

INTRODUCTION

Contexte historique

- Historique :
 - Depuis 1750-1760, suite aux travaux de Réaumur et Spallanzani, qui mettent en évidence l'activité enzymatique par expérience sur le suc gastrique du gésier des oiseaux (digestion de la viande in-vitro, dans tubes ou grains pré-broyés)
 - 1833-1870 : Payen et Persoz montrent que dans extraits d'orge en germination peuvent transformer l'amidon (principe actif 1000 fois supérieures à sa masse)
 - 1850 : Berzelius établit une comparaison entre les propriétés des catalyseurs chimiques et biologiques (qui relèvent du même processus)
 - 1878 : Von Kühne met en évidence chez les levures une substance responsable de fermentations qu'il appelle **enzyme** (du grec "en" = dans et "zûmé" = le jus)
 - 1890 : Emile Fisher définit les propriétés principales des enzymes :
 - catalyseurs biologiques à efficacité >> à celles des catalyseurs chimiques et
 - qui appartiennent à la classe des protéines
 - 1910 : définition des paramètres cinétiques par Victor Henri et Michaëlis
 - 1950 : Purification, identification et caractérisation de l'uréase par Summer;
 - 1960 : RNase = ribonucléase (la plus petite enzyme : 13 700 Da) synthétisées chimiquement par Sanger (deux fois Nobel)
 - 1960 : Jacques Monod et Koshland étudient l'allostérie et la cinétique catalytique pour déboucher sur la notion de régulation métabolique

Problématique à résoudre dans ce chapitre

- Diversité des réactions et des substrats. Etude des cinétiques de réaction. Traitement mathématique des cinétiques michaeliennes
- L'efficacité et la spécificité de la réaction implique une spécificité d'interaction E/S
- On va chercher à monter la (les) relation(s) entre structure et : spécificité / affinité / fonctionnement du site actif / du site catalytique / modulations (régulations) de l'activité

Limites du sujet

- On donnera des ex. choisis parmi ceux vus ailleurs (en TP surtout : catalase, peroxydase)
- On ne traitera pas des voies métaboliques
- On se limitera au traitement mathématique vu au programme de chimie sur les cinétiques michaeliennes (pas de traitement mathématique des enzymes allostériques)

Annonce du plan

- Qu'est-ce qui fait que les enzymes sont des protéines pouvant avoir une **activité** chimique sur d'autres molécules?
 - Notion de **biocatalyseur** : en quoi sont elles plus efficaces que les catalyseurs chimiques
 - Cette efficacité passe par une **spécificité** des protéine par rapport au **ligand** (ici le substrat de la réaction en général), spécificité qui joue sur un type de **réaction** et dans des **conditions** optimales
 - Cette spécificité est souvent optimisée par la liaison à un cofacteur
- Cette activité est **régulée**, mettant en adéquation la production et les besoins
 - on traitera du cas général puis
 - des différents types d'inhibitions et enfin
 - le cas des enzymes allostériques qui ont souvent un rôle charnière dans le métabolisme cellulaire.

I. Activité enzymatique : catalyse d'une réaction spécifique

Les réactions qui participent à la vie sont presque toutes médiées par des catalyseurs biochimiques remarquables : les enzymes. Ces molécules sont soumises aux mêmes lois de la thermodynamique que les autres substances mais elles diffèrent des catalyseurs chimiques par :

- leur **vitesse** de réaction élevée,
- des conditions d'action plus **douces** compatibles avec les composants cellulaires
- une plus grande **spécificité** de réaction (ex: synthèse des protéines, dans les ribosomes de plus de 1000 acides aminés sans erreur alors que chimiquement on est limité à 50 acides aminés, ensuite il y a trop de produits de réactions parallèles)
- leur capacités de régulation qui mettent en adéquation leur activité avec les besoins de la cellule et de l'organisme

A- Les enzymes : des biocatalyseurs

- Définition d'un biocatalyseur : facilite les réactions du catabolisme et de l'anabolisme avec des vitesses compatibles avec la vie (à 37°C chez les homéothermes)

1- Un catalyseur accélère une réaction sans intervenir dans son bilan chimique

a) Une réaction est spontanée quand sa variation d'énergie libre standard < 0

Rappel des 2 principes de thermodynamique et des principales grandeurs thermodynamiques ΔU , ΔH , ΔG

N.B. : Code couleur = en bleu, ce qui n'a pas été dit en classe dans ce cours mais qui sera dit dans le cours sur le métabolisme

VOIR COURS sur le METABOLISME : thermodynamique biologique des processus à l'équilibre

- Définition d'énergie

(exprimée en Joule = 1 Newton * 1 mètre):

- capacité d'un système à fournir un travail
- cela sous-entend que le système possède des **réserves** sous la forme :
 - énergie potentielle : fonction de la position
ex. : un objet sur une table possède, dans le champ de force gravitationnel terrestre, une énergie potentielle qui est fonction de sa masse et de sa position (en hauteur). Cette énergie potentielle pourra être utilisée pour un travail : casser un carreau en tombant, par exemple
 - énergie cinétique : fonction de la vitesse

- A l'équilibre :

un système qui passe de l'état initial I à l'état final F échange de l'énergie avec l'environnement :

- sous forme ordonnée = travail **W** ou
- sous forme désordonnée = chaleur **Q**
- **W** et **Q** sont appelées **grandeurs de transfert** (traversent les limites du système lors de son évolution d'un état initial vers un état final)

- Le **travail** fourni est de type :

- mécanique : déplacement de particules (produit scalaire d'une force par distance, s'exprime en Newton mètre qui équivaut à des Joules, pour une mole de système considéré), transports actifs à travers une membrane...
- électrique (ou photonique)
- chimique.: synthèses de nouvelles molécules, établissement de liaisons covalentes : phosphorylations etc.
- C'est le produit scalaire (noté " \cdot ") de la force par le déplacement. Il s'exprime en gm^2s^{-2} (fonction de la masse, de la distance parcourue et du temps)
- Un déplacement ordonné de matière conduit à la création d'un gradient de potentiels

- La **chaleur** est fonction de l'énergie cinétique des particules (qui changent de trajectoire à chaque choc, donc le déplacement n'est pas ordonné), s'exprime en joules, pour une mole de système considéré.

- Dans le cas des machines thermiques, la chaleur qui s'écoule du chaud vers le froid est utilisée pour fournir un travail

- Mais dans le cas des cellules (qui ne sont pas des machines thermiques), l'énergie dégradée sous forme de chaleur est "perdue" (non utilisable pour un travail)

- Au cours d'une réaction, l'**évolution** du système d'un état initial I vers un état final F est caractérisé par des **FONCTIONS de variables d'ETAT**. Ces fonctions sont indépendantes du chemin emprunté entre I et F.

a1) Premier principe de thermodynamique : l'énergie totale est toujours conservée

- On appelle "U" l'énergie interne du système considéré

- Il est impossible de mesurer directement l'énergie contenue dans un système. Par contre, on peut mesurer la **variation** d'énergie interne d'un système qui passe d'un état I à un état F :

$$U_F - U_I = \Delta U$$

- Noter que ΔU est indépendant du chemin suivi c'est-à-dire que l'on ne s'intéresse pas aux mécanismes qui interviennent lors du passage de I vers F

- **Premier principe de thermodynamique** : "rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme"

- On appelle ΔU la quantité d'énergie apportée au système, sous forme de travail ou de chaleur :

$$\Delta U = W + Q$$

- CONVENTION : Q exprime la quantité de chaleur **reçue** (absorbée) par le système et W le travail **appliqué** sur le système (donc $\Delta U > 0$)

- Un système qui fournit un travail ou de la chaleur voit donc son énergie interne totale diminuer ($\Delta U < 0$)

- Chaleur et travail sont interconvertibles

a2) Variation d'enthalpie (ΔH) : mesure de l'énergie transférée sous forme de chaleur

$$H = U + PV$$

- A pression P constante, on a :

$$\Delta H = \Delta U + P\Delta V$$

$$\Delta U = \Delta H - P\Delta V$$

$$Q = Q_P$$

$$\Delta H = Q_P \text{ et } W = -P\Delta V$$

- Si $\Delta H > 0$, la réaction (passage de I à F) absorbe de la chaleur : elle est **endothermique**.

Ex. : vaporisation de l'eau à 25°C $\Delta H = 44 \text{ kJmol}^{-1}$

- Si $\Delta H < 0$, la réaction est **exothermique**.

Ex. : oxydation du glucose en CO₂ et eau à 25°C $\Delta H = -2804 \text{ kJmol}^{-1}$

- Application : ΔH permet le calcul de la variation de l'énergie interne ΔU d'un composé par mesure du dégagement de chaleur associée à sa dégradation complète (sans travail fourni)

- On parle de variation d'enthalpie molaire standard de réaction, i.e. dans les conditions standards $\Delta_r H$:

- à 25°C (298 K),

- 1 atmosphère (= 101,3 kPa),

- 1 mole par litre et par réactif

(en biochimie, on prend souvent à pH=7; on note alors $\Delta_r H^{o'}$)

Transition :

- On décrit des échanges d'énergie au cours d'une réaction à P = cste;

- W et Q sont interconvertibles;

- Lequel est le plus probable (W ou Q) ?

- Quelle est la quantité d'énergie qui sera utilisable par la cellule (W), sachant que la cellule n'est pas une machine thermique?

a3) Deuxième principe de thermodynamique et prédiction du sens spontané d'une réaction

- ΔU et sens spontané de réaction ne sont pas liés
 - La majorité des phénomènes spontanés observables tous les jours, comme la chute des objets ou le refroidissement des corps, se fait avec diminution de l'énergie interne du système considéré.
 - Cependant, il existe un très grand nombre d'exceptions : des phénomènes spontanés avec augmentation de l'énergie interne du système. Ex. : la fonte d'un cube de glace dans de l'eau à 1°C est spontanée alors que l'eau est dans un état énergétique supérieur à la glace : la chaleur est absorbée par le système au cours de la fonte
- Définition de l'entropie S
 - On introduit une fonction thermodynamique qui rend compte du désordre d'un système (S augmente avec le désordre)
 - Ex. Dans le cas d'un échange réversible de chaleur, $Q > 0$; et $T_{ext} = T_{syst}$ d'où
$$\Delta S = Q/T \text{ (positif)}$$
$$S = 0 \text{ à } T = 0 \text{ K } (-273^\circ\text{C})$$
- Énoncé du Deuxième principe de thermodynamique
 - Une réaction spontanée se fait dans le sens qui entraîne une augmentation de l'entropie **totale** (de l'univers : du système **et** de son environnement) : le désordre est plus probable que l'ordre!
 - $S_F > S_I$

a4) Variation d'énergie libre de Gibbs (notée " ΔG ") : la quantité d'énergie disponible pour un travail

- Définition de l'énergie libre de Gibbs
 - Lorsqu'on s'intéresse au sens d'une réaction chimique, la fonction entropie n'est pas adaptée car elle considère des variations du système **et** de son environnement
 - On introduit une fonction $G = H - TS$
 - qui ne dépend pas de l'environnement mais
 - qui atteint un minimum à l'équilibre et
 - sert donc d'indicateur du **sens** de faisabilité d'une réaction et
 - qui permet de mesurer la quantité d'énergie disponible pour un travail, au cours de cette réaction,
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$
- Cas de la majorité des phénomènes biologiques : réactions à $V = \text{cste}$:
 - Quelques exceptions comme la plasmolyse/turgescence et les réactions avec dégagement gazeux
 - $\Delta H = \Delta U$
 - $T\Delta S$ est la part d'énergie non disponible pour un travail (hors cas des machines thermiques)
 - à $T = \text{cste.}$ et $P = \text{cste.}$
$$\Delta G = W_{\max}$$

Si $\Delta G < 0$, $W < 0$, travail récupérable!

- Préviation du sens de la réaction
 - $\Delta G = 0$: le processus est à l'équilibre (pas de réaction)
 - $\Delta G > 0$: réaction **endergonique** nécessite apport d'énergie extérieur (le système gagne de l'énergie interne et de l'ordre ou alors le système gagne plus d'énergie interne qu'il ne perd d'ordre)
 - $\Delta G < 0$: réaction **exergonique** spontanée
 - soit l'énergie interne et l'ordre diminuent
 - soit si l'énergie interne augmente, alors l'ordre diminue de manière significativement supérieure
- Attention : pour que ΔG soit utilisable, il faut qu'il y ait un **système accepteur** d'énergie couplé à la réaction (une réaction endergonique, par ex.!) sinon, l'énergie sera dissipée sous forme de chaleur.

b) L'association avec le catalyseur stabilise des intermédiaires réactionnels instables

b1) Principe

- fait chuter l'énergie d'activation nécessaire pour réaliser la réaction chimique

b2) Mise en évidence expérimentale :

- Avec des anticorps dirigés contre des intermédiaires instables
- L'association avec l'anticorps stabilise l'intermédiaire
- La vitesse de la réaction est multipliée par 1000 en général

c) Conséquences de l'intervention d'un catalyseur dans une réaction

- Le catalyseur n'oriente ni ne déclenche la réaction : il ne modifie pas les caractères thermodynamiques de la réaction (possible ou pas)
- La réaction est en principe réversible
 - en pratique, les réactions sont orientées :
 - par consommation du produit par une réaction couplée qui tire la première réaction dans un sens préférentiel ou
 - par changement d'un compartiment vers un autre (entrée du Glucose dans la cellule et Phosphorylation de Glu6P par hexokinase) lorsque les enzymes sont membranaires ex : tonoplastes et fructosyltransférase participant à la synthèse de l'inuline)
- L'énergie fournie par le catalyseur est restituée
- Le catalyseur est intact : il peut servir pour plusieurs molécules de substrat ; il n'est nécessaire qu'à faibles doses
- Le catalyseur modifie seulement la vitesse de la réaction (plus efficace) : il diminue l'énergie d'activation E_a nécessaire à la transformation des substrats en produits

2- Temps de demi réaction et cinétique enzymatique

a) Le temps de demi réaction peut être divisé d'un facteur 10^6 à 10^{12}

- temps pour que 50% des molécules soient transformées

- Expériences :

- Transformation chimique/enzymatique de l'empois **d'amidon**
- Décomposition de **l'urée** dans l'eau à 25-37°C



- spontanément : temps de demi réaction = 10^9 s; $k=1.8 \cdot 10^{-8} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$; $E_a = 103 \text{ kJ mol}^{-1}$
- avec uréase : temps de demi réaction = 10^{-1} s; $k=1.6 \cdot 10^{+8} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$; $E_a = 28.5 \text{ kJ mol}^{-1}$

Liaison : Cette rapidité est liée à la forte affinité de l'enzyme pour son substrat quant à la réaction considérée et dans des conditions particulières

b) Les cinétique enzymatique de type Michaeliennes donne l'affinité et l'efficacité catalytique de l'enzyme

- On n'étudie que ces cas : accède à des **temps de réaction de l'ordre de 1 à 10s**.
- Il existe aussi lois plus complexes pour accéder à des temps inf : de 10^{-3} à 1 s = cinétiques rapides.
- Pour les cinétiques plus rapides qui correspondent à la relaxation de la molécule, on utilise :
 - méthodes de saut des températures (jusqu'à 10^{-6} s),
 - absorption des ultra-sons (jusqu'à 10^{-8} s),
 - perturbations électriques (jusqu'à 10^{-9} s) et
 - spectroscopie (jusqu'à 10^{-12} s)

b1- Mesure des cinétiques

- On suit dP en fct de temps : c'est une constantes pour les premiers temps de la réaction (réaction d'ordre 1) puis dP/dt diminue puis devient nul. L'arrêt de la réaction peut être dû
 - à l'épuisement de S
 - à la réversibilité de la réaction
 - à une inhibition par P
- On suit l'influence de [S] sur la cinétique d'apparition de P : la vitesse initiale augmente puis se stabilise à une vitesse initiale maximale v_{\max} : il y a saturation de E
- Si on représente v initiale en fct de [S], on aura v_{\max} asymptote
- L'influence de [E] sur v_{initiale} conduit à une croissance linéaire de v_{initiale} (tant que $S \gg E$)

b2- Traitement mathématique des cinétiques

a) Axiome de michaëlis : condition de pseudo-équilibre

- On travail aux vitesses initiales donc [P]=0 donc k_{-2} négligeable
- $S \gg E$, v_i , $k_2 \ll k_{-1}$

$$v = v_{\max} S / (K_S + S)$$

est exprimé en fonction de 2 paramètres mesurables : [S] et K_S , constante de dissociation de (ES), avec

$$K_S = k_{-1} / k_1$$

et

$$v_{\max} = k_2 [E_T]$$

b) Axiome de Haldane : état quasi stationnaire

$S \gg E$, v_i , $P=0$

Après une courte période d'induction pré-stationnaire pendant lequel ES se forme, on aboutit à un état stationnaire marqué par la constance de [ES]

$$d[ES]/dt = 0 = k_1 [E][S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] \text{ d'où}$$

$$[ES] = [E][S] / ((k_{-1} + k_{-2}) / k_1) = [E][S] / K_M \text{ avec}$$

$$K_M = ((k_{-1} + k_{-2}) / k_1)$$

$$v_o = k_2 / K_M [E][S]$$

- On exprime v_o en fonction de [E] initial et [S]initial. Comme on travaille aux vitesses initiales donc [S]=[S]₀ d'où

$$v_o = k_2 [E_o] [S]_0 / K_M + [S]_0$$

c) Signification de v_M et K_M

- V_M vitesse de réaction à saturation de l'enzyme. Si la réaction est exprimée en mole de substrat consommé par s et E en mole alors donne l'activité en mol s^{-1} (moléculaire spécifique?) de l'enzyme
- Quand $[S]_0 \gg K_M$, alors v_o tend vers $k_2 [E_o]$ appelée v_{\max}
- $K_M \neq K_S$: ce n'est pas la constante de dissociation de ES. Dans un cas simple où il n'y a qu'une étape, c'est **l'inverse de l'affinité** de l'enzyme pour le substrat. Sinon, c'est une constante opérationnelle d'autant plus complexe qu'il y a d'étapes intermédiaires. Elle représente $[S]_0$ telle que $v_o = v_{\max}/2$

- Si K_m faible, cela signifie que l'enzyme est étroitement associée à S car atteint V_{max} rapidement

- Vitesse de turnover : $V_{max} / [Enzyme]$; de l'ordre de 100 molécules par secondes et par molécule d'enzyme

(parfois bien plus : anhydrase carbonique $CO_2 + 2 H_2O$ donne $HCO_3^- + H_3O^+$ turnover = 600 000 s^{-1} ; acétylcholine estérase turnover = 280 000 s^{-1}). Donne une idée de la quantité de substrat qu'une seule molécule peut transformer en un temps donné.

d) Représentations graphiques

- Plutôt que de mesurer V_m et K_m par une asymptote à la courbe $v = f(S)$, on préfère, pour des raisons de précision, mesurer ces valeurs par des intersections de droites

- Trois types de représentation :

- Lineweaver et Burk : $1/v_0 = 1/v_{max} + K_m/v_{max} * 1/[S]_0$

[facultatif : - Hanes et Dixon : S/v fct de S

- Hofstee : v fct de v/S]

CONCLUSION PARTIELLE : Les valeurs de v_M et K_M caractéristiques de l'enzyme déterminent la limite inf de S pour que l'enzyme ait une activité notable et le flux maximum de métabolites à travers cette étape dans les conditions de fonctionnement optimum

B. Spécificités des enzymes

1. Spécificité de substrat et notion de site actif

a) Mise en évidence d'un complexe enzyme-substrat

a1) Difficultés et astuce de l'étude de ES

- L'enzyme est une macromolécule. On ne peut avoir plus de 1g/l en solution à cause de la viscosité

- Dans la cellule, possibilité de complexes multienzymatiques ou de surconcentrations dans les compartiments (ex. d'un compartiment ne représentant que 10% du volume cellulaire : l'augmentation relative de la concentration du substrat est par 10!)

- ex : Masse = $10^5 Da$ (la plus petite enzyme synthétisée est la RNase qui fait 13,7 kD) *□■*

[enzyme] = $1/10^5 = 10^{-5} molL^{-1}$

- Astuce : E+S donne réversiblement (en présence de coenzyme) ES qui donne réversiblement E+P

- Si on ne met pas le coenzyme, ES reste stable

- Si on met un analogue du substrat non transformable en produit ES ne peut donner P + E

a2) Méthodes d'étude

Pour avoir accès aux concentrations en E, ES et/ou P :

b1) Ultracentrifugation

b2) Dialyse à l'équilibre

Permet d'obtenir le nombre de site actifs de l'enzyme pour le substrat

b3) Tamisage moléculaire sur billes de Céphadex ou biogel

b4) Spectrométrie

b) Complémentarité géométrique de E pour S : notion de site actif

b1) Ancien modèle Modèle clef-serrure

- le site actif est préformé (poche ou sillon)

- La complémentarité géométrique est large (à la surface de la protéine)

- il existe une toute petite région à la surface de la macromolécule impliquée dans la réaction; en général, c'est un creux

- Les enzymes qui agissent sur ADN, bactéries (peptidoglycane), et autres macromolécules ont un site actif étendu (ex : hélices ou en gouttière; cf. lysosomes); mais il existe toujours une sous-région constituée de peu d'acides aminés

b2) Ajustement induit de conformation

α) Méthode d'étude

- Analyse de cristallographie aux RX

β) Interprétation

- suite à une première fixation, acquisition de la bonne conformation.
- Ex. hexokinase possède deux domaines; la fixation du Glucose favorise la formation de liaisons hydrogènes nombreuses entre les sous unités et le glucose qui ferme la poche, rapproche les acides aminés et favorise l'activité enzymatique. Cette enzyme fixe un P sur Glu donnant Glu6P qui ne peut ressortir de la cellule

γ) Généralisation

- pratiquement toutes les enzymes sont légèrement modifiées par la fixation du substrat ("respiration moléculaire")

b3) Stéréospécificité :

- Stéréospécificité par rapport au substrat : isomère L ou D
ex : trypsine hydrolyse polypeptides composés de L-acides aminés
- Stéréospécificité de la réaction sur des analogues (épimères, énantiomères) d'un même substrat
ex : glucose oxydase sur βDglucose donne Dgluconolactone :
 - à partir du βDglucose : 100% efficace
 - à partir du αDglucose : 0,6% efficace
 - à partir du Dgalactose : 0,1% efficace
 - à partir du 2-déoxyglucose : 25% efficace
- Principe de la sélectivité d'une liaison à priori symétrique par rapport à l'autre : du à position à la surface de l'enzyme des résidus du site actif qui fixent le substrat en 3D

2- Spécificité de réaction et notion de site catalytique

Problématique : spécificité de réaction liée à positionnement optimal de certains groupes réactifs du substrat avec intervention d'un très petit nombre d'acides aminés responsables de mise en place de liaison covalente avec le substrat et interactions électroniques permettant réaction chimique

a) Mee expérimentale de l'importance de la position de groupes fonctionnels du site catalytique : cas de la mutarotation du glucose

- 1952 : Expérience de Swain et Brown, qui soupçonnent que l'enzyme permet à des **groupements réactifs** d'être en position optimale pour la réaction.

a1) Problématique :

Cherchent à mimer action de la mutarotase qui interconverti glucose α et glucose β 10.000 fois plus vite que phénomène spontané. On sait qu'un acide faible comme le phénol et une base faible comme la pyridine augmentent la vitesse de réaction proportionnellement à leur concentration : c'est donc une catalyse acido-basique qui intervient.

a2) Hypothèse :

- Ils cherchent une molécule simple qui mime le travaille de l'enzyme (permette la catalyse) en présentant les groupements OH et H⁺ en bonne configuration
- Ils associent la base faible = pyridine et l'acide faible = phénol sous forme d'ortho-hydroxy-pyridine.

a3) Résultats :

On obtient 10.000 fois plus vite la mutarotation du glucose α en glucose β que sans acide ni base mais à une vitesse telle qu'elle ne serait jamais atteignable même avec de très fortes concentrations d'acide et de base en solution. On a donc bien mimé l'action de la mutarotase!

a4) Interprétation physiologique :

- la mutarotase doit être une chaîne polypeptidique où apparaît :
 - un OH (sérine; importante dans les protéases à sérine) proche
 - d'une base faible (Lysine ou Arg) en 3D permettant l'interaction simultanée sur OH et H⁺

b) Taille du site catalytique

- Le site catalytique est constitué d'un petit nombre d'acides aminés, regroupés par repliement spatial (SIII), directement impliquée dans la transformation chimique (Les acides aminés qui participent au site catalytique ne se succèdent pas dans la chaîne mais se retrouvent proches suite au repliement 3D)

- Taille d'un site catalytique < 10 acides aminés
- La modification par génie génétique d'un seul acide aminé qui ne déplace les autres acides aminés que de moins d'un angstrom modifie l'activité de l'enzyme en moyenne par 1000

c) Mécanisme d'action catalytique : Ex. de la Chymotrypsine

- 1- Arrivée et Positionnement du substrat sur le **site actif**
- 2- Clivage de la **liaison covalente** et **transfert de charges** entre acides aminés du site catalytique (Ser 195, His 57 et Asp 102)
- 3- Liaison covalente d'une partie du substrat à l'enzyme et départ de l'autre partie du substrat (premier produit)
- 4- Action d'une molécule d'**eau** sur l'acyl-enzyme; rupture de la liaison enzyme-substrat
- 5- Départ du second produit (par **répulsion de charges**)

d) Classification des enzymes

- On connaît environ 10.000 enzymes (dont 600 endonucléases de restriction)
- Les bases de la classification reposent d'abord sur la classe de l'enzyme :
 - transférase 30%
 - oxydoréductase 25%
 - hydrolase 24%
 - Lyase 13% catalyse formation d'une liaison par condensation
 - Ligase ou synthétase 5% catalyse formation d'une liaison par hydrolyse d'ATP
 - Isomérase 3%

puis sur le type de groupe intervenant dans la réaction

- 1 : CH-OH
- 2 : C=O
- 3: CH=CH
- 4 : CH-NH₂,
- 5 : CH-NH
- 6 : NAPH-NADPH

3- Spécificités de conditions d'action

a) Effet du pH sur les réactions enzymatiques

- Pour la plupart des enzymes, on distingue une **étroite zone de pH optimum**
- L'étude des effets du pH sur l'activité enzymatique peut renseigner sur la nature des résidus amino-acides qui participent aux différentes étapes du processus catalytique
- **L'ionisation du substrat** peut exercer un effet sur la fixation de l'enzyme
- **Les courbes en cloche** d'activité suggèrent qu'au moins deux groupes ionisables interviennent dans la réaction (Un nombre restreint de groupes ionisables peut être impliqué : acides carboxyliques et aminés). La forme active de l'enzyme est celle où un des 2 groupes est ionisé et pas l'autre. La forme inactive correspond à une dénaturation du site catalytique au moins, de la S3D de l'enzyme dans les cas les plus extrêmes de pH.

b) Effet de la température - protection partielle par le substrat contre la dénaturation de l'enzyme

- **Courbe d'effet de la température** :
 - aux basses températures, loi du $Q_{10} = 2$ (quand la chaleur fournie au système augmente de 10°C alors la vitesse double)
 - température optimale puis
 - dénaturation thermique
- **Rappel** : L'instabilité du catalyseur est due au fait que, hormis les ponts disulfure, seules les liaisons faibles assurent la SIII (cf. cours prot.). On rappelle que la chaleur augmente l'entropie. Donc, si on chauffe une enzyme au-delà d'une certaine température critique, elle se dénature.
- **Méthode d'étude** : Analyse des paramètres de dénaturation (intérêts appliqués en industrie). Le processus de dénaturation peut être quantifié quand la réaction est réversible
- **Résultats** :

- nombre de sous-unités
- existence de groupes prosthétiques (molécules associées organiques = coenzymes; molécules associées inorganiques = métaux ou cations)
- identification des radicaux chimiques qui interviennent dans la réaction
- topologie du site catalytique (= site actif)
- **ses propriétés catalytiques** : il faut définir
 - la séquence de la réaction chimique,
 - la nature du substrat et de l'effecteur qui en module l'activité,
 - les paramètres cinétiques caractéristiques,
 - les paramètres thermodynamiques que expliquent l'efficacité de la catalyse

II. Régulations de l'activité enzymatique

La **catalyse** est un phénomène qui augmente la vitesse à laquelle une réaction approche de l'équilibre. La formation du complexe ES divise la réaction en une ou plusieurs étapes intermédiaires plus faciles thermodynamiquement

1- Régulation générales

(cas des enzymes allostériques traité au § suivant)

a) Par modifications covalentes : cas des Phosphorylation

ex : glycogène phosphorylase
transforme Glycogène en Glu1P
Limite du programme :

Adénylation

- fixation d'une base azoté adénosine \pm phosphorylée (ex. AMP, ADP, ATP)
- ex : glutamine synthétase de E. Coli

Addition lipidique

- Addition d'acides gras ou de radicaux isopréniques
- Commencent juste à être étudiés

b) Régulations propres aux paramètres cinétiques des enzymes

- Les valeurs de K_M et v_M caractéristiques de l'enzyme déterminent la limite inf de [S] pour que l'enzyme ait une activité notable et le flux maximum de métabolites à travers cette étape dans les conditions de fonctionnement optimum

- Dans la cellule, les [S] sont souvent proches du K_M donc les enzymes ne fonctionnent pas à V_M . Toutefois, les adaptations résultant d'une augmentation transitoire de S peuvent rendre plus efficace l'action d'une enzyme

ex : augmentation de dNTP X10 en fin de G1 ce qui accroît l'efficacité de la synthèse de l'ADN par la DNAPolymerase pdt la phase S d'un facteur 100

- Des formes différentes d'enzymes effectuant la même réaction existent dans différents tissus
ex : **hexokinase** dans foie et muscle a $K_M=0.35$ mM est saturée pour une glycémie normale (1g/L=5mM) donc travaille à v_M .

Glucokinase du foie seulement à $K_M= 5$ mM donc ne travaille pas à v_M et pourra s'adapter pour mise en réserve en fonction de la glycémie

- Cas des isoenzymes
- Différentes formes d'une enzyme lié à la combinaison différente des mêmes chaînes polypeptidiques
- ex 1 : lactate deshydrogénase A4, A3B, A2B2, AB3, B4, A4 prédomine dans le muscle, Km par rapport au pyruvate faible donc accumulation d'acide lactique; B4 prédomine dans le cœur, très active donc utilisation du lactate par le cœur même en condition anaérobie
- ex 2 : Lactose synthétase fabrique glucides des glycoprotéines membranaires; Dans la glande mammaire des mammifères, s'associe à a-lactalbumine (constituant du lait) et utilise de préférence le D-glucose plutôt que la glucosamine ce qui fournit le lactose du lait!

c) Thermosensibilité des enzymes

- résultant de mutations
 - ex 1 : Tyrosinase qui participe à la synthèse de mélanine : devenue thermosensible (à 1 ou 2° près) chez les chats siamois et ne permet pas la synthèse à 37°C sauf dans les parties les froide du corps = extrémités des pattes, oreilles, face
 - ex 2 : Enzymes définitivement inactives : albinisme = Tyrosine 3 monooxygénase
- Protéines chaperonnes :
 - Hsp 70 précoces au niveau du complexe ribosomique
 - Hsp 60 tardif avant protéolyse

d) Activation de proenzymes inactifs

- ex : activation intestinale par l'entérokinase des zymogènes des enzymes protéolytiques pancréatiques (trypsinogène, chymotrypsinogène, procarboxypeptidase)
- Ces phénomènes sont autocatalytiques
 - Ils permettent de n'activer les enzymes que dans les lieux où cela est nécessaire (digestion intestinale)
 - C'est un moyen de protection des cellules produisant ces enzymes contre une autodigestion (phénomène qui se couple éventuellement avec inhibition locale comme le BPTI : bovin pancreatic trypsin inhibitor)

e) Inhibition compétitive

- Valable pour toutes les enzymes sans exception
- Les analogues structuraux du substrat peuvent être des produits intermédiaires du métabolisme cellulaire
- Traitement à l'état stationnaire
- S et I sont mutuellement **exclusifs**
- $K'_m = K_m (1 + [I]/K_i)$
- Ex : alpha D glucose au lieu de bêta D glucose pour glucose oxydase
- Ex avec Km chiffré : L-alanine sur Alanine déshydrogénase ($K_i = 2 \cdot 10^{-2} M^{-1}$) au lieu de D-Alanine ($K_M = 1,7 \cdot 10^3 M^{-1}$)

f) Régulation portant sur des complexes enzymatiques

- ex : chaîne de transport des e⁻ dans les mitochondries
- L'organisation macromoléculaire joue un rôle important dans la régulation des systèmes biologiques :
 - en assurant l'utilisation efficace des composés
 - éventuellement en assurant une séparation stricte entre des voies métaboliques antagonistes
 - Les associations d'enzymes permettent la non accumulation des produits des étapes de la réaction, les enzymes travaillant en condition de vie.

2- Régulations particulières des enzymes michaeliennes

- La fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme ou sur le complexe ES diminue ou abolit l'activité catalytique
- L'équation de Michaelis Menten donne :

$$v_o = V_{\max} [S] / (\alpha K_M + \alpha' [S])$$

avec $\alpha = 1 + [I]/K_I$ ou I s'associe à E

et $\alpha' = 1 + [I]/K_I'$ ou I s'associe à ES

- La représentation de Lineweaver et Burk donne :

$$1/v_o = (\alpha K_M/v_{max}) 1/[S] + \alpha'/v_{max}$$

qui coupe l'axe des abscisses à $-\alpha'/\alpha K_M$ et l'axe des ordonnées à α'/v_{max}

- Ex : caféine sur phosphodiesterase ($5 \cdot 10^{-2} M^{-1}$) à la place d'AMPc ($5 \cdot 10^{-4} M^{-1}$)

Inhibition incompétitive

N.B. : limite du programme

- Dans la représentation de Lineweaver et Burk, les courbes pour différentes [I] sont parallèles entre elles, de pente K_M/v_{max} (comme en l'absence d'inhibiteur) et coupant l'axe des abscisses à $-\alpha'/K_M$ et l'axe des ordonnées à α'/v_{max}

- Inhibiteurs qui se fixent directement sur le complexe ES (donc ne modifie pas K_M) et qui abolissent l'activité enzymatique (i.e. modifient le site catalytique sans modifier le site actif. Difficilement envisageable sauf pour de très petits inhibiteurs et notamment H^+ ou des ions métalliques)

- Pas d'effet de dilution pour les grandes [S] (contrairement aux inhibitions compétitives) : l'asymptote est V_{max}/α' !

- Type d'inhibition observée souvent dans le cas de **réactions à plusieurs substrats**]

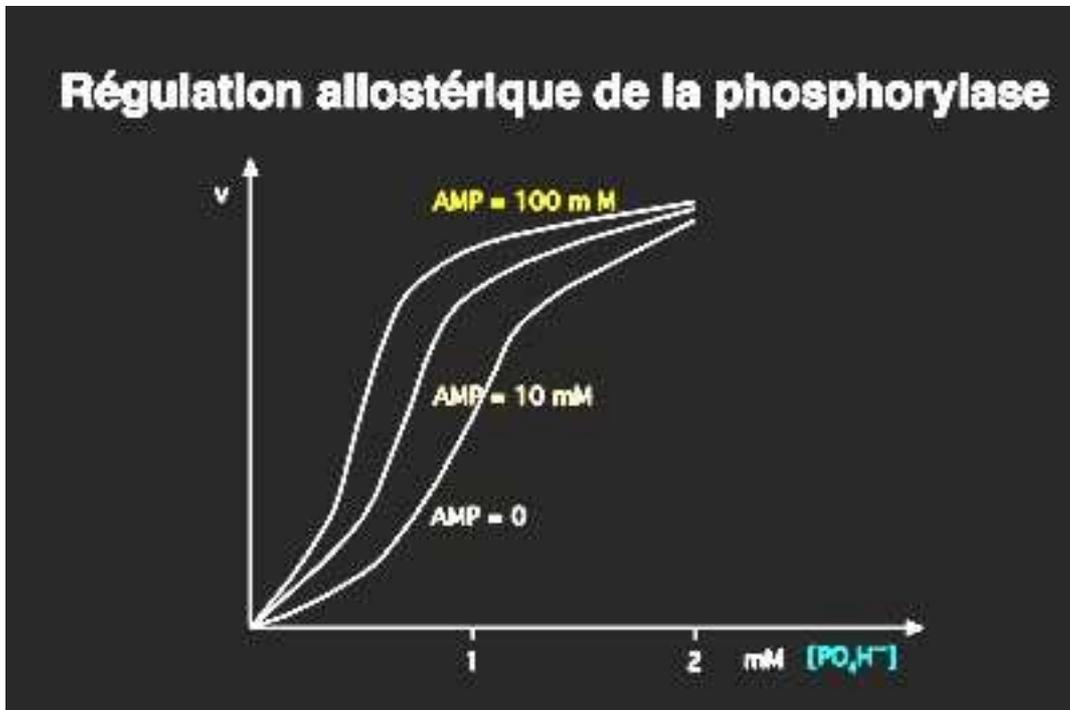
3- Régulations particulières des enzymes allostériques

N.B : Déjà vu au cours sur les protéines

Cas de la glycogène phosphorylase :

- Les glycogène phosphorylases sont des enzymes qui catalysent la première réaction de la glycogénolyse. Ce sont de grosses protéines d'une masse moléculaire de 500000 daltons.
- On les rencontre dans le cytoplasme des cellules contenant du glycogène (foie, muscles). La phosphorylase du foie est formée de 4 sous-unités, celle du muscle de 2 sous-unités.
- Elle catalyse la phosphorolyse de la liaison glycosidique α -1,4 qui unit le dernier glucose d'une branche au reste de la molécule de glycogène. Le glucose ainsi détaché reçoit le radical phosphoryl sur son Carbone 1, tandis que le glucose suivant récupère la fonction alcool secondaire sur son Carbone 4. La réaction est faiblement endergonique.
- La phosphorylation de l'enzyme (sur une Sérine) est indispensable pour que l'enzyme soit active.
- La glycogène phosphorylase du muscle est activée allostériquement par deux effecteurs : le phosphate, également substrat (effet homotrope) et l'AMP qui ne prend pas part à la réaction (effet hétérotrope). En outre, à l'état actif l'enzyme se dimérise, passant de 2 à 4 sous-unités par molécule

Régulation allostérique de la phosphorylase



EE 44/5

- Le graphe représente la vitesse de la réaction en fonction de la concentration du phosphate, qui est à la fois substrat et activateur allostérique.
- La courbe sigmoïde traduit un effet coopératif du phosphate sur les sous-unités, favorisant le passage à la forme relâchée, plus rapide : c'est un effet homotrope positif.
- L'adjonction de l'AMP dans le milieu à des doses croissantes (10 puis 100 mM) montre une activation de la réaction pour toutes les concentrations de phosphate. L'AMP, activateur allostérique, favorise également le passage des sous-unités à la forme relâchée.

-Les enzymes sont les agents responsables des circuits de synthèse et de dégradation métabolique. Tous ces circuits sont interconnectés et il importe que le flux des métabolites dans l'une ou l'autre des voies soit adapté aux besoins instantanés de la cellule. La sélection a développé un ensemble de mécanismes de régulation portant soit sur la synthèse des enzymes soit sur leur niveau d'activité. Nous ne traiterons ici que de la régulation de l'activité

- La régulation de l'activité enzymatique comporte deux aspects :
- La régulation générale qui s'applique à tous enzymes
- La régulation s'appliquant à des formes spécialisées d'enzymes (dits enzymes régulateurs). Parmi ces enzymes, on trouve les enzymes allostériques

L'activité d'un enzyme allostérique est modulée par la fixation d'un effecteur sur un site autre que le site catalytique

1) Mise en évidence d'une régulation allostérique

Courbe d'activité : $v_i = f([S])$ sigmoïde

2) Mécanisme de régulation allostérique : cas de l'ATCase

- Cas de l'ATCase : Diffraction RX mise en évidence 6 sous-unités catalytiques (fixant le substrat) associées à 6 sous-unités régulatrices (fixant CTP)

- Substrat : carbamoyl ATP et aspartate. Réaction : transfert de groupe. ATP effecteur positif. CTP effecteur négatif

- Forme tendue : les sous-unités sont proches. Forme relâchée : les sous-unités régulatrices éloignent par rotation les sous-unités catalytiques, favorisant la prise en charge du substrat.

- Généralisation : Une enzyme allostérique est en équilibre entre deux états conformationnels T et R ayant des affinités très différentes pour le substrat et l'effecteur

3) Modélisations de l'allostérie

cf.courss sur Structure quaternaire des protéines et modèles allostériques
Limite de programme!

a) Modèle concerté MWC (Monod, Wyman, Changeux) ou symétrique

- Distingue protomère/sous-unité
- La protéine a au moins un axe de symétrie

b) Modèle de transition séquentielle

- Changement d'affinité de chaque protomère pour le substrat au fur et à mesure de la saturation de l'enzyme
- Ex. de la saturation de l'hémoglobine

4) Rôles charnière des enzymes allostériques dans le métabolisme

- Inhibition par les produits de la réaction : rétrocontrôle négatif

- voie du métabolisme énergétique :ex : hexokinase des muscles et du foie inhibée par G6P, et pas la glucokinase exclusivement présente dans le foie
- voie du métabolisme des acides nucléiques ex. : ATC ase inhibée par CTP, produit de la voie métabolique
- idem voie du métabolisme des acides aminés

CONCLUSION

- Actuellement : deux grands axes de recherche :
 - Immobilisation des enzymes fragiles par inclusion d'enzymes purifiées dans un gel : activité in-vitro ❖ importantes applications
 - Enzymologie en milieu organique, ce qui change complètement la relation au substrat.
Ex. des lipases; on déplace complètement la réaction vers la synthèse.
- Applications en pharmacie et cosmétique et diététique