

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Département de Biologie Physico-Chimique, Faculté des sciences de la nature et de la vie
université A. Mira de Bejaia

Cours

Enzymologie Moléculaire et Appliquée

Master II: Pharmaco-toxicologie

Dr. CHERAFT-BAHLOUL Nassima

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Année: 2020/2021

la relation structure-fonction d'une protéase à sérine: La chymotrypsine

Les protéases à sérine

La chymotrypsine est une protéase à sérine

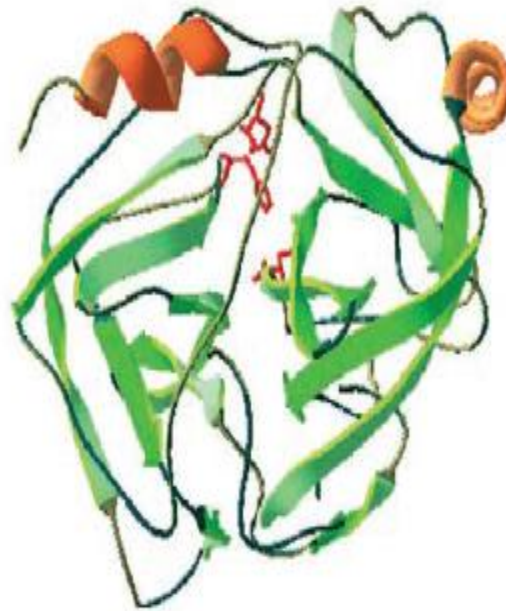
La plupart des protéases à sérine sont des **endopeptidases**, elles possèdent comme groupe catalytique **une cystéine qui joue le même rôle que la sérine.**

La plupart des protéases à sérine de mammifères (la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase, les protéases de la cascade de coagulation sanguine (thrombine)) sont synthétisées sous forme de prézymogène transformé en zymogène par élimination du peptide signal lors du passage à travers la membrane du réticulum endothélial rugueux et sécrété sous cette forme. Leur activation résulte de coupures protéolytiques.

Les protéases pancréatiques se trouvent dans le pancréas sous forme de précurseurs inactifs afin d'assurer un mécanisme de protection.

la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

La chymotrypsine (EC: 3.4.2.1.1) est une enzyme protéolytique sécrétée par le pancréas sous forme d'un précurseur inactif: **le chymotrypsinogène**. Au cours de la digestion, **le chymotrypsinogène** subit une série de clivage qui le convertit en **chymotrypsine**.



la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

Spécificité

La chymotrypsine partage une homologie de séquence de structure tridimensionnelle et de masse moléculaire (de 25000) avec d'autres protéases à sérine (trypsin et elastase) **mais de spécificité différente.**

La chymotrypsine clive préférentiellement le lien peptidique lorsqu'un résidu **aromatique (Phe, Tyr)** est engagé du côté carboxylique.

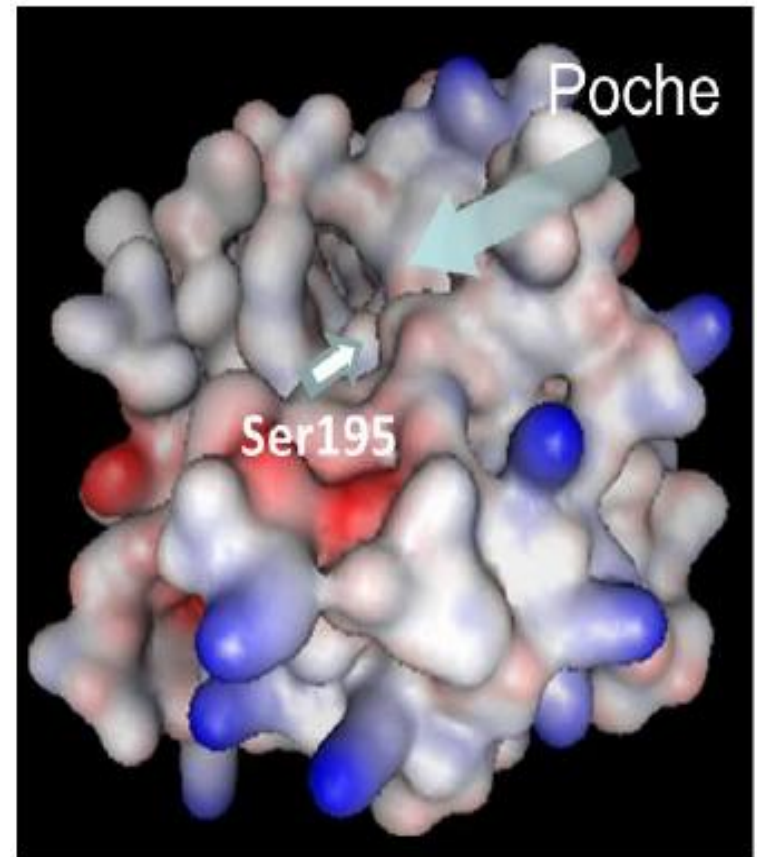
La trypsin clive par contre la liaison peptique lorsqu'un résidu **basique (Arg ou Lys)** est situé du côté carboxylique.

L'élastase n'a pas de préférence particulière si ce n'est qu'elle coupe le lien peptique lorsque un **résidu neutre à courte chaîne latérale** est placée du côté carbonyle.

la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

Spécificité

La spécificité de la réaction pour différentes protéases, provient de la forme de la poche hydrophobe qui permet de positionner certains substrats et d'en exclure d'autres.



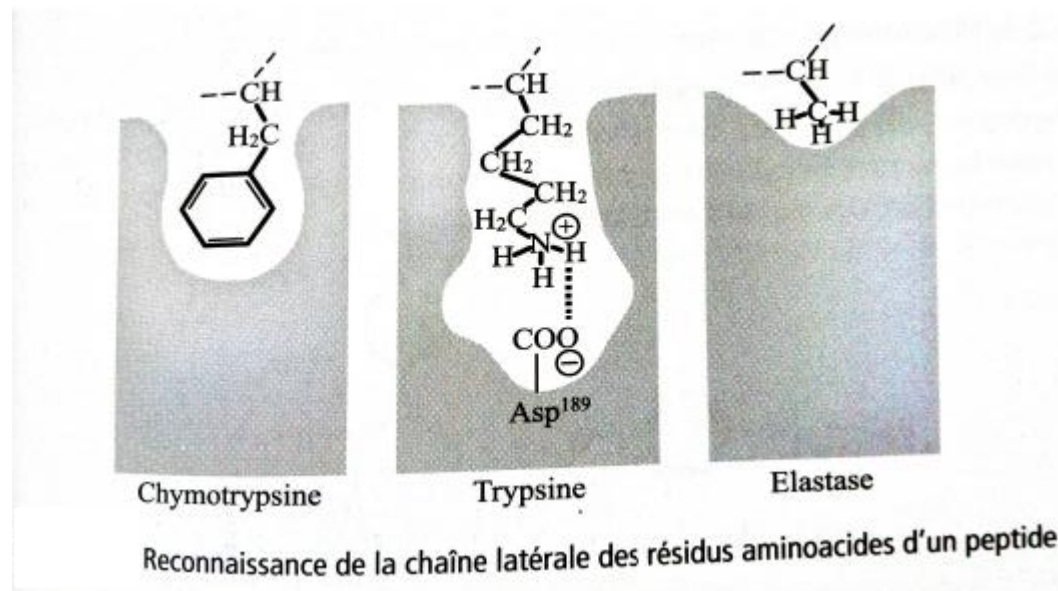
la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

Spécificité

La chymotrypsine: la poche abritant le site actif est tapissée de résidus non polaires capables d'engager des interactions hydrophobes avec une chaîne latérale comme celle de la tyrosine ou de la phénylalanine.

La trypsine : le résidu d'acide aspartique situé au fond de la poche permet de générer des interactions ioniques avec des résidus à charge opposée comme l'arginine ou la lysine

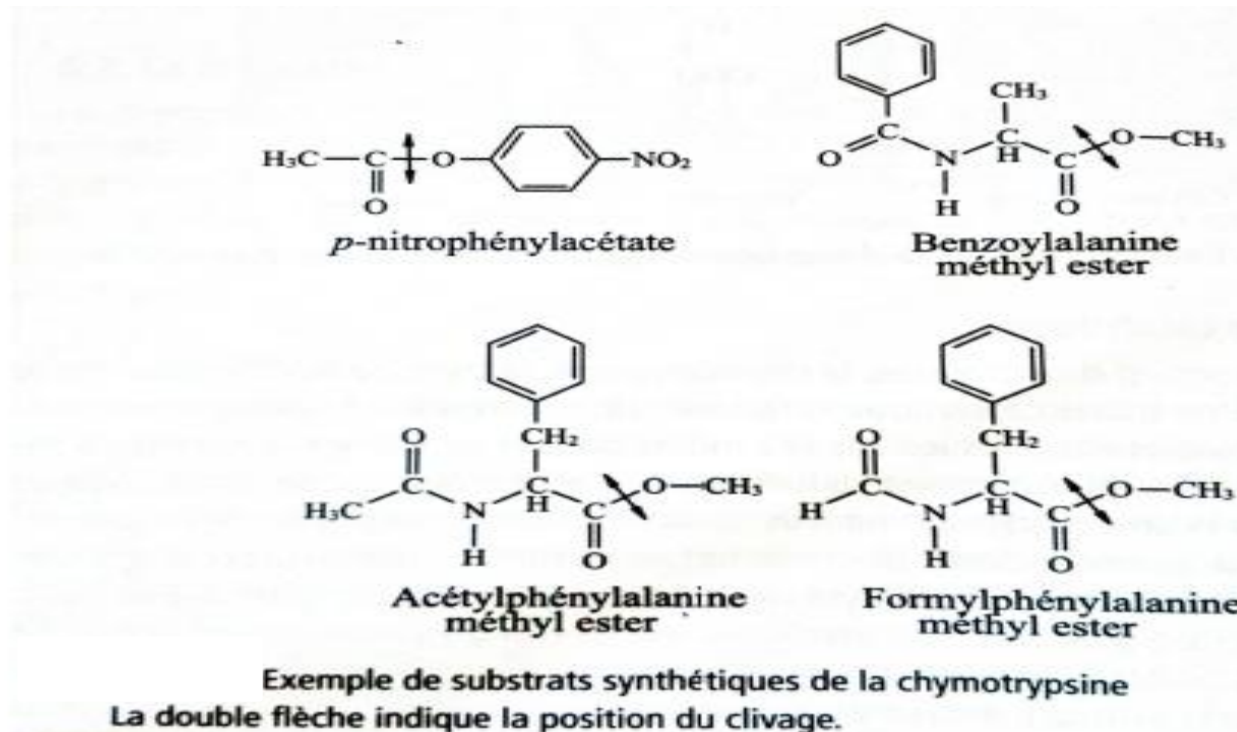
L'élastase : caractérisée par une poche à profondeur faible , qui ne lui permet pas d'accueillir des chaînes latérales non polaires et peu encombrantes comme celle de l'alanine.



la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

Mécanisme catalytique de la chymotrypsine

Le mécanisme a été étudié grâce à l'hydrolyse de substrats synthétiques comme les esters d'acide organique (*p*-nitrophénylacétate ou les esters méthylés d'acide dérivés de la formylphénylalanine ou de l'acétylphénylalanine.

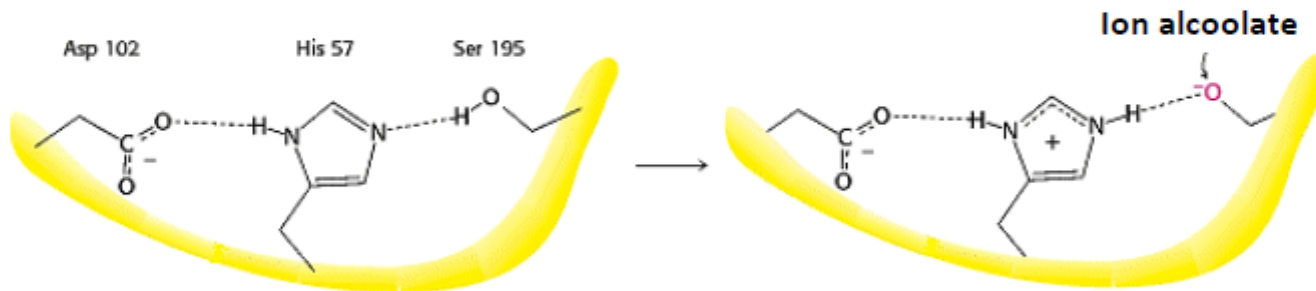


la relation structure-fonction d'une protéase à sérine: La chymotrypsine

La chymotrypsine est une sérine protéase en raison du rôle que joue cet acide aminé dans son activité; le terme sérine protéase ne désigne pas une protéase coupant les sérines! **Un transfert d'électrons initié sur l'aspartate 102, induisant l'histidine 57 à voler un hydrogène à la sérine active.**

Site Actif

Le groupe réactif au site actif est constitué d'une **triade catalytique**; la sérine 195 est l'acide aminé qui réagit avec le substrat, alors que l'**histidine 57** et l'**acide aspartique 102** contribuent à rendre la sérine particulièrement réactive.



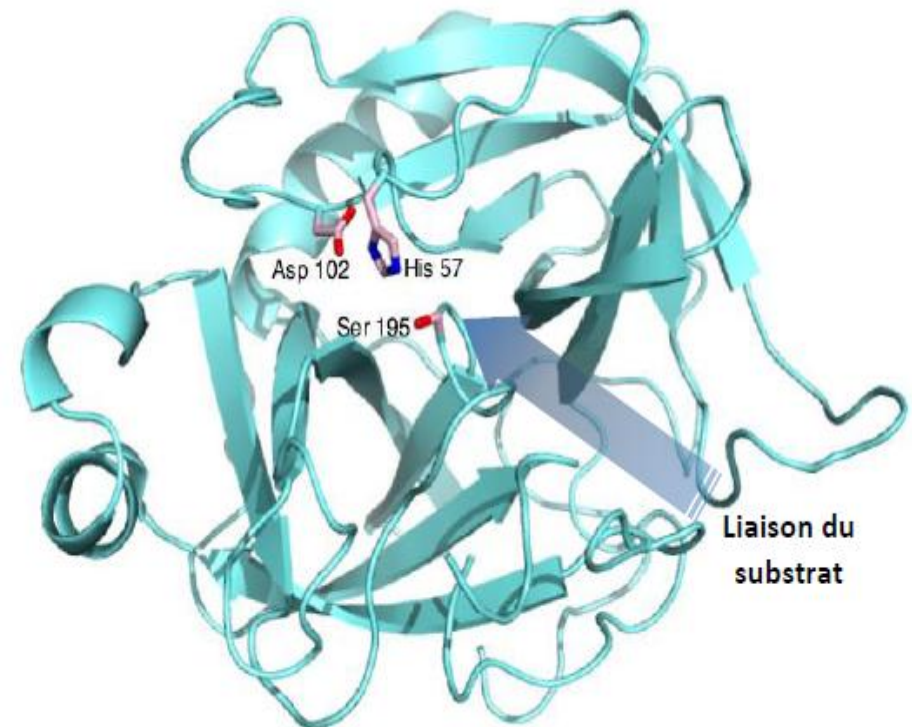
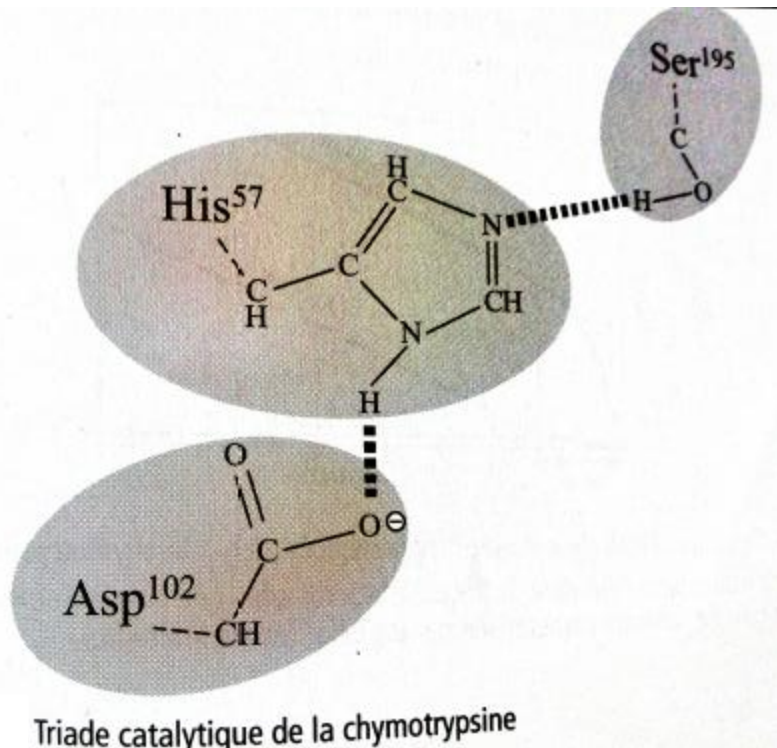
- voir site actif de la chymotrypsine notant la direction de liaison et la disposition d'His 57 et d'Asp 102 par rapport de la sérine réactive. Le site actif se situe dans la fente entre les deux domaines structuraux qui composent la protéase.

TD4

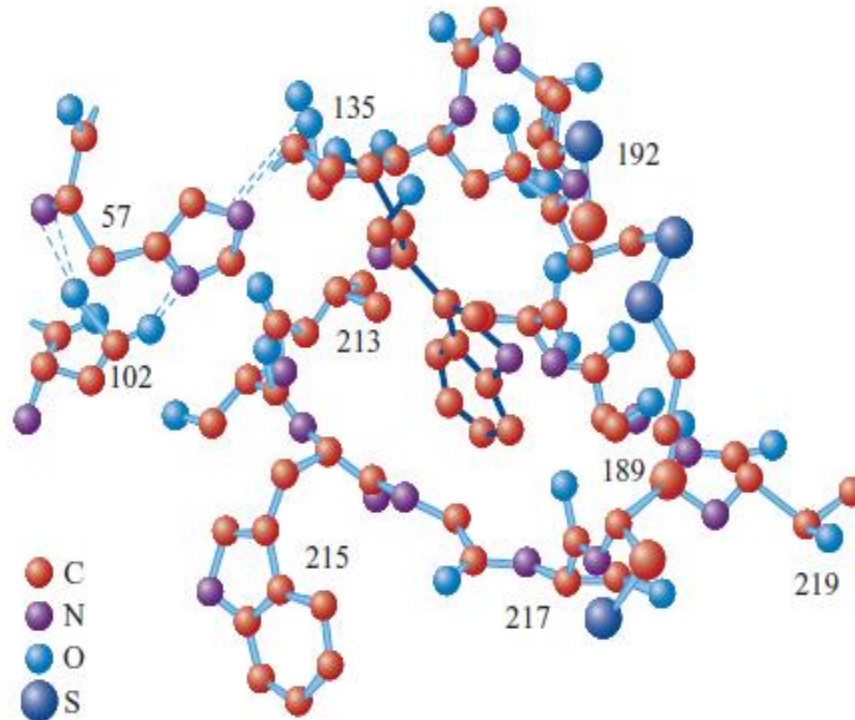
la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

Site actif

Mécanisme du site actif de la chymotrypsine. Le substrat, une chaîne polypeptidique avec une chaîne latérale hydrophobique comme *Tryptophane*, *phenylalanine* ou *yrosine* est logé dans le site de reconnaissance de telle façon que le lien à être hydrolysé se retrouve près de la sérine 195.



la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

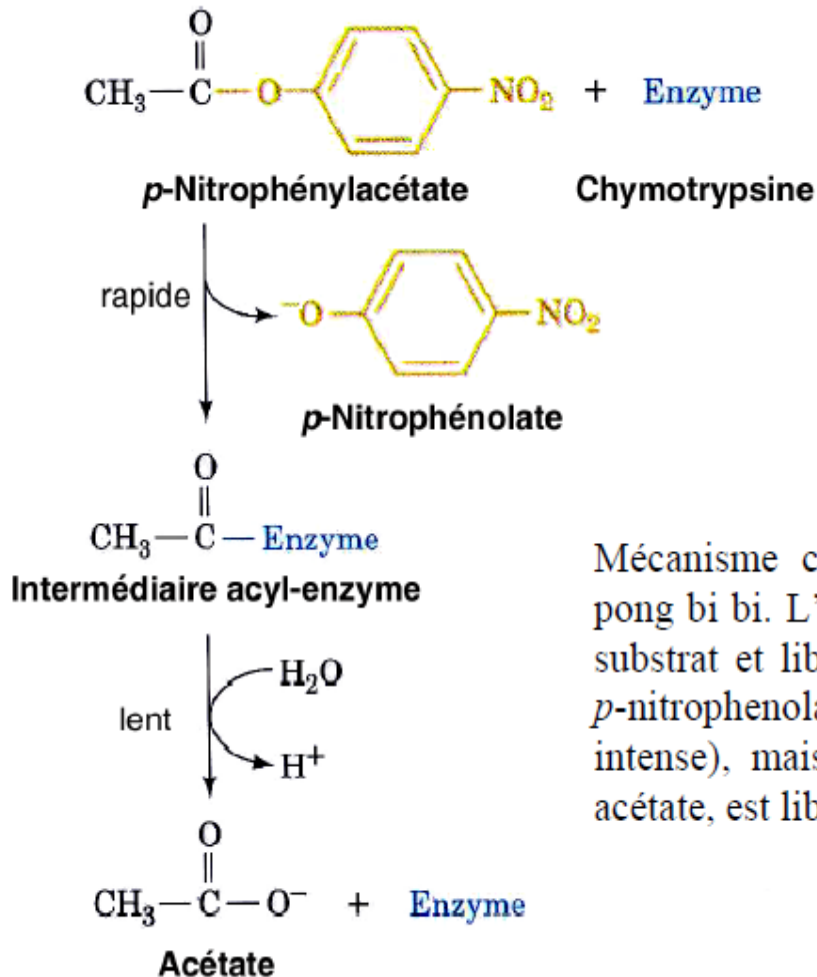


Site de fixation du N-formyl tryptophane au centre actif de la chymotrypsine.

Reprinted from *The Enzymes*, 3rd ed., Vol. III, BLOW D.M., *The structure of chymotrypsin*, 199. © (1971) Academic Press, with permission from Elsevier)

la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

Mécanisme catalytique de La chymotrypsine



Mécanisme catalytique est de type ping pong bi bi. L'enzyme se lie rapidement au substrat et libère le premier produit, l'ion *p*-nitrophenolate (chromatophore jaune intense), mais le deuxième produit, l'ion acétate, est libéré plus lentement.

Le mécanisme catalytique de la chymotrypsine marque **deux phases** : selon les produits libérés (**une rapide et l'autre lente**) qui précèdent l'état stationnaire, en présence de concentrations variables de ***p*-nitrophénylacétate**.

la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

Mécanisme catalytique de La chymotrypsine

Ces deux phases indiquent que la catalyse d'effectue selon plusieurs étapes:

Etape rapide: fait suite avec la formation d'un intermédiaire appelé **acylenzyme**.

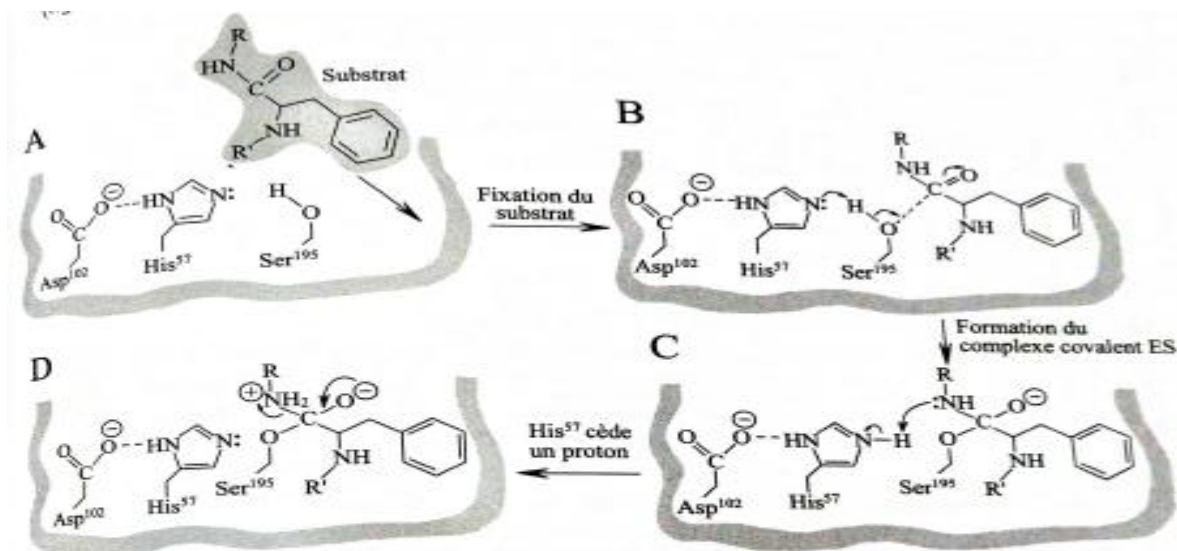


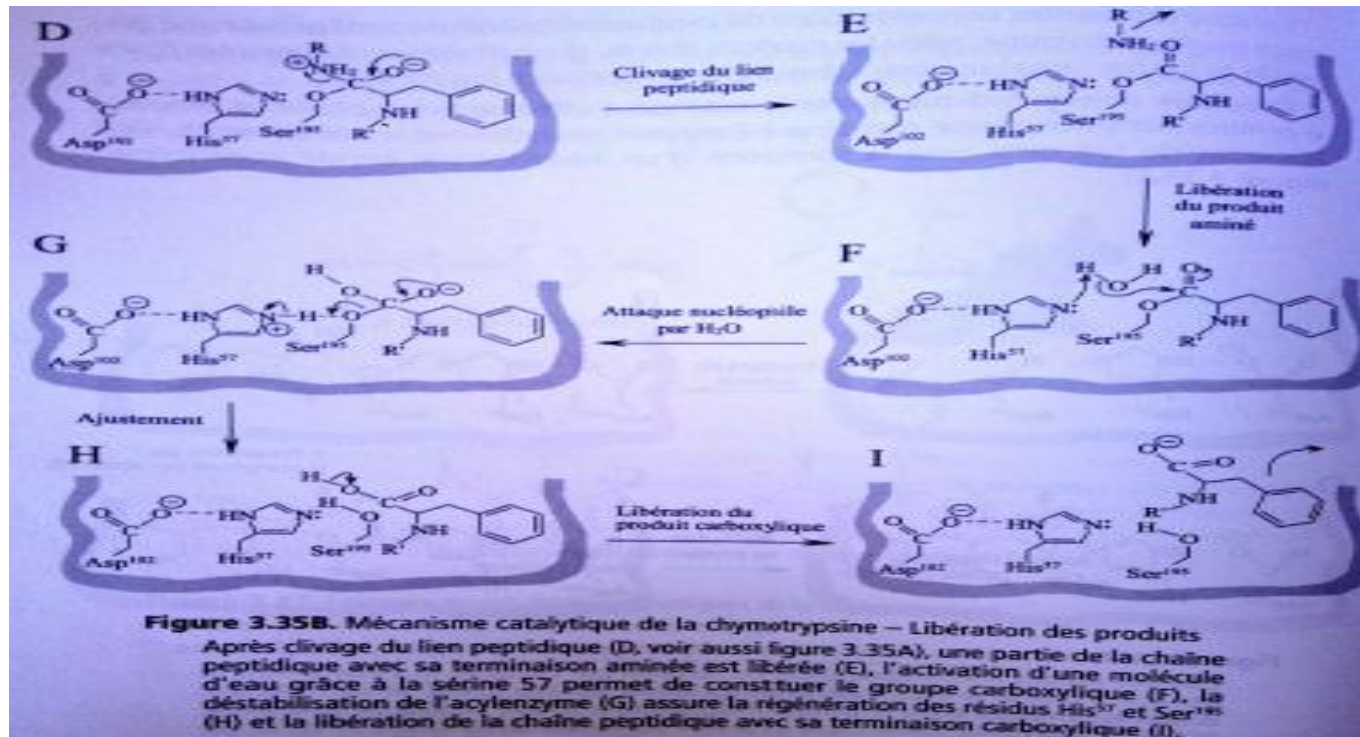
Figure . Mécanisme catalytique de la chymotrypsine – Formation de l'acylenzyme

L'un des résidus aromatiques (Phe) est reconnu par l'enzyme et s'insère dans le site actif à côté de la triade catalytique constituée par Asp¹⁰², His⁵⁷ et Ser¹⁹⁵ (A), une liaison est engagée entre le groupement carbonyle du lien peptidique et la sérine 195 (B), l'acylenzyme formé capte un proton provenant de l'histidine 57 (C) ce qui permet le clivage de la liaison peptidique (D).

la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

Mécanisme catalytique de La chymotrypsine

Le groupe p- nitrophényle est ensuite libéré sous forme de p- nitrophénolate.
 L'attaque de l'acylenzyme par une molécule d'eau libérant de l'acide acétique constitue l'étape limitante de la catalyse.
 La chymotrypsine est alors à nouveau disponible pour effectuer une autre cycle réactionnel.



la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

Mécanisme catalytique de La chymotrypsine

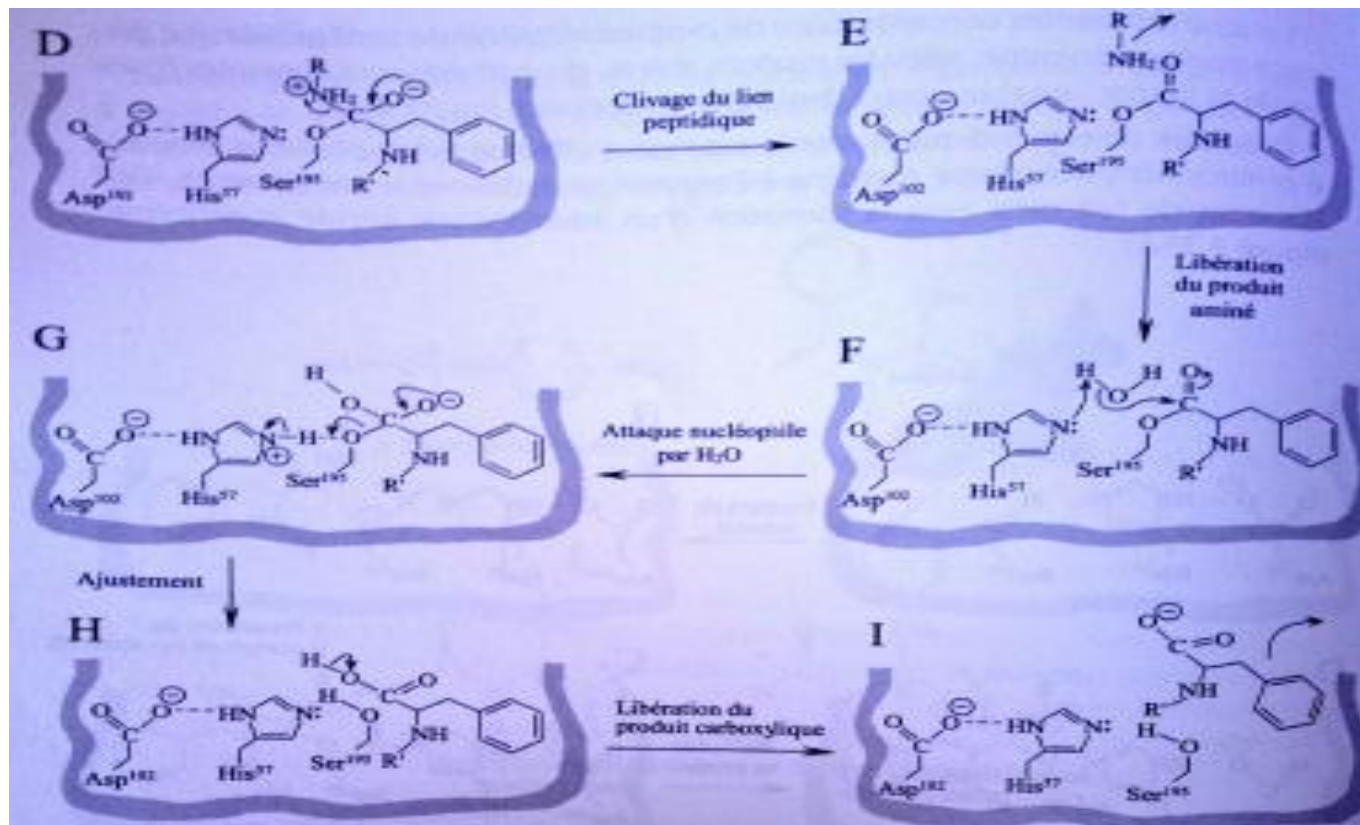
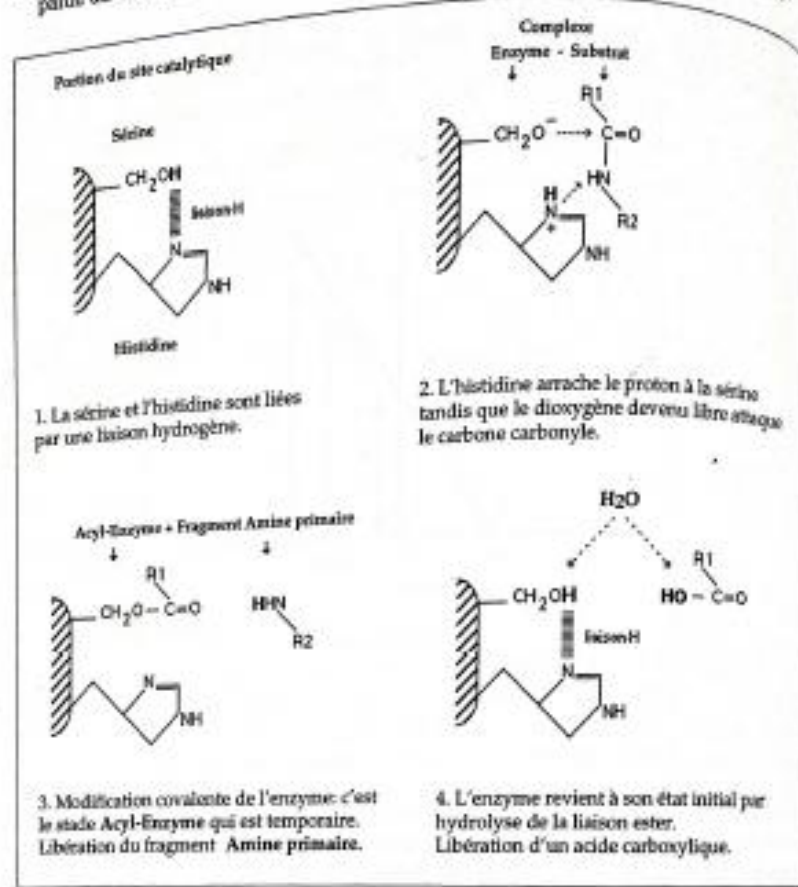


Figure 3.35B. Mécanisme catalytique de la chymotrypsine – Libération des produits
Après clivage du lien peptidique (D, voir aussi figure 3.35A), une partie de la chaîne peptidique avec sa terminaison aminée est libérée (E), l'activation d'une molécule d'eau grâce à la sérine 57 permet de constituer le groupe carboxylique (F), la déstabilisation de l'acylenzyme (G) assure la régénération des résidus His⁵⁷ et Ser¹⁹⁵ (H) et la libération de la chaîne peptidique avec sa terminaison carboxylique (I).

Figure 1a. Mécanisme moléculaire de la catalyse enzymatique par la chymotrypsine (seule une partie du site actif est schématisée). La zone hachurée représente le reste de la molécule.



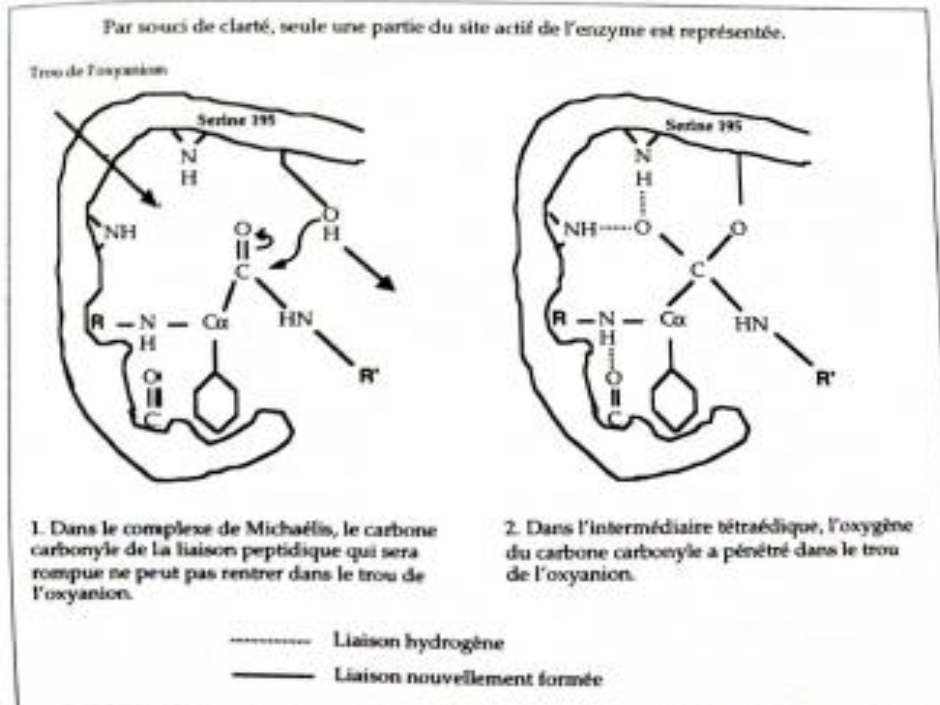
1. La sérine (Ser) et l'histidine (His) du site actif sont liées par une liaison Hydrogène. Le substrat n'est pas encore en position.
2. La chymotrypsine se lie au substrat pour former le **complexe de Michaëlis**. La sérine nucléophile attaque le groupe carbonyle de la liaison peptidique tandis que l'histidine arrache le proton de la sérine. Il en résulte un état de transition nommé **intermédiaire tétraédrique**. Un complexe enzyme-substrat se forme alors entre l'oxygène et le carbone carbonyle.
3. L'intermédiaire tétraédrique se décompose. Une liaison ester se forme sur la sérine tandis que le fragment amine R'-NH₂ est libéré grâce au proton venant de l'histidine. C'est le stade **acyl-enzyme**, l'enzyme est temporairement liée de façon covalente à une partie du substrat.

4. L'intermédiaire acyl-enzyme est très instable et il est désacylé grâce à une molécule d'eau par hydrolyse de la liaison ester. Il y a libération d'un acide carboxylique tandis que l'enzyme revient à l'état initial.

La présentation de ce mécanisme est basée sur des études aux rayons X mais d'autres travaux ont permis de valider ce modèle. Ainsi l'utilisation d'inhibiteurs a permis d'étudier dans le détail la formation du complexe inhibiteur-protéase. Ces études montrent que la formation de l'intermédiaire tétraédrique provoque une déformation conformationnelle localisée du carbone carbonyle de la liaison qui sera rompue. L'oxygène, nommé **oxyanion**, pénètre alors plus profondément dans le site actif pour se positionner dans une région jusqu'alors inoccupée appelée **trou de l'oxyanion**. Dans cette position, il forme deux liaisons hydrogène avec l'enzyme. De plus, le groupement NH du résidu qui précède la liaison à rompre forme aussi une liaison hydrogène avec l'enzyme.

C'est ce mécanisme qui est responsable de l'efficacité catalytique des protéases à sérine par stabilisation de leur état de transition. Le schéma ci-dessous représente une portion du site actif et illustre cette particularité.

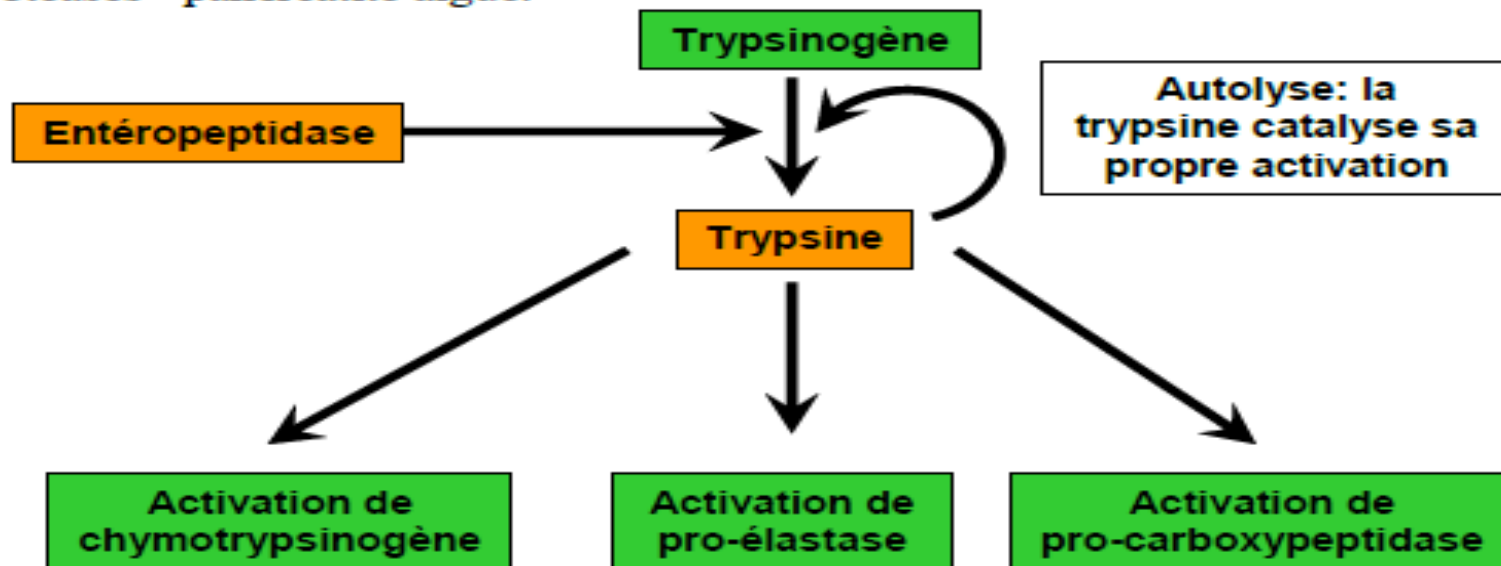
Figure 11b. Stabilisation de l'état de transition des protéases à sérine
(D'après Voet & Voet, Biochimie, 1998)



la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

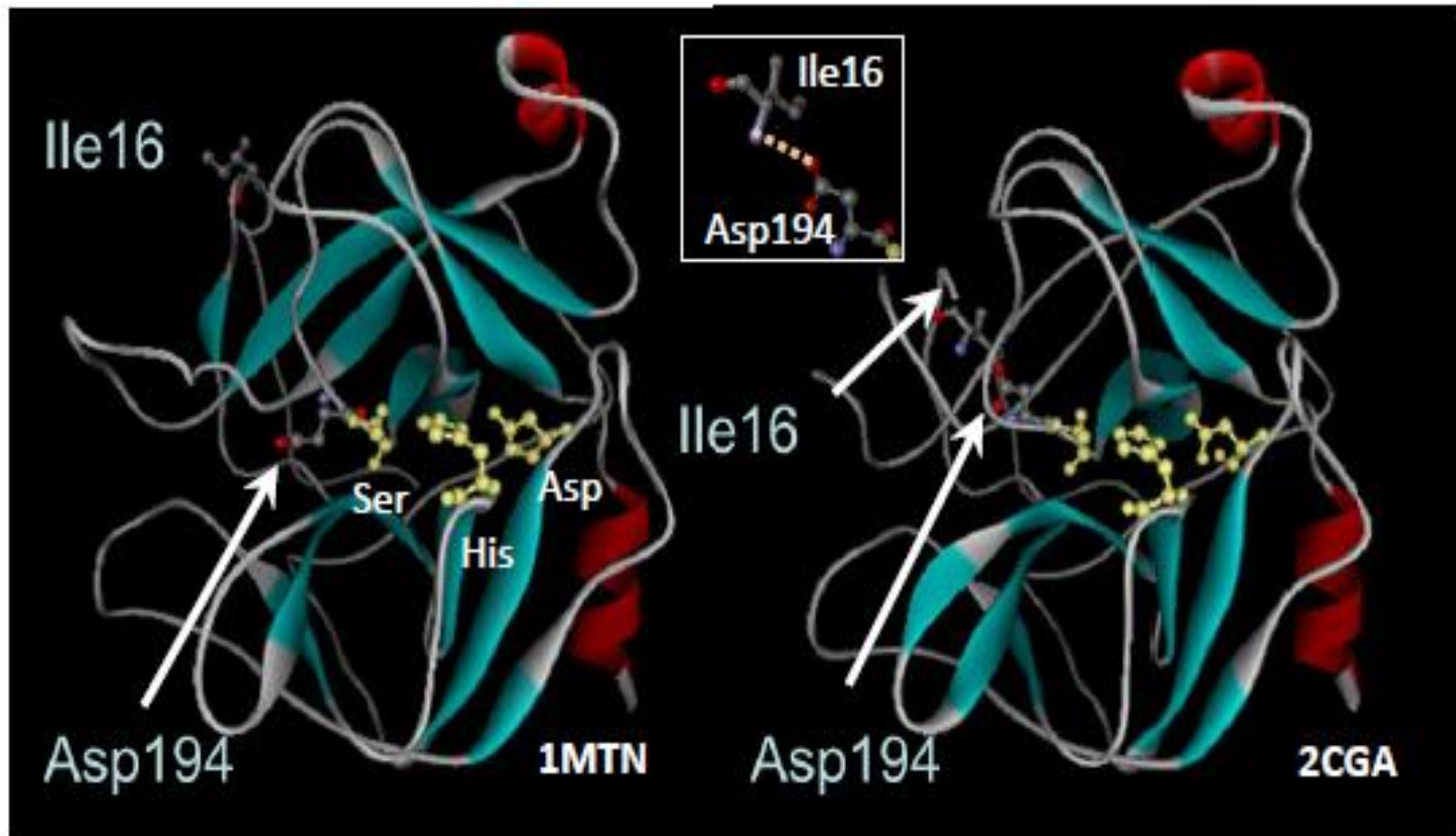
Régulation de l'activité protéolytique

La régulation de l'activité de l'enzyme se fait par activation protéolytique. Ces enzymes sont synthétisées sous forme de précurseur non actif (zymogène) et sont ensuite activées par un clivage protéolytique. Le manque de régulation provoque une autolyse ou une digestion prématurée des tissus qui ont synthétisé des protéases - pancréatite aiguë.



La trypsine est activée par une entéropeptidase et par autoactivation subséquente. La trypsine peut ensuite activer d'autres zymogènes, comme la chymotrypsine en la clivant entre les acides aminés 15 et 16. La chymotrypsine s'autolyse ensuite pour exciser deux dipeptides: Ser14-Arg15 et Thr147-Asn148.

la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

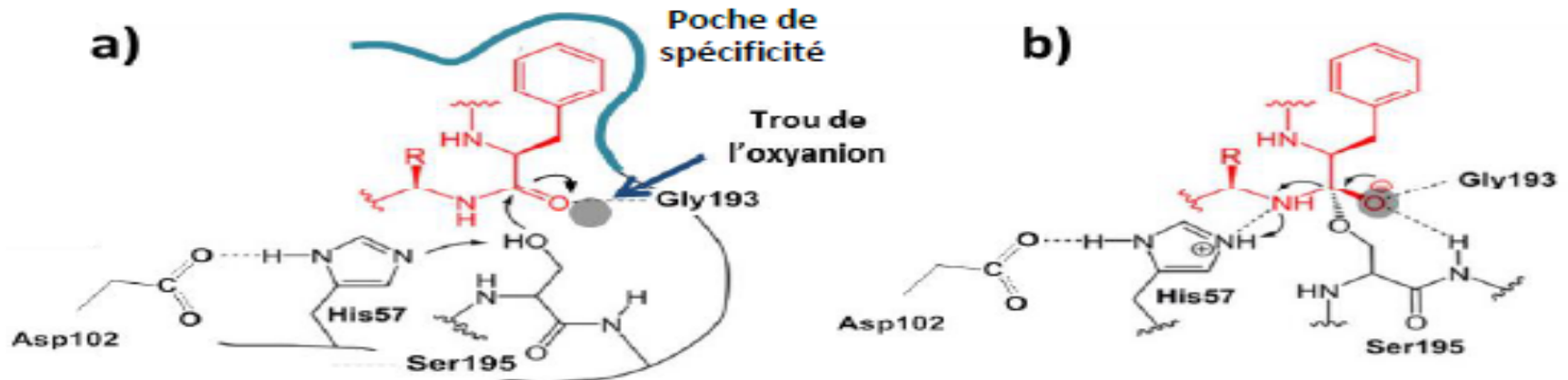


Chymotrypsinogène

Chymotrypsine

la relation structure-fonction d'une protéase à serine: La chymotrypsine

Récapitulation : Stabilisation de l'état de transition des protéases



a) Dans le complexe michaelien de la chymotrypsine, la liaison du substrat comprime le pont d'hydrogène entre Asp102 avec l'atome N δ 1 du His57 qui provoque un déplacement en densité d'électrons vers l'autre azote N ϵ 2 du His57 (non impliqué dans ce pont d'hydrogène). Ceci devient une base très forte qui permet à His57 à déprotoner Ser195 et la transformer en nucléophile fort qui attaque le carbone électrophilique du substrat. L'oxygène du carbonyle développe ainsi une charge partielle négative.

b) Dans l'intermédiaire tétraédrique, le trou de l'oxyanion stabilise cet oxygène avec la charge négative par des liaisons hydrogène avec les amides NH du squelette protéique de Gly193 et Ser195. La réaction avance dû à l'instabilité de la charge négative sur cet oxygène du substrat et qui conduit à la perte de l'intermédiaire tétraédrique et la reformation d'une double liaison avec le carbone qui ensuite clive la liaison peptidique. La protonation par His57 du N-terminus naissent facilite son déplacement.