



Cours pour Etudiants de Licence de Biochimie

Département de Biologie Physico-Chimique, Faculté des sciences de la Nature et de la vie SNV, Université de Bejaia

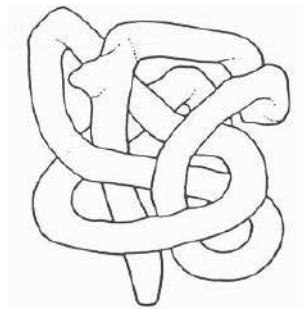
Matière: Enzymologie Appliquée **Chapitre III: aspect structural des enzymes**

Responsable de la matière et chargée de cours:
Pr. KHETTAL Bachra

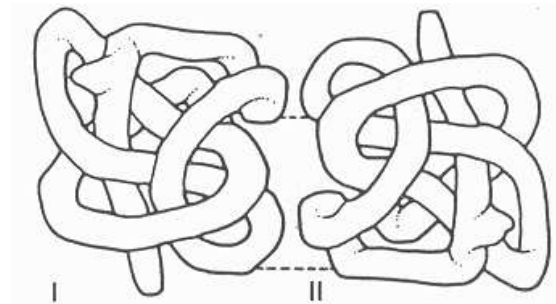
Email: khettalbachra@gmail.com

Laboratoire de Biotechnologie Végétale et Ethnobotanique
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Université de Bejaia

- ✓Biomolécule de nature **PROTEIQUE, Protéines globulaires**
- ✓Protéines globulaires de poids moléculaire élevé . (MM allant de 10^4 à 10^6)
 - ✓Ribonuclease : 13 700
 - ✓B galactosidase: 520 000
- ✓Existence de protéines enzymatiques de structures tertiaires (**monomérique**), D'autres de structures quaternaires (**oligomérique**). (2 à 60 sous unités, le plus souvent de 2 à 8)



Structure tertiaire



Structure quaternaire = dimère

- Enzyme monomérique
 - **Ex: Ribonuclease**: 124aa, 4 pont S-S
- Enzyme oligomérique à structure tertiaire: **homo-oligomère** ou **hétéro-oligomère**

association par liaison faible → réversible

→ séparation → pas de dénaturation

Les enzymes à structures quaternaire oligomériques:

-Complexes multienzymatique

-Isoenzyme

-Enzymes allostériques

Ex d'enzyme oligomérique: l' Aspartate transcarbamylase

Carbonyl + aspartate → carbamylaspartate

Etape d'engagement de la biosynthèse des pyrimidines

PM = 310 Kd

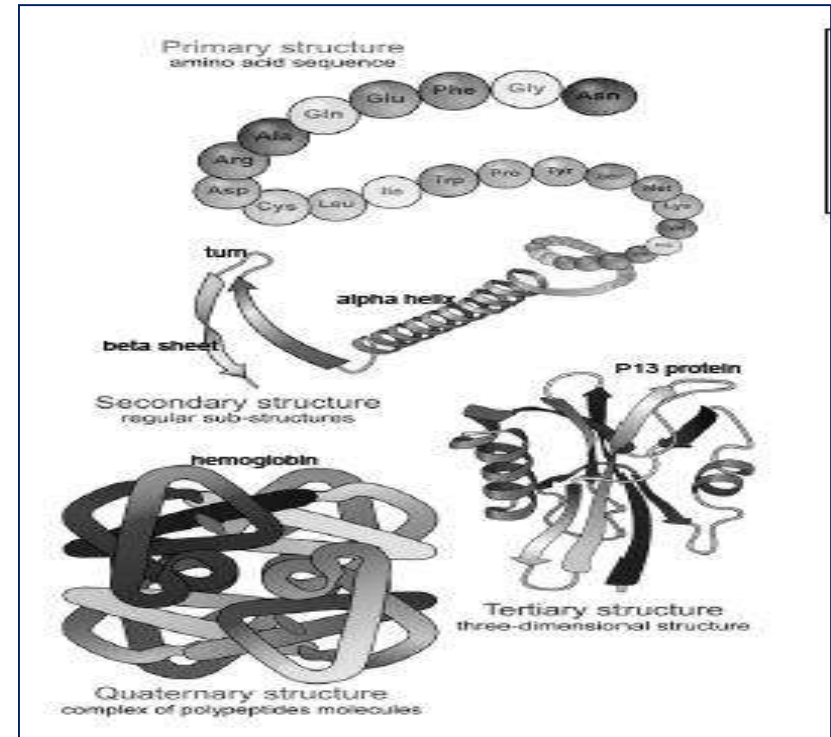
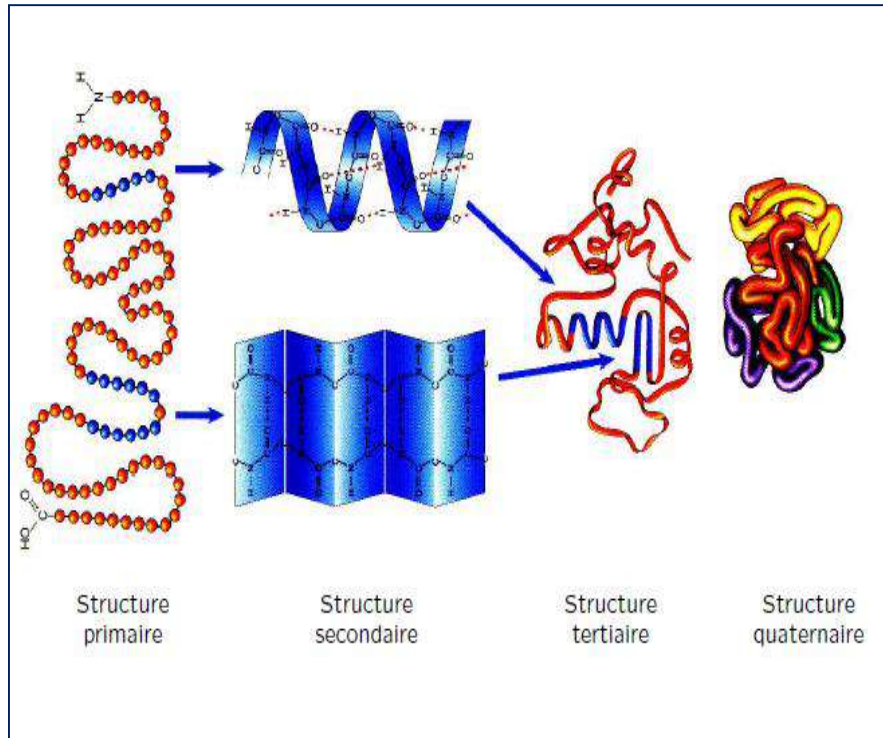
– 12 monomère :

6 monomères de 33kD → catalytiques

monomères de 17kD → régulateurs

I-Niveaux de structure des protéines

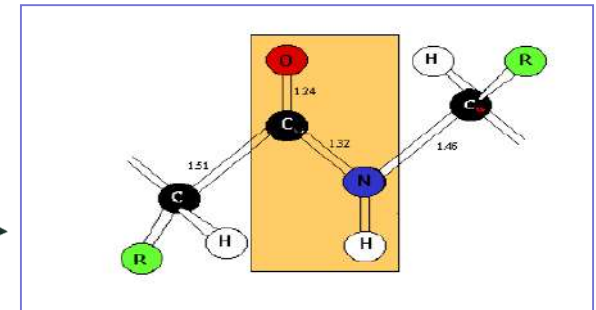
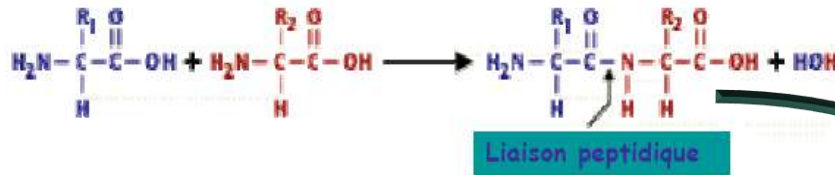
1- Aperçu global



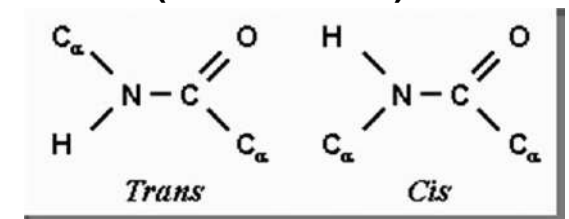
I-Niveaux de structure des protéines

1.1. Structure primaire: la liaison peptidique

La chaîne polypeptidique apparaît comme une succession de motifs « **liaison peptidique** » appelée squelette polypeptidique, sur laquelle sont greffées les chaînes latérales des acides aminés.

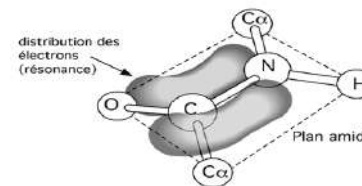


Motif de la liaison peptidique
(zone colorée)



Caractéristiques:

- ❑ Configuration Trans
- ❑ Simple liaison à caractère double
- ❑ Liaison planaire: plan amide

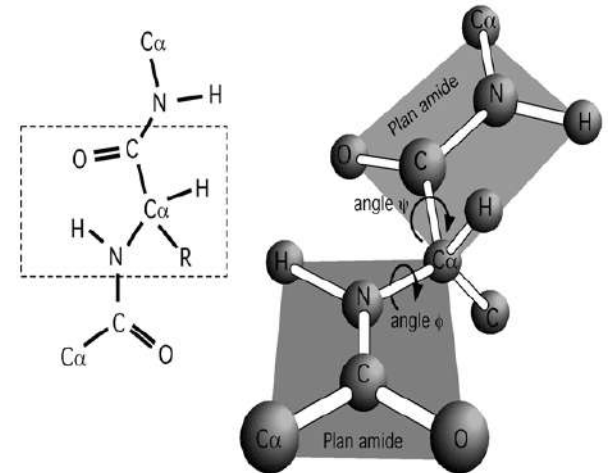


Angles de rotation autour de la liaison peptidique

La liaison simple se comporte comme une double liaison en raison d'un équilibre entre deux formes mésomériques. Ainsi, une rotation serait possible autour de chacune de ces liaisons.

L'angle de rotation d'un plan amide par rapport au carbone alpha en 5' est noté angle ψ ; l'angle entre le plan amide précédent et ce même carbone alpha est noté angle ϕ . ϕ , ψ sont deux angles entre deux plans on dit que ce sont des angles dièdres (angle dièdre ou diédral)

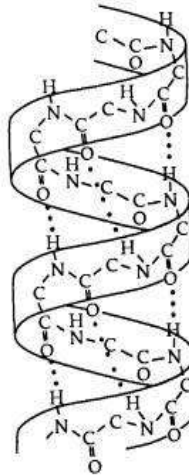
Toutes les valeurs des angles ϕ et ψ ne sont pas possibles car certaines conduisent à des contacts trop proches entre atomes qui sont énergétiquement très défavorables



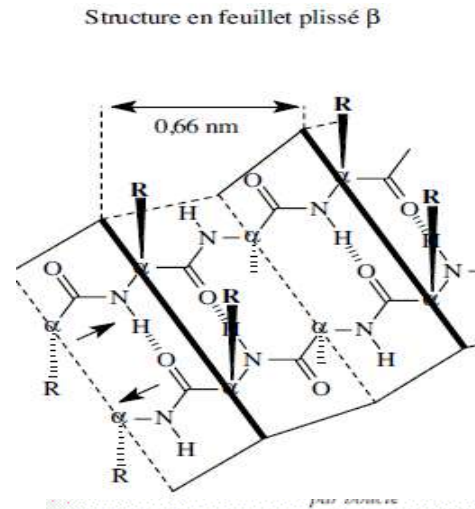
1.2. Structure secondaire Les éléments de structure secondaires

STRUCTURE SECONDAIRE

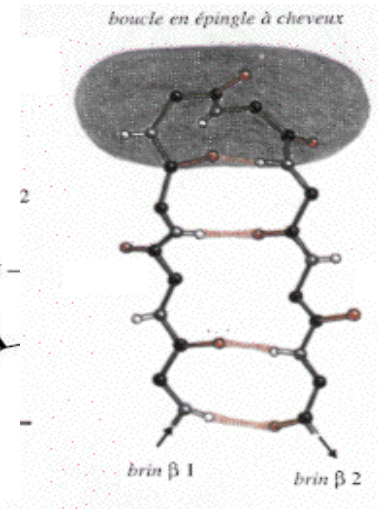
- Hélice α droite :
pas de l'hélice 3,6 acides aminés
- Feuillet β parallèle
- Feuillet β antiparallèle
- Coudes β , tour inverse, épingle à cheveux



Hélice alpha



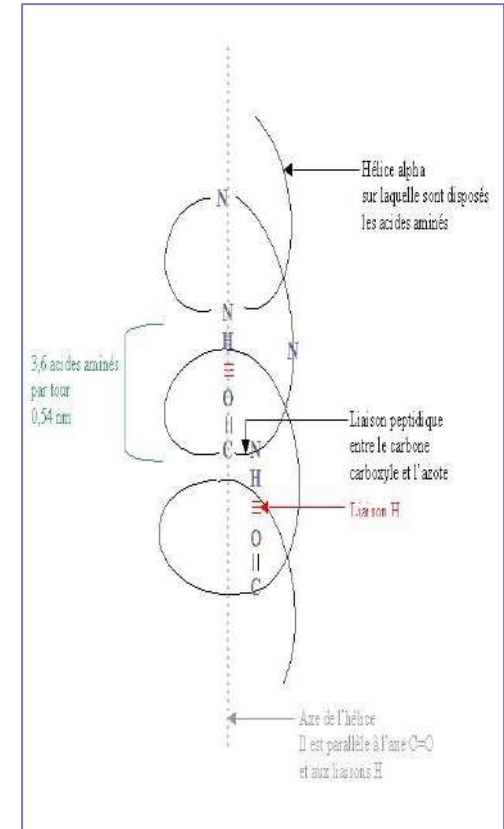
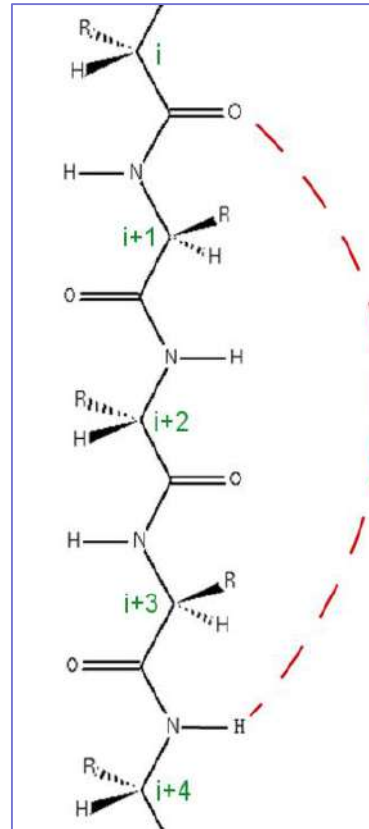
Feuillets plissés beta



Boucles en épingle à cheveux

1.2. Structure secondaire L'hélice α droite

- ❑ Structure secondaire la plus fréquente.
- ❑ Hélice est droite de pas d'hélice de 0,54 nm
- ❑ Le tour d'hélice contient 3,6 acides aminés de la chaîne carbonée
- ❑ L'hélice est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre le groupement carbonyl de la liaison peptidique de l'acide aminé n et le groupement amine de la liaison peptidique de l'acide aminé $n+4$



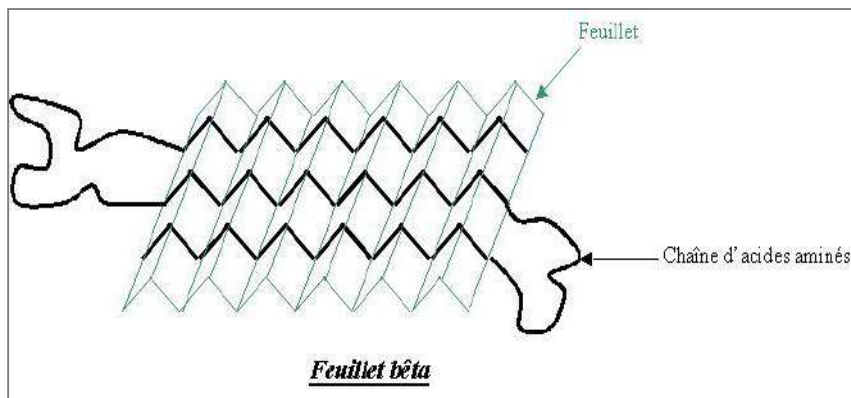
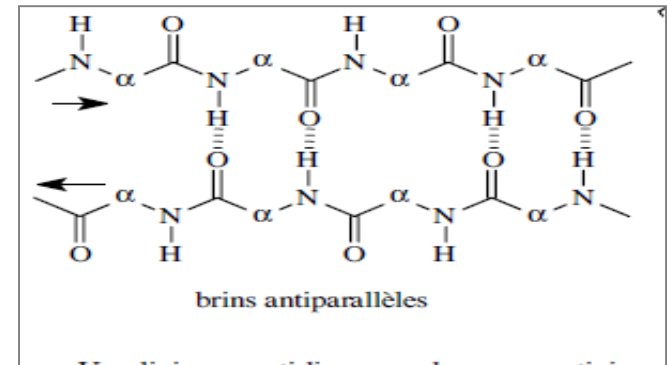
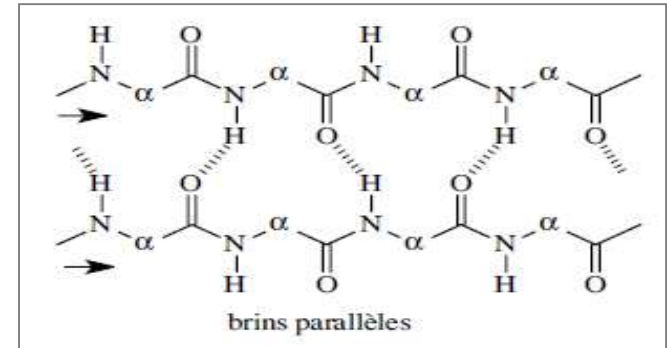
1.2. Structure secondaire Le feuillet β

❑ **feuillet β plissé**: structure à plat, étirée et étalée stabilisée par liaison hydrogène

❑ sens peptidique des deux brins adjacents identique \Rightarrow les feuillets sont dits **parallèles**

❑ sens peptidique des deux brins adjacents opposés \Rightarrow les feuillets sont dits **anti-parallèles**.

❑ **Les feuillets β anti-parallèles sont plus stables** car les liaisons hydrogènes subissent de plus faibles distorsions.



1.2. Structure secondaire Coudes β et boucles en épingle à cheveux

la chaîne polypeptidique forme des coins et se replie sur elle-même. La présence de ces coudes β appelés aussi coudes en épingle à cheveux conduit à un changement brutal de direction du feuillet β

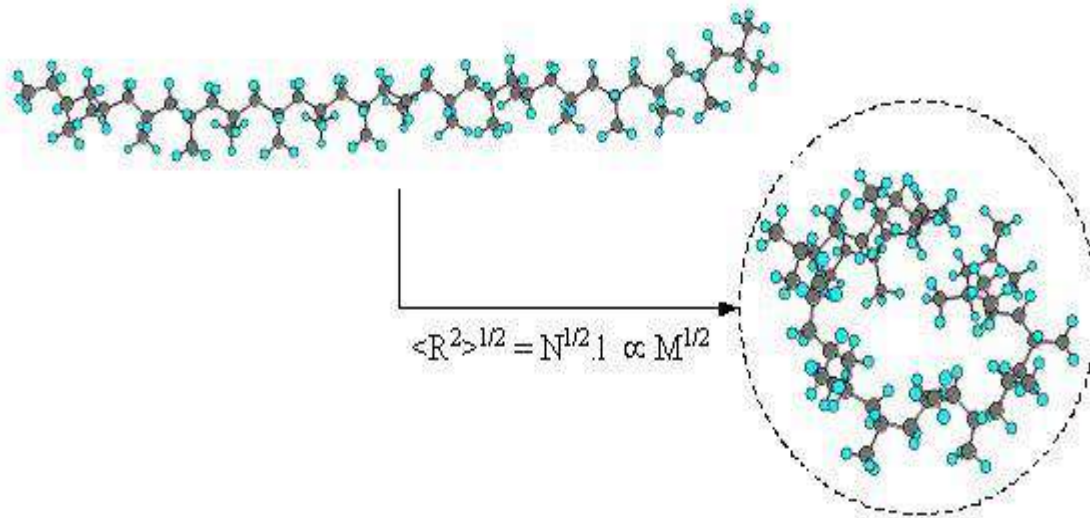
Les coudes ne sont pas des structures périodiques. Il s'agit plutôt d'un repliement particulier du squelette carboné localisé à 3 ou 4 résidus consécutifs. Les coudes permettent bien souvent de relier 2 structures secondaires périodiques (hélices et/ou brins).

Généralement, on trouve des boucles entre : des hélices α , des hélices α et des brins β , des brins β parallèles ou de feuillets différents.

*Les facteurs de transcription comportent un motif très particulier : **hélice-boucle-hélice***

1.2. Structure secondaire « Random coil » ou pelote statique

Certaines régions protéiques ne sont pas structurées dans des conformations périodiques comme l' α -hélice ou le feuillet plissé β : leur forme irrégulière est qualifiée de **pelote statistique (random coil)**. Cette structure n'est pas pour autant inorganisée, elle obéit aux contraintes locales de voisinage.



La taille de cette pelote s'exprime en fonction de la distance quadratique moyenne entre les deux extrémités N nombre de liaisons l longueur des liaisons M masse de la pelote

I-Niveaux de structure des enzymes

1.3. Structure super-secondaire

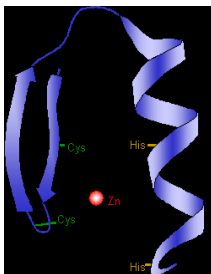
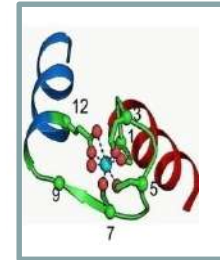
□ Les motifs structuraux

□ **structures** (ou motifs) **super-secondaires** correspondent à des associations caractéristiques de feuillets et hélices fréquentes.

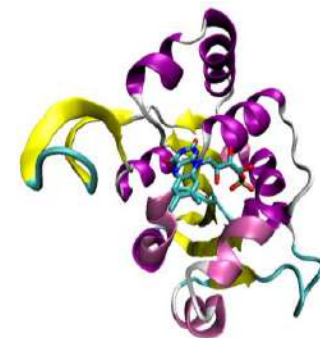
□ Les motifs protéiques peuvent être définis d'après leur séquence primaire ou d'après l'arrangement des éléments de structure secondaire.

□ Les motifs les plus fréquents sont:

- Hélice-tour-hélice
- Hélice-boucle-hélice
- Doigt de zinc
- leucine zipper (bZIP)
- *Winged Hélice* (WH) hélice ailée : Protéine Fox
- **Le Pli** ou motif **Rossmann** :



Un atome de zinc central stabilise le repliement de la protéine en établissant quatre liaisons avec deux résidus cystéine et deux résidus histidine



Le **pli Rossmann** (*Rossmann fold*):
3 feuillets β liés à 2 hélices α de manière alternée (β - α - β - α - β).

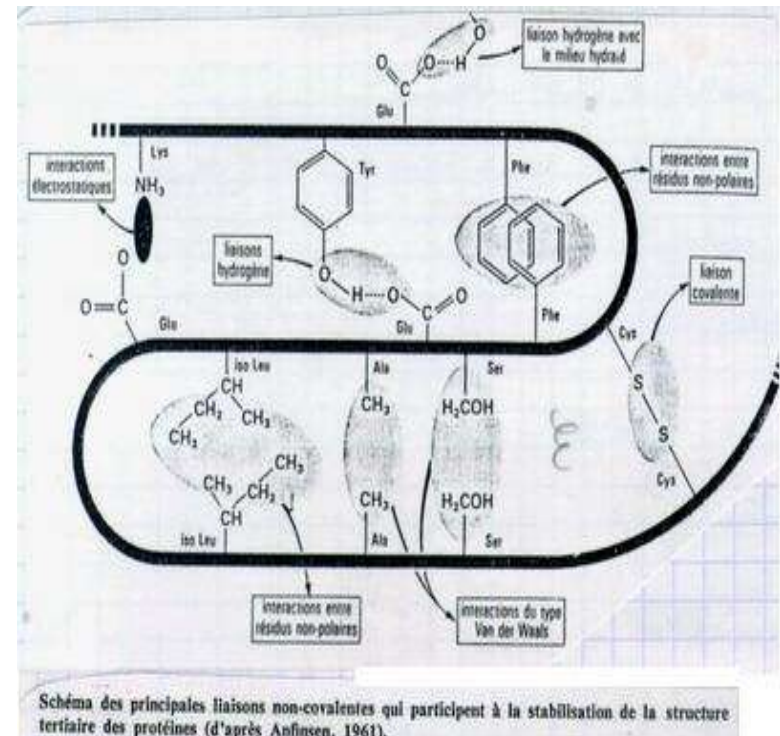
I-Niveaux de structure des enzymes

1.4. Structure tertiaire

- ❑ La structure tertiaire correspond au repliement tridimensionnel spontanée de la chaîne polypeptidique
 - ❑ La structure primaire est responsable de la structure tertiaire
 - ❑ Les interactions avec l'eau sont responsables de la
 - ❑ conformation tridimensionnelle
 - ❑ Les protéines dans de très nombreux cas présentent une structure tertiaire “sphérique ou ovoïde”.

❑ Forces de maintien de la structure tertiaire:

- Forces de Van der Waals
- Les liaisons hydrogènes
- Interactions hydrophobes
- Les liaisons ioniques
- Ponts disulfures



1.4. Structure tertiaire

❑ Domaines structuraux et famille protéique

- ❑ Les structures secondaires et super-secondaires s'organisent en unité structurale à conformation spatiale spécifique évolutivement conservée formant des régions réactionnelles et fonctionnelles spécifiques et indépendantes; **les domaines**
- ❑ Famille protéique: ensemble de protéines évolutivement reliées; un ou plusieurs domaines protéiques communs
 - ❑ *Classes des protéines selon les types de structures tertiaires (domaine), leur prédominance et leur distribution dans la molécule*

❑ Structures de type α

- Faisceaux d'hélices alpha reliées par des boucles
- « repliement globine »

❑ Structures Bêta antiparallèles

- Brins bêta antiparallèles (4 à plus de 10) arrangés en 2 feuillets
- Structure en tonneau
- Cœur hydrophobe

❑ Structure α/β

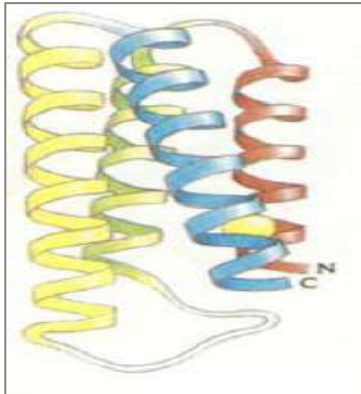
- Alternance de brins β et d'hélices α
- Motifs β - α - β (les brins β sont parallèles)
- Feuillet central parallèle ou mixte entouré d'hélices α

I-Niveaux de structure des enzymes

1.4. Structure tertiaire

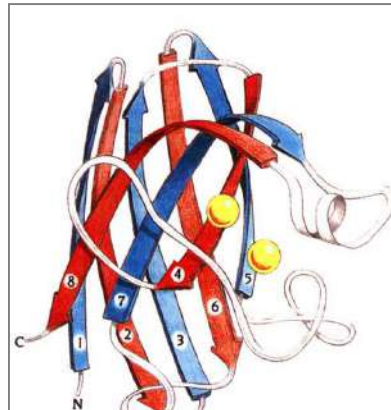
□ Exemples d'enzyme à structure α , β ou α/β

Structure α

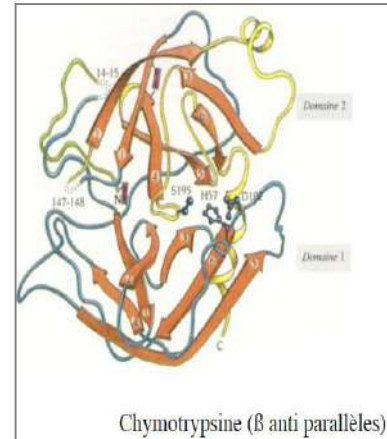


cytochrome b 562

structure β

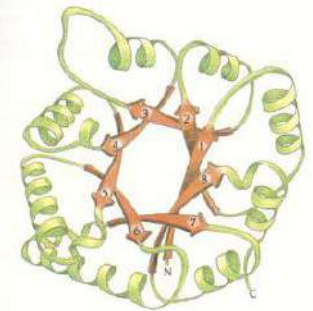


Superoxyde dismutase



Chymotrypsine (β anti parallèles)

structure α/β



triose-phosphate
isomérase

Ce type de structure ne concerne que facultativement les protéines globulaires.

l'association de sous-unités dans une même molécule protéique

sous-unités sont **toujours reliées par des liaisons faibles et jamais par des liaisons covalentes**

Une sous-unité à l'état libre est un **monomère**. La protéine est un **oligomère**.

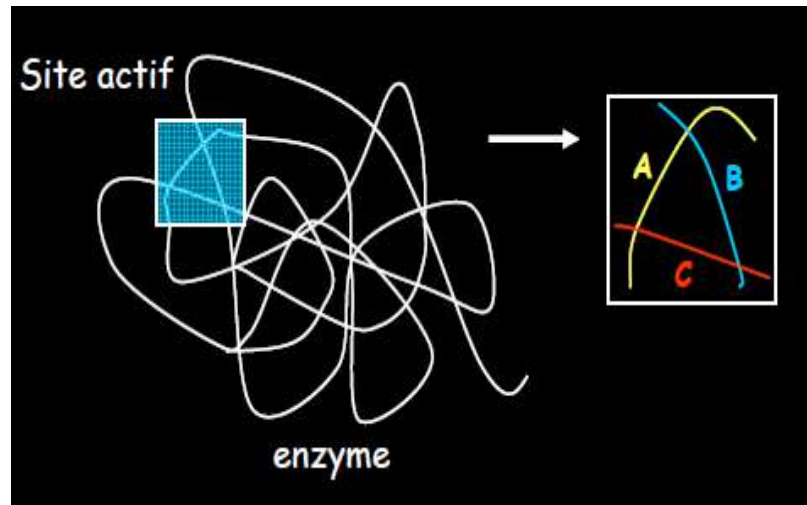
L'élément de symétrie se répétant n fois est un **protomère**.

Si toutes les sous-unités sont identiques le protomère prend le nom du monomère (exemple : protéine α_4)

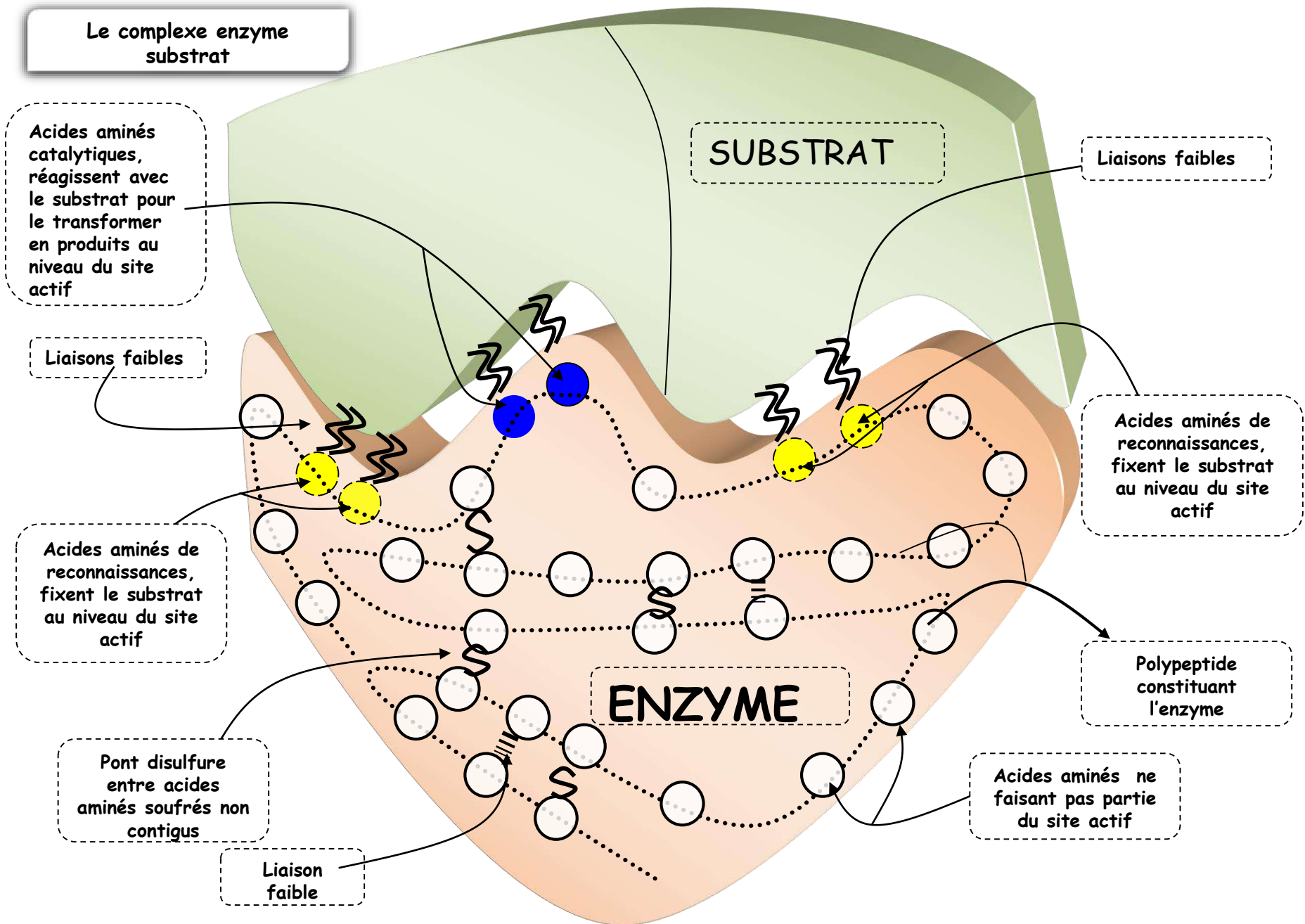
Si la protéine est constituée de 2 monomères α et 2 monomères β alors le protomère est $[\alpha \beta]$ et la protéine contient 2 fois le protomère, elle est dite " $\alpha_2 \beta_2$ ". *C'est par exemple le cas de l'hémoglobine*

II-Notion du site enzymatique

- Région particulière de la macromolécule enzymatique, souvent enfoui au sein de la protéine, de structure spatiale complémentaire en taille, forme et nature chimique du substrat, caractérisé par une grande diversité: petits, crevasses, hydrophobe, aa. polaires
- Il est constitué d'un petit nombre d'acides aminés, une douzaine au plus, qui le plus souvent ne sont pas contigus dans l'enchaînement de la chaîne polypeptidique.



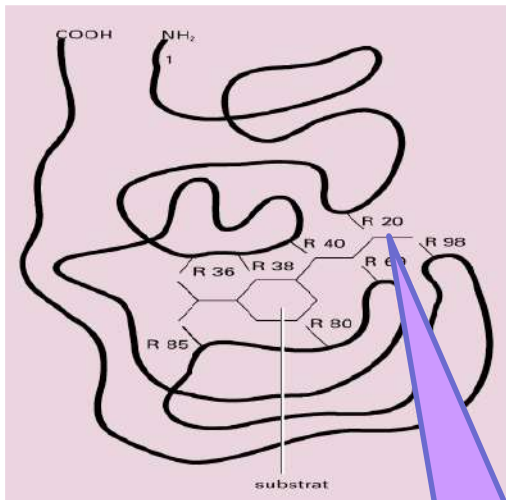
Le complexe enzyme substrat



II-Notion du site enzymatique

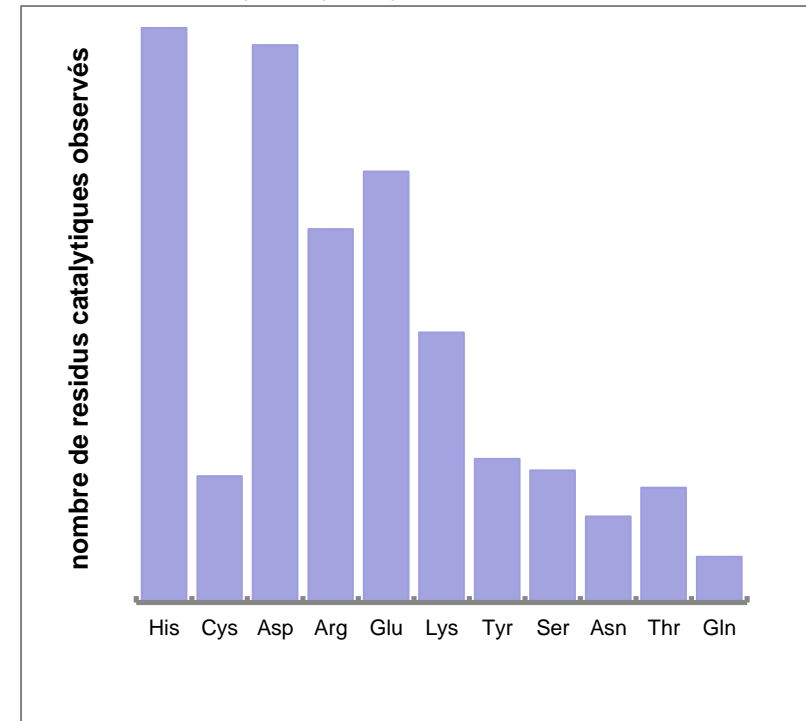
On distingue au sein du site enzymatique:

- ❑ les acides aminés qui constituent le **site de fixation du substrat** => **Reconnaissance et maintient le substrat**
- ❑ les acides aminés qui constituent le **site catalytique** ou site actif (2 ou 3 aa seulement), qui possèdent des potentialités réactives => **catalyse**.



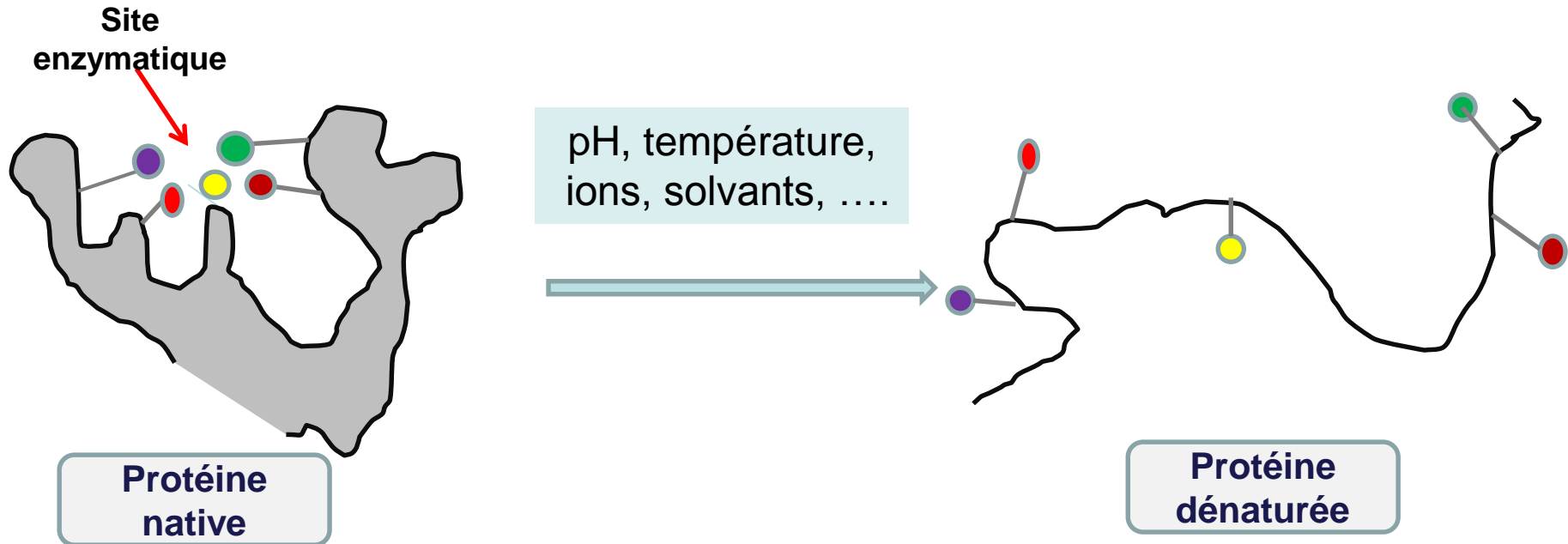
Fixation du substrat par des interactions à faible énergies (hydrogènes, électrostatiques, ..

Les acides aminés catalytiques sont polaires: His, Ser, Cys, Tyr, Lys, Asp,



Conséquence?

Dénaturation => perte d'activité enzymatique



L'activité catalytique dépend de l'intégrité de la conformation native

Facteurs de dénaturation

☐ pH

- modification de l'état d'ionisation de certains acides aminés
- rupture des liaisons hydrogènes

☐ température

- Energie de vibration ou de rotation
- déséquilibre des liaisons faibles

NB: chauffage important , acide fort ou base forte

→ dénaturation irréversible

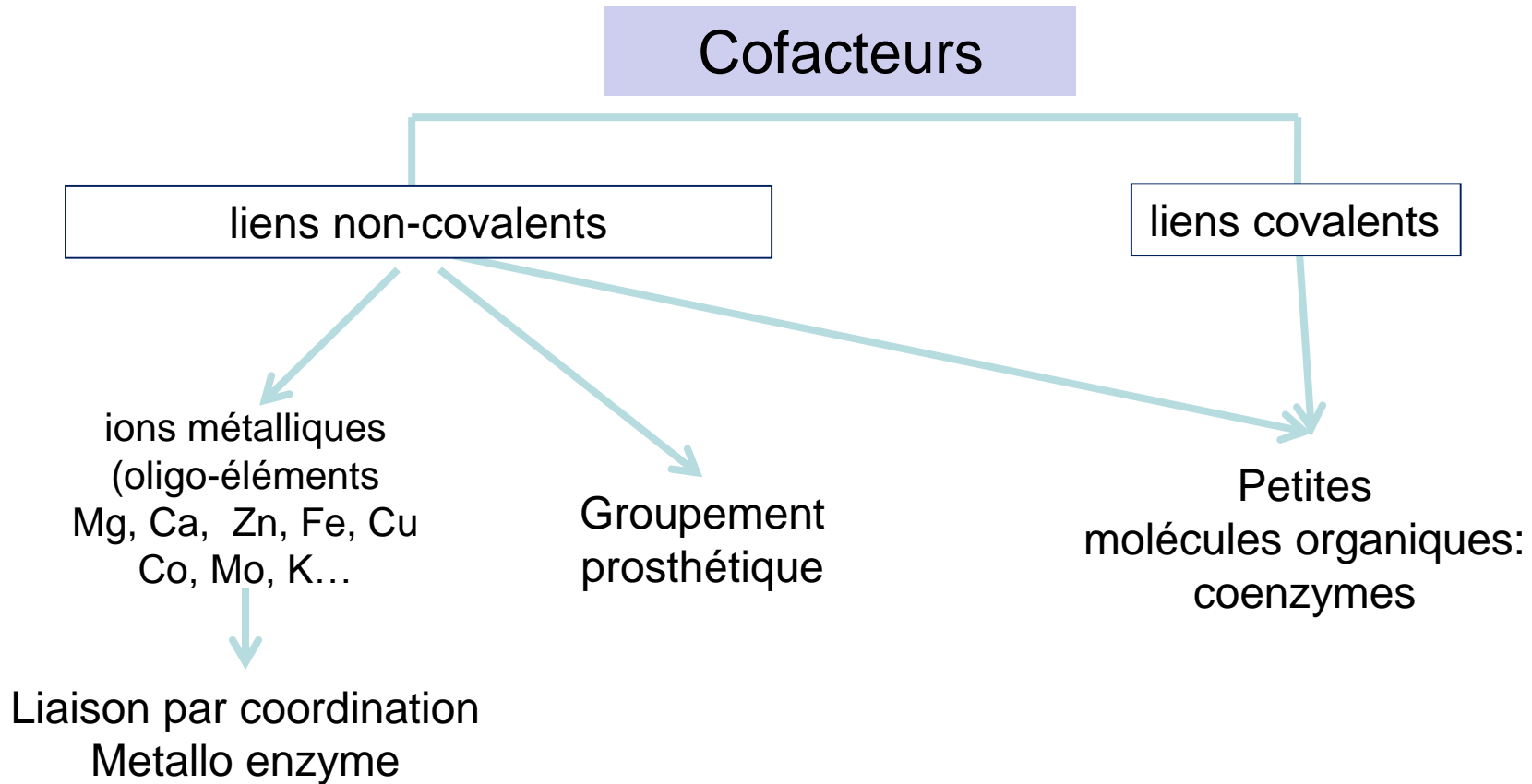
→ Rupture des liaisons covalentes

☐ Les agents chaotiques

- Urée $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$,
- Mercaptoethanol : rupture des liaisons S-S

☐ Les détergents

- SDS(dodecyl sulfate de sodium)
- rupture des interactions hydrophobes



- ☐ le coenzyme est une petite molécule de nature non protéique (parfois un simple ion métallique) lié à la protéine enzymatique.
- ☐ ils sont thermostables
- ☐ Dérivent de vitamines .
- ☐ Agissent de manière stoechiométrique dans la réaction chimique
- ☐ Diffèrent complètement des substrats des réactions, en effet, alors que les substrats sont transformés en produit, les coenzymes, après une ou plusieurs réactions retrouvent toujours leur état initial.
- ☐ Les coenzymes ne sont pas responsable de la spécificité de la réaction qui n'est assuré que par l'apoenzyme

Types De Coenzymes

✓ Les coenzymes activateurs

(coenzyme groupement prosthétiques ex : le FAD)

Coenzymes fortement liés à l'enzyme (apoenzyme) par des liaisons covalentes qu'il n'est pas possible de séparer sans dénaturer la protéine. Au cours de la réaction, le coenzyme ne se détache pas de l'apoenzyme.

✓ Les coenzymes transporteurs

(coenzyme cosubstrat ou coenzyme vrai ex : le NAD)

Coenzymes facilement dissociables de la partie protéique de l'enzyme (une simple dialyse suffit). Le coenzyme ne retrouve son état initial que dans une seconde réaction qui fait intervenir un second enzyme.

LES PRINCIPAUX COENZYMES

Nom du coenzyme	Abréviation	Vitamine	Structure générale	Groupe ment transféré
Nicotinamide-adénine-dinucléotide	NAD ⁺	Nicotinamide (vit PP)	Dinucléotide pyridinique	H
Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate	NADP ⁺	Nicotinamide	Dinucléotide pyridinique phosphorylé	H
Flavine-mononucléotide	FMN	Riboflavine (vit B2)	Riboflavine phosphorylée	H
Flavine-adénine-dinucléotide	FAD	Riboflavine	Adénosine-5'-monophosphate et riboflavine phosphorylée	H
Acide lipoi que ou lipoate	Lip (S2)	Acide lipoïde		H et acétyl
Métalloporphyrines	-		Hème ou hématine	Électrons
Adénosine triphosphate	ATP		Ribonucléotide-phosphates	Pm, AMP
Uridine-diphosphate	UDP		Ribonucléotide-phosphates	Ose, acide uronique
Cytidine-diphosphate	CDP		Ribonucléotide phosphates	Phosphoryl- choline
Coenzyme A	CoA	Acide pantothénique		Acyl et acétate
Acide tétrahydrofolique	THF	Acide folique		Groupe ment en C ₁
Biotine	-	Biotine (vit H)		Groupe ment carboxylique
Thiamine-pyrophosphate ou diphosphotiamine	TPP ou DPT	Thiamine (vit B1)	Ester diphosphorique de la thiamine	Groupe ment en C ₂
Pyridoxal-phosphate	PALP	Pyridoxine(vit B6)	Ester phosphorique du pyridoxal	Groupe ment aminé

Les coenzymes d'oxydoréduction

- Les nicotinamides dinucléotides :

Nicotinamide adénine dinucléotide **NAD**

Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate. **NADP**

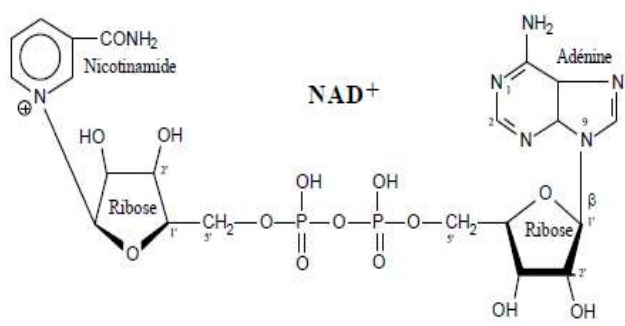
- Propriétés

Absorbance max : 260 nm, 340 nm

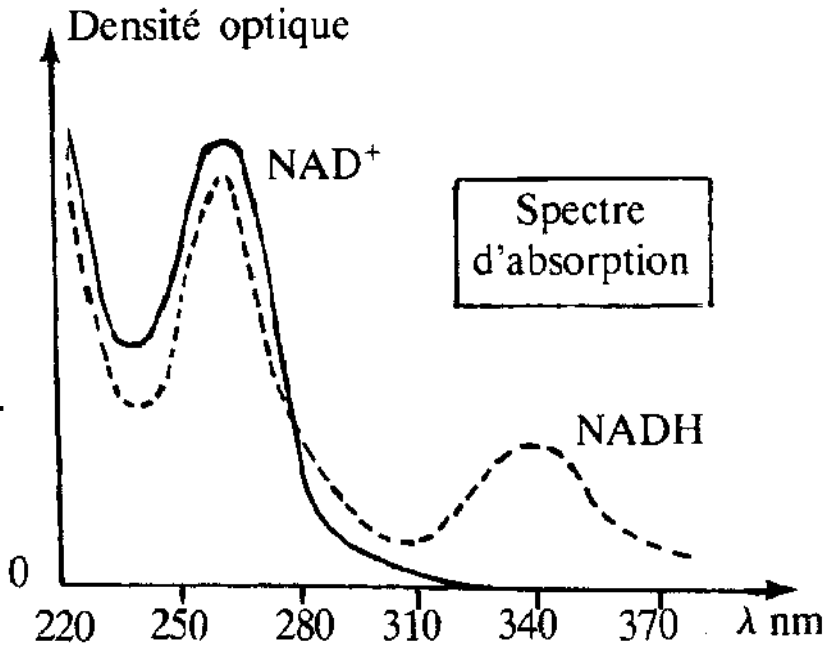
Fluorescence (émission à 460 nm)

Travail en milieu tamponné pour la stabilité

Réactions d'oxydoréduction



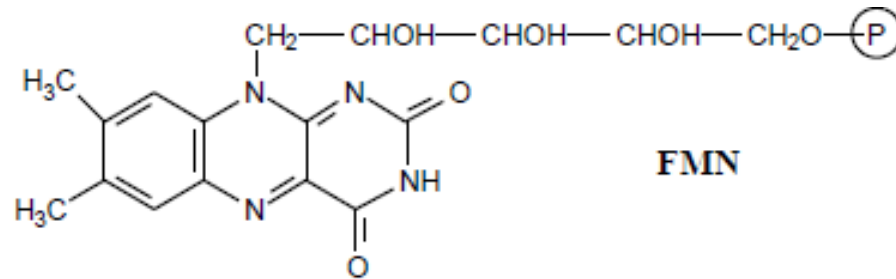
- NAD fonctionne le plus souvent à l'état oxydé : (NAD⁺ NADH + H⁺) dans les réactions du catabolisme, il est ensuite réoxydé dans la chaîne respiratoire, ou par un processus fermentaire anaérobie.
- NADP fonctionne le plus souvent à l'état réduit : (NADPH + H⁺ NADP⁺) dans les biosynthèses des acides gras par exemple.



○ **Les flavines nucléotides**

✓ **FMN : flavine mononucléotide et FAD : flavine adénine dinucléotide.**

- *Dérivent de la riboflavine, vitamine B2*
- *Absorbent dans le visible (jaune à l'état oxydé, incolore à l'état réduit).*
- *Très sensibles à la lumière.*
- *Très fortement liés à la protéine = flavoprotéine*



Les coenzymes transporteurs de groupement

- **PLP: phosphate de pyridoxal**

Dérive de la vitamine B6 (pyridoxine),
rôle dans le catabolisme des acides aminés.

Réactions de transamination, décarboxylation et de clivage des acides aminés et des réactions d'élimination.

Mécanisme réactionnel des enzymes à PLP est de type ping-pong.

- **Coenzyme A**

Dérive de vitamine du groupe B).

Transport de groupements acyl;

La fonction thiol se condense avec un groupement carboxylique des substrats à activer (formation d'une liaison "riche en énergie" acyl thio ester).



- **l'ATP (adénosine triphosphate)**

rôle de réserve énergétique

rôle de coenzyme transporteur de groupement phosphate.

IV. Enzymes multifonctionnels et complexes multienzymatique

- ❖ Ensembles d'enzyme ou d'activité enzymatique qui catalysent des réactions consécutives d'une même voie métabolique.
- ❖ Conséquences fonctionnelles dans la catalyse et la régulation de l'activité enzymatique:
 - ❖ Tel la canalisation des métabolites formés (phénomène de canalisation)
 - ➔ phénomène de diffusion libre des métabolites évité.
 - ➔ Augmentation de la vitesse globale de la réaction
 - ❖ Régulation de l'utilisation du métabolites au niveau de l'embranchement des voie métabolique par transfert direct du dit métabolite.
 - ❖ Grand stabilité thermodynamique des enzymes sous forme de complexe

❑ **Enzymes multifonctionnelles:** Une enzyme multifonctionnelle est une enzyme qui porte plusieurs activités catalytiques dans une chaîne protéique,

- ❑ tryptophane synthétase (hétéro oligomérique) Enzyme bi fonctionnell
- ❑ Phosphoribosylanthranilate isomérase-indole-glycyl synthétase (monomère)

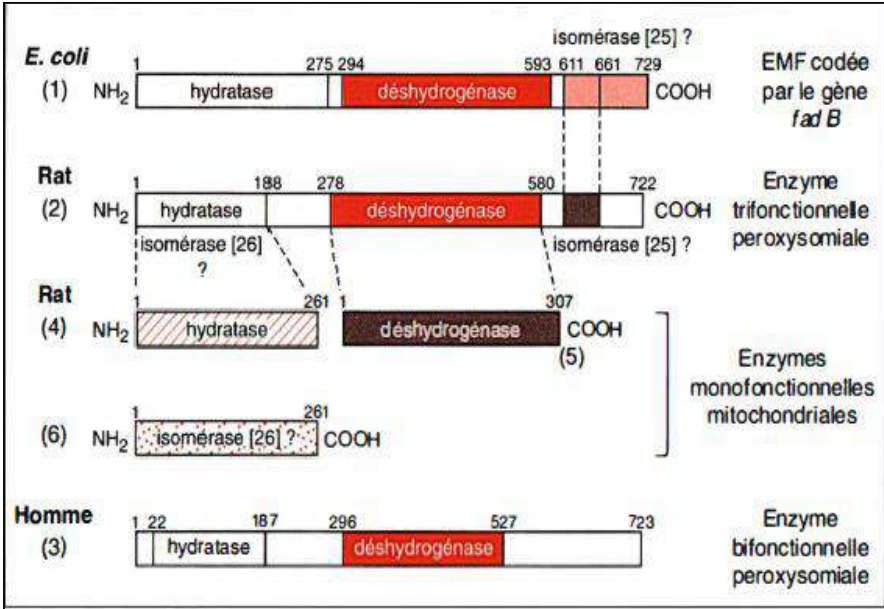
❑ **Système multienzymatique:** complexe formé par l'association de plusieurs enzymes/

- ❑ CAD
- ❑ Pyruvate déshydrogénase
- ❑ Complexe enzymatique de synthèse des Acides gras

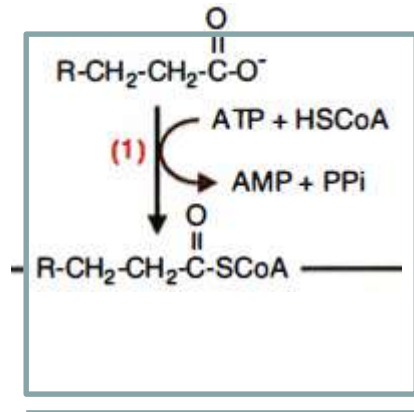
❑ **Complexe multienzymatique transitoire**

Ex1. Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase

L'enzyme bifonctionnelle énoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et l'oxydation peroxysomiale des acides gras à très longue chaîne



Localisation des domaines fonctionnels hydratase, déshydrogénase et isomérase sur les polypeptides multifonctionnels de trois espèces.



- (1) Acyl-CoA synthétase
- (2) Acyl-CoA oxydase
- (3) Enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
- (4) β-cétothiase
- (5) Acyl-CoA déshydrogénase
- (6) Enoyl-CoA hydratase
- (7) 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
- (8) β-cétothiase
- (9) Carnitine octanoyl transférase

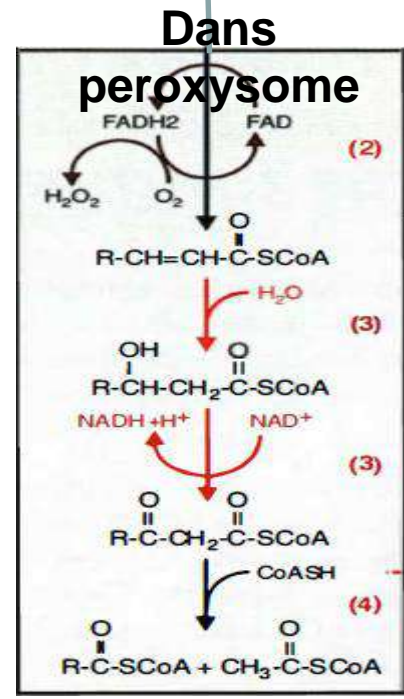


Schéma des systèmes deβ3-oxydation peroxysomiale des acides gras.

Ex1. Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (suite)

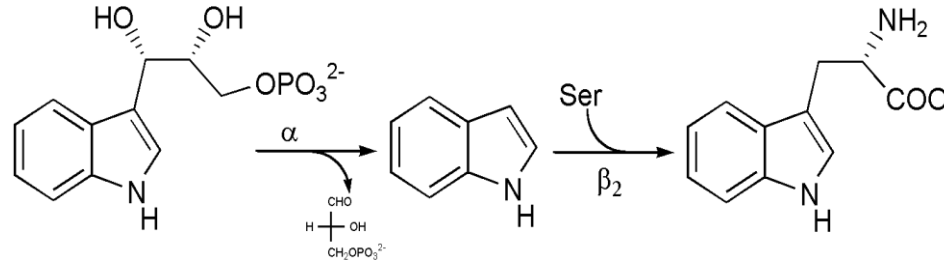
- ❑ L'enzyme bifonctionnelle est située dans la matrice peroxysomiale de masse moléculaire de 79 kDa.
- ❑ Elle possède le tripeptide ser-lys-leu en C-terminal, responsable de son importation dans le peroxysome.

- ❑ ADNc comporte 3 779 nucléotides, avec le rat, 80 % d'analogie au niveau de l'ADN et 78 % au niveau Protéique abondant dans le foie et les reins.
- ❑ Deux régions contiennent les activités énoyl-CoA hydratase (acides aminés 22 à 1 87) et 3-hydroxyacylCoA déshydrogénase (acides aminés 296 à 527).

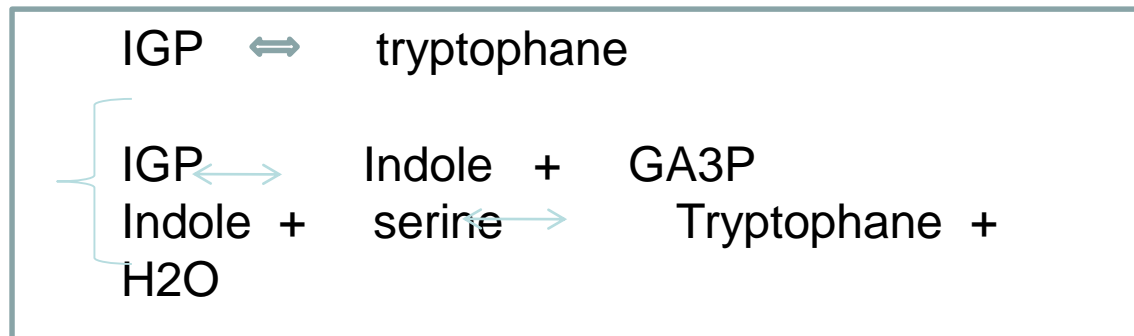
- ❑ Cette protéine est composée de deux sous-unités non identiques, associées sous forme de tétramère. Cette PMF est particulière car, contrairement aux autres protéines fonctionnelles de la mitochondrie connues, elle n'est pas soluble mais localisée dans la membrane mitochondriale.

Ex2. Tryptophane synthétase: enzyme bifonctionnelle

Cette enzyme catalyse les deux dernières étapes de la biosynthèse du tryptophane.
Présente chez les bactéries, les archées et certains eucaryotes, en particulier les plantes et les champignons.



Absente chez les mammifères, pour lesquels le tryptophane est un acide aminé essentiel



C'est une enzyme bi-fonctionnelle, comportant deux sites actifs, portés par deux types de sous-unités différentes.

- La sous-unité α catalyse la formation d'indole à partir d'indole-3-glycérol phosphate.
- La sous-unité β catalyse la condensation de l'indole sur la sérine pour former le tryptophane.

Ex2.Tryptophane synthétase (suite)

❑ Enzyme bactérienne heterodimère $\alpha 2\beta 2$

MM 143kDa

❑ α :MM=20kDa

❑ β : MM= 43kDa

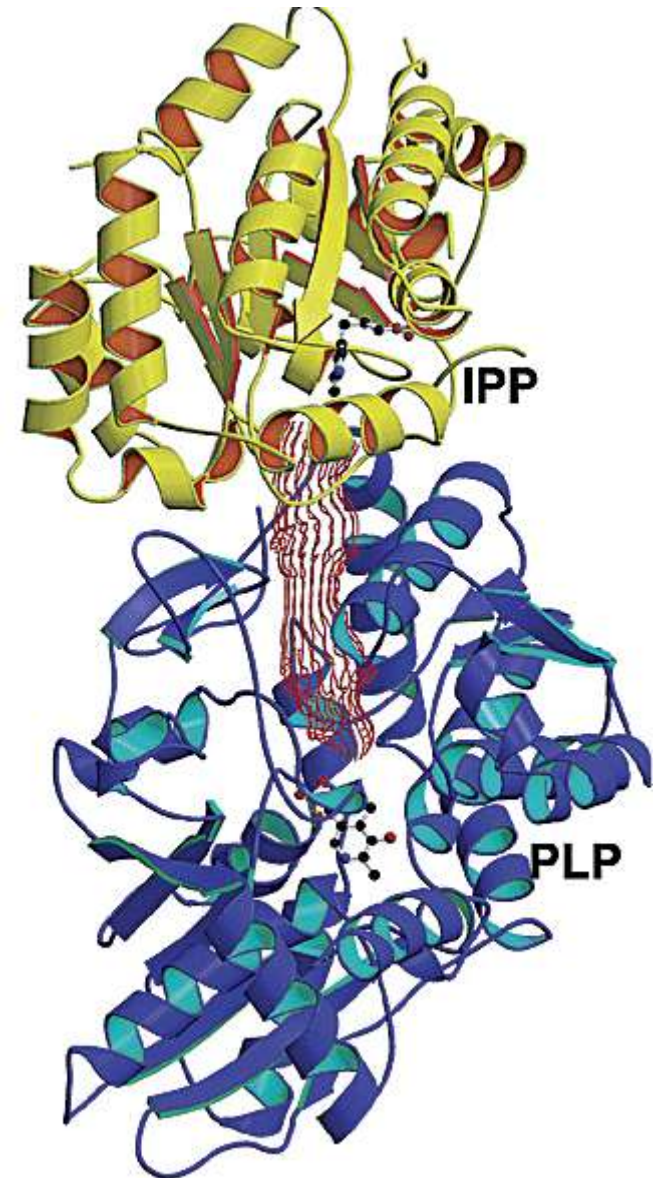
2domaines

PLP (phosphate de périododoxal)

lie covalamment à SU β à l'interface
des 2 domaines

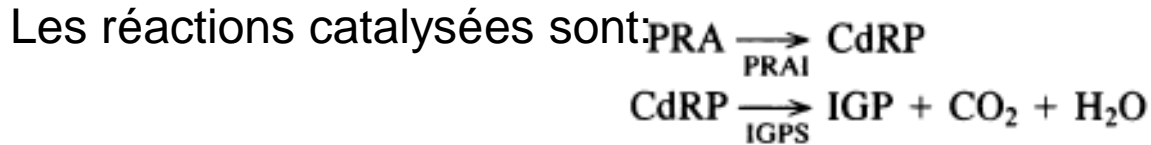
❑ Existence d'un tunnel reliant les centres actifs des deux SU (1^{ère} visualisation de la structure par DRX). Diamètres assez grand pour l'indol. La plus grand partie se situe dans le domaine sur la SU β . le tunnel est assez grand pour accommoder 4 molécules d'indole., il est long de 25Å°

❑ libre diffusion et direct de l'indol entre les sites actifs à travers ce tunnel avec une vitesse de diffusion rapide et transformation de l'indole ($> 1000s^{-1}$)pour éviter l'accumulation de l'indole dans le canal.



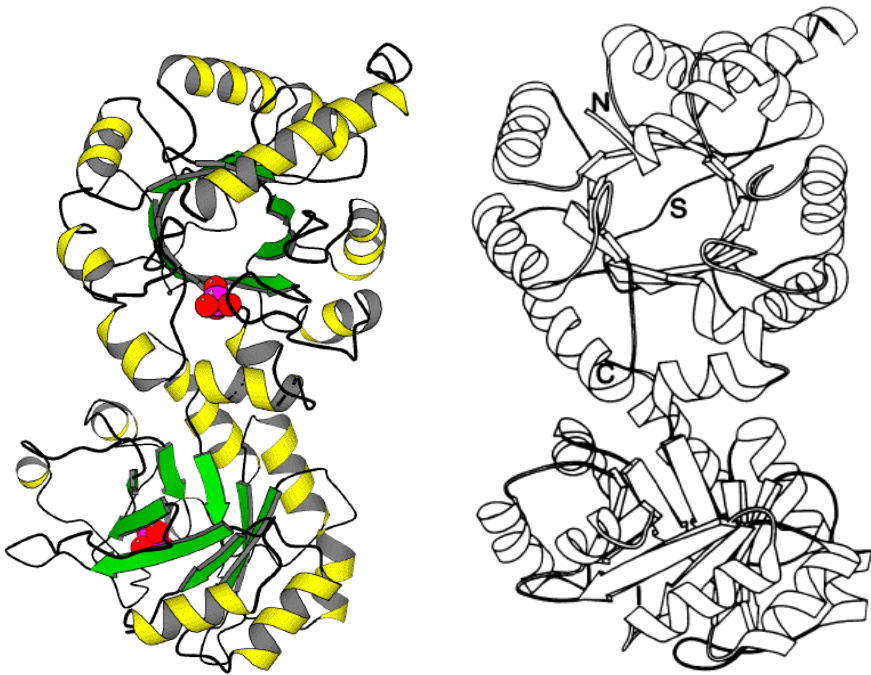
Ex3. Phosphorybosylthranilate isomérase-indolglycérol phosphate synthétase; enzyme bifonctionnelle monomérique

Voie de Synthèse du tryptophane à partir du chorismate:



PRAI= Phosphorybosylanthranilate isomérase

IGPS= isomérase-indolglycérol phosphate synthétase



Enzyme de E. Coli:

- MM=49,5
- Une chaîne polypeptidique repliée en 2 domaines distincts:
 - ✓ domaine N-terminal à activité IGPS
 - ✓ Domaine C-ter à activité PRAI
- Le phénomène de canalisation semble impossible dans le cas de cette enzyme

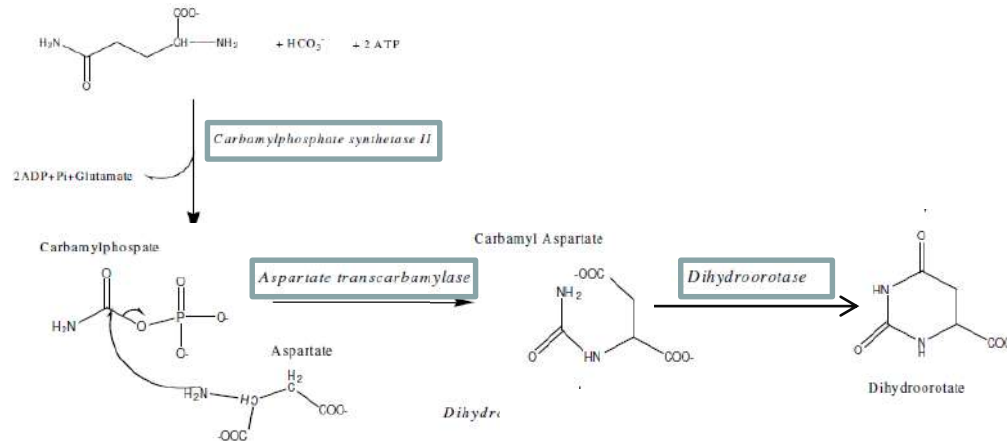
Ex4. La protéine CAD

❖ **LA CAD** « Carbamoyl-Phosphate Synthetase 2, Aspartate Transcarbamylase, And Dihydroorotase »

La protéine CAD est une protéine multifonctionnelle chez les eucaryotes et multienzymatique chez les procaryotes. Elle catalyse les trois premières étapes de

la voie de biosynthèse de novo des pyrimidines à partir de la glutamine

Elle porte les activités **carbamylphosphate synthétase (CPSase)**, **aspartate transcarbamylase**, **dihydroorotase**.



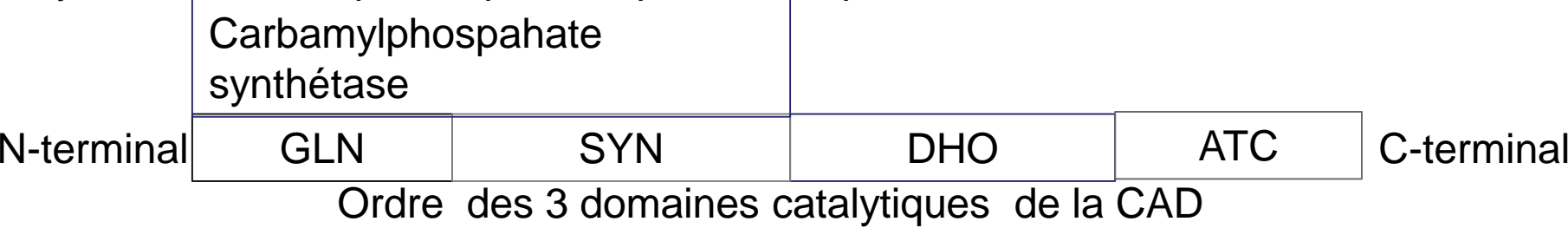
Le composant carbamylphosphate synthétase qui catalyse l'étape limitante de la voie de biosynthèse est soumis à une régulation par des effecteurs allostériques. Le flux des

Ex4. La protéine CAD (suite)

Chez le procaryotes les trois activités enzymatiques sont catalysées par 3 enzymes indépendants. Chez les mammifères ,, ces activités sont portés par une protéine trifonctionnelle. L'enzyme trifonctionnelle est codé par un seul gène.

C'est une enzymes constituée d'un homomultimère composé de 3 ou plus de SU identiques.

Chez la levure, la carbamylphosphate synthétase et l'aspartate tanscarbamylase sont portés sur une seule chaine polypeptidique, alors que l'activité dihydroooratase est portée par une proteine séparée.



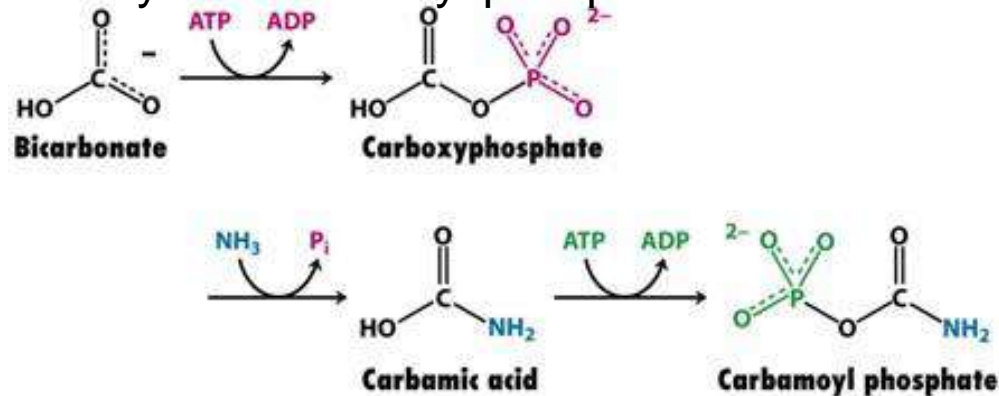
Structures d'un trimère multifonctionnel

- SU identiques séparées par une boucle sensible aux protéase
- Domaines séparés par protéolyse limitée ou par voie génétique sont actifs
- hypothèse CAD résulte de la fusion des gène au cours de l'évolution

Ex5. Carbamylphosphate synthétase

Carbamoyl Phosphate Synthetase Catalyzes the three step synthesis of carbamoyl phosphate Bicarbonate phosphorylated by phosphate from ATP forming carboxyphosphate.

Carboxyphosphate reacts with ammonia to form carbamic acid. Carbamic acid is phosphorylated by ATP to yield carbamoyl phosphate.



Unnumbered figure pg 662a
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

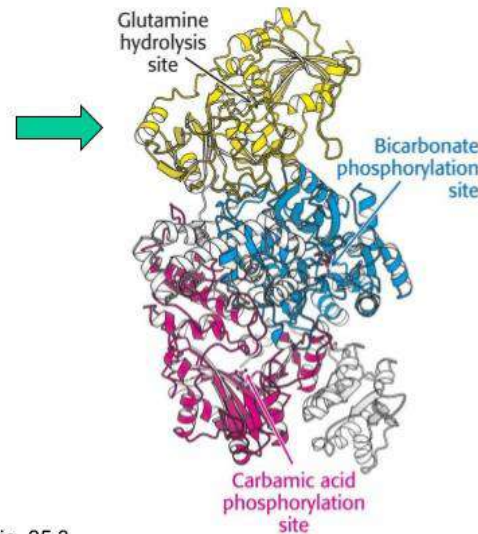
* Consommation de 2ATP / carbamoyl phosphate synthetisé

Ex5. Carbamylphosphate synthétase (suite)

Carbamoyl phosphate synthetase consists of two subunits:

- *The small subunit catalyzes the hydrolysis of glutamine to glutamate and ammonia
- *The ammonia is passed along an internal tunnel to the large subunit, where it is reacted with bicarbonate
- *The determined three-dimensional structure of carbamoyl phosphate synthetase sets a new long distance record in that the three active sites are separated by nearly 100 Å. * Increases the rate of reaction because the substrate is not “released” from the enzyme.
- *Protects labile substrates from degradation by hydrolysis –Carbonic acid decomposes in 1s at pH =7.

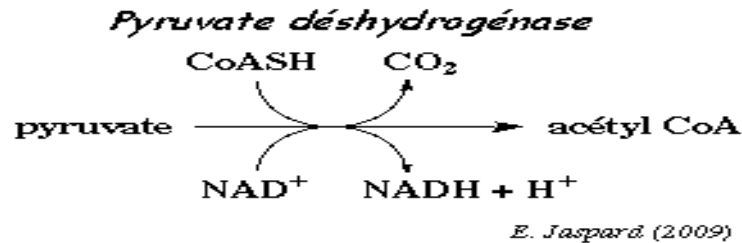
Structure of Carbamoyl phosphate synthetase II



Stryer Fig. 25.3

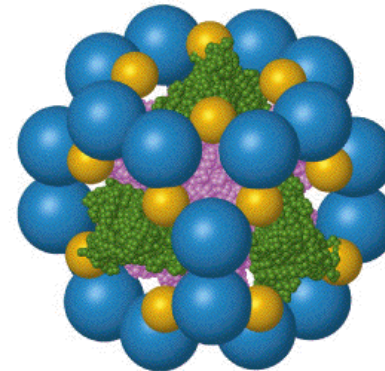
Ex6. Le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC)

Le **complexe pyruvate déshydrogénase (PDC)** est l'association de trois enzymes intervenant séquentiellement pour catalyser la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA.



Le PDC est constitué comme lui d'une décarboxylase, d'une acyltransférase et d'une oxydo-réductase. Chez les procaryotes, il est organisé selon une symétrie qui varie suivant les espèces, cubique chez les bactéries à Gram négatif, avec 24 sous-unités E2¹, et dodécaédrique chez les bactéries à Gram positif, avec 60 sous-unité E2². la PDH de Escherichia coli contient 60 sous-unités pour une masse molaire de $5 \cdot 10^6$ à $1 \cdot 10^7$ Daltons

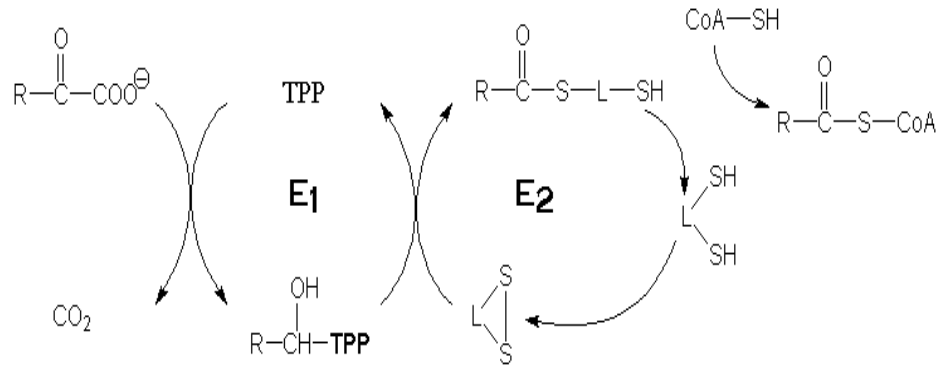
Chez les eucaryotes, on le trouve dans la matrice mitochondriale, l'enzyme humaine étant constituée de 96 sous-unités organisées selon une symétrie dodécaédrique³



Ex6.Le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC) (suite)

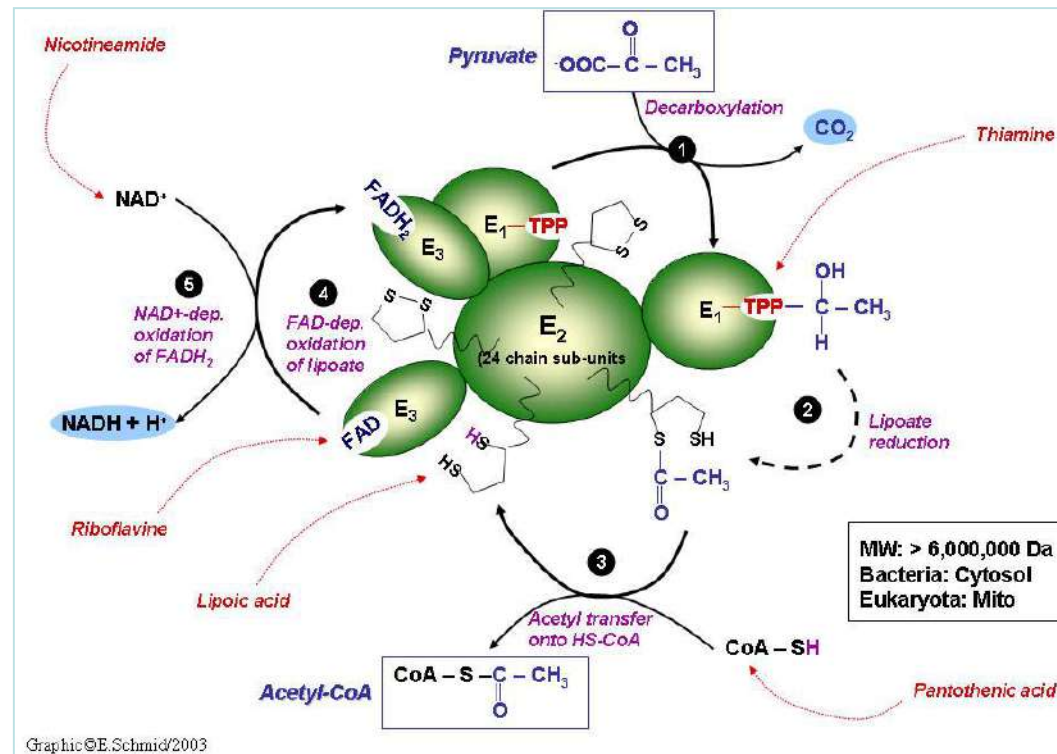
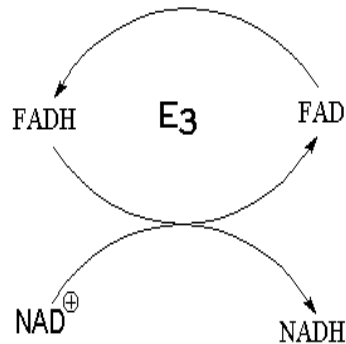
<u>Enzyme</u>	Abrév.	<u>Cofacteurs</u>	Nombre de sous-unités	
			<u>Procaryotes</u>	<u>Eucaryotes</u>
<u>Pyruvate déshydrogénase</u> EC 1.2.4.1 : <u>décarboxylase</u>	E1	<u>Thiamine pyrophosphate</u> (TPP)	24	30
<u>Dihydrolipoamide de S-acétyltransférase</u> EC 2.3.1.12 : <u>acyltransférase</u>	E2	<u>Lipoamide / dihydrolipoamide Coenzyme A</u> (CoA-SH)	24-60	48-60 ⁴
<u>Dihydrolipoyl déshydrogénase</u> EC 1.8.1.4 : <u>oxydo-réductase</u>	E3	<u>Flavine adénine dinucléotide</u> (FAD) <u>Nicotinamide adénine dinucléotide</u> (NAD ⁺)	12	12

Ex6.Le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC) (suite)



Cofactors:

TPP	(E ₁)
Lipoic acid, CoA	(E ₂)
FAD, NAD ⁺	(E ₃)



Ex6.Le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC) (suite)

Pyruvate déshydrogénase (I) : décarboxylase

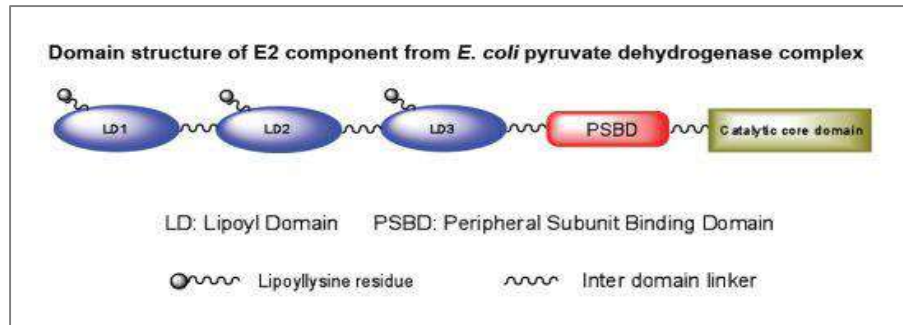
La décarboxylase liée au TPP, commence par décarboxyler le pyruvate en acétaldéhyde. Il intervient une molécule d'eau pour libérer l'ion bicarbonate. L'acétaldéhyde est aussitôt fixé sur le noyau thiazole du TPP.

La décarboxylase va transférer cet acétaldéhyde sur le coenzyme lié à la transacétylase (lipoamide). Ce faisant, elle sépare le radical acétyl d'une part et un hydrogène d'autre part qui vont se fixer respectivement sur les deux atomes de soufre. Imaginons que nous hydrolysions la liaison entre le soufre du dernier carbone et le radical : cela donnerait d'une part l'acide acétique et d'autre part le dihydrolipoamide. Ce transfert est donc une oxydoréduction au cours de laquelle l'acétaldéhyde a été oxydé en acide acétique et le lipoamide réduit en dihydrolipoamide. Le potentiel d'oxydoréduction du couple acétaldéhyde/acide acétique (-580 mv) étant très inférieur à celui du couple lipoamide/dihydrolipoamide (-290 mv) une partie de l'énergie produite par cette réaction couplée est conservée dans la liaison acyl-thiol qui unit l'acide acétique au dihydrolipoamide : c'est une liaison riche en énergie.

Ex6.Le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC) (suite)

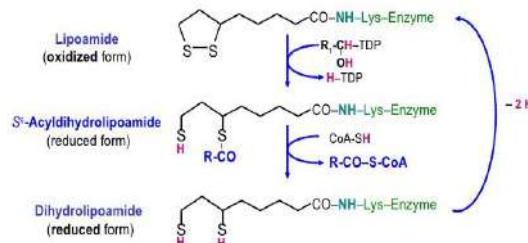
Pyruvate déshydrogénase (II) : transacétylase

La transacétylase transfère à nouveau le radical acétyl et l'énergie de la liaison riche en énergie sur un coenzyme A libre et l'Hydrogène de ce coenzyme sur le Soufre libéré du dihydrolipoamide. Le produit est l'acétyl-coenzyme A.

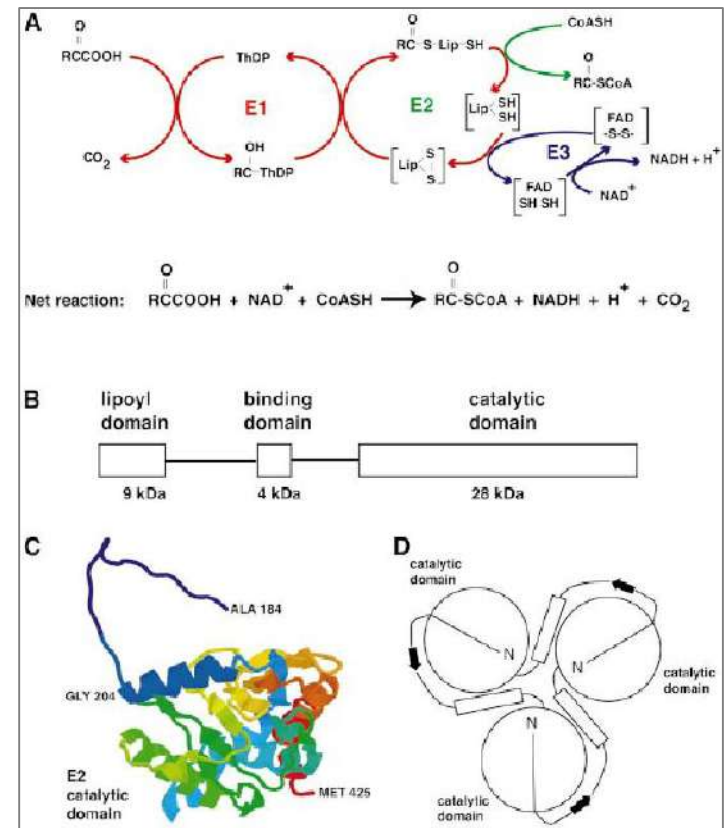


Lipoate (lipoamide)

part of the 2-oxo acid dehydrogenase complex (see the following lectures)
it is oxidant of a group carried by thiamine diphosphate (TDP),
binds the resulting acyl as thioester and transfers the acyl to coenzyme A:



71



Ex6.Le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC) (suite)

Pyruvate déshydrogénase (III) : lipoyl déshydrogénase

La déshydrogénase enfin qui est une flavoprotéine dont le noyau flavine a un potentiel d'oxydoréduction de -290 mv, réoxyde le dihydrolipoamide en lipoamide en transportant les Hydrogènes sur la flavine pour réduire un coenzyme NAD^+ en NADH et libérer un proton.

L'ensemble des réactions catalysées par ce multienzyme libère 38 kJ de chaleur par mole de pyruvate oxydée.

Le pyruvate ayant subi successivement une décarboxylation et une oxydation, on appelle l'ensemble : décarboxylation oxydative.

Comme toutes les réactions de décarboxylation, celle du pyruvate est irréversible.

isoenzymes ou isozymes : enzymes de même fonction mais de structure différente, ayant des propriétés physico-chimiques (charge électrique, taille, mobilité électrophorétique, ...) sont différentes. Ces enzymes présentent habituellement des paramètres cinétiques différents ou des propriétés de régulation différentes.

alloenzymes ou allozymes : isoenzymes codées par des allèles différents d'un même gène: ce sont des isozymes qui présentent une ségrégation mendélienne simple.

=> **véritable outil pour les généticiens des populations et les taxonomistes.**

Deux grands groupes sont à distinguer :

- ☐ Isoenzymes unigéniques,
- ☐ Isoenzymes multigéniques.

En biochimie, les isozymes sont des isoformes (variétés très proches) d'enzymes. En général, elles sont codées par les mêmes gènes mais ont muté avec le temps. Bien que les définitions d'allozyme et d'isoenzyme soient différentes, on utilise souvent les deux mots de façon interchangeable.

1.LES ISOENZYMES UNIGENIQUES

- ❑ Isoenzymes ne se distinguant pas entre elles par leur commande génétique;
- ❑ Leurs différences de structure résultent de toutes les modifications secondaires que peut subir la chaîne polypeptidique originelle.
 - isoenzymes unigéniques différant par leur structure primaire
 - combinaison à d'autres molécules
 - perte d'une partie de la molécule.
 - isoenzymes unigéniques différant par leur structure tertiaire ou quaternaire : isomères de conformation ou conformers

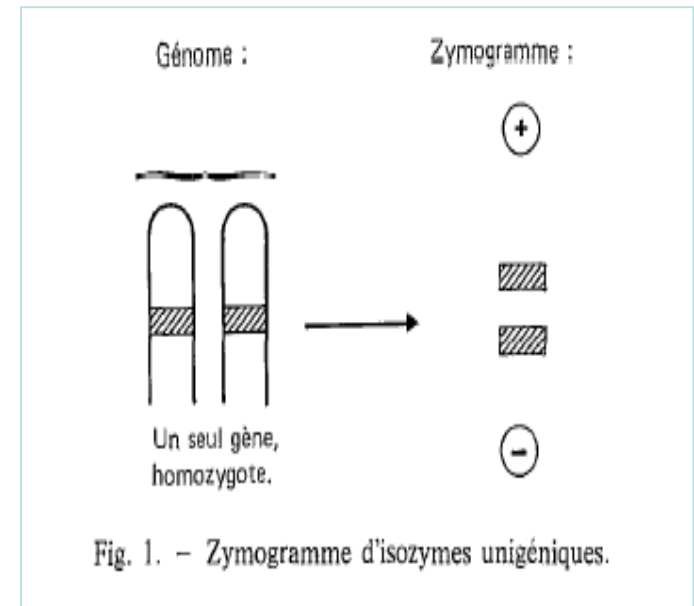


Fig. 1 : Zymogramme de deux isoenzymes unigéniques. Formes différentes d'une même enzyme, produites par l'action d'un seul gène monomorphe (sujet homozygote pour le gène considéré, modifications secondaires de la molécule enzymatique).

Les causes de l'apparition des isoenzymes sont de 3 ordres

- -Existence de plusieurs loci codant pour des chaînes polypeptidiques différentes.

Gènes différents liés ou non

Les gènes qui codent ces protéines ou les sous-unités de celles-ci peuvent être sur le même chromosome ou sur des chromosomes différents.

- Existence d'allèles multiples au niveau d'un seul locus déterminant, ainsi, des versions différentes de la chaîne polypeptidique.

Allèles différents : allozymes.

Les allozymes sont les produits d'un même gène qui possèdent des allèles différents. Les deux allèles d'un gène codant une isoenzyme sont codominants chez un individu hétérozygote.

- Existence de modification posttranslationnelles de la structure enzymatique donnant, ainsi, des 'isoenzymes secondaires'.

1. Isoenzymes multigéniques, alléliques

- Isoenzymes de structure différente correspondant à une commande génétique différente.
 - *Isoenzymes multigéniques alléliques. Alloenzyme = allozyme*
 - *Isoenzymes multigéniques non alléliques.*

- **Les isoenzymes alléliques:** Enzymes codées par des allèles différents d'un même gène (situé au même locus), séparables par la mobilité électrophorétique, et subissant une ségrégation mendélienne au sein des populations.
 - l'étude des ces alloenzymes est spécialement féconde en génétique évolutive
 - Les alloenzymes sont en principe impossibles à distinguer par l'immunoélectrophorèse
 - D'autre part, en général, deux alloenzymes présentent exactement la même spécificité de substrat

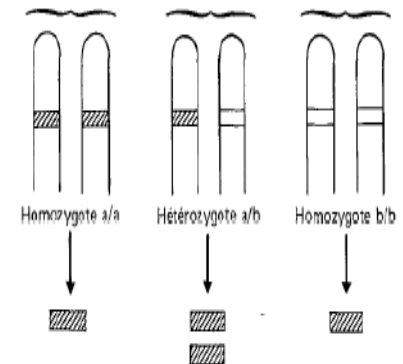


Fig. 2 et photo. 1 : Zymogramme d'isozymes multigéniques alléliques ou alloenzymes, chaque allèle codant pour une enzyme monomérique (constituée d'une seule unité polypeptidique). Au locus étudié, le gène présente par exemple deux allèles différents, a et b. L'allèle a commande la synthèse de l'alloenzyme a, l'allèle b produit l'alloenzyme b.

V. Les isoenzymes ou zymogènes

1. Isoenzymes multigeniques, alleliques

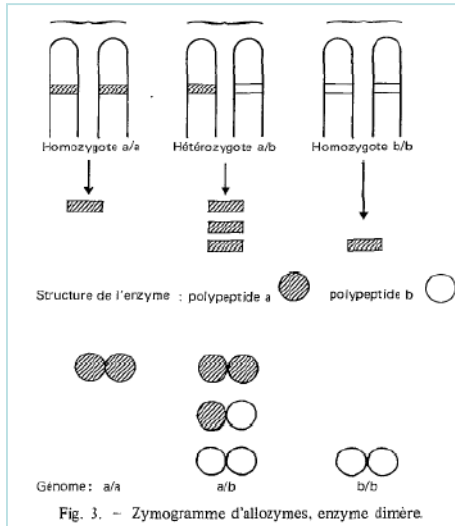


Fig. 3 : Zymogramme d'alloenzymes, chaque allèle codant non pas pour une enzyme, mais pour un polypeptide (= unité monomérique). L'enzyme fonctionnelle est constituée de plusieurs de ces unités monomériques (dans le cas figuré, deux : enzyme dimère, cas très fréquent). Au locus du gène considéré, on rencontre deux allèles a et b. L'allèle a commande la synthèse du polypeptide a. L'allèle b code pour la formation du polypeptide b.

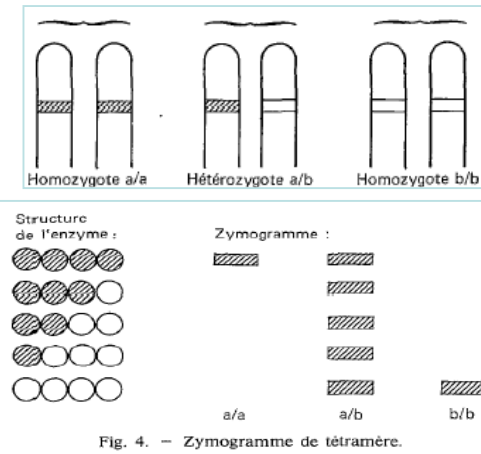


Fig. 4 : Zymogramme de tétramère. L'allèle a synthétise le polypeptide a. L'allèle b produit le polypeptide b.

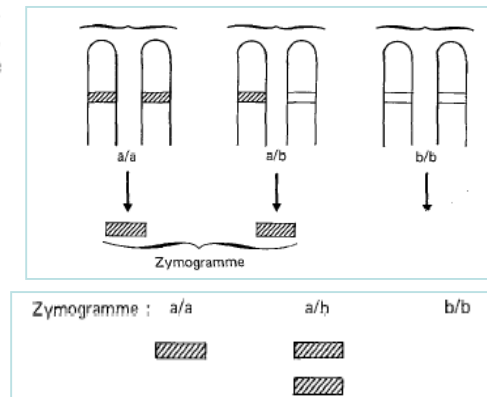


Fig. 6. - Zymogramme d'alloenzymes, avec un allèle nul (dimère).

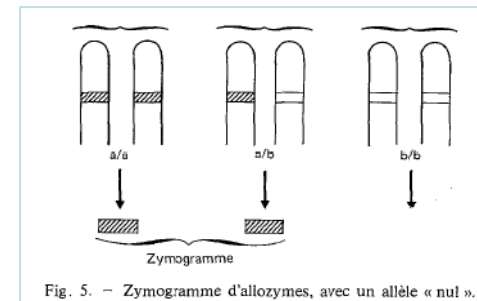


Fig. 5 : Zymogramme d'alloenzymes, dont un des allèles est « nul ».

V. Les isoenzymes ou zymogènes

1. Isoenzymes multigeniques, alleliques

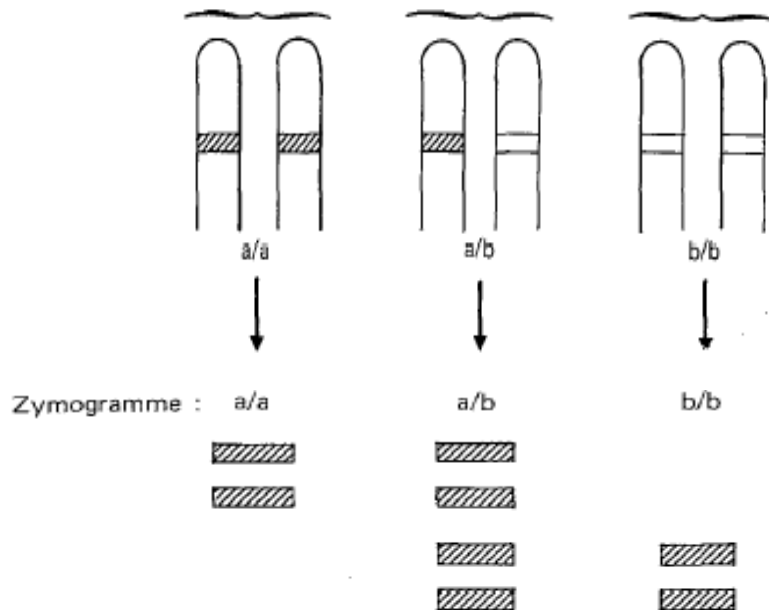


Fig. 7. — Zymogramme d'allozymes, chaque allèle commandant la synthèse d'une série d'enzymes unigéniques.

Fig. 7 : zymogramme d'alloenzymes, chaque allèle commandant la synthèse d'une série d'isoenzymes unigéniques (voir cas n° 1). Soient 2 allèles a et b d'un même gène. L'allèle a produit 2 isoenzymes unigéniques a et a' . L'allèle b donne 2 isoenzymes unigéniques b et b' .

V. Les isoenzymes ou zymogènes

2. Isoenzymes multigéniques, non alléliques

Chaque isoenzyme résulte de l'action d'un gène propre. Pour un même sujet, la présence de deux isoenzymes multigéniques non alléliques (zymogramme à deux bandes) traduit donc l'action de deux gènes, situés à des loci différents.

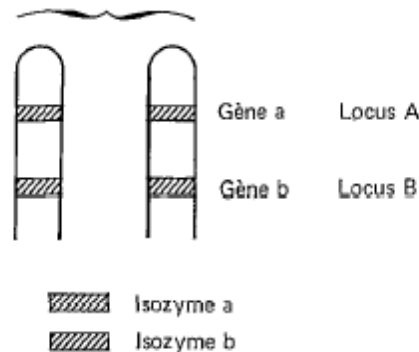


Fig. 8 : Zymogramme d'isozymes multigéniques non alléliques, avec le type le plus simple possible. L'enzyme a 2 isoenzymes, chacune étant codée par un gène différent située à un locus différent.

Au locus A, le gène a produit l'isoenzyme a. Au locus B, le gène b donne l'isoenzyme b.

Ceci donne un zymogramme à 2 bandes (le sujet est homozygote pour ces 2 loci).

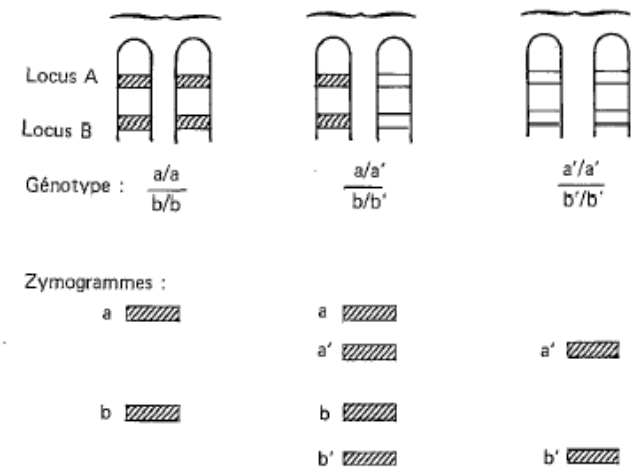


Fig. 9 : A chacun des loci peuvent ségréger plusieurs allèles, sécrétant des alloenzymes différentes. Par exemple, au locus A, le sujet présente 2 allèles a et a', sécrétant 2 alloenzymes a et a'.

Ceci donne 2 bandes. De même, au locus B, le sujet a 2 allèles b et b', qui produisent 2 alloenzymes b et b'. En tout, il y a 4 bandes sur le zymogramme.

3.Exemple d'isoenzyme : la LDH

Famille d'enzymes présentant des formes multiples

On a trouvé une trentaine d'enzymes qui possèdent des formes isoenzymatiques:

- des hydrolases : estérases, ribonucléase, pepsine, trypsine, lysozyme
- des transférases : hexokinase, adénylate kinase, phosphatase alcaline et acide
- des déshydrogénases : celles du lactate, du malate, de l'isocitrate.

3.Exemple d'isoenzyme : la LDH

Exemple 2 : Lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27).

Cette enzyme qui transforme le lactate en pyruvate de PM 134, est un tétramère ($n = 4$) à 2 sous-unités différentes et .

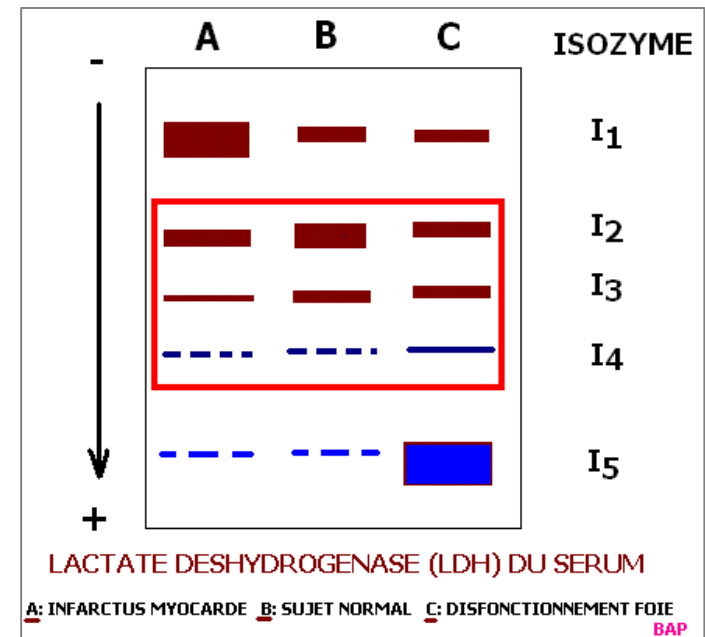
Les polypeptides dérivant des loci LDHA (**M**, Muscle) et LDHB (**H**, Heart) donnent naissance aux isoenzymes homomériques et aux isoenzymes hétéromériques .

Les 5 isoenzymes varient largement dans leur proportion.

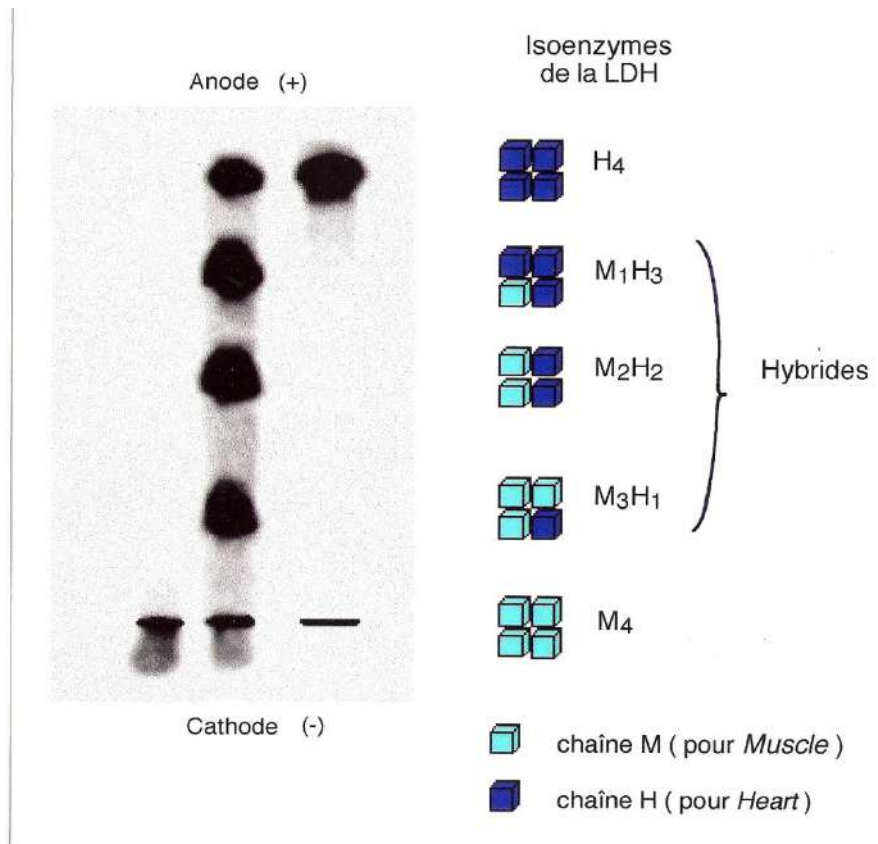
❑ Dans certains tissus (foie et muscle, squelettique), le polypeptide A est produit en grande quantité par rapport au polypeptide B .

❑ Par contre, dans d'autres tissus (cœur, rein) l'inverse est observé.

❑ Les profils électrophorétiques observés tendent à être très asymétriques.



3.Exemple d'isoenzyme : la LDH



Isoenzyme name	Composition	Electrophoretic migration	Present in	Elevated in
LDH 1 Heat resistant	(H ₄)	Fastest moving	Myocardium, RBC, kidney	myocardial infarction
LDH2 Heat resistant	(H ₃ M ₁)		Myocardium, RBC, kidney	Kidney disease, megaloblastic anemia
LDH3	(H ₂ M ₂)		brain	Leukemia, malignancy
LDH4 Heat labile	(H ₁ M ₃)		Lung, spleen	Pulmonary infarction
LDH5 Heat labile Inhibited by urea	(M ₄)	Slowest moving	Skeletal muscle, Liver	Skeletal muscle and liver diseases

Figure 1 : électrophorèse de solutions de LDH extraite de différents tissus bovins.(à gauche : muscle, au centre : sérum, à droite ; coeur) et mise en évidence des 5 formes isoenzymatiques

2.1. Propriétés différentes

2.1.1. selon l'espèce

Quel que soit le tissu considéré, l'isoenzyme a une mobilité électrophorétique propre à chaque espèce. La LDH est une isoenzyme universelle. Son profil électrophorétique varie selon l'espèce.

2.1.2. selon le tissu ou le compartiment cellulaire

Les propriétés des isoenzymes varient selon leur localisation tissulaire ou même cellulaire. Cela aura une retombée sur leur fonction.

2.1.3. selon le stade de l'ontogenèse

La synthèse des isoenzymes d'une même espèce varie au cours du développement embryonnaire. On peut observer une apparition et une augmentation de leur activité ou au contraire une disparition de cette activité.

2.2. Propriétés physico-chimiques

2.2.1. Mobilités électrophorétiques différentes

La structure primaire des isoenzymes diffère de quelques acides aminés. La modification d'un résidu et donc éventuellement de la charge ionique peut modifier la charge ionique de la molécule et donc sa mobilité électrophorétique.

2.2.2. Stabilité: Les isoenzymes d'une même famille ont une stabilité différente. Ainsi, grâce à des méthodes de dénaturation telle que l'inactivation par la chaleur ou par l'urée, on va pouvoir détecter les différences structurales d'un mélange isoenzymatique.

2.3. Propriétés catalytiques

2.3.1. Constantes cinétiques différentes

Les isoenzymes sont des protéines enzymatiques qui catalysent la même réaction mais leurs

paramètres cinétiques vis-à-vis d'un même substrat sont souvent différents. D'où la possibilité de régulation fine selon les besoins de la cellule ou du tissu.

Ex : hexokinase avec un K_M de 0,1 mM; glucokinase avec un K_M de 10 mM vis-à-vis du glucose

4. Propriétés (suite)

2.3.2. Régulations différentes de leur activité enzymatique

l'activité enzymatique des isoenzymes d'une même famille est régulée différemment. Des isoenzymes d'une même famille ne sont pas régulées et sensibles aux mêmes effecteurs.

2.4. Propriétés immunochimiques

Si on injecte un mélange d'isoenzymes chez une souris, on obtient un anti-sérum spécifique de toutes les formes enzymatiques (mélange polyclonal). Les sous-unités peuvent porter des déterminants antigéniques distincts. On peut observer des réactions croisées du fait d'isoformes ayant les mêmes sousunités (ex : H3M, H2M2 et HM3).

S. No	Property	E.g.
1	Electrophoretic mobility	Isoenzymes of Lactate dehydrogenase have different electrophoretic mobility
2	Heat stability	Alkaline phosphatase isoenzymes are either heat labile or stable
3	Inhibitor	An inhibitor can inhibit only one isoenzyme of an enzyme eg. Acid phosphatase
4	K_m	Glucokinase and hexokinase
5	Cofactors	Mitochondrial isocitrate dehydrogenase requires NAD^+ , cytosolic form requires $NADP^+$
6	Tissue localisation	LDH 1 is present in heart, LDH 5 in muscle
7	Antibodies	For creatine kinase, each isoenzyme can be bound only by a specific antibody