



L3S5 Biochimie structurale
UE EN190

Analyse structurale et fonctionnelle des protéines

Pr. Sylvie Nessler

Bibliographie

Les ouvrages suivants sont disponibles à la Bibliothèque Universitaire:

- **BIOCHIMIE** de L. Stryer
- **BIOCHIMIE** de D. Voet & J. G. Voet
- **BIOCHIMIE** de Garrett & Grisham
- **Enzymes, catalyseurs du monde vivant** de J. Pelmont
- **Structure et Fonction des Protéines** de Petsko & Ringe
- **Introduction à la structure des Protéines** de Branden & Tooze

Enzymologie

Enzymes: Fonctions et méthodes d'étude

- Notions de base
- Classification des enzymes
- Spécificité enzymatique
- Les co-enzymes
- Tests enzymatiques

Notions de base

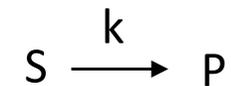
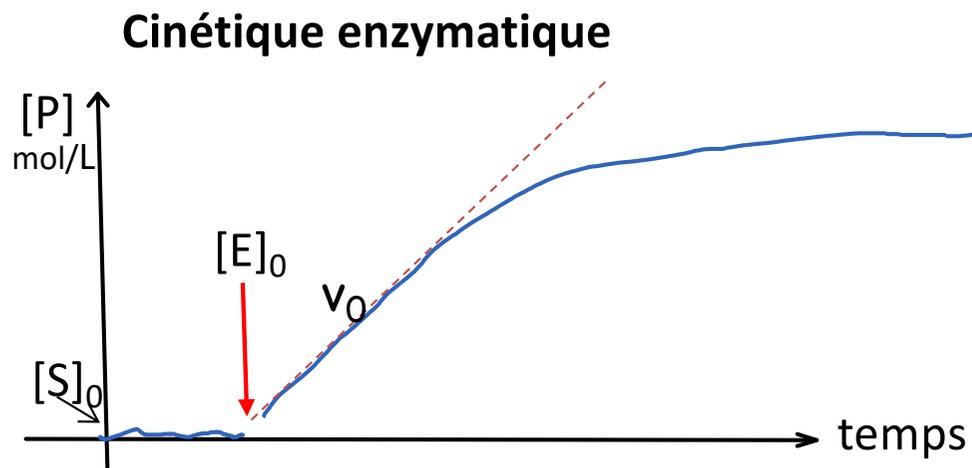
Un **enzyme** est un catalyseur biologique. C'est presque toujours une protéine.

La réaction a lieu dans le **site actif** de la protéine.

Un enzyme augmente la **vitesse de réaction**.

Un **catalyseur** accélère une réaction chimique sans être consommé par la réaction.

Le **substrat** (S) est le composé transformé en **produit** (P) par l'enzyme (E)



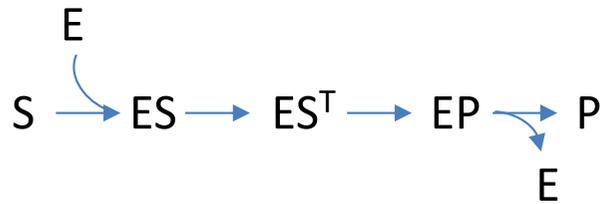
$$V = \frac{d[P]}{dt} = k [S]$$

Avec k , la constante cinétique

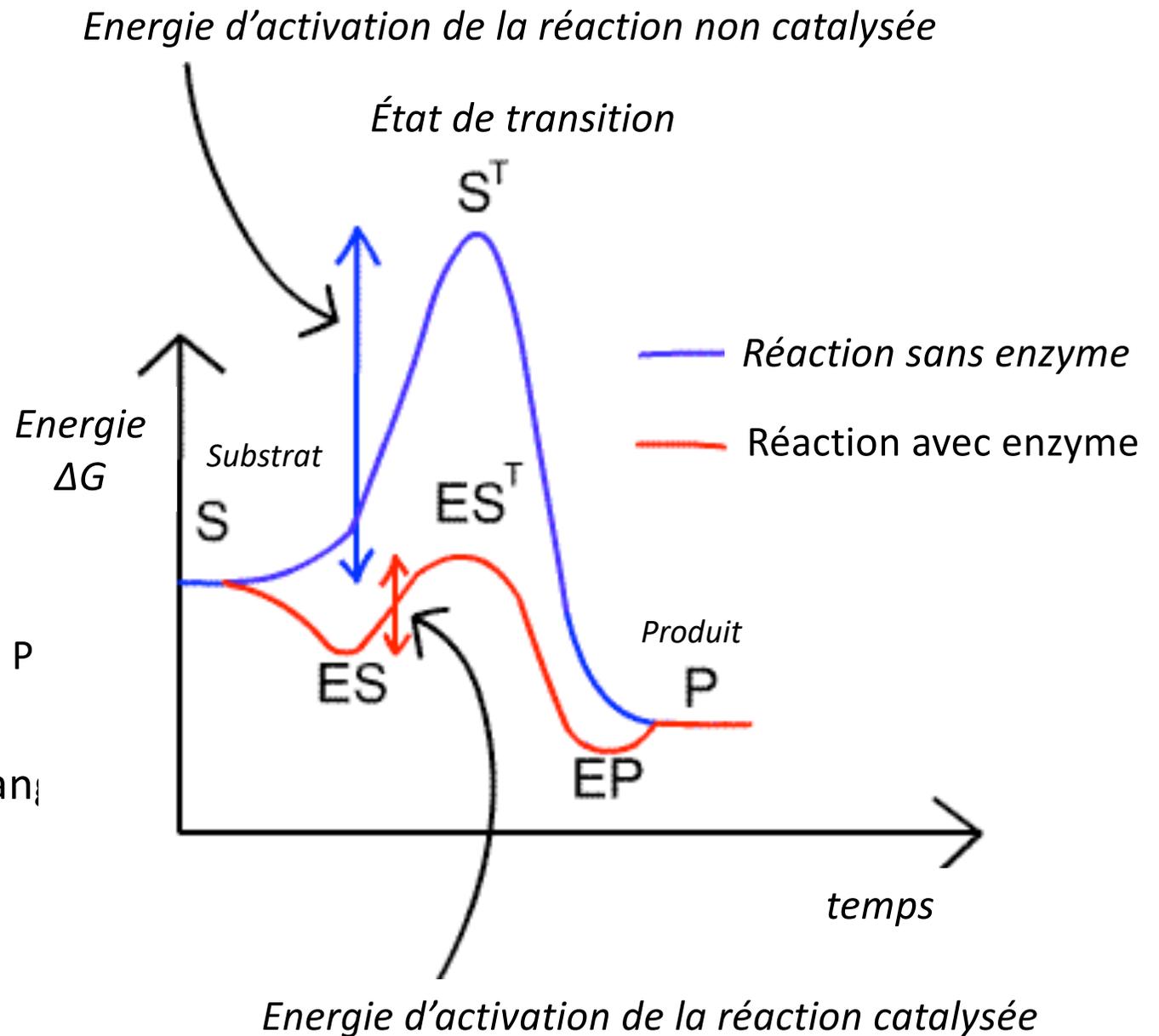
$$k_{\text{cat}} / k_{\text{non cat}} = 10^6 \text{ à } 10^{12}$$

Catalyse enzymatique

Les enzymes abaissent l'énergie d'activation d'une réaction en fixant leur substrat de manière à stabiliser l'état de transition, ce qui augmente la vitesse de réaction.



Les enzymes restent inchangées en fin de réaction.



Les enzymes au cœur des procédés biotechnologiques

Exemples d'application:

Industrie agro-alimentaire:

- Amélioration du rendement et de la qualité de production (lysozyme, lactamases...)
- Mise au point de nouveaux produits (pectinases...)

Applications médicales et pharmaceutiques:

- Analyse de biologie moléculaire (enzymes de restriction...)
- Cibles thérapeutiques (protéine-kinases, transcriptase inverse...)

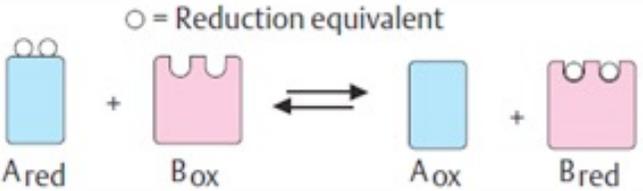
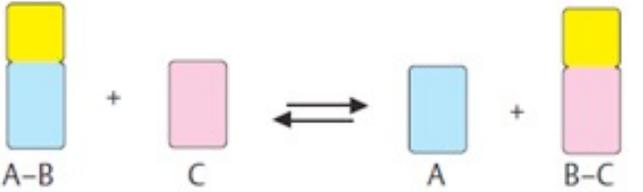
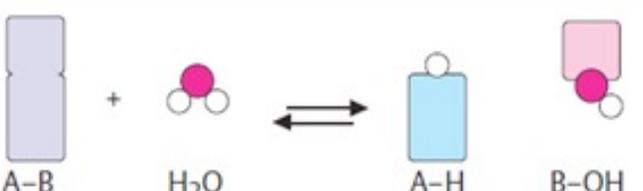
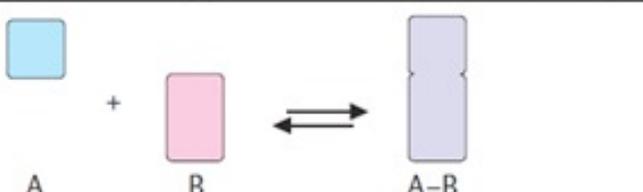
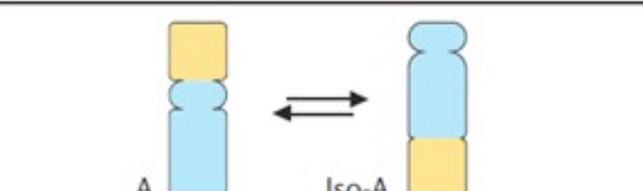
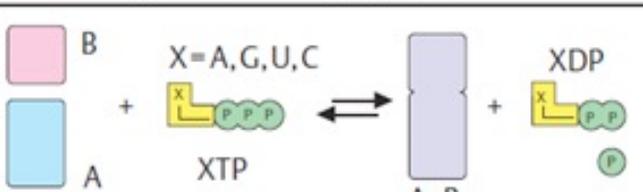
Industrie chimique:

- du papier (xylanases, cellulases...)
- des détergents (protéases, amylases, lipases...)

Environnement:

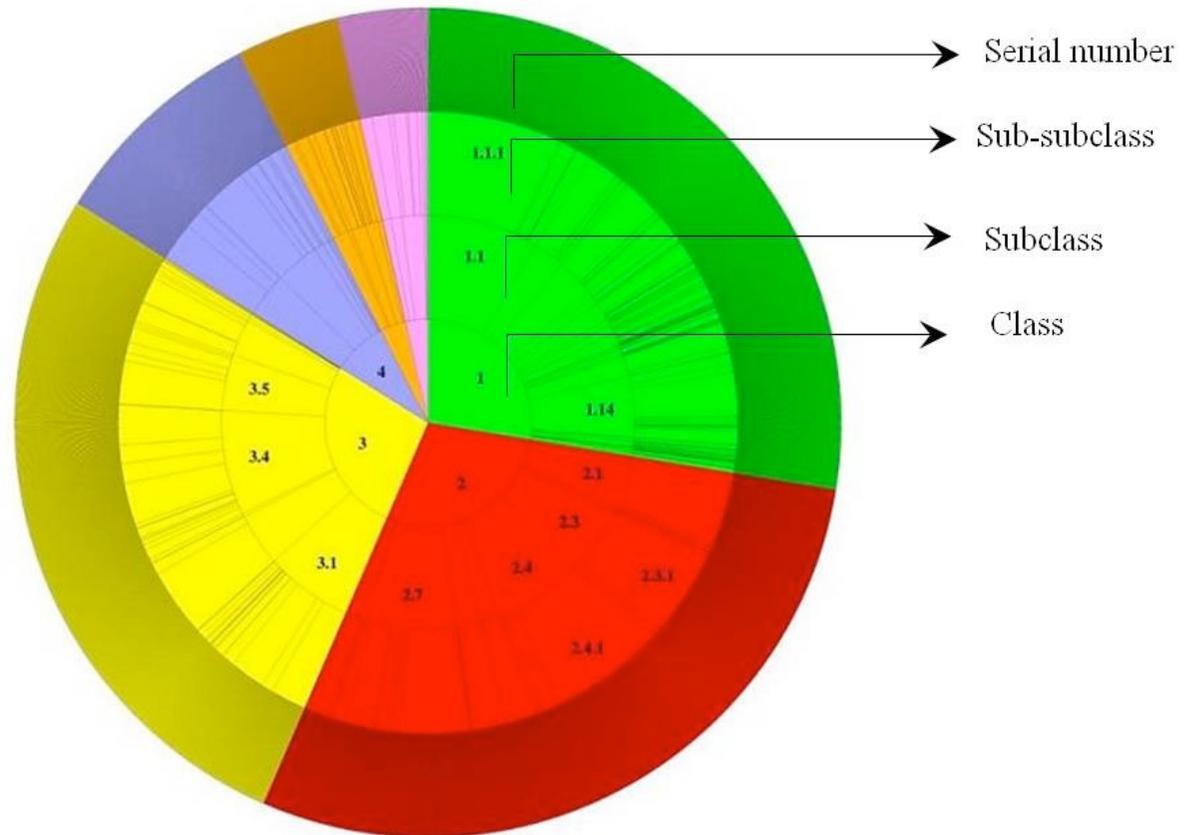
- Dégradation des plastiques
- Décontamination des sites pollués

La classification enzymatique

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>○ = Reduction equivalent</p>  <p>A_{red} + B_{ox} ⇌ A_{ox} + B_{red}</p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	 <p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C ₁ -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	 <p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	 <p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	 <p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerases <i>cis trans</i> Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	 <p>B + A + XTP ⇌ A-B + XDP + P</p> <p>X = A, G, U, C</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

Numérotation des enzymes

- 1 Oxidoreductases
- 2 Transferases
- 3 Hydrolases
- 4 Lyases
- 5 Isomerase
- 6 Ligases



Enzyme Classification (E.C.) de la Lactate Déshydrogénase (LDH):

Classe: Oxydoréductase

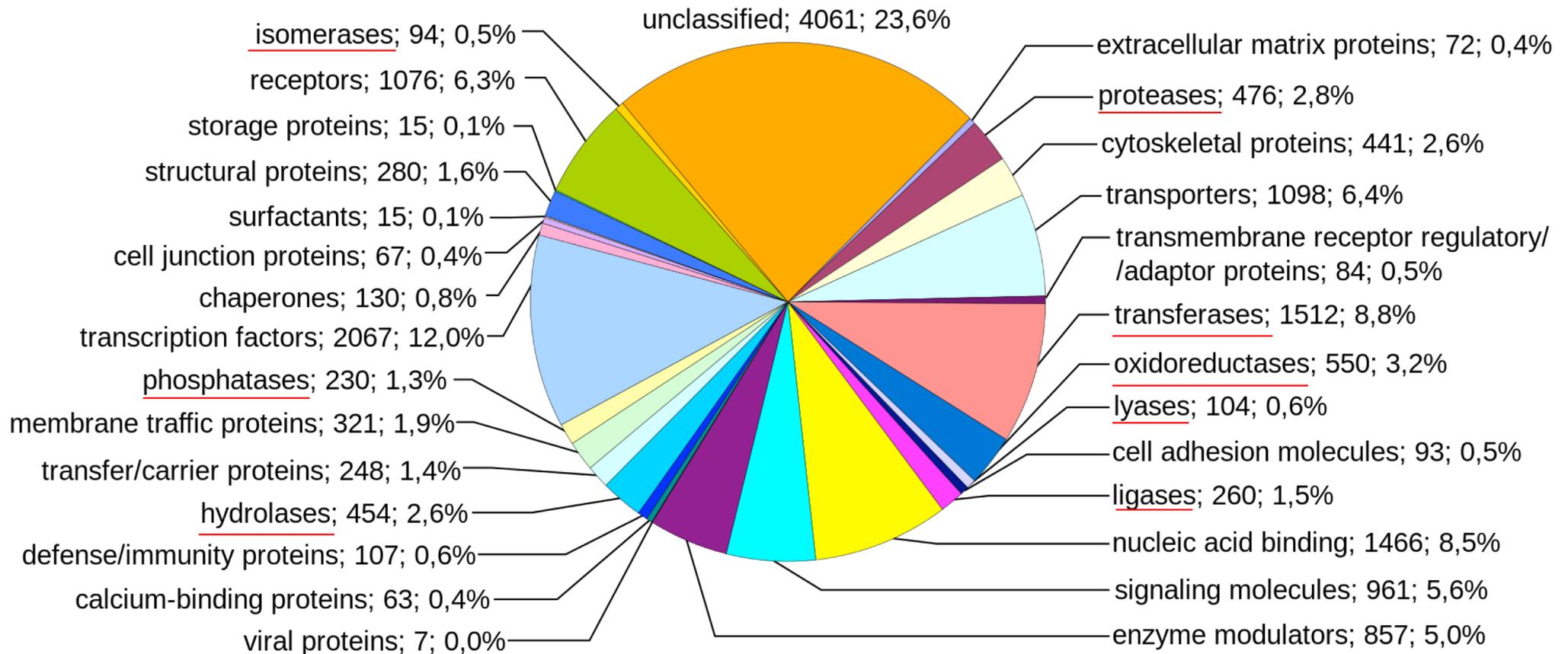
1.1.1.27

Enzyme spécifique dans
la sous-sous-classe

Sous-classe:
Agissant sur les alcools
primaires et secondaires

Sous-sous-classe:
Ayant le NAD⁺ comme
accepteur d'électron

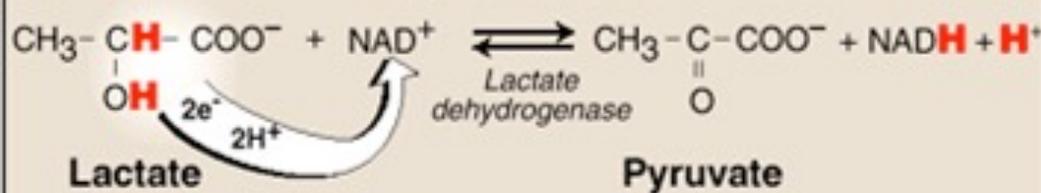
Répartition du protéome humain



Exemples de différents types de réaction

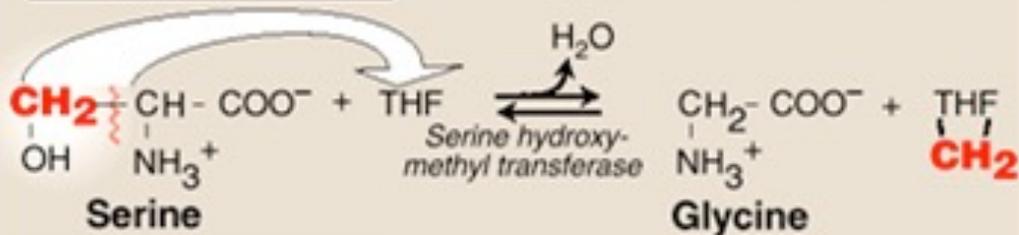
1. Oxidoreductases

Catalyze oxidation-reduction reactions, such as:



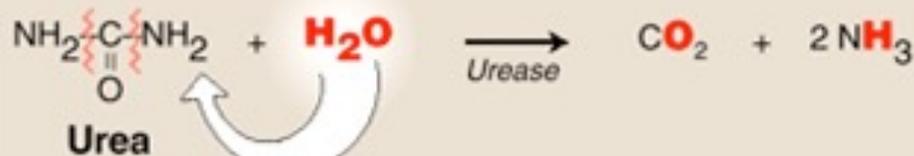
2. Transferases

Catalyze transfer of C-, N-, or P-containing groups, such as:



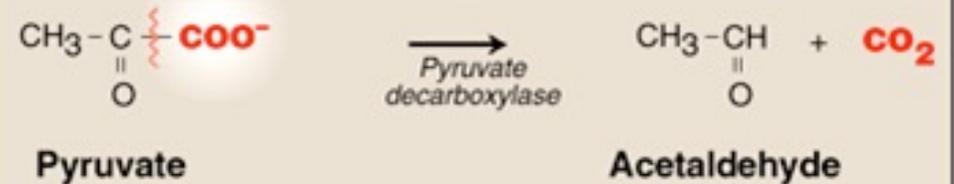
3. Hydrolases

Catalyze cleavage of bonds by addition of water, such as:



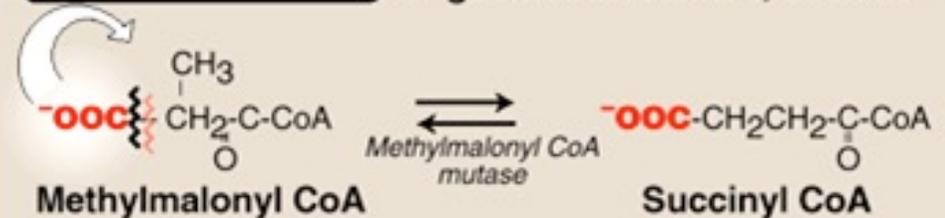
4. Lyases

Catalyze cleavage of C-C, C-O, C-S and certain C-N bonds:



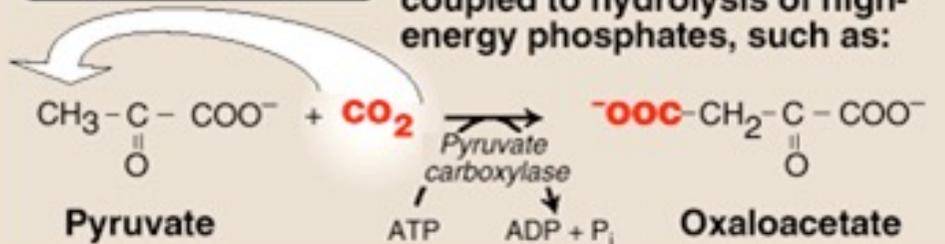
5. Isomerases

Catalyze racemization of optical or geometric isomers, such as:

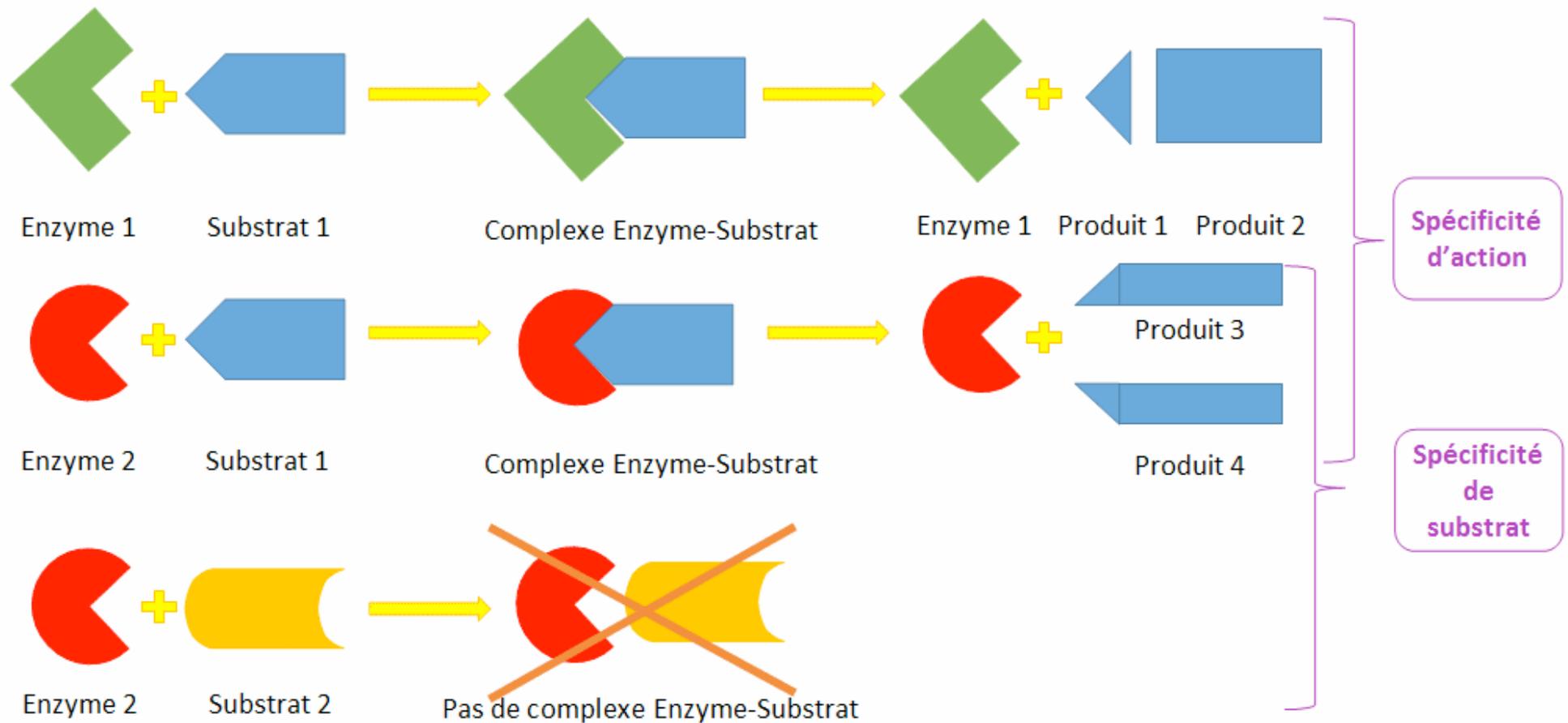


6. Ligases

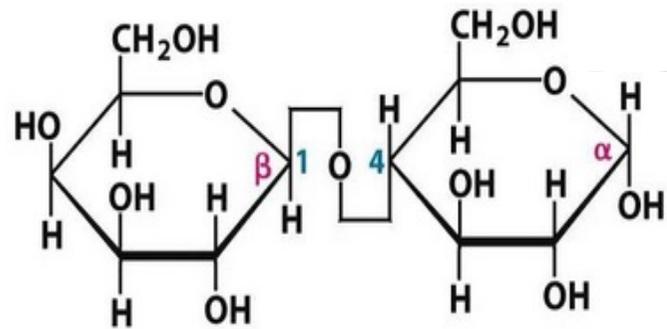
Catalyze formation of bonds between carbon and O, S, N coupled to hydrolysis of high-energy phosphates, such as:



Double spécificité des enzymes

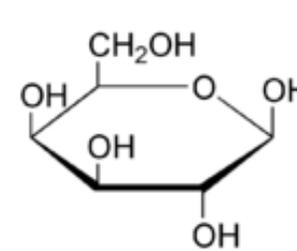


Exemple de la β -galactosidase

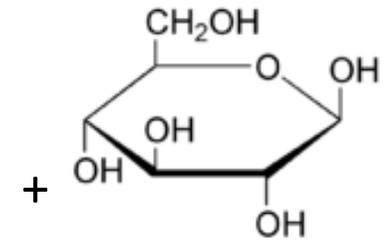


Lactose

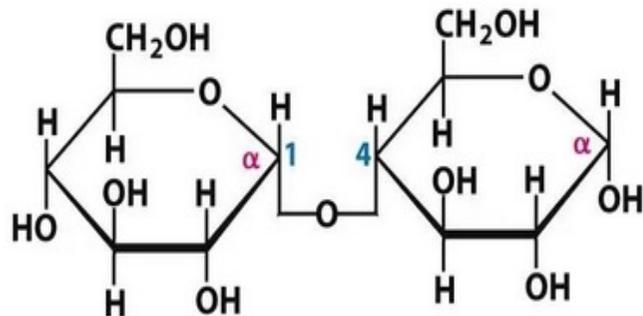
(β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranose)



D-galactose

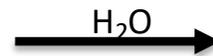


D-glucose

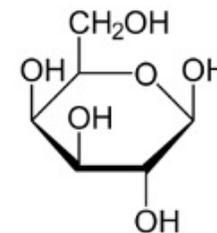
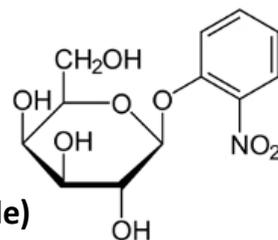


Maltose

(α -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranose)

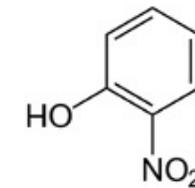


Pseudo-substrat:
orthonitrophényl- β -galactoside
(ou 2-nitrophényl- β -D-galactopyrannoside)
ONPG



D-galactose

+



Ortho-nitrophenol

Notion de site actif

La spécificité résulte de l'interaction entre enzyme et substrat dans le site actif

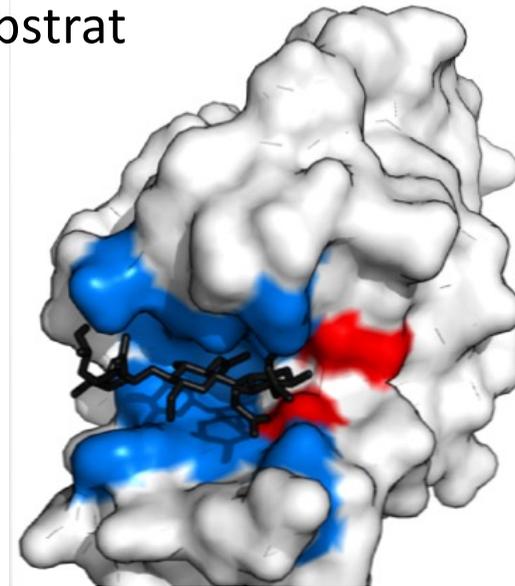
La structure de la protéine forme le site actif dans lequel se fixe le substrat

Site de fixation

Fixe et oriente

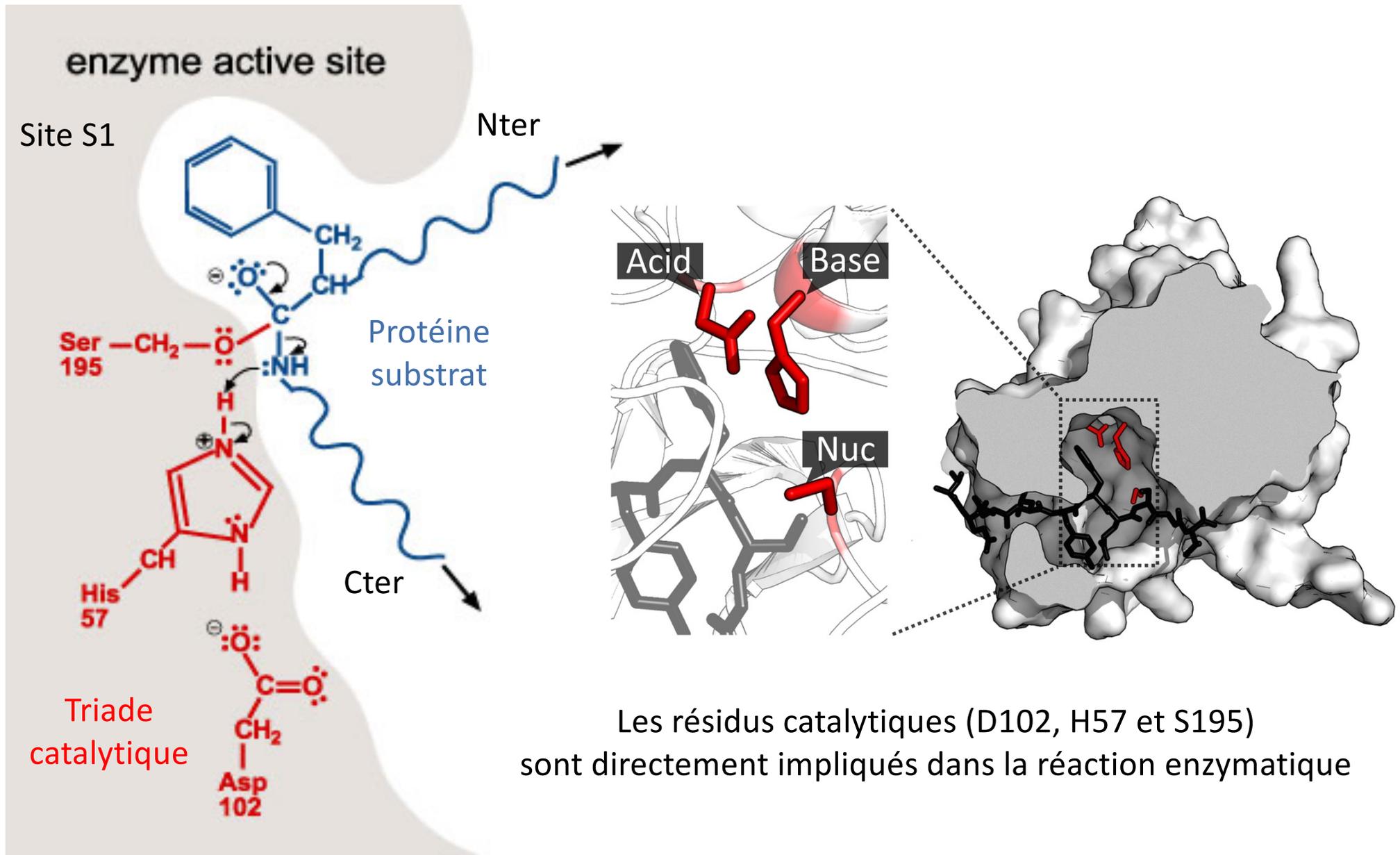
Site catalytique

Catalyse la réaction



La triade catalytique des protéases à sérine

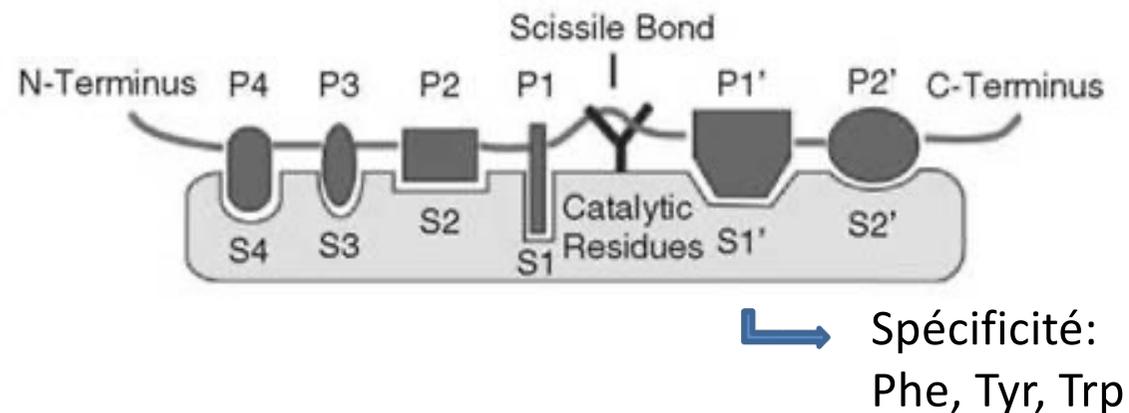
Exemple de la chymotrypsine



Spécificité des protéases à sérine

Exemple de la chymotrypsine

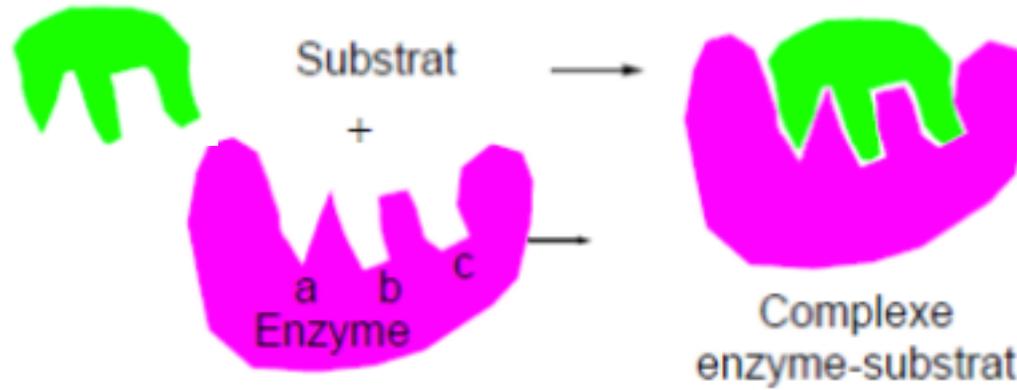
La séquence peptidique reconnue par la protéase s'étend au-delà du site de coupure



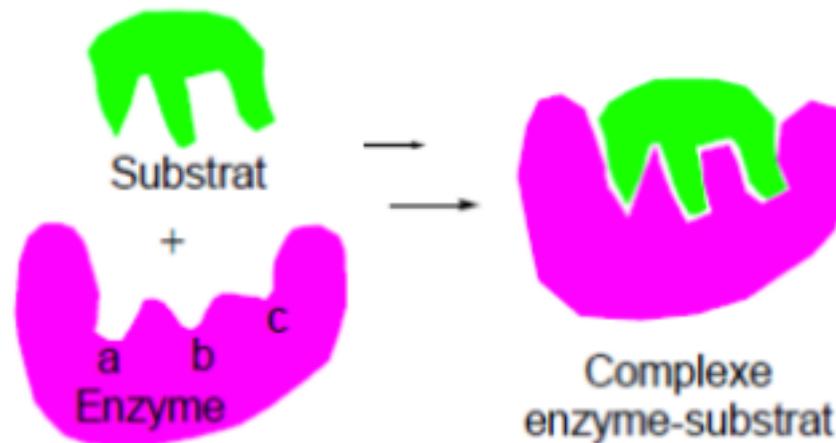
La chymotrypsine coupe la liaison peptidique en amont d'un résidu aromatique, Phe, Tyr ou Trp

2 modèles de spécificité

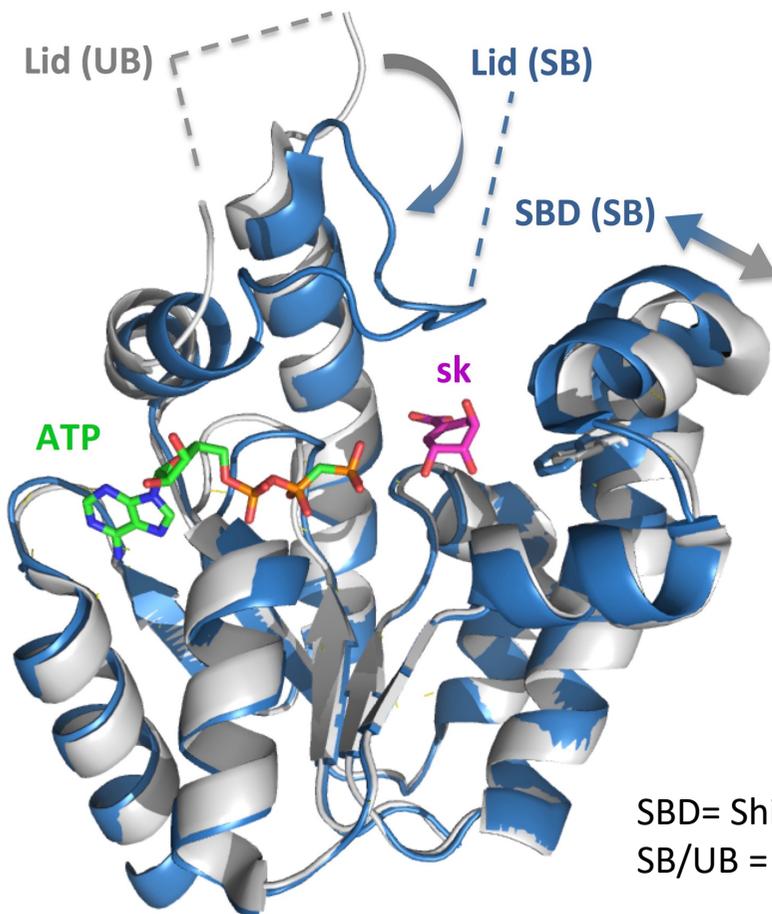
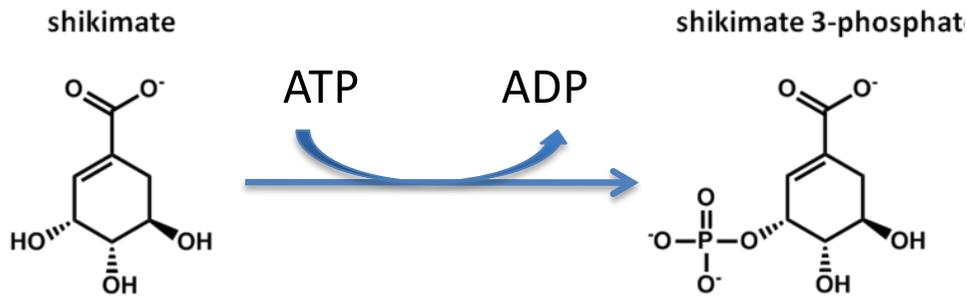
Clé-serrure: la forme du site actif est complémentaire à celle du substrat



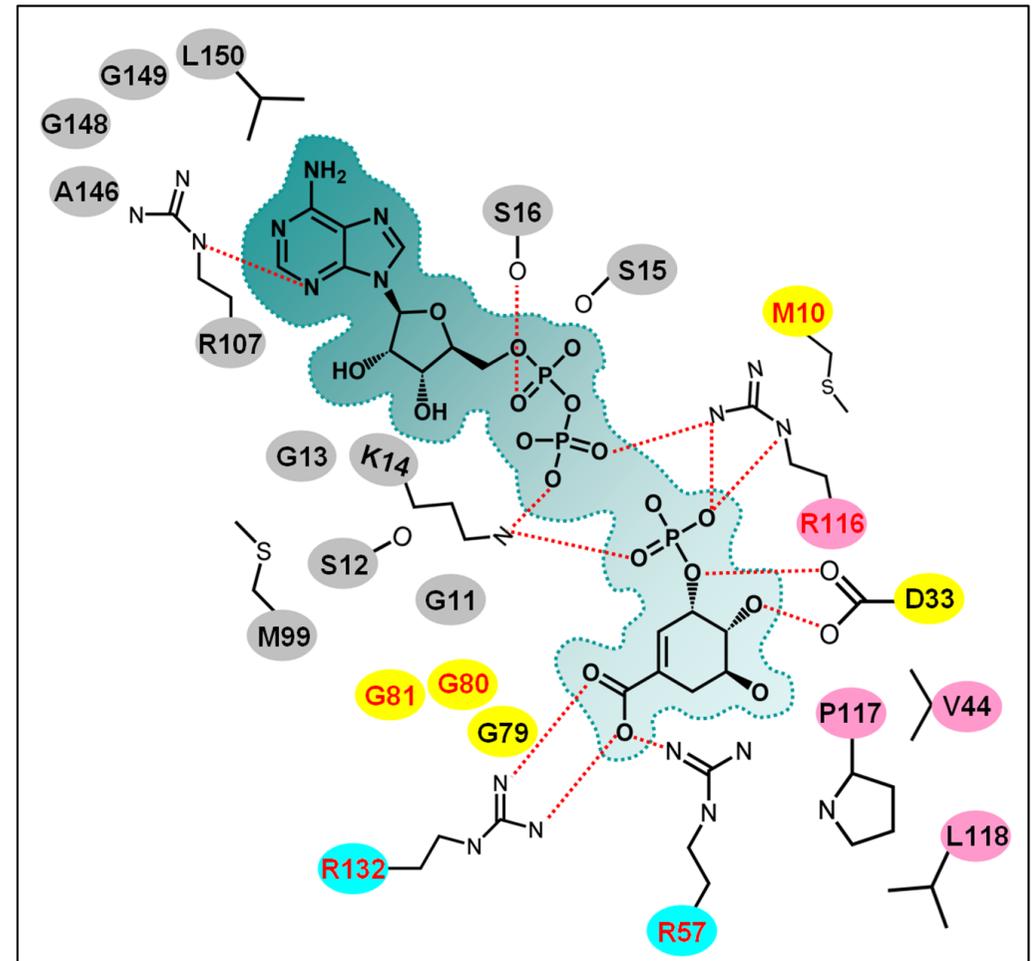
Forme induite: l'enzyme change sa conformation lors de la liaison du substrat.



Site actif de la shikimate kinase



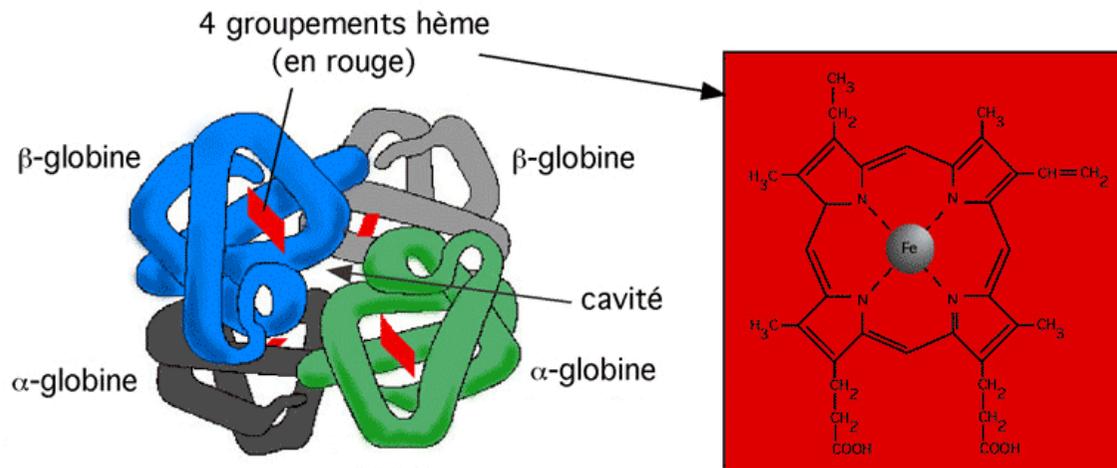
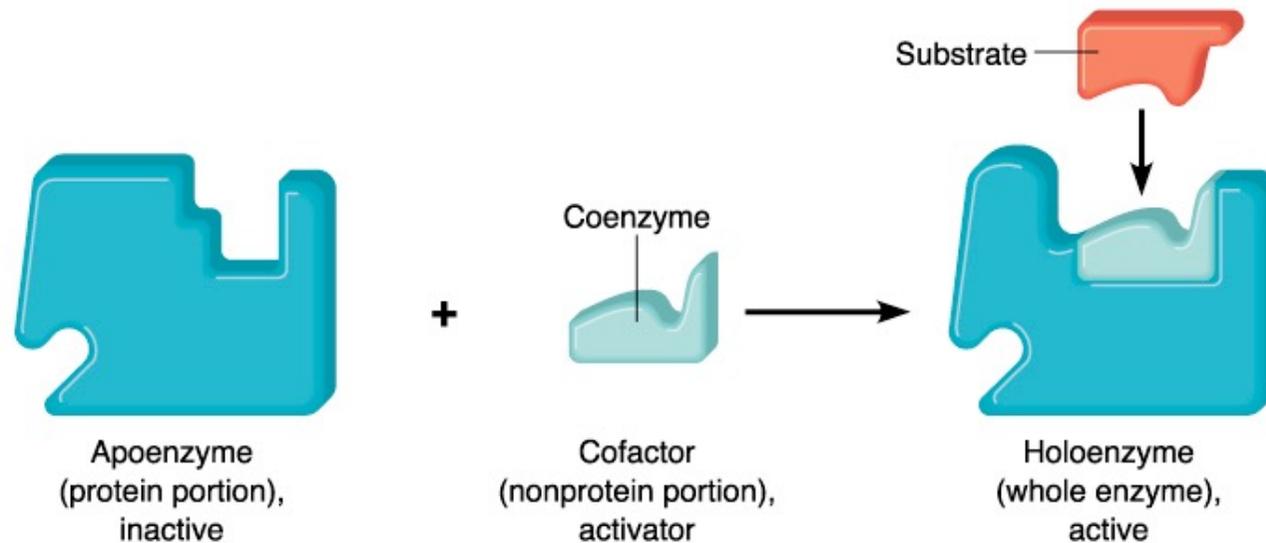
SBD= Shikimate (sk) Binding Domain
 SB/UB = Shikimate Bound/Unbound



Grey= ATP-binding residues
 Yellow= core residues
 Pink= lid residues
 Cyan= SBD residues

Les co-enzymes

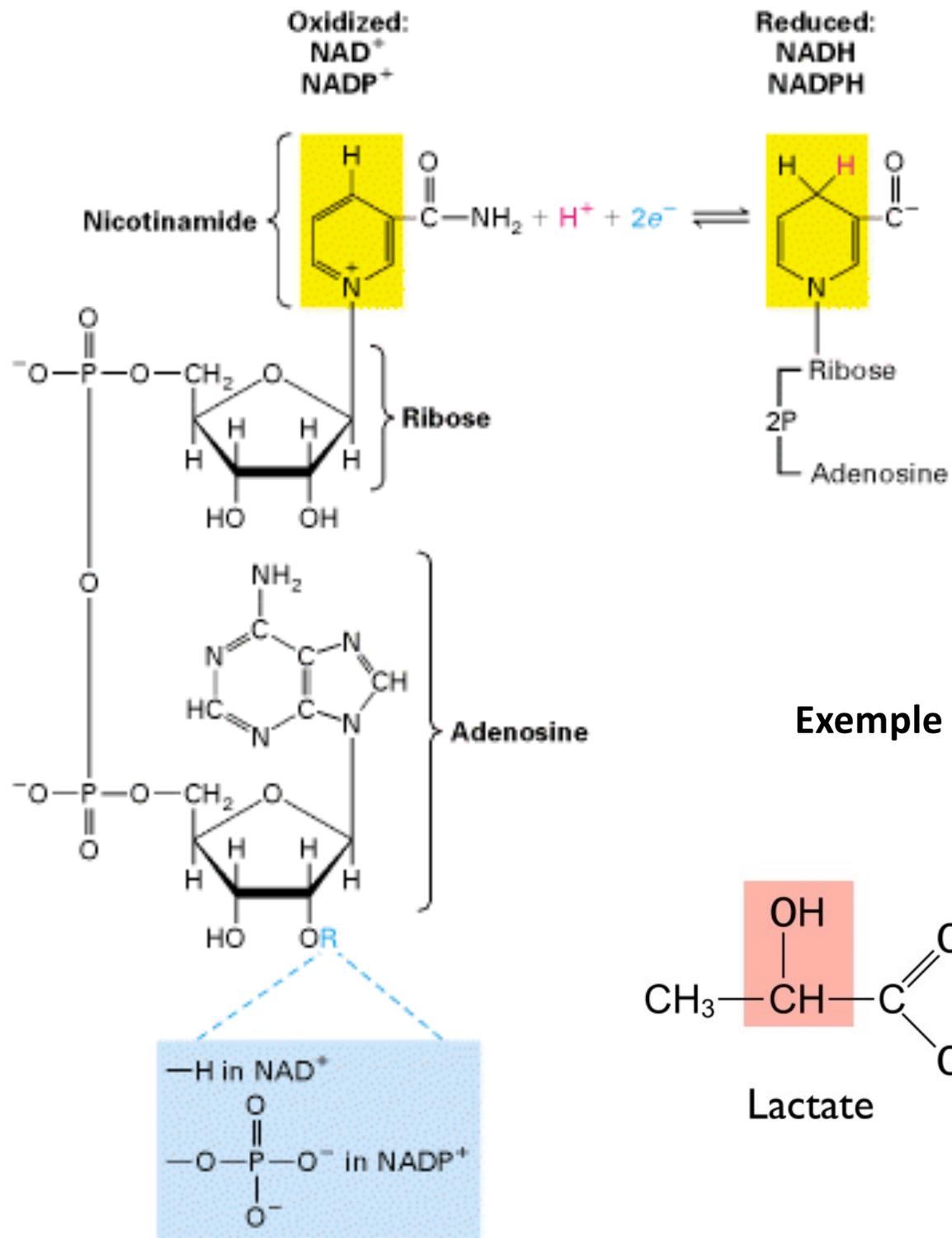
Les **coenzymes** se dissocient facilement de l'apoenzyme, et ne retrouvent leur état initial que lors d'une seconde réaction (ex: NAD(P) et coenzyme-A).



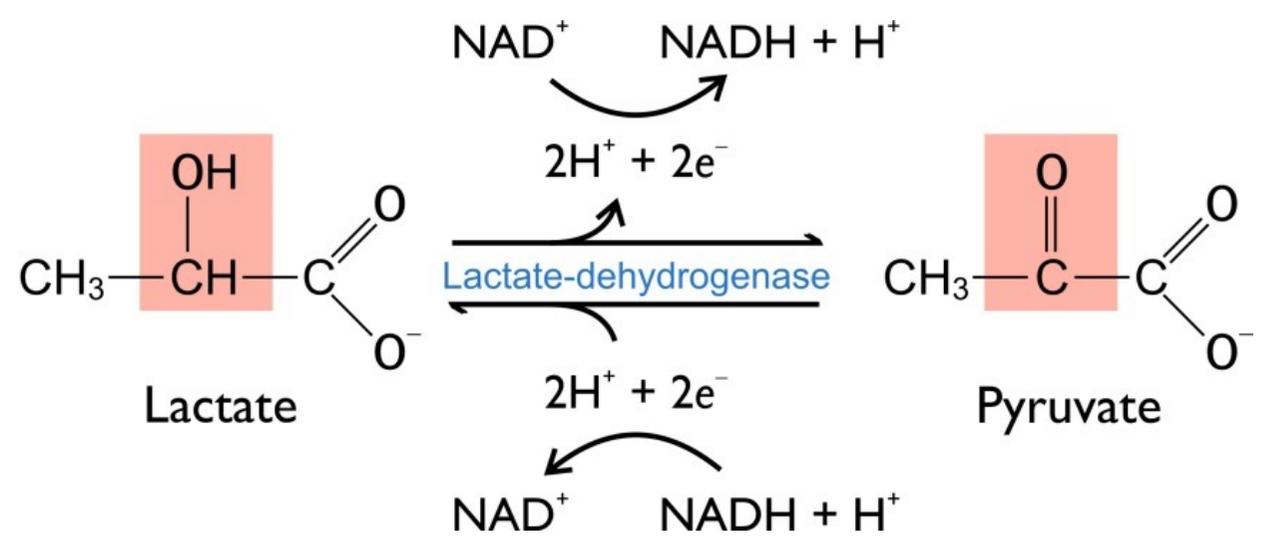
D'après Russell, P.J. (1996) Genetics, Harper Collins, New York

On distingue un second type de cofacteurs, les **groupes prosthétiques**, qui sont fortement liés à l'apoenzyme (ex: l'hème de la globine). Ils ne se détachent pas de l'apoenzyme au cours de la réaction. Leur état initial est restauré au cours de la réaction.

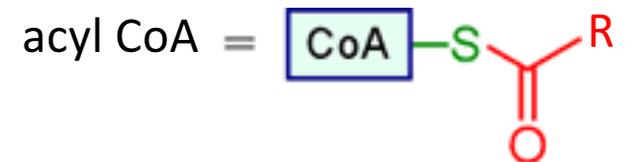
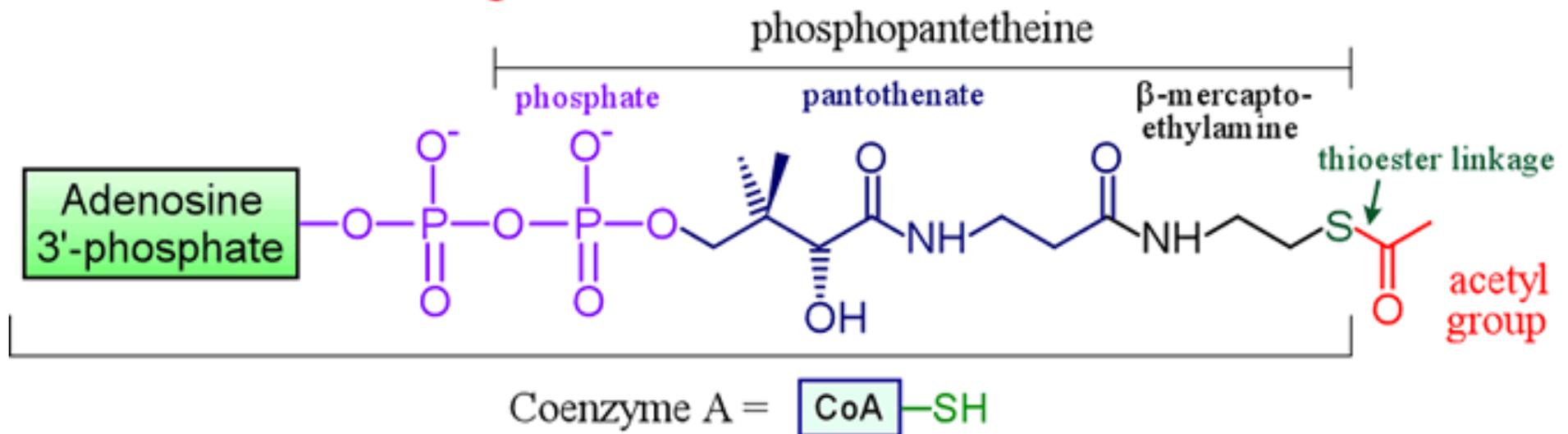
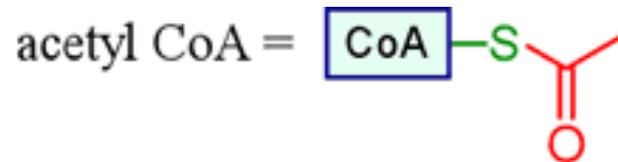
Le NAD(P) Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)



Exemple de la Lactate Déshydrogénase (LDH)



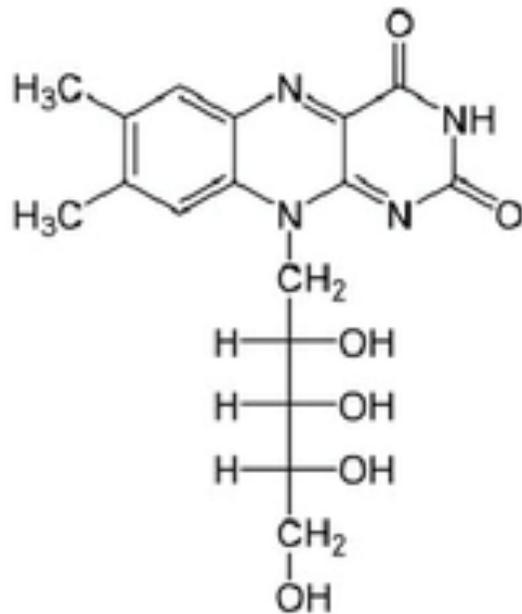
Le Coenzyme A (CoA)



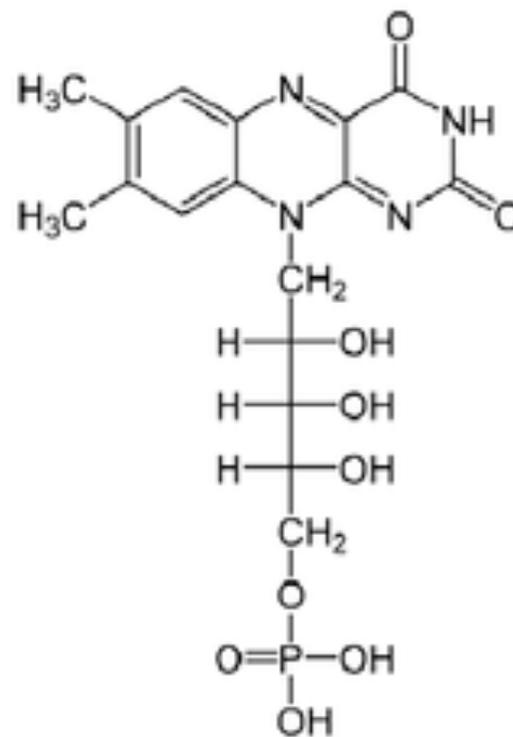
Dérivés de la riboflavine: FMN et FAD

(Vitamine B12)

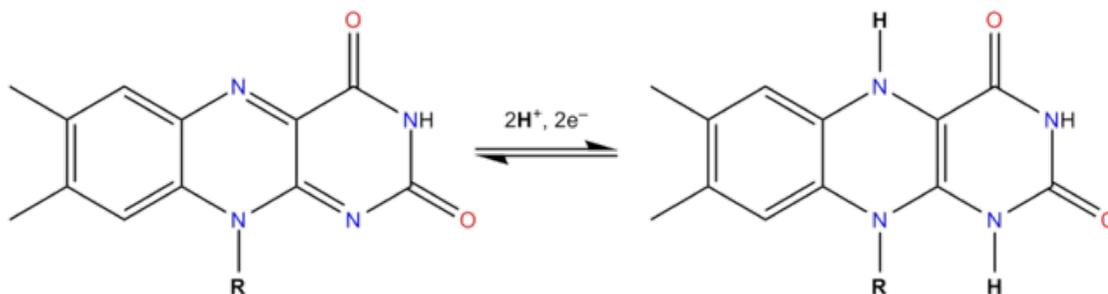
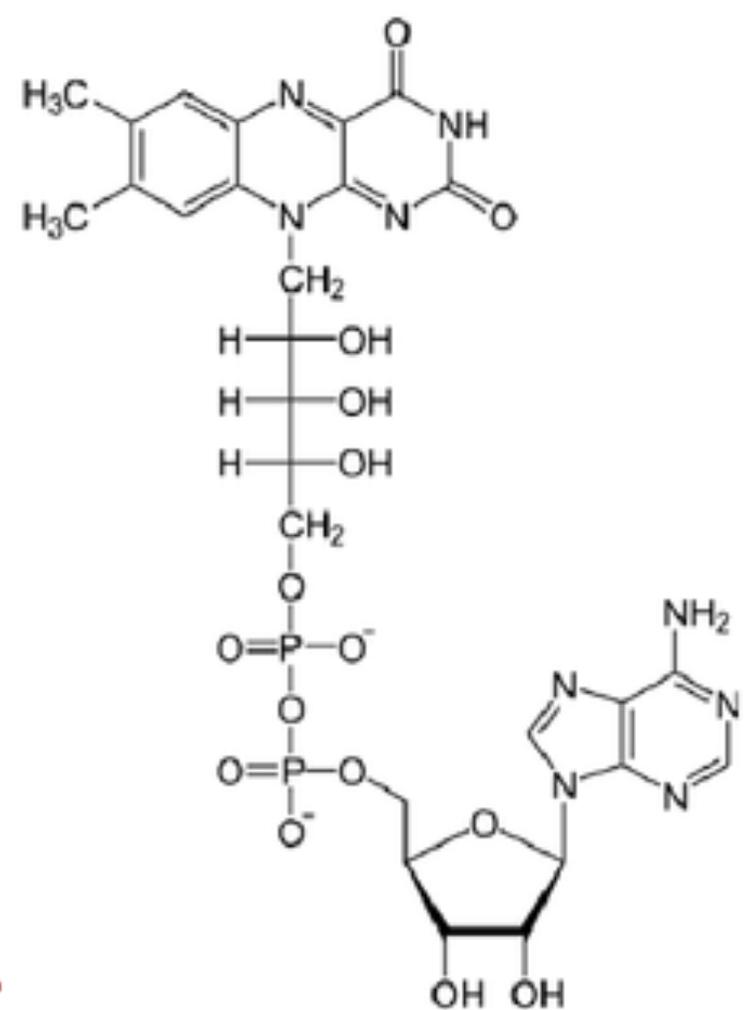
Riboflavin



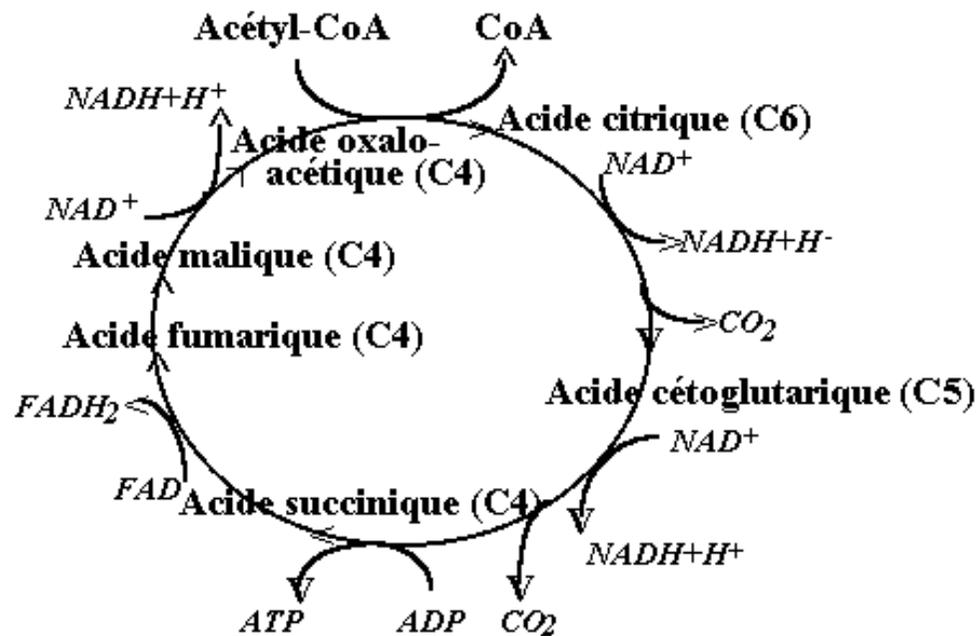
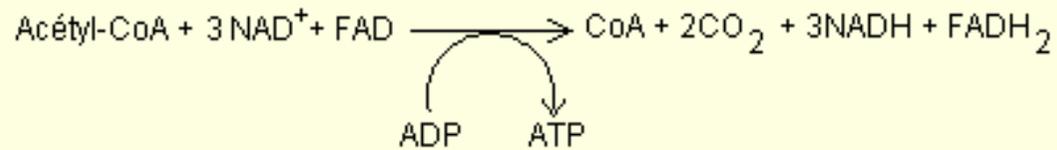
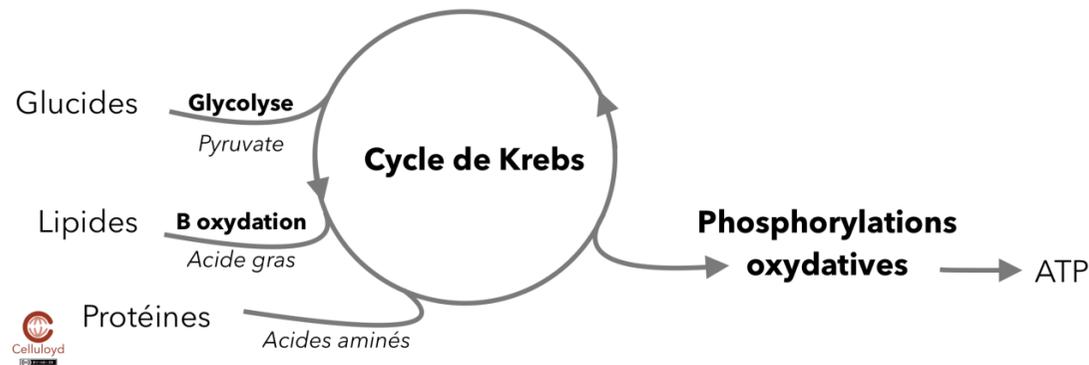
Flavin mononucleotide (FMN)



Flavin adenine dinucleotide (FAD)



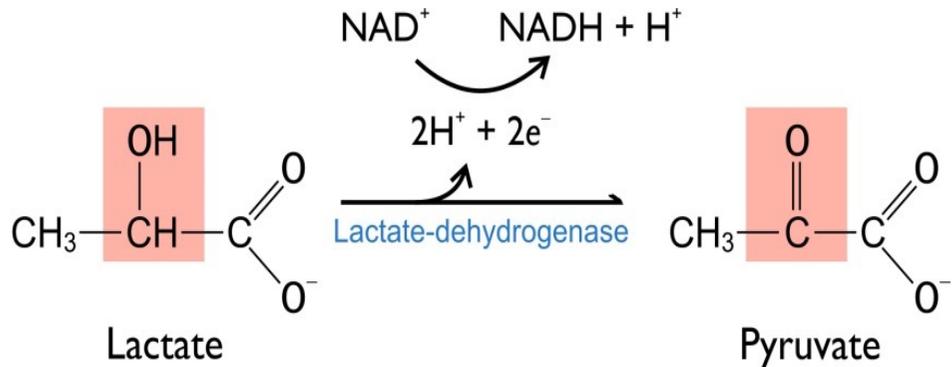
Cycle de Krebs et co-enzymes



Tests enzymatiques

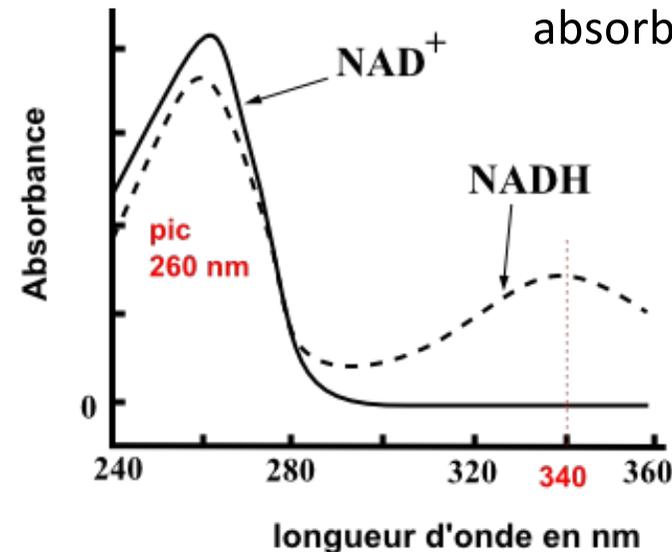
Mesure spectrophotométrique directe

Exemple de réactions faisant intervenir le NADH

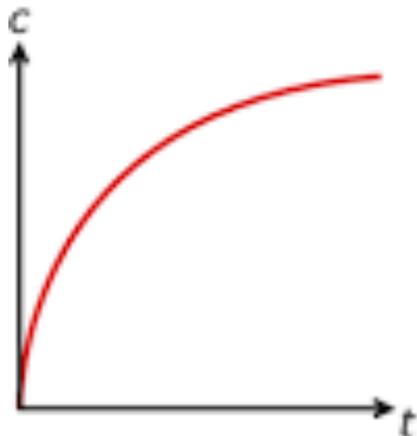


Le NAD⁺ et le NADH absorbent à 260 nm

mais seul le NADH absorbe à 340 nm



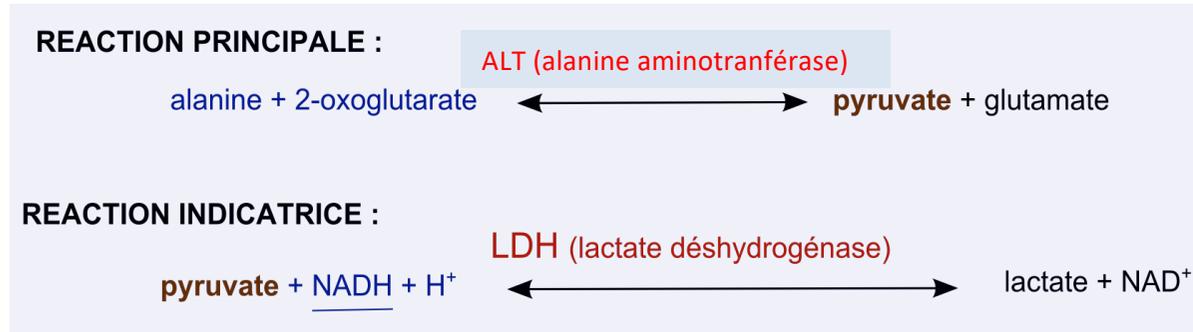
(Loi de Beer Lambert)
 $Abs(340\text{nm}) = \epsilon \cdot L \cdot [NADH]$



Le signal permet de suivre la cinétique enzymatique

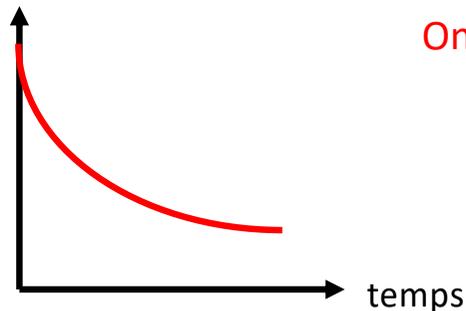
Mesure spectrophotométrique indirecte

Exemple: Test couplé à la LDH



On se place dans des conditions telles que la réaction principale soit limitante, avec [LDH] >> [ALT]

Abs(340) = $\epsilon \cdot l \cdot [\text{NADH}]$

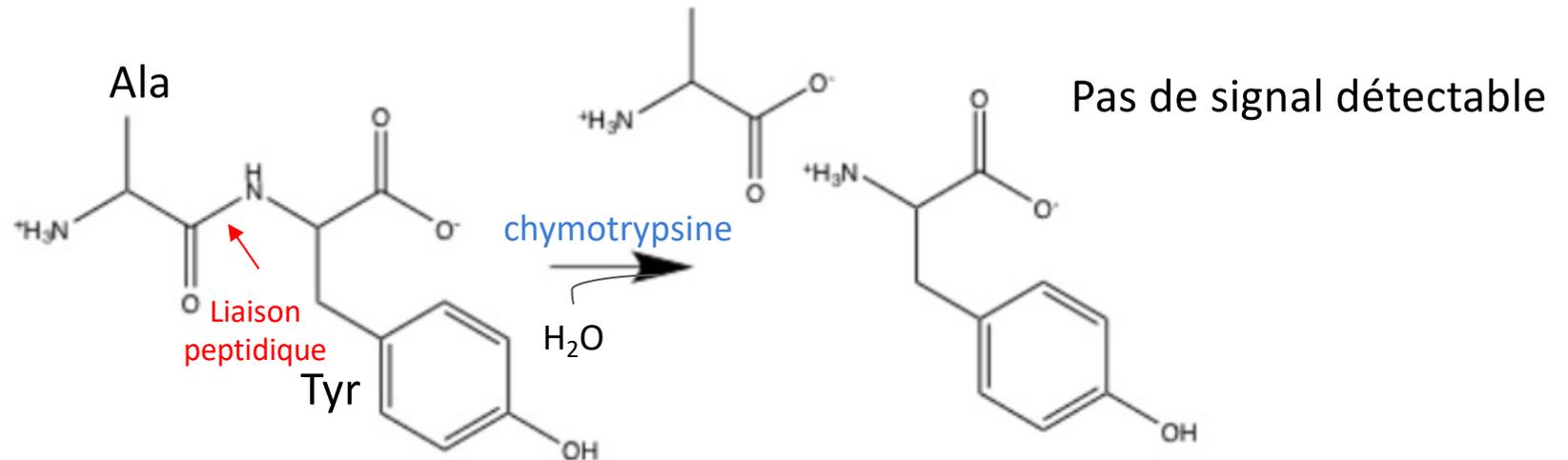


Commentaire:
On incube les 2 enzymes avec les substrats/co-enzymes indiqués en bleu mais c'est bien le pyruvate produit par la réaction principale qui est utilisé par la réaction indicatrice et on suit la cinétique de disparition du NADH à 340nm

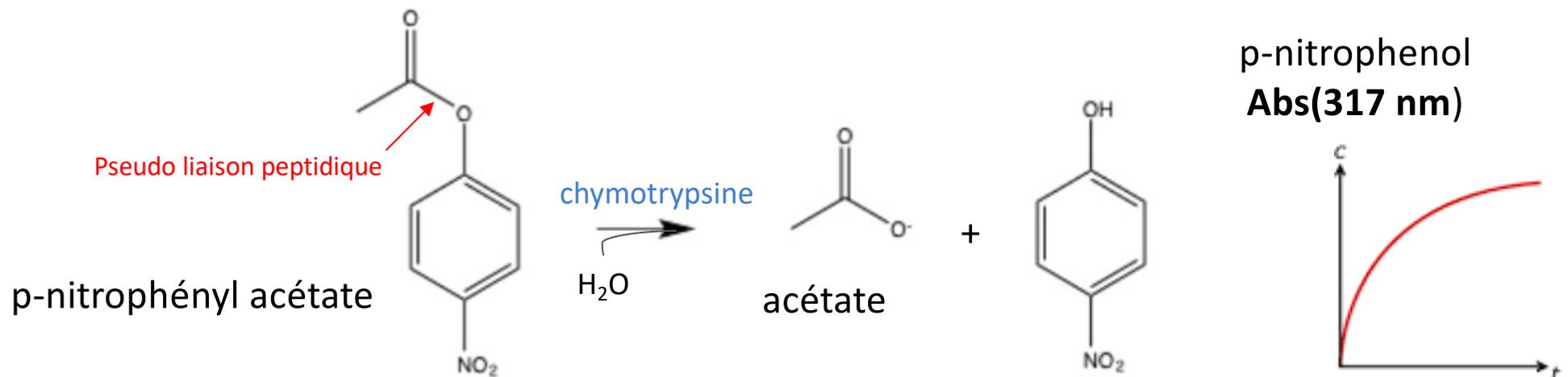
Utilisation d'un pseudo-substrat

Exemple de la chymotrypsine (protéase)

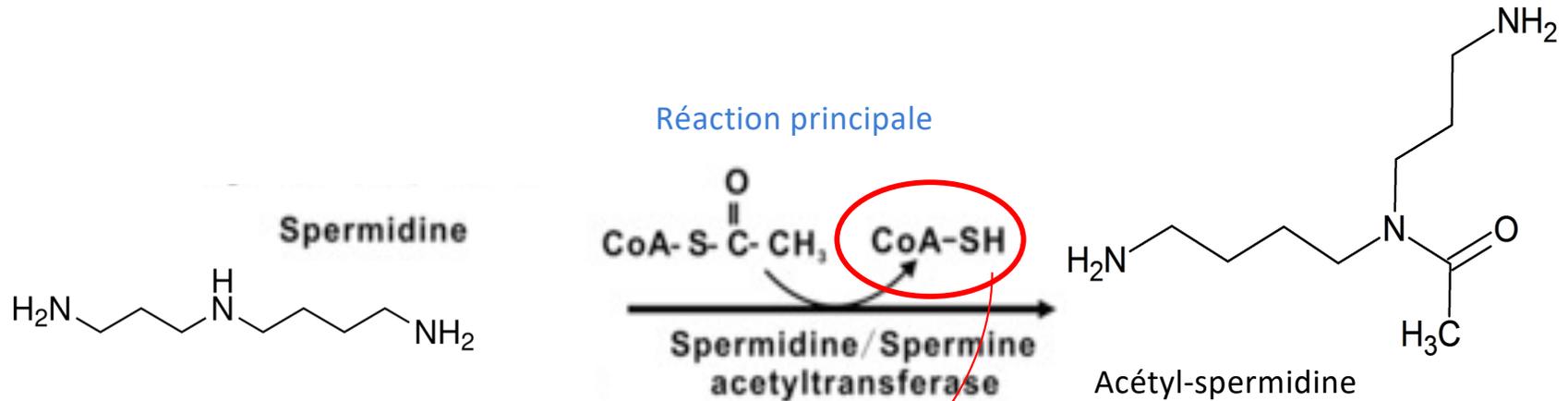
Réaction naturelle: hydrolyse de liaison peptidique



Réaction avec pseudo-substrat ayant des propriétés spectroscopiques intéressantes:



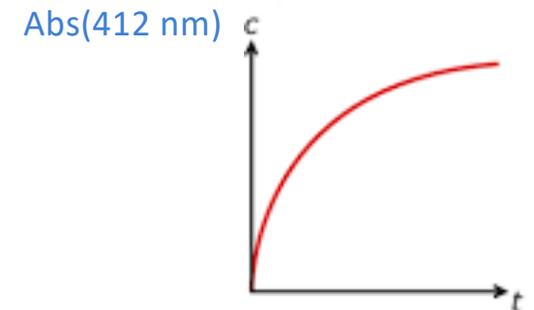
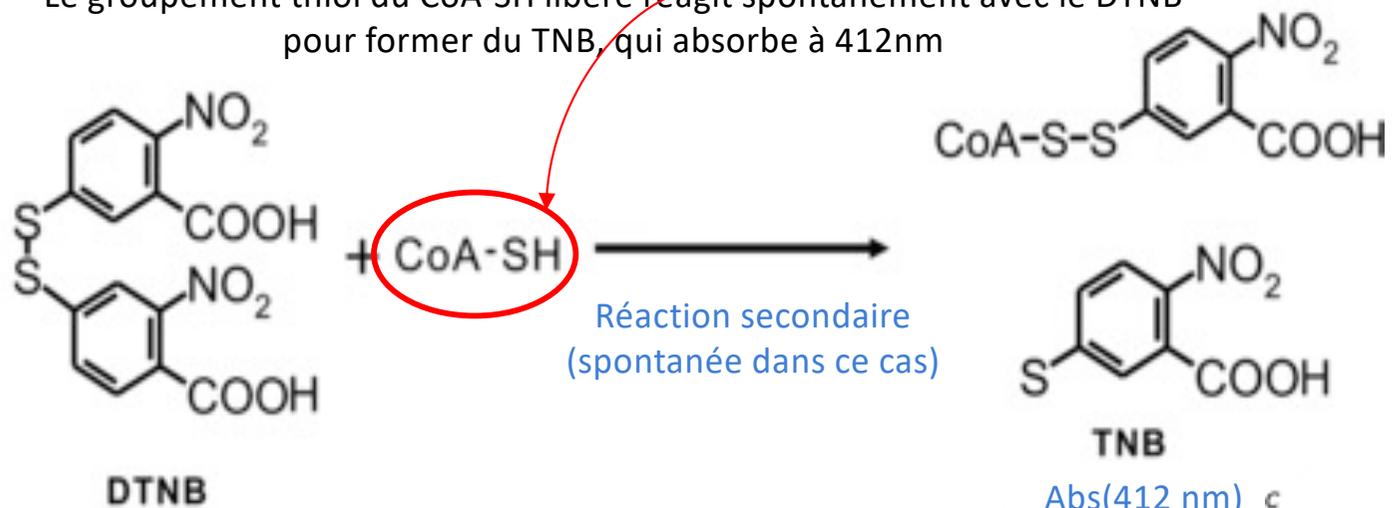
Test enzymatique couplé au DTNB



Commentaire:

On mélange l'enzyme avec son substrat (la spermidine) et le DTNB qui, à chaque cycle enzymatique, va réagir avec le CoA-SH et libérer du TNB dont on suit la cinétique d'apparition à 412nm

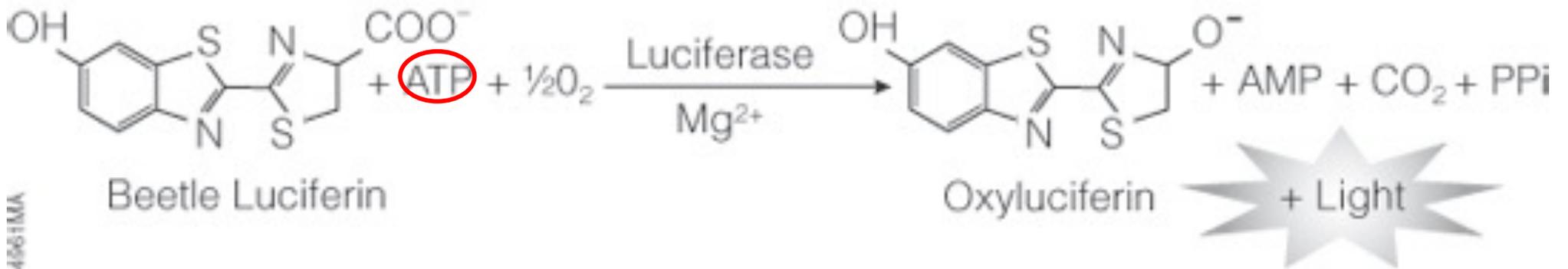
Le groupement thiol du CoA-SH libéré réagit spontanément avec le DTNB pour former du TNB, qui absorbe à 412nm



Test enzymatique couplé à la luciférase



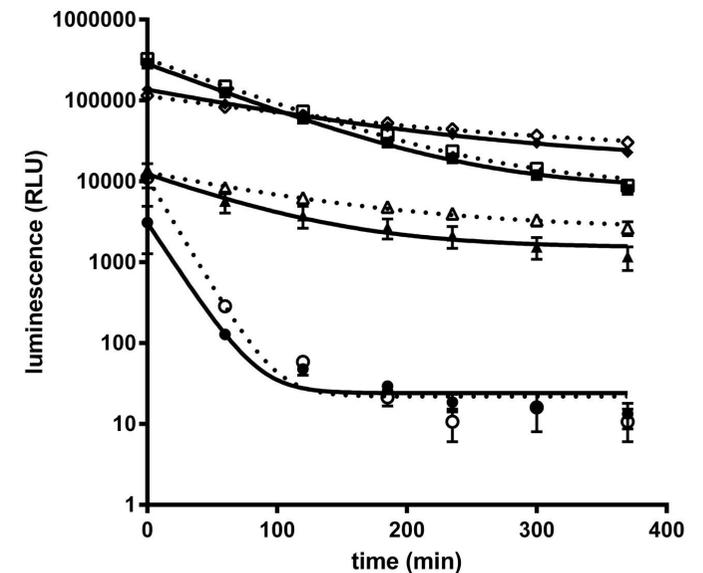
Mesure d'activité kinase



4561MA

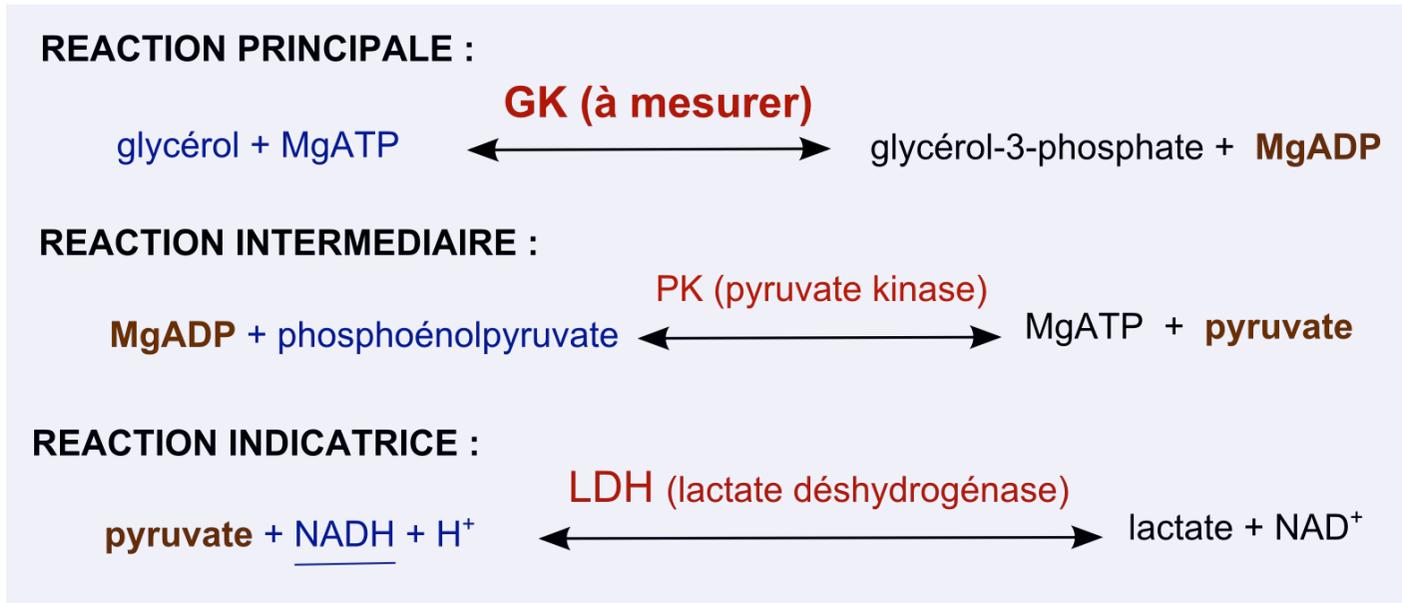
Détection par luminescence:

L'activité kinase (ou ATPase) consomme de l'ATP, entraînant une baisse de luminescence



Test enzymatique couplé à 2 réactions

Ex: glycérol-kinase (GK)



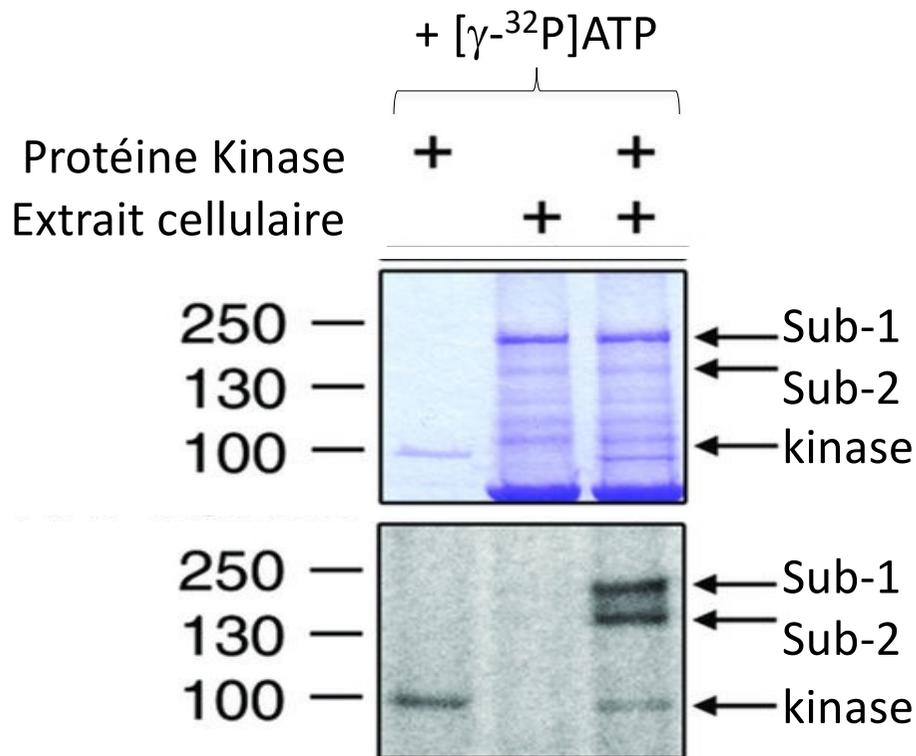
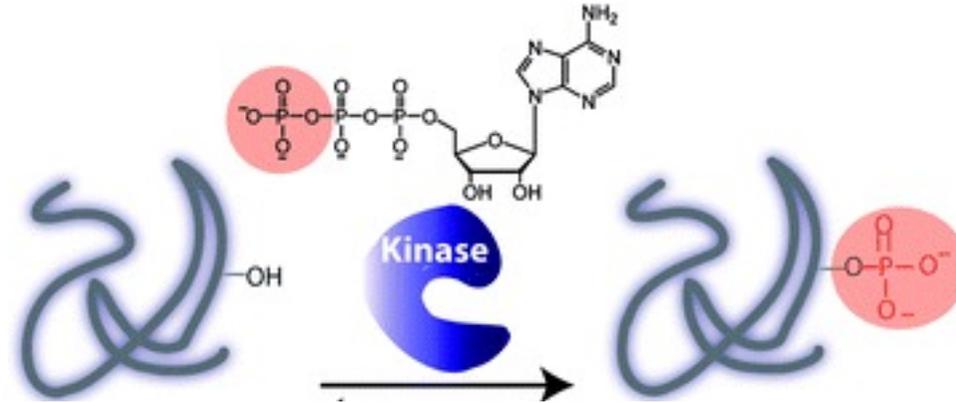
On incube les 3 enzymes avec les substrats indiqués en bleu mais c'est bien l'ADP-Mg produit par la réaction principale qui est utilisé par la réaction intermédiaire qui fournit à son tour le pyruvate nécessaire à la réaction indicatrice et on suit la cinétique de disparition du NADH à 340nm

En utilisant suffisamment d'activité pyruvate kinase (PK) et Lactate déshydrogénase (LDH), la vitesse de la réaction intermédiaire et de la réaction indicatrice sera limitée par la vitesse initiale de la réaction principale (celle qu'on veut mesurer). Après une phase pré-stationnaire (de courte durée), on aura un état stationnaire pour lequel

$$V_{i\text{-principale}} = V_{i\text{intermédiaire}} = V_{i\text{indicatrice}}$$

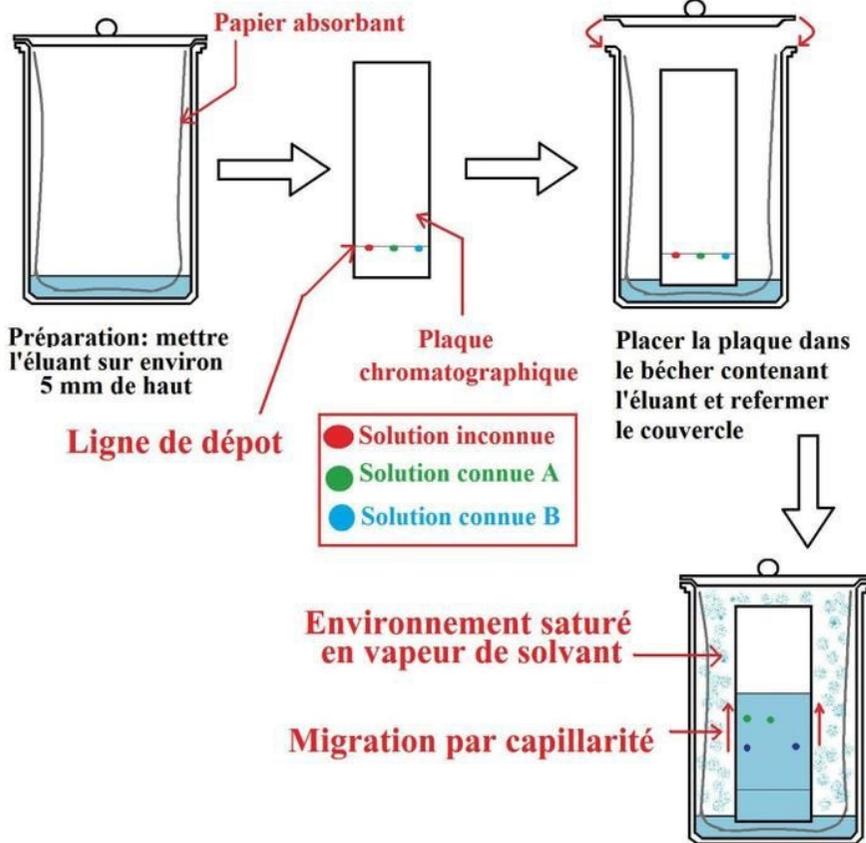
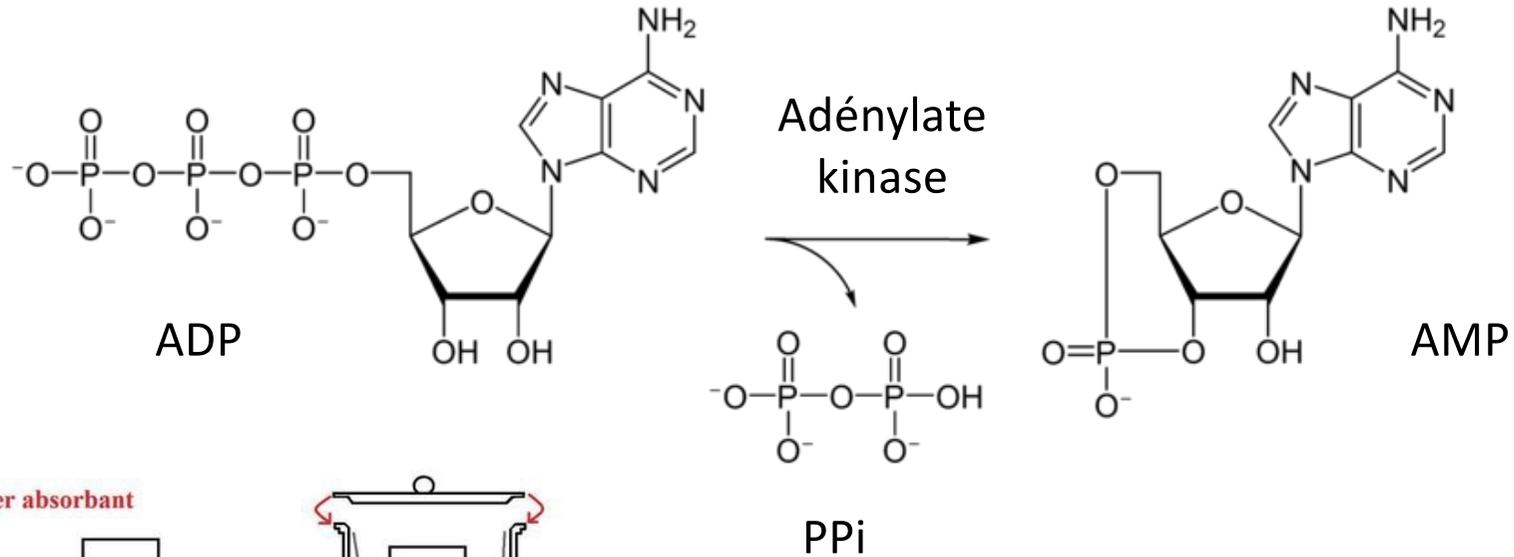
Test enzymatique par marquage radioactif

Ex: Protéine kinase: phosphorylation ATP-dépendante de Ser, Thr ou Tyr



1. Incubation des échantillons
2. Dénaturation pour analyse SDS-PAGE
3. Electrophorèse
4. Coloration au bleu de Coomassie
5. **Autoradiogramme**

Test en chromatographie couche mince



Marquage radioactif du substrat
→ autoradiogramme

