

## Bio 7 : les enzymes, des biocatalyseurs protéiques

### Les attendus du programme officiel

<p>On distingue les enzymes à comportement coopératif (enzymes allostériques) et à comportement michaelien. Pour une enzyme oligomérique, <u>l'allostérie correspond à l'influence d'un site de fixation d'un ligand sur un autre</u> qu'il soit identique (effet homotrope) ou différent (effet hétérotrope).</p> <p>Les principaux paramètres cinétiques permettant de décrire une activité enzymatique sont <math>v_{max}</math>, <math>K_M</math> ou <math>K_{0,5}</math>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réaliser le suivi expérimental d'une réaction enzymatique :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Obtention d'une cinétique et détermination de la vitesse initiale ;</li> <li>• Construction d'une courbe <math>v_i = f([S]_0)</math> et linéarisation en double inverse ;</li> <li>• Détermination de <math>K_M</math>, <math>v_{max}</math> et de l'efficacité catalytique.</li> </ul> </li> <li>- Argumenter le comportement coopératif ou michaelien d'une enzyme sur la base de la courbe <math>v_i = f([S])</math></li> <li>- Comparer et discuter les principales caractéristiques structurales et fonctionnelles des enzymes michaeliennes et des enzymes allostériques (enzymes à comportement coopératif).</li> </ul>
<p><b>Précisions et limites :</b>  <i>On se limite à un exemple d'enzyme michaelienne et un exemple d'enzyme allostérique, à prendre parmi ceux évoqués dans d'autres items du programme. Ces exemples sont ensuite réinvestis pour le contrôle de l'activité enzymatique. Seul le suivi expérimental d'une cinétique michaelienne est réalisé en TP.</i></p>	
<p>Les enzymes sont des biocatalyseurs et jouent souvent le rôle d'agents de couplage entre réactions. La catalyse enzymatique implique la formation d'un complexe enzyme-substrat au niveau du site actif de l'enzyme.</p> <p>Le site actif est à l'origine de la spécificité de substrat et de réaction. Il est constitué d'acides aminés ayant un rôle dans la fixation du substrat, dans la catalyse enzymatique ou dans les deux phénomènes à la fois.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Argumenter le rôle d'agent de couplage à l'aide d'exemples de couplages chimio-chimiques.</li> <li>- Relier la spécificité de substrat et de réaction à la structure tridimensionnelle et aux interactions du complexe enzyme-substrat.</li> <li>- Exploiter des données de modélisation moléculaire.</li> <li>- Exploiter des résultats de mutagenèse ou autres pour expliquer un mécanisme catalytique.</li> </ul>
<p><b>Précisions et limites :</b>  <i>Aucun mécanisme catalytique n'est à connaître.</i></p>	
<p>Plusieurs facteurs modifient l'activité enzymatique et donc les réactions du métabolisme :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- la quantité d'enzyme, liée à l'expression génétique et à sa localisation (adressage)</li> <li>- les conditions physico-chimiques (pH, T)</li> <li>- les modifications conformationnelles de l'enzyme par modification covalente ou par fixation d'un ligand.</li> </ul> <p>Les enzymes sont des éléments de spécialisation des cellules ou des compartiments cellulaires.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comparer les effets des inhibiteurs <u>compétitif et non compétitif</u> sur les paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne.</li> <li>- Argumenter, sur un exemple, la diversité des effecteurs allostériques et de leurs effets.</li> <li>- Expliquer l'importance physiologique et pharmacologique des effecteurs sur la base de quelques exemples.</li> <li>- Analyser et interpréter des données cinétiques en présence de différents types d'effecteurs.</li> </ul>
<p><b>Précisions et limites :</b>  <i>On étudie les mécanismes de contrôle de l'activité enzymatique sur les exemples d'enzyme michaelienne et d'enzyme allostérique étudiés précédemment. Pour les modifications conformationnelles par modification covalente, on se limite à la phosphorylation.</i></p>	

### La minute physique

Les deux principes de la thermodynamique :

- postulat 1 : l'énergie totale d'un système et de son milieu extérieur est une constante
- postulat 2 : un processus ne peut évoluer spontanément que si la somme des entropies du système et du milieu extérieur augmente, l'entropie étant une mesure du désordre.
- La variation d'entropie est un outil prédictif.

Il est difficile d'estimer la variation de l'entropie du milieu ; il est aussi difficile d'estimer la variation de l'entropie de la cellule qui est un système thermodynamique ouvert.

Les biologistes font appel à une autre grandeur thermodynamique : la **variation d'énergie libre, notée  $\Delta G$** .

- $\Delta G$  est reliée à la variation d'entropie du système (cellule)  $\Delta S$  par la relation :

$$\Delta G = \Delta E + P \Delta V - T \Delta S$$

où  $\Delta E$  est la variation d'énergie interne du système ; P la pression,  $\Delta V$  la variation de volume du système (en général négligeable dans la cellule) et T la température.

- $\Delta G$  est un **outil prédictif** facile à utiliser

Si  $\Delta G < 0$ , le travail est **exergonique** : il se déroule spontanément

Si  $\Delta G > 0$  le travail est **endergonique** : il ne peut se dérouler, sauf s'il y a un apport énergétique.

Si  $\Delta G = 0$ , le système est à l'équilibre.

- $\Delta G$  est une mesure énergétique : elle s'exprime en **Joule**
- $\Delta G$  ne renseigne ni sur les mécanismes du travail ni sur la vitesse du travail.
- Nous disposons de formules directement applicables à la cellule pour les principaux travaux cellulaires.

1<sup>ère</sup> formule de  $\Delta G$  à connaître : la variation d'enthalpie libre lors d'une réaction chimique

$$\Delta G_{\text{réaction}} = \Delta G^{\circ'} + RT \cdot \ln(\text{concentration des produits} / \text{concentration des réactifs})$$

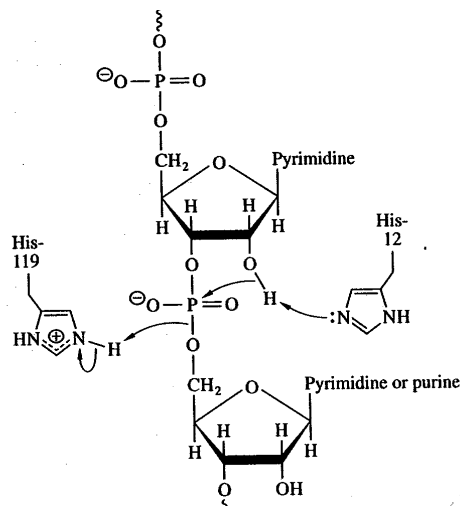
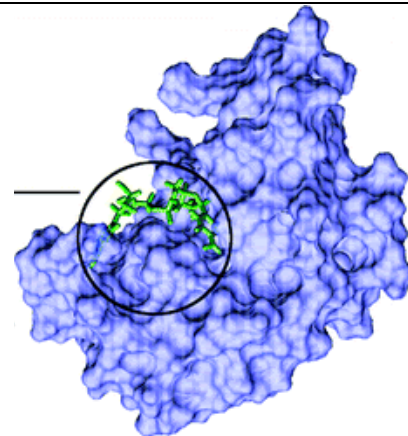
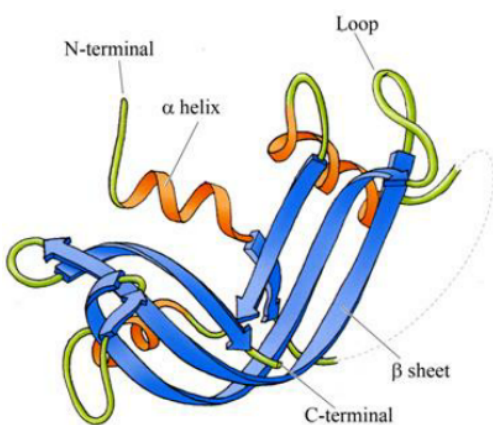
avec  $R = 8,32 \cdot 10^{-3} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$  et T la température absolue

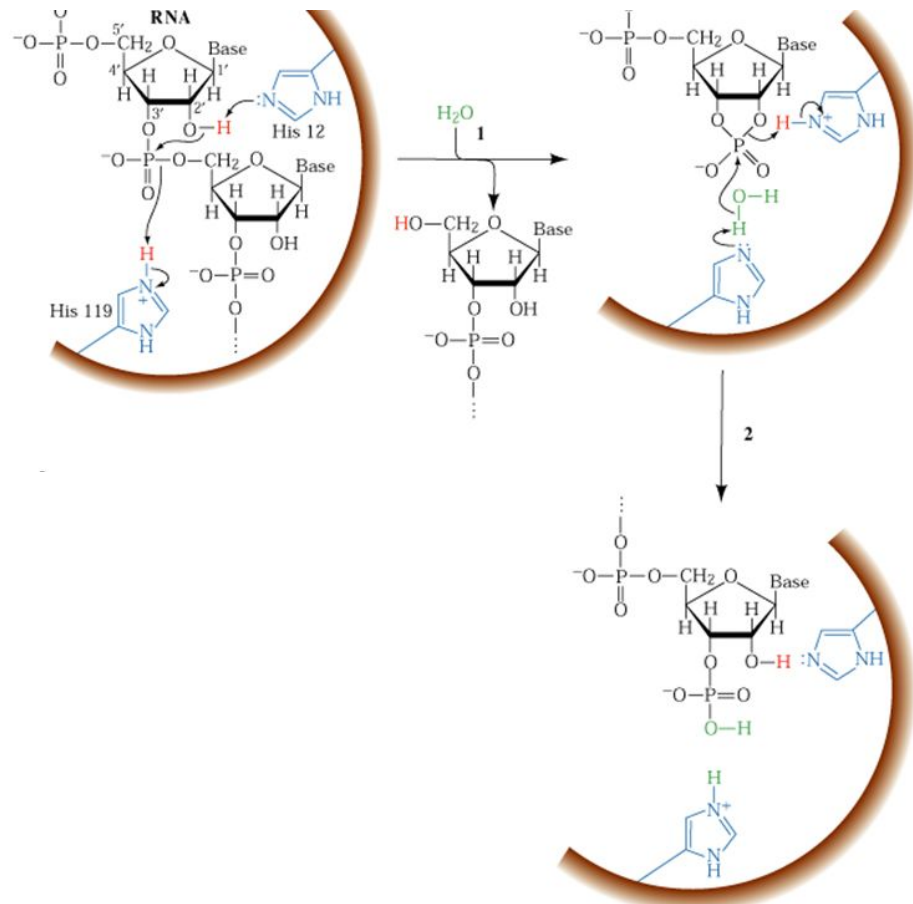
AN

$\Delta G^{\circ'}$ (kJ/mol)	Hydrolyse de l'ATP -30,5		Déphosphorylation du glucose 6P -13,8	
Concentrations moyennes dans le cytosol animal	ATP/ADP = 100	Glucose = $10^{-3}$ mol/L	Glucose 6P = $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L	Pi = $10^{-3}$ mol/L

**Document 1 : carte d'identité de la ribonucléase pancréatique bovine**

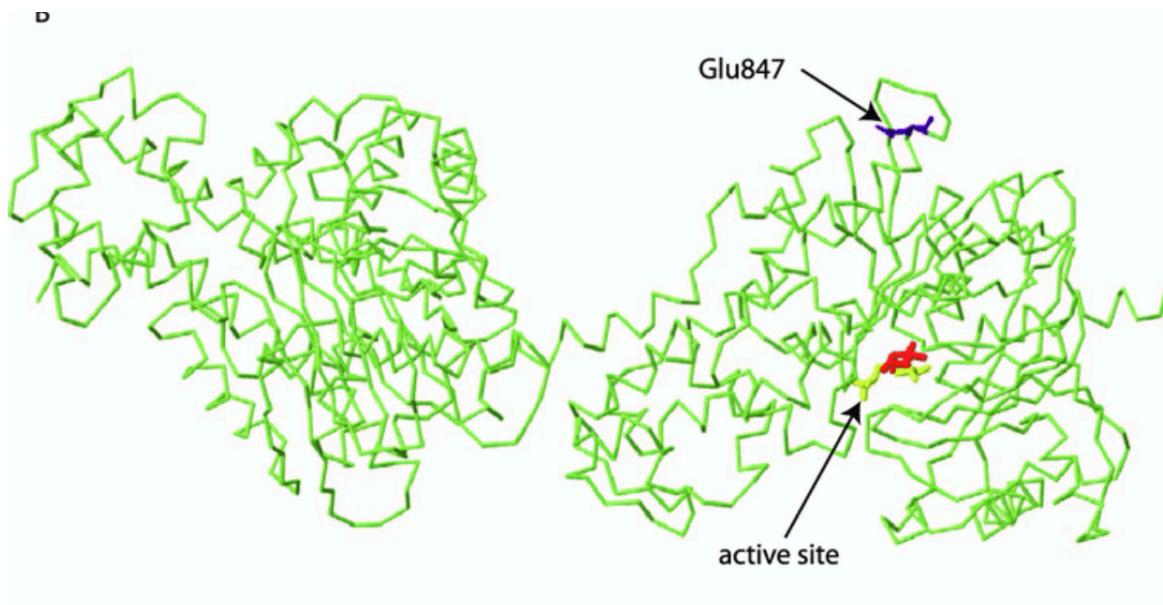
Structure primaire	124 acides aminés dont 8 cystéines
Structure secondaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 3 hélices alpha du côté N terminal</li> <li>- 2 regroupements de 3 feuillets bêta en C terminal</li> </ul>
Structure tertiaire	Forme globulaire munie d'un unique site en creux : le site actif en forme de gouttière. 2 x 3 x 4 nm environ 4 ponts disulfure
Structure quaternaire	/
Site actif	3 acides aminés fondamentaux : <ul style="list-style-type: none"> <li>- lysine 41 = le site de liaison</li> <li>- histidine 12 et histidine 119 = le site catalytique</li> </ul>
Cinétique	mickaélienne
Phosphorylation	/
Spécificité de substrat	ARN de toute séquence
Spécificité de réaction	Endonucléase capable d'hydrolyser les liaisons phosphodiester entre un nucléotide à C ou U et un autre nucléotide à tout niveau de l'ARN Enzyme de la famille des hydrolases
Localisation	Production dans les cellules exocrines du pancréas. Sécrétion et action dans le duodénum.
Effecteurs	Inhibiteurs de ribonucléase = protéine à fonctionnement inhibiteur compétitif

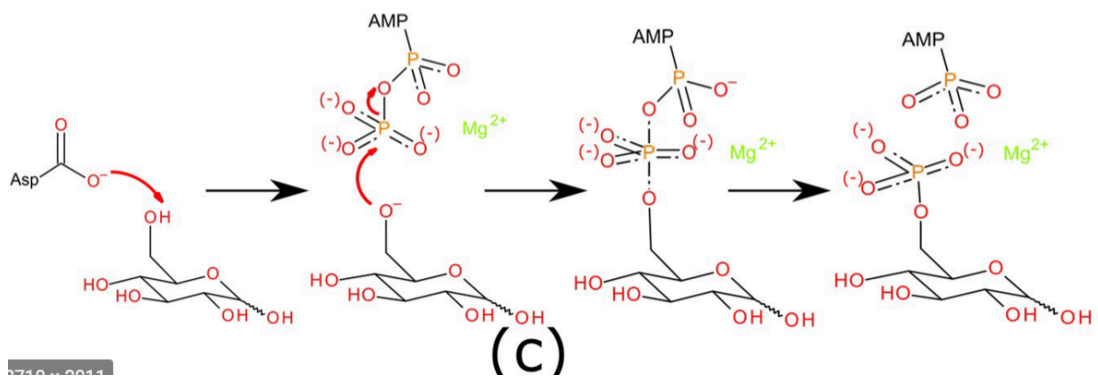
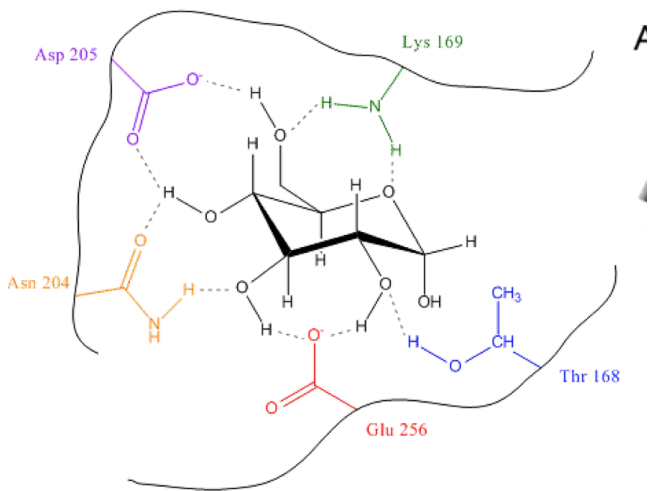
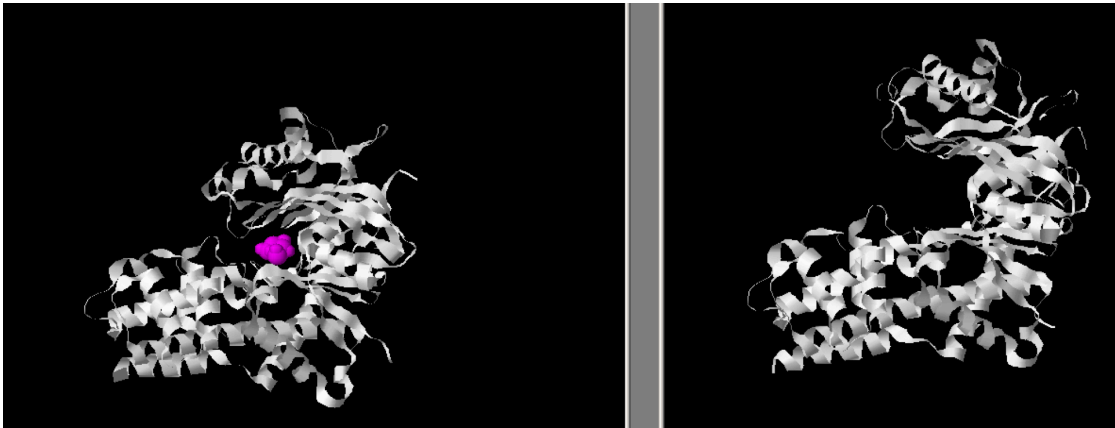




**Document 2 : carte d'identité de l'hexokinase**

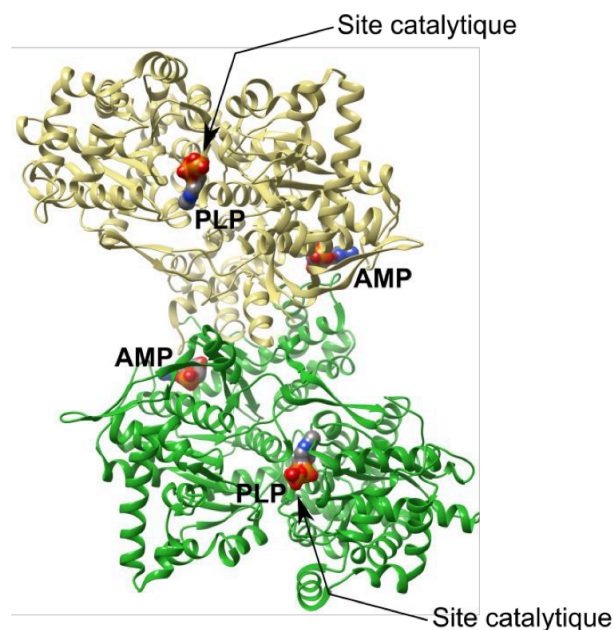
Structure primaire	500 à 900 AA selon les cellules
Structure secondaire	Nombreuses structures secondaires
Structure tertiaire	Deux domaines globulaires reliés par une charnière 6 x 8 x 5 nm Un site de fixation du glucose et de l'ATP : le site contient un cation $Mg^{++}$ Fermeture du site actif par fonctionnement de la charnière après fixation : microenvironnement anhydre. En face du site actif un site de fixation du glucose 6P
Structure quaternaire	/
Site actif	5 acides aminés fondamentaux et un ion $Mg^{++}$ : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3 acides aminés chargés négativement Asp (D) ou Glu (E) pour fixer spécifiquement le glucose</li> <li>- 2 acides aminés polaires <math>\delta^+</math> pour fixer spécifiquement l'ATP</li> <li>- <math>Mg^{++}</math> pour stabiliser l'ATP au cours de l'acte catalytique</li> <li>- certains de ces acides aminés participent aussi à la catalyse</li> </ul>
Cinétique	mickaélienne
Phosphorylation	/
Spécificité de substrat	- substrat principal : $\alpha$ -D-glucopyranose (peut aussi métaboliser d'autres hexoses en pyranose comme le galactose) - cosubstrat / coenzyme : ATP
Spécificité de réaction	Transfert du groupement phosphate de l'ATP au carbone 6 du glucose Enzyme de la famille des transférases, sous-groupe des kinases
Localisation	Dans le cytosol de routes les cellules Plusieurs isoformes selon les types cellulaires et selon les organismes
Effecteurs	Action inhibitrice du Glucose-6P dans le cadre d'un rétrocontrôle négatif ; action sur un site secondaire





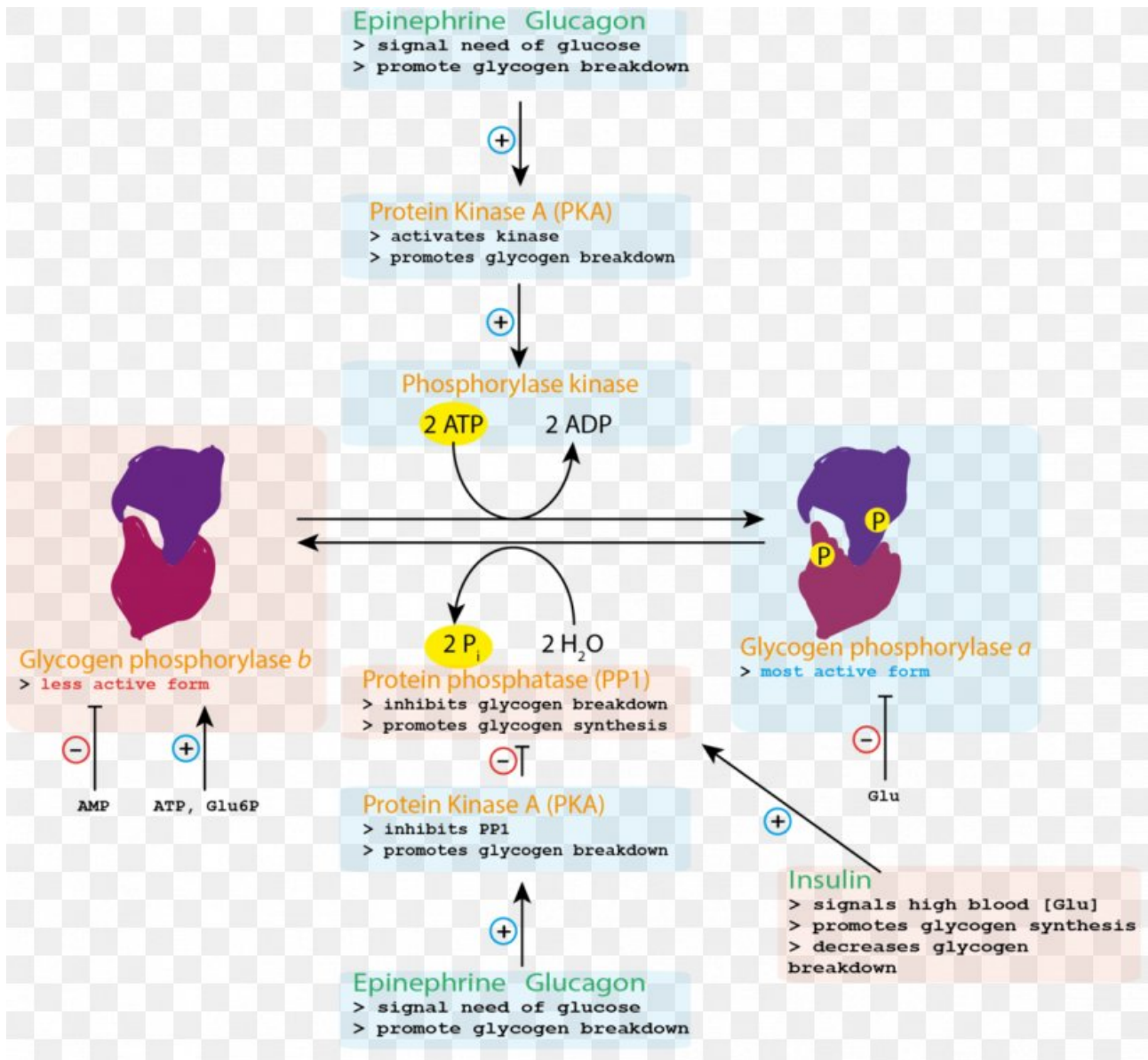
**Document 3 : carte d'identité de la glycogène phosphorylase**

Structure primaire	
Structure secondaire	Nombreuses hélices
Structure tertiaire	Structure globulaire
Structure quaternaire	Dimère associant deux sous-unités identiques
Site actif	Présence d'un groupement prosthétique (PLP ou vitB6) sur Lys 680
Cinétique	Allostérique
Phosphorylation	Sur Ser14 : la phosphorylation permet de stabiliser la structure de la portion N-terminale de la protéine et est alors activatrice e ,nécessaire
Spécificité de substrat	Deux substrats : - un glycogène - un phosphate inorganique
Spécificité de réaction	Coupure de la liaison O Glycosique à l'extrémité d'une branche de la molécule de glycogène et libération d'un glucose 1P
Localisation	Dans les cellules réalisant la glycogénolyse (par exemple foie et muscles des Vertébrés)
Effecteurs	Effecteurs allostériques : - ATP inhibiteur allostérique - AMP activateur allostérique Ces deux effecteurs se lient au même site secondaire : Tyr155 Un autre site secondaire peut fixer des composés hétérocycliques inhibiteurs : adénosine, FAD, caféine par exemple. Un troisième site secondaire prend en charge : - Glucose inhibiteur allostérique - Glucose 6P activateur allostérique





**Document 4 : contrôle du métabolisme du glycogène, des phosphorylations ou déphosphorylations en cascade**





**Document 5 : les inhibiteurs de ribonucléase**

Les inhibiteurs de ribonucléases sont des protéines cytosolique qui participent à la régulation de la durée de vie des ARNm ; elles ont également une action inhibitrice sur la ribonucléase pancréatique.

