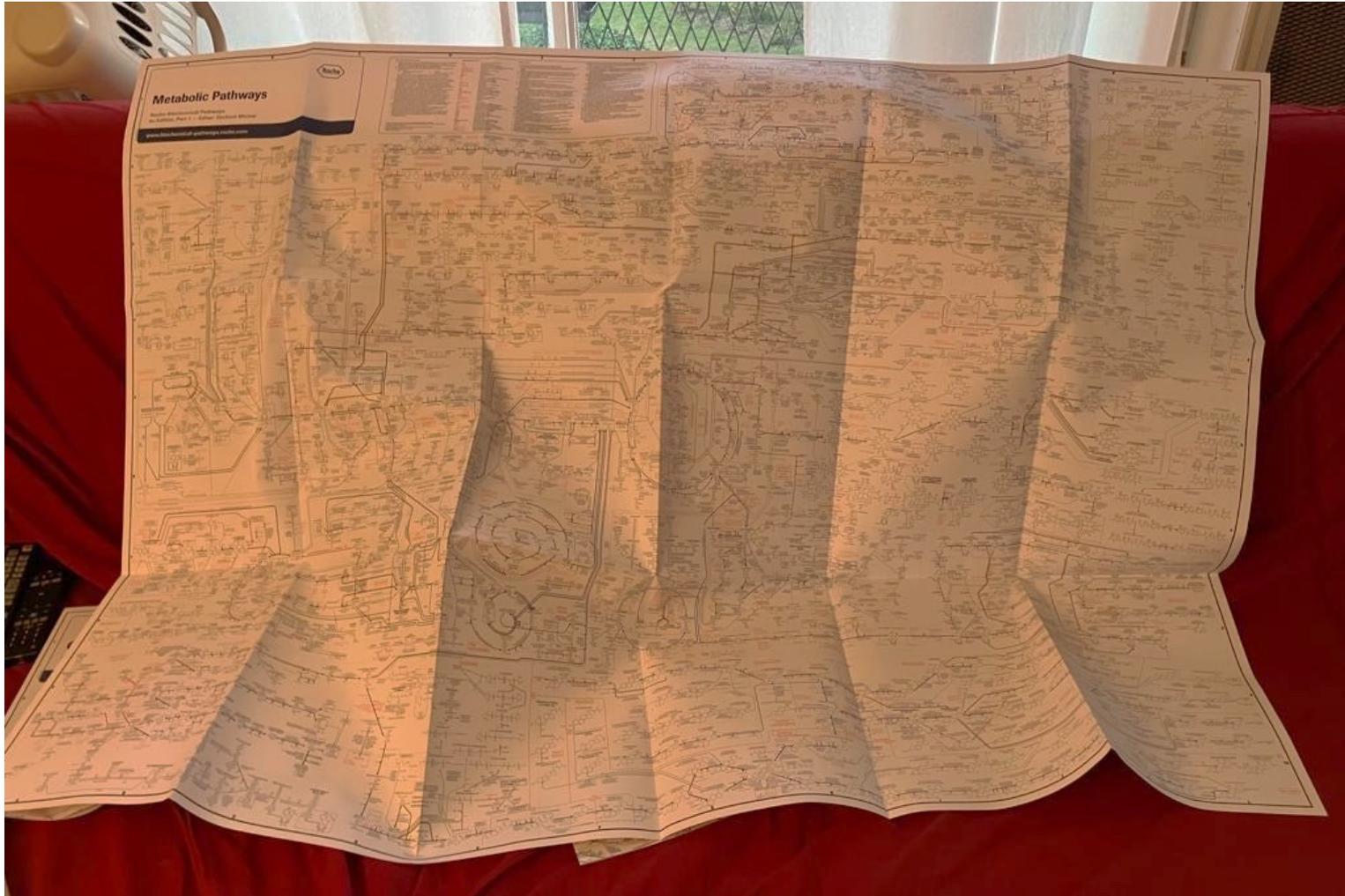
Dosages vitaminiques :



Dosages porphyrines :

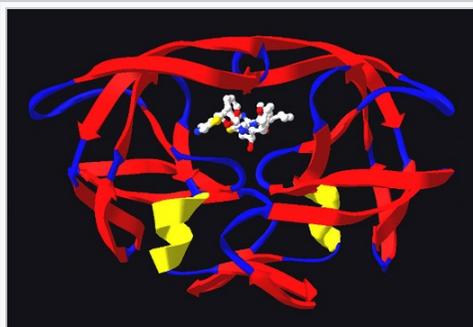


Le métabolisme cellulaire...



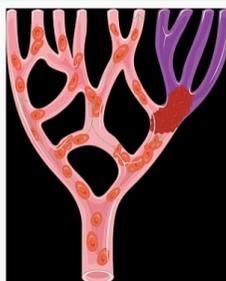
Intérêts pour le pharmacien :

- **cibles de médicaments** : inhibiteurs compétitifs
- **enzymes recombinantes** : thérapies substitutives / maladies héréditaires du métabolisme
- **biomarqueurs en biologie médicale** : diagnostic, pronostic, suivi thérapeutique ; dosage de substrats.
- **outils pour la recherche** : nucléases, ligases, hydrolases... (PCR, CRISPR-Cas9, glycosidases etc. etc. ...)



Complexe d'une **protéase** du VIH (rubans rouges, bleus et jaunes) associée à l'inhibiteur qu'est le **ritonavir** (petite structure en bâtons et boules près du centre).

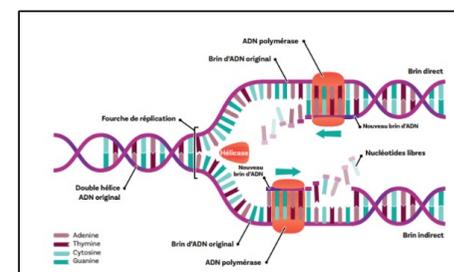
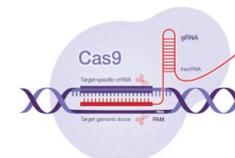
altéplase



Informations générales

- Princeps** • Actilyse
- Classe** Sang et organes hématopoïétiques, agents antithrombotiques, enzymes, ATC code B01AD02

- ASAT/ALAT – PAL- γ GT
- CK
- Lipase, amylase
- G6PD - PK
- etc. etc.



Enzymologie
=
Biochimie
Expérimentale

II- Rappels sur la vitesse initiale (V_i , V_0)

1- Conditions de V_0 , V_0 , équation de HMM, V_{\max}

Enzyme « Michaelienne »



L'enzyme E n'est pas consommée (E) = cste

Conditions de vitesse initiale

- Début de la réaction
- (S) initiale \gg (E)

En pratique, on a une solution d'enzyme et on lui « donne » du substrat en conditions de vitesse initiale.

La réaction devient : $E + S \longrightarrow E + P$

En conditions de vitesse initiale, la réaction catalysée « va dans un seul sens ».

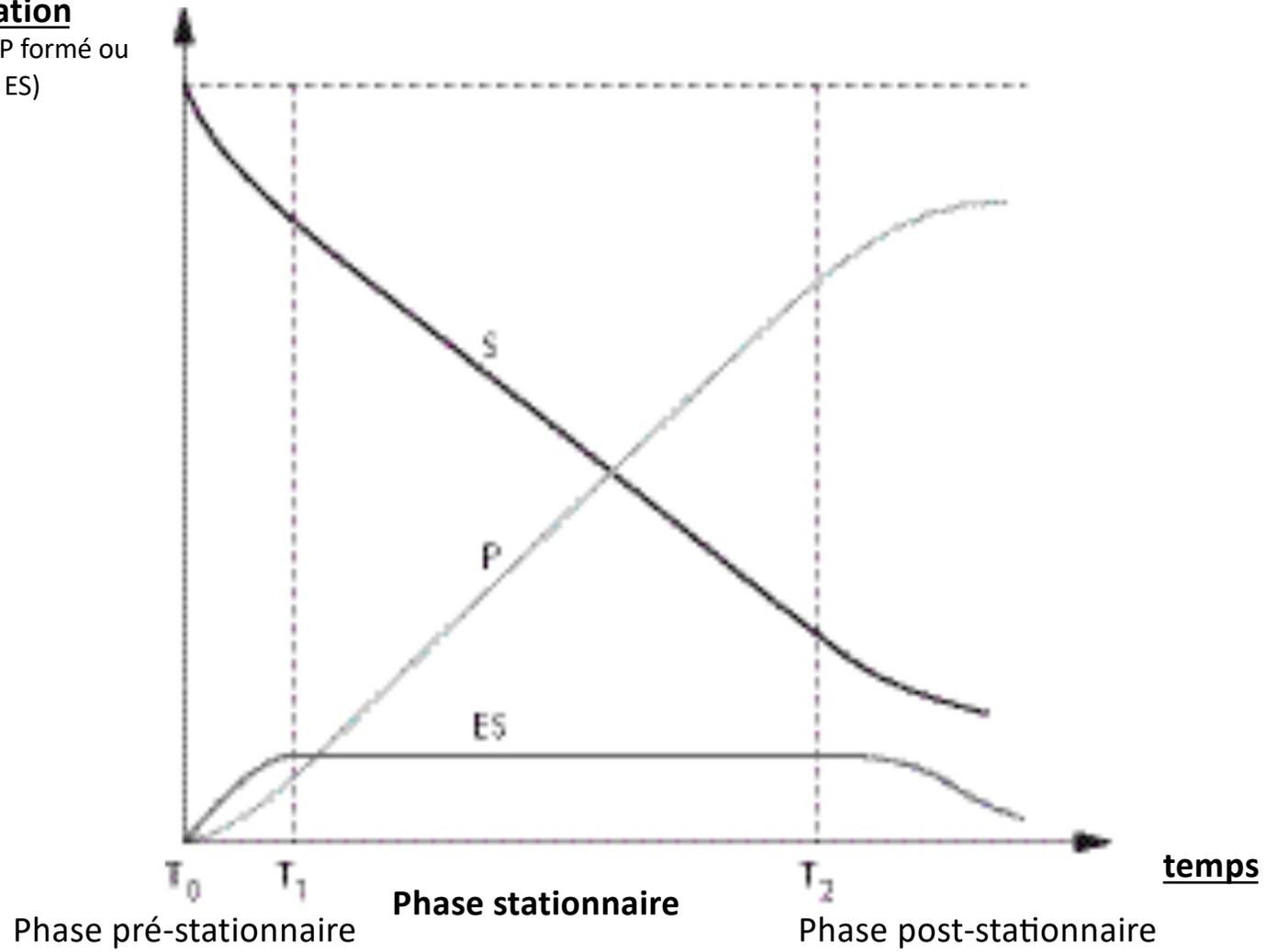
(Les conditions de température, pH, salinité, coenzymes etc. etc. etc. sont fixées)

- En conditions de V_0 (pendant la phase dite « **stationnaire** »),

vitesse = $V_0 = dP/dt = -dS/dt = k_2 (ES) = \text{constante}$

Concentration

(S consommé ou P formé ou complexe ES)



Et
$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot (S)}{K_M + (S)}$$
 Équation de (Henri-)Michaelis-Menten (HMM)

- Quand toute l'enzyme est sous forme complexée ES ($S \rightarrow \text{infini}$; $(ES) = (E)_{\text{totale}}$),

Alors, Vitesse = $V_0 = V_{\max} = k_2 (E)_{\text{totale}}$

La V_{\max} est une V_0 (un peu particulière)

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_2 (E)_{\text{totale}} \cdot (S)}{K_M + (S)}$$

$k_2 = k_{\text{cat}} = \text{constante catalytique} = \text{cste}$
 En conditions de V_0 , on considère que S n'est pas significativement consommé.
 $S = \text{cste}$
 $K_M = \text{constante de Michaelis} = \text{cste}$

→ $V_0 = f(E)_{\text{totale}} = \text{constante}$

- **Toute V_0 (pas seulement la V_{max}) est proportionnelle à la concentration de la solution d'enzyme utilisée.**

- Pour une concentration en enzyme donnée, $V_0 = \text{constante}$ (conditions expérimentales définies).

En conditions de vitesse initiale, **la constante de Michaelis = K_M correspond à la concentration en substrat permettant une demi-saturation de l'enzyme ($V_0 = V_{max}/2$) ; $K_M = \text{constante}$.**

- **Plus le K_M est grand, plus l'affinité de S pour E est petite**, et réciproquement.

- Si (S) est exprimé en **nombre de K_M** ($S = nK_M$) alors **$V_0 = V_{max} \cdot n/(n+1)$**

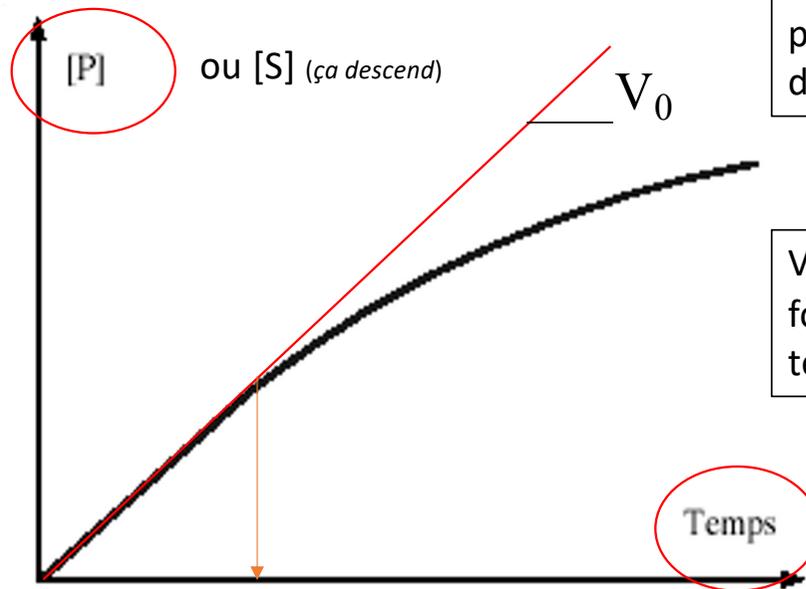
- Quand Enzyme + Substrat + « autre molécule » : K_M et V_{max} **apparent(e) ou mesuré(e)**

- $K_{+2} = K_{cat} = \text{constante catalytique}$ = en conditions de V_{max} , nombre de molécules de substrat transformées par une molécule d'enzyme par unité de temps (unités = temps^{-1}).

- **Efficacité catalytique = K_{cat}/K_M**

2- Représentations graphiques

- Produit formé (ou substrat consommé) en fonction du temps – U et katal



On donne [S] à une solution d'enzyme, on mesure le produit formé (ou le substrat consommé) et on en déduit V_0 ,

V_0 = pente de la tangente à la courbe « produit en fonction du temps », ou « substrat en fonction du temps », à temps = 0

→ Vitesse initiale et temps de la phase stationnaire

À quoi cela sert-il ?

Utilité de cette représentation ?

- Unités enzymatiques : U et Katal

- **U = quantité d'enzyme** permettant de transformer/former **1 μ mole** de substrat/produit par **minute**.

- **Katal** (unité internationale) = **quantité d'enzyme** permettant de transformer/former **1 mole** de substrat/produit **par seconde**.

- 1 katal = $60 \cdot 10^6$ U

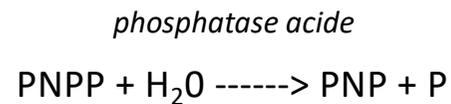
$$V_0 = f(E)_{\text{totale}} = \text{constante}$$

- Et donc, **déterminer une vitesse initiale peut permettre de doser une enzyme**.

- On mesure **une vitesse initiale** et on en déduit **une quantité/concentration d'enzyme**.

TP
BBCM

Enzymologie
=
Biochimie
Expérimentale

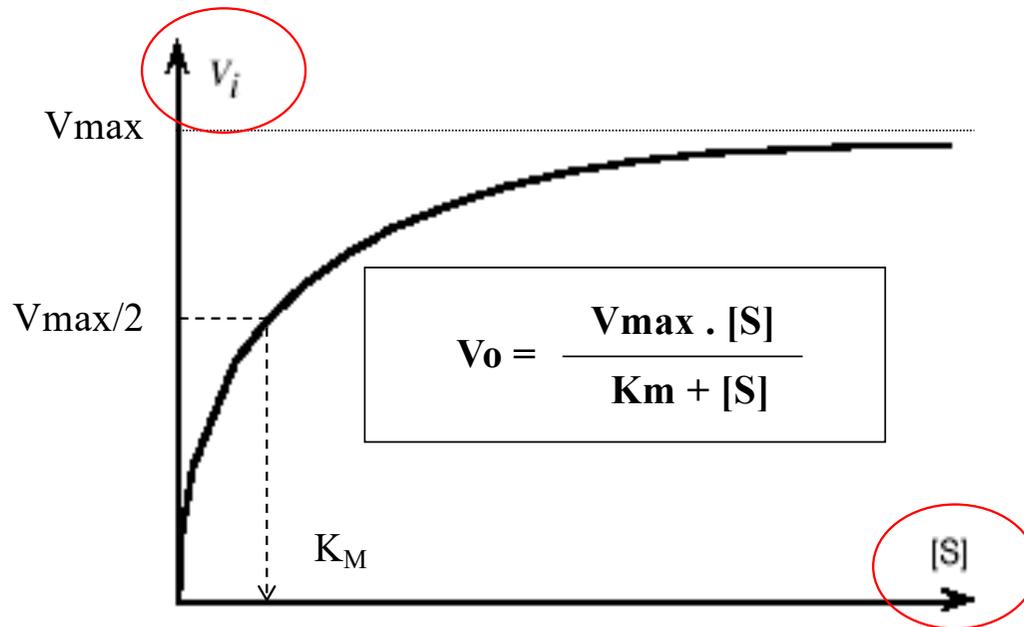


Si V_0 exprimée en $\mu\text{M}/\text{min}$, CC en U/L
Si V_0 exprimée en M/sec, CC en Kat/L
CC = *concentration catalytique*

2- Représentations graphiques

- Henri-Michaelis-Menten (vitesse initiale en fonction de S) – K_M et V_{max}

Enzymologie
=
Biochimie
Expérimentale



Pour une même solution d'enzyme, on mesure différentes V_0 pour différentes $[S]$

- Hyperbole
- **Quand $[S] \rightarrow \text{infini}$, $V_0 \rightarrow V_{max}$ (asymptote)**
- **$V_0 = V_{max}/2$ pour $[S] = K_M$**
- Quand $[S] \rightarrow 0$, $V_0 \rightarrow 0$

→ V_{max} et K_M

Manque de précision...

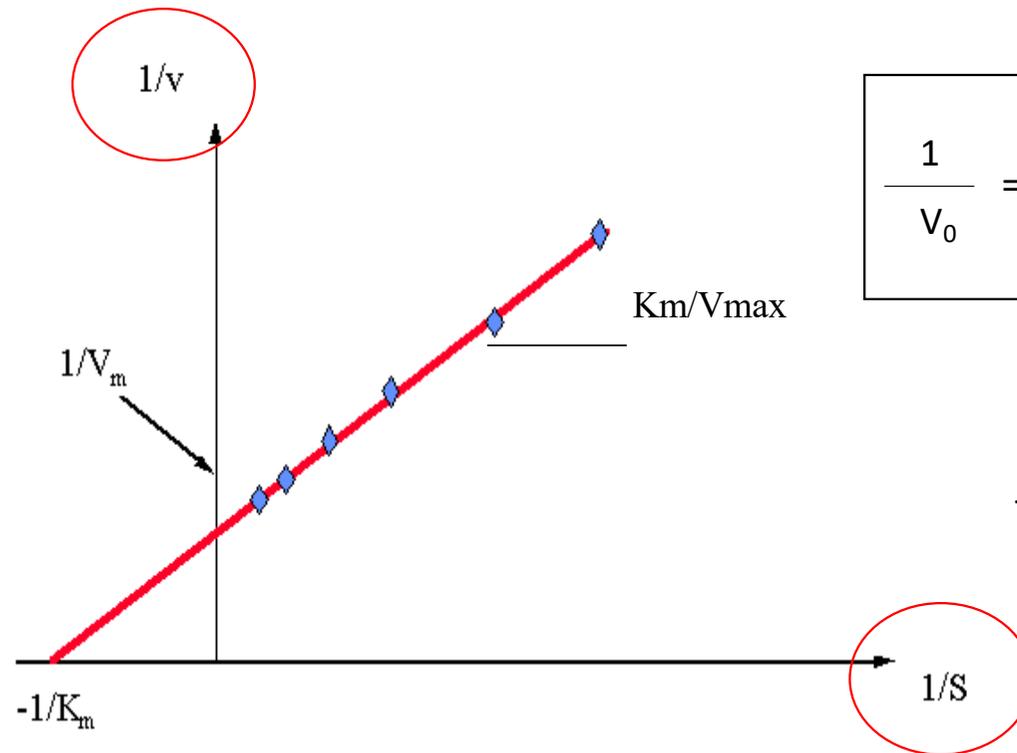
Enzymologie
=
Biochimie
Expérimentale

Pour une même solution d'enzyme, on mesure différentes V_0 pour différentes $[S]$. Et on « passe » aux inverses.

2- Représentations graphiques

- *Lineweaver-Burk* (doubles inverses) – K_M et V_{max}

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \rightarrow \frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{max} \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{max} \cdot [S]} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

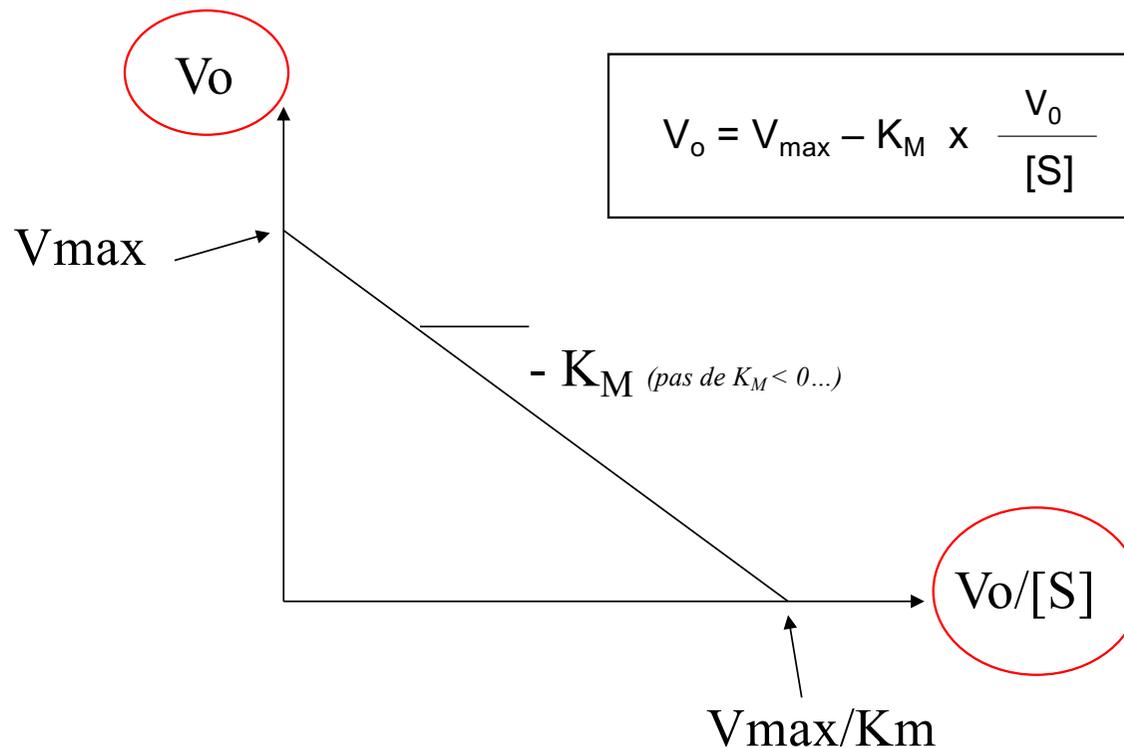
Théoriquement plus précis...

2- Représentations graphiques

- *Eadie-Hofstee* (V_0 en fonction V_0/S) – K_M et V_{max}

$$V_0 = V_{max} - K_M \times V_0/[S]$$

Pour une même solution d'enzyme, on mesure différentes V_0 pour différentes $[S]$. Et on exprime V_0 en fonction V_0/S .



Enzymologie
=
Biochimie
Expérimentale

$$Y = 0 \text{ alors } X = V_{max}/K_M$$

$$X = 0 \text{ alors } Y = V_{max}$$

Utilité de ces représentations graphiques ?

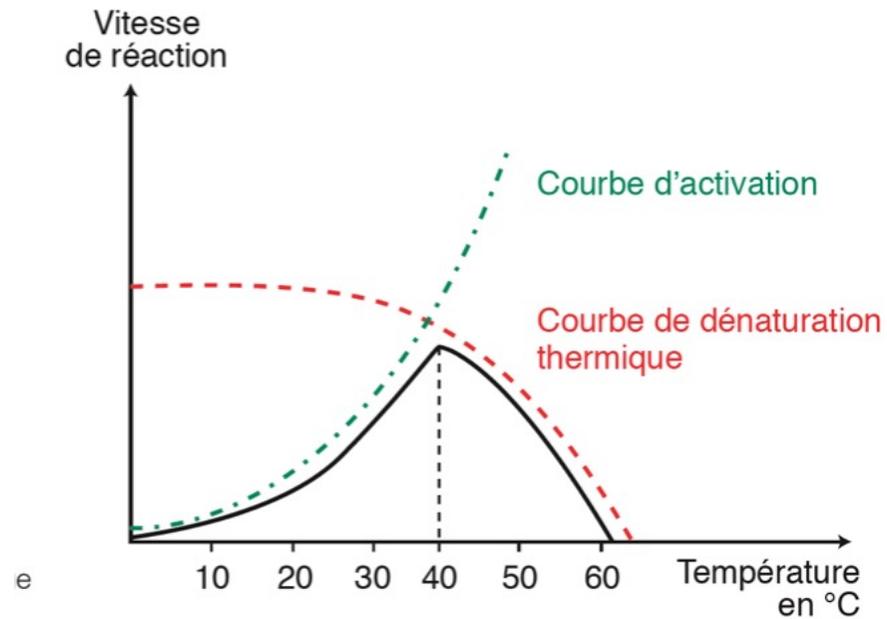
→ Déterminer K_m et V_{max} (K_{cat}) d'un couple enzyme/substrat

- Pour caractériser l'affinité et l'activité d'une enzyme à l'égard d'un substrat donné. Exemple : je dispose de plusieurs substrats pour une même enzyme. Lequel a le plus d'affinité pour l'enzyme ? Vis-à-vis de la transformation de quel substrat mon enzyme est-elle la plus « efficace » ?
- Quand enzyme à 2 substrats, on met un des 2 substrats en excès pour pouvoir étudier l'autre.
- Peut permettre/faciliter la mise au point d'une technique de dosage enzymatique. Dosage d'une enzyme ; dosage d'un substrat (cours suivants).

3- Effet de la température :

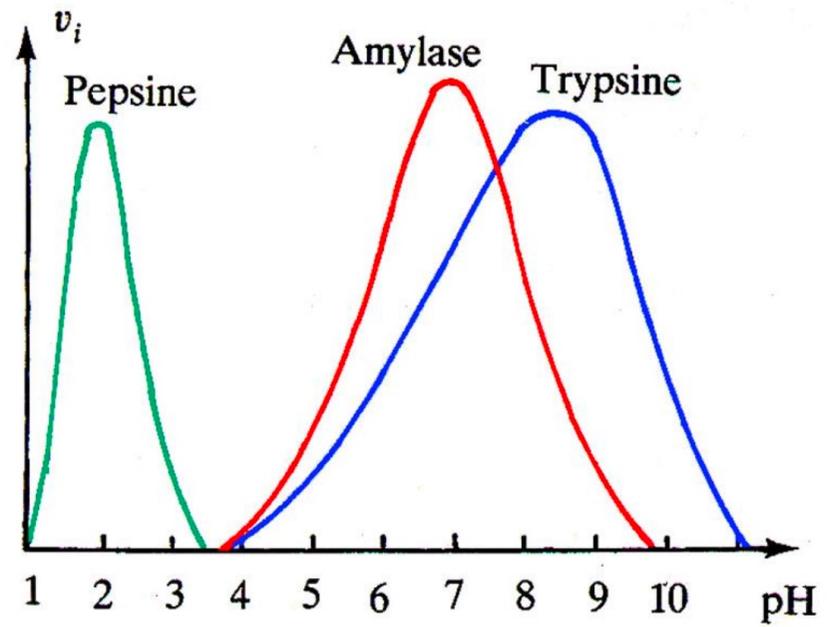
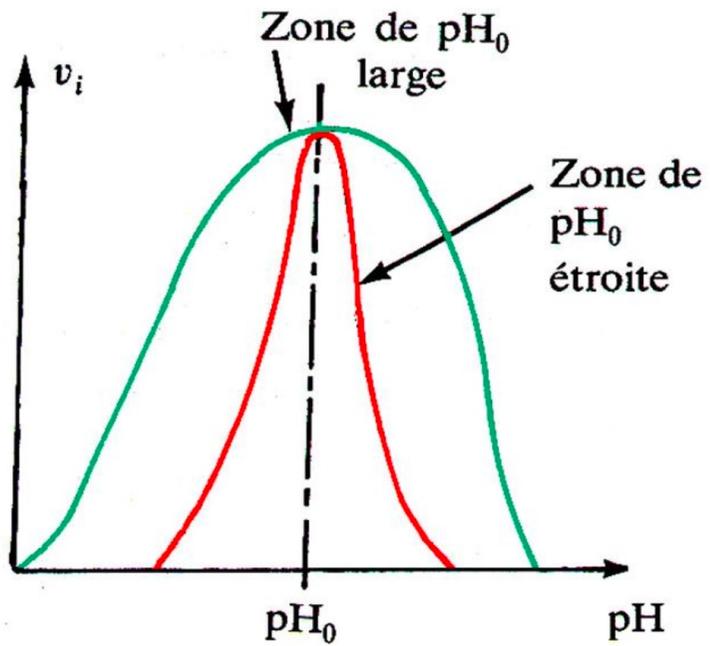
- activateur (mouvement brownien) puis inhibiteur (dénaturation) donc **température optimale** : 25°C à 37°C
- enzymes thermosensibles ou thermorésistantes

- *En biologie médicale, valeurs usuelles à 37°C*



3- Effet du pH :

- Ionisation du site actif ; notion de *pH optimum*



+ Phosphatase acide, phosphatase alcaline...