

Mécanismes de la catalyse enzymatique

Introduction **Page facebook ; Domaine SNV : Biologie, Agronomie, Science Alimentaire, Ecologie**

Une réaction enzymatique est caractérisé par le fait quelle se produit à l'intérieur d'une poche formée par l'enzyme est appelé le site actif.

La molécule lie au site actif est sur laquelle l'enzyme fait la catalyse est appelé substrat.

Définition du site actif : le site actif d'un enzyme est la partie de la protéine nécessaire du (ou des substrat (s)) et à sa (leurs) transformation on produit (s) cette d2finition de site actif implique l'existence de deux régions inséparable si on souhaite maintenir une activité catalytique

- Une zone de fixation
- Une zone catalytique

Définition 2 : ensemble de groupes de résidus de la protéine qui entre en contact avec le substrat par des liaisons faible pour en assuré la fixation et des groupe qui intervient dans la catalyse proprement dit mais en sait que ces groupes dépendant de certains groupement qui peuvent être éloignées de site de fixation et au site catalytique mais essentiel pour le maintien de la conformation native donc en peut fournir ainsi une définition élargie qui peut inclure tout la protéine.

- **Quelque principe pour expliquer le pouvoir catalytique et la spécificité des enzymes :**

Cette poche est souvent bordée par des chaines latérales d'acides aminés non polaires,

Les enzymes sont des catalyseurs puissant capable d'augmenté les vitesses des réactions enzymatique de 10^7 jusqu'à 10^{14}

Les enzymes sont aussi très spécifiques ;

La question est d'où vient l'énergie qui permet d'abaissé spécifiquement l'énergie d'activation de la réaction ?

Une partie de l'explication teint aux réactions chimiques entre le substrat et les groupements fonctionnels d'enzyme :

- Chaines latérale des acides aminées
- Ions métalliques
- Coenzymes

Ces groupements fonctionnelles d'enzyme augmentent les vitesses initiales de la réaction et diminuent l'énergie d'activation (car elle permet un chemin réactionnelle de moindre énergie ;

L'autre partie est dû à l'énergie nécessaire à l'abaissement de l'énergie d'activation qui est fournit par des interactions faibles non covalentes entre l'enzyme et le substrat ;

La distinction des enzymes par rapport d'autres catalyseurs et la formation des complexe enzyme-substrat ;

La formation de complexe enzyme-substrat dépend de même force qui stabilise la structure de l'enzyme ;

La formation de chaque interaction faible entre l'enzyme et substrat s'accompagné de petit libération d'énergie (une liaison faible fourni l'énergie de 4 à 30 KJ/mol) ;

L'énergie prévenante des interactions enzyme-substrat est appelé énergie de liaison son rôle :

D'une part stabilisation du complexe enzyme-substrat

Principale source d'énergie libre utilise par les enzymes pour abaisser l'énergie d'activation des réactions

- **Les interactions faibles entre l'enzyme et le substrat sont optimisé dans l'état de transition** : pour catalysé une réaction, l'enzyme doit être complémentaire de l'état de transition de substrat

Question : comment fonction les vrais enzymes ?

Des interactions faible sont formé dans le complexe Enzyme substrat mais la totalité des interactions faible enzyme-substrat ne se forment que quand le substrat est a l'état de transition ceci implique que l'énergie de liaison libérée par ses interaction permet d'atteindre le sommet de la courbe en cloche sur le diagramme énergétique.

Même en présence d'enzyme l'état de transition représente le bref instant qui passe par le substrat au sommet de la courbe énergétique, simplement dans ce cas le sommet est moins élevé quand l'absence de l'enzyme et la réaction est plus rapide.

Les interactions faibles formées uniquement dans l'état de transition, contribuent de façon majoritaire à la catalyse enzymatique ;

Remarque : la nécessité de former de nombreuses liaisons faibles pour permettre la catalyse est une des raisons pour laquelle des enzymes et coenzyme sont de si grosses molécules ;

L'utilisation de l'énergie de liaison est responsable de la spécificité et de la rapidité de la réaction enzymatique.

La spécificité : c'est la capacité d'une enzyme à faire la différence entre deux substrats compétiteurs, si le site actif d'une enzyme a des groupements fonctionnels disposés de manière optimale pour former des liaisons faibles avec un substrat donné à l'état de transition ne sera aussi favorable pour un autre substrat.

Exemple : si le substrat normal a un groupement hydroxyle OH qui forme une liaison hydrogène spécifique avec un résidu GLU sur l'enzyme, une molécule ne possédant pas ce groupement hydroxyle sera un moins bon substrat pour l'enzyme, par ailleurs une molécule possédant un groupement supplémentaire pour lequel l'enzyme n'a ni poche ni site de fixation a tout les chances de n'être pas reconnu par l'enzyme.

En générale la spécificité provient de la formation de multiples liaisons faibles entre l'enzyme et les parties spécifiques de leur substrat, ces principes sont illustrés par différents mécanismes catalytiques connus

La rapidité : L'énergie de la liaison et responsable est suffisante pour expliquer l'accélération des réactions enzymatiques.

Exemple : une liaison faible fournit une énergie de 4 à 30 KJ/mole, l'énergie globale fournie par un certain nombre de liaisons de ce type peuvent fournir un abaissement de 60 à 80 KJ/mole de l'énergie d'activation ce qui permet d'expliquer les grandes accélérations observées en présence de nombreux enzymes.

L'énergie de la liaison est la force principale intervenant dans plusieurs mécanismes catalytiques et elle rend compte souvent d'un seul de la catalyse enzymatique.

- **Des groupements catalytiques spécifiques contribuent à la catalyse**

Une fois le substrat lié, différents mécanismes peuvent être employés par l'enzyme pour former ou couper des liaisons en utilisant les groupements fonctionnels qui auront été correctement positionnés, parmi ces mécanismes on trouve :

- La catalyse générale acide-base (transfert d'un proton).
- La catalyse covalente (elle suppose la formation d'une liaison covalente transitoire entre l'enzyme et le substrat).
- La catalyse utilisation des ions métalliques

Une enzyme utilise une combinaison de plusieurs stratégies catalytiques pour aboutir à l'accélération de la vitesse de réaction.

Le mécanisme de la chymotrypsine est un bon exemple d'utilisation à la fois de catalyse covalente et la catalyse générale acide-base.

- **Modification chimique de site actif :**

- **Méthodologie générale**

Lorsqu'on modifie un groupement chimique d'une protéine pour interpréter le résultat, il faut déterminer d'une part l'effet de traitement sur l'activité catalytique ce qui se traduit par une modification des paramètres cinétiques K_m et K_{cat} .

D'autre part par la nature et la localisation du ou des groupements modifiés.

Si en fait réagit un réactif chimique avec la protéine qui est plus ou moins spécifique à la fonction thiol, carboxylique ou amine, et ensuite on élimine l'excès de ce réactif et on teste l'activité catalytique par la détermination des paramètres cinétiques

Comparé ces paramètres aux paramètres de l'enzyme non modifiée :

Si il n'y a pas de changement de réaction catalytique (K_m , V_{max}) donc le groupement n'entre pas dans la catalyse, si par contre l'enzyme est modifiée cela veut dire que le réactif chimique réagit avec l'enzyme et bloque un groupement nécessaire à la catalyse,

Cependant peu de réactifs sont strictement spécifiques à l'égard d'un seul groupement chimique, il sera donc nécessaire de procéder à une analyse de la protéine modifiée en effectuant :

- Une analyse globale des acides aminés avant et après la modification ;
- Une étude de modification spectrale de la protéine ;
- Une recherche de résidu modifié par un réactif radioactif.

Très souvent plusieurs résidus de même nature au différentes seront modifiées et l'attribution à l'un d'entre eux d'un rôle dans l'activité est très délicate. En ressource cette difficulté on étudie en parallèle au cours de la modification chimique

- Le nombre et la nature des groupements modifiés ;
 - L'évolution de l'activité de l'enzyme.
 - en essayant d'établir une corrélation entre les deux cinétique ainsi rétablit
- **Réactif d'acide aminée utilise**

groupement	Exemple de réactifs
-NH ₂	DNFB, anhydride acétique
-COOH	carbodiimide
-SH	iodacétate
-phénol	Anhydride acétique
-imidazole	iodacétate
Pont S-S	Dithiothreitol, mercapto-éthanol

II. Topologie et identification des enzymes

Pour décrire avec précision le mécanisme d'action des enzymes il est nécessaire de connaître sa structure tridimensionnelle, c'est le cas de toutes les protéines mais il est de plus lié la structure à l'activité enzymatique. Comme il est difficile d'obtenir la structure des protéines par cristallographie et diffraction des rayons X, l'étude des sites actifs des enzymes est réalisée par des méthodes indirectes, soit en modifiant par voie chimique ou génétique certains acides aminés, soit on utilise pour substrat des analogues variés.

Analyse cristallographique par diffraction des rayons X

Le principe et l'analyse de diffraction obtenue au moyen du bombardement par un faisceau de rayons X, de cristaux d'enzyme,

Une des difficultés de la technique est d'obtenir la formation de cristaux à partir d'une solution concentrée d'enzyme. Il existe de méthode générale de cristallisation. Toutefois, on cherche de part d'une solution protéine on provoque lentement la cristallisation :

La diffusion en phase gazeuse, La dialyse en solution

Le réseau cristallin est bombardé des rayons X monochromatique, le motif cristallin agit comme un réseau de diffraction tridimensionnelle chaque fois que les rayons X rencontre les électrons des atomes.

La structure de cristal, enzyme, ou le plus exactement la distribution de sa densité électronique peut être calculé à partir du diagramme de diffraction,

Cette méthode souffre de deux limitations principales :

Technique délicate nécessite une grande patience et le soutien d'une importante logistique pour l'analyse des spectres

La cristallographie des enzymes n'est pas à ce jour très simple à réaliser il est parfois difficile voire impossible d'obtenir des cristaux stable.

III. Les modifications chimiques des enzymes

1. Généralité :

Le principe de cette approche est de faire agir un réactif avec l'enzyme de façon à conduire à une modification covalente au niveau de la chaîne latérale d'un ou plusieurs acides aminés.

L'idéal est d'utiliser un réactif suffisamment spécifique pour un acide aminé donné, si ce dernier appartient au site actif on peut s'attendre alors à ce que l'activité enzymatique diminue. La mesure de la modification et l'analyse cinétique de la variation d'activité peut alors apporter des éléments d'information.

Pour compenser le manque de spécificité des réactifs, des marqueurs d'affinité ont été conçus, ce sont des analogues de ligand spécifique qui peut se fixer par des liaisons covalentes. L'inconvénient de cette méthode est qu'il faut pratiquement concevoir un réactif pour chaque enzyme ou classe d'enzyme.

2. Les réactifs spécifiques des groupements fonctionnels de la chaîne latérale des acides aminés

La réactivité des chaînes latérales dépend de leur caractère nucléophile, celui-ci est influencé par les conditions expérimentales et spécialement le pH

Liste des réactifs couramment employés pour la modification des résidus

Acide aminée	réactifs
Asp, Glu	Cardodimides, réactifs de Woodward(N-éthyle-5-phenylsulfonate-3-sulfonate)
Agr	Butanedione, phenylglyoxal
Lys	Trinitrobenzènesulfonate, carbamylation par cyanate
His	Diethylpyrocarbonate
Cys	Iodoacetate
Tyr	tetranitromethane
Ser	Diisopropyl fluorophosphate
Trp	N-bromosuccinimide

3. Aspect cinétique de la modification chimique d'enzyme

Le principe est de suivre en fonction du temps la modification de l'enzyme à l'aide d'un paramètre physicochimique ou à l'aide d'une mesure d'activité

4. Marqueur d'affinité :

Ce sont des molécules qui associent la spécificité liée à la reconnaissance enzyme-ligand et la modification chimique due à la formation ultérieure d'une liaison covalente généralement par alkylation, arylation. C'est cette liaison qui les différencie des inhibiteurs réversibles.

Exemple : le Tosyl-L-phenylalanine chlorométhylcétone (TPCK) réagit avec la chymotrypsine au niveau d'une histidine de site actif entraînant une inhibition irréversible de l'enzyme, l'analyse de l'inactivation montre que le TPCK agit comme un marqueur d'affinité.

Pour connaître l'importance d'un acide aminé au niveau de la structure et/ou de la fonction de l'enzyme on peut envisager de le remplacer par un autre acide aminé et ensuite d'évaluer l'effet de mutation ;

Le concept semble a priori simple mais la réalisation est plus complexe, puisque il faut effectuer un changement très localisé dans la séquence peptidique, une telle approche a été réalisée grâce au développement en 1984 par M. J. Zoller et M. Smith de la mutagenèse dirigée provoquant un changement au niveau du gène non pas au niveau de protéines. Il suffit alors d'évaluer l'effet de la mutation sur les propriétés structurales et/ou biologiques pour savoir si l'acide aminé initial joue un rôle important dans la structure non mutée.

Exemple : pour la tyrosyl-ARNt-synthase de nombreuses mutations ont été réalisées et l'activité enzymatique correspondante mesurée

enzyme	Efficacité Kcat/Km (mole/sec)
Enzyme non muté	8400
His 45→Gly45	1140
His45→Asn45	3
Thr51→Ala51	15900
Thr51→Pro51	208000

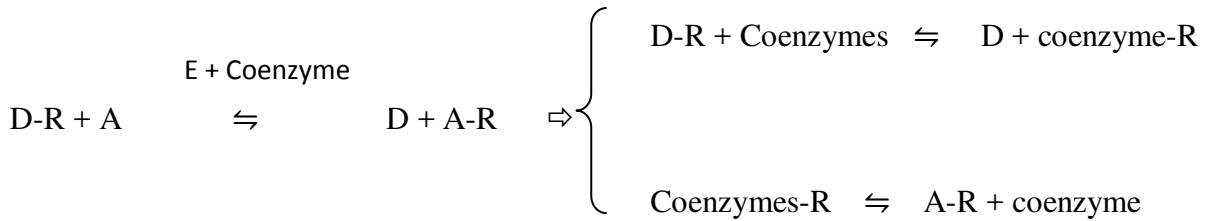
Les méthodes spectroscopiques

Ces techniques permettent d'obtenir des renseignements sur le changement conformationnel qui se sont induits globalement soit sur un site spécifique, les informations sur la conformation globale, ainsi que sur leur modification, peuvent être obtenues par des mesures de fluorescence par dichroïsme circulaire ou par spectrophotométrie RMN.

IV. Mécanisme d'action et classification des coenzymes

Les coenzymes sont des cofacteurs indispensables à certaines enzymes (appelées apoenzymes) un même coenzyme est généralement associé à des enzymes catalysant les réactions de même type mais la spécificité de l'enzyme envers le substrat demeure liée à l'apoprotéine.

La plus part des réactions enzymatiques faisant intervenir un coenzyme qui peuvent se ramener à des réactions de transfert où un radicale R est transféré d'un donneur « D » à un récepteur « A »



Dans ces réactions le coenzyme intervient en soumissions ou radicale R puis en le transférant à l'accepteur A

Les coenzymes engagé dan la première étape et régénéré dans la second, le coenzyme joue donc un rôle catalytique à comme l'enzyme lui-même, selon les réactions, les deux étapes peuvent être effectuée par le même enzyme ou des enzymes différent ce qui conduit a distingué deux types de coenzymes et donc de réaction.

Le 1^{er} cas le composé intermédiaire coenzyme-enzyme n'est pas libéré; le coenzyme qui est un groupement prosthétique demeure attacher a l'enzyme est intervient comme activateur.

Le 2^{eme} cas le composé intermédiaire coenzyme-enzyme se dissocie de site actif, le coenzyme qui est alors un substrat intervient comme transporteur.

Les coenzymes ont des origines diverse, certains son synthétisé à partir d'intermédiaires métaboliques pour la plupart des nucléotides ou dérivés nucléotidique, d'autres drivent des vitamines ; composés qui ne peuvent synthétiser par l'organisme animale et doivent donc apporter par l'alimentation. Les principaux coenzymes sont répertoriés dans des tableaux (voir planche)

V. Mécanisme d'action de serine protéase :

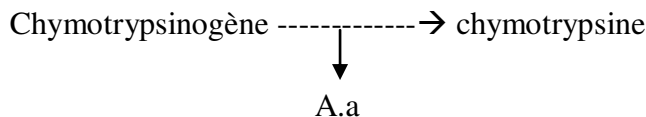
Les serine protéase forment une superfamille d'enzyme à laquelle appartient avec beaucoup d'autre la chymotrypsine la trypsine, élastase, subtilisine elle hydrolyse les liaisons peptidique pour donné 2 peptides, les différentes serine protéase hydrolyse les liaisons peptidique du coté carboxylique.

Ainsi les chymotrypsine du coté adjacent des acide aminés aromatique (Trp, Phe, Tyr) ;

La trypsine du coté carboxyle des acides aminés chargé positivement (Lys,Arg)

Chymotrypsine les structure tridimensionnel et établie par David Blow en 1967 est une protéine globulaire compact de PM 25000 elle comporte trois chaine polypeptidique les acides aminé de site actif sont regroupé dans la structure tridimensionnel.

VI. Activation des enzymes (proenzymes ou zymogènes) :



Constitue une régulation enzymatique dans l'organisme (liaison irréversible)

L'activation des zymogène représente un mécanisme de régulation enzymatique

Un précurseur inactif de l'enzyme appelé zymogène est coupée pour donné l'enzyme actif, beaucoup d'enzyme protéolytique (protéases) de l'estomac et de pancréas sont régulées de cette manière.

Exemple : la chymotrypsine et la trypsine sont initialement synthétisé sous forme chymotripsinogène et trypsinogène, des coupure spécifiques provoque des changement de conformation qui expose le site actif de l'enzyme, au cour de l'activation de chymotrypsine les résidus 14-15 et 147-148 sont excisés et les trois chaines polypeptidiques résultant reste liées l'une à l'autre par des ponts disulfures.

VII. Mécanisme d'action de pyridoxal phosphate

Le pyridoxal phosphate est un cofacteur (coenzyme) c-a-d un groupement prosthétique pour nombreux enzyme, dérivé de vitamine B₆.

Le pyridoxal 5'phosphate dérive de pyridoxine ou pyridoxal c'est le groupement prosthétique de nombreuse enzyme intervenant dans le métabolisme des acides aminés.

- Réaction de transamination
- Réaction de décarboxylation
- Réaction de désamination
- Réaction de racémisation

Le pyridoxal phosphate est lie a l'apoenzymes par une liaison aldimine ($-\text{CH}=\text{N}-$) base de Schiff entre le groupement aldéhydique et ϵ -amine de résidu de lysine on absence de substrat et par des liaisons ioniques impliquant le groupement phosphoryle

Exemple 01 réaction de transamination

Exemple 02 réaction de racimesation

Exemple 03 réaction de decarboxylation

Mécanisme d'action

La formation d'une base de Schiff entre le groupement aldéhydique et le groupement amine (qui déplace la lysine) fragilise en particulier les liaisons $-C-C\alpha-$ et $C\alpha-N$ selon l'apoenzyme la coupure de l'une ou d'autre libère une amine par décarboxylation ou un acide α cétonique par transamination