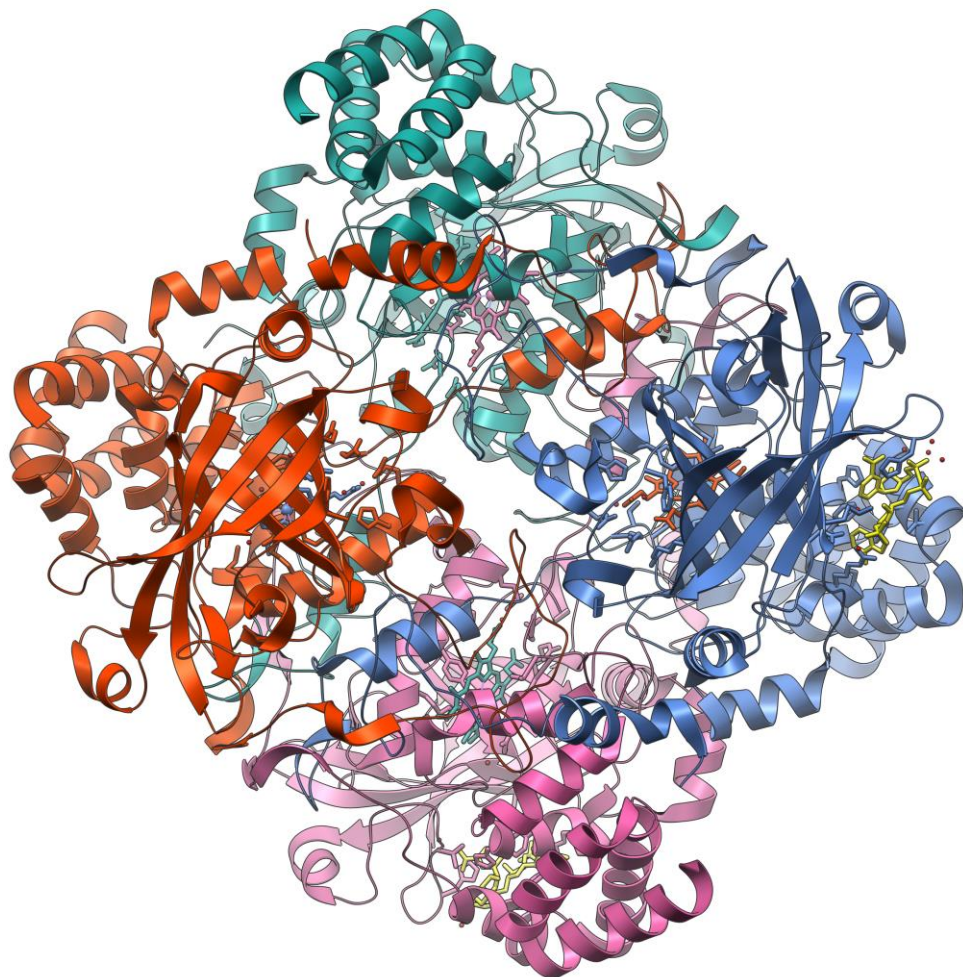




LES ENZYMES

(VERSION CHIMIE ORGANIQUE)



Floris Chevallier

floris.chevallier@ens-lyon.fr

+33 (0)4 72 72 87 33

Les enzymes

Introduction

Structure

Site actif

Catalyse

Inhibition

Classification

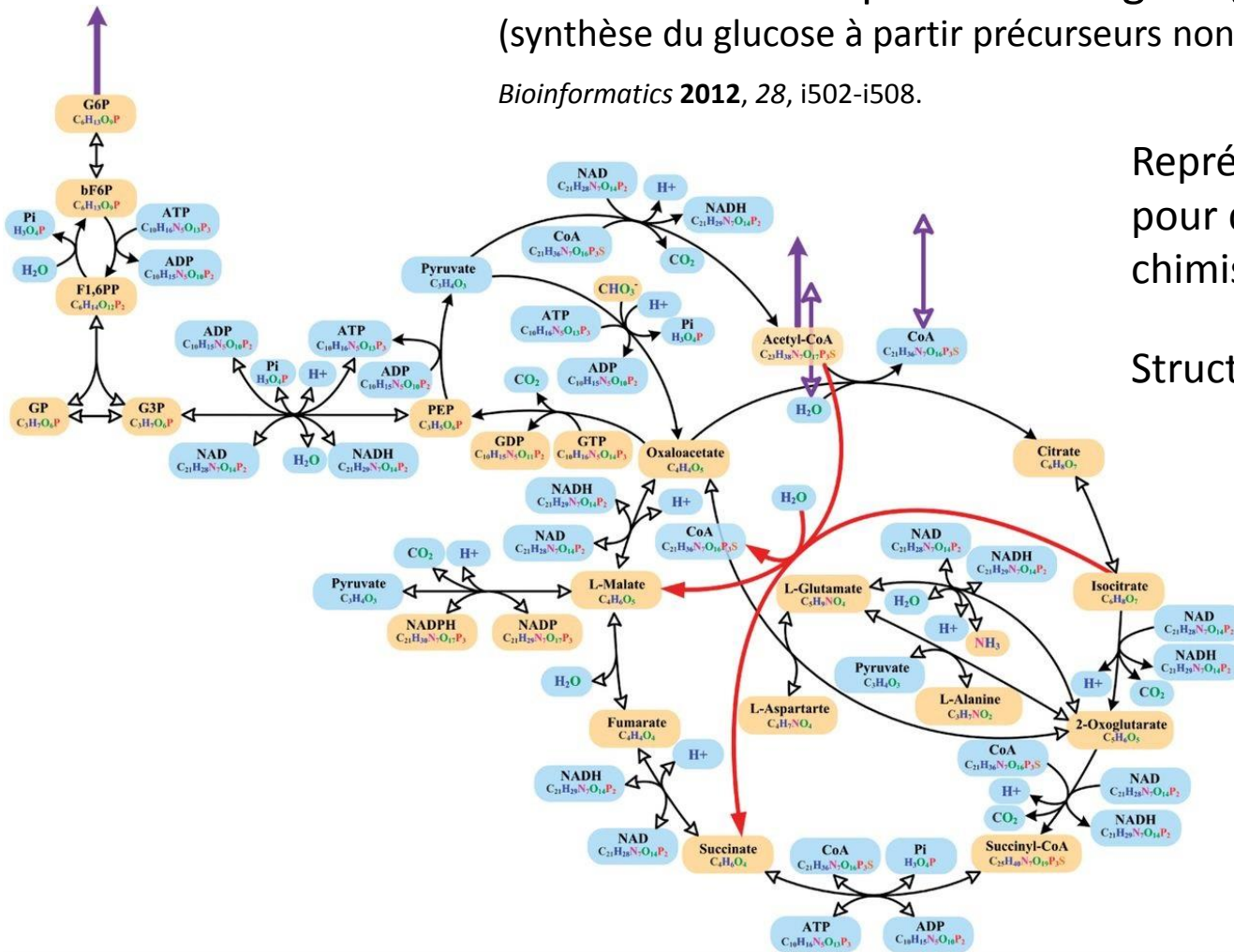
Applications

Bibliographie

Introduction

Modèle métabolique de la néoglucogenèse (synthèse du glucose à partir précurseurs non glucidiques)

Bioinformatics **2012**, 28, i502-i508.



Représentation adaptée
pour des biochimistes ou des
chimistes ?

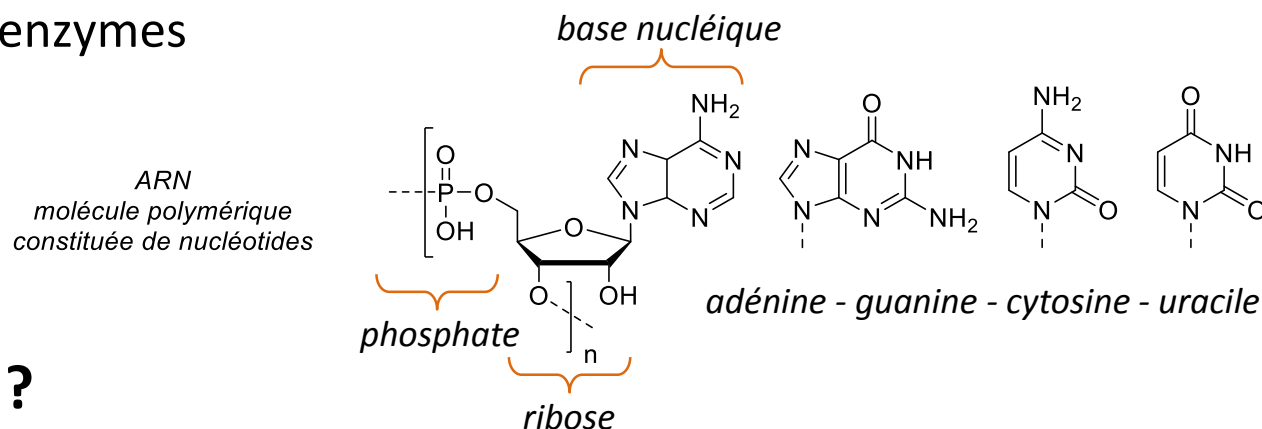
Structure ? Réactivité ?

Introduction

Enzyme

Protéine ayant des propriétés catalytiques... catalyseur protéique

À part les ribozymes (**a**cides **ribo**nucléiques), tous les catalyseurs chimiques intracellulaires sont des enzymes



Enzymes en synthèse organique ?

- + réactions avec haute régio-, chimio-, stéréo-sélectivité, faible coût...
- stabilité de l'enzyme (température, milieu) inhibition/dénaturation, spécificité de la réaction et du substrat...
- développement de catalyseurs synthétiques biomimétiques, modèles enzymatiques simplifiés

Introduction

Enzyme

Six classes d'enzymes :

- EC 1 : oxydoréductases (oxydoréduction)
- EC 2 : transférases (transfert de groupement fonctionnel ou de molécule)
- EC 3 : hydrolases (hydrolyse : esters, peptides, polysaccharides...)
- EC 4 : lyases (coupe sélectivement des liaisons C-C, C-O, C-N, C-S, C-X, P-O...)
- EC 5 : isomérases (racémisation, épimérisation, isomérisation *cis-trans*...)
- EC 6 : ligases (formation de liaisons covalentes entre deux molécules)

Introduction

Protéine

Macromolécule biologique constituée d'acides aminés associés

- holoprotéine = uniquement polypeptide(s)

- hétéroprotéine = apoprotéine + groupement prosthétique

polypeptide(s)

molécule organique, métal...

- la plupart des enzymes sont constituées :

enzyme = apoenzyme + cofacteur(s)

cofacteurs métalliques
(ions, clusters = agrégats
atomique par ex. Fe-S)

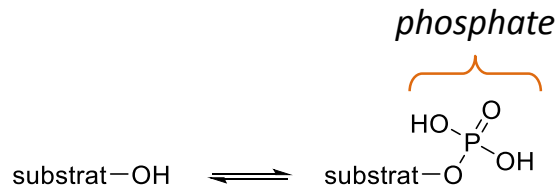
coenzymes
(molécules organiques et
organométalliques)

Introduction

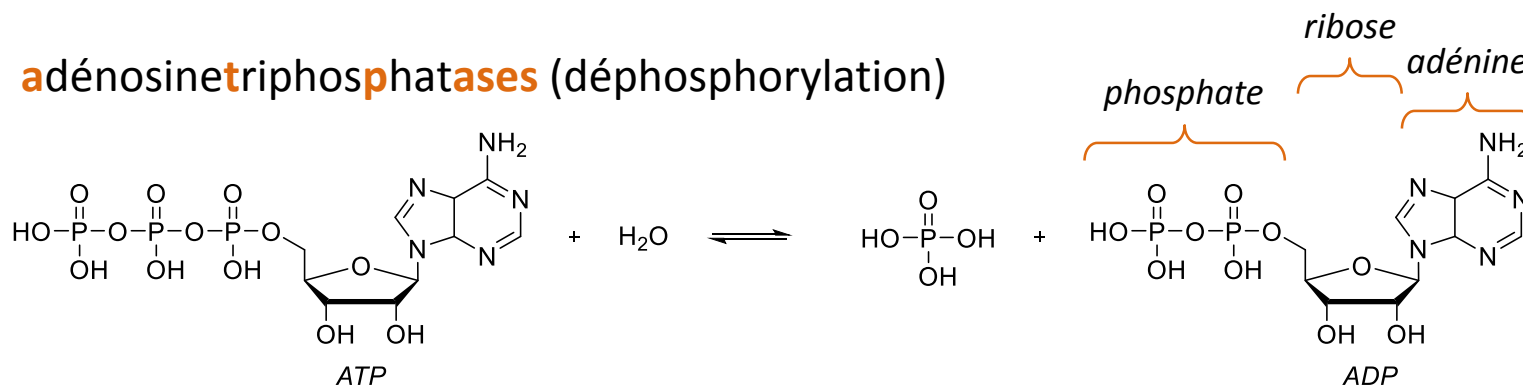
Cofacteurs métalliques

Mg²⁺

kinases (phosphorylation)



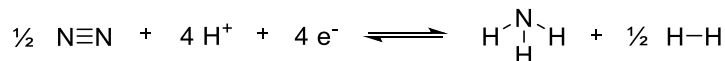
adénosinetriphosphatases (déphosphorylation)



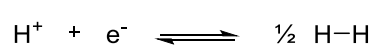
Fe²⁺/Fe³⁺ catalases (dismutation)



nitrogénases (réduction)

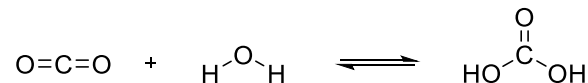


hydrogénases (réduction)



Zn²⁺

anhydrases carboniques (addition)



Introduction

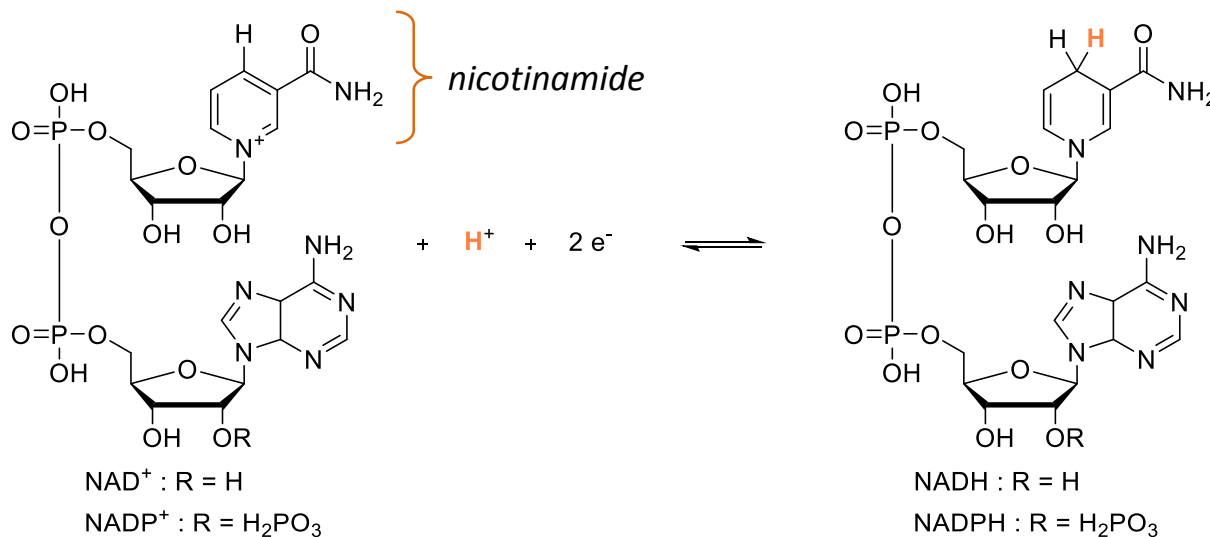
Coenzymes

Molécules organiques non-protéiques, que l'on peut classer en deux grandes catégories :

- coenzymes d'oxydoréduction

nicotinamide adénine dinucléotide NAD^+ / forme réduite NADH

nicotinamide adénine dinucléotide phosphate NADP^+ / forme réduite NADPH



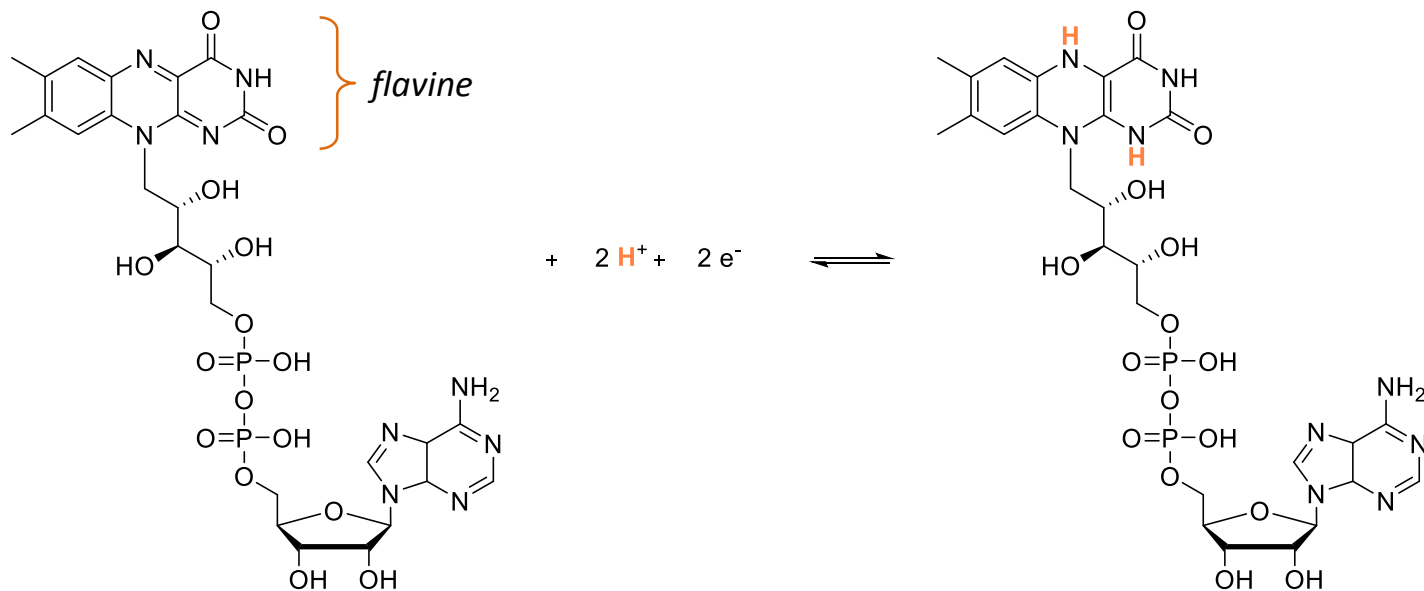
Introduction

Coenzymes

Molécules organiques non-protéiques, que l'on peut classer en deux grandes catégories :

- coenzymes d'oxydoréduction

flavine adénine dinucléotide FAD / forme réduite FADH₂



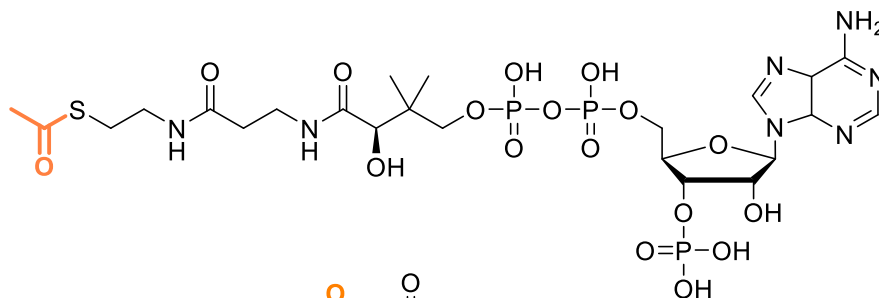
Introduction

Coenzymes

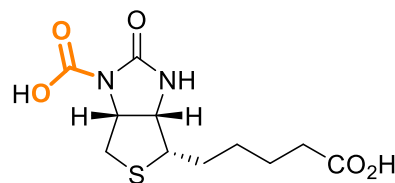
Molécules organiques non-protéiques, que l'on peut classer en deux grandes catégories :

- coenzymes d'oxydoréduction
- coenzymes de transport

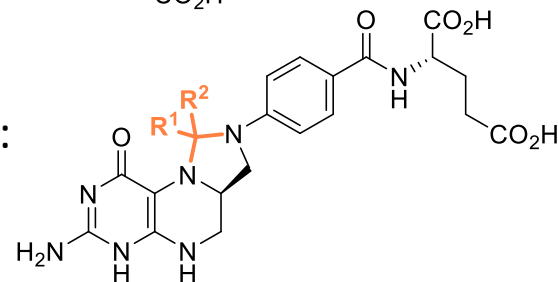
acétyl-coenzyme A / CoA :
transfert de groupements acétyle



carboxybiotine / biotine (vitamine B₈) :
transfert de dioxyde de carbone (carboxylases)



acide **méthylène**tétrahydro**f**olique / acide tétrahydrofolique :
transfert de groupes monocarbonés

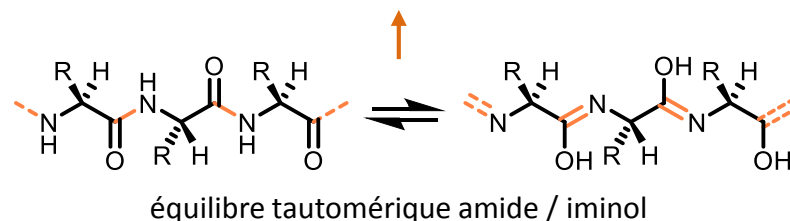
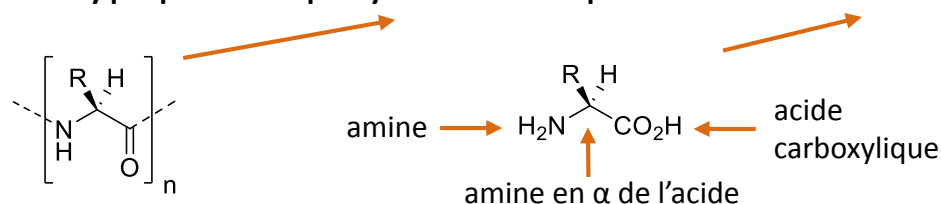


Structure des protéines

Protéine

Biopolymère (terme discutable) constitué de chaînes polypeptidiques (une ou plusieurs)

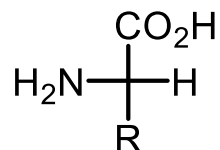
Polypeptide = polymère composé d'acides α -aminés associés par liaison peptidique



19/20 acides aminés naturels sont de configuration L, seule la glycine est achirale

$\rightarrow$ position gauche (latin *laevus*) de la fonction amine dans la projection de Fischer, i ne pas confondre avec levogyre / dextrogyre !

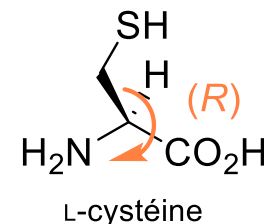
$\rightarrow$ caractère partiel de double liaison



distance CN 1,33 Å amide
1,47 Å amine
1,28 Å imine

18/20 acides aminés naturels sont de configuration (S), seule la cystéine est (R)

La thréonine et l'isoleucine ont un 2nd carbone stéréogène



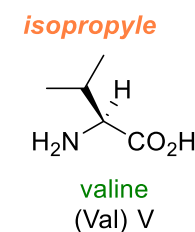
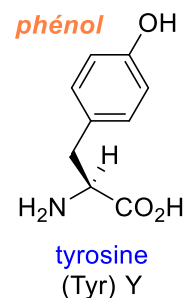
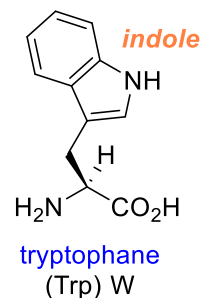
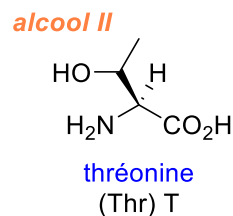
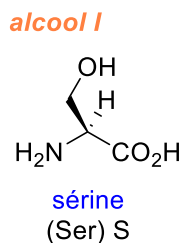
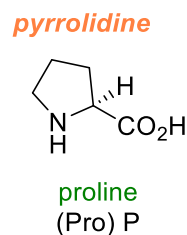
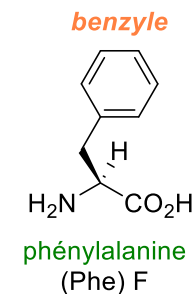
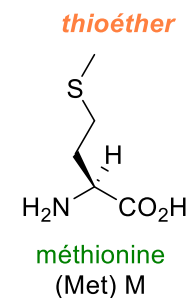
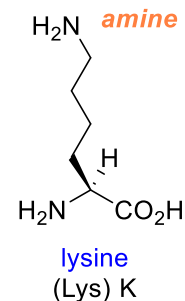
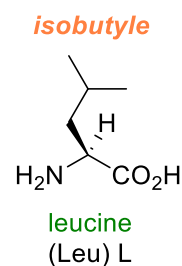
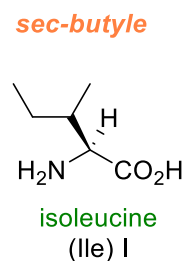
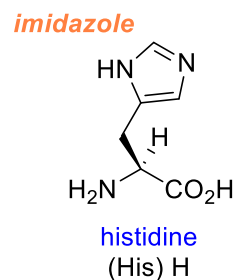
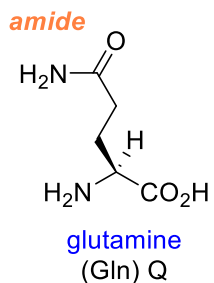
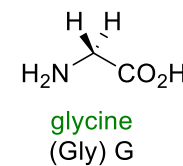
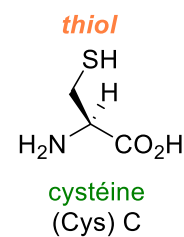
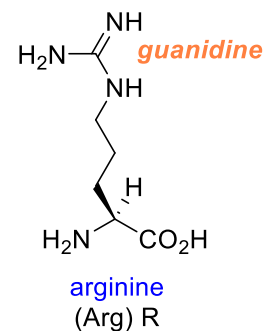
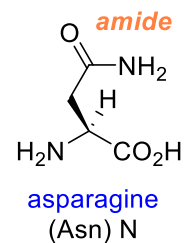
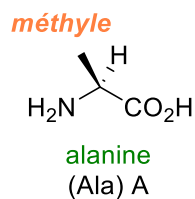
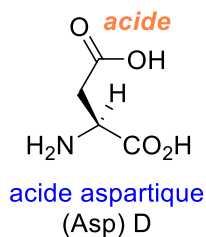
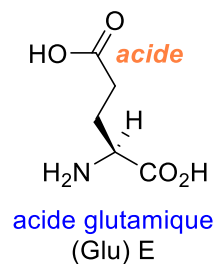
Structure des protéines

Protéine

polaire / hydrophobe

→ structure des protéines

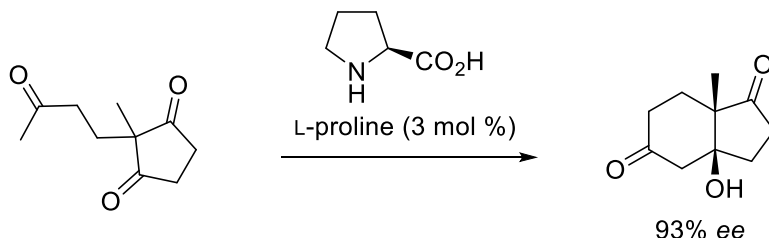
20 acides aminés protéinogènes standards :



Acides aminés en synthèse

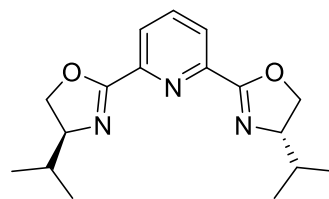
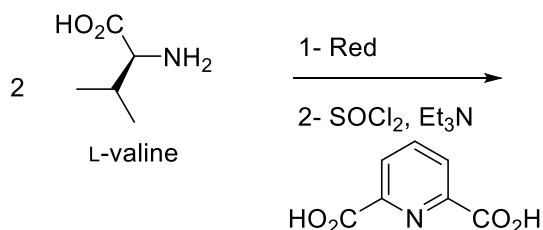
Source de chiralité : auxiliaires

Organocatalyse : ex. aldolisation intramoléculaire



J. Org. Chem. **1974**, 39, 1615-1621.

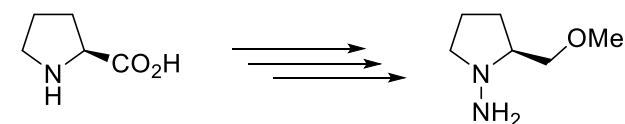
Synthèse de ligand : ex. PyBOX



Organometallics **1989**, 8, 846-848.

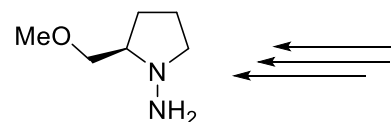
Réduction de cétones, addition sur des aldéhydes...

Accessibilité des énantiomères : ex. auxiliaires SAMP/RAMP de Corey et Enders

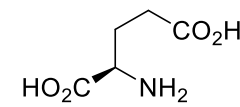


(*S*)-1-amino-2-methoxymethylpyrrolidine

Tetrahedron Lett.
1976, 17, 3-6.

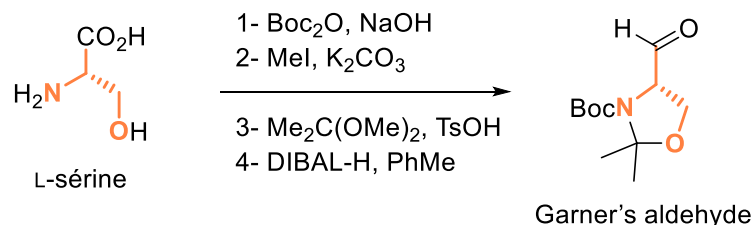


(*R*)-1-amino-2-methoxymethylpyrrolidine

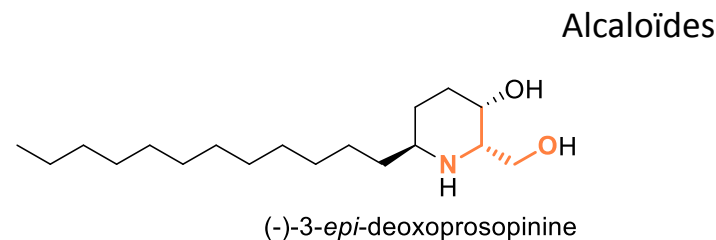


Acides aminés en synthèse

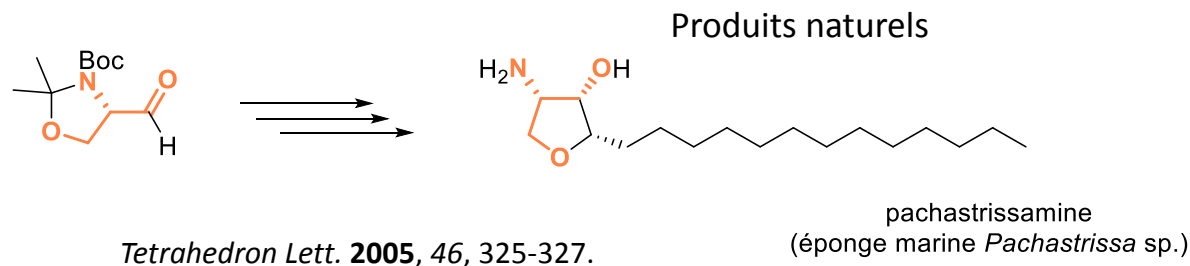
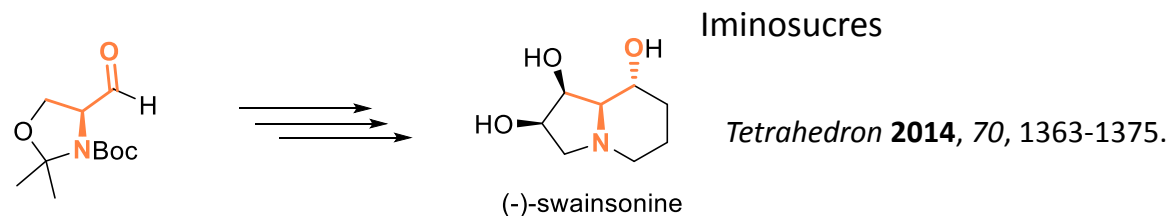
Source de chiralité : bloc de construction



Org. Synth. **1991**, 70, 18-28.



Eur. J. Org. Chem. **2003**, 4518-4527.



Structure des protéines

Structure primaire

Séquence d'acides aminés qui constituent la protéine

```

1  GAATTGGGCAAGCACTTGGAAAAAGAAAAGCAGOGATGAGTCTCTCTGATACGGAC  60
    M S L S D T D
61  AAGGCTGTGTGTTAAGGCCATCTGGGCTAAGATCAGCCCCAAGGCCGATGAAATTTGGTGCT  120
    K A V V K A I W A K I S P K A D E I G A
121  GAAGCCCTGGCCAGATGCTGACCGTCTACCCCTCAAACCAAGACCTACTTTTCTCACTGG  180
    E A L A R M L T V Y P Q T K T Y F S H W
181  GCTGACTTGAGCCCTGGGCTCTGGTCCCGTGAAGAAGCAAGGAAAGACTATCATGGGTGCC  240
    A D L S P G S G P V K K H G K T I M G A
241  GTCGGCGAAGCTATTTTCAAAAATAGACGACCTTGTGGGAGGACTGGCCGCCCTGAGCGAA  300
    V G E A I S K I D D L V G G L A A L S E
301  CTCATGCGCTTCAAGCTGCGTGTGTGACCCGGCCCACTTCAAGATCCTGTACACAATGTIC  360
    L H A F K L R V D P A N F K I L S H N V
361  ATTGTGGTTCATGCCATGCTCTTCCCTGCAGACTTCACCCCTGAGGTTACGTTGTCAGTIC  420
    I V V I A M L F P A D F T P E V H V S V
421  GACAAGTTCCTTTAATAACTTGGCCCTGGCTCTCTCTGAGAAGTACCGCTAAACCTCAAGT  480
    D K F F N N L A L A L S E K Y R
481  GGATATTCTACTGACAACAACACTGTGGGGGACTCTTAAACAACATCATGCATGATGTTGGAA  540
541  TGAAATTTCTCAATAAAAGGCACAGAACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAG  598
    
```

Séquence nucléotidique de l'hémoglobine α chez le poisson-zèbre adulte.

Blood **1997**, 89, 688-700.



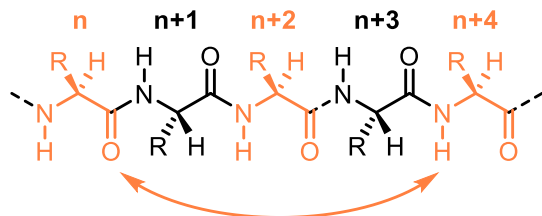
→ code linéaire, aucune information sur l'agencement spatial

Structure des protéines

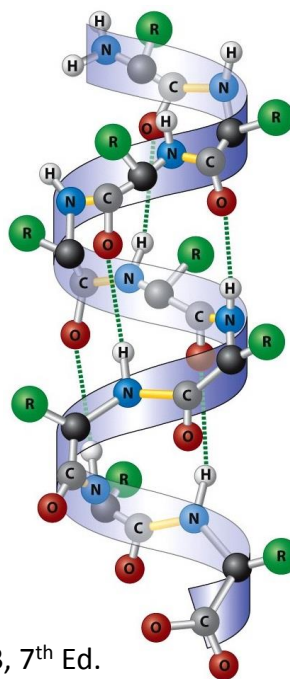
Structure secondaire

Repliement d'acides aminés à l'échelle locale (conformations énergétiquement favorisées)

Ex: hélice α , enroulement hélicoïdal de la chaîne peptidique



Liaison hydrogène $O \cdots H-N$
entre l'acide aminé n
et l'acide aminé $n+4$



Hélicité droite (forme de chiralité axiale)



P
(plus-droite)



M
(minus-gauche)

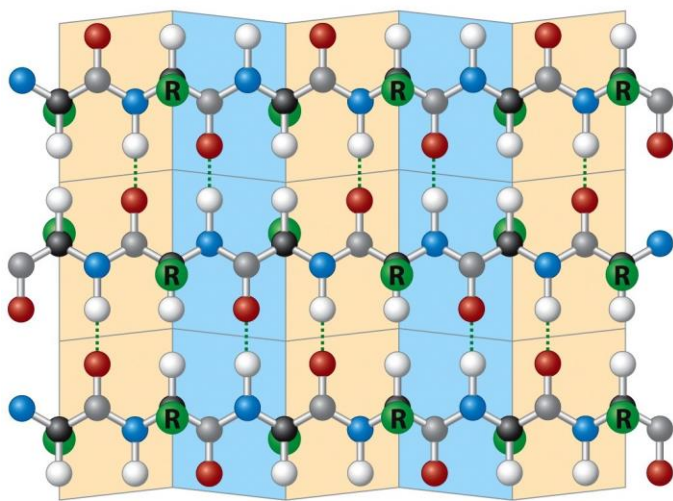
Molecular Cell Biology 2013, 7th Ed.

Structure des protéines

Structure secondaire

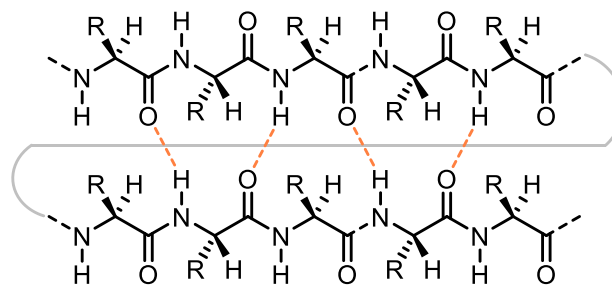
Repliement d'acides aminés à l'échelle locale (conformations énergétiquement favorisées)

Ex: feuillet β , association par liaison hydrogène de plusieurs brins peptidiques adjacents formant un plan plissé

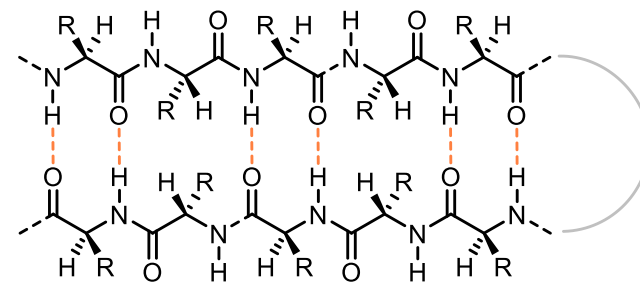


Molecular Cell Biology 2013, 7th Ed.

brins β parallèles



brins β antiparallèles



Structure des protéines

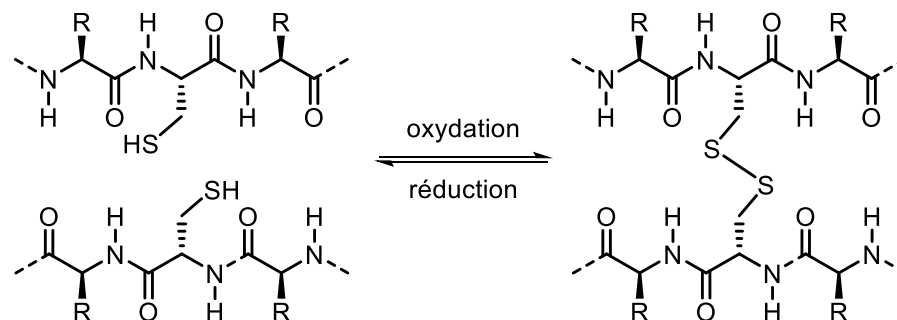
Structure tertiaire

Structure tridimensionnelle déterminée par l'association d'acides aminés éloignés

liaisons covalentes :

- liaison covalente de coordination ligand-métal

- pont disulfure entre deux cystéines



liaisons non-covalentes (motifs d'assemblages supramoléculaires)

- atomes électronégatifs + proton acide → liaisons hydrogène

- atomes chargés (zwitterions) → interactions ioniques

(...)

Structure des protéines

Structure quaternaire

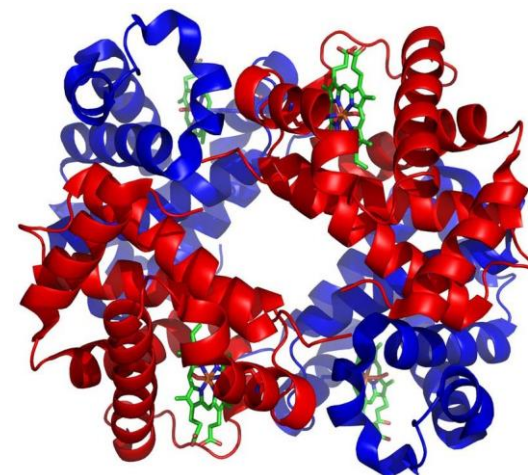
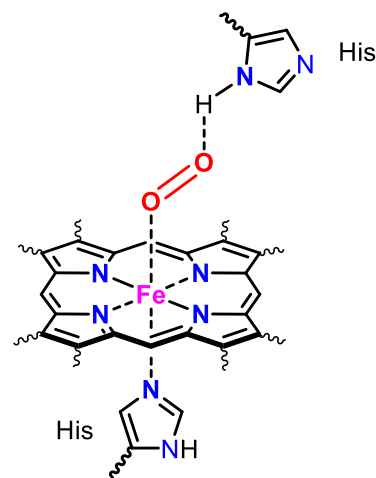
Association de plusieurs chaînes polypeptidiques, de plusieurs structures tertiaires

Ex: hémoglobine A humaine (HbA):

Structure quaternaire tétramérique :

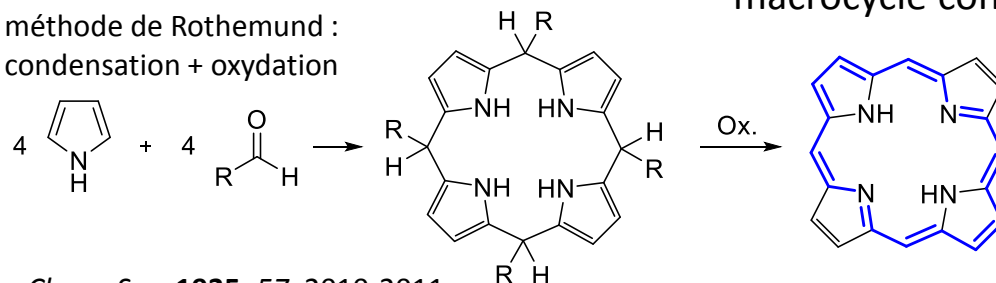
- deux chaînes α
- deux chaînes β
- quatre hèmes (porphyrine + métal)

groupe prostétique permettant la fixation du dioxygène



macrocycle constitué de quatre unités pyrroliques

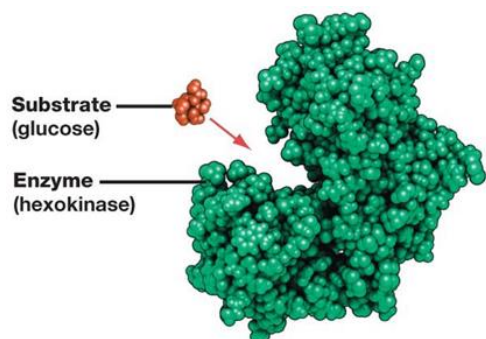
Au laboratoire:
méthode de Rothmund :
condensation + oxydation



$(4 \times 4 + 2) = 18$ électrons π conjugués
→ aromatique

Site actif

Zone de l'enzyme permettant d'interagir avec le substrat et de réaliser la réaction enzymatique :



- site de reconnaissance (fixation et orientation par complémentarité)
- site catalytique (diminution de l'énergie d'activation de la réaction)

Petite zone par rapport au volume total de la protéine

Les acides aminés qui forment le site actif peuvent être éloignés dans la structure primaire

De manière générale :

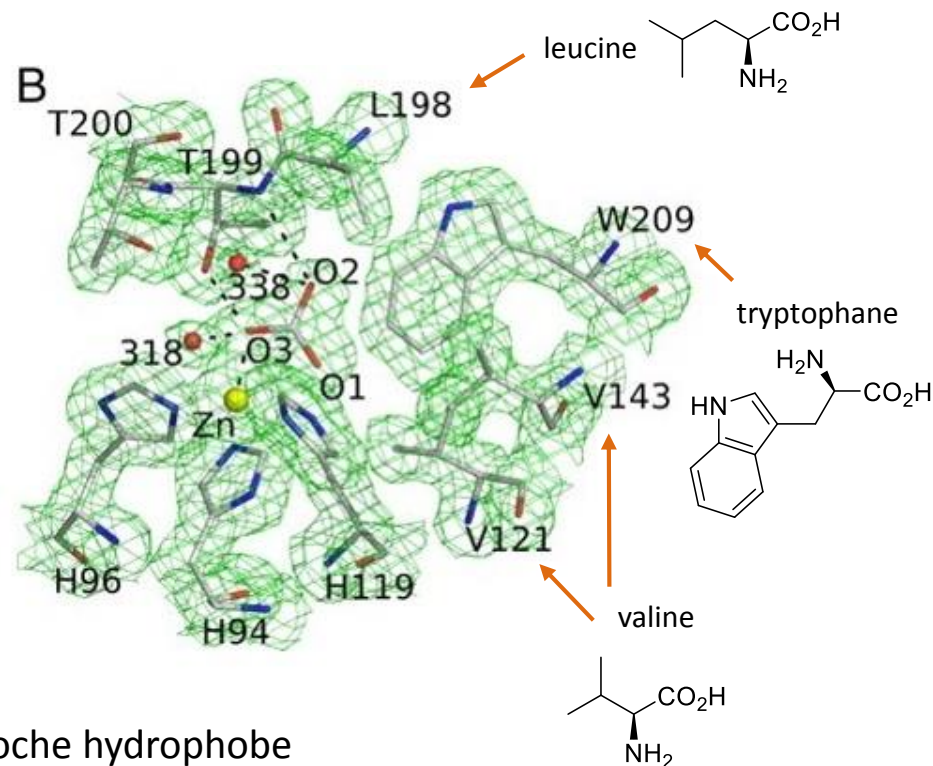
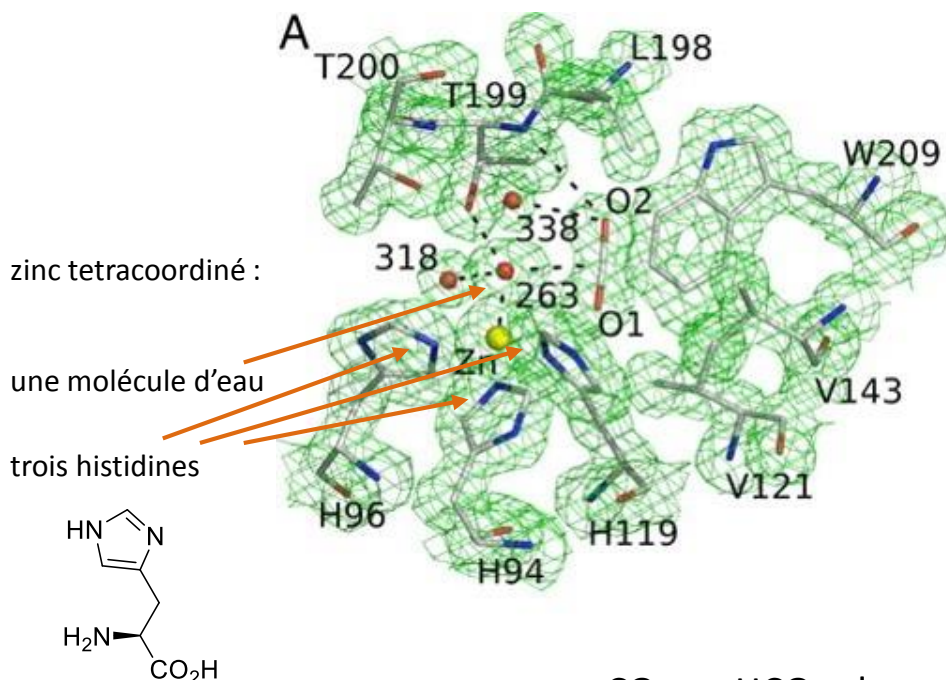
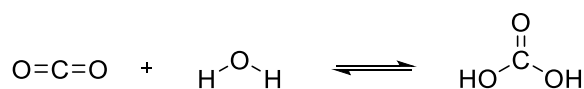
- les acides aminés hydrophiles permettent la catalyse,
- les acides aminés hydrophobes bloquent les molécules d'eau à l'extérieur du site actif

Site actif

Métalloenzyme

Structure cristalline du site actif de l'anhydrase carbonique humaine HCAII complexée à du CO_2 et de HCO_3^- (bicarbonate)

PNAS **2009**, 106, 10609-10613.

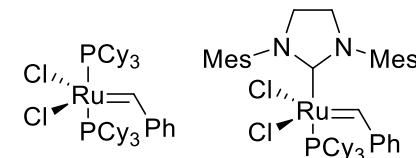


CO_2 ou HCO_3^- dans poche hydrophobe

Catalyse enzymatique

Enzymes = Catalyseur

complexes alkylidène de ruthénium
=
pré-catalyseurs de métathèse des oléfines

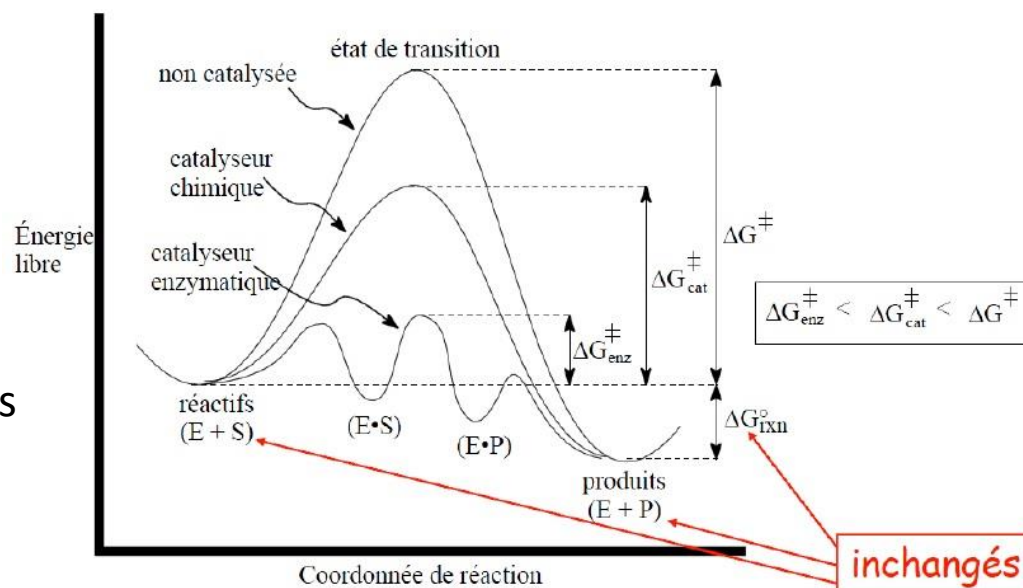


Catalyseur : substance qui accélère une transformation chimique (et qui est retrouvée dans son état initial en fin de réaction) → cinétique

Rien à voir avec la stœchiométrie → quantité catalytique = abus de langage

En tant que catalyseurs, les enzymes abaissent l'énergie d'activation d'une réaction chimique donnée.

→ plusieurs états intermédiaires

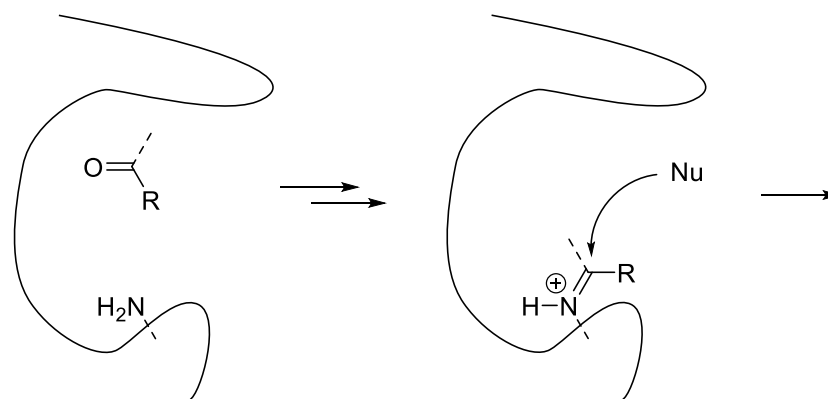


Catalyse enzymatique

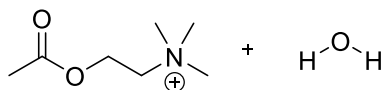
Diminution de l'énergie d'activation

- par liaison covalente (stabilisation de quelques dizaines de kcal.mol⁻¹)

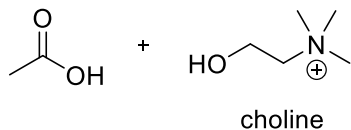
- par interactions non-covalentes (stabilisation de quelques kcal.mol⁻¹)



acétylcholine
(neurotransmetteur)



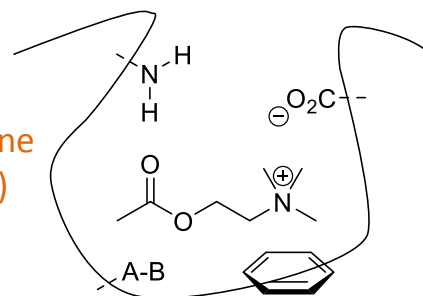
acétylcholinestérase



choline

liaison hydrogène
(~4 kcal.mol⁻¹)

force de van der Waals (dipôles)
(~0,1 kcal.mol⁻¹)



interaction ionique
(~3 kcal.mol⁻¹)

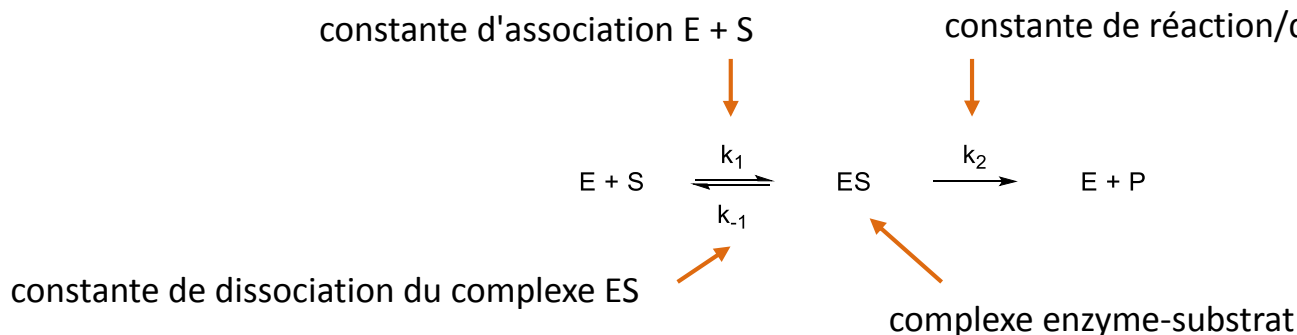
interactions cation- π
(~2 kcal.mol⁻¹)

Catalyse enzymatique

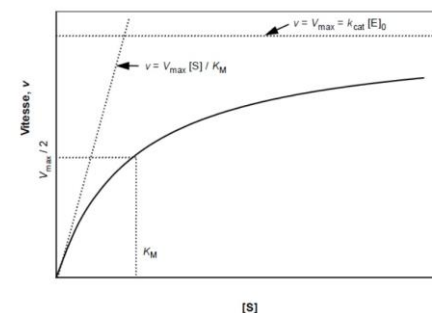
Cinétique enzymatique

Étude de la réaction Substrat (S) $\xrightarrow{\text{Enzyme (E)}}$ Produit (P)

Modèle de cinétique : exemple des enzymes Michaeliennes
(existe modèle Briggs-Haldane par exemple)



Biochem. Z. **1913**, 49, 333-369.



Approximation d'un état quasi-stationnaire pour le complexe ES

→ vitesses d'apparition et de disparition du complexe ES égales

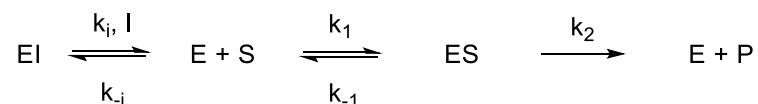
Équation de Michaelis-Menten
$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

avec constante de Michaelis
(affinité de l'enzyme pour le substrat)
$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Inhibition

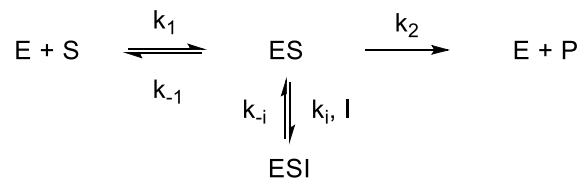
Inhibiteur compétitif

Généralement un analogue structurel du substrat, se lie au site actif à sa place



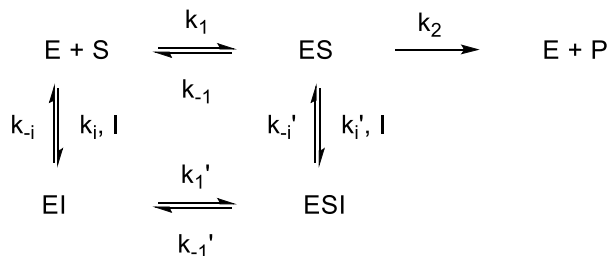
Inhibiteur incompétitif

Ne se fixe pas à l'enzyme libre, mais au complexe enzyme-substrat



Inhibiteur non-compétitif

Peut se lier à l'enzyme libre ou au complexe enzyme-substrat

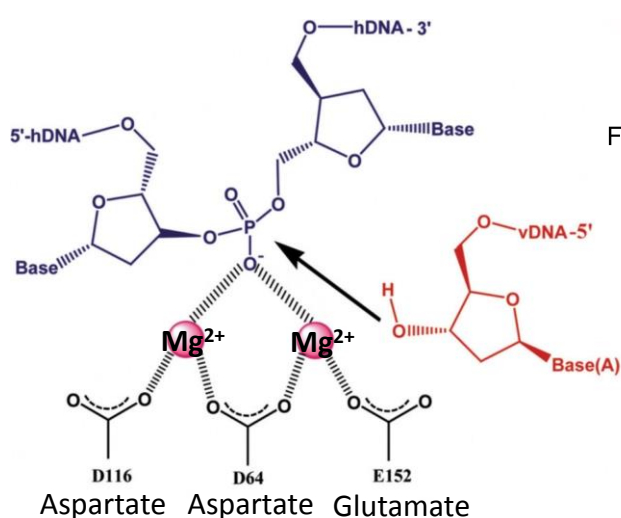


Inhibition

Raltégravir (Isentress®)

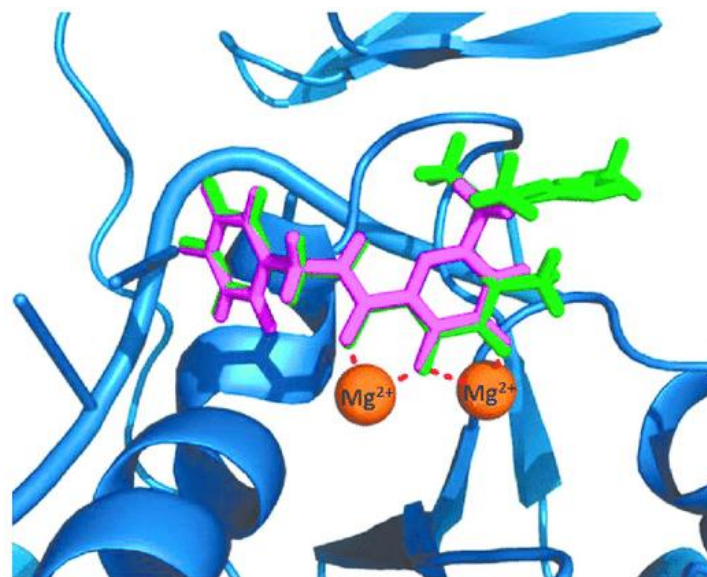
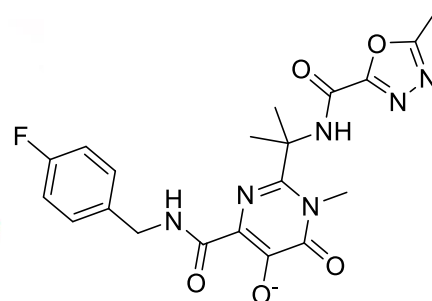
Inhibiteur de l'intégrase du VIH développé par les laboratoires Merck

Bloque le transfert du brin de l'ADN proviral vers le génome la cellule infectée



Transestérification permettant l'intégration

Eur. J. Med. Res. **2009**, 15, 5-16.

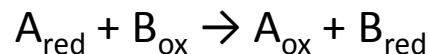


Modélisation moléculaire de l'amarrage (docking)

PNAS **2012**, 109, 2251-2256.

Classification

Oxydoréductases (EC 1)



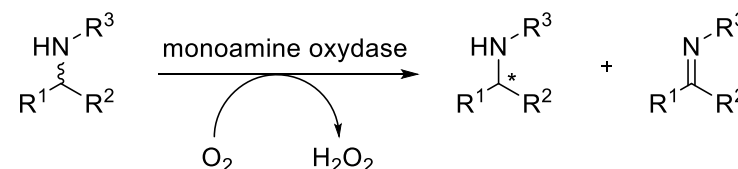
Nature Chem. **2017**, 9, 961-969.

J. Am. Chem. Soc. **1995**, 117, 6412-6413.

J. Bacteriol. **2000**, 182, 5495-5504.

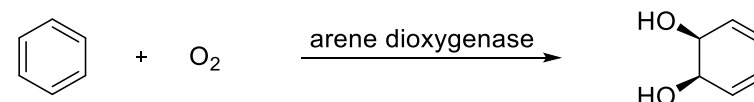
Oxydases

→ utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons sans qu'il soit transféré au substrat



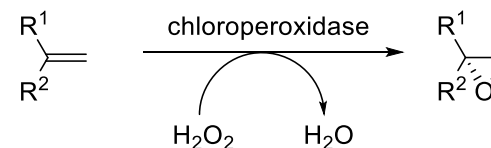
Oxygénases

→ utilisent l'oxygène comme accepteur, l'oxygène est incorporé au substrat



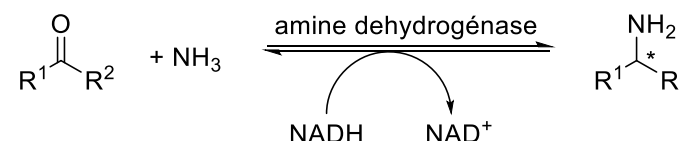
Peroxidases

→ utilisent H₂O₂ comme accepteur d'électrons



Déshydrogénases

→ utilisent d'autres molécules que l'oxygène comme accepteur d'électrons

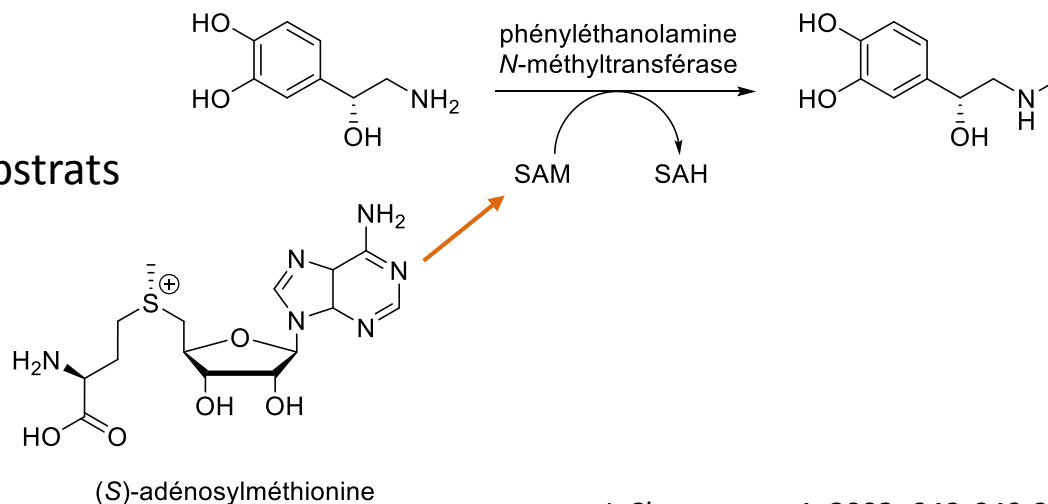


Classification

Transférases (EC 2) $A-B + C \rightarrow A + B-C$

Méthyltransférases

→ transfert d'un méthyle entre substrats

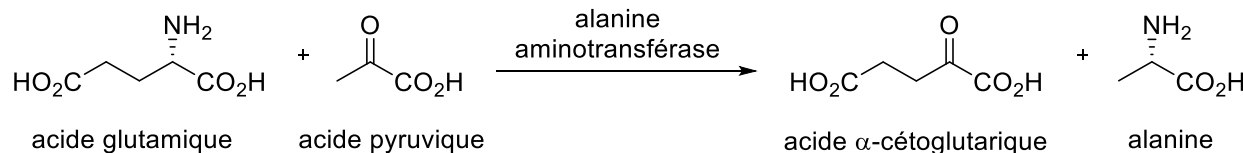


J. Chromatogr. A. **2002**, 948, 249-256.

Aminotransférases

→ transfert d'un NH_2 d'un acide aminé vers un cétoacide

J. Biotechnol. **2009**, 139, 102-107.

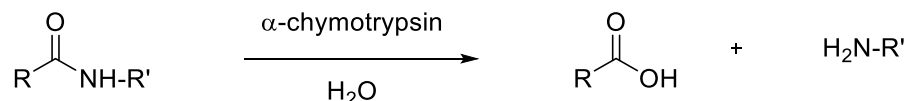


Classification

Hydrolases (EC 3) $A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$

Protéases (peptidases)

→ hydrolyse de la liaison amide (protéines)



J. Am. Chem. Soc. **2011**, 133, 17824-17831.

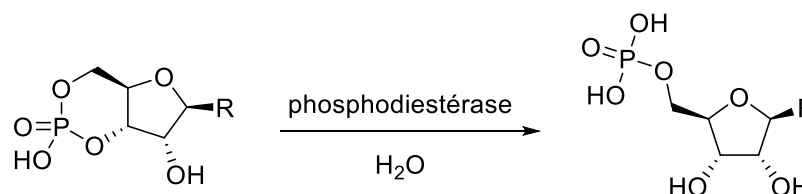
Chem. Rev. **2002**, 102, 4817-4868.

Phosphodiesterases

→ hydrolyse de la liaison phosphodiester (acides nucléiques)

Molecules **2007**, 12, 114-129.

Comput. Theor. Chem. **2012**, 983, 88-94.

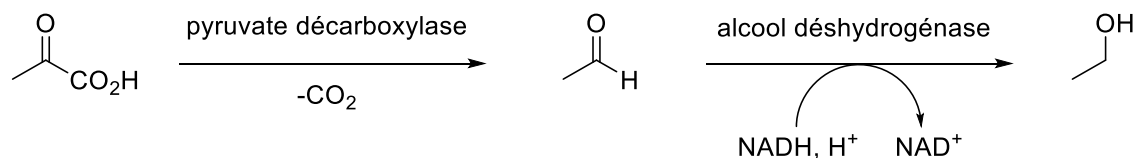


Classification

Lyases (EC 4)

Décarboxylases (carboxy-lyases)

→ libèrent du CO_2 (ex: fermentation alcoolique des levures)

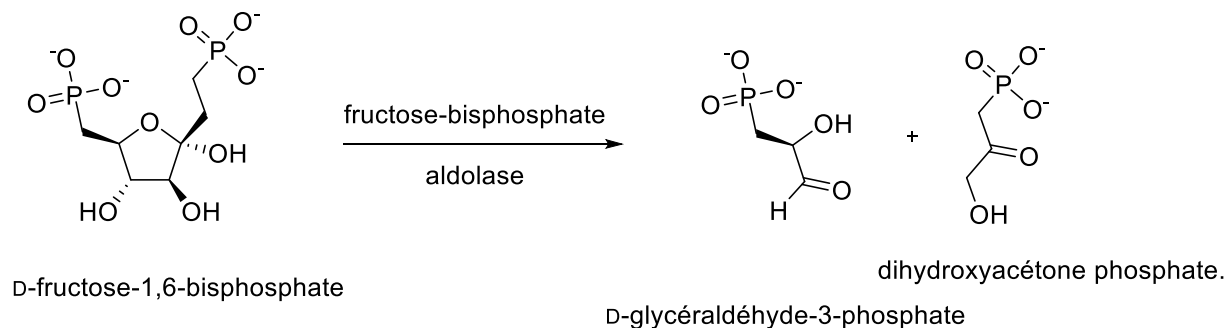


J. Am. Chem. Soc. **2010**, 132, 11753-11758.

Aldolases

→ produit un aldéhyde par élimination

J. Am. Chem. Soc. **2011**, 133, 3609-3616.

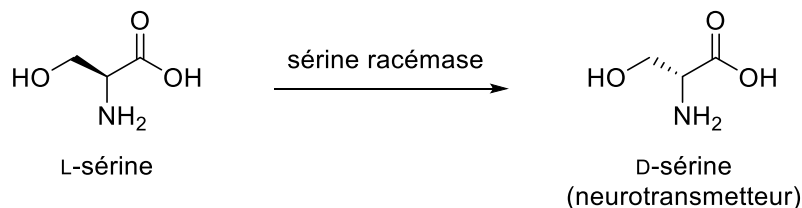


Classification

Isomérases (EC 5)

Racémases

→ interconvertissent des énantiomères

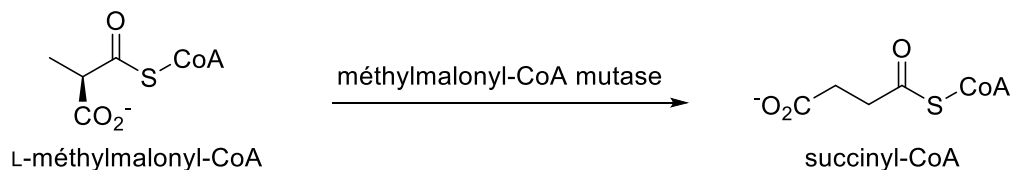


Front. Synaptic Neurosci. **2014**, 6, 1-15.

Mutases

Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **1986**, 25, 366-367.

→ transfèrent des groupements entre des atomes d'une même molécule

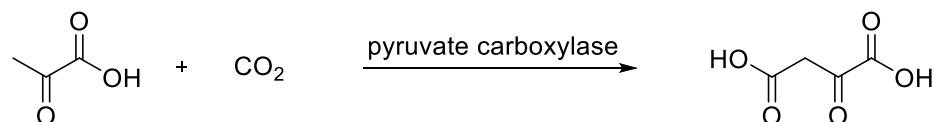


Classification

Ligases (EC 6)

Carboxylases

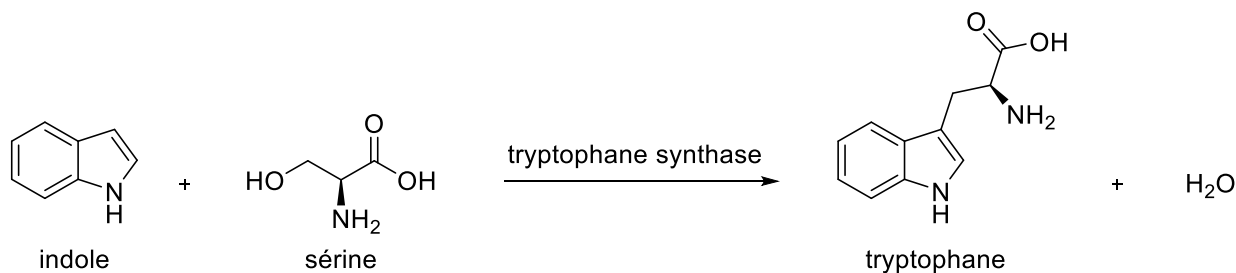
→ utilisent CO_2 comme substrat



Biochemistry, **1969**, 8, 5136-5148.

Synthases

→ lient deux molécules

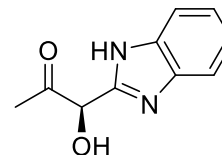
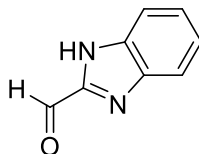
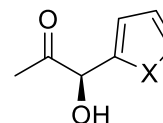
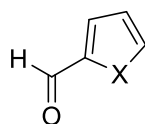
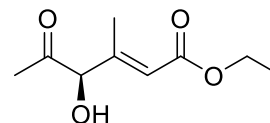
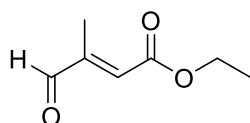
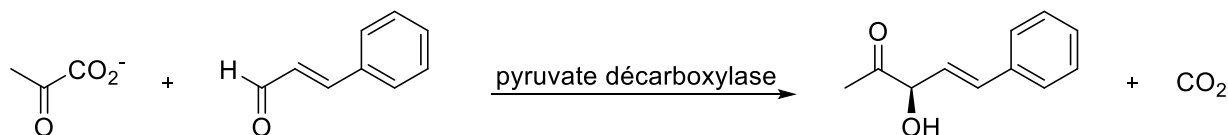


Applications au laboratoire

Pyruvate décarboxylase (lyase)

Permet le couplage décarboxylant de nombreux aldéhydes avec le pyruvate

→ large choix de substrat, synthèse à l'échelle de plusieurs grammes



J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1988**, 1619-1621.

Applications industrielles

Amylase (hydrolase)

hydrolyse de l'amidon de malt → bière

Cellulase (hydrolase)

hydrolyse de la cellulose des végétaux → "bio"carburant

Xylose isomérase

conversion du glucose en fructose → pouvoir sucrant très élevé

Papaïne (protéase)

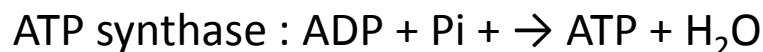
clivage de liaisons peptidiques → augmente la tendreté de la viande

Applications en nanotechnologies

ATP synthase

Prix Nobel de chimie 2016 : J.-P. Sauvage, J. F. Stoddart, B. L. Feringa pour "*design et synthèse de machines moléculaires*"

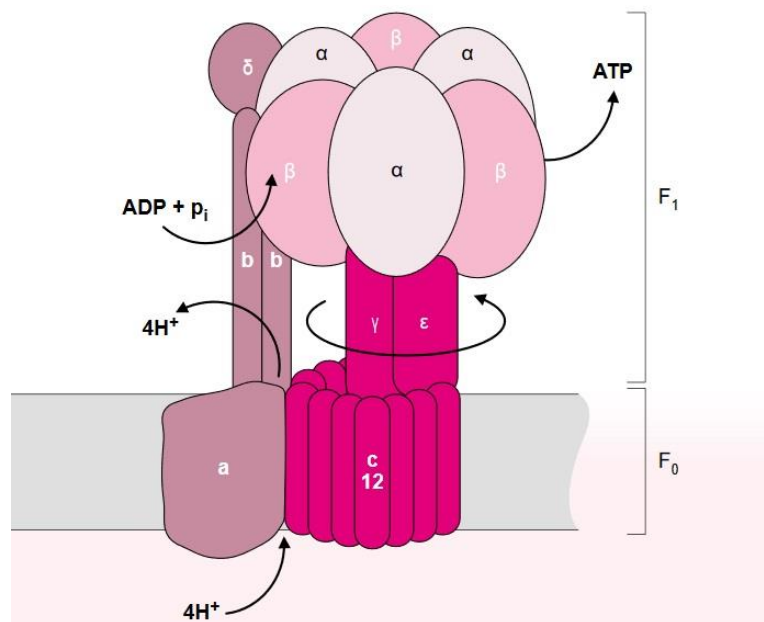
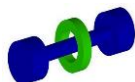
Moteurs moléculaires synthétiques s'inspirent des moteurs protéiques



Énergie : gradient de concentration de H^+ à travers de la membrane mitochondriale interne

Rotor / **Stator**

Rotaxane naturel



Bibliographie

Introduction to Protein Science - A. M. Lesk

Chimie Bioorganique - M. Santelli

Enzyme Catalysis in Organic Synthesis - K. Drauz, H. Gröger, O. May

Enzyme Database BRENDA, <http://www.brenda-enzymes.org/>

Chimie Fondamentale tome 3 - J.-C. Chottard, J.-C. Depezay, J.-P. Leroux

Les Enzymes : Cinétique et Mécanisme d'Action - L. Penasse

The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions - R. B. Silverman

Chimie Industrielle - R. Perrin

Génie Enzymatique - D. Loncle

Biochimie Générale - J. H. Weil

Organic Synthesis using Biocatalysis - A. Goswami J. Stewart