

Stage de Pré-Rentrée 2013

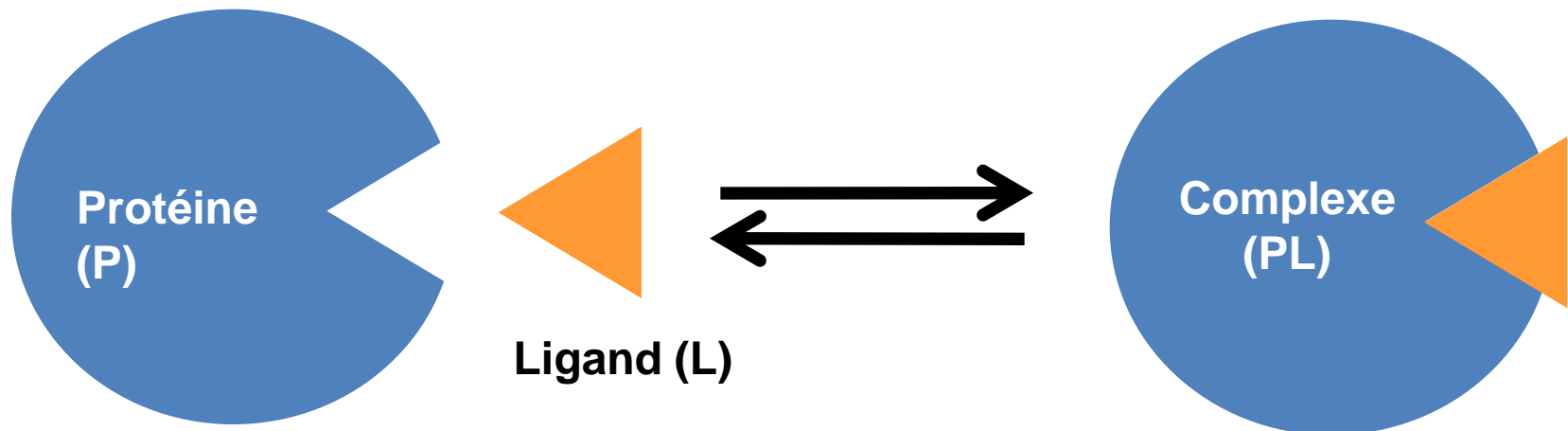
UE 1 – Enzymologie

Diaporama réalisé par les tuteurs de La Féd'





En biochimie, un **ligand** est une molécule capable de se fixer sur une protéine avec une certaine affinité.



L peut être : un ion, une petite molécule, une protéine plus petite, etc...

L'interaction est en général **réversible**.

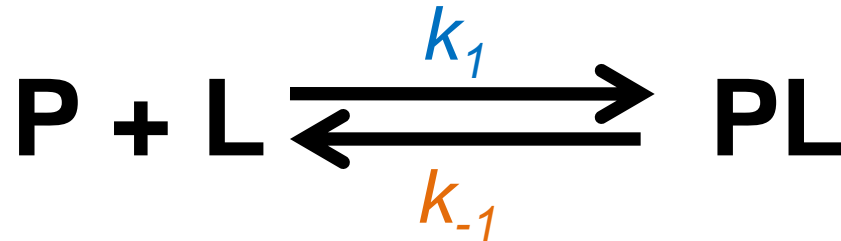
Elle fait intervenir des **liaisons faibles non covalentes**.

Elle peut être **michaëlienne** ou **allostérique**.

Par soucis de simplification, nous ne traiterons aujourd'hui que la michaëlienne.



Nous allons modéliser cette interaction



Exprimons :

- La vitesse d'apparition du complexe PL : $v_1 = k_1 \times [P] \times [L]$
- La vitesse de disparition du complexe PL : $v_{-1} = k_{-1} \times [PL]$

A l'équilibre, il se forme autant de complexes PL qu'il en disparaît

Alors on peut écrire : $v_1 = v_{-1}$

D'où l'égalité : $k_1 \times [P]_{eq} \times [L]_{eq} = k_{-1} \times [PL]_{eq}$



Définition de la constante de dissociation K_D

On définit K_D , la **constante de dissociation**.

Il s'agit d'une concentration (unité mol.L⁻¹)

K_D est un rapport de constantes de vitesse :

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Nous avons écrit :

$$k_1 \times [P]_{eq} \times [L]_{eq} = k_{-1} \times [PL]_{eq}$$

Nous en déduisons :

$$K_D = \frac{[P]_{eq} \times [L]_{eq}}{[PL]_{eq}}$$



Définition de la saturation Y

On définit Y, la **fraction de saturation** de la protéine.
Il s'agit d'une valeur entre 0 et 1, sans dimension.

$$Y = \frac{[PL]}{[P] + [PL]}$$

NB : La somme ($[P] + [PL]$) peut être notée P_0

Cherchons un moyen de déterminer Y en fonction de L_{eq} et de K_d



On sait que : $[P]_{eq} = K_D \times [PL]_{eq} \times [L]_{eq}^{-1}$

Alors, à l'équilibre :

$$Y = \frac{[PL]_{eq}}{K_D \times [PL]_{eq} \times [L]_{eq}^{-1} + [PL]_{eq}}$$

Après factorisation :

$$Y = \frac{\cancel{[PL]_{eq}}}{\cancel{[PL]_{eq}} (1 + K_D \times [L]_{eq}^{-1})}$$

On multiplie par $[L]_{eq} / [L]_{eq}$:

$$Y = \frac{[L]_{eq}}{[L]_{eq} + K_D}$$



Mettons-nous dans la situation où $Y = 0,5$ (protéine à moitié saturée).

$$0,5 = \frac{[L]_{0,5}}{[L]_{0,5} + K_D}$$

$$0,5 K_d = 0,5 [L]_{0,5}$$

$$K_d = [L]_{0,5}$$

Conclusion : K_D est la concentration en ligand pour laquelle la protéine est à moitié saturée.

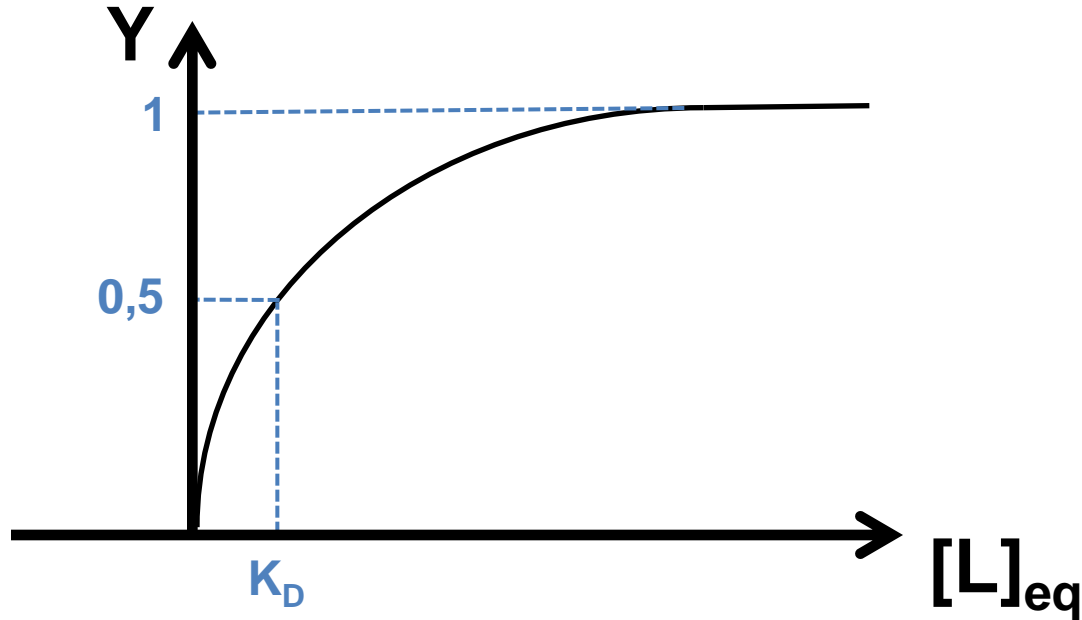
Corollaire : Si $K_d \nearrow$, l'affinité \searrow et inversement



$$Y = \frac{[L]_{eq}}{[L]_{eq} + K_D}$$

Il s'agit d'une fonction $Y = f([L]_{eq})$

de type $y = x/(a+x) \rightarrow$ **HYPERBOLE**



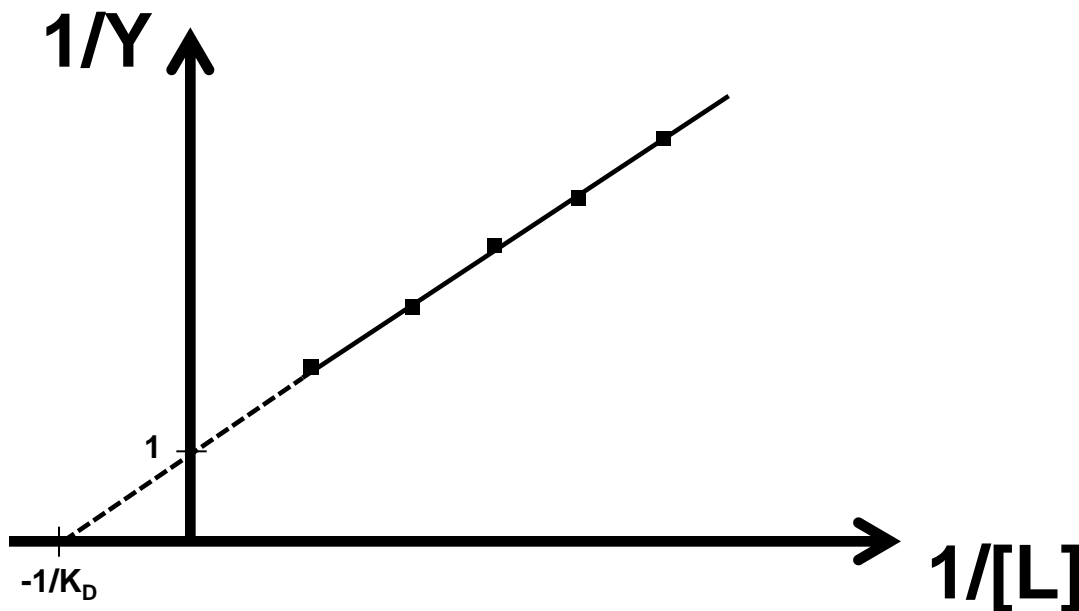


Linéarisation de $Y = \frac{[L]_{eq}}{[L]_{eq} + K_D}$

On inverse : $\frac{1}{Y} = \frac{[L]_{eq} + K_D}{[L]_{eq}}$

$\leftrightarrow \frac{1}{Y} = K_D \frac{1}{[L]_{eq}} + 1$

Équation de la forme : $y = a x + b$



Expérimentalement : on relève un nuage de points.

La détermination de K_D (pente de la droite) peut se faire par extrapolation mathématique.

En effet, la droite extrapolée coupe l'axe des abscisses au point $(1/[L]) = (- 1/K_D)$



Exercices

Répetons ensemble les deux formules que vous devez connaître par cœur :

- Expression de K_D .
- Expression de Y (en fonction de $[L]$ et K_D).

Une immunoglobuline interagit avec un antigène.

La constante de dissociation (K_D) de cette interaction est de $10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$

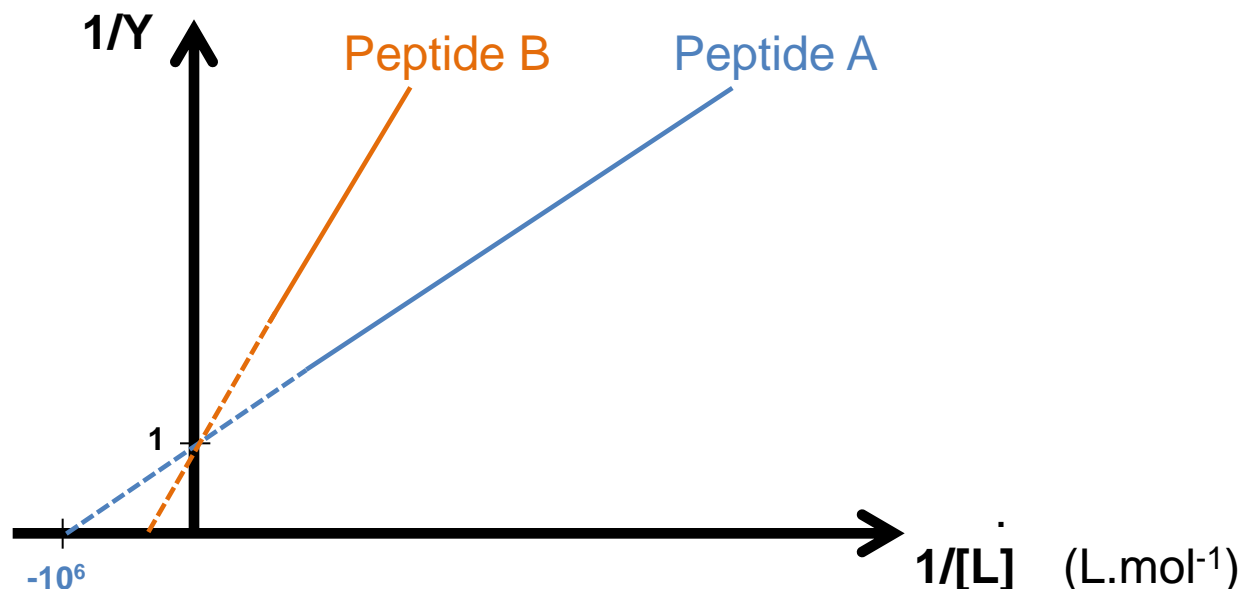
- Par quels types de liaisons pourraient se faire cette interaction ?
- Quelle est la signification biochimique de K_D ?
- Que vous inspire une telle valeur ?



Exercices Deux peptides (A et B) interagissent avec un ion Ca^{2+} .

- Quels résidus pourraient probablement être engagés dans la liaison avec Ca^{2+} ?

On relève pour chacun $1/Y$ en fonction de $1/[L]$.

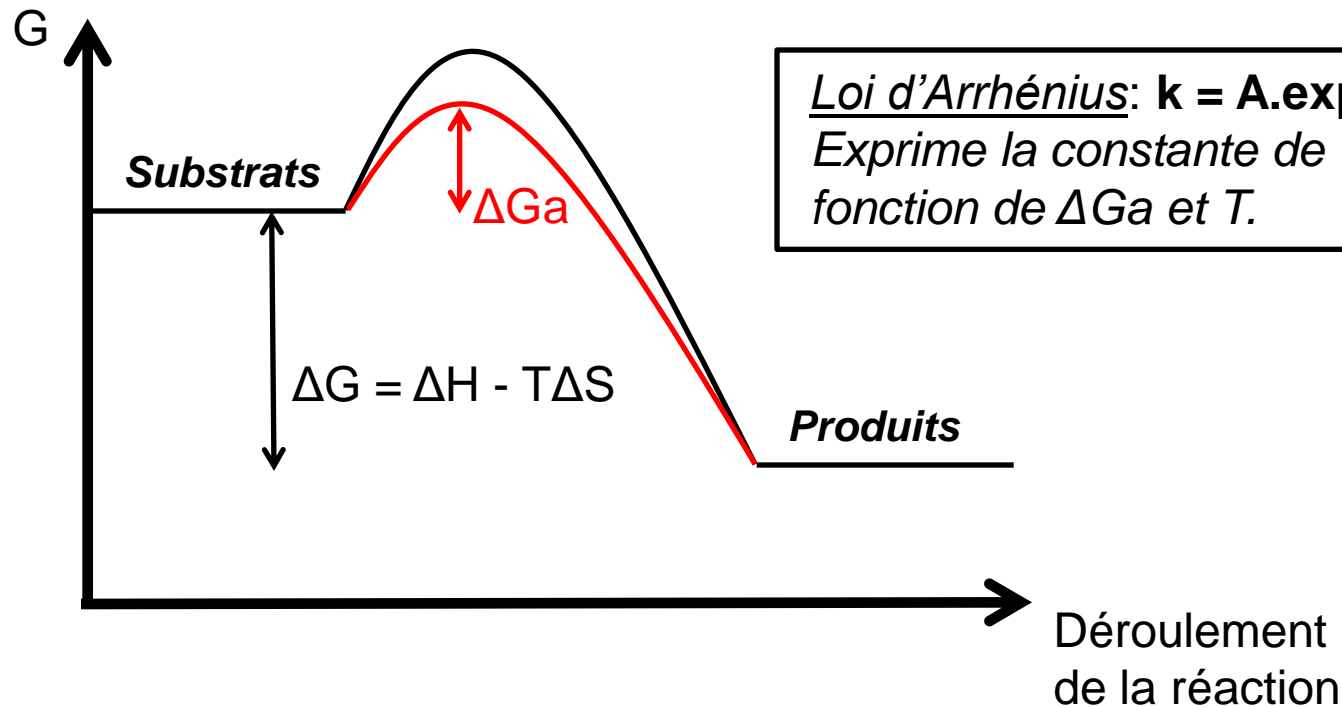


- Rappeler l'expression mathématique des deux droites ci-dessus.
- A vue d'œil, quel est le peptide le plus affiné pour le calcium ?
- Déterminer le K_D du peptide A.



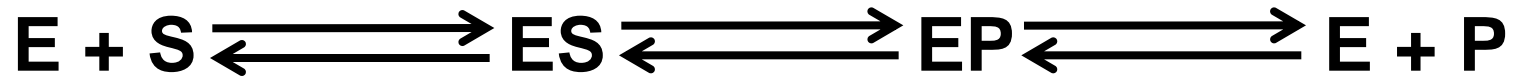
Les enzymes sont des **catalyseurs** de nature **protéique** (le plus souvent). Elles permettent d'accélérer considérablement les réactions chimiques du vivants, et ce **dans les deux sens** si la thermodynamique le permet.

L'enzyme prend en charge un **substrat** et accélère sa transformation en diminuant l'énergie d'activation (ΔG_a) de la réaction.





Modélisation de la relation enzyme-substrat

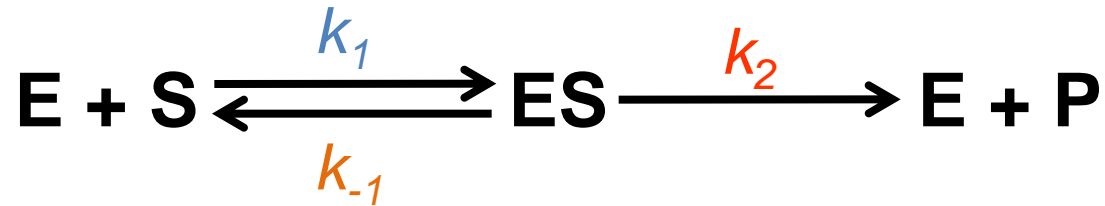


Simplification de Michaelis-Menten



Arguments :

- Les constantes de vitesse de l'étape $ES \leftrightarrow EP$ sont très grandes (très rapide)
- Le flux métabolique suppose l'irréversibilité de la transformation.



A l'équilibre, il se forme autant de complexe ES qu'il en disparaît :

$$v_1 = v_2 + v_{-1}$$

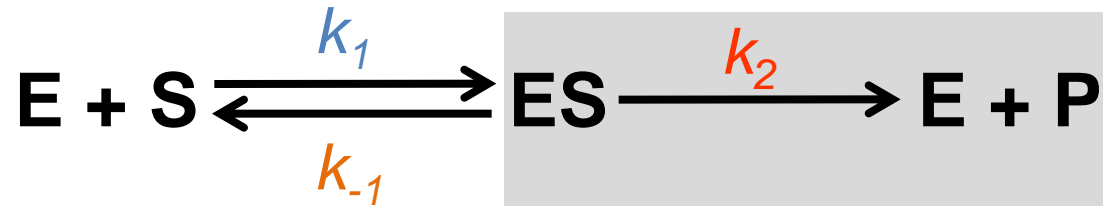
$$k_1 \times [E] \times [S] = k_2 \times [ES] + k_{-1} \times [ES]$$

$$k_1 \times [E] \times [S] = [ES] \times (k_2 + k_{-1})$$

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

K_M = constante
de Michaelis

Unité : mol.L⁻¹



k_2 est la constante de vitesse de l'étape cinétiquement limitante.

On peut donc écrire :

$$v = k_2 \cdot [ES]$$

[ES] peut au maximum atteindre $[E_0]$ (*Enzyme totale, saturée*)

Dans ces conditions, $v = V_m$:

$$V_M = k_2 \cdot [E_0]$$

et donc

$$\frac{v}{V_M} = \frac{[ES]}{[E_0]} = Y$$



$$\frac{v}{V_M} = \frac{[ES]}{[E] + [ES]}$$

Or $[E] = K_M \times [ES] \times [S]^{-1}$

$$\frac{v}{V_M} = \frac{[ES]}{[ES] (1 + K_M \times [S]^{-1})}$$

On multiplie par $[S]/[S]$:

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

Conclusion :

$$v = \frac{V_M \times [S]}{K_M + [S]}$$

v rend compte de $[S]$ et de :

← La vitesse maximum

← L'affinité pour le substrat



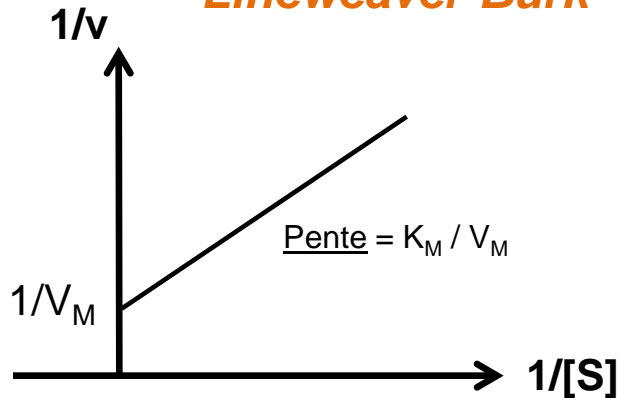
$$v = \frac{V_M \times [S]}{K_M + [S]}$$

Graphe direct = Hyperbole

On inverse

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_M} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_M}$$

Lineweaver-Burk



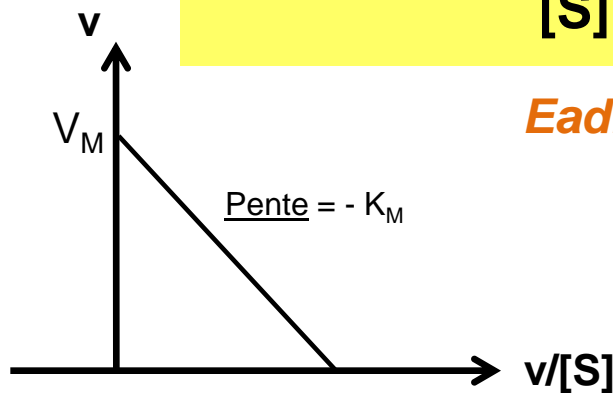
1) Produit en croix

$$v \cdot K_M + v \cdot [S] = V_M \cdot [S]$$

2) On divise par [S]

$$v = (-K_M) \times \frac{v}{[S]} + V_M$$

Eadie-Hofstee



**Exercices**

Par quel mécanisme une enzyme accélère-t-elle la vitesse d'une réaction ?

Rappeler la simplification de Michaelis-Menten.

QCM : La vitesse d'une réaction enzymatique est égale à $v = (1/4) \cdot V_M$ lorsque la concentration en substrat est de $3 \cdot 10^{-5}$ M.

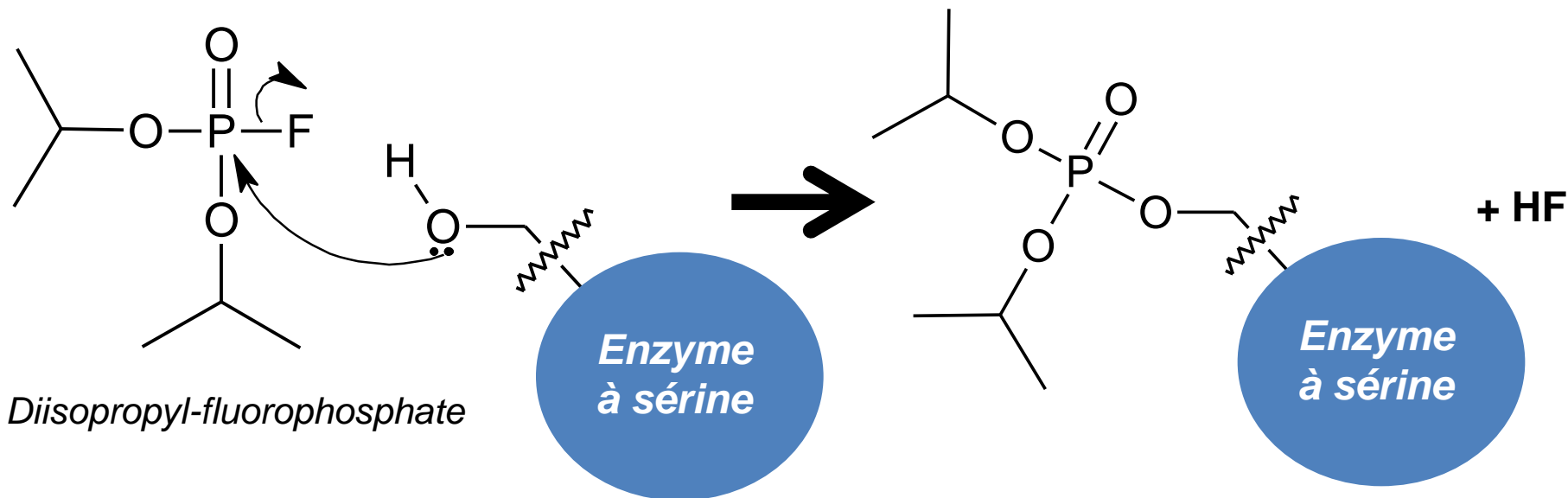
- A. $K_M = 10^{-5}$ M
- B. $K_M = (3/4) \cdot 10^{-5}$ M
- C. $K_M = 9 \cdot 10^{-5}$ M
- D. K_M correspond à la concentration en substrat pour laquelle $v = V_M / 2$
- E. K_M correspond à la concentration en substrat pour laquelle $[E] = [ES]$



1) Inhibition irréversible

- **Agents dénaturants classiques des protéines** : *chaleur, pH, détergents...*
- **Composés chimiques** :

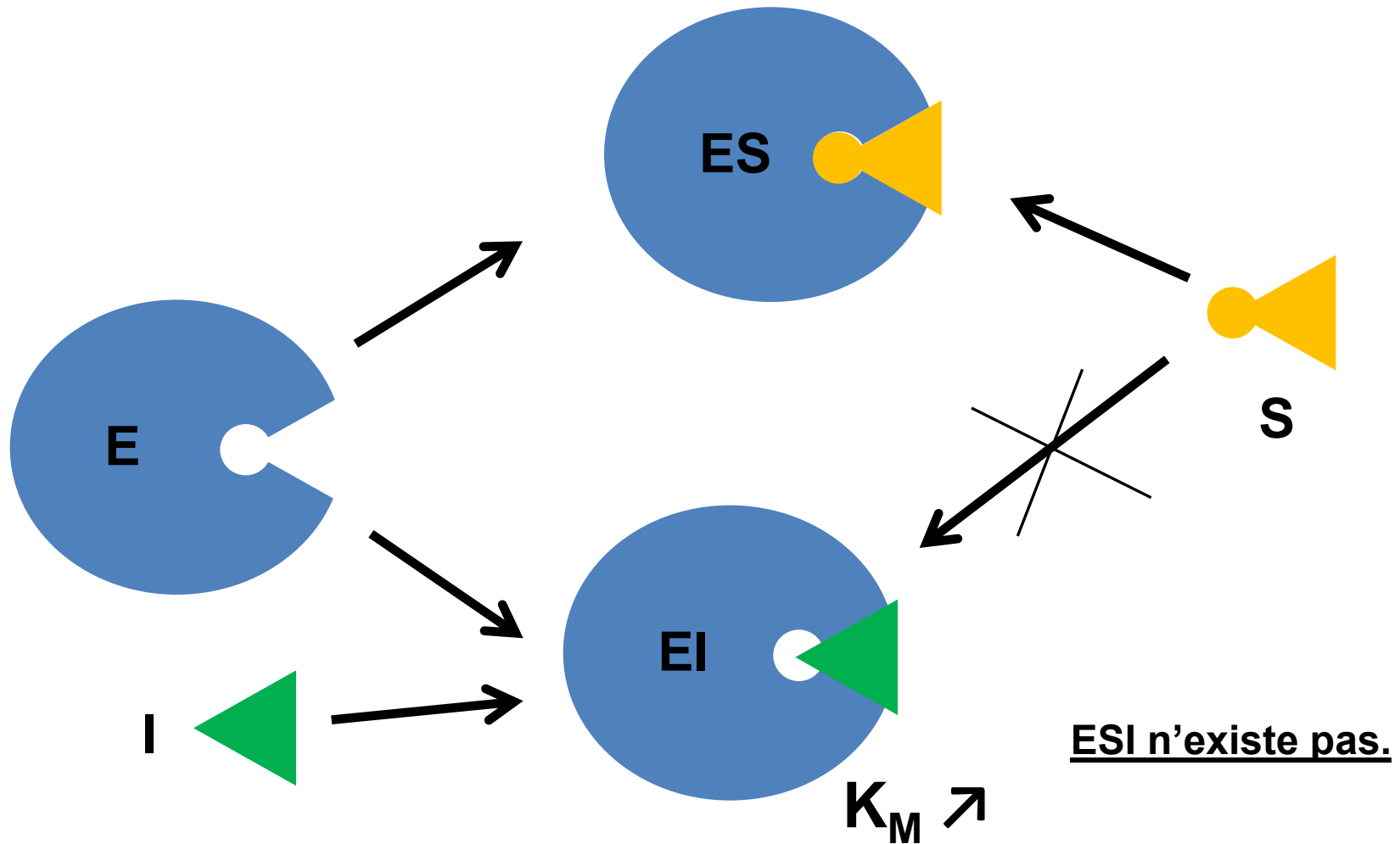
Intoxication courante des agriculteurs aux organosphosphorés
→ Inhibition de l'acétylcholinestérase





2) Inhibition réversible

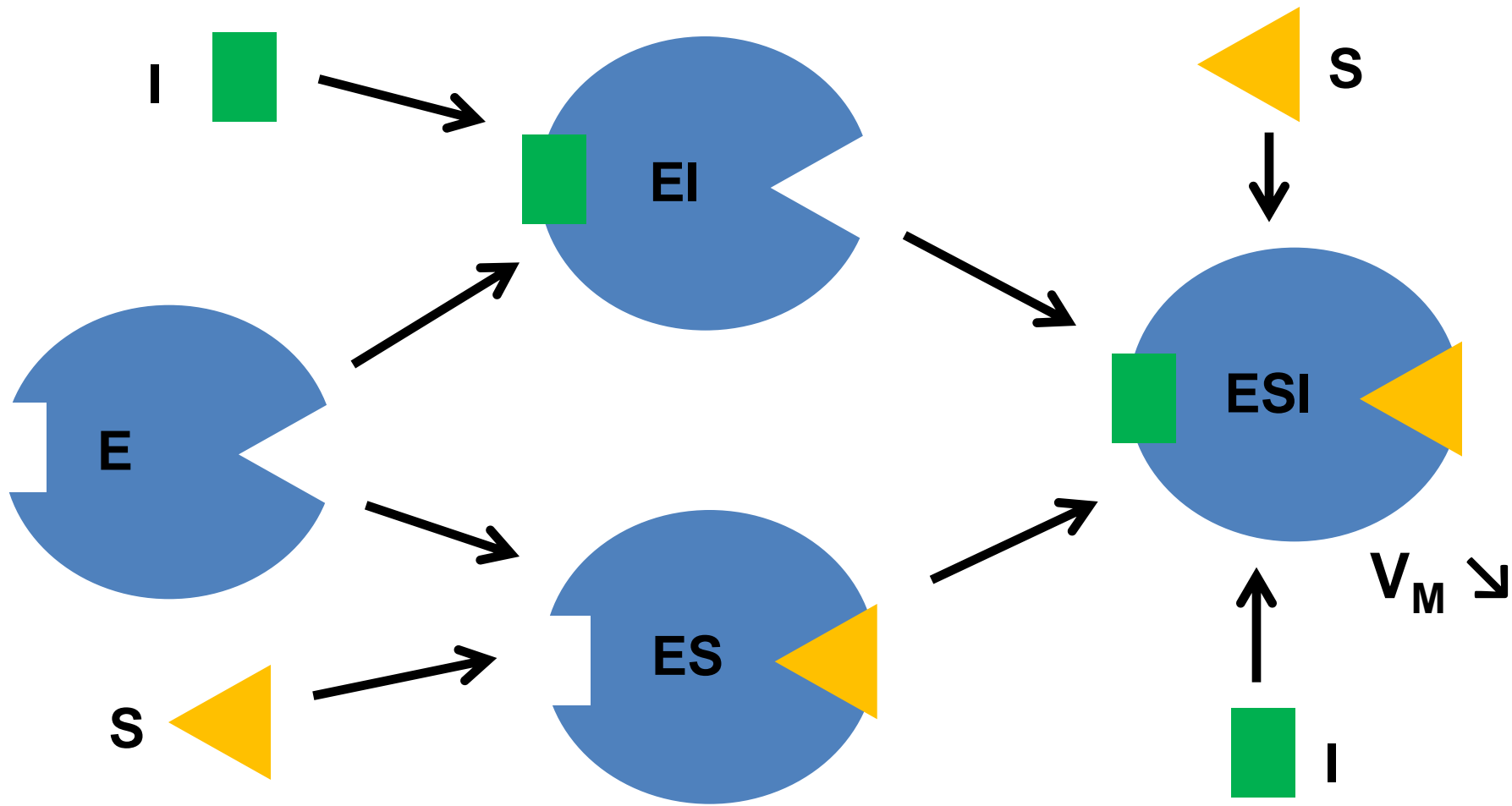
Inhibition compétitive





2) Inhibition réversible

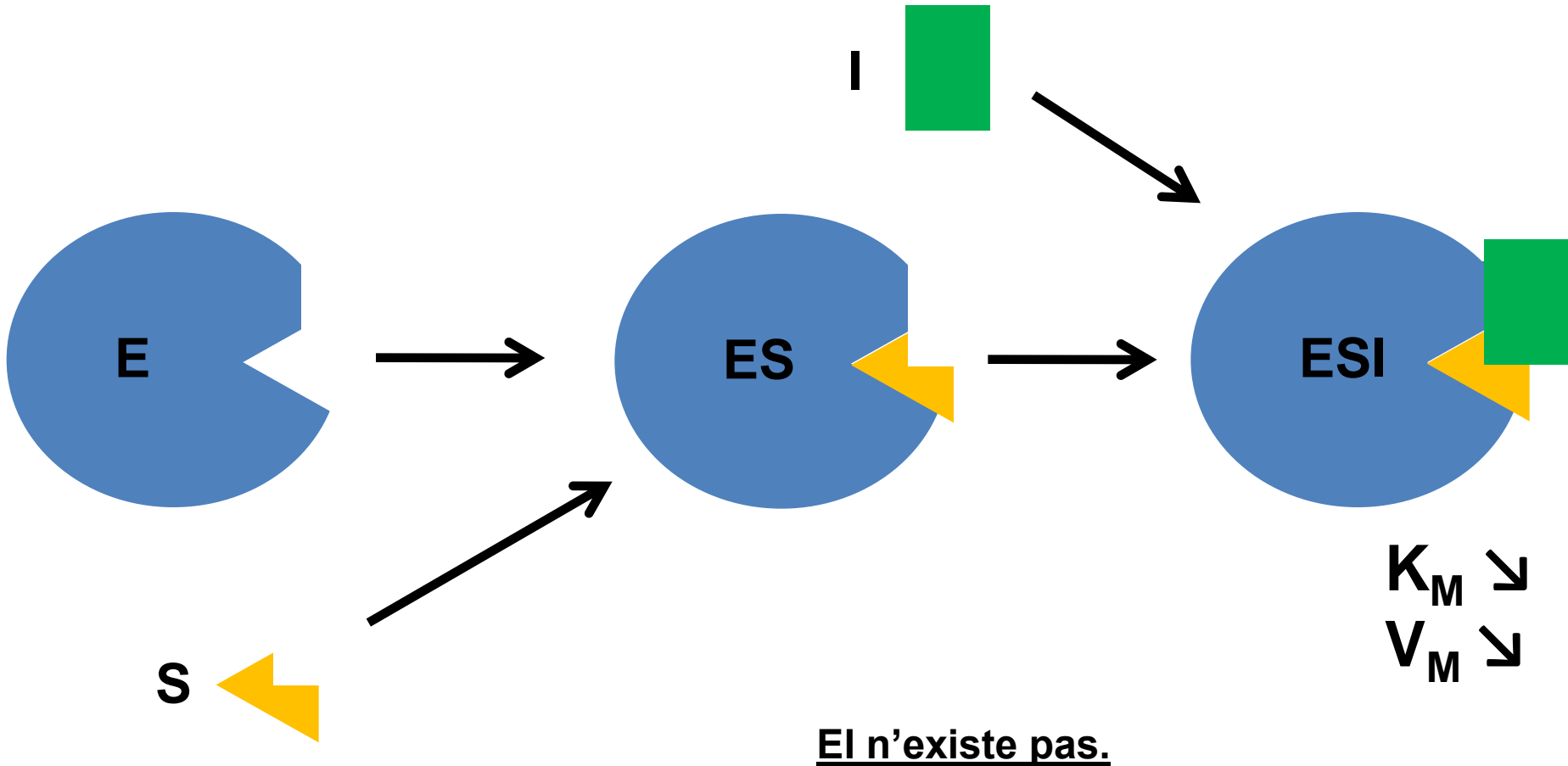
Inhibition non compétitive





2) Inhibition réversible

Inhibition incompétitive





On définit K_i :

K_i est analogue à K_D mais il concerne l'interaction enzyme-inhibiteur.

Inhibition compétitive : $K_M \nearrow$

$$v = \frac{V_M \times [S]}{K'_M + [S]} \quad \text{avec } K'_M = K_M \times (1 + [I]/K_i)$$

Inhibition non compétitive : $V_M \searrow$

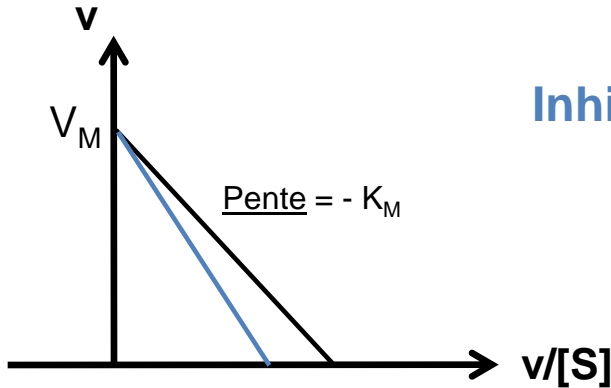
$$v = \frac{V'_M \times [S]}{K_M + [S]} \quad \text{avec } V'_M = V_M / (1 + [I]/K_i)$$

Inhibition incompétitive : $K_M \searrow$
 $V_M \searrow$

$$v = \frac{V'_M \times [S]}{K'_M + [S]} \quad \begin{array}{l} \text{avec } K'_M = K_M / (1 + [I]/K_i) \\ \text{avec } V'_M = V_M / (1 + [I]/K_i) \end{array}$$

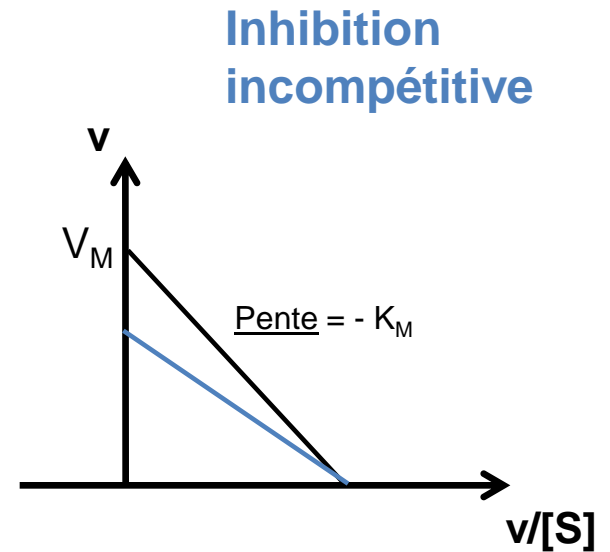


Eadie-Hofstee



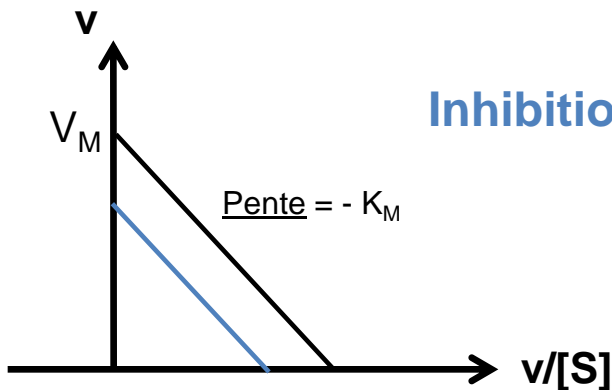
Inhibition compétitive

$$V_M =$$
$$K_M \nearrow$$



Inhibition incompétitive

$$K_M \searrow$$
$$V_M \searrow$$



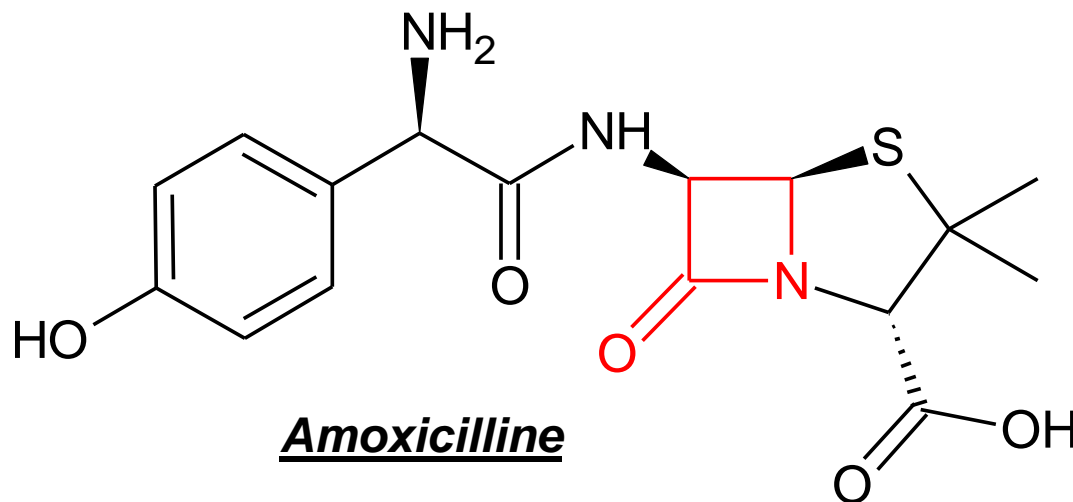
Inhibition non compétitive

$$V_M \searrow$$
$$K_M =$$



Exercices *A propos de l'AUGMENTIN®*

L'amoxicilline est un antibiotique de la famille des β -lactamine (pénicilline). Il possède un cycle β -lactame caractéristique de la famille.



Question 1 : Vous souvenez-vous quelle est la cible des pénicillines ?

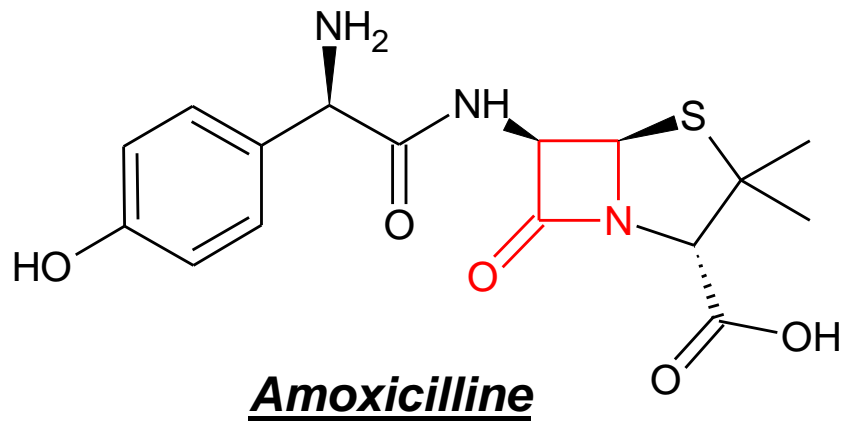


Exercices

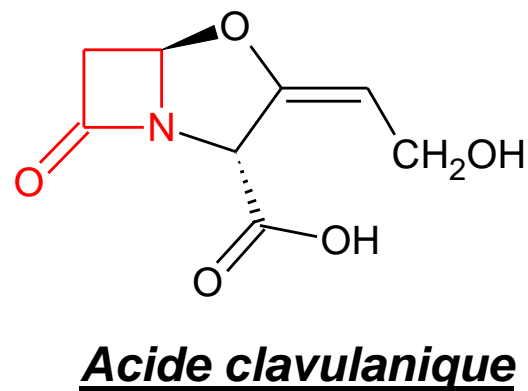
Les bactéries peuvent développer une résistance à l'antibiotique à cause de l'expression d'enzymes, les β -lactamases.

Les β -lactamases dégradent le cycle β -lactame.

Dans ce cas, on utilise l'acide clavulanique, inhibiteur des β -lactamases.



+



Question 2 : A votre avis, de quel type d'inhibiteur réversible s'agit-il ?



Exercices

Question 3 : A quelle modification du graphe de Eadie-Hofstee vous attendez-vous lorsqu'une β -lactamase est mise en présence d'acide clavulanique ?

Graphe 1 / Graphe 2 / Graphe 3 ?

