

II- FORMATION DU CENTRE ACTIF DES ENZYMES

Les évènements qui conduisent à la formation d'une protéine active sont complexes et diversifiés. Ils sont actuellement plus ou moins déchiffrés. En effet, les informations contenues dans les gènes sont nécessaires pour arriver à la structure primaire d'un peptide, mais ceci reste insuffisant et d'autres événements d'importance capitale doivent se produire pour que la fonction biologique qui nécessite une structure tridimensionnelle ou même une structure quaternaire puisse s'exprimer. Ces événements peuvent se produire au cours de la biosynthèse protéique (co-traductionnels) ou après la formation de la chaîne (post-traductionnels).

Ces modifications sont de 2 types, les **processus covalents** qui touchent les liaisons covalentes, comme les protéolyses limitées et les modifications chimiques et les **processus non covalents**, tels que les repliements et l'assemblage des sous unités. Ce sont ces modifications qui engendrent les propriétés fonctionnelles des protéines.

Il est vrai que la fonction d'une protéine dépend de sa structure tridimensionnelle, mais aussi de sa localisation à l'intérieur d'un organe ou d'une cellule ou d'un organite. Il ne faut pas imaginer une cellule comme un sac à l'intérieur duquel baignerait l'ensemble des molécules biologiques, mais au contraire comme une structure hautement ordonnée dans laquelle des fonctions particulières ne peuvent s'exercer que dans des endroits bien précis, exigeant un microenvironnement bien déterminé, permettant des régulations très précises et très fines qui assurent son bon fonctionnement. Le rôle d'une protéine est autant lié à son organisation structurale qu'à sa localisation précise dans la cellule.

1. PROCESSUS COVALENTS

Les protéolyses limitées et les modifications chimiques sont les 2 grands axes qui forment les processus covalents.

1.1. Protéolyses limitées

Certaines protéines subissent des actions protéolytiques ciblées et limitées, au cours ou après leur synthèse voire même lors de leur transport inter- ou intracellulaire.

Actuellement on connaît 2 types d'action protéolytique limitée qui conduisent à la formation de protéines fonctionnelles, à savoir, le **clivage du peptide signal** et **l'activation des précurseurs** zymogènes et prohormones.

Un peptide signal (séquence signal) est une séquence d'adressage d'une vingtaine d'acides aminés, riche en acides aminés hydrophobes (Phe, Leu, Ile, Met, Val), située à l'extrémité N-terminale de la majorité des protéines destinées à être **sécrétée** par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi ou l'endosome ou à être **adressée** à un organe intracellulaire tel que le noyau, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique ou le peroxysome. Ces peptides signaux sont particulièrement présents lorsqu'une protéine n'est pas codée par le génome de l'organe en question, mais par le génome nucléaire.

Des coupures protéolytiques spécifiques sont nécessaires à l'activation de certaines protéines. Elles conduisent à l'activation du précurseur et permettent la régulation de la production des protéines actives.

Pratiquement, plusieurs systèmes biologiques sont régulés par protéolyse: on peut citer la formation des hormones et l'activation de zymogènes en enzymes actives et la cascade de coagulation du sang ... etc.

L'activation des zymogènes en enzymes signifie des ruptures protéolytiques limitées n'entraînant que de faibles variations dans la chaîne polypeptidique mais apportant des affinements conformationnels très importants.

Dans le cas des protéases à sérine, la protéolyse limitée du zymogène induit la formation d'un **pont salin** entre le groupe aminé libéré par protéolyse et un carboxylate voisin de la sérine réactive. Ce pont stabilise la structure fonctionnelle de l'enzyme.

La protéolyse limitée et l'établissement du pont salin induisent de **faibles affinements conformationnels** du point de vue amplitude mais très décisifs du point de vue activité.

Prenant l'exemple de l'insuline. La pré-pro-insuline (108 aa) donne la pro-insuline (84 aa) après clivage du peptide signal. L'élimination du segment C (33 aa) fait apparaître les chaînes A (21 aa) et B (30 aa) qui ensemble forment l'insuline active (51 aa) après réarrangement conformationnel (**Fig. 24**).

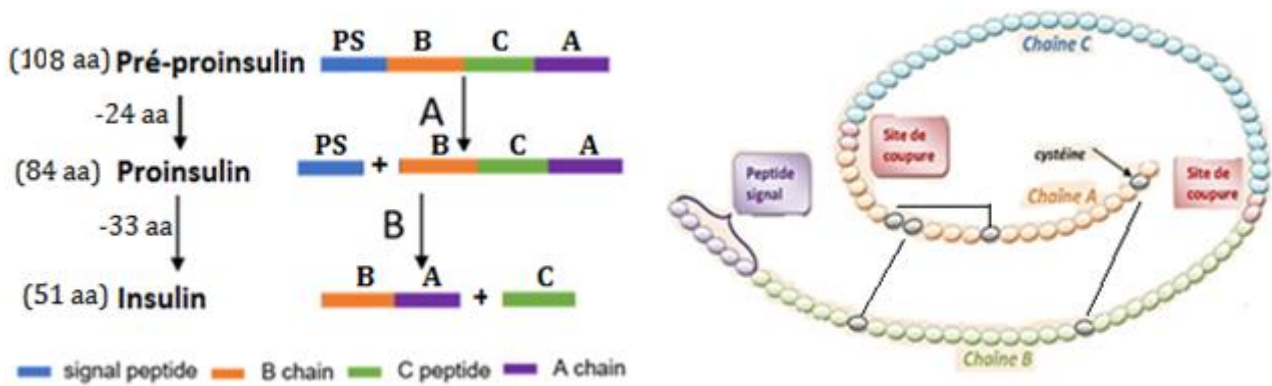


Fig. 24: Transformation de la pré-pro-insuline en pro-insuline puis en insuline active. (A) = protéolyse limitée induisant le clivage du peptide signal, (B) protéolyse limitée d'activation induisant la libération du segment peptidique C. Ponts disulfure inter-chaines (B7-A7 et B19-A20) et intra-chaine (A6-A11).

Cas de maturation des protéines dans le réticulum endoplasmique

La maturation des protéines dans le réticulum endoplasmique se fait en 3 étapes:

- *1- Clivage du peptide signal: un clivage au bon site est indispensable à un repliement correct.
- *2- Repliement de la protéine: avant tout, les polypeptides se lient aux protéines chaperons, qui les maintiennent dépliées jusqu'à la fin de la translocation. L'intervention des chaperons est nécessaire car:
 - * Elle favorise la translocation en maintenant la protéine dépliée jusqu'à la fin de la translocation.
 - * Les chaperons empêchent un repliement prématuré de la protéine qui risque d'être incorrect tant que la structure primaire n'est pas encore complète.
 - * Les chaperonines favorisent le repliement ce qui empêche les interactions illicites entre les chaînes polypeptidiques voisines.
- *3 Glycosylation: permet de renforcer les formes natives des protéines.

1.2. Modifications chimiques

En plus des protéolyses limitées, plusieurs événements chimiques conduisent à la formation et la stabilisation des protéines fonctionnelles. Les modifications chimiques co- et post-traductionnelles sont très diversifiées, on citera les plus importants.

1.2.1. Ponts disulfures S-S

C'est une modification co- et post-traductionnelle. Elle confère une plus grande stabilité à la protéine ce qui implique qu'elle préserve leur structure fonctionnelle

malgré les variations que puisse subir leur environnement sauf cas extrêmes. La formation de ces ponts disulfures résulte de l'oxydation et de la condensation de deux groupements sulfhydriles (thiols, SH) des résidus cystéine.

1.2.2. Glycosylation

C'est une modification très répandue dans les protéines membranaires et dans beaucoup de protéines solubles. Il est à noter que les aa capables de se lier aux sucres sont peu nombreux (Ser, Thr, Asn) et que les glucides qui participent à la glycosylation ne sont pas toujours les mêmes. La présence de la fraction glucidique améliore la stabilité de la protéine. Comme elle est fondamentale à l'adhésion cellulaire, à la fixation d'hormones et à la réponse immunitaire.

1.2.3. Hydroxylation des lysines et des prolines

C'est une modification enzymatique qui consiste en l'ajout d'un groupement OH à la molécule. La prolyl hydroxylase convertit la proline en 4hydroxy-proline et 3 hydroxyproline. La lysyl hydroxylase transforme la lysine en hydroxylysine.

1.2.4. Phosphorylation

La phosphorylation est une réaction réversible (phosphatase/kinase) très importante dans la régulation et le contrôle de certains processus cellulaires. Elle se fait principalement sur les résidus Ser, Thr, Tyr. Elle peut soit activer soit inhiber l'activité selon l'enzyme en question.

Exemples d'enzymes activées par la phosphorylation: Phospho fructokinase, triacyl glycérol kinase, tyrosine hydroxylase, ARN polymérase.

Exemples d'enzymes inhibées par la phosphorylation: Glycogène synthétase, pyruvate déshydrogénase, glycérophosphate acyl transférase.

1.2.5. Carboxylation

La carboxylation est une modification post-traductionnelle, qui permet d'ajouter un groupement carboxylique (-COO-) à la molécule. Elle touche principalement les résidus Lys, Asp, Glu. Dans le cas de la Lys par exemple, les résidus lysyls se transforment en carboxylsyls ...etc.

1.2.6. Acétylation de la partie N-terminale (N α Acétylation)

L'acétylation est une modification post-traductionnelle catalysée par les N α acétyltransférases. Elle consiste en l'ajout d'un groupement acétyl- (CH₃-CO-) sur le groupement aminé de l'extrémité N-terminale de la protéine. La majorité des protéines humaines subissent cette modification.

Exemple: L'acétylation des résidus lysine des histones, permet de réguler l'expression des gènes. En effet, l'acétylation réduit l'affinité des histones pour l'ADN et par conséquent elle affaiblit leurs interactions moléculaires, ce qui va permettre la pénétration de l'ARN polymérase et par conséquent la transcription des gènes de la région concernée.

2. PROCESSUS NON COVALENTS

Les modifications chimiques ne sont pas communes à toutes les protéines, par contre, les repliements des chaînes polypeptidiques sont communs à toutes les protéines, à l'exception de la structure quaternaire reste un processus complémentaire.

2.1. Repliements des protéines

Le repliement est un processus capital, qui transforme une information monodirectionnelle en une information tridimensionnelle, seule capable d'assurer une activité biologique. Le repliement est considéré comme étant le premier acte de morphogénèse. Les différents niveaux de structuration des protéines sont essentiels pour former le centre actif d'une enzyme et pour moduler ses propriétés.

Pratiquement, la connaissance des principes et des règles de repliement des protéines va permettre une exploitation des informations contenues dans le génome, ce qui va permettre de développer de nouvelles thérapies et même de concevoir des substances synthétiques ayant des activités biologiques spécifiques.

2.2. Assemblage des sous unités

L'assemblage des sous unités (structure quaternaire) n'a pas une grande **amplitude**, mais il permet une meilleure mise en place des sites actifs. Dans certaines enzymes *oligomériques*, les sites actifs sont localisés à l'interface entre deux sous unités et impliquent des chaînes latérales d'acides aminés appartenant à chacune d'elles. Dans certaines enzymes oligomériques, une sous unité peut présenter une activité enzymatique plus au moins importante.

Toutes les informations nécessaires au repliement d'une protéine dans un environnement donné sont contenues dans sa séquence. Une recherche au hasard de la conformation native, la plus stable parmi toutes les conformations possibles que peut adopter une chaîne polypeptidique n'est pas une hypothèse plausible et demanderait un temps astronomique (**voir exo 9, TD N° 2**).

III. TOPOLOGIE DU CENTRE ACTIF DES ENZYMES

La disproportionnalité entre la taille de l'enzyme et celle du substrat a conduit à la notion du centre actif. Koshland a défini le centre actif comme étant l'ensemble des atomes de l'enzyme qui rentrent en contact avec les atomes du substrat. Cette définition tient compte de la structure mais ne tient pas compte des fonctions.

En fait, les résidus aminés de l'enzyme qui sont en contact avec le substrat peuvent intervenir dans la fixation du substrat en participant à la catalyse. Certains ne jouent aucun rôle malgré leur présence dans le centre actif, leur modification ou leur substitution n'a aucun effet sur l'activité de l'enzyme.

Par contre certains acides aminés qui ne se trouvent pas dans le rayon de Van der Waals, avec le substrat peuvent jouer un rôle essentiel en favorisant la fixation du substrat ou en créant un microenvironnement favorable au fonctionnement du site actif ou en participant au maintien de la conformation fonctionnelle du site actif.

Il faut bien retenir que le centre actif, inclut à la fois le **site catalytique (actif)**, le **site de fixation** et le **site de conformation**.

* **Site actif** qui concerne les groupes intervenant directement dans l'acte chimique.

* **Site de fixation** qui concerne les groupes de l'enzyme qui établissent des interactions non covalentes avec le substrat.

* **Site conformationnel** qui correspond aux résidus spécifiques et importants pour le maintien de la conformation active de l'enzyme.

La topologie du centre actif de l'enzyme n'est pas facile à déterminer. Elle fait appel à plusieurs méthodes complémentaires, à savoir: les **approches cinétiques**, les **méthodes chimiques**, les **mutagenèses dirigées**, la **radiocristallographie** et **RMN**.

3.1. Approche cinétique (analyse des profils de pH)

L'approche cinétique consiste à analyser les variations des paramètres cinétiques en fonction du pH, c.à.d. analyser l'influence du pH sur la réaction enzymatique. Chaque enzyme a un pH optimum (zone d'activité). L'effet du pH sur l'activité enzymatique provient de l'état d'ionisation des éléments composants le centre actif en fonction du pH. Cette approche permet de déterminer le rôle des groupements impliqués dans l'activité, sans apporter une conclusion sur la nature de ces groupements.

Le pH joue un rôle important car il a des effets sur:

1- Etat conformationnel de la protéine: trois cas peuvent se présenter (**Fig. 25**):

a- Dénaturation réversible

b- Dénaturation irréversible

c- Ionisation des groupements intervenant dans la conformation active de l'enzyme

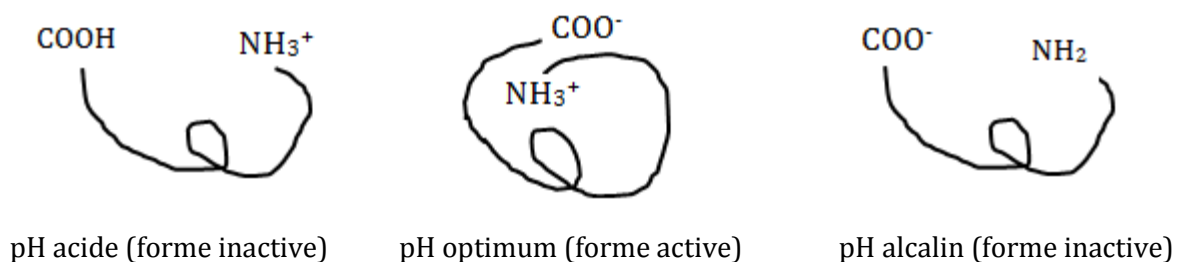


Fig. 25: Equilibre conformationnel des protéines à sérine en fonction du pH

2- Etat d'ionisation du substrat: le substrat lui-même peut exister sous différentes formes ioniques dans la zone d'activité de l'enzyme.

3- Associations enzyme-substrats, qui font intervenir des interactions électrostatiques entre les charges de l'enzyme et les charges de signe opposé du substrat.

4- Ionisation des groupes catalytiques. Il existe un grand nombre d'états d'ionisation des groupes catalytiques de l'enzyme, qui dépendent du pH et des constantes d'ionisation des divers groupes. Il est clair, que c'est une zone très étroite de pH qui fait que l'enzyme est catalytiquement active.

3.2. Méthodes chimiques

Les méthodes chimiques de marquage spécifique des groupes d'une protéine constituent des instruments très importants pour déterminer la nature de ces groupes.

Les stratégies utilisées pour modifier chimiquement des résidus du centre actif de l'enzyme sont nombreuses.

*Marquage par un substrat ou analogue de substrat moins réactif ou une coenzyme.

*Marqueurs d'affinité: une technique qui utilise les caractéristiques structurales des substrats pour diriger une fonction réactive (active-site directed reagent).

*Marquage par photoaffinité: à la différence des marqueurs d'affinité, la fonction chimique n'est pas réactive mais susceptible d'être activée par photolyse.

Ces techniques conduisent à un marquage spécifique, à condition de disposer de réactifs adéquats. Lorsque ces stratégies ne peuvent être utilisées, ils existent des réactifs plus au moins sélectifs du groupe que l'on veut marquer. Donc ils permettent de modifier un type de résidus bien défini et pas d'autres, mais seulement des réactifs sélectifs entraînant la modification préférentielle d'une catégorie de groupes dans des conditions de pH et de forces ioniques bien déterminées.

3.3. Mutagenèses dirigées

Elles constituent un outil très important et complémentaire aux méthodes chimiques pour l'étude du centre actif de l'enzyme. Elles sont principalement utilisées dans la détermination des résidus essentiels à la catalyse. Un contrôle très rigoureux doit se faire sur les propriétés structurales de l'enzyme mutante avant de tirer la conclusion.

3.4. Radiocristallographie

La radiocristallographie (cristallographie aux rayons X ou diffractométrie des rayons X ou XRD pour X-Ray Diffraction) est une méthode fondée sur la diffraction des rayons X par la matière cristalline. Donc elle exige l'obtention de cristaux de complexes que forme l'enzyme avec des analogues de substrat. Cette technique permet de connaître les groupes localisés à proximité de la liaison à rompre dans le substrat et susceptible d'intervenir dans la catalyse. Elle permet aussi de connaître les changements structuraux qui auront lieu lorsque le substrat est fixé à l'enzyme.

Les études radiocristallographiques sont très difficiles à réaliser avec le vrai substrat, car le complexe enzyme-substrat se décompose pendant la diffraction au

rayons X (avant et au cours de l'acquisition de données). Il faut donc faire recours à des analogues de substrat ou à des inhibiteurs spécifiques.

3.5. RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)

Le noyau de certains atomes d'une molécule placée dans un champ magnétique peut absorber l'énergie lorsqu'il est exposé à certains rayonnements électromagnétiques puis la relâcher. L'énergie mise en jeu lors de ce phénomène de résonance correspond à une fréquence très précise, cette fréquence est appelée *fréquence de résonance*. La spectroscopie RMN est basée sur ce principe. Elle est donc fondée sur la mesure de l'absorption de la radiation de radiofréquence par un noyau atomique dans un champ magnétique.

La RMN est une technique utilisée en physique, en chimie et en biochimie structurale et en médecine IRM (imagerie par résonance magnétique). La spectroscopie par RMN constitue l'un des plus puissants instruments de détermination de la structure des espèces organiques y compris les protéines.

La RMN présente l'avantage d'être appliquée à des protéines en solution, mais elle exige de fortes concentrations de l'ordre de 0.5 à 1 mM.

La radiocristallographie et RMN donnent des informations différentes mais complémentaires sur la molécule, car la molécule est placée dans des conditions différentes, en cristallographie, la protéine est bloquée dans un cristal, par contre en RMN, la protéine est solution, donc, elle est en libre rotation avec un degré de liberté plus important. La comparaison des données des 2 techniques, permet d'obtenir une bonne image sur la structure et la dynamique des protéines et ouvre des perspectives pour établir des relations entre la structure et les fonctions. Plus de 10000 structures protéiques déterminées par XRD et RMN sont déposées dans la Protein Data Bank (PDB) et quelques dizaines de milliers de structures ont été déterminées par l'exploitation de toutes les méthodes utilisables.