

# Enzymologie & régulations

Biochimie

*Emmanuel Vignal / Lauriane Fritsch*

# Plan du cours

- 1) **Introduction**
- 2) Régulation transcriptionnelle et traductionnelle
- 3) Enzyme allostérique
- 4) Modifications covalentes réversibles
- 5) Activation protéolytique des enzymes
- 6) Rétrocontrôle transcriptionnel
- 7) Les isoenzymes

# Rappels

Qu'est ce qu'une enzyme ?

# Rappels

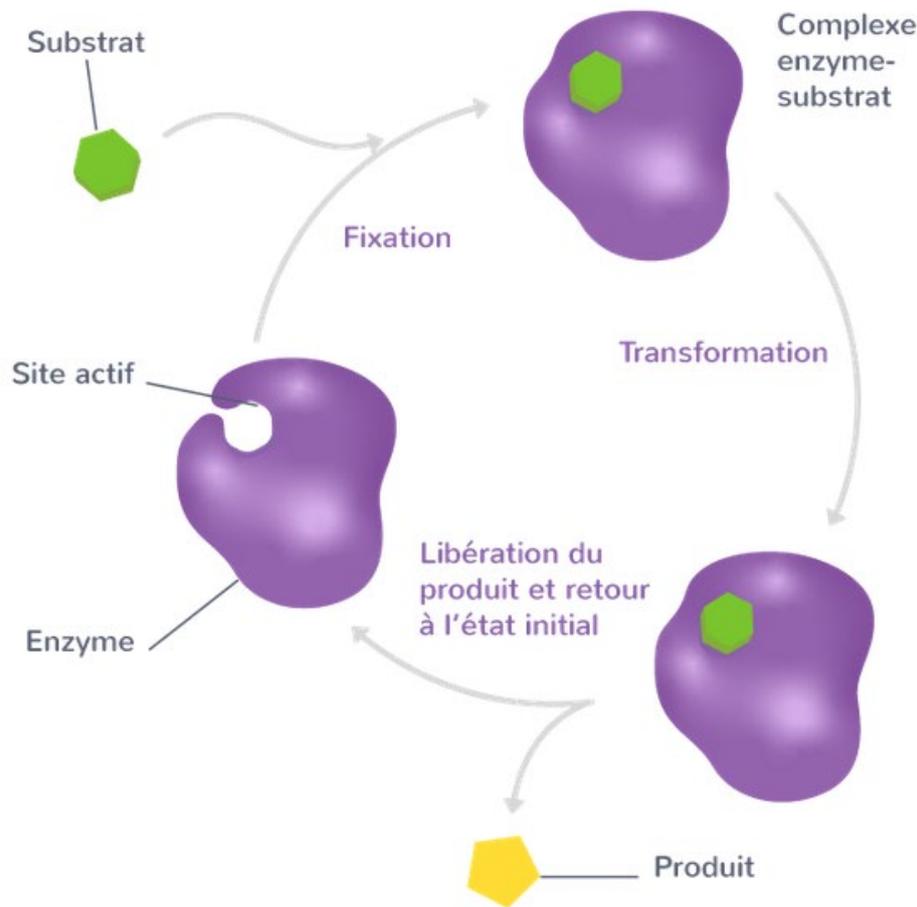
Une enzyme est un **catalyseur biologique de nature protéique généralement**. Un catalyseur permet d'accélérer une réaction biochimique dans un organisme vivant. (ex : les enzymes digestives)

Comme tout catalyseur, une enzyme permet d'augmenter la vitesse d'un processus sans être consommée, donc sans apparaître dans le bilan

Presque toutes les biomolécules capables de catalyser des réactions chimiques dans les cellules sont des enzymes ; certaines biomolécules catalytiques sont cependant constituées d'ARN et sont donc distinctes des enzymes : ce sont les ribozymes.

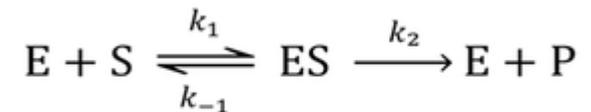
# Rappels

## L'équation de Michaelis-Menten



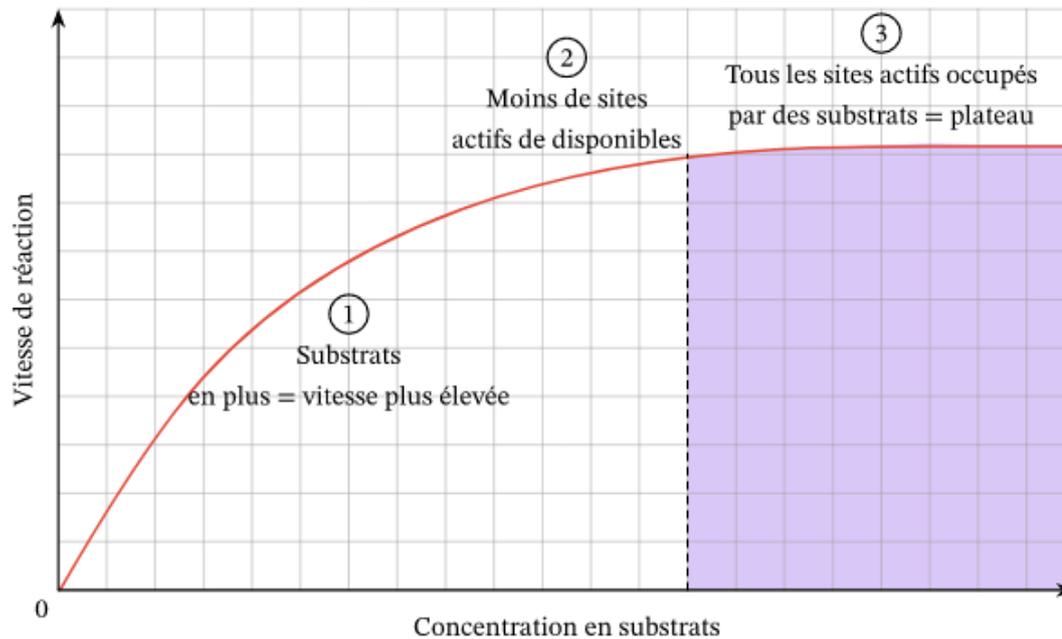
Le cycle catalytique d'une enzyme

Une réaction enzymatique se déroule en 2 étapes : formation d'un complexe enzyme-substrat, ES, et dissociation de l'enzyme et du produit.

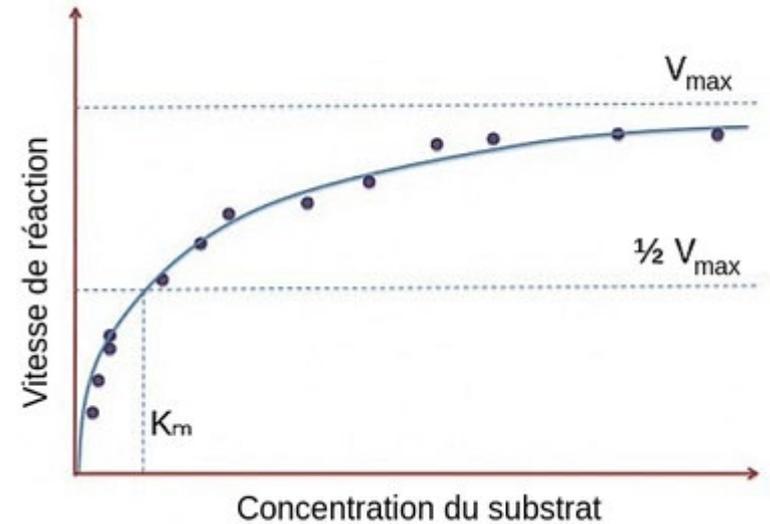


# Rappels

# L'équation de Michaelis-Menten



**Figure 5:** Graphique montrant l'effet de la concentration en substrats sur la vitesse de réaction enzymatique.



Allure hyperbolique

# Rappels

Qu'est ce qui influence une reaction enzymatique ?

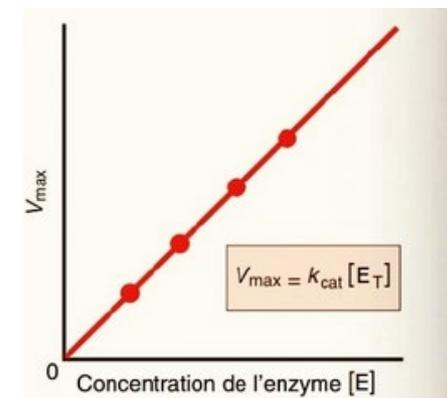
# Rappels

**La température** : L'augmentation de la température accélère généralement la réaction, et la baisse de la température ralentit la réaction. Cependant, des températures extrêmes élevées peuvent entraîner la perte de forme (dénaturation) d'une enzyme et alors l'empêcher de fonctionner.

**Le pH** : Chaque enzyme a une gamme de pH optimale. Changer le pH en dehors de cette gamme ralentit l'activité enzymatique. Les valeurs extrêmes de pH peuvent causer la déformation des enzymes.

**La concentration du substrat** : Augmenter la concentration du substrat augmente également la vitesse de réaction jusqu'à un certain point. Une fois que toutes les enzymes se sont liées, toute augmentation de substrat n'aura aucun effet sur le taux de réaction, car les enzymes disponibles seront saturées et fonctionneront à leur taux maximal.

**La concentration d'enzyme** : L'augmentation de la concentration d'enzyme accélérera la réaction, tant qu'il y a suffisamment de substrat disponible pour se lier. Une fois que tout le substrat est lié, la réaction ne s'accélérera plus, car il n'y aura plus de substrat à lier aux enzymes supplémentaires.



# Introduction

## Régulation enzymatique

□ **Régulation enzymatique** : Mécanisme par lequel une cellule peut allumer, éteindre ou moduler l'activité de voies métaboliques en contrôlant l'activité d'enzymes :

- Contrôler l'activité d'enzymes permet de changer le comportement d'une cellule pour l'adapter aux métabolites disponibles.
- Si une molécule est en excès, la régulation enzymatique permettra d'orienter l'utilisation de ce produit vers d'autres réactions.
- Si une molécule est demandée, alors la cellule va pouvoir activer des voies métaboliques qui permettent sa synthèse.

□ Les activités métaboliques cellulaires en sont un exemple, de nombreuses enzymes fonctionnent de concert dans une cascade.

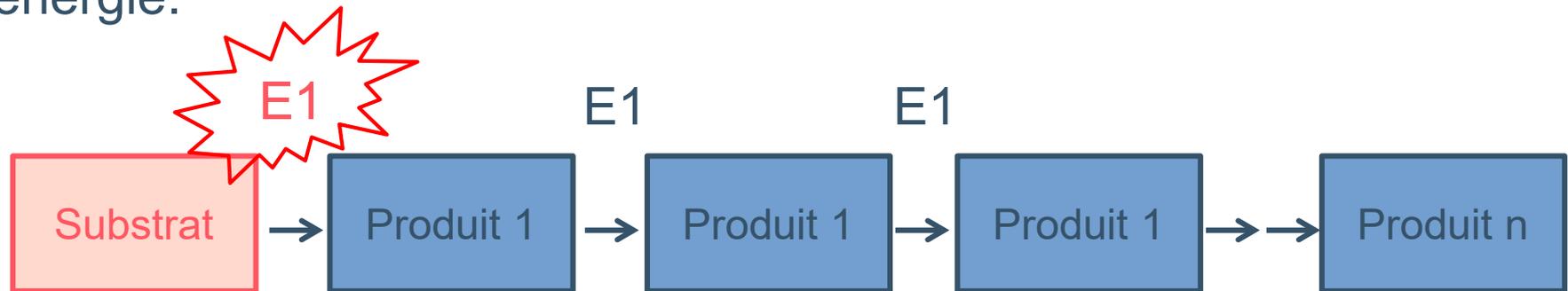
- Par exemple : la glycolyse (10 réactions qui s'enchaînent)

# Introduction

## Les mécanismes de la régulation enzymatique

**Enzyme régulatrice** : Dans une cascade enzymatique on va trouver une enzyme qui contrôle la vitesse globale de cette cascade de réactions.

- Cette enzyme est dite : enzyme régulatrice.
- Elle est capable de répondre à des signaux cellulaires en augmentant ou diminuant son activité catalytique.
- En général, il s'agit de la première enzyme de la séquence métabolique qui joue le rôle d'une enzyme régulatrice (Cela permet d'éviter de déclencher une cascade de réactions très consommatrices en énergie).



# Introduction

## Les mécanismes de la régulation enzymatique

Régulations  
enzymatiques

Régulation transcriptionnelle

Régulation allostérique

Modifications covalentes réversibles

Clivages protéolytiques

Rétrocontrôle

Isoenzymes

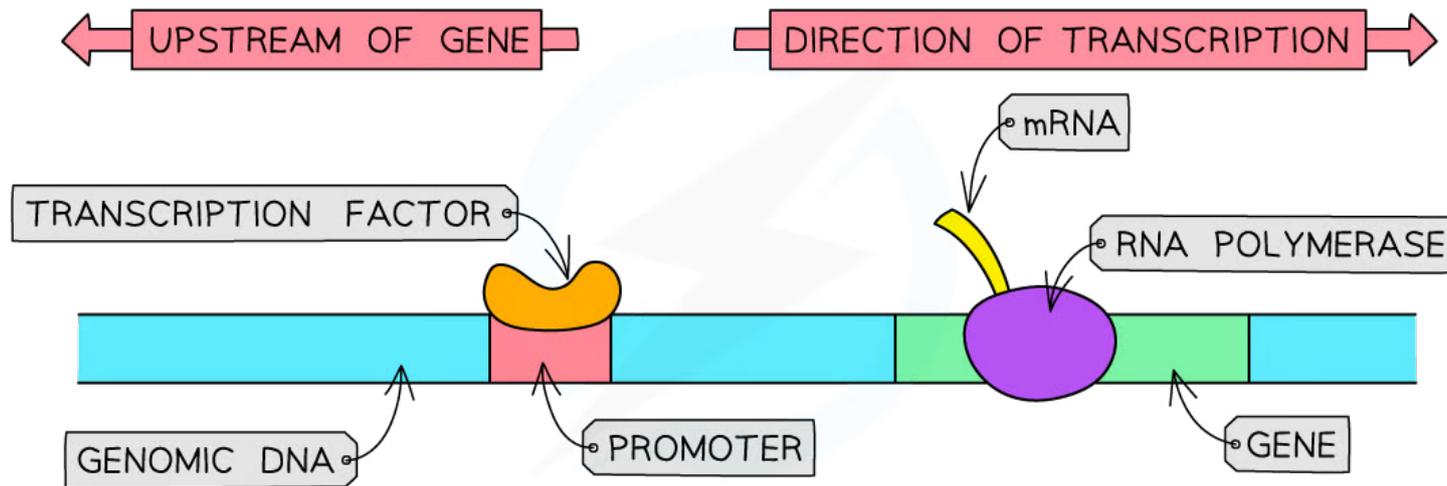
# Plan du cours

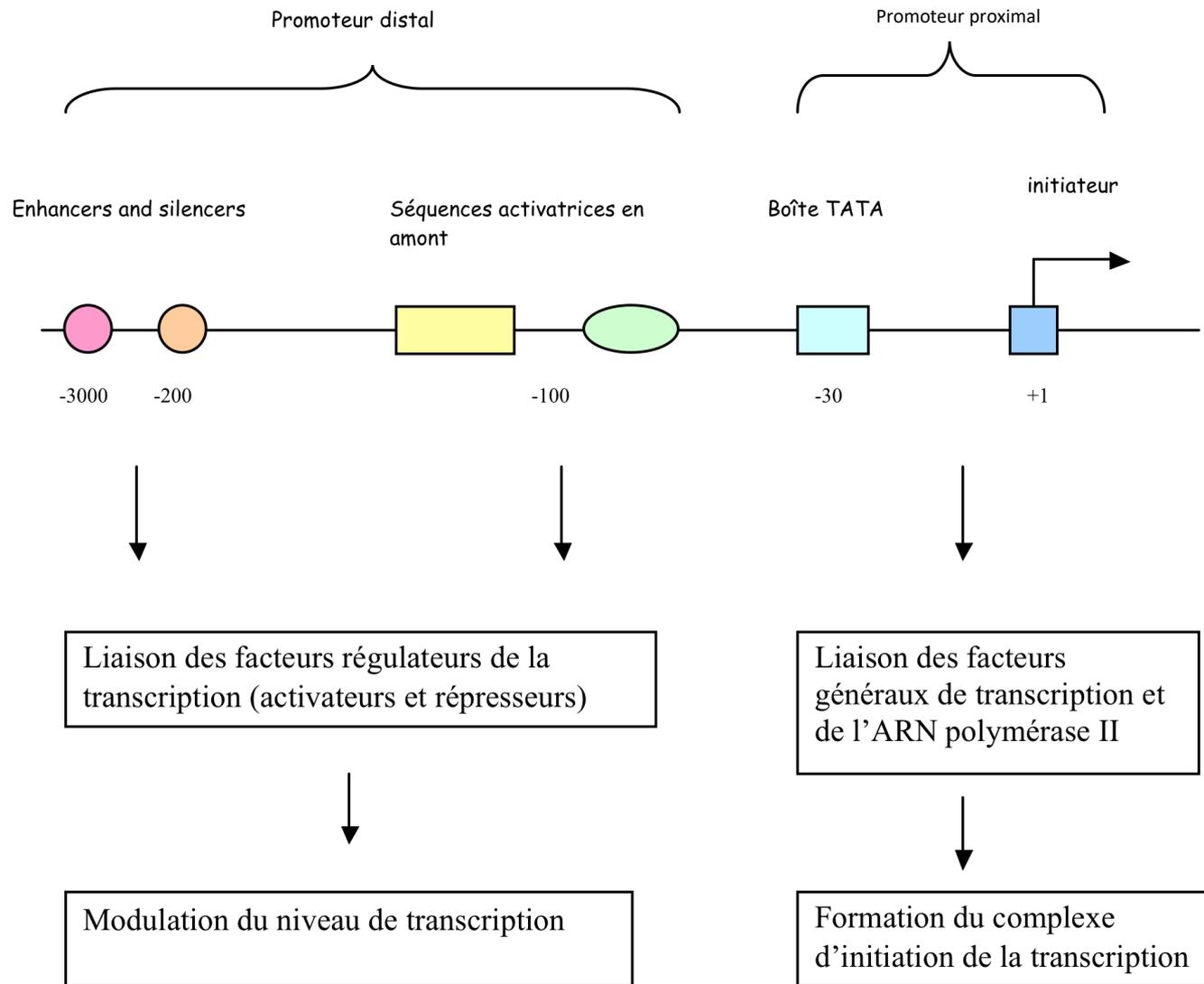
- 1) Introduction
- **2) Régulation transcriptionnelle et traductionnelle**
- 3) Enzyme allostérique
- 4) Modifications covalentes réversibles
- 5) Activation protéolytique des enzymes
- 6) Rétrocontrôle transcriptionnel
- 7) Les isoenzymes

# Régulation transcriptionnelle

Toutes les enzymes sont codées par des gènes

Une façon de contrôler l'activité d'une enzyme est de contrôler son expression.

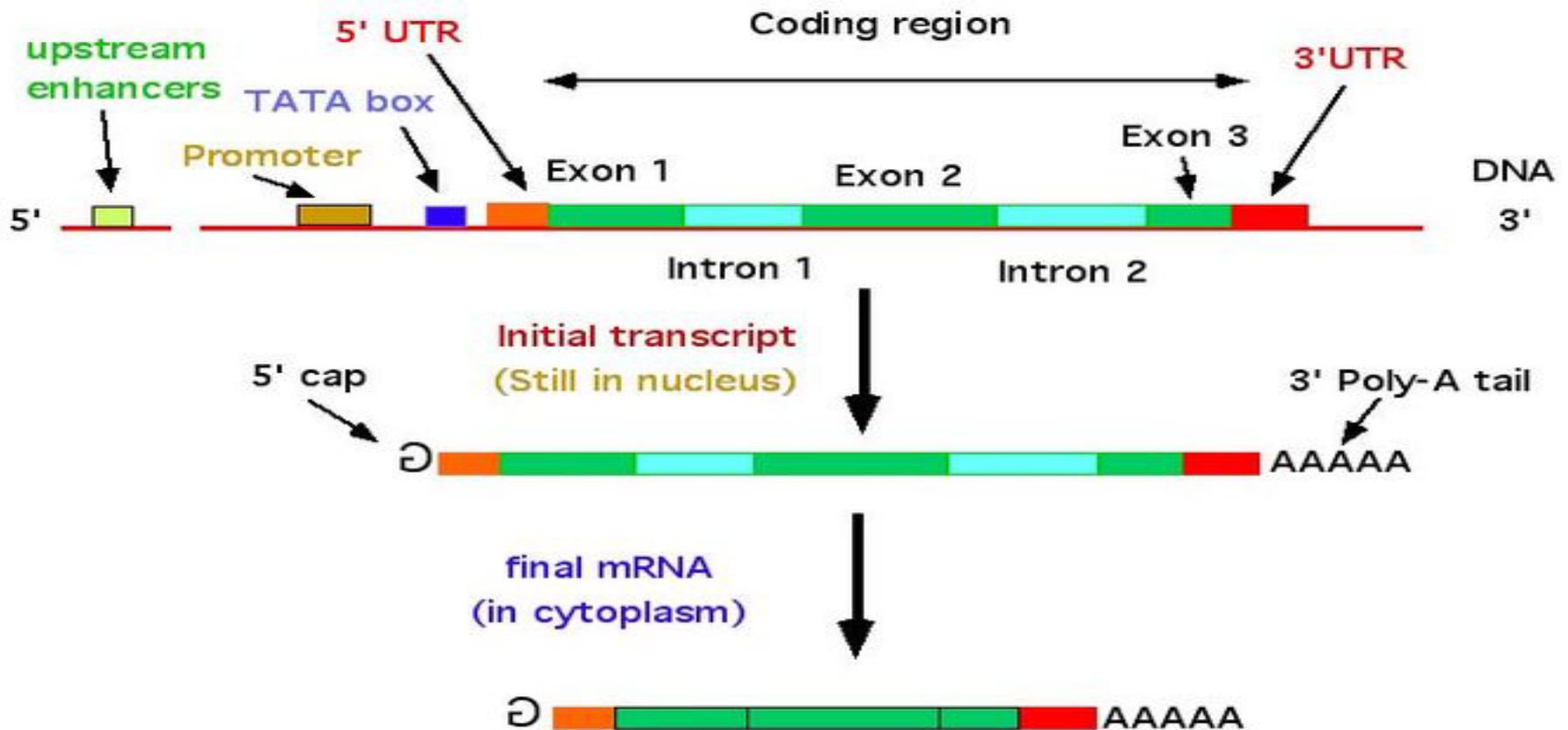




Cf. Schéma : Structure d'un promoteur de gène de classe II (p23)

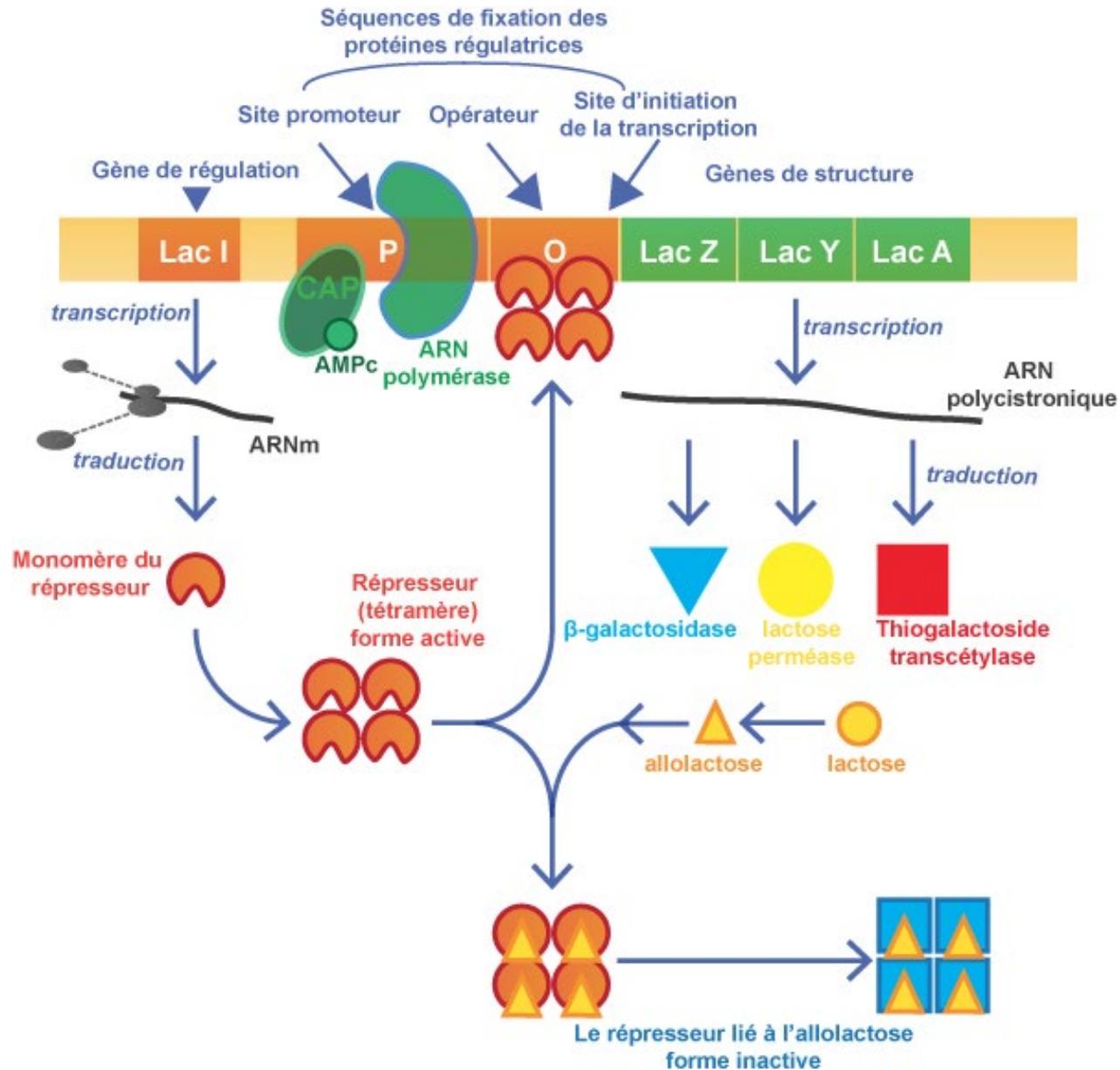
# Régulation transcriptionnelle

## Structure d'une gène eucaryote



# Régulation transcriptionnelle

## L'exemple de l'opéron Lactose ( /!\ procaryotes)

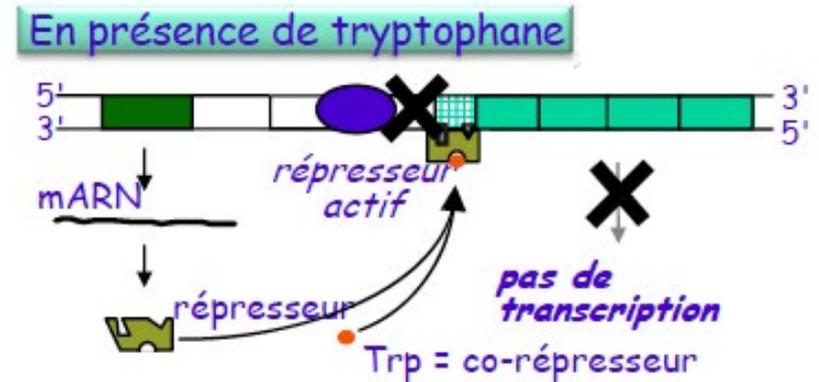
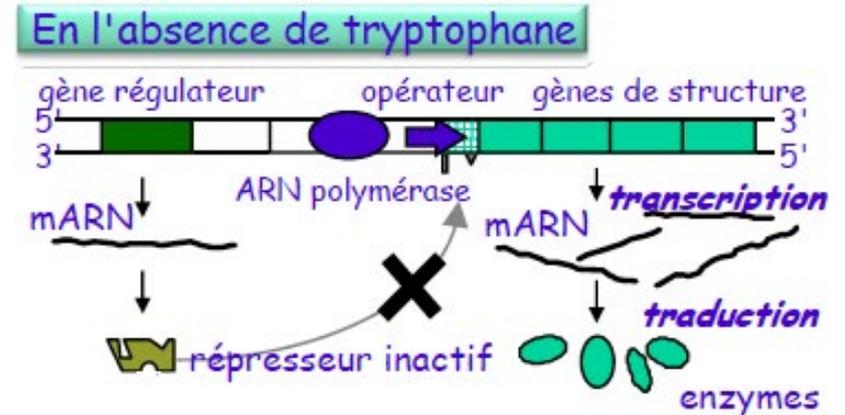


# Régulation transcriptionnelle

## L'exemple de l'opéron Tryptophane ( /!\ procaryotes)

### Appliqué aux voies anaboliques

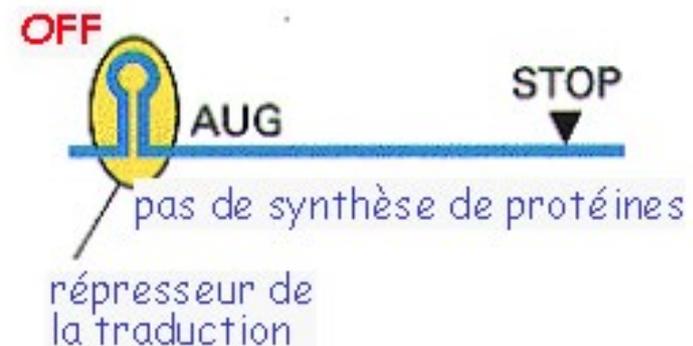
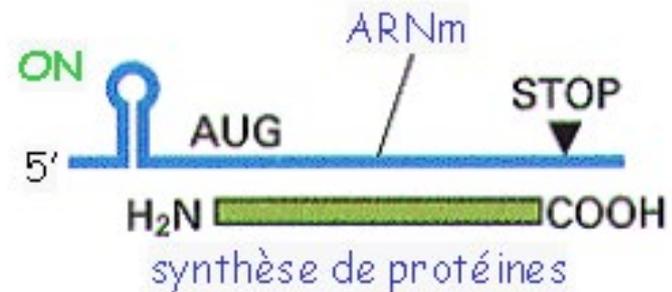
- **Gène régulateur :**  
code pour la protéine répresseur toujours exprimée sous sa forme inactive, ne se liant pas à l'opérateur
- **En absence de Trp :**  
répresseur inactif ne se fixe pas sur l'opérateur → transcription
- **En présence de Trp :**  
répresseur lie le Trp (co-répresseur), il devient actif → arrêt de la transcription



# Régulation traductionnelle

## □ Mécanisme

- proche de la régulation des procaryotes
- une protéine répresseur ou activateur
- un signal associé reconnu par la protéine
- exemple : ferritine et récepteur de la transferrine



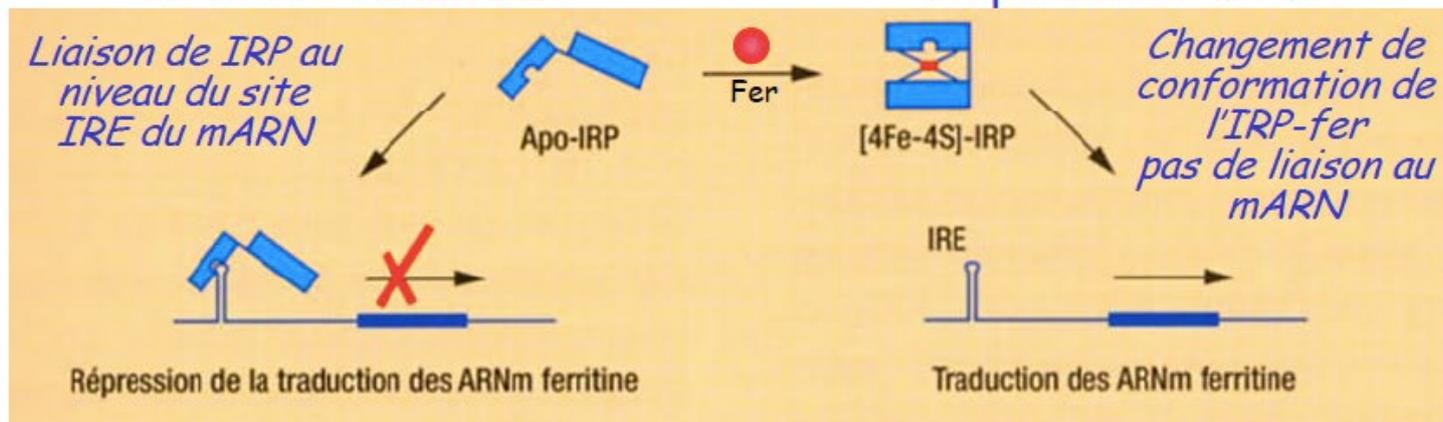
# Régulation traductionnelle

## L'exemple de la ferritine

### □ Exemple : régulation du métabolisme du fer

- En absence de fer

- En présence de fer



Si IRE en 5' :  
(ferritine)    pas de fer → blocage de traduction    ↓ expression  
                  présence de fer → traduction            ↑ traduction

# Plan du cours

- 1) Introduction
- 2) Régulation transcriptionnelle
- **3) Enzyme allostérique**
- 4) Modifications covalentes réversibles
- 5) Activation protéolytique des enzymes
- 6) Rétrocontrôle transcriptionnel
- 7) Les isoenzymes

# Enzymes allostériques

## Définition

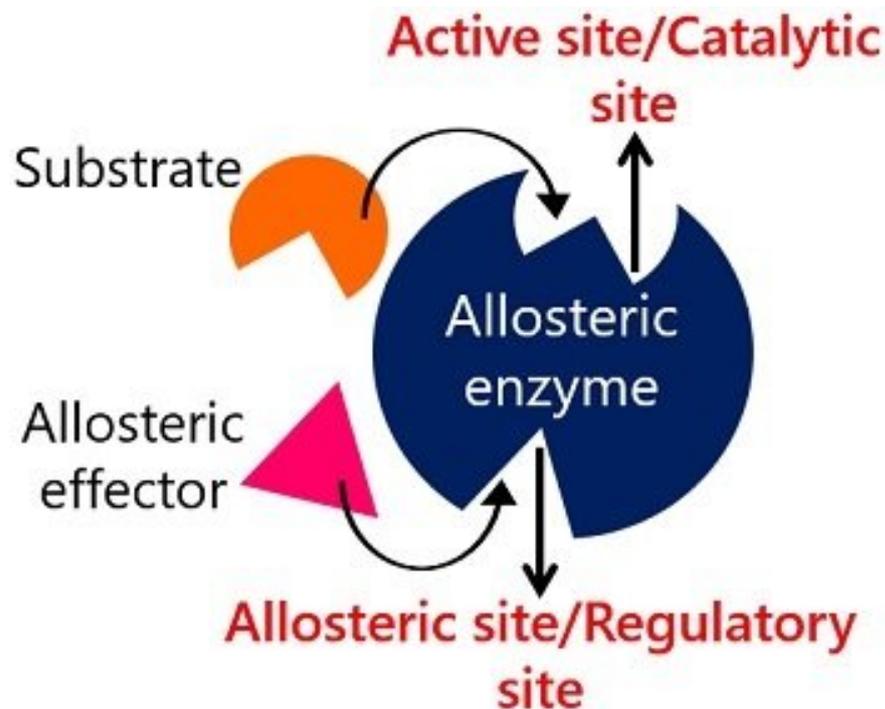
**Enzyme allostérique** : est une enzyme qui a un site supplémentaire de son site actif auquel un effecteur se lie. - cela vient du grec "allo", qui signifie "autre"

L'allostérie est un mode de régulation de l'activité d'une protéine **oligomérique** par lequel la fixation d'une molécule effectrice en un site modifie les conditions de fixation d'une autre molécule, en un autre site distant de la même protéine.

- Ce concept a été formalisé par Jacques Monod, Jean-Pierre Changeux et Jeffries Wyman dans une série d'articles, dont le plus important a été publié en 1965 dans Journal of Molecular Biology

# Enzymes allostériques

La fixation de la molécule effectrice induit un changement de conformation spatiale de l'enzyme. Cela a pour conséquence de modifier le site de liaison et ses réactifs impliqués dans le processus de catalyse.



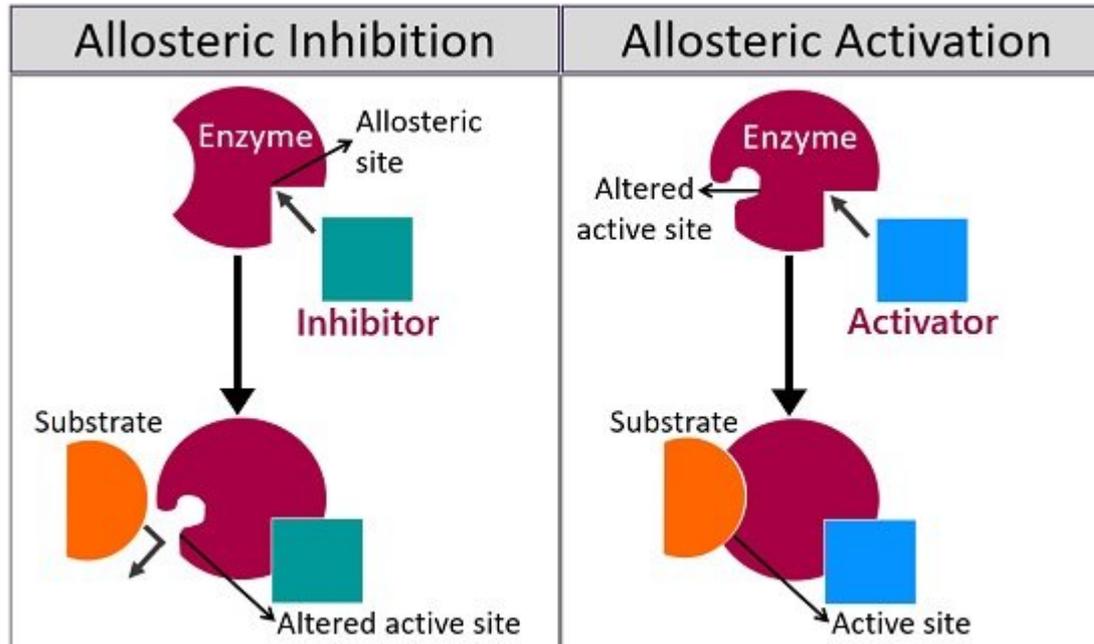
Molécule effectrice = effecteur allostérique

Les effecteurs allostériques induisent des changements conformationnels qui permettent de rendre l'enzyme plus ou moins active

# Enzymes allostériques

## Molécules effectrices activatrices & inhibitrices

La fixation de la molécule effectrice peut avoir pour conséquence aussi bien une activation ou une inhibition de la fixation du substrat au site actif. On parle alors d'allostérie d'activation ou d'inhibition.

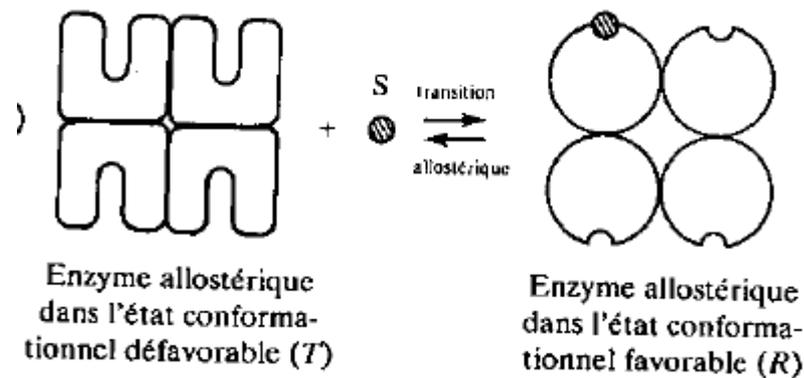


# Enzymes allostériques

## Mode de fonctionnement

Les enzymes allostériques doivent présenter plusieurs propriétés

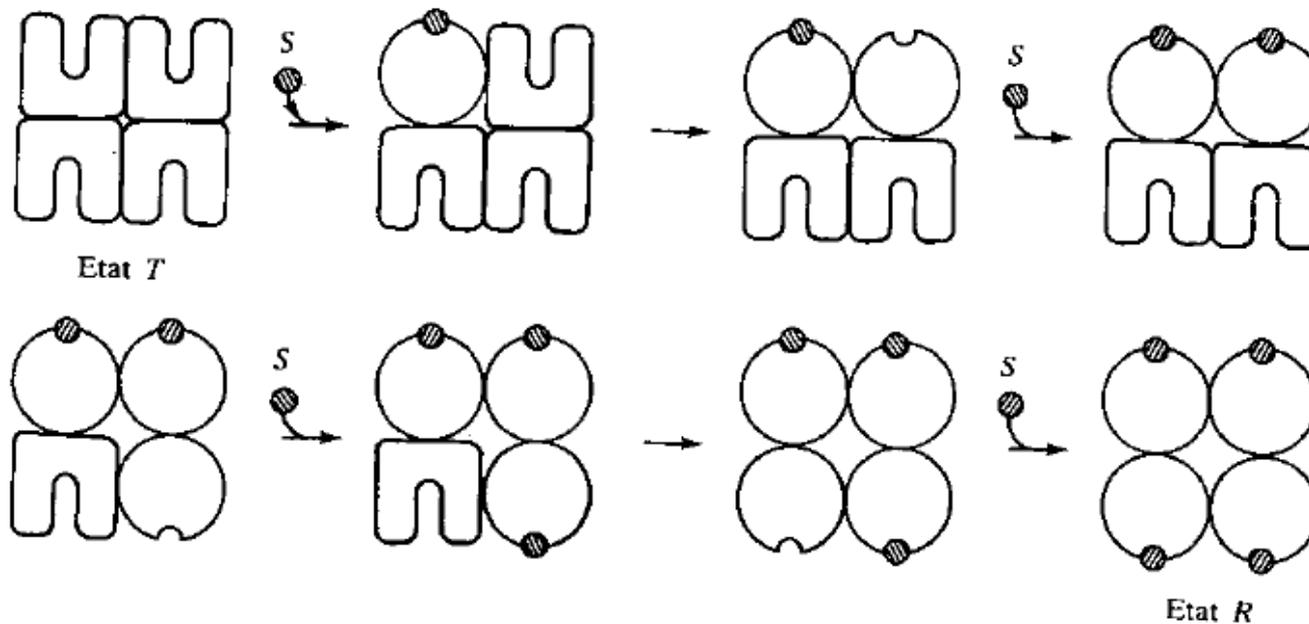
- elles sont multimériques, chaque protomère fixe une molécule de ligand ;
- elles possèdent au moins un axe de symétrie ;
- elles existent sous deux conformations différentes : l'une appelée T (tendue, faible affinité pour le substrat) l'autre R (relaxée, forte affinité pour le substrat) ;



# Enzymes allostériques

## Mode de fonctionnement

Il existe une allostérie dite positive où la fixation d'un effecteur augmente l'affinité de liaison du ligand. On parle de fixation coopérative.

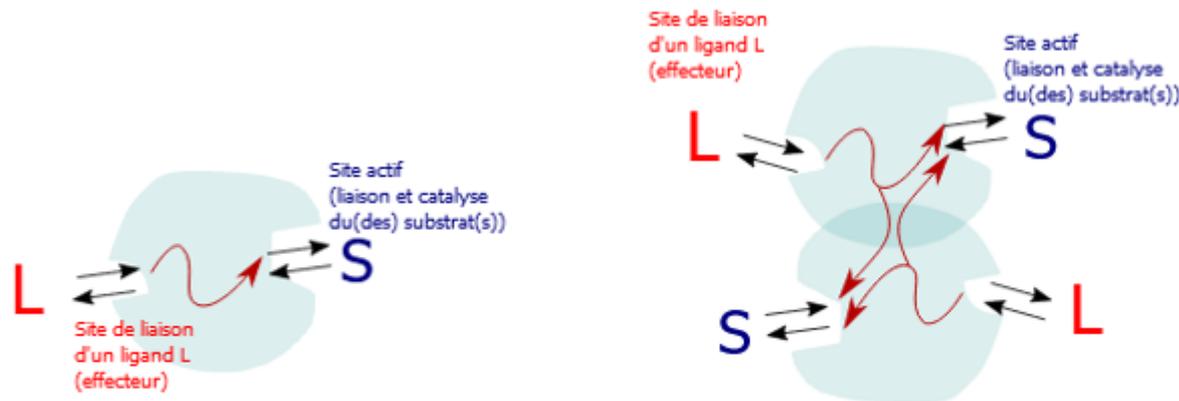


# Enzymes allostériques

## Mode de fonctionnement

Il existe une allostérie dite positive où la fixation d'un effecteur augmente l'affinité de liaison du ligand. On parle de fixation coopérative.

La molécule effectrice peut être une molécules de nature différente de celle du substrat on parle d'effet hétérotrope



**Enzyme allostérique, schéma de principe classique pour un effecteur à effet hétérotrope.**

Les sites pour L et S sont éloignés et ne se recouvrent pas. La liaison de L modifie les propriétés du site actif : affinité pour le substrat et/ou coefficient catalytique. L'effet hétérotrope peut être inhibiteur ou activateur.

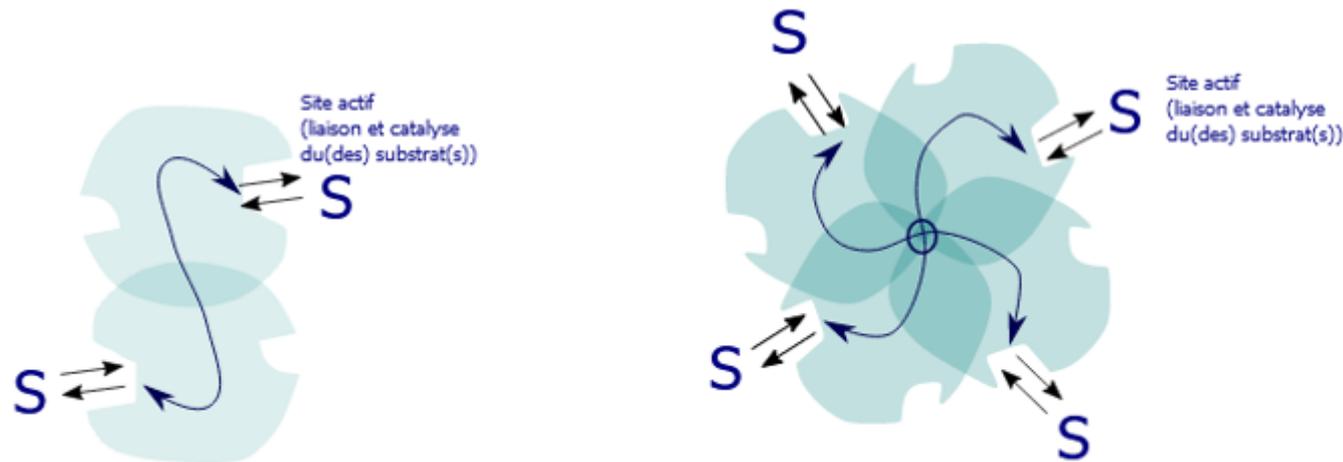
Le schéma de droite est "plus réaliste" que celui de gauche, les enzymes allostériques oligomériques (très souvent tétramériques).

# Enzymes allostériques

## Mode de fonctionnement

Il existe une allostérie dite positive où la fixation d'un effecteur augmente l'affinité de liaison du ligand. On parle de fixation coopérative.

La molécule effectrice est le ligand lui-même et modifie dans ce cas l'affinité des autres sites de fixation on parle d'effet homotrope



**Enzyme allostérique, schéma de principe d'un effet coopératif (homotrope) substrat..**

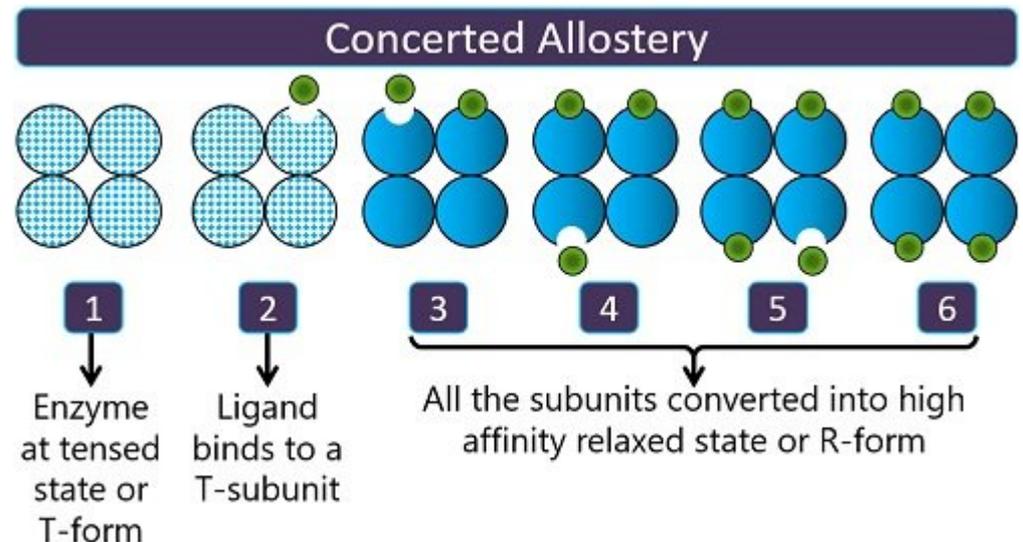
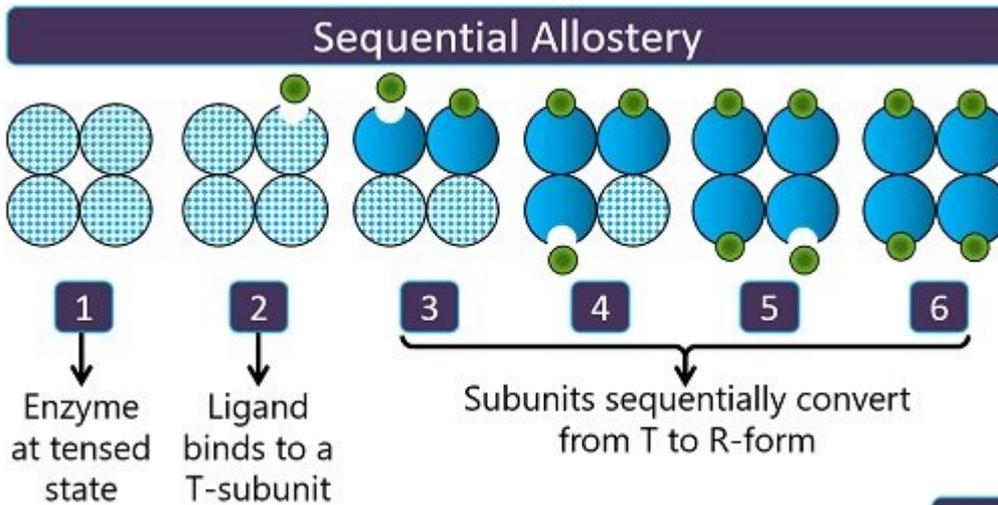
Les sites actifs pour S sont éloignés et ne se recouvrent pas. La liaison de S sur un site modifie les propriétés d'un autre site actif distant : affinité pour le substrat et/ou coefficient catalytique. L'effet coopératif substrat est en général activateur (mais rien n'interdit l'effet inhibiteur, souvent qualifié d'anti-coopératif).

Les enzymes allostériques à effet coopératif substrat sont oligomériques (très souvent tétramériques).

# Enzymes allostériques

## Mode de fonctionnement

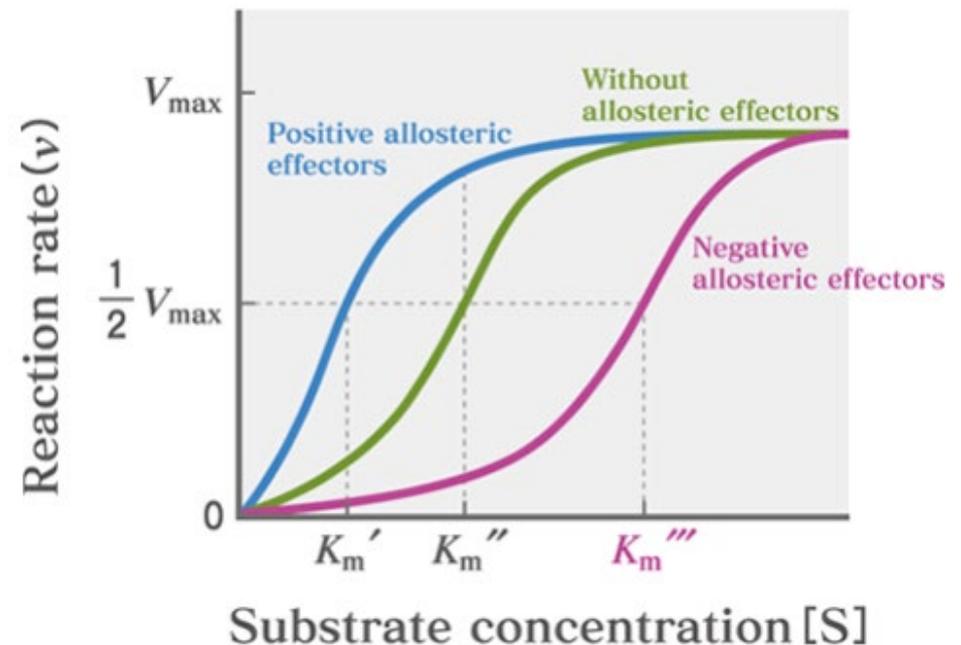
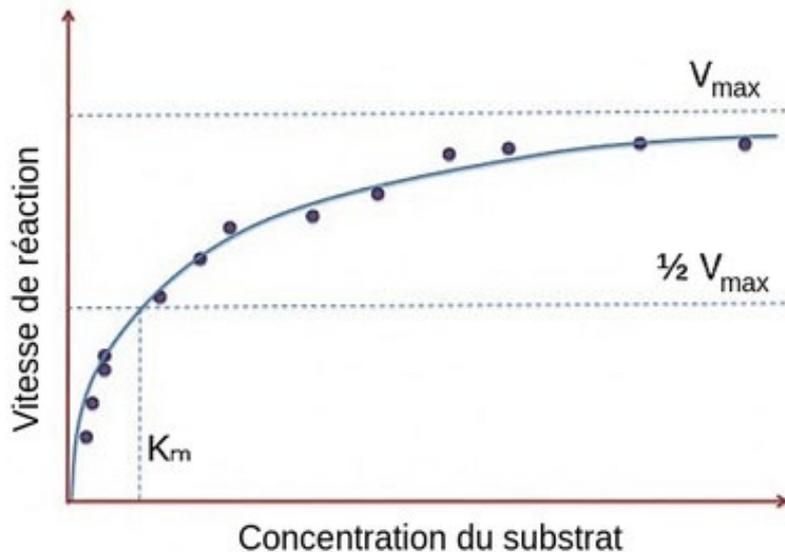
☐ Cela induit différents comportements :



# Enzymes allostériques

## Comportement cinétique

Sur le plan cinétique, la coopérativité se manifeste par des courbes vitesse-substrat de forme non plus hyperboliques mais sigmoïdales.

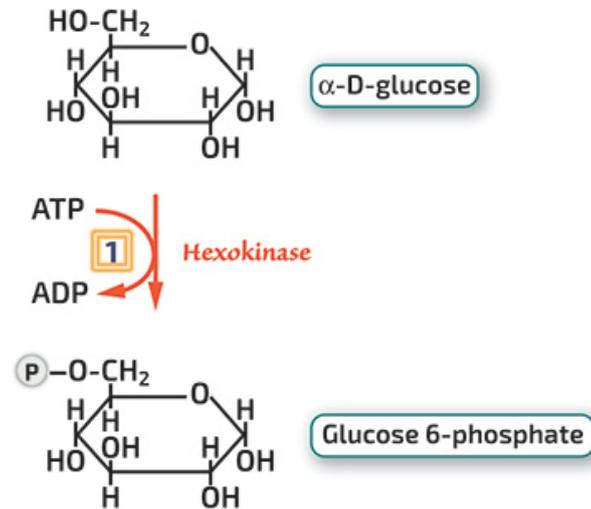


Comportement michaélien

Site actif indépendant

# Enzymes allostériques

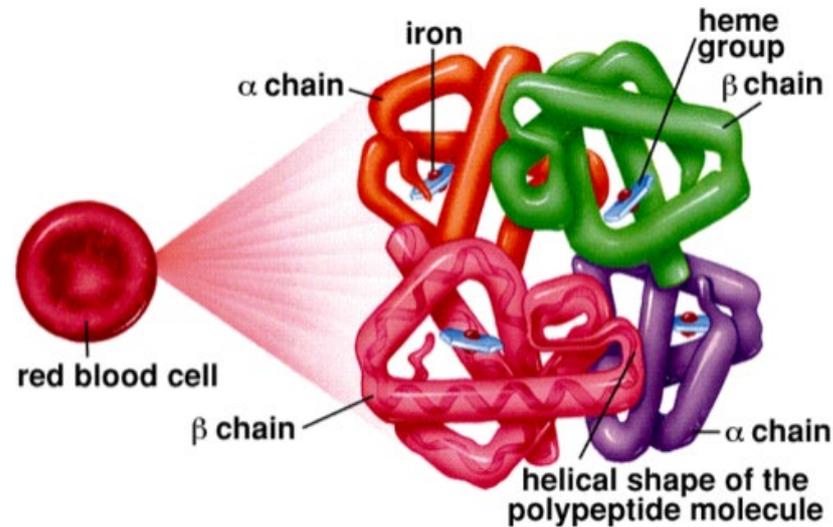
## Exemple : l'hexokinase



Autrement dit, l'allostérie est un mode de régulation de l'enzyme par la liaison d'une molécule à un endroit (site allostérique) modifie les conditions de liaison d'une autre molécule, à un autre endroit ([site catalytique](#)) de l'enzyme, éloigné du premier. Par exemple, la fixation de l'[ATP](#) ou du [glucose](#) sur une enzyme appelée [hexokinase](#) augmente l'affinité de l'enzyme pour l'autre ligand et favorise ainsi la [phosphorylation](#) du glucose en glucose-6-[phosphate](#) (première étape de la [glycolyse](#)).

# Enzymes allostériques

## Exemple : l'hémoglobine



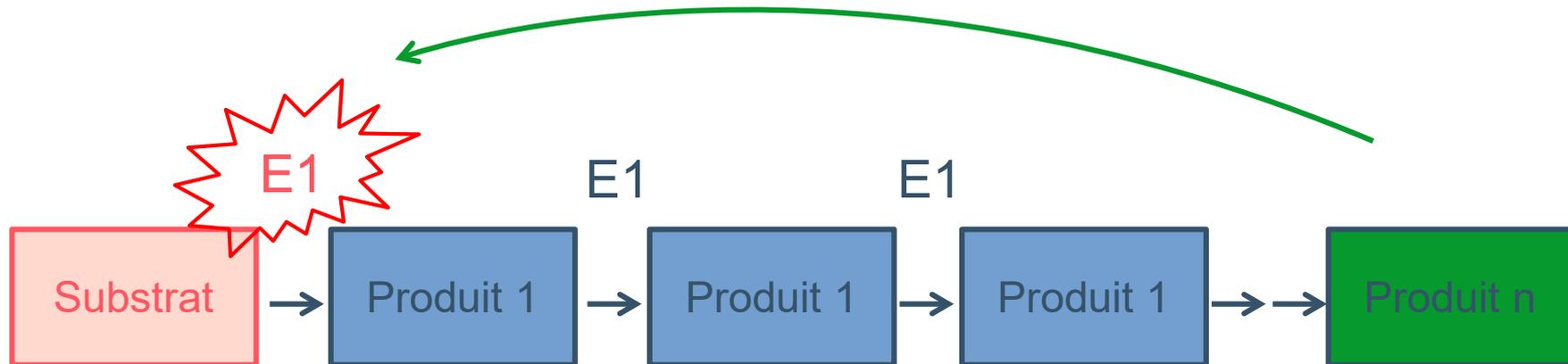
L'[hémoglobine](#) est un exemple important d'une protéine allostérique, bien qu'elle ne soit pas une enzyme, mais une molécule transporteuse. Chacune des quatre sous-unités d'hémoglobine contient un groupement appelé groupe [hème](#), qui peut se lier à une molécule d'[oxygène](#). La liaison de la première molécule d'oxygène augmente l'affinité de liaison pour le deuxième groupe hémique, la liaison de la seconde augmente l'affinité pour le troisième, etc. ([coopération](#) positive, effet homotrope)

# Enzymes allostériques

## Inhibition par rétrocontrôle

□ L'inhibition par rétrocontrôle est un type spécifique de contrôle de l'activité enzymatique des enzymes allostériques

□ Dans certaines voies métaboliques une enzyme régulatrice va être inhibée par le produit final de cette voie.

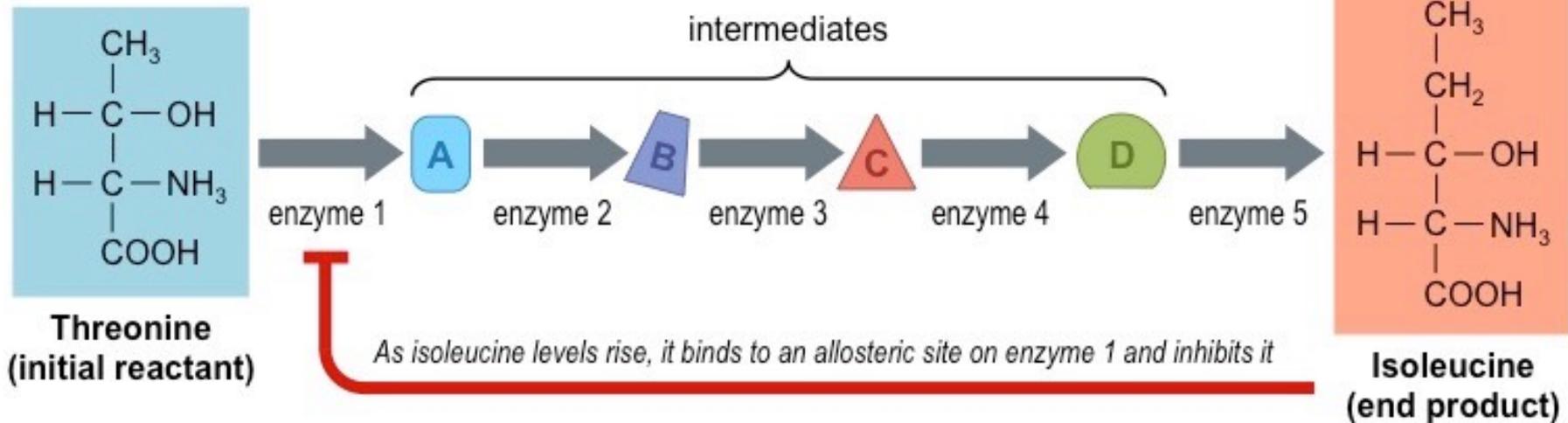
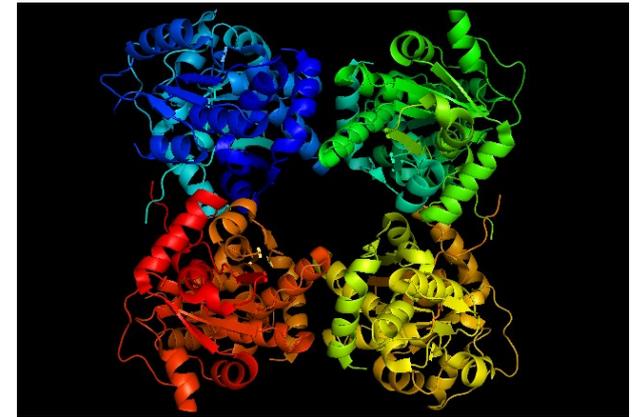


# Inhibition par rétrocontrôle

## Exemple de la voie de synthèse de l'Isoleucine

Exemple classique : voie de synthèse de l'isoleucine chez les bactéries

Enzyme 1 : Thréonine déshydratase contrôlée négativement par l'isoleucine



# Plan du cours

- 1) Introduction
- 2) Régulation transcriptionnelle et traductionnelle
- 3) Enzyme allostérique
- 4) **Modifications covalentes réversibles**
- 5) Activation protéolytique des enzymes
- 6) Rétrocontrôle transcriptionnel
- 7) Les isoenzymes

# Modif. Covalentes réversibles

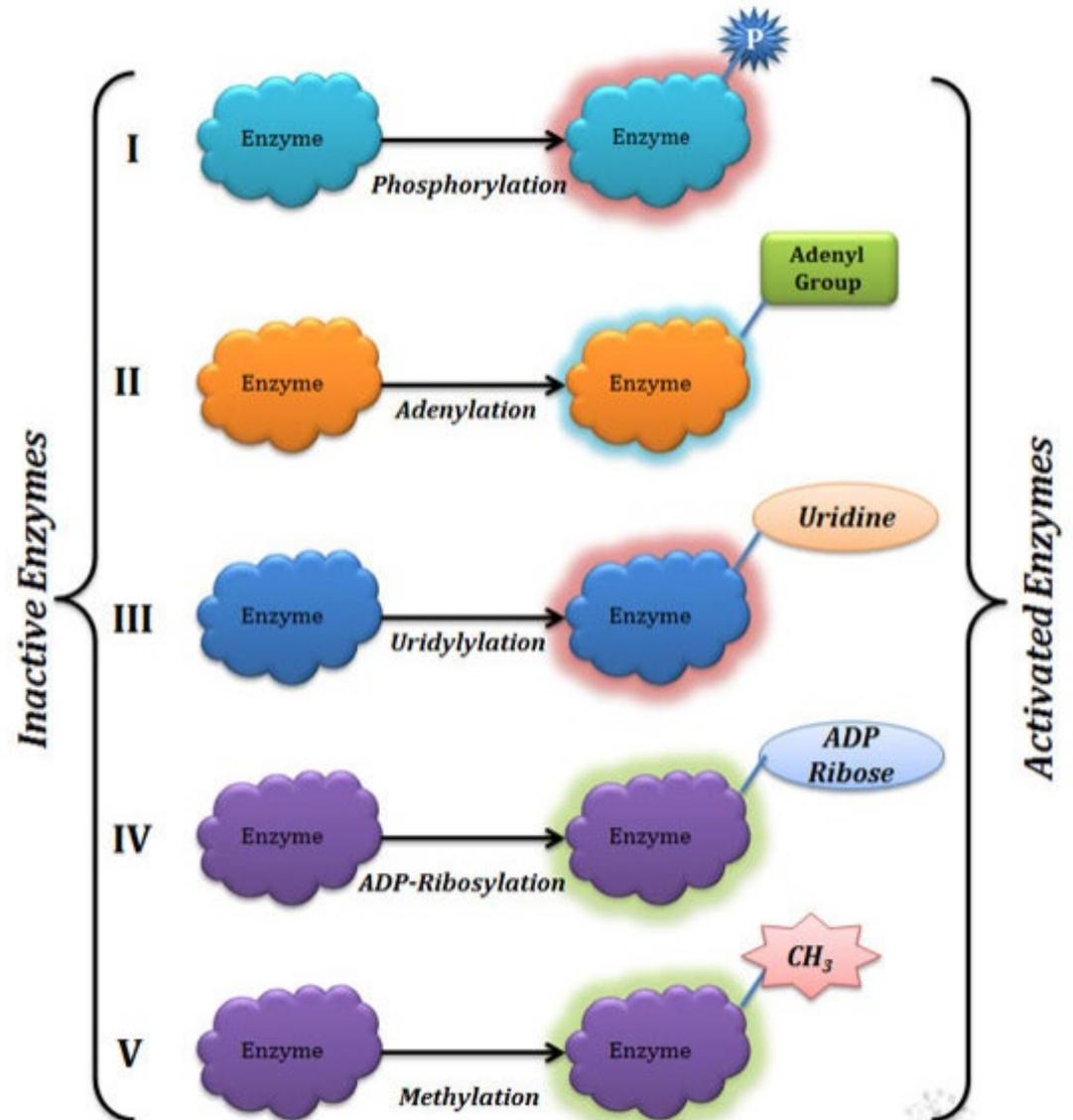
## Généralités

☐ s'agit de l'ajout d'un groupement chimique sur un résidu d'acide aminé de la protéine enzyme.

☐ existe de nombreuses modifications covalentes post-traductionnelles

☐ Ces modifications sur des enzymes modifient leur caractéristiques cinétiques

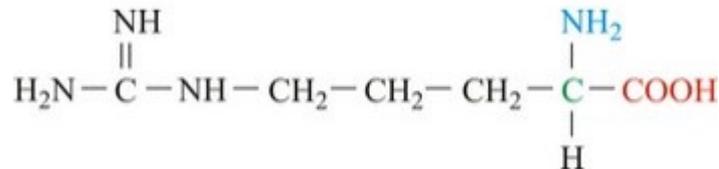
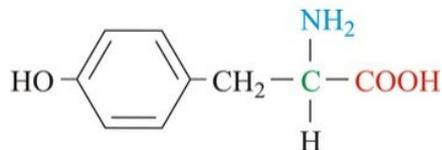
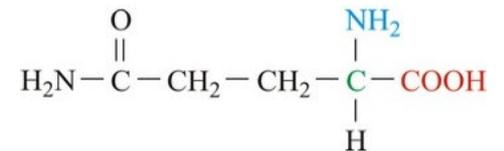
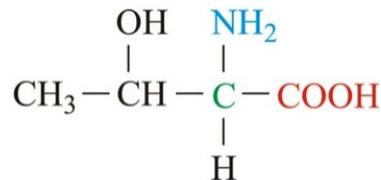
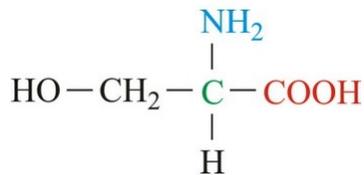
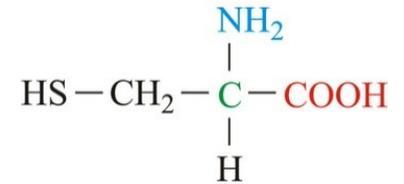
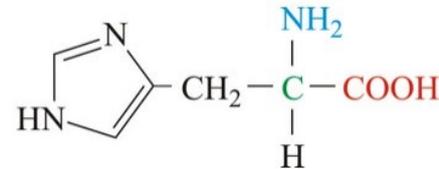
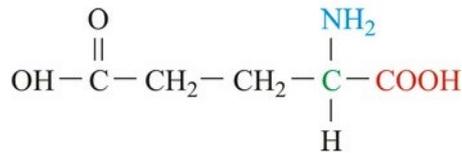
- Capacité de lier le substrat ( $K_m$ )
- Vitesse ( $V_m$ )



# Modif. Covalentes réversibles

## Quelques exemples communs

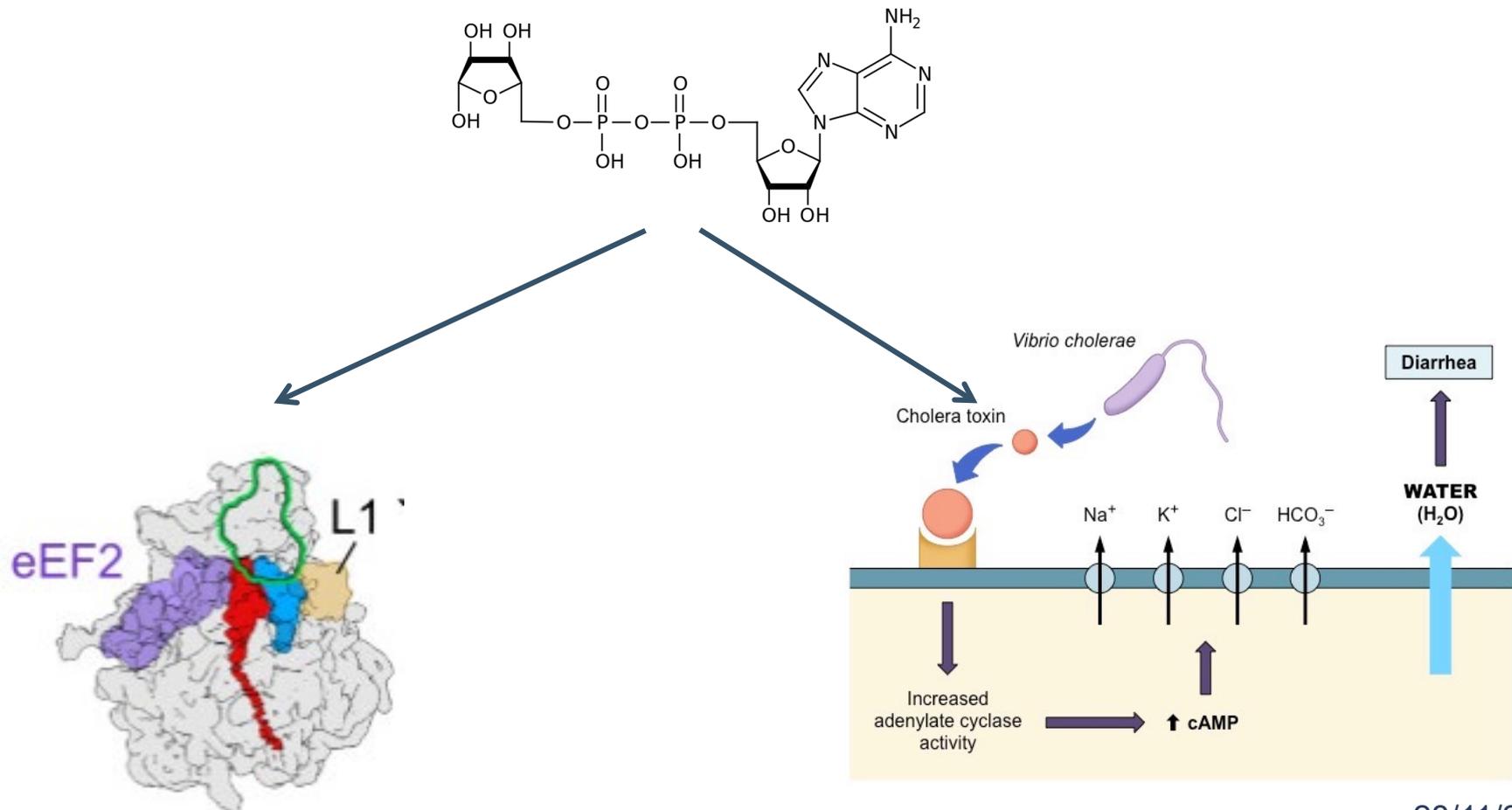
- ❑ **Phosphorylation** : ajout d'un groupement phosphate sur des acides aminés phosphorylables (alcool : Tyr, Ser, Thr et His) d'une protéine.
- ❑ **Adénylation** : addition d'une adénine sur les résidus Tyr d'une protéine.
- ❑ **ADP-ribosylation** : addition d'un groupement ADP-ribose sur Arg, Gln et Cys
- ❑ **Méthylation** : ajout d'un groupement méthyl sur un résidu Glu



# Modif. Covalentes réversibles

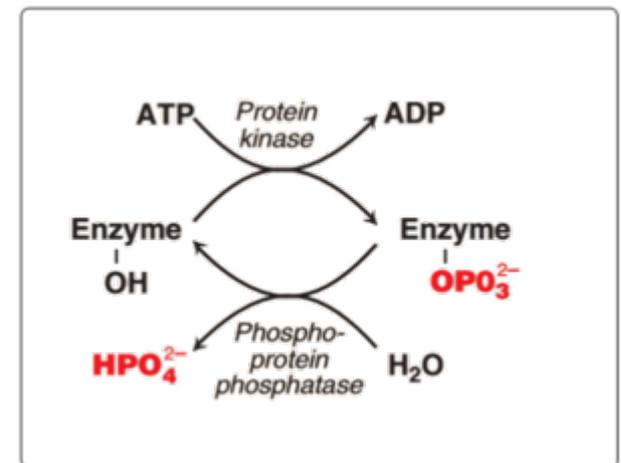
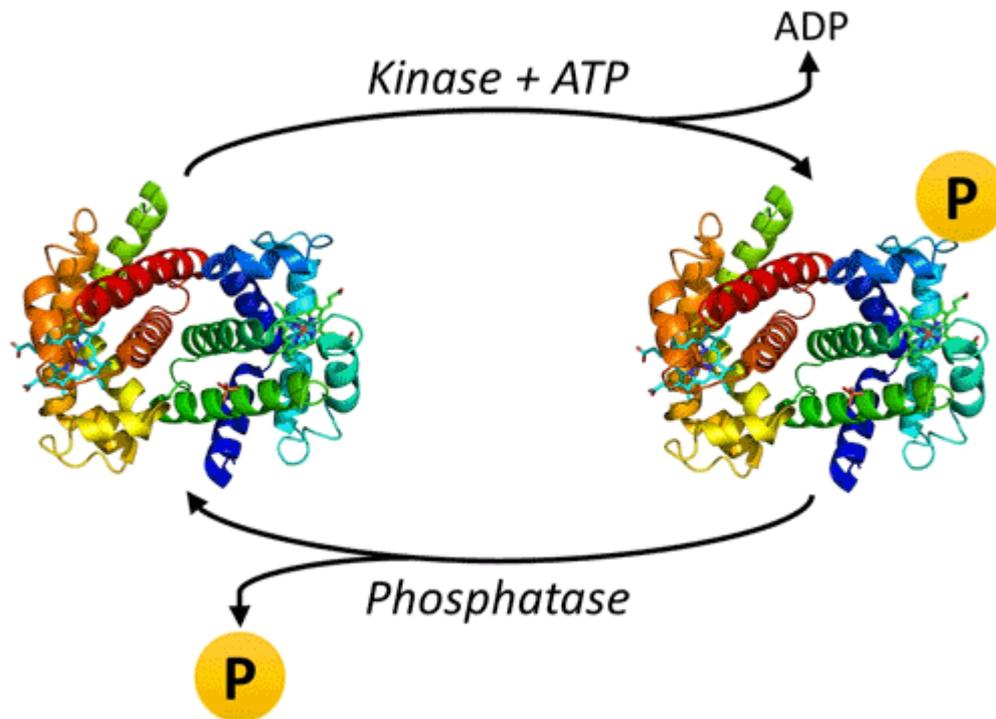
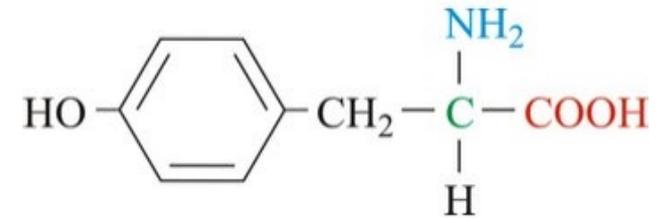
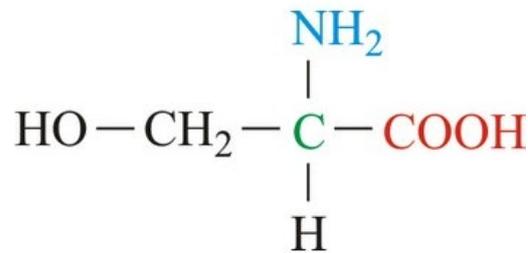
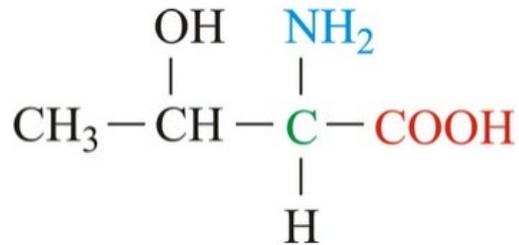
## Exemple de l'ADP Ribosylation

Les toxines diphtériques, pertussique et cholérique sont des enzymes qui catalysent l'ADP ribosylation (et donc l'inactivation) d'enzymes clés du métabolisme



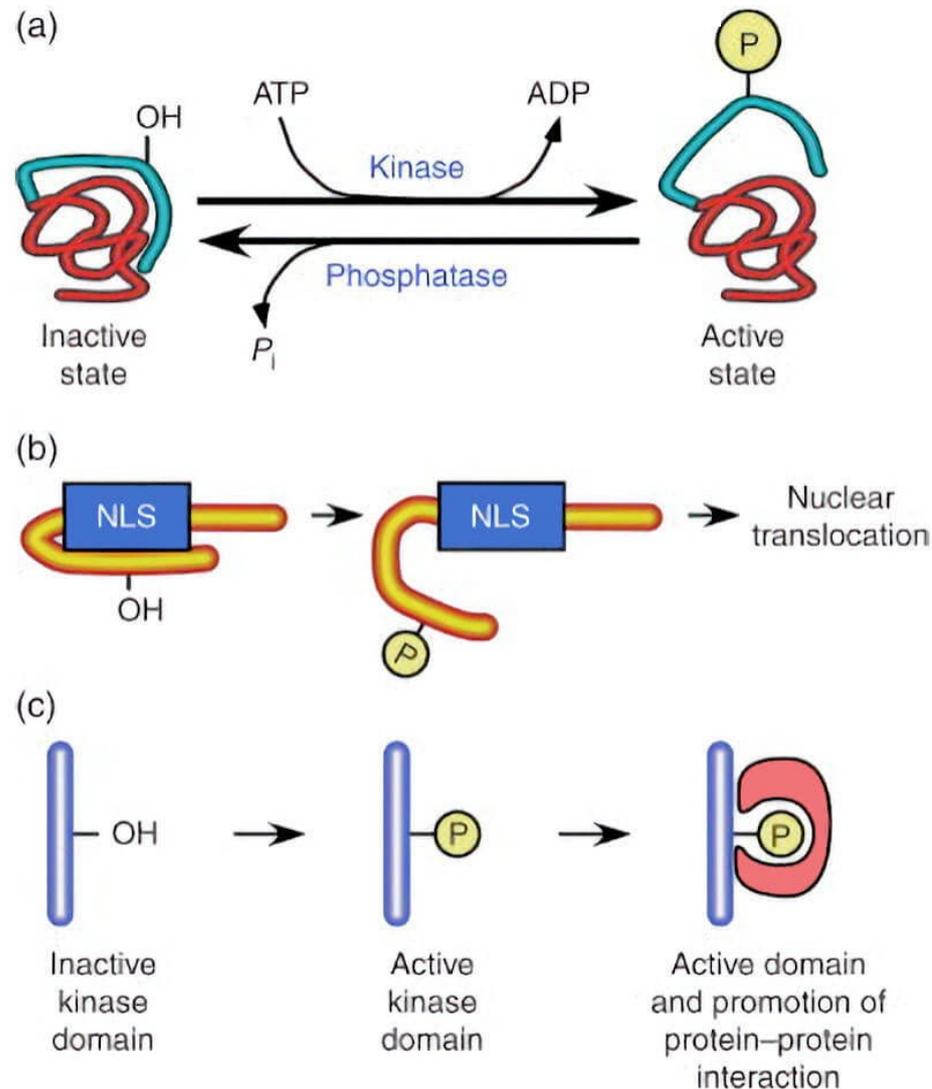
# Modif. Covalentes réversibles

## Le mécanisme de phosphorylation



# Modif. Covalentes réversibles

## Le mécanisme de phosphorylation



# Plan du cours

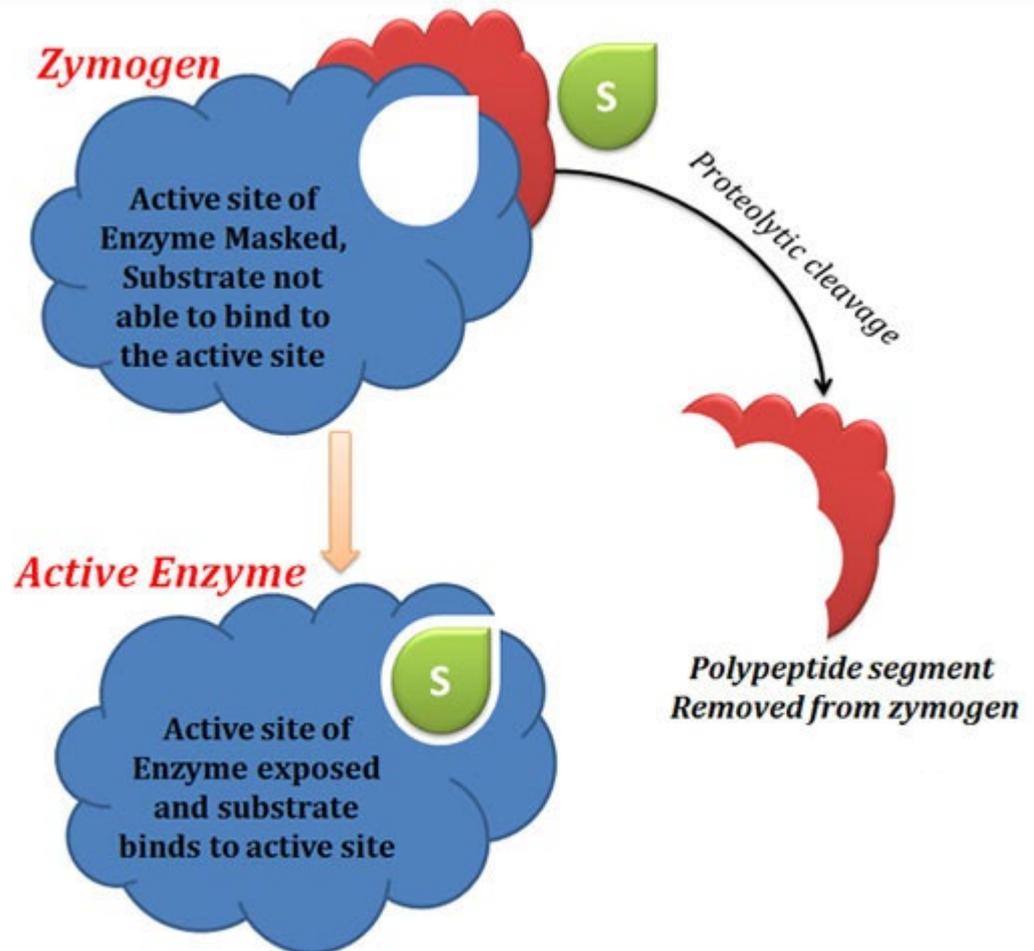
- ❑ 1) Introduction
- ❑ 2) Régulation transcriptionnelle
- ❑ 3) Enzyme allostérique
- ❑ 4) Modifications covalentes réversibles
- ❑ **5) Activation protéolytique des enzymes**
- ❑ 6) Rétrocontrôle transcriptionnel
- ❑ 7) Les isoenzymes

# Activation protéolytique

## Mécanisme général

Il existe des enzymes qui sont produites sous forme inactives et qui nécessitent une coupure (clivage) de leur chaîne polypeptidique pour devenir actives

Ces enzymes sous forme inactives sont appelées Zymogènes ou Pro-Enzymes

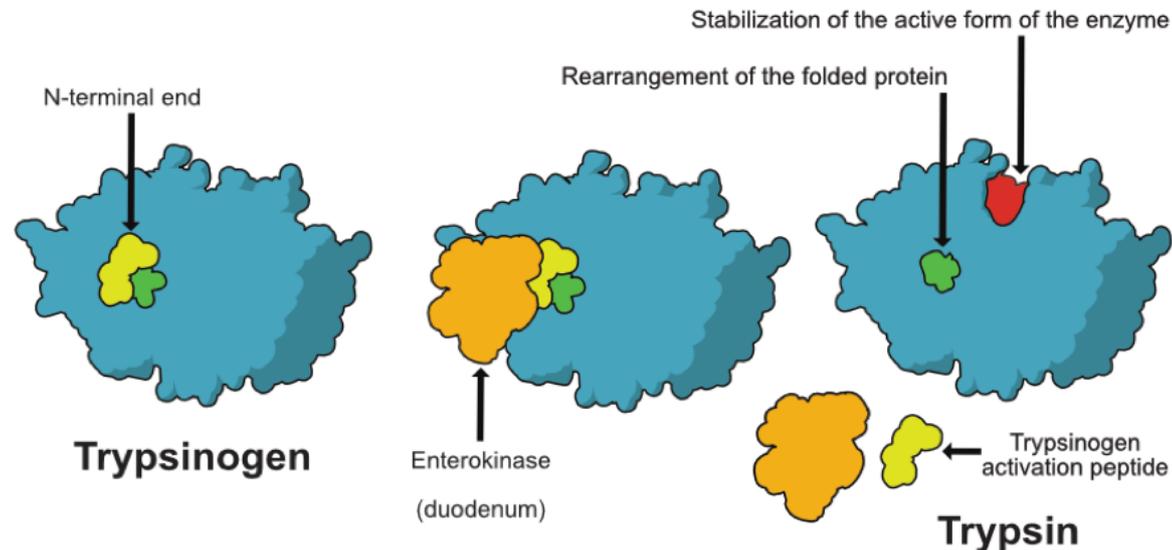


### Zymogen Activation by Proteolytic Cleavage

# Activation protéolytique

## Mécanisme général

- Les pro-enzymes sont sécrétées sous forme inactives et converties ensuite sous forme active
- L'activation intervient par clivage protéolytique et élimination d'une partie de la chaîne polypeptidique
- Ces coupures entraînent des changements de structure, de conformation qui exposent le site actif de l'enzyme
- Ce type d'activation est irréversible (contrairement à l'allostérie ou aux modifications post-traductionnelles). L'enzyme une fois activé ne peut plus être inactivée.



# Activation protéolytique

## Mécanisme général

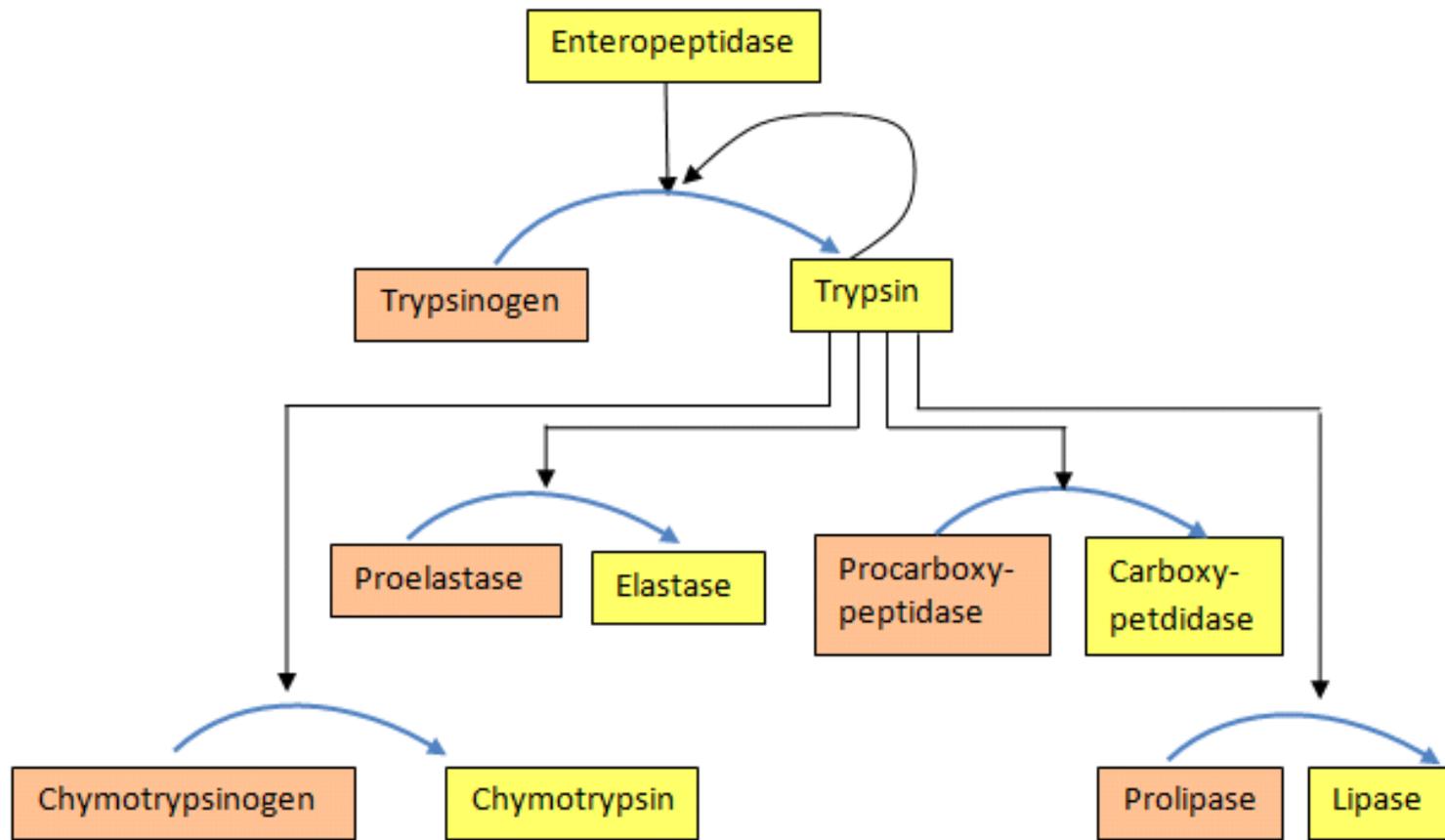
❑ Quel intérêt de contrôler l'activation d'enzymes par clivages ?

- Cela permet d'éviter des dommages cellulaires liés à l'activité catalytique intrinsèque (enzymes digestives).
- Permet d'immobiliser et stocker sur le long terme des enzymes inactives dans la cellule.
- Ces zymogènes peuvent être convertis sous forme active lorsque le besoin s'en fait sentir.
- La demi-vie des pro-enzymes est plus longue que celle des enzymes actives.

# Activation protéolytique

## Les enzymes digestives

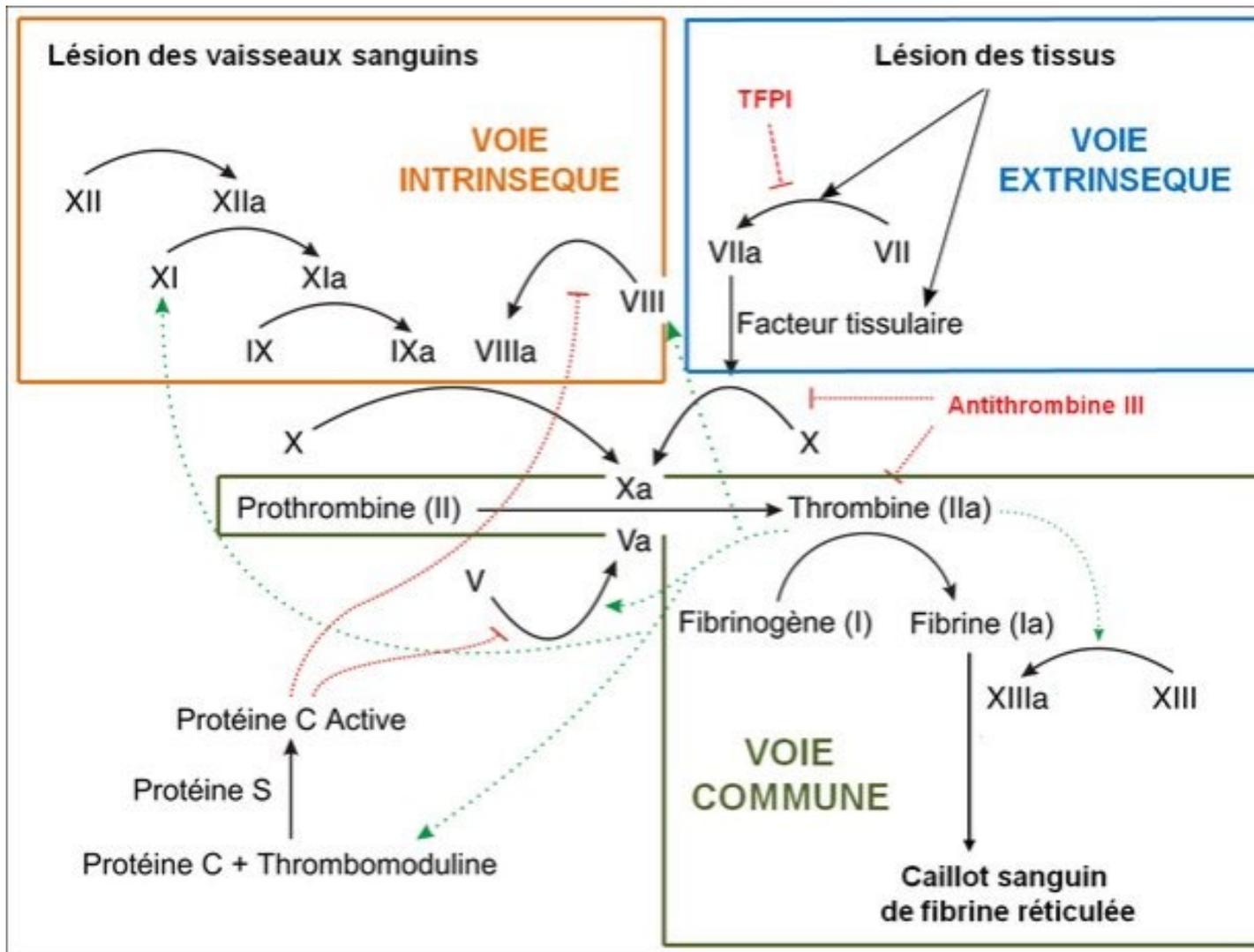
Exemple : les enzymes digestives



# Activation protéolytique

## Les voies de la coagulation

### Exemple 2 : Les voies de la coagulation

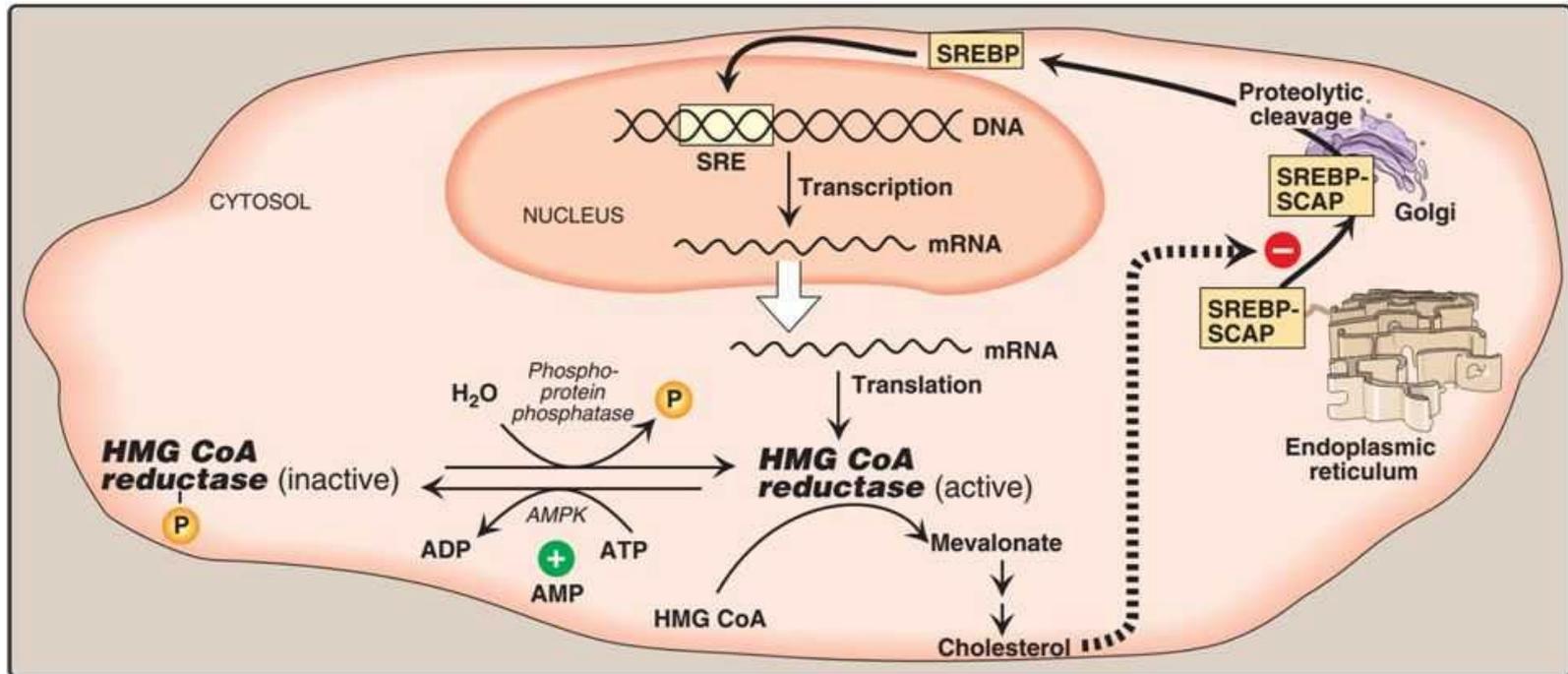


# Plan du cours

- ❑ 1) Introduction
- ❑ 2) Régulation transcriptionnelle
- ❑ 3) Enzyme allostérique
- ❑ 4) Modifications covalentes réversibles
- ❑ 5) Activation protéolytique des enzymes
- ❑ 6) **Rétrocontrôle transcriptionnel**
- ❑ 7) Les isoenzymes

# Rétrocontrôle transcriptionnel

## Exemple du contrôle de la HMGCoA Reductase



- \* Figure 18.6 Regulation of HMG CoA reductase.  
SRE = sterol regulatory element;  
SREBP = sterol regulatory element binding protein;  
SCAP = SREBP cleavage-activating protein

La **HMG-CoA réductase** est l'enzyme limitant la vitesse de synthèse du [cholestérol](#). La HMG-CoA réductase qui est l'une des enzymes les mieux régulées dans la nature, [catalyse](#) la conversion de l'HMG-CoA en [acide mévalonique](#) ou mevalonate. Il est considéré comme l'enzyme limitant la vitesse de la voie de [biosynthèse](#) du cholestérol.

Normalement, dans les cellules de mammifères, cette enzyme est supprimée par une forte concentration en cholestérol afin de limiter sa synthèse.

Le gène HMGR humain qui code pour la seule HMG-CoA réductase humaine est situé sur le [chromosome](#) 5.

Probablement en raison de son rôle critique dans l'[homéostasie](#) du cholestérol cellulaire, la HMG-CoA réductase de [mammifère](#) est largement régulée aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Ainsi, les [modifications](#) de l'[activité de l'enzyme](#) s'accompagnent de modifications de la synthèse du cholestérol.

L'activité de l'enzyme est régulée par des changements dans la transcription, la traduction (mécanisme inconnu) et la stabilité des protéines.

La dégradation de la HMG-CoA réductase est régulée et la [demi-vie](#) (une mesure de la stabilité des protéines) varie d'au moins 10 fois. Lorsque le taux de cholestérol cellulaire est bas, l'enzyme est relativement stable (demi-vie ~10 h).

Ainsi, l'enzyme HMG-CoA réductase active s'accumule dans le réticulum endoplasmique en réponse à (1) une vitesse lente de dégradation de la protéine et (2) une transcription [accrue](#) par SREBP. Étant donné que la HMG-CoA réductase est l'enzyme limitant la vitesse, le résultat net est une augmentation de la synthèse du cholestérol.

Les travaux de Brown et Goldstein ont montré que la transcription et le clivage protéolytique des isoformes SREBP-1a et SREBP-2 étaient activés par la déplétion en cholestérol.

Ainsi, quand la concentration de cholestérol est faible, le complexe SCAP-SREBP migre du réticulum endoplasmique vers le Golgi où le précurseur est clivé par deux protéases. Au contraire, lorsque la concentration de cholestérol est élevée, le complexe SCAP-SREBP est retenu dans les membranes du réticulum endoplasmique par les protéines de rétention Insig et le précurseur n'est pas clivé.

# Plan du cours

- ❑ 1) Introduction
- ❑ 2) Régulation transcriptionnelle
- ❑ 3) Enzyme allostérique
- ❑ 4) Modifications covalentes réversibles
- ❑ 5) Activation protéolytique des enzymes
- ❑ 6) Rétrocontrôle transcriptionnel
- ❑ 7) **Les isoenzymes**

# Les isoenzymes

## Généralités

□ **Isoenzyme** : Il s'agit d'une enzyme qui possède la même activité enzymatique mais qui diffère par sa séquence en acides aminés.

- Les isoenzymes ont des paramètres cinétiques différents
- Le  $K_m$  et  $V_m$  d' isoenzymes sont différents
- Exemple : Glucokinase et Hexokinase

□ Les isoenzymes sont capables de catalyser la même réaction mais dans des conditions différentes dans les cellules (pas les même  $K_m$  et  $V_m$  → donc pas les même comportements cinétiques)

L'**hexokinase** est l'enzyme qui phosphoryle le glucose en glucose 6 P dans les cellules périphériques (genre le muscle) et **la glucokinase** est l'enzyme qui phosphoryle le glucose dans le foie.

Le  $K_m$  de la glucokinase vis-à-vis du glucose est élevé et elle n'agit que lorsque le taux de glucose intracellulaire est augmenté. La glucokinase ( $V_{max}$  élevée) répond bien au besoin du foie qui doit faire face aux afflux importants de glucose en période post-prandiale afin de le stocker sous forme de glycogène.

Le  $K_m$  de la hexokinase est bas car elle a une très forte affinité pour le glucose elle subit une rétroinhibition en présence de concentration élevée en glucose. Son  $V_{max}$  est relativement faible en comparaison à la glucokinase.

# Les isoenzymes

## Exemple de la LDH

☐ Exemple de la LDH (Lactico Déshydrogénase)

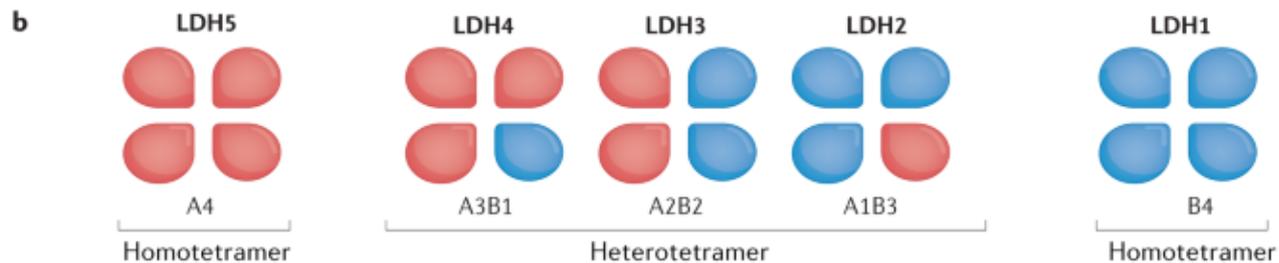
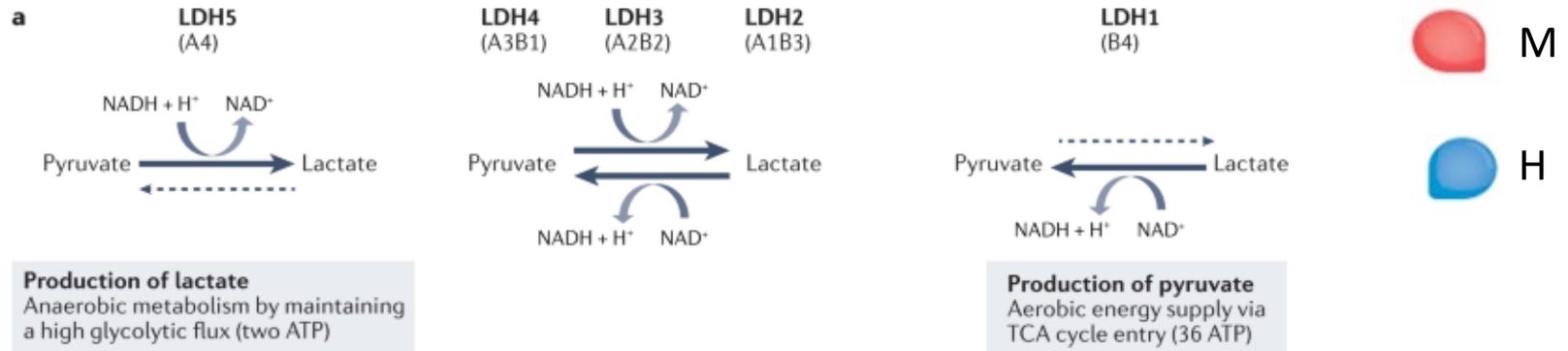
- Il existe deux isoformes de LDH (H-cœur Chr12  et M-muscle chr 11 )
- Deux séquences, avec des constantes cinétiques différentes.

☐ Différents tissus expriment différentes isoenzymes en fonction de leurs besoins métaboliques

☐ En contrôlant le niveau d'expression de chacune des sous unités H et M on peut réguler l'activité enzymatique soit vers la formation de pyruvate, soit vers la formation de lactate

# Les isoenzymes

## Exemple de la LDH



**c**

	LDH5	LDH4	LDH3	LDH2	LDH1
<b>Expressed in</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liver</li> <li>• Skeletal muscle</li> <li>• Kidney (medulla)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liver</li> <li>• Skeletal muscle</li> <li>• Kidney (medulla)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lymphoid tissue</li> <li>• Lung</li> <li>• Platelets</li> <li>• Brain</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heart</li> <li>• Red blood cells</li> <li>• Kidney (cortex)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heart</li> <li>• Red blood cells</li> <li>• Germ cells</li> </ul>
<b>Non-malignant serum (% of activity)</b>	8–20%	9–15%	18–25%	27–37%	17–27%
<b>Related diseases</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liver diseases</li> <li>• Skeletal muscle diseases</li> <li>• Lung cancer</li> <li>• Advanced-stage CRC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Breast cancer</li> <li>• Advanced-stage melanoma</li> <li>• Advanced-stage CRC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leukaemia</li> <li>• Breast cancer</li> <li>• Advanced-stage melanoma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Haemolytic diseases</li> <li>• Non-Hodgkin lymphoma</li> <li>• Lymphocytic leukaemia</li> <li>• Myeloproliferative syndrome</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Myocardial infarction</li> <li>• Haemolytic anaemia</li> <li>• Ovarian cancer</li> <li>• Testicular cancer</li> </ul>



Génie  
**Biologique**  
Montpellier

---





Génie  
**Biologique**  
Montpellier

---





Génie  
**Biologique**  
Montpellier

---

