ENZYMOLOGIE

I - GENERALITES

Les enzymes interviennent dans la réalisation des réactions chimiques s’effectuant au niveau de l’organisme . Autrefois appelés diastases ou ferments , les premiers enzymes furent identifiés au 18 ° siècle :

* Pepsine du suc gastrique par Schwan en 1836
* Trypsine du suc pancréatique par Kuhne en 1848
* Lipase par Claude Bernard en 1849 …..

11- Définition :

L’enzyme est une protéine présentant des propriétés catalytiques spécifiques d’une réaction chimique du métabolisme de l’être vivant qui la produit ; elle peut également agir en dehors de cet organisme.

→ On appelle catalyseur une substance :

* qui agit à de très faibles concentrations
* qu’on retrouve intacte à la fin de la réaction
* qui augmente considérablement la vitesse des réactions chimiques (plus que les catalyseurs chimiques) en diminuant l’énergie d’activation sans modifier l’équilibre final , exemple :

2 H2O2 O2 + 2 H2O .

L’énergie de cette réaction est de 18 Kcal/mole en absence de catalyseur, elle est de 12 Kcal/mole en présence de platine ( catalyseur chimique ) et de 6 Kcal/mole seulement en présence de catalase ( enzyme ).

→ L’enzyme présente une double spécificité :

* une spécificité liée au substrat
* une spécificité liée au type de réaction , exemple :

R-CH2-NH2

*Décarboxylase* Amine primaire

CO2

R-CH-COOH H2O

NH2 *Désaminase*

NAD+ NH3

NADH,H+ R-CO-COOH

Acide α cétonique

12- Structure :

121- Protéine:

Les enzymes sont des protéines. Elles ont une structure compacte repliée sur elle-même due aux structures, secondaire et tertiaire; qui reposent elles-mêmes sur les liaisons faibles. Toute déformation de cette structure retentit sur les propriétés catalytiques de l’enzyme.

* Une augmentation de la température rompt les liaisons H et hydrophobes, dénature la structure et rend l’enzyme inactif.
* Une variation du pH entraîne l’apparition de charges supplémentaires sur les acides aminés diacides ou dibasiques , déforme la structure spatiale de l’enzyme et le rend inactif. L'enzyme comprend deux sites:

122- Site actif ou site catalytique:

C’est une zone privilégiée de l’enzyme ( représentant environ 5% de la surface totale de l’enzyme) au niveau de laquelle le substrat est transformé. Il possède une structure complémentaire de celle du substrat. Deux à dix amino-acides seulement , regroupés dans une zone hydrophobe interne de la molécule , participent à l’activité catalytique. Les plus rencontrés sont : histidine , serine , cystéine , lysine , tyr ; ce sont des acides aminés polaires dotés de doublets électroniques libres , possédant ainsi une activité nucléophile ( N , O , S …. )

SITE ACTIF

Tyr 53

Ser195

Arg 234

123- Site de fixation ou de reconnaissance :

L’enzyme peut agir sur n’importe quel assemblage atomique ressemblant à son substrat. La spécificité de l’enzyme est assurée par un groupe d’acides aminés formant une zone proche du site actif appelée « site de fixation » ou « site de reconnaissance ». Ce site aide l’enzyme à “identifier” son substrat.

Exemple : action de l’acétylcholinestérase sur son substrat, l’acétylcholine.



Site de Site actif

reconnaissance



Choline Acétate

Le site de reconnaissance ou site de positionnement ou site de fixation permet à l’enzyme, l’acétylcholinestérase, d'identifier son substrat: l’acétylcholine.

Des expériences faites avec des pseudo-acétylcholines plus longues ou plus courtes que l’acétylcholine montrent que ces pseudo-substrats sont correctement fixés sur le site de reconnaissance mais ne peuvent être hydrolysés car la liaison ester n’est plus en face du site actif.

 Pas d’action

 Pas d’action

##### 124- Réactivité :

→ L’enzyme agit sur le substrat :

* en formant avec lui un complexe intermédiaire [ES]
* en provoquant dans le substrat des déplacements électroniques permettant à la réaction de s’effectuer.

→ Tout agent chimique susceptible de se fixer sur les acides aminés du site actif bloque celui-ci et inhibe l’enzyme :l’iodacétamide, acide nitreux …..

##### → Exemple : mécanisme d’action de la carboxypeptidase.

La carboxypeptidase hydrolyse la liaison peptidique en partant du carboxyle terminal des peptides : c’est une exopeptidase.

Le substrat peptidique se fixe sur le site actif, lequel comporte Arg 145, l’ion Zn2+, Tyr 248, Glu 270 et ce qu’on appelle la *poche hydrophobe*, qui contient les chaînes latérales des acides aminés aliphatiques et aromatiques.

L’ion Zn2+ agit comme un électrophile qui polarise davantage l’oxygène du carbonyle avant la formation d’une liaison ester avec le γ-carboxyle du Glu 270 de l’enzyme. Cette liaison est covalente, et la réaction est dite catalyse covalente.

L’attaque nucléophile de Glu 270 sur la liaison peptidique s ‘accompagne de la prise d’un proton H+ à Tyr 248. Il en résulte la rupture de la liaison peptidique et la libération de l’acide aminé C-terminal.

Le polypeptide lié par covalence est alors relâché et l ‘enzyme libre régénérée par l’attaque nucléophile d’une molécule de H2O sur la liaison anhydride avec Glu 270 ; ensuite vient la reprotonation de Tyr 248.



125- Structure quaternaire et allostérie :

► Rappel :

Il existe deux types d’enzymes:

→ Enzyme monomérique : enzyme comportant une seule unité appelée monomère ou protomère , exemple : la trypsine , la chymotrypsine , la papaïne.

→ Enzyme polymérique : enzyme comportant plusieurs unités dont l’assemblage constitue la structure quaternaire.

- E.homopolymérique : constituée de monomères identiques

- E.hétéropolymérique : constituée de monomères présentant des différences minimes dans la structure mais une même activité catalytique : les isoenzymes.

► Chaque sous-unité des enzymes polymériques porte un site actif. Les effecteurs ( activateurs ou inhibiteurs ) se fixent sur des régions distinctes du site actif et provoquent une modification de la conformation de la protéine enzymatique . Ces sites allostériques sont appelés , selon le type de l’effecteur , site d’activation ou site d’inhibition. Ce site influence la structure tertiaire de toute la molécule , changement qui retentit aussitôt sur les autres sous-unités : effet coopératif.

Exemple d’enzymes polymériques :

* Dimère ( deux sous-unités ) : la phosphatase alcaline
* Tétramère ( quatre sous-unités ) : l’hexokinase
* Hexamère ( six sous-unités ) : l’aldolase.

13- Catégories d’enzymes:

Il existe deux catégories d’enzymes:

→ Enzyme sans cofacteur  : l’amylase.

→ Enzyme avec cofacteur : transaminase, décarboxylase, lipase …..

On appelle cofacteur un corps chimique indispensable à certains enzymes pour catalyser une réaction. Son rôle est de transporter ou compléter un substrat, accepter un produit ou participer à la structure de l’enzyme.

Le cofacteur peut être :

* un ion métallique : Zn2+, Mg2+, Fe2+ , Fe3+ , Cu2+ ………
* une petite molécule minérale : l’eau.
* Molécules organiques plus complexes synthétisées par la cellule : les coenzymes qui sont de deux types : les groupements prosthétiques formant des liaisons covalentes avec le substrat ( FAD , cytochromes , coenzyme Q …) et les cosubstrats formant des liaisons non covalentes avec le substrat ( NAD , ATP …). Plusieurs de ces molécules ne peuvent pas être synthétisées par la cellule et doivent être apportées par l’alimentation : ce sont les vitamines.

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide.

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide.

ATP : Adénosine Tri Phosphate.

Apoenzyme + Coenzyme = Holoenzyme

Inactif Inactif Actif

II **-** NOMENCLATURE ET CLASSIFICATION :

21- Nomenclature :

Les enzymes sont dénommés de différentes manières :

* Certains ont gardé leur nom primitif : pepsine, trypsine ……
* Pour d’autres on ajoute le suffixe “ase” au nom du substrat ou au radical de ce nom : maltase, amylase ….
* La dénomination la plus correcte comporte le nom du substrat à transformer et la désignation de la réaction effectuée : l’alcool déshydrogénase.

Il existe une nomenclature codifiée proposée par l’union internationale de la biochimie en 1964 : deux lettres E.C ( Enzyme Commission ) suivies de quatre chiffres désignant le numéro de la classe d’enzyme , le type de réaction ou le numéro de la sous-classe , le type de molécule sur laquelle elle a lieu et le numéro d’ordre de l’enzyme dans le sous-groupe considéré. Exemple EC 1.1.1.1 représente l'alcool-déshydrogénase.

22- Classification :

Adoptée sur recommandation de la commission internationale des enzymes qui dégage six classes :

* Oxydo-réductases ou deshydrogénases
* Transférases
* Hydrolases
* Lyases
* Isomérases
* Ligases ou synthétases.

221- Les oxydo-réductases :

sont responsables du processus d’oxydo-réduction

CH3-CH2-OH CH3-CHO Acetaldéhyde

Ethanol NAD+  NADH,H+

Alcool deshydrogénase

Ces enzymes agissent sur les liaisons suivantes :

* CH-OH
* C = O
* CH-CH
* CH-NH2
* CH-NH

222- Les transférases :

catalysent le transfert d’un groupement X ( autre que H ) d’un substrat A à un substrat B :

A R-CO-COOH R-CH-COOH

NH2

R’-CH-COOH R’-CO-COOH

BNH2

L’enzyme est la B – A aminotransférase.

Ces enzymes assurent le transfert des radicaux tels :

* le groupement aminé
* le groupement aldéhyde ou cétone
* le groupement acyl
* le groupement phosphate
* le groupement soufré.

223- Les hydrolases :

Entraînent la coupure des molécules :

→ Les estérases hydrolysent les liaisons esters des acides organiques ou minéraux : lipases , phosphatases , sulfatases …

→ Les osidases hydrolysent les oses : glucosidase …

→ Les désacylases hydrolysent la liaison thioester : acyl-CoA désacylase …

→ Les amidases coupent les liaisons amides.

→ Les désaminases libèrent le NH3.

→ Les décarboxylases libèrent le CO2.

224- Les lyases :

Catalysent les réactions d’élimination de certains groupements faisant apparaitre une double liaison sur le subtrat : L-malate hydrolyase (E.C.4.2.1.2.).

225- Les isomérases :

Catalysent le transfert d’atomes ou de groupement d’atomes dans une molécule : D-3-Phosphoglycéraldéhyde cétol isomérase (E.C.5.3.1.1.).

226- Les ligases :

Catalysent la formation de liaisons et participent aux réactions de synthèse : liaisons C-C , C-N , C-O , C-S …

# **III- CINETIQUE ENZYMATIQUE :**

C’est l’étude de la vitesse d’une réaction catalysée par un enzyme. Cette vitesse exprime l’activité catalytique d’un enzyme. L’unité de l’activité enzymatique est l’unité internationale (U.I ) qui correspond à la quantité d’enzyme nécessaire pour catalyser la transformation d’une micromole de substrat par minute dans les conditions optimales de l’enzyme. L’activité spécifique est exprimée en unités d’activité enzymatique par mg de protéine.

31- Rappels de cinétique classique :

Les réactions chimiques sont classées en fonction du nombre de molécules réagissant entre elles pour former les produits , on parle alors d’ordre de réaction :

réaction d’ordre zéro , d’ordre 1…

→ *Ordre zéro* :

La vitesse est indépendante de la concentration du substrat.

A P

d[A]

V = - = k0 - d[A] = k0dt

dt

A t

- ∫A0 d[A] = ∫t 0 k0t - [A] + [A0] = k0 ( t – t0 )

t0 = 0 [A0] - [A] = k0 t

k0 est exprimée en M.s-1

[A]

[A] = - k0 t + [A0]

[A0]

- k0

t

→ *Ordre 1* :

La vitesse dépend de la concentration du substrat .

A P

d[A] d[A]

V = - = k1[A] - –––––– = k1dt

dt [A]

[A] d[A] t

- ∫[A0] ––––– = ∫t 0 k1dt

[A]

- Ln [A] + Ln [A0] = k1 (t- t 0)

t 0 = 0 Ln [A] = - k1 t + Ln [A0]

Ln [A]

Ln [A0]

- k1

t

[A0] Ln [A0] / [A]

ou Ln ––––– = k1 t

[A]

k1 est exprimée en s-1 k1

t

→ *Ordre 2* :

A + B P

La vitesse de la réaction dépend de la concentration des deux réactifs.

d[A] d[B]

V = - –––––– = - ––––––– = k2[A][B]

dt dt

à t 0  si [A0] = [B0] à t [A] = [B] d’après la réaction

d[A] d[B]

V = - –––––– = - ––––––– = k2[A]2

dt dt

d[A]

- –––––– = k2dt k2 est exprimée en M-1.s-1

[A]2

[A] d[A] t

- –––––– = k2dt

[A0] [A]2  t 0

1 1

–––– - –––– = k2t

[A] [A0]

1 1 1 / [A]

–––– = k2t + –––––

[A] [A0] k2

1 / [A0]

t

32- Cinétique Michaelienne :

Les principes généraux de cinétique chimique s’appliquent aussi aux réactions enzymatiques. Cependant les enzymes possèdent un caractère particulier :

Le phénomène de saturation par le substrat.

321- Détermination de l’équation de Michaelis-Menten :

k1

E + S  ES (**1)**

k-1

k2

ES  E + P (**2)**

k-2

d[ES] d[P]

v0  = - –––––– = –––––– v0  = k2[ES] (**3)**

dt dt

La vitesse initiale v0 est la vitesse de la réaction au cours de la phase stationnaire où [ES] / [Et] est maximale . Cette vitesse augmente de manière constante.

k2 et [ES] ne peuvent pas être déterminés directement , il faut trouver une expression de v0 utilisant des variables mesurables.

→ Formation de ES :

v1 = k1 [E][S] k-2 étant négligeable

[E] = [Et – ES] v1 = k1 [Et – ES][S] **(4)**

→ Disparition de ES :

d[ES]

v2 = - ––––– = k-1 [ES] + k2 [ES] = ( k-1 + k2)[ES] **(5)**

dt

→ Lorsque la vitesse de formation de ES est égale à la vitesse de sa disparition le système atteint l’état stationnaire [ES] = constante. v1 = v2

k1[E][S] = ( k-1 + k2)[ES]

[E][S] k-1 + k2

–––––– = ––––––– = KM  **(6)**

[ES] k1

KM est la constante de Michaelis –Menten qui n’est autre que la constante de dissociation du complexe ES.

* KM est spécifique pour chaque enzyme.
* 1 / KM exprime l’affinité de l’enzyme pour le substrat.

KM diminue 1 / KM augmente l’affinité augmente.

KM augmente 1 / KM diminue l’affinité diminue .

Exemple : L’hexokinase a une affinité dix fois plus grande pour le glucose que pour le fructose KM glucose = 0,15 et KM fructose = 1,5 .

→ La [ES] à l’équilibre peut être déduite de l’équation **(6)**

[E][S] [Et – ES][S] [Et][S] – [ES][S] [Et][S]

KM = –––––– = –––––––––––– = –––––––––––––– = ––––––– - [S]

[ES] [ES] [ES] [ES]

[Et][S] [Et][S]

d’où KM + [S] = –––––– [ES] = –––––––– **(7)**

[ES] KM + [S]

→ On revient à l’équation **(3)** pour déterminer v0 :

[Et][S]

v0 = k2 [ES] = k2 ––––––– (k2 correspond au K catalytique)

KM + [S]

Quand [S] est très grande [Et] = [ES] k2 [Et] = Vmax.

Vmax [S]

D’où v0 = –––––––– **(8)**

KM + [S]

L’équation de Michaelis-Menten (M.M) représente l’équation de vitesse pour une réaction enzymatique à un substrat. Elle permet d’établir une relation entre la vitesse , la concentration en substrat et l’affinité de l’enzyme pour le substrat. La concentration de l’enzyme n’apparaît cependant pas dans l’équation de M.M.

Le graphe suivant est obtenu :

V0

Vmax --------------------------------------------------

Vmax/2-----------

KM [S]

* Lorsque la concentration du substrat [S] est faible , la vitesse de la réaction est proportionnelle à [S] , la réaction est d’ordre 1 .
* Lorsque [S] augmente , la vitesse continue de s’accroître mais pas dans les mêmes proportions car la réaction dépend également de la concentration de l’enzyme [E] , il s’agit d’une réaction mixte.
* Aux fortes [S] , la vitesse devient constante , elle est indépendante de [S], la réaction est d’ordre 0. Le rendement est maximal et ne dépend que de la quantité d’enzyme.

Cela s’explique par le fait que l’enzyme est saturé et montre que la formation du complexe [ES] est une étape essentielle de la réaction. Ensuite il y a libération du produit et régénération de l’enzyme , d’où le rôle régulateur joué par l’enzyme.

Tous les enzymes présentent cet effet de saturation , mais la quantité de substrat qui produit cette saturation varie beaucoup d’un enzyme à l’autre.

322 – Relation de Lineweaver-Burk :

L’équation de Michaelis-Menten peut être transformée pour une meilleure exploitation des résultats expérimentaux . La plus utilisée est celle de Lineweaver-Burk et elle consiste à prendre l’inverse de l’équation de M.M.

1 KM + [S] KM [S]

–––– = –––––––– = –––––––– + ––––––––

v0  Vmax [S] Vmax [S] Vmax [S]

1 KM 11

–––– = ––––– ––– + ––––– **(9)**

v0  Vmax [S] Vmax

Cette relation est représentée par une droite en reportant sur un graphe 1/v0 en fonctionde 1/[S]

1/v0

Pente = KM /Vmax

1/Vmax

-1/KM 1/[S]

33- Cinétique non Michaelienne ( allostérie )

v

Vmax -------------------------------------------

1 2 [S]

*Effet de seuil* *Effet coopératif*

Au début la réaction est très lente. A partir d’un certain seuil la vitesse augmente rapidement. En effet, la fixation d’une mole de substrat facilite la fixation d’une deuxième mole de substrat et ainsi de suite : c’est l’effet coopératif.

→ *Les effecteurs* , activateurs ou inhibiteurs , sont généralement sans analogie avec le substrat et se placent sur un site allostérique autre que le site actif. Si un inhibiteur se place sur le site allostérique , il modifie la conformation du site actif. Ceci peut modifier soit l’affinité de l’enzyme pour le substrat , soit la vitesse de la réaction catalysée par cette enzyme.

→ *La rétroinhibition* : Dans une chaîne métabolique dont la première étape est catalysée par une enzyme allostérique , le produit final de la chaîne de réaction peut inhiber cette enzyme bien qu’il n’ait aucune analogie avec le substrat. C’est le phénomène de rétroinhibition ; il joue un rôle très important dans la régulation du métabolisme cellulaire.

34- Action des agents physiques sur l’activité enzymatique :

→ *Le pH* : Les enzymes ont une activité maximale dans une zone restreinte de pH . De part et d’autre de cette zone l’activité enzymatique décroît très vite.

Le pH peut agir sur l’enzyme et le substrat en modifiant :

* l’ionisation du substrat
* l’ionisation du site actif de l’enzyme qui se lie au substrat
* la conformation tertiaire de l’enzyme.

Le pH joue un rôle régulateur sur l’activité de l’enzyme dans le milieu intracellulaire.

Exemple : effet du pH sur l’activité de trois enzymes :

Activité

Trypsine

6 8 10 pH

Activité

Pepsine

2 4 6 pH

Activité

Cholinestérase

4 6 8 10 pH

→ *Action de la température sur l’activité enzymatique* :

Généralement la vitesse des réactions enzymatiques augmente avec la température dans l’intervalle où l’enzyme reste stable. Cette vitesse est maximale aux alentours de 40°C. Au-delà d’un certain seuil ( T > 60°C ) commence la dénaturation de l’enzyme.

Activité

20 40 60 T °C

→ *Action des radiations ionisantes* :

Les radiations ionisantes (rayons X par exemple) peuvent inactiver l’enzyme en dénaturant sa structure.

## **IV- INHIBITION ENZYMATIQUE :**

L’inhibition spécifique de certains enzymes par des métabolites intracellulaires joue un rôle important dans la régulation des réactions enzymatiques et donc du métabolisme cellulaire.

Son étude renseigne sur la spécificité des enzymes envers leurs substrats , sur la nature du groupement fonctionnel du site actif de l’enzyme et sur le mécanisme d’action des enzymes. Il existe trois types d’inhibition :

* Inhibition compétitive
* Inhibition non compétitive
* Inhibition incompétitive.

41- Inhibition compétitive :

Dans ce cas l’inhibiteur est un analogue structural du substrat et agit en prenant la place de celui-ci sur le site actif de l’enzyme.

E + S  ES

 

EI E + P

[E] [I]

KI étant la constante de dissociation du complexe EI KI = ––––––

[EI]

L’affinité de l’enzyme pour le substrat diminue : 1/K’M < 1/KM K’M > KM

[I]

K’M = KM (1 + ––– )

KI

La vitesse maximale (Vmax) reste inchangée car l’inhibition peut être levée par un excès de substrat. V’max = Vmax

1 K’M  1 1 KM  [I] 1 1

–– = –––– –– + ––––– = –––––– (1 + ––– ) –– + –––––

v’0 V’max [S] V’max Vmax KI [S] Vmax

1/v0

Avec I

Sans I

1/V’max = 1/ Vmax

-1/ KM -1/ K’M 1/[S]

Exemple : le malonate prend la place du succinate sur la succinodéshydrogénase lors de la réaction succinate fumarate.

42- Inhibition non compétitive :

Dans ce cas l’affinité n’est pas affectée car le site de l’inhibiteur est différent du site du substrat. L’inhibiteur se fixe à la fois sur l’enzyme et sur le complexe ES. Par contre la vitesse maximale est diminuée.

E + S  ES  E + P

+ +

I I

 

EI + S  ESI

1 1

K’M = KM et –––– > ––––– V’max < Vmax

V’max Vmax

1 1 [I]

–––– = –––– (1 + ––– )

V’max Vmax KI

1 K’M  1 1 KM  [I] 1 1 [I]

–– = –––– –– + ––––– = –––––– (1 + ––– ) –– + ––––– (1 + ––– )

v’0 V’max [S] V’max Vmax KI [S] Vmax KI

1/v0

Avec I

Sans I

1/ V’max

1/ Vmax

-1/ K’M = -1/ KM 1/[S]

Exemple : le cuivre est un inhibiteur non compétitif de la succinodéshydrogénase.

43- Inhibition incompétitive :

L’inhibiteur ne se fixe pas sur l’enzyme libre mais uniquement sur le complexe ES. Dans ce cas, la vitesse maximale est diminuée , l’affinité est augmentée , cependant la pente de la droite n’est pas modifiée car le rapport

KM / Vmax est inchangé.

E + S  ES + I  ESI.



E + P

1 1  KM

–– > –– K’M < KM K’M = ––––––

K’M KM [I]

(1 + –– )

KI

1 1 1 1 [I]

––– > ––– V’max < Vmax –––– = –––– (1 + –– )

V’max Vmax V’max Vmax KI

1 K’M  1 1 KM  1 1 [I]

–– = –––– –– + ––––– = –––––– –– + ––––– ( 1 + ––– )

v’0 V’max [S] V’max Vmax [S] Vmax KI

1/v0

Avec I

Sans I

1/ V’max

1/ Vmax

-1/ K’M -1/ KM 1/[S]

Exemple : l’iodacétamide , Ag+ , Hg++ …

Tableau récapitulatif des différents types d’inhibition.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Types d’inhibition | Pente | Abcisse à l’origine | Ordonnée à l’origine |
| Sans inhibiteur | KM  ––––  Vmax | 1  - –––  KM | 1  –––  Vmax |
| Compétitive | KM [I]  –––– ( 1 + –– )  Vmax KI | 1  - –––––––––––––  [I]  KM ( 1 + –– )  KI | 1  –––  Vmax |
| Non Compétitive | KM [I]  –––– ( 1 + –– )  Vmax KI | 1  - –––  KM | 1 [I]  ––– (1 + –– )  Vmax KI |
| Incompétitive | KM  ––––  Vmax | [I]  ( 1 + –– )  KI  - ––––––––  KM | 1 [I]  ––– (1 + –– )  Vmax KI |