

I. Rappels sur l'enzymologie

I.1. Histoire

La plus ancienne référence connue à l'utilisation commerciale des enzymes provient d'une description du vin. L'utilisation de micro-organismes comme sources d'enzymes pour la fermentation a été répandue parmi les peuples anciens. Les textes anciens contiennent également un certain nombre de références au processus connexe de production de vinaigre, qui est basé sur la conversion enzymatique de l'alcool en acide acétique. Les produits laitiers constituaient une autre source de nourriture importante dans les sociétés anciennes. Au fil du temps, la conversion du lait en fromage est devenue un élément essentiel de production alimentaire, permettant à l'agriculteur d'apporter son produit vers des marchés lointains sous une forme acceptable. Le fromage est préparé en caillant le lait via l'action d'un nombre d'enzymes. Les substances les plus couramment utilisées à cette fin dans les temps anciens étaient *la ficine*, obtenue sous forme d'extrait de figuiers, et *la présure*.

Le premier rapport scientifique sur la découverte d'enzymes a été publié en 1833 par **Anselme Payen** et **Jean-François Persoz**, qui ont rapporté que l'extrait alcoolique de malt qui était capable de transformer l'amidon en sucre par l'enzyme *diastase*. Aujourd'hui, la diastase fait référence à toute α -, β - ou γ -amylase (toutes sont des hydrolases) qui peuvent décomposer les glucides. A l'époque, la levure n'était pas encore considérée comme une cellule vivante

- En 1834, **Schwann** découvrit le suc gastrique qui peut digérer les aliments et son principe actif a été nommé *pepsine*.
- En 1838, **Charles Cagniard de Latour** montra que le processus de fermentation est dû à des organismes vivants.
- En 1850 **Louis Pasteur** a observé que la fermentation du sucre en alcool par la levure est catalysée par des substances appelées « ferments » (appelé plus tard *invertase*).
- En 1876, **W. F. Kühne** a confirmé les observations qui ont été faites par Louis Pasteur et a utilisé le mot « enzyme » (en grec), qui signifie « dans la levure » (en = in ; zyme = levure).
- En 1897, un autre scientifique allemand, **Hans Buchner** a isolé l'enzyme à partir d'un extrait de levure.
- En 1937, **Berzelius** proposa le concept de catalyse et donna d'exemples issus de systèmes biologiques tels que la fermentation du sucre par la levure.
- En 1926, Sumner cristallisa l'uréase.

Au début du 20^e siècle, l'enzymologie s'est développée rapidement (**Figure 1**) et de gros travaux furent entrepris pour purifier des enzymes et surtout décrire leur activité catalytique en termes mathématiques.

Dans les années 1940 et 1950, centaines d'enzymes furent purifiées et cristallisées permettant ainsi l'élucidation de dizaines de voies métaboliques comme la glycolyse et cycle de l'acide tricarboxylique, De nombreux événements biochimiques sont également détectés comme la digestion, la coagulation, la contraction musculaire et la fonction endocrinienne.

Dans les années 1960, La première séquence d'une enzyme (la ribonucléase) fût publiée et la première synthèse chimique de cette enzyme fût obtenue en 1969.

L'utilisation des techniques de l'ADN recombinant ont apporté des nouvelles compréhensions dues au fait que, pour la première fois, il était possible de modifier l'activité catalytique et la spécificité d'un enzyme de façon rationnelle et ceci par l'incorporation des mutations à des positions définies en utilisant la mutagenèse dirigée.

Des recherches exhaustives ont été menées sur les réactions catalysées par des enzymes et les enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire. Actuellement, 2000 enzymes différentes ont été reconnues, chacun catalysant une réaction chimique différente. Actuellement, l'accent est davantage mis sur l'application des enzymes. Le haut rendement d'enzymes leur confère une valeur commerciale et leur spécificité d'action est offrant divers avantages en médecine clinique.

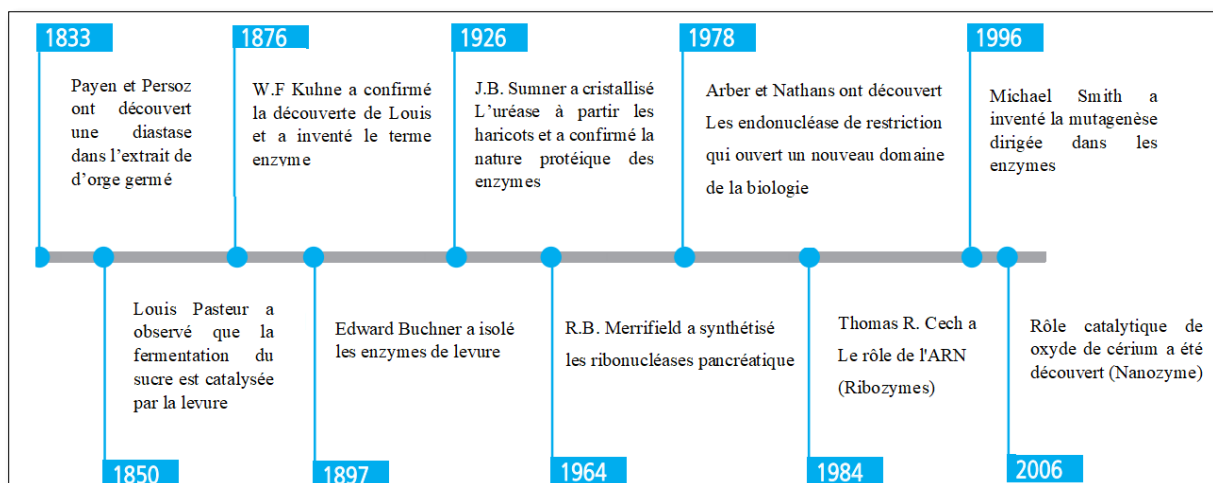


Figure : La chronologie d'enzymologie.

I.2. Définition et distribution

Les enzymes sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa), des protéines ou des ARN (les ARN catalytiques sont plus correctement dénommés ribozymes). Elles sont non toxiques, biodégradables et peuvent être produits en grandes quantités par des micro-organismes pour des applications industrielles qui jouent un rôle central dans le monde vivant. Les enzymes ont des fonctions fondamentales dans divers processus biologiques tel que l'hémostasie, signalisations cellulaire, contractions musculaires, régulation des activités géniques (dont la réparation des ADN), immunité non spécifique, régulation du système rénal et métabolisme énergétique des organismes vivants (dont la voie du métabolisme des nutriments, métabolisme de la digestion, chaîne de la respiration cellulaire). Ils assurent alors la catalyse des réactions biochimiques indispensables au maintien et développement des fonctions vitales. Dans les processus de régulation, ou encore dans certains dysfonctionnements de l'organisme, les enzymes peuvent être inhibés.

I.3. Nomenclature et classification

I.3.1. Classes

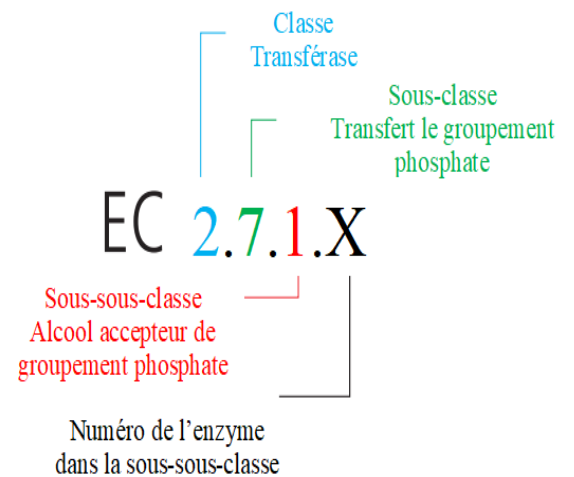
De nombreuses enzymes portent des noms qui donnent peu d'information sur leur action comme la trypsine, la pepsine et la thrombine. Selon la nomenclature fonctionnelle, beaucoup d'autres enzymes sont dénommées par leur substrat(s) et les réactions qu'ils catalysent avec le suffixe « ase ». Les enzymes sont classées dans 6 groupes principaux selon le substrat dont elles assurent la catalyse :

- ✓ **EC1 : oxydoréductases.** Elles catalysent les réactions d'oxydoréduction, le transfert d'électrons et de protons d'un donneur à un accepteur. La plupart de ces enzymes sont des déshydrogénases, d'autres sont des oxydases, des peroxydases, des réductases. Ex : Catalases (EC1.11.1.6).
- ✓ **EC2 : transférases.** Elles catalysent le transfert de groupes fonctionnels entre les substrats. Ex : Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11).
- ✓ **EC3 : hydrolases.** Elles catalysent les hydrolyses et coupures des liaisons C-C, C-O et C-N et autres par de l'eau. Ex : Lipases (EC3.1.1.3).
- ✓ **EC4 : lyases.** Elles catalysent l'addition ou l'enlèvement de groupes à des liaisons doubles. Ex : Isocitrate lyase(EC4.1.3.1).

- ✓ **EC5 : isomérases.** Elles catalysent les isomérisations et le transfert des groupes dans une même molécule en produisant des isomères. Ex : Triose-phosphate isomérases (EC5.3.1.1).
- ✓ **EC6 : Ligases.** Elles catalysent la ligation de deux substrats par des liaisons C-C, C-O, C-N aux dépens de l'hydrolyse de l'ATP. Ex : ADN ligase (EC 6.5.1.1).

I.3.2. Numéro de code

Chaque enzyme est assignée par un code à quatre chiffres, par la Commission des Enzymes, ou EC de l'Union Internationale de Biochimie Moléculaire (I U B). Les chiffres sont séparés par des points. Nom de l'enzyme (EC W.X.Y.Z).



- ✚ Le premier chiffre représente la classe. Comme il existe sept classes d'enzymes, ce premier chiffre sera compris entre 1 et 6.
- ✚ Le deuxième chiffre représente la sous-classe. La sous-classe contient généralement des informations sur le type de composé ou groupe impliqué, pour chaque classe, la définition de la sous-classe peut être différente.
- ✚ Le troisième chiffre représente une sous-sous-classe, ce qui explique davantage les différences dans les réactions.
- ✚ Le quatrième chiffre indique le numéro d'ordre de l'enzyme dans la sous sous classe.

I.3.2. Nom systématique et nom commun recommandé.

Le nom systématique précise la nature du donneur, la nature de l'accepteur et le type de réaction catalysée avec le suffixe -ase. Le nom commun recommandé est l'appellation consacrée par l'usage général, désigné souvent sous forme d'abréviation. Le tableau 1 répertorie certains des noms communs et noms systématiques de certaines enzymes

Exemple : EC 2.7.1.X

2 : Transférase

7 : le groupement transféré contient du phosphore

1 : le groupement accepteur a une réactivité alcool

Donc c'est la famille des Phosphotransférases avec un groupe alcool comme accepteur

X : c'est le numéro de l'enzyme dans cette famille

Quand X = 1 = la hexokinase (EC 2.7.1.1)

Réaction : ATP + D-hexose \longrightarrow ADP + D-hexose 6-phosphate

Nom systématique : ATP : D -hexose 6-phosphotransférase

Nom commun recommandé : hexokinase (HK)

Tableau 1 : Exemples de noms recommandés et noms systématiques

Nom commun	Nom systématique	Réaction
Alcool déshydrogénase	Alcool: NAD ⁺ oxidoréductase	Oxidation des alcools
Méthyltransférase	Donneur : Accepteur méthyltransférase	Transfer de groupement méthyl
Uréase	Urée : Amidohydrolase	Hydrolyse d'urée
Hexokinase	ATP:D-hexose 6-phosphotransférase	Phosphorylation d'hexose
Pyruvate Kinase	ATP: pyruvate 2-O-phosphotransferase	Formation de pyruvate à partir de Phosphoénolpyruvate
Cytochrome oxidase	Ubiquinol:oxygène oxidoréductase	Phosphorylation oxidative

I.3.3. Numéros EC partiels

Les numéros EC partiels sont des numéros EC incomplets avec un numéro de série incertain. Parfois, les sous-classes peuvent avoir la valeur 99, qui représente un groupe d'enzymes pour lequel une catégorie spécifique n'est pas été élucidée ou ne rentre pas dans les catégories existantes. Par exemple. EC 4,99 représente d'autres lyases et EC 5,99 représente d'autres isoméras.

I.4. Nature et structure

L'enzyme est une protéine qui est simplement un polypeptide composé d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Il est nécessaire de connaître les propriétés des acides aminés et comment les acides aminés sont liés entre eux pour comprendre le fonctionnement d'une enzyme, y compris ses propriétés fonctionnelles. La relation entre leurs structures et leurs fonctions est un objectif fondamental en biologie moléculaire et cellulaire.

Les enzymes sont essentiellement composés de deux parties (**Figure 1**) : la partie protéique appelée apoenzyme, et la partie non protéique connue sous le nom de cofacteur qui peut-être un ion métallique, coenzyme ou groupe prosthétic. L'ensemble, donnent naissance à l'enzyme fonctionnelle complète, appelée holoenzyme. Les coenzymes peuvent être liés aux vitamines, comme le coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) qui est vital pour le

métabolisme énergétique. Certaines enzymes nécessitent des ions métalliques comme cofacteurs. Les cations Mg^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} étant les plus courants ; on les appelle souvent activateurs enzymatiques. Selon les rapports, les coenzymes et les ions métalliques sont stables sous l'effet de la chaleur, tandis que la partie protéique d'une enzyme (l'apoenzyme), est dénaturée par la chaleur.

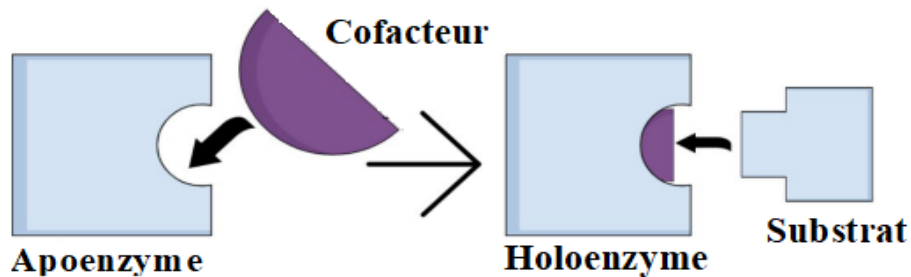


Figure 2 : Schéma présente l'apoenzyme et l'holoenzyme.

I.5. Caractéristiques

I.5.1. Spécificité

Le processus de catalyse résulte de sa spécificité considérée comme une des principales caractéristiques des enzymes.

I.5.1.1. Spécificité du substrat

Pour agir, les enzymes doivent d'abord se lier aux molécules qui interviennent dans les réactions chimiques à catalyser : ces molécules sont des *substrats enzymatiques*. Certaines enzymes sont spécifiques aux substrats et elles ne peuvent pas agir sur des substrats différents (Spécificité étroite). Exemple : l'amylase salivaire n'hydrolyse que l'amidon en maltose.

D'autres peuvent admettre des substrats de différentes structures (Spécificité de groupe). Exemple l'hexokinase qui hydrolyse différents hexoses tel que le glucose, fructose et galactose.

I.5.1.1. Spécificité d'action

Une enzyme ne catalyse, pour un substrat donné, qu'un seul type de réaction. Un acide aminé on pourra avoir soit une transamination, une décarboxylation, une oxydation.

I.5.2. Stéréospécificité

Les enzymes forment des sites asymétriques et se distinguent par des isomères optiques (L-D) ou des isomères Z et E (cis-trans). Un substrat qui n'a pas la chiralité correcte ne pourra pas se fixer à un site de liaison enzymatique pour pratiquement la même raison que la main droite qui ne peut pas se glisser dans un gant gauche.

Exemple : La trypsine (enzyme de la digestion) n'hydrolyse que des substrats formés d'aminoacides de configuration absolue L.

I.5.3. Sites actifs

La liaison de l'enzyme sur un substrat enzymatique fait intervenir un site de liaison appelé site actif. Le site actif est relativement réduit par rapport au volume de l'enzyme en général. Il s'agit d'une fente ou cavité où l'eau est généralement exclue. Le site actif ou catalytique d'une enzyme est constitué de plusieurs acides aminés, situés à une certaine distance les uns des autres dans la chaîne peptidique. Ces acides aminés sont rapprochés par le repliement résultant des phénomènes secondaires et tertiaire des enzymes.

L'interaction entre un site actif et son substrat est très spécifique en raison des interactions moléculaires temporaires et faibles qui se produisent entre les substrats et les acides aminés du site actif. Des interactions faibles covalentes sont formées de types : Van der Waals ; électrostatiques ; ponts hydrogènes.

Pour permettre cette interaction il faut :

- ✚ Une configuration géométrique qui permet le site de liaison, situé à la surface de l'enzyme de se compléter avec le substrat, dont la forme est complémentaire à celle-ci (complémentarité géométrique).
- ✚ Les résidus d'acides aminés qui constituent le site de liaison sont disposés afin d'interagir spécifiquement avec le substrat pour l'attirer c'est à dire une distribution de charges électriques (ions, électrons, polarité...) compatibles (complémentarité électronique)

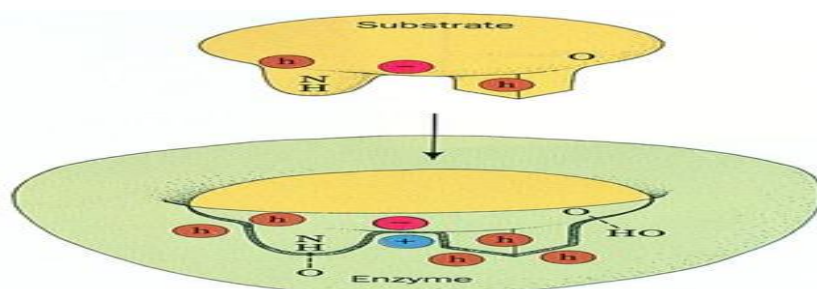


Figure 3 : Complémentarité géométrique et électronique de site de liaison.

I.5.4. Propriétés catalytiques

Les enzymes agissent toujours comme des biocatalyseurs et de petites quantités par rapport à leur substrat. Elles augmentent considérablement la vitesse des réactions chimiques, dans lesquelles les enzymes eux-mêmes ne subissent aucun changement global.

I.5.5. Configuration structurelle

Les enzymes sont des *molécules organiques* d'origine *protéique*. Les protéines des enzymes sont *globulaires* (sphéroprotéines). Les configurations structurelles des enzymes sont de manière tertiaire ou quaternaire. Leurs séquences en acides aminés déterminent leurs propriétés catalytiques comme biocatalyseurs. Le pliage (feuillet β , hélice α) de la structure primaire est appelé structure secondaire, alors que le repliement des chaînes polypeptidiques forment la structure tertiaire tridimensionnelle. Contrairement à ces structures la structure quaternaire est l'association de plusieurs sous unités par des liaisons non covalentes (hydrogène, ionique, hydrophobe).

I.6. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de l'enzyme repose sur la nature de l'enzyme, et les interactions avec le substrat, qui explique la spécificité de la réaction des catalyseurs. Le mécanisme d'action repose également sur une réaction chimique dans laquelle l'enzyme se lie au substrat et forme finalement un complexe enzyme-substrat (ES). Dans ce complexe ES, le substrat forme des liaisons avec les résidus d'acides aminés du site actif en renforçant toutes leurs interactions. La liaison induit ainsi une réaction conformationnelle dans le site actif et l'enzyme forme un état de transition. Cela aide l'enzyme à catalyser la réaction et le complexe E-S alors devient le complexe enzyme-produit (EP). Comme les produits de la réaction se dissocient, l'enzyme revient à son état d'origine. L'enzyme est maintenant disponible pour catalyser un autre cycle de réaction (**Figure 5**).

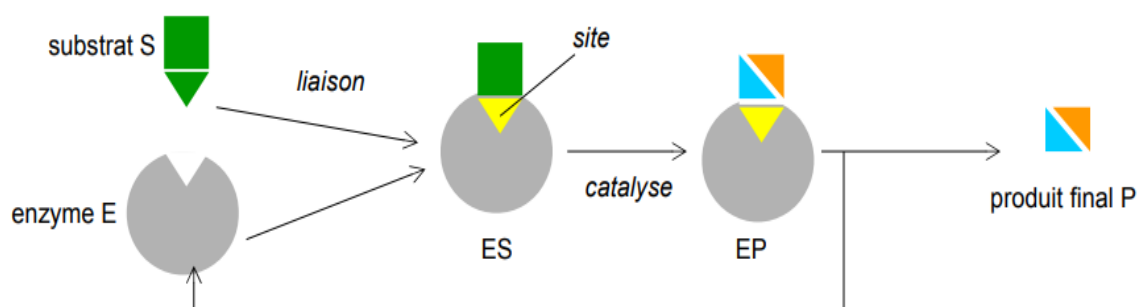


Figure 4 : Mécanisme d'action d'une enzyme.

Deux différents modèles du mécanisme d'action enzymatique sont présentés ci-dessous qui sont à retenir :

- ✚ Le modèle de la clé « le substrat » et de sa serrure « l'enzyme ».
- ✚ Le modèle de l'adaptation induite.

I.6.1. Modèle de la serrure la clé

Il s'agit d'un modèle rigide du site catalytique, proposé par Emil Fischer en 1894. Le modèle explique l'interaction entre un substrat et une enzyme. Dans ce modèle, le substrat s'adapte comme une clé s'insère dans une serrure.

I.6.2 Modèle d'adaptation induite

En 1963, Koshland a suggéré un modèle d'ajustement induit. Une caractéristique importante de cette procédure est la flexibilité du site actif. Dans ce modèle, le substrat induit un changement de conformation dans le site actif d'enzyme de sorte que le substrat s'insère dans le site actif pour favoriser la réaction chimique.

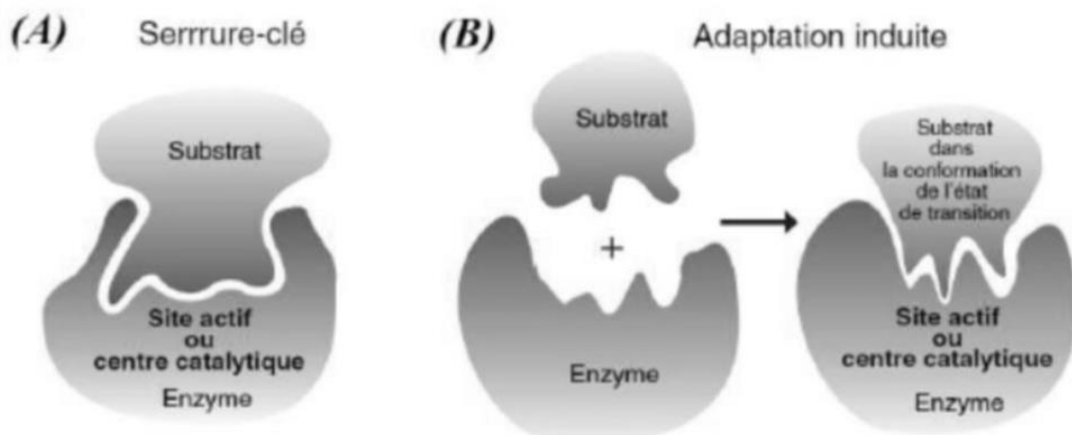


Figure 5 : Serrure-clé (A) et adaptation induite (B).