

Module: Biochimie
1^{ère} Année Médecine
Chapitre IV

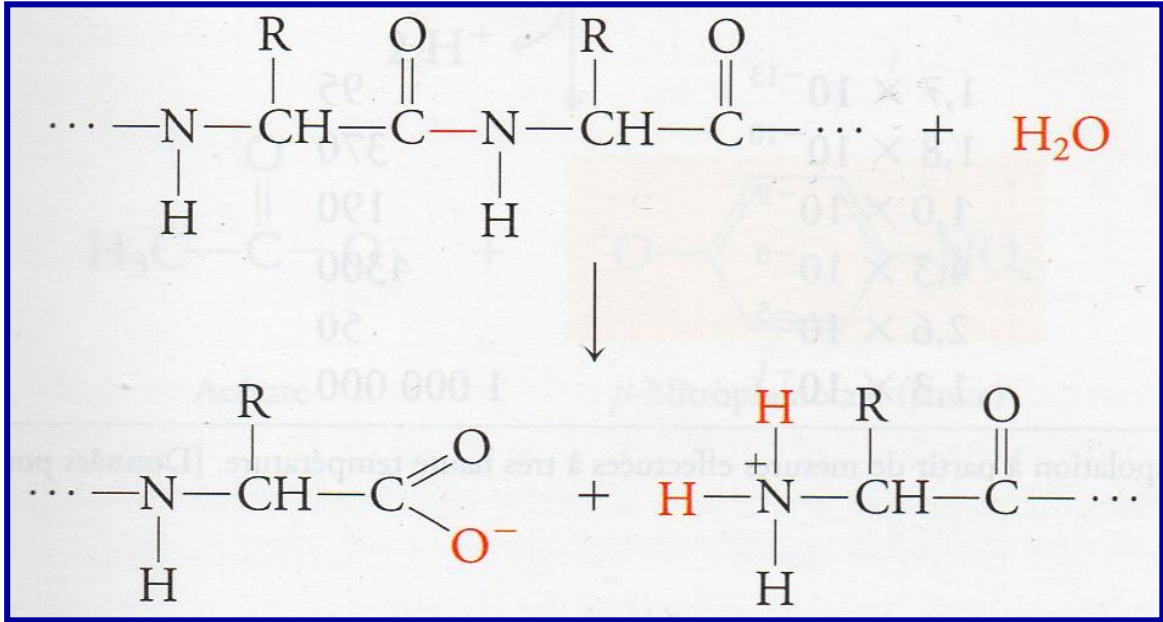
ENZYMOLOGIE

Partie I

Dr. H. BENSAFI-GHERAÏBIA
bensafihanene@yahoo.fr
Faculté de Médecine
Université Badji Mokhtar-Annaba
2019-2020

Introduction

In vitro, dans les conditions physiologiques, la liaison peptidique qui relie les acides aminés dans les peptides et les protéines a une **demi-vie d'environ 20 ans**, c-à-d qu'après **29 ans**, environ la moitié des liaisons peptidiques dans un échantillon de peptide donné aura été cassée par hydrolyse (coupure par l'eau).



Introduction

La longue demi-vie de la liaison peptidique est avantageuse pour les êtres vivants:

- Puisque beaucoup de leurs **caractéristiques structurales et fonctionnelles dépendent de l'intégrité des protéines.**
- D'un autre côté, de nombreuses **protéines, des hormones** par exemple doivent être **dégradées** rapidement afin de **limiter leurs effets biologiques.**

Il faut donc un organisme qui soit capable **d'accélérer l'hydrolyse des liaisons peptidiques.**

Introduction

En générale, il existe 3 moyens d'augmenter la vitesse d'une réaction chimique comme une hydrolyse:

1. En augmentant la température: cette possibilité n'est pas très pratique car la grande majorité des organismes ne peuvent pas réguler leur température interne, de plus une augmentation de température accélère toutes les réactions chimiques, pas seulement qui est désirée.

2. En augmentant les concentrations des substrats: Cependant une cellule peut contenir des dizaines de milliers de type différents de molécules, l'espace y est limité et de nombreux substrats essentiels sont rares aussi bien dans la cellule qu'à l'extérieur.

3. En ajoutant un catalyseur: une substance qui participe à la réaction mais qui se retrouve sous sa forme originale à la fin de celle-ci.

Les systèmes vivants utilisent des catalyseurs appelés **enzymes** (biocatalyseurs) pour augmenter la vitesse des réactions chimiques.

Notions préliminaires

• Enzyme

Les enzymes diffèrent de simples catalyseurs chimiques par leur **efficacité** et leur **spécificité**.

- La plupart des enzymes sont **des protéines**, mais certaines sont **composées d'ARN** (ribozymes).
- Les protéines enzymatiques sont **des catalyseurs**, c-à-d qu'en agissant à des **concentrations très petites**, elles **augmentent la vitesse** des réactions chimiques, sans en modifier le résultat. A la fin de la réaction la **structure de l'enzyme se retrouve inchangée**.
- Une enzyme donnée est **spécifique d'une réaction**, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les **mêmes corps chimiques initiaux**.
- Les protéines enzymatiques sont synthétisées par des êtres vivants. Cette synthèse est **déterminée génétiquement**.

Notions préliminaires

- **Enzyme:** **Exemple:** *La chymotrypsine*
- C'est une protéine digestive synthétisée dans le pancréas et excrétée dans l'intestin grêle où elle aide à la dégradation des protéines alimentaires.
- Les **241 acides aminés** de la chymotrypsine forment une structure compacte à **deux domaines**
- L'hydrolyse du substrat polypeptidique a lieu dans une fente entre les deux domaines, cette région de l'enzyme est le **site actif**.
- Les sites actifs de presque toutes les enzymes connues sont localisés dans des crevasses similaires, à la surface des enzymes.

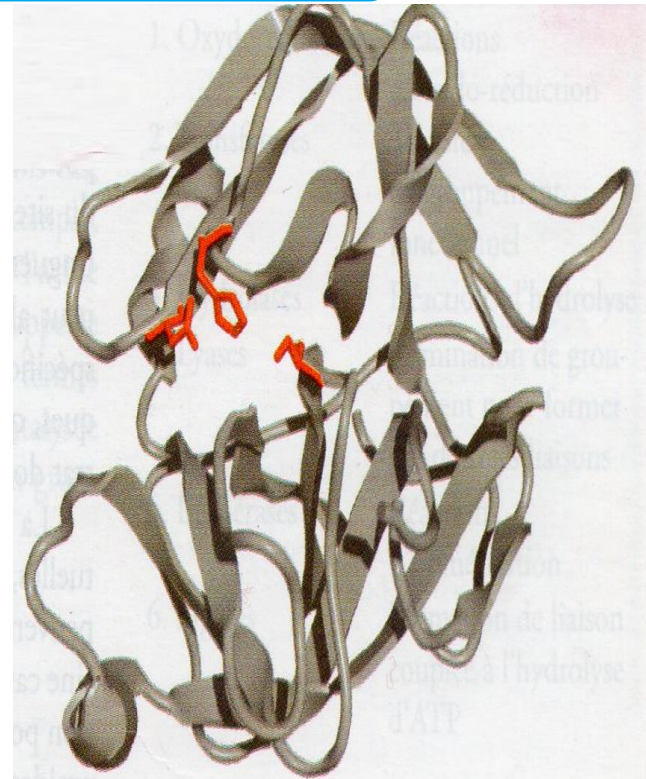


Figure 6-1 Modèle en rubans de la chymotrypsine. La chaîne polypeptidique (en gris) se replie en deux domaines. Trois résidus essentiels pour l'activité de l'enzyme sont indiqués en rouge.
[Structure (pdb 4CHA) déterminée par H. Tsukada et D.M. Blow.]

Notions préliminaires

- **Enzyme:** **Exemple:** *La chymotrypsine*
- La chymotrypsine catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidiques à une **vitesse d'environ 190 par seconde**, environ **$1,7 \times 10^{11}$ fois plus rapide qu'en l'absence de catalyseur**.
- De plus, la chymotrypsine et d'autres enzymes agissent dans des **conditions douces** (pression atmosphérique et température physiologique); tandis que de nombreux catalyseurs chimiques requièrent des températures et des pressions extrêmement élevées pour une performance optimale.

Notions préliminaires

- **Substrat**

Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme.

- Toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement **modifiées** sont appelées substrats.

Notions préliminaires

- **Produit**

Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme.

- La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation est appelée **produit**.

Notions préliminaires

- Réaction enzymatique



- Lorsque le sens d'une réaction enzymatique réversible est changé le produit devient substrat et vice-versa.

Notions préliminaires

- Réaction enzymatique

Enzyme

Cofacteurs et coenzymes liés

Substrat $\rightleftharpoons$ Produit

Coenzymes libres

Ions et Energie

- Un troisième corps chimique est indispensable : **cofacteur**.
- Les cofacteurs sont des atomes ou des molécules qui interviennent dans la réaction enzymatique, mais **ne sont pas transformés** définitivement à la fin de cette réaction.
- La protéine enzymatique reconnaît **spécifiquement** les cofacteurs dont elle a besoin.
- La réaction enzymatique nécessite aussi que le complexe enzyme-substrat échange de **l'énergie** libre avec le milieu environnant.

Notions préliminaires

- **Ligand**

Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une protéine

- Toutes les molécules ayant une **liaison spécifique** avec une **protéine** sont appelées ligands.
- Pour chaque ligand, il existe au moins un **site de fixation** sur la protéine qui le reçoit.

Notions préliminaires

• Cofacteur

Corps chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique :

- *Pour transporter ou compléter un substrat*
 - *Pour accepter un produit*
 - *Comme participant à la structure d'enzyme*
-
- Les cofacteurs peuvent être des ions comme l'atome de Zinc de l'anhydrase carbonique ou de petites molécules minérales habituellement présentes dans les milieux biologiques, à commencer par la molécule d'eau.
 - Certains cofacteurs sont des molécules plus complexes **synthétisées par les cellules**: nous les appellerons coenzymes.

Notions préliminaires

- **Coenzyme**

- *Molécule biologique intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction.*
- *Les coenzymes libres interviennent dans la réaction de manière stœchiométrique.*
- *Les coenzymes liés interviennent dans la réaction de manière catalytique.*
- Les coenzymes sont des **molécules biologiques** (leur synthèse naturelle ne peut être faite que par des cellules vivantes).
- Lorsque cette synthèse n'est pas inscrite dans le patrimoine génétique d'une espèce, alors tout ou partie de la molécule du coenzyme doit être apporté à cette espèce par son alimentation : cet aliment indispensable s'appelle une **vitamine**.
- Les coenzymes sont des **cofacteurs** donc des molécules **indispensables** à la catalyse enzymatique.

Notions préliminaires

• Coenzyme

- Lorsque les coenzymes sont liés à l'enzyme par des liaisons de type électrostatique ou plus faiblement encore, cette liaison est renouvelée à chaque réaction effectuée : l'énergie mise en jeu par la liaison enzyme-coenzyme est du même ordre de grandeur que l'énergie mise en jeu dans la liaison enzyme-substrat ; dans ce cas, la concentration des coenzymes doit être égale à celle du substrat (on dit stœchiométrique). Ces coenzymes sont appelés coenzymes libres parce qu'ils se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée.
- Lorsque au contraire les coenzymes sont liés aux enzymes par des liaisons fortes de type covalente, leur concentration est égale à celle de l'enzyme, donc très petite (on dit catalytique). Ces coenzymes sont appelés coenzymes liés parce qu'ils ne se dissocient pas de l'enzyme.

Notions préliminaires

- Voie métabolique

- Les enzymes sont les agents de la fonction métabolique.
- Agissant en ordre séquentiel, les enzymes organisent les voies métaboliques de la **dégradation** des nutriments et de la **synthèse** d'autres molécules.
- La dégradation libère de **l'énergie** qui est convertie en des formes utilisables par le **métabolisme** et génère des **précurseurs** qui seront transformés par d'autres voies métaboliques pour créer les milliers de **molécules biologiques distinctes** dans toute cellule vivante.

Notions préliminaires

- Enzymes de régulation

- Interviennent aux carrefours des voies métaboliques.
- Agissent aux besoins métaboliques momentanés de la cellule et ajustent leur activité catalytique en fonction de ces besoins.
- Les réponses de ces enzymes assurent une intégration harmonieuse des diverses activités métaboliques des cellules de sorte que l'état vivant soit préservé et perpétué.

Notions préliminaires

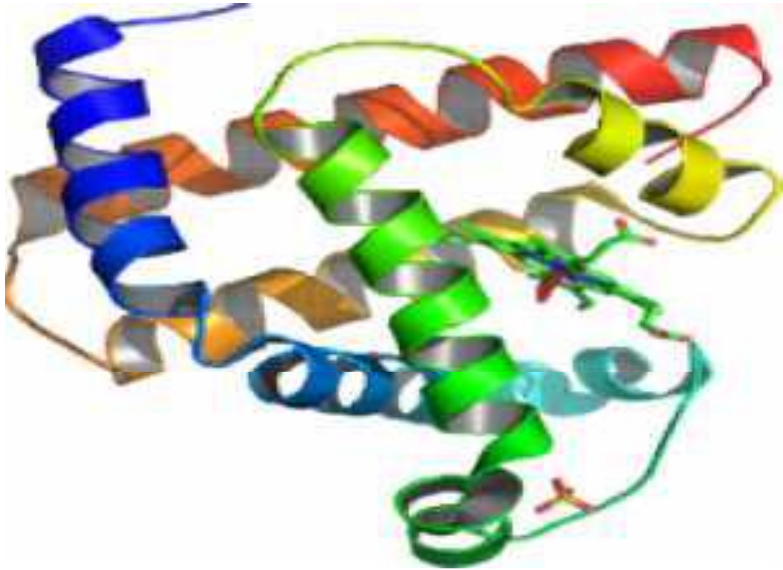
- Isoenzymes

- Isozymes sont des isoformes d'enzymes (variétés très proches).
- Sont des enzymes qui diffèrent par leur séquence d'acides aminés mais catalysent la même réaction chimique.
- Elles présentent des paramètres cinétiques différents ou des propriétés de régulation différentes.
- Leur existence permet une meilleure adaptation au métabolisme.
- Elles sont codées par les mêmes gènes mais ont muté avec le temps.

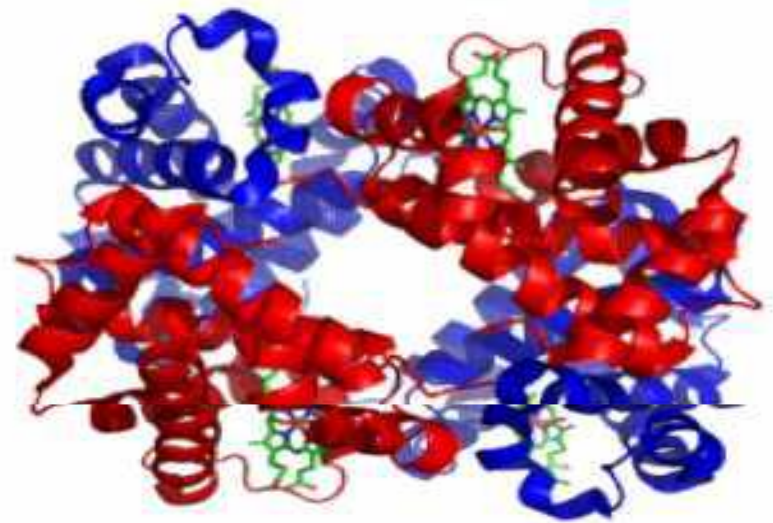
Structure des enzymes

- Les enzymes sont des protéines globulaires.
- Comme toutes les protéines, les enzymes sont constituées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques repliées pour former une structure tridimensionnelle.
- La séquence en acides aminés de l'enzyme détermine sa structure qui à son tour détermine les propriétés catalytiques de l'enzyme.
- La structure des enzymes est altérée (dénaturée) lorsqu'elles sont chauffées ou mises en contact avec des dénaturants chimiques.
- Les enzymes sont des molécules bien plus grandes que leurs substrats, Leur taille varie de 62 résidus pour le monomère de 4-oxalocrotonate tautomérase à plus de 2000 résidus pour l'acide gras synthase animale.

Structure des enzymes



Structure **monomérique**
(S. tertiaire)



Structure **oligomérique** ou **polymérique**
(S. quaternaire)

- Enzymes **homo-polymériques**: formés de protomères identiques
- Enzymes **hétéro-polymériques**: formés de protomères différents

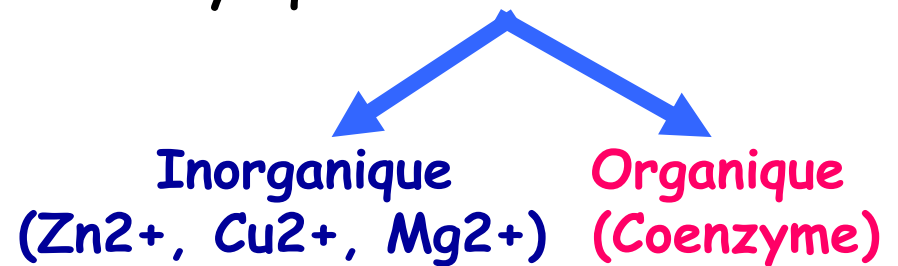
Structure des enzymes

- Seule une **petite partie** de l'enzyme (**2 ou 4 résidus**) est directement impliquée dans la catalyse (**site catalytique**).
- Le **site catalytique** est situé à proximité d'un ou plusieurs **sites de liaison**, au niveau desquels les substrats sont **liés** et **orientés** afin de **permettre la catalyse** de la réaction chimique.
- Le site catalytique et les sites de liaison forment le **site actif** de l'enzyme.
- Le reste de la protéine sert à **maintenir la configuration du site actif** et à y générer les conditions optimales pour le déroulement de la réaction.
- Dans certains cas, la catalyse ne fait intervenir aucun des **résidus d'acides aminés** de l'enzyme mais plutôt un **cofacteur** lié à cette enzyme.
- La structure des enzymes peut également contenir un site de liaison pour un **effecteur allostérique** qui provoque un **changement conformationnel** **activant** ou **inhibant** l'activité enzymatique.

Structure des enzymes

Types des enzymes

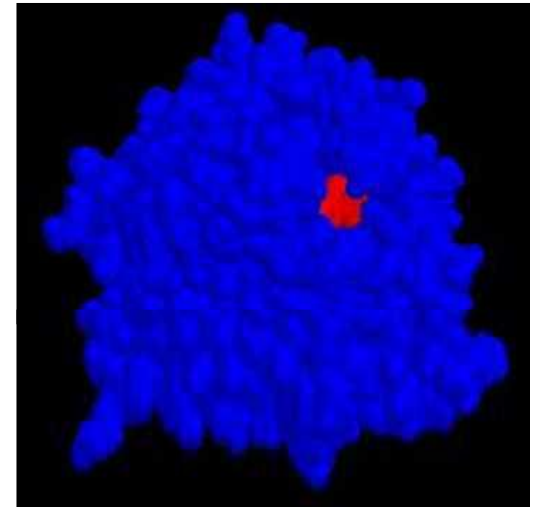
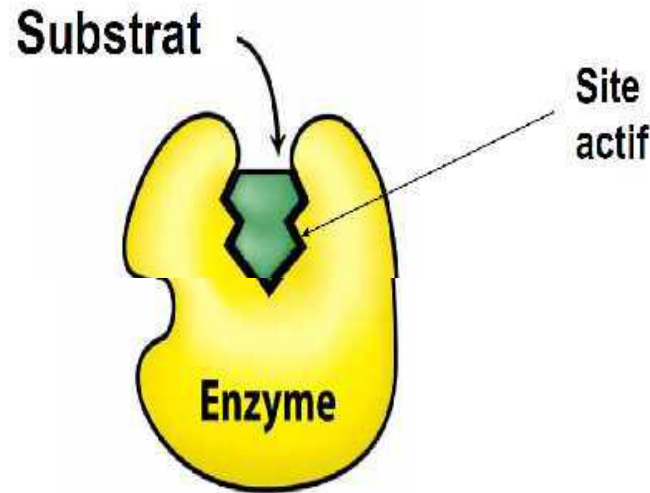
- Enzymes holoprotéiques: $\left\{ \begin{array}{l} \text{Site de fixation= AA} \\ \text{Site catalytique=AA} \end{array} \right.$
- Enzymes hétéroprotéiques: $\left\{ \begin{array}{l} \text{Site de fixation= AA (apoenzyme)} \\ \text{Site catalytique= Cofacteur} \end{array} \right.$



- **Coenzyme vrai (Libre)**: se lie et se dissocie du site actif (NAD, FAD....)
- **Groupelement prosthétique**: le coenzyme est fortement lié au site actif

Structure des enzymes

Site actif



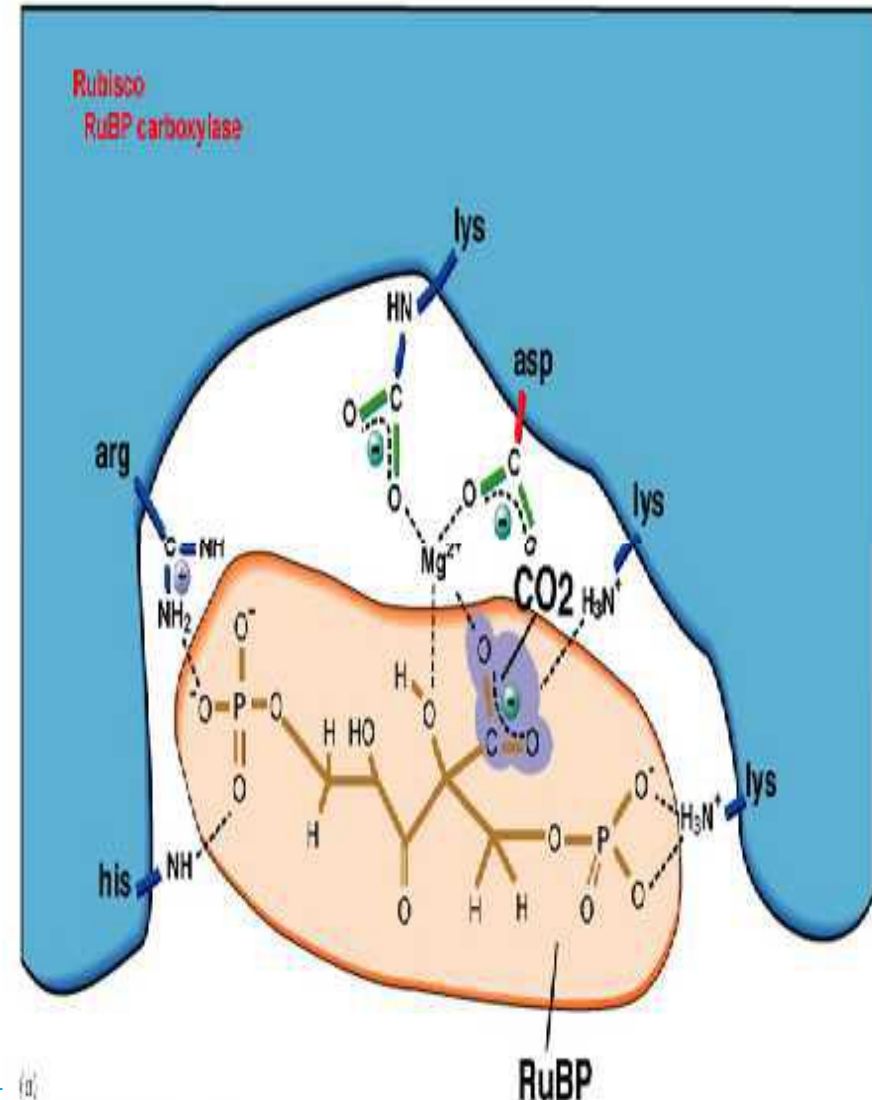
- 1- Située dans la **zone hydrophobe** de la protéine au niveau de laquelle s'exerce le **pouvoir catalytique**.
- 2- Ce site doit être **complémentaire** de point de vue **structural** au **substrat** ou à une partie du substrat.

Structure des enzymes

Site actif

On y distingue :

- **Le site de fixation:** ce site est constitué d'une séquence d'acides aminés fonctionnels qui établissent des liaisons **non covalentes** avec le substrat pour le stabiliser.
- **Le site catalytique:** c'est la partie de la protéine qui est responsable de la **transformation** du substrat en produit.



Structure des enzymes

Hiérarchie des acides aminés sur une enzyme

- **AA. de contact:** établissent des liaisons avec le substrat et assurent la catalyse.
- **AA auxiliaires:** situés dans le site actif mais n'entrent pas en contact avec le substrat, ils permettent la flexibilité de la chaîne peptidique.
- **AA collaborateurs:** (conformation): maintient la forme de l'enzyme.
- **AA non collaborateurs:** (indifférents): on peut les enlever sans réduire l'activité de l'enzyme.

Nomenclature des enzymes

- Le nom de l'enzyme fournit souvent un indice sur sa fonction.
- Dans certains cas, une enzyme est nommée en ajoutant le suffixe **-ase** au nom de son substrat.
- Exemple:
 - L'**uréase** est le nom de l'enzyme qui hydrolyse l'urée.
 - Les **phosphatases** sont des enzymes qui hydrolysent les groupes phosphoryle des molécules organiques phosphorylées.
 - La chymotrypsine peut de façon similaire être appelée **protéinase**, **protéase** ou **peptidase**.

Nomenclature des enzymes

- La plupart des noms d'enzymes contiennent des termes plus descriptifs (aussi terminés par **-ase**) pour indiquer la **nature de la réaction** catalysée par cette enzyme
- **Exemple:**
 - la **pyruvate décarboxylase** catalyse l'ablation d'un groupement CO_2 du pyruvate
 - **L'alanine aminotransférase** catalyse le transfert d'un groupement amino de l'alanine sur un α -céto acide

Classification des enzymes

- La nomenclature reconnaît **six classes de réactions**, les classes contiennent des sous-classes, elles mêmes subdivisées en sous-sous-classes qui regroupent les enzymes ayant des **propriétés communes**.
- Chacun des enzymes sont numérotés, de sorte qu'une série de 4 nombres spécifie très précisément un enzyme; à cette série de nombres s'ajoute un nom systématique qui décrit la réaction.

La classification des enzymes

Groupes généraux		Rôle	Exemple
1	Oxydo-réductases	Catalysent les oxydoréductions (transferts de H^+ et d' e^- entre 2 substrats)	• catalase
2	Transférases	Catalysent le transfert de groupements moléculaires entre 2 substrats	
3	Hydrolases	Catalysent l'hydrolyse de liaisons diverses	• amylase qui hydrolyse l'amidon • carboxypeptidase qui hydrolyse la liaison peptidique où est engagé le dernier acide aminé de la chaîne
4	Lyases	Catalysent soit l'enlèvement d'un groupe (autrement que par hydrolyse) soit l'addition d'un groupement moléculaire	
5	Isomérases	Catalysent les isomérisations	
6	Ligases (= synthétases)	Catalysent l'union de deux molécules en utilisant de l'énergie	• amidon-synthétase (= glucose-polymérase) • Glycogène-synthétase

Classification des enzymes

Numéro de code : E.C. A.B.C.D.

- E.C : Commission des Enzymes
- Le premier chiffre (A): La classe.
- Le second (B): La sous-classe.
- Le troisième (C): La sous sous-classe.
- Le quatrième chiffre (D): Le numéro d'ordre (groupe)

- **Nom systématique** : il indique clairement:
 - La nature du donneur
 - La nature de l'accepteur
 - Le type de réaction catalysée
- **Nom commun recommandé** : c'est une appellation plus simple fréquemment employée

Classification des enzymes

- **Exemple 1:** ATP+ D-glucose  ADP+ D-glucose-6-phosphate
Un groupement phosphate est transféré de l'ATP au C-6-OH du glucose, l'enzyme est donc une **transférase**

Numéro de code : E.C.2.7.1.2

Nom systématique: ATP:D-glucose -6-phosphotransférase

Nom commun: Glucokinase

- **Exemple 2:** Le 1^{er} enzyme enregistré dans la sous-sous-classe est référencé:

Numéro de code : E.C.2.7.1.1,

Nom systématique: ATP:D-hexose -6-phosphotransférase (il n'est pas spécifique d'un D-hexose)

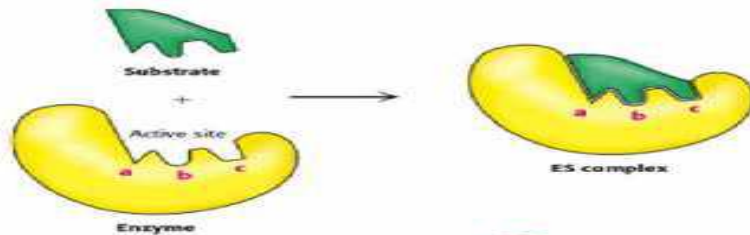
Nom commun: Hexokinase

Spécificité des enzymes

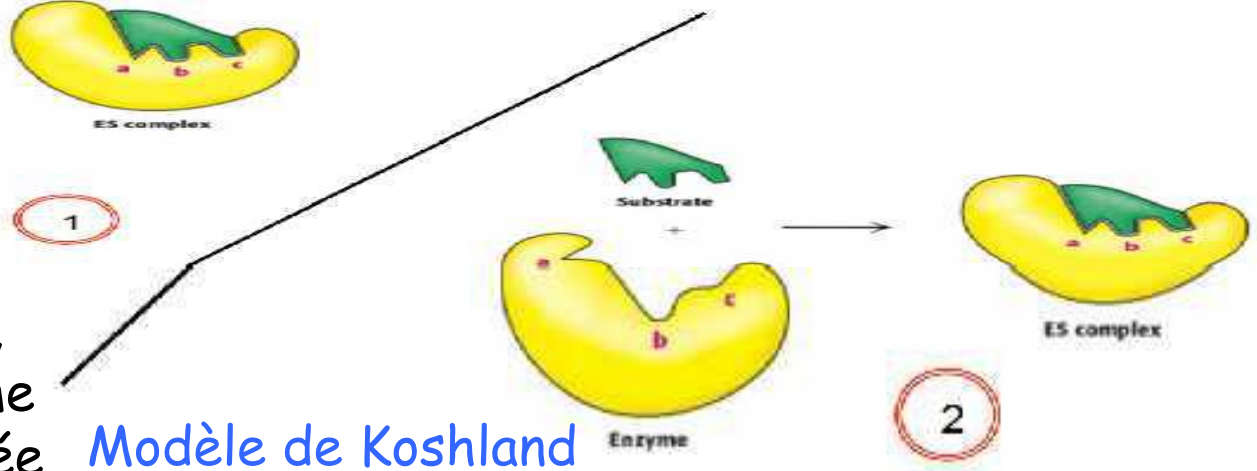
- La plupart des **enzymes** sont **hautement spécifiques** pour leurs substrats et leurs produits.
- D'autres enzymes ont une **spécificité plus large** catalysant une réaction particulière mais sur une classe de substrats
- **Exemple 1:** La chymotrypsine et quelques autres enzymes.
- **Exemple 2:** L'hexokinase(ATP:hexose-6-phosphotransférase) catalyse en présence d'ATP la phosphorylation en position 6 de divers hexoses, y compris le glucose.
- La spécificité résulte de la reconnaissance moléculaire:
 - Le premier modèle proposé est celui de **Fisher**, dit modèle "**clé-serrure**". Basé sur une **complémentarité de forme** entre le substrat et la cavité du site actif. Ce modèle est **statique**, la complémentarité de forme étant pré-existante, il n'y a pas de déformation ni du substrat, ni de l'enzyme lors de la formation de l'interaction entre les deux.

Spécificité des enzymes

- Le modèle de l'ajustement induit de **Koshland**. Basé sur l'hypothèse que la **structure de l'enzyme se déforme pour s'adapter à son substrat**. Une partie de l'énergie d'interaction entre l'enzyme et son substrat est utilisée pour permettre cette déformation, qui contribue à mettre l'**enzyme dans une conformation active**. C'est un modèle **dynamique** où la structure de l'enzyme n'est pas figée.



Modèle de Fisher
Clé-serrure: Rigide,
suppose que l'enzyme
à une structure figée



Modèle de Koshland
Ajustement induit: dynamique,
l'enzyme à une structure flexible

Propriétés des enzymes

- Une enzyme est capable à faible concentration d'accroître la vitesse d'une réaction chimique et se retrouve intacte à la fin de celle-ci.
- Les enzymes sont des substances extrêmement efficaces à basse température (conditions douces) Ex: l'hydrolyse du saccharose en glucose par la saccharase s'effectue immédiatement, tandis qu'il faut chauffer à 100°C pendant plusieurs minutes avec HCL (acide chlorhydrique).
- Une enzyme possède une double spécificité: du substrat et d'action.
- Outre la stabilisation de l'état de transition, les enzymes utilisent des effets de proximité et d'orientation, l'ajustement induit et la catalyse électrostatique pour faciliter les réactions.

Soit la réaction: $S \xrightleftharpoons[2]{1} P$

- Si **S** possède plus d'énergie que **P**, la réaction se fait spontanément dans le sens **1** avec libération d'énergie. La réaction est dite **exergonique** ($\Delta G^\circ < 0$).
- Si **P** possède plus d'énergie que **S**, la réaction ne se fait pas spontanément dans le sens **1**, elle nécessite de l'énergie. La réaction est dite **endergonique** ($\Delta G^\circ > 0$).
 - Elle est spontanée dans le sens **2**.

ENERGIE D'ACTIVATION

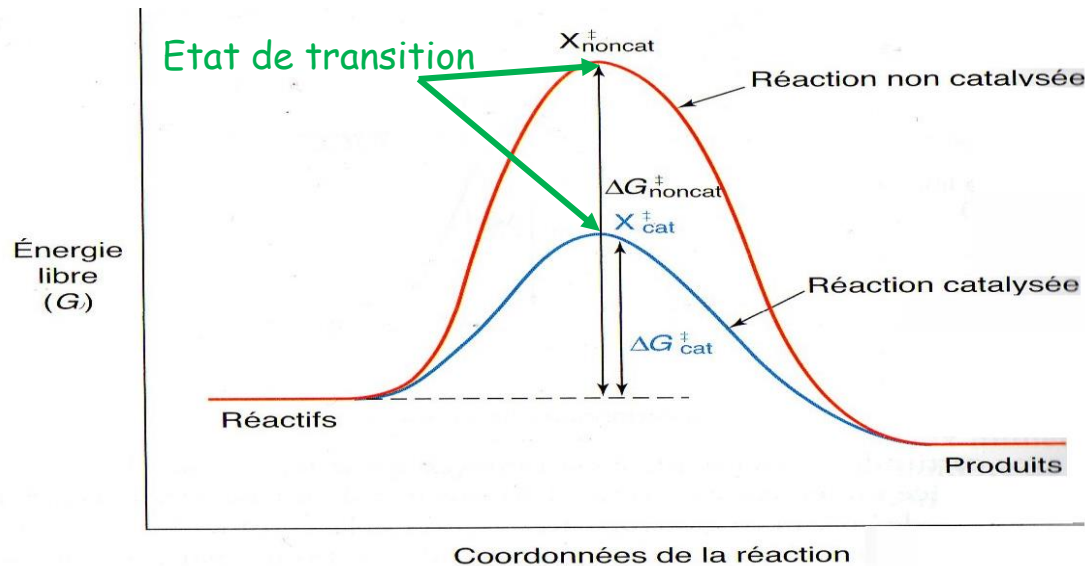
Elle correspond à la quantité d'énergie absorbée par les molécules du substrat, nécessaire pour passer à un **état de transition instable ou état activé**, dans lequel les liaisons sont plus fragiles et plus faciles à briser.

L'état de transition se trouve au sommet de la barrière énergétique.

ENERGIE D'ACTIVATION

- **Energie libre moyenne qu'une molécule de complexe Enzyme-Substrat doit recevoir du milieu environnant pour que la réaction se produise à une vitesse donnée**
- **La vitesse de la réaction sera proportionnelle à l'énergie captée par le système**

Mécanisme d'action des enzymes



Un catalyseur fournit un chemin réactionnel avec une barrière d'énergie d'activation plus basse

$$\Delta G^{\ddagger}_{\text{cat}} < \Delta G^{\ddagger}_{\text{noncat.}}$$

- Un catalyseur **accélère la réaction**, plus il y a de molécules qui atteignent l'**état de transition** par unité de temps, plus de molécules de produit peuvent se former par unité de temps.
- Une enzyme **diminue** la hauteur de la barrière d'énergie d'activation (ΔG) en abaissant l'énergie de l'état de transition.

Mécanisme d'action des enzymes

Les enzymes utilisent des mécanismes de catalyse chimique:

1- La catalyse acido-basique

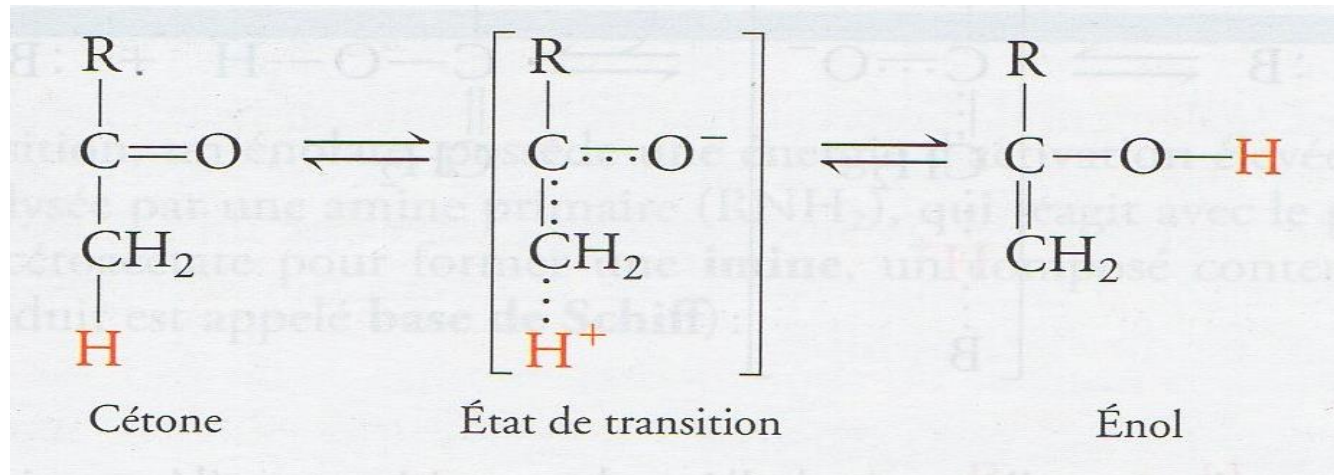
-Dans laquelle un proton est transféré entre l'enzyme et le substrat.

-Ce mécanisme de catalyse peut être à son tour subdivisé en catalyse acide et en catalyse basique, certaines enzymes utilisent l'une ou l'autre, beaucoup utilisent les deux.

Exemple: La tautomérisation d'une cétone en énol.

(les tautomères sont des isomères interconvertibles qui diffèrent par l'emplacement d'un atome d'hydrogène et une double liaison).

Mécanisme d'action des enzymes



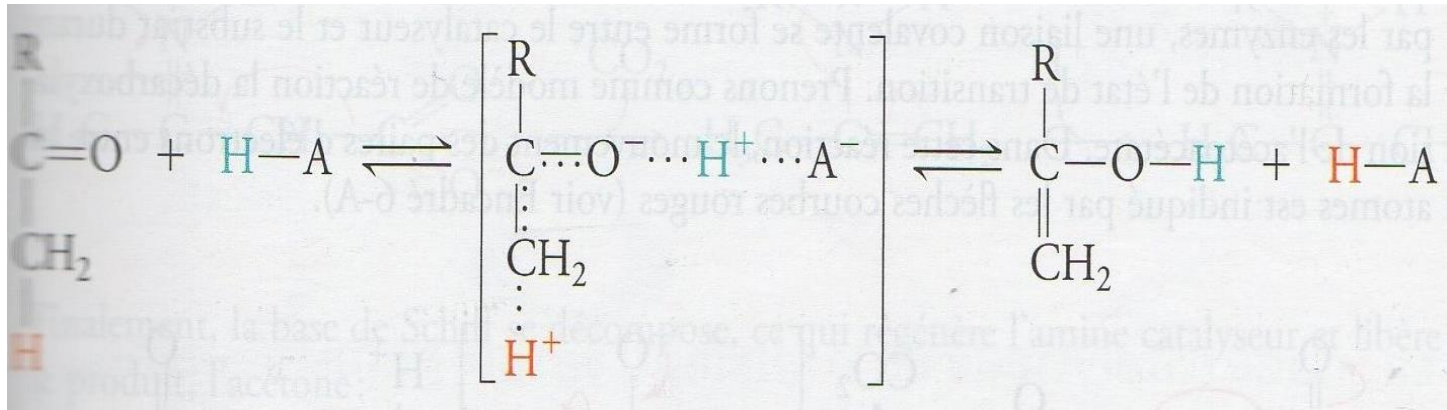
-Ici, l'état de transition est instable, **transitoire**.

-La ligne en pointillés représente des **liaisons** en cour de **rupture** ou de **formation**.

-La réaction **non catalysée se fait lentement** car la formation de l'état de transition de type carbanion a une **barrière d'énergie d'activation élevée** (un carbanion est un composé dans lequel l'atome de carbone porte une charge négative)

Mécanisme d'action des enzymes

Exemple: catalyse acide



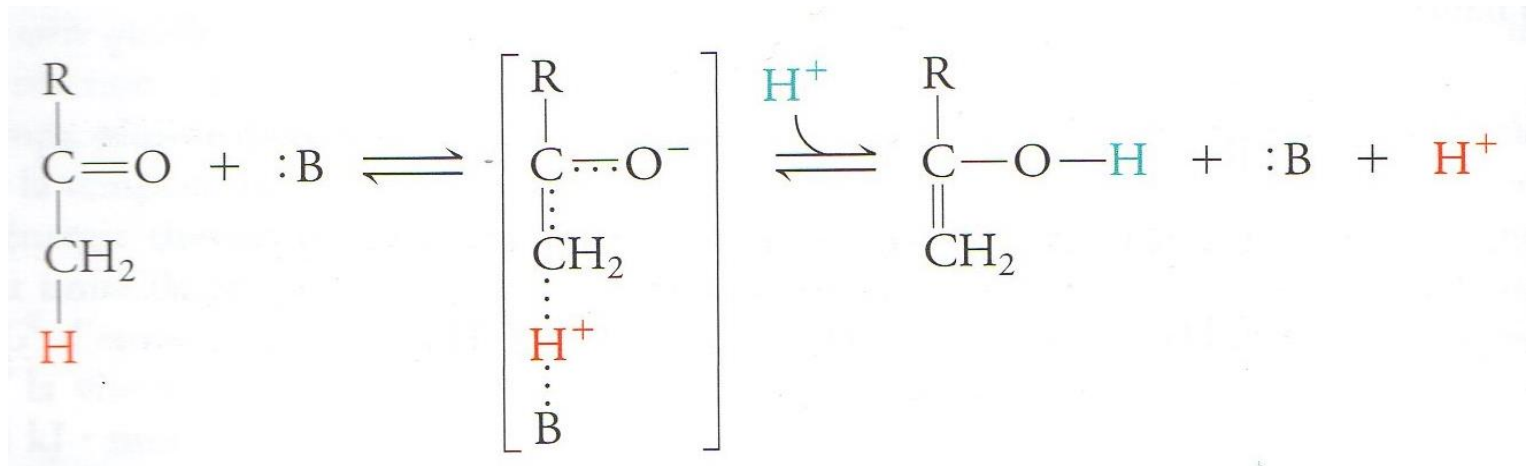
-Lorsqu'un catalyseur ($\text{H}-\text{A}$) cède un proton à l'atome d'oxygène de la cétone: il **réduit** le caractère défavorable de carbanion de l'état de transition d'où une **diminution de son énergie** et donc un **abaissement** de la barrière d'énergie d'activation de la réaction.

-Le catalyseur revient à sa forme originale à la fin de la réaction.

Mécanisme d'action des enzymes

Exemple: catalyse basique

La même réaction de tautomérisation céto-énol peut être accélérée par un **catalyseur qui accepte un proton** (catalyseur **:B**, les points représentent des électrons non appariés).



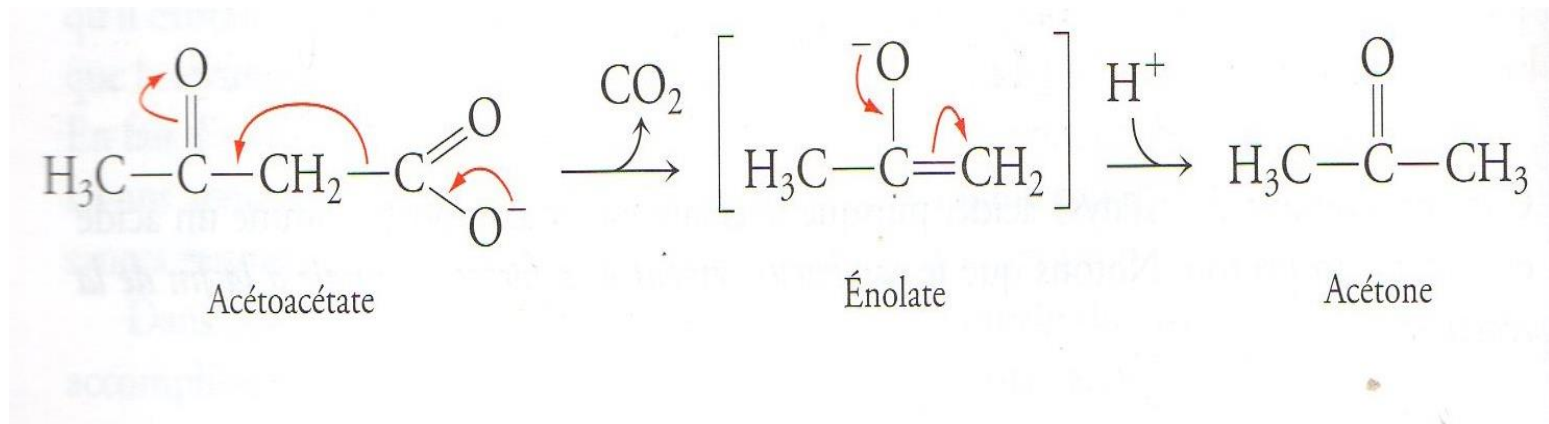
La catalyse basique **diminue l'énergie de l'état de transition**, en **accélérant la réaction**.

Mécanisme d'action des enzymes

2- La catalyse covalente

Une **liaison covalente** se forme entre le catalyseur et le substrat durant la formation de l'**état de transition**.

Exemple: décarboxylation de l'acétoacétate.



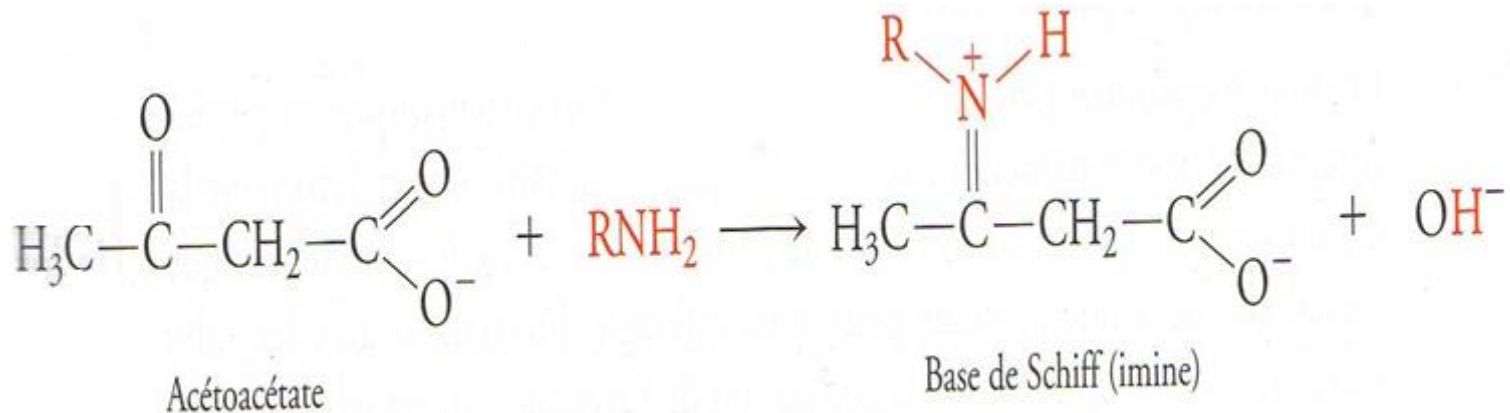
L'état de transition, un énolate possède une énergie d'activation élevée.

Mécanisme d'action des enzymes

2- La catalyse covalente

Exemple: décarboxylation de l'acétoacétate.

Cette réaction peut être catalysée par une **amine primaire** (RNH_2) qui réagit avec le groupement **carbonyle** de l'acétoacétate pour former une **imine** (contenant une liaison $\text{C}=\text{N}$) (**base de Schiff**).

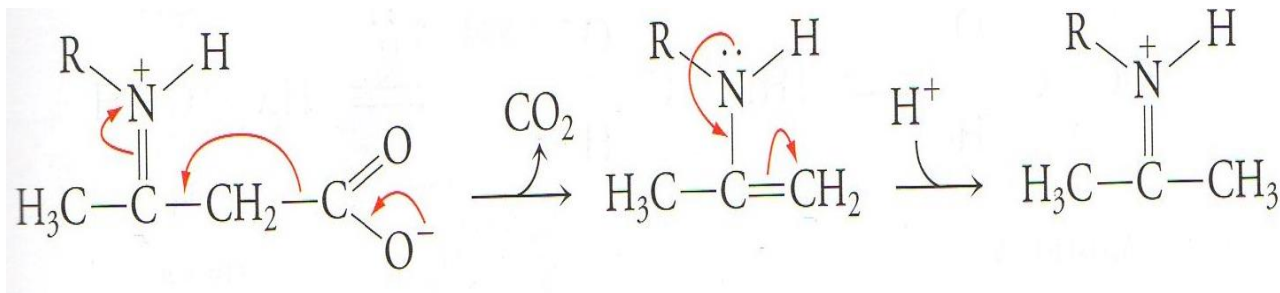


Mécanisme d'action des enzymes

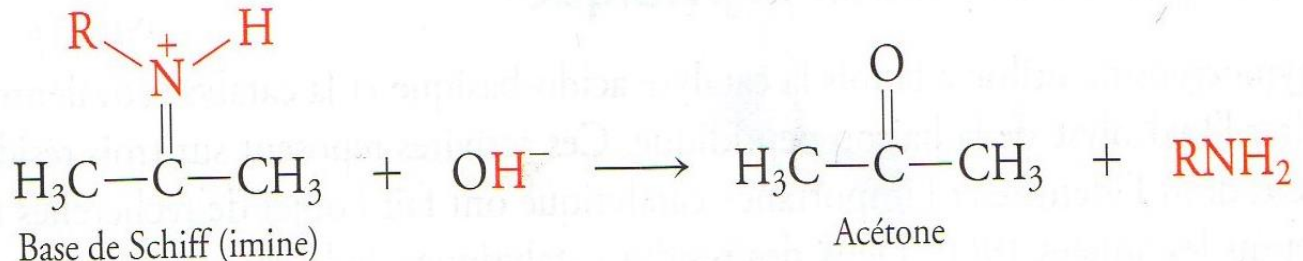
2- La catalyse covalente:

Exemple: décarboxylation de l'acétoacétate.

- L'atome d'azote protoné sert de réservoir d'électrons pour réduire le caractère énolate de l'état de transition dans la réaction de décarboxylation.



- Finalement, la base de Schiff se décompose, ce qui régénère l'amine catalyseur et libère le produit, l'acétone:



Mécanisme d'action des enzymes

3- La catalyse par un ion métallique

- Les ions métalliques participent aux réactions **d'oxido-réduction** en favorisant la réactivité d'autres groupements du site actif de l'enzyme par des effets électrostatiques.
- Un ion métallique lié à une protéine peut aussi interagir directement avec les substrats de la réaction.
- **Exemple:** la conversion de l'acétaldéhyde en éthanol catalysée par l'alcool déshydrogénase hépatique, un ion de zinc **stabilise** les **charges négatives** qui apparaissent sur l'atome d'oxygène durant l'état de transition.

