

UNE FONCTION MAJEURE DES PROTEINES :

LA CATALYSE ENZYMATIQUE

***Avertissement** : ce qui suit ne constitue en aucune manière un (très bref) traité d'enzymologie fondamentale mais seulement un exposé schématique de quelques-unes des propriétés des protéines enzymatiques qui devraient être utiles à un futur médecin. Les « simplifications » qu'on y trouve ne doivent donc pas prendre place parmi « **Les erreurs persistantes dans l'enseignement de l'enzymologie** » (Goldberg M., *Regards sur la Biochimie*, 4, 21-33, 2003) !*

PLAN DU COURS

1. INTRODUCTION
2. PROPRIETES GENERALES DES ENZYMES
3. SITE ACTIF
4. COFACTEURS
5. CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE
 - 5.1 Vitesse (V) de la réaction en fonction de la concentration de substrat (S). Equation de Michaelis-Menten
 - 5.2 Vitesse (V) de la réaction en fonction de la concentration d'enzyme (E)
6. CONTROLE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE
 - 6.1 Introduction
 - 6.2 Rôle du pH
 - 6.3 Rôle de la température
 - 6.4 Modifications covalentes des enzymes
 - 6.4.1 Modifications réversibles
 - 6.4.2 Modifications irréversibles
 - 6.5 Rôle des agents modulateurs
7. AGENTS MODULATEURS DE L'ACTIVITE DES ENZYMES
 - 7.1 Inhibitions irréversibles
 - 7.2 Inhibitions réversibles
 - 7.2.1 Inhibition compétitive (E)
 - 7.2.2 Inhibition incompétitive (ES)
 - 7.2.3 Inhibition non compétitive (E/ES)
 - 7.2.4 Exemples et applications
 - 7.3 Activations
8. ENZYMES ALLOSTERIQUES
 - 8.1 Généralités
 - 8.2 Enzymes allostériques du système K (les plus nombreux)
 - 8.3 Enzymes allostériques du système V
9. CLASSIFICATION DES ENZYMES

1. INTRODUCTION

Comme vous le savez à présent, les peptides et les protéines sont formés par des enchaînements d'acides aminés unis par des liaisons covalentes très stables (liaisons peptidiques). Si l'on veut rompre ces liaisons au laboratoire par des moyens chimiques, il faut placer les protéines dans des conditions extrêmement dures : par exemple, en solution dans l'acide chlorhydrique 6 N, à 110°C pendant 16 à 96 h, sous vide ou sous atmosphère d'azote. Autrement dit, il faut fournir une énergie importante pour que la rupture des liaisons se produise.

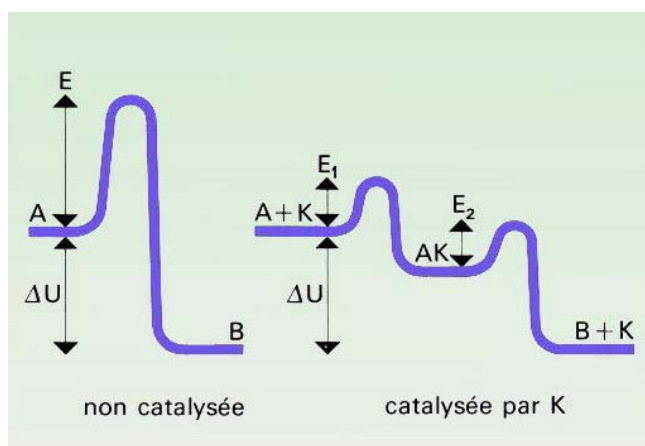
Et pourtant de telles ruptures de liaisons peptidiques ont lieu en permanence dans nos cellules ou dans les espaces extracellulaires, à une température et un pH évidemment très différents de ceux-ci, et de manière extrêmement rapide. Par exemple, la production de peptides biologiquement actifs fait intervenir la rupture de liaisons peptidiques.

Ces réactions sont possibles dans les conditions où se trouvent nos organismes car elles sont *catalysées*, autrement dit l'énergie qu'il faut apporter pour les déclencher est considérablement plus faible qu'en l'absence de catalyseur. Les catalyseurs qui sont à l'œuvre dans nos organismes sont des protéines, qu'on appelle des *enzymes*. Le mot enzyme est aussi bien féminin que masculin. Il est emprunté à l'allemand *Enzym*, composé du préfixe *en-*, et du radical du grec *zumê*, « levain ». Comme presque toute règle, celle qui stipule que les enzymes sont des protéines connaît une exception : certains acides ribonucléiques, qu'on appelle des ribozymes, possèdent une activité catalytique. Nous ne traitons ici que des protéines enzymatiques.

2. PROPRIETES GENERALES DES ENZYMES

Comme tous les catalyseurs, les enzymes agissent à une très faible concentration, ils restent inchangés à la fin de la réaction qu'ils catalysent, et n'affectent pas l'équilibre d'une réaction réversible : ils augmentent simplement la vitesse à laquelle l'équilibre est atteint, *i.e.* augmentent la vitesse de réaction.

Pour simplifier, comme le montre la figure ci-dessous (ΔU : variation nette de l'énergie), un catalyseur (K) [un enzyme] diminue l'énergie d'activation E d'une réaction (qui transforme un *substrat* A en un *produit* B), en permettant la formation d'un ou plusieurs intermédiaires dont l'énergie d'activation est plus basse (E_1 , E_2). Divers mécanismes peuvent être impliqués que nous ne détaillerons pas ici.

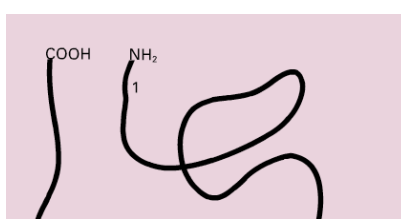


3. SITE ACTIF

Contrairement aux catalyseurs non organiques qui ont une spécificité très limitée, les enzymes sont étroitement spécifiques d'une réaction chimique définie, réalisée sur un type de substrat donné.

Le site actif d'un enzyme est schématiquement formé par un petit nombre d'acides aminés organisés en un arrangement tridimensionnel précis formant une poche ou une crevasse dans la protéine. Le site a une affinité élevée pour le substrat, parce que la nature chimique des acides aminés du site et leur arrangement spatial forment une région complémentaire de certains groupements de la molécule de substrat, comme l'illustre le schéma de la page suivante.

En d'autres termes, la configuration spatiale du substrat est reconnue par l'enzyme. On se réfère souvent, pour décrire cette complémentarité, à un modèle clé-serrure. En réalité, un tel modèle, qui implique une certaine rigidité, n'est pas tout à fait juste, puisque, dans la majorité des cas, la liaison du substrat à l'enzyme pour former un complexe enzyme-substrat (ES), et la catalyse, s'accompagnent d'un changement conformationnel de la protéine, voire du substrat.



4. COFACTEURS

Certains enzymes sont simplement formés par une structure protéique ; d'autres requièrent des composants additionnels appelés *cofacteurs*. Ce sont des corps chimiques intervenant obligatoirement dans la réaction enzymatique pour transporter ou compléter un substrat, pour accepter un produit, ou encore comme participant à la structure de l'enzyme. Ces cofacteurs sont des ions inorganiques ou, au contraire, des molécules organiques, appelées *coenzymes*.

Certains coenzymes ne sont liés que de manière lâche à la protéine, et fonctionnent en réalité comme des substrats de l'enzyme. Ces coenzymes sont parfois appelés coenzymes libres parce qu'ils se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée. Ils ont des fonctions spécifiques, comme le transfert d'électrons, par exemple, par le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺). Beaucoup d'enzymes différents catalysant des réactions distinctes ont le même coenzyme ; ainsi, plus d'une centaine d'oxydoréductases sont connues pour utiliser le NAD⁺ comme coenzyme. D'autres coenzymes sont solidement liés à la protéine, et ne quittent pas la molécule après la catalyse ; ils sont alors appelés groupes prosthétiques. Ainsi, le FAD (flavine adénine dinucléotide) est un autre transporteur d'électrons associés à divers enzymes, par exemple la succinate déshydrogénase. De même, le groupement hème est considéré comme un groupe prosthétique dans le cytochrome, par exemple.

Beaucoup de coenzymes ne peuvent pas être synthétisés par les animaux (l'Homme y compris) et doivent être fournis dans le régime alimentaire par des végétaux ou des microorganismes. Les *vitamines*, c'est-à-dire des facteurs nutritifs essentiels dont les animaux ont besoin en quantités minimales, sont souvent les précurseurs de coenzymes.

Le tableau ci-dessous fournit quelques exemples de ce qui vient d'être énoncé.

<i>Enzyme</i>	<i>Classe</i>	<i>Cofacteurs</i>	<i>Nature</i>	<i>Vitamine</i>
Subtilisine (protéase)	Hydrolase	aucun		
Glucose isomérase	Isomérase	Co ²⁺ , Mg ²⁺	Ion	
β-galactosidase	Hydrolase	Na ⁺ , K ⁺	Ion	
Lactate déshydrogénase	Oxydoréductase	NAD ⁺	Coenzyme « libre »	Nicotinamide (B3)
Succinate déshydrogénase	Oxydoréductase	FAD	Coenzyme « groupement prosthétique »	Riboflavine (B2)
Cytochrome	Oxydoréductase	Hème	groupement prosthétique	

5. CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

5.1 Vitesse (V) de la réaction en fonction de la concentration de substrat (S). Equation de Michaelis-Menten

Ainsi, les enzymes (E) catalysent les réactions en formant un complexe avec leur substrat (S) au niveau de leur site actif. La façon la plus schématique et la plus simple de représenter la réaction catalysée par un enzyme est la suivante :



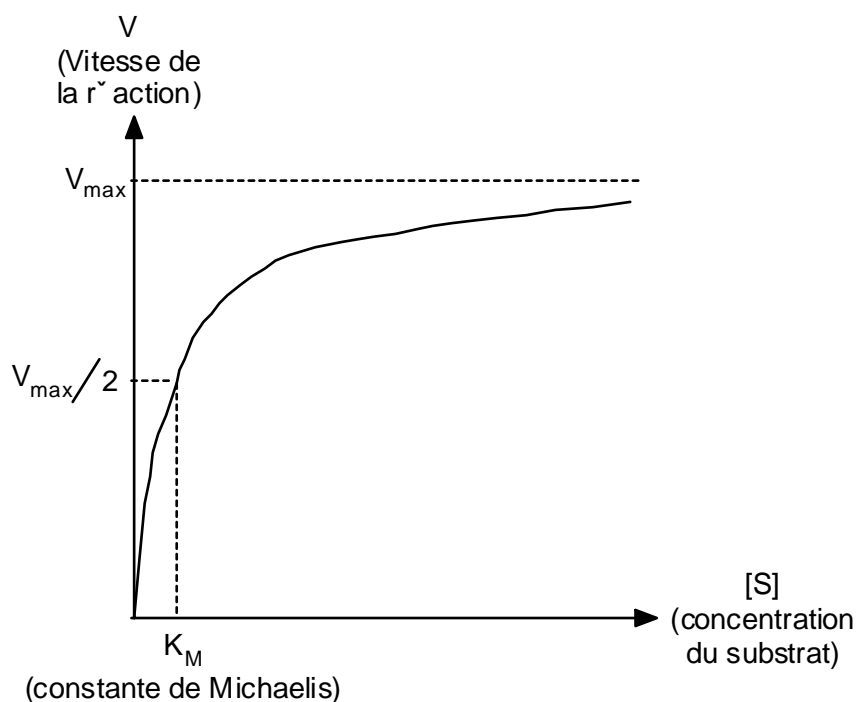
où E = enzyme, S = substrat, ES = complexe enzyme-substrat, P = produit.

La première étape consiste en la liaison rapide et réversible entre l'enzyme et le substrat pour former le complexe enzyme-substrat (ES). Les constantes de vitesse de cette réaction réversible sont k_1 et k_{-1} . Des changements chimiques s'ensuivent au sein du site actif, avec des ruptures et des formations de liaisons pour aboutir au produit de la réaction (P). La constante de cette réaction est k_2 . Cette réaction est réversible, mais l'on se place dans des conditions où la constante k_{-2} est négligeable. Des arguments en faveur de ce modèle de réaction enzymatique peuvent être obtenus en mesurant la vitesse globale de formation du produit (ou de disparition du substrat, ce qui est évidemment la même chose).

Si l'on mesure cette vitesse en présence d'une quantité constante d'enzyme et des quantités variables de substrat, toutes choses égales par ailleurs (notamment la température et le pH étant maintenus constants), on obtient une courbe telle que celle qui est représentée page suivante. La vitesse augmente jusqu'à un certain point au-delà duquel elle reste constante : c'est la vitesse maximum de la réaction ou V_{max} . L'enzyme est alors saturé par le substrat, et chaque molécule d'enzyme catalyse la réaction au niveau le plus élevé possible dans les conditions de l'expérience. Cette courbe est une hyperbole rectangulaire dont l'équation générale est de la forme: $y = a.x/(b + x)$, où a et b sont des constantes. Soit la vitesse (V) en fonction de la concentration en substrat [S], $V = f([S]) = a.[S]/(b + [S])$

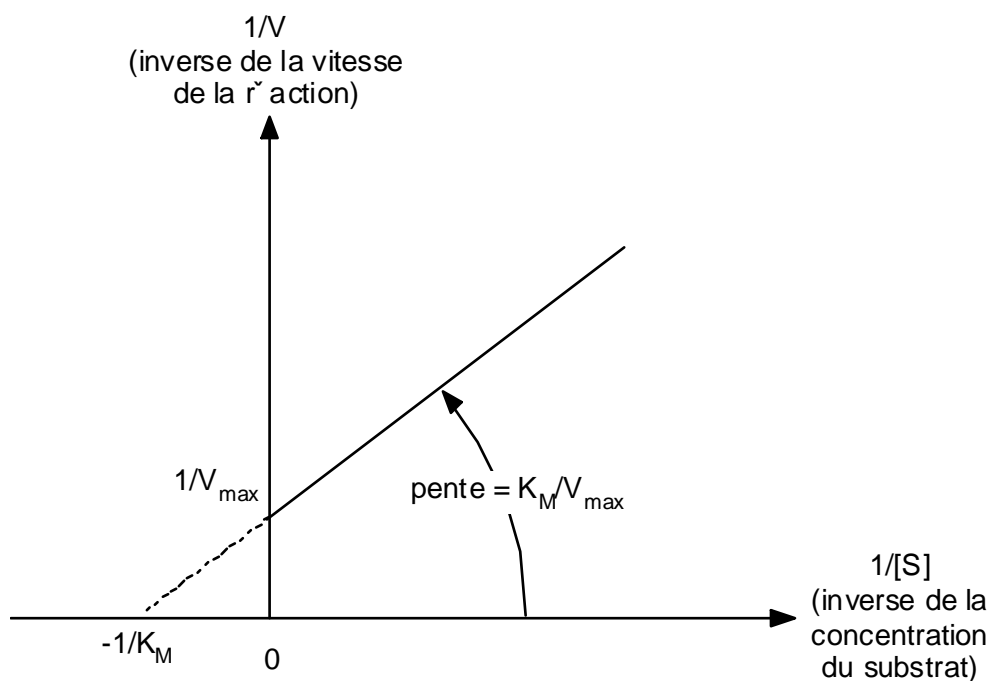
Une analyse cinétique réalisée la première fois par Michaelis et Menten permet de démontrer que, pour une réaction catalysée par un enzyme, a est égal à V_{max} ; la constante b est appelée *constante de Michaelis, K_M* . L'équation de Michaelis-Menten s'écrit :

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$



La constante de Michaelis K_M est une caractéristique fondamentale très utile d'un couple enzyme-substrat. K_M est égale à la concentration de substrat à laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximum V_{max} . En d'autres termes, quand $V = V_{max}/2$, alors $[S] = K_M$. Selon le mécanisme précis de la réaction, K_M est une fonction complexe des constantes k_1 , k_{-1} et k_2 . K_M peut être considéré comme un index exprimant la facilité avec laquelle l'enzyme peut être saturé par le substrat (c'est-à-dire l'affinité de l'enzyme pour le substrat). Plus la valeur de K_M est basse, plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est élevée.

L'extrapolation d'une hyperbole à partir de quelques points n'est pas facile : il est malaisé de tracer une courbe telle que celle qui est représentée ci-dessus à partir des mesures des vitesses réellement faites au cours d'expériences avec différentes concentrations de substrat. On peut prendre les inverses des deux membres de l'équation de Michaelis-Menten, et, en effectuant quelques opérations mathématiques simples, l'équation devient celle d'une fonction linéaire de type $y = ax + b$. Dans cette *transformation due à Lineweaver et Burk*, l'inverse de la vitesse est exprimé en fonction de l'inverse de la concentration du substrat et de K_M et V_{max} . Le graphe représentant cette fonction linéaire est appelé graphe en double inverse puisque les deux variables sont respectivement les inverses des variables de l'hyperbole précédente. Une telle droite (figure page suivante) est facile à tracer à partir des mesures expérimentales



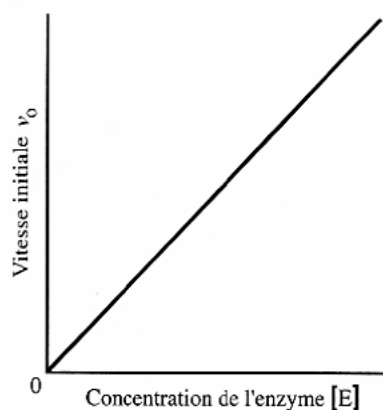
Son équation est la suivante :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

L'étude de cette fonction montre que l'ordonnée à l'origine est égale à l'inverse de la V_{\max} , la pente vaut K_M/V_{\max} , et, si l'on prolonge la droite, son intersection avec l'axe des x ($1/[S]$) est égale à $-1/K_M$. Cette représentation permet de déterminer graphiquement les valeurs de K_M et V_{\max} .

5. 2 Vitesse (V) de la réaction en fonction de la concentration d'enzyme (E)

Contrairement au K_M , la V_{\max} n'est pas une constante. Dans certaines conditions, les valeurs de la vitesse instantanée et de la V_{\max} varient d'ailleurs linéairement avec la concentration d'enzyme, comme l'illustre la figure ci-dessous.



6. CONTROLE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

6.1 Introduction

Nous avons noté que la vitesse d'une réaction enzymatique dépendait de l'environnement de l'enzyme : de la concentration de substrat (voir 5.1), et des cofacteurs (voir 4). Nous venons de voir que la vitesse dépend aussi de la concentration de l'enzyme (voir 5.2). Par conséquent, elle est fonction de l'intensité de la synthèse et de la dégradation de l'enzyme. La situation de l'enzyme dans tel ou tel compartiment cellulaire, ou dans les espaces extracellulaires, est également un facteur déterminant. De fait, un enzyme peut être séquestré dans un compartiment où son accès à son (ou ses) substrat(s) est limité. Par exemple, la dégradation des protéines cellulaires est contrôlée par la localisation des enzymes protéolytiques dans les lysosomes.

A côté des facteurs affectant la concentration et/ou la localisation des enzymes, il existe divers mécanismes régulateurs qui vont altérer l'activité catalytique intrinsèque des enzymes. L'activité enzymatique peut s'exprimer par la quantité de substrat transformée par unité de temps et par molécule (ou unité de masse) d'enzyme, ou par la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 1 unité (par exemple 1 molécule) de substrat par unité de temps, dans des conditions définies.

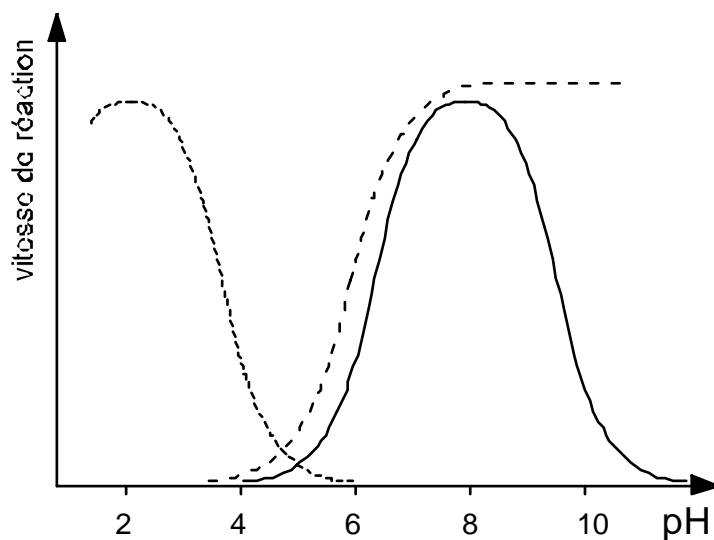
Le fait que la quasi-totalité des réactions qui surviennent dans l'organisme soient catalysées par des enzymes permet donc un contrôle très fin de la vitesse de ces réactions, via des modifications de l'activité des enzymes. Ces modifications sont une caractéristique essentielle, vraiment très importante, des enzymes, qui les distinguent encore des catalyseurs non organiques. Ainsi, étant donné qu'ils sont des protéines, les enzymes sont sensibles aux variations du pH ou de la température qui peuvent affecter considérablement leur activité. C'est à la régulation de l'activité des enzymes que la suite de ce cours est consacrée.

6.2 Rôle du pH

Beaucoup d'enzymes ont un pH caractéristique pour lequel la vitesse de la réaction catalysée est maximum, et souvent la vitesse diminue en deçà et au-delà de cette valeur de pH. La

figure ci-dessous qui exprime la vitesse de la réaction en fonction du pH (toutes choses égales par ailleurs) pour trois enzymes distinctes en fournit une illustration. Elle montre que l'activité enzymatique dépend du pH et que cette dépendance est spécifique à chaque enzyme.

Ces courbes dépendent de divers facteurs. En particulier, quand le pH change, l'état d'ionisation des groupements chargés, aussi bien dans le site actif de l'enzyme (en fonction du pK propre à chaque résidu chargé participant à la constitution du site actif) que dans le substrat, varie, ce qui affecte la vitesse de formation et de dissociation du complexe enzyme-substrat. Le pH optimum d'un enzyme n'est pas forcément identique au pH de son environnement « normal », ce qui indique que le pH local peut exercer une influence régulatrice sur l'activité de l'enzyme. En outre, le pH optimum pour l'activité enzymatique ne correspond pas nécessairement au pH auquel la protéine enzymatique est la plus stable, et un effet des variations de pH peut être de provoquer une dénaturation de la protéine enzymatique.

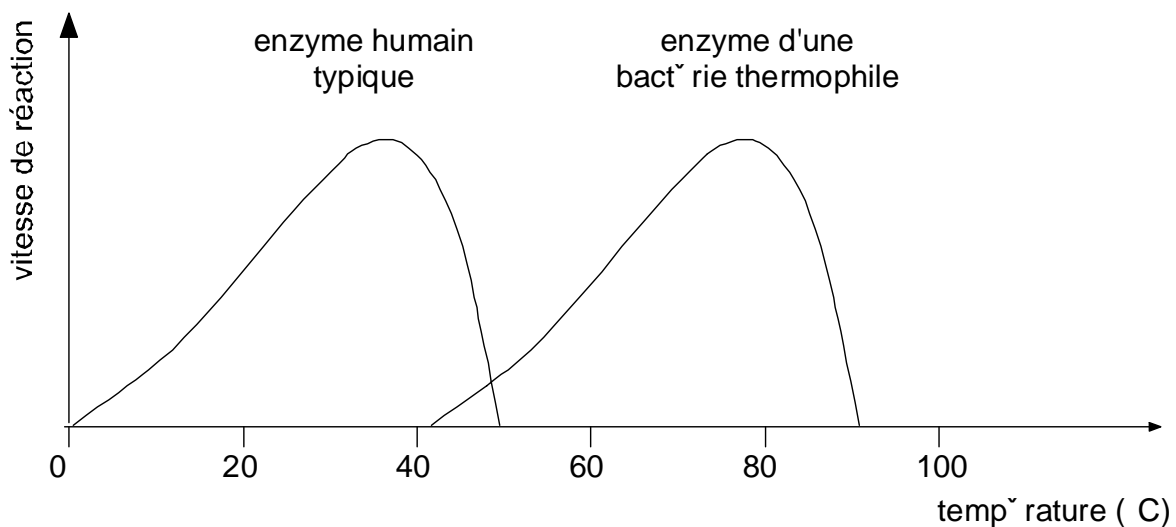


6.3 Rôle de la température

Les effets de la température sur l'activité d'un enzyme sont complexes et peuvent être considérés comme le résultat de l'action de deux forces agissant simultanément mais dans des sens opposés. Quand la température augmente, la vitesse de la réaction augmente (en raison de l'accroissement de l'énergie cinétique des molécules), mais en même temps il y a une

inactivation (dénaturation) progressive de la protéine enzymatique. Cette dénaturation est d'autant plus prononcée que la température augmente, de telle sorte que, comme on le voit dans la figure ci-dessous, il existe une température optimale apparente. La dénaturation thermique est fonction du temps, et, pour un enzyme, l'expression « température optimale » n'a pas grand sens si la durée de l'exposition à une température donnée n'est pas indiquée.

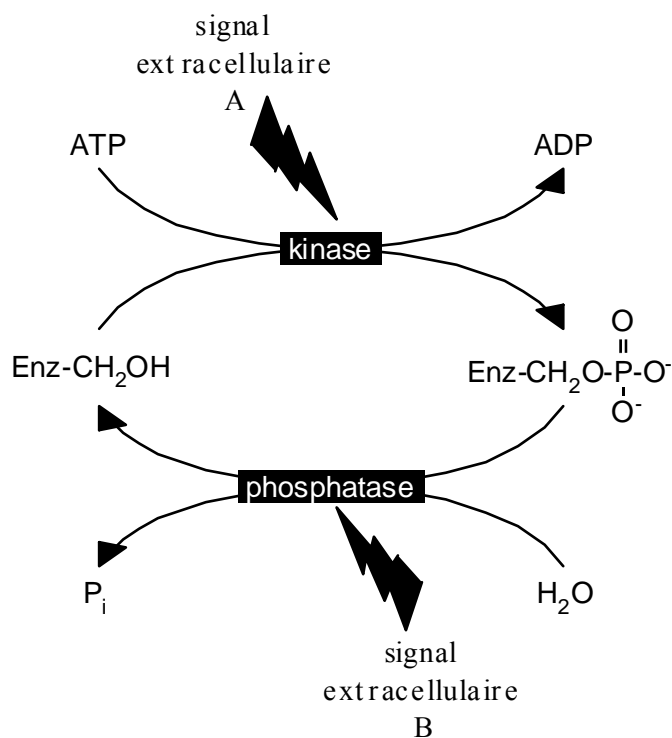
La température à laquelle la dénaturation devient un facteur important varie d'un enzyme à l'autre. Généralement, la dénaturation est négligeable en dessous de 30°C et commence à être appréciable au-delà de 40°C. Quelques enzymes gardent une activité importante à des températures bien supérieures, par exemple les enzymes des bactéries thermophiles (figure ci-dessous), et cette propriété a des applications pratiques importantes.



6.4 Modifications covalentes des enzymes

6.4.1 Modifications réversibles

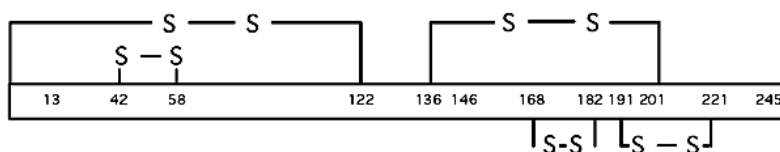
Il s'agit le plus souvent d'un processus de phosphorylation/déphosphorylation de l'enzyme (figure page suivante). Selon l'enzyme, il permet temporairement soit l'activation soit l'inhibition de son activité, fréquemment en réponse à un signal extracellulaire. Ce processus implique des résidus sérine, thréonine ou tyrosine de l'enzyme. Il met en jeu des protéine kinases (addition de phosphate) et des protéine phosphatases (suppression de phosphate). Chaque réaction est « irréversible », mais, comme l'illustre la figure, l'ensemble du processus est réversible.



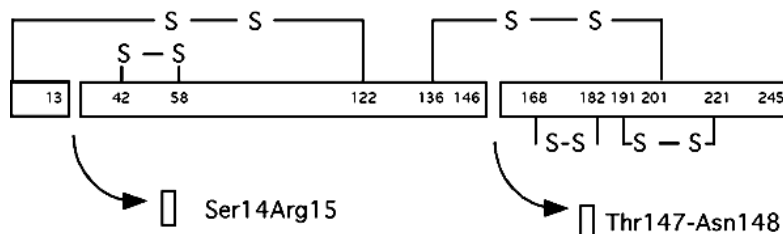
6.4.2 Modifications irréversibles

L'activité des enzymes peut être contrôlée de manière irréversible par protéolyse ménagée, dont il existe plusieurs modes. C'est un processus d'activation courant des enzymes digestifs, et des enzymes de la cascade de la coagulation du sang. On appelle zymogène le précurseur inactif d'un enzyme activé par protéolyse. La figure ci-dessous présente l'exemple de la chymotrypsine, un enzyme produit par le pancréas qui le secrète dans l'intestin où il participe à la digestion des protéines alimentaires.

Chymotrypsinogène (zymogène inactif)



Chymotrypsine (protéase active)



6.5 Rôle des agents modulateurs

L'activité des enzymes peut être contrôlée par des agents modulateurs, inhibiteurs ou activateurs, impliquant divers mécanismes schématiquement exposés ci-après.

7. LES AGENTS MODULATEURS DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

7.1 Inhibitions irréversibles

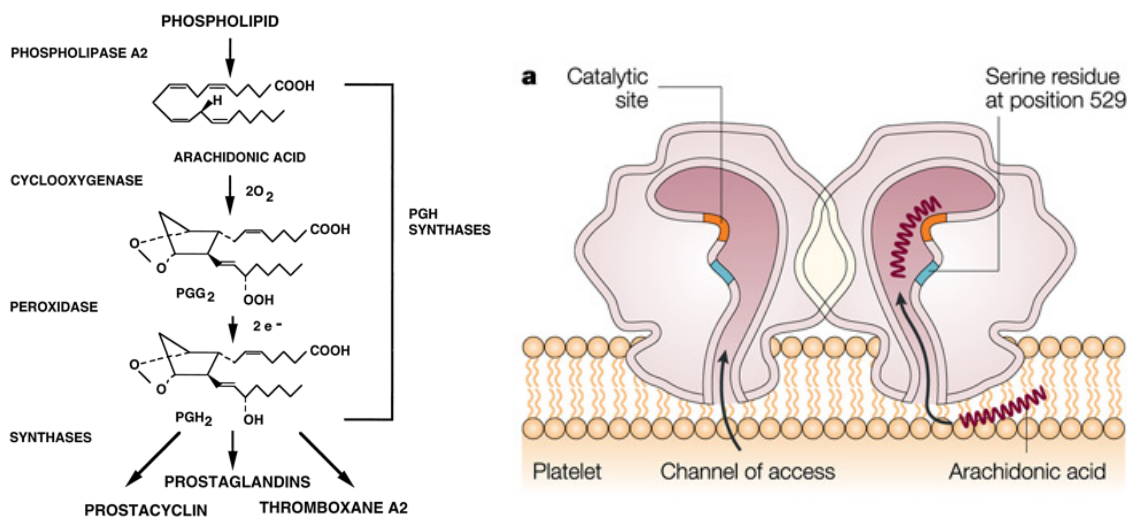
L'inhibition irréversible d'un enzyme aurait un intérêt modeste, voire nul, dans le cadre du contrôle physiologique du métabolisme, dont les réactions doivent plutôt être ajustées en permanence que définitivement bloquées tant que de nouvelles molécules d'enzymes ne sont pas synthétisées. En revanche, et cela permet de noter que les enzymes sont la cible de nombreux médicaments, une inhibition enzymatique irréversible peut avoir un intérêt thérapeutique.

Soit un médicament parmi les plus anciens, les plus connus et les plus utilisés, l'aspirine. Il fait partie d'une classe de médicaments appelés Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS). Les AINS inhibent des enzymes, les cyclo-oxygénases (COX), qui concourent à la production des prostaglandines, de la prostacycline et du thromboxane à partir de l'acide arachidonique (voir la figure page suivante). On les appelle d'ailleurs aussi prostaglandine synthases.

Les COX forment une sorte de canal dans lequel le substrat, l'acide arachidonique, entre pour être transformé. La plupart des AINS sont des inhibiteurs réversibles des COX. En revanche, en acétylant, c'est-à-dire en formant une liaison covalente (liaison ester) avec la fonction hydroxyle d'une sérine de la protéine enzymatique, sérine qui est à proximité du site catalytique, mais non en son sein, l'aspirine provoque de manière irréversible pour chaque molécule d'enzyme ainsi modifiée un encombrement dans la lumière du canal qui empêche le substrat d'y entrer et donc d'être transformé. L'activité enzymatique est donc bloquée irréversiblement, jusqu'à ce que l'organisme ait de nouveau synthétisé l'enzyme (voir la figure page suivante).

La capacité limitée des plaquettes (anucléées) à régénérer des protéines en fait une cible particulière de l'aspirine. L'administration chronique de faibles doses d'aspirine provoque une

réduction de la production du principal produit de l'action des COX plaquettaires, le thromboxane, qui est vasoconstricteur et favorise l'agrégation plaquettaire et la thrombose. L'aspirine à faible dose est ainsi un traitement préventif secondaire efficace de l'infarctus du myocarde et des accidents vasculaires cérébraux.



7.2 Inhibitions réversibles

Les inhibiteurs réversibles des enzymes sont des molécules qui vont interférer avec une étape de la catalyse. Ils sont très utiles pour la compréhension des mécanismes enzymatiques ; ils peuvent être aussi, nous venons de le signaler pour les AINS (sauf l'aspirine), des médicaments importants. Les inhibiteurs réversibles se fixent sur l'enzyme à l'aide de liaisons faibles comme celles engagées entre l'enzyme et le substrat. Celles-ci se forment rapidement et peuvent être rompues facilement.

Il existe trois types d'inhibition enzymatique réversible selon le mécanisme d'action de la molécule inhibitrice : inhibition compétitive, incompétitive et non compétitive.

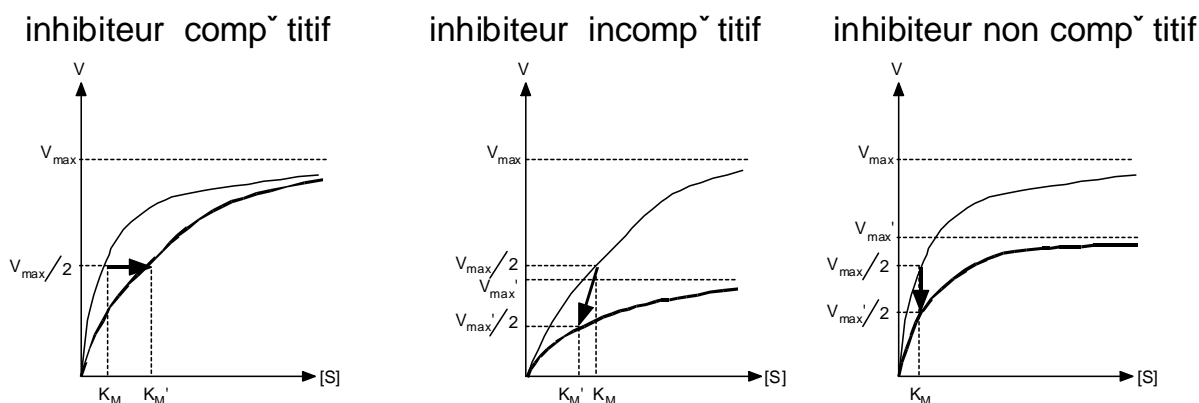
7.2.1 Inhibition compétitive (E)

Un inhibiteur compétitif se fixe sur la forme libre de l'enzyme, au niveau du site actif, en lieu et place du substrat avec lequel il a, le plus souvent, une parenté structurale (qui lui permet de prendre la place du substrat). La fixation d'un inhibiteur (I) sur (E) aboutit à la formation d'un

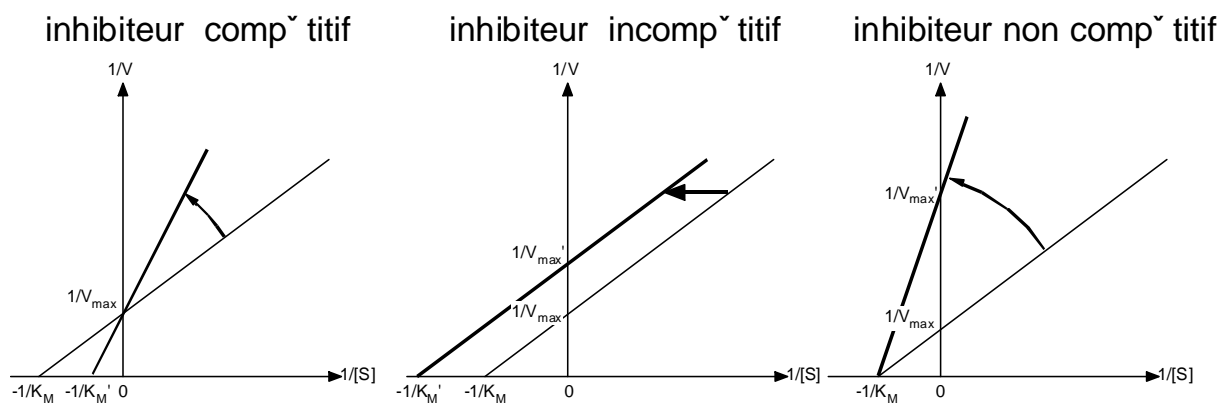
complexe binaire (EI) complètement déplaçable en présence d'un excès de substrat.

Autrement dit, il est possible de décrocher l'inhibiteur fixé sur l'enzyme et de le remplacer par le substrat. Donc, la V_{max} déterminée en présence de I ne changera pas par rapport à celle obtenue en absence de I. En revanche, la fixation de I sur E déplace l'équilibre $E + S \rightleftharpoons ES$ en faveur de E, dont la concentration augmente aux dépens de celle de ES. Donc, le K_M (apparent) augmente en présence de I. L'affinité apparente de l'enzyme pour S diminue (figure ci-dessous).

Représentation de Michaelis-Menten



Représentation de Lineweaver-Burk



7.2.2 Inhibition incompétitive (ES)

L'inhibiteur incompétitif ne peut se fixer que sur l'enzyme préalablement complexé au substrat (ES). Cette fixation aboutit à la formation d'un complexe ternaire ESI, non productif. La fixation de I sur ES déplace l'équilibre $E + S \rightleftharpoons ES$ en faveur de ES dont la

concentration augmente. Donc K_m diminue : l'affinité apparente de l'enzyme pour son substrat augmente. Comme une partie de l'enzyme reste piégée sous forme de ESI, la V_{max} est diminuée. Ainsi, ce type d'inhibition est connu cinétiquement par une diminution parallèle de K_m (augmentation de l'affinité de E pour S) et de V_{max} (figure page précédente).

7.2.3 Inhibition non compétitive (E/ES)

L'inhibiteur se fixe avec la même affinité sur les formes libre (E) et complexée (ES) de l'enzyme. L'inhibiteur n'affecte pas la combinaison du substrat à son enzyme. L'équilibre $E + S \rightleftharpoons ES$ est déplacé pareillement dans les deux sens. K_m reste inchangée (l'affinité de l'enzyme pour S ne varie pas). En revanche, la formation d'un complexe ternaire ESI non totalement déplaçable par excès de substrat fait diminuer V_{max} (figure page précédente).

7.2.4 Exemples et applications

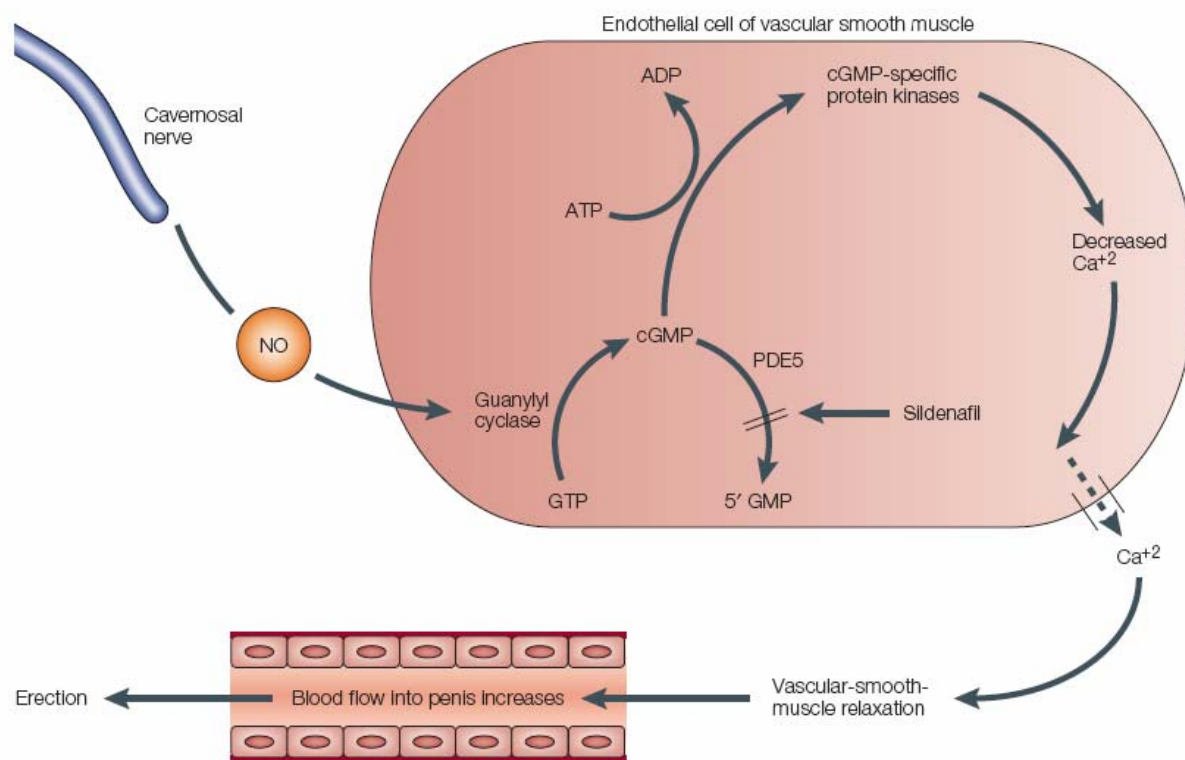
Un grand nombre de médicaments sont des inhibiteurs compétitifs. Un exemple très classique est fourni par les sulfamides. Ces molécules sont des agents anti-infectieux. Etant des analogues de l'acide p-aminobenzoïque, les sulfamides entrent en compétition avec ce substrat lors de la biosynthèse de l'acide folique nécessaire pour la croissance des bactéries. Les sulfamides ne sont pas nocifs pour l'Homme qui ne synthétise pas l'acide folique.

Les phosphodiésterases (PDEs) constituent une superfamille d'enzymes qui dégradent les seconds messagers intracellulaires que sont l'adénosine monophosphate (AMP) cyclique (AMPc) et la guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Vingt-et-un gènes codant des PDEs ont été identifiés chez l'Homme. Les PDEs sont divisées en 11 familles en fonction de leur similarité structurale et de leurs propriétés catalytiques (telles la spécificité de substrat, la cinétique...). Comme l'AMPc et le GMPc régulent de très nombreuses fonctions cellulaires, les PDEs sont la cible de médicaments pour traiter diverses affections.

Par exemple, le sildénafil (Viagra®) est un analogue du GMPc et, en conséquence, un inhibiteur compétitif de la phosphodiésterase de type 5 (PDE5) spécifique du GMPc. Il augmente l'effet du signal transmis par le NO dans les corps caverneux du pénis et renforce l'érection (figure page suivante). Comme l'inhibiteur est également actif sur d'autres familles de PDE (PDE1, PDE2, PDE3, PDE4, PDE6...), il a des effets indésirables. En effet, PDE3 et

PDE6 sont impliquées, respectivement, dans la contraction cardiaque et la vision des couleurs. Le Cialis® (tadalafil) et le Lévitra® (vardenafil) sont d'autres inhibiteurs de la PDE5.

Physiologiquement, l'activité de l'enzyme dépend de son degré de phosphorylation (voir plus haut, 6.4.1) : sous l'action de protéine kinases, l'activité de l'enzyme augmente en raison de la phosphorylation d'un résidu sérine. La PDE5 est un enzyme allostérique (voir plus bas, 8) : le GMPc l'active en se fixant sur un site régulateur, distinct bien sûr du site catalytique. Le GMPc est donc à la fois substrat et régulateur allostérique de la PDE5.



7.3 Activations

A côté des inhibiteurs enzymatiques, il existe des effecteurs qui modulent l'activité des enzymes en sens inverse. Ce sont des activateurs. Cet aspect de la régulation de l'activité enzymatique ne sera pas développé ici.

8. ENZYMES ALLOSTERIQUES

8.1 Généralités

Ces enzymes ne sont autres que des protéines allostériques présentant des propriétés semblables à celles de l'hémoglobine.

Les enzymes allostériques font intervenir une liaison réversible, non covalente, d'une molécule régulatrice appelée *modulateur*, ou *effecteur*, *allostérique*. Le terme allostérique vient du grec *allos*, autre, et *stereos*, forme. Les enzymes allostériques prennent une autre forme (une autre conformation) à la suite de la liaison du modulateur. Ce sont des protéines complexes possédant généralement *plusieurs sous-unités*. Il existe au moins un *site de fixation pour le substrat* (site actif, catalytique) et au moins un *site de fixation (spécifique) pour un modulateur* (site régulateur). Dans certains cas, le site régulateur et le site actif sont sur des sous-unités différentes. Les modulateurs des enzymes allostériques peuvent être des *inhibiteurs* ou au contraire des *activateurs*.

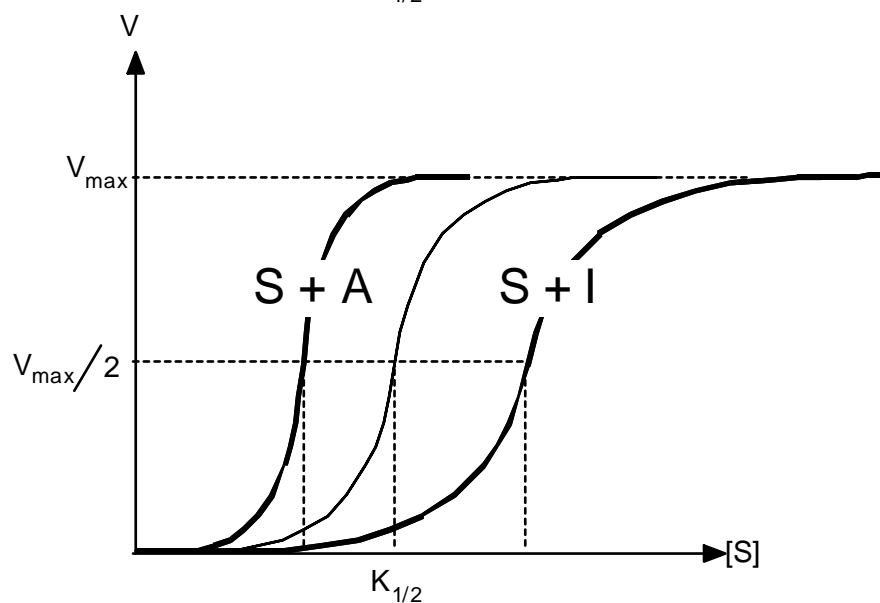
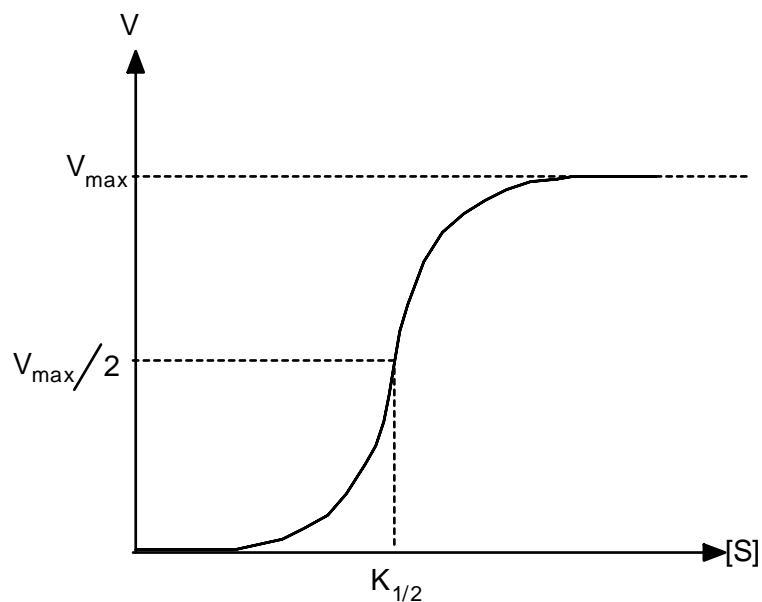
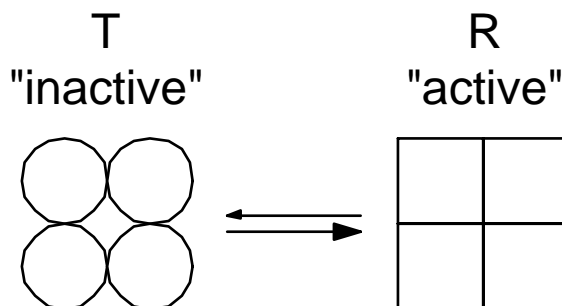
Pour beaucoup d'enzymes allostériques, mais pas pour tous, si on trace v en fonction de S , on obtient une courbe sigmoïde, comme celle qui correspond à la liaison de l'oxygène sur l'hémoglobine, et non l'hyperbole caractéristique des enzymes michaeliens. La saturation est tout de même obtenue pour des concentrations de S suffisantes. Bien qu'il existe sur la courbe sigmoïde de saturation une concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de la vitesse maximale, il n'est pas correct de l'appeler K_m , puisque l'enzyme n'est pas michaelien. On utilisera les expressions $S_{0,5}$ ou $K_{0,5}$ ($K_{1/2}$) pour désigner cette concentration de substrat donnant pour un enzyme allostérique une vitesse de réaction égale à la moitié de la vitesse maximale (figure page suivante).

Une cinétique sigmoïde reflète en général des interactions coopératives entre plusieurs sous-unités protéiques. En d'autres termes, des changements dans la structure d'une sous-unité se traduisent par des changements dans la structure des autres sous-unités, à la suite d'interactions non covalentes à l'interface entre les sous-unités.

Les principes et les modèles sont semblables à ceux qui sont présentés à propos de la liaison coopérative de l'oxygène à la protéine non enzymatique hémoglobine, avec un état tendu (T) et un état relâché (R). Le modèle tout ou rien ou symétrique, et le modèle séquentiel, peuvent être rassemblés. En effet, les deux modèles ne s'excluent pas mutuellement. De fait, le modèle

symétrique peut être considéré comme un cas limite, tout ou rien, du modèle séquentiel. En réalité, le mécanisme précis des interactions allostériques n'a pas été établi.

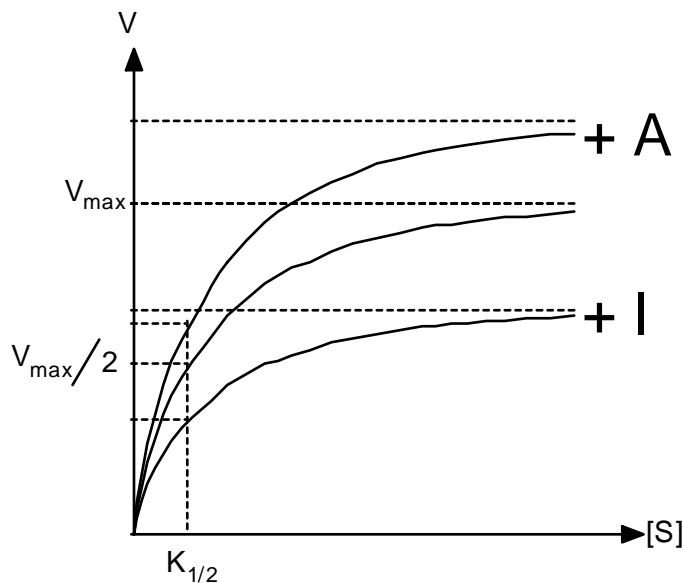
8.2 Enzymes allostériques du système K (les plus nombreux)



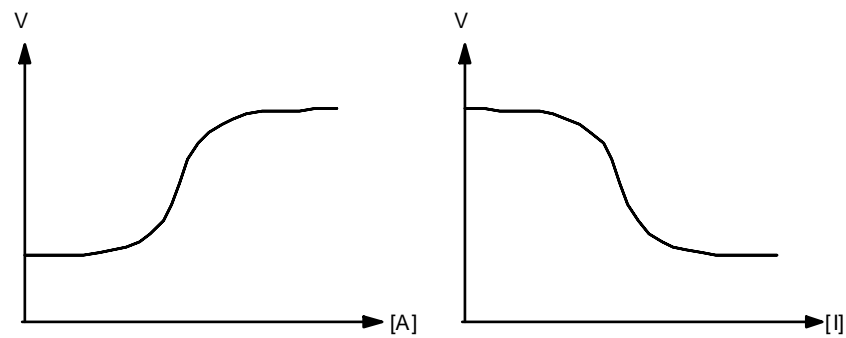
Ce sont des enzymes où le substrat et l'effecteur présentent des affinités différentes pour les formes R et T de l'enzyme. Il en résulte une fixation toujours sigmoïde. Les formes R et T ont une même vitesse maximale. Sur le plan cinétique, ce sont des enzymes où l'effecteur ne peut modifier que l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat. L'affinité pour le substrat (S) diminue en présence d'un inhibiteur allostérique (I). Elle augmente en présence d'un activateur allostérique (A) (figure page précédente). Ainsi, la variation de la concentration d'un effecteur entraîne des modifications très marquées de la vitesse de la réaction. Il en est de même concernant la dépendance vis-à-vis de la concentration de substrat.

8.2 Enzymes allostériques du système V

Les enzymes allostériques du système V sont caractérisés par le fait que le substrat (S) a la même affinité pour les deux formes d'enzyme R et T. Tout se passe comme s'il n'y avait qu'une seule forme d'enzyme. Il en résulte une fixation hyperbolique de S. La coopérativité semble absente. Activateur (A) et inhibiteur (I) modifient la vitesse sans modifier l'affinité (figure ci-dessous).



Pour tout enzyme allostérique, on met en évidence l'effet coopératif des effecteurs (activateur : A ; inhibiteur : I) par mesure de la vitesse en faisant varier leur concentration à concentration de substrat constante. C'est une façon de détecter le caractère allostérique des enzymes du système V (figure page suivante).



9. CLASSIFICATION DES ENZYMES

La quasi-totalité des réactions qui se produisent dans l'organisme sont catalysées par des enzymes. Ces réactions sont régulées, entre autres, via la modulation de l'activité des enzymes. Très nombreux, les enzymes peuvent être regroupés en 6 classes, comme l'indique le tableau ci-dessous.

- | | |
|---------------------------|---|
| 1. Oxydoréductases | Transfert d'électrons |
| 2. Transférases | Transfert de groupes chimiques d'un composé à un autre |
| 3. Hydrolases | Coupure de liaisons grâce à l'apport d'eau |
| 4. Lyases ou Synthases | Addition de groupes sur une double liaison ou formation d'une double liaison par soustraction d'un groupe |
| 5. Isoméras | Transfert de groupe à l'intérieur d'une molécule pour former un isomère |
| 6. Ligases ou Synthétases | Formation de liaisons C-C, C-S, C-O ou C-N utilisant l'énergie fournie par la rupture d'une liaison pyrophosphate d'un triphosphonucléotide (tel l'ATP) |