
Université Mohamed KHIDER Biskra
Faculté des Sciences Exacte et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique

Dr. Deghima. A

Année Universitaire 2020/2021

Université Mohamed KHIDER Biskra
Faculté des Sciences Exacte et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Chapitre I : généralités en enzymologie

1. Introduction

Depuis le début de l'histoire humaine, l'homme a utilisé des enzymes indirectement. La fermentation du sucre en éthanol dans la préparation des boissons alcooliques, la production du vinaigre par oxydation de l'éthanol, le caillage du lait par fermentation du lactose sont des procédés vieux de plusieurs milliers d'années où les activités catalytiques des enzymes sont responsables de transformations chimiques. Probablement la première application de l'enzyme acellulaire a été dans la fabrication du fromage où la présure obtenue à partir d'estomac de veau a été utilisée. La protéase-présure qui coagule les protéines du lait est utilisée depuis des centaines d'années dans la préparation du fromage. Plusieurs milliers d'enzymes ont été identifiées à ce jour. Ce groupe de biomolécules a trouvé sa première application industrielle au début des années 1900. Aujourd'hui, un ensemble d'enzymes sont utilisées à des fins industrielles, analytiques et thérapeutiques. La première enzyme commerciale a probablement été signalée en Allemagne en 1914. Il a été démontré que l'utilisation de la trypsine, la protéase isolée des animaux, améliorait le pouvoir de lavage du détergent par rapport aux produits traditionnels. Le succès dans l'amélioration de la qualité du détergent a déclenché des efforts vers la sélection de protéases appropriées pour une application dans des détergents.

Par la suite, une percée dans l'utilisation commerciale des enzymes s'est produite avec l'introduction de protéase microbienne dans la poudre à laver à un coût abordable. La première protéase alcaline commerciale extraite du genre *Bacillus* sp. a été

commercialisé en 1959 et la production de détergent ajouté aux enzymes est rapidement devenu un grand marché en quelques années. Pendant la période où l'utilisation de protéases alcalines dans les détergents est devenue populaire, l'utilisation d'enzymes dans les industries de transformation des aliments a également pris de l'ampleur en parallèle. Les enzymes de clarification des fruits, appelées pectinase, étaient utilisées dans les unités de fabrication de jus de fruits depuis 1930. Les enzymes hydrolysant l'amidon en dextrine et en glucose sont largement entrées dans l'industrie alimentaire en 1960 et plus ou moins complètement remplacé le processus d'hydrolyse acide de l'amidon. Les enzymes d'hydrolyse de l'amidon (α -amylase et amyloglucosidase) pour la production de glucose sont rapidement devenues le deuxième groupe d'enzymes utilisé dans l'industrie après la protéase détergente.

Les enzymes peuvent être extraites de tout organisme vivant. Les sources d'enzymes commerciales couvrent un large éventail, des micro-organismes aux plantes en passant par les sources animales. Mais pour diverses raisons, les micro-organismes sont devenus la principale source d'enzymes. Dans la production commerciale d'enzymes, les champignons et les levures contribuent pour environ 50%, les bactéries 25%, les animaux 8% et les plantes 4% du total.

Les microbes sont préférés aux plantes et aux animaux car ils sont des sources bon marché, leur teneur en enzymes est prévisible et les substrats de croissance sont obtenus comme matières premières standard. En outre, le génie génétique a ouvert une nouvelle ère de technologie enzymatique avancée. La technologie de l'ADN recombinant a permis d'obtenir des enzymes présentes dans des sources précieuses, d'être synthétisées dans des micro-organismes à croissance facile et également de produire des enzymes sur mesure avec les propriétés souhaitées selon les exigences des clients. Les enzymes conservant leur activité dans des conditions extrêmes de température, de pH et de

concentrations de sel, partiellement actives dans les solvants organiques, deviennent toutes une réalité. Les perspectives de l'industrie des enzymes semblent très brillantes avec une position de marché accrue pour une utilisation existante, une nouvelle utilisation d'enzymes connues et de nouvelles enzymes ayant de nouvelles applications industrielles. La production industrielle totale d'enzymes dans le monde était estimée à 1,5 milliard de dollars américains en 1997 et elle a enregistré un taux de croissance annuel moyen de 4,0%. Les applications des enzymes pour l'alimentation humaine et animale dominant constamment l'utilisation d'enzymes industrielles à l'échelle mondiale.

2. Définitions et généralités

2.1. Les Enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques ou biocatalyseurs de nature protéique. Ce sont des acteurs omniprésents dans la vie de la cellule. Toutes les réactions chimiques se déroulent dans la cellule ou le milieu cellulaire, en présence d'une enzyme. L'enzyme présente des propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique du métabolisme de l'être vivant qui la produit. Comme tous les catalyseurs, les enzymes agissent à des concentrations très petites. **Elles augmentent la vitesse des réactions chimiques (Tableau 1), sans en modifier le résultat ou l'équilibre thermodynamique. A la fin de la réaction, la structure de l'enzyme se retrouve inchangée.**

Tableau 1 : taux d'augmentation de la vitesse de quelques enzymes

Enzyme	Taux d'augmentation de la vitesse
Carbonic anhydrase	10 ⁶
Chorismate mutase	10 ⁶
Triose phosphate isomerase	10 ⁹
Carboxypeptidase A	10 ¹¹
AMP nucleosidase	10 ¹²
Phosphoglucomutase	10 ¹²
Succinyl CoA transferase	10 ¹³
Staphylococcal nuclease	10 ¹⁴
Orotidine monophosphate decarboxylase	10 ¹⁷

- Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes éléments chimiques initiaux.
- Les protéines enzymatiques sont synthétisées par des êtres vivants. Cette synthèse est déterminée génétiquement
- L'enzymologie est l'étude de la relation structure-fonction des enzymes.
- Le substantif « enzyme » est du genre féminin.
- Toutes les enzymes sont des protéines.

2.2. Les pro-enzymes

Appelés aussi zymogènes sont des enzymes synthétisés sous forme inactive ; l'activité ne s'exerce que lorsqu'elle perd une partie de sa structure. Prenons l'exemple de quelques enzymes digestives :

Pepsinogène (proenzyme) + HCL → Pepsine (enzyme)

Trypsinogène (proenzyme) en présence de la pepsine → Trypsine (enzyme)

Il existe dans la nature des biocatalystes non protéiques tels que les Ribozymes (catalyseurs constitués de RNA) et des DNazymes (catalyseurs formés de DNA). On les appelle aussi acides nucléiques catalyseurs.

2.3. Substrat

Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme. Toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement modifiées sont appelées substrats.

2.4. Produit

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

2.5. Ligand

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

2.6. Cofacteur

Élément chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique :

- pour transporter ou compléter un substrat ;
- pour accepter un produit ;
- comme participant à la structure de l'enzyme.

Les cofacteurs peuvent être des ions comme l'atome de Zinc de l'anhydrase carbonique ou de petites molécules minérales habituellement présentes dans les milieux biologiques, à commencer bien sûr par la molécule d'eau. Certains cofacteurs sont des molécules plus complexes synthétisées par les cellules : nous les appellerons coenzymes. Ce sont des molécules biologiques intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction.

2.7. Coenzymes

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 possible, alors tout ou partie de la molécule du coenzyme doit être apportée à cette espèce par son alimentation : cet aliment indispensable s'appelle **une vitamine** (Tableau 2).

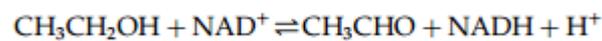
Tableau 2 : Différents vitamines agissant comme coenzymes

Vitamin	Coenzyme	Reaction-mediated and metabolic roles
Biotin	Biocytin	Carboxylation, nonphotosynthetic fixation of carbon dioxide
Cobalamin, B ₁₂	Adenosyl cobalamin, B ₁₂	Alkylation, intermolecular rearrangements
Coenzyme A	CoA	Acyl transfer
Folic acid	Tetrahydrofolate	One carbon group transfer
Lipoic acid	Lipoic acid	Acyl transfer
Nicotinamide	Nicotinamide	Oxidation–reduction
Niacin	Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD ⁺	Redox-active
Pantothenate, B ₃	CoA	Acyl transfer
Pyridoxine, B ₆	Pyridoxal phosphate	Amino group transfer
Riboflavin, B ₂	Flavin dinucleotide, FAD	Oxidation–reduction
Thiamine, B ₁	Thiamine pyrophosphate, TPP	Aldehyde transfer
Vitamin A	Retinol, carotenoid	Vision
Vitamin K	Vitamin K	Carboxylation of glutamate residues
Vitamin C	Ascorbic acid	Oxidation–reduction
Vitamin D	Ergocalciferol, β-carotene, ergosterol, steroid	Photolysis, photochemical reaction, calcium adsorption
Vitamin E	Tocopherol, terpenes	Reducing agent

Lorsque les coenzymes sont liés à l'enzyme par des liaisons de type électrostatique ou plus faiblement encore, cette liaison est renouvelée à chaque réaction effectuée : Ces coenzymes sont appelés coenzymes libres parce qu'ils se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée.

Lorsque au contraire les coenzymes sont liés aux enzymes par des liaisons fortes de type covalent, leur concentration est nécessairement la même que celle de l'enzyme, c'est-à-dire très petite (on dit catalytique). Ces coenzymes sont appelés coenzymes liés parce qu'ils ne se dissocient pas de l'enzyme.

Une molécule organique telle que le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) sert un groupe spécifique avec des activités catalytiques pour les réactions d'oxydoréduction catalysées par les déshydrogénases. Une réaction typique catalysée par l'alcool déshydrogénase est présentée comme suit :



Les formes de NAD^+ et NADP^+ sont connues comme les premières coenzymes reconnues. Ils sont impliqués dans un grand nombre de réactions enzymatiques. La conversion du NAD^+ en forme réduite de NADH s'accompagne d'une modification marquée des propriétés spectrophotométriques de la coenzyme.

Lorsqu'une enzyme nécessite un cofacteur pour son activité, le composant protéique inactif est généralement appelé apoenzyme, et l'apoenzyme plus le cofacteur (c'est-à-dire l'enzyme active) est appelé holoenzyme (Figure 1).

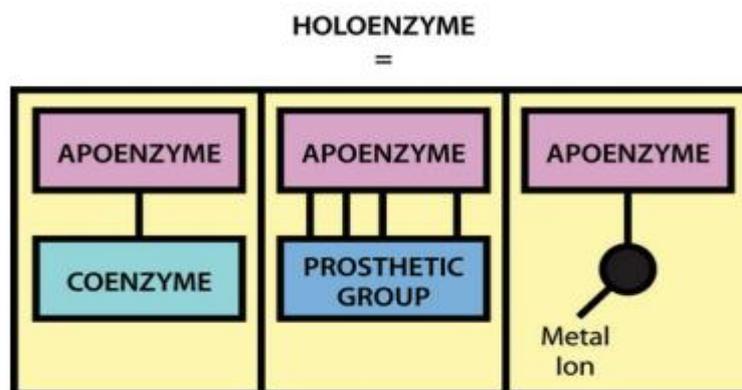


Figure 1 : Les différents composants de l'holoenzyme

3. Structure des enzymes

Les enzymes sont des protéines et, en tant que telles, se prêtent aux mêmes méthodes d'analyse structurales et chimiques des protéines.

3.1. Structure Primaire

Les enzymes sont constituées de plusieurs acides α -aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une **liaison amide**. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1 000 kDa. L'ordre, dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la **structure primaire** des enzymes (le nombre, la nature des acides aminés, et surtout l'ordre d'enchaînement) (**figure 2**).

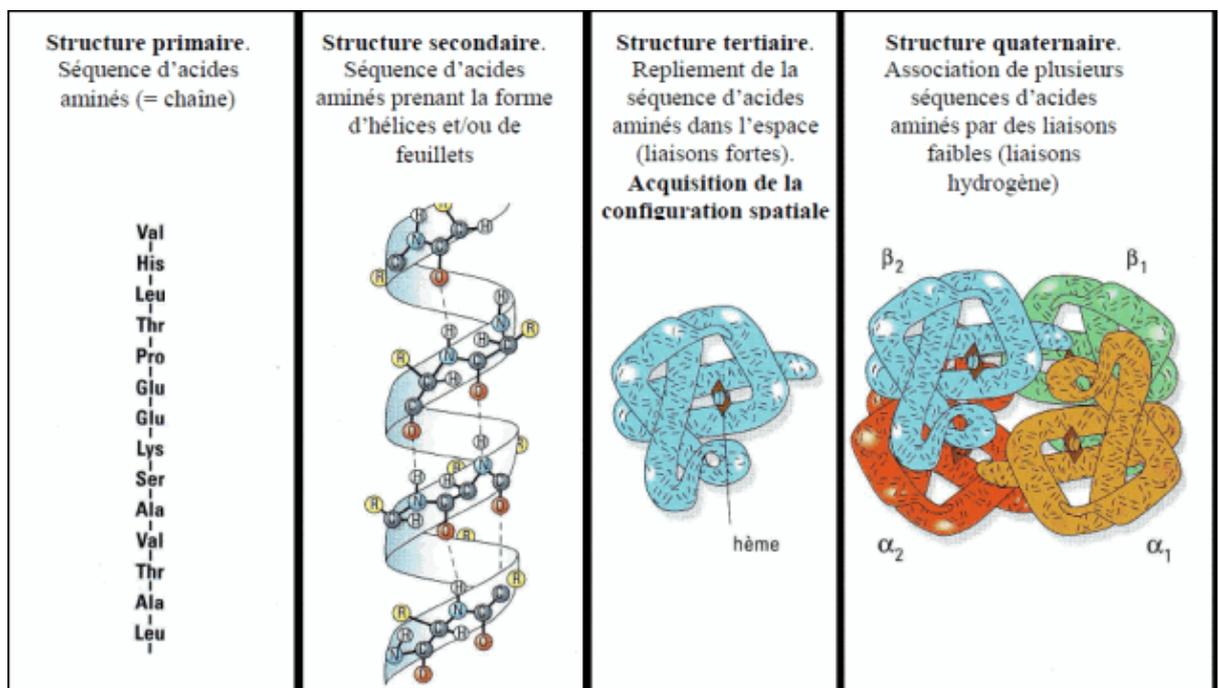


Figure 2 : Différents niveaux structurels des protéines (Cas de l'hémoglobine)

3.2. Structure Secondaire

Ces acides aminés vont avoir tendance à se replier sur eux-mêmes afin de former des arrangements secondaires principalement en hélices α et en feuillets β (figure 1) ; cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes et pont disulfure (liaison entre deux atomes de Soufre présent dans trois acides aminés différents). La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne principale d'une protéine. L'existence de structures secondaires vient du fait que les repliements énergétiquement favorables de la chaîne peptidique sont limités et que seules certaines conformations sont possibles.

3.3. Structure tertiaire (tridimensionnelle)

Les acides aminés d'une séquence protéique se comportent comme des molécules ionisées, chargées électriquement (positivement ou négativement). Il peut alors s'établir des interactions (attractions ou répulsions) entre différents acides aminés. Dans une structure tertiaire, des régions hélicoïdales ou plissées de la chaîne polypeptidique se replient les unes sur les autres et forment une molécule en forme de boule, ou molécule globulaire. La structure tertiaire est maintenue par des liaisons (covalentes, hydrogène ...) entre des acides aminés souvent très éloignés sur la chaîne primaire.

3.4. Structure quaternaire

Une structure quaternaire peut même être décrite pour les très grosses enzymes (**figure 1**). L'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques -identiques ou différentes - par des liaisons non-covalentes, liaisons dites faibles (liaison H, liaison ionique, interactions hydrophobes et force de Van der Waals). Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité permettant à celle-ci de reconnaître un substrat en particulier via une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif.

3.5. Le site actif

Le site actif d'une enzyme est la région tridimensionnelle qui se lie au substrat. Ces sites sont des cavités de caractère non polaire et dans lesquelles les substrats s'insèrent (**Figure 3**). L'eau est normalement exclue du site actif lorsque le substrat est lié, sauf si elle est un réactif. Le site actif consiste d'au moins deux parties fonctionnelles, qui peuvent ou non être voisines sur la chaîne polypeptidique (si non, la structure tertiaire les amène près l'une de l'autre) :

- **le site de reconnaissance** du substrat est constitué de certains acides aminés qui sont associés avec l'orientation du substrat, et donc, avec la spécificité de l'enzyme
- **le site catalytique** est constitué des résidus qui sont directement impliqués dans la formation et rupture des liens chimiques. Ces résidus sont souvent localisés dans le fond de la cavité, et dans la majorité des cas, possèdent des chaînes latérales ioniques ou réactives (ex. His, Lys, Cys, Ser, Asp, Glu).

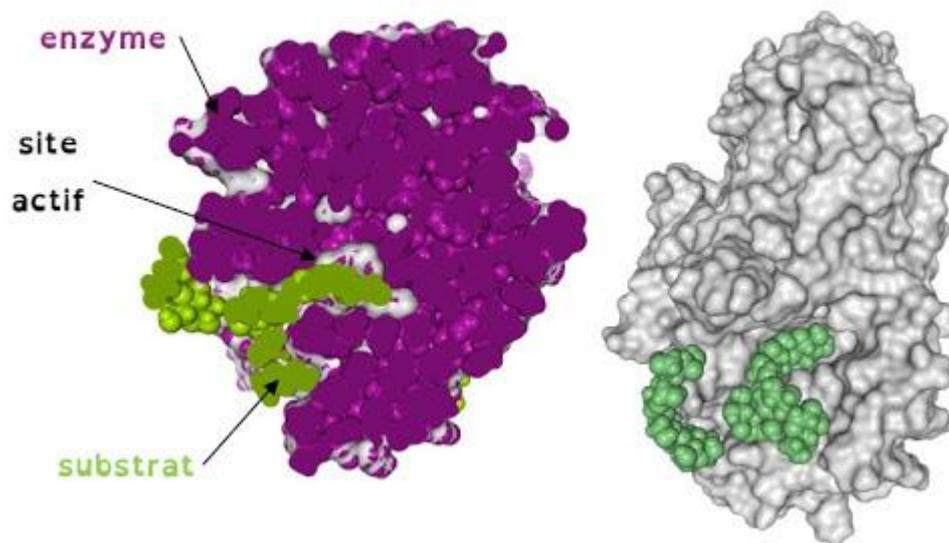
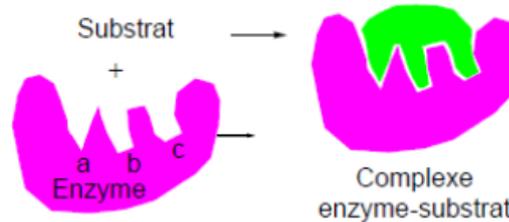


Figure 3 : Configuration spatiale du site actif d'une enzyme

❖ Deux modèles pour expliquer la spécificité des enzymes:

Clé-serrure: la forme du site actif est complémentaire à celle du substrat



Forme induite: l'enzyme change sa conformation lors de la liaison du substrat.

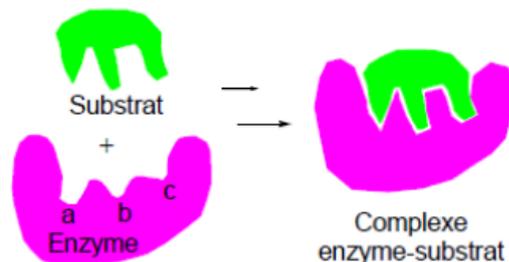


Figure 4 : Modèle de la spécificité des enzymes

L'hypothèse selon laquelle la spécificité enzymatique résulte de la nature complémentaire du substrat et de son site actif a été proposée pour la première fois par le chimiste allemand Emil Fischer en 1894, et est devenue connue sous le nom de « l'hypothèse : clé et serrure » de Fischer, selon laquelle seule une clé de la taille et de la forme correctes (le substrat) s'insère dans le trou de la serrure (le site actif) de l'enzyme. **Il est étonnant que cette théorie ait été proposée à une époque où il n'était même pas établi que les enzymes étaient des protéines (Figure 4).**

Au fur et à mesure que l'on en apprenait davantage sur la structure des enzymes grâce à des techniques telles que la cristallographie aux rayons X, il est devenu clair que les enzymes ne sont pas des structures rigides, mais sont en fait de forme assez flexible. À la lumière de cette découverte, en 1958, Daniel Koshland a étendu les idées de Fischer et a présenté le « modèle d'ajustement induit » de la liaison du substrat et de l'enzyme,

dans lequel la molécule d'enzyme change légèrement de forme pour s'adapter à la liaison du substrat. L'analogie couramment utilisée est le « modèle de la main dans le gant », où la main et le gant ont une forme largement complémentaire, mais le gant est moulé autour de la main au fur et à mesure qu'il est inséré afin de fournir une correspondance parfaite (**Figure 4**).

Puisque c'est le site actif seul qui se lie au substrat, il est logique de se demander quel est le rôle du reste de la molécule protéique. La réponse simple est qu'il agit **pour stabiliser le site actif et fournir un environnement approprié pour l'interaction du site avec la molécule de substrat**. Par conséquent, le site actif ne peut pas être séparé du reste de la protéine sans perte d'activité catalytique, bien que des études d'évolution dirigée (ou forcée) en laboratoire aient montré qu'il est parfois possible de générer des enzymes plus petites qui conservent leur activité.

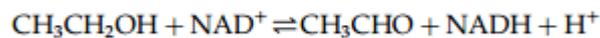
4. Classification des enzymes

Les enzymes peuvent être regroupées en familles sur la base d'un certain nombre de critères différents. Ils peuvent être classés selon le type de substrat qu'ils transforment. Ils sont souvent nommés simplement en ajoutant « ase » à la fin du nom du substrat, d'où les classifications générales de « protéase », «carbohydrase», «lipase», «pectinase», etc. Les enzymes dégradant les polymères sont également souvent classées comme « Endo- » ou « exo- » selon la position des liaisons dans le substrat attaqué par l'enzyme.

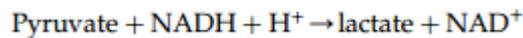
La méthode de classification enzymatique la plus complète et la plus reconnue internationalement est basée sur le type de réaction catalysée. En utilisant ce système, les enzymes sont classées dans l'une des six catégories de base : oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérase et ligases.

4.1. Oxydoréductases

Cette classe englobe toutes les enzymes qui catalysent les réactions redox. Le nom recommandé est déshydrogénase dans la mesure du possible, mais la réductase peut également être utilisé. L'oxydase n'est utilisée que lorsque l'O₂ est l'accepteur de la réduction. Le nom systématique est formé selon le donneur : accepteur oxydoréductase. L'oxydation de l'éthanol en aldéhyde avec réduction du NAD⁺ est un bon exemple de ces réactions.

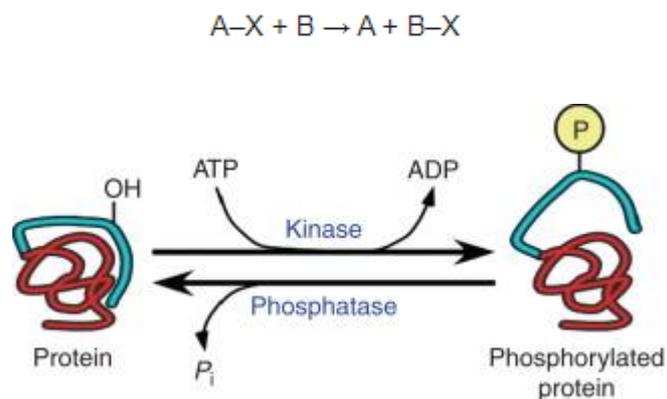


La réduction du pyruvate en lactate avec oxydation du NADH + H⁺ est un autre exemple



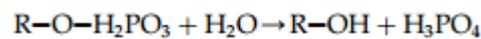
4.2. Transférases

Les transférases catalysent le transfert d'un groupe spécifique, tel que méthyle, acyle, amino, glycosyle, ou phosphate, d'une substance à une autre. Le nom recommandé est normalement la transférase du groupe accepteur ou la transférase du groupe donneur. Le nom systématique est formé en fonction du groupe donneur : accepteur transférase.



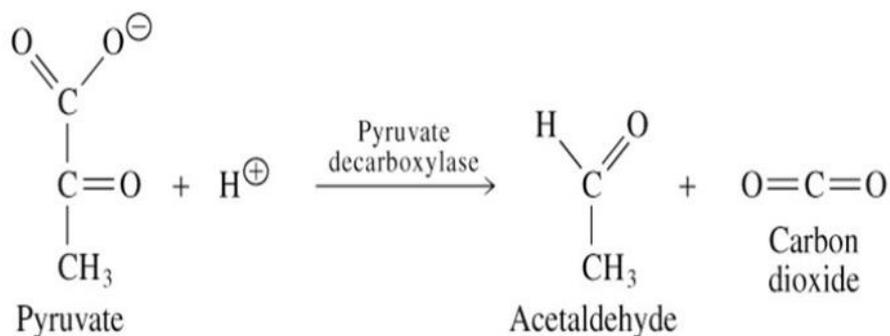
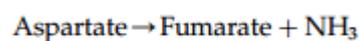
4.3. Hydrolases

Les hydrolases catalysent le clivage hydrolytique de C – O, C – N, C – C et d'autres liaisons. Le nom recommandé se compose souvent simplement du nom du substrat avec le suffixe -ase. Le nom systématique inclut toujours l'hydrolase.



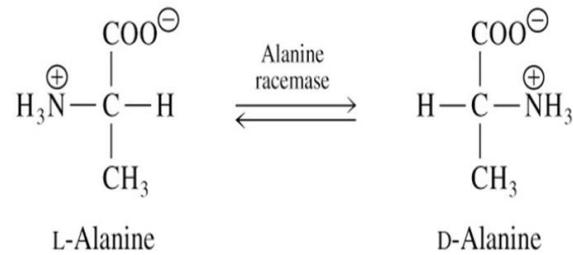
4.4. Lyases

Les lyases catalysent le clivage des liaisons C – C, C – O, C – N et autres par élimination. Le nom recommandé est, par exemple, décarboxylase, aldolase, déshydratase (élimination du CO₂, de l'aldéhyde et de l'eau, respectivement). Le nom systématique est formé selon le groupe substrat-lyase. L'aspartate ammonia lyase (aspartase) catalyse la transformation de l'aspartate en fumarate par élimination d'une molécule d'ammonia (NH₃)

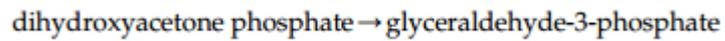


4.5. Isomérases

Les isomérases catalysent les réarrangements géométriques ou structurels au sein d'une molécule. Les différents types d'isomérisation conduisent aux noms racémase, épimérase, isomérase, tautomérase, mutase ou cycloisomérase. L'alanine racémase catalyse la conversion du L-alanine en D-alanine.



Alors que la triose phosphate isomérase transforme la dihydroxyacétone phosphate en glyceraldéhyde-3-phosphate.



4.6. Ligases

Les ligases catalysent la jonction de deux molécules, couplée à l'hydrolyse d'une liaison pyrophosphate dans l'ATP ou un autre nucléoside triphosphate. Le nom recommandé incluait souvent la synthétase, mais la recommandation actuelle est d'utiliser plutôt les noms de type X – Y ligase, pour éviter toute confusion avec le nom synthase (qui ne se limite pas aux enzymes de classe 6). Le nom systématique est formé par X : Y ligase (formant l'ADP).

