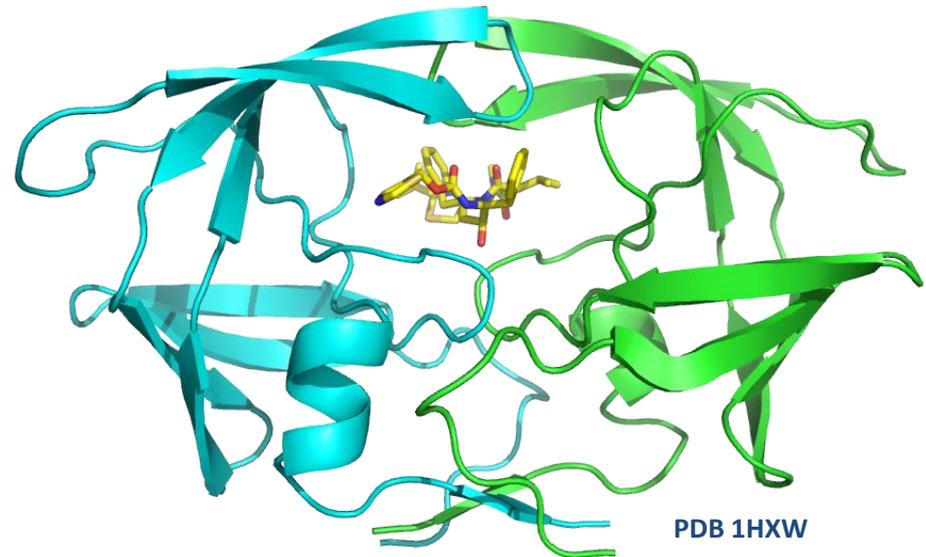


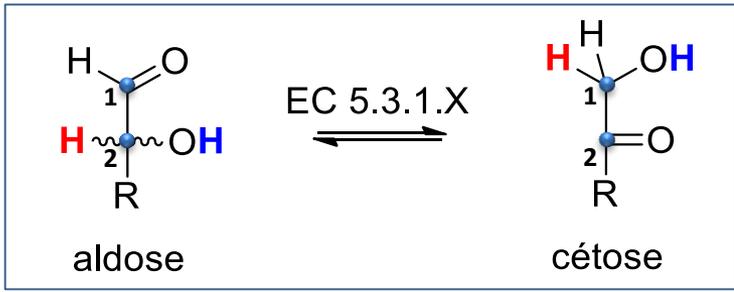
3. Mécanismes enzymatiques sans coenzymes (cofacteurs)

- a) Aldose-cétose isomérases
- b) Aldolases et transaldolases
- c) Glycosidases et glycosyltransférases
- d) Décarboxylases
- e) Hydrolases
 - Protéases →
 - Estérases
 - Lipases
 - Epoxyde-hydrolases
 - Autres...



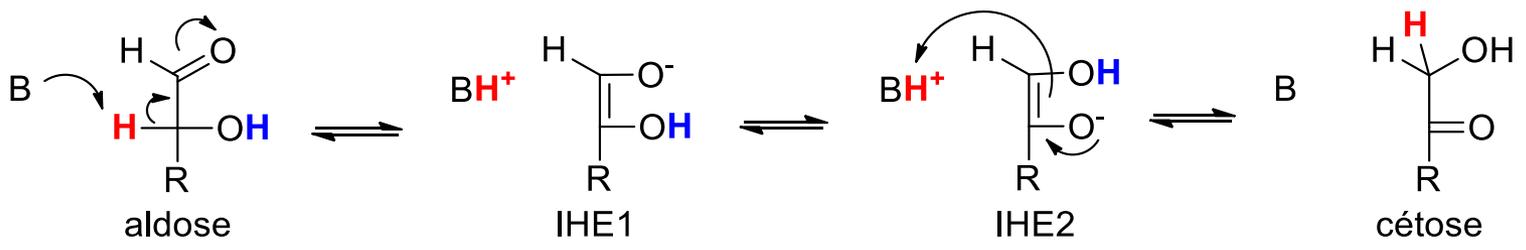
3. Mécanismes enzymatiques sans coenzymes (cofacteurs)

a) aldose-cétose isomérase (ou comment transférer un hydrogène...)



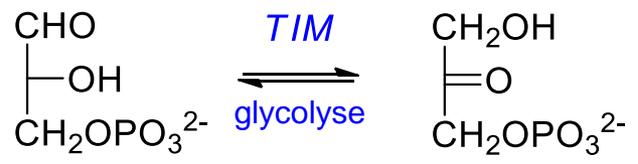
➤ Deux mécanismes possibles *a priori*:

i. par transfert de proton :



- Triosephosphate isomérase (TIM)
- Phosphoglucose isomérase (PGI)
- Phosphomannose isomérase (PMI)
- Phosphoribose isomérase (PRI)...

} Mécanismes : cf. partie « Inhibiteurs »

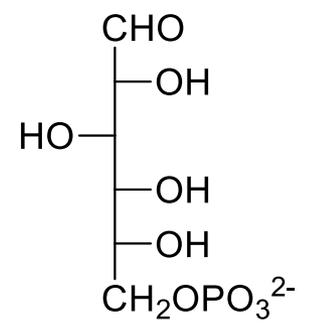


G3P

D-glyceraldehyde
3-phosphate

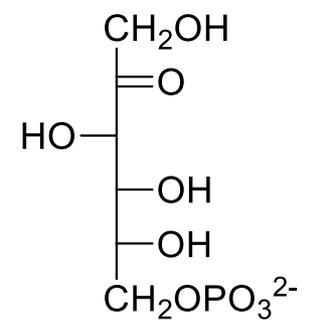
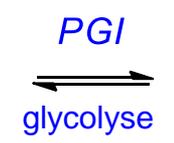
DHAP

dihydroxyacetone
phosphate



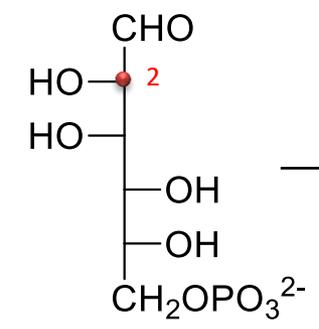
G6P

D-glucose 6-phosphate



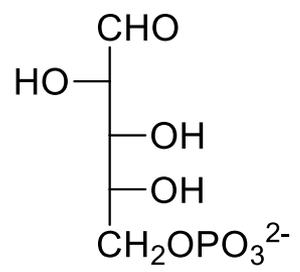
F6P

D-fructose 6-phosphate



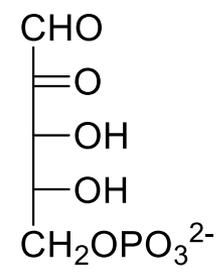
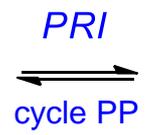
M6P

D-mannose 6-phosphate



R5P

D-ribose 5-phosphate



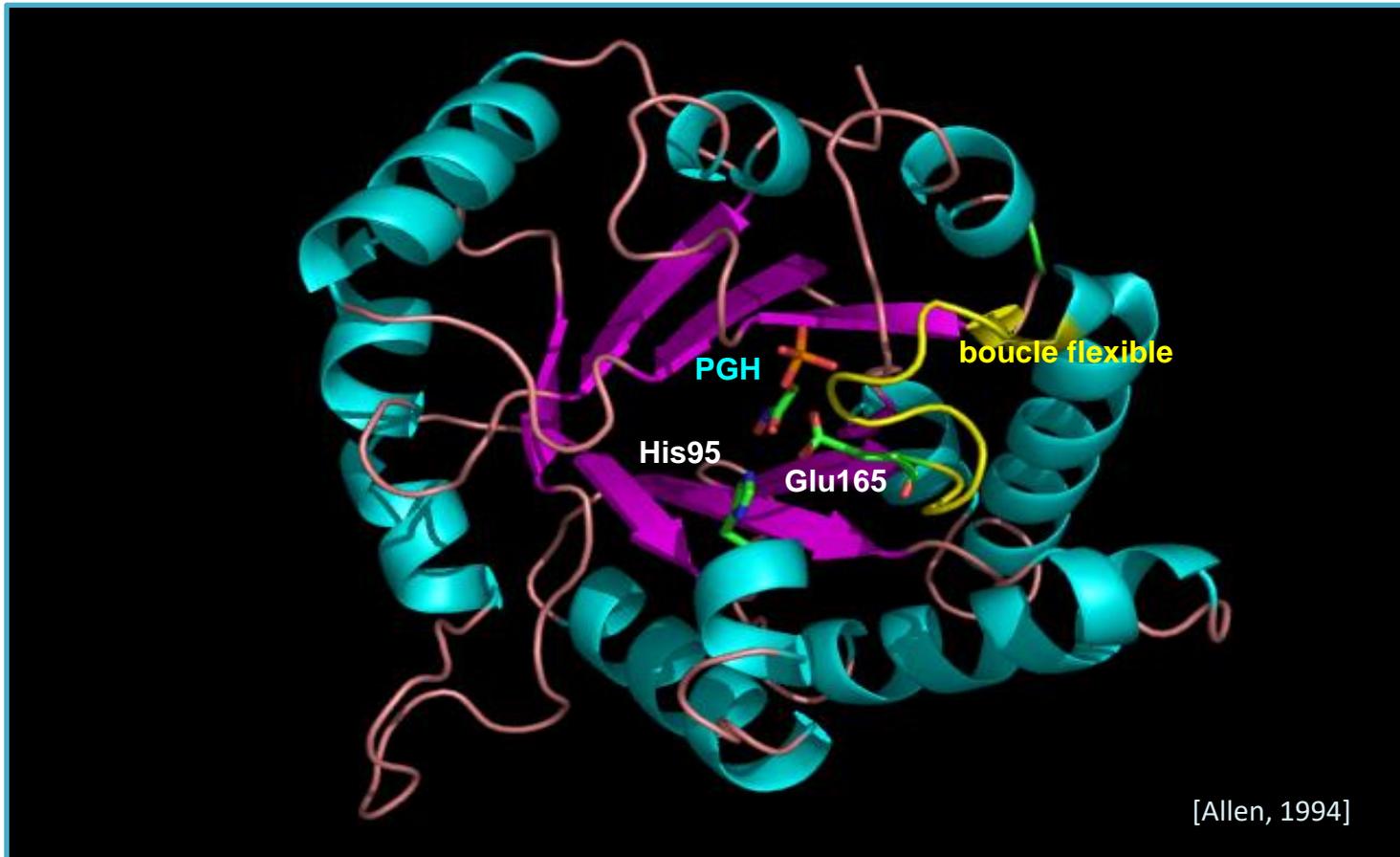
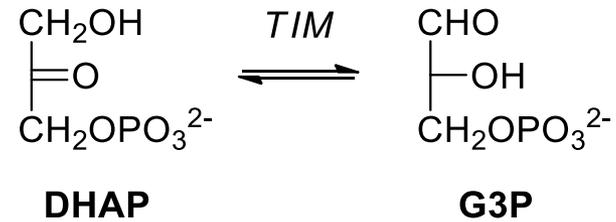
Ru5P

D-ribulose 5-phosphate

La triosephosphate isomérase (TIM)

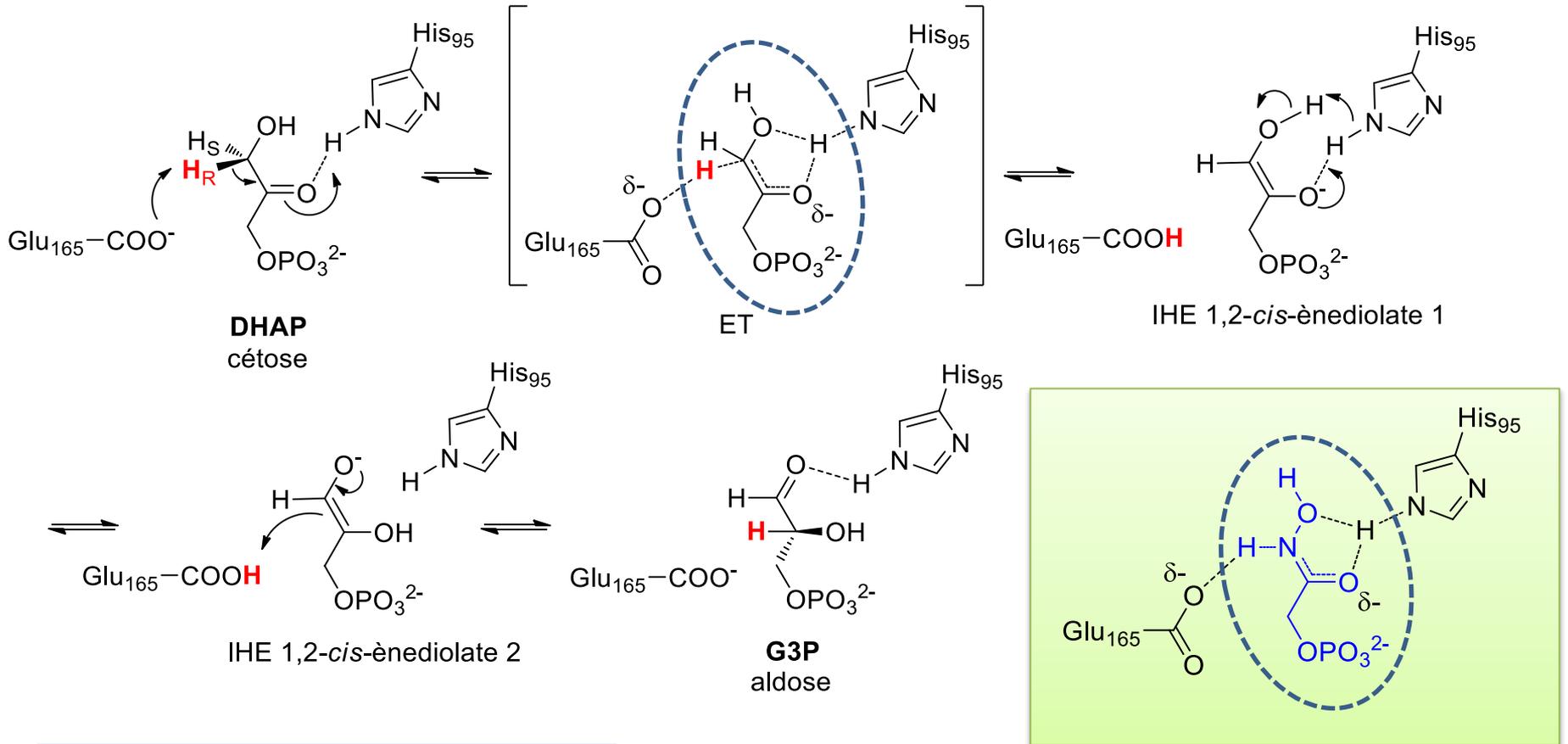
✓ présentation

- Enzyme non-métallée (glycolyse)
- Structure quaternaire dimérique
- Monomère : tonneau ($\alpha\beta$)₈



La triosephosphate isomérase (TIM)

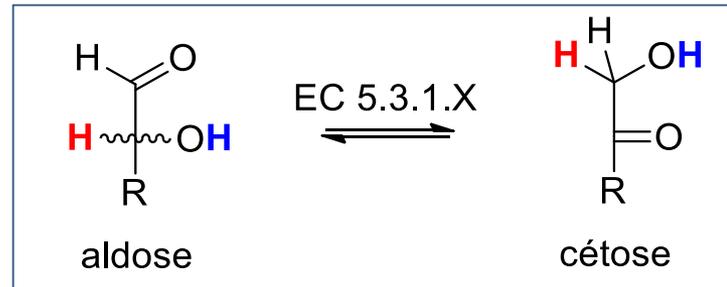
✓ mécanisme



DHAP : dihydroxyacétone phosphate
G3P : D-glycéraldéhyde 3-phosphate
PGH : phosphoglycolohydroxamate

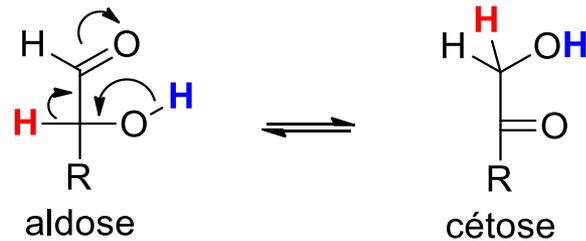
PGH : analogue stable d'ET

a) Les aldose-cétose isomérase



➤ Deux mécanismes possibles *a priori*:

ii. par transfert d'hydrure :

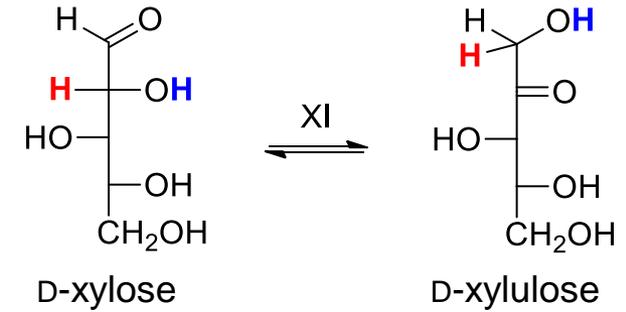
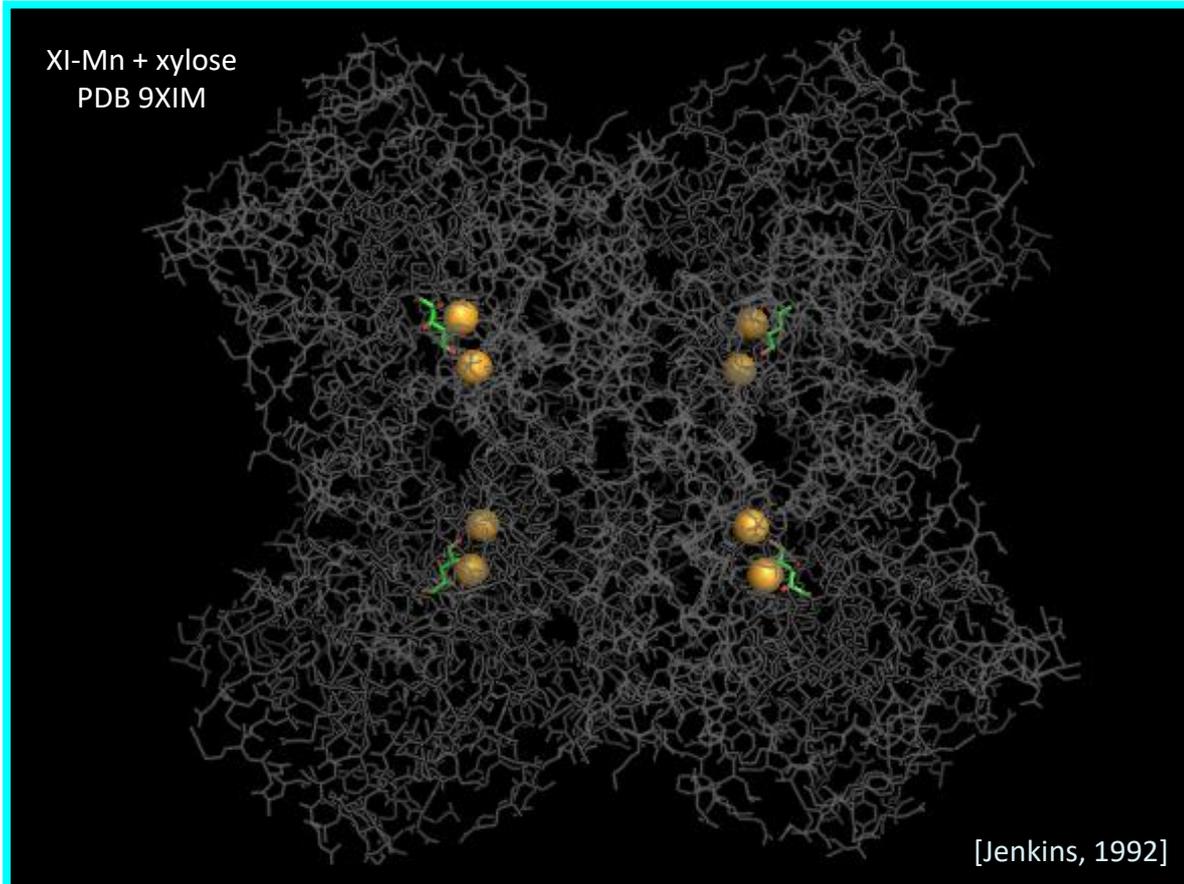


- Xylose isomérase (XI) [ou glucose isomérase (GI)]

La xylose/glucose isomérase (XI/GI)

✓ présentation

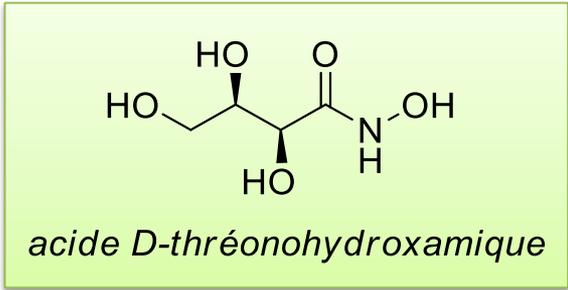
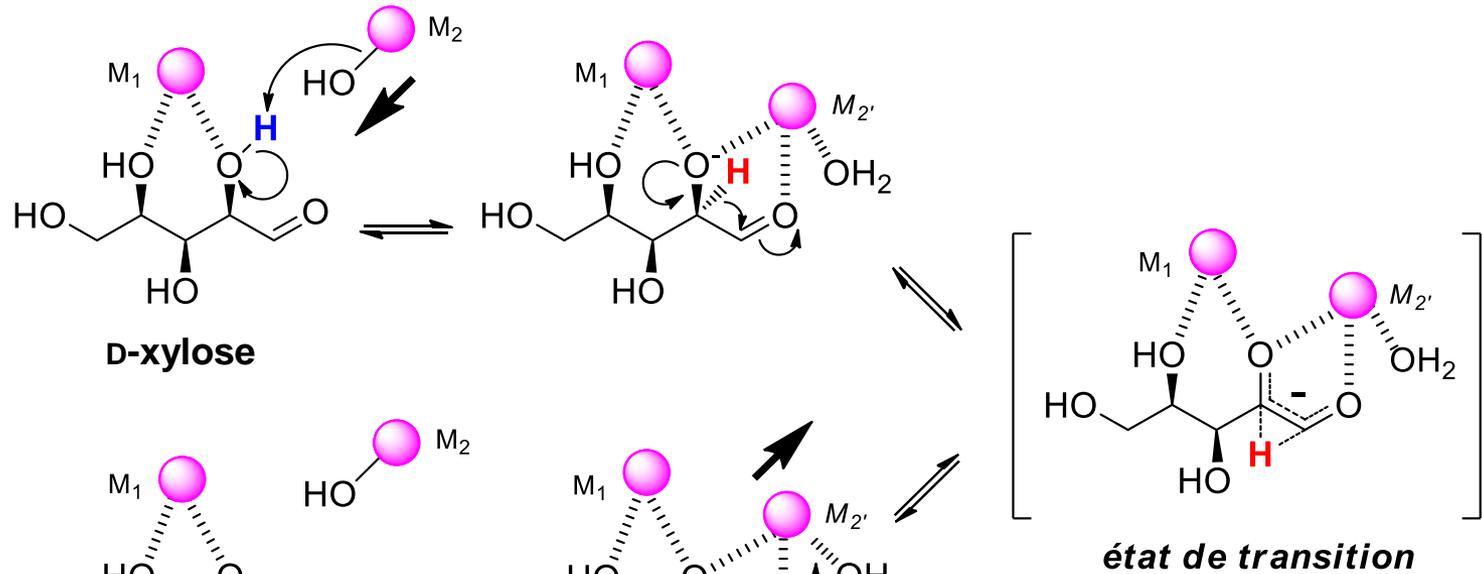
- Structure quaternaire : dimérique ou tétramérique
- Enzyme bimétallique (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+})



- 1 000 000 tonnes fructose / an
- Sweetzyme® (Novozyme)

La xylose/glucose isomérase (XI/GI)

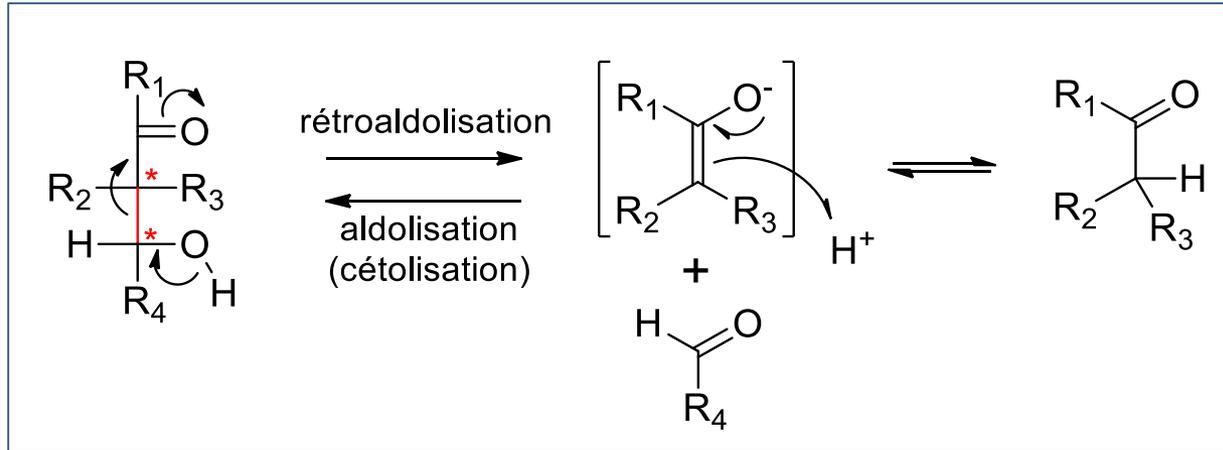
✓ mécanisme



Analogue stable de l'ET

b) Les aldolases et transaldolases

❖ *Les aldolases*



Rôle de l'enzyme :

- arracher / fournir des protons (*catalyse acido-basique*)
- catalyse asymétrique (réaction *énantio-/diastéréosélective*)
- *stabiliser* l'intermédiaire de haute énergie (énolate... ou autre)

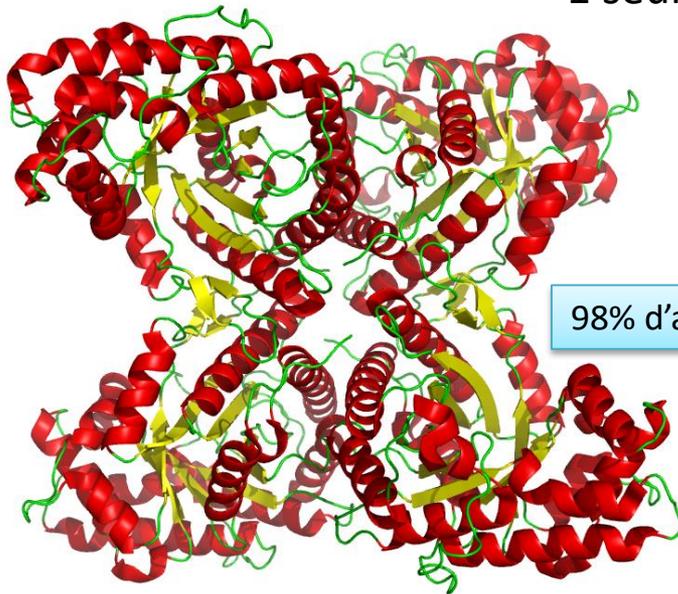
Les fructose-1,6-bis-phosphate aldolases (FBA)

✓ présentation

-enzyme glycolytique

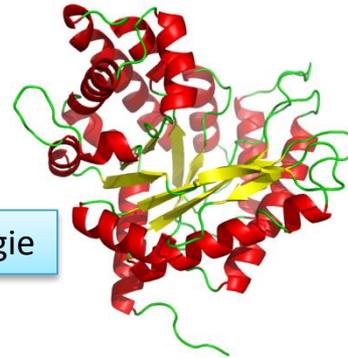
-2 classes d'enzymes (FBA^I, FBA^{II}) : 2 mécanismes

-1 seule stéréosélectivité, 1 seule constante d'équilibre



Aldolase de lapin
(homotétramère)

98% d'analogie

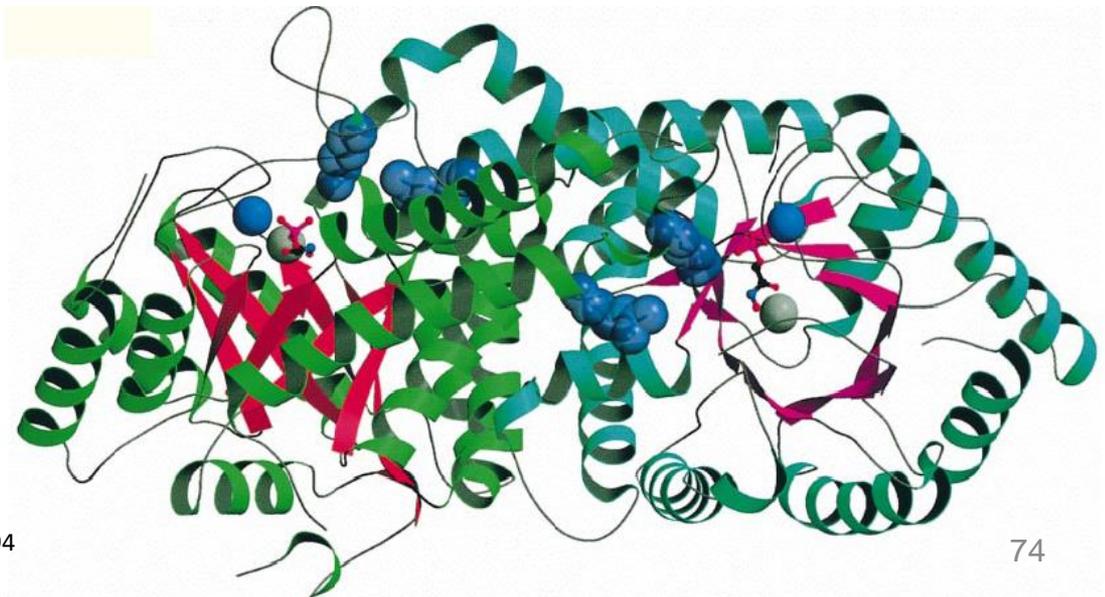


Monomère de l'aldolase humaine

Gamblin, S. J.; et al. *J. Mol. Biol.* **1991**, *219*, 573-576;
St-Jean, M. et al. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27262-27270

Dimère de l'aldolase de *E. coli*

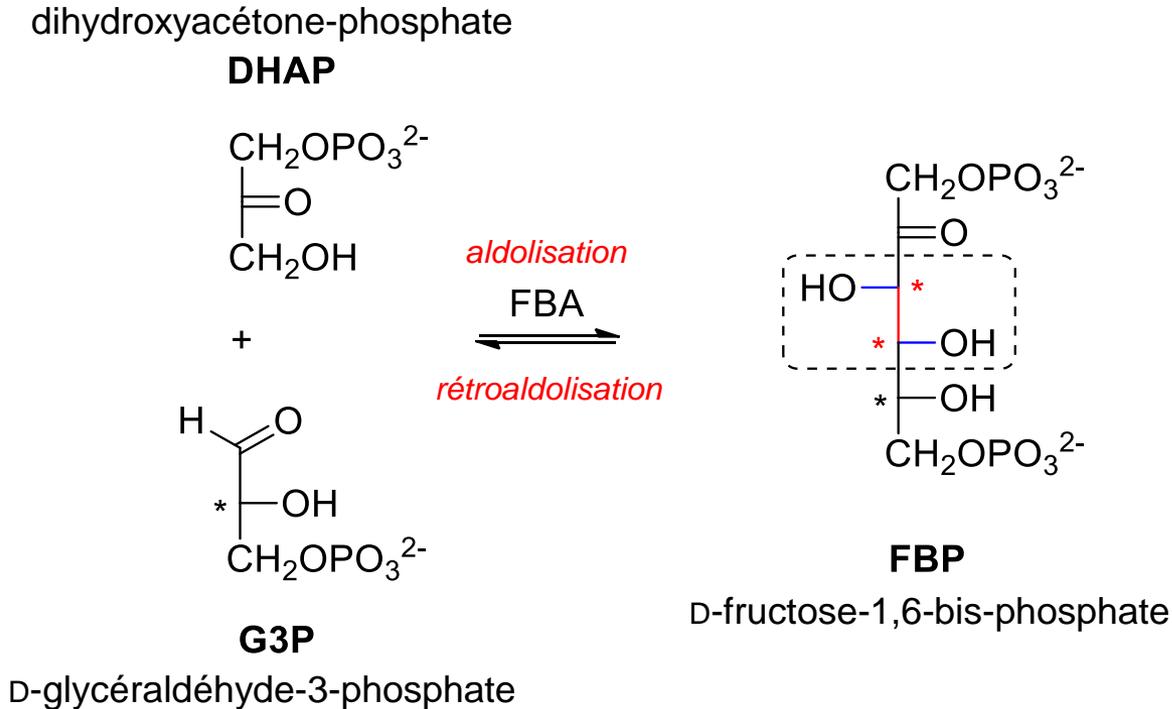
Hall, D. R. et al. *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 383-394





Les fructose-1,6-bis-phosphate aldolases (FBA)

✓ réaction catalysée



réaction *énantiosélective* et *diastéréosélective*

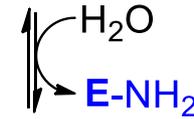
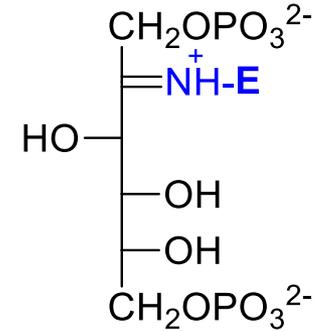
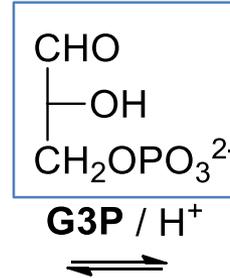
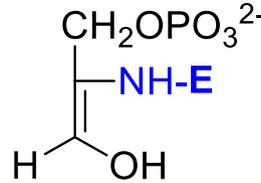
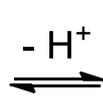
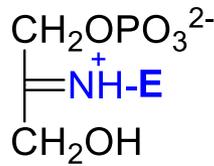
-aldolisation : création de 2 centres stéréogènes d'un coup !



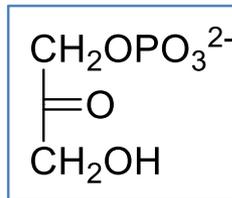
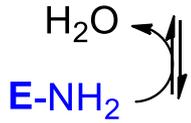
Les fructose-1,6-bis-phosphate aldolases (FBA)

✓ mécanismes

- FBA classe I
- FBA classe II



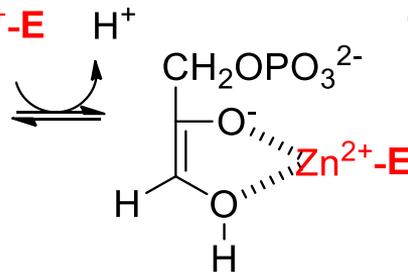
FBA^I



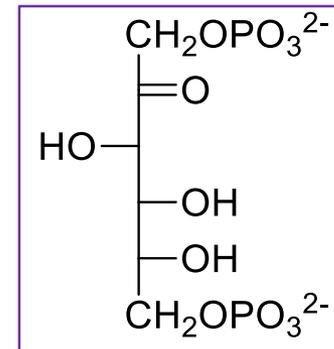
DHAP

FBA^{II}

Zn²⁺-E



H⁺ G3P Zn²⁺-E

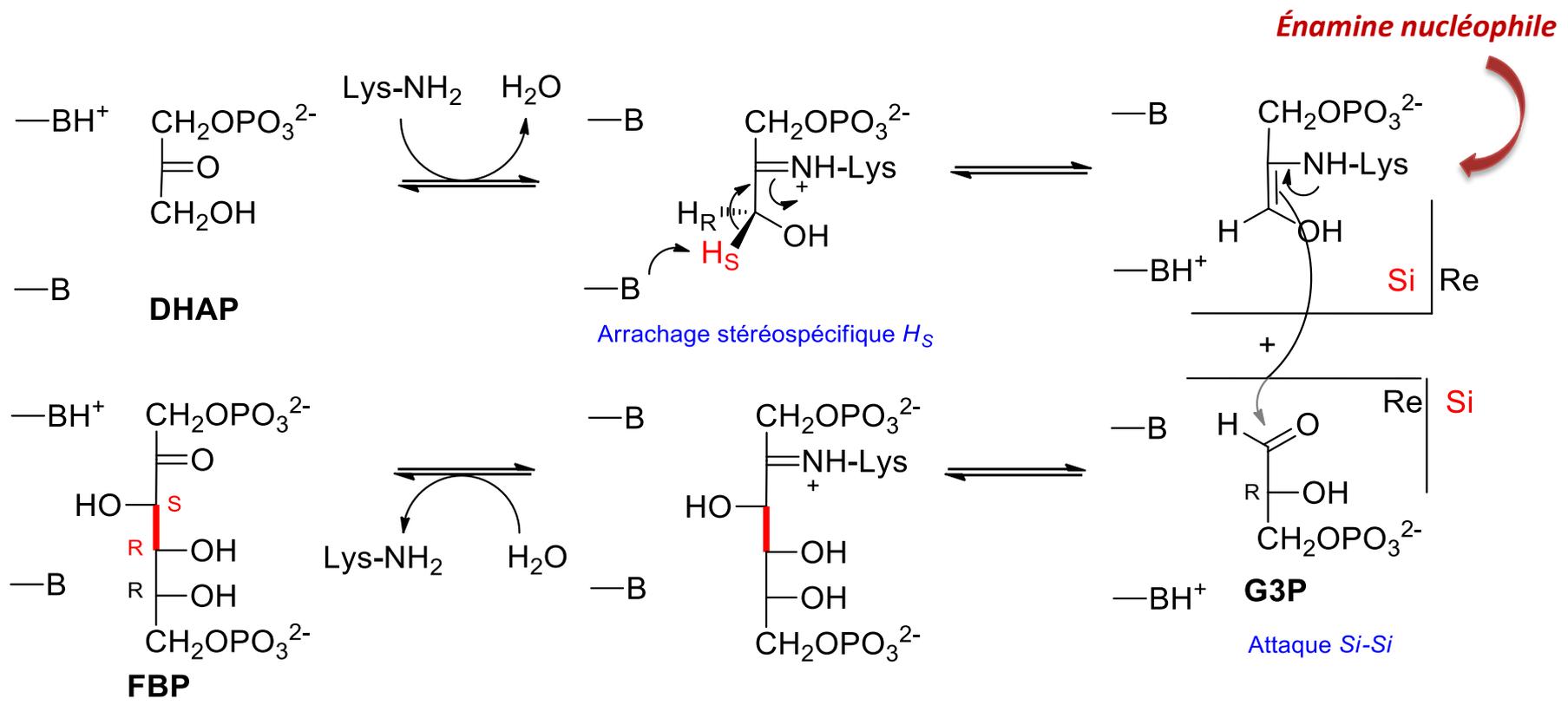


FBP



• **FBA de classe I** (mammifères, plantes, certains microorganismes)

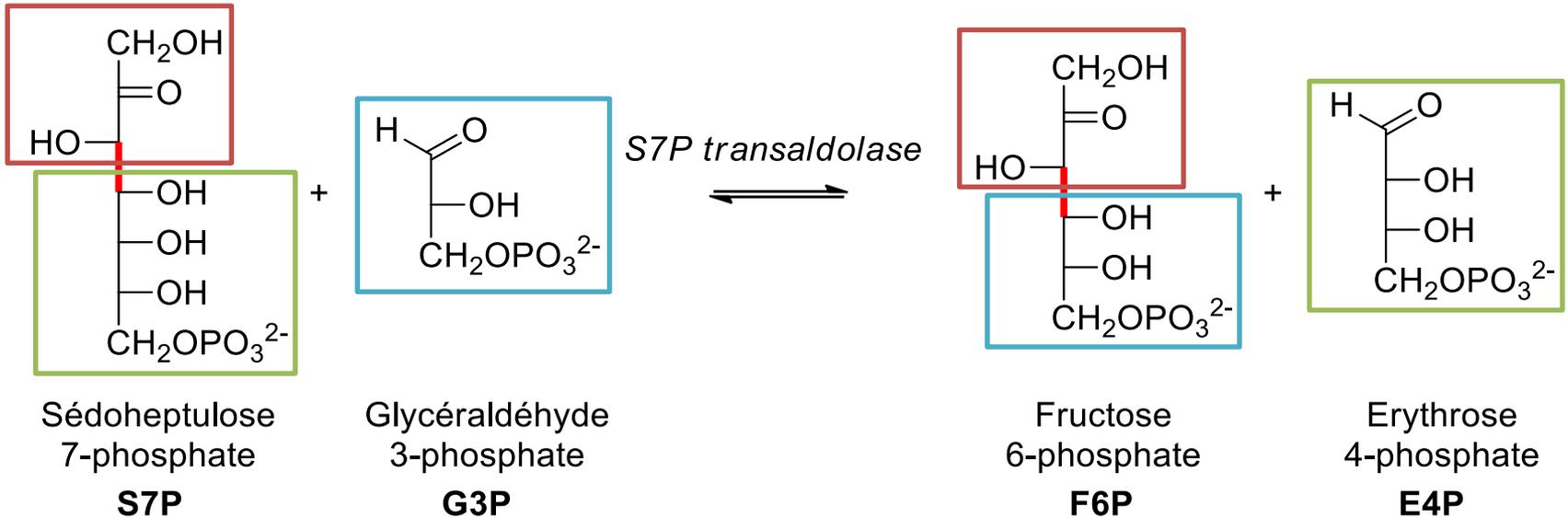
✓ mécanisme et stéréochimie



❖ **Les transaldolases** (des aldolases qui n'aiment pas les protons...)

La sedoheptulose transaldolase

✓ réaction globale

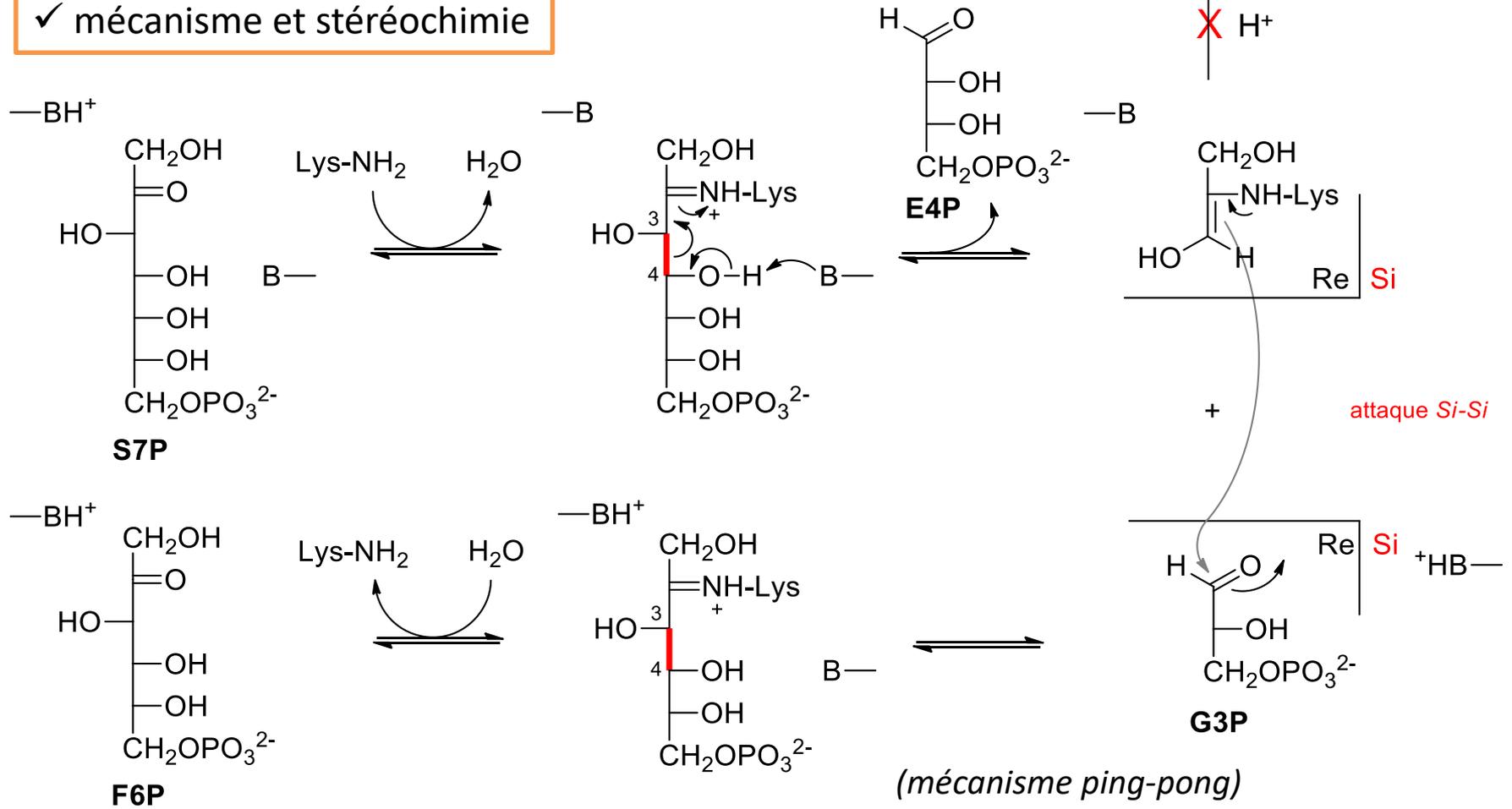




❖ **Les transaldolases** (des aldolases qui n'aiment pas les protons...)

La sedoheptulose transaldolase

✓ mécanisme et stéréochimie

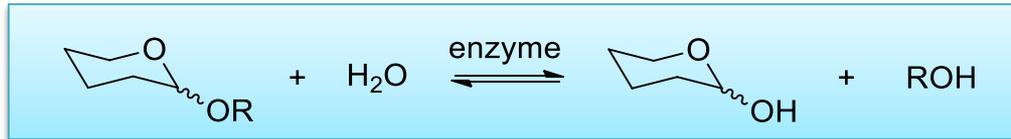


➡ Coupure/formation diastéréosélective et énantiosélective d'une liaison C-C
-2 carbones asymétriques d'un coup

c) Les glycosidases et glycosyltransférases

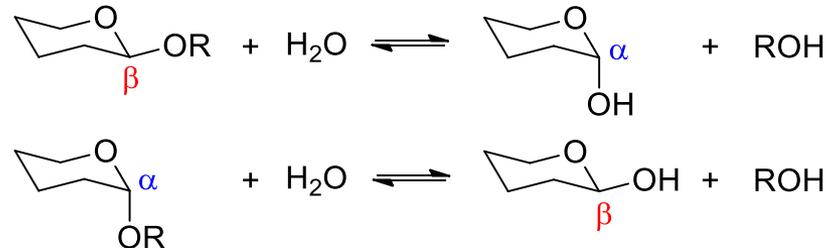
❖ *Les glycosidases (ou glycoside hydrolases)*

- Hydrolyse des liaisons glycosidiques des polysaccharides
- Dégradation des glucides, défenses antibactériennes, métabolisme cellulaire, pathogénicité...
- Lysozyme, neuraminidase, α -amylase...

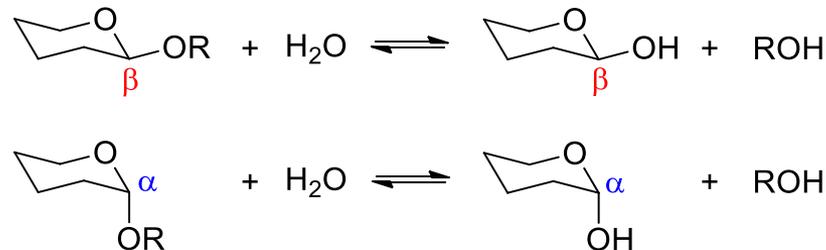


- A priori, deux mécanismes sont possibles :

- avec inversion de configuration du C anomère : ***invertig*** glycosidases



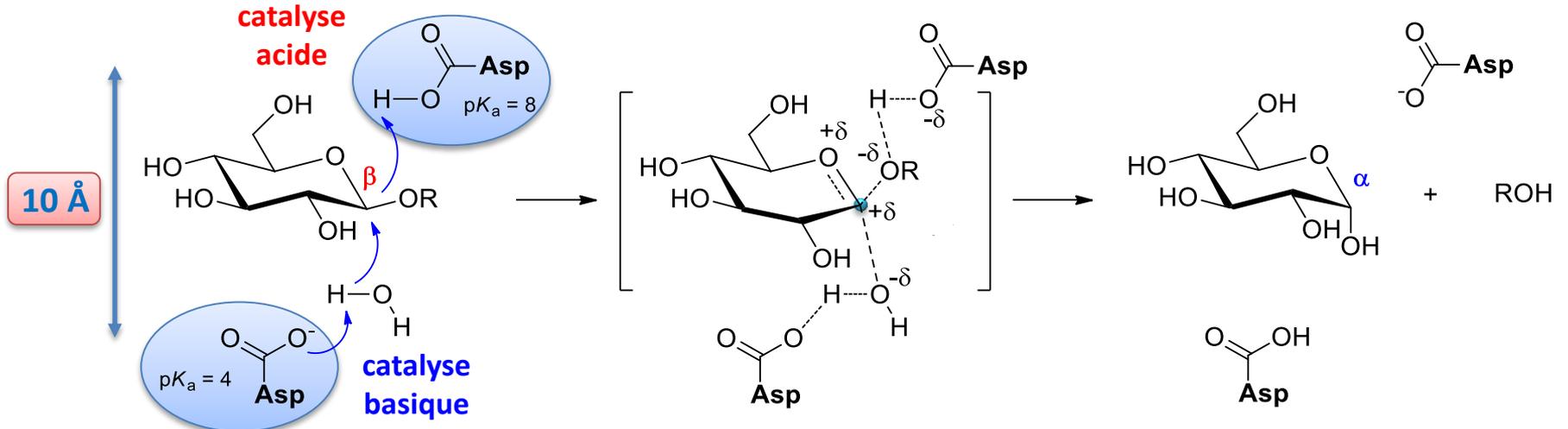
- avec rétention de configuration du C anomère : ***retaining*** glycosidases



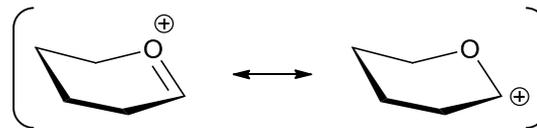
« Inverting » glycosidases

Exemple d'une *inverting* β -glucosidase

(catalyse générale acide-base)

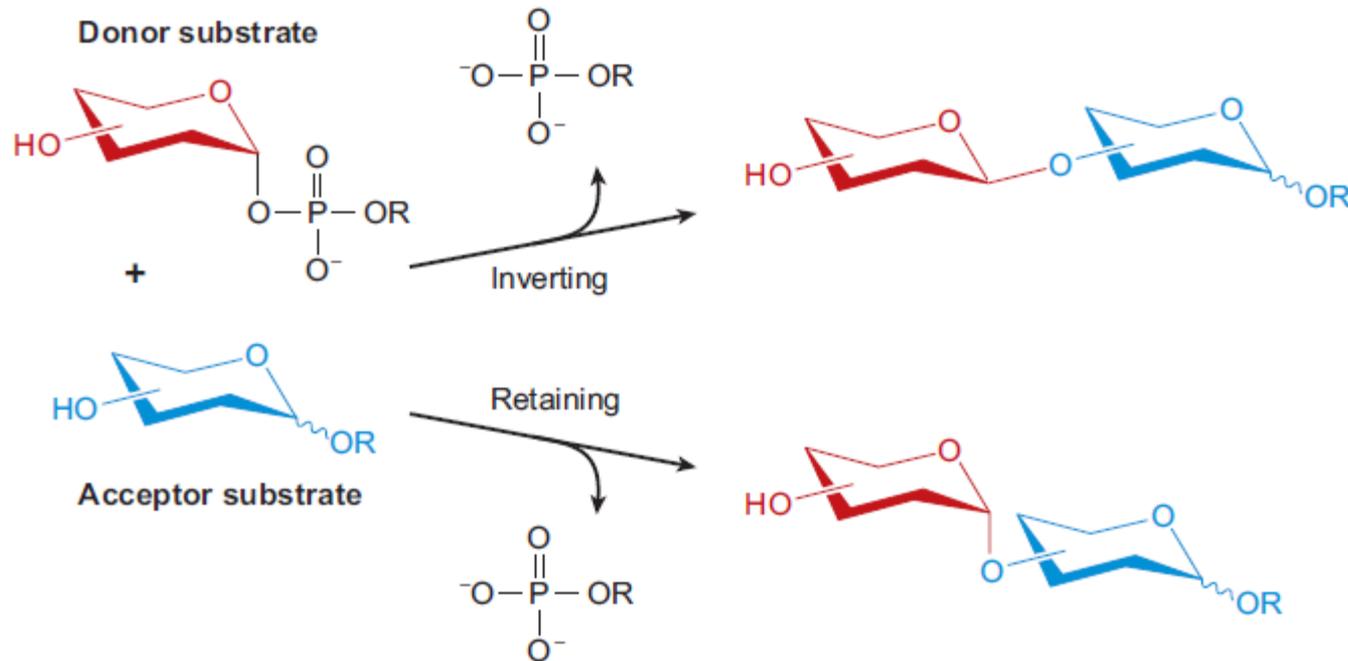


ET « oxo-carbenium »



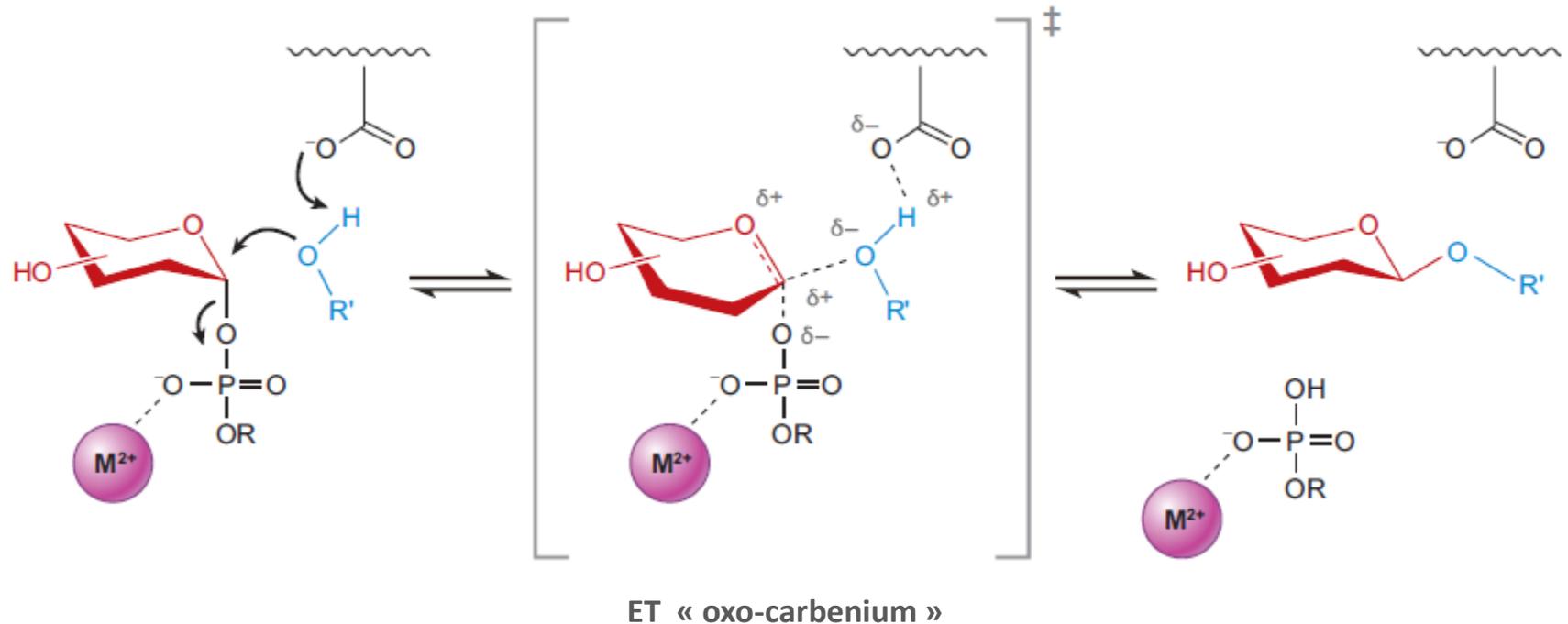
❖ Les glycosyltransférases (GT)

- Formation d'une liaison glycosidique entre un sucre « **donneur** » contenant un nucleoside-phosphate, un lipide-phosphate ou un phosphate et un substrat « **accepteur** » (autre sucre, protéine, antibiotique...)
- Transfert du groupe glycosyle avec *réretention* ou *inversion* de configuration du C anomère (cf. glycosidases)



« Inverting » glycosyltransferases

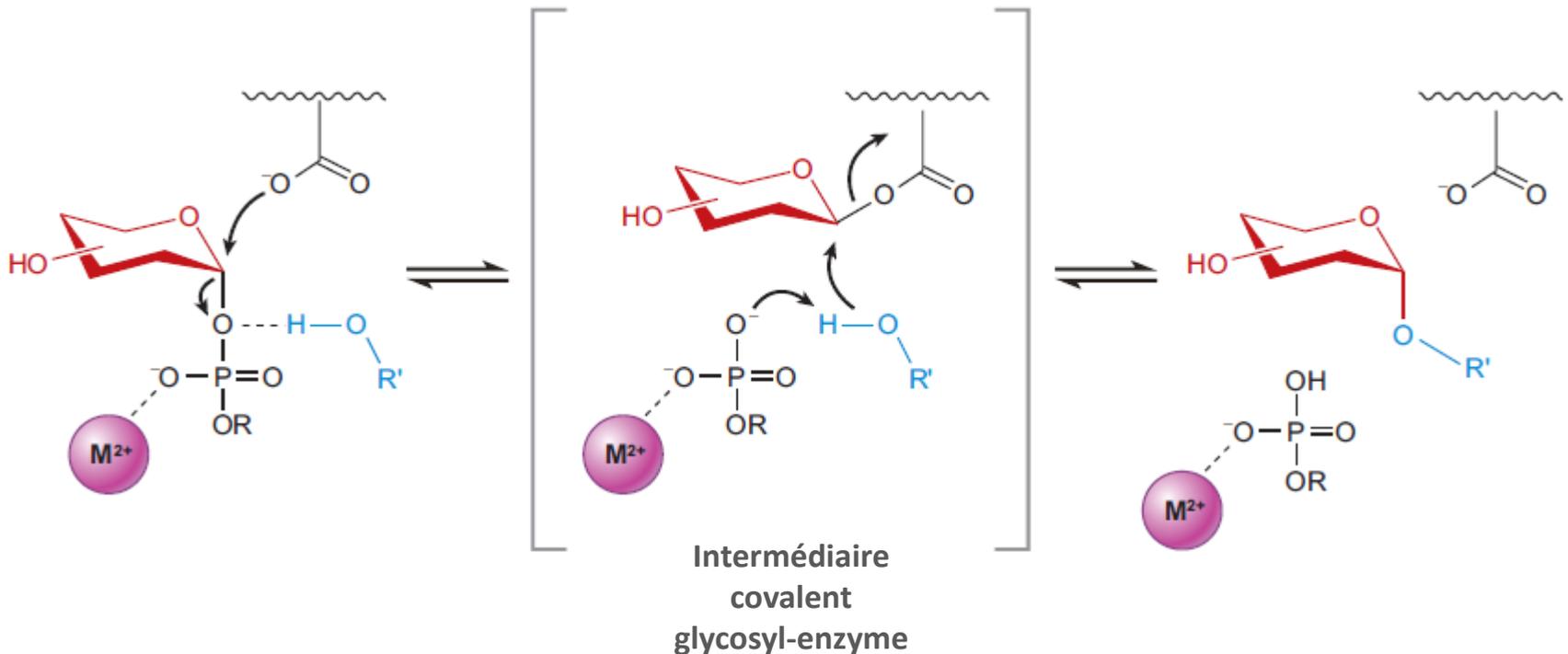
- Mécanisme analogue à celui des « inverting » glycosidases
- Selon le type de GT, l'action de M^{2+} peut être remplacée par un résidu chargé, un groupe OH ou un dipôle



« Retaining » glycosyltransferases

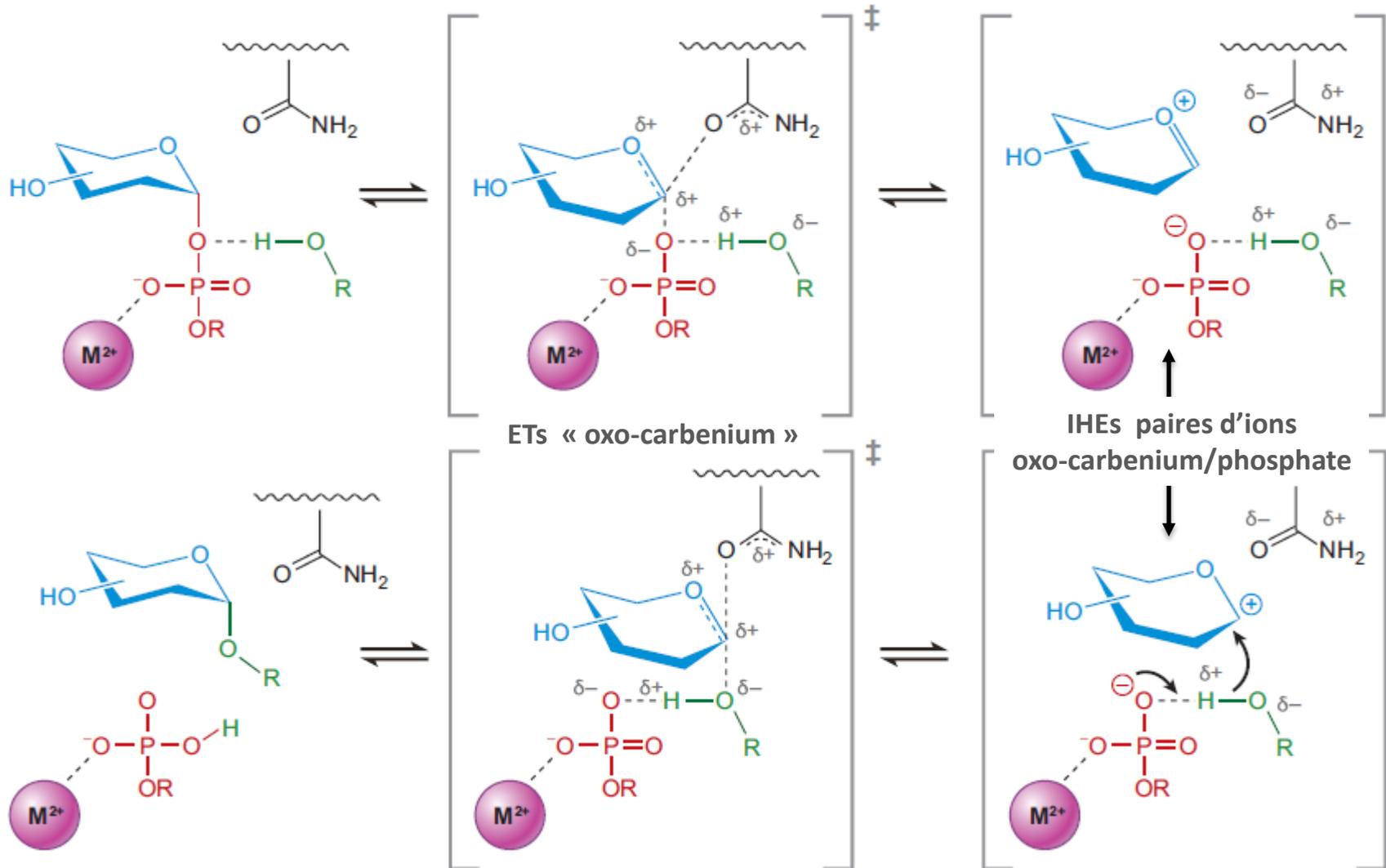
➤ Mécanisme des « retaining » GT moins bien décrit que celui des « inverting » GT

1. Mécanisme type « retaining » glycosidase par double inversion de configuration est peu probable du fait du mauvais positionnement d'un résidu basique :



« Retaining » glycosyltransferases

2. Mécanisme probable : implication de l'anion phosphate comme base catalytique :





d) Les décarboxylases (ou quoi faire des électrons ?)

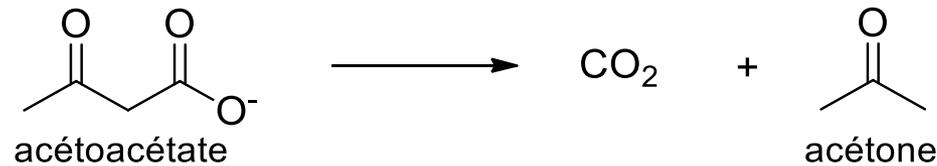
bactérie Gram+ anaérobie
(fermentation)

L'acétoacétate décarboxylase de *Clostridium acetobutylicum*

(une enzyme d'usage industriel dans la 1^{ère} moitié du XX^{ème} siècle : amidon → acétone, butanol, éthanol)

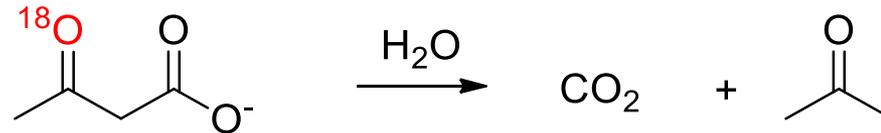
Chaim Weizmann : process ABE

✓ réaction globale

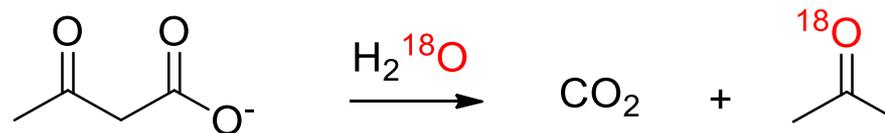


✓ informations sur le mécanisme

- en présence d'acétoacétate, l'enzyme est inactivée par le cyano-borohydrure de sodium
- le substrat marqué à l'oxygène lourd perd sa marque quand on fait la réaction dans l'eau normale :



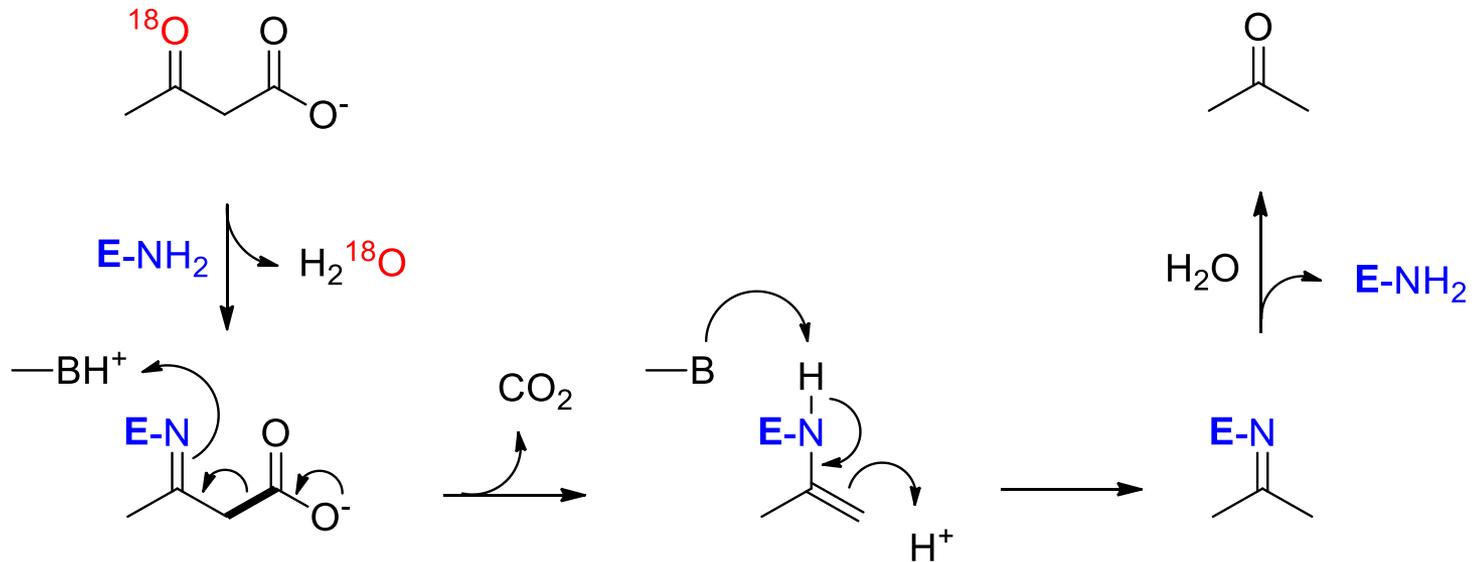
- le substrat non-marqué, traité dans l'eau « lourde » donne de l'acétone marquée



mécanisme via une *imine/énamine* avec une étape d'*hydrolyse*

L'acétoacétate décarboxylase de *Clostridium acetobutylicum*

✓ mécanisme

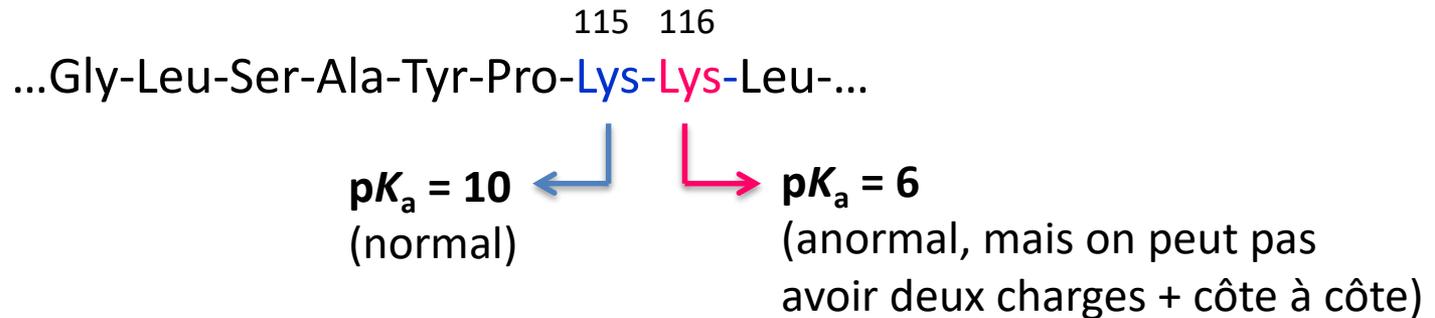


Mais comment un groupement amine de protéine ($\text{p}K_a$ 10-11) peut-il être nucléophile à pH 7 alors qu'il est supposé être sous forme NH_3^+ à 99,9 % ?



L'acétoacétate décarboxylase de *Clostridium acetobutylicum*

-La structure primaire l'explique : 2 lysines adjacentes



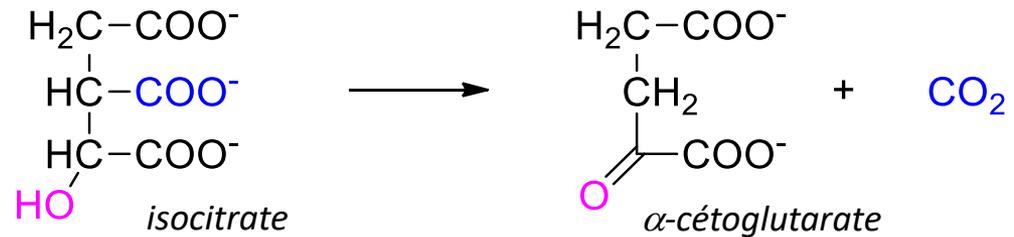
-A pH 7 on a donc :





L'isocitrate déshydrogénase (cycle de l'acide citrique)

✓ réaction globale



- la réaction compte visiblement 2 étapes : oxydation d'un OH et décarboxylation
- l'enzyme est bi-fonctionnelle : à l'origine, deux enzymes ont fusionné

(déshydrogénase + décarboxylase)

✓ informations sur le mécanisme

- L'enzyme est insensible au cyano-borohydrure de sodium
- Le substrat marqué à l'oxygène lourd *ne perd pas* sa marque quand on fait la réaction dans l'eau normale ($\text{H}^{18}\text{O}-\text{CH}$)
- le substrat, traité dans l'eau « lourde » (H_2^{18}O) donne de la cétone non marquée

➔ pas d'intermédiaire *imine/enamine* ; pas d'*hydrolyse* de C=N

- l'enzyme est inactivée si la réaction a lieu en présence d'EDTA (complexant fort des ions métalliques)

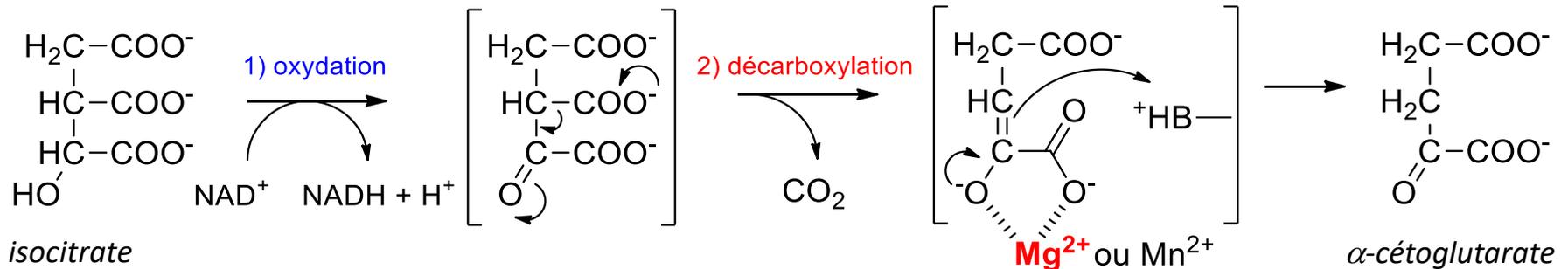
➔ présence d'un *cation métallique* au site actif



L'isocitrate déshydrogénase

(cycle de l'acide citrique)

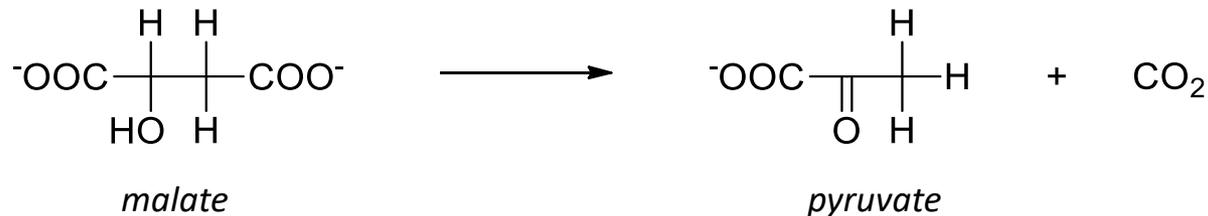
➔ « pour savoir quoi faire des électrons, il faut oxyder *avant* de décarboxyer »



La malate déshydrogénase

(cycle de l'acide citrique)

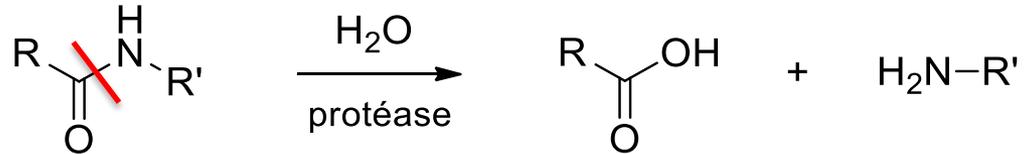
➔ même séquence : 1) oxydation, 2) décarboxylation



e) Les hydrolases

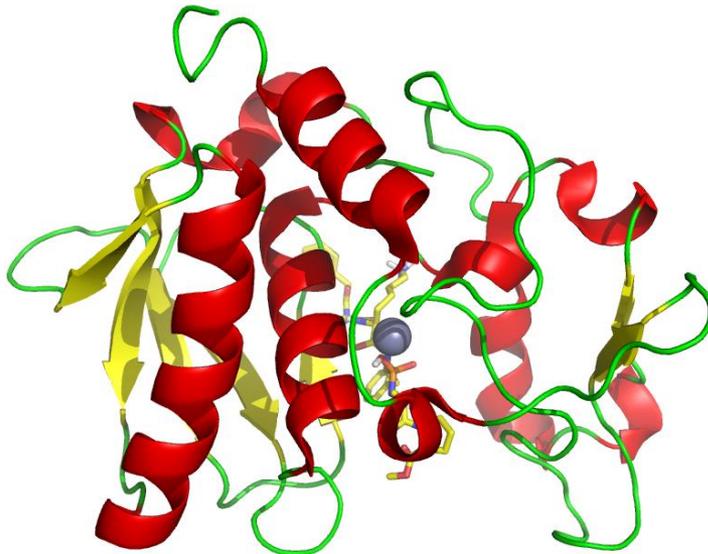
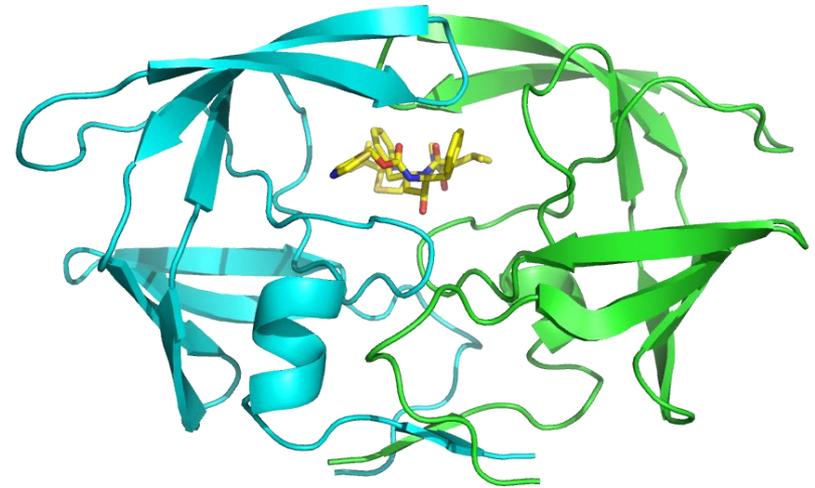
i. Protéases :

- i. protéases (+ estérases, lipases, etc...)
- ii. époxyde-hydrolases



-Différents types de protéases :

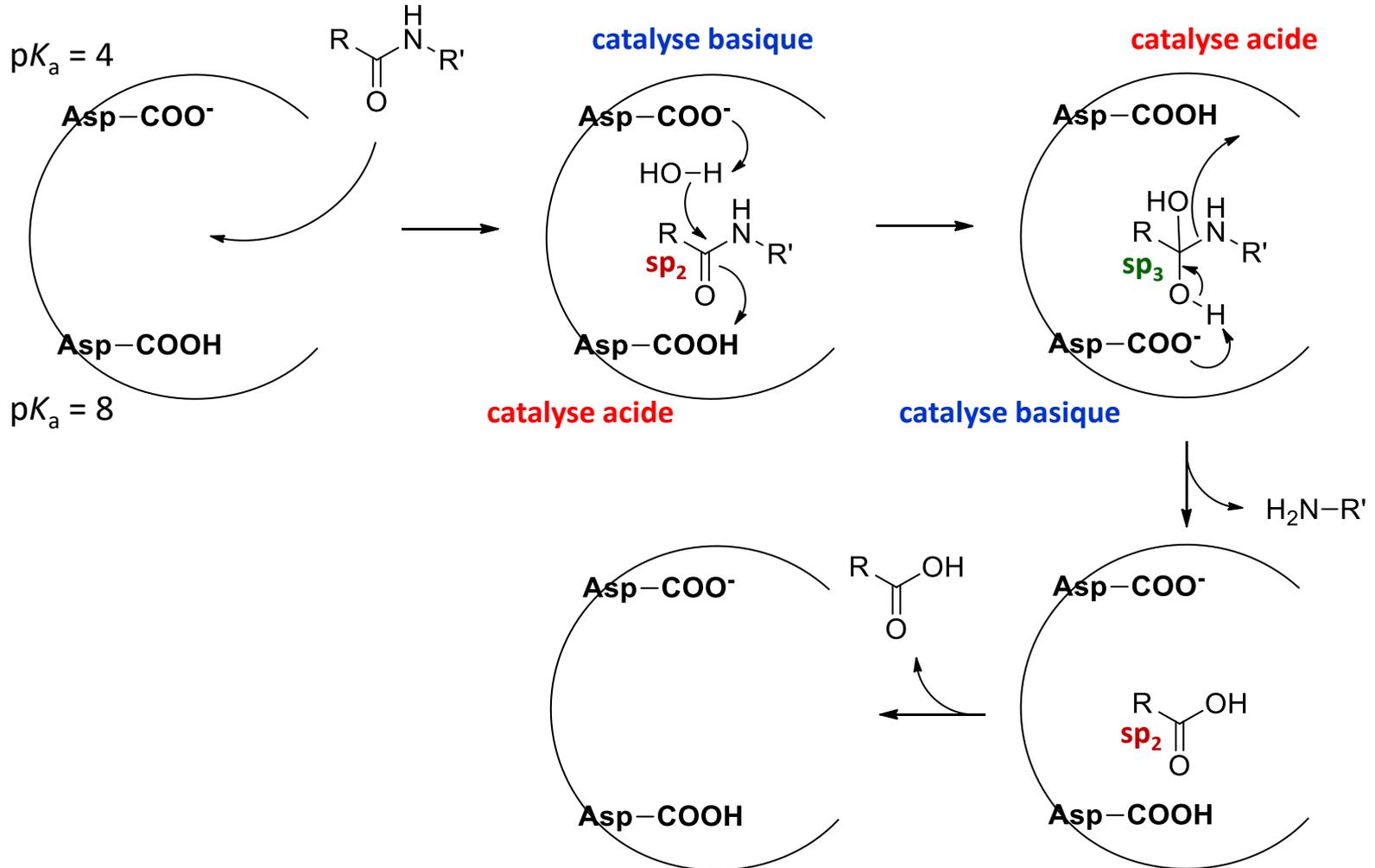
- protéases à aspartates
- protéases à zinc
- protéases à cystéine
- protéases à sérine (thréonine)



e) Les hydrolases

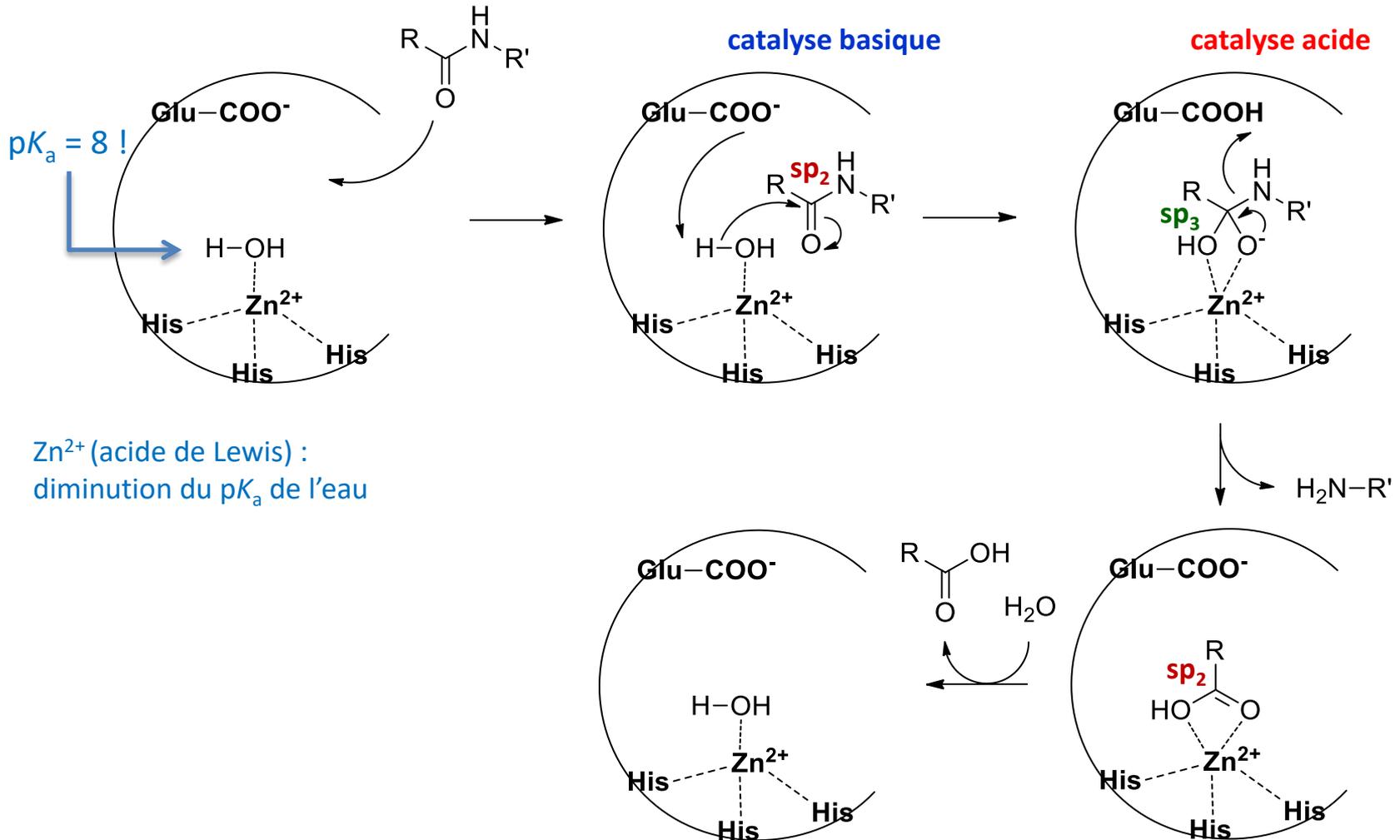
i. Protéases :

- Protéases à aspartates (pepsine, protéase du VIH...)



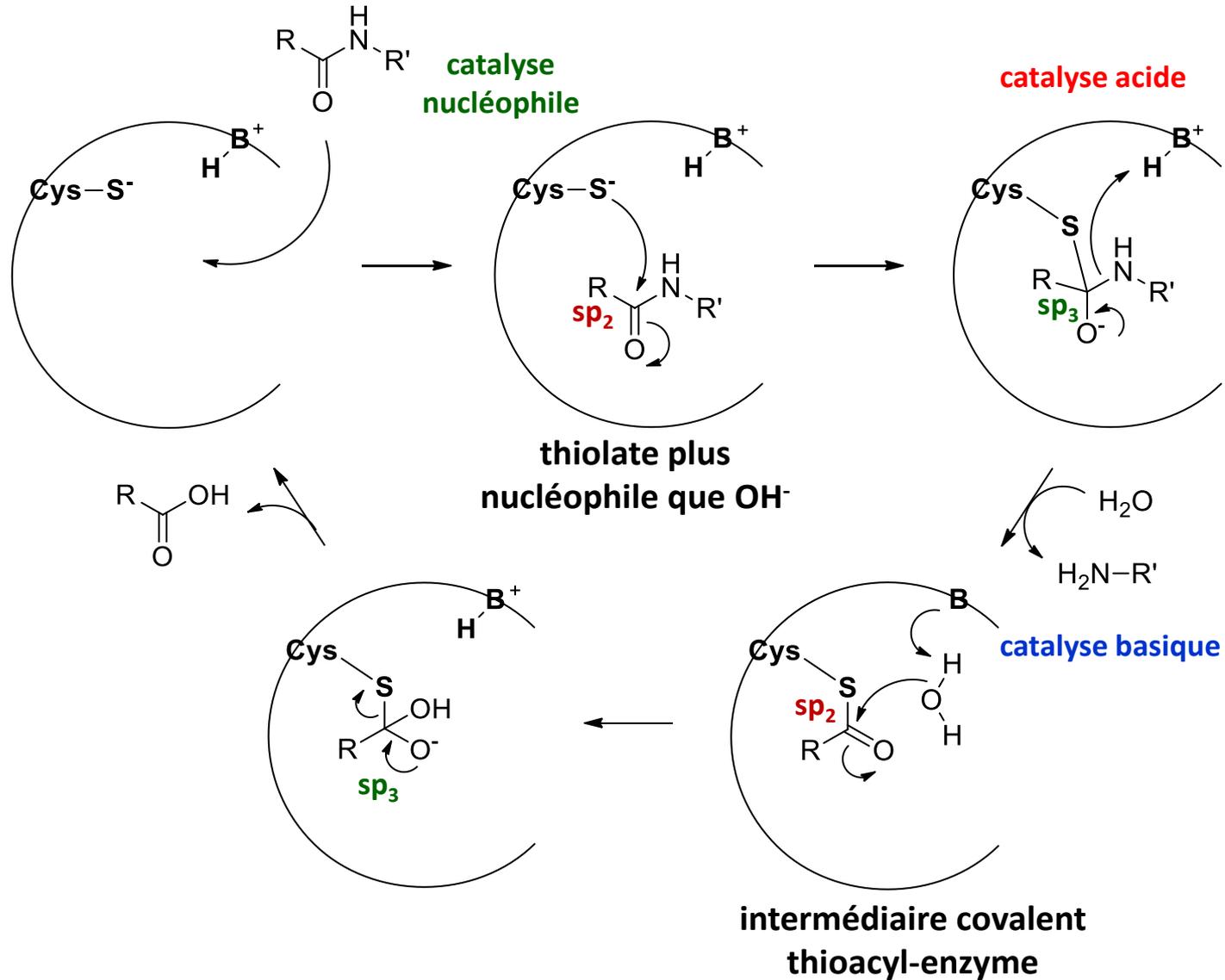
i. Protéases :

• Protéases à zinc (carboxypeptidase...)



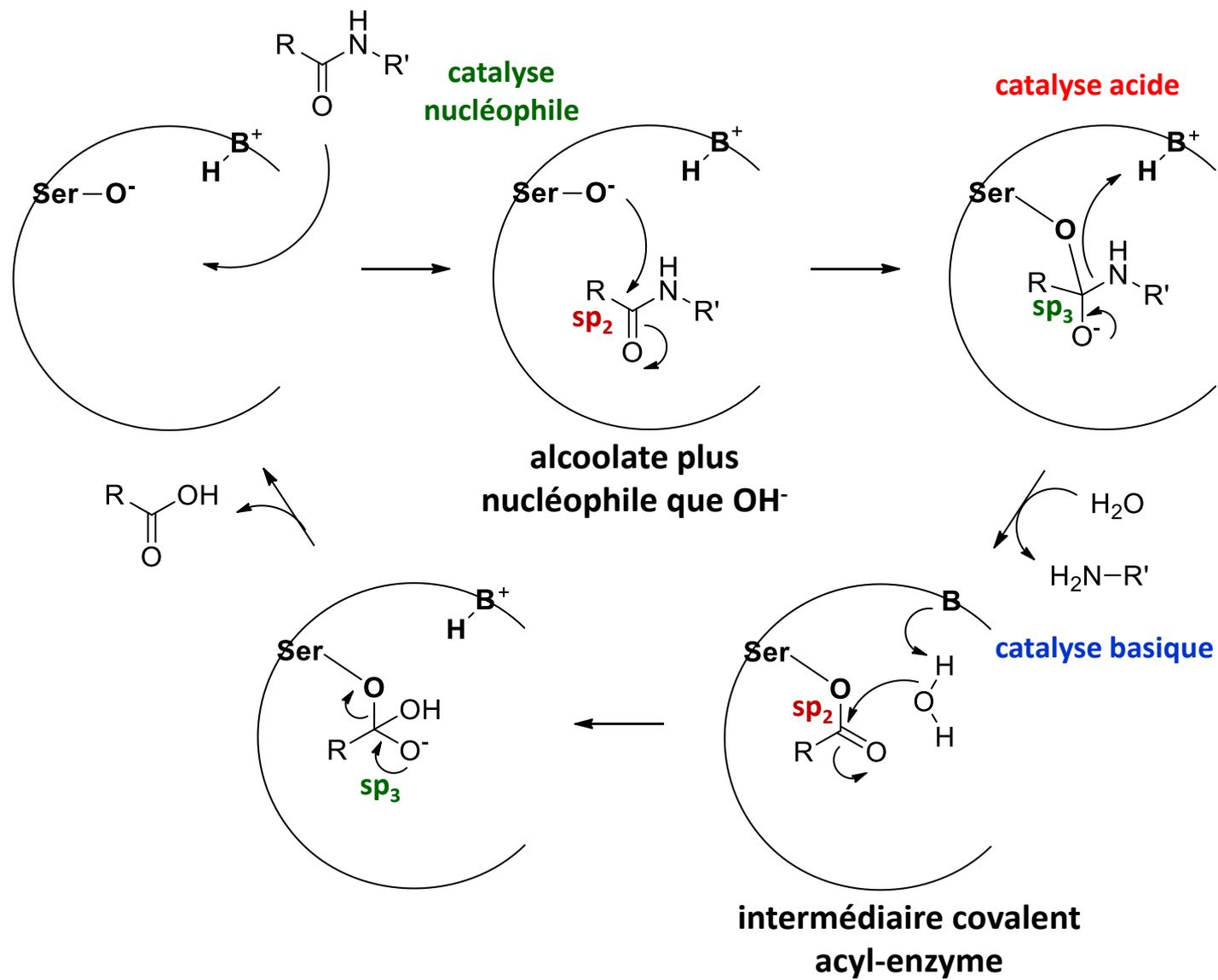
i. Protéases :

- Protéases à cystéine (papaine, bromélaïne...)



i. Protéases :

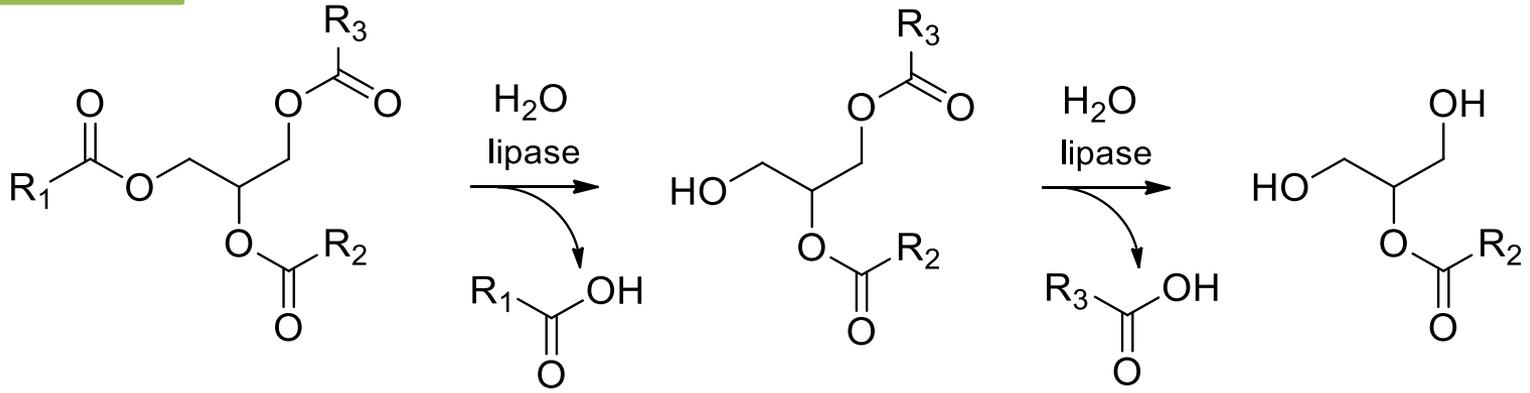
- Protéases à sérine (thréonine) (chymotrypsine, trypsine, subtilisine...)





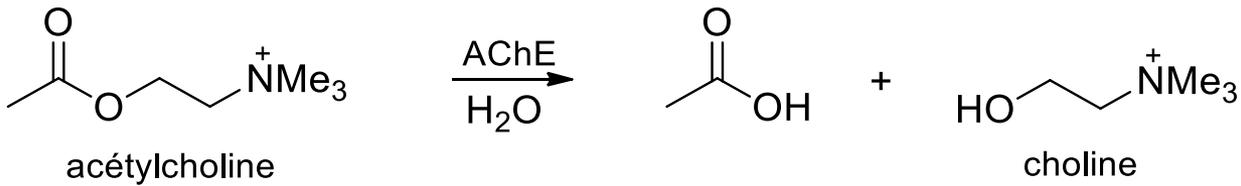
Le mécanisme type *protéases à serine* est à l'œuvre dans une grande variété d'enzymes :

Lipases :



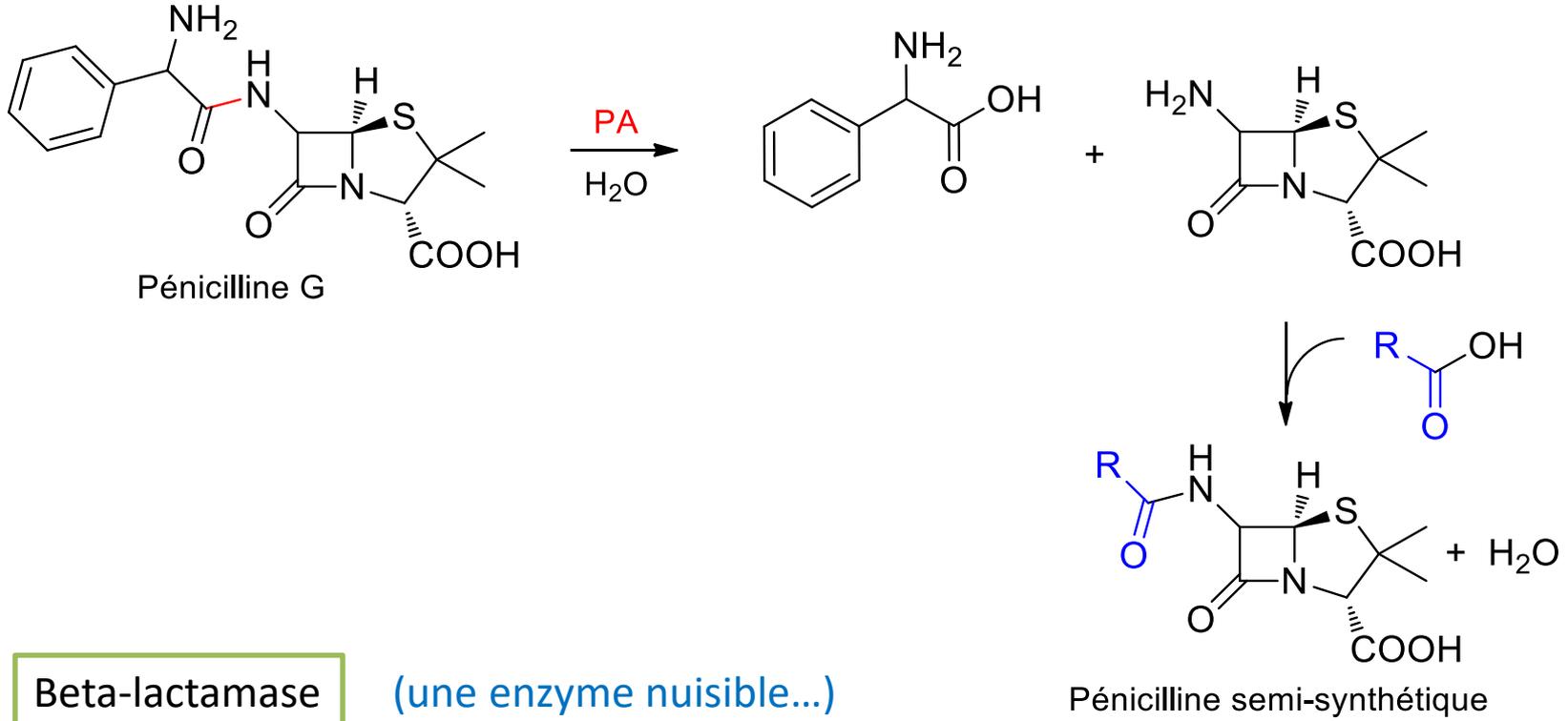
Estérases :

(exemple : acétylcholinestérase)



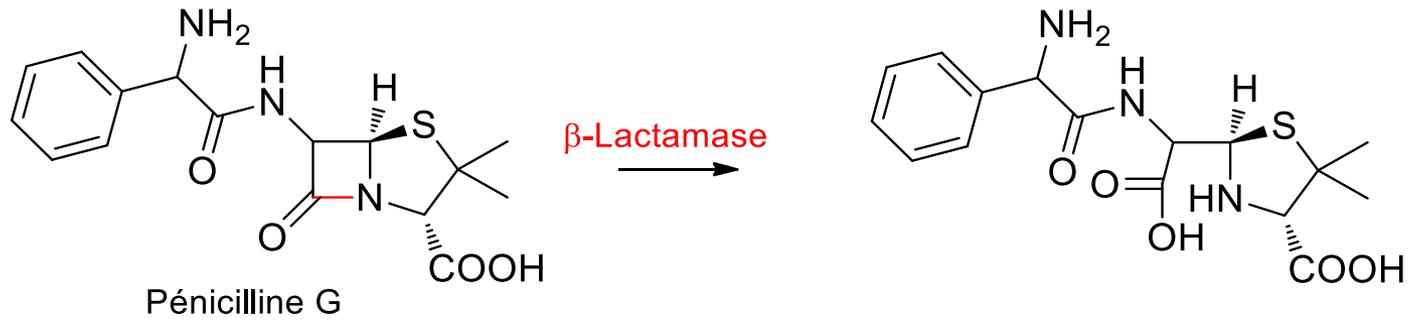
Penicilline acylase

(une enzyme utile...)



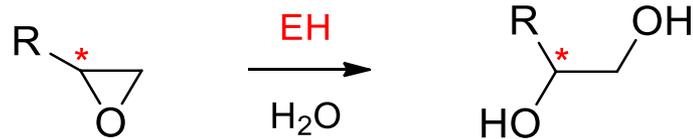
Beta-lactamase

(une enzyme nuisible...)



ii. Epoxyde hydrolases :

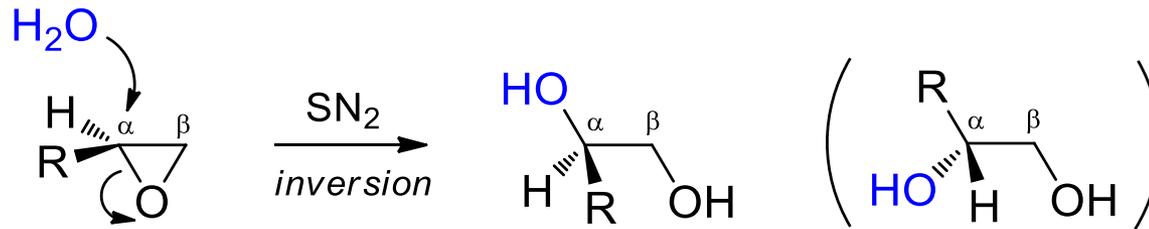
✓ réaction globale



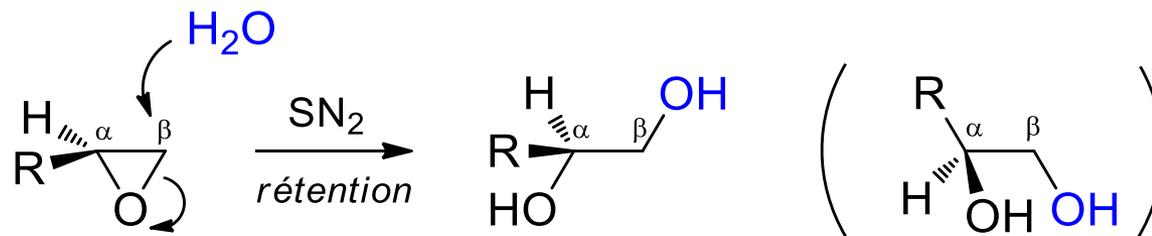
- Intérêt évident en chimie organique : possibilité de former des *époxydes chiraux* et/ou des *diols chiraux*
- Sources d'EH (enzymes de détoxification quasiment universelles) :
 - mammifères : foie, rein, vaisseaux
 - plantes : soja, cresson, pomme de terre...
 - moisissures et levures : *Aspergillus niger*... → -champignon filamenteux (moisissures noires des fruits et légumes)
 - bactéries : *Rhodococcus erythropolis*... → -bactérie Gram+ aérobie non-motile opportuniste
- Question du mécanisme proprement dit
- Double problème mécanistique (liés) de la *régiosélectivité* de l'attaque par l'eau et de la *stéréosélectivité*.

✓ stéréochimie de la réaction

• Attaque sur carbone α (asymétrique) :

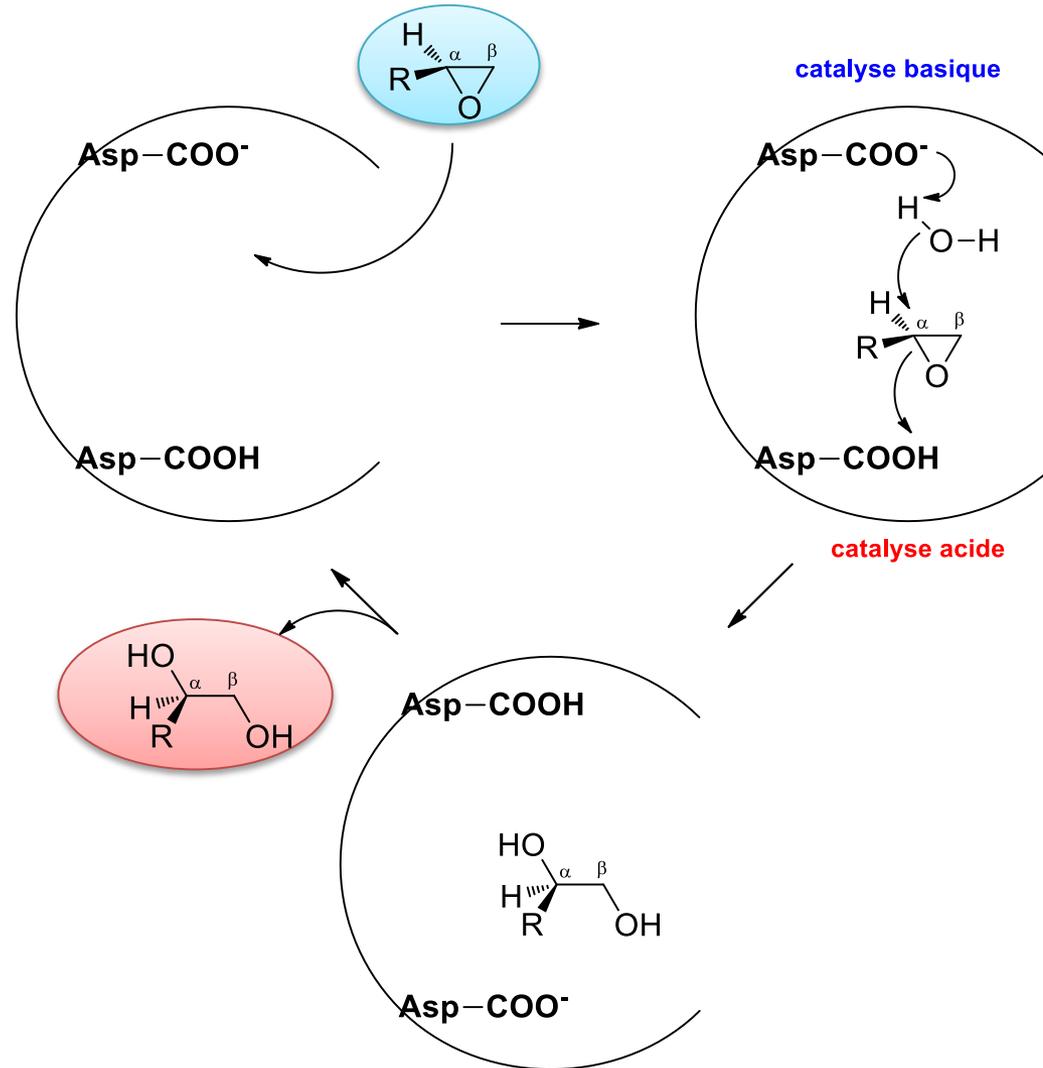


• Attaque sur carbone β :



Epoxyle de *Rhodococcus erythropolis*

➔ pas d'*intermédiaire covalent* avec l'enzyme

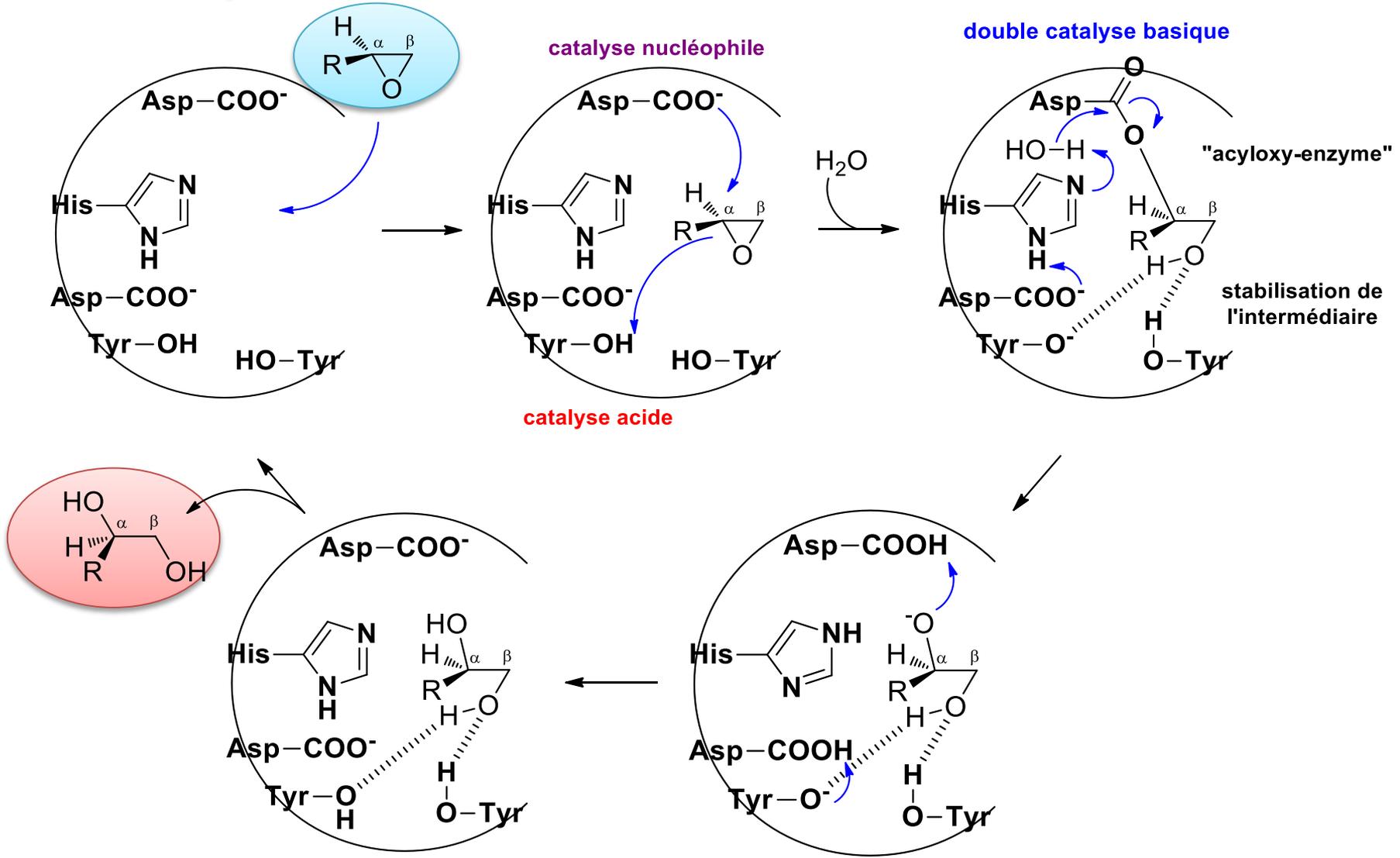


Inversion de configuration du C α si l'attaque s'est faite sur le C α (dépend du substrat)

Epoxyde hydrolases d'*Aspergillus niger* et de *Solanum tuberosum*



➔ passage par un *intermédiaire covalent* avec l'enzyme



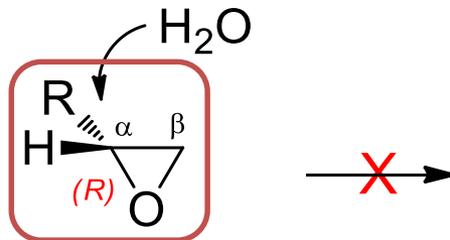
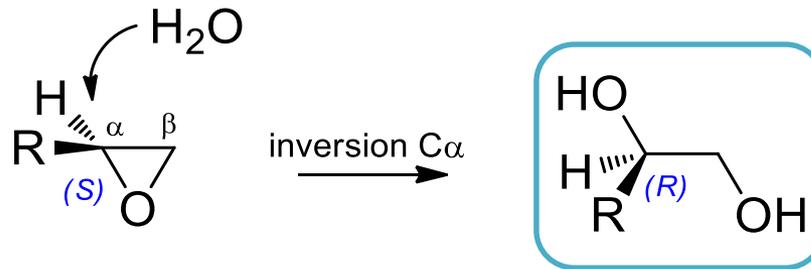
Inversion de configuration du C α si l'attaque s'est faite sur le C α (dépend du substrat)

✓ applications en synthèse organique

- résolution d'époxydes racémiques
- préparation de diols chiraux

* Si la réaction est *énantiosélective* et *régiosélective* :

a) un seul des deux énantiomères réagit (*S*) + attaque de H₂O sur le carbone α



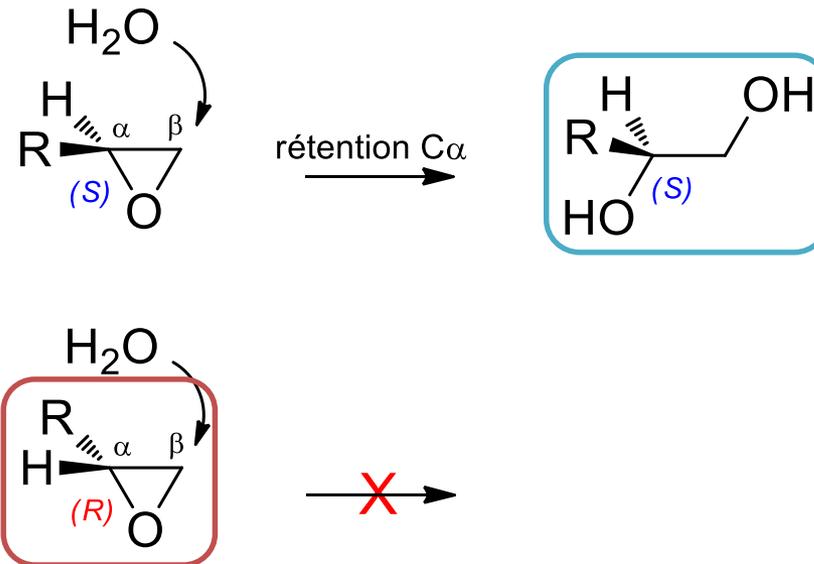
Epoxyde *R* optiquement pur + diol *R* optiquement pur
(rendement max. = 50% depuis le racémique)

✓ applications en synthèse organique

- résolution d'époxydes racémiques
- préparation de diols chiraux

* Si la réaction est *énantiosélective* et *régiosélective* :

b) un seul des deux énantiomères réagit (*S*) + attaque de H₂O sur le carbone β



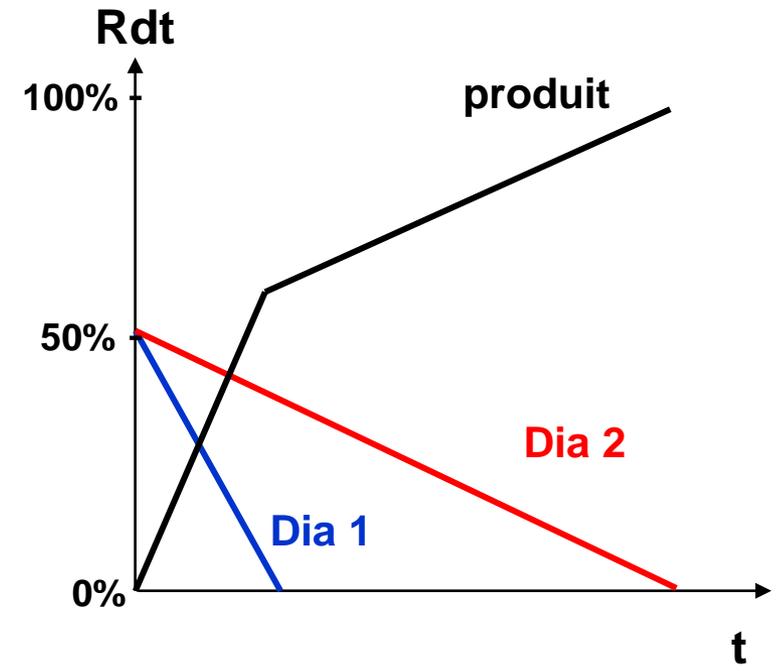
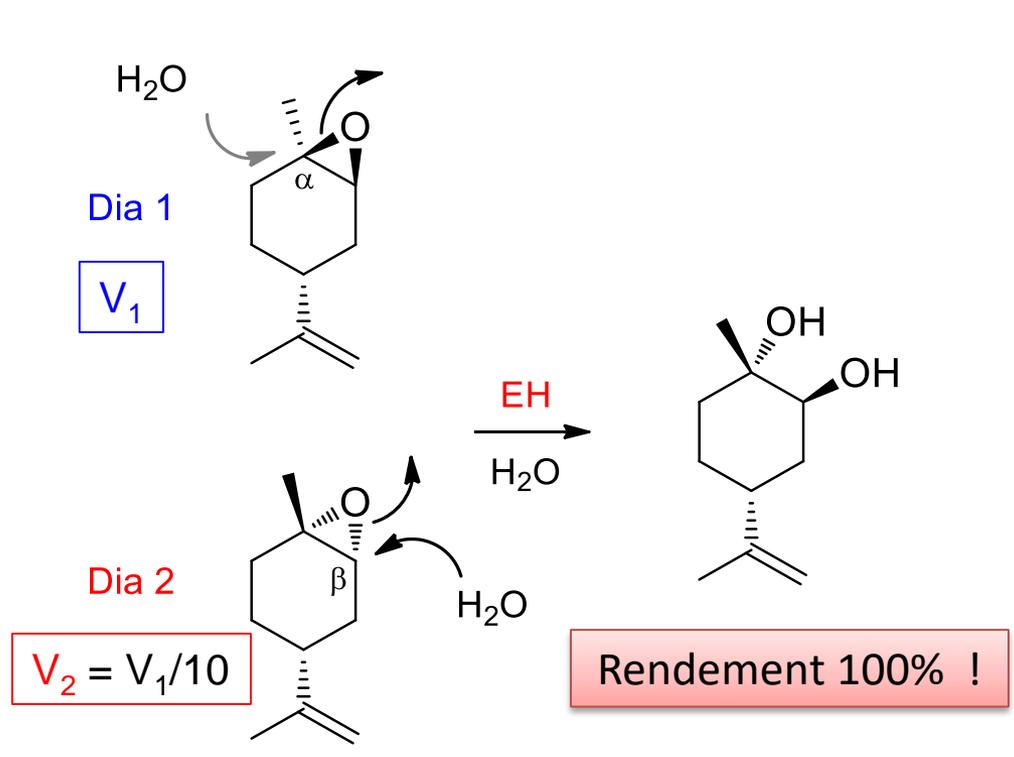
➔ Epoxyde *R* optiquement pur + diol *S* optiquement pur
(rendement max. = 50% depuis le racémique)

✓ applications en synthèse organique

- résolution d'époxydes racémiques
- préparation de diols chiraux

* Cas « surprenants » de réactions *énantio/diastéréo-convergentes* :

Exemple : époxyde du limonène et EH de *R. erythropolis*



Explication : les deux diastéréoisomères réagissent avec des *régiosélectivités différentes*