

Universite Mohammed Seddik Benyahia -Jijel-

Département EF-SNV

2 ème Année Sciences Biologiques

Année universitaire : 2024-2025

Préparée par : Dr. AMIRAWIDAD

Notions d'enzymologie

I- Généralités sur les enzymes

I-1 introduction

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.

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.

I-2 Définitions

1- Enzyme

Les enzymes sont des protéines douées d'activité catalytique spécifique. Elles catalysent et accélèrent les réactions chimiques nécessaires à la vie et à la multiplication cellulaire.

En effet, ils ont un pouvoir catalytique de 10^6 à 10^{12} fois supérieur aux réactions spontanées et interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction.

Les enzymes agissent en très faible quantité, elles 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 elles 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.

2- Substrat

C'est une molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme. Donc le substrat est la substance qui interagit spécifiquement avec le site actif et sur laquelle l'enzyme va agir.

3- Produit

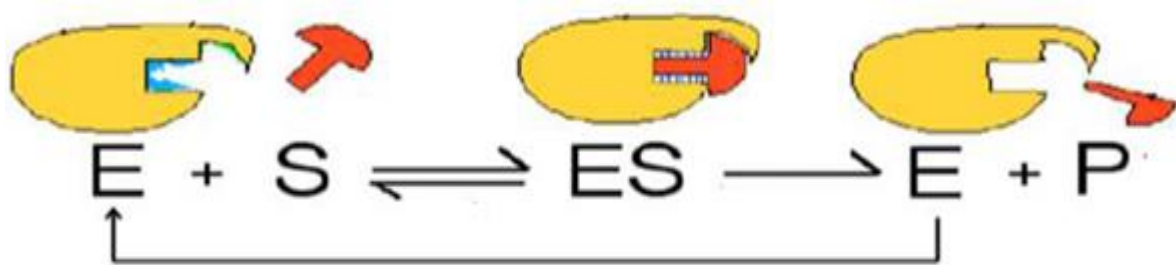
C'est la molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme. La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation est appelée produit.

4- Ligand

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. Les enzymes peuvent avoir des interactions spécifiques avec d'autres molécules qui peuvent être protéique ou non protéique ; ces molécules sont appelées **ligands**. Une protéine dénaturée par la chaleur est incapable de lier son ligand.

5- Notion de spécificité

Dans les réactions biologiques catalysées par des enzymes, le substrat est transformé en produit. La réaction globale est composée de deux réactions élémentaires : le substrat forme d'abord d'un complexe avec l'enzyme, puis ce complexe se décompose en produit et enzyme.



La réaction de transformation d'un substrat en produit catalysée par une enzyme.

I-3 Structure des enzymes

Il existe deux grandes catégories d'enzymes :

1. Enzymes entièrement protéiques : (enzymes constituées uniquement d'acides aminés).

Ce sont les protéines qui interviennent dans la réaction enzymatique par la fixation et la transformation de substrats en produits via leurs sites actifs.

2- Enzymes formées de 2 parties (Holoenzymes) : Très souvent les enzymes sont constituées d'une protéine (l'apoenzyme) associée à une espèce chimique de petite taille et de nature différente, un **cofacteur**. Le cofacteur est thermostable, alors que la protéine est thermolabile.

Les cofacteurs sont très variés. Il peut s'agir d'**ions métalliques** (Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Zn^{++}), ou de **coenzymes**, molécules organiques le plus souvent dérivées de vitamines. Ils possèdent un noyau flavinique comme le FAD et FMN ou nicotinamide comme le NAD^{+} et le $NADP^{+}$.

Le coenzyme se lie à l'apoenzyme, soit par des liaisons faibles soit par des liaisons fortes (covalentes).

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.

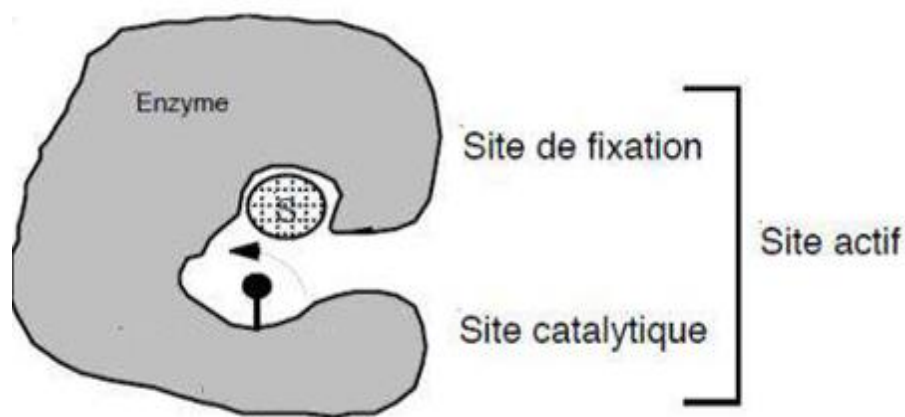
À la différence des enzymes qui sont spécifiques, les coenzymes ne le sont pas et plusieurs enzymes peuvent avoir le même coenzyme.

3- Le site actif

Pour que l'enzyme fonctionne, il doit se combiner avec son substrat. Le site de liaison du substrat avec l'enzyme correspond à une poche ou crevasse à la surface de la molécule de l'enzyme dont la forme est complémentaire à celle du substrat. Hypothèse de la clef (substrat) qui entre dans la serrure (enzyme) : cette crevasse ou poche est appelée : site actif. Le site correspond à l'ensemble des acides aminés qui entrent en contact avec le substrat. On distingue dans le site actif deux parties.

- Le site de fixation ou de reconnaissance: qui reconnaît la complémentarité de forme avec un substrat spécifique de l'enzyme et détermine l'affinité et la spécificité de la réaction.
- Le site catalytique : qui permet la transformation du substrat en produit et détermine la vitesse de la réaction.

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



Les interactions entre enzymes et substrat font intervenir des liaisons non covalentes et sont des réactions spontanées, qui ne nécessitent aucune énergie (interactions de Van der Waals, électrostatiques, hydrophobes et des liaisons hydrogène).

I-4 Nomenclature et classification

Il existe 3 types de nomenclatures :

1- La nomenclature commune

- Un certain nombre d'enzymes sont fréquemment désignés à l'aide de noms communs.

Exemples : Pepsine (endoprotéase digestive du suc gastrique)

Trypsine (endoprotéase digestive du suc pancréatique)

Chymotrypsine (protéase digestive fabriquée par le pancréas)

Papaïne (protéase trouvée dans le latex de la papaye et dans l'ananas)

- Pour certaines enzymes, on ajoute le suffixe "ase" au nom du substrat attaqué.

Exemples : Les peptidases, dont les substrats sont des peptides.

Les estérases, dont les substrats sont des esters.

Les amylases, dont le substrat est l'amidon (du latin *amylum*).

2- La nomenclature fonctionnelle (systématique)

Elle prend en compte le nom du substrat de l'enzyme et le type de réaction catalysée. Pour désigner une enzyme, on indique successivement :

- Le nom du substrat
- Le type de réaction catalysée
- Le suffixe "ase"

Exemples : Lactate déshydrogénase.

Glucose-6-phosphate isomérase

Isocitrate lyase

Pyruvate carboxylase

3- La nomenclature officielle (numéro de code)

Cette nomenclature précise et complète la nomenclature fonctionnelle.

Depuis 1961, l'Union Internationale de Biochimie a codifié la nomenclature et la classification des enzymes sous une nomenclature dite officielle. Les enzymes sont répartis selon le type de réaction qu'ils catalysent en **six classes**, elles-mêmes subdivisées en **sous classes** permettant de mieux définir la fonction de chaque enzyme. Toutes les enzymes actuellement connues sont répertoriées sous un numéro portant **4 nombres** séparés par des points et précédés de EC (Enzyme Commission number) : (E.C. X1.X2.X3.X4). La signification des nombres est la suivante :

X1 : Varie de 1 à 6 et indique les 6 types de réactions catalysées par les enzymes (6 classes chacune comportant de 4 à 13 sous classes) :

1. Oxydoréductase (catalysent les réactions d'oxydoréduction : transfert d'électrons, d'atomes d'hydrogène ou fixation d'oxygène)

2. Transférase (transfert d'atomes ou de groupes d'atomes, un phosphate par exemple)

3. Hydrolase (Coupure des liaisons avec consommation de H₂O)

4. Lyase (Coupure des liaisons par d'autres modes autres que l'hydrolyse, sans consommation de H₂O).

5. Isomérase (catalysent les réactions d'isomérisation dans une molécule, réaction conservant la formule brute du composé).

6. Ligase (catalysent la formation de liaisons covalentes entre deux molécules : CC, CO, CN, CS, CP, N-métal). Ce sont des synthétases utilisant l'énergie des ATP.

X2 : Le deuxième désigne **la sous-classe** de l'enzyme qui est définie suivant son mécanisme d'action.

X3 : Désigne la nature du groupe accepteur des protons/électrons sur lequel agit l'enzyme (sous-sous-classe)

X4 : Désigne le numéro d'ordre ou numéro de série du substrat sur lequel agit l'enzyme (numéro d'ordre d'enregistrement de l'enzyme dans la sous-sous classe concernée).

Exemple: L'alcool déshydrogénase : EC.1.1.1.1 (1 : oxydoréductase, 1.1 : agit sur CH-OH, 1.1.1. avec NAD ou NADP comme accepteur, 1.1.1.1 premier enzyme découvert et reconnu).

II- Cinétique enzymatique à un seul substrat et inhibition

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biochimiques, catalysées par les enzymes, en étudiant leur vitesse c'est-à-dire leur évolution en fonction du temps.

II-1 Notion de vitesse initiale

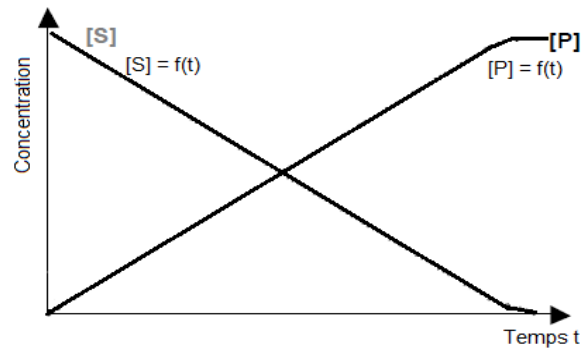
L'activité enzymatique est l'expression de la quantité d'enzyme nécessaire à la transformation d'un substrat en produit. Elle est mesurée par la quantité de substrat transformée en produit par unité de temps (micromole de substrat en une minute par exemple) ou par la quantité de molécules de produits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

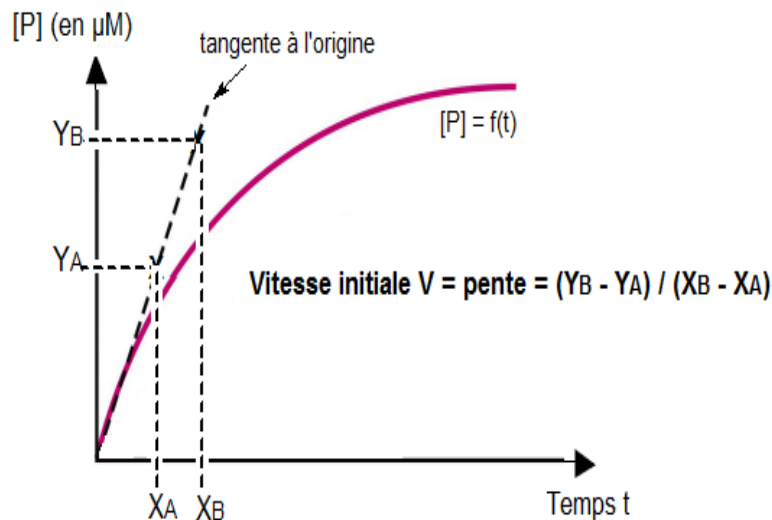


- De façon expérimentale, des courbes peuvent être établies montrant l'apparition du produit formé ou la disparition du substrat utilisé en fonction du temps (c'est ce qui est représenté sur la figure).



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

- ❖ Dès qu'une enzyme est mise en contact avec le substrat, une formation du produit en fonction du temps est observée. En pratique, on considère que la courbe présente une partie rectiligne et l'on mesure l'augmentation de la concentration de produit $d[P]$ pendant un intervalle de temps dt .



Calcul de la vitesse initiale

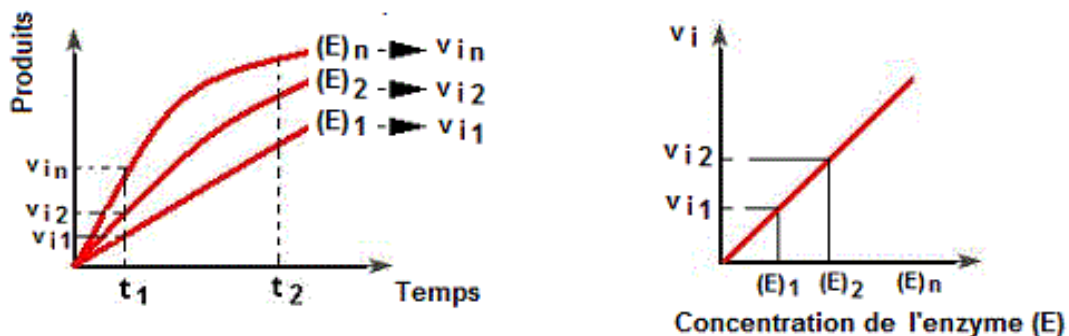
On observe deux parties sur cette courbe :

- 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. (Pente = $(YB - YA) / (XB - XA)$).

II-2 Influence de la concentration d'enzyme sur la vitesse initiale

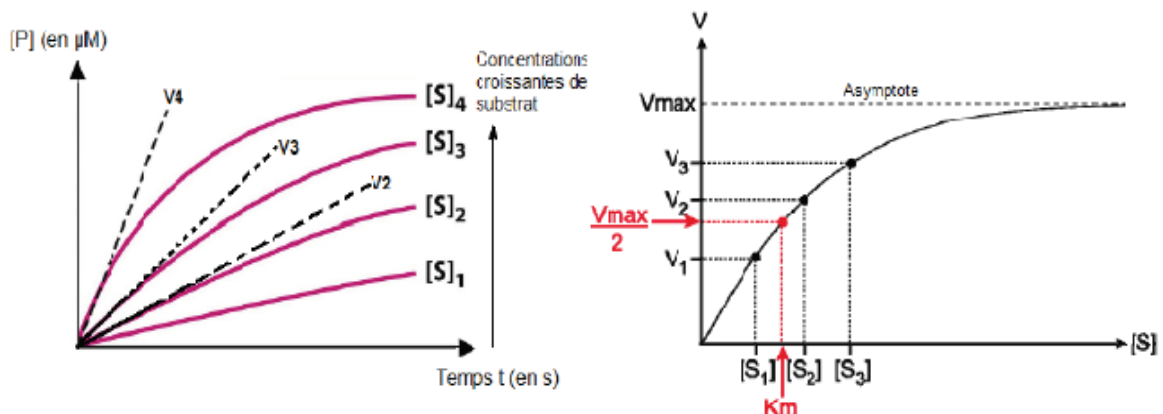
La mesure de la vitesse initiale en présence de concentrations croissantes d'enzyme, pour une concentration constante de substrat, montre que cette vitesse est proportionnelle à la concentration d'enzyme.



II-3 Influence de la concentration de substrat sur la vitesse initiale

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, $V = f([S])$.

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



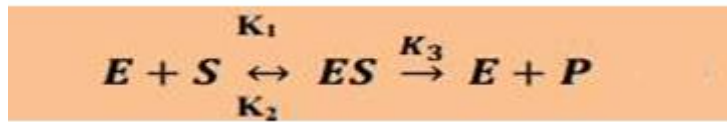
II-4 Cinétique Michaëlienne

En 1913, Michaëlis et Menten (M.M) ont établi l'équation d'une réaction de vitesse enzymatique qui permet de :

- Décrire la cinétique (et donc la vitesse) d'une réaction catalysée par **une enzyme agissant sur un substrat unique**, pour donner un produit
- Décrire la forme hyperbolique du graphe de la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale en substrat.

1- Equation de vitesse de Michaelis-Menten

La transformation enzymatique du substrat en produit nécessite la formation préalable du complexe enzyme-substrat, ES, suivie de sa conversion en enzyme et produit :



Dans ce schéma :

- k_1 : constante de vitesse de formation du complexe ES .
- k_2 : constante de vitesse de dissociation du complexe ES .
- k_3 ou k_{cat} : constante catalytique, constante de vitesse de formation de E et P .

L'équation de **Michaelis-Menten** représente l'équation de vitesse pour une réaction enzymatique à un substrat. 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. Cette équation est la description mathématique de la courbe hyperbolique.

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

L'équation de Michaelis-Menten

De type : $Y = a.X$ a : pente $= V_{max}/K_M + [S]$.

V_i : vitesse initiale de la réaction enzymatique (en $\mu\text{Mol/min}$) ;

V_{max} : Vitesse maximale mesurée pour une concentration saturante de substrat (en $\mu\text{M/min}$);

$[S]$: Concentration en substrat (en mol/L) ;

K_M : Constante de Michaelis spécifique de l'enzyme.

2- Interprétation de la courbe de Michaelis-Menten

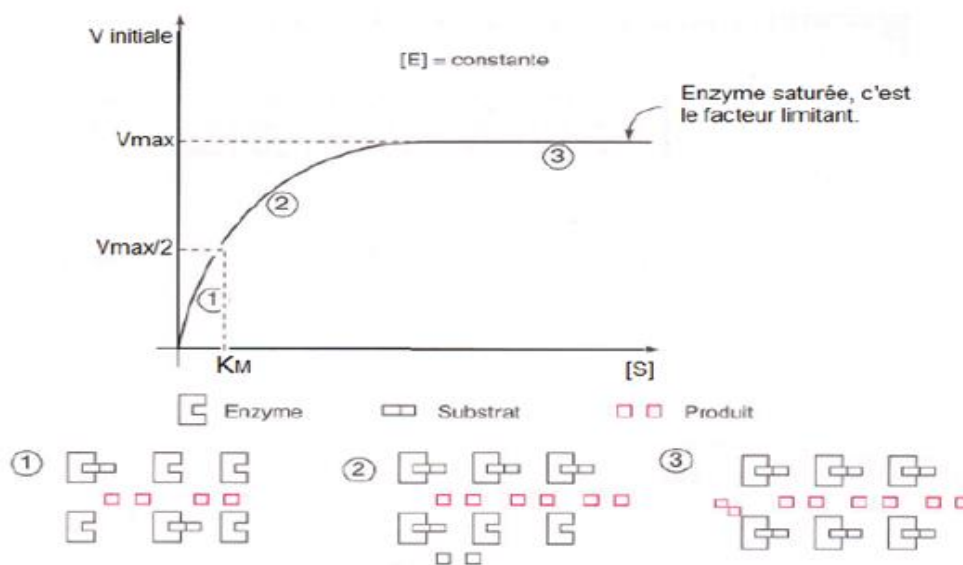
La concentration en substrat influe sur la vitesse de la réaction.

D'après la courbe de **Michaelis-Menten**, 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} .

Cette hyperbole est constituée de trois parties :

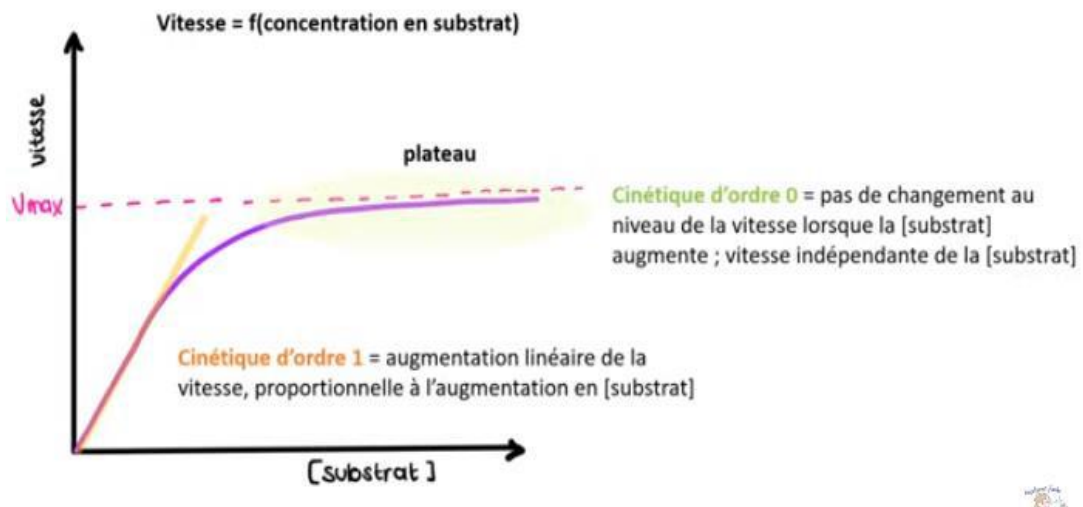
- 1- Aux faibles concentrations de substrat, la vitesse de la réaction est proportionnelle à celle du substrat.
- 2- Lorsque la concentration en substrat augmente, la vitesse n'accroît plus dans les mêmes proportions.
- 3- Aux fortes concentrations en substrat, la vitesse devient constante, indépendante 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.

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

❖ Cette courbe peut être subdivisée de la manière suivante :



- La cinétique d'ordre 1 peut être décrite par l'équation de droite : $y = ax + b$, avec :
 y = vitesse ; a = pente ; x = $[S]$; b = intersection sur l'axe y (axe des ordonnées).
- La cinétique d'ordre 0 ne peut pas être décrite par une équation de droite. C'est pour cela que nous aurons recours à l'équation de Michaelis-Menten pour redécrire la courbe.

3- La Constante de Michaélis K_M

- K_M (exprimée en mole/litre) est la constante de dissociation du complexe $[ES]$. Elle est définie par le rapport :

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Remarque: lorsque k_3 est très petit devant k_2 (dissociation de ES plus rapide que la formation de P) : $K_M = k_2/k_1$

- 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 (lorsque la moitié des molécules de l'enzyme sont complexées au substrat). 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.

4- La constante catalytique k_{cat}

Il est intéressant de savoir avec quelle rapidité une enzyme travaille après s'être fixée à son substrat. Autrement dit, à quelle vitesse le complexe $[ES]$ est transformé en $E + P$.

Puisque c'est le complexe [ES] qui permet d'obtenir l'enzyme libre E et le produit P, la constante de vitesse de la réaction k_3 est appelée k_{cat} (k catalytique). La constante catalytique décrit la rapidité d'action d'une enzyme.

k_{cat} est aussi appelé nombre de turnover: nombre de molécules de substrat convertie en produit par unité de temps par un seul site actif de l'enzyme à saturation. En d'autres termes, le turnover de la réaction est le nombre de fois que l'enzyme travaille par unité de temps (elle est exprimée par s- ou par min-).

5- L'efficacité catalytique

L'efficacité catalytique d'une enzyme dépend de l'activité avec laquelle elle se fixe à ses substrats et à quelle vitesse elle les convertit en produits. Une mesure de l'efficacité catalytique doit donc rendre compte à la fois des événements de liaison et de ceux de catalyse (spécificité et efficacité). L'efficacité catalytique se mesure par sa **constante de spécificité** : **k_{cat}/K_M** (exprimé en M⁻¹.s⁻¹).

Elle indique la façon dont la vitesse varie en fonction de la fréquence de combinaison entre l'enzyme et le substrat. La valeur de k_{cat}/K_M , bien mieux que K_M ou k_{cat} pris isolément, représente la capacité globale de l'enzyme à convertir le substrat en produit. Plus k_{cat}/K_M est élevée, plus l'enzyme est efficace.

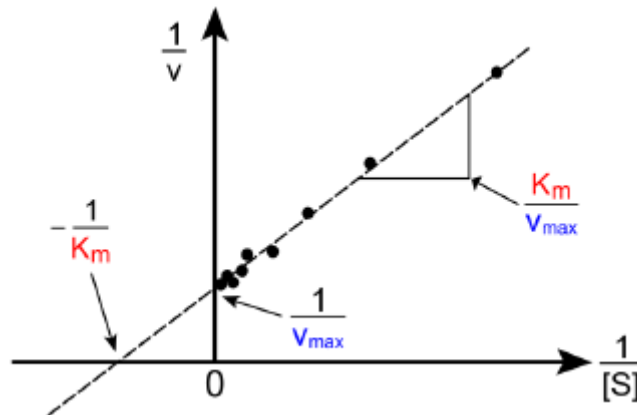
II-5 Linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten (Méthode de Lineweaver-Burk (méthode des doubles inverses))

Malheureusement, La détermination de V_{max} et K_M sont peu précises avec les hyperboles, des erreurs sont possibles. La linéarisation de la représentation graphique de l'équation de Michaelis-Menten, transforme l'hyperbole en droites.

Parmi les méthodes les plus utilisées pour la linéarisation Celle de la représentation en double inverse selon Lineweaver-Burk. En prenant l'inverse des deux côtés de l'équation de Michaelis-Menten, nous obtenons :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Cette équation est une équation de droite de la forme : $y = ax + b$ ou $1/v = f(1/[S])$ et consiste donc en un tracé de $1/v$ en fonction de $1/[S]$



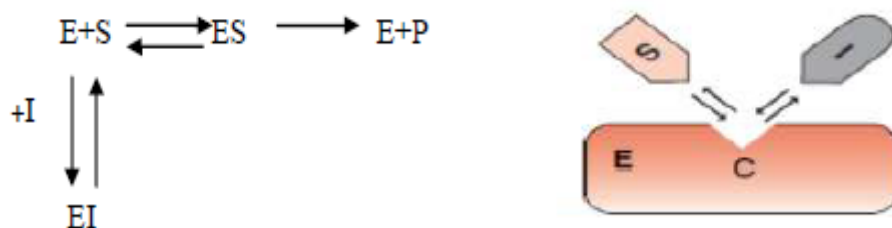
L'intersection de la droite avec l'abscisse détermine $-1/K_M$ et son intersection avec l'ordonnée détermine $1/V_{max}$. La pente de la droite est K_M / V_{max} .

II-6 Inhibition enzymatique

Un inhibiteur enzymatique est une substance se liant à une enzyme et qui en diminue l'activité. Il existe principalement 3 types d'inhibitions réversibles qui se distinguent par leurs effets sur les constantes cinétiques michaelienne de la réaction enzymatique, il s'agit :

1- Les Inhibiteurs compétitifs

Ces composés moléculaires présentent une analogie structurale avec le substrat et le site actif de l'enzyme. Un inhibiteur compétitif possède généralement une ressemblance structurale avec le substrat et tous deux entrent en compétition pour se fixer sur le même site enzymatique. La fixation de l'inhibiteur compétitif exclut la fixation ultérieure du substrat, et vice-versa.

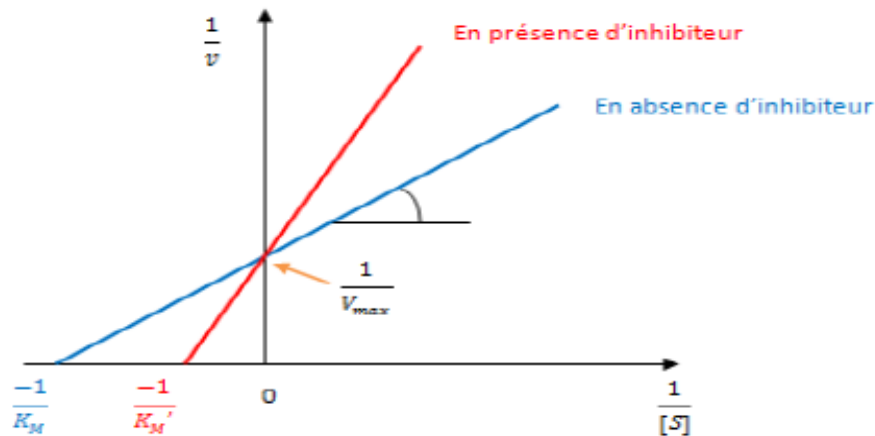


La présence de l'inhibiteur **ne change pas V_{max}** mais **augmente K_M** . L'équation devient :

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad K'_M = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad V_{max} = V'_{max}$$

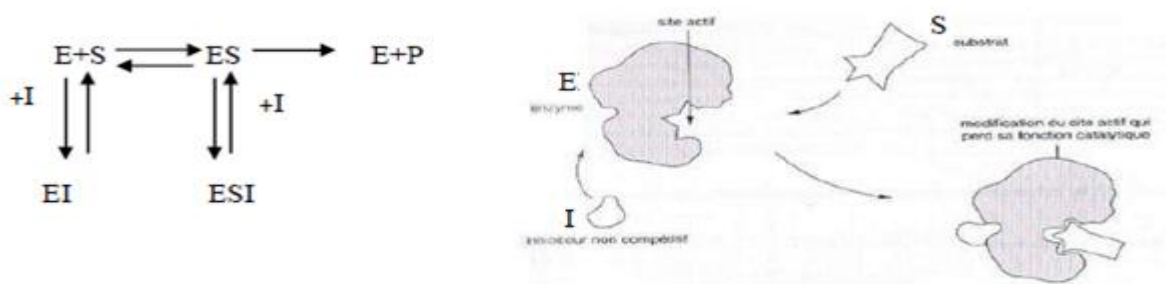
K_I : constante de dissociation

K'_M : est la constante de Michaelis apparente en présence de l'inhibiteur



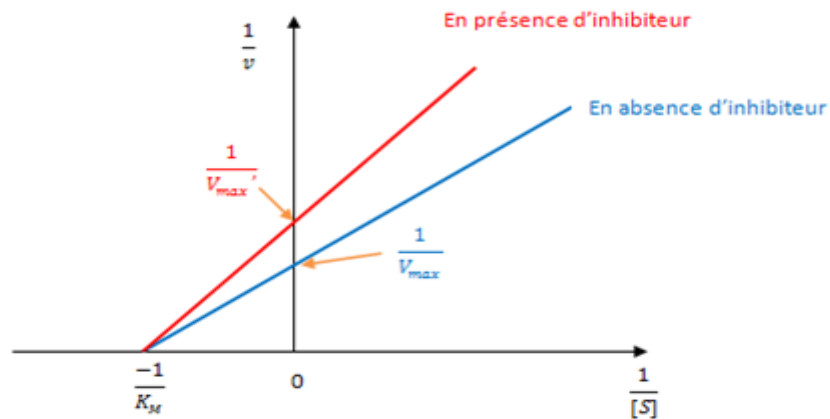
2- Les inhibiteurs non compétitifs

Dans ce cas, la fixation de l'inhibiteur se fait sur l'enzyme au niveau d'un site différent du site de fixation du substrat. Il n'y a donc aucune compétition entre le substrat et l'inhibiteur pour l'occupation du site actif. Un inhibiteur non compétitif donc, peut se lier à la fois, et avec une même affinité, sur l'enzyme libre et sur l'enzyme liée au substrat. Cependant, l'inhibiteur et le substrat ne rentrent pas en compétition pour se fixer sur un même site : le substrat se lie au site actif, et l'inhibiteur à un autre site de fixation. L'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la transformation du substrat en produit mais n'influe pas sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat.



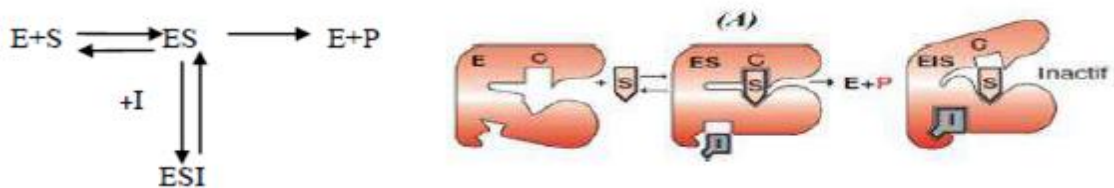
La fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme ne gêne pas la fixation du substrat sur le site catalytique. L'affinité du complexe ES n'est donc pas modifiée, **K_M ne change pas**, la **V_{max} est alors diminuée**. L'équation devient :

$$v = \frac{V_{max}[S]}{(K_M + [S])\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad V'_{max} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad K_M = K'_M$$



3- Les Inhibiteurs incompétitifs

L'inhibiteur ne se combine pas avec l'enzyme libre et n'affecte pas la réaction de celui-ci avec son substrat, mais il se fixe sur le complexe enzyme-substrat pour donner un complexe enzymesubstrat- inhibiteur inactif qui ne peut plus fournir le produit normal de la réaction. Généralement, la liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de la conformation de l'enzyme, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme, et empêche la réaction.



Ce type d'inhibition est connu cinétiquement par une **diminution parallèle de Vmax et de KM**. L'équation devient :

$$v = \frac{V'_{max}[S]}{K'_M + [S]} \quad V'_{max} = \frac{V_{max}}{1 + \left(\frac{I}{K_i}\right)} \quad K'_M = \frac{K_M}{1 + \left(\frac{I}{K_i}\right)}$$

