

Les enzymes, catalyseurs biochimiques

par R. Drapron

(*Station de biochimie et physico-chimie des céréales de l'I.N.R.A., 91305 Massy*)

Il n'est pas une seule manifestation du monde vivant qui ne procède d'une série de réactions chimiques, d'un mécanisme totalement différent de celui des réactions effectuées par le chimiste organicien. Les transformations réalisées dans les cellules vivantes, ou celles provoquées par les extraits de ces cellules, s'effectuent pour la plupart entre 0 et 40 °C environ. Toutes présentent un caractère commun : elles sont catalysées par des entités organiques.

Avant d'exposer les concepts dont nous disposons pour rendre compte du mode d'action de ces catalyseurs, il nous paraît essentiel de donner un aperçu historique des découvertes importantes qui ont profondément influencé l'évolution des recherches.

La découverte, par Payen et Persoz, en 1833, de la première de ces entités (provoquant l'hydrolyse de l'amidon) a ouvert en chimie biologique une ère nouvelle, comparable par exemple à celle de la synthèse de l'urée réalisée cinq années auparavant par Wöhler.

La naissance de concepts chimiques rigoureux concernant la nature de l'action de ces systèmes biochimiques a eu lieu lors du développement de la théorie générale de la catalyse chimique proposée en 1835 par Berzelius. Celui-ci faisait état, dans son étude théorique, de l'efficacité de la substance découverte deux années plus tôt, efficacité considérablement plus grande que celle d'un catalyseur inorganique (SO_4H_2 , par exemple) dans l'hydrolyse de l'amidon.

Jusqu'au milieu du XIX^e siècle, la découverte de nombreux catalyseurs biochimiques et les renseignements recueillis sur leur action ont conduit à penser que cette dernière était beaucoup plus spécifique que celle des catalyseurs non biochimiques.

A la fin du XIX^e, les connaissances se sont trouvées enrichies de très nombreuses découvertes : réversibilité des réactions, optimum d'action en fonction du pH et de la température, inactivation irréversible par la chaleur, action inhibitrice ou activatrice de divers composés chimiques, notion de co-facteur.

C'est en 1905 qu'Henri, par une étude expérimentale s'appuyant sur la loi d'action de masse, est arrivé à formuler une conception générale des lois à partir desquelles il est possible d'envisager les mécanismes d'action de ces catalyseurs. Il faut attendre ensuite 1922

pour que Willstätter établisse définitivement leur nature protéique et c'est en 1926 que Summer a obtenu le premier à l'état cristallisé.

Depuis cette date, les recherches n'ont fait que s'amplifier et d'abondantes données expérimentales et théoriques se sont accumulées. De nos jours, de nombreux travaux sont consacrés à l'étude de la structure et du mécanisme d'action de ces puissants catalyseurs biochimiques, afin de tenter d'apporter une réponse au problème fondamental qui reste à préciser, à savoir : comment ces substances accomplissent-elles la fonction de catalyse et aboutissent-elles à des réactions hautement spécifiques ?

Tels sont les aspects que nous aborderons, après avoir fait un bref rappel de quelques définitions et précisé les caractéristiques essentielles de ces substances, des points de vue de leurs propriétés, constitution chimique et structure.

Définitions

Ces catalyseurs ont été successivement dénommés : diastases (de diastasis : qui sépare), ferments solubles, puis *enzymes*, terme définitivement adopté qui fait allusion à leur découverte dans les levures (de en : dans et zumé : levain). On désigne sous le nom de *substrats*, les corps transformés.

On donne généralement des enzymes la définition suivante : *ce sont des macromolécules protéiques solubles, thermolabiles, produites par la cellule, jouant le rôle de catalyseurs spécifiques de réactions très diverses.*

A part quelques enzymes qui ont gardé des noms particuliers (trypsine, lysozyme, par exemple), la majorité d'entre elles sont désignées par le nom du substrat sur lequel elles agissent spécifiquement, suivi du nom évoquant le type de réaction catalysée auquel on ajoute le suffixe « ase » : β -D-glucoside hydrolase, provoquant l'hydrolyse des β -D-glucosides ; β -D-glucose : oxygène oxydoréductase, provoquant l'oxydation du β -D-glucose, par exemple.

Caractéristiques catalytiques

Comme tout catalyseur, une enzyme, par sa seule présence, en quantité infime, accélère considérablement la vitesse d'une réaction. L'enzyme, en principe récupérée intacte à la fin de la réaction, peut intervenir de nouveau dans de nombreux cycles de réaction successifs.

Du point de vue thermodynamique, l'enzyme a donc la propriété d'abaisser considérablement le niveau énergétique de la réaction (figure 1) et de faciliter ainsi, l'obtention de l'état d'équilibre, un déplacement de celui-ci étant rigoureusement impossible. La réaction étant en principe réversible, les vitesses des deux réactions inverses sont également accélérées :



Ainsi, les enzymes obéissent aux lois qui régissent l'activité de tout catalyseur chimique mais elles se distinguent de ces derniers par deux caractéristiques importantes :

leur *efficacité* est généralement beaucoup plus grande. A la température de 20 °C, une molécule de lipoxygénase (*), par exemple, oxyde en une seconde

* La lipoxygénase catalyse l'oxydation des acides gras possédant le système de doubles liaisons non conjuguées *cis-cis* 1-4-pentadiène (acides linoléique, linoléique et arachidonique) en donnant un hydroperoxyde.

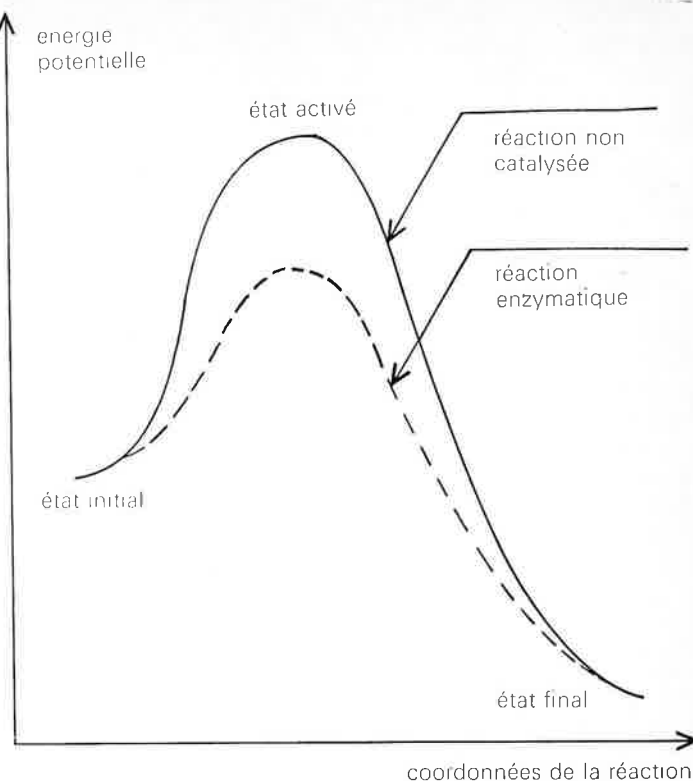
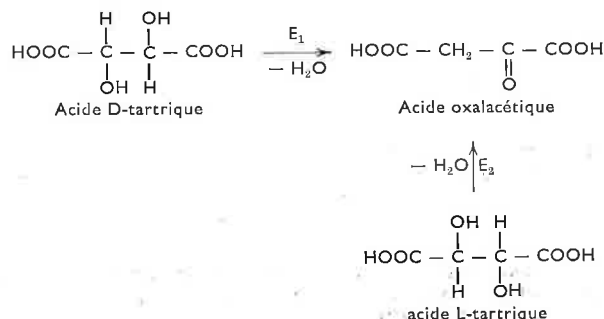


Figure 1.

Une enzyme a pour effet de diminuer l'énergie d'activation nécessaire pour induire une réaction. Elle accroît la vitesse sans que l'état initial et l'état final soient modifiés.

plus de 300 molécules d'acide linoléique, alors que l'oxydation de celui-ci, catalysée par les ions Cu^{++} , est environ 100 000 fois moins rapide (1, 2) ;

contrairement aux catalyseurs chimiques qui peuvent être employés dans diverses réactions mettant en jeu des composés très différents, une enzyme n'est *spécifique* que d'une réaction donnée, ainsi la β -D-glucose : oxygène oxydoréductase ne catalyse que l'oxydation de son substrat, le β -D-glucose. En dehors de cette spécificité d'action, l'enzyme présente une spécificité vis-à-vis du substrat. Il y a spécificité absolue lorsque l'enzyme catalyse la transformation d'une seule espèce chimique à l'exclusion de toute autre, c'est le cas de la β -D-glucose : oxygène oxydoréductase. Dans d'autres cas, l'enzyme peut catalyser la transformation de composés qui possèdent une même configuration stérique ; la β -galactoside galactohydrolase ne catalyse que l'hydrolyse des β -galactosides et non celle des β -glucosides qui ne diffèrent entre eux que par l'orientation du groupe hydroxyle en position 4, les formes α n'étant pas non plus attaquées. Il existe même des enzymes capables de distinguer des isomères optiques dans un mélange racémique ; ainsi, deux enzymes distinctes, catalysent respectivement et spécifiquement la transformation des acides L et D-tartrique pour donner toutes deux de l'acide oxalacétique, optiquement inactif :



Ces observations sur les phénomènes de dégradation sont également valables pour les phénomènes de synthèse. L'addition ou la substitution de groupements sont systématiquement réalisées par l'enzyme de façon telle que le carbone peut devenir asymétrique et que c'est exclusivement soit une forme L, soit une forme D qui est synthétisée. Cette aptitude à une synthèse asymétrique totale, synthèse contre laquelle le chimiste organicien butte encore, constitue une des plus importantes propriétés de la cellule vivante (*).

Cette spécificité vis-à-vis du substrat ne présente pas toujours un caractère aussi strict, certains enzymes peuvent catalyser la transformation de diverses espèces moléculaires appartenant à un même groupe; c'est ainsi que l'enzyme qui catalyse l'oxydation de l'éthanol en aldéhyde provoque également l'oxydation d'autres alcools. Pour d'autres enzymes, agissant en particulier sur des macromolécules complexes, leur spécificité se manifeste par leur aptitude à ne reconnaître qu'un seul type de liaison parmi d'autres de même nature mais d'un environnement stérique différent. C'est le cas, par exemple, de la chymotrypsine qui catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidique des protéines située exclusivement du côté C-terminal de la phénylalanine ou de la tyrosine, toutes deux acides aminés aromatiques ayant un encombrement stérique comparable. Il en est de même de la trypsine qui catalyse spécifiquement la rupture de la liaison située à la droite des résidus arginine et lysine (figure 2).

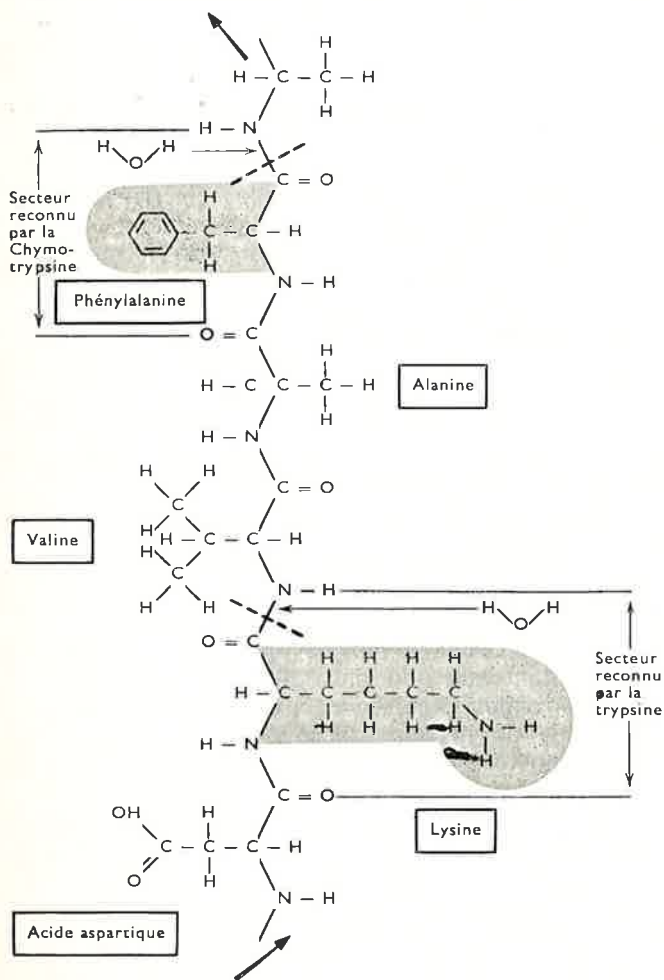


Figure 2. Spécificité d'action de deux enzymes protéolytiques. La chymotrypsine catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidique située à la droite de la phénylalanine. L'action de la trypsine porte sur la liaison peptidique située à la droite de la lysine.

* On consultera avec intérêt l'article de J. P. Vigneron sur l'origine et le développement de l'activité optique sur la terre (L'Actualité Chimique, 1, 1973).

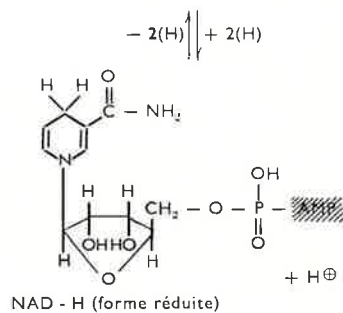
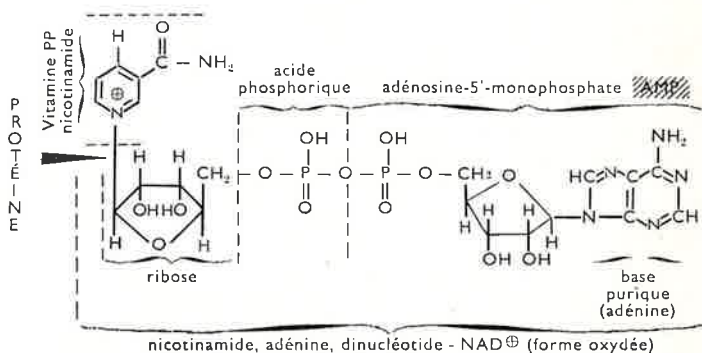
Classification et nomenclature

Leur composition chimique permet de distinguer deux grandes catégories : la première comprend les enzymes constituées d'une protéine pure (*holoprotéine*), la seconde regroupe les enzymes de nature *hétéroprotéidique* qui requièrent, outre une molécule protéique (nommée *apoenzyme*), une molécule plus petite ou un élément métallique (le *coenzyme*) associée à la première. Ce groupe comprend des enzymes du type *nucléoprotéidique* (l'enzyme est alors une protéine associée à un nucléotide), des enzymes du type *chromoprotéidique*

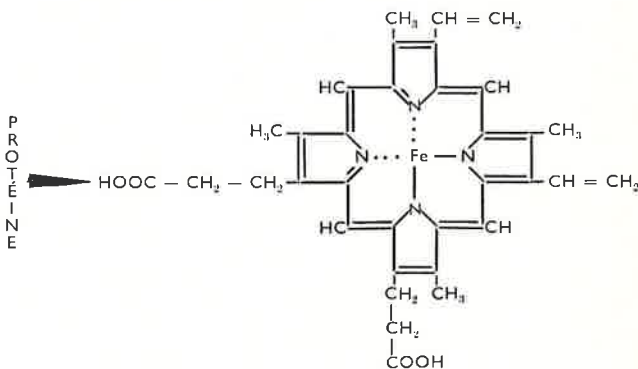
I *Holoprotéines* Protéines pures

II *Hétéroprotéines* Protéine pure (apoenzyme) + coenzyme

1) De type *nucléoprotéidique* Protéine associée à un nucléotide, par exemple, le NAD



2) De type *chromoprotéidique*. Protéine associée à un noyau tétrapyrrolique contenant un atome de Fe



3) De type *métalloprotéidique*. Protéine associée à un élément autre que le fer (Zn, Cu, Mn, Mg, Mo).

Figure 3.

Classification des enzymes.

Les vitamines font souvent partie intégrante des coenzymes nucléotidiques.

Le NAD et son homologue, le NADP (résultant de l'estérification par PO₄H₃, de la fonction -OH portée en 2' par le ribose lié à l'adénine), sont des coenzymes transporteurs d'hydrogène (déshydrogénases) : leur fonction réside uniquement dans la fixation réversible d'hydrogène par l'intermédiaire du noyau pyridinique.

Les coenzymes tétrapyrroliques interviennent dans les transferts d'électrons. Le fer, passant réversiblement de l'état oxydé à l'état réduit, participe activement à ce transfert; ainsi, dans la dernière étape des oxydations cellulaires l'électron accepté par le Fer est cédé à l'oxygène.

(protéine associée à un composé tétrapyrrolique contenant un atome de fer) et enfin, des enzymes du type *métalloprotéidique* contenant un élément autre que le fer (figure 3).

Le coenzyme n'est pas spécifique d'un substrat, c'est la partie protéique, l'apoenzyme qui confère la spécificité à l'enzyme, mais leur association est nécessaire pour induire une réaction. Il intervient chimiquement dans la réaction catalysée et est lui-même modifié, il ne répond donc pas à la stricte définition du catalyseur. Il joue souvent le rôle de transporteur et ne retrouve son état initial qu'à la suite d'une seconde réaction enzymatique au cours de laquelle il cède à une molécule acceptrice le radical ou la particule transportée.

En raison de la multiplicité des réactions impliquées dans le métabolisme d'une cellule, on conçoit qu'il existe un très grand nombre d'enzymes. On l'évalue à plusieurs milliers dans le cas d'une simple bactérie.

Du point de vue nomenclature, la plus rationnelle est celle qui repose sur la distinction entre les grands types de réactions mises en jeu (3). On distingue 6 groupes principaux et à l'intérieur de chacun d'eux existent plusieurs sous-groupes, tenant compte de la nature du substrat transformé, autrement dit, de la spécificité stricte de chaque enzyme :

1. Les enzymes intervenant dans des réactions d'oxydoréduction : les *oxydo-réductases*.

$A \text{ (oxydant)} + B \text{ (réducteur)} \rightarrow A \text{ (réduit)} + B \text{ (oxydé)}$
L'oxydant peut être un coenzyme (soit nucléotidique, soit tétrapyrrolique, soit un atome de métal autre que le fer), l'oxygène, ou un autre accepteur. Le réducteur représente le substrat.

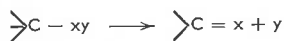
2. Les enzymes de transfert : les *transférases* (possédant un co-facteur nucléotidique). Dans la réaction mise en jeu, un groupement x d'une molécule A est transféré sur une autre molécule B :
 $Ax + B \rightarrow A + Bx$.

3. Les enzymes de scission hydrolytique : les *hydrolases* (ne possédant pas de co-facteur). Une molécule $A - B$ fixe une molécule d'eau sur une liaison, qui se trouve rompue, en donnant deux nouvelles molécules AH et BOH



4. Les enzymes provoquant la formation de doubles liaisons : les *lyases* (possédant un co-facteur nucléotidique).

Un groupement d'atomes y , lié par l'intermédiaire d'un autre groupement x à un atome de C , est éliminé et transféré sur une autre molécule, il se forme une double liaison entre l'atome de C et le groupement x



5. Les enzymes d'isomérisation : les *isomérases* (ne possédant généralement pas de co-facteur).

Une molécule B est transformée en une autre de même formule brute mais de propriétés dissemblables, l'une par exemple est l'inverse optique de l'autre : $B \rightarrow B$.

6. Les enzymes de synthèse, les *ligases* ou synthétases (possédant un nucléotide triphosphate comme co-facteur). Une molécule est greffée sur une autre pour donner une nouvelle molécule :

$A + B \rightarrow AB$. En général leur action exige de l'énergie, fournie par la libération de pyrophosphate.

Structure de la protéine enzymatique

La compréhension du mode d'action des enzymes est liée, pour une grande part, à la connaissance de la

disposition dans l'espace des quelques milliers d'atomes qui constituent ces protéines. La structure complète d'un nombre très restreint d'enzymes est aujourd'hui connue.

C'est ainsi qu'il a été possible de déterminer la *structure primaire*, c'est-à-dire le nombre et l'ordre d'enchaînement des acides aminés de la molécule du lysozyme, enzyme qui a la propriété de détruire les parois des bactéries. La figure 4 montre que la chaîne polypeptidique est constituée par 129 résidus de 20 acides aminés différents (tous de forme L). La molécule se trouve repliée sur elle-même par suite de la présence, à différents niveaux, de 8 molécules d'un acide aminé particulier (la cystéine) qui s'assemblent deux à deux par l'intermédiaire de leur atome de soufre.

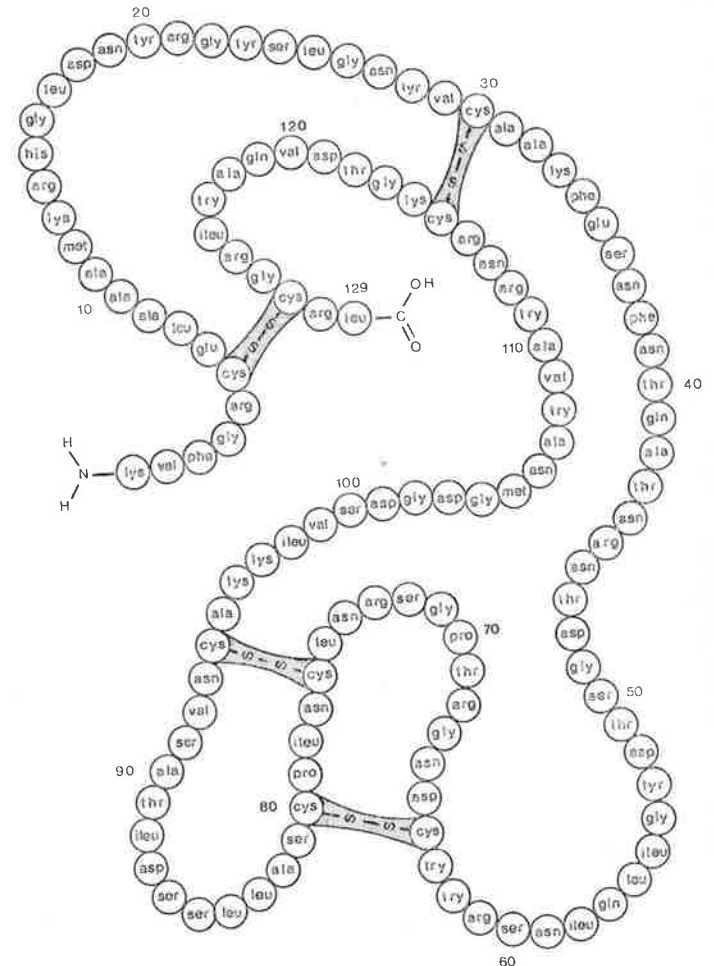
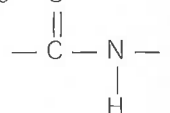


Figure 4.

Structure primaire du lysozyme. Les 20 acides aminés participant à cette structure sont :

Ala : alanine	Gly : glycine	Pro : proline
Arg : arginine	His : histidine	Ser : sérine
Asn : asparagine	Ileu : isoleucine	Thr : thréonine
Asp : acide aspartique	Leu : leucine	Tyr : tryptophane
Cys : cystéine	Lys : lysine	Tyr : tyrosine
Glu : acide glutamique	Met : méthionine	Val : valine
Gln : glutamine	Phe : phénylalanine	

Dans cette structure, le groupe peptidique



est localisé dans un seul plan et les possibilités de rotation sont limitées aux liaisons qui l'encadrent. Or, on sait, à la suite des travaux d'Astbury puis de Pauling, que le nombre de configurations stables possibles des molécules protéiques est pratiquement restreint à deux types principaux que l'on nomme *structures*

secondaires, stabilisées par des liaisons hydrogène, qui limitent le nombre et l'importance des rotations. Le premier type est représenté par deux chaînes polypeptidiques de même sens (β parallèles) ou de sens opposé (β antiparallèles) s'inscrivant dans une forme en feuillets plissés (figure 5).

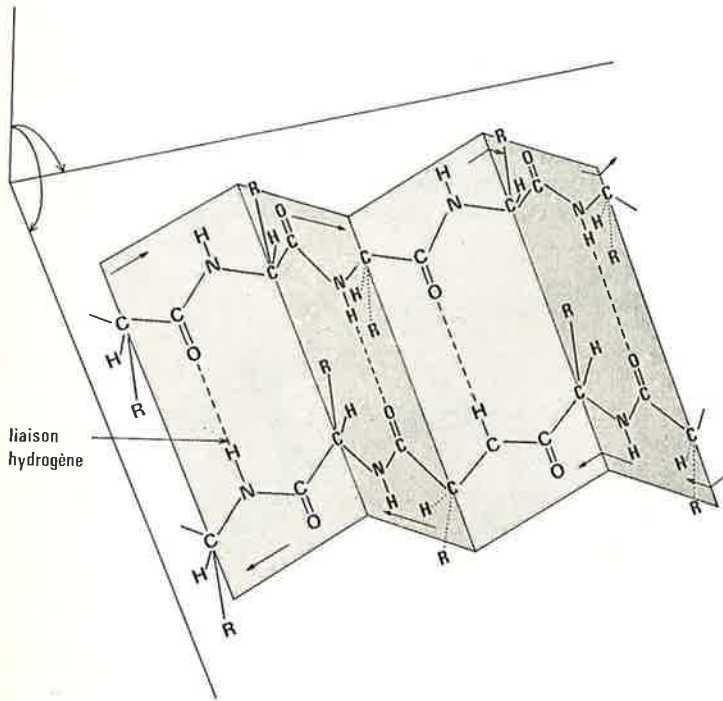


Figure 5.

Représentation schématique de la configuration en feuillets plissés, de deux chaînes polypeptidiques de sens opposés, β antiparallèles.

Le second type de structure est représenté par une chaîne spiralée, dite en hélice α droite (figure 6).

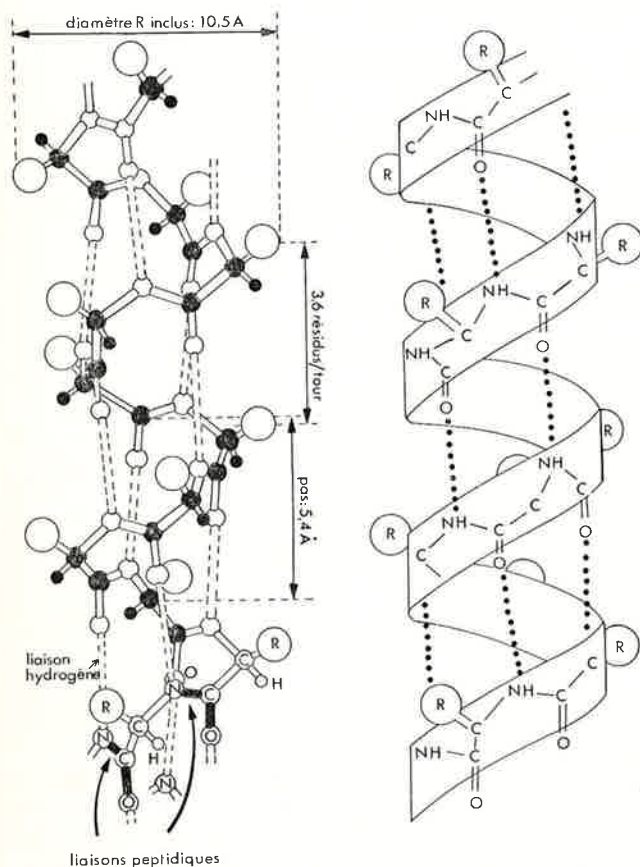


Figure 6.

Représentations schématiques de l'hélice α de Pauling.

Dans chacun de ces deux modèles, établis à la suite d'études cristallographiques, les liaisons hydrogène se créent entre l'oxygène et l'hydrogène des groupes peptidiques appartenant à deux chaînes parallèles ou à une même chaîne spiralée, la position de chaque résidu d'acide aminé ne posant pas de problèmes d'encombrement stérique. Ces régions ordonnées ne représentent qu'une partie de la structure des protéines enzymatiques étudiées jusqu'ici.

La présence de ces segments spiralés et plissés entraîne elle-même de nouveaux repliements de la chaîne protéique qui amènent au voisinage les uns des autres des segments maintenus dans leur position par différents types de liaisons : liaisons covalentes en petit nombre représentées par des ponts disulfure et surtout liaisons non covalentes résultant d'interactions électrostatiques (entre groupes carboxyliques et aminés libres), d'interactions entre résidus apolaires provoquées par leur commune répulsion des molécules du solvant (eau), forces d'attraction de Van der Waals, liaisons hydrogène s'établissant directement entre deux groupes polaires ou par l'intermédiaire d'une molécule d'eau formant pont. Ce sont ces interactions faibles, mais nombreuses, qui stabilisent définitivement la structure, dite *structure tertiaire*, correspondant à un ensemble relativement compact, globulaire, dont la configuration dans l'espace est particulière à chaque enzyme et conditionne leur activité. Un des caractères importants de cette structure réside dans le fait que les groupes latéraux des acides aminés apolaires (hydrophobes) sont tournés vers l'intérieur de la molécule, alors que ceux qui sont polaires (hydrophiles) sont disposés à la surface.

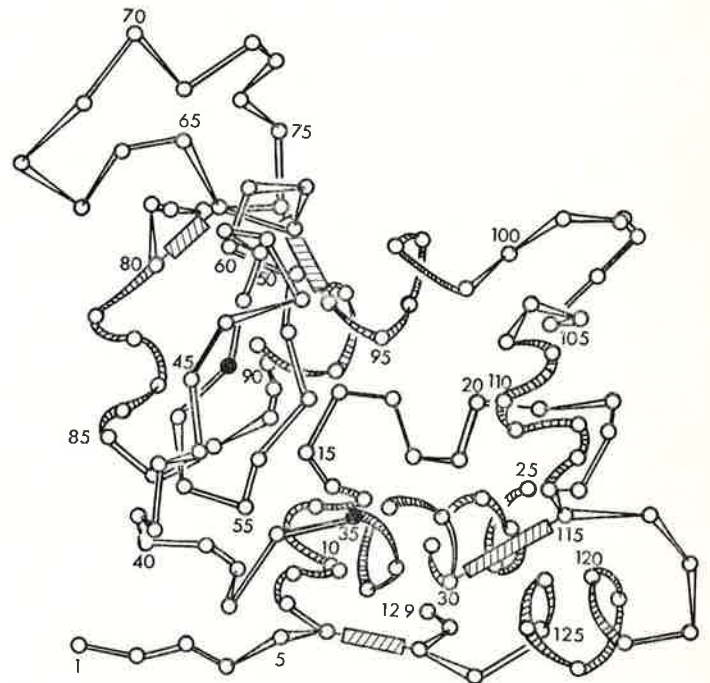


Figure 7.

Représentation schématique de la structure tertiaire du lysozyme. Les groupes catalytiques sont indiqués par les cercles noirs. On distingue plusieurs segments spiralés et les ponts disulfures (rectangles hachurés). Le site de fixation du substrat est bordé par 3 régions hélicoïdales (5-15, 24-34, 88-96) et par une autre région organisée en feuillets plissés anti-parallèles (41-54).

La figure 7 représente l'architecture réalisée dans le cas de la molécule du lysozyme (4) au sein de laquelle, seuls sont indiqués les 4 ponts disulfure contribuant, pour une part relativement faible, à la stabilité de la structure tertiaire. Comme nous le verrons, une telle structure n'est pas définitivement figée dans cet état, car elle est soumise à certains facteurs extérieurs, tels que la température et le pH.

L'activité d'un certain nombre d'enzymes dépend d'une structure d'un ordre supérieur, la *structure quaternaire*, qui est le résultat de l'association spécifique de plusieurs molécules en un édifice, seul capable d'assurer la fonction enzymatique et que les molécules individuelles n'assurent que partiellement.

Mécanismes d'action des enzymes

Combinaison de l'enzyme et du substrat Les lois de la cinétique enzymatique en milieu aqueux dilué

Trois faits expérimentaux sont essentiels pour interpréter la cinétique des réactions enzymatiques : la vitesse d'une réaction enzymatique dépend de la concentration de l'enzyme ; elle dépend de la concentration du substrat ; à concentrations équivalentes, elle dépend de la nature de l'enzyme et du substrat, donc de leur affinité.

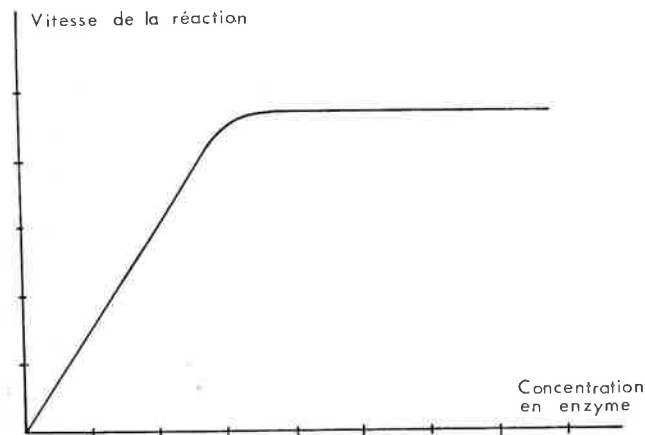


Figure 8. Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse de la réaction enzymatique, la concentration en substrat restant constante.

Ainsi, lorsqu'à une quantité donnée de substrat, on ajoute des doses croissantes d'enzyme, on observe d'abord une vitesse initiale de réaction proportionnelle à celles-ci, puis cette vitesse demeure constante (figure 8), le substrat est alors « saturé » en enzyme. Si, au contraire, on maintient constante la concentration en enzyme en faisant varier celle du substrat, on observe une courbe, dont l'allure, sensiblement hyperbolique, tend vers une limite asymptotique pour des valeurs très élevées de concentration en substrat (figure 9), l'enzyme est alors complètement « saturée » en substrat.

Si les concentrations respectives de l'enzyme et du

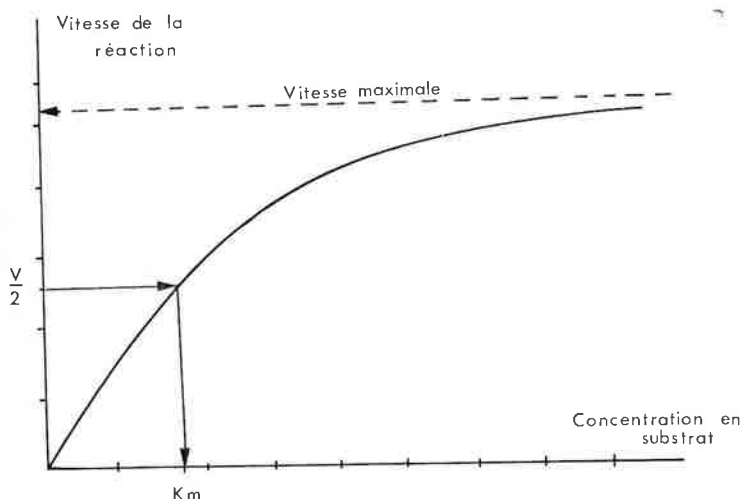
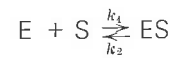


Figure 9. Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de la réaction enzymatique, la concentration en enzyme restant constante.

substrat étaient seules en cause pour régir la réaction enzymatique, à concentrations équivalentes les vitesses devraient être les mêmes, quels que soient l'enzyme et le substrat. Or, il n'en est rien, il y a donc nécessairement intervention des « personnalités » propres de l'enzyme et du substrat : l'action enzymatique dépend donc de leur affinité mutuelle. Ceci conduit à admettre que la réaction enzymatique doit être précédée par une combinaison dissociable de l'enzyme avec son substrat. Ainsi, Henri (5) puis Michaelis et Menten (6) ont représenté le déroulement de la cinétique enzymatique en deux étapes :



1. Il y a d'abord une réaction d'équilibre entre le substrat S + l'enzyme E et la combinaison enzyme-substrat ES, à laquelle correspondent deux constantes de vitesse k_1 et k_2 :

2. Cette réaction est suivie de la dissociation du complexe ES au cours de laquelle le substrat donne naissance aux produits de la réaction P. A la réaction correspond une constante de vitesse k_3 : $ES \xrightarrow{k_3} E + P$. L'enzyme libérée est de nouveau susceptible de réagir avec une autre molécule de substrat. La transformation continue de S en P conduit à la réalisation d'un équilibre dynamique. Il devient alors important d'étudier, non pas les concentrations à l'équilibre (qui n'est pratiquement jamais atteint) mais la vitesse globale de la réaction. On peut appliquer la loi d'action de masse à l'équilibre $E + S \rightleftharpoons ES$ et le calcul aboutit à l'expression :

$$\frac{(E) \times (S)}{(ES)} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = Km$$

Km est assimilée à la constante de dissociation (constante de Michaelis) du complexe enzyme substrat. On la définit comme étant la concentration du substrat pour laquelle, en présence d'une quantité donnée d'enzyme, la vitesse de la réaction atteint la moitié de sa valeur limite (figure 9). Km varie d'une enzyme à l'autre (10^{-6} à 10^{-2} Mole/litre) et l'inverse de sa valeur $1/Km$ représente, en première approximation, l'affinité des deux constituants l'un pour l'autre (*).

Les études récentes de cinétique rapide (on a pu déterminer des valeurs de la constante de vitesse de diverses réactions inférieures à la milliseconde — 1) ont montré qu'il se forme une série de complexes intermédiaires consécutifs, de courtes durées de vie : $E + S \rightleftharpoons ES_1 \rightleftharpoons ES_2 \rightleftharpoons ES_n \rightarrow E + P$. Ce schéma plus compliqué obéit encore à une cinétique de type michaelien. Cette formation d'intermédiaires a pour conséquence de fractionner la barrière d'énergie en une série de barrières beaucoup plus basses, donc plus faciles à franchir, et par suite, d'augmenter la vitesse de la réaction (figure 10).

L'étude cinétique est essentielle pour caractériser les enzymes, définir avec précision une réaction enzymatique et une unité d'activité. Cette dernière est généralement représentée par la quantité d'enzyme, réagissant dans les conditions optimales, qui transforme 1 micromole de substrat par minute. L'activité moléculaire (nombre de rotations) caractérise l'efficacité d'une enzyme pure, elle est représentée par le nombre de molécules de substrat transformé par une molécule d'enzyme, en une seconde, cette activité varie de 10^2 à 10^7 .

* L'affinité réelle est représentée par $\frac{k_1}{k_2}$.

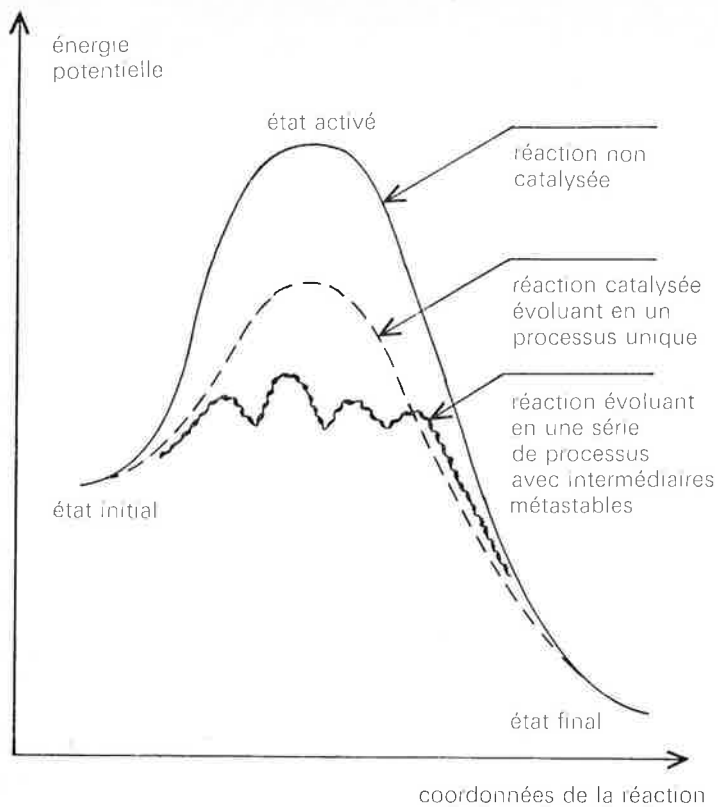


Figure 10. La réaction enzymatique met en jeu plusieurs intermédiaires réactionnels, il y a fractionnement de la barrière d'énergie.

Sites actifs

L'ensemble des connaissances acquises (nature et structure de la protéine enzymatique, existence de complexes enzyme-substrat, spécificité d'action) a permis de concevoir que l'action catalytique ne met en jeu que certains sites stéréospécifiquement définis de la structure de la protéine enzymatique.

Le rôle et la nature de ces sites ont été déterminés pour un certain nombre d'enzymes en faisant appel à différentes méthodes chimiques et physiques : blocage sélectif de certains radicaux d'acides aminés, diffraction des rayons X, hydrolyse ménagée de la protéine par des enzymes protéolytiques spécifiques, utilisation d'analogues structuraux de substrats non transformés par l'enzyme, action d'inhibiteurs spécifiques (7).

On a montré ainsi que les divers groupements du site actif peuvent avoir des rôles différents : ils interviennent soit comme *sites de fixation* du substrat, soit comme *sites catalytiques*.

Dans le cas du lysozyme (4), le substrat (polyside) s'adapte par l'intermédiaire de liaisons non covalentes en plusieurs points privilégiés de la molécule d'enzyme (figure 7). La région du site actif où se fixe le substrat est bordée, d'un côté par le segment de chaîne 41 à 54, organisé en feuilletts plissés antiparallèles et de l'autre par les segments hélicoïdaux 5 à 15, 24 à 34 et 88 à 96. Le substrat étant ainsi fixé, la liaison à rompre se trouve alors en face du site catalytique représenté par les restes d'acides aminés 52 (aspartique) et 35 (glutamique).

Les études thermodynamiques des interactions entre l'enzyme et le substrat montrent que la formation du complexe s'accompagne d'une variation d'entropie, correspondant à la modification réversible de la structure de l'enzyme et à celle de son substrat conduisant à une orientation optimale des groupes catalytiques et à des distorsions dans la géométrie du substrat, favorisant ainsi la catalyse. Plusieurs arguments expérimentaux tendent à montrer qu'au cours

des différentes étapes réactionnelles, il se produit une réorientation continue des groupes catalytiques entraînant des tensions dans le substrat l'amenant à prendre une configuration voisine de celle de l'état activé.

C'est ainsi qu'on a pu montrer que le site de fixation du substrat comporte plusieurs restes d'acides aminés, indispensables à l'activité de l'enzyme. Ce sont les restes des tryptophanes 62, 63 et 108 ainsi que ceux de l'acide aspartique 101 qui interagissent par des forces de liaisons faibles avec des radicaux hydroxyles des chaînons osidiques du substrat. Les spectres de diffraction des rayons X ont montré que ces liaisons provoquent une légère déformation de l'enzyme, prouvant ainsi qu'elles exercent une traction et une distorsion sur le substrat, favorable à l'hydrolyse.

Le mode d'intervention des sites catalytiques a été élucidé dans certains cas. La réaction se décompose généralement en deux étapes : le substrat est d'abord rattaché à un site par une liaison covalente, dans la seconde étape il y a libération du produit et régénération de l'enzyme actif. Pour le lysozyme, par exemple (4), la liaison glycosidique à hydrolyser est celle qui unit un reste acétylmuramique à un reste acétylglucosamine; l'acide glutamique 35 et l'acide aspartique 52 participent de manière déterminante à l'action catalytique (figure 11) : le premier, sous forme anionique, exerce une attaque nucléophile sur le carbone 1 de l'acide acétylmuramique en formant une liaison covalente; le second, agissant sous forme non

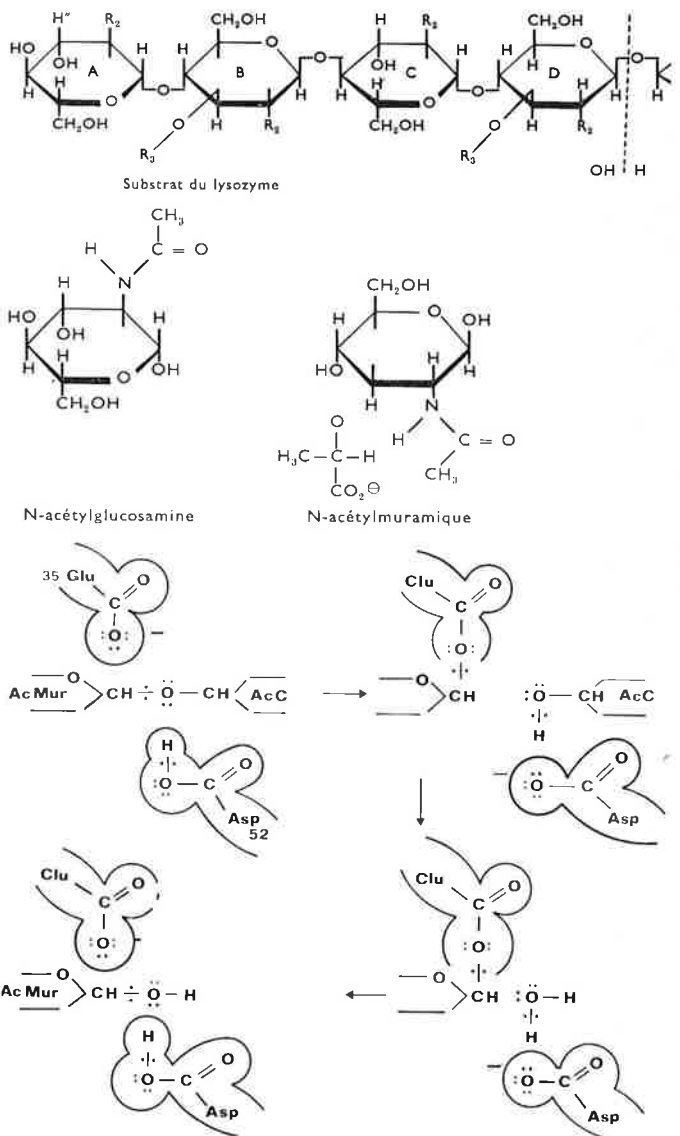


Figure 11. Mécanisme de l'hydrolyse, par le lysozyme, de la liaison glycosidique entre l'acide acétylmuramique et l'acétylglucosamine.

ionisée par une attaque électrophile, attire l'oxygène de la liaison glycosidique et lui cède un proton. Cette liaison étant relâchée, le reste acétylglucosamine se détache en laissant le radical muramique lié à l'enzyme. Une molécule d'eau se substitue alors à l'acétylglucosamine et le déplacement inverse des électrons régénère l'enzyme dans sa configuration initiale en libérant le fragment polyosidique.

Influence de divers facteurs sur la vitesse des réactions enzymatiques

Comme c'est la structure conformationnelle de la molécule protéique qui détermine l'activité enzymatique, toute modification de cette structure par des agents physiques ou chimiques peut entraîner des variations favorables ou défavorables à cette activité. En particulier, les enzymes peuvent subir une dénaturation, c'est-à-dire un dépliement de la chaîne polypeptidique mettant au contact de l'eau tous les résidus hydrophobes masqués à l'intérieur de la structure tertiaire. Une telle modification, généralement irréversible, a lieu sous l'action, en particulier, de la chaleur et du pH et conduit à une inactivation partielle ou totale des enzymes.

Influence de la température

La courbe d'activité de l'enzyme en fonction de la température présente un optimum traduisant un double effet de ce facteur : d'une part, un accroissement de la vitesse de la réaction due à l'augmentation de l'agitation moléculaire; d'autre part, une dénaturation de la protéine (figure 12).

Au voisinage de 0 °C, la vitesse est généralement très réduite. Dans la partie ascendante de la courbe, une élévation de température de 10 °C fait doubler et parfois quadrupler sensiblement la vitesse. Au-delà de la température optimale, variable suivant l'enzyme considérée et le pH du milieu, cette vitesse décroît, puis devient nulle. A 100 °C les enzymes sont en majorité totalement inactivées, un nombre très réduit d'entre elles ne l'étant que partiellement.

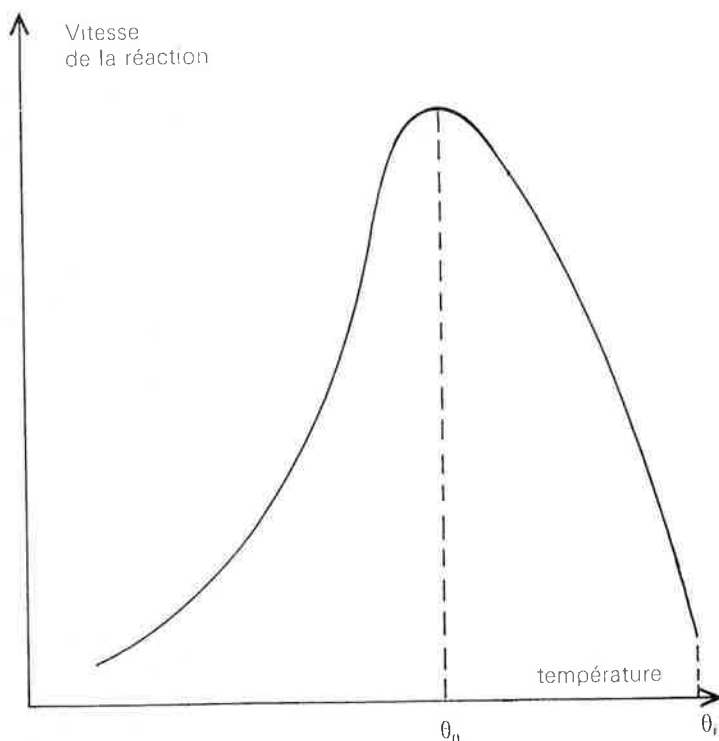


Figure 12. Influence de la température sur la vitesse de la réaction enzymatique (θ_0 = température optimum, θ_i = température d'inactivation).

Influence du pH

Dans la plupart des cas, lorsqu'on étudie la vitesse d'action enzymatique en fonction du pH, on obtient une courbe semblable à celle représentée dans la figure 13 qui permet de définir :

un pH optimum correspondant à une vitesse maximum; deux pH d'inhibition (ou d'arrêt) de la réaction correspondant à des vitesses nulles.

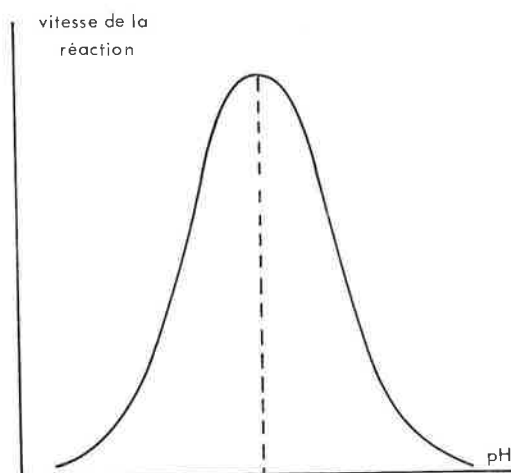


Figure 13. Influence du pH sur la vitesse de la réaction enzymatique.

Le pH optimum varie selon l'enzyme considérée, il atteint les valeurs extrêmes de 1,5 à 2,5 pour la pepsine et de 8 à 10 pour la trypsine. L'effet du pH résulte de causes multiples : influence sur la structure des groupes polaires de l'enzyme ou du substrat par addition ou élimination de protons, interférence avec des réactions d'oxydo-réductions. Ainsi, les changements d'ionisation des groupes polaires des résidus aminoacides provoquent des modifications structurales pouvant amener l'enzyme dans un état conformationnel optimum ou au contraire, sans aller jusqu'à une dénaturation, entraîner la perte de l'aptitude à la fixation temporaire du substrat et l'inhibition de la réaction.

Influence de la teneur en eau

Dans les milieux peu hydratés, lorsque la concentration en eau constitue un facteur limitant, l'activité enzymatique devient fonction de l'affinité pour l'eau des réactants. Cette affinité peut être représentée par l'isotherme de sorption (figure 14) qui relie la teneur en eau à l'humidité relative, autrement dit l'activité de l'eau avec laquelle le produit est mis en équilibre. La tangente au point d'inflexion de la courbe permet de distinguer deux régions : l'une correspondant à une eau n'ayant pas de caractère solvant et fixée par des énergies de liaisons d'autant plus faibles que l'activité de l'eau est plus élevée, l'autre à une eau ayant un degré de liberté important et possédant un caractère solvant.

Pour la majorité des hydrolases, la réaction se manifeste seulement à partir d'une activité de l'eau correspondant à l'apparition d'eau « solvante » dans le milieu et va croissant avec l'importance de celle-ci. Cette eau faciliterait le déplacement des constituants du milieu les uns par rapport aux autres, en particulier les rencontres enzyme-substrat (8).

On ne connaît actuellement qu'une seule enzyme (hydrolytique) susceptible d'exercer son action aux très faibles activités de l'eau, c'est la lipase, enzyme qui provoque l'hydrolyse des liaisons esters du glycérol avec les acides gras à chaînes longues. Ce comportement particulier est dû à l'état liquide du substrat dont la

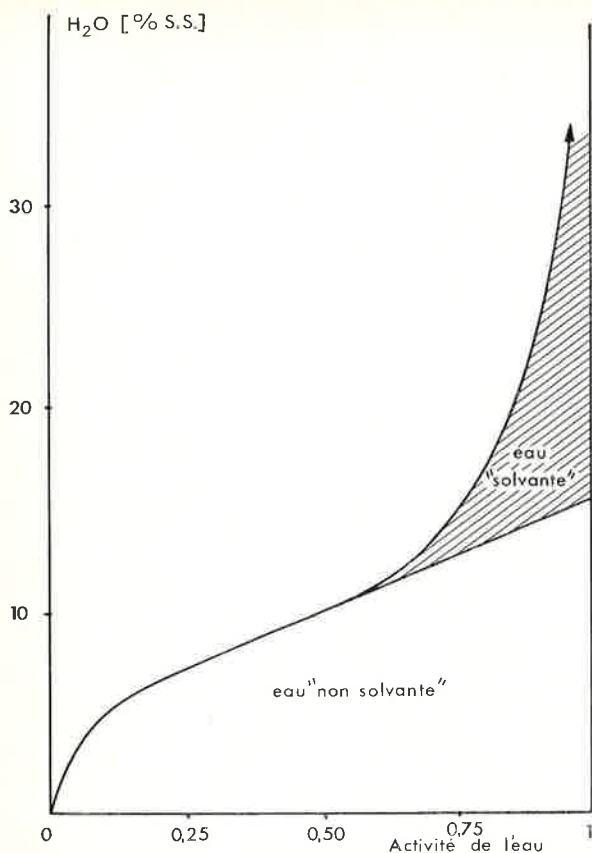


Figure 14.

Isotherme de sorption d'un produit biologique. L'activité de l'eau est caractérisée par l'humidité relative du système en équilibre, l'eau libre ayant, par définition, un coefficient d'activité égal à 1, équivalent à 100 % d'humidité relative (H.R.). A la température T, $H.R. = \frac{p}{p_0}$ = pression de vapeur d'eau en équilibre avec le produit / pression de vapeur d'eau saturante

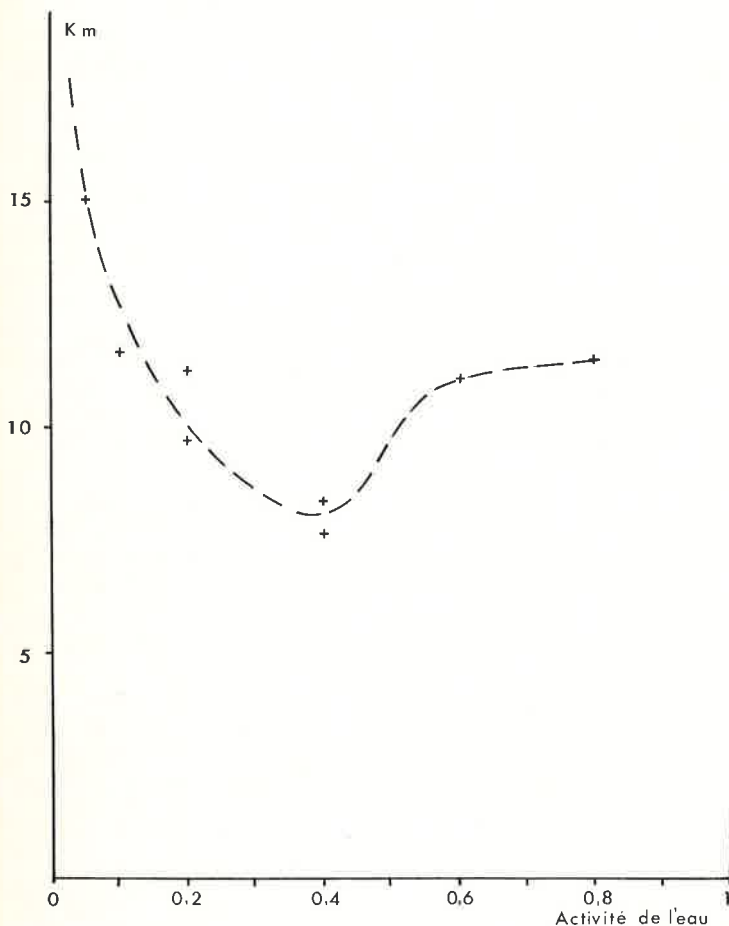


Figure 15.

Évolution du K_m de la réaction de lipolyse. K_m est exprimé en quantité de substrat % de la préparation enzymatique utilisée.

« mobilité » permet le renouvellement des contacts avec l'enzyme, alors que pour les autres hydrolases, c'est l'eau « solvante » qui assure cette fonction.

Aux activités de l'eau très faibles, l'évolution de la lipolyse est linéaire et la droite passe par l'origine. Ceci montre que l'eau la plus fortement fixée, considérée comme participant à la structure conformationnelle active de l'enzyme, ou éventuellement à celle du substrat, est directement impliquée dans la réaction enzymatique. Sa fixation par liaison hydrogène constituerait donc l'étape préliminaire de la catalyse enzymatique (9). En fonction de l'activité de l'eau, la valeur de la constante K_m passe par un minimum, l'affinité de l'enzyme pour son substrat étant par conséquent maximum (figure 15). Aux activités de l'eau inférieures à 0,4 environ, l'hydratation de la protéine enzymatique serait donc insuffisante pour lui assurer une conformation réactionnelle optimum. Aux activités de l'eau supérieures, l'excès d'hydratation générerait la formation du complexe enzyme-substrat du fait de l'hydrophobicité de ce dernier. Avec l'apparition d'eau « solvante », la valeur de K_m reste constante et voisine de celle obtenue en milieu aqueux dilué (9). Ces faits montrent l'importance de l'hydratation sur l'activité des enzymes et constituent une première approche pour préciser les mécanismes mis en jeu dans les interactions protéine enzymatique-eau-substrat.

Effecteurs d'enzymes

On désigne ainsi toute substance qui peut inhiber ou activer une réaction enzymatique en agissant soit sur l'enzyme, soit sur le coenzyme, soit sur le complexe enzyme-substrat, soit encore sur le substrat. Certains jouent un rôle biologique important, en particulier dans la régulation des métabolismes, ils présentent également un intérêt très grand en enzymologie en permettant de préciser les mécanismes de l'action enzymatique. Selon leur modalité d'action, on en définit plusieurs types :

1. L'inhibiteur se fixe sur les sites actifs de l'enzyme, créant entre lui-même et le substrat une véritable compétition. Pour cette raison, l'inhibition produite est dite de *type compétitif*. Il existe une certaine parenté de structure entre le substrat et l'inhibiteur et l'inhibition est réversible. L'exemple le plus classique est celui de l'inhibition de la déshydrogénase de l'acide succinique ($\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH} \rightarrow \text{COOH} - \text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$) par l'acide malonique ($\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$). Une série importante de ces inhibiteurs est constituée par les « analogues » de substrats utilisés souvent comme antimétabolites. Ainsi les sulfamides du type $\text{NH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{SO}_2\text{NH}_2$ sont des analogues de l'acide *p*-aminobenzoïque $\text{NH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{COOH}$ qui fait partie d'un coenzyme, l'acide folique, facteur de croissance de diverses bactéries. Les sulfamides bloquent la synthèse de ce coenzyme au niveau d'une réaction enzymatique ayant l'acide *p*-aminobenzoïque pour substrat, en entrant en compétition avec celui-ci. L'enzyme étant inhibée, les bactéries ne peuvent plus synthétiser l'acide folique et meurent, ce qui explique l'action antibactérienne des sulfamides.

2. L'inhibiteur s'associe à l'enzyme sans être concurrencé par la combinaison enzyme-substrat. L'inhibition est du *type non compétitif*. Ce sont souvent des petites molécules, auxquelles manque la structure caractéristique du substrat, qui interviennent en bloquant un site catalytique, mais permettant toutefois la fixation du substrat. La vitesse des réactions, en particulier la vitesse maximum est abaissée.

3. L'inhibition *irréversible* a lieu lorsqu'une réaction stœchiométrique se produit entre un groupe catalytique et l'inhibiteur. Les ions des métaux lourds, qui forment des complexes avec les bases ou les groupes nucléophiles, suppriment toute activité enzymatique. Tel est le cas des composés organomercuriques qui inhibent les enzymes dont l'activité est liée à la présence de groupes — SH.

Toutes les enzymes possédant un élément métallique comme cofacteur sont inhibées par les composés susceptibles de fournir des complexes plus stables que ceux résultant de l'union du métal avec la protéine ou le coenzyme.

Divers ions des sels minéraux peuvent jouer le rôle d'activateurs. Il est souvent difficile de se prononcer sur leur fonction, soit de coenzyme, soit d'activateur se fixant sur un site particulier et modifiant la configuration de la protéine dans un sens favorable à la catalyse. Ils peuvent également exercer une action au niveau du substrat et ce serait alors le complexe ion-substrat qui réagirait avec l'enzyme.

4. Un dernier type d'effecteurs qui nécessiterait à lui seul un très long développement, est représenté par les *effecteurs allostériques*. L'interprétation de leur action a été donnée en 1965 par Monod, Changeux et Wyman (10). Ces effecteurs sont en général de petites molécules (acides aminés, nucléotides) se fixant sur des sites récepteurs spécifiques, autres que ceux du substrat et intervenant comme activateurs ou inhibiteurs. Ils exercent leur action à distance en modifiant la conformation quaternaire de la protéine enzymatique. Il existe une conformation propre à l'état actif et une conformation propre à l'état inhibé de l'enzyme (figure 16); le passage de l'une à l'autre (transition allostérique) est sous la dépendance de la concentration locale de l'effecteur allostérique.

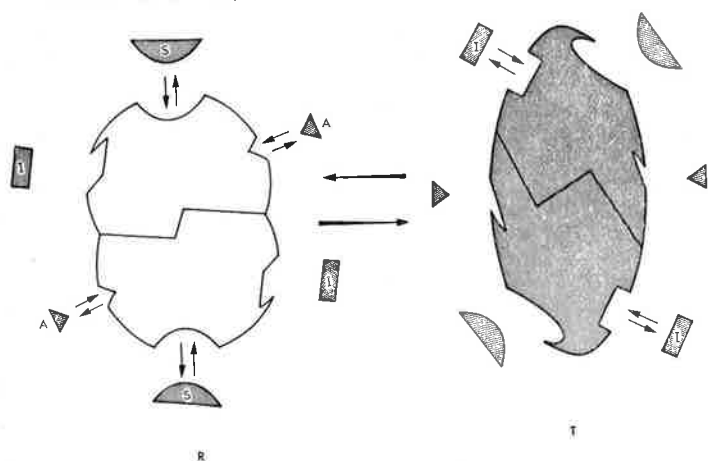
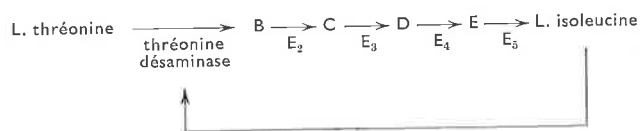


Figure 16.

Représentation idéalisée de l'interaction entre sites multiples. Les enzymes allostériques possèdent deux types de sites : le site actif qui se combine au substrat et catalyse la réaction enzymatique et le site régulateur qui peut se combiner à un activateur ou à un inhibiteur. Ces enzymes sont formées de plusieurs sous-unités identiques (protomères) associées de sorte qu'elles occupent des positions équivalentes, la molécule possédant un axe de symétrie. Il existe deux états de l'enzyme qui sont en équilibre, un état catalytique R et un état inhibé T. Dans l'état R, la conformation de l'enzyme lui permet de se combiner au substrat et à l'activateur; dans l'état T, seul l'inhibiteur peut se combiner. L'équilibre est déplacé suivant que l'on ajoute du substrat ou de l'activateur ou que l'on ajoute de l'inhibiteur. (Koshland *et al.* ont, depuis, proposé d'autres types de modèles qui permettent de préciser les diverses possibilités d'interaction entre les sous-unités sous l'influence d'un substrat) (11).

Ce type particulier d'effecteurs existe chez un certain nombre d'enzymes occupant une position stratégique à divers carrefours importants du métabolisme. Les molécules impliquées peuvent être, soit le substrat, soit un produit

intermédiaire d'une chaîne de transformations, soit encore le produit final de cette chaîne. Elles agissent, soit sur une des enzymes catalysant les étapes intermédiaires, soit sur l'enzyme intervenant dans la dernière étape. Ainsi, par exemple, la L-isoleucine, synthétisée par *E.coli* à partir de la L-thréonine est un inhibiteur de l'enzyme intervenant dans la première étape de la chaîne de transformation :



Les effecteurs allostériques jouent un rôle particulièrement important dans la cellule en tant que régulateurs du fonctionnement des enzymes. Lorsque la cellule a synthétisé une certaine quantité d'une substance, la production cesse par un effet de rétro-inhibition. Lorsqu'il y a insuffisance d'un composé important, un activateur intervient, favorisant la synthèse de cette substance. L'effet coopératif permet à l'enzyme de ne pas transformer un substrat lorsqu'il est présent en faible quantité mais, par contre, de transformer l'excès de substrat au-dessus d'un certain seuil.

Conclusion

Ce tableau, trop rapidement brossé, montre le travail considérable effectué depuis près d'un siècle et demi pour comprendre les mécanismes par lesquels les enzymes exercent leur fonction de catalyse. Seules quelques-unes d'entre elles (lysozyme en particulier, ribonucléase, trypsine) ont livré un bon nombre de leurs secrets. Cependant, les enzymes existent dans la cellule à des centaines d'exemplaires d'espèces différentes, chacune devant être étudiée individuellement; aussi, les travaux à accomplir pour préciser leurs modalités d'action restent immenses.

L'avancement de nos connaissances en enzymologie exige, peut-être plus que dans toute autre branche de la science, une interpénétration des différents secteurs de la recherche (biologie, chimie, physique, physicochimie...). Les données acquises en biologie cellulaire, les possibilités offertes par les méthodes modernes de l'analyse des protéines, de la détermination des structures et d'études de cinétiques rapides, ouvrent un champ d'exploration très vaste pour une connaissance encore plus approfondie de ces puissants catalyseurs. Sans doute, la compréhension de leurs modalités d'action ne nécessite peut-être pas de connaître, obligatoirement, de manière précise, tous les détails de leur structure conformationnelle, des voies d'accès plus directes pouvant être trouvées.

Quoi qu'il en soit, les résultats que l'on peut escompter dans l'avenir aboutiront, vraisemblablement, à des conséquences pratiques importantes dans de nombreux domaines.

Déjà, les connaissances acquises aujourd'hui ont permis le développement et le perfectionnement de plusieurs techniques propres à l'enzymologie : production industrielle d'enzymes diverses à partir de nombreux microorganismes; purification et isolement d'enzymes par des méthodes sélectives, en particulier par la chromatographie d'affinité; fixation des enzymes sur polymères insolubles dans l'eau, permettant leur fonctionnement au cours de nombreux cycles de réactions.

Par ailleurs, l'utilisation des données actuelles sur leurs modalités d'action permet de nombreuses applications :

en chimie analytique, par les réactions hautement spécifiques qu'elles sont capables de réaliser, elles permettent d'une part, non seulement le dosage de tout métabolite, mais également celui de tout composé se comportant comme inhibiteur ou activateur d'une réaction enzymatique (dosage de l'ion Mg^{++} ou d'insecticides comme le D.D.T. par exemple); d'autre part, la détermination de la structure primaire de macromolécules telles que les protéines, les polysides comme l'amidon et le glycogène;

en médecine thérapeutique, pour corriger des déficiences en enzymes entraînant des maladies métaboliques, pour suppléer à la sécrétion en enzymes digestives, ou encore, pour expliquer le mode d'inhibition de réactions par diverses substances utilisées ou non comme médicaments;

en synthèse organique, pour provoquer certaines transformations spécifiques difficiles à réaliser par l'action de réactifs chimiques, hydroxylation et déshydrogénation de stéroïdes par exemple;

en alimentation, pour suppléer ou maîtriser leur action au cours de différents processus de transformations de produits céréaliers (panification, biscotterie, biscuiterie), de fruits (boissons fermentées et jus de fruits), de produits laitiers (lait, fromages, etc...).

Il n'est guère de domaine d'activité de l'industrie humaine qui ne soit tributaire de l'action des enzymes et il n'est pas douteux que l'exploitation des résultats qui vont s'accumuler dans les prochaines années, permettront de maîtriser, ou même de concurrencer la synthèse naturelle des composés biologiques.

Bibliographie

Ouvrages généraux

S. A. Bernhard, *Structure et fonction des enzymes*. Ediscience, Paris, 1969.

P. Boyer, *The enzymes*. Volumes I à V. Acad. Press, Inc., N.Y., 1970-1971.

C.N.E.R.N.A., *Activités enzymatiques et technologie des denrées alimentaires*, C.N.R.S. ed. Paris, 1968.

P. Cuatrecasas, *Affinity chromatography of macromolecules*, in *Adv. in enzymology*, 1972, vol. 36. M. Dixon et E. C. Webb, *Enzymes*, Longman, Green, ed. London, 1964.

M. Eigen et G. G. Hammes, *Elementary steps in enzyme kinetics*, in *Adv. in enzymology*, 1963, vol. 25.

M. Florin et E. H. Stotz, *Comprehensive Biochemistry*, section III, vols 12-16. *Biochemical reaction mechanisms*, Elsevier Publishing Co, Amsterdam, 1964-1966.

J. Goodwin, I. Harris et B. Hartly, *Structure and activity of enzymes*, Acad. Press, London, 1964.

C. G. Guilbault, *Enzymatic methods of analysis*, Pergamon Press, 1970.

F. F. Nord, *Advances in enzymology* (séries annuelles partant de 1941), Interscience publishers.

L. Pauling, *The nature of chemical bond*, Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 1960.

J. L. Webb, *Enzyme and metabolic inhibitors*, Vol. I-III, Acad. Press, Inc., N.Y., 1963-1966.

J. Yon, *Structure et dynamique conformationnelle des protéines*, Hermann ed., Paris, 1969.

Références particulières

1. H. Theorell, R. T. Hollman et A. Ackeson, *Acta Chem. Scand.*, 1947, **1**, 571-576.

2. A. L. Tappel, in *Enzymes*, Acad. Press, 1963, **8**, 275-283.

3. M. Florin et E. H. Stotz ed., *Comprehensive Biochemistry*, section III, vol. 13, *Enzyme nomenclature*. 1965. Elsevier Publishing Co, Amsterdam.

4. D. C. Phillips, *Scientific American*, 1966, **215**, 78-90.

5. V. Henri, *Thèse*, Paris, 1905.

6. L. Michaelis et M. L. Menten, *Biochem. Z.*, 1913, **49**, 333.

7. R. A. Laursen et F. H. Westheimer, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 3426.

8. R. Drapron et A. Guilbot, *Ann. Techn. Agr.*, 1962, **11**, 4, 275-317.

9. R. Drapron, *Ann. Techn. Agr.*, 1973 (sous presse).

10. L. Monod, J. Wyman et J. P. Changeux, *J. Mol. Biol.*, 1965, **12**, 88.

11. D. E. Koshland, G. Nemethy et D. Filmer, *Biochemistry*, 1966, **5**, 365.