

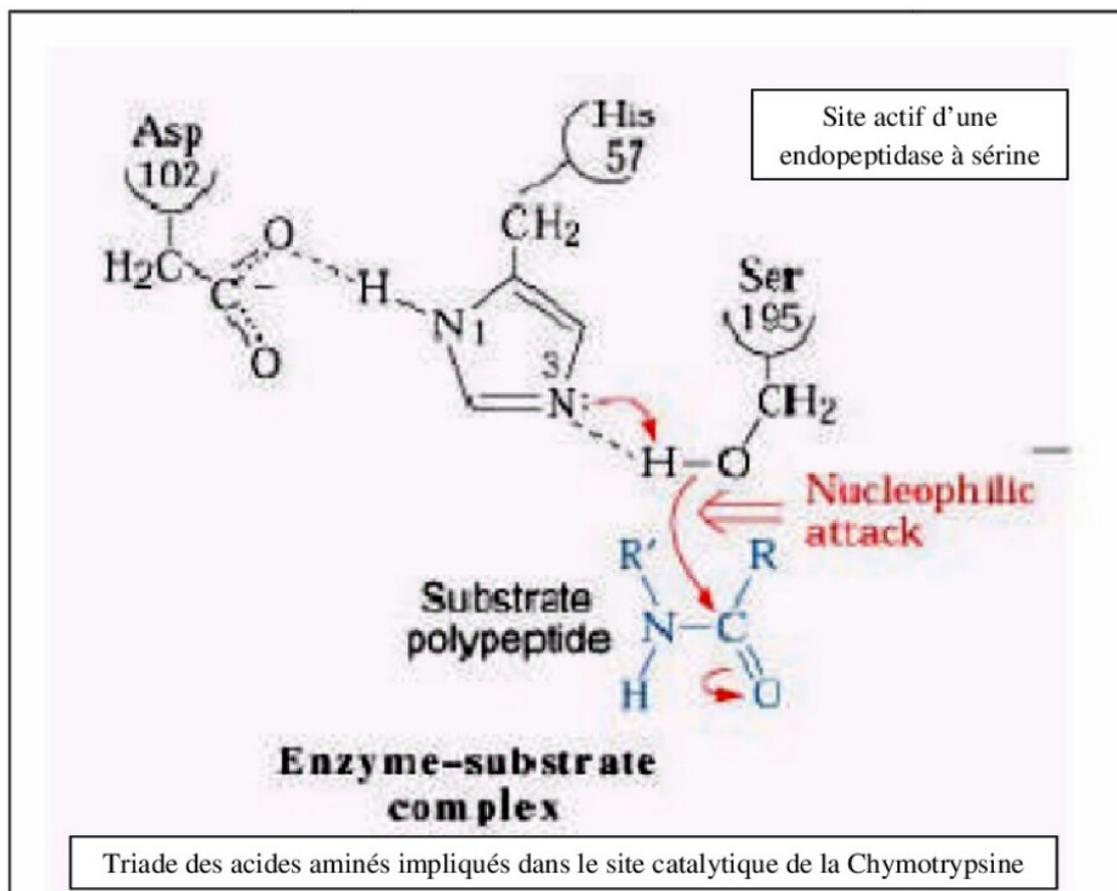


FACULTE DES SCIENCES APPLIQUEES

Module 21 : Enzymologie et Biochimie Métabolique

COURS D'ENZYMOLOGIE SV4

PARTIE 1



ENZYMOLOGIE – rappel de cours

1- Introduction :

Les enzymes sont des macromolécules protéiques douées d'activité catalytique. Ce sont des biocatalyseurs des réactions biochimiques qui se déroulent au sein de la cellule. Elles agissent dans certaines conditions, à très faibles concentrations en accélérant considérablement les réactions biochimiques et du métabolisme. Chaque enzyme reconnaît spécifiquement une seule molécule de substrat et ne catalyse qu'un seul type de réaction.

Les réactions biochimiques se déroulent dans des systèmes biologiques caractérisés par un milieu aqueux et une température fixe (en général 37 à 40 °C, parfois une température ambiante 25°C). Dans ces conditions, les enzymes agissent en diminuant l'énergie d'activation nécessaire pour le déroulement de la réaction biochimique. La reconnaissance Enzyme-Substrat se fait au niveau d'un site particulier très restreint au niveau de l'Enzyme (spécifique au Substrat) appelé site actif.

Pour qu'elle soit fonctionnelle, l'enzyme doit au moins présenter la structure tridimensionnelle tertiaire (organisation en forme spatiale au niveau de laquelle les acides aminés polaires sont en surface et les acides aminés apolaires sont vers l'intérieur en zones hydrophobes). Une enzyme peut s'organiser en structure quaternaire (sous forme de plusieurs sous-unités protéiques dites oligomères) et être soumise à régulation. A la fin de la réaction, l'enzyme se retrouve intacte (inchangée) et prête pour recevoir une nouvelle molécule de Substrat.

2- Définitions et propriétés générales :

Enzyme : C'est une protéine présentant des propriétés de catalyse spécifique d'une réaction Biochimique du métabolisme de l'être vivant qui la produit. Cette protéine est régulée (activité contrôlée).

Catalyseur : C'est un composé intervenant dans une réaction chimique sans être modifié. Il a pour rôle d'accélérer la réaction chimique sans modifier son équilibre.

Substrat : Molécule reconnue par l'enzyme et transformée au cours d'une réaction enzymatique. C'est la molécule qui se lie au site actif et sur laquelle l'enzyme va agir.

Produit : molécule transformée (produite) au cours de la réaction enzymatique.

Les enzymes se caractérisent par leur spécificité : **a)- d'action** : ne catalysent qu'un seul type de réaction dont elle est spécifique ; **b)- de substrat** : chaque enzyme est spécifique d'un substrat (parfois même on a une stéréospécificité) et **c)- par leur pouvoir catalytique** soumis à régulation (activation ou inhibition).

Cofacteurs : Certaines enzymes sont actives par eux même sans autres groupes fonctionnels. D'autres nécessitent la participation de molécules non protéiques appelées cofacteurs indispensables pour la catalyse. Ils peuvent-être des **ions métalliques** appelés **activateurs** (Ex. : Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , ...etc. dans le cas des métalloenzymes) ou des **Coenzymes** ou les deux à la fois. Ces ions peuvent agir au site catalytique, servir de site de liaison au substrat ou comme agent de stabilisation de la forme active de l'enzyme.

Coenzyme : sont des molécules Bio-organiques indispensables à l'enzyme pour son action catalytique. Elles peuvent-être **libre** (= mobiles) lorsqu'elles ne sont pas liées à l'enzyme par une liaison covalente. Dans ce cas elles agissent dans la réaction catalysée de façon stœchiométrique. Elles dérivent le plus souvent de vitamines ou de facteurs de croissance et dont l'apport par l'alimentation est nécessaire. Ils agissent à faibles doses et sont des composés indispensables au métabolisme car ne sont pas synthétisés par l'organisme (les principales coenzymes seront développées en **Partie 2** de ce cours).

- **Les coenzymes liées** : dans ce cas, ils sont appelés **groupements prosthétiques** liés à l'enzyme de façon covalente (exemple des **fer-tetrapyrroles** dans le cas des cytochromes ou les Flavoprotéines liées au FMN ou au FAD). Elles interviennent dans la réaction de façon **catalytique (liées à l'Enzyme)**.

- **Les coenzymes libres** s'associent au moment de la catalyse à la partie protéique de l'enzyme E appelée « **apoenzyme** » pour former le **complexe fonctionnel** apoenzyme-coenzyme (E-Co) dit **Holoenzyme**. C'est sous la forme **d'holoenzyme** que l'enzyme acquiert une spécificité pour son substrat.

- **Ligand** : Molécule chimique capable de se lier spécifiquement à une région de la Protéine.

- **Apoenzyme** : la partie protéique seule = c'est l'enzyme inactive proprement dite.

- **Holoenzyme** : l'ensemble apoenzyme + cofacteur → enzyme complète.

- **Activité catalytique** : l'**U.I.** d'activité enzymatique est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 μmol de Substrat/minute.
- **Activité spécifique** : s'exprime en UI d'activité enzymatique par mg de protéine et elle est liée à la pureté de l'enzyme et permet de la suivre.
- **Activité enzymatique moléculaire** : C'est l'activité enzymatique par nombre de moles de molécules de l'enzyme.
- **La catalyse** : Les enzymes sont des biocatalyseurs de nature Protéique. Elles respectent strictement les lois de la catalyse: L'enzyme ne figure pas quantitativement parmi les produits de la réaction, elle n'est donc pas consommée par celle-ci et chaque molécule d'enzyme peut théoriquement provoquer la transformation d'un nombre illimité de molécules de substrat. L'enzyme ne modifie pas la nature de la réaction, ni son équilibre, ni son bilan thermodynamique. Mais l'enzyme accélère la vitesse de la réaction.
- **Pouvoir catalytique** : leur **taux de réaction est plus élevé**. Les enzymes ont un pouvoir catalytique de 10^6 à 10^{12} fois supérieur aux réactions non catalysées, et de plusieurs ordres de grandeur supérieur aux réactions catalysées par des réactifs chimiques.
- **Energie d'activation basse** : Les **réactions enzymatiques** se font dans des **conditions** relativement **douces** (pH neutre, basse température, ... etc.). Les enzymes abaissent en effet l'énergie d'activation d'une manière plus importante qu'un catalyseur.
- Les réactions enzymatiques sont **très spécifiques**, à la fois pour le substrat (absolu ou large ou parfois même une stéréospécificité pour le substrat) et pour le type de réaction. La réaction est efficace à 100% et ne génère normalement pas de produits secondaires.
- Elles agissent à **très faibles doses**.
- Les réactions enzymatiques peuvent être **modulées (contrôlées)**. La **régulation** de l'activité enzymatique peut s'effectuer (de façon allostérique) par des effecteurs allostériques, par des protéines régulatrices, par une modification covalente de l'enzyme, par une activation protéolytique, par la quantité d'enzyme produite, par une régulation hormonale...etc.
- Les **activateurs** augmentent l'activité, les **inhibiteurs** la diminuent ce qui permet d'ajuster la vitesse globale du métabolisme au besoin cellulaire.
- Les enzymes sont classées selon un système international qui attribue pour chacune un code à 4 chiffres (voir partie 2 de ce cours).

3- La catalyse enzymatique :

3.1- - Site actif et formation du complexe Enzyme-Substrat :

Le site actif d'une enzyme est une région restreinte de l'enzyme dans laquelle s'effectue la catalyse. Elle correspond à une petite cavité au sein de l'enzyme à l'intérieur de laquelle règne un microenvironnement spécifique et occupant un petit volume par rapport au volume total de l'enzyme (moins de 5%). Il comporte des groupements réactifs permettant, la reconnaissance du substrat et sa fixation de façon stéréospécifique et les groupements catalytiques (les acides aminés) responsables de la transformation du Substrat en Produit P et du déroulement de la catalyse. Toute modification structurale du site actif engendre un arrêt de la catalyse par formation d'enzymes inactives. Ce site assure deux fonctions : **1/- reconnaissance, attraction et fixation du Substrat ;**

2/- Catalyse et transformation du Substrat en Produit P.

Ce site actif s'adapte parfaitement et étroitement à la molécule de Substrat. Ceci traduit la spécificité très élevée des réactions enzymatiques : il existe une complémentarité géométrique et physique entre site actif de l'enzyme et le substrat. Le substrat se fixe au site actif par des interactions faibles (Van der Waal, électrostatiques, ponts hydrogènes et hydrophobiques). Les interactions enzyme-substrat sont spontanées : ne nécessitent pas d'énergie; elles passent par une étape de reconnaissance très spécifique, l'attraction et ensuite la fixation.

Ce site actif est subdivisé en 2 parties :

- **a- Site de liaison, fixation, et reconnaissance** : Reconnaît la complémentarité de forme avec un substrat spécifique de l'enzyme ;
- **b- Site catalytique** : Permet la réaction transformant le substrat en produit ; Il comprend 3 types d'acides aminés :

1- Acides aminés contributeurs :

Permettent à la protéine enzymatique d'adopter une conformation spatiale pour que le substrat (ligand) puisse s'adapter à la protéine.

2- **Acides aminés auxiliaires** : Assurent la mobilité des zones situées au voisinage du centre actif.

4- **Acides aminés de contact** : Lieu de la réaction enzymatique. Fait intervenir des groupements particuliers de ces acides aminés de contact qui interagissent avec un ou plusieurs groupements particuliers du substrat. Parfois et souvent, les coenzymes interviennent aussi dans le mécanisme catalytique au site catalytique.

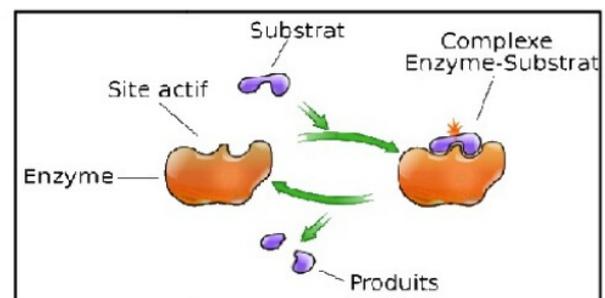
Par-ailleurs, les sites actifs présentent **les caractères généraux suivants** :

- Le site actif occupe une part relativement réduite du volume total d'une enzyme (la majorité des enzymes ont plus de 100 résidus AA ou 10kDa avec un diamètre de plus de 25 Å) ;
- Le site actif est une entité tridimensionnelle ;
- Les substrats sont liés aux enzymes par des forces relativement faibles ;
- Les sites actifs sont des fissures ou des crevasses (cavités) créant un microenvironnement où certains résidus acides aminés acquièrent des propriétés particulières essentielles pour leur rôle catalytique.
- La spécificité de liaison dépend de la disposition précisément définie des atomes dans le site actif.

La formation du complexe enzyme-substrat est la 1^{ère} étape de la catalyse enzymatique. La réaction enzymatique passe par l'étape de fixation du substrat au site actif. Ce dernier doit-être dans une conformation spatiale telle que le substrat puisse s'y fixer. Deux modèles sont proposés pour expliquer la formation du Complexe Enzyme-Substrat :

• **Modèle de Fischer : appelé aussi adaptation clé-serrure :**

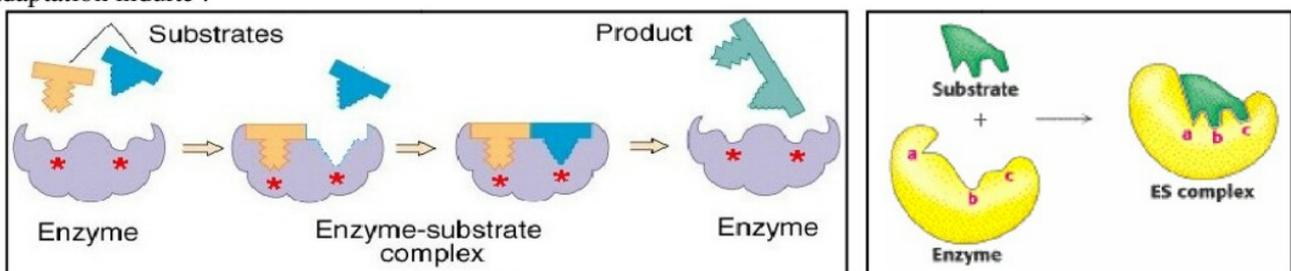
Selon ce model, le site actif est déjà préformé et existe au niveau de l'enzyme en surface ou en cavité (hypothèse clé-serrure). La formation du complexe enzyme-substrat [ES] nécessite une interaction entre un ou plusieurs groupes fonctionnels du substrat avec des motifs de la cavité enzymatique. Il explique la spécificité de l'Enzyme pour son substrat mais il n'explique pas l'effet des effecteurs.



Model d'adaptation clé-serrure selon Fischer

• **Modèle de Koshland : ajustement induit ou « induced fit » :**

La structure élastique (flexible) des Protéines permet une adaptabilité au substrat; l'association enzyme-substrat est permise après une modification de la conformation de l'enzyme induite par l'entrée partielle du substrat. Selon ce model, le site actif est au départ déformé et non adapté au substrat (flexible) mais l'approche du substrat induit des changements de conformation au niveau du site actif qui s'adapte donc au substrat. C'est le model dynamique de l'adaptation induite :



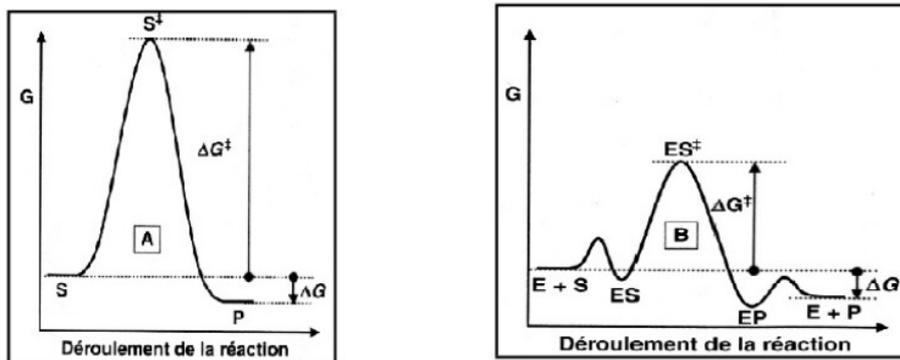
Model d'ajustement induit proposé par Koshland

Après l'action catalytique de l'enzyme et la libération du substrat, l'enzyme libre retourne à sa conformation initiale de départ. Ce model est plus proche de la réalité et permet d'expliquer certains aspects liés aux effecteurs allostériques. En présence d'un activateur allostérique, l'enzyme peut adopter une conformation spatiale qui serait favorable à l'interaction enzyme -substrat d'où l'accélération de la vitesse de la réaction enzymatique.

3.2- Energie d'activation et théorie de l'état de transition :

Les enzymes ne modifient pas le bilan d'énergie des réactions ni l'équilibre thermodynamique. Pour une réaction de transformation $S \leftrightarrow P$, l'énergie libre réactionnelle ΔG reste la même qu'elle soit ou non catalysée par une enzyme. La vitesse de la réaction dépend de la température et de la différence d'énergie entre le substrat S et l'état de transition $[ES^*]$ appelé énergie libre d'activation de Gibbs : $\Delta G^* = G_{\text{état de transition}} - G_{\text{Substrat}}$

- Selon cette théorie, pour que la réaction biochimique se produise et transformer $S \rightarrow P$, il faut que les molécules de substrat acquièrent une énergie suffisante pour atteindre le seuil d'activation ΔG^* appelé état de transition. La vitesse de la réaction dépend en réalité de la concentration des molécules de Substrat ayant atteint ce seuil d'activation ou cette barrière d'énergie appelée **état de transition**.
- L'énergie libre d'activation ΔG^* représente la quantité d'énergie nécessaire, à une température donnée, pour amener toutes les molécules d'une mole de S à l'état transition.
- La combinaison de l'Enzyme au Substrat permet de créer un état transitoire [ES] dont l'énergie atteint facilement le seuil d'activation ΔG^* largement inférieur à celui nécessaire pour la réaction non catalysée. Ainsi les catalyseurs accélèrent la vitesse de la réaction en abaissant l'énergie d'activation.
- La catalyse par l'Enzyme diminue donc l'énergie libre d'activation ΔG^* mais l'énergie libre de la réaction reste inchangée (le bilan énergétique global de la réaction reste inchangé).

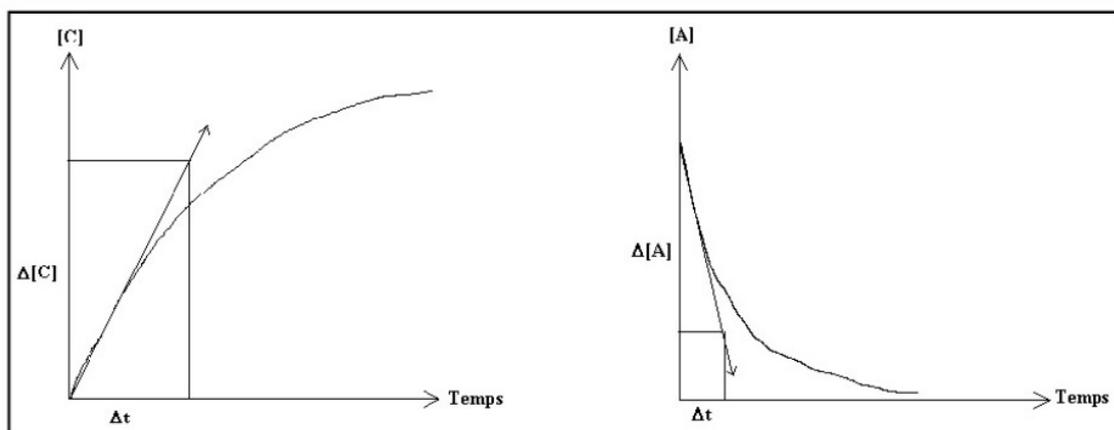


Energie libre d'activation en absence (à gauche) et en présence d'Enzyme (Biocatalyseur) (à droite)

4- Cinétique de la réaction enzymatique :

L'étude de la cinétique enzymatique consiste à étudier la vitesse de la réaction lorsqu'on fait varier les différents paramètres dont elle dépend. Elle a pour but d'obtenir des informations sur les mécanismes de ces réactions. La cinétique de l'action enzymatique fut d'abord éclaircie par le postulat selon lequel l'enzyme se combine réversiblement avec son substrat pour former un complexe intermédiaire **enzyme-substrat**. L'isolement des complexes enzyme-substrat en quantité suffisante a permis des études plus poussées de la cinétique enzymatique.

4.1- Vitesse initiale de réaction :



La vitesse d'une réaction chimique est définie par la quantité de substances transformées ou de produit formé par unité de temps (en général en min ou en s). Plusieurs facteurs influencent sur la vitesse de la réaction (la concentration, la température, le pH et la présence de catalyseurs...etc).

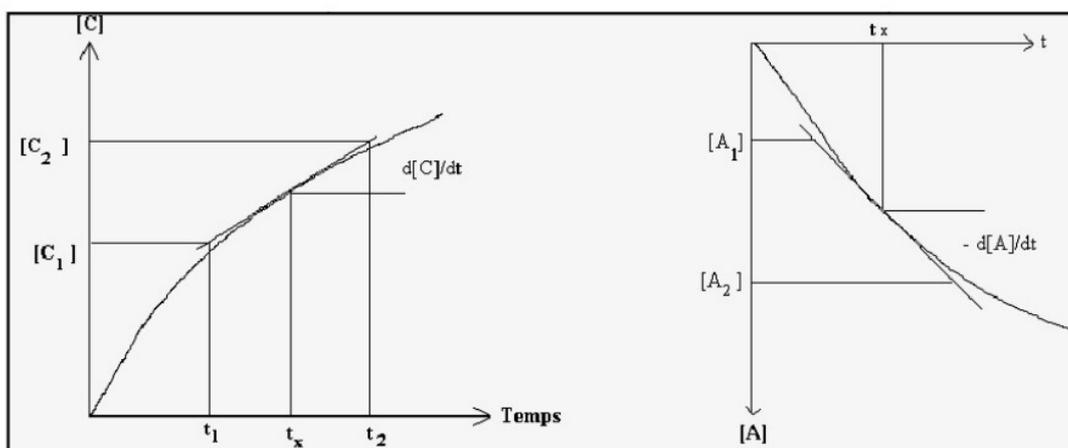
Soit la réaction suivante : $A + B \longrightarrow C + D$ où A et B sont des réactifs et C et D des produits

Si on suit l'évolution (variation) de la quantité du produit C formé ou du réactif A transformé au cours du temps, on obtient les courbes de vitesse de réaction ci-dessus représentées en haut. Il est bien évident que la quantité des réactifs diminue au cours du temps (courbe descendante) alors que celle des produits augmente (c. ascendante). La vitesse initiale V_0 (= vitesse de la réaction au temps $t=0$ s) est mesurée (donnée) par **la pente de la tangente** (droite) à la courbe au temps $t = 0$. Cette pente n'est autre que la valeur $\text{tg } \alpha$, α étant l'angle formé entre l'axe des abscisses et cette droite (tangente) :

$$V_0 = \Delta C / \Delta t = (C_1 - C_0) / (t_1 - t_0) = - \Delta A / \Delta t = - (A_1 - A_0) / (t_1 - t_0)$$

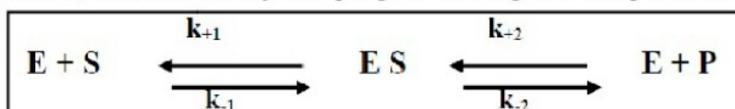
4.2-Vitesse instantanée de la réaction :

La vitesse de la réaction varie le plus souvent entre son début et sa fin. A chaque instant t, on peut définir une vitesse instantanée qui est égale à **la pente de la tangente à la courbe de vitesse au point correspondant à ce temps t**.



4.3- Cinétique enzymatique à un seul substrat :

Considérons la réaction enzymatique **d'ordre 1** : $S \rightarrow P$. Si on met une petite quantité d'Enzyme en présence d'un excès de Substrat S, la réaction enzymatique peut-être représentée par le model suivant dit de Michaelis-Menten :



Dans ce model, bien qu'au départ on a une enzyme et un substrat, la réaction est **considéré de 1^{er} ordre** puisque la molécule de l'enzyme est obtenue intacte (régénérée) à la fin de la réaction.

k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} et k_{-2} sont des constantes de vitesses spécifiques.

Michaelis et Menten ont émis l'hypothèse selon laquelle le déroulement de la réaction enzymatique au cours du temps se fait selon le diagramme ci-dessous où S est le substrat et P le Produit :

Le déroulement de la réaction en fonction du temps peut-être représenté comme suit :

4.3.1- Phases de la réaction : on peut distinguer selon ce model, les trois phases distinctes suivantes :

a- **Phase Pré-stationnaire (PPRS)** : Pendant cette phase commence l'interaction E-S avec début de formation du complexe [ES] ainsi que la formation des 1^{ères} molécules de P. Cette réaction est si rapide (durée de l'ordre de milliseconde) qu'il est très difficile de la suivre sans appareillage spécial. Durant cette phase la concentration de [P] varie peu et peut-être considérée comme négligeable devant [S] alors que [ES] ne l'est pas (Figure ci-dessous).

b- Phases stationnaire (PS) : dite aussi phase de vitesse initiale V_0 où la vitesse reste constante. Pendant la phase pré-stationnaire, la $[ES]$ augmente jusqu'à atteindre à la fin de cette phase une valeur maximale pour laquelle sa vitesse de formation est exactement équilibrée par sa vitesse de décomposition. On atteint donc, un état stationnaire où $d[ES]/dt = 0$, et où la quantité de produit formé par unité de temps est constante (une droite) et la cinétique est d'ordre zéro. Durant cette phase, la quantité d'enzyme étant constante et le substrat en large excès, la concentration du complexe $[ES]$ demeure constante ainsi, par conséquent, que la vitesse de formation du produit. Cette phase se maintient, aussi longtemps, que la concentration du substrat non consommé demeure saturante pour l'enzyme.

c- La vitesse de formation du produit $[P]$, ayant crû (augmenté) en même temps que $[ES]$, devient constante durant la phase stationnaire : c'est la vitesse initiale V_0 de la réaction.

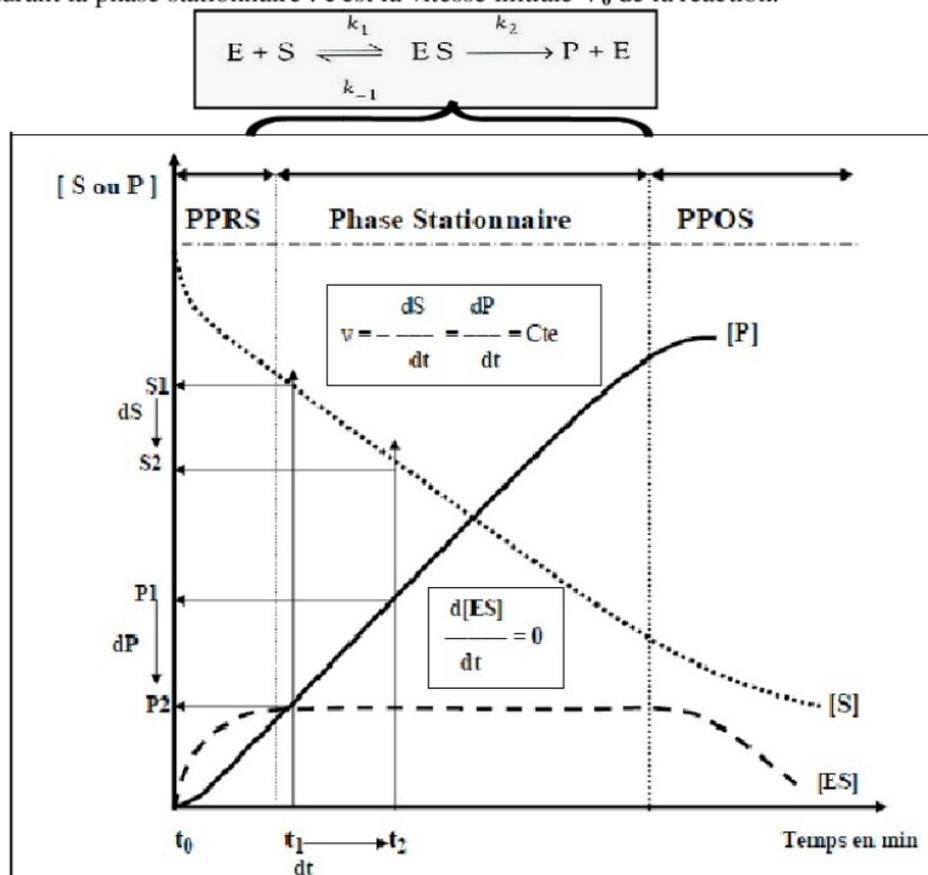


Figure 6 : Différentes phases d'une réaction enzymatique, hypothèse de Michaelis

Phase post-stationnaire (PPOS) : où le substrat n'est plus en excès, sa concentration devient limitante et où la cinétique se rapproche du premier ordre ou d'un ordre supérieur pour les enzymes à plusieurs substrats. Cette étape peut-être compliquée, en outre, par l'inhibition de l'enzyme par le produit ainsi que par la réversibilité. L'intérêt de cette phase réside d'ailleurs, non dans sa cinétique, mais dans les valeurs des concentrations en substrat produits à l'équilibre, qu'elle permet de mesurer.

4.3.2- Mesure de la Vitesse de la réaction enzymatique selon le model de Micahelis-Menten :

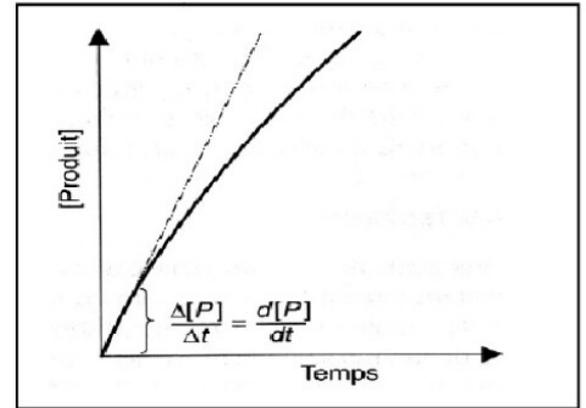
- La vitesse de réaction représente le nombre de moles de substrat transformés en moles de produit, dans un volume donné et dans un temps donné. Les cinétiques enzymatiques ont été traitées surtout par la méthode de **Michaelis et Menten** qui ont postulé que le complexe ES est en équilibre avec l'enzyme et le substrat.
- Dans cette hypothèse de l'état stationnaire, on peut mesurer la vitesse initiale d'une réaction enzymatique par la pente de la partie rectiligne de la courbe $[P] = f(t)$ (partie où $[ES] = cste$; c'est-à-dire dans la phase stationnaire).

Pratiquement, on mesure la tangente au temps $t=0$ (à l'origine) de la courbe expérimentale (**réaction de 1^{er} ordre**). Vers $t=0$, cette vitesse est maximale puisque la concentration du substrat est maximale.

La vitesse initiale de la réaction ($= V_{max}$) est déterminée dans les conditions de validité de l'équation de Michaelis-Menten où pas ou peu de produit est formé c'est-à-dire vers ($t = 0$ s) :

La vitesse de la réaction à un instant t n'est autre que le coefficient angulaire de la tangente à la courbe au temps t ($V_t = dP/dt$). Cette vitesse diminue avec le temps puisque le substrat est consommé et sa concentration diminue.

Au cours de la phase stationnaire, on admet que la vitesse de formation du Produit P reste presque constante car la concentration du complexe [ES] est constante en cette phase.



4.3.3- Constante de Michaelis :

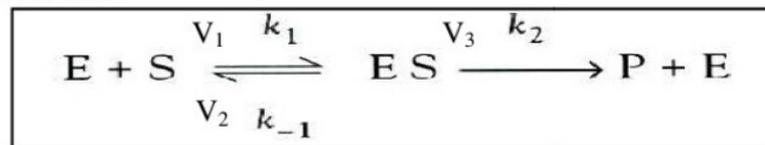
Dans le cas général, on a :



La vitesse globale de la réaction est la vitesse de formation du Produit à partir de [ES] :

$$V = d(P)/dt = k_{+2} [ES] - k_{-2} [E] [P]$$

Pour déterminer la vitesse initiale de la réaction, on est dans le cas où $t=0$, $[P] \approx 0$ et par conséquent **le model du système peut-être réduit à l'équation suivante :**



La vitesse initiale dans ces conditions peut-être déterminée selon l'équation suivante :

$$V = d(P)/dt = k_{+2} [ES]$$

C'est un cas particulier limite mais très important, on a :

$$V_1 = K_{+1} [E] [S] \text{ et } V_2 = K_{-1} [ES] \text{ et } V_3 = k_{+2} [ES]$$

La vitesse de disparition des substrats = vitesse d'apparition des Produits $-dS/dt = dP/dt$

Etat stationnaire $\rightarrow [ES] = cste \rightarrow d[ES]/dt = 0$

$$\Leftrightarrow V_1 - V_2 = V_3 \rightarrow K_{+1} [E] [S] - K_{-1} [ES] = k_{+2} [ES] \rightarrow K_{+1} [E] [S] = (K_{-1} + k_{+2}) [ES]$$

$$\Leftrightarrow K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \text{ C'est } K_m \text{ la constante de Michaelis}$$

NB. : Dans cette équation K_{-1} et K_{+2} ont les dimensions de $1/T$ alors que K_{+1} a les dimensions de $T^{-1} \cdot M^{-1}$.

La constante de Michaelis K_m possède donc les dimensions d'une concentration (en M).

4.3.4- Equation de Michaelis :

Selon l'équilibre précédent dans les conditions de validité de l'équation de Michaelis-Menten, on a :

$$d[ES]/dt = 0 = K_{+1} [E_L] [S] - (k_{-1} + k_{+2}) [ES] \rightarrow [E_L] = ((k_{-1} + k_{+2}) [ES]) / K_{+1} [S]$$

où $[E_L]$ est la concentration en enzyme libre ; $[E_T]$: concentration en enzyme totale = $[E_L] + [ES]$

Donc : $[E_T] = E_L + [ES] \rightarrow$

$$[E_T] = [ES] \left(1 + \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{K_{+1} [S]} \right)$$

$$\Rightarrow [ES] = \frac{[E_T][S]}{[S] + \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{K_{+1}}}$$

On a $V = k_{+2} \times [ES]$ et $k_{cat} = k_{+2} \rightarrow V = \frac{k_{cat} \times [E_T] \times [S]}{[S] + \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{K_{+1}}}$

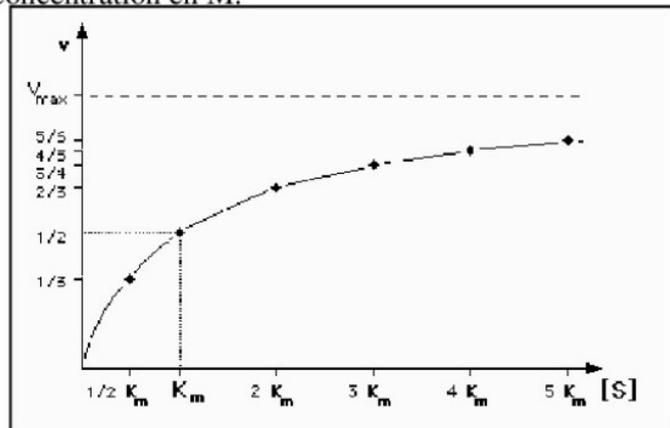
La vitesse $V = V_{max}$ lorsque tout les sites actifs de l'enzyme totale sont occupés par le Substrat :

$$V_{max} = V_m = k_{+2} \times [E_T] \rightarrow V = \frac{V_m \times [S]}{[S] + k_m} \quad K_m = \frac{[E] \times [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-1}}$$

La constante K_m possède les dimensions d'une concentration en M.

On distingue 3 cas :

- Lorsque $[S] \gg K_m \rightarrow V = V_m$
- Lorsque $[S] = K_m$ alors $V = V_{max} / 2$
- Lorsque $[S] \ll K_m \rightarrow V = (V_m \times [S]) / K_m$



• **Figure 7- Représentation graphique V=f([S]) de Michaelis-Menten**

4.3.5- Signification des constantes de Michaelis V_m et K_m :

K_m : concentration initiale en substrat pour laquelle $V = (V_m / 2)$

- Quand la concentration initiale en substrat est très supérieure à $K_m \rightarrow V=V_m = k_{cat} [E_T] \rightarrow$ la Vitesse devient maximale lorsque tout les sites actifs de toutes les molécules d'enzymes sont occupés par le substrat.
- $k_{cat} = k_2$ est l'efficacité catalytique de l'enzyme, en s-1 : elle nous renseigne sur le pouvoir catalytique de l'Enzyme.
- Quand la concentration initiale en $[S]$ est très inférieure à K_m , la vitesse est alors directement proportionnelle à $[S]$:

$$\rightarrow V = \frac{V_m \times [S]}{k_m} = \frac{k_{cat}}{k_m} [E_T] [S]$$

- $\frac{k_{cat}}{k_m}$ est la constante de spécificité, de l'ordre de $10^8 - 10^9$

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 k_{cat}}{k_{-1} + k_{cat}}$$

- La comparaison de différentes constantes de spécificité permet de déterminer le meilleur substrat pour une enzyme donnée ($K_{cat} = k_2$)
- Si k_{cat} est très supérieure à k_{-1} , (K_{cat}/K_m) tend vers k_1
- Si $k_{-1} \gg k_{cat} \rightarrow$ la dissociation de ES est plus rapide que la formation de E et de P
 - \Rightarrow Dans ce cas, $K_m = K_S = (K_{-1}/K_{+1})$; K_S ou K_D est la constante de dissociation
 - \Rightarrow K_m mesure la stabilité du complexe E-S : si K_m est élevé \rightarrow la liaison E-S est faible donc une faible affinité E-S. Si au contraire K_m est petit (bas), cela signifie que la liaison E-S est forte d'où une grande affinité de l'Enzyme pour le Substrat.

3.4.6- Méthodes de détermination des constantes de Michaelis K_m et V_m :

La détermination graphique de V_{max} et K_m à partir de la courbe peut-être faite selon plusieurs méthodes. La méthode directe est celle de Michaelis-Menten en représentant sous forme d'hyperbole V en fonction de $[S]$

$$V = \frac{V_m \times [S]}{K_m + [S]}$$

mais dans ce cas la détermination n'est pas précise.

\rightarrow On utilise plutôt la méthode graphique de Lineweaver et Burk qui consiste à représenter (selon une transformation mathématique de l'équation de Michaelis-Menten) $1/V$ en fonction de $1/[S]$. L'expression de l'équation devient :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

Cette équation est de la forme $Y = aX + b$, et les variations de $1/V$ en fonction de $1/[S]$ sont représentées par une droite. Cette droite rencontre l'axe des ordonnées à $1/V_{max}$ et l'axe des abscisses à $(-1/K_m)$. L'intérêt étant la détermination séparée de K_m et de V_m .

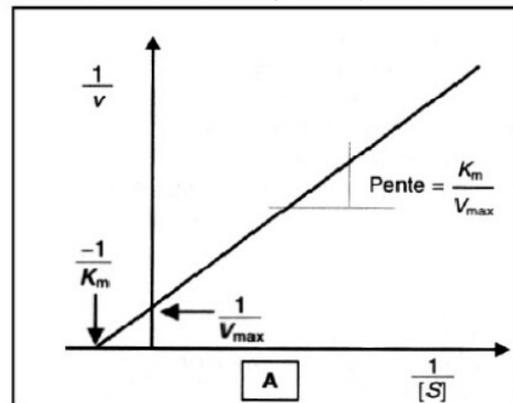


Figure 8- Représentation graphique $(1/V) = f(1/[S])$ selon Lineweaver et Burk.

\rightarrow Une autre représentation dite *d'Eadie et Hofstee* consiste à représenter $V = f(V/[S])$:
Après une transformation mathématique différente de l'équation de Michaelis-Menten, on obtient la relation suivante *d'Eadie et Hofstee* :

$$V = V_m - K_m \times \frac{V}{[S]}$$

On obtient une droite descendante de pente $-K_m$ qui rencontre l'axe des ordonnées en V_{max} et qui coupe l'axe des abscisses au point V_{max}/K_m : la représentation graphique est la suivante :

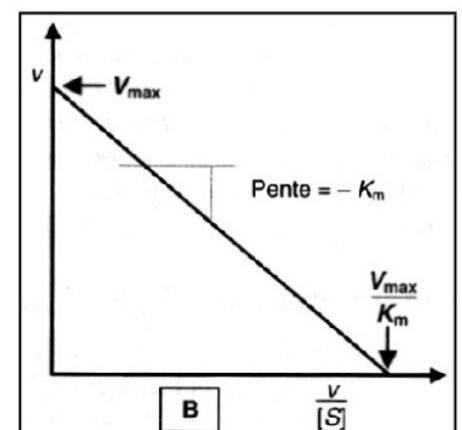


Figure 9- Représentation graphique $(V) = f(V/[S])$ selon Eadie et Hofstee.

➤ Une troisième représentation dite de **Hanes et Woolf** consiste à représenter $[S]/V$ en fonction de $[S]$; c'est une autre transformation mathématique de l'équation d'origine de Michaelis-Menten. On obtient l'équation suivante :

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{v_m} + \frac{1}{v_m} [S]$$

On obtient la courbe suivante :

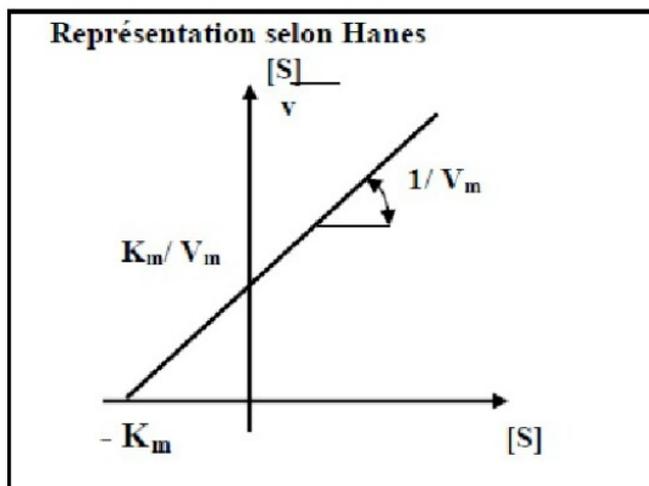
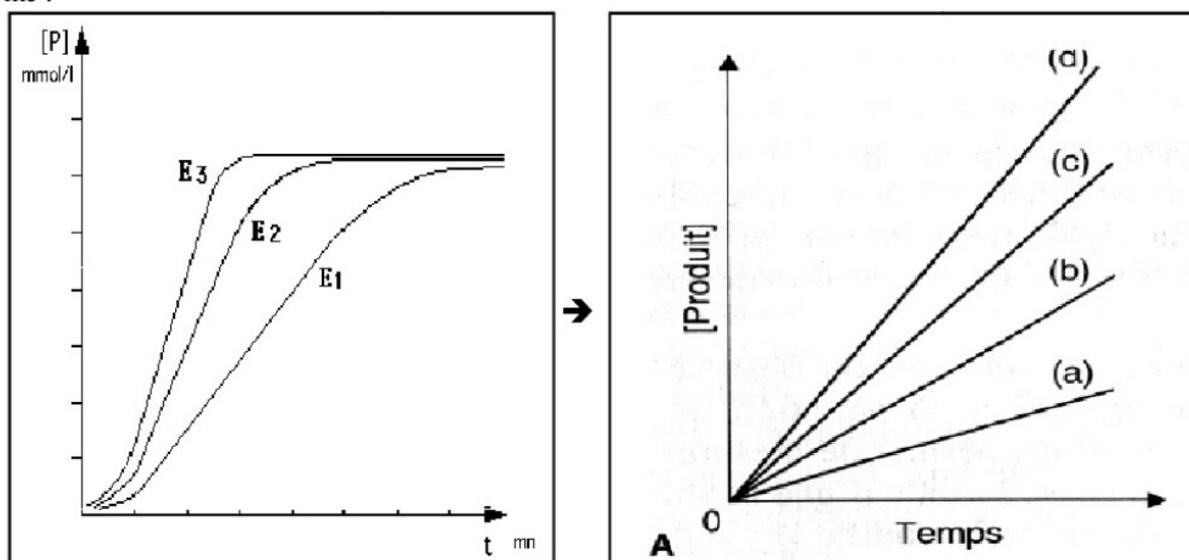


Figure 10- Représentation graphique $([S]/V) = f([S])$ selon *Hanes et Woolf*.

Tableau 7 : Valeurs de K_m de quelques enzymes		
Enzymes	Substrat	K_m (M)
Maltase	Maltose	$2.1.10^{-1}$
Glycérophosphatase	Glycérophosphate	3.10^{-2}
Tryptophanase	Tryptophane	$3.3.10^{-4}$
Monoamine oxydase	Benzylamine	$3.3.10^{-3}$
Isocitrate déshydrogénase	Isocitrate	$2.6.10^{-6}$
Déshydrogénase hydrofolique	Acide folique	$1.2.10^{-7}$

4.1. Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale :

• Pour une concentration constante de substrat, si on mesure l'évolution de la vitesse Initiale en présence de concentrations différentes d'enzyme, on constate que cette vitesse est proportionnelle à la concentration de l'enzyme :



A partir des courbes $[P] = f(t)$ obtenues pour différentes concentrations en enzyme E1 ; E2 ; E3 , on peut déterminer pour chaque concentration en enzyme $[E]$, la vitesse initiale qui n'est autre que la tangente de la courbe au temps initiale t_0 pour chaque concentration d'Enzyme. Ensuite on représente en courbe la vitesse initiale V_i en fonction de la concentration en Enzyme et on obtient :

De (a) à (d) on a des concentrations croissantes en Enzyme ;
On constate que la vitesse initiale est proportionnelle à la concentration en Enzyme $[E]$ (droite passe par l'origine).
Ce résultat très important et est exploité en analyses Biomédicales pour doser une enzyme (mesurer sa quantité) par simple détermination de son activité (V_i).

- En comparant la vitesse initiale d'un milieu à analyser aux vitesses obtenues pour des concentrations en enzyme connues de cette enzyme, on peut déterminer la concentration en $[E]$ cherchée : (Figure 10).

- Ces dosages enzymatiques sont des Mesures d'activités catalytiques exprimées en Katal (dans le système International) :

- Un **Katal** = quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une mole de substrat en une seconde (mole/s).

- En pratique médicale, on travail avec des sous multiples du katal : le microkatal (= 10^{-6} katal) et le nanokatal (= 10^{-9} katal).

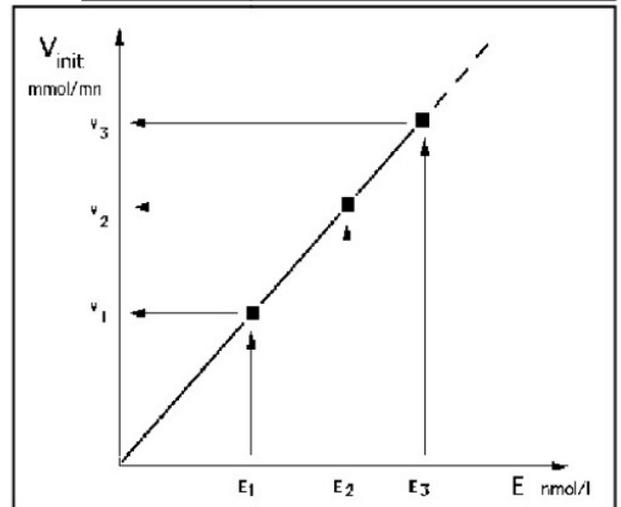
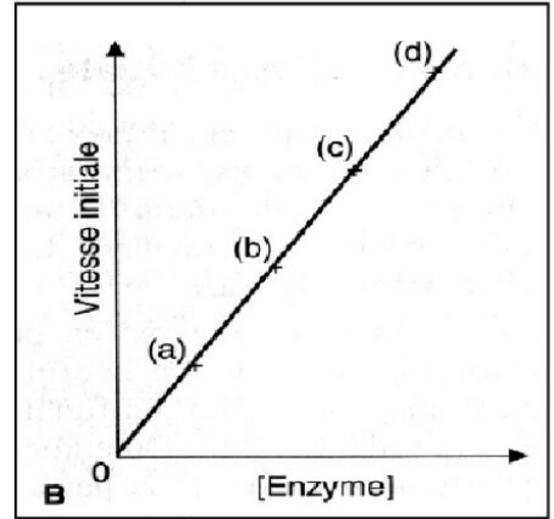
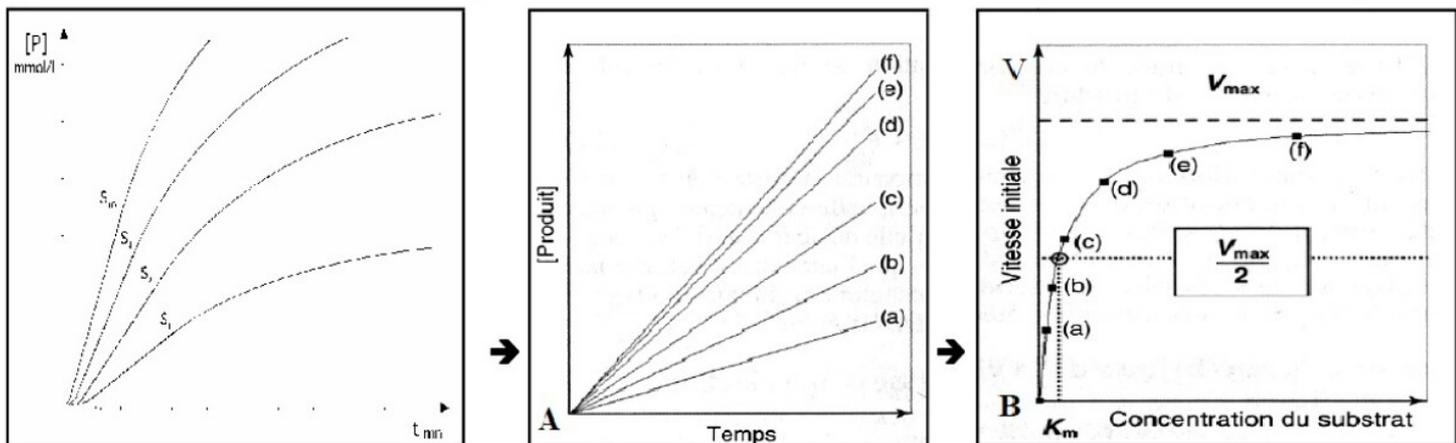


Figure 10- détermination de la concentration en enzyme à partir de la courbe par mesure de la vitesse initiale

- Pour exprimer une concentration d'enzyme, on rapporte au volume considéré et l'unité devient le nanokatal/L.
- L'Unité Internationale est une ancienne unité de mesure = quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une micromole de substrat/mn = **15 nanokatal**.

4.2-Influence de la concentration de Substrat sur la Vitesse initiale :

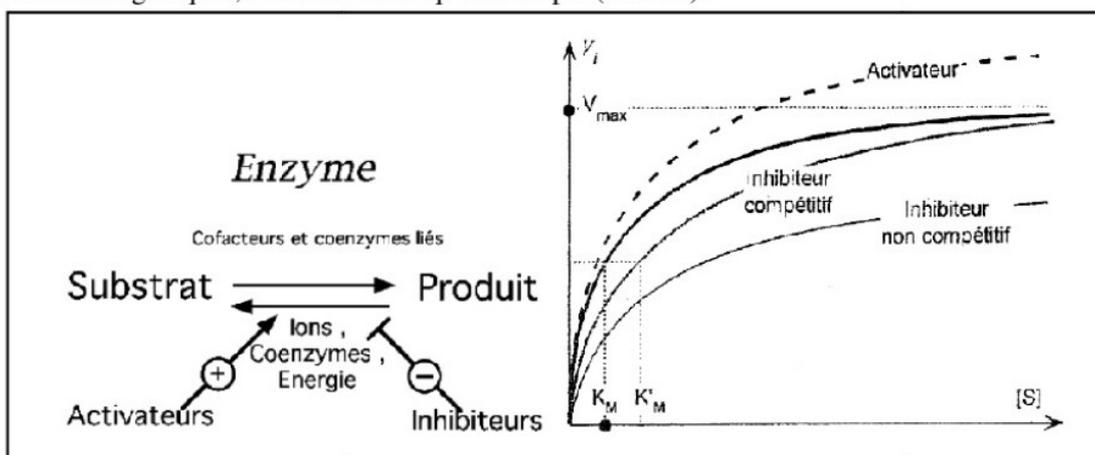
- On examine cette fois l'évolution de la vitesse de la réaction lorsqu'on fait varier la concentration en Substrat tout en maintenant la concentration en enzyme fixe.
- Pour étudier expérimentalement cet effet, il faut pour chaque concentration en substrat déterminer la vitesse initiale V_i .
- Ensuite il faut représenter les V_i en fonction de chaque concentration en substrat.
- On obtient en général la courbe caractéristique en hyperbole selon Michaelis-Menten.



A partir des courbes représentant les vitesses initiales de la réaction pour chaque concentration en substrat, on peut représenter finalement la courbe $V = f([S])$ qui n'est autre que la représentation de Michaelis et Menten. Pour $[S] = K_m \rightarrow V = V_{max} / 2$. Lorsque $[S] \gg K_m \rightarrow V = V_{max}$.

5- Action des effecteurs sur les réactions enzymatiques :

Un grand nombre de substances sont capables, en se combinant avec les enzymes, de modifier l'activité des enzymes. Les ligands sont des molécules chimiques qui sont reconnues par les Enzymes et peuvent s'y fixer. Les effecteurs sont des ligands qui en se combinant aux enzymes modifient la vitesse de la réaction. Ils peuvent être soit des molécules organiques, des ions métalliques ou le pH (ions H^+).



Effecteurs des enzymes et leurs effets sur les paramètres cinétiques

6. Les Inhibiteurs :

On distingue deux types d'inhibition : réversible et irréversible.

6.1- Inhibition réversible :

Les inhibiteurs peuvent se fixer de façon réversible aux enzymes par des liaisons de faible énergie.

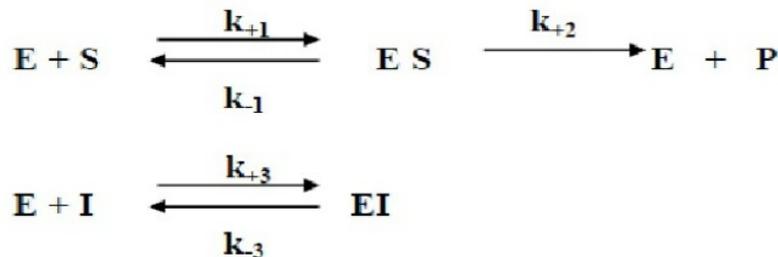
On distingue plusieurs types d'inhibiteurs :

6.1.1- Les inhibiteurs compétitifs :

L'inhibiteur compétitif a une similarité de structure avec le substrat (analogue structural du S) de sorte qu'il se lie sur le centre actif empêchant ainsi le substrat de se fixer (il entre en compétition avec le substrat sur le site actif de l'Enzyme);

K_m augmente alors que V_{max} reste constante :

L'enzyme peut fixer le substrat selon la constante de vitesse K_{+1} comme elle peut fixer l'Inhibiteur sur le même site avec une autre constante de vitesse K_{+3} . Le model de ce type d'inhibition est le suivant :



- **Démonstrations :** On a les équations suivantes : on suppose que [EI] ne donne rien

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_m \quad \text{et} \quad K_I = \frac{k_{-3} [E][I]}{k_{+3} [EI]} \quad K_I \text{ est la constante de dissociation du complexe [EI]}$$

L'équation de conservation s'écrit : $[E_T] = [E_L] + [ES] + [EI]$

Où $[E_T]$ est la concentration en enzyme totale ; $[E_L]$ est la concentration en enzyme libre

$[ES]$ est la concentration en complexe enzyme-substrat et $[EI]$ la concentration en Enzyme-Inhibiteur

$[EI]$ peut être calculé à partir de l'égalité suivante :

$$\frac{K_m [ES][I]}{[E][I]} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \Rightarrow \quad \frac{K_m [ES]}{[S]} = \frac{[E_T][I]}{[I]}$$

En remplaçant ces concentrations dans l'équation de conservation, on aura :

$$[E_T] = \frac{K_m [ES]}{[S]} + [ES] + \frac{K_m [ES] \cdot [I]}{[S] \cdot K_I}$$

(on peut déterminer alors [ES])

Puisque $V = k_{+2} [ES] \rightarrow$

$$v = \frac{k_{+2} [E_T]}{1 + \left(\frac{K_m}{[S]} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

$V_m = k_{+2} [E_T]$ d'où :

$$v = \frac{V_m [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

- Cette équation de vitesse à la même forme générale que celle de la réaction non inhibée :

$$v = \frac{V_m [S]}{[S] + K'_m} \quad K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

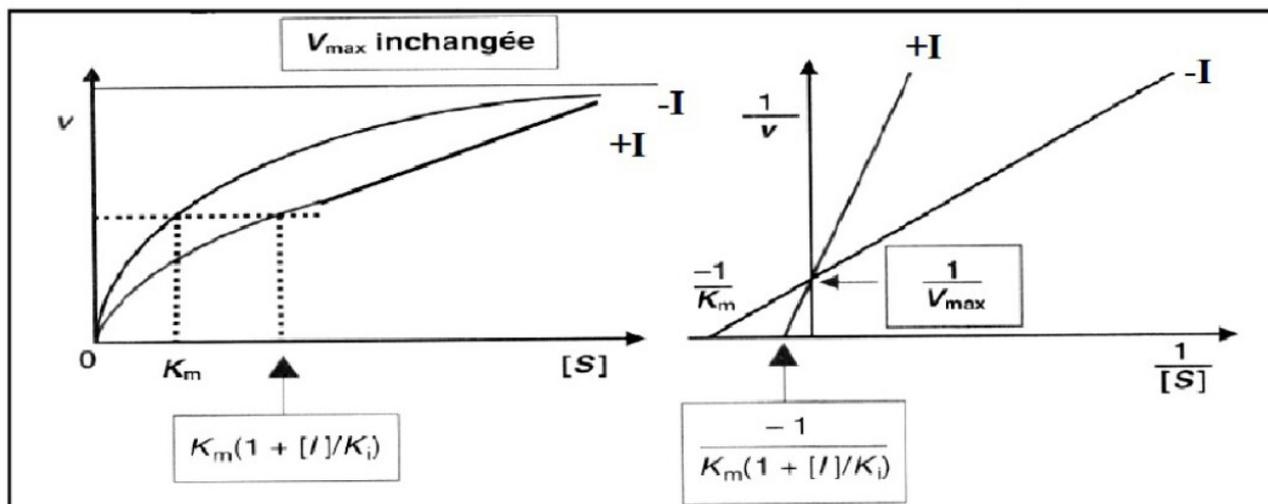
L'inhibition compétitive modifie le **K_m**. La valeur apparente de K_m est alors augmentée (K_m est multiplié par la valeur (1 + [I]/K_I)).

La vitesse de réaction est diminuée par la présence de l'Inhibiteur à la concentration [I] : il se forme le complexe [EI] qui ne donne rien (pas de produit) mais par conséquent diminue la concentration du complexe [ES]. Le degré d'inhibition dépend des concentrations relatives en substrat et inhibiteur. L'inhibition peut-être complètement annulée par une forte concentration en Substrat.

Le tableau ci-dessous donne des exemples de quelques inhibiteurs compétitifs :

Tableau 8 Exemples d'inhibiteurs compétitifs				
Enzyme	Substrat	K _m	Inhibiteur	K _I
Alanine déshydrogénase	L-alanine	1,7. 10 ⁻³	D-alanine	2. 10 ⁻²
Hexokinase	D-glucose	2. 10 ⁻²	D-glucosamine	10 ⁻³
Succinate déshydrogénase	Succinate	1,3. 10 ⁻³	malonate	4.1. 10 ⁻⁵

Représentation graphique :



Cinétique de l'inhibition compétitive

A gauche, représentation en hyperbole selon Michaelis.

A droite, représentation graphique selon Lineweaver et Burk :

En absence d'inhibiteur, on peut déterminer K_m graphiquement.

A partir de la valeur K_m en absence et K'_m en présence d'inhibiteur, on peut déterminer K_I.

La représentation graphique selon Lineweaver et Burk permet de déterminer plus précisément et plus facilement K_m, K'_m et K_I.

$$v = v_{max} \frac{[S]}{K_m(1 + \frac{[I]}{K_I}) + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m(1 + \frac{[I]}{K_I})}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

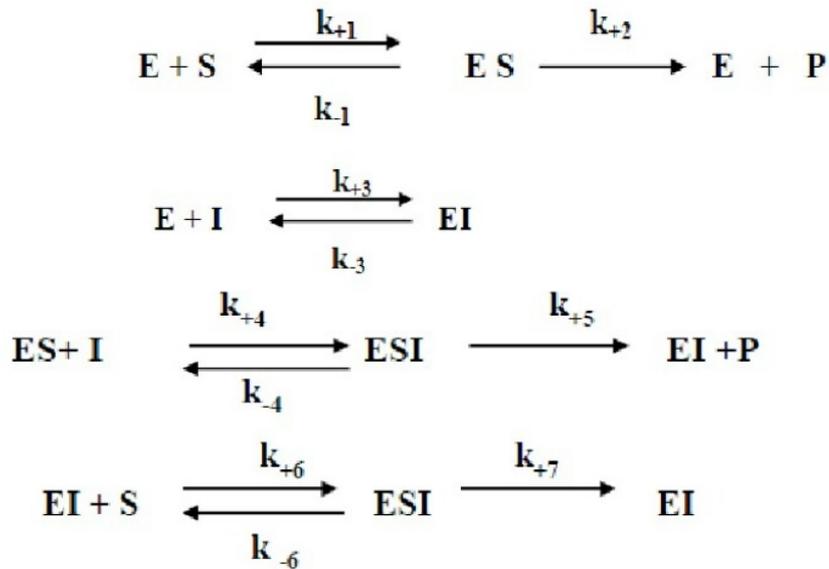
6.1.2- L'inhibition non-compétitive :

Dans ce cas, on suppose en général que l'inhibiteur ne possède pas une analogie structurale avec le substrat, et se fixe sur un site différent du site de fixation du substrat. Dans ce type d'inhibition, seule la vitesse maximale de la réaction (**V_m**) est modifiée, **K_m** reste inchangé.

La fixation de [I] provoque la déformation de l'enzyme telle que le fonctionnement de celui-ci est perturbé, d'où une diminution de la vitesse de réaction. L'inhibiteur non compétitif se lie aussi bien à l'enzyme libre [E_L] qu'au complexe [ES], mais il bloque néanmoins l'activité de l'enzyme.

❖ **Cinétique de l'inhibition non compétitive :**

La fixation du substrat est indépendante de celle de l'inhibiteur et ne modifie pas l'affinité de l'enzyme pour le S. L'inhibiteur est un ligand qui se fixe à l'enzyme sans affecter la fixation du S sur l'enzyme. Le model de cette inhibition est donnée par les équations suivantes :



Dans ce model, l'Inhibiteur non compétitif peut se fixer aussi bien sur le complexe [ES] que sur l'enzyme libre [E_L] selon la même constante de vitesse. On a donc $K_{+3} = K_{+4}$. La même remarque pour les constantes des vitesses de dissociation K_{-4} de [ESI] en [ES] + [I] et K_{-3} de [EI]. On a donc : $K_{-3} = K_{-4}$.

Même constatation pour les constantes de vitesse $K_{+1} = K_{+6}$ et $K_{-1} = K_{-6}$.

Pour les constantes de vitesses K_{+5} et K_{+7} on suppose qu'elles sont nulles (on suppose que le complexe [ESI] n'aboutit à rien).

L'équation de conservation s'écrit : $[E_T] = [E_L] + [ES] + [EI] + [ESI]$

On a les égalités suivantes :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]} = K_m \quad \text{et} \quad \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} = K_I$$

D'où : \rightarrow

$$\frac{K_m [ES]}{[S]} = \frac{K_I [EI]}{[I]} \Rightarrow [EI] = \frac{K_m [ES] [I]}{K_I [S]}$$

\Rightarrow

$$v = \frac{k_{+2} [E_T]}{1 + \frac{[I]}{K_I} + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)} = \frac{k_{+2} [E_T]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right)}$$

$$\Rightarrow v = \frac{V_m \cdot [S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)} \rightarrow v = \frac{V_m' [S]}{[S] + K_m}$$

C'est la même forme de l'équation de Michaelis : ce qui a changé c'est V_m
 V_{max} est affectée d'un coefficient qui dépend de $[I]$ et de l'inverse de K_I .
La constante K_m , reste au contraire inchangée.

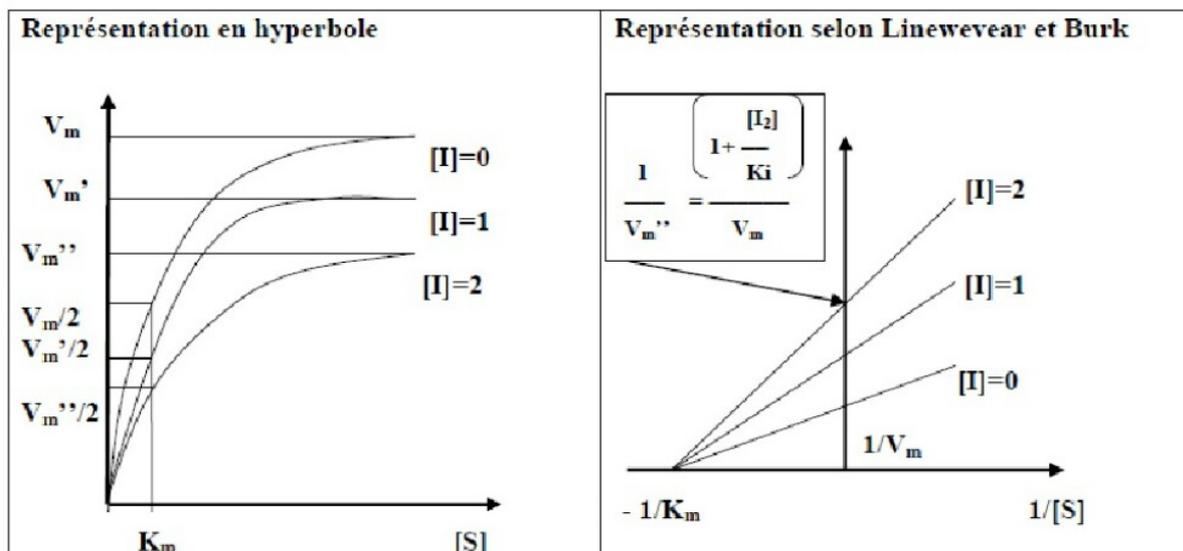
$$V_m' = \frac{V_m}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m(1 + \frac{[I]}{K_I})}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{V_{max}}$$

Enzyme	Substrat	K_m	Inhibiteur	K_I
Galactokinase	Galactose	7.10^{-4}	Galactose-1-P	$1.5.10^{-2}$
Phosphodiesterase	AMP cyclique	$4.9.10^{-4}$	Caffeine	5.10^{-2}
Anhydrase carbonique	HCO_3^-	$9.6.10^{-3}$	Acétazolamide	$6.1.10^{-7}$

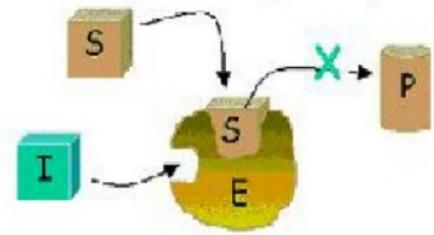
❖ Représentation graphique de l'inhibition non compétitive :



Cinétique de l'inhibition non compétitive

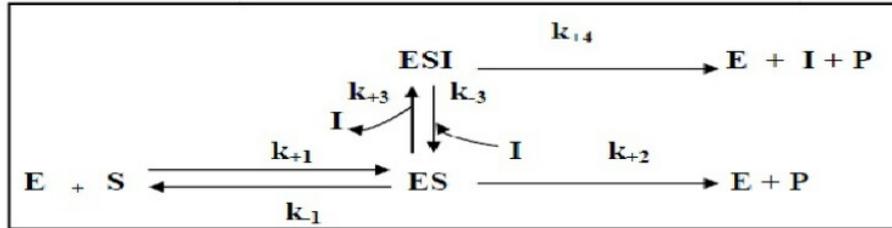
6.1.3- Inhibition un-compétitive ou anticompetitive :

- Ce type d'inhibition est rare. L'inhibiteur incompétitif ou uncompétitif se fixe exclusivement au complexe ES.
- la fixation de I n'est probablement possible qu'après fixation de S.



- V_m diminue et K_m aussi et donc l'affinité de l'enzyme augmente indiquant que la fixation de [I] favoriserait la stabilité du complexe [ES].

Le model de cette inhibition est le suivant :



Les équations suivantes sont vérifiées :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_m$$

et

$$\frac{[ES][I]}{[ESI]} = K_I$$

- L'équation de conservation s'écrit : $[E_T] = [E_L] + [ES] + [ESI]$

$$\Rightarrow [ES] = [E_T] - \frac{K_m [ES]}{[S]} - \frac{[ES][I]}{K_I}$$

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \times \frac{[S]}{K_m + [S] + \frac{[I]}{K_I} [S]}$$

- Etant donné que : $V = k_{+2} \cdot [ES]$; et que $V_m = k_{+2} \cdot [E_T] \Rightarrow$

Dans ce type d'inhibition: V_m et K_m sont les deux modifiées V'_m et K'_m

❖ Représentation graphique : **Cinétique d'inhibition un-compétitive :**

