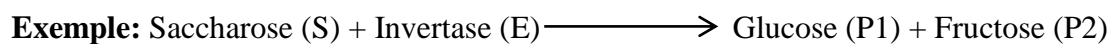

Chapitre 5. Notions d'enzymologie

Toutes les réactions du métabolisme sont catalysées par les enzymes ou biocatalyseurs ou protéines catalytiques. L'enzymologie est la partie de la biochimie qui étudie les propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes.

I. Définition de quelques notions d'enzymologie

Les enzymes (E) sont des composés de nature protéique, qui catalysent des réactions biologiques dans lesquelles un substrat (S: toute molécule qui, en entrant dans une réaction enzymatique est définitivement transformée) est transformé en un produit (P: molécule résultant de la transformation d'un substrat sous l'action d'une enzyme.).



Les enzymes sont très spécifiques à leurs substrats, elles agissent à faible température, et à faibles concentrations, elles restent inchangées en fin de réaction,

Sur le plan structural, il existe deux grandes catégories d'enzymes:

1. Les holoenzymes: les enzymes purement protéiques, elles sont constituées uniquement d'acides α -aminés. Exp : La ribonucléase.

2. Les hétéroenzymes: En plus des structures protéiques (l'apoenzyme), elles comportent des éléments non protéiques appelés : Cofacteurs ou Coenzymes.

- **Les cofacteurs :** Eléments ou groupements inorganiques, généralement des Ions métalliques (le plus souvent bivalents : Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , ...) fortement liés à l'enzyme. Leur rôle est de :
 - Participer à la reconnaissance et la fixation du substrat.
 - Participer à la transformation catalytique du substrat.
 - Stabiliser la structure tridimensionnelle du site réactif de l'enzyme.
- **Les coenzymes :** Molécules organiques non protéiques comportant généralement dans leur structure des hétérocycles. La plus part d'entre elles sont des dérivés vitaminiques.

Les cofacteurs peuvent être classés selon leur mode de liaison aux enzymes : des cofacteurs faiblement liés à l'enzyme (liaisons non covalentes) seront appelés coenzymes libres, et des cofacteurs fortement liés à l'enzyme (liaison covalente) seront appelés groupements prosthétiques ou coenzymes liés.

- Exemple de coenzymes liés : Le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide).
- Exemple coenzymes libres: Le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide).

II. Nomenclature et classification

Des milliers d'enzymes sont identifiées jusqu'à présent ; on pense qu'il y'en aurait des milliers encore à découvrir dans le monde vivant.

La nomenclature des enzymes n'est pas standardisée, mais le plus souvent elle se compose d'un radical proche du substrat ou du produit de la catalyse suivit du suffixe -ase. En 1961, la commission des enzymes (E.C) a établi une classification et une nomenclature systématique, suivant la réaction biochimique réalisée par les enzymes, les six classes sont :

- **E.C.1: Les oxydoréductases**, qui catalysent des réactions d'oxydoréduction (comme l'oxydase) ;
- **E.C.2: Les transférases**, qui transfèrent un groupement fonctionnel d'une molécule à l'autre (comme les méthyltransférases qui transfèrent un groupement méthyle) ;
- **E.C.3: Les hydrolases**, qui hydrolysent des liaisons chimiques (comme les nucléases qui coupent l'ADN ou l'ARN) ;
- **E.C.4 : Les lyases**, qui rompent des liaisons mais en produisent de nouvelles simultanément.
- **E.C.5 : Les isomérases**, qui réarrangent les groupements fonctionnels d'une molécule pour former des isomères (comme les topoisomérases qui enroulent l'ADN) ;
- **E.C.6 : Les ligases ou synthétases**, qui permettent la jonction de deux molécules par des liaisons covalentes (comme les ADN ligases).

A chaque enzyme est attribué un numéro à 4 chiffres et un nom systématique qui identifie la réaction catalysée: EC X1.X2.X3.X4

- **1^{er} chiffre** : Le type de réaction (Classe).
- **2^{ème} chiffre** : le type de fonction du substrat métabolisé (sous classe de l'enzyme)
- **3^{ème} chiffre** : le type d'accepteur (sous sous classe de l'enzyme).
- **4^{ème} chiffre** : le numéro d'ordre (numéro d'ordre ou groupe).

III. Mécanisme d'action

La réalisation d'une réaction chimique repose sur la réactivité des composants qui entrent en réaction (l'enzyme et le substrat) mais aussi sur leur rencontre et affinité.

La réaction enzymatique peut se diviser en trois principales étapes :

- L'association de l'enzyme (E) et du substrat (S) : Elle se produit en une région bien précise de l'enzyme appelée (site actif). L'association enzyme-substrat (ES) est stabilisée par des liaisons de faibles énergie : liaisons hydrogène, interactions hydrophobes,
- Le complexe ES subit un réarrangement interne qui va permettre la transformation du substrat en produit (P).
- L'enzyme libère le produit P de la réaction et retrouve son état initial. L'enzyme alors libérée pourra se fixer sur une autre molécule de substrat.

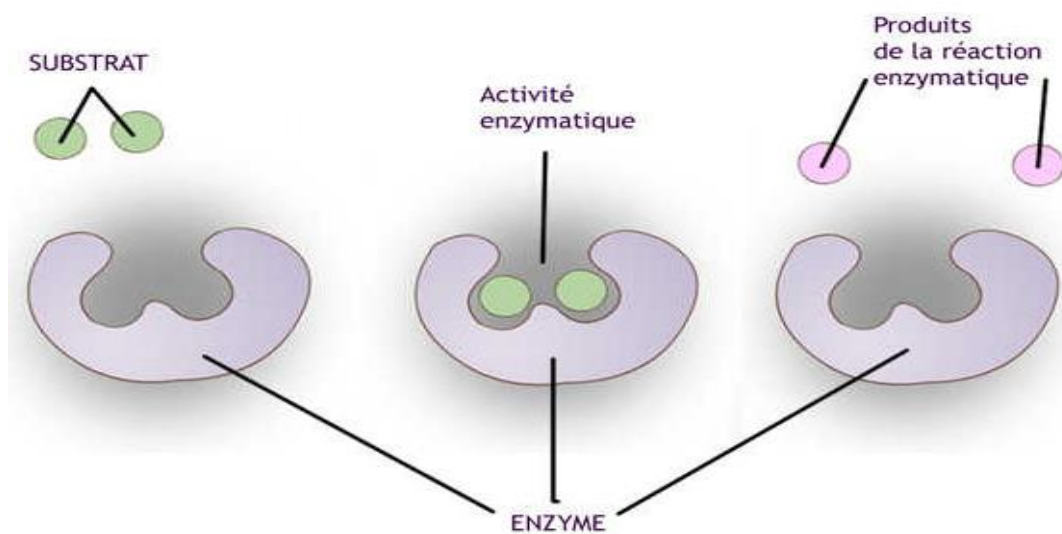


Figure 1. Mécanisme d'action des enzymes.

IV. 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 réagir et se transformer en produit.

Le site actif est subdivisé en deux parties (Figure 2):

- **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.

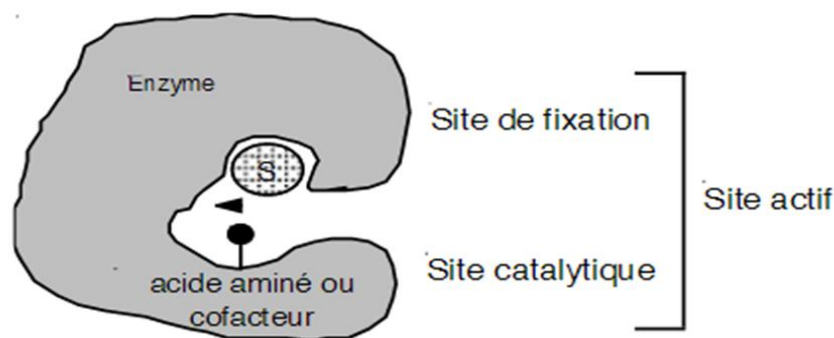


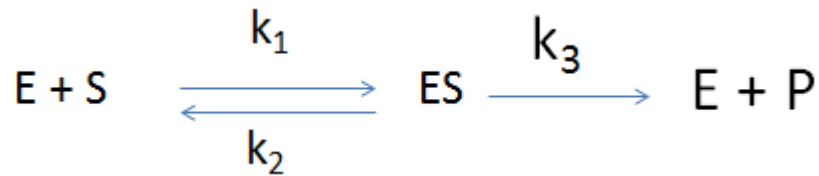
Figure 2. Représentation du site actif.

V. Cinétique enzymatique et types de représentation

L'étude cinétique d'une réaction enzymatique consiste en l'étude de la vitesse de réaction qu'une enzyme est capable de catalyser. Elle est mesurée à partir de la quantité de produit constitué ou de réactif disparu par unité de temps.

La vitesse d'une réaction enzymatique :

Soit la réaction catalysée par l'enzyme E qui transforme le substrat P en produit :



La vitesse instantanée de réaction est la quantité de S disparue par unité de temps ou la quantité de P apparue par unité de temps ; elle est proportionnelle à la concentration du substrat :

- k_1 est la constante de formation du complexe ES ;
- k_2 est la constante de dissociation du complexe ES ;
- k_3 est la constante de formation du P.

Suivant la réaction, la vitesse de disparition du substrat S ($- ds/dt$) est égale à la vitesse de formation des produits de la réaction (dp/dt).

$$- ds/dt = dp/dt$$

La courbe $V=f([S])$ est une courbe hyperbole qui tend vers une valeur limite, la vitesse maximale ou V_{max} .

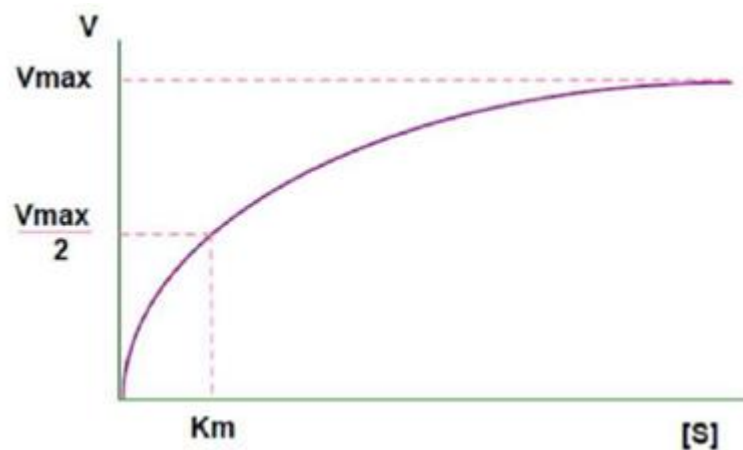


Figure 3. Représentation graphique de Michaelis-Menten.

$V = V_{max} [S] / k_m + [S]$. C'est l'équation de Michaelis-Menten

$$K_m = [E] [S] / [ES] = K_2 + K_3 / K_1$$

K_m (appelée constante de Michaelis-Menten) est la constante de dissociation du complexe $[ES]$. C'est la concentration de substrat qui sature l'enzyme à moitié (exprimée en mole), elle définit l'affinité de l'enzyme pour son substrat : Si K_m est faible, l'affinité de l'enzyme pour le substrat est grande et réciproquement.

V_{max} est la vitesse maximale que peut atteindre la réaction lorsque l'enzyme est saturée de substrat (toutes les enzymes sont occupées).

Pour simplifier la représentation graphique de l'équation de Michaelis-Menten, on transforme l'hyperbole en droite (Figure 4).

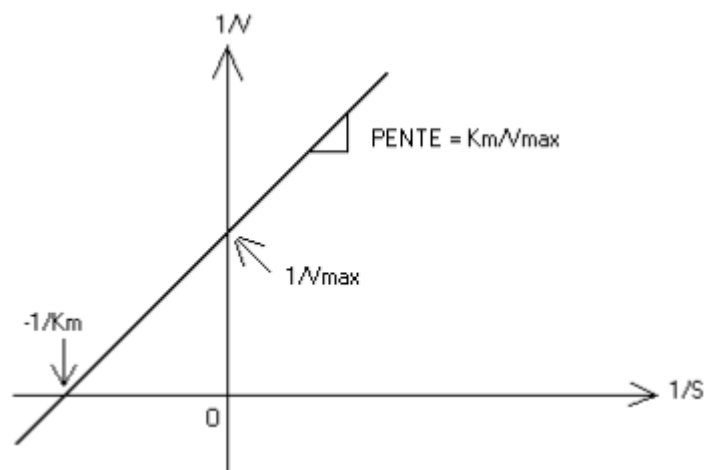


Figure 4. Représentation de Line Weaver et Burke

VI. Inhibition enzymatique

En plus de leur substrat les enzymes sont capables de fixer des substances dont elles ne peuvent catalyser la conversion. Ces substances sont appelées inhibiteurs. Elles ralentissent ou arrêtent l'activité catalytique de l'enzyme.

On distingue différents types d'inhibiteurs:

- **Des inhibiteurs irréversibles** : Ils ne présentent pas d'analogies structurales avec le substrat. Ils se fixent de manière covalente sur la protéine enzymatique, de manière irréversible.

- **Des inhibiteurs réversibles:** Ce sont des substances qui ne réagissent pas de manière covalente avec l'enzyme. Parmi ces inhibiteurs, on distingue trois types d'inhibitions (Figure 5):
- **les inhibiteurs compétitifs :** Un inhibiteur compétitif est une molécule présentant une analogie de structure avec le substrat, il peut donc entrer en compétition avec le substrat pour occuper le site actif de l'enzyme. Ces inhibiteurs ne peuvent pas être transformés par l'enzyme en produit quelconque. L'inhibition peut être levée en présence d'un très large excès de substrat.
 - **Les inhibiteurs non compétitifs :** Ce sont des composés biologiques dont la structure est très différente de celle du substrat. Ils n'agissent pas sur le site actif, en effet, le substrat et l'inhibiteur peuvent se lier simultanément à l'enzyme sans qu'il y ait de compétition entre les deux. Comme pour les autres inhibiteurs, ils ne pourront être transformés en produit quelconque. Un très large excès en substrat ne pourra lever l'inhibition.
 - **les inhibiteurs incompétitifs :** Il y a blocage du complexe E-S. L'inhibiteur se fixe obligatoirement sur le complexe E-S. Ceci suppose que le site de fixation de l'effecteur ne soit pas directement accessible. Mais, dès que le substrat S est fixé, le site de l'inhibiteur est alors démasqué.

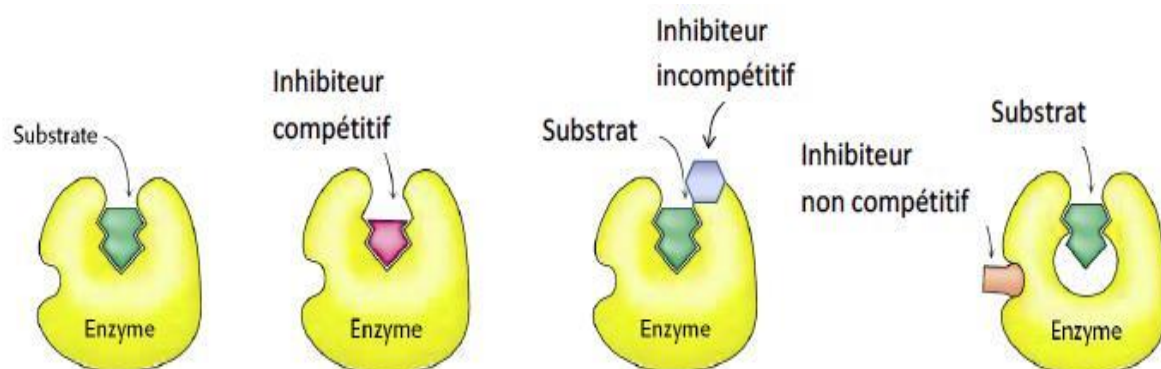
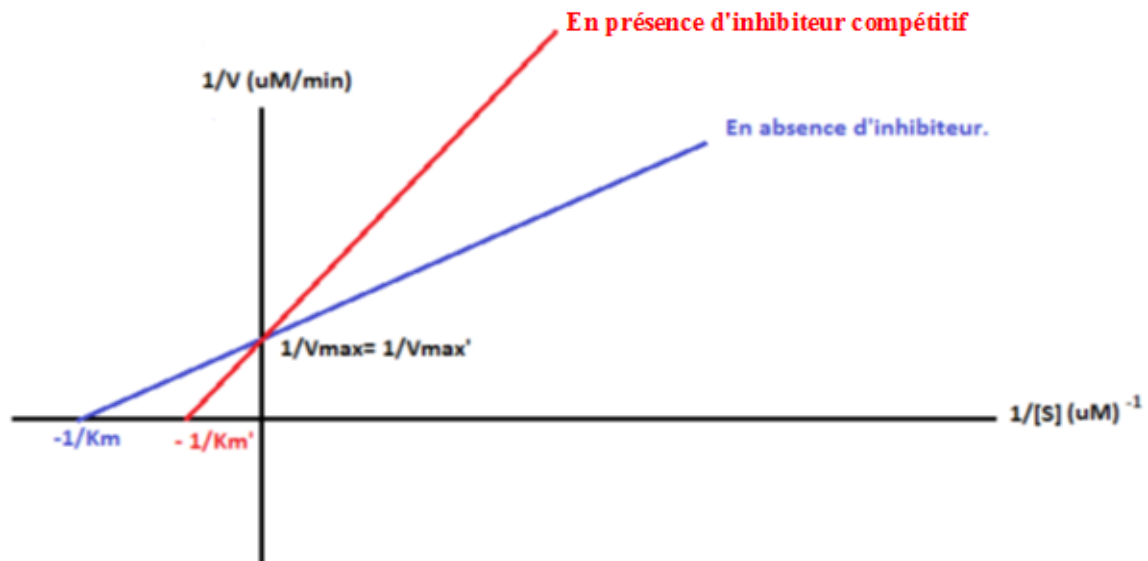
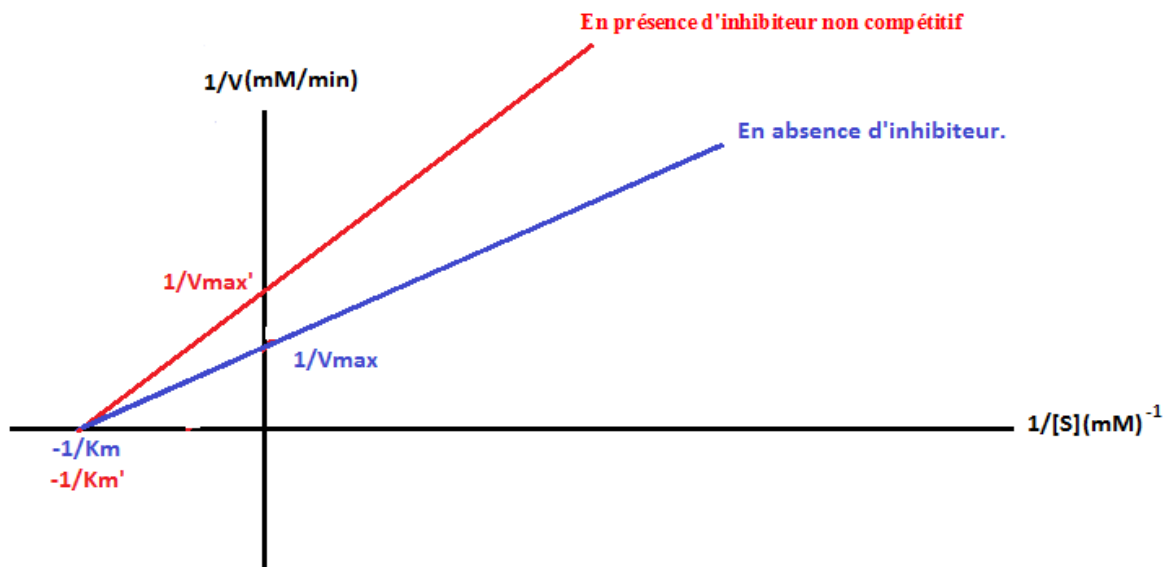


Figure 5. Mode de fixation des inhibiteurs réversibles.



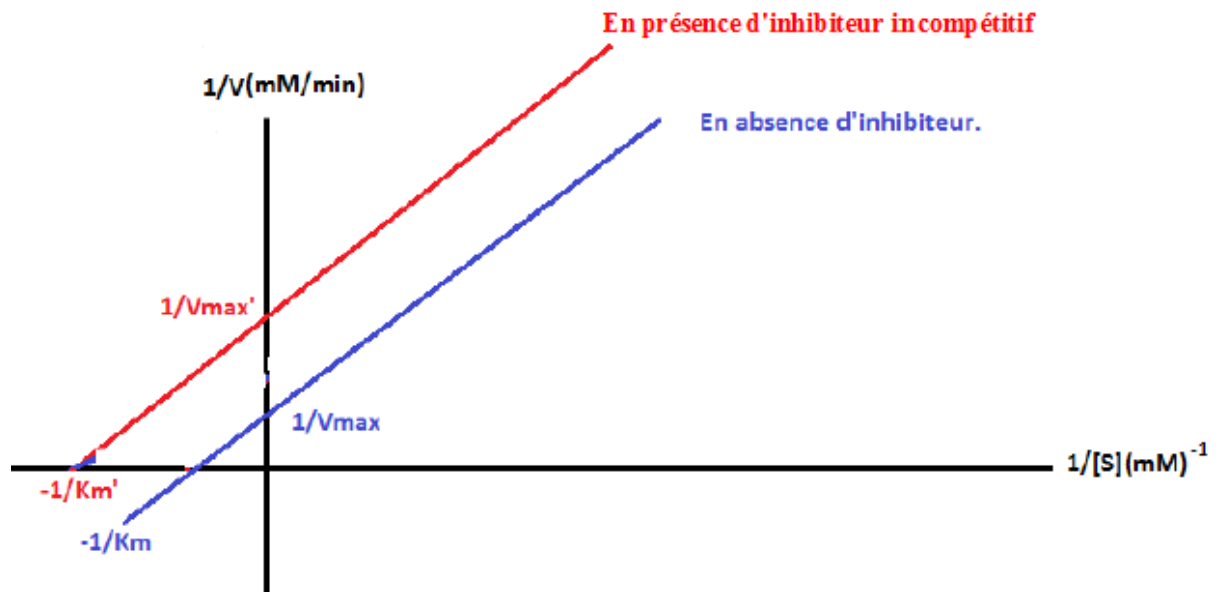
En présence d'une inhibition compétitive :

- K_m augmente ($K_m' > K_m$) donc l'affinité diminue
- $V_{max} = V_{max}'$



En présence d'une inhibition non compétitive :

- V_{max} diminue ($V_{max}' < V_{max}$)
- l'affinité n'est pas modifiée ($K_m' = K_m$)



En présence d'une inhibition incompétitive :

- K_m diminue ($K_m' < K_m$) donc l'affinité augmente.
- $V_{max} < V_{max}'$

VII. Phénomène allostérique

Les enzymes allostériques sont des enzymes dont l'activité catalytique peut être modifiée par la présence d'effecteurs allostériques. Ces enzymes possèdent un site actif responsable de l'activité catalytique de l'enzyme et un ou plusieurs sites régulateurs ou allostériques ou peuvent se fixer des effecteurs allostériques positifs (activateurs : qui augmentent l'affinité de l'enzyme pour le substrat) ou négatifs (inhibiteurs : qui diminuent l'affinité de l'enzyme pour le substrat) n'ayant aucune analogie structurale avec le substrat (Figure 6). Les enzymes allostériques prennent une autre conformation à la suite de la liaison de l'effecteur.

De la même manière que le site catalytique est spécifique du substrat, le site régulateur est spécifique de l'effecteur.

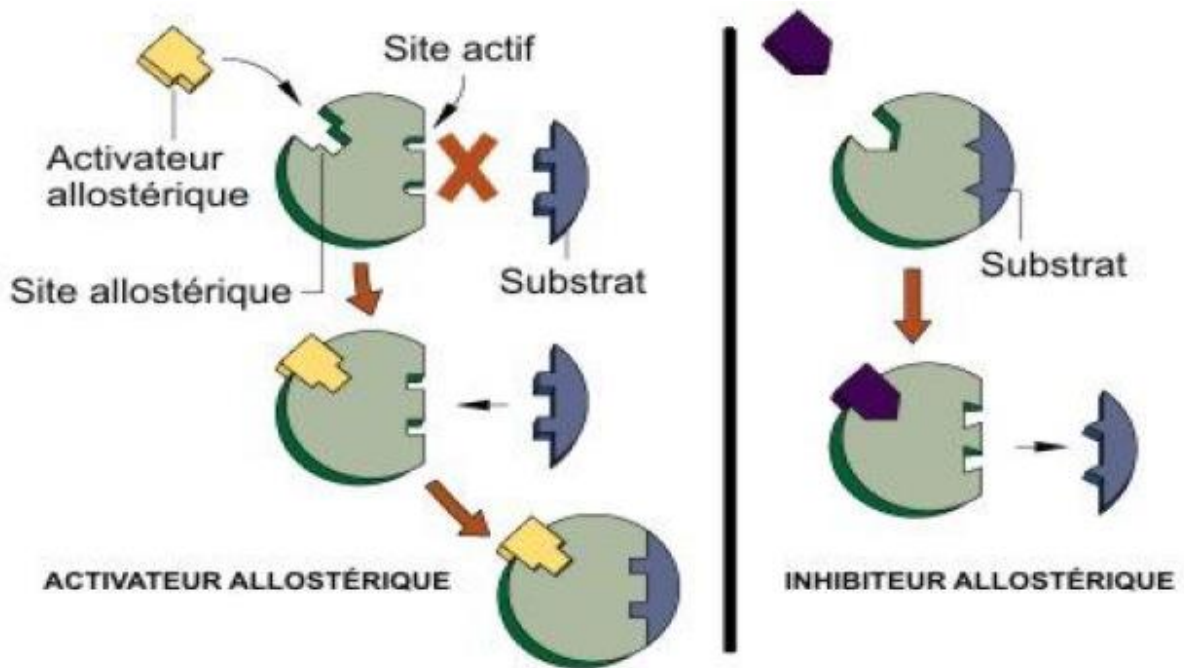


Figure 6. Les effecteurs allostériques [1].