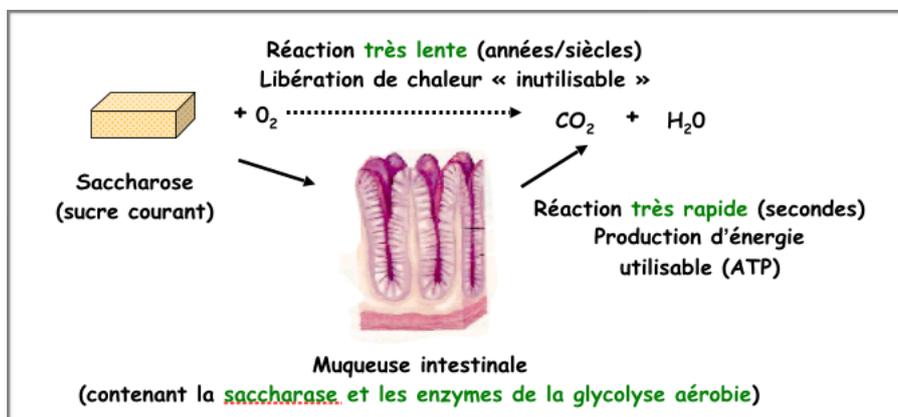


Enzymologie

I. Catalyse et catalyse enzymatique

A. Notion de catalyse. Propriétés des catalyseurs biologiques, les enzymes



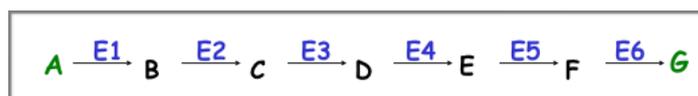
La transformation chimique est donc la fonction spécifique des enzymes.
Les enzymes sont des prot qui catalysent la transformation d'un/de substrat(s) en produits.

B. La nature chimique de la transformation permet la classification des enzymes

Substrat : molécule à transformer

Produit : molécule qui a été transformée

Un produit peut être le substrat d'une autre transformation (chaîne métabolique)



Nous avons déjà rencontré quelques enzymes:

Chymotrypsine : hydrolyse des peptides alimentaires

Trypsine : hydrolyse des peptides alimentaires

Proteine-kinase: phosphorylation des protéines

ATPases: hydrolyse de l'ATP (sur la myosine)

Nomenclature : Nom substrat + ase (saccharase) ou nom du substrat et de la transformation de la transformation réalisée (lactate déshydrogénase)

	Classe	Action	S → P
1	Oxydo-réductases	Transfert d'électrons	$A^- + B \rightleftharpoons A + B^-$
2	Transférases	Transfert de groupes chimiques	$A-B + C \rightleftharpoons A + B-C$
3	Hydrolases	Réaction d'hydrolyse : transfert de groupes fonctionnels à l'eau	$A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$
4	Lyases	Addition de groupes sur double liaison ou formation de double liaison par soustraction de groupe	$A-B \rightleftharpoons A=B + X-Y$
5	Isomérases	Transfert de groupes à l'intérieur d'une molécule pour former un isomère	$\begin{matrix} X & Y & & Y & X \\ & & & & \\ A-B & \rightleftharpoons & A-B \end{matrix}$
6	Ligases	Formation de liaison C-C, C-S, C-O ou C-N par réaction de condensation. Nécessite la fourniture d'énergie (ATP).	$A + B \rightleftharpoons A-B$

C. Les enzymes sont spécifiques du/ des substrats et du type de réaction :

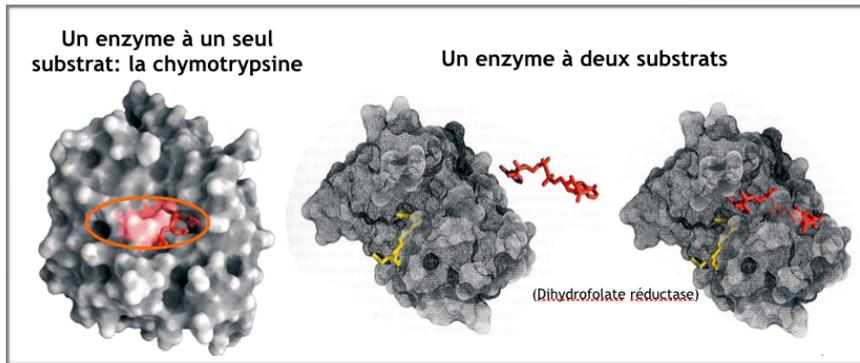
Spécificité :

La trypsine coupe la liaison peptidique après un résidu lysine ou arginine.

La chymotrypsine après un résidu de tyrosine, méthionine, phénylalanine, leucine, tryptophane.

Notion de site actif :

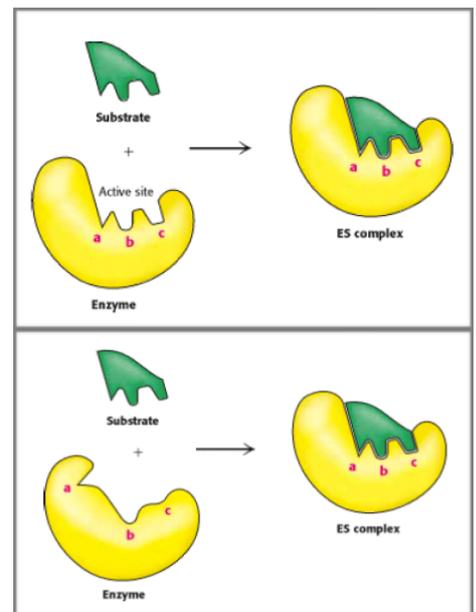
On appelle site actif de l'enzyme la partie de la protéine capable de reconnaître et de transformer le/les substrats.



Deux modèles :

* Modèle de la serrure et de la clé

Les configurations sont parfaitement adaptés.



* Modèle de l'adaptation ensuite pour l'interaction enzyme-substrat.

C'est le contact et le rapprochement qui induit ce changement.

D. La notion de cofacteur

Activité catalytique de nombreux enzymes dépend de la présence de petites molécules appelées « cofacteurs »

2 groupes de cofacteurs

- métaux
- les coenzymes qui sont de petites molécules organiques.

Des enzymes différents peuvent avoir le même coenzyme : ils ont alors des mécanismes d'action catalytique semblables.

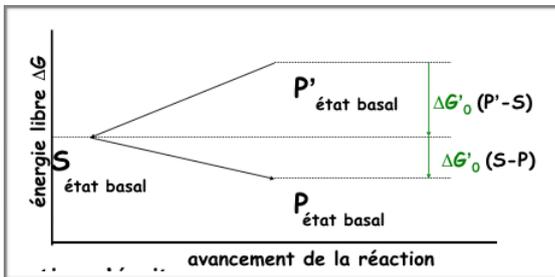
II. Mécanisme généraux de la catalyse enzymatique

2 valeurs caractérisent la réaction : la constante d'équilibre, la constante de vitesse.

Les constante d'équilibre s'écrit :

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \text{ avec } \Delta G'_0 = -RT \ln K'_{eq}$$

Elle est directement liée à la variation d'énergie standard entre S et P.



Si $\Delta G'_0 < 0$ ou si $K > 0$ alors la réaction va dans le sens $S \rightarrow P$ (sens direct ou sens 1) Si $\Delta G'_0 > 0$ ou si $K < 0$ alors la réaction va dans le sens $P \rightarrow S$ (sens indirect ou sens-1)
Donc la constante d'équilibre K'_{eq} indique le sens de la réaction et non sa vitesse.

$\Delta G'_0$ permet de définir le sens d'une réaction. Lorsqu'elle est négative, il y a une perte d'énergie, le sens direct de la réaction est donc favorisé. Lorsqu'elle est positive, le système nécessite un apport d'énergie, le sens direct de la réaction n'est donc pas favorisé.

Les constantes de vitesse

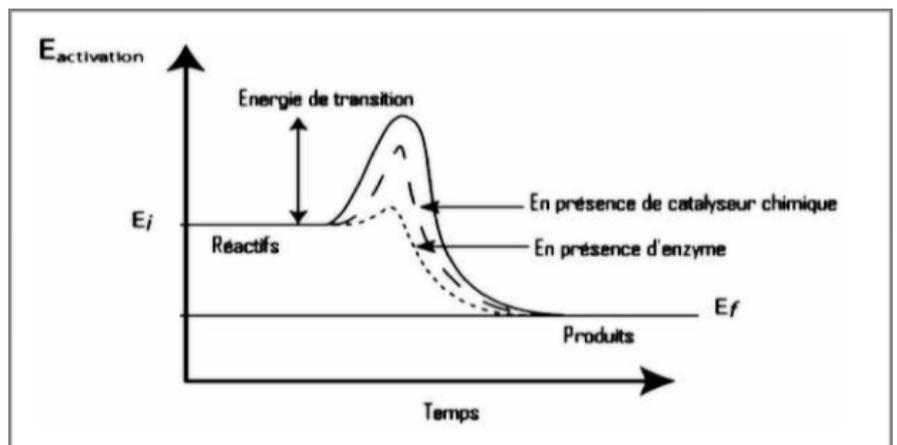
$$V = k \times [S] \text{ et } k = \frac{k_b \times T}{h} \times e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}}$$

où ΔG^* représente l'énergie d'activation (énergie de l'état de transition qui correspond au palier à dépasser pour que la réaction se fasse ; voir cours cinétique chimique) k_b est la constante de Boltzmann et h est la constante de Planck

A partir de cette formule, on en déduit que k évolue en sens inverse de ΔG^* . Plus ΔG^* est élevée et plus la constante de vitesse (donc la vitesse) est basse (et réciproquement).

Le rôle d'un catalyseur est de diminuer l'énergie d'activation d'une réaction donnée en permettant la formation d'un ou de plusieurs intermédiaires dont l'énergie d'activation est plus basse. Un catalyseur agit exclusivement sur la vitesse et pas sur l'équilibre d'une réaction.

Le catalyseur (l'enzyme, pour ce chapitre) est inchangé à la fin de la réaction.



* En présence d'un catalyseur, l'énergie d'activation diminue, ce qui accélère la vitesse de la réaction en permettant la formation d'un ou de plusieurs intermédiaires dont l'énergie d'activation est plus basse.

* Ce mécanisme repose sur la modification temporaire des liaisons, covalentes ou non, entre le substrat et l'enzyme.

Exemples : Le facteur d'augmentation de la vitesse de réaction par les enzymes est considérable: (anhydrase carbonique: 10^5 ; carboxypeptidase A: 10^{11} ; uréase: 10^{14})

4 mécanismes enzymatiques :

1. Catalyse par effet de proximité

Rapproche les réactifs et favorisent leurs interactions. Avec deux sites de liaisons pour les substrats, l'enzyme peut lier les deux et les rapprocher.

2. Catalyse générale enzyme-base

Utilisée dans pratiquement toutes les réactions, c'est souvent un échange de protons H^+ entre substrat/intermédiaire et résidus de l'enzyme (ex : chymotrypsine).

3. Catalyse covalente

Le site actif contient un groupe réactif qui est temporairement modifié par covalence au cours de la catalyse

4. Catalyse par des ions métalliques

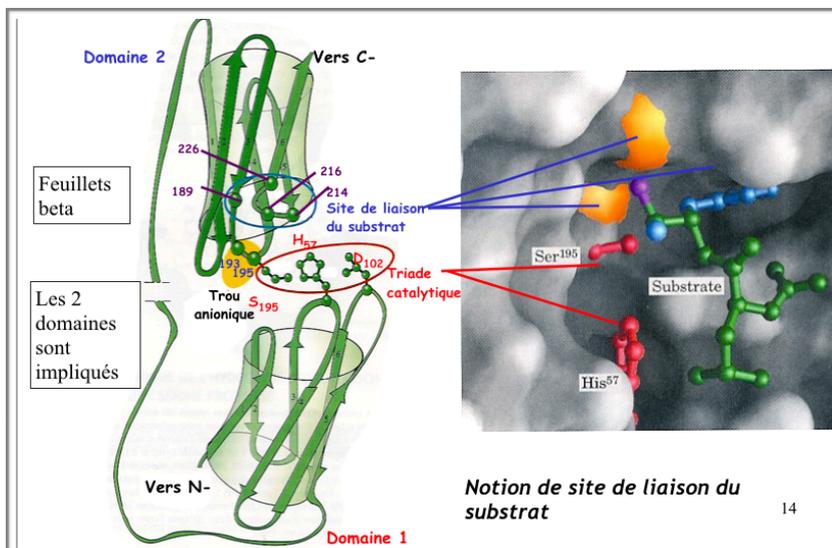
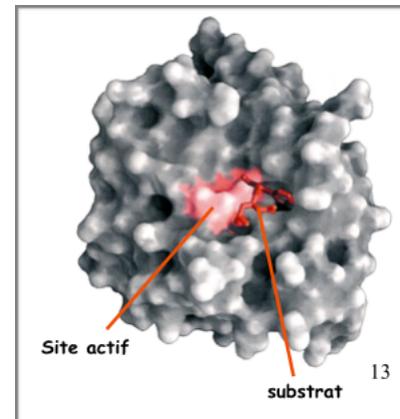
Dans un certain nombre d'enzymes, des ions métalliques servent de catalyseur (magnésium, fer..).

III. Mécanisme enzymatique : un exemple, les séries-protases.

Chymotrypsine : appartient à la famille des sérine-protéases, avec la trypsine.

Ces enzymes catalysent une réaction d'hydrolyse de la liaison peptidique. Ce sont des endopeptidases.

Le repliement de la protéine génère un **site actif** dans lequel **3 acides aminés (triade catalytique)** particuliers vont jouer un rôle majeur : **His 57**, **Asp 102**, **Ser 195**. Ils forment la **triade catalytique**.



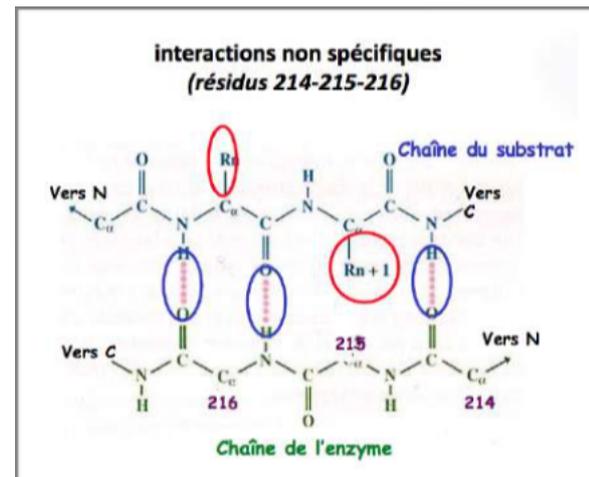
Le site actif contient le site de liaison du substrat qui correspond au site de reconnaissance du substrat (spécificité du substrat) ainsi que la triade catalytique qui intervient dans la catalyse de la coupure de la liaison peptidique (spécificité d'action)

Action de la chymotrypsine en 2 temps :

1. Approche

La liaison substrat-enzyme comporte des interactions :

- * Non spécifiques : liaisons hydrogène entre le NH et le C=O des liaisons peptidiques de la chaîne du substrat et de la chaîne de l'enzyme
- * Spécifiques : poche hydrophobe formée (constituée de 3 résidus particuliers : 1 sérine (189) et 2 glycines (261 et 226). Ces résidus vont interagir avec les résidus hydrophobes du substrat et ces interactions sont à l'origine de la spécificité de l'enzyme pour les résidus aromatiques ou hydrophobes (ils servent à accrocher le substrat).

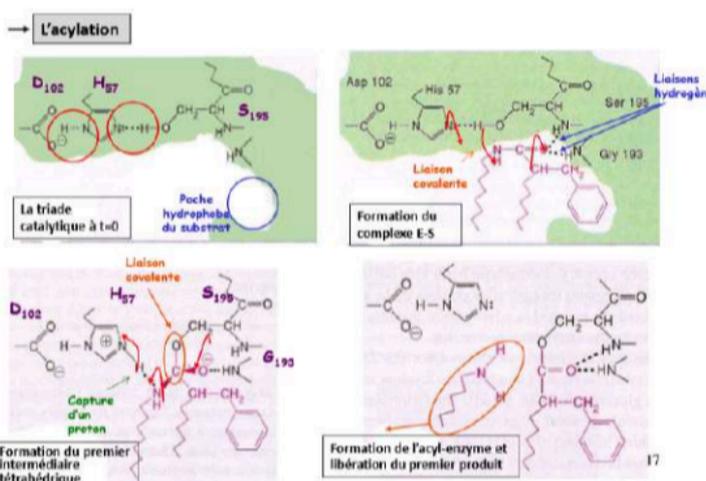


La chymotrypsine est spécifique des résidus aromatiques ou hydrophobes.
La trypsin, des résidus basiques : lysine, arginine.

2. Hydrolyse : 2 étapes

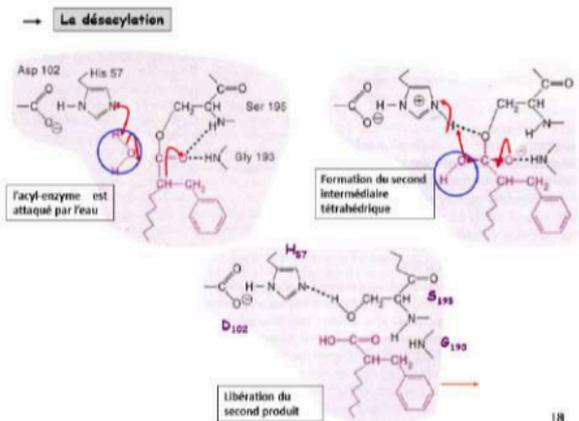
1. Acylation (branchement acyle sur sérine)

- Formation du complexe ES (1^{er} intermédiaire tétraédrique instable), grâce à la mise en place d'une liaison covalente (entre O de la sérine de la triade catalytique et C de la liaison peptidique du substrat), d'où le nom de sa famille (« sérine-protéase »)
- Formation de l'acyl-enzyme par transfert d'un proton H⁺ par l'histidine (catalyse acide-base)
- Libération du 1^{er} produit (fragment NH₂)



2. Désacylation

- L'eau attaque l'acyl-enzyme ce qui conduit à la rupture de la liaison covalente entre la sérine et le carbone du substrat
- 2^{ème} intermédiaire tétraédrique instable
- Libération du 2^{ème} produit (fragment COOH) et retour à l'état initial de la triade catalytique



Les états intermédiaires font baisser l'énergie d'activation. La chymotrypsine fait donc intervenir une catalyse covalente et une catalyse acide-base. On a une libération séquentielle des 2 produits de la réaction : les deux fragments de la chaîne polypeptidique ne sont pas libérés en même temps. L'enzyme est non-modifiée à la fin de la réaction (comme toute enzyme).

À retenir normalement (mais écouter ce que dit le prof là-dessus) :

Endopeptidase. Les AA qu'elle coupe, le fait qu'elle les coupe en deux étapes.

Liaison enzyme-substrat avec des liaisons spécifiques et des liaisons non-spécifiques.

Des liaisons covalentes, hydrogène, hydrophobes.

2 intermédiaires tétraédriques qui baissent ΔG^* . Libération séquentielle des deux produits.

IV. Modélisation des réactions enzymatiques : la cinétique enzymatique

Les réactions enzymatiques sont quantifiables (mesure de l'activité) et analysables en terme mathématique. C'est l'étude de la cinétique enzymatique.

A. Facteurs affectant la réaction enzymatiques

Ces facteurs sont :

* Ceux contenus dans la relations :



= facteurs intrinsèques

* Ceux liées à l'environnement de la réaction : pH, température, ions, coenzymes

= facteurs extrinsèques

-> Le critère majeur pour mesurer la catalyse enzymatique est la vitesse de la réaction. On l'évalue en mesurant la vitesse de disparition du substrat ou celle de l'apparition du produit en

fonction du temps : $V = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$

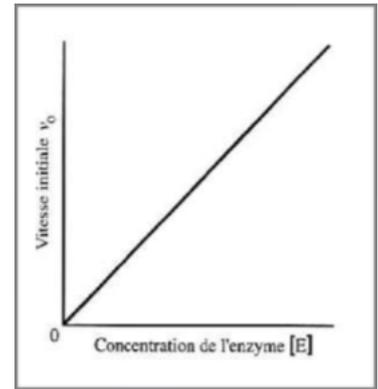
-> La courbe représentant la concentration de produit en fonction du temps est une hyperbole, donc la vitesse (= la pente de cette courbe) change en fonction du temps.

On utilisera alors comme vitesse de référence la vitesse initiale V_0 , qui est la vitesse au début de la réaction et à l'état stationnaire : c'est la tangente à la courbe à $t = 0$ (voir cours Cinétique chimique de Chimie G).

La vitesse dépend de l'enzyme alors que l'équilibre n'en dépend pas.

B. Influence de la concentration en enzyme

La mesure de l'activité enzymatique, en présence de concentrations croissantes d'enzyme (et concentrations constantes de substrat) dans des conditions de mesure de V_0 , montre que V_0 varie linéairement avec la concentration en enzyme $[E]$. En médecine, on la mesure par dosage colorimétrique.

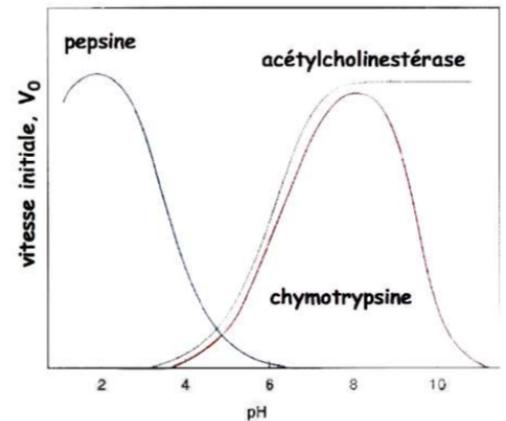


C. Influence du pH

Chaque enzyme possède dans son site actif des résidus chargés. Ainsi, un changement de pH modifiera l'état d'ionisation de ces résidus, selon leur pKa, et ce, différemment selon chaque enzyme et les résidus chargés qu'elle possède.

L'activité enzymatique dépend donc du pH et cette dépendance est propre à chaque enzyme (voir figure ci-dessous).

Exemple de l'image : le pH de fonctionnement optimal pour la pepsine est aux alentours de $\text{pH} = 2$, car c'est à ce pH que la vitesse initiale V_0 est la plus élevée. On peut en déduire que le site actif de l'enzyme possède des résidus acide aspartique ou acide glutamique.

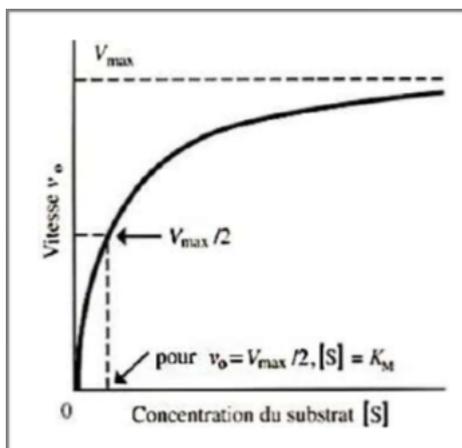


D. Influence de la température

Une augmentation de la température va dénaturer l'enzyme (déstabiliser sa conformation) et la rendre inactive (perte de fonction). Comme le pH, cette température d'inactivation est propre à chaque enzyme.

E. Influence de la concentration en substrat : équation de Michaelis-Menten

Equation de Michaelis-Menten : $V_0 = V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$ à connaître par cœur.



*La réaction enzymatique suit une hyperbole équilatère.

*Elle est saturable (V_{max})

*Il existe une valeur particulière pour V_0 : $V_{max}/2$ qui donne la mesure de la constante de Michaelis (K_M) (= permet de mesurer l'affinité de l'enzyme pour son substrat) Plus le K_M est petit et plus l'affinité est grande et inversement.

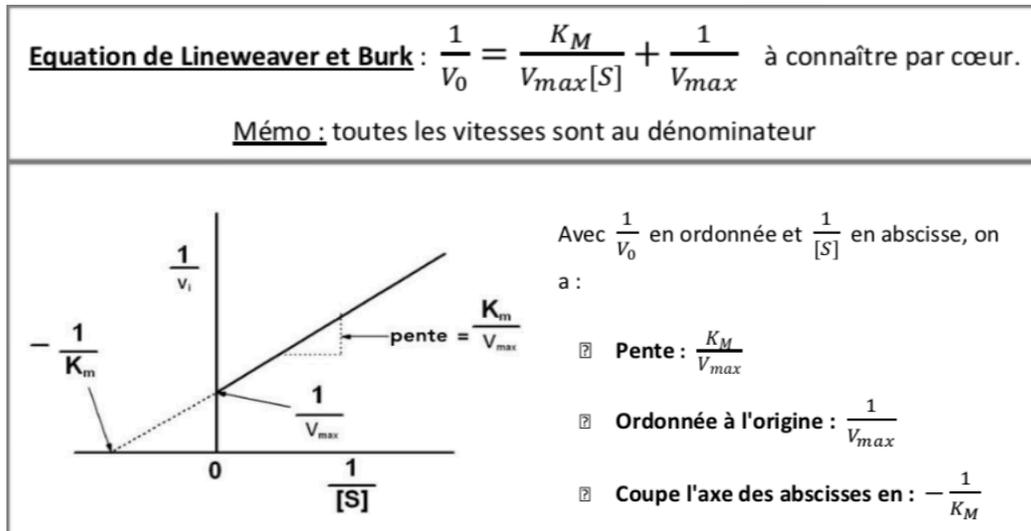
Valeurs de K_M courantes entre 10^{-1} et 10^{-7} M.)

k_{cat} est la constante catalytique.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_T]}$$

Elle traduit directement de l'efficacité de l'enzyme (exprimée en s-1)
Plus elle est grande, plus l'enzyme fonctionne rapidement.

Le rapport k_{cat}/K_M décrit la perfection cinétique d'une enzyme (plus le K_M est petit et plus le k_{cat} est grand → plus le rapport est grand → meilleure est l'enzyme). Une enzyme géniale a un rapport de l'ordre de 10^8 à $10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.



V. Contrôle de l'activité des enzymes

A. L'activité des enzymes peut être contrôlée par de nombreux processus

Cette activité dépend de :

- * leur concentration (biosynthèse et de la dégradation des enzymes)
- * leur localisation (trafic intra)
- * leur environnement (pH, ions, coenzymes, vitamines, inhibiteurs)
- * concentration en substrat : voir la cinétique, inhibition par excès de substrat

L'activité des enzymes peut être contrôlée par :

- * protéolyse ménagée
- * par modification covalente réversible (phosphorylation, formation ou rupture de ponts disulfure).
- * régulation allostérique

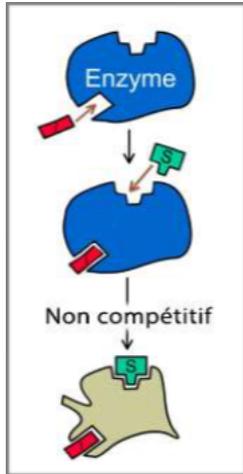
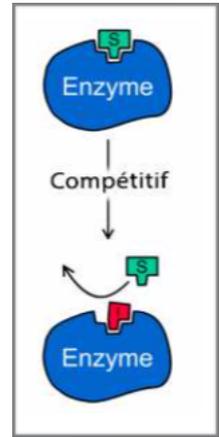
Plusieurs modes de contrôle peuvent bien sûr être associés.

B. Influence des inhibiteurs

Les inhibiteurs enzymatiques sont de natures très diverses. Ils interfèrent avec une étape de la catalyse et sont très utiles en thérapeutique et pour la compréhension des mécanismes enzymatiques. Il existe des inhibiteurs exogènes (par ex : certaines drogues, certains médicaments) et des inhibiteurs physiologiques.

2 grandes classes d'inhibiteurs : irréversibles et réversibles
 2 types de réversibles :

* **Compétitif** : Il se fixe sur le même site que le substrat et entre donc en compétition avec celui-ci pour se fixer.



K_M augmente (on a l'impression que S a moins d'affinité pour E, l'affinité apparente est diminuée).

Inhibiteurs	K_M	V_{max}
Compétitif	Modifié	Inchangé
Non compétitif	Inchangé	Modifié

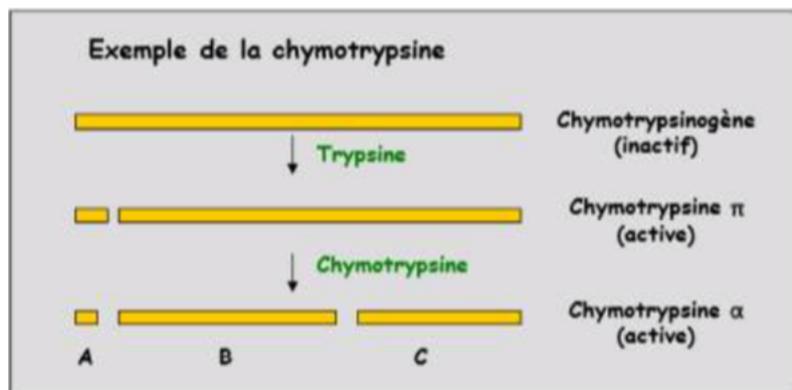
* **Non compétitif** : L'enzyme possède 2 sites de fixation différents : un pour l'inhibiteur et un autre pour le substrat. L'inhibiteur peut agir sur l'enzyme seule ou sur le complexe enzyme-substrat.

K_M (donc l'affinité) reste constant car rien n'empêche le substrat de se fixer (l'affinité apparente est inchangée).

C. Contrôle de l'activité enzymatique par protéolyse ménagée

= mode d'activation courant des enzymes digestives (chymotrypsine) et des enzymes de la coagulation du sang.

Déf : Un zymogène est un précurseur inactif d'une enzyme activée par protéolyse ménagée.

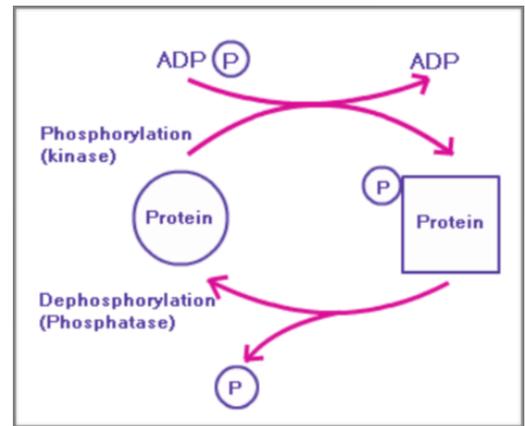


Dans l'exemple de la chymotrypsine, le zymogène est le chymotrypsinogène, synthétisé dans le pancréas. Le chymotrypsinogène est coupé par la trypsine, présente dans la lumière digestive, pour donner la chymotrypsine π active. Cette dernière est capable d'autoclivage pour donner 3 fragments de la chymotrypsine α , encore plus active.

D. Par modification covalente réversible

Exemple : la phosphorylation

La phosphorylation permet temporairement l'activation ou l'inhibition de l'enzyme en réponse à un signal extracellulaire. C'est une réaction coûteuse en énergie et qui a donc besoin d'ATP (c'est le 3^{ème} phosphate de l'ATP que l'on colle à l'enzyme par liaison covalente). La phosphorylation se fait sur une sérine, une thréonine ou une tyrosine (au niveau de la fonction alcool de leur chaîne latérale). Elle met en jeu des kinases (addition de P) ou des phosphatases (suppression de P).

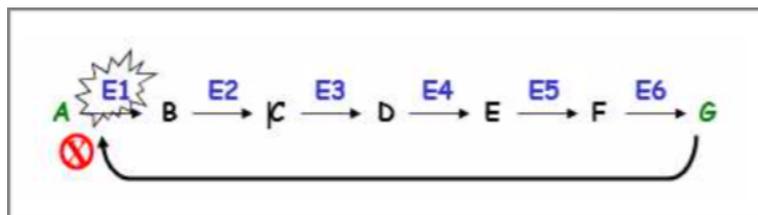


E. Les enzymes allostériques

L'allostérie permet une réponse rapide et fine aux variations des conditions intracellulaires.

Caractéristiques des enzymes allostériques :

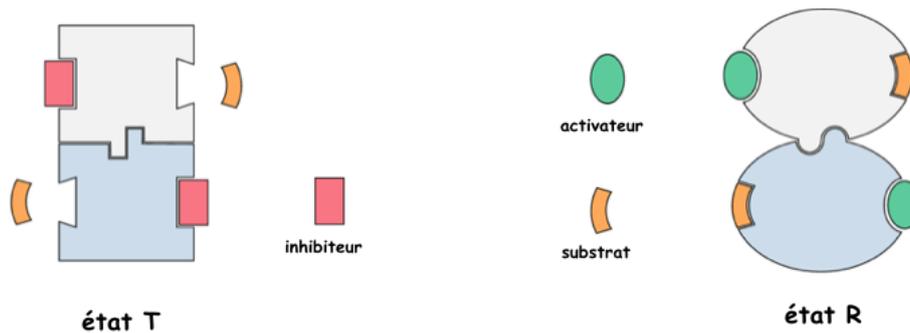
- * Généralement plusieurs sous-unités (multimérique)
- * La fixation d'un modulateur allostérique modifie la conformation de l'enzyme et donc la fixation du substrat
- * Il existe généralement au moins un site de fixation du substrat (dit catalytique) et au moins un site de fixation pour un modulateur (dit régulateur)
- * Il existe une coopérativité du modulateur et/ou du substrat pour l'activité enzymatique
- * L'enzyme est souvent placée à une étape-clé d'une chaîne métabolique.



Dans cet exemple théorique, A est le substrat de l'enzyme-clé E1 (qui est allostérique) et c'est un modulateur positif (= activateur allostérique, il active l'enzyme). En revanche, G, le produit final, est un modulateur négatif (= inhibiteur allostérique, il inhibe l'enzyme). On dit que G « rétro- inhibe » E1 (en anglais, on parle de *feedback négatif*).

Exemple de la phosphofructokinase 1 (PFK1) : elle présente 2 états extrêmes mais un grand nombre d'états intermédiaires :

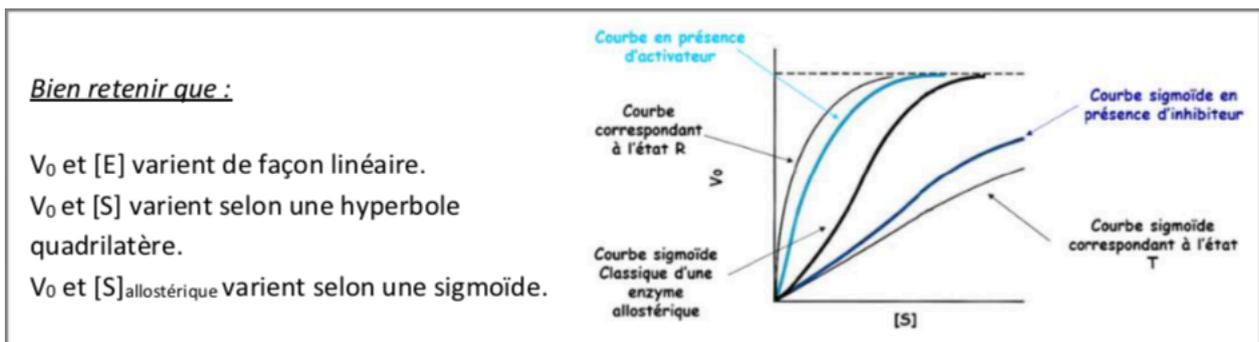
État T (tendu)	État R (relâché)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ L'état T est défavorable à la glycolyse et est stabilisé par l'ATP (si on a de l'ATP, pas besoin de faire de la glycolyse). ✓ L'état T correspond à une forme de moins active catalytique (lorsque l'on ajoute un inhibiteur allostérique) : il y a un aplatissement de la courbe sigmoïde. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ L'état R est favorable à la glycolyse et est stabilisé par l'ADP, le Fructose 2, 6 biphosphate et les substrats ce qui favorise la production d'ATP. ✓ L'état R se rapproche d'une hyperbole lorsque l'on rajoute un activateur allostérique : il y a donc perte de coopérativité.



La fixation sur une sous-unité régulatrice d'un modulateur positif écarte les sous-unités catalytiques en les faisant pivoter, et ce changement conformationnel les rend plus actives. La fixation d'un modulateur négatif (ATP) a l'effet inverse.

Attention, avec l'allostérie, l'enzyme ne suit plus l'équation de Michaelis-Menten.

La courbe de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat est une sigmoïde, traduisant la coopérativité !



Formulaire

La constante d'équilibre	$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \text{ et}$ $\Delta G'_0 = -RT \ln (K'_{eq})$ $\Delta G'_0 \text{ est l'énergie libre}$
La vitesse de la réaction	$V = k[S] = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$
La constante de vitesse k	$k = \frac{k_b T}{h} e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}}$ $\Delta G^* \text{ est l'énergie d'activation}$
L'équation de Michaelis-Menten	$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$
La constante de Michaelis K_M	$f(K_M) = \frac{V_{max}}{2}$
La constante catalytique k_{cat}	$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_t]}$
La perfection cinétique	$\frac{k_{cat}}{K_M}$
L'équation de Lineweaver et Burk	$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$