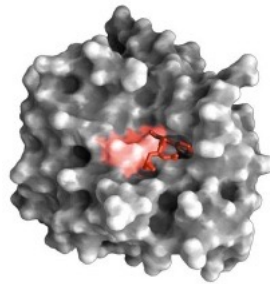


ENZYMES

Protéines possédant des propriétés catalytiques associées à une capacité d'activation spécifique



1

Polycopié "Introduction à l'enzymologie"
L3 SV – UE « Biomolécules »

Gilles Lalmanach – année 2022-2023

2

Enzymes

Macromolécules protéiques: synthèse par les cellules

Intérêts cruciaux de la catalyse biologique:

- ✓ Compenser la « lenteur » des réactions chimiques
- ✓ Spécificité / réactions chimiques très variées
- ✓ Divers modes possibles de régulation de l'activité enzymatique

3

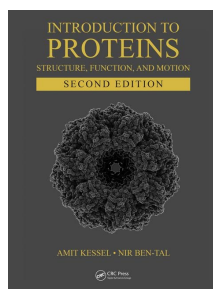
Spécificité des enzymes

- Enzymes are highly specific for the kind of reaction they catalyze, but is not always true of substrates they attack
 - succinic dehydrogenase always catalyzes an oxidation-reduction reaction and its substrate is invariably succinic acid
 - alcohol dehydrogenase always catalyzes oxidation-reduction reactions but attacks a number of different alcohols.

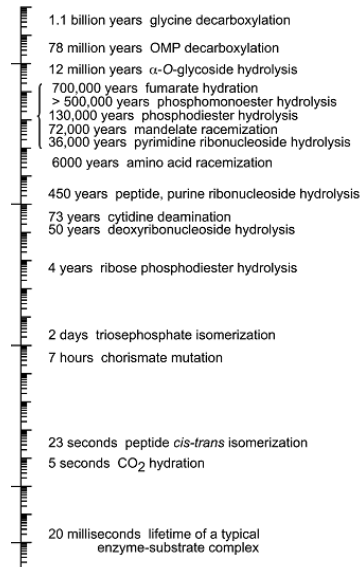
4

Metabolic reactions require catalysis

- **Metabolic reactions must occur very fast to sustain life (10^{-5} - 10^2 sec)**
- **Many chemical reactions are slow**
- **Catalysts can accelerate reactions without heating**



Amit Kessel & Nir Ben-Tal (2018)



5

Facteur d'augmentation de v : 10^6 à 10^{12}

$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	
Conditions	Vitesse (L x mol ⁻¹ x s ⁻¹)
Pas de catalyseur	10^{-7}
+ Fe (catalyse chimique)	56
+ catalase (catalyse biologique)	4×10^6

TABLE 6-5	Some Rate Enhancements Produced by Enzymes
Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucomutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

Table 6-5
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

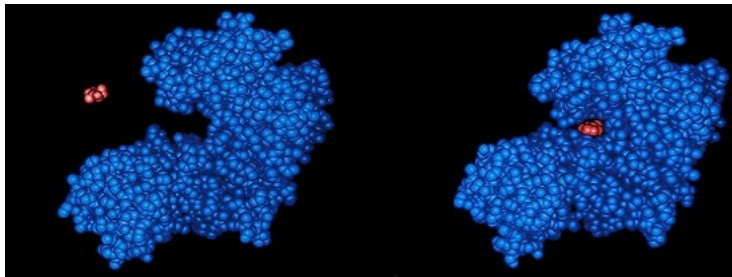
6

Comme les autres protéines:

Enzymes: macromolécules possédant des structures I, II, III (parfois IV)

Du fait de cette structuration:

- ✓ Changement de conformation
- ✓ Sensibilité à la température, au pH, etc...
- ✓ Souvent: structure globulaire
- ✓ Structure 3D +/- complexe

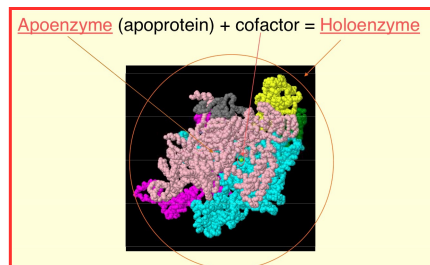


7

Pour mémoire: *holoenzymes vs apoenzymes*

- **Holoenzyme** = « complexe enzymatique » qui nécessite la présence de **cofacteurs** pour être actif
- La partie protéique de l'enzyme est alors nommée **apoenzyme**
- Si absence de cofacteurs: **apoenzyme = enzyme**

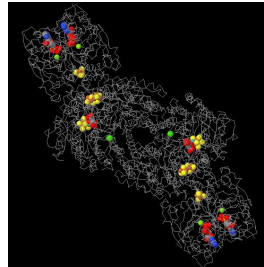
- **Principaux cofacteurs:**
Métaux (inorganiques)
Coenzymes (structures organiques)



8

Cofacteurs:

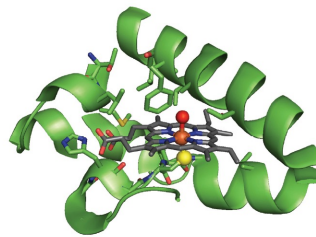
- **Molécule additionnelle de nature non-protéique** indispensable pour la catalyse



Nitrogénase

Co-facteurs = ions métalliques (Fe, Mo) + ADP

- Si liaisons fortes ou liaisons covalentes avec le cofacteur:
Groupement prosthétique



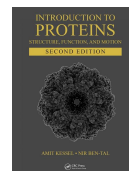
Cytochrome P450

Co-facteur = noyau hème

9

Enzyme cofactors

- *Perform certain tasks better than amino acids:*
 - Binding or **transfer of a chemical group** in the substrate
 - **Stabilizing** charged intermediates electrostatically
 - **Transfer of electrons or protons** to/from the substrate
 - **Polarization of a chemical bond** in the substrate or enzyme
 - **Substrate transport** between different enzyme parts



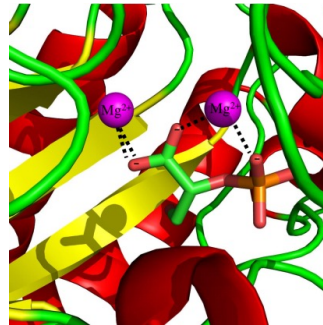
10

Enzyme cofactors

- *Perform certain tasks better than amino acids*

- Example: Cationic metals

- **Positively charged** →
Binding and stabilizing
negatively charged species.
Polarize chemical bonds.
- **Various oxidation states** →
Transfer electrons.
Coordinate O, S, N atoms.



11

Enzyme cofactors

– Organic **coenzymes**, many derived from **vitamins**.

For example:

- **Thiamine pyrophosphate (TPP)** – vitamin B₁
- **Flavin adenine dinucleotide (FADH₂)** – vitamin B₂
- **Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)** – vitamin B₃
- **Coenzyme A (CoA)** – vitamin B₅
- **Biotin** – vitamin B₇/H
- **Tetrahydrofolate (THF)** – vitamin B₉ (folic acid)
- **Cobalamin (CoB₁₂)** – vitamin B₁₂

12

Coenzymes dérivés des vitamines

Implication directe dans la catalyse

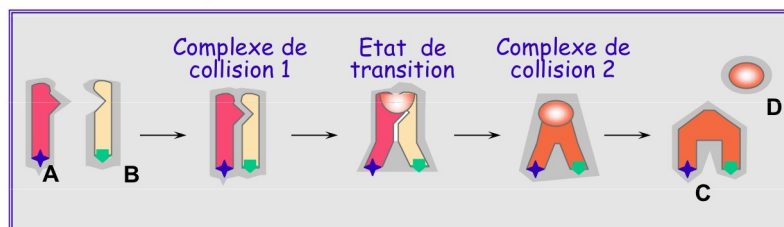
Coenzyme	Reaction Catalyzed
Biotin	Carboxylation
Cobalamin (B12)	Alkylation transfer
Coenzyme A	Acyl transfers
Flavin	Oxido-Reduction
Lipoic acid	Acyl transfers
Nicotinamide	Oxido-Reduction
Pyridoxal phosphate	Amino group transfers
Tetrahydrofolate	One carbon group transfers
Thiamine pyrophosphate	Aldehyde transfer

13

Réaction : évolution

Réaction $A + B$ (réactifs) $\rightarrow C + D$ (produits)

□ non catalysée



14

Comment accélérer la vitesse de la réaction ?
- 1 -

Increasing the temperature make molecules move faster

But:

Biological systems are very sensitive to temperature changes

15

Comment accélérer la vitesse de la réaction ?
- 2 -

Enzymes can increase the rate of reactions without increasing the temperature.

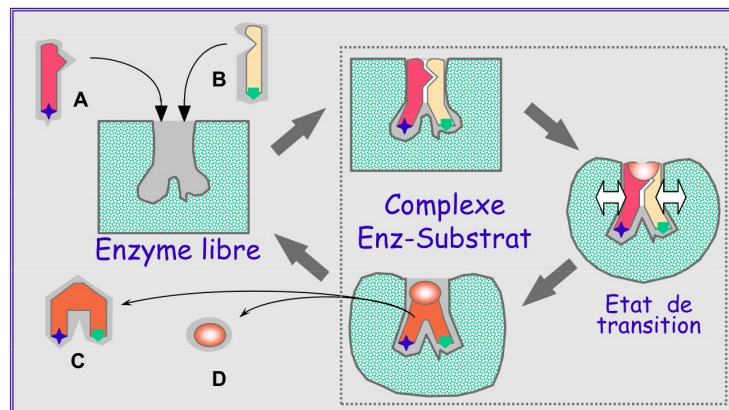
- They do it by lowering the activation energy.
- Creation of a “**new reaction pathway**” (“a short cut”)



16

Réaction $A + B$ (réactifs) $\rightarrow C + D$ (produits)

□ Catalysée par enzyme



17

Lors d'une réaction chimique

Apport initial d'énergie
= **ÉNERGIE D'ACTIVATION** (EA)

$$\Delta G^\ddagger$$

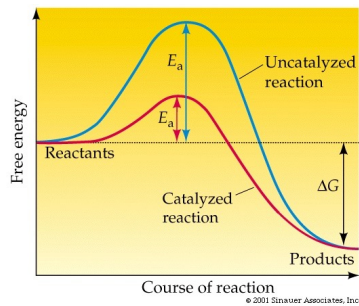
Durant cette phase, les molécules sont à
l'**ÉTAT DE TRANSITION**

18

- Accélération de la réaction chimique par diminution de l'EA (à température modérée) *

* *Proposé en 1889 par Svante Arrhenius*

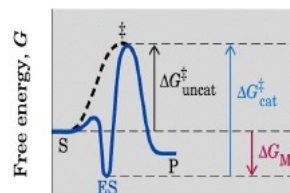
- Pas de modification de l'équilibre thermodynamique (ΔG)



19

Le modèle « clef-serrure »

Mais Incompatibilité / lois de la thermodynamique



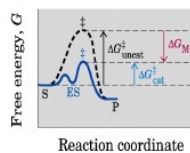
20

The Induced Fit Hypothesis *ou* Modèle de l'adaptabilité induite

- Some proteins can change their shape (conformation)
- When a substrate combines with an enzyme, it induces a change in the enzyme conformation
- The active site is then moulded into a precise conformation
- Making the chemical environment suitable for the reaction
- The bonds of the substrate are stretched to make the reaction easier (**lowers activation energy**)

21

- Enzymes lower the free energy of activation by binding the **transition state** of the reaction better than the substrate
- The enzyme must bind the substrate in the correct orientation otherwise there would be no reaction



Modèle de Koshland:
Compatible / thermodynamique

22

Principaux facteurs modifiant l'activité enzymatique

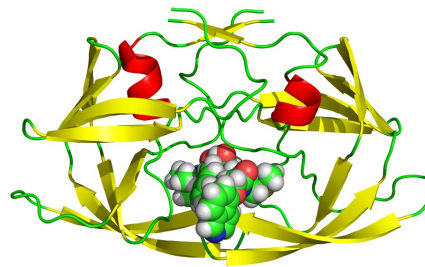
- Substrat(s) et produit(s): concentration(s)
- pH
- Température
- Inhibiteurs

“Petites molécules”
(régulation allostérique)

Phosphorylation

Dégradation protéolytique

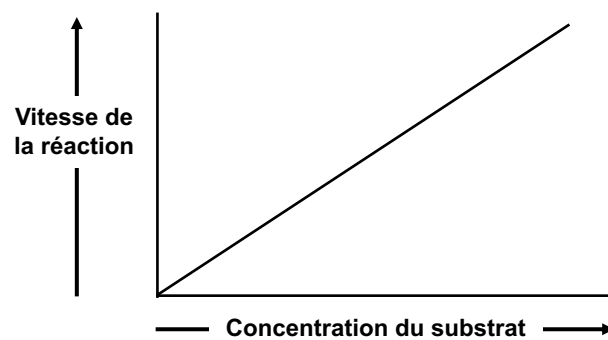
Stress oxydatif, etc ...



HIV-1 protease & KNI-272

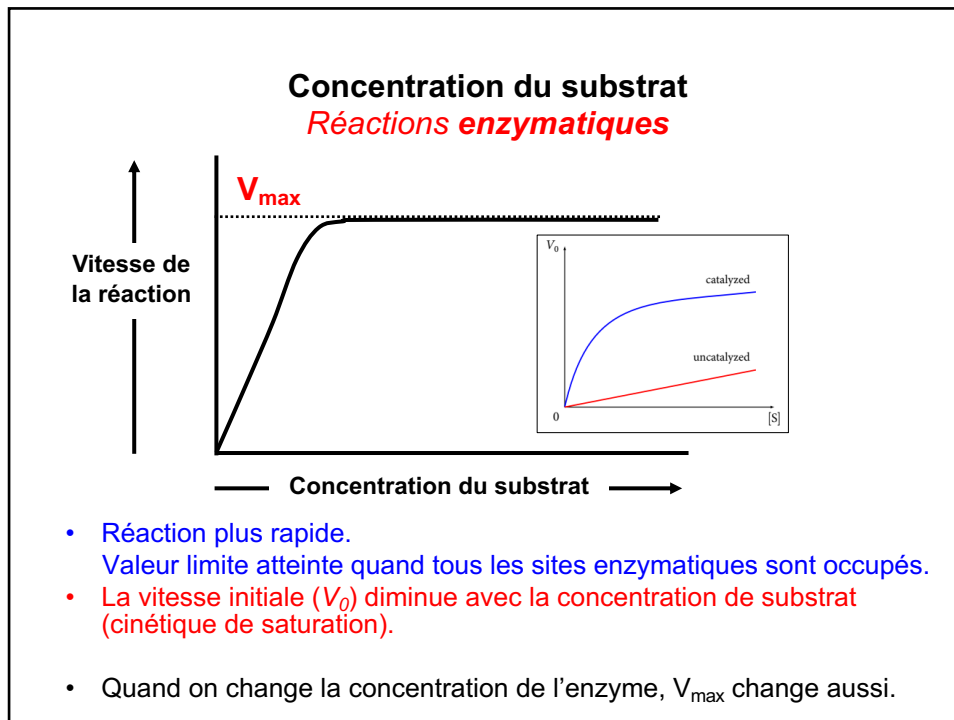
23

Concentration du substrat *Réactions non-enzymatiques*

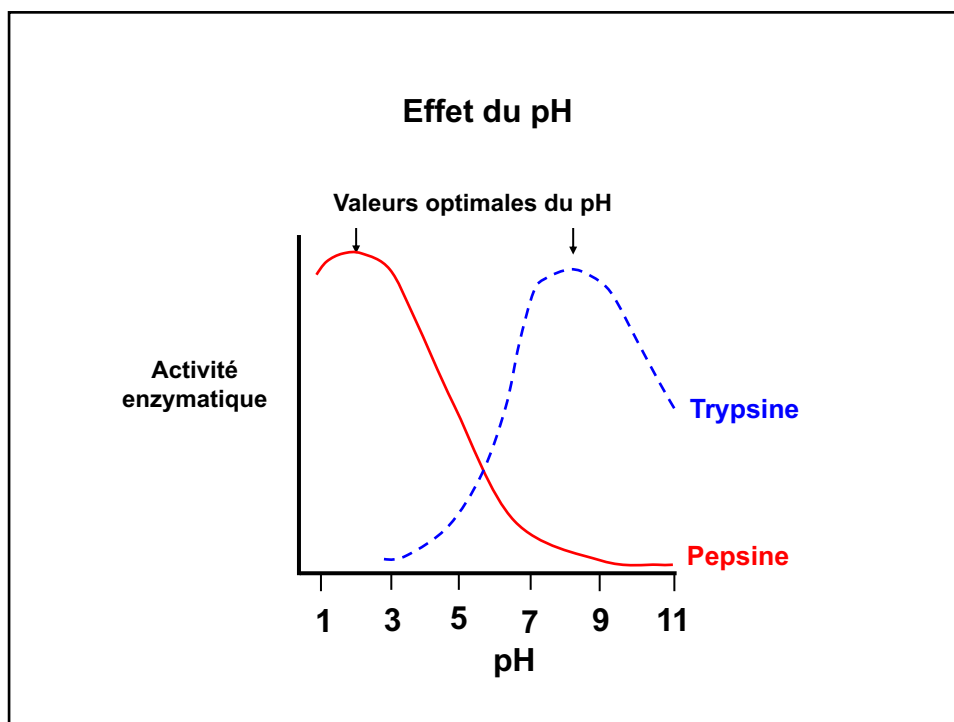


- La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du substrat

24



25



26

Site actif

Région (zone) spécifique de l'enzyme:
Où se fixe le substrat
Où se déroule la réaction

Caractéristiques:

Occupe une part (souvent assez réduite) du volume (hydrodynamique) de l'enzyme
Correspond très souvent à une (des) « fissure(s) » / « crevasse(s) »



Organisation tridimensionnelle
Liaisons / substrat stéréospécifique
Interactions avec le substrat: via des interactions faibles (non covalentes)

27

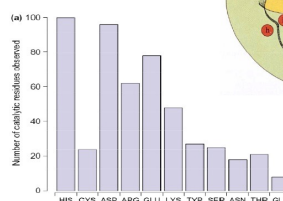
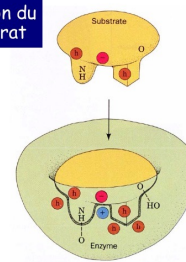
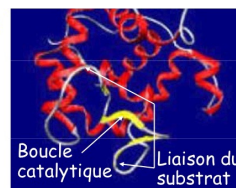
Structure du site actif (quelques généralités)

Deux parties fonctionnelles

✓ **Site de liaison ou de fixation:**
Reconnaissance et maintien
du substrat par des interactions faibles

✓ **Site catalytique:**
Implication d'acides aminés
possédant une réactivité chimique

Asp, Glu
His
Lys
Tyr, Ser, Cys



28

Exemple: lactate deshydrogenase

Conversion pyruvate/lactate
Co-enzyme: NADH/NAD+

$$\begin{array}{ccc}
 \text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{COOH} & \xrightleftharpoons[\text{NADH}]{\text{LDH}} & \text{CH}_3-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH} \\
 \text{Pyruvate} & & \text{Lactate}
 \end{array}$$

6 interactions hydrogène
1 interaction ionique

Eléments impliqués dans la liaison du NAD⁺

Eléments impliqués dans la catalyse

29

Susceptibilité importante à la dénaturation

□ Conséquences : dénaturation → plus d'activité enzymatique

Site de liaison

Protéine native

↓ Dénaturation

Protéine dénaturée

Site actif fonctionnel

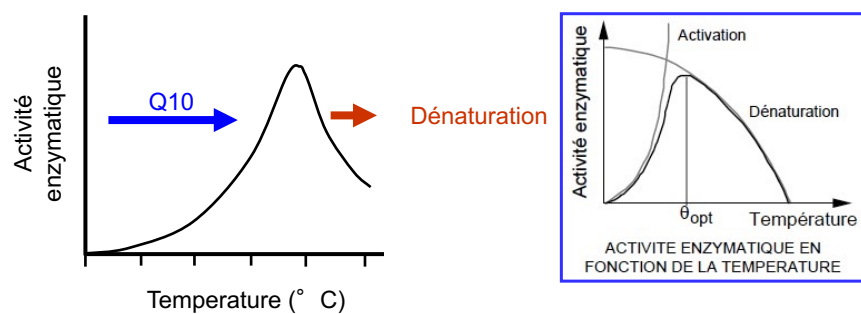
↔

pH
température
ions
solvants...

30

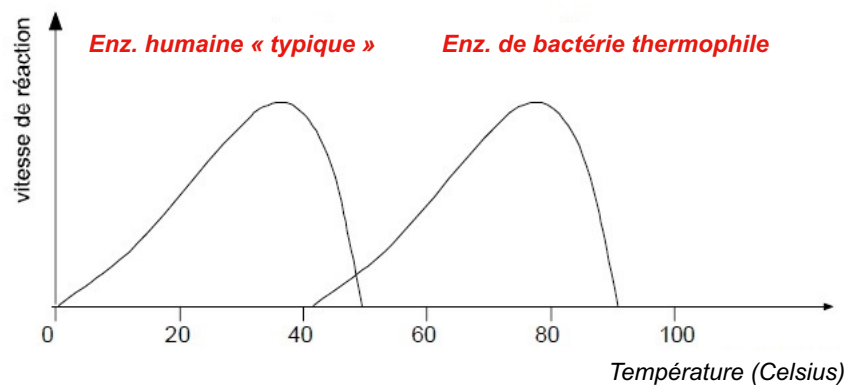
Effet de la température

- Q10 (the temperature coefficient) = the increase in reaction rate with a 10° C rise in temperature.
- For chemical reactions the Q10 = 2 to 3. The rate of the reaction doubles or triples with every 10° C rise in temperature.
- Enzyme-controlled reactions follow this rule as they are chemical reactions
- BUT at higher temperatures proteins **denature**
- The optimum temperature for an enzyme controlled reaction will be a balance between the Q10 (activation) and denaturation.



31

Effet de la température



32

Régulation de l'activité enzymatique Autres effecteurs

Divers agents chimiques

Ions métalliques (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$ etc...)

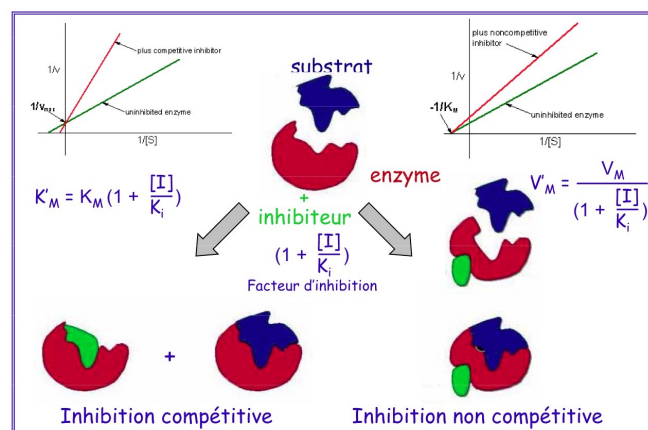
Activateurs

Inhibiteurs

- ✓ Compétitifs: V_{max} inchangée, K_m augmentée
- ✓ Non-compétitifs: V_{max} diminuée, K_m inchangée

33

Principaux modes d'inhibition enzymatique Inhibiteurs compétitifs vs non-compétitifs



Inhibiteurs compétitifs: V_{max} inchangée, K_m augmentée
Inhibiteurs non-compétitifs: V_{max} diminuée, K_m inchangée

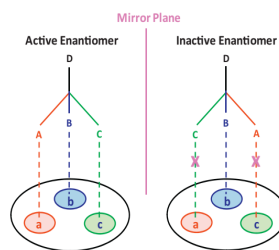
34

Les enzymes sont très majoritairement stéréo-sélectives



SAUF:

- Enzymes also are generally specific for a particular steric configuration (optical isomer) of a substrate
 - Except for Racemases that attack both D and L forms of their substrate



35

Proximité, contrainte/distorsion et électrostatique

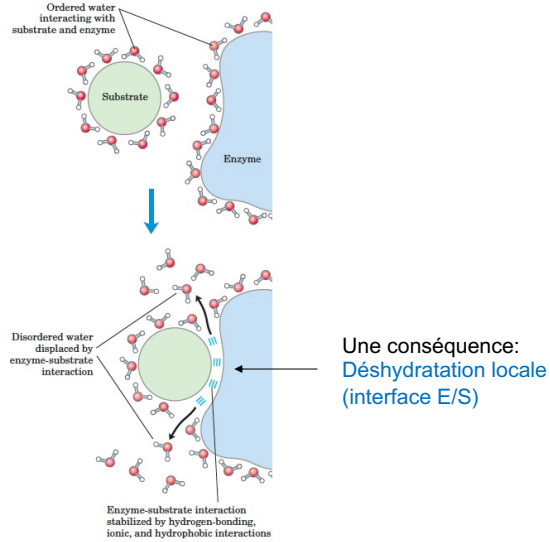
Comment ça marche ?

Common Mechanisms

- Proximity and Strain Effects**
 - Substrate fits the catalytic site with proper orientation to catalytic groups. Enzyme conformation changes to give a strained E-S complex.
 - Facilitates attaining the transition state.
- Electrostatic Effects**
 - Substrate binding site excludes H_2O & lowers the dielectric constant strengthening electrostatic interaction between E and S.

36

Réarrangements des interactions faibles entre l'enzyme et son substrat



37

En bref:

Principaux mécanismes mis en jeu lors de la catalyse

Catalytic Mechanisms

- Acid-Base catalysis
 - Enzyme side chains act as proton donors and acceptors.
- Covalent Catalysis
 - Powerful nucleophilic side chain forms an unstable covalent bond to the substrate.

Metal Catalysis

- Orients substrates + stabilizes charge in the transition state + supplies or captures electrons during the course of the reaction.
- Metal bound at the active site of enzymes can act as electrophilic catalysts, stabilizing the increased electron density of negative charge that can develop during reaction.
- Metal can also provide a nucleophile at neutral pH by coordinating to a group with ionizable proton

Example: Alcohol dehydrogenase



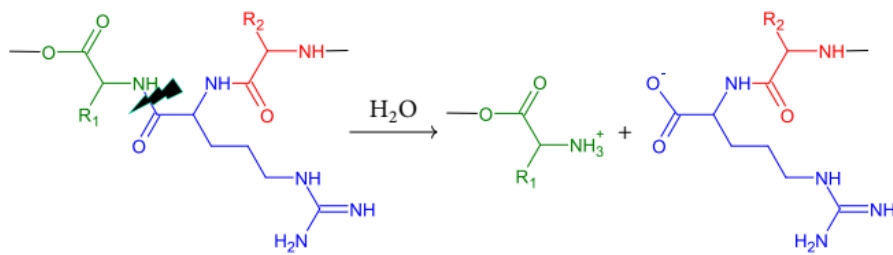
38

Cas de la chymotrypsine ou de la trypsine

Mécanisme simplifié

Clivage par hydrolyse d'une liaison peptidique (amide)

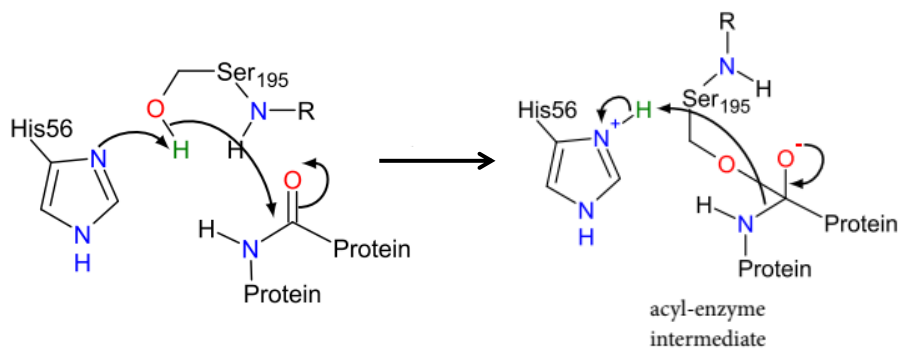
- Catalyse acidobasique
- Catalyse covalente
- Influence de la polarisation des groupements



39

Mécanismes de la catalyse

- Rupture d'une liaison amide par la trypsine
 - Mécanisme (premières étapes):
 1. Polarization et déprotonation de Ser195 par His56
 2. Ser195 attaque le substrat → intermédiaire acyl-enzyme



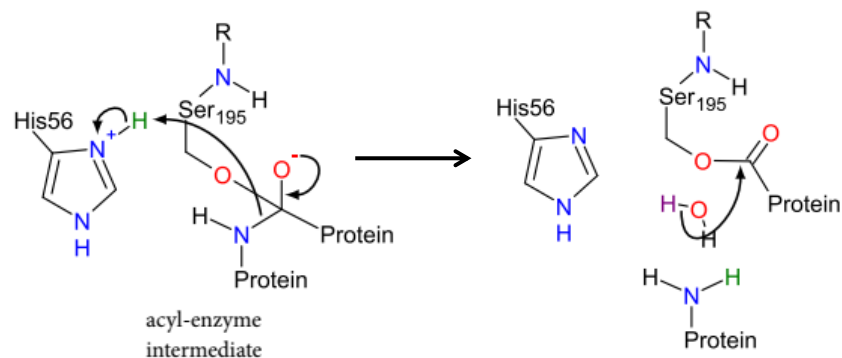
40

Mécanismes de la catalyse

– Rupture d'une liaison amide par la trypsine

- Mécanisme (premières étapes):

3. **Protonation** du substrat par His56 → **clivage de la liaison**



41

Classification et Nomenclature des Enzymes

A l'origine: Utilisation d'un Nom usuel / trivial

- Souvent **pratique**
en tout cas lors des étapes initiales de caractérisation
- Mais ne renseigne pas sur la source, la fonction ou la réaction catalysée.
- Exemple: trypsine, thrombine, lysozyme.

Donc besoin d'une nomenclature basée sur une approche systématique

42

Nom systématique (EC #)

- Selon l' "International Union of Biochemistry" (IUBMB):
Le nom d'une enzyme se décompose en deux parties:

1/ La première partie correspond au nom du (des) substrat(s) de l'enzyme.

2/ La deuxième partie correspond au type de réaction catalysée par l'enzyme.

Cette partie finit par le suffixe "ase".

Ex: Lactate déhydrogénase

43

EC

Classification en 6 groupes différents **selon la nature de la réaction chimique impliquée.**

Toutes les enzymes ont un "EC number".

La classification ne tient pas compte:

- de la séquence primaire de l'enzyme (donc de l'homologie en amino acides)
- de la structure protéique de l'enzyme
- des mécanismes catalytiques* mis en jeu

(≠ type de la réaction chimique à proprement parler)*

44

Classification des enzymes (selon IUBMB)

Basée sur le type de réaction: **CINQ types**

- ✓ Oxydo-réduction
- ✓ Transfert de groupement
- ✓ Rupture de liaison impliquant H₂O (*hydrolyse*)
- ✓ Rupture ou formation de liaison (2 cas) - *absence d'H₂O*
- ✓ Isomérisation

Donc:

SIX classes d'enzymes

45

Les 6 classes

- | | |
|--------------------|--|
| 1. Oxidoreductases | oxidation/reduction
(eg. dehydrogenases) |
| 2. Transferases | group transfer
(eg. kinases) |
| 3. Hydrolases | hydrolysis
(eg. proteases) |
| 4. Lyases | lysis, generating double bond
(eg. synthases) |
| 5. Isomerases | rearrangement
(eg. racemases) |
| 6. Ligases | ligation requiring ATP
(eg. synthetases) |

- **EC 1. Oxydoréductases**
- **EC 2. Transférases**
- **EC 3. Hydrolases**
- **EC 4. Lyases**
- **EC 5. Isomérases**
- **EC 6. Ligases**

46

EC 1.

CLASSE	TYPE DE REACTION	EXEMPLES
Oxydo-réductases*	<p>Transferts d'équivalents réducteurs</p>	<p>Déshydrogénases Oxydases..</p>
<p>1. Oxidoreductases Catalyse les réactions d'oxydo-réduction</p> <p> $\text{CH}_3-\underset{\text{OH}_2\text{e}^-}{\text{CH}}-\text{COO}^- + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{COO}^- + \text{NADH} + \text{H}^+$ </p> <p>Lactate Pyruvate</p> <p style="text-align: center; font-size: small;">Lactate dehydrogenase</p>		

- Catalyse: transfert d'e⁻, d'atomes d'hydrogène/d'oxygène entre deux substrats
Aussi appelées: oxydases, déshydrogénases, ou réductases
- Toujours présence d'un couple donneur/accepteur d' e⁻ pour permettre la réaction redox

47


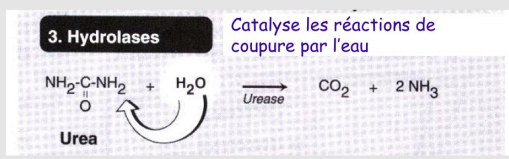
EC 2.

CLASSE	TYPE DE REACTION	EXEMPLES
Transférases*	<p>Transfert d'un groupe fonctionnel</p>	
<p>2. Transferases Catalyse les réactions de transfert de groupes</p> <p> $\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{COO}^- + \text{THF} \rightleftharpoons \text{CH}_2-\text{COO}^- + \text{THF}-\text{CH}_2$ </p> <p>Serine Glycine</p> <p style="text-align: center; font-size: small;">Serine hydroxy-methyl transferase</p> <p style="text-align: center; font-size: x-small;">THF : tétra hydro folate</p>		

- Catalyse des réactions de transfert de groupement chimique
- Pas de réaction d'oxydo-réaction pour les enzymes de la classe EC 2 (Oxydoréductases - classe EC 1: transfert d'atomes d'hydrogène / d'oxygène)

48


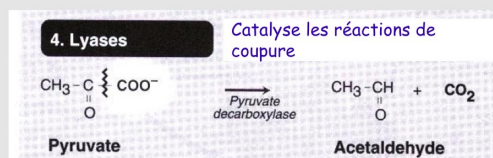
EC 3.

CLASSE	TYPE DE REACTION	EXEMPLES
Hydrolases	 <p>$A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$</p> <p>Coupe d'une liaison par les éléments d'une molécule d'H_2O</p>	<p><i>Estérase</i> <i>Glycosidase</i> <i>Peptidase</i> <i>Phosphatase</i></p>
<p>3. Hydrolases Catalyse les réactions de coupe par l'eau</p>  <p>Urea $\xrightarrow{\text{Urease}}$ $CO_2 + 2 NH_3$</p>		

- Réactions d'hydrolyse (implication d'une molécule d'eau).
- **Lipases, estérases, nucléases, glycosidases, peptidases/protéases.**

49


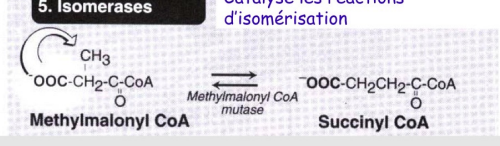
EC 4.

CLASSE	TYPE DE REACTION	EXEMPLES
Lyases	 <p>$A + B \rightleftharpoons A-B$</p> <p>Addition d'un groupe fonctionnel sur Δ ou formation d'une Δ (fonctionne surtout dans de sens de la coupure)</p>	<p>sur liaison $C=C$ sur liaison $C=O$ sur liaison $C=N$ <i>Déshydratase</i></p>
<p>4. Lyases Catalyse les réactions de coupe</p>  <p>Pyruvate $\xrightarrow{\text{Pyruvate decarboxylase}}$ Acetaldehyde + CO_2</p>		

- Elimination non-hydrolytique (cf EC 3) de groupements chimiques
- Formation d'une double liaison (produit) dans le sens de l'addition ($A-B \rightarrow A=B$)
- Ex: **Décarboxylases et aldolases** dans le sens de l'élimination, et **synthases** dans le sens de l'addition

50


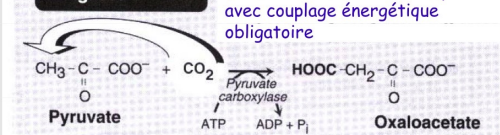
EC 5.

CLASSE	TYPE DE REACTION	EXEMPLES
Isomérase*	 <p>A</p> <p>Transfert d'un groupe fonctionnel à l'intérieur d'une molécule</p>	<p>isoA</p> <p><i>Epimérase</i> <i>Mutase</i></p>
<p>5. Isomerase Catalyse les réactions d'isomérisation</p>  <p>Methylmalonyl CoA $\xrightleftharpoons{\text{Methylmalonyl CoA mutase}}$ Succinyl CoA</p>		

- ✓ Catalyse des réactions d'isomérisation
Ex: racémisation, et isomérisation cis-trans

51

EC 6.

CLASSE	TYPE DE REACTION	EXEMPLES
Ligase*	 <p>A + B</p> <p>Formation de liaisons covalentes C-X, couplage à une réaction → énergie</p>	<p>sur liaison C-C sur liaison C-O sur liaison C-N</p>
<p>6. Ligases Catalyse les réactions de formation d'une liaison simple avec couplage énergétique obligatoire</p>  <p>Pyruvate + CO₂ $\xrightarrow[\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i]{\text{Pyruvate carboxylase}}$ Oxaloacetate</p>		

- Catalyse la synthèse de nombreuses liaisons (principalement C-X)
- Besoin d'apport énergétique
Donc couplage / substrats riches en énergie (le plus fréquent: ATP)

52