

4.3. Mécanismes catalytiques

Les mécanismes mis en jeu lors des réactions enzymatiques ne diffèrent pas de ceux qui sont impliqués dans la catalyse chimique. Cependant, les enzymes font intervenir un plus grand nombre de facteurs d'efficacité que les catalyseurs chimiques. Le principe est toujours d'abaisser la barrière énergétique de la réaction, donc d'augmenter la vitesse d'apparition des produits.

Pour abaisser la barrière d'énergie, il faut soit **déstabiliser l'état initial** ou **stabiliser l'état de transition**. Donc, un catalyseur peut affaiblir les liaisons fortes des substrats ou stabiliser les liaisons faibles formées dans les complexes activés (état de transition), et ceci soit par

1* **des interactions électrostatiques,**

2* **des interactions covalentes avec les électrons non appariés**

3* **distorsion de la liaison.**

Dans les réactions enzymatiques ces divers facteurs peuvent intervenir en même temps pour la même réaction. Les groupes fonctionnels impliqués dans la catalyse enzymatique sont les mêmes que ceux impliqués dans la catalyse chimique.

Sur la base des principes fonctionnels, les enzymes peuvent être classées en 3 groupes :

1-Enzymes qui fonctionnent sans coenzymes, c.a.d, la réaction chimique se fait directement par l'intermédiaire de groupes catalytiques de l'enzyme. Il peut s'agir de résidus de chaînes latérales nucléophiles, comme l'imidazole de His, les carboxyles des Asp et Glu, l'alcool des Ser et Thr. En plus les dipôles de la molécule peuvent intervenir pour polariser la liaison à rompre.

2-Enzymes qui fonctionnent avec un coenzyme dissociable, comme le NAD, qui intervient dans un grand nombre de déshydrogénases. Le coenzyme se comporte comme un 2^{ème} substrat.

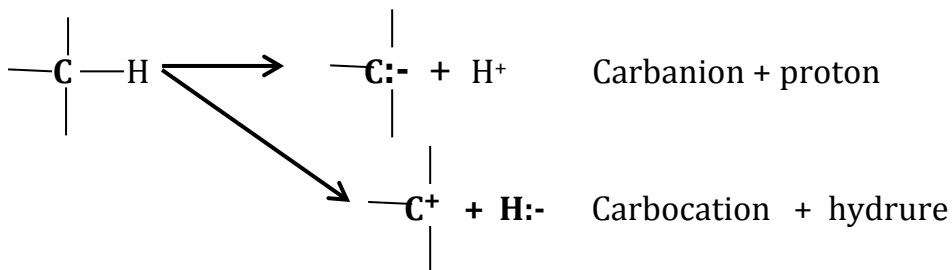
3-Enzymes comportant un groupement prosthétique (groupement non protéique fortement lié à la protéine), souvent c'est une métalloporphyrine. Dans ce cas, la réaction met en jeu le métal qui change de valence au cours de la réaction. C'est une catalyse par un métal de transition. Les oxydases et les peroxydases appartiennent à cette catégorie.

4.3.1. Catalyse chimique

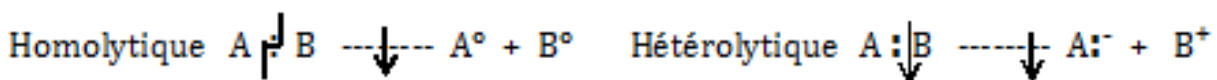
4.3.1.1. Définitions

a- Mécanisme de rupture d'une liaison covalente

La rupture d'une liaison covalente peut se faire selon 2 mécanismes différents si on prend en considération le devenir des électrons de la liaison à rompre. Les 2 ruptures possibles sont: **rupture hétérolytique** ou polaire et **rupture homolytique** ou radicalaire. La scission hétérolytique correspond à la rupture asymétrique de la liaison qui donne naissance à des ions. Lorsqu'une liaison C-H subit une rupture hétérolytique, il y'aura 2 mécanismes possibles, soit que les 2 électrons restent sur le carbone donnant lieu à un **carbanion** et à un proton. Ou bien les électrons sont captés par l'hydrogène formant un ion hydrure et un **carbocation**.



La rupture homolytique est symétrique avec partage du doublet d'électron, ce qui donne lieu à des radicaux libres. Les radicaux libres sont très instables



La majorité des réactions biochimiques sont hétérolytiques, toutefois certaines réactions enzymatiques (oxydases et peroxydases) sont homolytiques et font apparaître des espèces radicalaires.

b- Réactifs nucléophiles et électrophiles

Les réactifs qui peuvent catalyser une réaction chimique sont des réactifs polaires classés en agents nucléophiles et électrophiles, selon leur rôle dans la réaction. Lorsqu'un réactif fournit un doublet d'électron au carbone de la liaison à rompre dans une molécule organique, le réactif est dit **nucléophile** (anionoïde), comme les ions chargés négativement, les molécules contenant des atomes porteurs de doublets libres et les molécules comportant des liaisons polarisées ou polarisables (ex HO⁻, RO⁻, CN⁻ ... etc.).

Le réactif qui accepte un doublet d'électrons du carbone dans une réaction est dit **électrophile** (cationoïde), comme les ions positifs et les molécules contenant des liaisons polarisées ou polarisables (ex H₃O⁺, NH₄⁺ ...etc.).

c- Théorie de l'état de transition

L'état de transition est un état instable dans lequel la liaison est en train de se former ou de se rompre. La stabilisation de cet état est impliquée dans les mécanismes catalytiques, elle permet d'abaisser la barrière d'énergie de la réaction.

4.3.1.2. Catalyse nucléophile

Beaucoup de résidus de protéines ont des chaînes latérales portant des groupes nucléophiles capables d'intervenir dans la catalyse. C'est le cas de l'hydroxyle de la sérine dans les protéases à sérine et dans les phosphatases alcalines et les phosphatases acides, du groupe thiol de la cystéine dans les protéases à thiol et dans la GAP déshydrogénase...etc. Dans l'exemple de la rupture de la liaison peptidique, l'attaque par un réactif nucléophile se fait sur le carbone de la liaison C-X, selon un mécanisme qui met en jeu un intermédiaire d'addition instable dit complexe tétraédrique.

4.3.1.3. Catalyse électrophile

Dans la catalyse électrophile, le catalyseur électrophile arrache une paire d'électrons au substrat. Les groupes électrophiles sont soit les acides conjugués des aa, soit des ions métalliques (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Co ...) soit des coenzymes. Les métalloenzymes sont de bons exemples de la catalyse électrophile.

4.3.1.4. Catalyse générale basique

Dans la catalyse générale basique, le catalyseur réagit au moyen d'une attaque sur l'hydrogène et non pas sur le carbone (*comme dans le cas de la catalyse nucléophile*). Toute base conjuguée peut agir comme catalyseur général basique.

Une réaction peut être stimulée par la catalyse basique générale, si le taux de réaction est augmenté par l'arrachement partiel d'un proton par une base (base Bronsted - une molécule qui peut capter ou accepter des protons).

4.3.1.5. Catalyse générale acide

En catalyse acide générale, toutes les espèces capables de donner des protons contribuent à l'accélération de la vitesse de réaction. Les réactions dans lesquelles le transfert de proton est déterminant pour la vitesse de réaction sont des réactions de catalyse générale acide (**Fig. 16**).

Une catalyse acide générale est un procédé dans lequel il y'aura un transfert partiel d'un proton à partir d'un groupe acide (acide Bronsted - une molécule qui peut fournir un ou plusieurs protons - H⁺) ce qui abaisse l'énergie libre de l'état de transition.

4.3.1.6. Catalyse générale acide-base

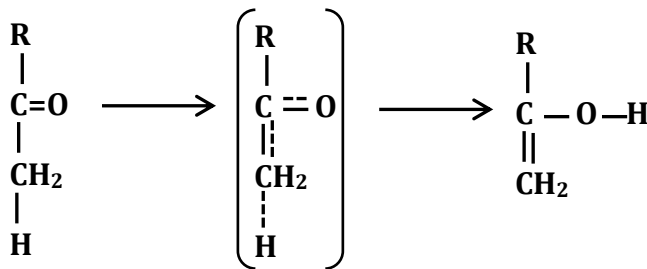
Certaines réactions utilisent les deux types de catalyse acide et base, si les deux réactions sont simultanées, la réaction globale devient acide-base générale (**Fig. 17**).

Ex Catalyse acide-base générale: cas de la Ribonuclease A.

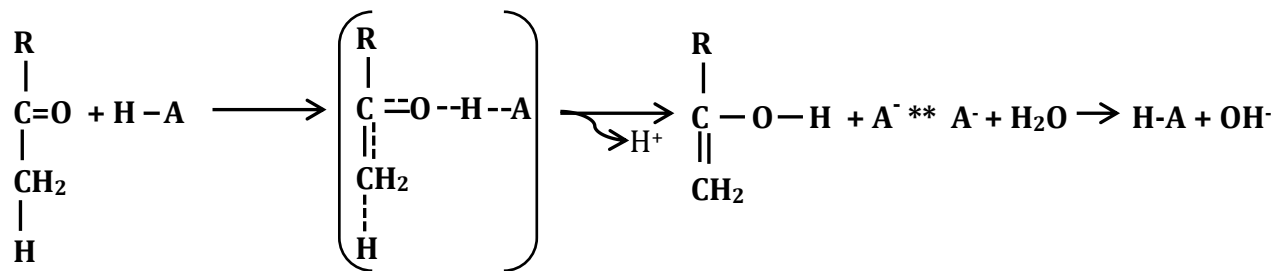
La RNase A est une enzyme digestive qui hydrolyse l'ARN, son pH optimum correspondant à l'ionisation de 2 groupements, His 12 et His 119 est de 6. Les 2 histidines (His 12 et His 119) agissent en concertation dans un mécanisme acide-base.

1) His 12 : agit comme une base, retirant un proton du groupe 2'-OH de l'ARN, permettant ainsi une attaque nucléophile sur l'atome de phosphore adjacent. En même temps, la His 119 agit comme un acide et provoque la rupture de la liaison en protonant le groupe R'-O- (**Fig. 17**).

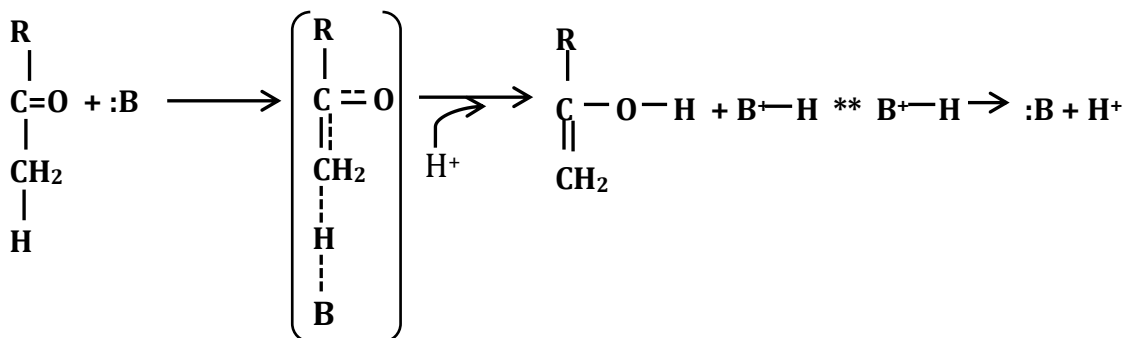
2) L'intermédiaire 2'-3'-cyclique formé est hydrolysé par un processus acide-base inverse où His 12 est maintenant l'acide et His 119 est la base (**Fig. 17**).



Transformation d'un groupe cétone en groupe énol, [] état de transition



Catalyse acide générale, l'acide (AH) est le donneur de proton H⁺



Catalyse base générale, la base (:B) est l'accepteur du proton H⁺

Fig. 16: Catalyse acide générale et base générale

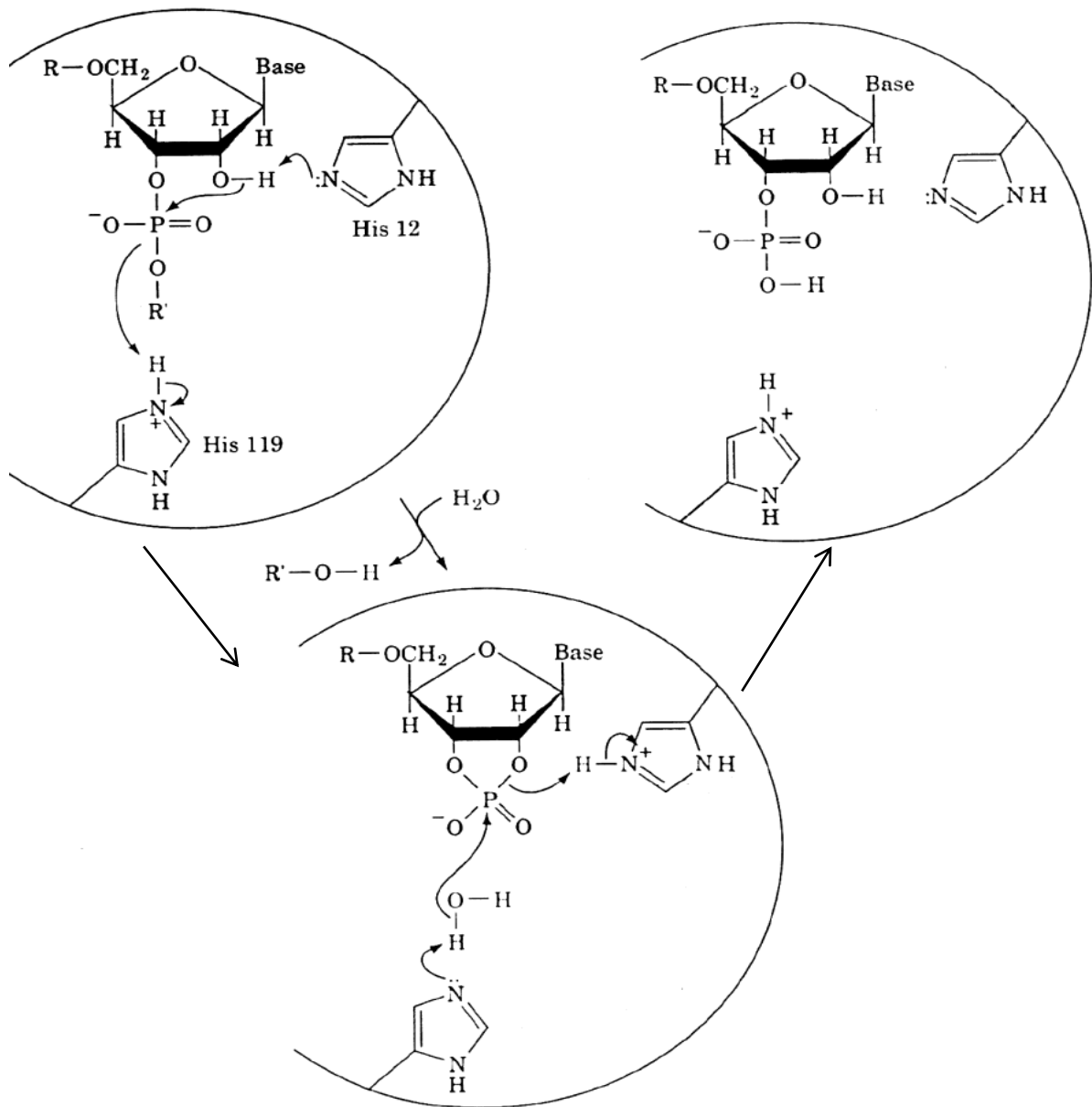


Fig. 17: Catalyse par RNAase A, c'est une catalyse acide-base générale. L'His12: agit comme une base, retirant un proton du groupe 2'-OH du RNA, permettant ainsi une attaque nucléophile sur l'atome de phosphore adjacent. En même temps, l'His119 agit comme un acide et provoque la rupture de la liaison en protonant le groupe R'-O-. L'intermédiaire 2'-3'-cyclique est hydrolysé par le processus acide-base inverse où His12 est maintenant l'acide et l'His119 est la base.

4.3.2. Mécanismes d'action des enzymes

- 1* L'enzyme fixe le substrat de telle sorte que la liaison sensible à l'attaque soit **1-** très proche du groupement catalytique sur le site actif **2-** orientée par rapport au groupement catalytique de telle sorte que l'état de transition se forme facilement.
- 2* L'enzyme peut se combiner de façon covalente avec le substrat pour former un intermédiaire covalent instable et très réactif ce qui favorise le passage à l'état transitoire permettant ainsi une réaction plus rapide.
- 3* L'enzyme fournit les groupements accepteurs ou donneurs de protons, dans un mécanisme de catalyse acide générale ou base générale ou acide-base.
- 4* L'enzyme peut induire une distorsion et/ou une tension au niveau de la liaison à rompre, ce qui la déstabilise et la rend plus facile à couper. L'enzyme fixe donc préférentiellement le substrat sous sa forme de transition.
- 5* L'enzyme utilise des ions comme cofacteurs, pour stabiliser différentes charges intermédiaires, pour ioniser les molécules d'eau et les rendre plus nucléophiles, et/ou pour cacher des charges.
- 6* L'enzyme utilise les forces électrostatiques, pour aligner le substrat et stabiliser l'état de transition.

4.3.3. Particularités de la catalyse enzymatique

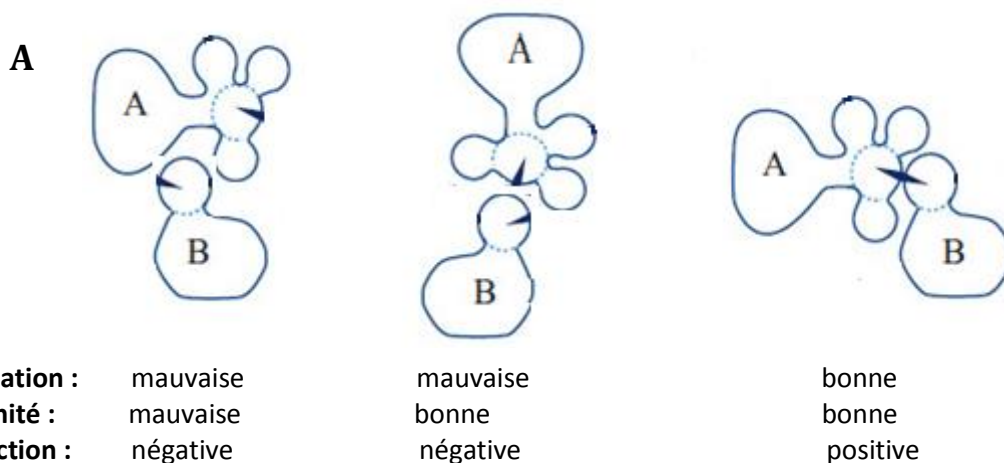
La catalyse enzymatique met en œuvre les mêmes mécanismes chimiques mais avec beaucoup plus d'efficacité et de spécificité. En fait, la structure tertiaire de l'enzyme engendre un grand nombre de facteurs qui contribuent à assurer l'efficacité fonctionnelle du catalyseur ainsi que sa sélectivité et à les moduler suivant les exigences métaboliques de la cellule. Et c'est de l'ensemble de ces facteurs que découlent les performances catalytiques de l'enzyme.

Les particularités de la catalyse enzymatique sont :

- 1- La catalyse enzymatique est une catalyse intramoléculaire
- 2- La catalyse enzymatique est une catalyse polyfonctionnelle
- 3- La structure du centre actif est complémentaire de l'état de transition du substrat
- 4- L'enzyme crée un microenvironnement particulier susceptible de favoriser la réaction
- 5- La catalyse enzymatique met en jeu plusieurs intermédiaires réactionnels

4.3.3.1. La catalyse enzymatique est une catalyse intramoléculaire

- 1* Les réactions enzymatiques sont des réactions de premier ordre. La formation du complexe ES de Michaelis, fait de la catalyse enzymatique une catalyse intramoléculaire. Ce qui signifie qu'elle est du premier ordre.
- 2* La concentration effective du substrat au niveau du centre actif se trouve nettement accrue (elle pourrait être 10^6 fois plus élevée que la concentration du substrat dans la solution).
- 3* Effets d'orientation, le substrat et les groupes catalytiques doivent non seulement être à proximité l'un de l'autre mais en plus ils doivent être alignés de telle sorte qu'il y'aurait un recouvrement des orbitales concernées c.à.d. dans une orientation optimale afin d'augmenter la probabilité d'atteindre l'état transitoire.
- 4* Effets entropiques, Lorsque 2 molécules s'associent pour former une seule molécule, l'ordre augmente, ce qui va se manifester par une diminution d'entropie. En plus les atomes du complexe E-S se trouvent plus contraints et perdent un certain nombre de degré de liberté de vibration, de translation et de rotation. Une molécule libre dispose de 3 degrés de liberté de rotation et 3 DDL de translation (les vibrations ne contribuent que très faiblement à l'entropie). Lorsque 2 molécules se condensent ils perdent 3 DDL de rotation et 3 DDL de translation.



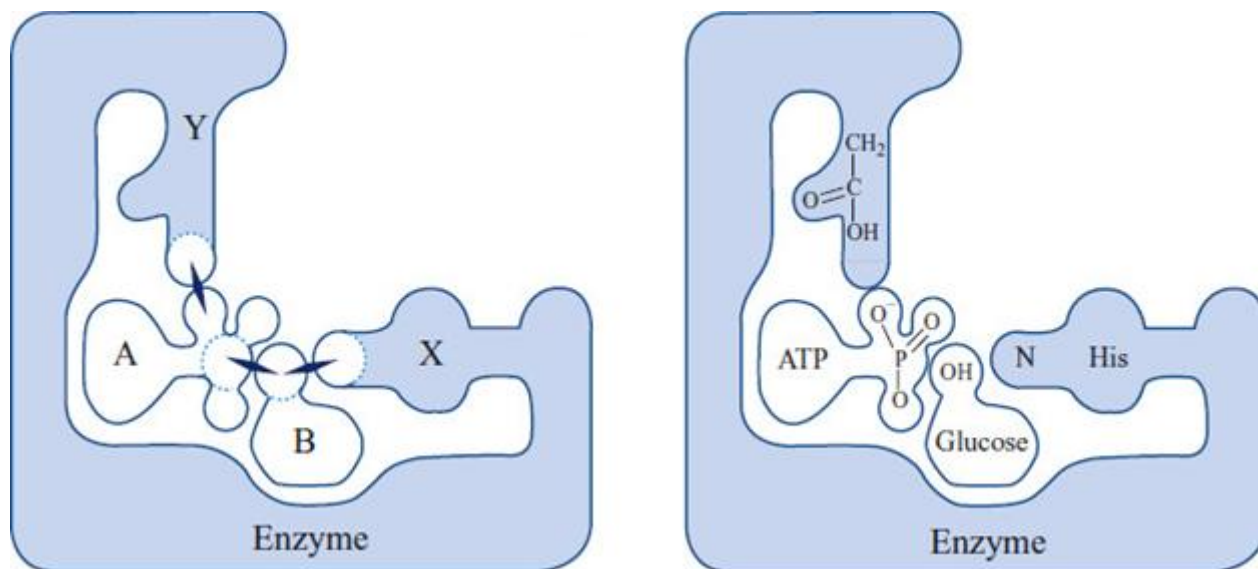


Fig. 18: Effets de proximité et d'orientation du substrat et des groupes catalytiques du centre actif dans une réaction enzymatique à un substrat (A) et à deux substrats (B) cas de l'hexokinase.

4.3.3.2. La catalyse enzymatique est une catalyse polyfonctionnelle

La catalyse polyfonctionnelle ou l'attaque de la liaison à rompre par plusieurs groupes catalytiques est un important facteur d'efficacité de la catalyse enzymatique. La catalyse bifonctionnelle représente un gain d'efficacité par rapport à une catalyse monofonctionnelle (n 10⁴ fois plus rapide). En effet, toutes les réactions mettent en jeu la participation d'au moins 2 groupes catalytiques. A titre d'exemple, on peut citer **Ser195 et His57** dans les protéases à sérine, **Asp52 et glu35** dans le lysozyme, **Asp32 et Asp215** dans la pepsine et **His12 et His119** dans la ribonucléase...etc.

Généralement la catalyse enzymatique est intramoléculaire et polyfonctionnelle.

4.3.3.3. La complémentarité de l'enzyme à l'état de transition du substrat

La complémentarité de l'enzyme pour l'état de transition du substrat et non de l'état fondamental du substrat est bien supportée par plusieurs études expérimentales (cristallographie, mutagenèse dirigée, modélisation moléculaire et les études enzymatiques et chimiques). En effet, plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est élevée plus le complexe ES est stable et plus la barrière énergétique est élevée et plus il est difficile d'atteindre l'état activé. Les calculs énergétiques, les études cinétiques, le marquage chimique via l'étude de l'affinité des enzymes pour les analogues de l'état de transition des substrats supportent cette thèse.

4.3.3.4. Le microenvironnement particulier favorise la réaction

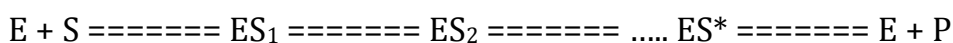
Effets électrostatiques : Les protéines possèdent de nombreuses charges ainsi que des dipôles qui créent de véritables champs électrostatiques dont l'intensité est très variable suivant les différents endroits de la protéine. De plus, ces charges fluctuent en fonction des divers mouvements qui animent la molécule. L'influence des charges au centre actif des enzymes et leur rôle dans la catalyse sont bien confirmées. En effet, les champs électrostatiques créés par la protéine au centre actif sont complémentaires de la distribution des charges du substrat dans l'état de transition.

Effets des molécules d'eau : Les effets des solvants en solution et des molécules d'eau au centre actif des enzymes sur la vitesse de la réaction sont certains. Le déplacement des molécules d'eau autour des charges du substrat ou de l'enzyme lors de leur association a pour effet d'accroître les effets électrostatiques locaux. A titre d'exemple, la décarboxylation du pyruvate par le pyrophosphate de thiamine s'effectue à une vitesse 10^4 à 10^5 fois plus grande dans l'éthanol que dans l'eau. L'accroissement de la vitesse est provoqué par une plus faible localisation de la charge dans l'état de transition en présence d'éthanol tandis qu'elle est stabilisée dans l'eau.

Effet de l'hydrophobie: Le microenvironnement au centre actif de l'enzyme peut avoir un grand nombre de charges mais aussi des régions à caractères hydrophobes. Suivant la nature de la réaction celle-ci peut être facilitée dans le milieu hydrophobe.

4.3.3.5. Les intermédiaires réactionnels dans la catalyse enzymatique

La majorité des réactions enzymatiques procèdent à travers la formation de plusieurs complexes intermédiaires, impliquant soit des modifications de l'enzyme, soit des modifications du substrat, soit les deux.



Certains de ces intermédiaires sont instables et ne s'accumulent pas, particulièrement ceux qui sont proches de l'état de transition.