

Chapitre 2 : Structure et différentes formes des enzymes

Introduction

Les enzymes sont des protéines globulaires solubles dans l'eau. Elles peuvent être différenciées d'après leurs structures, origines, poids moléculaires et autres propriétés. Par rapport à leur structure on distingue des enzymes à structure monomérique (une seule sous-unité) et des enzymes à structure oligomérique (plusieurs sous-unités).

Du point de vue cinétique les enzymes monomériques possèdent une cinétique michaelienne (courbe hyperbolique) alors que les enzymes oligomériques ont une cinétique allostérique (courbe sigmoïde) (**Figure 1**).

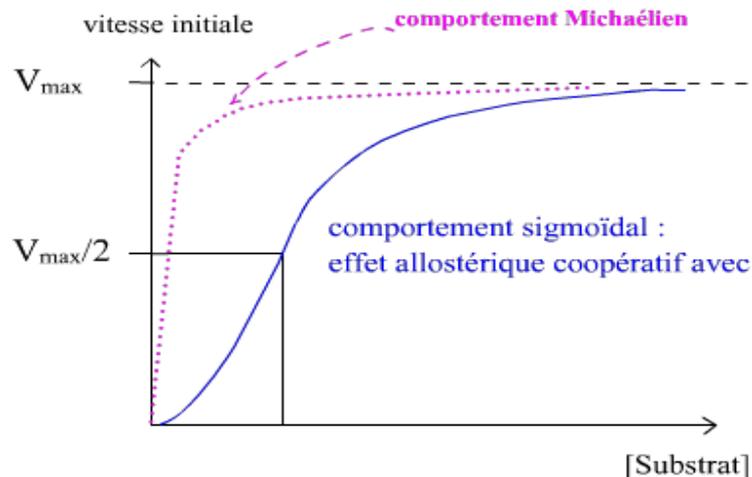


Figure 1 : Enzyme michaelienne et enzyme allostérique.

Une même enzyme peut exister sous différentes formes, ayant des PM et des propriétés différentes, il s'agit d'isoenzymes on les appelle aussi isoformes. Il existe aussi des enzymes qui s'associent physiquement au sein d'une même macromolécule pour former un complexe multienzymatique (associations de plusieurs enzymes) appelées aussi protéines multi enzymatiques.

1. Enzyme monomérique

Ce sont des enzymes constituées d'une seule chaîne polypeptidique. C'est à dire une seule unité fonctionnelle arrangée en structure tertiaire (il n'a pas de structure quaternaire).

Exemple: la chymotrypsine (EC.3.4.4.5) c'est une protéase à sérine dont la structure est connue depuis 1969. Elle est synthétisée par le pancréas. Celle du bœuf renferme 245 acides aminés. Elle hydrolyse les liaisons peptidiques dont lequel le carboxyle (COOH) appartient aux acides aminés aromatiques (tyrosine et phénylalanine). Elle est stéréosélective c'est à dire agit de préférence sur la forme L. La principale propriété est le type de cinétique. Elle se caractérise par une cinétique michaelienne.

2. Enzyme oligomérique

Une enzyme oligomérique est une protéine formée par l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques (unités fonctionnelles). Chaque sous-unité correspond à un seul polypeptide et forme un protomère. La structure quaternaire résulte de l'association des protomères en un oligomère.

Propriétés

- Elles ont un PM élevé.
- Le nombre d'unité est pair
- Les sous-unités sont reliées entre elles par des liaisons ioniques ou hydrogènes.
- Elle présente une cinétique allostérique.

Exemple: la β -galactosidase d'*E. Coli* qui hydrolyse le lactose, est une enzyme de diagnostic médical utilisée dans la détection des bactéries coliformes capables d'hydrolyser le lactose. La β -galactosidase d'*E. coli* comprend 4 sous-unités identiques dont le PM est de l'ordre 105 KDa (plus de 900 acides aminés). Les sous-unités chez d'autres espèces sont comprises entre 80 – 100 KDa, lorsque les sous-unités sont séparées elles deviennent inactives.

3. Isoenzymes

Les isoenzymes sont des protéines très voisines par leurs propriétés de catalyse. Elles sont fabriquées par un même organisme et catalyse la même réaction, cependant elles se différencient entre elles par quelques propriétés physico-chimiques telles que : PM, pH_i , pH , T, paramètres cinétiques (V_m , K_m), sensibilité à certains effecteurs (activateurs et inhibiteurs), etc.

Exemple: la lactate-déshydrogénase (EC.1.1.1.27) (**Figure 2**) catalyse l'oxydation du lactate en pyruvate. C'est une enzyme tétramérique (ce compose de deux types de sous-

unités). La sous-unité SSM abondante dans le muscle et la sous-unité SSH prédominante dans le cœur. La mesure de l'activité d'une iso-enzyme renseigne sur l'état du tissu dont elle est spécifique.

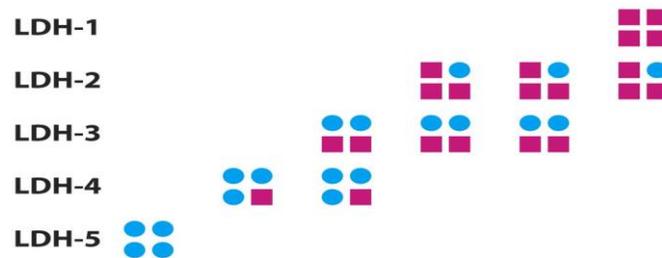
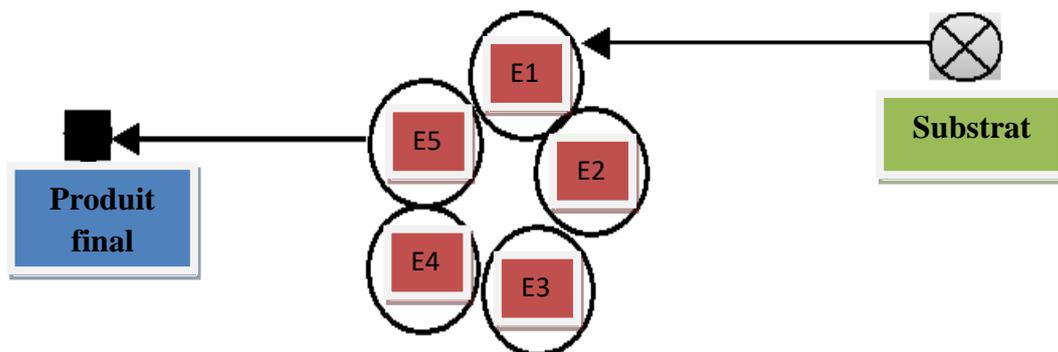


Figure 2 : Isoenzyme lactate déshydrogénase.

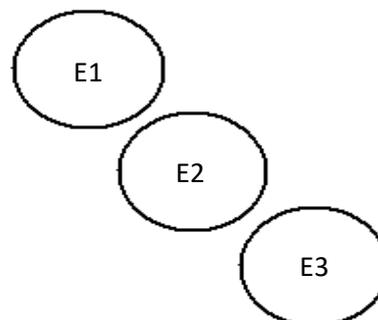
4. Complexes multienzymatiques

Une protéine multienzymatique est constituée par l'association physique de plusieurs enzymes au sein d'une même macromolécule. Elle est également appelée enzyme multifonctionnelle. Généralement, les complexes multienzymatiques sont formés d'enzymes associées qui catalysent deux réactions successives ou plus d'une voie métabolique.



Dans ce type de réactions le substrat se fixe sur le complexe, puis il se fixe par une liaison covalente. Il est ensuite séquentiellement modifié par les enzymes E1 Jusqu'à E5 avant que le produit final soit libéré.

On peut avoir aussi des enzymes séparées.



Exemple : Dans le cycle de Krebs. L'Acétyl CoA se forme à partir de pyruvate par décarboxylation grâce à un complexe multi enzymatique appelé pyruvate déshydrogénase composé de 3 enzymes dont :

E1 : Pyruvate déshydrogénase.

E2 : Dihydrolipoamide transacétylase.

E3 : Dihydrolipoamide déshydrogénase

5. Technique de dénombrement des sous-unités (protocole expérimental de la technique de Laemmli, 1970)

Pour déterminer le nombre de sous unités qui existent éventuellement dans une protéine, on utilise une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence du SDS [SDS-PAGE]. C'est une technique universelle la plus utilisée (**Figure 3**).

1- La protéine est précipitée et dénaturée par le TCA 10%.

2- Le précipité centrifugé est repris dans un petit volume de tampon contenant du 2-mercaptoethanol 10mM (pour casser les liaisons S-S) et SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{SO}_3\text{Na}^+$ (c'est un dénaturant doux) qui va rompre les liaisons ioniques et qui transforme les sous-unités en polyanion chargé négativement.

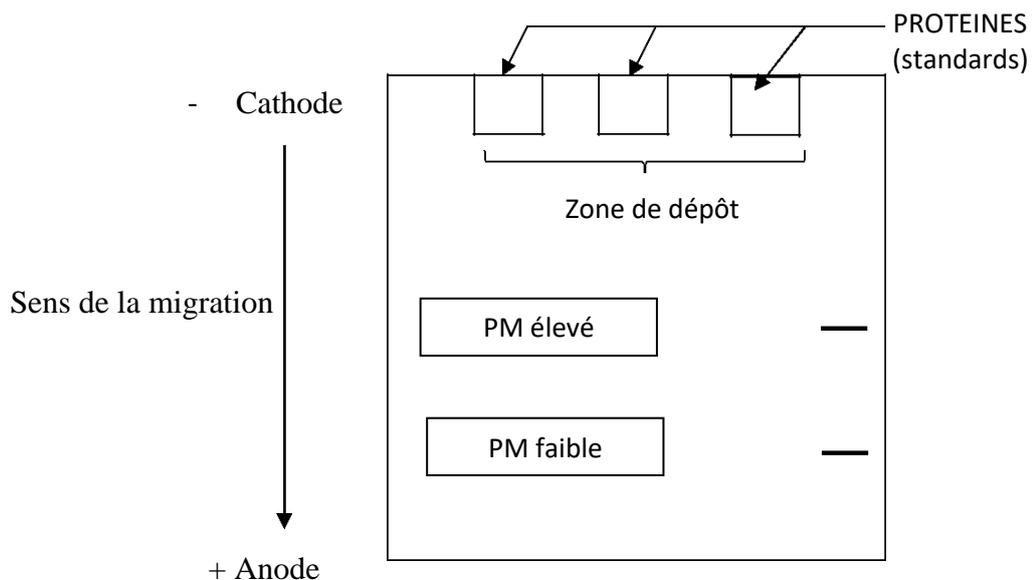


Figure 3 : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

3- Le mélange est porté quelques minutes à ébullition.

4- La solution du (10-50 μ l) est disposée sur un gel de polyacrylamide. On lance ensuite le courant électrique.

5- Une fois la migration est achevée, pour rendre les bandes visuelles, on colore le gel avec une solution au bleu de Coomassie. Puis une décoloration avec un mélange de méthanol acide acétique. On compare les bandes avec des standards (Protéine pure de PM connu). Cette technique est également utilisée pour déterminer le poids moléculaire d'une protéine.

