

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Département de Biologie Physico-Chimique, Faculté des sciences de la nature et de la vie
université A. Mira de Bejaia

Cours

Enzymologie Moléculaire et Appliquée

Master II: Pharmaco-toxicologie

Dr. CHERAFT-BAHLOUL Nassima

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Année: 2023/2024

Programme de la matière Enzymologie Moléculaire et Appliquée

Chapitre 1 : Interaction protéine/ligand

Sites équivalents indépendants

Sites équivalents dépendants

Sites non équivalents

Chapitre 2 : Enzymologie moléculaire et dynamique

Notion du site enzymatique

Les isoenzymes

Les complexes multienzymatiques

Les enzymes allostériques

Chapitre 3 : Régulation de l'activité enzymatique

Chapitre 4 : Les principales enzymes cibles en pharmacologie

***Déroulement des TD:**

TD N°1 : Généralités sur les enzymes

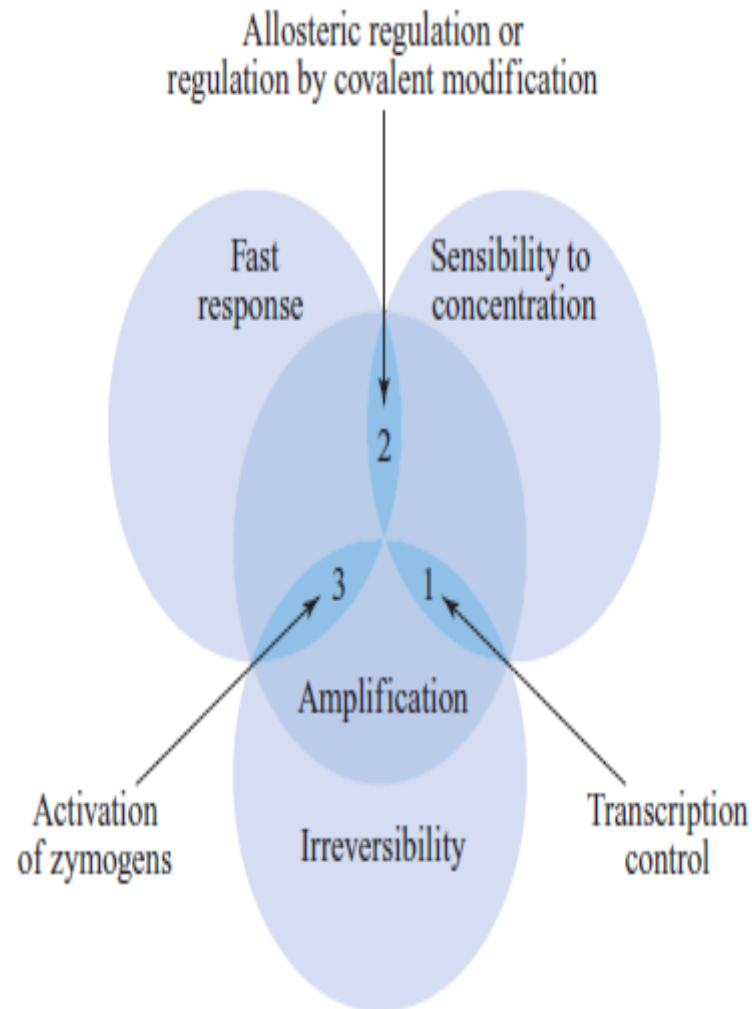
TD N°2 : Interaction protéine/ligand

TD N°3 : Isoenzymes et site enzymatique

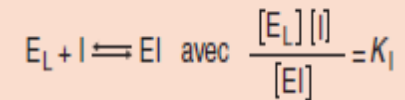
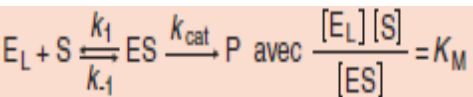
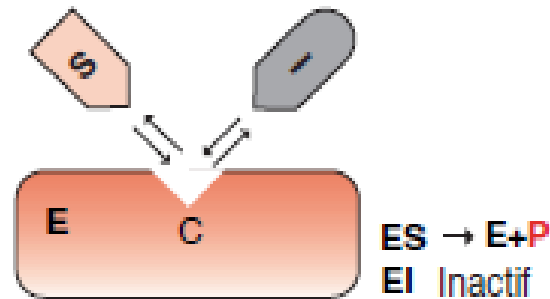
TD N°4 : Relations structure-fonction dans quelques systèmes enzymatiques

TD N°5 : Enzymes cibles en pharmacologie

Généralités



Inhibition compétitive des enzymes

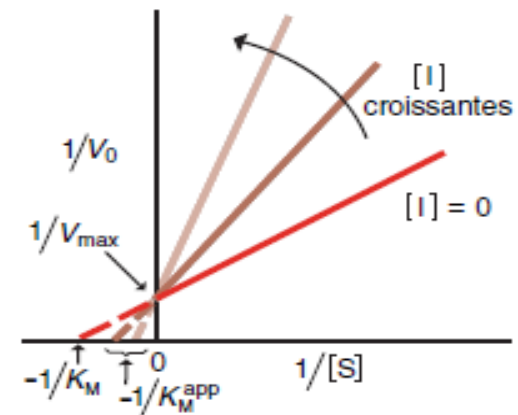
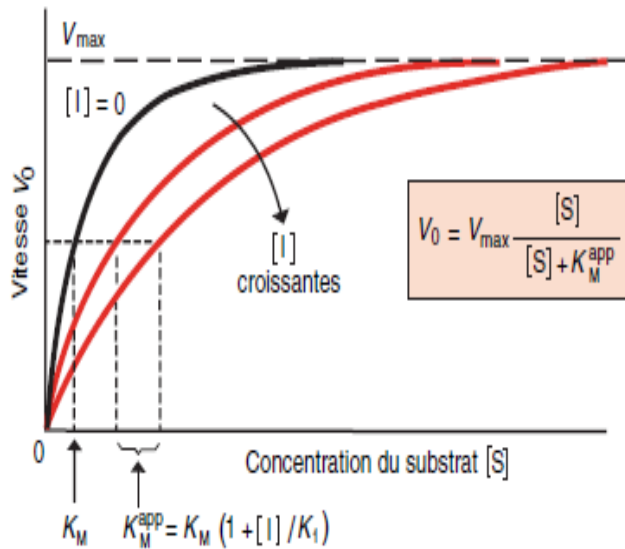


$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M^{app}} = k_{cat} [E_T] \frac{[S]}{[S] + K_M^{app}} \text{ où } K_M^{app} = K_M (1 + [I]/K_I)$$

Inhibition compétitive des enzymes

Régulation de l'activité enzymatique

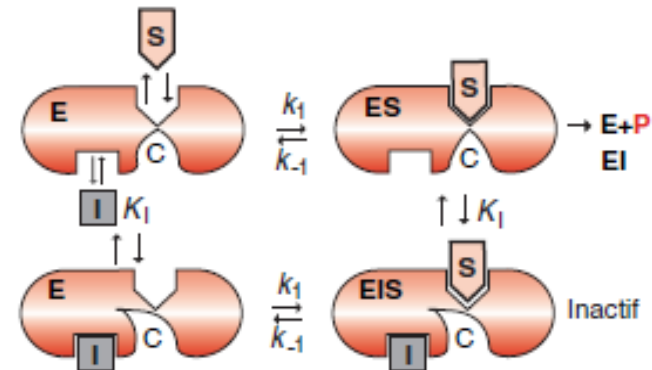
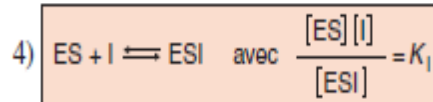
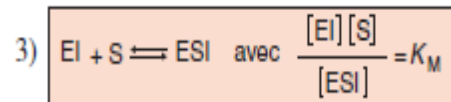
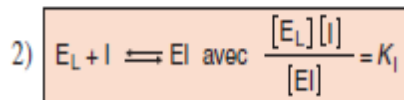
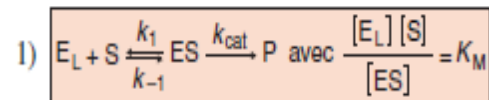
Inhibition compétitive des enzymes



Inhibition non compétitive des enzymes

Régulation de l'activité enzymatique

Inhibition non compétitive des enzymes



Ces équations sont identiques aux équations de Michaelis-Menten:

- V_{max} est remplacé par un V_{max}^{app}
- k_{cat} par un k_{cat}^{app} de valeur $k_{cat}/(1 + [I]/K_I)$.

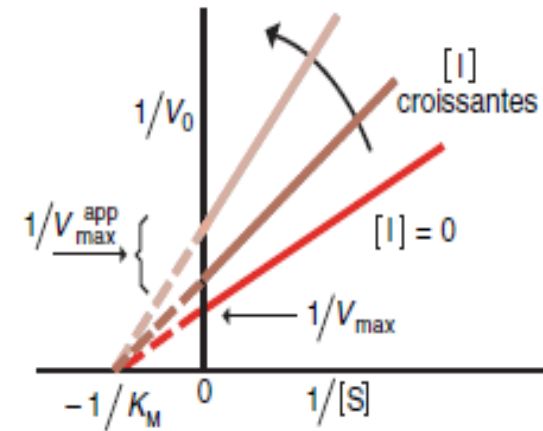
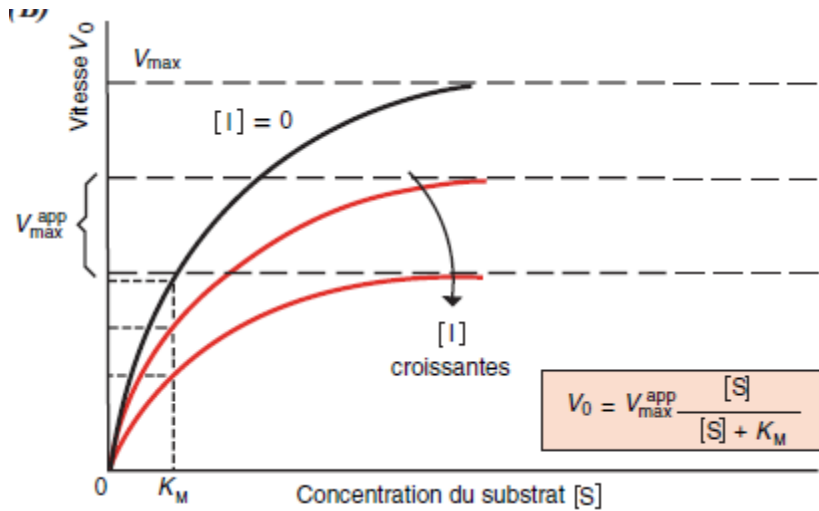


$$V_0 = V_{max}^{app} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} = k_{cat}^{app} [E_T] \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

$$V_{max}^{app} = k_{cat}^{app} [E_T] \quad \text{et} \quad k_{cat}^{app} = k_{cat} / (1 + [I]/K_I)$$

Inhibition non compétitive des enzymes

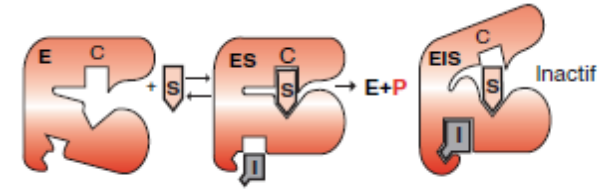
Régulation de l'activité enzymatique



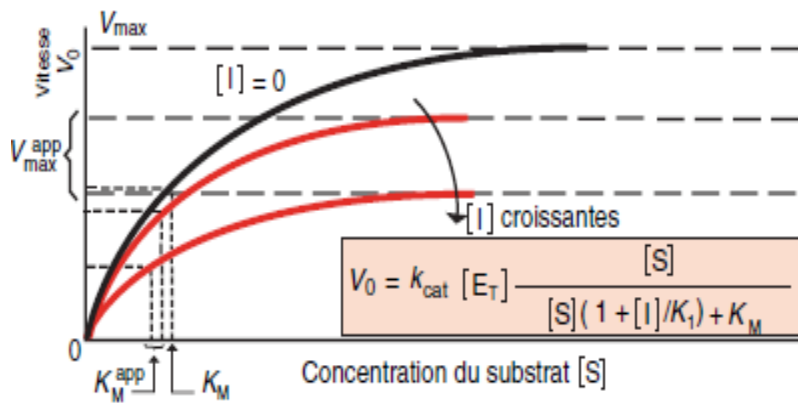
Inhibition incompétitive des enzymes

Régulation de l'activité enzymatique

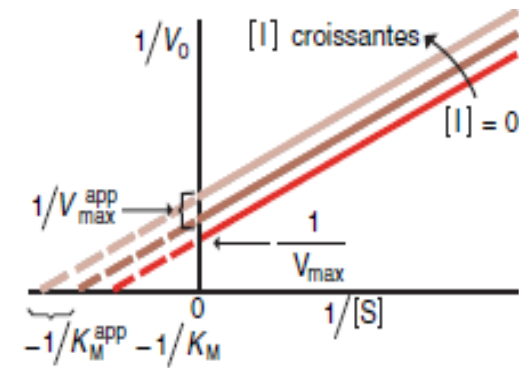
Inhibition incompétitive des enzymes



$$V_0 = k_{\text{cat}} [E_T] \frac{[S]}{[S] (1 + [I]/K_I) + K_M}$$



$$V_0 = k_{\text{cat}} [E_T] \frac{[S]}{[S] (1 + [I]/K_I) + K_M}$$

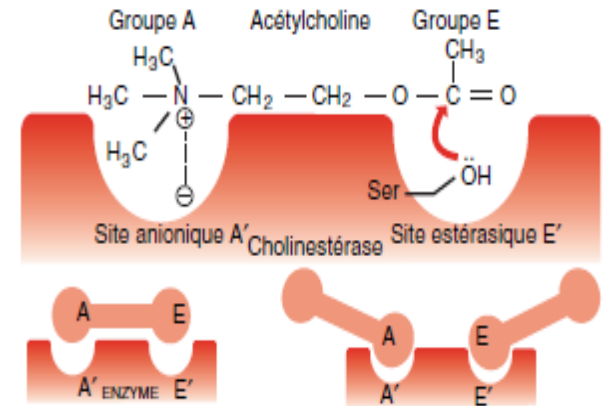
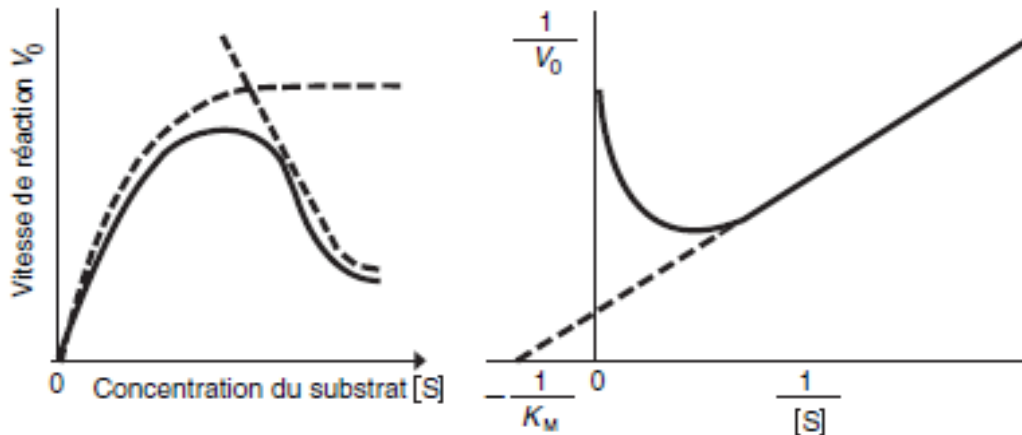


Pour des concentrations croissantes de I:
 Les droites sont parallèles \gggg des décroissances
 proportionnelles de K_M et de V_{max} .

Inhibition par excès de substrat

Régulation de l'activité enzymatique

Inhibition par excès de substrat



Dans le complexe actif, le substrat est lié par deux groupes de l'acétylcholine : (A), $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$, et (E), $\text{O}-\text{C}=\text{O}$, aux sites anionique (A') et catalytique (estérasique) (E') de l'enzyme, respectivement.

Régulation allostérique

Enzymes allostériques

Généralités

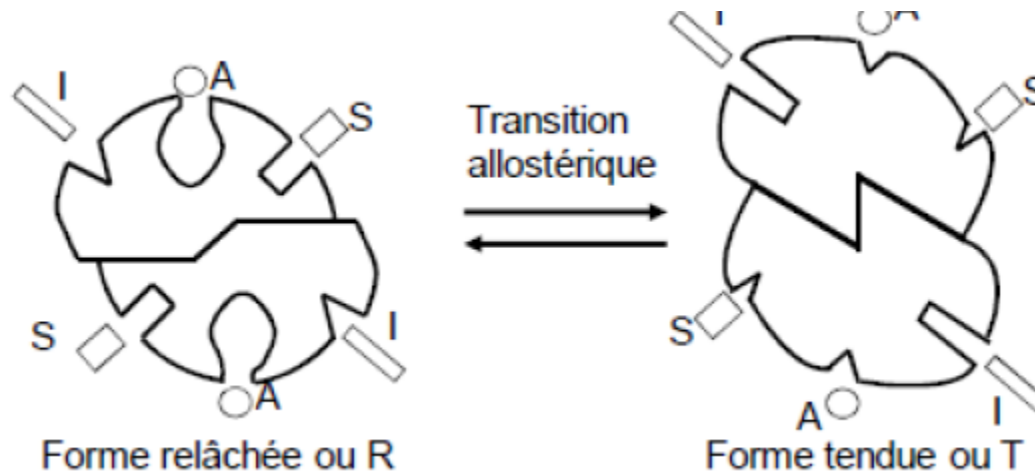
*Le terme allostérique vient du grec **allos**,
autre, et **stereos**, **forme**.

Les enzymes allostériques

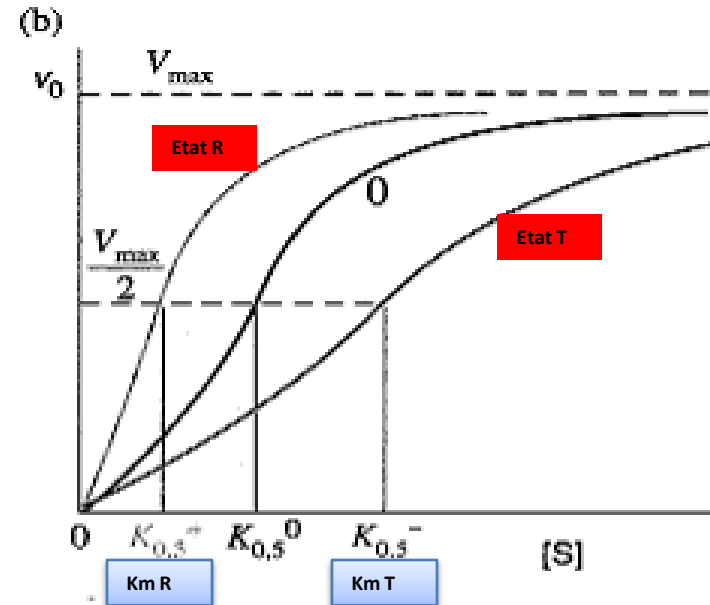
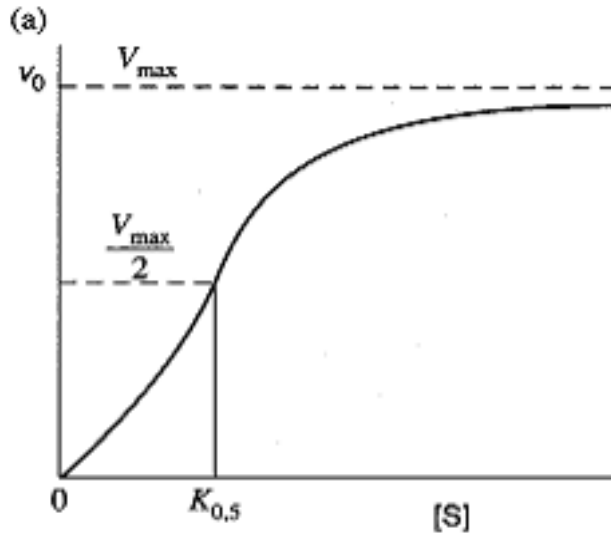
Modèle MWC des enzymes allostériques

- **T** (pour "Tense"), conformation "tendue", les sites de fixation ont une **affinité faible** pour un ligand donné.
- **R** (pour "Relax"), conformation "relâchée", les sites de fixation ont une **affinité forte** pour un ligand donné

Ces deux conformations sont en équilibre (quelle que soit la concentration d'un ligand donné) et cet équilibre est régi par la **constante allostérique L_0** :



Les enzymes allostériques



Coopérativité Allostérique

Il y aura coopérativité allostérique si la **complexation** d'un deuxième substrat est **améliorée par une interaction** (électrostatique, stérique ou conformationnelle) **entre les deux substrats**.

Les enzymes allostériques

Deux types d'effets allostériques :

- effets homotropes
- effets hétérotropes :

Allostérie	Exemple		
	Enzyme	ligand	Effet
Homotrope	Pyruvate kinase	PEP	positif
Homotrope	Alcool déshydrogénase	NADH	négatif
Hétérotrope	Pyruvate kinase	FDP	positif
Hétérotrope	Thréonine désaminase	isoleucine	négatif

Tableau 8.1. Principaux types d'allostérie et leurs effets

PEP : phosphoénolpyruvate, FDP : fructose-1,6-diphosphate, positif : activateur, négatif : répresseur.

Les enzymes allostériques

Exemple: L'hémoglobine (effet homotrope)

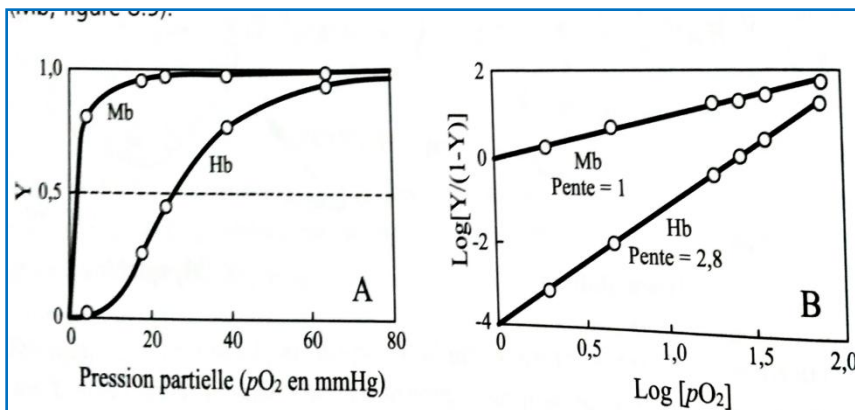
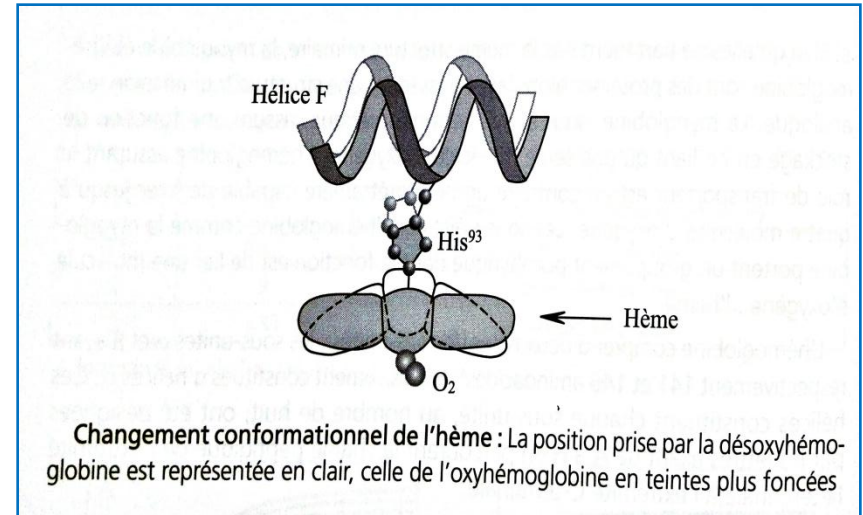
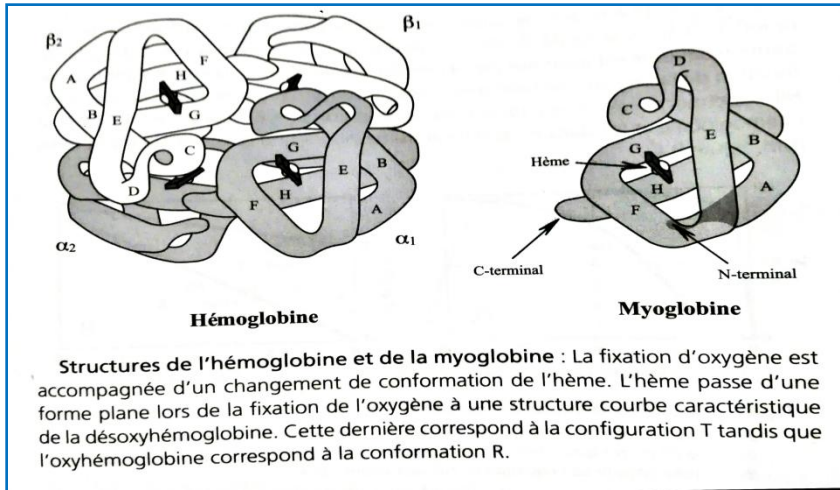


Figure 8.9. Courbes de fixation de l'oxygène

A : La fraction de saturation de la myoglobine (Mb) et de l'hémoglobine (Hb) en oxygène (Y) est portée en fonction de la pression partielle d'O₂ (pO₂) ; B : Application de la forme linéaire de l'équation de Hill aux valeurs de A.

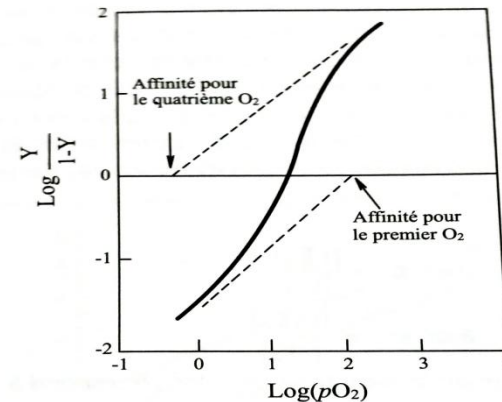
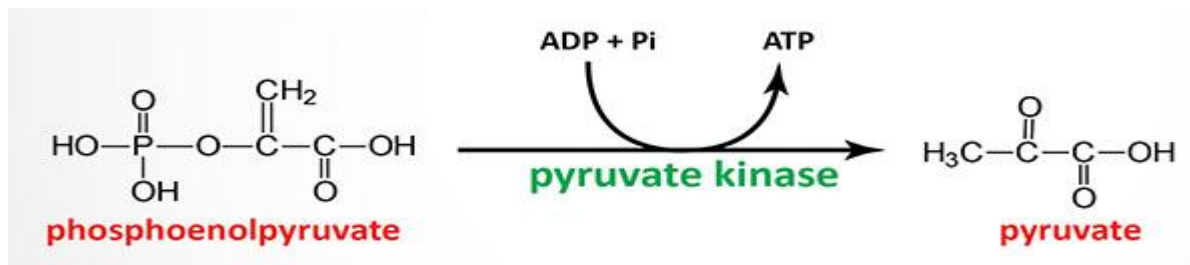
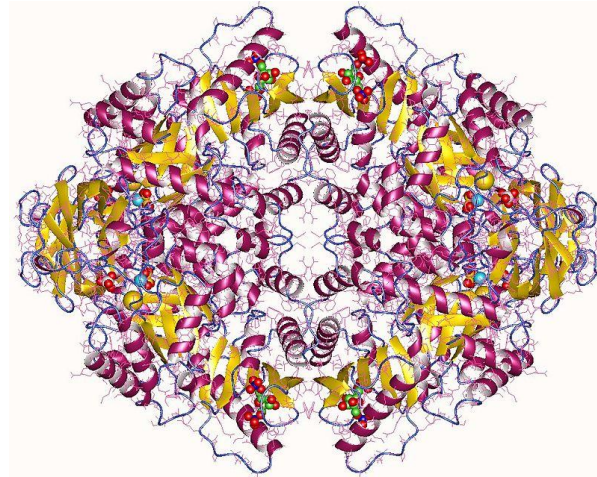


Figure 8.10. Représentation de Hill de l'hémoglobine

L'intersection de la tangente à l'asymptote avec le segment de droite positionné à $\log(Y/(1-Y)) = 0$ correspond à l'affinité de la première et de la quatrième liaison de l'oxygène à l'hémoglobine. Le rapport des affinités, supérieur à 100, indique qu'une première liaison de l'oxygène augmente l'affinité de l'oxygène pour les fixations suivantes.

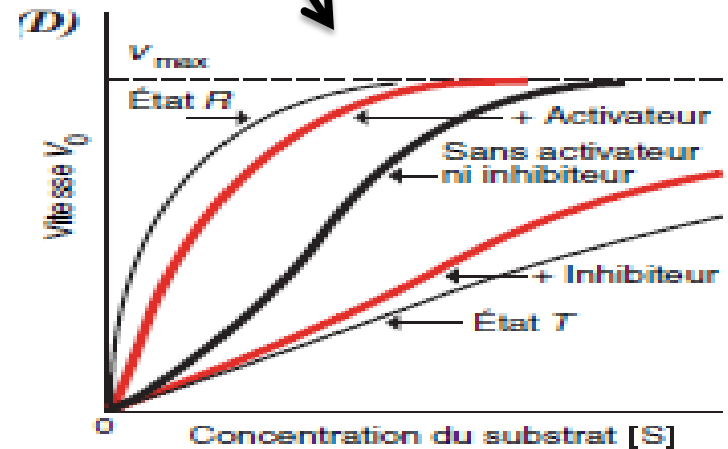
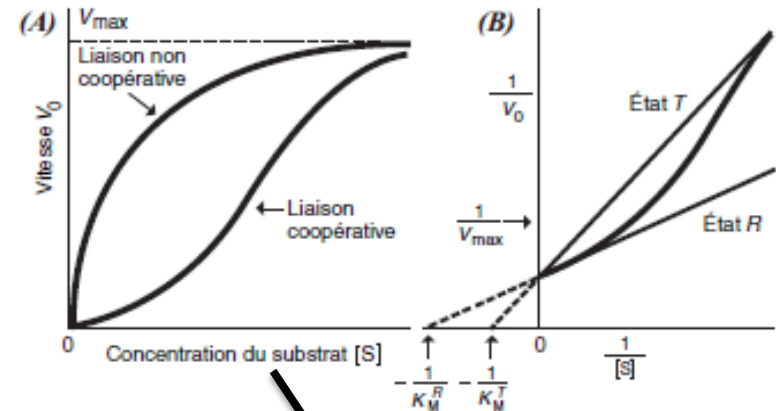
Les enzymes allostériques

Exemple d'étude: Pyruvate kinase



Régulation allostérique

Phénomène coopératif réversible



**L'activité des enzymes allostériques est gouvernée,

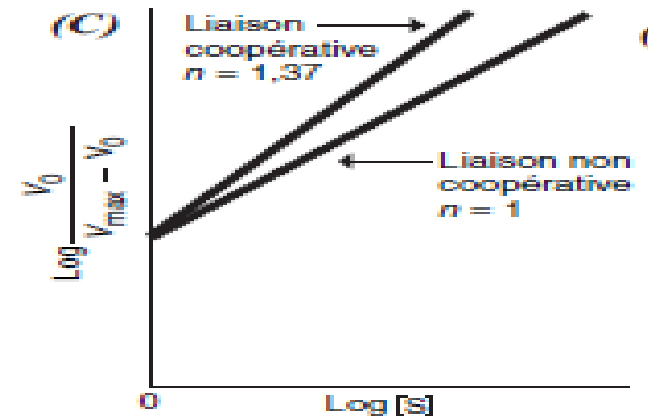
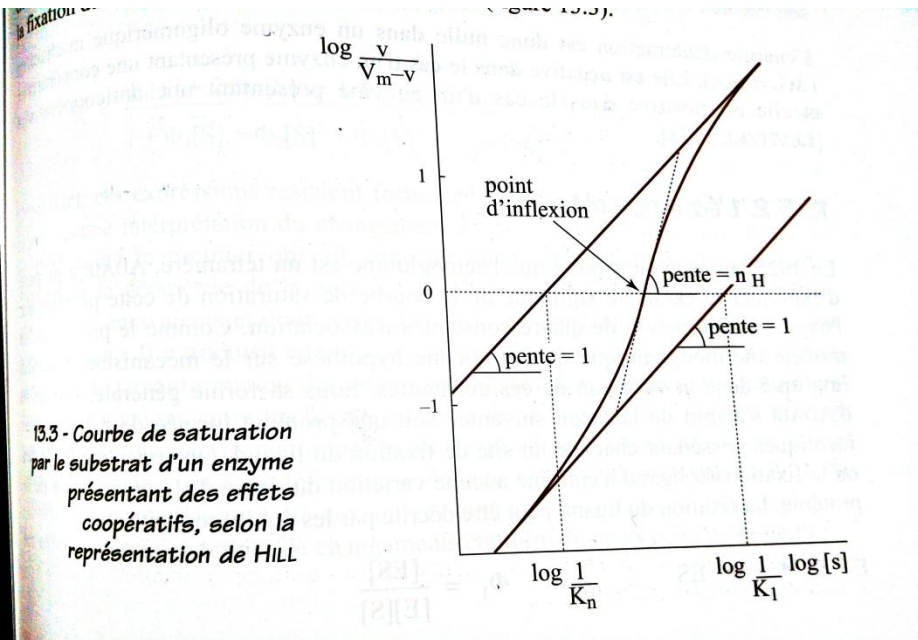
<<<Par la concentration de leurs substrats,

<<<<par celle d'autres métabolites qui souvent sont :

- des produits plus ou moins différents de ceux de la voie métabolique à laquelle ils participent
- ou d'une voie parallèle

Régulation allostérique

Aspect phénoménologique de la coopérativité



La représentation de Hill,

$\log (V_0/V_{\max} - V_0)$ est exprimé en fonction de $\log [S]$, **donne une courbe en S** dont la partie centrale est assimilable à une **droite de pente n**,

Les enzymes allostériques

✓ Représentation de Scatchard

n	$[S_{0,9}]/[S_{0,1}]$	Type
1	81	Pas de coopérativité (courbe hyperbolique)
0,5	6561	Coopérativité négative
2	9	Coopérativité positive
3	4,33	Coopérativité positive

Tableau 8.2. Calcul du rapport $[S_{0,9}]/[S_{0,1}]$ selon n

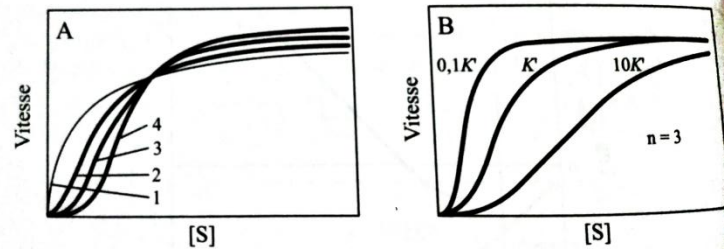


Figure 8.8. Effets du coefficient de Hill et de la constante K' sur les cinétiques

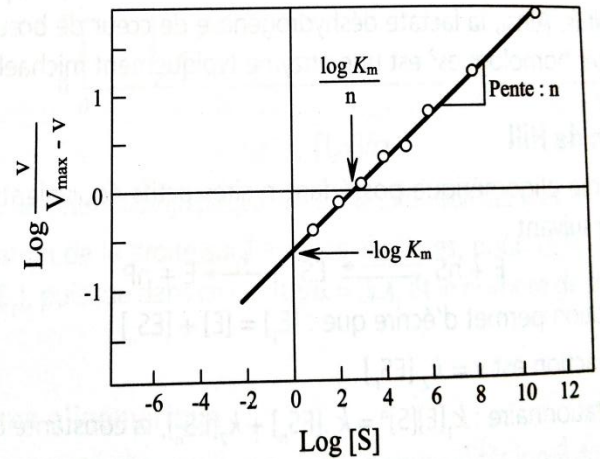


Figure 8.6. Détermination du nombre de Hill

Les enzymes allostériques

Exemple: La phosphofructokinase (PFK)

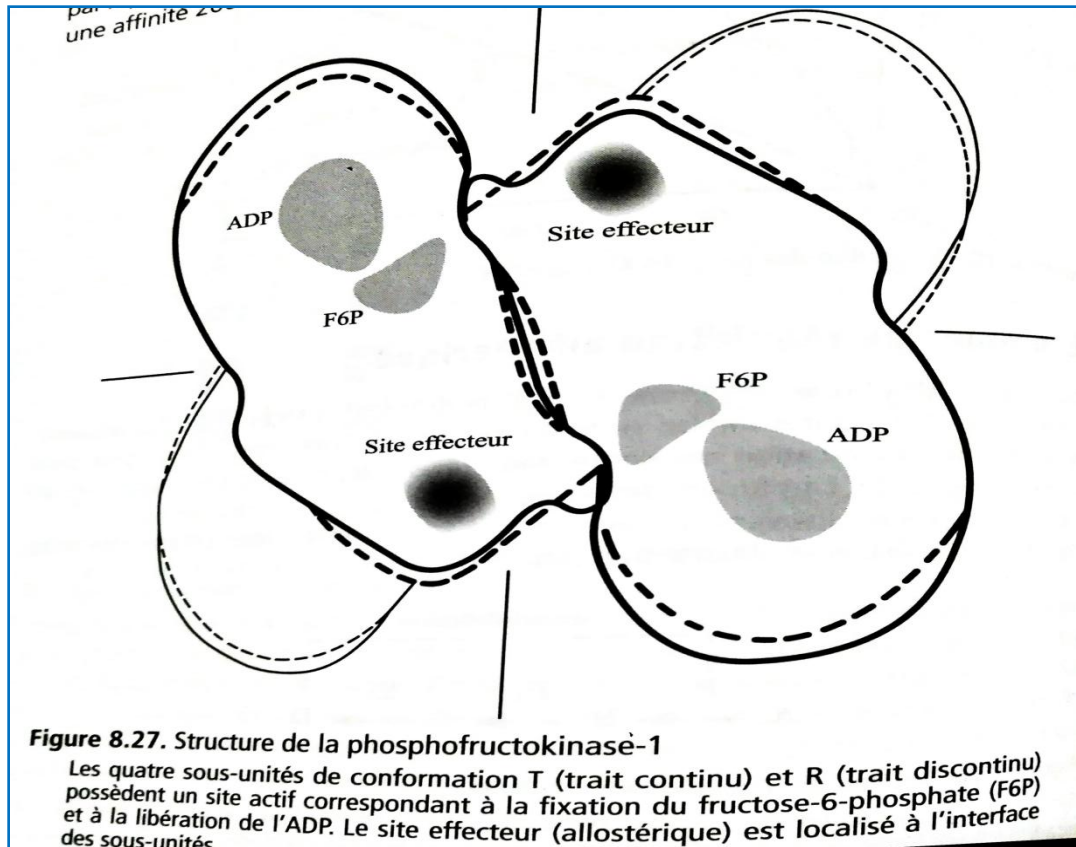


Cette réaction de phosphorylation constitue l'Étape 3 de la glycolyse, la voie de dégradation du glucose qui est une source importante d'ATP dans pratiquement toutes les cellules.

La réaction de la phosphofructokinase est inhibée par le phosphoénolpyruvate (un exemple **de rétro-inhibiteur**) lorsque sa concentration cellulaire est suffisamment élevée, il arrête sa propre synthèse en bloquant une étape plus précoce de la voie de biosynthèse.

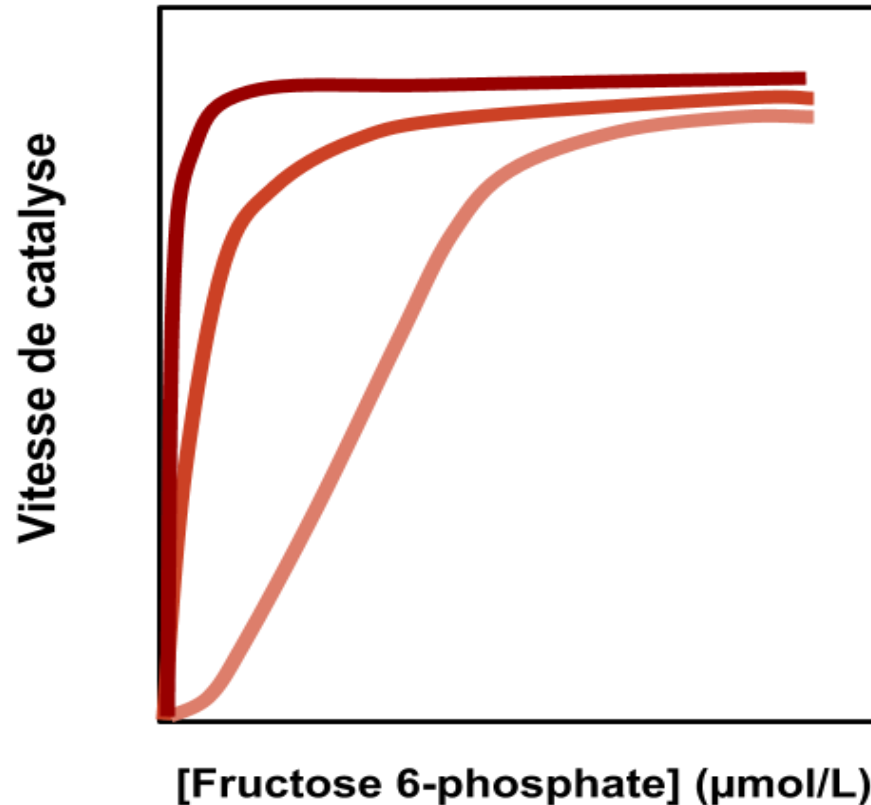
Les enzymes allostériques

Exemple: La phosphofructokinase (PFK)



Les enzymes allostériques

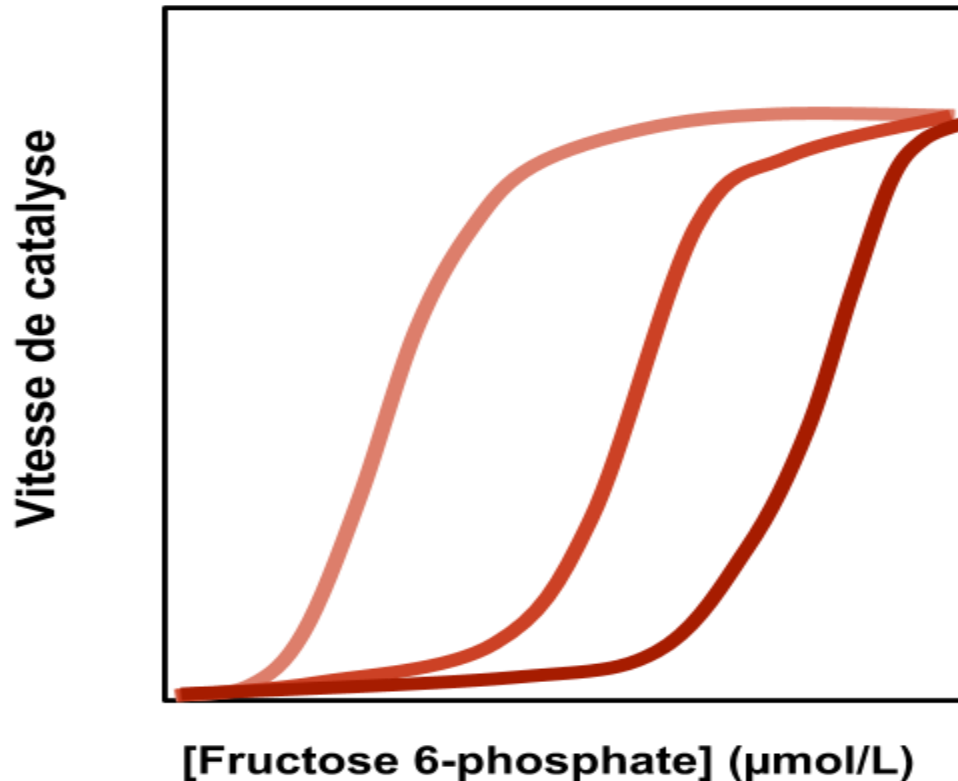
Activation allostérique par effet hétérotrope positif



- 1 µmol/L de fructose 2,6 biphosphate
- 0.1 µmol/L de fructose 2,6 biphosphate
- 0 µmol/L de fructose 2,6 biphosphate

Les enzymes allostériques

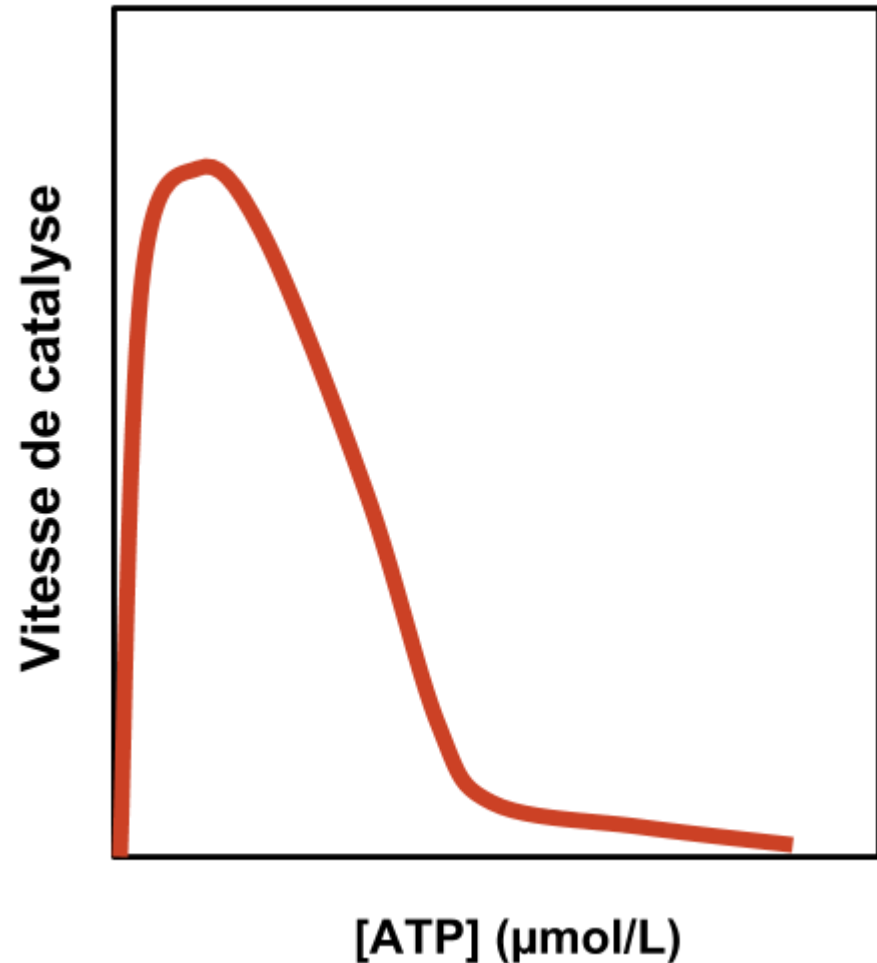
Inhibition allostérique par effet hétérotrope négatif



- 1 $\mu\text{mol/L}$ de citrate
- 0.1 $\mu\text{mol/L}$ de citrate
- 0 $\mu\text{mol/L}$ de citrate

Les enzymes allostériques

Inhibition allostérique par effet homotrope négatif



Régulation par interaction protéine-protéine

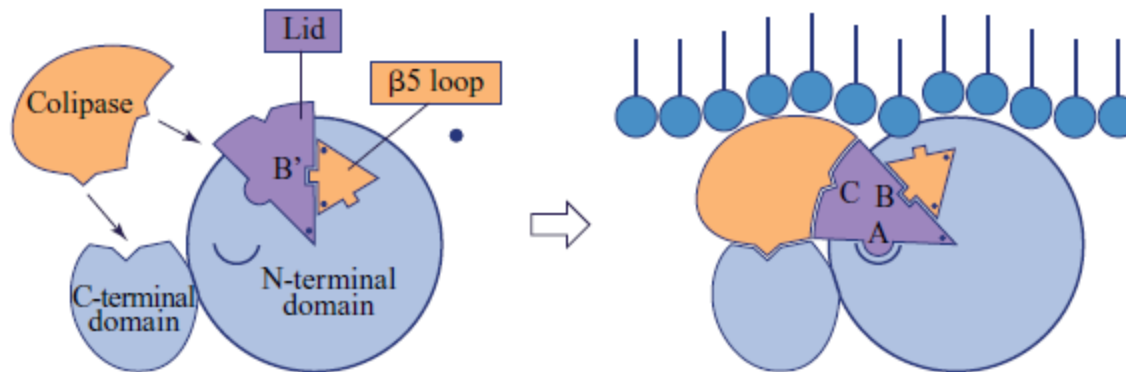


Fig. 13.53 Activation mechanism of the lipase

(Reprinted from *Protein Engineering, Design and Selection*, 7, CARRIÈRE F. et al., Structure-function relationships in naturally occurring mutants of pancreatic lipase, 563. © (1994) by permission of Oxford University Press)

Chapitre III

Régulation par modification covalente

Régulation par modification covalente

❖ **Modifications par protéolyse limitée : activation de précurseurs**

Il existe des enzymes sous forme de **précurseurs ou zymogènes**, qui doivent être activés par des clivages protéolytiques et la **libération d'un propeptide**.

Exemples:

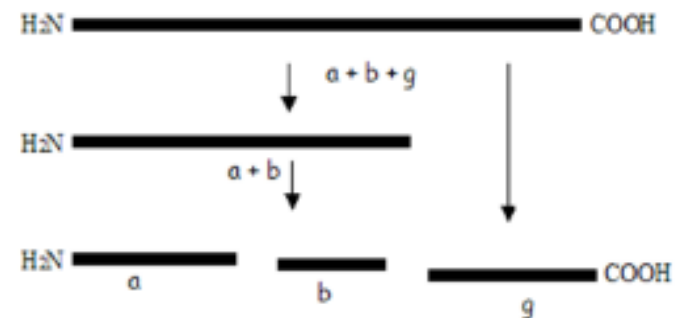
- ✓ Protéases à sérine,
- ✓ Protéases à trypsine,
- ✓ chymotrypsine,
- ✓ élastase,
- ✓ protéases de la cascade de la coagulation sanguine etc.

Régulation par modification covalente

Clivage de chaîne polypeptidique

*Acquisition d'une structure fonctionnelle :

Clivage du peptide signal :



SIGNAL-PEPTIDE

- Chaînon de quelques acides aminés (15 à 20) à l'extrémité N-terminale de la forme traduite de certaines protéines qui doivent être excrétées hors de la cellule.

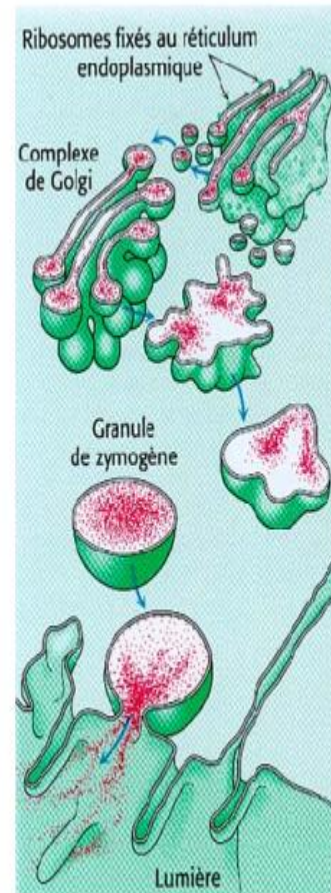
Chapitre III

Régulation par modification covalente

Régulation par modification covalente

Modifications par protéolyse limitée : activation de précurseurs

Les zymogènes:



Chymotrypsinogène
(inactif)

1 245



π -Chymotrypsine
(active)

1 15 16 245



α -Chymotrypsine
(active)

1 13 16 146 149 245

Chaîne A

Chaîne B

Chaîne C

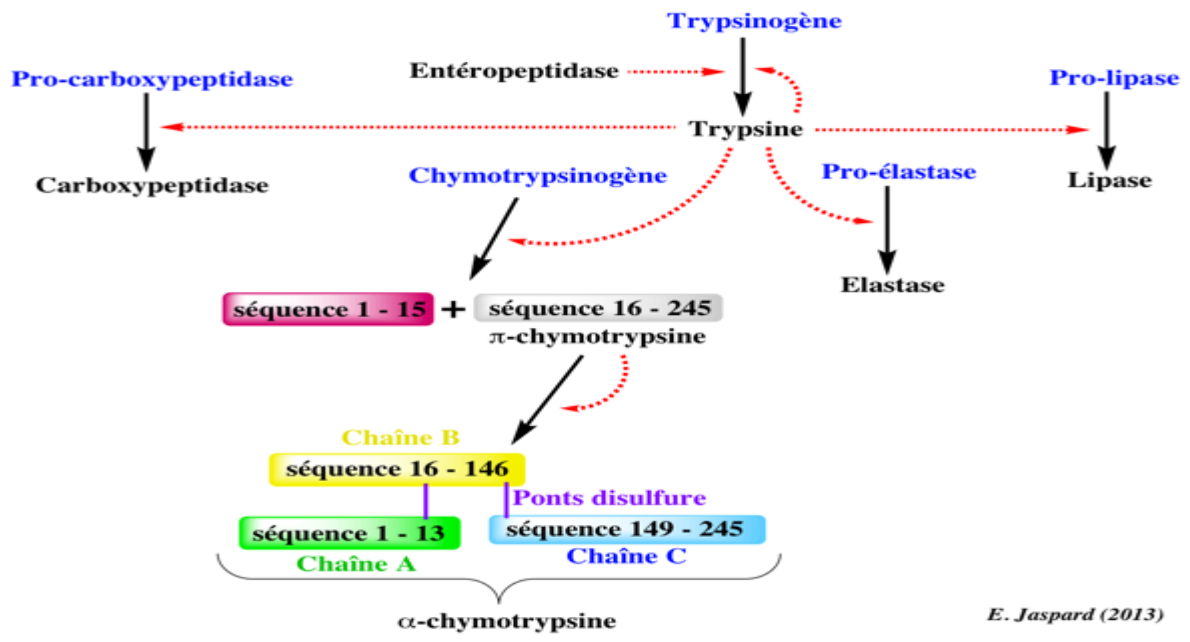
Deux dipeptides

Chapitre III

Régulation par modification covalente

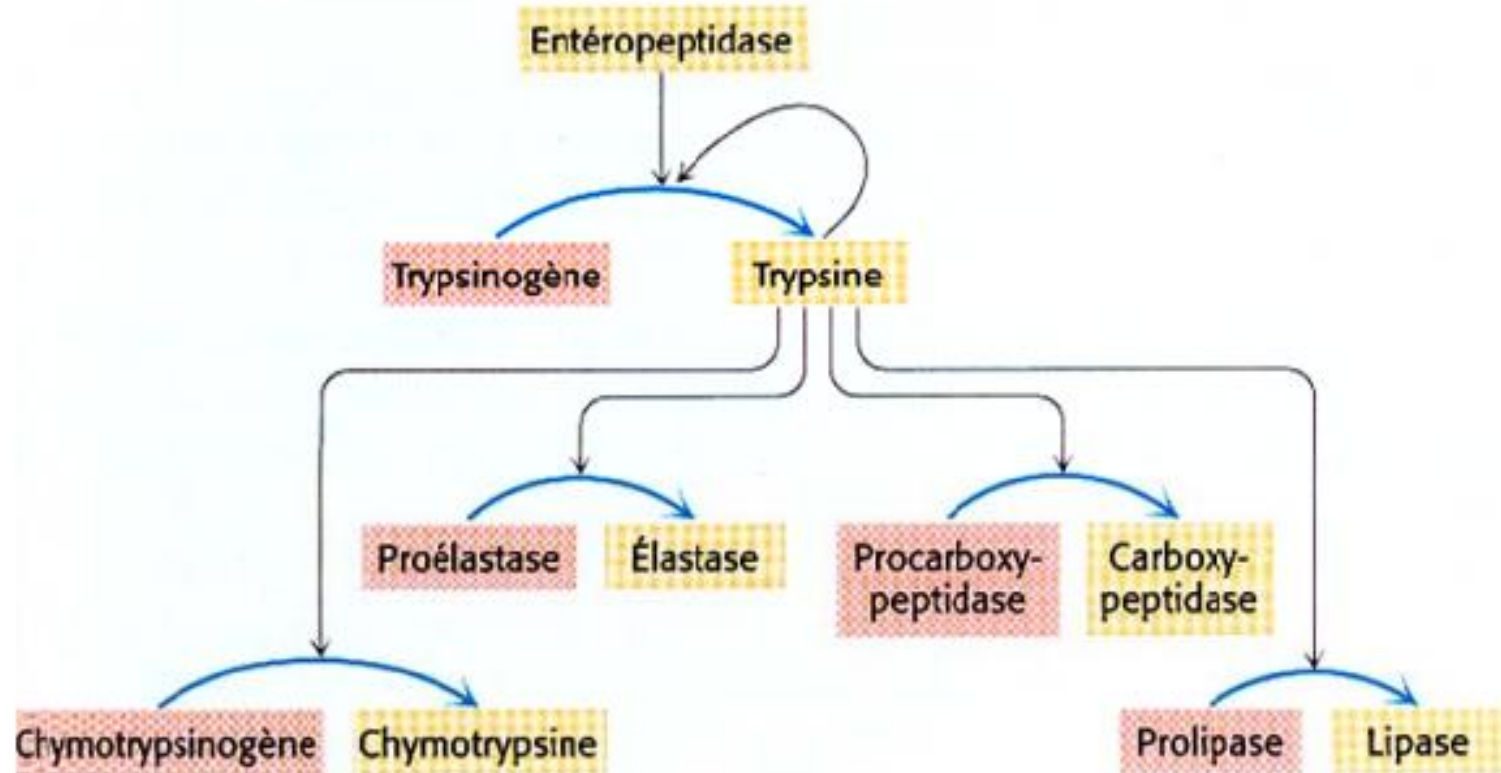
Modifications par protéolyse limitée : activation de précurseurs

Les zymogènes:



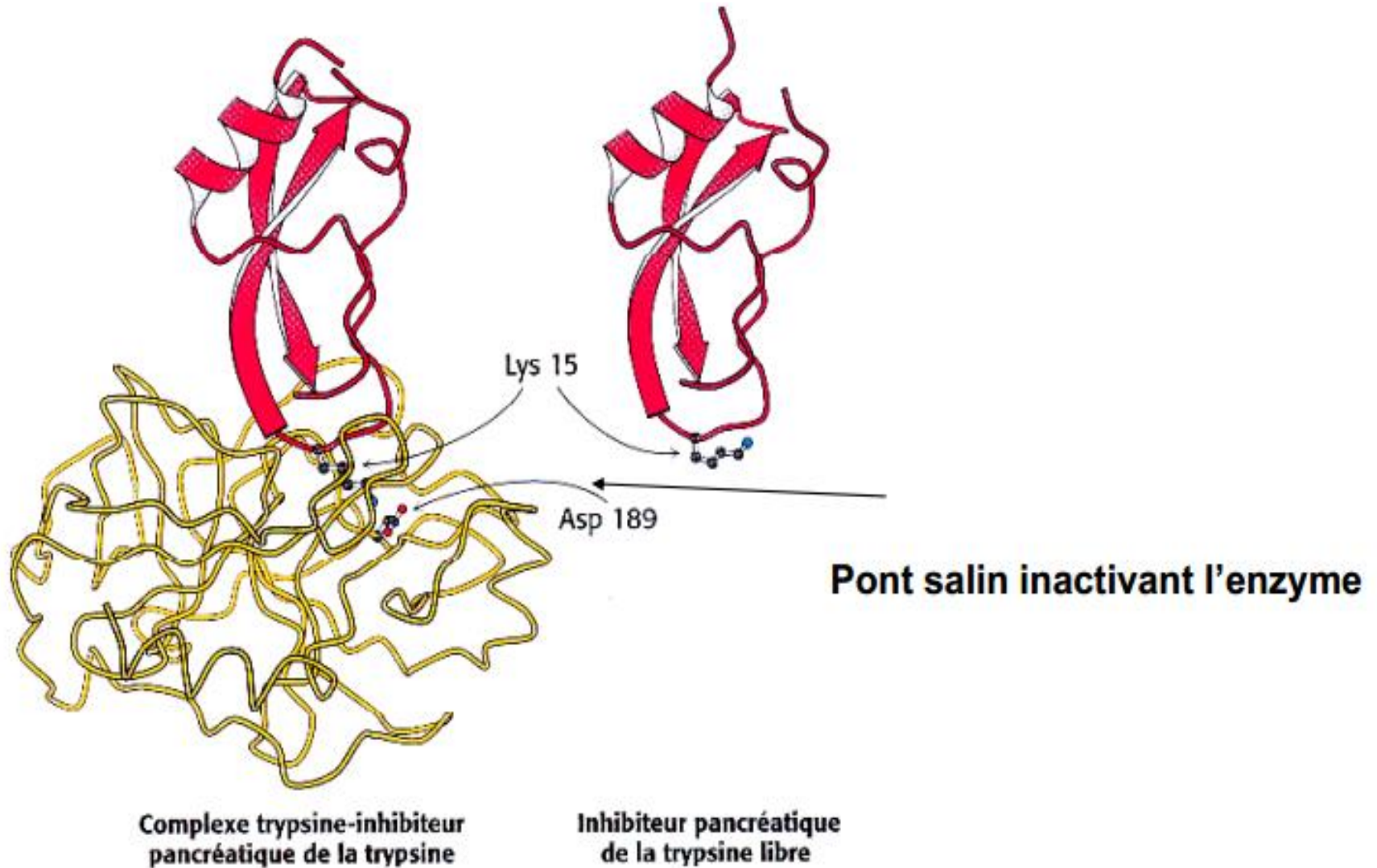
E. Jaspard (2013)

Régulation par modification covalente



Contrôle de la suractivité de la trypsine par l'inhibiteur pancréatique

Régulation par modification covalente



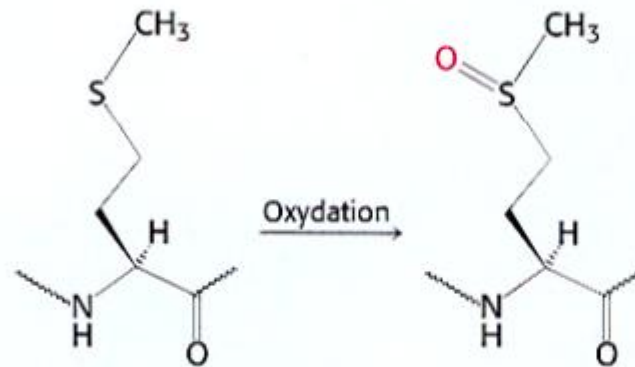
Régulation par modification covalente

α 1-antitrypsine (anti-elastase des neutrophiles)

Mutation type Z

homozygote : 15% d'inhibiteur résiduel : emphysème

hétérozygote : fumeur !!



Oxydation de la méthionine 358 en sulfoxyde : absence de reconnaissance de l'elastase par l'inhibiteur

Action du comportement humain sur la biochimie !!

Modifications covalentes courante

Modifications post-traductionnelles majeures

1. Clivage de chaine polypeptidique
2. Elimination d'acides aminés (Méthionine)
3. Acétylation, hydroxylation, biotinylation, sulfonation d'acides aminés
4. Glutamylaton et glycylation
5. Ubiquitinylation
6. Formation de ponts covalents
7. Ancrage lipidique
8. Glycosylations
9. Phosphorylation
10. Modifications accidentelles

ADP Ribosylations

méthylation

Chapitre III

Régulation par modification covalente

Régulation par modification covalente

❖ Régulation par modifications chimiques

Modifications post-traductionnelles des protéines – définitions

- La production de protéines par la cellule ne consiste pas seulement en une traduction de la séquence d'acide nucléique.
- Modifications chimiques ou biologiques intervenant après l'étape de polymérisation des acides aminés par le ribosome.
- Les modifications post-traductionnelles:
 - Permettent des modifications d'activité (inhibition, activation)
 - Ce sont des réactions catalysées la plupart du temps par des enzymes

Chapitre III

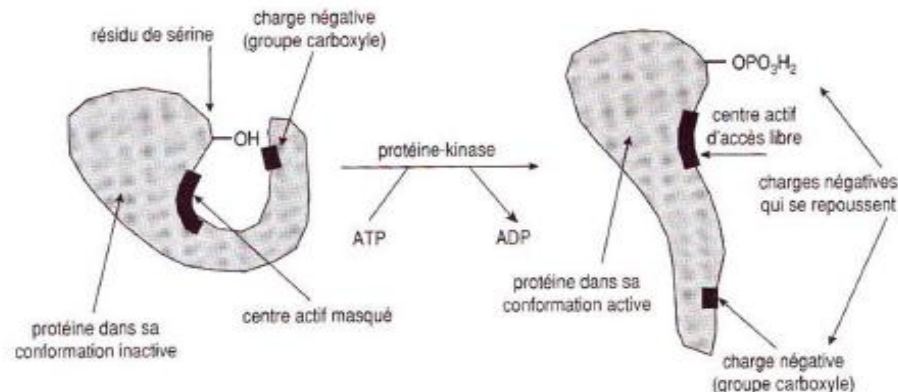
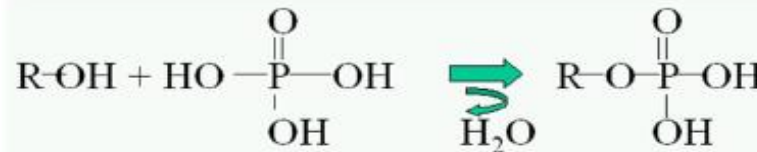
Régulation par modification covalente

Régulation par modification covalente

Régulation par modifications chimiques

Phosphorylation

Ajout d'un phosphate sur la sérine, la thréonine ou la tyrosine.
Important dans la transduction de signaux à travers les membranes.



(95%), thréonine (4%) Et tyrosine (1%) Conduisant à la formation d'une **liaison phosphoester**.

Chapitre III

Régulation par modification covalente

Régulation par modification covalente

Régulation par modifications chimiques

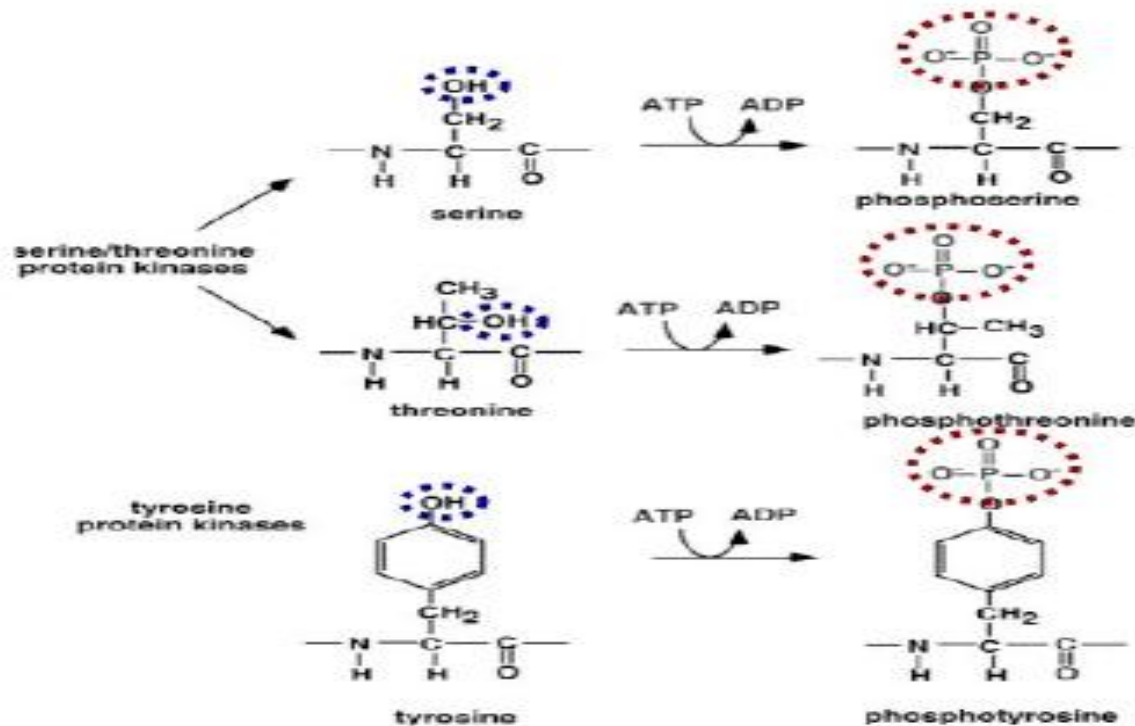


Fig: Réactions de phosphorylation sur la chaîne latérale des résidus : sérine, thréonine et tyrosine.

Chapitre III

Régulation par modification covalente

Régulation par modification covalente

Régulation par modifications chimiques

Phosphorylation : moyen très courant de réguler l'activité d'enzymes

550 protéines kinases chez l'homme

Transfert groupe phosphoryle en γ de l'ATP sur OH sérine, thréonine, tyrosine.

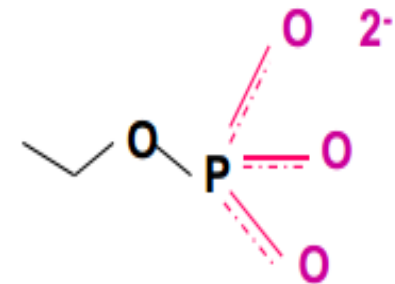
2 charges négatives ajoutées

3 liaisons hydrogènes

Apport de 24kJ/mol à la protéine phosphorylée :
modification de la constante d'équilibre

Rapide et stable

Amplification



Régulation par modification covalente

Régulation par modification covalente

Régulation par modifications chimiques

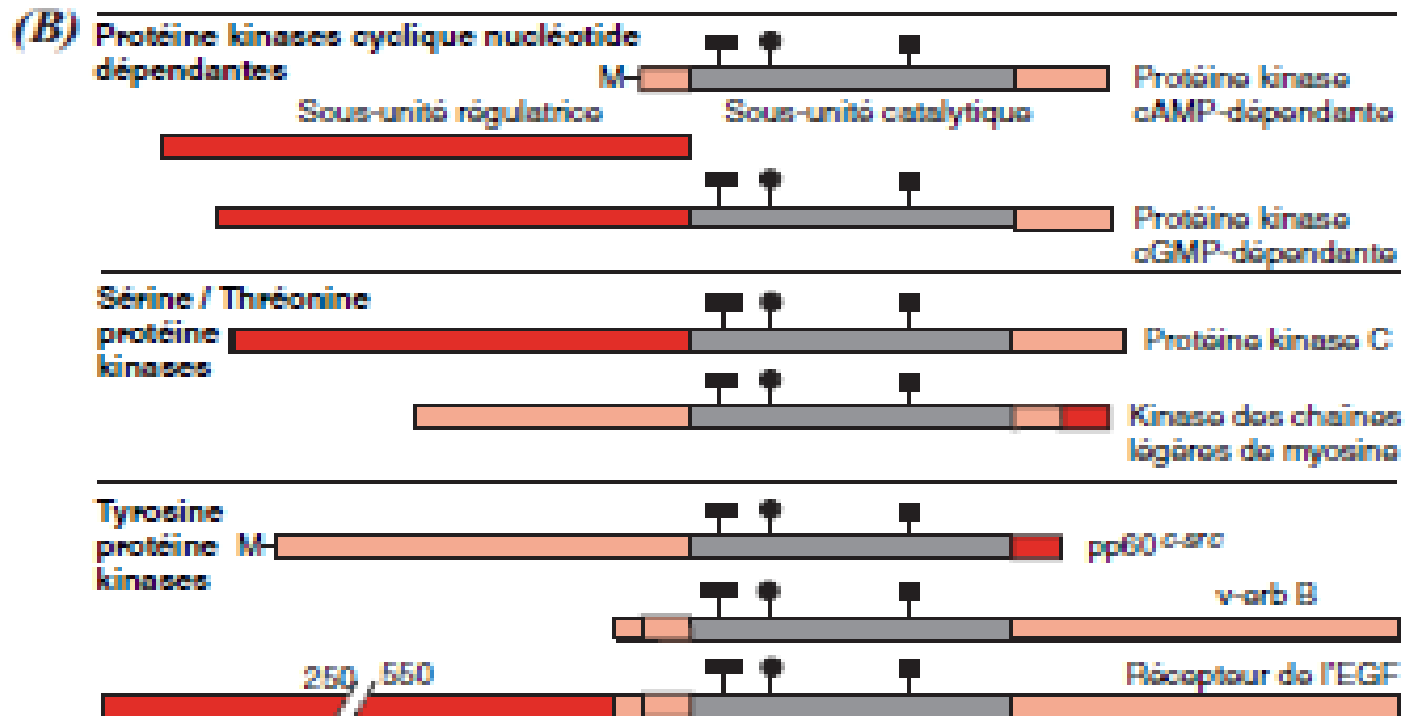
LES PROTÉINE KINASES

Les différentes kinases

- **Protein Kinase A, B, C**
 - Nombreux isoformes
- **MAP kinase (mitogen activated kinases)**
 - ERK (extracellular regulated kinase)
 - JNK (Jun regulated kinase)
 - P38 (SAPK2)
- **SrK (Stress regulated kinase)**
- **Cycline dépendantes kinases (CdK)**

Régulation par modification covalente

Protéine kinase cAMP-dépendante



Comparaison de la structure de quelques protéine kinases. Chaque kinase est schématisée par une structure linéaire où le core catalytique est représenté en gris et les parties régulatrices en rouge. Les résidus invariants du core catalytique : Asp184(■), Lys72(●) et les trois glycines : Gly55, Gly52 et Gly50(▲) sont alignés.

Régulation par modification covalente

Régulation par modification covalente

Régulation par modifications chimiques

Glycosylation

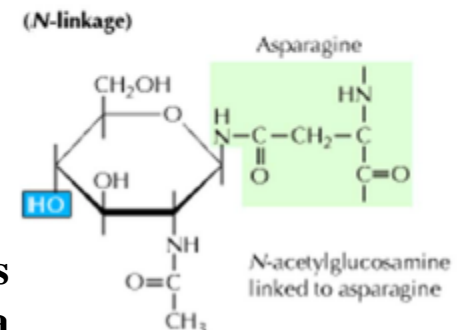
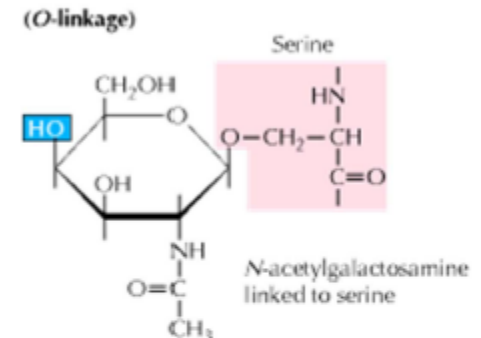
Glycosylation des protéines (1)

- N-glycosylation :
liaison amide entre une asparagine et un ose.
- O-glycosylation :
 - liaison osidique entre une sérine ou une thréonine et un ose.
 - Enzyme: oligosaccharyl transferase

Rôle de la glycosylation:

- Reconnaissance et adhésion cellulaire
- Contrôle du repliement des protéines
- Modulation métabolique d'enzymes
- Transport et adressage de protéines
- Rôle structural

*La glycosylation rend les polypeptides plus résistants à la protéolyse



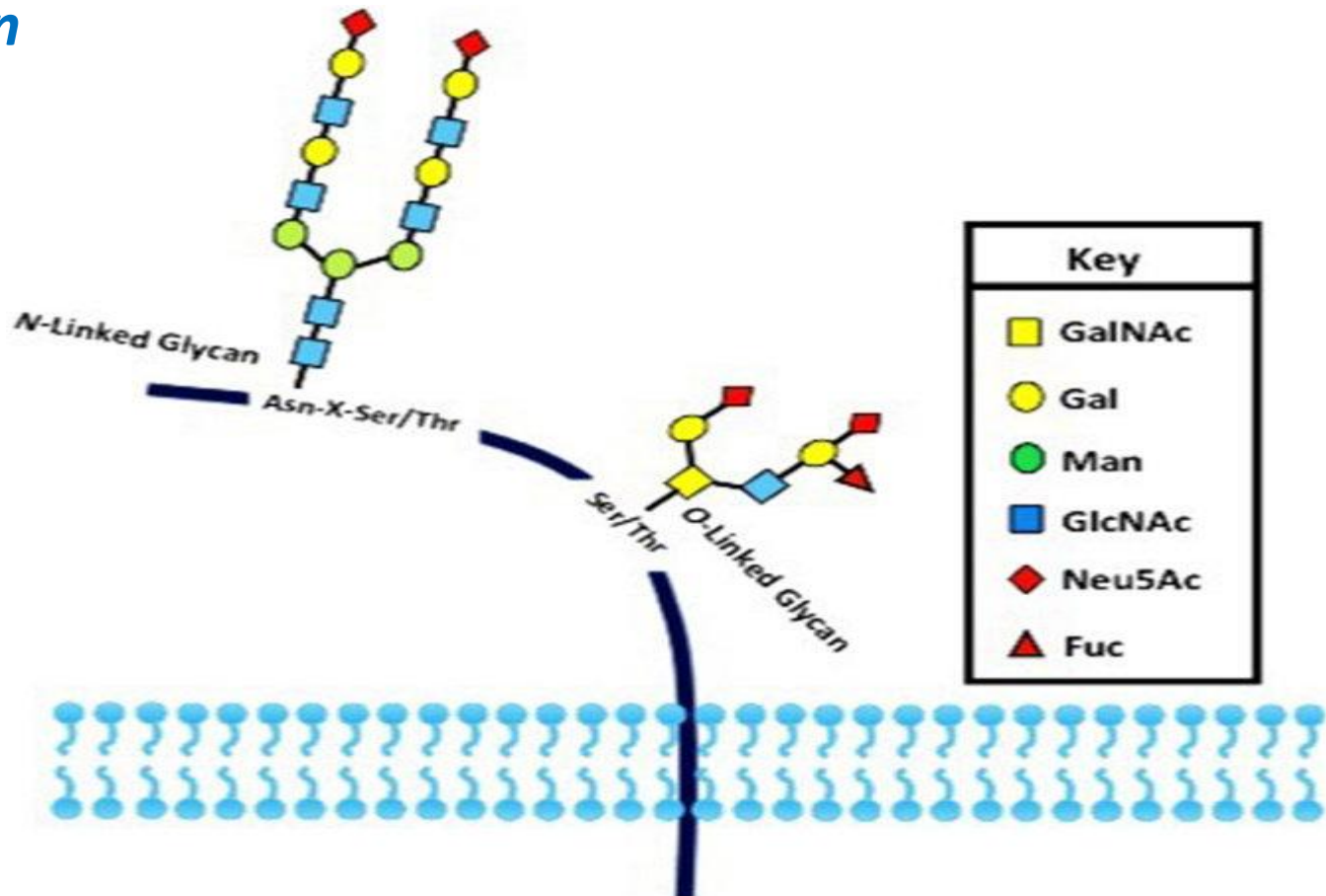
Chapitre III

Régulation par modification covalente

Régulation par modification covalente

Régulation par modifications chimiques

Glycosylation



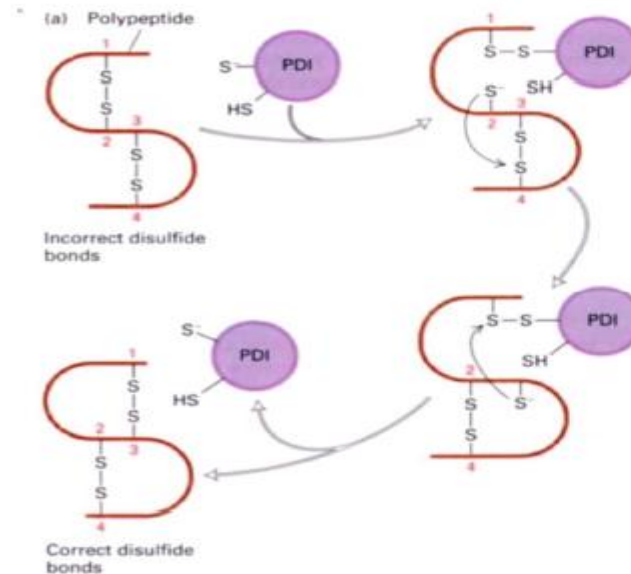
Chapitre III

Régulation par modification covalente

Régulation par modification covalente

Régulation par modifications chimiques

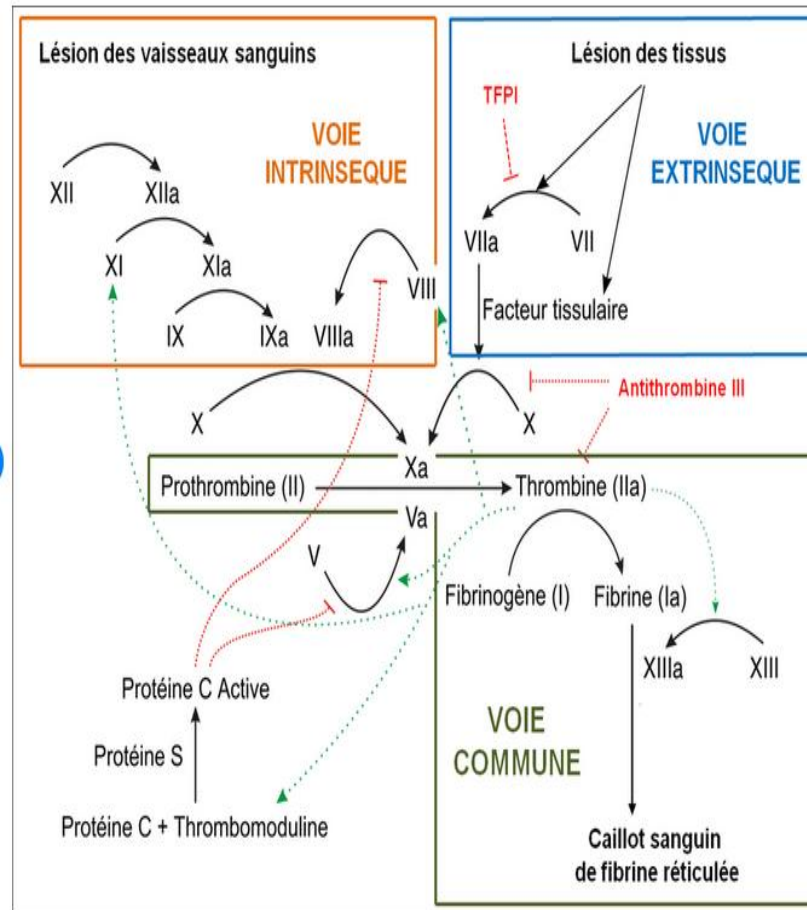
Formation de ponts covalents



Les ponts disulfures

Régulation par modification covalente

*Mécanismes d'action des systèmes Cascades



Régulation par modification covalente

*Mécanismes d'action des systèmes Cascades

