

# ENZYMES

## I. Définitions, classification

**ENZYME** → protéine jouant le rôle de biocatalyseur de réactions biochimiques

- accélère +++ la vitesse d'une réaction thermodynamiquement possible : transforme le(s) substrat(s) en produit(s) : efficacité ++
- ne modifie pas l'équilibre thermodynamique
- Spécificité d'action élevée : type de réaction, nature des substrats, stéréospécificité
- Ni consommé, ni modifié à la fin de la réaction

NB : Les enzymes sont des protéines SAUF les ribozymes : ARN à action catalytique !

Nomenclature : type de réaction + ase

### Classification internationale (IUAC – IUBMB) :

- EC 1 : oxydo reductases
- EC 2 : Transferases
- EC 3 : hydrolases
- EC 4 : lyases
- EC 5 : isomerase
- EC 6 : ligases

EC + 4 chiffres (classe, sous-classe, sous-sous-classe, numéro d'ordre dans la classification)

Nom réel de l'enzyme : « Donneur : accepteur, nature du groupement, action »

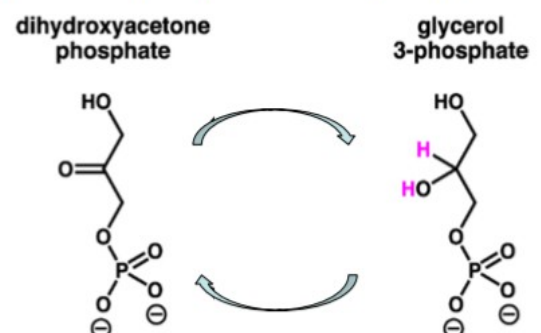
**ISOENZYME (=isozyme)** → protéine enzymatiques possédant les mêmes propriétés catalytiques mais qui diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques (ex : différents aa), parfois elles exercent leurs rôles dans différents tissus.

### EC1 : oxydo reductases

Catalysent les réactions de **transfert d'électrons**.

Oxydases, reductases, déshydrogénases, ..

Ex: *glycérol-3-phosphate deshydrogénase*

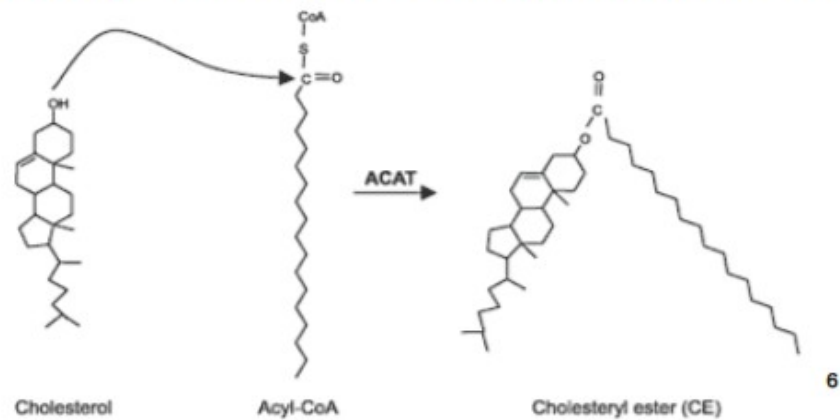


## EC 2 : Transferases

Catalysent les réactions de **transfert d'atome ou groupements d'atomes**.

Ex : ACAT enzyme intra cellulaire

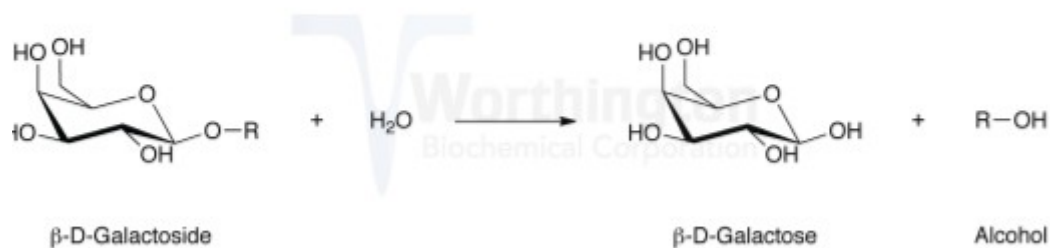
### **Ex: *Acyl-CoA:cholestérol acyltransférase (ACAT)***



## EC 3 : Hydrolases

Catalysent les réactions de coupure par l'eau.

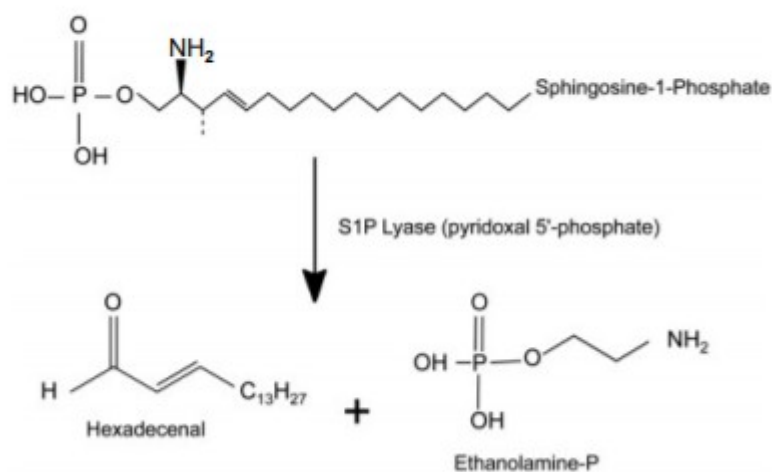
### • **Ex: *$\beta$ -galactosidase***



## EC 4: Lyases (synthases)

Catalysent les réactions de coupure de liaison autrement que par l'eau.

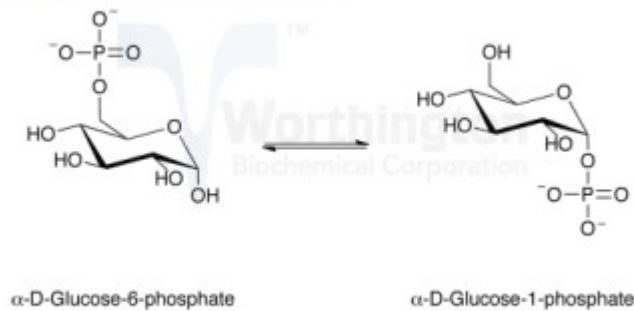
### • **Ex: *sphingosine 1-phosphate lyase***



## EC5 : isomérases (racémases, épimérases, mutases)

Catalysent les réaction d'isomérisation

**Ex: phosphoglucomutase**

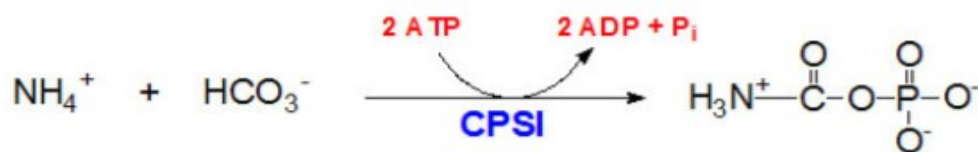


**Autre ex: phosphohexose isomérase (G6P  $\rightarrow$  F6P)**

## EC 6 : ligases (synthétases)

Catalysent les réactions de création de liaison par couplage à l'hydrolyse d'ATP

• **Ex: carbamoyl phosphate synthétase**



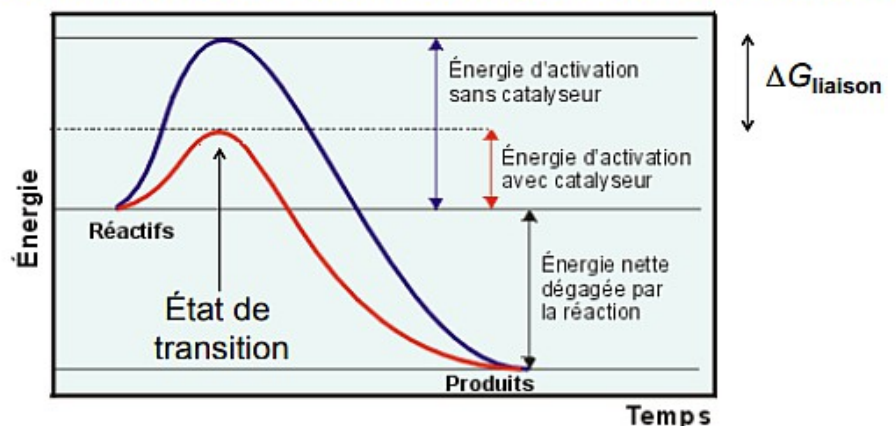
## II. Notion de catalyse enzymatique

Les enzymes diminuent l'énergie libre d'activation  $\Delta G^0$

### POUVOIR CATALYTIQUE :

Le passage de l'état de substrat à l'état de produit passe un état intermédiaire dit « **état de transition** » qui est une barrière énergétique à franchir (arrangements nécessaires pour que la réaction se fasse).

Plus cette barrière est importante plus l'énergie libre d'activation ( $\Delta G^0$ ) sera important, et + la réaction sera lente !



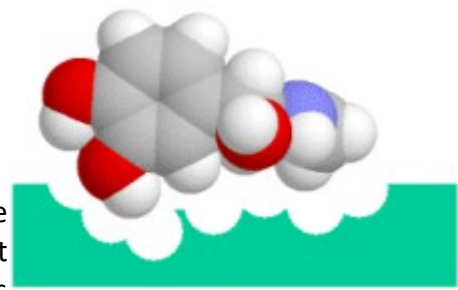
L'enzyme permet de réduire considérablement cette énergie libre d'activation : facilite la conversion des réactifs en produits  $\rightarrow$  accélère un très grand nb de fois la réaction chimique.

Ici :  $\Delta G^0 \text{ produits} < \Delta G^0 \text{ réactifs} \rightarrow$  réaction exergonique (=spontanée)

Si  $\Delta G^0 \text{ produits} > \Delta G^0 \text{ réactifs} \rightarrow$  réaction endergonique, l'enzyme est capable de catalyser cette réaction mais il faut coupler à une autre réaction permettant de libérer de l'énergie (ex : hydrolyse d'ATP).

## SITE ACTIF :

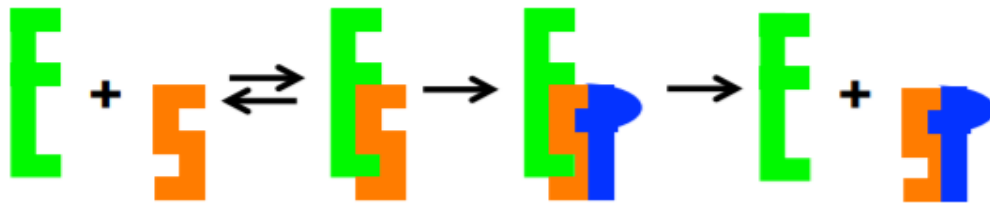
La reconnaissance spécifique du substrat sur l'enzyme s'effectue sur le **site actif** → poche/sillon dans (la)lequel(le) peut se loger le substrat permettant le rapprochement des gr fonctionnels, créer des liaisons faibles de manière idéale :



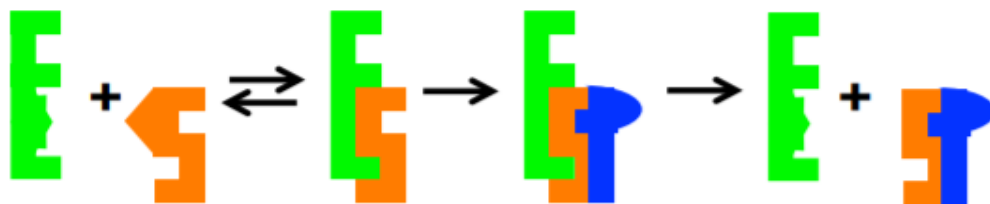
- Région de la protéine enzymatique où se fixent par des **liaisons faibles** les substrat, les co-enzymes
- Région où a lieu la réaction enzymatique : **site catalytique**

## INTERACTION ENZYME/SUBSTRAT :

### - Modèle « clé-serrure »

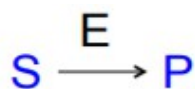


### - Modèle de l'ajustement induit



- modèle clef-serrure : congruence parfait entre structure 3D de l'enzyme et du/des substrats
- Modèle de l'ajustement induit (main-gant) : la structure 3D de l'enzyme et du substrat ne sont pas congruentes, il y a une adaptation mutuelle quand l'enzyme et le substrat s'approchent. Quand l'enzyme est libérée, elle retrouve sa morphologie initiale.

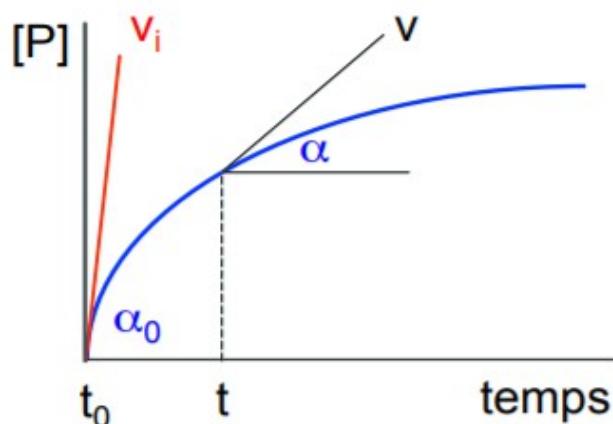
## III. Cinétique enzymatique



$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

• à l'instant  $t_0$

$$v_i = \operatorname{tg} \alpha_0$$



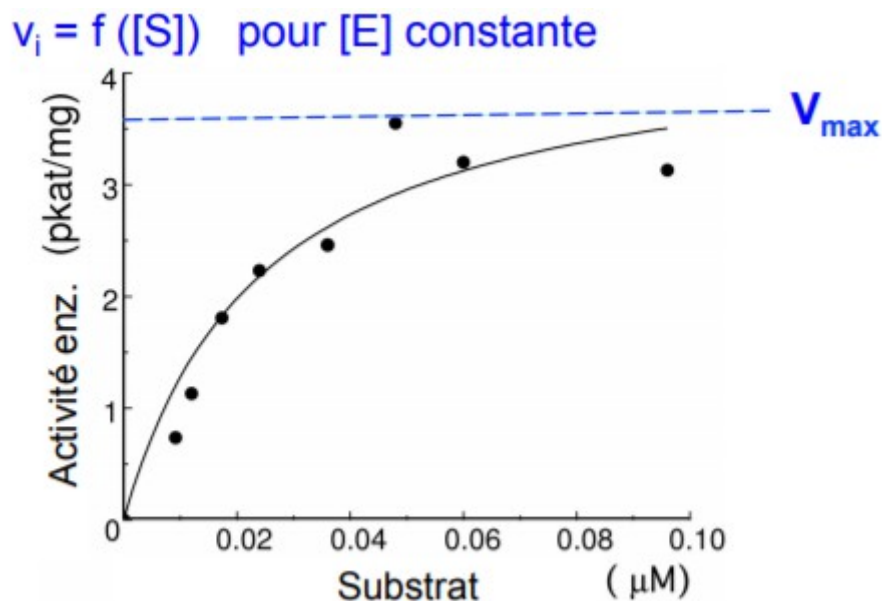
Comment évolue la vitesse d'une enzyme ?

Vitesse = tangente à la courbe en un point

- On ne s'intéresse qu'à la vitesse initiale  $v_i$  qui est la vitesse la + grande (à l'instant  $t_0$ )  
La vitesse est alors proportionnelle à la consommation du substrat qui se transforme en produit en fonction du temps. (le substrat est ici largement saturant par rapport à l'enzyme)
- dans un premier temps : phase ascendante de la concentration de produit en fonction du temps : vitesse élevée
- Puis, ralentissement de la vitesse, qui traduit l'épuisement en substrat
- Finalement, on atteint un plateau par épuisement du substrat, et enfin l'arrêt de la production de produit.

Si l'expérience continuait, on verrait une diminution des produits : la réaction se ferait en sens inverse et on verrait augmenter la concentration en substrat.

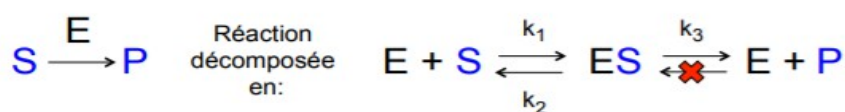
Que se passe-t-il avec la vitesse initiale si on fait varier la concentration en substrat ?



Activité enzymatique = vitesse initiale

Pour des enzymes Michaeliennes : Cinétique Michaelienne : les vitesses initiales vont s'aligner sur une hyperbole au fur et à mesure que la concentration en substrat augmente (concentration d'enzyme cste!). Aux fortes concentrations en substrat, on obtient une asymptote : c'est la **vitesse maximale  $V_{max}$**

• équation de L. Michaelis et M. Menten (1913)



$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_M \quad \text{Constante de Michaelis-Menten}$$

Equation de Michaelis-Menten :

$$v_i = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

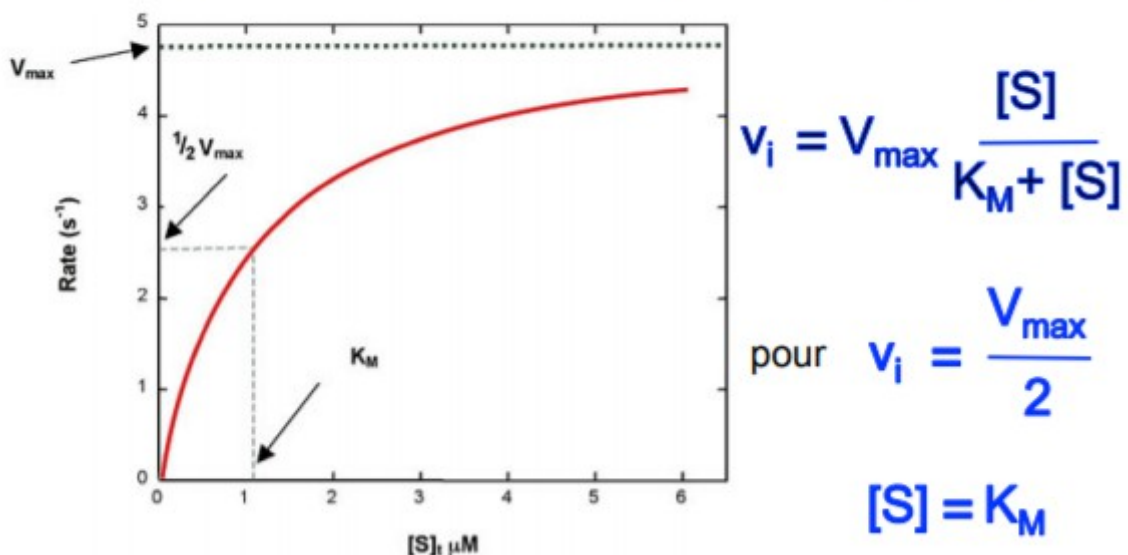
car:  $v = k_3 [ES]$   $V_{max} = k_3 [E_{total}]$  et  $[E] = [E_{total}] - [ES]$

Réaction se décompose en 2 phases :

- (1) Rapide : formation du complexe ES (enzyme-substrat) avec des vitesses et constantes propres  
K1 : cste de formation du complexe  
K2 : cste de dissociation du complexe
- (2) Lente : formation du produit qui libère in fine l'enzyme  
K3 : cste de formation du produit

NB : on considère qu'on est dans des phases initiales de réactions enzymatiques et donc de formation des produits, on peut négliger la réaction opposée qui permettrait la re formation de substrats.

### • cinétique « Michaelienne » : représentation graphique

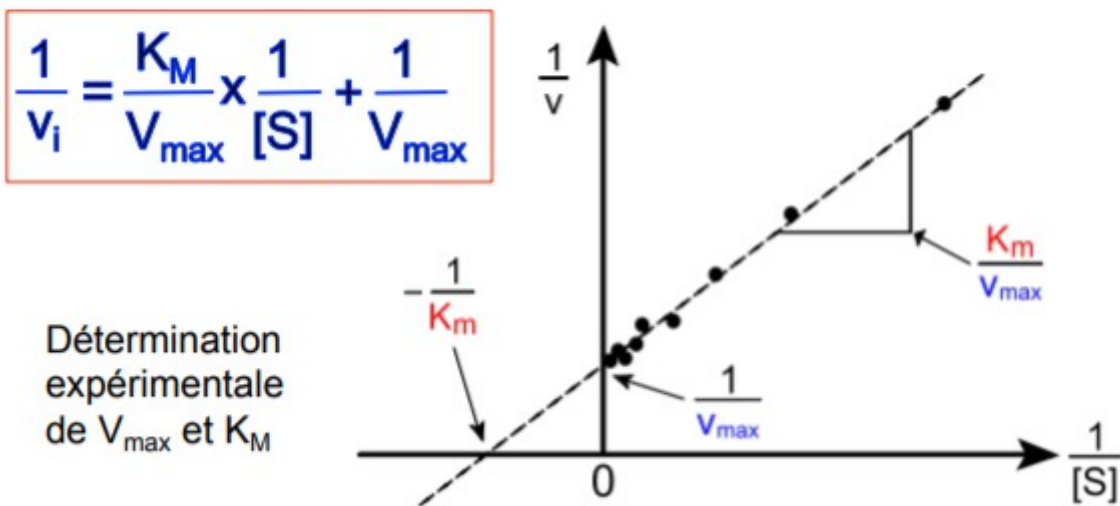


K<sub>M</sub> : concentration en substrat permettant d'atteindre la moitié de la vitesse max

→ traduit l'affinité : + K<sub>M</sub> est faible + l'affinité est grande

### • cinétique « Michaelienne » :

représentation graphique selon Lineweaver et Burk





### Lineweaver et Burk :

Évolution de l'inverse de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la concentration en substrat  
→ formation d'une droite de pente =  $K_M / V_{max}$

**$V_{max}$**  : vitesse initiale de l'enzyme que l'on obtiendrait quand l'enzyme est saturée en substrat

**$K_M$**  : concentration qui permet d'obtenir la moitié de  $V_{max}$ , donc la concentration en substrat lorsque l'enzyme est à demi-saturation

$K_M$  est donc inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour son substrat

### Conséquences pratiques:

- si  $[S] \gg K_M$  :  $v_i \approx V_{max} = k_3 [E_{total}]$

c'est en excès de S que l'on dose une E

- si  $[S] \ll K_M$  :  $v_i \approx k [S]$

c'est en excès de E que l'on dose un S

Si Concentration en substrat  $\gg K_M$  : Vitesse initiale  $V_i = V_{max} = k_3 \times$  concentration totale d'enzyme → vitesse proportionnelle à la concentration en enzyme !

**C'est en excès de substrat qu'on dose une enzyme !**

Si la concentration en substrat  $\ll K_M$  :  $V_i =$  concentration en substrat

**C'est en excès d'enzyme qu'on dose un substrat !**

## IV. Détermination d'une activité enzymatique

Unité Internationale :

1 UI = qté d'enzyme qui permettra de catalyser la transformation d'1  $\mu$ mole de Substrat par minute (dans des conditions définies) → abandonné

1 Katal (kat) = qté d'enzyme qui catalyse la transformation d'1 mole de substrat par seconde → abandonné

Unité retenue : **Unité de concentration par unité de temps par unité de volume ou de masse**

ex : N  $\mu$ mol. min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de protéines

## • Conditions

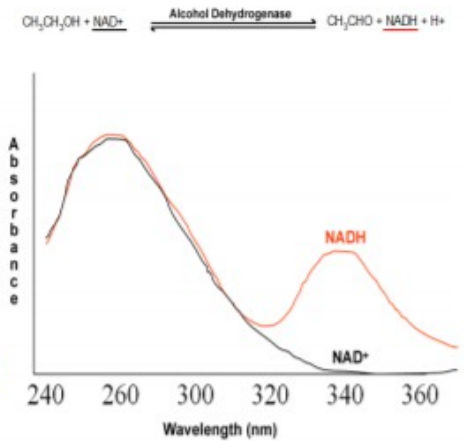
- [S] saturante
- Température et pH optimaux

### Conditions définies :

- Concentration en substrat saturante
- température et pH optimaux

## • Moyens:

- [S] marqué (radioactif, coloré, fluorescent, chromogénique, fluorogénique,...)
- Coenzyme (ex: dosage d'une deshydrogénase par NADH)



### Moyens :

- Substrat marqué : radioactif (le produit sera lui aussi radioactif), coloré (le produit sera lui aussi coloré), fluorescence : substrat fluo ou fluorogénique, chromogénique : substrat qui donne une couleur une fois transformé en produit, fluorogénique : porte un gr qui ne fluorecse pas à l'état de substrat mais en produit oui , ..

Pour suivre la disparition du substrat ou l'apparition d'un produit

- Coenzymes (co-facteurs)

Ex : EC1 oxydo reductase : transfert d'électron avec NAD (co enzyme nicotinique)

Selon si le coenzyme est réduit ou oxydé, il n'a pas le même spectre d'absorption : même pic à 260 nm et seul le coenzyme réduit NADH absorbe à 340nm.

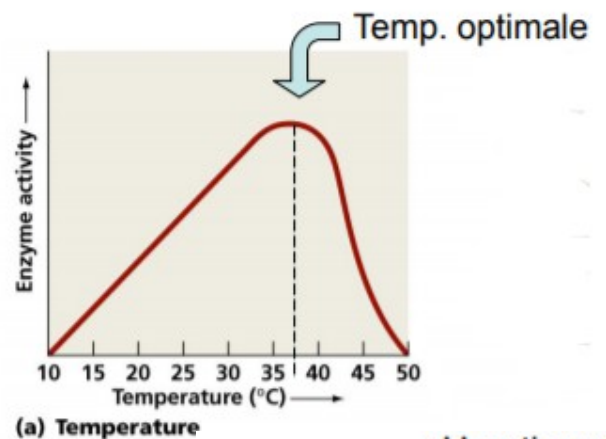
## V. Effecteurs

Quels sont les paramètres pouvant influencer sur une activité enzymatique ?

### Facteurs physico-chimiques :

- Température : si on mesure une activité enzymatique à Temp basse : act enzymatique faible, + on se rapproche de la temp physiologique + l'act enzymatique augmente

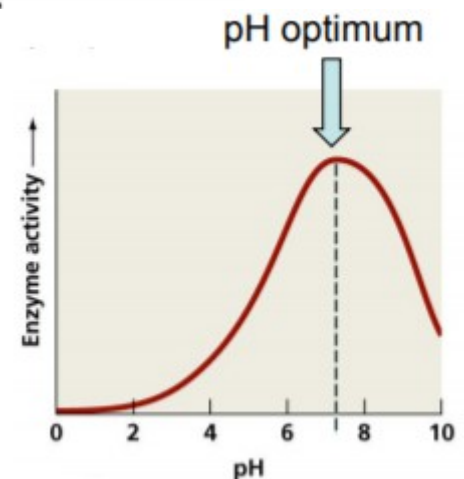
Au delà de la temp optimale : diminution de l'activité enzymatique car enzyme dénaturée !



- PH : càd la concentration en protons

Courbe biphasique : en deça : diminution de l'activité enzymatique, ph optimum : max de l'act enzymatique, au delà : diminution de l'activité enzymatique

Ph optimum dépend du tissu : acide dans l'estomac, alcalin dans les intestins, acide dans les lysosomes, ..





## Effecteurs chimiques :

### – Activateurs

ex : ions métalliques  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , ..

### – Inhibiteurs :

→ irréversibles : se lient de façon covalente à un groupement fonctionnel de l'enzyme (site actif) : inactivation permanente

ex : 5-FU (analogue nucléotidique, TT KC) inhibiteur irréversible de la Thymidylate synthase : substrat suicide

→ réversibles :

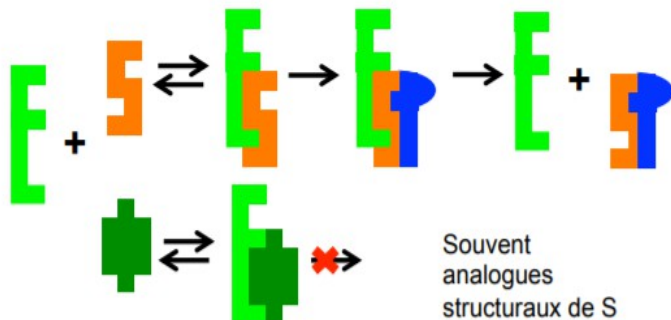
**COMPETITIFS** : rentrent en compétition avec les substrat, effecteur qui peut se lier par liaison faible au site actif de l'enzyme : analogie structureaux du substrat

Aug du  $K_m$  : diminution de l'affinité

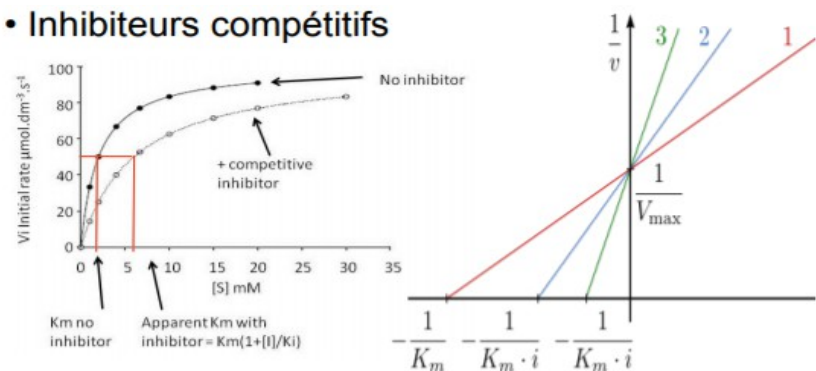
Pour atteindre la  $V_{max}$  il faut + de substrat pour atteindre la même vitesse

→  $1/V_{max}$  inchangé,  $-1/K_m$  varie en diminuant : Aug du  $K_m$

## Liaison non covalente au site actif de E à la place de S



### • Inhibiteurs compétitifs



→ Affinité de E pour S  $\searrow$  →  $K_M$  apparent  $\nearrow$   
( $V_{max}$  intacte, car I déplacé par un excès de S)

25

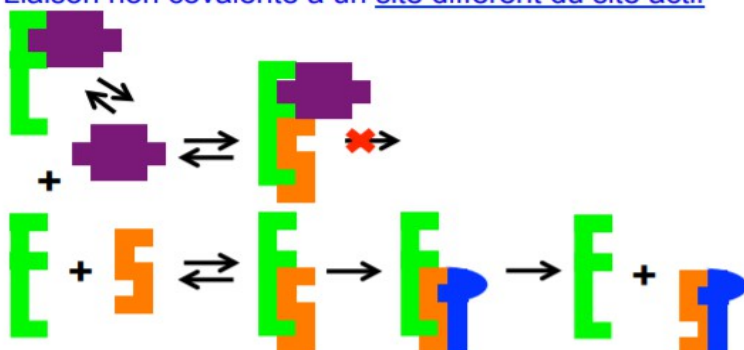
**NON COMPETITIFS** : peuvent se lier de façon non-covalente à un site distinct du site actif ce qui ne permet plus au complexe enzyme/substrat de catalyser la réaction, ce n'est pas un analogue structural du substrat.

Diminution de la  $V_{max}$  (Aug  $1/V_{max}$ )

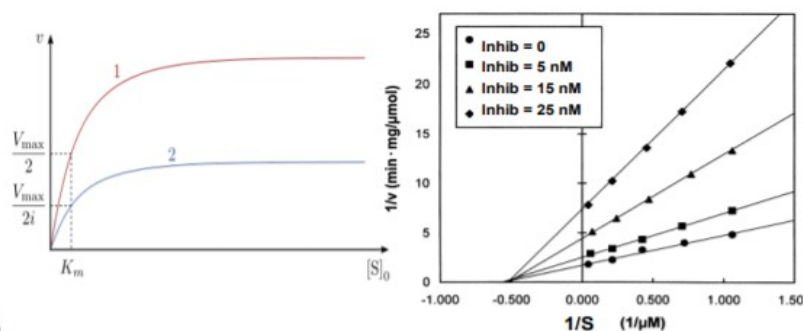
Même  $V_{max}/2 =$  Même  $K_m$  même affinité

### • Inhibiteurs NON compétitifs

#### Liaison non covalente à un site différent du site actif



### • Inhibiteurs NON compétitifs



→ Affinité de E pour S inchangée  
→  $V_{max}$   $\searrow$  ( $K_M$  inchangé) comme si  $[E_{total}]$   $\searrow$

27

## VI. Mécanismes de régulation enzymatiques

Souvent, c'est la réaction lente = réaction limitante qui est l'objet de ce contrôle.

La vitesse de la réaction enzymatique dépend de différents facteurs :

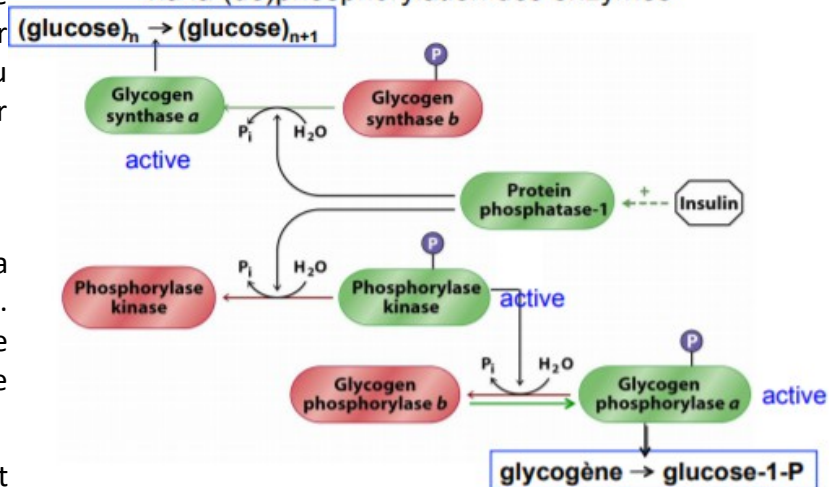
- **disponibilité en substrat et en co-enzymes**
- **qté d'enzyme** : contrôle transcriptionnel et de dégradation
- **Activité de l'enzyme** :
  - Activation de l'enzyme par un clivage protéolytique limité : précurseurs inactif (= proenzyme = zymogène) qui devient actif
  - ex : enzymes pancréatiques : Trypsinogène → Trypsine, Pro-caspases → Caspases
- Liaison à une autre protéine de contrôle
  - ex : complexe calmoduline / Calcium
- Activation par modification covalente (réversible) post-trad : interconversion de 2 formes de l'enzyme par modification covalente : état de phosphorylation par protéines kinases (sur Ser, Thr, Tyr) de l'enzyme qui permet de passer d'un état actif à inactif

Le glucose est stocké sous forme de glycogène dans le muscle squelettique (pour produire de l'ATP pdt l'effort) ou au niveau du foie (en prévision de le libérer pour maintenir constante la glycémie).

Le métabolisme du glycogène :

- la **Glycogen synthase** : permet la construction de polymère de glucose. Active seulement sous forme déphosphorylée (Inactive sous forme phosphorylée)
- la **Glycogen phosphorylase** : permet la dégradation du glycogène en glucose-1-P (glycogénolyse). N'est active qu'à l'état phosphorylée.

Ex: régulation du métabolisme du glycogène par l'insuline via la (dé)phosphorylation des enzymes



L'hormone clef : Insuline (seule hormone hypoglycémiante) a comme relais une Protéine phosphatase-1 qui déphosphoryle donc active la glycogen synthase, ce qui permet la formation de glycogène et déphosphoryle la phosphorylase kinase qui devient inactive et ne peut donc plus phosphoryler (et donc activer) la Glycogen Phosphorylase qui à l'état phosphorylée permettrait la glycogénolyse du glycogène en glucose. => Synthèse de glycogène activée et dégradation du glycogène inhibée

→ Régulation par allostérie :

**Enzyme allostérique** → Oligomères (structure quaternaire), enzymes dont les paramètres cinétiques diffèrent d'une enzyme Michaelienne. Elle présente une cinétique avec une courbe **sigmoïde** : traduit un **effet coopératif** : chacune des SU peut fixer 1 substrat ce qui aug l'affinité pour le substrat

**Ainsi, pour une faible variation de concentration en substrat, on observe une variation de vitesse très importante !**

On observe :

- un **point d'inflexion** qui définit un  **$K(0,5)$** : concentration en substrat correspondant à la moitié de la  $V_{max}$
- Ralentissement de la vitesse de l'enzyme pour des concentrations sup

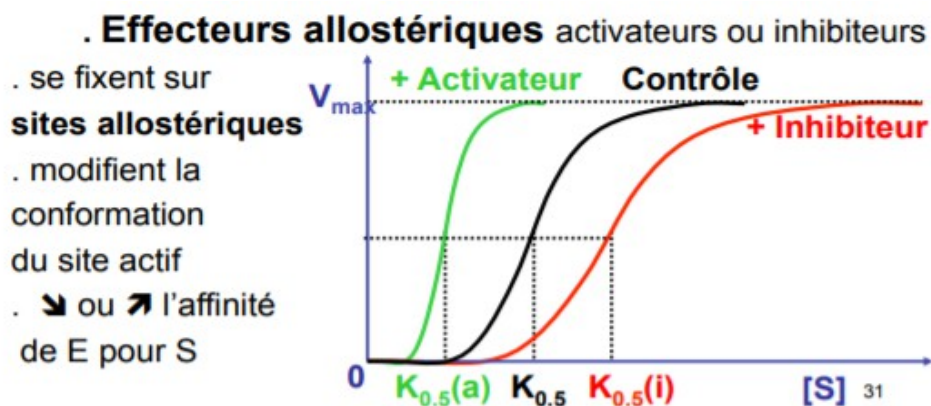
Contrôle allostérique effectué par les effecteurs allostériques : activateurs ou inhibiteurs qui se fixent sur le site allostérique

Si effecteur activateur : déplace la sigmoïde sur la gauche → diminuent le  $K(0,5)$  : augmentation affinité

Si effecteur inhibiteur : déplace la sigmoïde vers la droite → augmentation du  $K(0,5)$  : diminution de l'affinité

*Pourquoi ?*

Car les effecteurs, en se liant sur le site allostérique, modifient la conformation du site actif = transition allostérique, ce qui modifie l'affinité de l'enzyme pour le substrat



Il existe 3 grands types de réponse dans le temps :

(1) très court terme : **contrôle allostérique**

Réponse immédiate, brève, adaptée aux conditions (s'adapte aux concentrations en substrats et en effecteurs)

(2) Moyen terme : **modifications post-trad** (covalentes)

Hormones agissent sur les protéines qui vont phosphoryler/déphosphoryler par des protéines kinases et phosphatases → modification de la conformation de l'enzyme → modulent l'activité

(3) Long terme : **régulation transcriptionnelle**

## VII. Coenzymes

**Coenzymes** → Cofacteurs indispensables à certaines enzymes (apoenzymes)

Holoenzyme = apoenzyme + coenzyme

Rôle : Participent à la fixation du substrat et/ou à la catalyse

Les coenzymes peuvent être :

- liés par des **liaisons faibles** ( co-enzymes libres) = **co-substrats**
- liés par des **liaisons covalentes** = **groupement prothétiques**

Propriétés :

- pas de nature protéique ( de + petite taille, thermostable)
- souvent hétérocycliques
- souvent hydrosolubles
- retrouvent leur état initial après la réaction
- intervient dans le transfert d'une entité : électron, atome, molécule
- souvent vitamines ou dérivés apportés par l'alimentation ou synthétisés par la flore intestinale

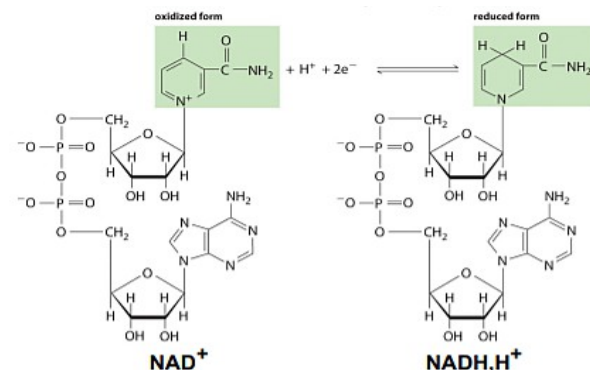
Coenzymes d'oxydo-réduction : transfèrent des électrons ou des équivalents réducteurs

- **Co-enzymes pyridiniques** ou **nicotiniques** : dérivent de la VIT B3 (Niacine) ou PP (Prévention de la Pélagre : démence, dermatite, diarrhée)

**NAD<sup>+</sup>** (Nicotinamide Adénine Dinucléotide): formé oxydée / **NADH, H<sup>+</sup>** : forme réduite

AMP lié à un ribophospho Nicotinamide , réactions de catabolisme ++

**NADP** : porte un groupement phosphate sur le 2' du ribose de l'AMP, agent réducteur des réactions de biosynthèse ++ (lipides ++)



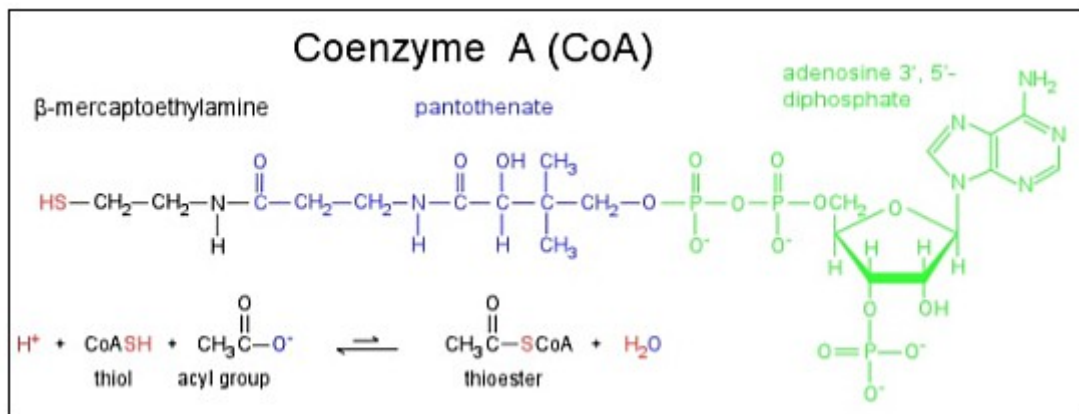
- **Co-enzymes flaviniques** : dérivent de la VIT B2  
**FMN** (Flavine Mono Nucléotide), **FAD** (Flavine Adénine Dinucléotide)
- **Co-enzyme (acide) lipoïque**
- **Co-enzymes quinoniques** : dérivés isopréniques  
**CoQ** (Q10): interviennent sur la chaîne respi
- **Co-enzymes héminiques** : gr prosthétique = hème → structure tétrapyrrolique capable de lier un ion métallique (Fe) avec un noyau Porphyrine
- **Protéines à centre Fer-Soufre** : dans la chaîne respi

### Co-enzymes de transfert de groupements d'atomes :

- **Biotine** (B8, vit H) : transfert **CO<sub>2</sub>** (enzymes = carboxylases)
- **Acide Folique** (TétraHydro-Folique, B9) : transfert **groupements mono-carbonés** (ex : CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, Formyl,...)
- **Cobalamines** (B12) : transfert de groupements **Méthyl** CH<sub>3</sub>  
Contient l'ion Cobalt, Vitamines apportés par l'alimentation (viandes), synthèse par les bactéries du tube digestif
- **Co-enzyme A** (Vit B5) : transfert de groupements Acyles (Acyls, Acétyls, ..)

Co-enzyme majeur

Analogue de nucléotide : AMP aussi phosphorylé en 3' sur l'Oxygène du ribose lié au PhosphoPantoténate (Acide Pantoïque lié à la Bêta Alanine) lié à la Cystéamine (= B-MercaptoEthylAmine)!! Fonction Sulfhydryle à l'extrémité de la cystéamine : SH fondamental pour les réaction que le CoA exerce : peut se lier aux Acyls portant une fonction carboxylique et permettant donc de créer une liaison ThioEster riche en NRJ



- **Pyrophosphate de Thiamine** (B1) : **décarboxylation**  
Carence : Berry-Berry
- **Phosphate de Pyridoxal** (Vit B6) : **Métabolisme des aa : décarboxylation, Transamination, ..**