

L'ENZYMOLOGIE ÉLÉMENTAIRE

1. Introduction.

1.1 Définition.

Un enzyme est une protéine présentant les propriétés de catalyse spécifique d'une réaction chimique du métabolisme de l'être vivant qui l'a produite.

Anciennement nommé diastase car en 1833, Payen a isolé la diastase (= amylase) d'orge germé qui permettait la transformation en sucre.

Étymologiquement, enzyme vient de levain. En effet, les enzymes furent trouvés dans le levain en 1878 par Kühne.

La fermentation était considéré comme une propriété du vivant jusqu'à Büchner en 1897 qui réalisa in vitro la fermentation de levure.

Ribozyme= acide nucléique donc ARN bien que molécule à activité enzymatique.

Enzyme= catalyseur réagissant à faible T et permettant l'augmentation de la vitesse de réaction sans altérer ni modifier les produits. Synthétisé par le vivant, un enzyme est spécifique d'une réaction c'est à dire toujours la même réaction avec les mêmes espèces chimiques initiales.

1.2 Énergie d'activation.

Une réaction peut être possible d'un point de vue thermodynamique sans se réaliser réellement.

ex: Le bois peut brûler mais pas spontanément, il faut une allumette pour activer la molécule en fournissant l'énergie permettant le passage à un état intermédiaire d'activation, indispensable.

L'énergie nécessaire varie avec les conditions expérimentales.

Plus l'énergie à fournir est élevée et plus la réaction est lente.

Le chauffage est une contribution à l'activation du système:

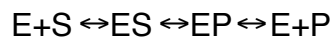
Cf Enz 2.

L'enzyme diminue l'énergie d'activation. Si cette énergie d'activation n'existait pas, l'ADN, le sucre,... devraient pouvoir s'hydrolyser entraînant leur désagrégation.

Plus l'énergie d'activation est grande et plus la molécule est stable.

2. Réactions enzymatiques.

2.1 Les acteurs de la réaction.



avec S=substrat qui via l'enzyme E donne le produit P.

Le complexe ES est formé dans le site actif par réactions non covalentes. Un nombre très élevé de liaisons faibles, chacune contenant une petite quantité d'énergie. L'énergie d'activation est la somme de toutes ces petites énergies.

Un ligand est un corps chimique ayant une liaison spécifique avec une protéine.

Mais le ligand peut tout autant se lier à une protéine enzymatique que non enzymatique.

Ex: Cofacteur(pas forcément obligé dans une réaction ES). Il n'est pas transformé définitivement en fin de réaction, il est recyclable. Il permet le transport du produit et la structure de l'enzyme. La protéine enzymatique reconnaît spécifiquement ses cofacteurs nécessaires.

Le cofacteur peut être un ion(métallique dans 1/3 des cas), une molécule biologique(=coenzyme). Un coenzyme est une molécule biologique servant de cofacteurs donc indispensable à la catalyse de la réaction. Les vitamines sont des coenzymes essentielles.

Il existe des coenzymes libres(=une liaison faible se dissocie à la fin de la réaction (ex: NAD)) et des coenzymes liés(=les liaisons covalentes restent associées à la protéine (ex: FAD ou FMN (Flavoprotéine))).

2.2. Le site actif.

C'est la région de l'enzyme qui lie le substrat et parfois le cofacteur, participant directement à la réaction enzymatique.

C'est une place très réduite de l'enzyme, unité en 3D, pas forcément adjacent à la structure primaire de la protéine. (Puisque valable que dans la structure 3D de la protéine, n'est aussi valable que pour la structure tertiaire.)

Le site actif est fermé donc privé d'eau, résidus apolaires (microenvironnement tout à fait particulier).

Les substrats sont reliés au site actif par des liaisons faibles, il y a donc nécessité d'adéquation et donc de proximité pour le meilleur rendement. C'est le modèle de Cerurcley. Il faudra attendre 1890 pour que Fischer démontre la fausseté de ce modèle. En effet, si la complémentarité est totale, l'action catalytique est faible.

Schéma 1

L'énergie de liaison augmente la vitesse de réaction par liaisons faibles. Cette énergie de liaison sert à la fois à la reconnaissance du substrat et à la vitesse de réaction. La forme du site actif peut être modulée. Confère Enzyme 22 où l'on voit une protéine phosphoridée ou non et la conséquence directe sur la forme de l'enzyme révélant ou non le site actif. Ici, le phosphore joue le rôle de cofacteur.

3. Liaisons covalentes dans le site actif.

Elles surviennent de façon transitoire entre une partie du site actif et du substrat.

Schéma 2

Présentent chez les oxygènes carboxylates, les amines, les azotes, les sulfures de cystéine (RS₂), les oxygènes de tyrosine (RO₂), l'aspartate, le glutamate (COO₂), la cystine, l'arginine, l'histidine.

4. Six classes d'enzymes.

Cf Enzyme 6.

Chaque enzyme est codée par une séquence de chiffres.

Ex: Amydrase carbonique 4.2.1.1

Schéma 3

Le 4 signifie qu'il s'agit d'une enzyme de classe 4=Lyase.

Le 2 précise le caractère de la lyase.

Le 1 indique le nombre de molécules d'eau utilisé.

Le 1 est le numéro d'ordre, c'est donc la 1e nommée dans cette catégorie.

5. Caractéristiques de la réaction.

Les deux caractéristiques sont réversibilité et spécificité.

Quand $S \rightarrow P$ veut faire $S \leftarrow P$, il faut que le produit ne soit pas utilisé, qu'il soit disponible. Mais des fois, le produit est de suite utilisé et par conséquent la réaction

est irréversible. L'enzyme catalyse une réaction particulière mais peut travailler sur plusieurs substrats à la fois.

La phosphatase est un enzyme qui renferme un phosphate. La phosphatase G6P de fonction 1,6 disP.

Ex: La phospholipase A, B, C et D.

Schéma 4

Quatre enzymes différentes faisant chacune une réaction d'hydrolyse mais à des endroits différents.

Mais d'autres enzymes ne travaillent que sur un site comme la LDH (lactase déshydrogénase)

$\text{lactase} \leftrightarrow \text{pyruvate}$

musculaire $\rightarrow$ L lactate

bactérie $\rightarrow$ D lactate.

6. Effet du pH.

Si l'on fait varier le pH in vitro, la modification de la structure dénature l'enzyme. In vivo, les modifications de charges électriques conduisent à un pH optimum. Ce dernier varie en fonction du lieu de l'enzyme et des conditions physiologiques.

Ex: Enzyme de digestion: pepsine(dans l'estomac donc pH très acide puisque le pH optimum est de 2), tyrosine et amylase(dans le duodénum, donc le pH optimum est de 8-9).

L'enzyme fumarase privilégie un sens en fonction du pH:

$\text{Fumarate} \rightarrow \text{malate}$ (pour pH=6,2 avec une molécule d'eau)

$\text{Fumarate} \leftarrow \text{malate}$ (pour pH=7,5)

Les radiations ionisantes telles que les émissions radio actives ou les rayons X agissent directement en ionisant les molécules.

7. Cinétique enzymatique.

C'est l'étude de la réaction enzymatique et de sa vitesse.

A. Effet de la concentration d'enzyme.

1. Vitesse de la réaction.

Cf Enzyme 8

$S \rightarrow P$; soit on mesure la disparition de S ou l'apparition de P.

La réaction est lente dans la phase préstationnaire puis elle augmente rapidement dans la phase stationnaire pour finir en asymptote correspondant à l'état d'équilibre.

Cf Enzyme 7

La vitesse est l'augmentation de la formation de P en fonction du temps ou la diminution de S en fonction du temps: dP/dt ou $-dS/dt$

2. Les phases de la réaction.

$E+S \leftrightarrow ES \leftrightarrow EP \leftrightarrow E+P$

Cf Enzyme 8

La phase préstationnaire est la phase où le S va s'associer à E, il s'agit donc de la formation du complexe ES, et ce en quelques millisecondes.

La phase stationnaire apparaît lorsque toutes les molécules d'E se sont associées à du S. Ainsi, $[S] \gg [P]$, S est en quantité saturante.

Formation du complexe ES

Equilibre de la réaction: $[ES] = [EP]$

Il faut se placer à vitesse constante donc V_i = phase stationnaire.

3. V_i (vitesse initiale).

C'est la vitesse d'une réaction enzymatique au cours de la phase stationnaire c'est à dire quand $[ES]/[E_{total}] = \max$.

Pendant cette phase, l'E est saturée en substrat donc la vitesse est la plus forte.

Cf Enzyme 9

Cf Enzyme 10

B. L'effet de la concentration en substrat.

K_m est la constante de Michaelis-Menten. $[S]$ pour laquelle $V_i = 1/2 V_{max} = V_{max}/2$

Ex: LDH

lactate $\leftrightarrow$ pyruvate avec $K_m = 0,8 \text{ mM}$

3. Détermination théorique de K_m (Michaelis).

Cf Enzyme 11

Nécessité des constantes de V_i

Equation de la vitesse: $V = V_{max} [ES]/[E_{total}]$

Si $[S] = 0$ alors $V_i = 0$

Si $[S] \rightarrow \infty$ alors $[S]/K_m + [S] \rightarrow 1$ donc $V \rightarrow V_{max}$.

Cf Enzyme 12.

6. La signification de la constante de Michaelis.

Cette constante ne peut décrire tous les enzymes, elle n'est faite que pour les hyperboles. C'est une expression donc elle s'exprime en mol/ L.

$K_m = (k_2 + k_{-1}) / k_1$

$S \leftrightarrow ES \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} EP$.

Dans beaucoup de cas, $ES \leftrightarrow EP$ sera très lente.

$k_m = k_{-1} / k_1 = k_d$ avec k_d la constante de dissociation.

k_d est une mesure de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Ainsi, plus k_m est élevé et plus la dissociation sera rapide donc plus k_d sera faible.

Par contre, quand $E \leftrightarrow EP$ est rapide, l'on peut la réduire à une simple affinité:

$k_2 \leq k_{-1}$

Exemple: La catalase = 25 mM et l'isocytate déshydrogénase = $2,6 \mu\text{M}$; ce dernier a plus grande affinité pour son substrat.

La vitesse, en mol/ s est la formation de produit par unité de temps.

Rq: 1 mol/ s est une katal et $1 \text{ uSI} = 1 \mu\text{M/ ms} = 15 \text{ mkat}$.

B. Effet de la concentration des effecteurs.

1. Effecteurs.

$S \leftrightarrow P$ via un enzyme ou un cofacteur.

Un effecteur est un corps chimique qui se lie à l'enzyme pour l'accélérer (accélérateur) ou la ralentir (inhibiteur).

2. Inhibition compétitive.

Cf Enzyme 13.

L'inhibiteur aura le même site de fixation que le substrat. Ainsi, soit l'on aura affaire à $E+S$ ou à $E+I$ ayant pour conséquence un blocage de l'enzyme.

Le k_m apparent est la seule valeur qui change. Dans l'inhibition compétitive, la V_{max} n'est pas touchée.

Exemple d'inhibiteur compétitif:

Succinate → fumarate et Malonate → fumarate. Et dans les deux cas via la succinate déshydrogénase. Nous pouvons constater que la malonate (COO⁻ - CH₂ - COO⁻) entre en compétition avec son homologue supérieur la succinate.

3. Inhibition non compétitive.

Dans ce cas, le substrat se lie à son site et l'inhibiteur non compétitif va sur un autre site donc k_m reste inchangé. En revanche, si l'inhibiteur va sur l'enzyme, il va réduire son activité engendrant une diminution de V_{max} et ce d'autant plus que la concentration en inhibiteur sera grande.

Rq: Il existe des inhibiteurs qui se fixent sur le complexe ES ou qui détruisent un groupement fonctionnel via une liaison covalente irréversible.

D. Cinétique à deux substrats.

1. Mécanisme bibi ordonné.

Cf Enzyme 15.

Exemple: Malate déshydrogénase.

Malate ↔ Oxaloacétate via NAD⁺ restitué en NADHréduit.

Ainsi, sur le même type de schéma que Enz. 15:

A: NAD⁺

B: Malate

P: NADHréduit

Q: Oxaloacétate.

2. Mécanisme bibi aléatoire.

Cf Enzyme 16.

A intervient avant ou après B selon les concentrations de chacun.

3. Mécanisme ping-pong.

Cf Enzyme 17.

Exemple: Cf Enzyme 18.

L'enzyme est le pyruvate carboxylase qui va régler la migration d'un carboxyle entre un carbonate fournit par le milieu et le pyruvate.



A: HCO₃⁻

P: OH⁻

B: pyruvate

Q: Oxaloacétate

4. Enzymes régulatrices.

Lorsqu'une molécule est engagée dans plusieurs voie métabolique (= carrefour métabolique) comme pour le glucose, sujet au stockage ou à la dépense. Chaque phase débute par un enzyme clé lui même régulé par des enzymes. Le produit de chaque phase sert de substrat pour la suivante,... Les enzymes régulatrices sont allostériques, c'est à dire qu'elles régulent de deux façons: soit par des réactions non covalentes soit par des réactions covalentes.

Rq: Il existe aussi des régulations par clivage.

Allostérie vient de allo= autre et stéréo= forme, donc = autre forme. En effet, les enzymes allostériques ont la propriétés qu'ont certaines protéines à pouvoir changer

de structure spatiale lorsqu'elles se lient à un effecteur, entraînant une modification de l'activité de l'enzyme.

Rq: L'allostérie ne concerne pas que les enzymes puisqu'elle existe chez l'hémoglobine par exemple.

Les effecteurs allostériques sont des ligands, liés en dehors du site actif où se fixe le substrat. Soit il s'agit d'une molécule de même formule que le substrat (= allostérie homotrope) ou différente (= allostérie hétérotrope).

Souvent, l'enzyme subira un rétrocontrôle négatif de la part du bout de chaîne afin d'éviter une surproduction de produits.

Schéma 5.

La notion de coopérativité est très importante en cinétique allostérique puisque l'on constate une courbe de Hill aux débuts difficiles mais se rattrapant très vite. Ce léger retard est expliqué par le modèle symétrique de Monod-Wyman-Changer. Ce modèle suppose que les protomères ou sous unités peuvent avoir deux états à savoir tendu et relâché. Considérons l'état relâché définissant une plus grande affinité enzyme- substrat. En effet, la présence du substrat favorise le passage de l'état tendu à relâché. La fixation d'un substrat sur une sous unité va faire passer l'ensemble de la molécule à l'état relâché; c'est la coopérativité. Lorsque le substrat entre en contact avec l'enzyme, il va difficilement trouver un site de fixation mais sitôt fait, il décuple la vitesse grâce à la coopérativité, d'où le retard si vite rattrapé.

3. Exemples d'allostérie.

Exemple: $F6P \leftrightarrow F1,6 \text{ bi } sP$ via l'ATP restitué en ADP.

F6P est la phospho fructo kinase.

Rq: Cette réaction bien que se servant d'ATP le reconnaît aussi comme inhibiteur.

Cf Enzyme 21.

Schéma 6.

B. Mécanisme de régulation

1. Interactions covalentes.

Exemple: Phosphorylation.

Le glycogène phosphorylase (= enzyme qui dégrade le glycogène) existe sous une forme a, active (phosphorylée) et b, moins active.

$\text{Glycogène (n)} \rightarrow \text{glycogène (n-1)} + \text{glucose 1P}$

$a \rightarrow b$ restituant un P est la phosphorylase phosphatase.

$b \rightarrow a$ est la phosphorylase kinase.

Il peut y avoir une activation par coupure protéolytique.

Exemple: Trypsine, dit zymogène dans ce cas.

$T \rightarrow R$ par l'ajout de $[S]$.

Rq: C'est aussi une activation protéolytique qui est à l'origine de la cascade de réactions concernant l'hémoglobine dans la cicatrisation.