

Chapitre 1 : Généralités sur les enzymes

1. Les enzymes sont des protéines

Les enzymes molécules de nature protéique, catalyseurs des systèmes biologiques, sont de remarquables machines moléculaires qui déterminent le profil de certaines transformations chimiques. Elles assurent aussi la transformation d'une forme d'énergie en une autre.

Environ, un quart des gènes du génome humain code pour des enzymes, ce qui témoigne de leur importance pour la vie.

Elles sont constituées de plusieurs acides α -aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides dont les masses moléculaires peuvent aller de 10000 (ribonucléase A : 13700 Da) à un million ou plus (complexes multienzymatiques comme la pyruvate déshydrogénase : 4600000 Da).

L'ordre, dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des enzymes (**Figure 1**).



Figure 1 : Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine.

Ces protéines vont avoir tendance à se plier sur elles-mêmes afin de former des arrangements secondaires principalement en hélices α et en feuillets β (**Figure 2**) ; cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes.

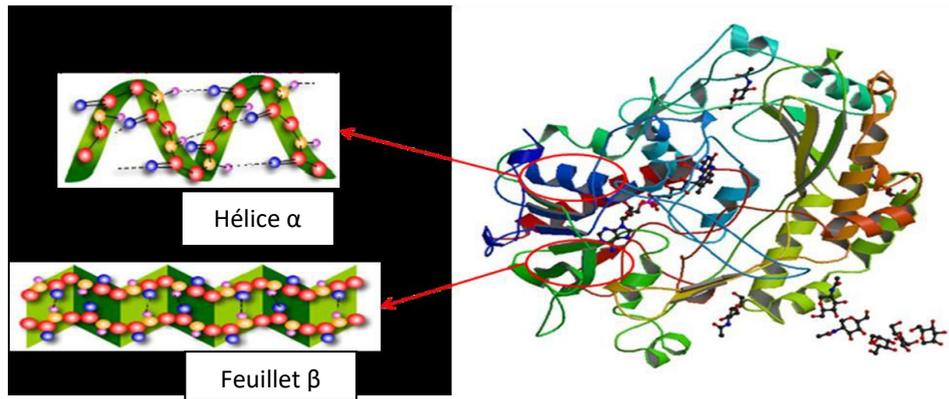


Figure 2 : Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine.

L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une structure tertiaire qui, elle, sera stabilisée par des ponts disulfures (**Figure 3**).

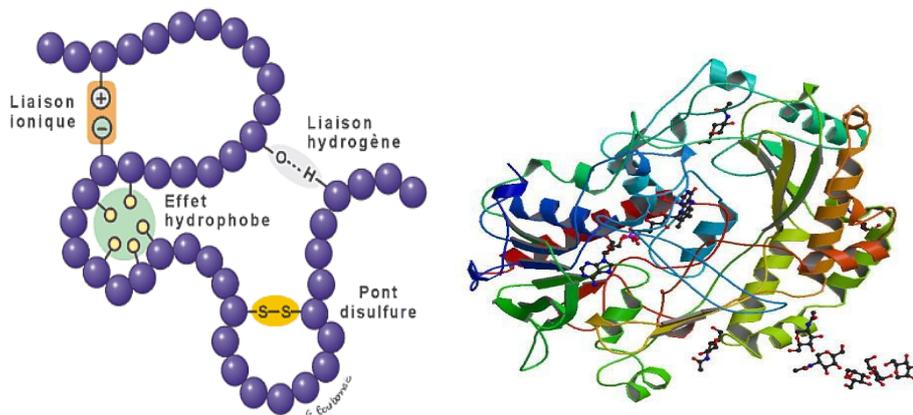


Figure 3 : Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine (glucose oxydase).

Une structure quaternaire peut même être décrite pour les très grosses enzymes (**Figure 4**). Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité permettant à celle-ci de reconnaître un substrat en particulier *via* une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif.

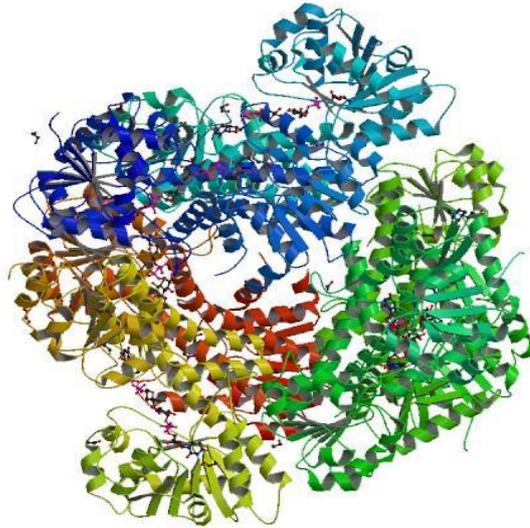


Figure 4 : Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine (glucose déshydrogénase).

Les enzymes peuvent être répartis en deux groupes :

- ✚ **Enzymes extracellulaires**(ou exoenzymes) : elles sont synthétisées à l'intérieur de la cellule, puis sécrétées dans l'espace extracellulaire.
- ✚ **Enzymes intracellulaires**(ou endoenzymes): elles sont synthétisées et utilisées entièrement à l'intérieur de la cellule où elles sont généralement liées à des particules subcellulaires ou membranes intracellulaires rendant leur extraction plus difficile.

2. Les enzymes sont des catalyseurs

C'est une réaction chimique qui se déroule dans la cellule ou le milieu cellulaire, en présence d'un catalyseur biologique (biocatalyseur), l'enzyme.

On écrit une réaction enzymatique de la manière suivante :



Il existe essentiellement deux grands types de réactions biochimiques :

- Les réactions de dégradation de la matière organique (catabolisme).
- Les réactions de synthèse de la matière organique (anabolisme).

Substrat : C'est une molécule transformée au cours d'une réaction chimique.

Produit : Dans une réaction enzymatique est la molécule résultante de la transformation d'un substrat au cours de cette réaction (**Figure 5**).

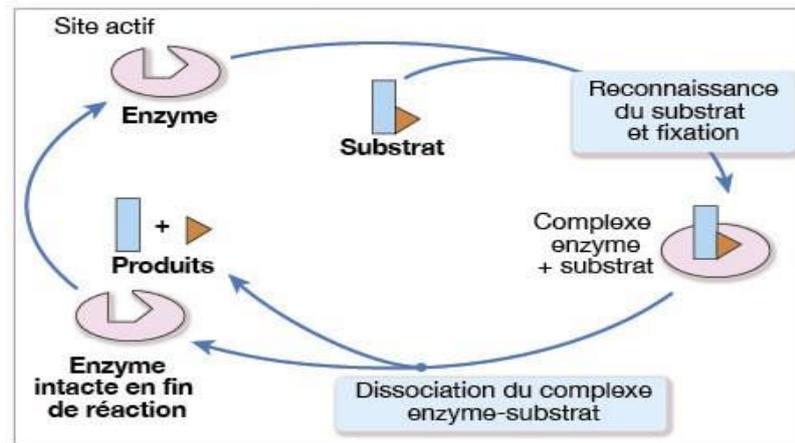


Figure 5 : Représentation schématique d'une réaction enzymatique.

Du point de vue de leur structure on divise les enzymes en deux catégories :

- Les enzymes purement protéiques : elles ne sont constituées que d'acides aminés. Ce sont les **holoenzymes**.
- Les enzymes en deux parties : une partie protéique appelée apoenzyme (thermolabile) et une partie non protéique appelée cofacteur ou coenzyme (thermostable). L'association des deux parties forme l'**hétéroenzyme**.

Nature des cofacteurs

Un cofacteur est une substance chimique non protéique, mais qui est liée à une protéine, et qui est nécessaire à l'activité biologique de cette protéine.

Les cofacteurs peuvent être considérés comme des molécules d'assistance aidant aux transformations biochimiques. Ils peuvent être classés selon leur mode de liaison aux enzymes :

- ✓ **Composés liés fortement à l'enzyme (groupement prosthétiques)** exemple : le groupement porphyrine dans les catalases ou cytochromes.
- ✓ **Composés liés faiblement à l'enzyme** : beaucoup de ces coenzymes sont des dérivés de vitamines exemple : NAD ou NADP qui dérivent du Nicotineamide (vitamine pp).
- ✓ **Ions métalliques** (cations) : Fe^{2+} , Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^+ , Ca^+ , l'ion associé à la partie protéique forme la métallo-enzyme.

Site actif

La fonction des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé le site actif. Schématiquement, il a la forme d'une cavité ou d'un sillon dans lequel vont se fixer les substrats grâce à plusieurs liaisons chimiques faibles. Une fois fixés, les substrats vont agir et se transformer en produits (**Figure 6**).

Le site actif est subdivisé en deux parts :

- Le site de liaison /fixation/reconnaissance : il reconnaît la complémentarité de forme avec un substrat spécifique à l'enzyme.
- Le site catalytique ; il permet la réaction transformant le substrat en produit.

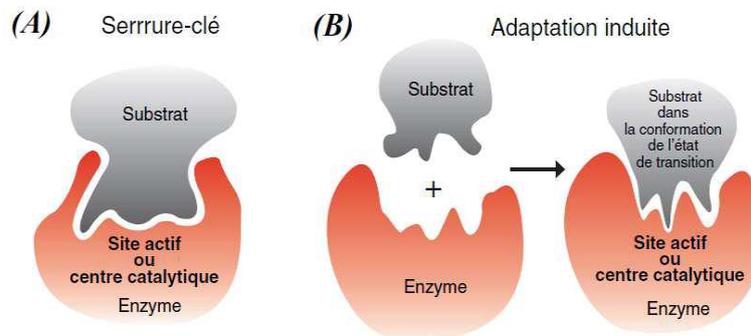


Figure 6 : Représentation schématique du site actif de l'enzyme.

3. Propriétés des enzymes

- ❖ Les enzymes modifient la réaction en accélérant sa vitesse. Elles accélèrent les réactions chimiques dans les systèmes biologiques d'un facteur 10^6 au minimum.
- ❖ L'enzyme agit à concentration très faible
- ❖ l'enzyme ne figure pas quantitativement parmi les produits de la réaction. Chaque molécule peut catalyser un nombre illimité de réaction.
- ❖ L'enzyme ne modifie pas la nature de la réaction ni son équilibre ni son état thermodynamique, elle modifie la réaction en accélérant sa vitesse.
- ❖ Les enzymes abaissent l'énergie libre d'activation du substrat (**Figure 7**).

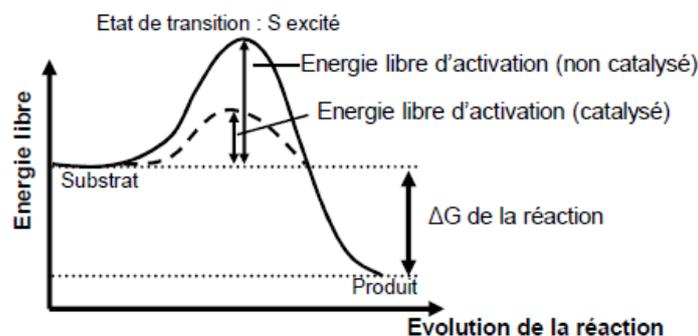


Figure 7 : Energie d'activation avec et sans enzyme.

- ❖ Les enzymes sont des catalyseurs spécifiques, c'est-à-dire qu'en fonction de leur nature, elles n'agissent que sur des composés moléculaires bien précis. Par exemple :

les amylases n'agissent que sur les amidons, les protéases n'agissent que sur des protéines.

Toutes les réactions sont contrôlées par une enzyme particulière spécifique de la réaction et souvent de la molécule qui en est le siège. On distingue différents aspects de la spécificité.

- ✓ **Spécificité de la réaction :** C'est la plus évidente. Une déshydrogénase catalyse la réaction de déshydrogénation, une hydrolase catalyse une réaction d'hydrolyse. Cependant, il existe des exceptions apparentes à cette règle : certaines enzymes peuvent catalyser plusieurs types de réactions. Exemples : la trypsine possède une activité protéolytique et une activité estérasique, mais ces réactions font appel à un mécanisme identique (hydrolyse d'une liaison).
- ✓ **Spécificité de substrat :** Chaque enzyme possède un substrat spécifique privilégié qui porte un groupe d'atomes sur les quels a lieu la réaction. Cette spécificité est plus ou moins étroite et chaque enzyme accepte comme substrat des molécules voisines du substrat habituel, avec pour chacune une cinétique particulière.
- ✓ **Stéréospécificité de substrat et de réaction :** Cette propriété des enzymes est essentielle. Toutes les molécules biochimiques ont un carbone asymétrique et peuvent donc exister sous la forme des deux séries L et D. Chaque enzyme n'attaque que l'une des séries. Exemple : la déshydrogénase lactique du muscle (LDH) oxyde l'acide lactique (L) en acide pyruvique.

4. Dosage de l'activité enzymatique

Les approches utilisées sont :

4.1. Dosage direct

La mesure de la vitesse de la réaction est effectuée de façon continue. Seules quelques méthodes analytiques sont adoptées à cette mesure directe dans le milieu réactionnel. Ce sont essentiellement la spectrophotométrie d'absorption dans le visible et l'ultra-violet, la spectrofluométrie, la turbidimétrie, la conductimétrie, la potentiométrie et la polarographie. Dans cette approche, un des produits de la réaction enzymatique absorbe la lumière, par exemple, la formation de NADH par réduction de NAD⁺ (le NADH absorbe la lumière à 340 nm et émet de la fluorescence à 450 nm) (**Figure 8**).

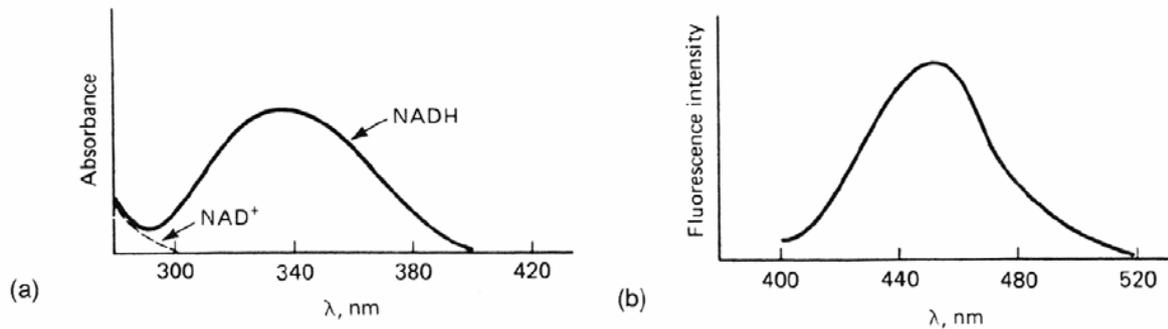


Figure 8 : (a) Spectre d'absorption du NADH comparé avec à celui du NAD⁺.

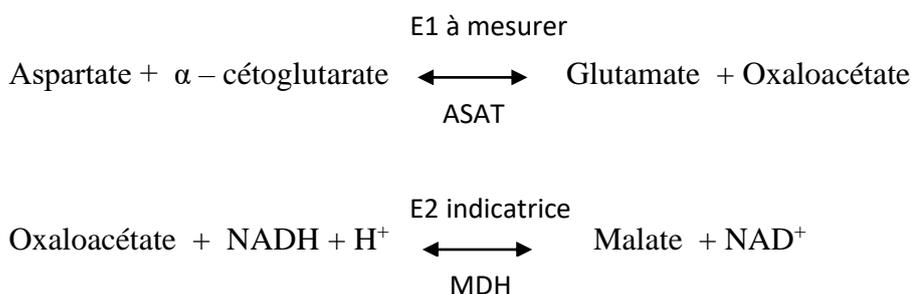
(b) Spectre d'émission de fluorescence du NADH, avec excitation à 365 nm.

Les catégories d'enzymes dont on peut mesurer l'activité en méthode continue sont:

- les déshydrogénases qui utilisent NAD ou NADP,
- les hydrolases qui peuvent utiliser des substrats synthétiques qui libèrent des produits colorés ou fluorescents,
- les polymères endohydrolases qui par leur activité réduisent la viscosité d'un polymère.

4.2. Dosage indirect

Quand le substrat (ou la coenzyme) éventuel ne présente pas de propriétés spectrales utilisables, la réaction enzymatique ne peut pas être étudiée en continu. Par contre, si par chance l'un des produits de la réaction étudiée est le substrat d'une déshydrogénase ayant pour coenzyme le NAD ou le NADP, il devient possible de coupler les deux réactions enzymatiques dans la même cuve de mesure. La deuxième réaction devient indicatrice de la première. Exemple : dosage des transaminases.



5. Détermination de l'activité enzymatique

On appelle mélange réactionnel le milieu dans lequel l'enzyme est active. Il comprend : le substrat, les co-substrats, cofacteur et coenzyme éventuellement impliqués dans la réaction, le tampon, et bien sûr l'enzyme. L'activité enzymatique se mesure :

- ✚ Soit par la vitesse de disparition d'un substrat
- ✚ Soit par la vitesse d'apparition d'un produit
- ✚ Soit par la vitesse d'utilisation d'un cofacteur

5.1. Expression de l'activité enzymatique

C'est la quantité d'enzyme qui transforme une quantité définie de substrat donné par unité de temps, dans les conditions opératoires définies (pH, T°,...).

Les unités conventionnelles sont la $\mu\text{mole /min}$ pour l'unité internationale d'enzyme (U ou UI) ou la mole par seconde pour le Katal (et ses dérivés, μKat , nKat).

$$1\text{U} = 16,67 \text{ nKat}$$

$$\text{Activité enzymatique} = \frac{\Delta \text{Abs. min}^{-1} \cdot V_t}{\epsilon \cdot L \cdot V_e}$$

Vt : volume totale

Ve : volume de l'échantillon contenant l'enzyme

ϵ : coefficient d'extinction molaire

L : longueur du trajet optique fixée à 1 cm

5.2. Activité spécifique

C'est le nombre d'unités enzymatiques rapporté au poids total de protéines (en mg) dans la solution enzymatique.

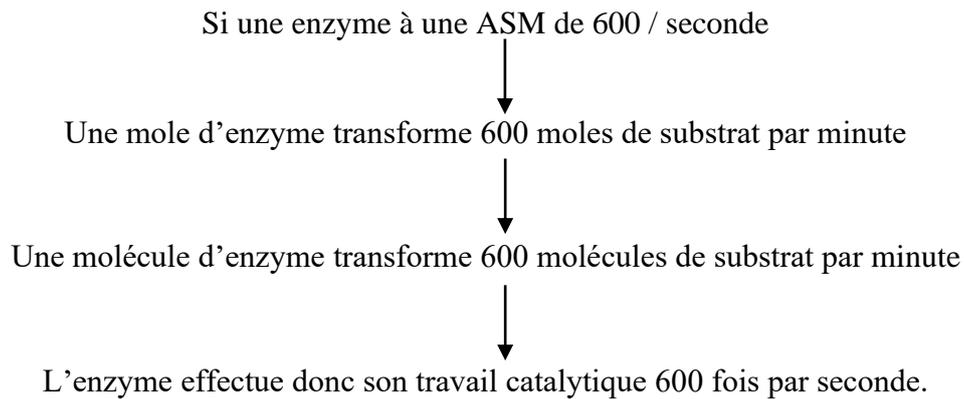
$$A_{sp.} = \frac{\text{Activité enzymatique (U)}}{\text{Quantité de protéines (mg)}}$$

C'est un paramètre essentiel, elle permet de suivre le degré de pureté des enzymes pendant leur purification. Elle augmente pendant les étapes de purification des enzymes. Elle est donc liée à la pureté de l'enzyme.

5.3. Activité spécifique moléculaire

C'est le nombre de moles de substrat transformées par 1 mole d'enzyme en 1 minute à 25 °c dans les conditions optimales de l'enzyme. Pour déterminer cette activité l'enzyme doit être ultra pure et on doit connaître son poids moléculaire. Elle est exprimée en inverse du temps. Il s'agit donc d'une fréquence (Turnover de la réaction: c'est le nombre de fois que l'enzyme travaille par unité de temps).

Exemple :



6. Nomenclature et classification des enzymes

La nomenclature ou la classification des enzymes est considérée habituellement comme une question abstraite. Elle est pourtant utile, car connaître le nom d'une enzyme permet de savoir le type de réaction catalysée et le substrat mis en jeu. Avant 1961 les enzymes ont été dénommées selon le nom du substrat sur lequel elles agissent en ajoutant le suffixe ase. En 1961, l'Union internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBMB) a donné une nouvelle classification des enzymes selon le type de réaction catalysée.

6.1. Nomenclature fonctionnelle

Elle est très utilisée. Elle prend en compte le nom du substrat de l'enzyme et le type de réaction catalysée. Pour désigner une enzyme on indique :

- D'abord le nom du substrat
- Puis le type de réaction catalysée
- On ajoute enfin le suffixe ase

Par exemple :

- Glucose -6- phosphate isomérase
- Isocitrate lyase
- Pyruvate carboxylase

Lorsque l'enzyme utilise deux substrats on les désigne tous les deux en indiquant :

- Le substrat donneur de radicaux
- Puis le substrat accepteur du radical libéré
- Le radical échangé
- Le type de réaction

- On ajoute enfin ase

Exemple :

- ATP- glucose- phosphotransférase
- UDP – glucose – fructose glucosyltransférase
- Glutamate pyruvate aminotransférase

Dans le cas d'une réaction équilibrée réversible, on peut former les noms à partir des substrats ou des produits.

6.2.Nomenclature et classification officielle des enzymes

Le nombre des enzymes est très important et n'arrête pas d'augmenter peut être à l'heure où je vous parle il ya des chercheurs qui ont découvert de nouvelles enzymes donc le nombre est tellement grand qu'il est impossible de garder uniquement l'ancienne nomenclature.

Depuis 1961, l'Union internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire(IUBMB) a codifiée la nomenclature et la classification des enzymes sous une nomenclature officielle. Toutes les enzymes actuellement connues sont répertoriées sous un numéro portant 4 nombres séparées par des points et précédés par les lettres EC (sigle de Enzyme Commission) soit (EC X1.X2.X3.X4). Cette classification est régulièrement mise à jour au fur et à mesure des découvertes. Pour donner une idée du nombre de réactions connues et de l'évolution au fil des ans, la classification EC possédait à ses débuts, en 1962, 712 classes à 4 chiffres, en 1992, elle en possédait déjà 3196 et en 2014 le nombre de classes connues est de 5509.

La signification des 4 nombres est la suivante :

X1 : le premier nombre varie de 1 à 6. Il désigne la classe de l'enzyme qui dépend du type de réaction catalysée. Ces réactions sont classées en 6 groupes (classes) (**Tableau 1**):

- 1- Oxydoréductase
- 2- Transférase
- 3- Hydrolase
- 4- Lyase
- 5- Isomérase
- 6- Ligase

Tableau 1 : Classification des enzymes selon la réaction catalysée.

Classification	Type de réaction catalysée
1. Oxydo-réductases	Oxydo-réduction
2. Transférases	Transferts de groupements fonctionels
3. Hydrolases	Hydrolyse
4. Lyases	Élimination de groupements et formation de double liaisons
5. Isomérases	Isomérisation
6. Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

X2 : le deuxième nombre désigne la sous-classe de l'enzyme qui est définie selon le mécanisme de la réaction. Dans le cas des oxydoréductases on distingue les déshydrogénases qui transfèrent les atomes d'hydrogène, les monooxygénases qui transfèrent $\frac{1}{2}$ O₂, les dioxygénases qui transfèrent l'O₂, etc.

X3 : le troisième nombre désigne la sous-sous-classe de l'enzyme. Il indique la nature de la molécule servant d'accepteur lorsqu'il s'agit d'un transfert d'(è). Donc il détermine la nature précise des groupements chimiques en jeu ou les mécanismes réactionnels quand ils sont connus.

Le deuxième et le troisième nombre constituent des sous-classes. Ils indiquent le type de réaction puis le type de molécule sur laquelle a lieu la réaction.

X4 : le quatrième chiffre est le numéro de série de l'enzyme attribué à l'intérieur de sa sous-sous-classe. Il désigne le substrat particulier sur lequel porte la réaction (ou éventuellement les substrats s'ils sont plusieurs à participer à la réaction). Donc le quatrième nombre permet un classement supplémentaire en fonction du substrat sur lequel l'enzyme agit.

La nomenclature complète est disponible à l'adresse <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

Exemple :

Le lysozyme porte le nom systématique de peptidoglycane *N*-acétylmuramylhydrolase et le numéro de classification EC 3.2.1.17. Le premier chiffre (3) indique la classe principale de l'enzyme hydrolases, le deuxième chiffre (2) précise sa sous-classe (glycosylase), le troisième chiffre (1) sa sous-sous-classe (enzyme hydrolysant les composés *O*- et *S*-glycosylés), et le quatrième chiffre (17) est le numéro de série de l'enzyme attribué arbitrairement à l'intérieur de sa sous-sous-classe.

Comme autre exemple : l'enzyme dont le nom recommandé est alcool déshydrogénase porte le nom systématique d'alcool : NAD^+ oxydoréductase et le numéro de classification EC 1.1.1.1.

6.3. Les différents types d'enzymes

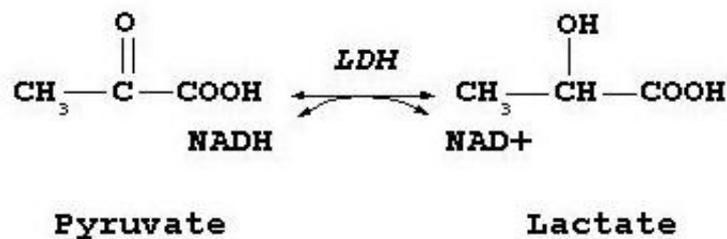
6.3.1. Les oxydo-réductases

Cette première classe comporte les enzymes catalysant des réactions d'oxydation ou de réduction, dont l'écriture la plus générale est la suivante :



Toute oxydation correspond à l'enlèvement d'un ou de plusieurs (e^-) à un substrat. Ces électrons sont cédés à une autre molécule, l'accepteur, qui de ce fait est réduite. Ces enzymes possèdent obligatoirement deux substrats et elles nécessitent la présence d'un coenzyme (NAD, NADP, FAD ou FMN).

Exemple : L - lactate déshydrogénase nom officiel : L - lactate - NAD - oxydoréductase (EC 1.1.1.27) catalyse la réaction suivante :



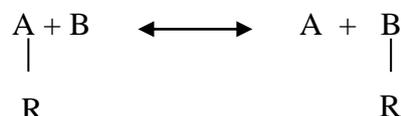
Cette enzyme agit sur un groupement $\text{CH} - \text{OH}$ (du donateur d'hydrogène) avec NAD comme accepteur d'hydrogène.

6.3.2. Les transférases

Ces enzymes transfèrent des radicaux ou des groupes d'atomes d'une molécule (substrat donneur) à une molécule (substrat accepteur). Leur nom complet comporte le donneur, l'accepteur, le radical transféré suivi de transférase.

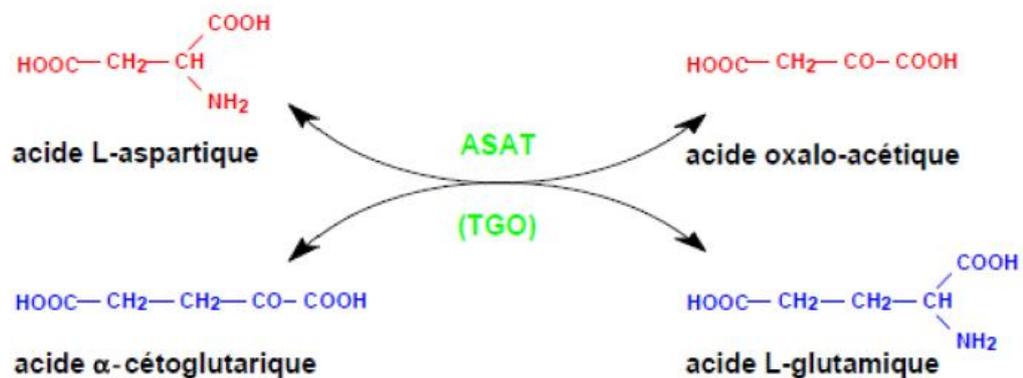
Les groupes transportés sont : le méthyl ($-\text{CH}_3$), l'hydroxyméthyl ($-\text{CH}_2\text{OH}$), carboxyl ($-\text{COOH}$), groupement carboné comportant des fonctions aldéhydes ou cétones ($-\text{CHO}$) ou ($-\text{CO} - \text{R}$) groupe amine (NH_2), etc....

La réaction générale est la suivante :



Dans cette réaction un groupe d'atome R est détaché d'une molécule A est fixé sur une molécule B.

Exemple : L – aspartate – aminotransférase (EC 2.6.1.1). Cette enzyme fait partie d'un groupe d'enzymes les aminotransférases ou transaminases, qui catalyse la transformation réversible des acides α - cétoniques en acides aminés par transfert de groupes amines.



6.3.3. Les hydrolases

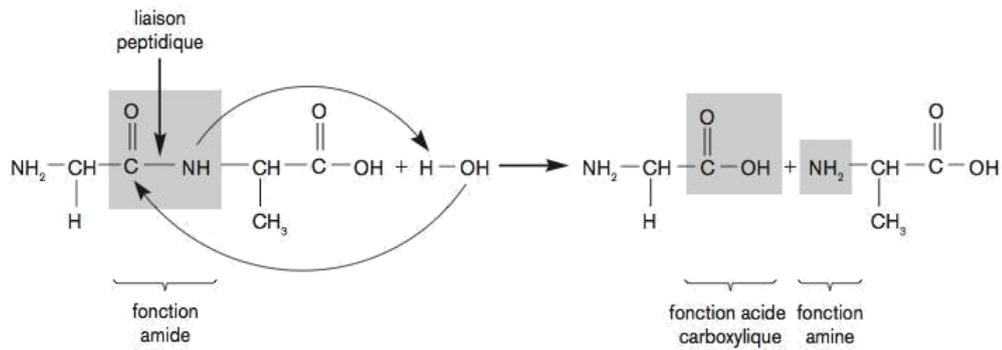
La réaction générale est la suivante :



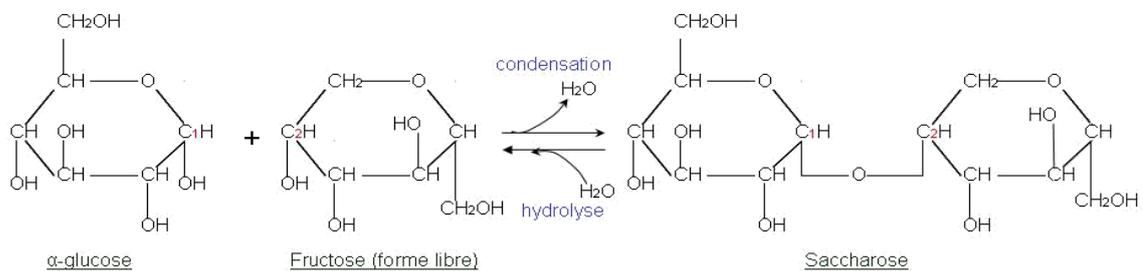
Ce sont des enzymes de dégradation. Elles provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ce sont des enzymes sans coenzymes. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters, phosphoriques, liaisons O – O des peroxydes, liaisons C – N des amides, etc..... Ce groupe d'enzyme est très vaste.

Exemple :

- Les protéases et les peptidases hydrolysent les liaisons peptidiques (agissant entre le groupement cétone d'un acide aminé (C=O) et le groupement amine (NH₂) d'un acide aminé voisin.



- La saccharase (invertase) hydrolyse le α -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2) β -D-fructofurannoside (saccharose) en fructose et glucose.

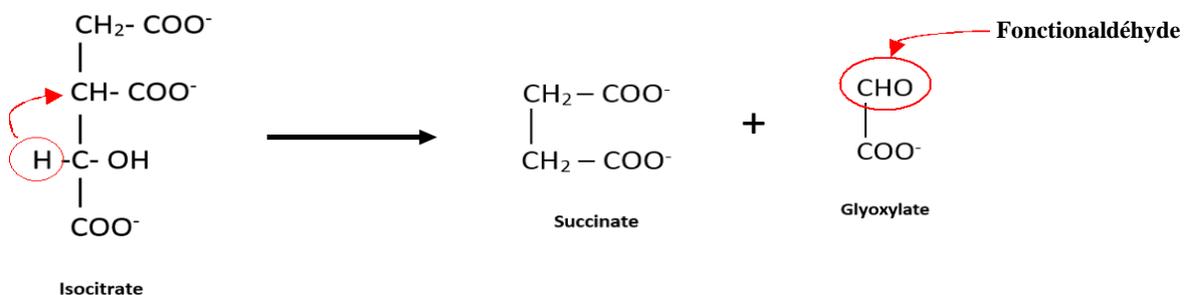


- Les estérases qui hydrolysent les esters en acides gras et alcool.
- Les lipases qui hydrolysent les glycérides en glycérol et acides gras.

6.3.4. Les lyases (synthases)

Dans les réactions de ce groupe il ya rupture d'un enchainement entre deux atomes, carbone – carbone ou carbone – hétéroatome, sans la participation d'une molécule d'eau. C'est par un réarrangement interne que les valences rendues disponibles par la rupture sont à nouveau saturées.

Exemple : Isocitrate glyoxylate lyase (EC 4.1.3.1) catalyse la réaction suivante :

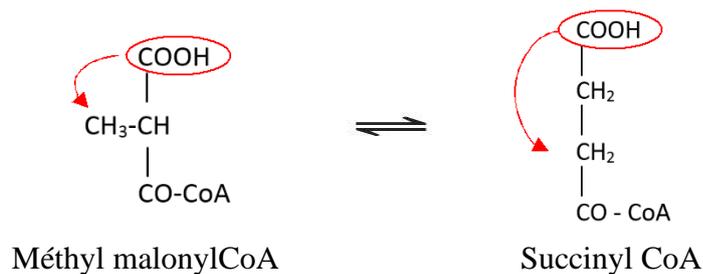


Dans cette réaction le réarrangement conduit à l'oxydation de l'alcool secondaire en aldéhyde.

6.3.5. Les isomérases

Elles catalysent des changements de structure dans une même molécule sans changer sa formule globale (isomérisation, cis – trans, épimérisation, déplacement de radicaux, etc.). La partie déplacé peut être plus ou moins importante (groupe phosphoryle, double liaison, etc...) et constitue le critère de classification.

Exemple: L –méthylmalonyl - CoA isomérase (EC 5.4.99.2) catalyse la réaction suivante :



Dans cette réaction le carboxyle (COOH) est déplacé du C_α au C_β et inversement un hydrogène de ce dernier est transféré au C_α.

6.3.6. Les ligases (synthétases)

Elles catalysent la condensation de deux molécules. Elles forment des liaisons C-C, C-N, C-S, CO-O-P grâce à l'utilisation de l'énergie formé par l'hydrolyse concomitante d'un groupement phosphate ou pyrophosphate de l'ATP.

Exemple: Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1) catalyse la réaction suivante (forme des liaisons C-C).

