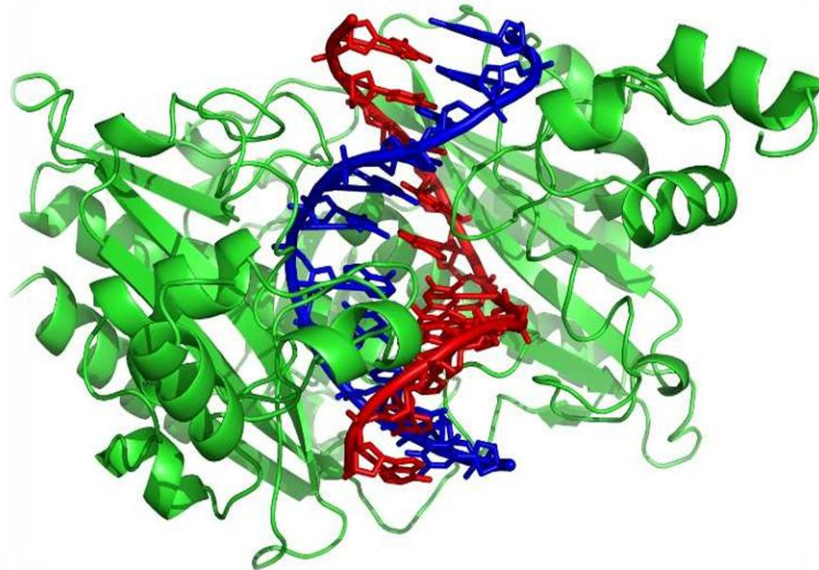




Université de RELIZANE
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département: Sciences biologiques



Généralités sur l'enzymologie approfondie



Dr Berzou

Année universitaire : 2022/2023

I- Généralités

II. Structure et propriétés des enzymes

III. Interactions protéines-ligands

IV. Cinétique Enzymatique

**V. Fonctionnement et régulation des enzymes
allostériques**

VI. Mécanisme de la catalyse.

VII. Isolement et purification des enzymes

VIII. Génie enzymatique

VIII.1 .Méthodes d'immobilisation des enzymes

VIII.2.Applications des enzymes en biotechnologie

I. Introduction

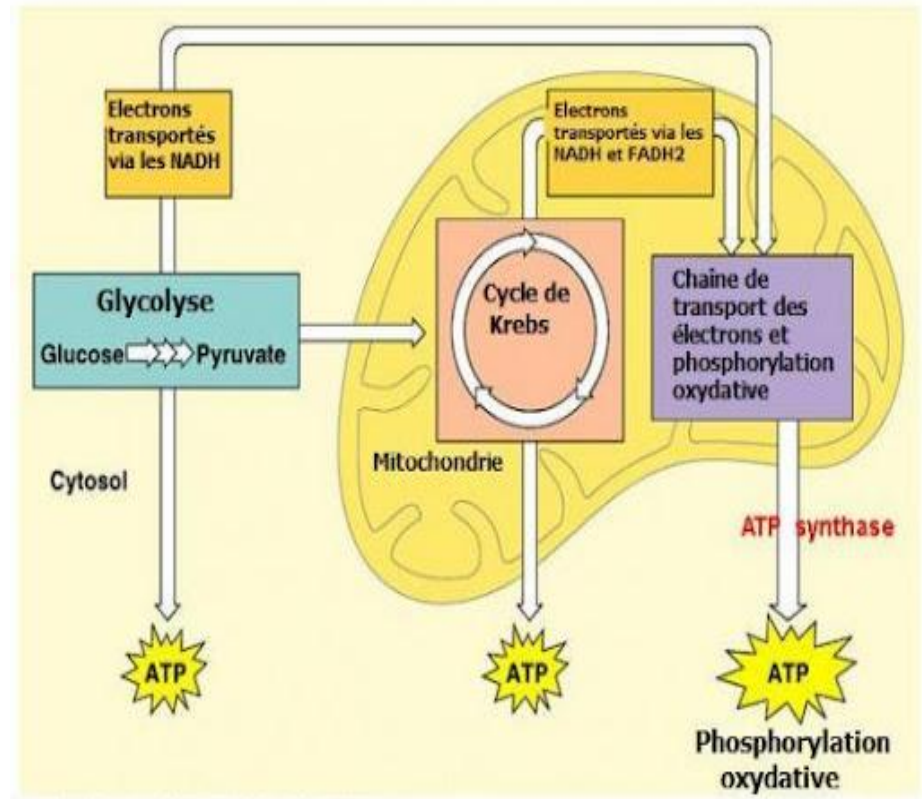
❖ Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques très diverses. Toutes les réactions métaboliques sont catalytiques par les enzymes ou biocatalyseurs ou protéines catalytiques.

❖ En fait, toutes les réactions qui concourent aux performances et au développement des êtres vivants sont déclenchées et régulées par un (ou une) enzyme.

Exp:

➤ La glycolyse transforme le glucose en deux acides pyruviques et permet la fabrication de 2 ATP.

➤ Pour rappel, la glycolyse a lieu à l'extérieur de la mitochondrie, dans le cytosol (matrice du cytoplasme).



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig.1 Glycolyse

1-Définition

➤ Les enzymes sont **des protéines** qui jouent le rôle de **catalyseur** en ce sens qu'elles font **évoluer plus rapidement** la réaction vers son point d'équilibre sans toutefois modifier la position de ce dernier.

Exp : L'hexokinase

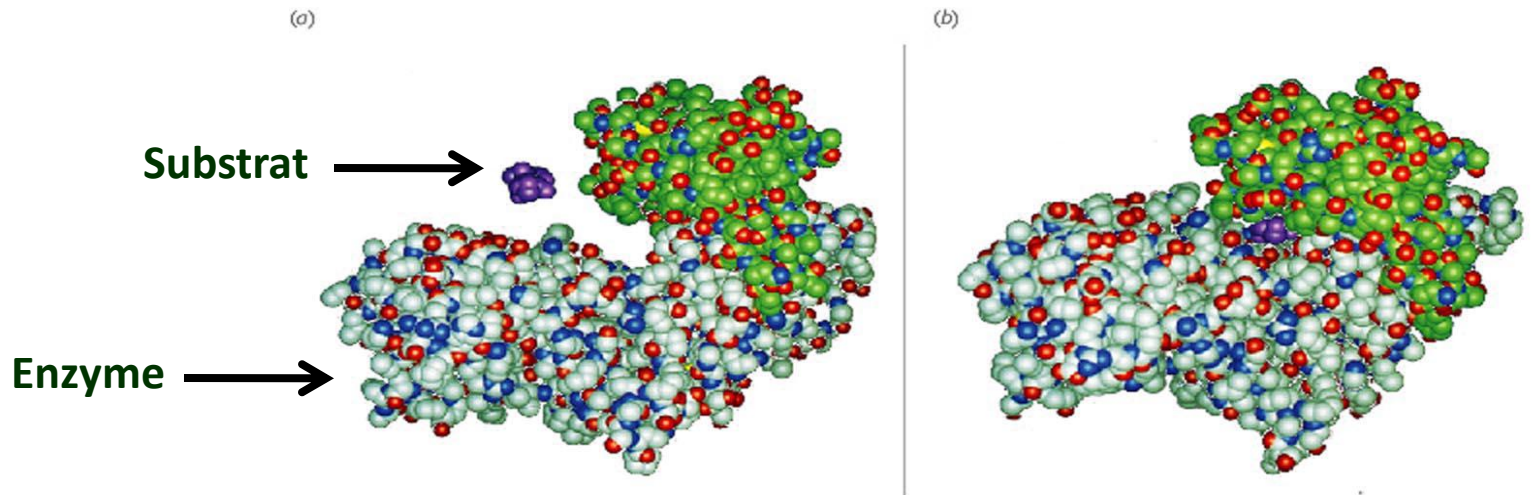
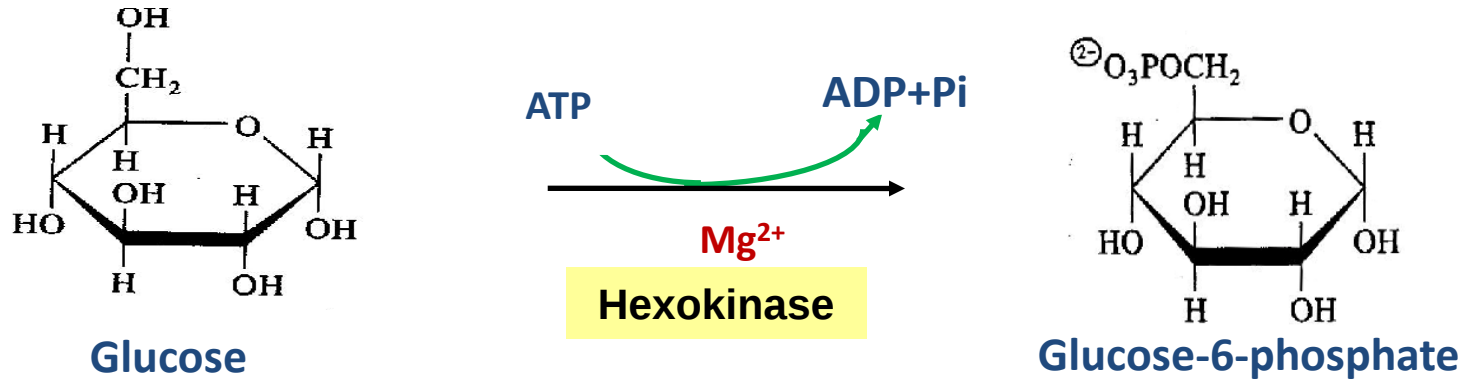


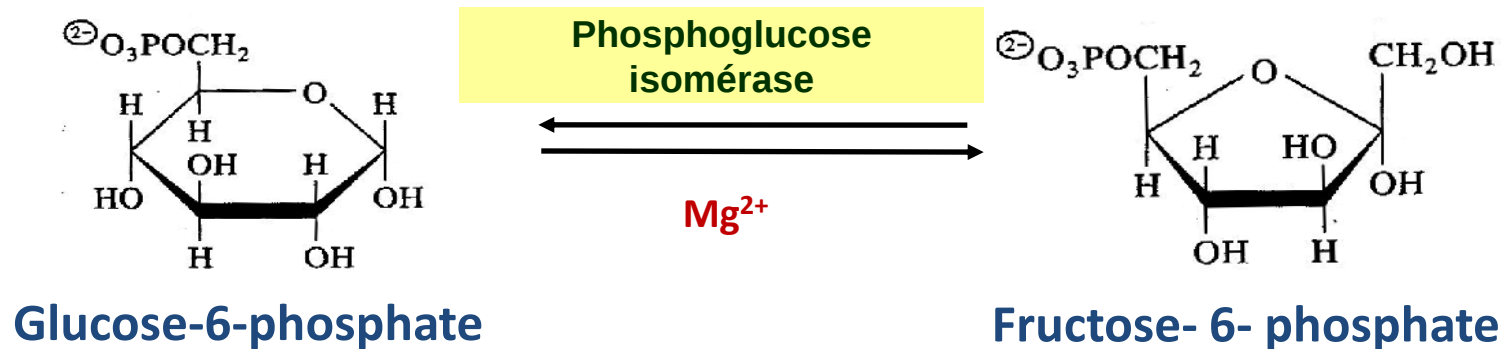
Fig.2 Réaction enzymatique

➤ Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui accélèrent les réactions métaboliques d'un organisme vivant.

➤ Ils interviennent dans diverses réactions de dégradation, ou de synthèse



Exp : **Isomérase**s



2. Répartition des enzymes

❖ Les enzymes sont réparties sur des différents organites cellulaires et peuvent, ainsi, être qualifiées comme des "enzymes marqueurs". On cite comme exemples :

➤ Exp : La cytochrome C oxydase dans la membrane interne mitochondriale.

➤ La lactate déshydrogénase dans la fraction cytoplasmique soluble.

❖ Selon leur localisation in vivo, les enzymes peuvent être groupées en :

➤ Enzymes extracellulaires (ou exoenzymes) qui sont sécrétés par une cellule et qui fonctionnent en dehors de celle-ci, dans le milieu extracellulaire. Exp. Amylase (glande salivaire et pancréatique), agit dans le catabolisme des glucides.

➤ Enzymes intracellulaires : 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 (pepsine, est une enzyme du suc gastrique elle hydrolyse les protéines).

3. Intérêt et rôle des enzymes

- L'étude des enzymes a une très grande importance pratique. Elle conduit à la compréhension de nombreuses maladies telles que les maladies génétiques.... ,voire **une absence totale** d'un ou de plusieurs enzymes. De plus, **dans certaines pathologies**.
- **La mesure de l'activité de certaines enzymes** tissulaires ou plasmatiques est un élément important du **diagnostic** et/ou **du pronostic**.
- Le mécanisme d'action de nombre de **médicaments** peut être compris en termes moléculaires lorsqu'il fait intervenir une interaction entre ces derniers et des **systèmes enzymatiques spécifiques**.
- Enfin, les enzymes **sont de puissants outils** dans **l'agriculture**, **l'industrie alimentaire** et même dans certaines **industries chimiques**.

4- Propriétés et caractéristiques des enzymes

1-Elles se terminent par le **suffixe ase**. Exp : Hexokinase.
ATPase, Dnase, **pyruvate carboxylase**.

2-Les protéines enzymatiques agissent à **des concentrations très faibles** ou (petites quantité).

3-Elles **augmentent la vitesse** des réactions chimiques, **sans modification du résultat**.

4-A la fin de la réaction, **la structure de l'enzyme se retrouve inchangée**.

5-Chaque enzyme ne catalyse qu'un **seul type de réaction**, par exemple une hydrolyse ou le transfert d'un certain groupe d'atomes.

6-Le composé transformé par l'enzyme et nommé **substrat** et le composé obtenu est appelé **produit**.

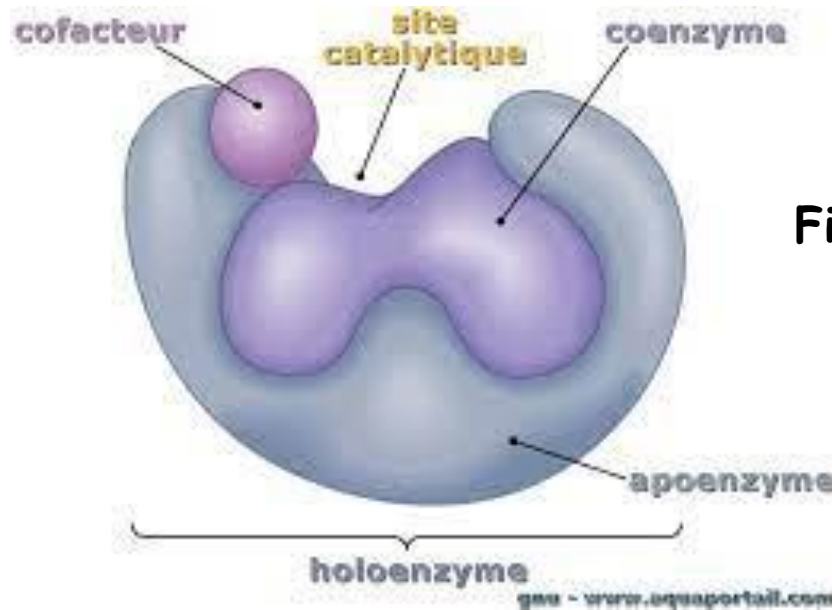


Fig.3 Structure de l'enzymatique

- **Le substrat le "ligand"**: toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement modifiées.
- **Le produit** : c'est la nouvelle molécule qui résulte de cette transformation .

➤ Certaines réactions enzymatiques s'effectue avec présences des coenzymes.

➤ Les coenzymes sont des cofacteurs donc des molécules indispensables à la catalyse enzymatique. Certaines son apporté par l'alimentation (oligoéléments).

➤ Il existe des cofacteurs qui sont des ions métalliques comme Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , cuivre, sélénium et non des molécules organiques comme les coenzymes.

➤ Les coenzymes sont dérivées de vitamines et ils subissent des modifications chimiques lors des réactions enzymatique auxquelles ils participent.

☐ Exemples de coenzymes

➤ La biotine (vitamine H), un cofacteur de carboxylases.

□Exemples de coenzymes

- **La cobalamine** (vitamine B12) : fabriquée par des bactéries, des champignons et des algues, elle est indispensable à la formation des cellules sanguines.
- **La Pyridoxine** (vitamine B6), lie aux enzymes du métabolisme des acides aminés.
- **Le coenzyme A**, dérivé de la vitamine B5 (acide pantothénique). Dans l'organisme, le coenzyme A est souvent associé à un groupement acétyl pour former l'acétyl-coenzyme A ou acétyl-CoA.
- **Le coenzyme Q10 ou ubiquinone** : ce coenzyme joue un rôle important dans la formation d'ATP la mitochondrie (Il existe sous forme de complément alimentaire et un Antioxydant, il est aussi présent dans des crèmes anti-âge).
- **Les coenzymes nicotinamide** NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), deux cofacteurs de réactions d'oxydoréduction.
- **Le FAD (flavine adénine dinucléotide)**, qui dérive de la riboflavine (vitamine B2).

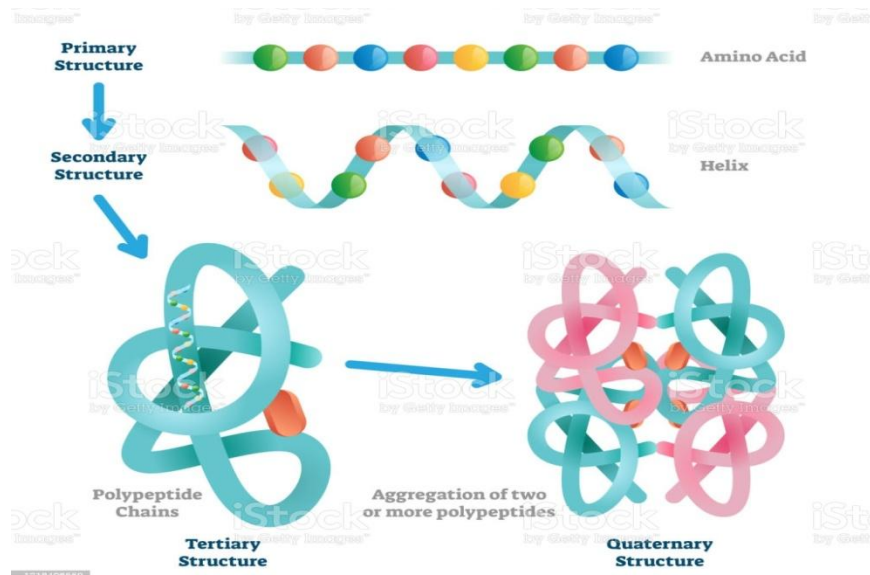
II-Structure et propriétés des enzymes

❑ Les enzymes sont des protéines globulaires, elles adoptent plusieurs degrés d'organisation :

1-Structure primaire : se définit par la séquence en acides aminés.

2-Structure secondaire : La séquence en acides aminés subit des repliements pour former des motifs (hélices α et feuillet β).

3-Structure tertiaire : Former par l'association de plusieurs motifs, donnant une forme spatiale à la protéine.



❖ Cette organisation entraîne une localisation:

- Des acides aminés polaires en surface externe.
- Les acides aminés non polaires vers l'intérieur de la molécule (zone hydrophobe interne).

❖ C'est au niveau de cette zone que se situe le site actif d'une enzyme.

Pour qu'une enzyme soit fonctionnelle, il faut qu'elle adopte une structure tertiaire.

4) Structure quaternaire

- Association de plusieurs chaînes protéiques
 - Une chaîne : monomère
 - Plusieurs chaînes : oligomère

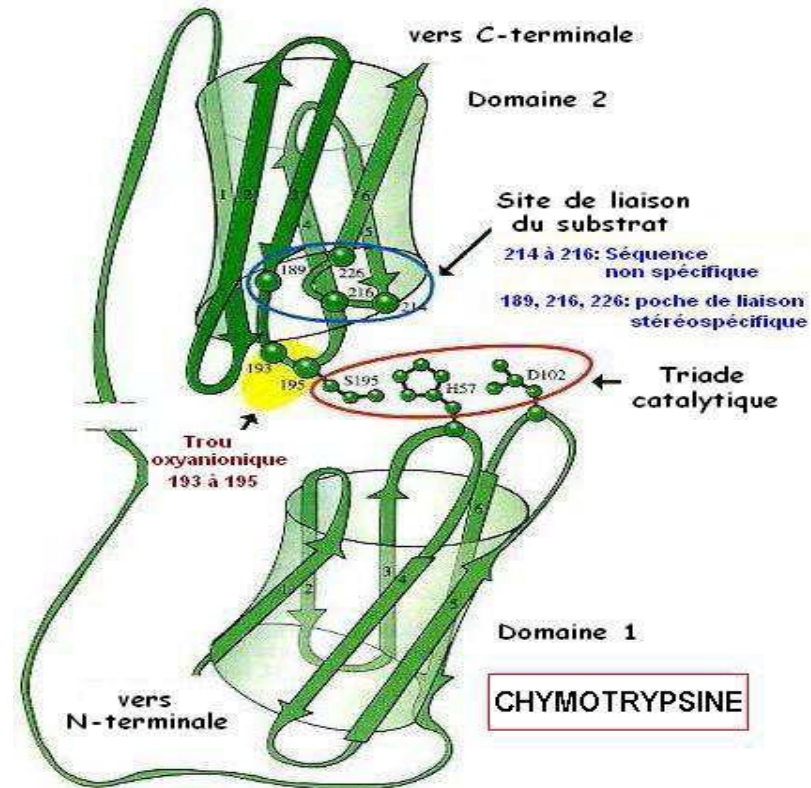
Cette structure est adoptée par les enzymes régulatrices

1- Enzymes monomérique et polymérique

1.1 Enzymes monomérique

❑ Constitue d'une seule chaîne polypeptidique, il s'agit le plus souvent d'enzyme secrétés par la cellule, exemple de ribonucléase pancréatique et de chymotrypsine.

➤ La chymotrypsine est une protéase digestive, fabriquée par le pancréas, qui qui peut accomplir la protéolyse



D'après Weinman, Mehul: Biochimie, Structure et Fonction des Protéines, Dunod 2000

Chymotrypsine

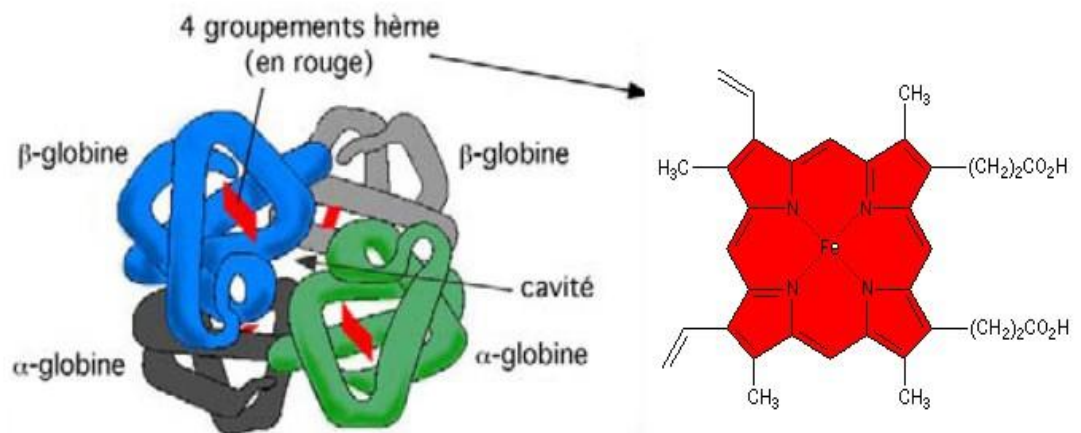
1.2 Enzymes polymérique

➤ Structure polymérique est constituée de plusieurs chaînes polypeptidiques des sous-unités identiques ou différentes, on parle alors de protomères ou monomères formant un oligomère de 2 à 12,

➤ La grande majorité des enzymes oligomériques sont endocellulaire, les enzymes sécrétés par la cellule sont le plus souvent monomérique.

➤ Exemple d'une protéines oligomérique :

Hémoglobine



1.3 Les isoenzymes

❑ Les isoenzymes correspondent à différentes formes d'une même enzyme, catalysant la même réaction, mais dont les propriétés physico-chimiques (charge électrique, taille,...) sont différentes.

❖ Les isoenzymes peuvent être d'origine cytosolique ou plastidique.

➤ Exp : **LDH (1-5) - Lactate-déshydrogénase**

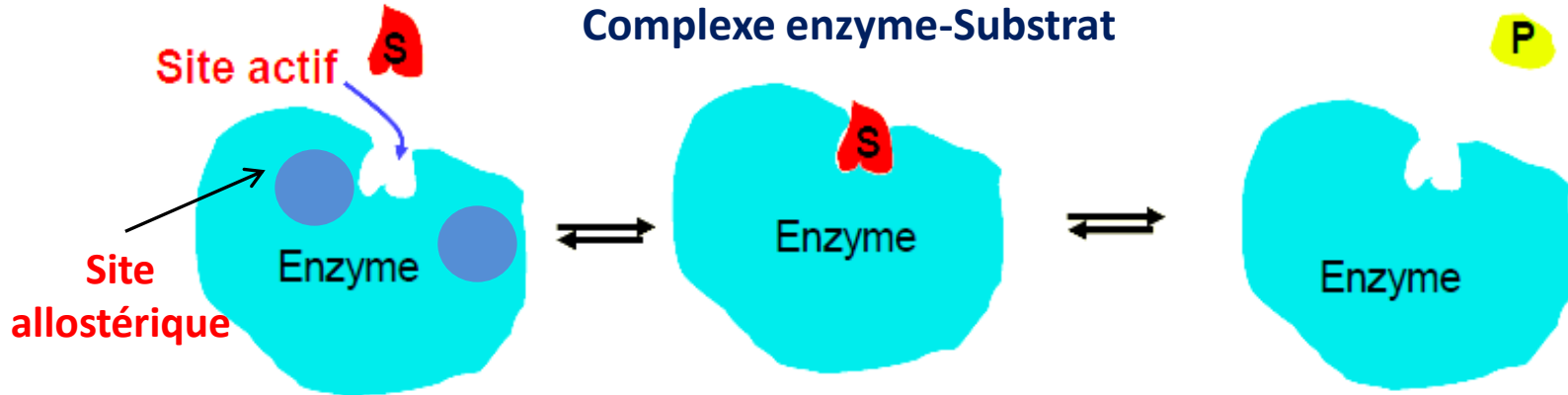
(rein, cœur, muscles, pancréas, rate, foie, cerveau, poumons, peau, globules rouges, placenta...).

1.4 Exemple d'enzyme allostérique

❑ Se sont des enzymes régulatrices de métabolisme, elles font intervenir la liaison réversible non covalent d'un métabolite régulateur appelé *modulateur*.

❑ Comportant en plus du site actif, un ou plusieurs site permettant la fixation de composés effecteurs (inhibiteur ou activateur).

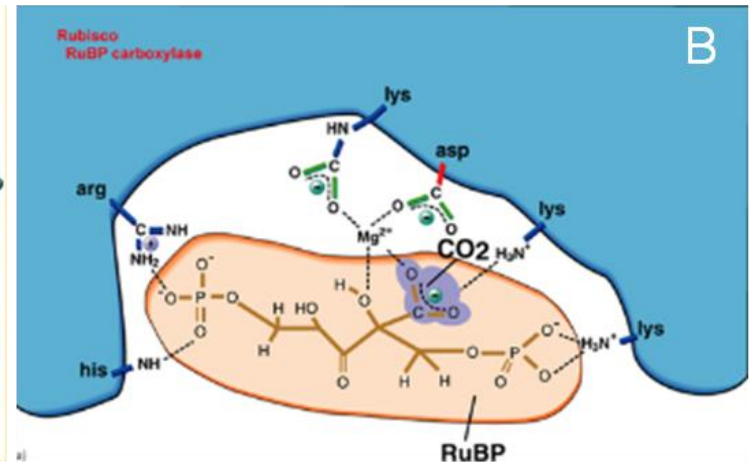
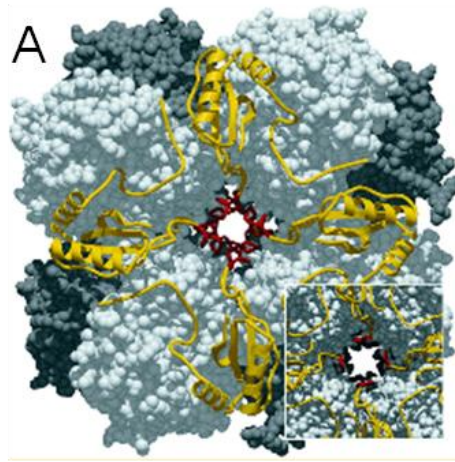
2-Structure et fonctionnement des enzymes



- Le site actif d'un enzyme est schématiquement formé par un petit nombre d'acides aminés organisés en un arrangement tridimensionnel précis formant une poche ou une crevasse dans la protéine.
- **Site actif** : siège de la réaction catalytique et subdivisé en deux sous-sites.
- Située dans la zone hydrophobe de la protéine au niveau de laquelle s'exerce le pouvoir catalytique.
- Ce site doit être complémentaire de point de vue structural au substrat ou à une partie du substrat.

1-Site actif

1.1 Site de fixation



➤ Ce site est constitué d'une séquence d'acides aminés fonctionnels qui établissent des liaisons non covalentes avec le substrat pour le stabiliser.

1.2 Site catalytique

➤ C'est la partie de la protéine qui est responsable de la transformation du substrat en produit.

➤ Site allostérique

Site particulier d'une enzyme où se lie un effecteur allostérique (Modulateur), Ils peuvent être des inhibiteurs ou au contraire des activateur.

1.3-Acides amines du site actif

❑ Quatre groupes d'acides aminés peuvent être distingués dans la constitution du site actif d'une enzyme :

- Acides aminés de "contact"
- Acides aminés "auxiliaires"
- Acides aminés "collaborateurs"
- Acides aminés "non collaborateurs"

1. Acides aminés de "contact" :

Ils sont les composants du site actif, ils sont situés trop près du substrat. Ils assurent la catalyse.

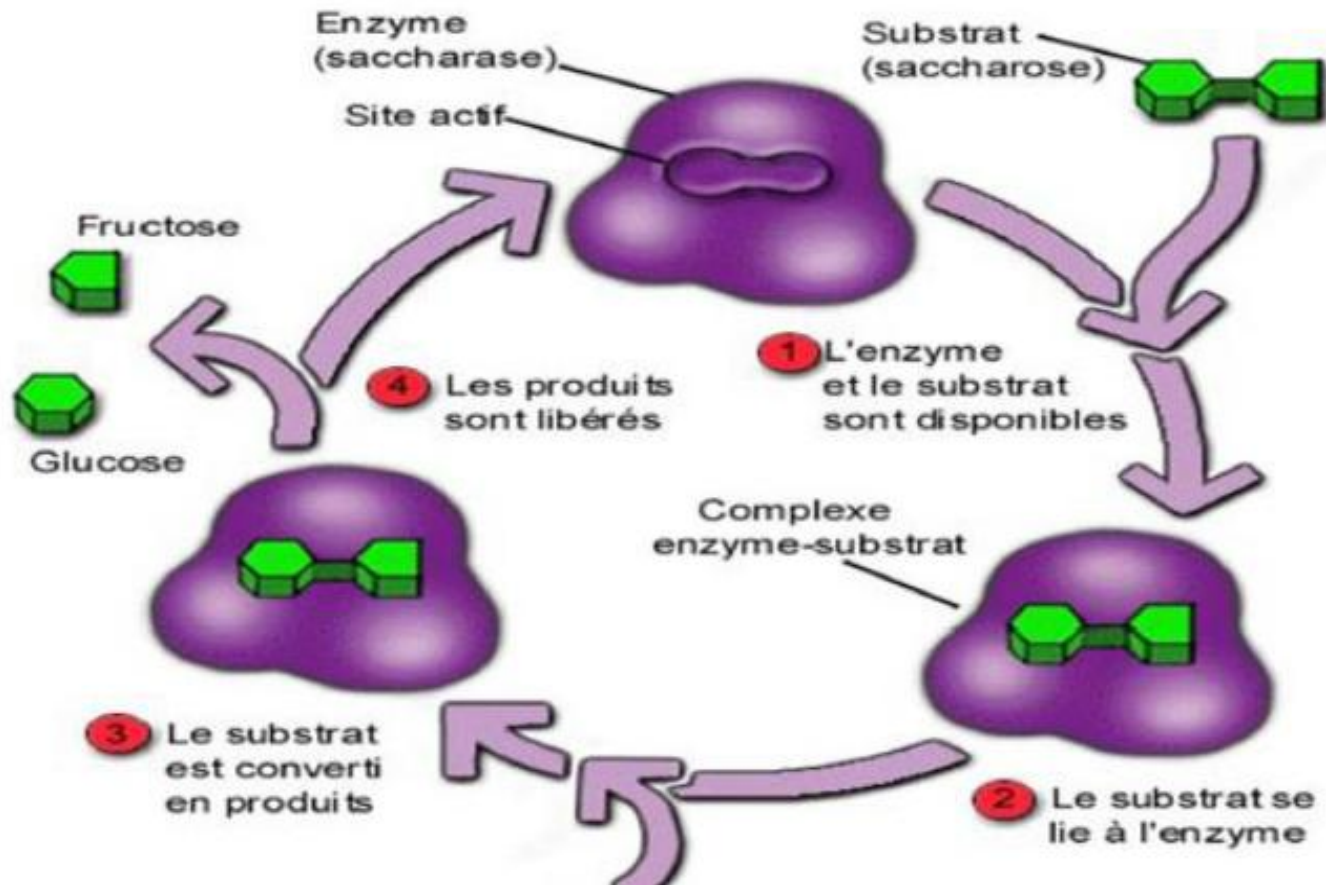
2. Acides aminés "auxiliaires" :

Ils assurent la mobilité des zones situées au voisinage du site actif. Ils assurent également une certaine flexibilité à la chaîne moléculaire.

3. Acides aminés "collaborateurs" : ils servent de support pour les acides aminés fonctionnels. Si on les enlève, l'activité enzymatique demeurera mais elle devient fragile.

4. Acides aminés "non collaborateurs" : leur rôle est inconnu. Si on les enlève, l'activité enzymatique restera inchangée.

Cycle catalytique



II- Classification & Nomenclature des enzymes

❖ **Nomenclature** reconnaît **six classes de réactions**, les classes contiennent **des sous-classes**, elles mêmes subdivisées en sous-sous-classes qui regroupent les enzymes ayant des propriétés communes.

❖ Chacun des enzymes sont **numérotés**, de sorte qu'une série **de 4 nombres spécifie (3.4.17.1)** très précisément un enzyme; à cette série de nombres s'ajoute un nom systématique qui décrit la réaction.

❖ Les enzymes sont répartis selon le type de réaction qu'ils catalysent.

1. Nomenclature officiel des enzyme

- ❖ La nomenclature officiel des enzymes, a été établie par la **commission des enzymes (EC)**, un organisme tributaire de l'union Internationale de Biochimie et de Biochimie Moléculaire (INBMB).
- ❖ Cette nomenclature officiel nous permet d'avoir une référence unique à l'échelle mondiale pour la désignation des enzymes.
- ❖ La Commission des enzymes (Enzyme Commission) a établi une classification qui attribue à chaque enzyme un nombre à quatre chiffres :

❖ **Les quatre chiffres de la nomenclature EC** des enzymes désignent chacun une caractéristique de l'enzyme qui permet de l'identifier en fonction du type de réaction catalysée:

➤ **E.C.a.b.c.d** a, b, c et d sont des chiffres

Exp : Acétylcholinestérase, **EC 3.1.1.7**

E.C : *Commission des Enzymes*

a : Le premier chiffre (A): La classe; **indique la réaction catalysée (1-6).**

b : Le second (B): La sous-classe; **indique le substrat général (ou groupe de substrats) impliqué.**

c : Le troisième (C): La sous sous-classe, **indique le substrat spécifique ou la coenzyme.**

d : Le numéro de série de l'enzyme.

2. Classification des enzymes

❖ Les enzymes sont répartis en six classes selon le type de réaction qu'ils catalysent, elles-mêmes subdivisées en sous-classes permettant de mieux définir la fonction de chaque enzyme :

1- **Oxydoréductase (EC 1)** : Réaction oxydation – réduction.

2- **Transférase (EC 2)** : Transfère des groupements fonctionnels.

3- **Hydrolase (EC 3)** : Réactions hydrolytiques; catalysent la coupure de liaisons avec consommation de H_2O .

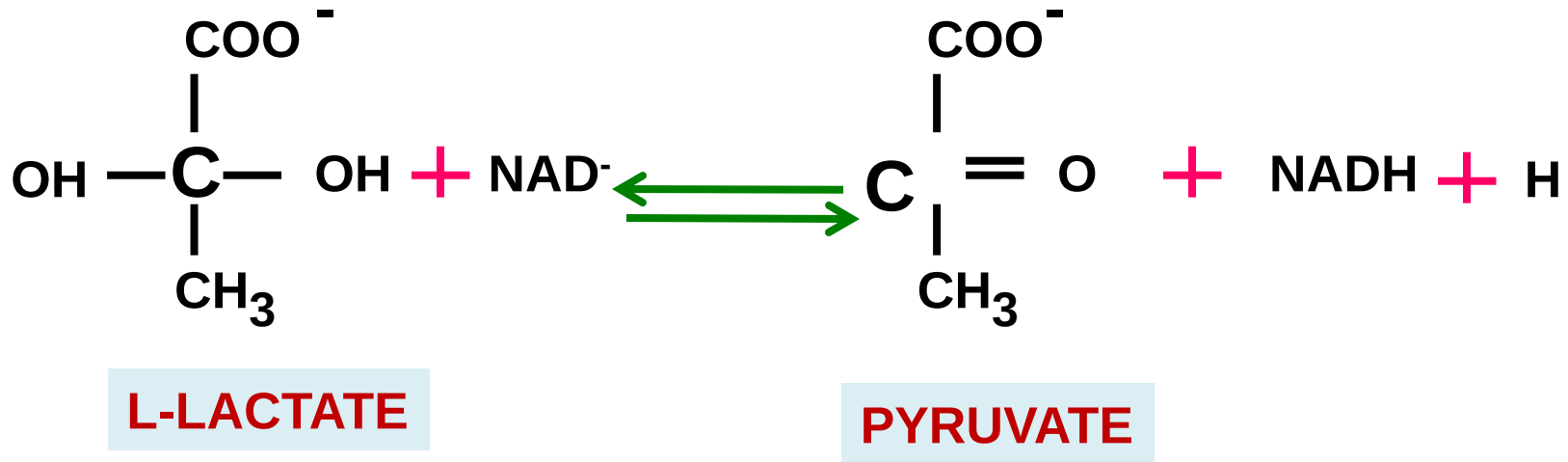
4- **–Lyase (EC 4)** : Réaction d'élimination pour former des liaisons doubles sans consommation de H_2O .

5- **Isomérase (EC 5)** : catalysent les réactions d'isomérisation dans une molécule.

6- **Ligase (EC 6)** : Union de molécules couplée avec l'utilisation de nucléotides tri-phosphoré (ATP).

1 - Oxydoréductase (EC 1)

- Catalysent le transfert d'électrons, atome d'hydrogène, ou fixation d'oxygène et vont avoir comme substrat l'oxydant et le réducteur. Exp : **Lactate déshydrogénase LDH**



- Elles sont associées à des coenzymes d'oxydoréduction : NAD^+ , FAD, FMN, etc.
- Plusieurs de ces enzymes sont connues en tant que :
- Peroxydases
 - Oxygénases
 - Déshydrogénases
 - Oxydases
 - Réductases

2- Les transférases (EC 2)

❖ Transfère d'un groupement carboné, phosphoré, azoté, etc..... d'une molécule à une autre.

- Enzymes transférant **un groupe méthyle** 3
- Enzymes transférant des radicaux a plusieurs carbonés : **aldéhyde, cétone, acyle...etc.**
- Enzymes transférant des molécules **glucidiques**
- Aminotransférases
- **Phosphotransférases**

Exp: Aminotransférases

La **transamination** appelée aussi **aminotransférase** conduit à un **transfert** du groupement α -aminé d'un acide aminé à un cétoacide (l' α -cétooglutarate) pour former l'acide glutamique.



❖ Deux aminotransférases : **Aspartate aminotransférase (ASAT)** et **Alanine aminotransférase (ALAT)** très active dans les tissus des animaux.



3 -Hydrolases EC3

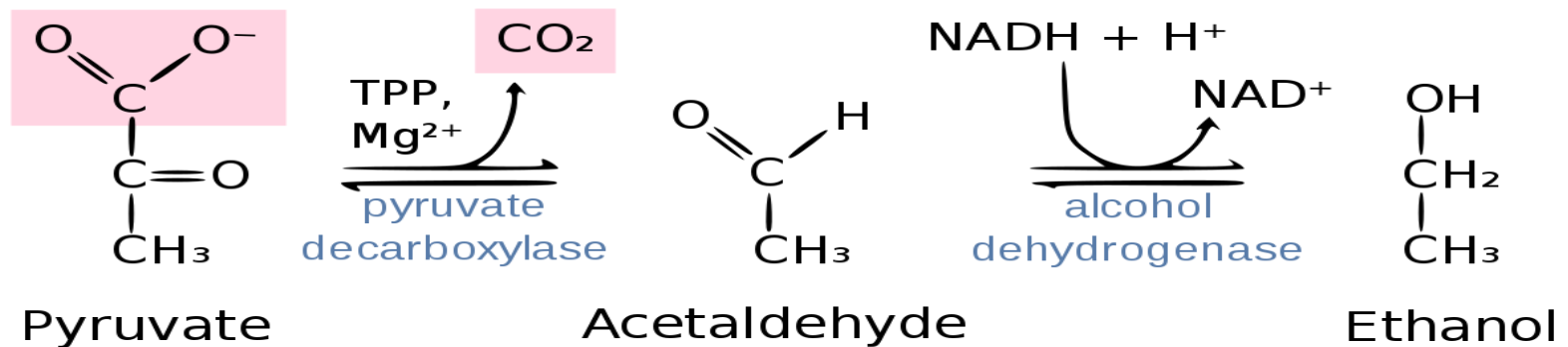
❖ Ce sont des enzymes de dégradation. Elles provoquent une coupure d'une molécule et fixent des radicaux H , OH de l'eau sur les valences libérées. Ce sont des enzymes sans coenzymes.

❖ Elles interviennent sur les fonctions éther, ester, acétals, ester phosphoriques, liaisons O-O peroxydes, C-N amines.

1. Hydrolase des glucides
2. Hydrolase des ester phosphoriques des oses (Glucose-6-P)
3. Hydrolase des lipides
4. Hydrolases des peptides et des lipides

4- Lyases

➤ Une enzyme qui catalyse la rupture de différentes liaisons chimiques par des moyens autres que l'hydrolyse ou l'oxydation, formant ainsi souvent une nouvelle liaison double ou un nouveau cycle.



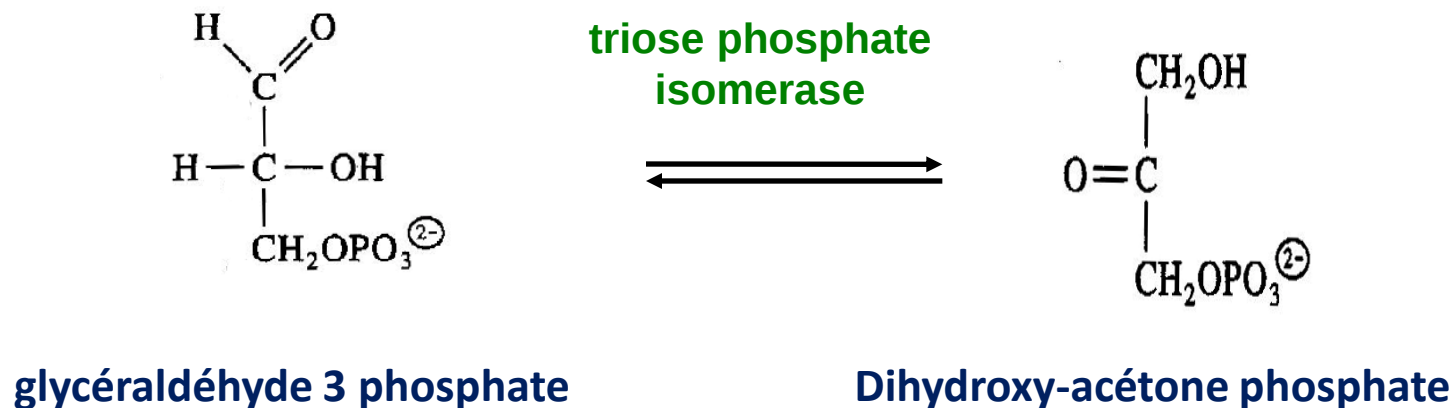
Exemple d'autres type d'enzymes a lyase

- Lyase propromement dites.
- Snythétases.
- Déshydratase.

5– Isomérases EC5

❖ Catalysent des changements de structure dans une même molécule sans changer sa formule globale (épimérase, isomérase, Cis-trans, déplacement de radicaux.....)

➤ **EC5.3.1.1** D-glycéraldéhyde 3-phosphate céto-isomérase =
Triose phosphate-isomérase



6 - Ligases (synthétase) EC 6

❖Création d'une liaison entre deux molécules couplée avec la dégradation d'une liaison avec consommation de l'énergie .

- Ligases formant des liaisons C-O.
- Ligases formant des liaisons C-C
- Ligases formant des liaisons C-S
- Ligases formant des liaisons C-N

EC6.4.1.1 *Pyruvate : dioxyde de carbone ligase (ADP) = pyruvate carboxylique*