

CHAPITRE 7

ENZYMOLOGIE

L'enzymologie est la partie de la biochimie qui étudie les propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes. Elle s'intéresse aussi à décrire la vitesse des réactions catalysées par les enzymes, c'est-à-dire la cinétique enzymatique.

I. LES ENZYMES

Les organismes vivants sont le siège de nombreuses réactions biochimiques. Ces réactions constituent le métabolisme, c'est-à-dire la biosynthèse (anabolisme) et la dégradation (catabolisme) d'un grand nombre de molécules biologiques.

Ces réactions se déroulent dans des conditions physiologiques qui ne pourraient pas avoir lieu sans la présence d'enzymes. Les enzymes ont donc un rôle vital.

1 DÉFINITIONS

Enzyme

Protéine présentant des propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique du métabolisme de l'être vivant qui la produit.

Les protéines enzymatiques sont des catalyseurs, c'est-à-dire qu'en agissant à des concentrations très petites, elles augmentent la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat.

Les enzymes agissent en très faible quantité, ne sont pas consommées au cours de la réaction (c'est-à-dire qu'elles se retrouvent intactes à la fin de la réaction) et ont une spécificité de substrat et de réaction, c'est-à-dire qu'une enzyme transforme un substrat donné grâce à une réaction donnée.

Les protéines enzymatiques sont synthétisées par les êtres vivants, synthèse déterminée génétiquement.

Substrat

Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme.

Produit

Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme. La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation est appelée produit.

Ligand

Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une enzyme. Toutes les molécules ayant une liaison spécifique avec une protéine sont appelées ligand. Pour chaque ligand, il existe au moins un site de fixation sur la protéine qui le reçoit.

Cofacteur

Corps chimique intervenant dans une réaction enzymatique : pour accepter ou compléter un substrat, pour accepter un produit, comme participant à la structure de l'enzyme. Les cofacteurs peuvent être des ions, des petites molécules minérales ou encore l'eau.

Certains cofacteurs sont des molécules plus complexes synthétisées par les cellules : ce sont les coenzymes.

Coenzymes

Molécules biologiques intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction :

- Les **coenzymes libres** interviennent dans la réaction de manière stœchiométrique, c'est-à-dire en même proportion que le substrat ;
- Les **coenzymes liés** interviennent dans la réaction de manière catalytique, leur concentration est alors la même que celle de l'enzyme.

Les coenzymes sont des molécules biologiques, c'est-à-dire que leur synthèse naturelle ne peut être faite que par des cellules vivantes. Lorsque cette synthèse n'est pas inscrite dans le patrimoine génétique d'une espèce, alors tout ou partie de la molécule du coenzyme doit être apporté par l'alimentation : cet aliment indispensable est une vitamine.

2 STRUCTURE DES ENZYMES

Il existe deux grands groupes d'enzymes :

- Les enzymes entièrement protéiques ou enzymes holoprotéiques.
- Les enzymes formées d'une partie protéique, l'apoenzyme, et d'une partie non protéique, le cofacteur. Ces enzymes sont dites hétéroprotéiques.

Les enzymes holoprotéiques

Il s'agit de protéines globulaires pouvant être formées d'une seule chaîne polypeptidique ou de plusieurs chaînes identiques ou différentes.

Ces enzymes possèdent un site actif qui comprend :

- Un site de fixation du substrat ;
- Un site catalytique qui agit sur le substrat pour lui faire subir la réaction chimique.

Les interactions par lesquelles le substrat se fixe à l'enzyme impliquent des interactions de Van der Waals, électrostatiques, hydrophobes et des liaisons hydrogène.

La conformation et la composition chimique du site actif déterminent la spécificité de l'enzyme.

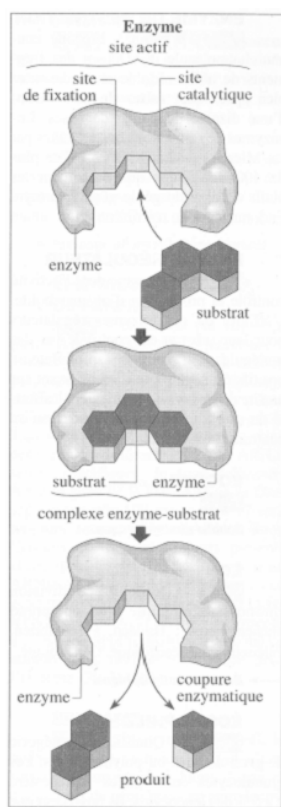


Figure 1: Le site actif

Les enzymes hétéroprotéiques

Il s'agit d'enzymes à cofacteurs qui sont soit de nature inorganique, comme les ions métalliques, soit de nature organique, comme les coenzymes.

La partie protéique ou apoenzyme intervient dans la spécificité au niveau du site de fixation du substrat et le coenzyme correspond au site catalytique. Ainsi, la réaction se produit par fixation du substrat sur l'apoenzyme puis action catalytique du coenzyme. À la différence des enzymes qui sont spécifiques, les coenzymes ne le sont pas et plusieurs enzymes peuvent avoir le même coenzyme.

3 NOMENCLATURE

Depuis 1961, les enzymes sont classées selon le type de réaction catalysée. La nomenclature officielle comporte six classes, elles-mêmes divisées en sous-classes.

Le numéro de code spécifie :

- Le type de réaction (classe) ;
- Le type de fonction du substrat métabolisé (sous-classe) ;
- Le type de l'accepteur ;
- Le numéro d'ordre (dans la sous-classe).

L'ensemble est précédé de EC.

Les six classes

1- EC 1 : oxydoréductases :

Elles catalysent le transfert d'électrons d'un donneur vers un accepteur. Elles nécessitent la présence d'un coenzyme (NAD, NADP, FAD ou FMN).

Exemples :

- **Les hydroxylases** qui catalysent la fixation d'un atome d'oxygène.
- **Les déshydrogénases.**
- **Les cytochromes.**

2- EC2 : transférases :

Elles catalysent le transfert d'un atome ou groupement d'atomes entre deux substrats. Elles nécessitent également un coenzyme.

Exemples :

- **Les transaminases** qui transfèrent les radicaux aminés d'un acide aminé à un acide cétonique accepteur. Le coenzyme est le phosphate de pyridoxal (dérivé de la pyridoxine ou vitamine B6).
- **Les phosphokinasés ou kinases** qui transfèrent un groupement phosphate sur une molécule d'ADP. L'ion magnésium est indispensable.

- **Les transacétylases** qui transfèrent les radicaux acétyles (-CH₂-COOH). Le coenzyme est le coenzyme A.
- **Les transméthylases** qui transfèrent les radicaux méthyles (-CH₃) d'une molécule à une autre. Le coenzyme est l'acide tétrahydrofolique (dérivé de l'acide folique ou vita-mine B9).

3- EC 3 : hydrolases :

Elles catalysent la rupture d'une liaison avec fixation des éléments d'une molécule d'eau.

Exemples :

- **Les estérases** qui hydrolysent les esters en acides gras et alcool.
- **Les lipases** qui hydrolysent les glycérides en glycérol et acides gras.
- **Les osidases** qui hydrolysent les osides.
- **Les enzymes protéolytiques** qui hydrolysent les liaisons peptidiques.

4- EC 4 : lyases :

Elles catalysent la rupture des liaisons autrement que par hydrolyse.

Exemples :

- **Les décarboxylases d'acides cétoniques** qui enlèvent un CO₂ aux acides cétoniques. Le coenzyme est la thiamine pyrophosphate (dérivé de la thiamine ou vitamine B1).
- **Les décarboxylases d'acides aminés** dont le coenzyme est le phosphate de pyridoxal.

5- EC 5 : isomérases :

Elles catalysent le déplacement de groupes à l'intérieur d'une molécule sans que la formule brute varie.

Exemples :

- **Les épimérases** qui provoquent des interconversions d'oses.
- **Les mutases** qui catalysent le transfert d'un radical d'une partie d'une molécule à une autre.

6- EC 6 : ligases :

Elles catalysent la condensation de deux molécules avec consommation d'énergie sous forme d'ATP.

 **INFORMATION BTS :** Ces six classes sont à connaître.

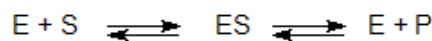
II. ÉTUDE DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE

1 LA VITESSE INITIALE

L'activité enzymatique est l'expression de la quantité d'enzyme nécessaire à la transformation d'un substrat en produit. Elle est mesurée par la quantité de substrat transformée en produit par unité de temps (micromole de substrat en une minute par exemple) ou par la quantité de molécules de produits formées par unités de temps.

La réaction se déroule en deux étapes :

- Fixation temporaire de l'enzyme sur le substrat, formant un complexe enzyme/substrat. Le complexe enzyme/substrat est formé par des liaisons faibles et il s'associe et se dissocie selon les conditions du milieu ;
- Transformation du substrat en produit (avec libération de l'enzyme intacte).



E: enzyme

S: substrat

ES: complexe enzyme/substrat

P: produit

Figure 2 : La réaction enzymatique

De façon expérimentale, des courbes peuvent être établies montrant l'apparition du produit formé ou la disparition du substrat utilisé en fonction du temps, c'est ce qui est représenté sur la figure 3. Les conditions expérimentales (température, pH, salinité, concentration en enzyme...) doivent être optimales.

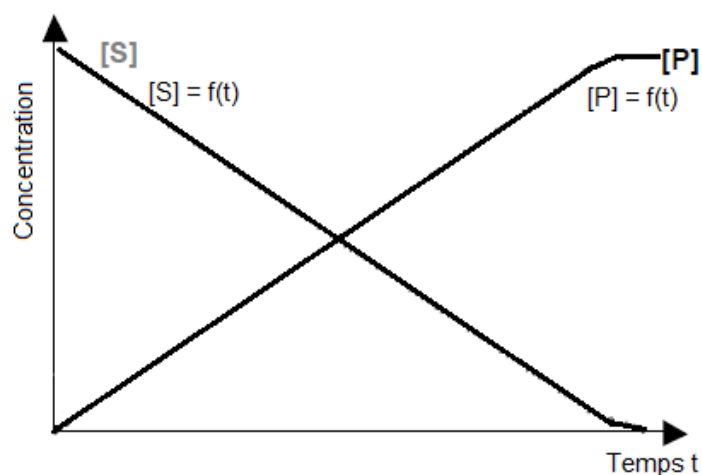


Figure 3 : Concentration en produit ou en substrat en fonction du temps ($[P]=f(t)$ ou $[S]=f(t)$)

On observe deux parties sur cette courbe :

- Une première partie pour les temps courts qui peut être assimilée à une droite. La quantité de produit formé est proportionnelle au temps.
- Un plateau correspondant à l'arrêt de la production de produit car l'ensemble du substrat aura été transformé en produit.

Ce type de graphique permet de calculer la **vitesse initiale** de la réaction, exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}$. La vitesse initiale correspond à la quantité de produit apparu par unité de temps. Elle est calculée en prenant la tangente à l'origine qui est une droite et dont la pente donne la vitesse initiale. (Pour rappel : pente = $(Y_B - Y_A)/(X_B - X_A)$).

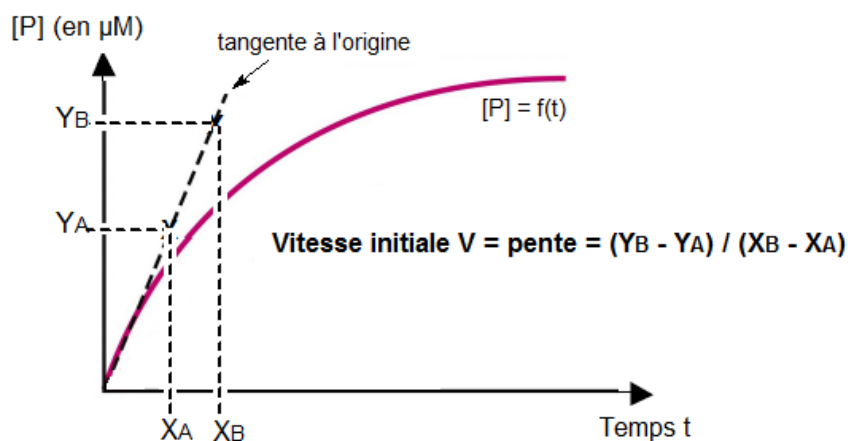
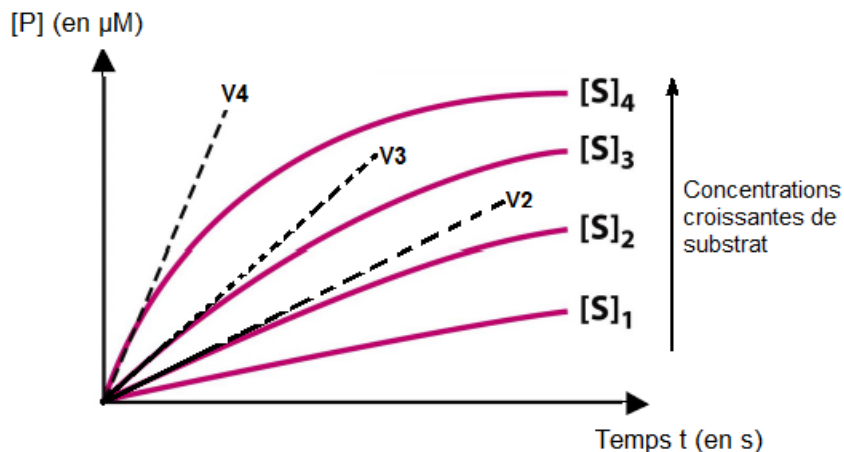


Figure 4 : Calcul de la vitesse initiale

2 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT SUR LA VITESSE DE RÉACTION

En prenant des concentrations croissantes de substrat et en mesurant la quantité de produit formé au cours du temps, on peut observer que les concentrations en produit en fonction du temps sont différentes pour chacune des concentrations en substrat essayées. Plus la concentration en substrat est élevée, plus la vitesse initiale est grande. Chacune de ces vitesses initiales peut être calculée, ce qui permet de représenter une nouvelle courbe avec les vitesses initiales en fonction de la concentration en substrat, $V = f([S])$. Description de $V = f([S])$.



Pour chaque concentration de substrat, la vitesse initiale est mesurée. Une courbe représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat peut alors être établie. Cette courbe $V = f([S])$ est la courbe de Michaelis-Menten.

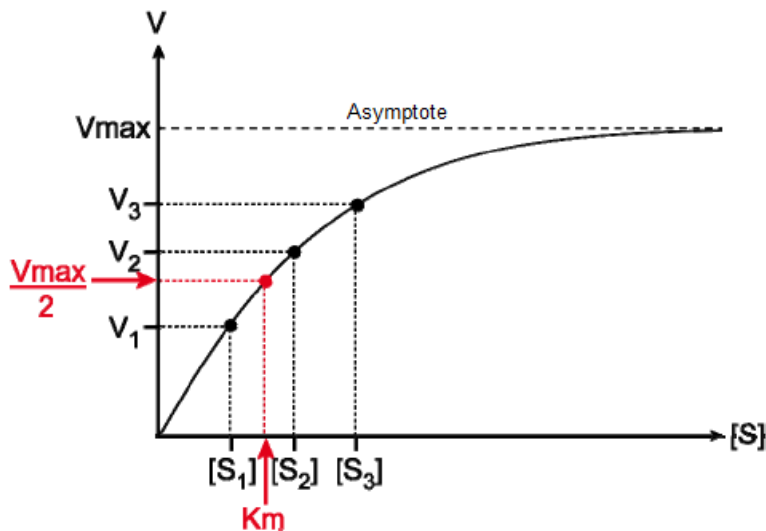


Figure 5: Établissement de la courbe de Michaelis-Menten: $V = f([S])$

Description de $V = f([S])$

Cette courbe de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat ($V = f([S])$) est la courbe de Michaelis-Menten.

On observe que les vitesses mesurées augmentent en fonction des concentrations du substrat mais cette relation n'est pas linéaire, le graphe est une hyperbole.

Lorsque la concentration en substrat est nulle, la vitesse est de 0, l'hyperbole passe donc par l'origine. Lorsque la concentration en substrat tend vers l'infini, l'hyperbole se rapproche de son asymptote qui correspond à la vitesse maximale, notée V_{max} .

Définition

Il s'agit de la vitesse initiale théorique d'une réaction enzymatique pour une concentration infinie du substrat. La vitesse maximum est donc une vitesse initiale mais qui ne peut pas être réellement observée puisqu'il est impossible de réaliser dans le milieu une concentration infinie de substrat.

Si on considère le point de la courbe pour lequel l'ordonnée est égale à la moitié de celle de l'asymptote, son abscisse est une concentration de substrat pour laquelle la vitesse initiale est égale à la moitié de la vitesse maximum. Cette concentration est appelée constante de Michaelis, notée K_M .

Définition

Le K_M correspond à la concentration du substrat pour laquelle la vitesse initiale d'une réaction enzymatique atteint la moitié de la vitesse maximum. Chaque enzyme a un K_M caractéristique pour un substrat. Cette constante indique également l'affinité de l'enzyme pour le substrat. En effet, plus le K_M augmente, plus l'affinité diminue. Autrement dit, le K_M représente l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

Cette hyperbole est constituée de trois parties :

- Aux faibles concentration de substrat, la vitesse de la réaction est proportionnelle à celle du substrat.
- Lorsque la concentration en substrat augmente, la vitesse n'accroît plus dans les mêmes proportions.
- Aux fortes concentration en substrat, la vitesse devient constante, indépendante de cette même concentration : l'enzyme est saturée par son substrat.

Autrement dit, quand la concentration en substrat est faible dans le milieu, les complexes enzyme-substrat auront plus de mal à se former. La vitesse initiale de la catalyse est plus faible. Elle augmente avec la concentration en substrat jusqu'à un palier (vitesse maximale) où toutes les molécules d'enzymes sont liées à des molécules de substrat. L'enzyme est saturée: c'est le facteur limitant de la réaction.

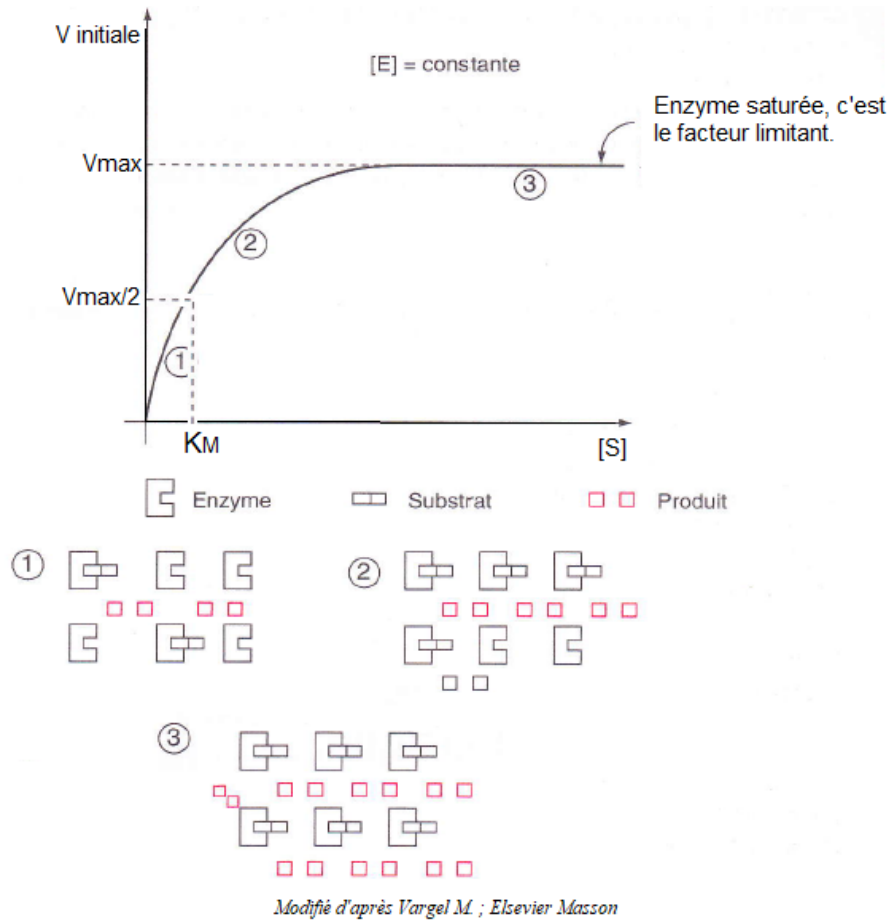


Figure 6: Interprétation de la courbe de Michaelis-Menten

Équation de Michaelis-Menten

Cette équation est l'expression de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat et des deux constantes caractéristiques d'une réaction enzymatique, la vitesse maximum et la constante de Michaelis.

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

- V est la vitesse initiale de la réaction;
- [S] est la concentration en substrat;
- K_M représente l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat;
- V_{max} est la vitesse initiale maximale dans des conditions expérimentales définies: concentration initiale saturante en substrat, pH, température, concentration en enzyme.

Figure 7: L'équation de Michaelis-Menten

Représentation de Lineweaver et Burk

Les déterminations de V_{\max} et K_M sont peu précises avec les hyperboles. Une méthode de linéarisation graphique est alors employée, ou méthode de double inverse.

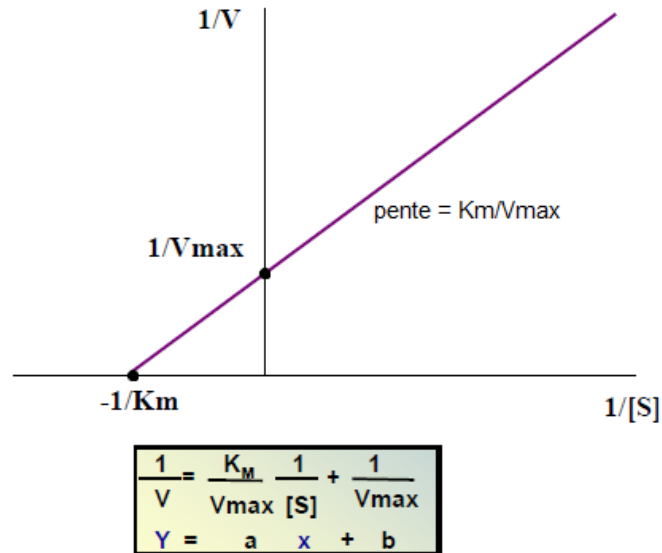


Figure 8 : Représentation en double inverse de Lineweaver et Burk

👉 **INFORMATION BTS** : Cette dernière représentation n'est pas à savoir faire mais est à savoir analyser.



Entraînement 1

L'activité d'une enzyme est mesurée en fonction de la concentration en substrat. On trouve les résultats suivants :

[S] X 105M	VITESSE (MMOLES/MIN)
0	0
0,3	10,4
0,5	14,5
1	22,5
3	33,8
9	40,5

Déterminez la V_{max} et le K_M de cette enzyme.

N.B. M = molaire, c'est-à-dire en moles par litres.