

Enzymologie

Association Protéine - Ligand

Généralités

Gènes : chez l'homme, environ 20 - 25000 gènes (en réduction ...)

Protéines : au contraire, nombre bien plus étendu que prévu (existence d'isoformes, de variants d'épissage, de modifications post-traductionnelles, associations différentielles, multiplient les possibilités des protéines)

Les protéines sont des macromolécules offrant beaucoup de diversité, ce sont des structures **dynamiques**.

Une protéine donnée a certainement plus d'une fonction.

Une protéine peut avoir un rôle précis en milieu intracellulaire et un rôle différent en milieu extracellulaire.

Exemple

- **Facteur XIII coagulation** : en extracellulaire stabilise fibrine caillot, aide cicatrisation (ulcère), stimule angiogenèse et en intracellulaire stimule plaquettes
- **Sérumalbumine** (protéine majeure du plasma) : pression oncotique, tampon et transport de substances

Protéome : complément protéique complet du génome

Interactome : réseau complexe et mouvant (transitoire) d'interactions entre ces macromolécules protéiques (ou non) avec nœuds et liens.

Métabolome : ensemble des voies métaboliques à un instant donné dans une cellule, un organe (lipidome, physiome, glycome, intégrome, etc....)

En règle générale, les macromolécules s'associent :

- **Soit entre elles** : au minimum **dimères** (2 monomères), sinon **oligomères**, en associations homologues (**homomères**) ou hétérologues (**hétéromères**)
- **Soit avec des molécules plus petites**, toutes appelées **ligand** au sens large

Cette association est, sauf exception, de nature **non covalente** par liaisons dites **secondaires**, faiblement énergétiques (4-30 kJ / mole ou 1-7 kcal / mole), du type hydrogène, hydrophobe ou électrostatique.

Les ligands varient à l'extrême en nature et en taille.

Exemples (du plus petit au plus grand) :

- **Atome métallique ionisé** (Ca^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , métaux de transition...)
- **Acide aminé** (Glutamate et Glycine : neurotransmetteurs qui ont leurs récepteurs protéiques dédiés)
- **Dérivés d'AA** (Gaba, Histamine, Adrénaline)
- **Hormone peptidique** (Glucagon, Insuline)
- **Macromolécule** (Acide nucléique, autres protéines ...)

L'association se fait par une partie limitée de la protéine liante (surface de quelques centaines d'Å², via une à trois dizaines de résidus d'AA).

H₂O indispensable à l'assemblage / désassemblage des protéines, présente à l'interface entre les protéines.

Si P est la protéine et L le ligand, l'association se symbolise par PL.

Cette association a le plus souvent une **spécificité** : telle protéine pourra lier fortement un ligand, moins fortement un autre (**notion de compétition**).

Rôle de l'association Protéine - Ligand

Transformation du ligand (qui est alors substrat d'enzyme)

Reconnaissance du complexe PL (Antigène-anticorps à la surface de certains globules blancs)
Participe à la défense spécifique

Transport : la **transferrine** capte le fer du tube digestif

Protection : Hémoglobine extra globulaire (dangereuse) + **haptoglobine** \leftrightarrow complexe soluble
En cas d'hémolyse (destruction des GR)

Défense non spécifique : la **lactoferrine** des polynucléaires capte le fer des bactéries, même chose avec la **psoriasine**, qui capte le zinc dont ont besoin certaines bactéries qui ne pourront de ce fait se développer sur la peau

Inhibition d'action : très nombreux exemples (système protéase / antiprotéase : **antithrombine**, **antitrypsine**, **antiélastase**)

Transduction du signal (extraC vers intraC) : cascades d'associations / dissociations

« **Voirie** » **cellulaire** : pour rediriger une protéine à sa bonne place (**chaperone** + protéine dénaturée vers protéasome pour destruction ou à l'inverse renaturation ; ciblage cellulaire)

Associations intercellulaires (ICAMs) ou cellule-matrice (fibronectine, intégrines), pour adhérer à un support (migration, etc.)

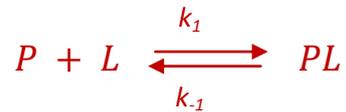
Thérapeutique :

- **Agonistes** si déficits en ligand naturel : cas d'asthme et des **β mimétiques**, **insuline** si diabète
- **Antagonistes** si excès de ligand naturel : cas des antagonistes du récepteur de la progestérone (**mifépristone**), **naloxone** antagoniste des récepteurs à la morphine en cas d'overdose aux opioïdes
- Parfois **anticorps** contre facteurs de croissance (cancer)

Relation d'équilibre

Cas simple michaélien

Du fait du caractère non covalent de l'association, celle-ci est réversible : elle met en jeu un équilibre



Trois espèces en présence à un moment donné

Constantes de vitesse k_1 et k_{-1}

C'est le cas le plus simple : une molécule de L s'associe à une molécule de P

➤ C'est le **modèle Michaélien**

Sur le plan formel, on peut dire qu'à tout moment la vitesse instantanée de formation de PL est égale à PL qui se forme moins PL qui se dissocie

$$\frac{d[PL]}{dt} = k_1 \cdot [P] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [PL]$$

A l'équilibre, la vitesse de formation de PL est égale à la vitesse de dissociation de PL

$$k_1 \cdot [P] \cdot [L] = k_{-1} \cdot [PL] \quad \text{et} \quad \frac{d[PL]}{dt} = 0$$

$$\text{Constante de dissociation} \quad \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} = K_d$$

K_d : constante intrinsèque, apparente, dépendant de la T° , de la force ionique et du pH

En biologie, on considère que K_d reste constant pour une T° donnée

K_d a les dimensions d'une concentration **pour l'équilibre proposé**

C'est aussi un rapport de constantes de vitesse 1^{er} ordre sur 2^{ème} ordre

Remarque : on parle parfois de K_a , cte d'association, qui est l'inverse de la cte K_d (donc l'unité sera ici L/mol par ex)

Signification de K_d

Dans certaines conditions, si $[P] = [PL]$, on dit que **la protéine est à moitié saturée** (on n'est pas forcément à l'équilibre !)

➤ Alors $[L]$ (concentration en ligand libre) sera notée $L_{0,5}$ et K_d sera égal à $L_{0,5}$

La cte de dissociation se définit comme la concentration en ligand libre pour laquelle la protéine est saturée à 50 % par son ligand.

Exemples



$Kd \approx Km \approx Ks$ voisin de 10^{-3} à 10^{-7} M : **affinité faible ou moyenne**

Peptide $A\beta$ (1-42) + Cu^{++} \longrightarrow complexe cuivrique de Kd attomolaire (10^{-18} M)

Autoagrégation facilités dans la maladie d'Alzheimer

Le peptide physiologique (1-40) a beaucoup moins d'affinité

Application : chromatographie d'affinité

Notion de fraction de saturation

Se définit comme le rapport du nombre de molécules P ayant lié L au nombre total de molécules P.

Ce rapport s'exprime par Y et peut s'écrire aussi en termes de concentration.

On parle également de saturation fractionnelle ou de saturation

$$[P_0] = [P] + [PL]$$

$$Y = \frac{[PL]}{[P_0]} = \frac{[PL]}{[P] + [PL]} \quad \text{or} \quad [P] = Kd \frac{[PL]}{[L]}$$

$$Y = \frac{[L]}{[L] + Kd}$$

[L] : concentration de ligand libre

Y varie de 0 à 1 (ou 100 %) et n'a pas de dimension

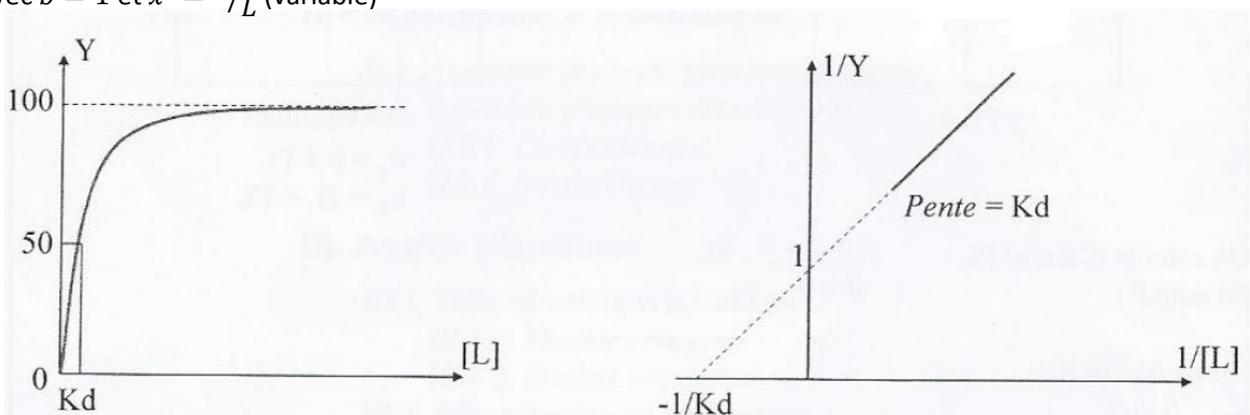
Y est une fonction du type $y = x/(x+a)$, (x variable, a constante) dont la représentation graphique est une **hyperbole**, typique d'un **phénomène saturable, réversible et spécifique**

➤ On a affaire à un **phénomène michaélien**

Linéarisation en faisant les inverses :

$$\frac{1}{Y} = 1 + Kd \cdot \frac{1}{[L]} \quad (y' = b + ax')$$

Avec $b = 1$ et $x' = 1/[L]$ (variable)



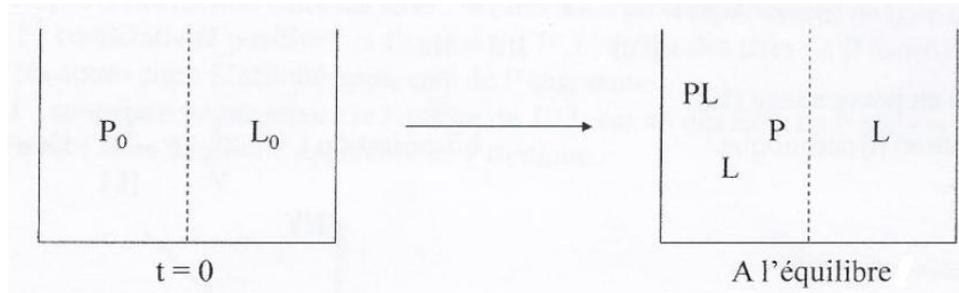
Mesure expérimentale de Kd

- **Dialyse à l'équilibre**

Non applicable aux petits ions qui obéissent à l'équilibre de Donnan.

Dispositif : 2 compartiments séparés par une **membrane « hémiperméable »** (laisse passer L et pas P), de même volume.

- Au temps 0, une espèce par compartiment (P_0, L_0) de concentrations connues
- A l'équilibre, dans un compartiment, trois espèces : P, PL et L ; dans l'autre L, que l'on mesure



On aura à l'équilibre :

$$P_0 = P + PL$$

$$L_0 = PL + 2L$$

On déduit donc d'abord PL puis P enfin Kd

- **Méthode de Scatchard**

Cette représentation permet :

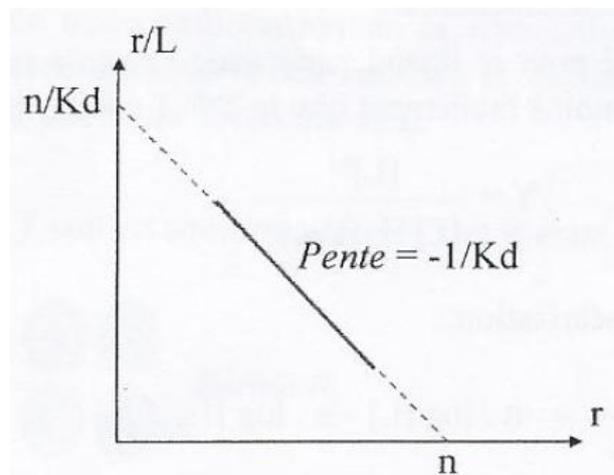
- De déterminer le nombre de sites récepteurs présents sur une protéine P
- De déterminer Kd ou Ka
- De déterminer le nombre de sites occupés par le ligand L

Soit n le nombre de sites de fixation du ligand $n = P_0 \times n'$
 n' : nombre de sites de fixation de L sur 1 protéine
 r le nombre de sites de fixation occupés par le ligand $r = L_0 - L$

$$Kd = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} = \frac{[L] \cdot (n - r)}{r}$$

Après linearisation:

$$\frac{r}{[L]} = \frac{-1}{Kd} \cdot r + \frac{n}{Kd}$$



Cas particulier d'association PL

P possède plusieurs sites indépendants

En théorie, Kd n'est pas influencée par l'occupation des sites donc par Y .

Kd ne varie pas donc il peut être défini.

L'affinité ne varie pas en fonction de la concentration en ligand.

- On est dans le cas d'une **protéine type micahélienne**

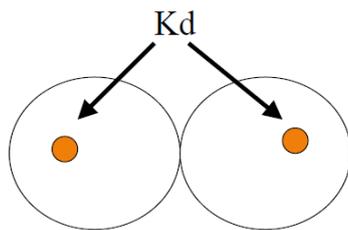
P peut être **multimérique** avec un site de fixation par monomère.

Si les monomères sont identiques, les sites sont identiques (même Kd).

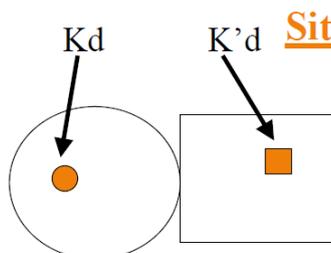
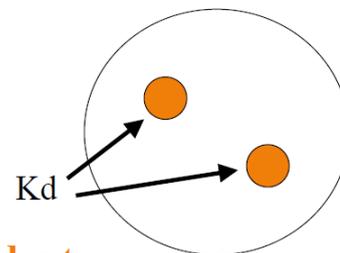
P peut être **monomérique** avec n sites identiques ou différents (dans ce dernier cas les Kd ne varient pas selon leur état d'occupation mais les Kd seront distincts, ils ne s'influencent pas mutuellement)

Exemples :

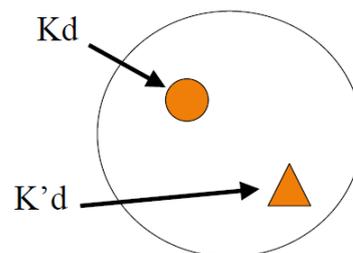
- La transferrine est une protéine monomérique à 2 sites de fixation pour le fer ferrique Fe^{+++}
- La calbindine monomérique fixant 2 Ca^{++}



Monomère, 2 sites identiques



Oligomère: dimère



Monomère, 2 sites différents

P possède plusieurs sites dépendants (allostérie)

L'affinité pour le ligand varie lorsque l'état de saturation Y varie : on ne peut définir Kd
 On parlera d'allostérie car en effet interviennent **d'autres types de sites**.

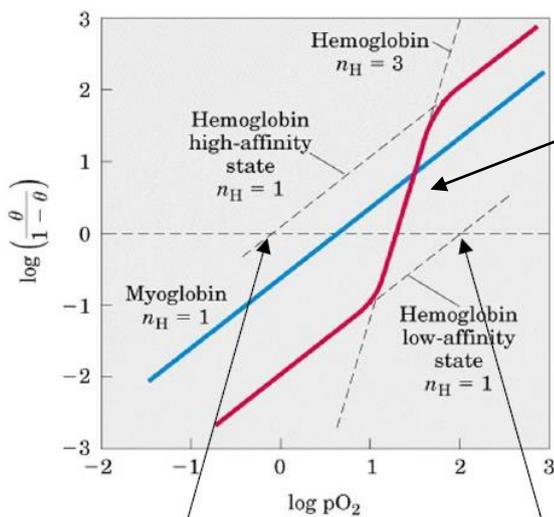
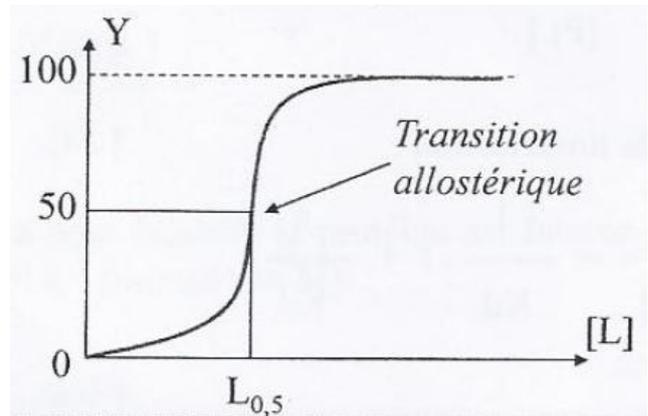
Comportement

La courbe est de **type sigmoïde** (graphe de Hill)

$$Y = \frac{[L]^n}{[L]^n + [L_{0,5}]^n}$$

Après linéarisation :

$$\log \frac{Y}{1-Y} = n \cdot \log[L] - n \cdot \log [L_{0,5}]$$



Équivalent K_m

Équivalent $K'm$

$n =$ pente de a droite

Lorsque $[L]$ est très élevé (soit $\log[L]$ élevé) ou très faible ($\log[L]$ faible), la pente n diminue et prend une valeur remarquable égale à 1

➤ On revient à un **phénomène michaélien**

Une protéine allostérique peut avoir dans certaine circonstances un comportement de type michaélien

Interprétation

Cette droite, dans sa partie centrale, a n pour pente : c'est le **nombre de Hill** ou coefficient de Hill. n est un nombre positif, inférieur, égal ou supérieur à 1. n est aussi appelé **coefficient d'interaction**.

Ce nombre représente en première approximation le **nombre de sites en interaction, sur n' sites au total** que compte la protéine.

Souvent, comme la protéine est oligomérique, et comme il y a un site par sous-unité (ou protomère ou monomère), on parle faussement de n sous unités en interaction.

- Si $n = n'$, on parle de **coopérativité totale**, cas théorique jamais atteint
- Si $n = 1$, on n'a pas d'interaction entre les sites
La protéine aura un **comportement purement michaëlien** (sites indépendants)
- Si $n > 1$, on parle de **coopérativité positive**
La fixation du premier ligand sur un des sites facilitera la fixation du même ligand sur les autres sites (dits homologues ou homotropes)
L'affinité apparente de P augmente (l'affinité d'une protéine est invariable mais son affinité apparente peut varier)
- Si $n < 1$, on parle de **coopérativité négative**
La fixation du premier ligand gêne la fixation des autres molécules du même ligand sur les sites ultérieurs
L'affinité apparente de P diminue
Ce dernier cas semble peu fréquent (récepteur insuline et insuline)

Remarque : On parle de **transition allostérique** autour de $Y = 0,5$

Modèles

Aucun n'est entièrement satisfaisant. Dans tous les cas, la protéine possède au moins deux sous-unités, le plus souvent identiques.

Le **modèle séquentiel** implique une **perte de symétrie** transitoire de la protéine.

Le **modèle concerté** propose la **conservation de la symétrie** (loi du tout ou rien).

- La réalité est un compromis entre ces deux modèles

Le modèle concerté explique très bien la coopérativité positive (et ne rend pas compte de la coopérativité négative).

Ce modèle stipule que l'allostérie est un phénomène d'**interaction entre sites de protomères** appartenant à une protéine oligomérique possédant une structure quaternaire symétrique, se manifestant lors de la fixation d'un **ligand dit principal** sur des **sites dits homologues ou homotropes**.

On parle d'**effet homotrope positif** quand la fixation du premier ligand principal facilite la fixation de la deuxième molécule de ligand principal sur un autre site homologue.

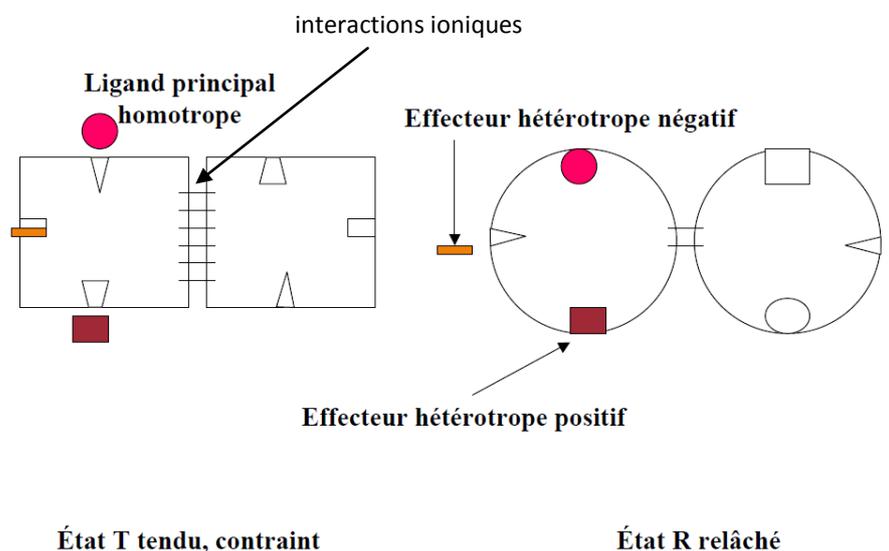
Ce type d'interaction est permis parce qu'il existe sur la protéine des **sites autres (hétérotropes)** que celui du ligand principal, sites où peuvent venir se fixer des **ligands dits secondaires**, différents du ligand principal. Ces ligands peuvent être :

- Positifs, augmentant l'affinité apparente de la protéine pour son ligand principal : on parle d'**activateurs allostériques**
- Négatifs, diminuant l'affinité apparente de la protéine pour son ligand principal : on parle d'**inhibiteurs allostériques**

Cette modulation est possible parce qu'il se produit, au moment de la fixation d'un ligand, un changement de conformation de **l'ensemble** de la molécule oligomérique : c'est bien de l'allostérie, c'est à dire « **autre disposition dans l'espace** ».

Ainsi, la **transition allostérique** n'est pas une succession d'états agrégation-désagrégation de monomères mais un **passage réversible contraint-relâché** d'une protéine oligomérique.

Les interactions ioniques sont très nombreuses à l'état contraint et beaucoup moins nombreuses à l'état relâché.



Enzymes

Généralités

Définition

Les enzymes sont des macromolécules biologiques, en général protéiques, spécifiques, **catalysant des réactions biochimiques** du vivant.

La **spécificité** tient au **type de réaction** (transfert, oxydoréduction, isomérisation, hydrolyse,...). La spécificité tient souvent à la molécule transformée qu'on appelle **substrat**.

Ces biocatalyseurs **accélèrent les réactions biologiques** (sinon incompatibilité avec la vie car trop lentes même si spontanées). Le facteur d'accélération peut être considérable : 10^4 , 10^6 , 10^9 et davantage.

Les enzymes catalysent **en théorie des réactions réversibles** (in vitro, modulation possible ; in vivo, le flux métabolique impose souvent un **sens unique**). Les enzymes sont en principe **intégralement restituées** en fin de réaction ce qui différencie de la catalyse chimique, où le catalyseur est recyclable en théorie indéfiniment.

Remarques

L'immense majorité des réactions du vivant sont catalysées par des enzymes.

Néanmoins, on trouve in vivo des **réactions non enzymocatalysées**, le plus souvent **non régulées**.

- **Phénomène de glycation** : cas de l'**hémoglobine A1C glyquée** qui, sur une de ses 4 chaînes, à fixé de manière covalente (lien avec une base de Schiff) une molécule de glucose de façon non enzymocatalysée (spontané).
Le taux d'hémoglobine glyquée est anormalement élevé en cas de diabète sucré mal traité.

La **spécificité** d'une enzyme peut être **absolue (étroite)**.

- Cas de l'**uréase** qui ne dégrade que l'urée, de l'**anhydrase carbonique** avec l'acide carbonique (CO₂, H₂O)

Cette **spécificité** peut aussi être **relative (large)**.

- Cas de la **trypsine** qui hydrolyse de nombreux peptides distincts, mais au niveau de mêmes motifs structuraux

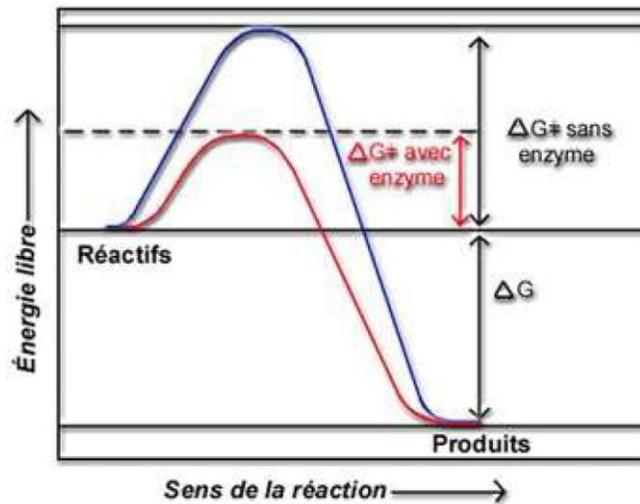
Classification

Internationale, 6 classes subdivisées en sous-groupes

Mode d'action

Les enzymes travaillent par rupture /création de liaisons covalentes en milieu acide, basique ou neutre. Les mécanismes sont le fait d'entités intermédiaires électrophiles, nucléophiles, radicalaires, avec toujours passage par un état transitionnel.

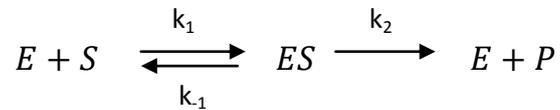
Les enzymes **accélèrent la réaction en diminuant ΔG^\ddagger**



**La spécificité de reconnaissance fait qu'on atteint plus vite l'état activé.
Les enzymes ne modifient pas ΔG , c'est à dire l'équilibre.**

Cinétique michaélienne à 1 substrat

Equation de Michaelis-Menten (MM)



$$v_1 = k_1 [E] \cdot [S]$$

$$v_{-1} = k_{-1} [ES]$$

$$v_2 = k_2 [ES] \quad \text{Vitesse initiale (étape limitante)}$$

La cinétique Michélienne se fonde sur l'existence d'un état stationnaire ES, lequel se forme à la même vitesse qu'il ne disparaît.

On écrit qu'à l'état stationnaire il se forme autant qu'il se dissocie d'espèce ES :

$$v_1 = v_{-1} + v_2 \quad \text{soit} \quad k_1 [E] \cdot [S] = (k_{-1} + k_2) \cdot [ES]$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$$

K_m est la cte de michaëlis

k_2 petit = constante de vitesse de l'**étape limitante**, c'est-à-dire déterminant la vitesse de catalyse

On dit que cette vitesse est une **vitesse initiale** qui est de la forme $v = k_2 [ES]$

ES peut au mieux atteindre E_0 concentration initiale en enzyme, qui sera à ce moment entièrement **saturée**

Dans cette condition $v = V_{\max}$ puisque toute la quantité disponible d'enzyme sera occupée à transformer S.

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

K_m représente la concentration en S nécessaire pour que E soit à moitié saturée

C'est aussi la concentration en S pour laquelle $v = V_{max}/2$

K_m représente l'inverse d'un cte d'affinité donc **plus K_m augmente, plus l'affinité diminue**

Le fait que l'affinité soit grande ne signifie pas que la cinétique sera rapide.

Ordre de grandeur de K_m : 10^{-3} à 10^{-6} M

Pour des [S] élevées (10 à 20 K_m), la réaction ne dépend plus de S mais de E_0 . En pratique, c'est ce qu'on cherche à reproduire au laboratoire d'analyses pour les dosages in vitro.

In vivo, la plupart des enzymes ne sont pas saturées :

$$[S] \ll K_m \text{ et } v \ll V_{max} \text{ (} k_{-1} \text{ négligeable)}$$

Le rapport k_2/K_m est le **critère d'efficacité globale** rapide (limite: ce rapport tend vers k_1)

- Plus k_2 augmente, plus K_m diminue, plus E est à la fois efficace et rapide

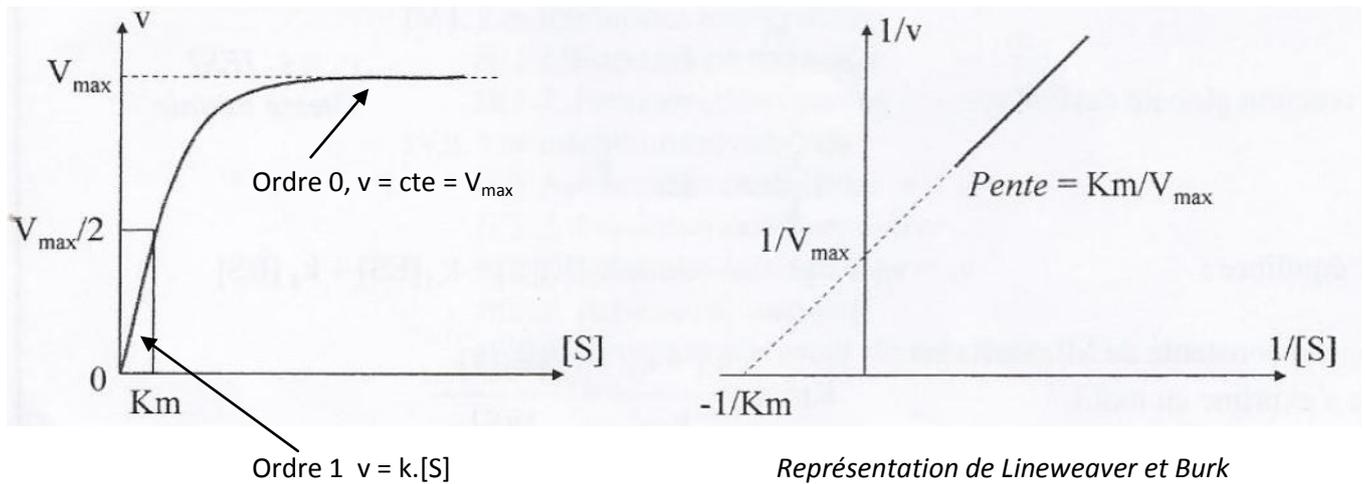
On dit que ces enzymes tendent vers la **perfection cinétique**

Courbe expérimentale

$$Y = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Après linéarisation :

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

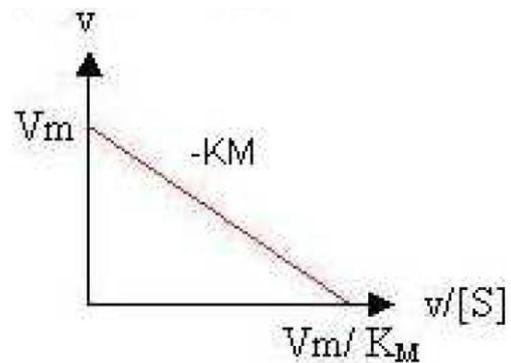


La cinétique michaélienne à 1 substrat se déroule de l'ordre 1 vers l'ordre 0

Représentation de Eadie-Hofstee

$$v = V_{max} - \frac{v}{S} \cdot K_m$$

Expression du type $y = b + ax$



Activités enzymatiques

Valables pour des enzymes michaeliennes, mais aussi pour toute enzyme même non michaelienne (allostérique).

Utilisées pour les dosages in vitro (examens de laboratoire d'analyses médicales, ou de recherche)

On dispose de trois indicateurs :

- L'**unité internationale** (UI) est la **quantité d'enzyme** qui dans les conditions standardisées (**S saturante, T° 25°C, pH optimal**) catalyse la transformation de **1 μM de S en 1 min**. Cette unité est en pratique plus utilisée que le **catal (Katal)** : quantité d'enzyme qui transforme une mole de substrat en une seconde.
- L'**activité spécifique** correspond à une **quantité de substrat** transformé par unité de poids de protéine et par unité de temps

Par exemple x UI/mg d'une préparation d'enzyme mélangée à d'autres protéines.

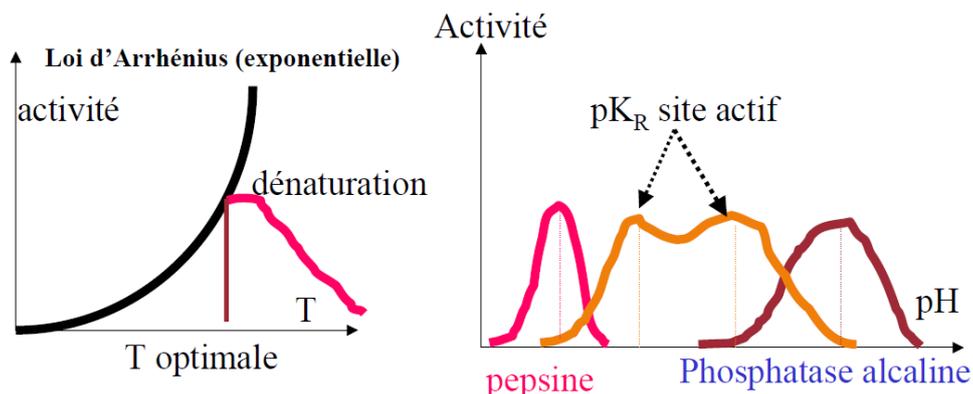
On conçoit qu'en purifiant l'enzyme, cette activité spécifique augmente jusqu'à la ramener à la quantité de protéine enzymatique qui représentera la seule protéine. On parle de:

- L'**activité moléculaire** de l'enzyme
Dans ces conditions $v = V_{max} = k_2 \cdot E_0$ et $k_2 = V_{max}/E_0$, qui est bien une **quantité de substrat transformée par unité de temps et par mole (ou masse) d'enzyme**. On retrouve bien k_2 en unité t^{-1}

Facteurs influençant la cinétique

- **La température** lors d'une catalyse augmente la probabilité de chocs moléculaires (bonnes rencontres), donc accélère v si elle augmente (et inversement). La limite (si T° trop grande) est apportée par la **dénaturation thermique irréversible**
- **Le pH**
Par exemple : la pepsine a un pH optimal de 1.2 ; la phosphatase alcaline de 9.5

NB : **La pression** est aussi un moyen d'étude et facteur de variation



Cinétique michaelienne à 2 substrats

Cas fréquent en pratique

Plusieurs cas de figure: aléatoire, ordonnée, ping pong

On n'envisagera ici que le cas de la **cinétique ping-pong**

E possède 1 seul site pour les substrat A et B.

A et B ne peuvent être présents sur E au même moment: **EAB complexe ternaire n'existe pas.**

E donnera les produits respectifs P et Q.

E existe sous deux états E et E' (coenzyme lié transformé)

EA et E'B sont des complexes réputés « actifs » (transformation du substrat).

Cas de la **transamination** par les aminotransférases

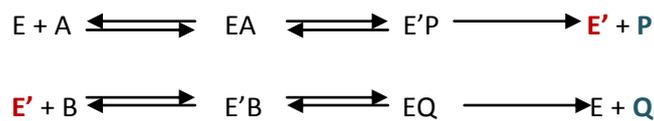
E porte Pyridoxal phosphate (lien covalent), E' porte Pyridoxamine phosphate

E + A donne réversiblement EA (K_a)

EA donne réversiblement E'P : E' et P sont libérés

E' + B donne réversiblement E'B (K_b)

E'B donne réversiblement EQ : E et Q sont libérés



Pour le cas des transaminases (amino-transférases):

A = aa1, B = acide α cétonique 2

B = acide α cétonique 1, Q = aa2 (voir coenzymes)

Passage par une **base de Schiff** intermédiaire qui s'isomérisé (imine)

Expression de la cinétique ping-pong

$$v = \frac{V_{max}}{\frac{K_a}{A} + \frac{K_b}{B} + 1}$$

On se place dans le cas où [B] = cte et [A] = variable

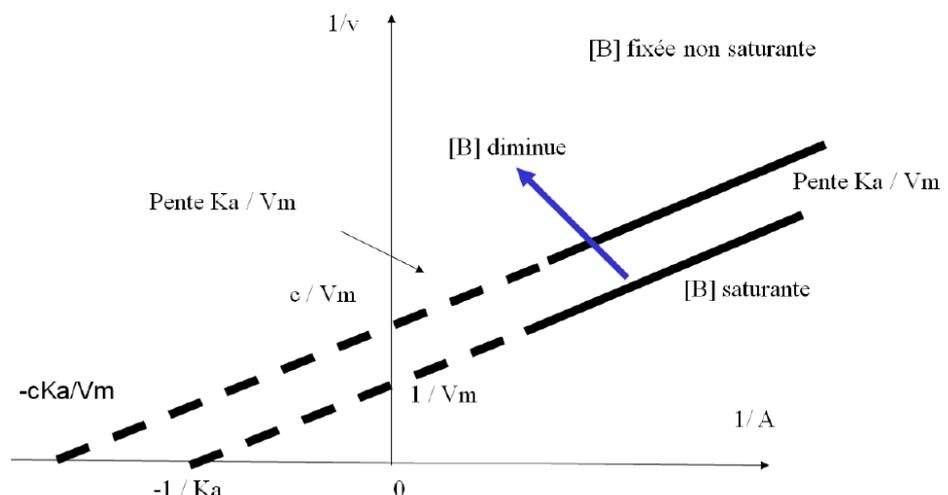
On pose: $c = 1 + \frac{K_b}{B} = cte$

Après linéarisation :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V_{max}} \cdot \frac{1}{A} + \frac{c}{V_{max}}$$

Si [B] saturante, c tend vers 1 et :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V_{max}} \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{max}}$$



Inhibition enzymatiques

Inhibitions irréversibles

- **Par facteurs physiques**

Cas de **pH extrêmes, de T° élevées, de pressions fortes** (il se trouve cependant des **extrêmophiles** acceptant les environs de 100°C ou à l'inverse les environs de 0°C).

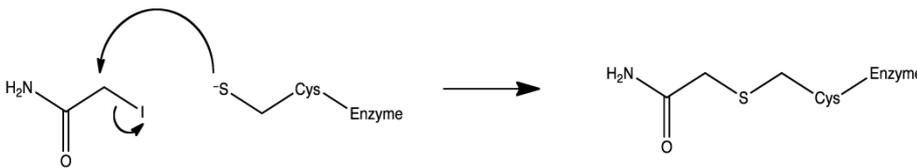
De même on connaît des organismes psychrophiles, halophiles, acidophiles, basophiles, xérophiles. Pour l'homme, au-delà de 70°C, les protéines précipitent de façon irréversible

- **Par modifications chimiques (biochimiques)**

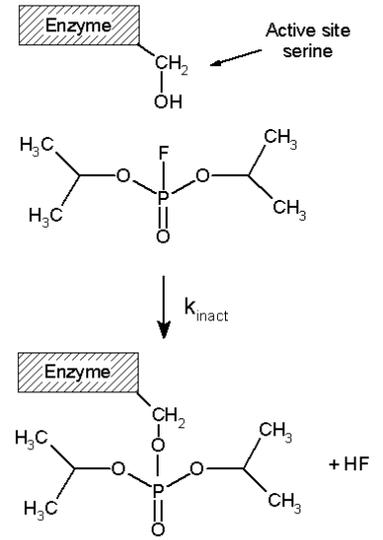
Action du **di-isopropyl-fluoro-phosphate (DFP)** : bloque beaucoup de sérine-protéases (**acétylcholinestérase** et **organophosphorés** : intoxication classique des agriculteurs).

Il se lie de façon covalente avec la fonction alcool primaire de la Sérine en établissant une liaison ester-phosphate.

L'**iodoacétamide** bloque le site actif des enzymes en établissant une liaison thio-éther avec la fonction thiol libre d'une cystéine.



Il existe des exemples dans la pharmacopée : blocage de cystéine protéases par des **cathepsines** (impliquées dans des cancers, avec d'autres molécules que l'iodoacétamide).



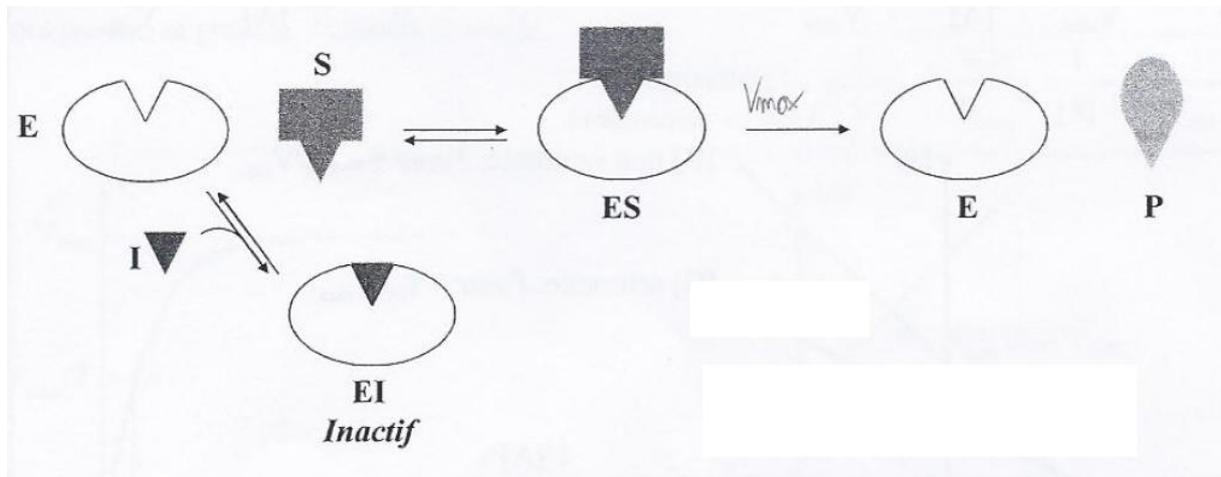
Inhibitions réversibles

Les inhibiteurs ne créent pas de covalence, ils agissent au niveau du site actif ou à distance, par association non covalente.

- **Inhibition compétitive**

L'inhibiteur compétitif (IC) est souvent un **analogue de substrat**, de telle sorte qu'il se loge à la place de S, sans être en général transformé. On conçoit intuitivement que **c'est l'affinité apparente qui va diminuer et pas la V_{max}** .

L'IC peut être délogé par un excès de substrat (inhibition levée).



$v = k_2 [ES]$ et on définit les constantes K_m et K_i (= cte de dissociation)

Le complexe ESI ne peut pas exister

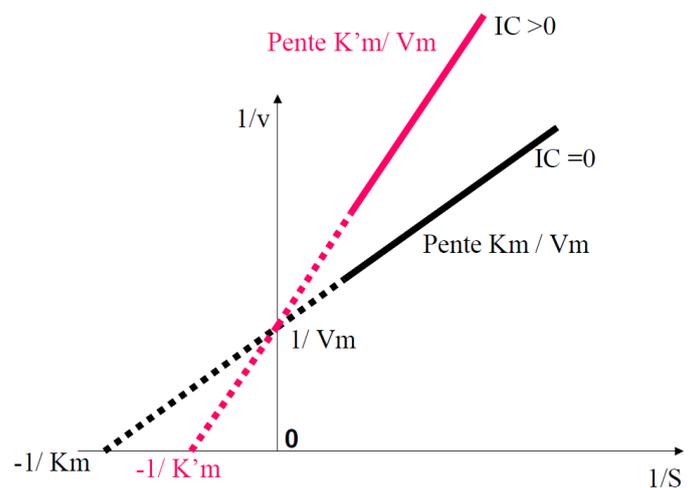
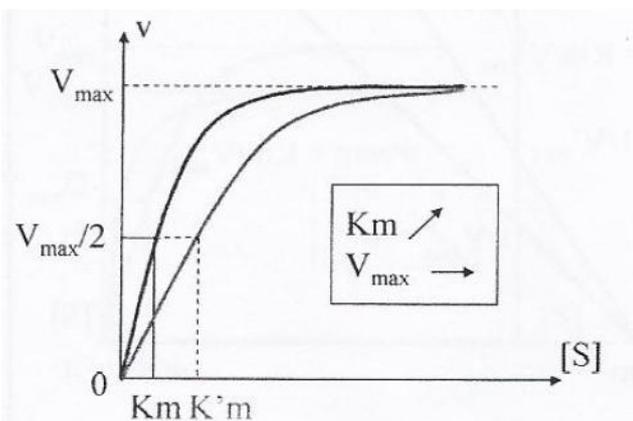
$$Y = \frac{v}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[E] + [EI] + [ES]}$$

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K'm + [S]} \quad \text{avec} \quad K'm = K_m \cdot \frac{1 + [I]}{K_i}$$

$[I]$: concentration en inhibiteur

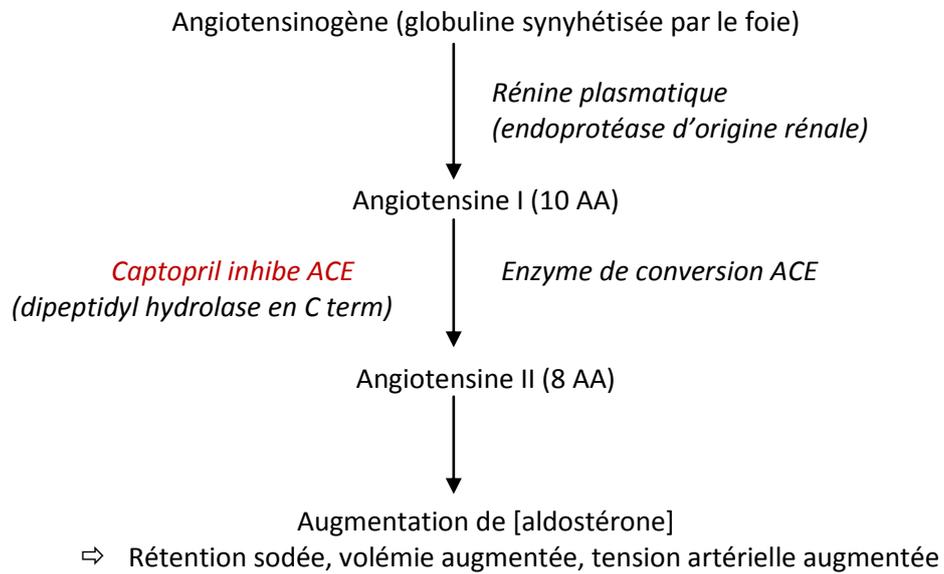
$1 + [I]/K_i$: facteur d'inhibition

Quand K_m augmente, l'affinité diminue



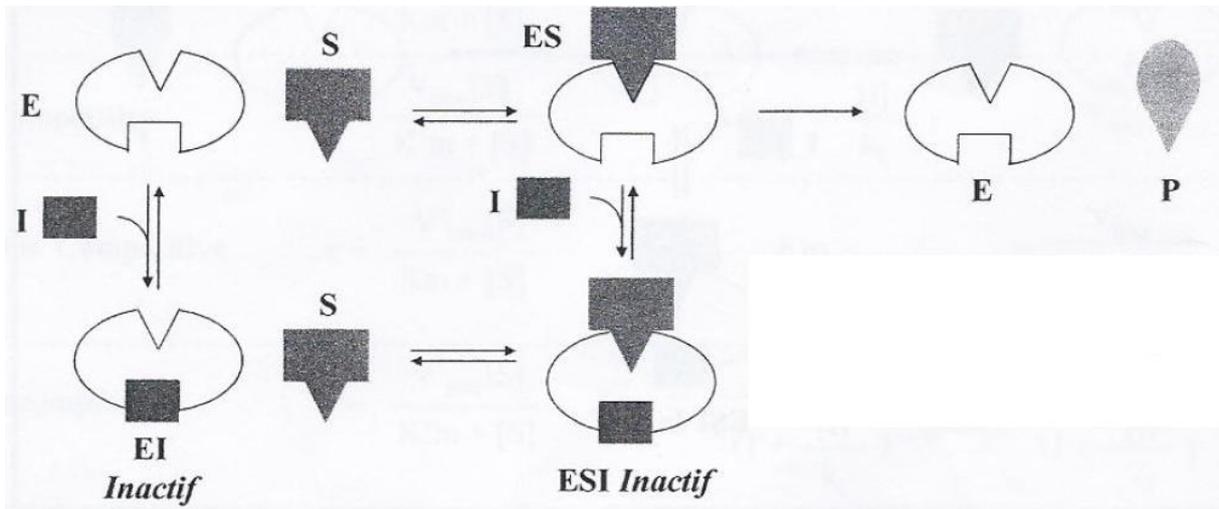
Remarque: cette classe d'inhibiteurs donne lieu au maximum d'applications médicales

Exemple : **Captopril**, analogue peptidique de l'angiotensine I (**antihypertenseur**)



- **Inhibition non compétitive**

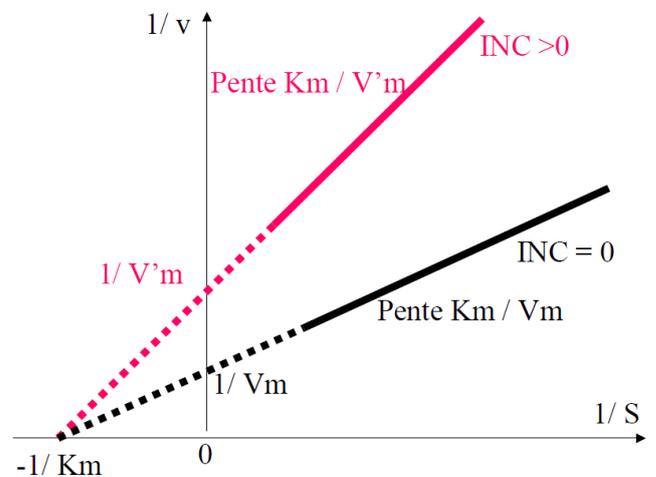
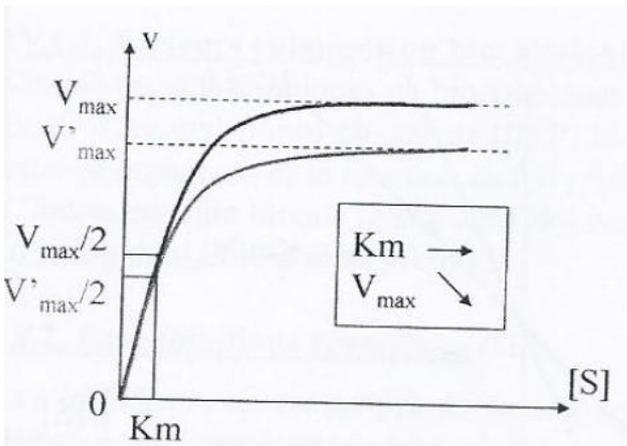
Les inhibiteurs non compétitifs (INC) ne sont pas des analogues structuraux de S. Ils se fixent de façon non covalente en un **site différent du site actif** de l'enzyme à la fois sur l'enzyme et sur le complexe enzyme/substrat. **Ils ne diminuent pas l'affinité de l'enzyme pour S (donc ne modifie pas K_m) mais diminuent la V_{max}** puisque l'inhibiteur ne peut être déplacé du complexe ternaire ESI par un excès de S. Tout se passe comme si $[E_0]$ était diminué.



$$v = k_2 [ES]$$

$$Y = \frac{v}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[E] + [EI] + [ES] + [ESI]}$$

$$v = \frac{V'_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{avec} \quad V'_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{I}{K_i}}$$

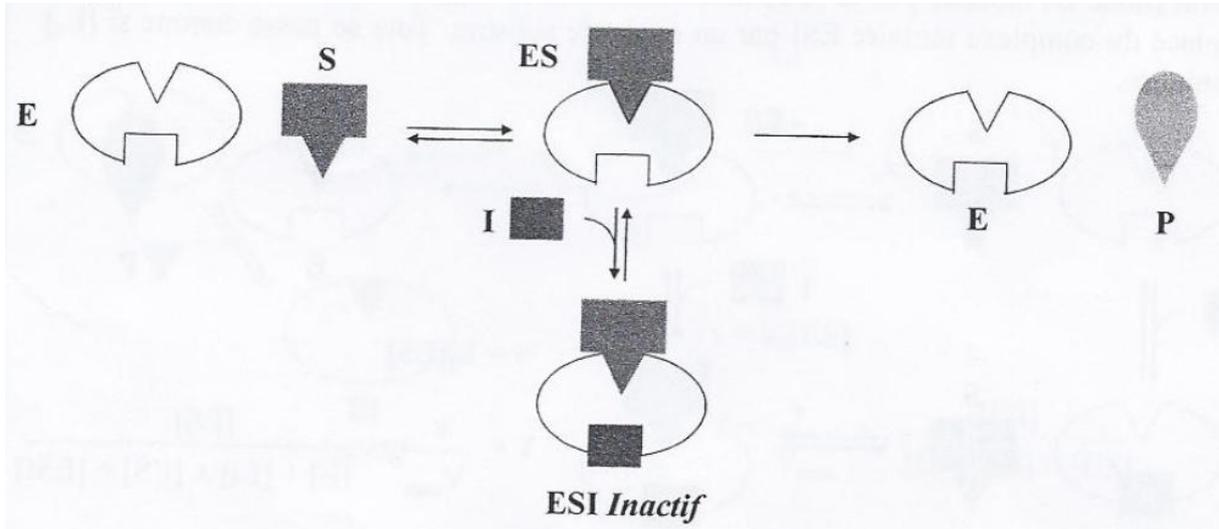


Exemples

- **L'ion H^+** : INC vis à vis de la chymotrypsine
- **Acétazolamide** : INC de l'anhydrase carbonique (rénale en particulier)

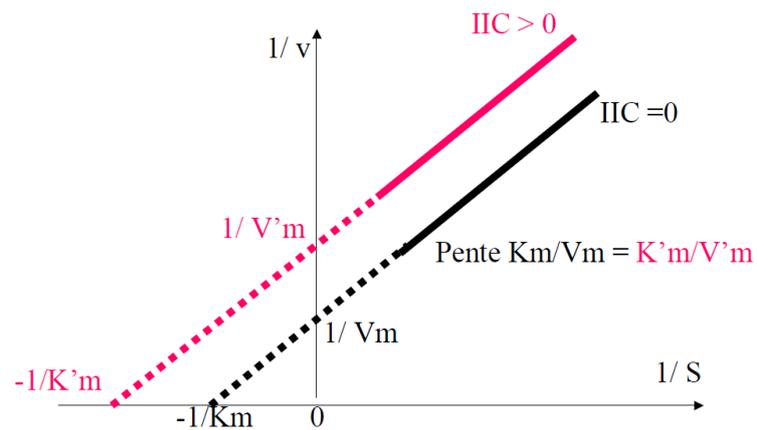
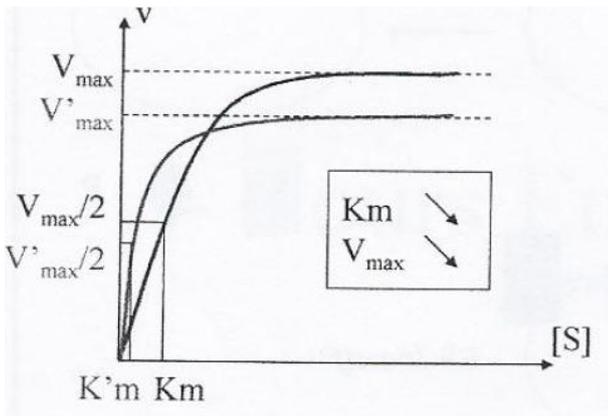
- **Inhibition incompétitive**

Les inhibiteurs incompétitifs (IIC) ne sont pas de analogues structuraux de S. Ils se fixent de façon non covalente en un **site différent du site actif** de l'enzyme uniquement sur le complexe enzyme/substrat. **K_m diminue (donc l'affinité de l'enzyme pour S augmente) et la V_{max} diminue.**



V_{max} et K_m sont divisés par le même facteur $1 + [I]/K_i$

$$v = \frac{V'_{max} \cdot [S]}{K'm + [S]} \quad \text{avec} \quad V'_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{I}{K_i}} \quad \text{et} \quad K'm = \frac{K_m}{1 + \frac{I}{K_i}}$$

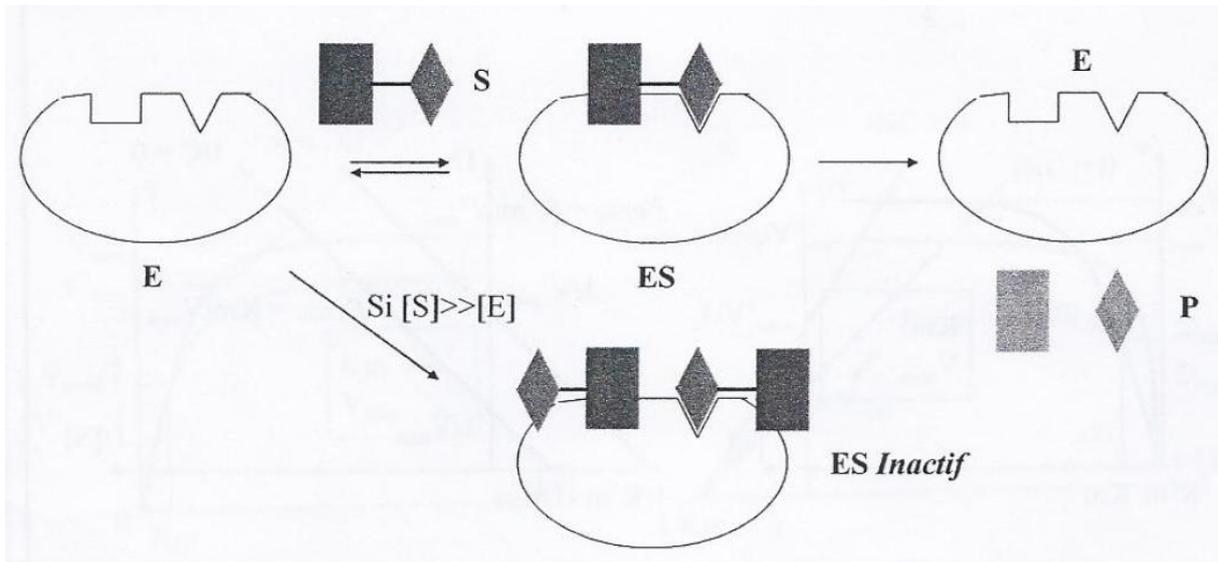


Exemples

- **Glyphosate** (désherbant) : IIC d'une enzyme végétale
- **Li⁺** : cation IIC d'une phosphatase de l'inositol-di-phosphate (IP2)

- **Autres types d'inhibition réversibles**

Par excès de substrat : le complexe ES est non réactif à cause d'une mauvaise disposition de S dans le site actif (cas de l'acétylcholinestérase, en situation physiologique d'excès d'acétylcholine).



Par le produit P, qui est parfois considéré comme un analogue de S. P exerce alors un effet de régulation sur E mais c'est différent de l'allostérie.

Tableau récapitulatif

Effet de divers type d'inhibitions sur l'équation de Michaelis-Menten, sur le K_m apparent et sur la V_{max} apparente.

Inhibition	Equation de la vitesse	K_m apparent	V_{max} apparente
Sans inhibition	$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$	K_m	V_{max}
Compétitive	$v = \frac{V_{max}[S]}{K'_m + [S]}$	$K_m (1 + \frac{[I]}{k_I})$	V_{max}
Non Compétitive	$v = \frac{V'_{max}[S]}{K_m + [S]}$	K_m	$\frac{V_{max}}{(1 + \frac{[I]}{k_I})}$
Incompétitive	$v = \frac{V'_{max}[S]}{K'_m + [S]}$	$\frac{K_m}{(1 + \frac{[I]}{k_I})}$	$\frac{V_{max}}{(1 + \frac{[I]}{k_I})}$

Coenzymes

Généralités

Auxiliaires non protéiques de certaines enzymes.

Beaucoup d'enzymes fonctionnent sous la forme **holoenzyme** (sans coenzymes)

De nombreuses autres enzymes fonctionnent avec une autre molécule, de quelques centaines de daltons, voire moins (ion métallique), appelée au sens large **coenzyme**. La partie protéique de l'enzyme est alors nommée **apoenzyme**.

Ces coenzymes sont rattachés de façon covalente ou non covalente à E.

Si non covalence, on parle de **cofacteur** au sens strict, et il est dialysable. Si covalence, on parle de **groupement prosthétique**, non dialysable.

De nombreuses **vitamines** sont à l'origine des coenzymes.

Ces vitamines ne sont en fait que des **précurseurs inactifs** de coenzymes.

Un (une) coenzyme participe à la transformation du S, subit des modifications au cours de la catalyse, mais doit être **restitué intact en fin de réaction** ; ce qui se fait parfois par le biais d'échange.

Un coenzyme donné peut servir à telle ou telle famille d'enzyme.

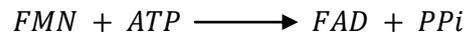
Donc nombre de coenzymes est beaucoup plus restreint par rapport à celui des enzymes.

Un coenzyme a plutôt de l'affinité pour une famille d'enzymes ; une enzyme a de l'affinité pour le substrat.

Certaines Enzymes fonctionnent avec **plusieurs coenzymes**: cas de la **NO synthase** (NADPH puis FAD puis FMN).

- **FMN \ FAD** : flavine adénine mono ou dinucléotide

Conserve la dénomination nucléotide (au sens large, association base azotée + sucre + phosphate). Ici le sucre du côté flavine est linéaire en C5 (ribitol).

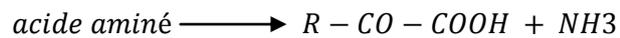


Donc le sucre du côté adénine est ribose.

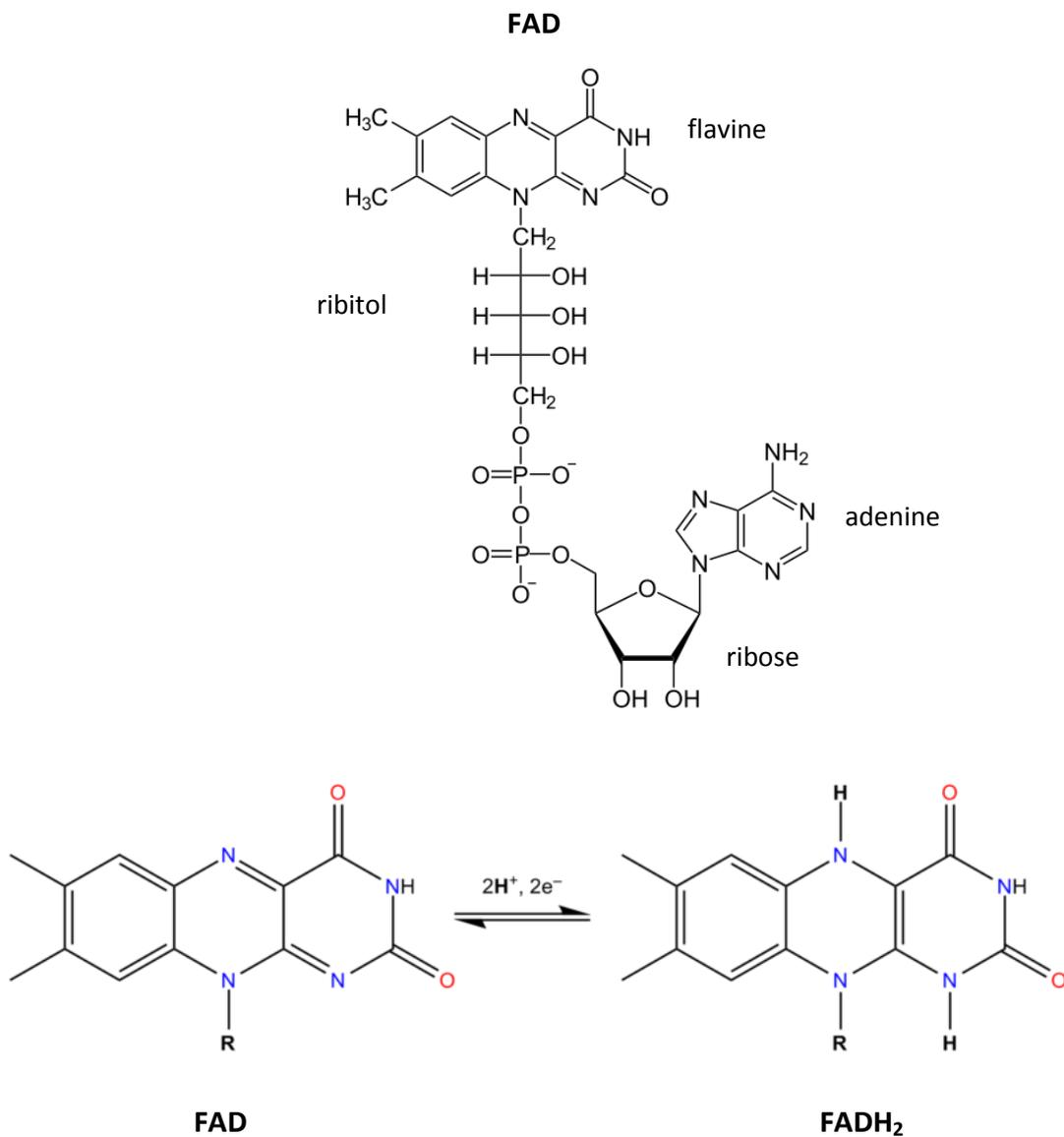
Exemple avec FAD : succinate donne fumarate grâce à la *fumarase*, dans le cycle de Krebs.

Exemple avec FMN :

Catalyse par la *L-aminoacide oxydase*)



Ne pas confondre avec transamination !!

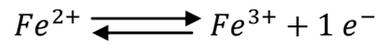


Coenzymes de transfert d'électrons

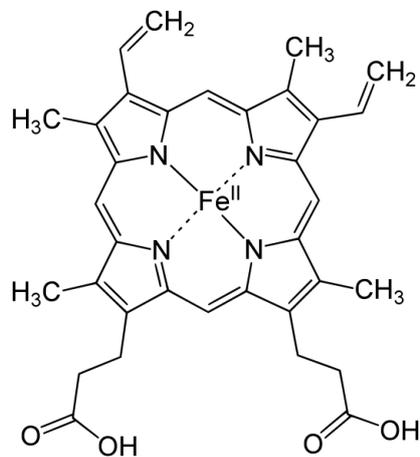
D'une part des **hèmes de cytochromes (protéines)** de la **chaîne respiratoire mitochondriale**, d'autre part des **hèmes de cytochromes divers, d'origine surtout hépatique** (grande famille des cytochromes

P 450) servant à la détoxification d'agents exogènes : médicaments, xénobiotiques,...).

La base du fonctionnement de ces groupes prosthétiques est le **passage réversible du fer héminique de l'état bivalent à l'état trivalent**.



L'homme sait faire la synthèse de l'hème.



Hème

Coenzymes de transfert de fractions carbonées

- **THF** (tétra hydro folate)

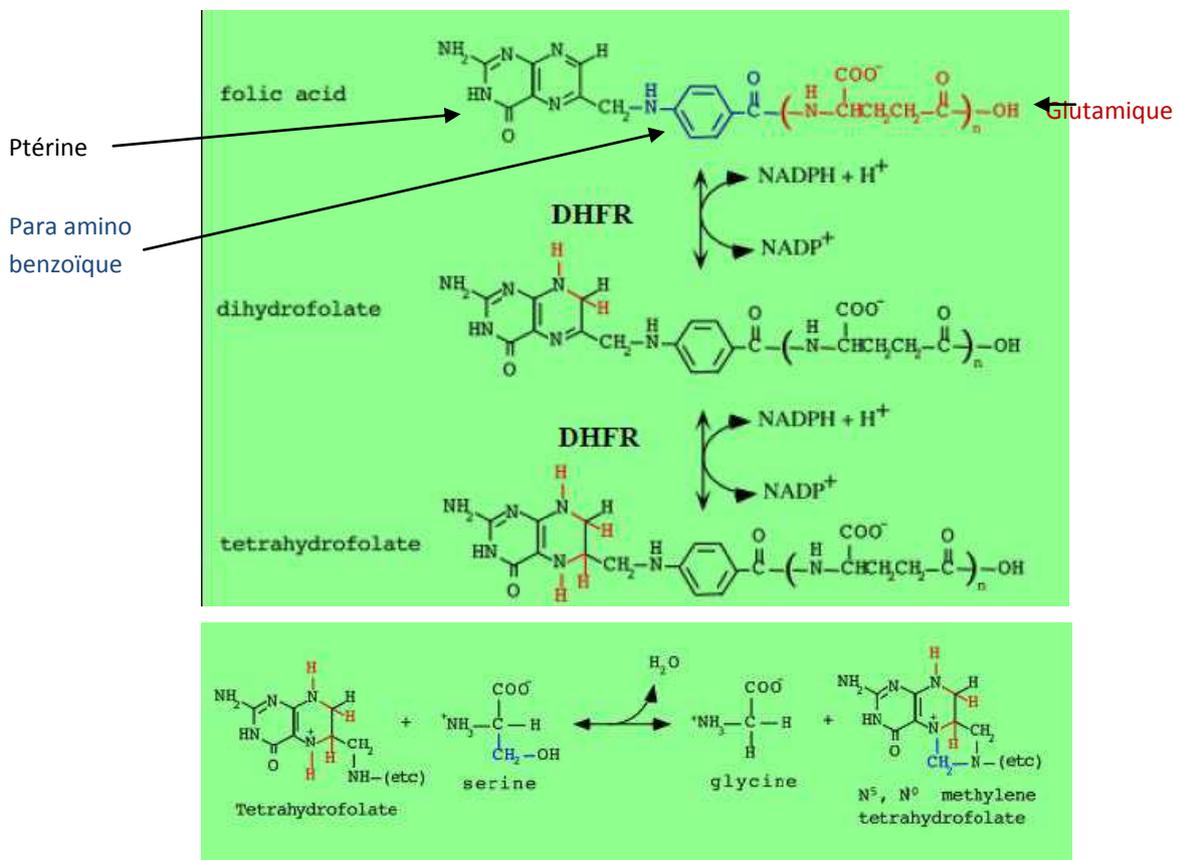
Coenzyme impliquée dans le transfert de **fractions monocarbonées**.

Importance de la **DHF réductase**, fait passer des folates au DHF puis THF, forme active.

Contient au moins un **résidu glutamique**, souvent davantage (3, 6, 7, etc....) rattachés par lien amide peptidique (les Glu supplémentaires permettraient de garder le coenzyme en intracellulaire).

Pontage de CH₂ (méthylène) entre N5 et N10: **méthylène THF** par une **sérine hydroxyméthyl transférase (SHMT)**

A partir du méthylène THF, on fabrique le **N5 méthyl THF** avec la **méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR)**.



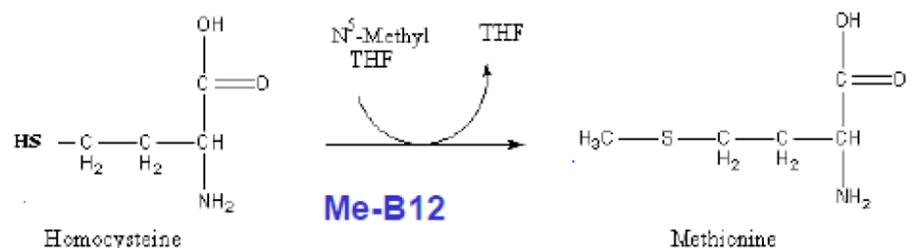
Ce méthylène est aussi transférable lors de la synthèse des pyrimidines. (bases nucléiques).

Des groupes tels que $-\text{CHO}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$, $-\text{CH=}$ (méthényle), $-\text{CH=NH}$ (formimino) peuvent transiter par THF, **jamais $-\text{COOH}$** .

La **méthionine synthase (MS)** intervient pour la **reméthylation**

Réaction capitale dépendant de la **vitamine B12** (ici méthylée) et des **folates** (ici THF)

Pratiquement dans tous les tissus



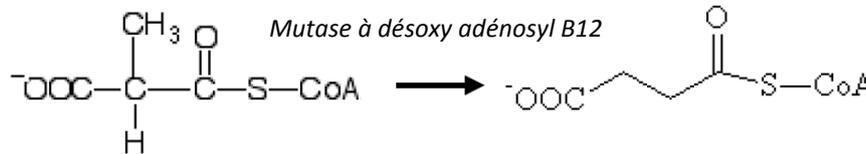
- **Vitamine B 12**

C'est un **coenzyme nucléotidique** car il contient une succession base azotée – sucre – phosphate.

Le cobalt monovalent est hexacoordiné, une des coordinations axiales étant CH₃, ou OH.

Cette molécule fonctionne parfois avec le groupe 5'-désoxy adénosyl (le 5' désoxyribose participe à la 6^{ème} coordinance).

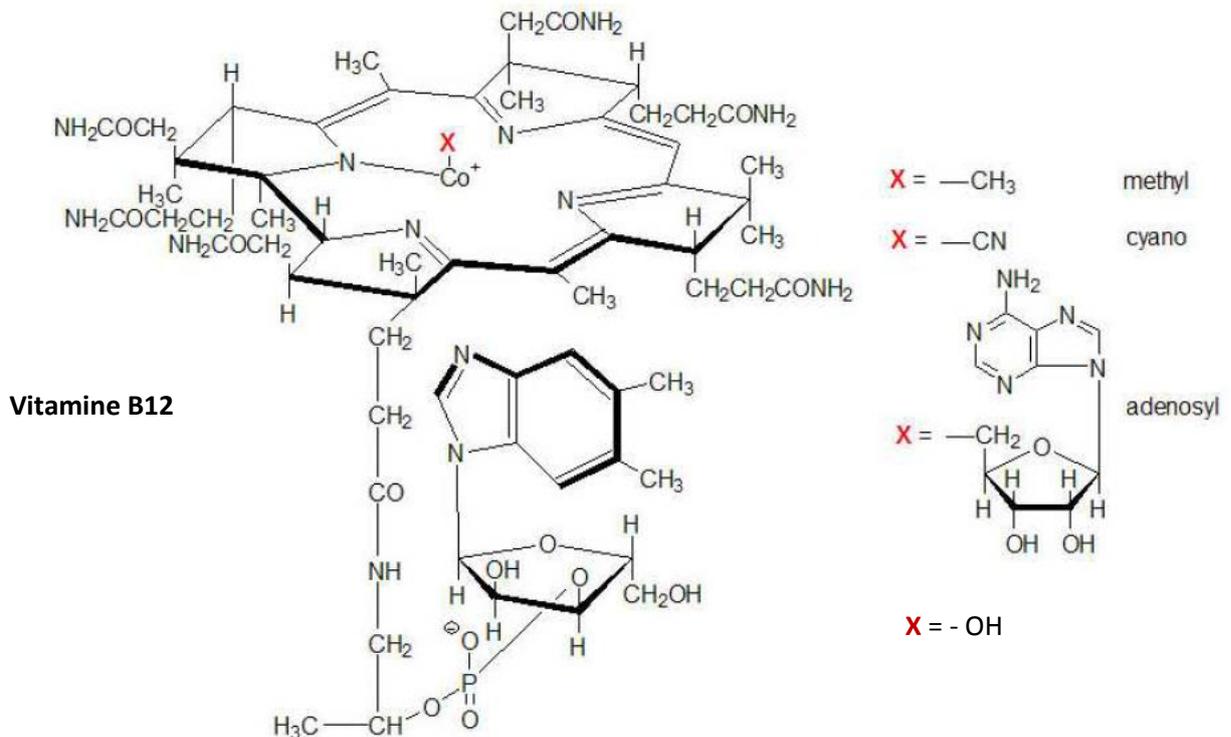
Exemple :



Méthyl malonyl CoA

Succinyl CoA

Si déficit en mutase: acidurie Me-malonique



Exemple : Homocystéine Méthionine (avec Me-cobalamine, en synergie avec THF).

Ce sont en pratique les 2 seules réactions où la B12 intervient chez l'homme.

Remarque : B12 alimentaire est absorbée grâce au **facteur intrinsèque** protéique de l'estomac. La B12 étant le **facteur extrinsèque**. Si absence, anémie macrocytaire (précurseurs nucléés des globules rouges déficients en pyrimidines) : Cas des gastrectomisés, de gastrites chroniques.

NB : Il existe des transporteurs dans le sang de cobalamine (**transcobalamines**) dont on connaît des mutants à l'origine de pathologies. L'**haptocorrine** est une autre protéine transportant B12 dans le sang.

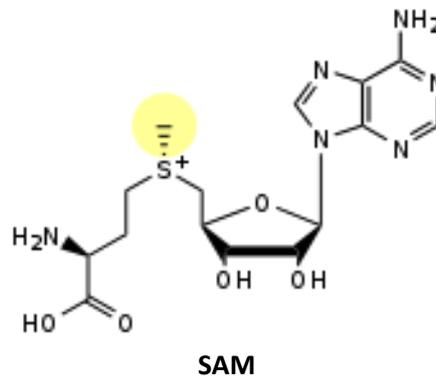
- **S- adénosyl méthionine (SAM)**

Formation d'un méthyle « activé » à partir de la méthionine avec la **Met Adénosyl Transférase (MAT)**



Il apparaît un soufre activé : **Sulfonium** réactif

Intervient dans la synthèse de **créatine**, de **mélatonine** (dérivé du tryptophane), de **bétaïne** (tri Methyl Glycine), de **sarcosine** (dérivé de la Glycine), de **Phosphatidyl choline** (PC), d'**arginine** (ADMA, DiMéthyl Asymétrique Arginine), de **lysine** (histones méthylées).
Cofacteur des Me- transférases sur ADN (épigénétique)

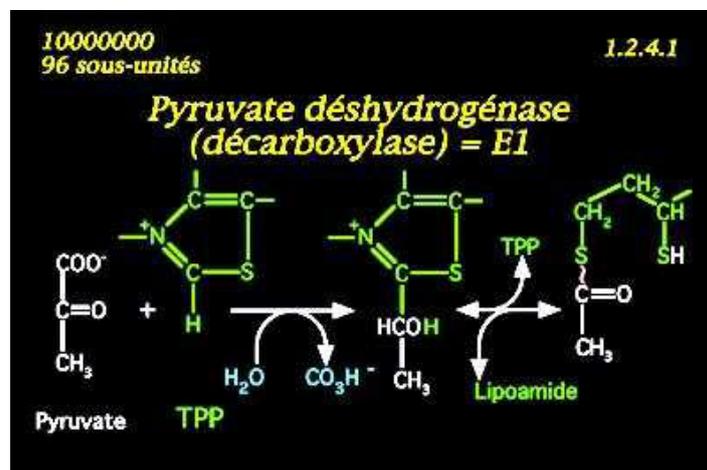


- **Thiamine Pyrophosphate (TPP)**

Coenzyme majeur de la **décarboxylation**. Dérive de la vitamine B1.

Intervention avec la **pyruvate déshydrogénase (PDH)**, complexe à 3 enzymes dont la première (E1= décarboxylase) fait intervenir la décarboxylation du pyruvate (C3) en acétate (C2).

Résultat: **Acétyl CoA** et **NADH, H+** (pas besoin d'ATP)

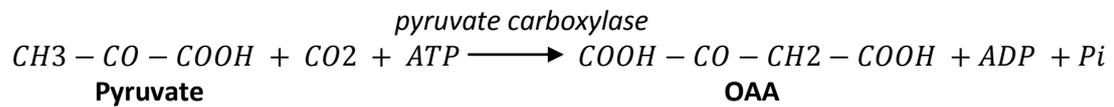


- **Biotine**

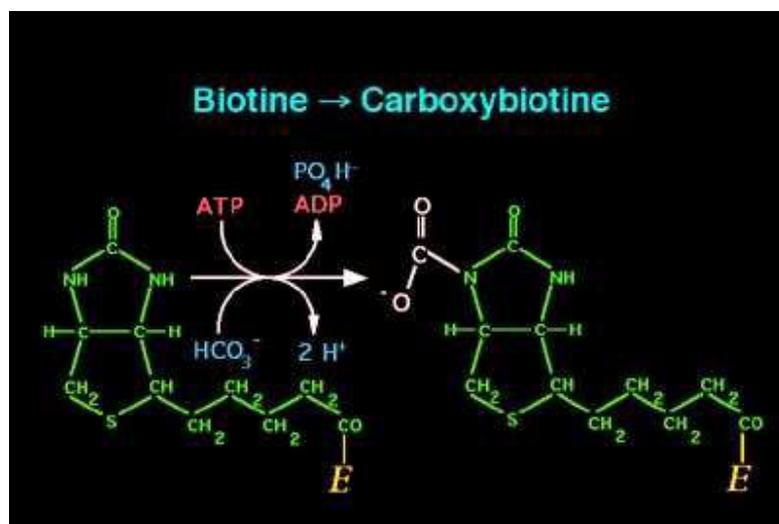
Dérivé de la vitamine H. **Coenzyme de carboxylation.**

Intervient avec la **pyruvate carboxylase** (rien à voir avec la pyruvate déshydrogénase et son E1 décarboxylase).

La biotine est restituée par transfert du CO₂ sur Pyruvate pour donner l'oxalo-acétate (OAA).



Importance de l'OAA dans le cycle de Krebs mitochondrial et la néoglucogénèse (NGG).



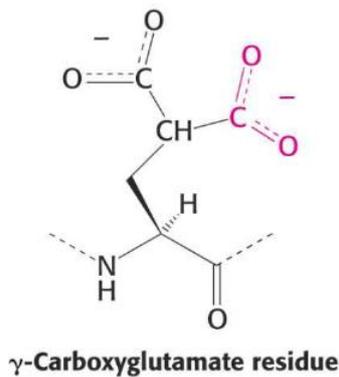
Importance à ce niveau de la **biotinidase** qui mobilise la biotine des « réserves »

- **Vitamine K** (groupe des liposolubles A, D, E, K)

Coenzyme de **carboxylation** de protéines plasmatiques impliquées dans la coagulation et synthétisées par le foie (facteurs II, VII, IX, X en particulier, dits **vit. K dépendants**).

Ces facteurs sont carboxylés par cette vitamine à l'aide de l'équivalent HCO_3^- (mécanisme non envisagé) **sur des résidus glutamique** en donnant des gamma carboxy Glu.

La pince formée par ces 2 COO^- retient Ca^{++} (facteur capital de la coagulation, cf. tube EDTA : sang incoagulable).

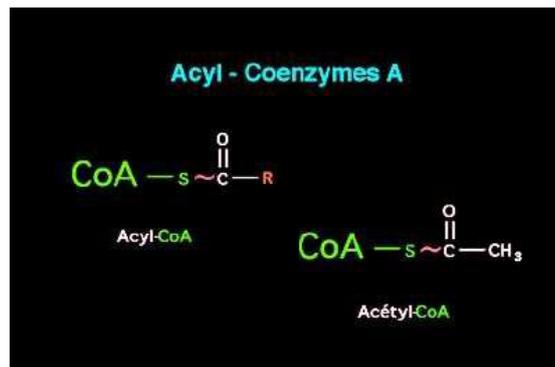
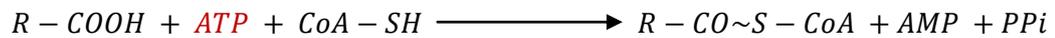


- **CoA-SH**

Seul exemple de transfert de fraction à plus de un carbone.

Transfère le groupe acyl ($\text{R}-\text{CO}-$) lors de la dégradation des acides gras.

Ce dernier est d'abord activé par ATP et CoA-SH en **thio-ester** :

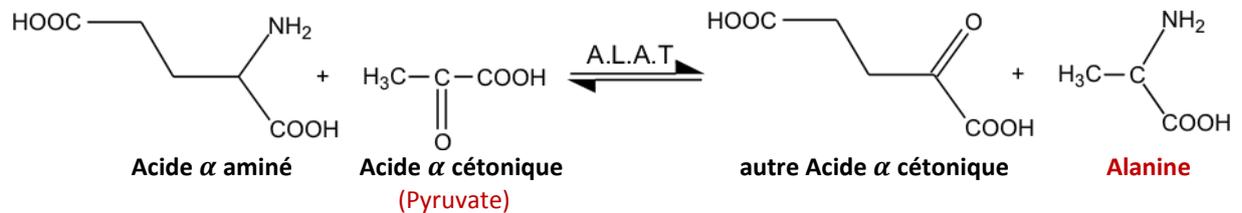


Autres

- **Couple Pyridoxal-P - Pyridoxamine-P**

Le précurseur est la pyridoxine **vitamine B6** (du groupe B des vitamines hydrosolubles).

Exemple



ALAT : alanine amino transferase



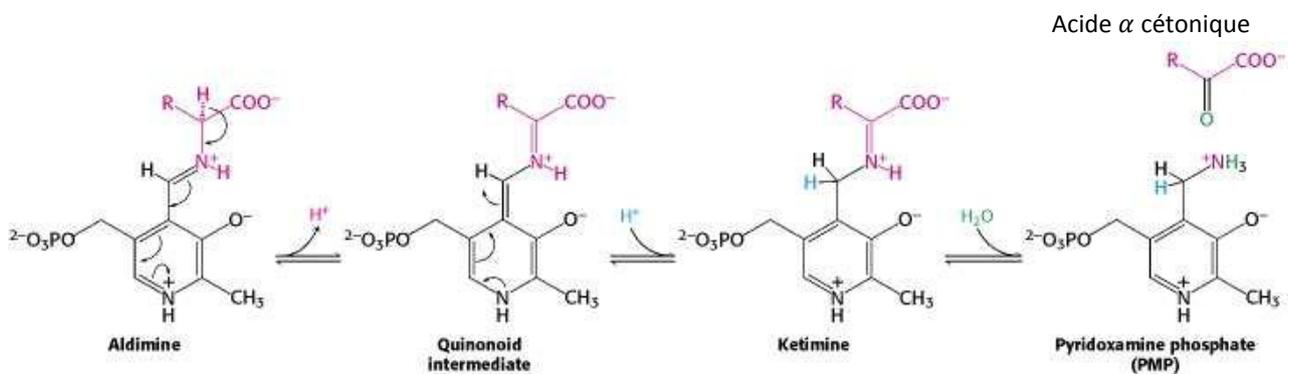
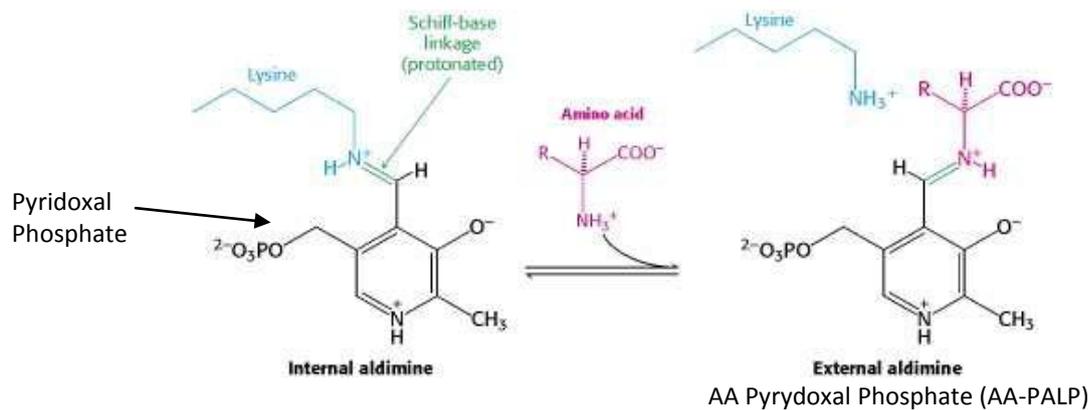
Les enzymes sont des **aminotransférases** ou **transaminases**.

Le phosphate de pyridoxal intervient aussi dans des réactions de **décarboxylation D'AA**.

Par exemple His donne Histamine, Tyr donne Tyramine, Glu (AA exciteur) donne Gaba (inhibiteur, via GAD, glutamate décarboxylase). Les enzymes concernées sont des **décarboxylases**.

Le couple Pyridoxal-P / Pyridoxamine-P est parmi le plus universel: sur les 6 classes d'enzymes, 5 possèdent des représentants fonctionnant avec ce couple (hormis les synthétases).

La famille les représentant le plus étant celles des **transférases**.



Pyridoxamine-P ne peut se fixer avec covalence sur une Lysine (comme le faisait le Pyridoxal Phosphate).

La base de Schiff (aldimine interne) est un intermédiaire obligatoire quel que soit le type de réaction catalysée (transamination, décarboxylation, racémisation).

Les enzymes à B6 sont des cibles d'intervention pharmacothérapeutiques.

Applications: des **analogues artificiels AA-PALP** (avec imine réduite en amine II) se fixent **de manière non covalente** sur les apoenzymes à B6 et jouent le rôle d'inhibiteurs compétitifs.

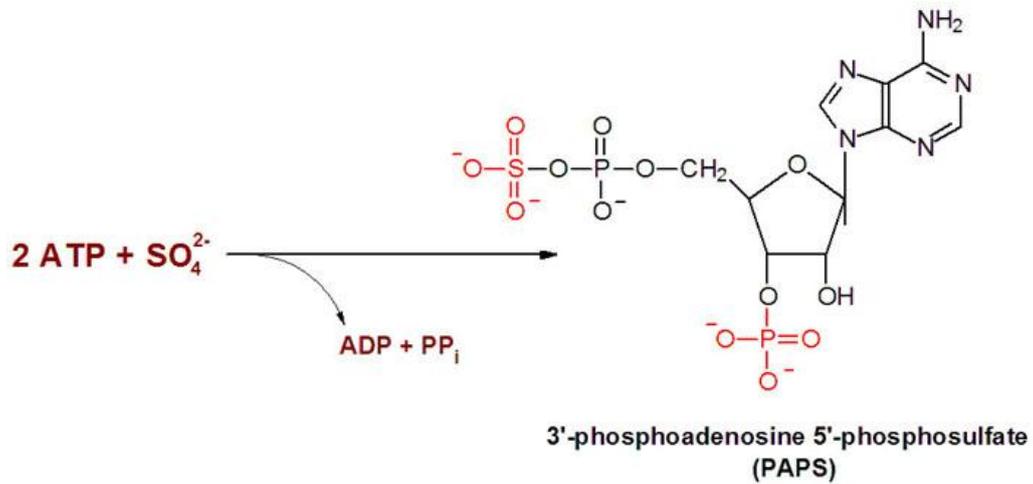
Exemples

- **Ornithine décarboxylase**, première E de biosynthèse des polyamines (putrescine, spermidine, spermine) impliquées dans des proliférations cellulaires (**ODC à B6**): espoir de thérapies anti-cancer
- **Histidine décarboxylase**: donne histamine en excès si allergie, inhibiteurs à l'étude

- **PAPS (Phospho Adénosyl Phospho Sulfate)**

C'est le « sulfate actif ».

Formation par couplage réaction **endergonique** + réactions **exergoniques** :



⇒ 2 ATP sont consommés par sulfate activé

Intervention comme **donneur de sulfate** pour la synthèse des polymères glucidiques sulfatés (héparine), pour la formation de sulfoconjugués de détoxication (forme d'élimination urinaire de nombreux médicaments, rendus + solubles).