

Séance d'anticipation : Enzymologie

Définitions :

- Les enzymes sont des **protéines** servant de **catalyseurs biologiques**
- Les enzymes sont présentes dans **tous les compartiments cellulaires**
- Leur **synthèse est déterminée génétiquement** (comme toutes les protéines)

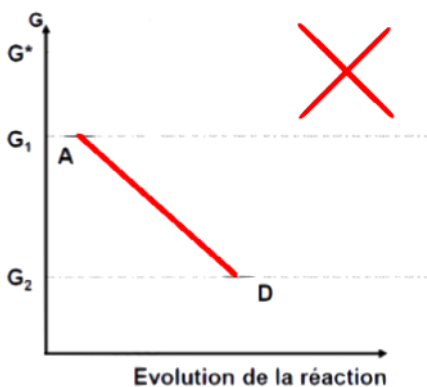
En chimie, une réaction transforme un réactif en un produit. En biochimie, on ne parle plus de réactif mais de **substrat**. C'est lui qui sera transformé grâce à l'action de l'enzyme.

Découplage réactionnel :

Dans un tube à essai, la dégradation du glucose en 2 molécules de pyruvate (= glycolyse) peut se faire en une seule étape. Dans la cellule, cela libérerait trop d'énergie, on va donc découpler cette réaction en 10 étapes. On parle de **voies métaboliques**, aucune réaction n'est isolée.

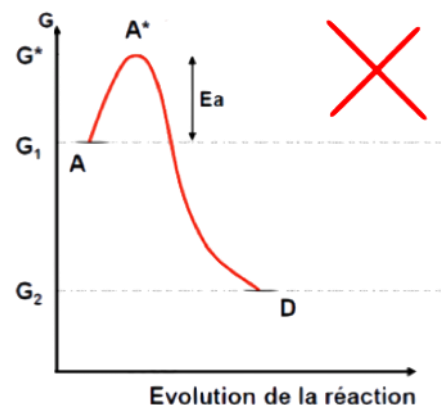
Découplage énergétique :

L'axe des ordonnées correspond au niveau énergétique des différentes molécules :



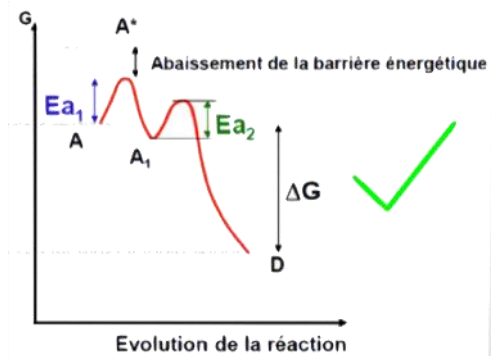
Lors d'une réaction chimique, on ne passe pas directement du substrat (A) au produit (D).

On va devoir fournir une certaine quantité d'énergie, qu'on appelle **énergie d'activation (Ea)**. On atteint un **état de transition**, de plus **haut niveau énergétique**. Le substrat est alors « activé » et prêt à entrer en réaction. Cependant l'énergie d'activation est pour le moment trop élevée, et cela est incompatible avec la cellule, qui ne pourra pas fournir toute cette énergie.



On va avoir un découplage énergétique, on va réaliser 2 réactions nécessitant chacune une énergie d'activation plus faible → **Compatible** avec la cellule.

$$E_a = E_{a_1} + E_{a_2}$$



Tout ça, c'est bien beau, mais un catalyseur, c'est quoi ?

Un catalyseur est une entité qui **accélère la vitesse d'une réaction**. Les enzymes sont des catalyseurs **biologiques**, elles sont toujours bien plus puissantes que les catalyseurs chimiques.

<3 Les règles de la catalyse enzymatique <3

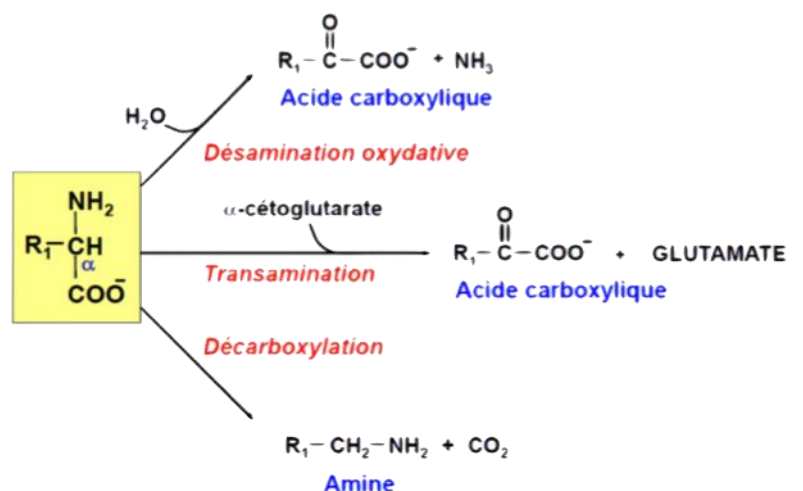
- Une enzyme **ne provoque jamais de réaction chimique** (elle l'accélère simplement)
- Une enzyme **ne rend jamais possible une réaction thermodynamiquement non favorable**
- Une enzyme **augmente la vitesse** de la réaction (#définition)
- Une enzyme se retrouve toujours **intacte à la fin de la réaction**
- Une enzyme agit à **faible concentration**
- Une enzyme **ne modifie pas l'équilibre chimique** d'une réaction réversible, mais elle permet de l'atteindre plus rapidement

I) Spécificité des enzymes

Spécificité de réaction :

- Elle est **absolue**, une enzyme ne catalyse **qu'un seul type de réaction**

Exemple : un acide aminé peut subir différentes réactions : désamination oxydative, décarboxylation, transamination. Bien que le substrat soit le même, il faudra **3 enzymes différentes** pour catalyser ces 3 réactions.

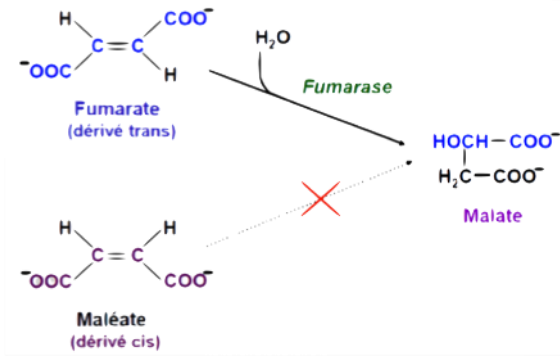


Spécificité de substrat :

Elle peut être :

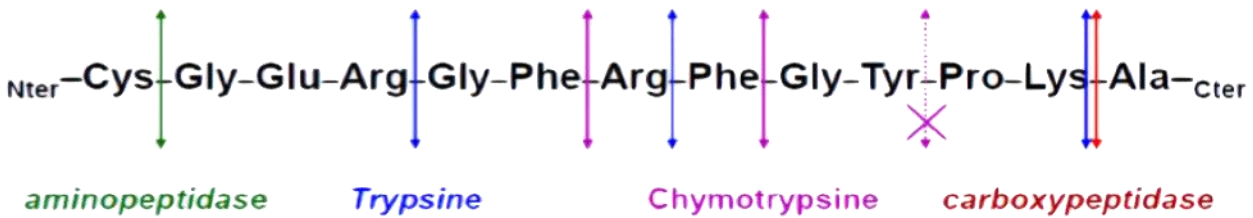
- **Absolue**

Exemple : Vis à vis d'un isomère



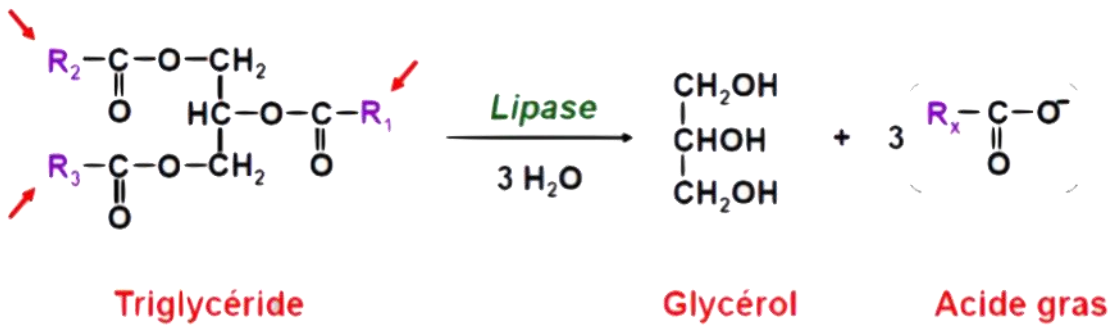
- **Relative**

Exemple : Spécificité de liaison : la chymotrypsine clive la liaison peptidique du côté C-ter (à droite) des acides aminés aromatiques



- **Large**

Exemple : Les lipases hydrolysent les triglycérides quelque soit l'acide gras impliqué.



II) Structure des enzymes

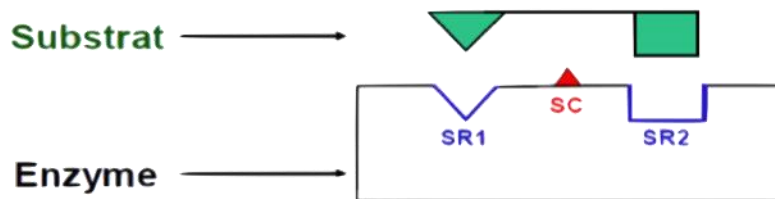
Toute la protéine n'intervient pas dans la réaction enzymatique. La partie qui lie le substrat et catalyse la réaction s'appelle le **site actif**.

On peut classer les acides aminés composant l'enzyme en 4 classes :

- Acides aminés **indifférents** : présents **aux extrémités N-ter et C-ter de la protéine (nombre variable)**, ils n'interviennent pas dans la réaction enzymatique.
- Acides aminés **de conformation** : **stabilisent l'enzyme sous sa forme réactionnelle**, ils n'interviennent pas dans la réaction enzymatique.

- Acides aminés **auxiliaires** : dans l'espace, ils sont **proches du site actif** mais ne sont pas en interaction avec le substrat. Ils permettent la **flexibilité du site actif**.
- Acides aminés **de contact** : d'un nombre de **10 ou moins**, ils composent le site actif et **interagissent directement avec le substrat**. Ils ne sont pas forcément proches dans la séquence polypeptidique, mais ils sont **proches spatialement**. On y retrouve fréquemment des acides aminés à **chaîne latérale polaire et chargée**.

Le site actif correspond à une **crevasse**/un renfoncement à la **périphérie** de l'enzyme. Il occupe **une faible part du volume de l'enzyme** (10 acides aminés VS plusieurs centaines/milliers qui composent l'enzyme).



SITE ACTIF = SITE DE FIXATION + SITE CATALYTIQUE
SC : Site catalytique

Le site de fixation, aussi appelé de reconnaissance, est composé de plusieurs sous-sites de reconnaissance. Plus ils sont nombreux, plus la spécificité entre l'enzyme et son substrat sera étroite et plus l'affinité sera grande.

L'enzyme et son substrat interagissent via des liaisons non covalentes (ponts salins). Lorsque les 2 sont liés, on a formation d'un **complexe enzyme substrat**, qui est un **état de transition** au cours duquel le niveau énergétique du substrat et de l'enzyme est élevé, ce qui permettra de rentrer plus facilement en réaction (= baisse de l'Ea).

Théorie de l'ajustement induit :

L'enzyme existe sous 2 formes :

- **Forme R = réactive**
 - **Forme T = inactive**
- ⇒ Il existe un **équilibre chimique dynamique** entre ces 2 formes.

Déroulement d'une réaction enzymatique :

1. Au départ, l'enzyme et le substrat sont au repos
2. Rencontre des deux, qui s'associent pour former le complexe enzyme substrat
3. Les acides aminés auxiliaires permettent la flexibilité du site actif qui enserre le substrat
4. Enzyme et substrat sont sous forme contrainte, on atteint l'état de transition
5. Le(s) produit(s) est/sont formé(s) puis relargués par l'enzyme
6. L'enzyme pourra aller catalyser une autre réaction

III) Cofacteurs

Certaines enzymes ne sont actives qu'en présence d'un cofacteur.

- **Apoenzyme** = enzyme **non liée à son cofacteur**, c'est la forme **inactive**
- **Holoenzyme** = enzyme **associée à son cofacteur**, c'est la forme **active**

Les cofacteurs sont des entités **non protéiques** :

- **Ions métalliques** : cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} ...)
- **Coenzymes** : NAD^+ , FAD...

Les coenzymes :

Ils sont synthétisées à partir de **vitamines**, elles même apportées par **l'alimentation** (*prenez bien vos vitamines #just'orange, on va venir contrôler vos cofacteurs !*)

Point vocabulaire : c'est l'apoenzyme qui choisit et reconnaît spécifiquement son cofacteur, et non pas le cofacteur qui choisit son apoenzyme (++).

Il en existe 2 types :

- **Stoechiométriques** : ils se lient à l'apoenzyme via des **liaisons faibles/non covalentes** le temps d'une réaction, puis s'en détachent. Ce sont des coenzymes dits « libres ».
 - ✓ NAD^+ : coenzyme d'oxydoréduction (transporte des électrons)
 - ✓ Coenzyme-A (CoA) : transporteur de groupements acyls
 - ✓ NADP^+ : coenzyme essentiel pour les réactions anaboliques (= de synthèse)
- **Catalytiques** : ils se lient de façon **covalente/définitive** à l'apoenzyme. Ils ne s'en dissocient jamais, c'est une maturation post-traductionnelle de la protéine.
 - ✓ FAD : coenzyme d'oxydoréduction essentiel pour la chaîne respiratoire mitochondriale

IV) Régulation des enzymes

Il existe différents moyens de **moduler la vitesse des réactions** catalysées par certaines enzymes. En régulant une enzyme on va réguler une voie métabolique. Cette régulation devra se faire :

- Le plus en **amont** possible de la voie
- Sur une réaction **irréversible**

Pourquoi pas sur une réaction réversible ? Parce qu'une enzyme ne modifie pas l'équilibre chimique ! Si on stimule son activité, on aura plus de formation de B à partir de A, mais aussi plus de formation de A à partir de B, au final l'équilibre sera le même → inutile !

Régulation en fonction de la concentration :

- Pour **stimuler** une réaction, on va **augmenter la synthèse** de l'enzyme en charge de sa catalyse
- Pour **l'inhiber**, on va **dégrader** cette enzyme

Régulation en fonction de la localisation :

Isoenzymes : enzymes catalysant une même réaction mais avec des **paramètres cinétiques différents**.

Exemple : la Lactate Déshydrogénase (LDH)

- Dans le muscle, elle catalyse la réaction dans le sens : Pyruvate → Lactate (isoforme M4)
- Dans le cœur, elle catalyse la réaction dans le sens : Lactate → Pyruvate (isoforme H4)

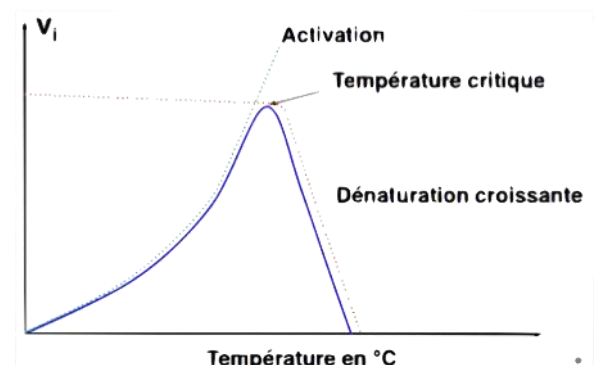
Régulation en fonction du pH :

Le pH va **modifier l'ionisation des groupements** des chaînes latérales des acides aminés du site actif (qui sont souvent polaires et chargés), et donc perturber les interactions entre l'enzyme et le substrat. Les enzymes ont donc un pH de prédilection :

- La pepsine est active à pH acide : elle se retrouve dans l'estomac (pH = 2)
- La trypsine est active à pH neutre/faiblement basique : intestin

Régulation en fonction de la température :

L'augmentation de la température favorise **l'agitation moléculaire**, on atteindra plus facilement l'état de transition. Ceci est **valable jusqu'à un seuil** à partir duquel la chaleur va rompre les liaisons non covalentes stabilisant la protéine → **dénaturation** par la chaleur.



Régulation covalente (= par phosphorylation) :

La fixation **réversible** d'un groupement **phosphate** (liaisons covalente) peut se faire sur les acides aminés possédant un groupement **hydroxyle** sur le chaîne latérale :

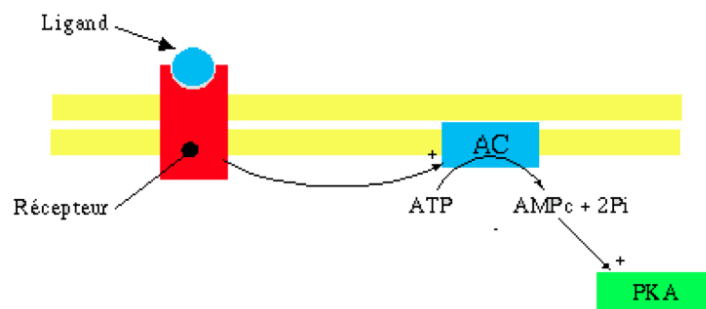
- Sérine
- Thréonine
- Tyrosine

- ✓ Les enzymes en charge de fixer le groupement phosphate sont des **kinases** (*très spécifiques*)
- ✓ Les enzymes qui enlèvent ce groupement sont des **phosphatases** (*spécificité plus large*)

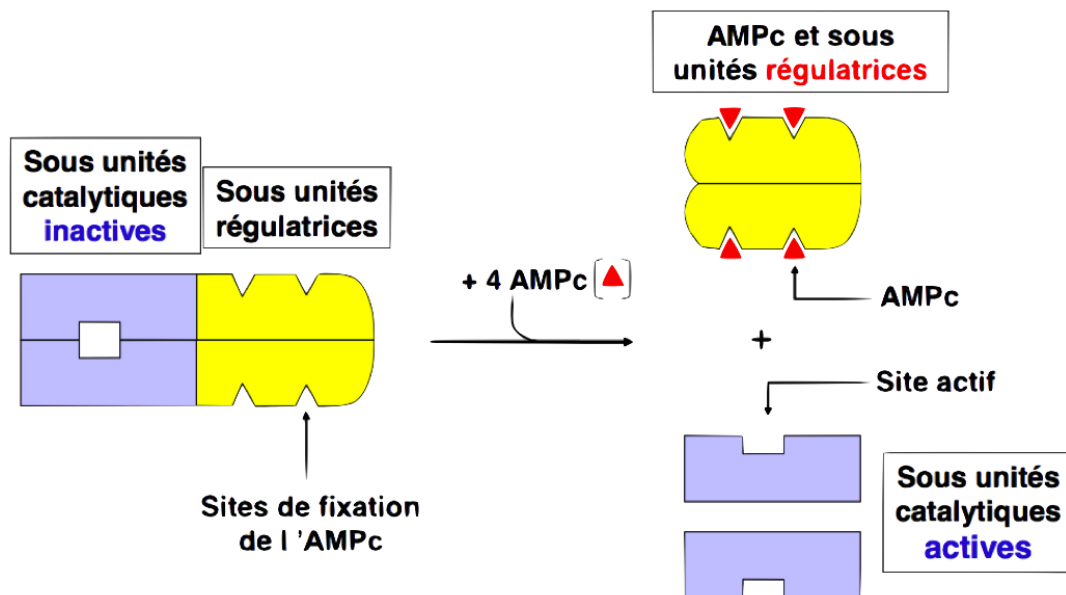
On parle de **cascade de phosphorylation**, qui a 2 objectifs :

- ✓ Réponse **sélective**, permettant **d'adapter la physiologie cellulaire à son environnement**
- ✓ **Amplification** de la réponse : un messenger active 10^3 enzymes, qui activent chacune 10^3 enzymes, etc...

- Fixation du **messenger primaire** (glucagon ou adrénaline) sur son récepteur membranaire
- Le récepteur activé va stimuler **l'adénylate cyclase**, enzyme catalysant la transformation de l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) en **AMPc** (Adénosine Mono Phosphate cyclique)



- Cet AMPc va se fixer sur une **Protéine Kinase A (PKA)** : la PKA est une enzyme possédant 4 sous unités, 2 régulatrices et 2 catalytiques. L'AMPc en se fixant sur les régulatrices va libérer les catalytiques.



- Les sous unités catalytiques de la PKA vont **phosphoryler leurs enzymes cibles** (exemple : *Phosphorylase Kinase (PhK)*)
- Ces enzymes cibles vont être soit activées par la phosphorylation, soit désactivées, selon le cas (exemple : *la PhK va être activée et phosphoryler la Glycogène Phosphorylase*).

Régulation allostérique :

Allostérie : variation de la conformation de certaines enzymes (dites allostériques) en réponse à la fixation d'un effecteur ou d'un substrat.

L'allostérie s'explique par la mise en place de **domaines coopératifs** entre les différentes sous-unités de l'enzyme → Qui dit plusieurs sous-unités dit **structure quaternaire** → toutes les enzymes allostériques existent sous forme de structure quaternaire. Chaque sous unité prend le nom de **protomère**, et les protomères s'associent de telle sorte que l'enzyme ait au moins **un axe de symétrie**.

Chaque protomère possède :

- **Un site actif** (site de fixation + site catalytique)
- **Un site régulateur** (différent du site actif) sur lequel se fixent les effecteurs via des **liaisons non covalentes**, réversibles

La fixation d'un effecteur au site régulateur provoque un changement de la conformation du site actif, qui va pouvoir provoquer :

- Une augmentation de l'activité enzymatique : on parle **d'activateur allostérique**
- Une diminution de l'activité enzymatique : on parle **d'inhibiteur allostérique**

L'effecteur peut être :

- Une molécule de **substrat** (qui se fixe sur le site régulateur) → Effet allostérique **homotrope**
- Une molécule **différente** → Effet allostérique **hétérotrope**

Effet allostérique homotrope :

Dans le milieu, on a : de l'enzyme sous forme R (Er), sous forme T (Et), du substrat.

- On augmente la concentration de substrat [S]
- Celui-ci se fixe sur l'enzyme **sous sa forme R** (apte à réaliser la réaction)
- Formation de complexes ErS → **[ErS] augmente**
- La concentration **d'enzyme R libre diminue** (puisqu'elle est impliquée dans le complexe)
- On doit restaurer l'équilibre chimique entre les formes R et T, donc on va avoir une **transition allostérique de T vers R**

Les effets allostériques homotropes présentent toujours une coopérativité positive.

Effet allostérique hétérotrope :

En présence d'un **effecteur positif** (« A » pour activateur) :

Dans le milieu, on a : de l'enzyme sous forme R (Er), sous forme T (Et), du substrat, et un activateur.

- L'activateur se fixe sur l'enzyme **sous sa forme R** (apte à réaliser la réaction)
- Formation de complexes ErA → **[ErA] augmente**
- La concentration **d'enzyme R libre diminue** (puisqu'elle est impliquée dans le complexe)
- On doit restaurer l'équilibre chimique entre les formes R et T, donc on va avoir une **transition allostérique de T vers R**

On a bien un **effet hétérotrope positif**.

En présence d'un **effecteur négatif** (« I » pour Inhibiteur) :

Dans le milieu, on a : de l'enzyme sous forme R (Er), sous forme T (Et), du substrat, et un inhibiteur.

- L'inhibiteur se fixe sur **l'enzyme sous sa forme T** (inactive)
- Formation de complexes EtI → **[EtI] augmente**
- La concentration **d'enzyme T libre diminue** (puisqu'elle est impliquée dans le complexe)
- On doit restaurer l'équilibre chimique entre les formes R et T, donc on va avoir une **transition allostérique de R vers T**

On a bien un **effet hétérotrope négatif**.

La désensibilisation :

C'est **la perte de la sensibilité aux effecteurs allostériques**.

- Le site allostérique est détruit, on a une **perte de la coopérativité entre les protomères**
- L'enzyme est toujours active, mais va adopter une **cinétique classique** (non allostérique)