

CHAPITRE

4

CARACTÉRISATION DES ENZYMES PAR DES ÉTUDES DE CINÉTIQUE

Les êtres vivants sont animés d'un ensemble de réactions chimiques. Au vu de la composition complexe d'une cellule, le nombre de réactions chimiques thermodynamiquement favorable est extrêmement élevé. La plupart du temps ces réactions chimiques sont en plus peu stéréospécifiques et les réactions observées classiquement sont très lentes *in vitro* comparées à leur vitesse dans la cellule. Au début du 19^{ème} siècle (1815), le français Joseph Louis Gay-Lussac établit la première équation des réactions du vivant : la fermentation alcoolique. Les éléments responsables de la fermentation sont tout d'abord nommés "ferments" par Justus Liebig (1830). Le terme enzyme (en « dans » et zyme « levure » grec) a été introduit en 1878 par Frederich Wilhem Kühne. La nature protéique des enzymes n'a été acceptée que dans les années 1930 et l'existence d'ARN à activité enzymatique a été montrée par la suite (Ribozyme). La première structure primaire d'enzyme a été obtenue en 1963 (ribonucléase A du pancréas bovin) et la première structure tridimensionnelle date de 1965 avec le lysosyme du blanc d'œuf de poule ([1]).

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui augmentent la vitesse des réactions enzymatiques de façon à les rendre compatibles avec la vie. Les enzymes sont qualifiées de spécifiques. Il faut être capable de mesurer et de quantifier l'action des enzymes. C'est le propre des études cinétiques : étudier la vitesse d'une réaction en présence d'un enzyme. Ces études sont basées sur des données expérimentales qui ont donné lieu à des modèles mathématiques qui reflètent ces données.

Cette année, nous définirons les enzymes et aborderons leurs caractéristiques générales. Nous aborderons ensuite les études de cinétique à l'état stationnaire ainsi que l'établissement des modèles mathématiques dans le cas des réactions irréversibles à un ou deux substrats ainsi qu'en présence de régulateurs.

I. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques

A. Notion de catalyseur biologique

Un enzyme est un catalyseur biologique c'est-à-dire une molécule synthétisée par les êtres vivants qui, à très faible concentration, augmente la vitesse de réactions chimiques, sans en modifier le résultat. A la fin de la réaction, la structure de l'enzyme reste inchangée. La réaction catalysée par l'enzyme est thermodynamiquement favorable mais elle est très lente. Un enzyme ne change pas l'équilibre d'une réaction chimique. Le mot enzyme, à l'origine, est un nom masculin mais la forme féminin est de plus en plus acceptée.

1 Comparaison avec les catalyseurs chimiques

En chimie, de nombreux catalyseurs sont utilisés : souvent des métaux ou des surfaces particulières qui accélèrent la réaction chimique mais restent inchangés en fin de réaction.

Les enzymes ont cependant de nombreux avantages sur les catalyseurs chimiques :

- Les vitesses des réactions catalysées par les enzymes sont plus grandes.
- Les enzymes multiplient la vitesse de réaction entre 10^6 et 10^{12} fois par rapport à la réaction non catalysée et est supérieure de plusieurs ordres de grandeur à la même réaction catalysée par un catalyseur chimique.
- Les conditions de réaction sont plus douces car compatibles avec la vie que se soit en terme de pression, température ou pH.
- La spécificité est plus grande : il n'y a pas de réaction « parasite ».
- Les enzymes sont régulables.

2 Comment agit un catalyseur sur une réaction ?

Le mode d'action des catalyseurs est décrit en thermodynamique chimique par l'étude de l'énergie de Gibbs notée G_0 . Pour qu'une réaction soit favorable, il faut que G_0 avant la réaction soit supérieur à G_0 en fin de réaction.

Pour toute réaction, il y a une phase d'activation de la réaction qui est thermodynamiquement limitante : temps de rencontre des réactifs par exemple. Elle aboutit à un état de transition à partir duquel la réaction va pouvoir avoir lieu. Par exemple, dans cet état de transition les réactifs sont suffisamment proches et orientés pour permettre la réaction chimique. Le passage à cet état de transition nécessite une forte énergie d'activation et n'est pas une étape favorable même si le bilan global de la réaction est lui thermodynamiquement favorable. Les catalyseurs "facilitent" le passage dans un état de transition de plus faible énergie. Cela diminue la barrière énergétique nécessaire au démarrage de la réaction et donc accélère celle-ci (figure 4.1). Par exemple, les catalyseurs peuvent stabiliser l'état de transition et ainsi diminuer l'énergie de Gibbs. Ils diminuent uniquement l'énergie d'activation de la réaction (figure 4.2).

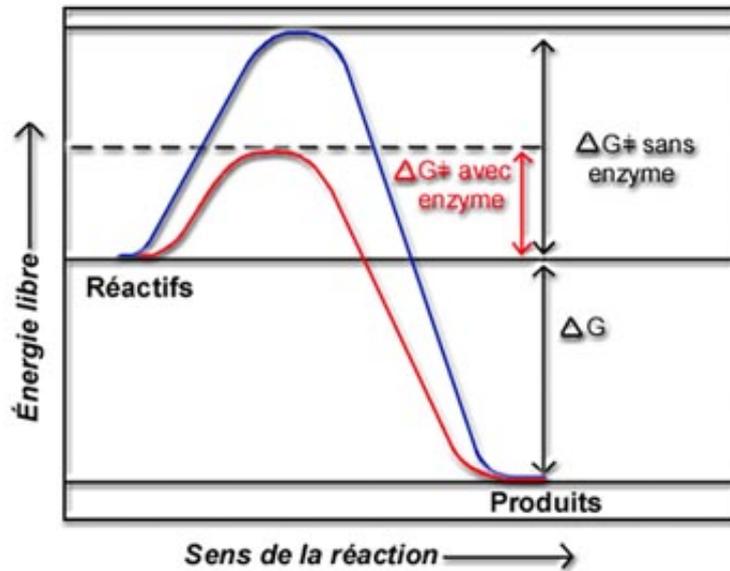


FIGURE 4.1 – Diagramme des énergies de Gibbs en présence et en absence de catalyseur

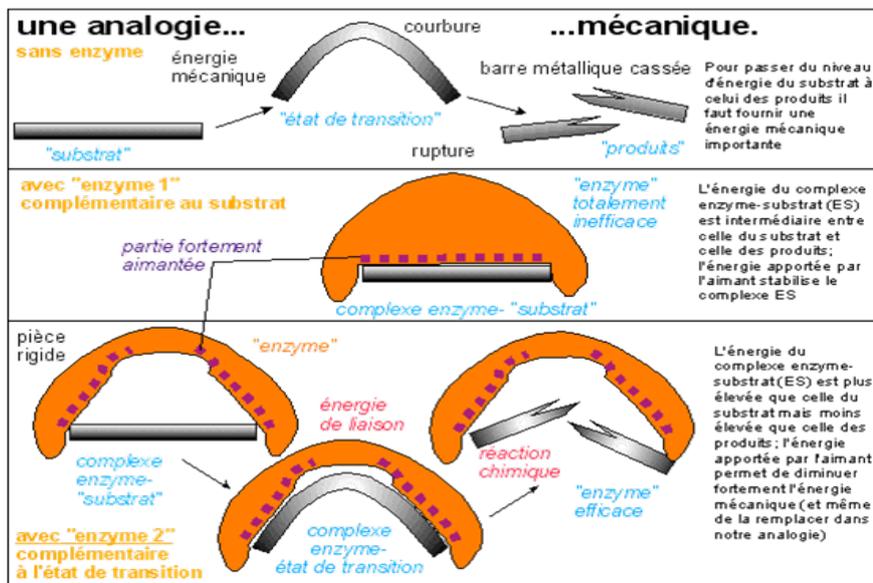


FIGURE 4.2 – Les enzymes seraient complémentaires de l'état de transition d'une réaction : petite analogie mécanique. (ref : Pierre Stouf)

a. Le site actif des enzymes

Dans le repliement des enzymes, une région de la structure est particulièrement importante : c'est ce qu'on appelle le **site actif**. Le plus souvent ce site actif est une cavité où un sillon qui contient à la fois les acides aminés impliqués dans la fixation (site de reconnaissance) du ou des substrats et les acides aminés impliqués dans la catalyse (site catalytique).

L'arrangement des atomes constituant le site actif est responsable de la spécificité d'action de l'enzyme. La spécificité de l'enzyme pour le ou les substrats est à la fois stéréospécifique (les enzymes sont chirales car formées uniquement de D-aa donc, pour un substrat donné, elles ne vont reconnaître qu'un seul stéréoisomère ce qui est rarement le cas des catalyseurs chimiques) et ont

aussi une spécificité géométrique (il faut la bonne fonction au bon endroit) : le ligand se fixe car il y a à la fois complémentarité de forme et de liaison au niveau d'une zone du site actif : le site de reconnaissance (figure 4.3).

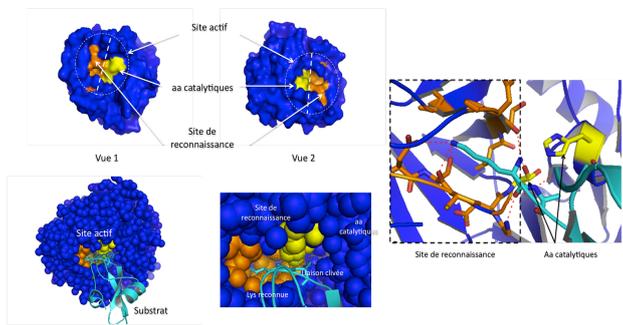


FIGURE 4.3 – Le site actif de la trypsine. En haut, deux vues de la localisation du site sur l'enzyme en absence de substrat. En bas, des vues de la protéine en présence d'un substrat : à gauche une vue globale, au milieu un agrandissement permettant de voir la complémentarité de forme entre le site de reconnaissance et la lysine reconnue ainsi que le positionnement de la liaison à cliver située face aux acides aminés catalytiques ; à gauche, un zoom permettant d'identifier les interactions polaires (pointillés rouges).

Il existe deux modèles quant à la fixation du substrat dans l'enzyme. Le premier modèle est le modèle clef-serrure : le substrat est parfaitement complémentaire (forme et liaison) du site de fixation et donc s'insère parfaitement. Le second modèle est celui de l'ajustement induit : quand le substrat entre dans le site actif, celui-ci change de conformation et se « referme » parfaitement sur le substrat (figure 4.4).

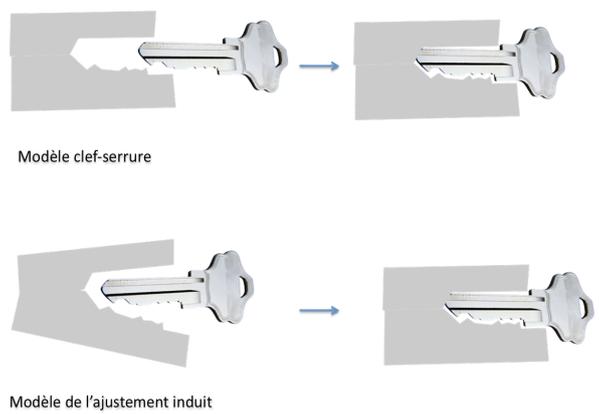


FIGURE 4.4 – Théories des modalités d'interaction du substrat dans le site actif

B. Les ARNs peuvent avoir une activité enzymatique

Pendant longtemps, les scientifiques ont cru que l'activité enzymatique de complexes ARNs-protéines tels que les ribosomes était le fait des protéines. Or, l'activité enzymatique est portée par l'ARN lui-même. Depuis, on a découvert de nombreux petits ARNs dans le noyau capables, par exemple, de modifier des bases.

C. La réaction enzymatique

1 Les acteurs de la réaction enzymatique

a. Au minimum : substrat et produit

La réaction enzymatique peut s'écrire :



Le substrat est la molécule qui entre dans la réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique de l'enzyme. Le produit est la molécule qui apparaît au cours de la réaction catalysée par l'enzyme. Les modèles de fonctionnement des enzymes montrent qu'avant d'être transformé en produit, le substrat se fixe à l'enzyme : c'est le **complexe enzyme-substrat** dont nous avons décrit les caractéristiques précédemment dans la partie sur le site actif. La réaction enzymatique peut alors s'écrire en deux étapes : la fixation du substrat, puis la catalyse du substrat en produit.



b. Les autres acteurs possibles

D'autres acteurs que l'enzyme elle-même peuvent influencer la réaction enzymatique :

- *Les ligands* : c'est un corps chimique ayant une liaison spécifique avec l'enzyme (liaison spécifique signifie : site défini dans l'espace et saturable, schéma) mais qui n'est pas transformé au cours de la réaction.
- *Les cofacteurs* : un cofacteur est un corps chimique qui intervient obligatoirement dans une réaction enzymatique pour transférer ou compléter un substrat, pour accepter un produit ou comme participant à la structure de l'enzyme. Cela peut être des ions ou des coenzymes.
- *Les coenzymes* (figure 4.5) sont des molécules biologiques intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique : ils sont soit libres soit liés à l'enzyme. Ils sont impliqués le plus souvent soit dans des réactions d'oxydo-réduction soit dans des réactions de transfert de groupements.
 - FAD/FADH₂ : Lié très fortement à l'enzyme. C'est un groupement prosthétique. Il est modifié en cours de réaction entre sa forme réduite et sa forme oxydée mais l'enzyme le régénère en fin de réaction. Il peut être détecté par fluorescence selon son état redox.
 - NAD(P)⁺/NAD(P)H : Ce sont des coenzymes libres qui se comportent comme des co-substrats. Ils sont utilisés sous forme réduite ou oxydée selon le besoin de l'enzyme. Ils ne sont pas régénérés en fin de réaction. Ils peuvent être détectés par spectroscopie selon leur état redox.
 - ATP/UTP/GTP : Ce sont des coenzymes libres de transfert de groupement phosphate. L'ATP est considéré comme l'énergie du vivant. Ils se comportent comme des co-substrats et ne sont pas régénérés en fin de réaction.

NB : Au cours du métabolisme, la dégradation des nutriments permet la synthèse de coenzyme d'oxydoréduction sous forme réduite (NADPH) ce qui fournit un pouvoir réducteur à la cellule pour des réactions de synthèse mais aussi des ATP/GTP/UTP, sources d'énergie cellulaire.

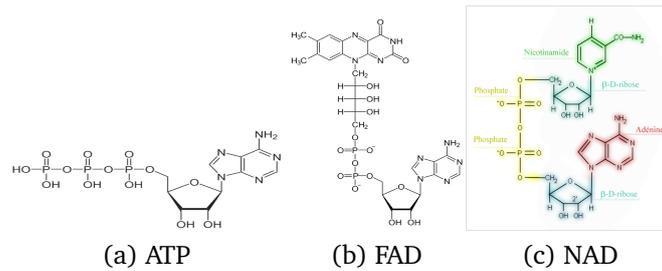


FIGURE 4.5 – Quelques exemples de coenzymes

2 C'est quoi la catalyse ?

Que se passe-t-il entre l'enzyme et les substrats pour faciliter la réaction ?

a. Définition

L'enzyme ne se contente pas de rapprocher spatialement les substrats (ce qui n'aurait aucun sens dans le cas d'une réaction à un seul substrat), elle fournit un environnement chimique qui modifie l'état des substrats. C'est le rôle des acides aminés catalytiques. Ceux-ci sont modifiés en cours de réaction mais retrouvent leur état initial en fin de réaction.

b. Les types de catalyse

Différents types de catalyse participent aux cycles enzymatiques :

- *catalyse générale acido-basique* : dans ce cas les acides aminés catalytiques fournissent ou acceptent un proton du substrat de façon à modifier les fonctions de ce dernier. Le plus souvent les acides aminés impliqués sont asp, glu, His, Cys, Tyr et Lys qui ont des pKa proches des pH physiologiques.
- *Catalyse covalente* : dans ce cas il existe une liaison covalente transitoire entre l'enzyme et le substrat de façon à pré-modifier celui-ci.
- *Catalyse par ion métallique* : un tiers des enzymes connues nécessitent des ions métalliques : soit elles sont activées par les métaux soit elles possèdent des ions métalliques dans leur structure (métalloenzymes). Ces ions peuvent avoir trois rôles : orientation du substrat par liaison (complexation), modification de l'état redox ou modification des propriétés électrostatiques du substrat.
- *Catalyse électrostatique* : le départ de l'eau à l'arrivée du substrat renforce les liaisons polaires
- *Catalyse par effet de proximité ou d'orientation* : disposition spatiale correcte des substrats
- *Catalyse par liaison préférentielle à l'état de transition*

c. Un exemple

Les protéases à sérine sont des enzymes qui possèdent une triade catalytique caractéristique : sérine, histidine, aspartate. Le cycle est caractérisé par la succession de différents type de catalyse : la catalyse générale acido-basique, la complémentarité à l'état de transition et la catalyse covalente (figure 4.6).

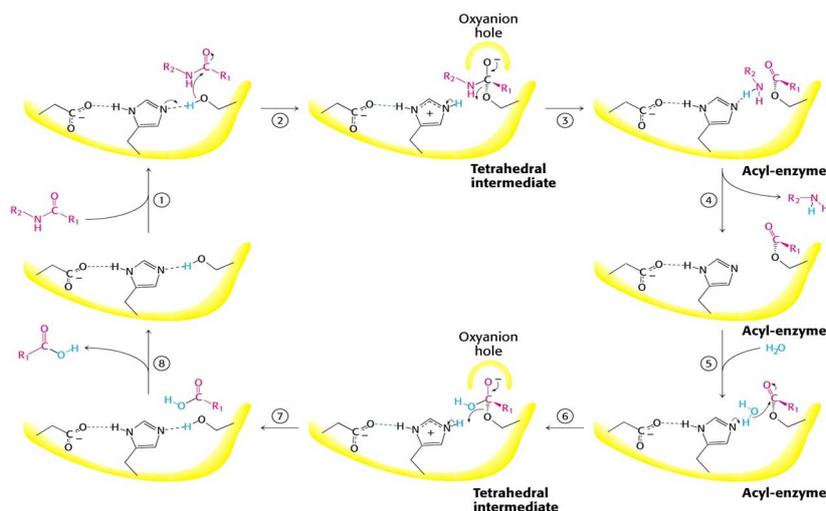


FIGURE 4.6 – Exemple de la catalyse du clivage d'un peptide par une protéase à sérine

D. Nomenclature des enzymes

La classification des enzymes est basée sur la spécificité de la réaction et du substrat. Il existe six classes principales d'enzymes. Chaque enzyme a deux noms et un code de classification (figure 4.7 :

- Le nom recommandé ou usuel : le plus commode au quotidien, par exemple : carboxypeptidase A
- Le nom systémique : S1 :S2 :... :Sn réaction-ase. Par exemple, la carboxypeptidase A devient la peptido-L-aminoacide hydrolase
- Le code : EC classe-sous classe-sous sous classe-numéro de série. Le chiffre 99 final implique un enzyme en cours de classification. Par exemple, la carboxypeptidase A devient EC 3.4.17.1 : 3 pour hydrolase, 4 pour peptidase, 17 pour metalloxydoreductase.

Deux isoenzymes sont des enzymes qui catalysent la même réaction mais qui ont une séquence en acides aminés différente.

Cette classification « administrative » comporte inévitablement des choix arbitraires et des compromis qui ne sont pas toujours très commodes. Parfois un enzyme peut catalyser des réactions appartenant à des classes différentes. Par exemple, la phosphatase alcaline ne se contente pas d'hydrolyser les ester-phosphates, mais peut aussi catalyser une transphosphorylation, c'est à dire le passage du groupe phosphate d'une molécule à une autre. Presque toutes les hydrolases ont cette propriété. Quand la réaction la plus efficace est l'hydrolyse, on range l'enzyme dans la classe 3.

Dans les **oxydo-réductases**, il y a aussi des subtilités :

- Lorsqu'elle se sert du NADH ou du NADPH pour réduire un accepteur organique. On l'appelle déshydrogénase et on lui donne le nom avec la forme réduite (le produit) : alcool déshydrogénase
- Lorsque la protéine possède un cofacteur fermement lié comme une flavine, une porphyrine, ou un centre fer-soufre qui est réduit au cours de l'opération : on l'appelle alors réductase.

En ce qui concerne les enzymes de **Formation et rupture de liaisons** :

Classification officielle des enzymes		
EC 1 Oxydo-réductases 1.2 sur aldéhyde ou oxo 1.3 sur liaison C-C 1.4 sur liaison amine 1.11 utilise H ₂ O ₂	Formiate deshydrogenase Fumarate réductase Glutamate déshydrogénase Catalase	1.2.1.2 1.3.1.6 1.4.1.2 1.11.1.6
EC 2 Tranférases 2.1 tr. Groupe 1 seul C 2.7 tr. Groupe avec P	Sérine hydroxyméthyl transf. Pyruvate kinase	2.1.2.1 2.7.1.40
EC 3 Hydrolases 3.1 sur esters 3.4 liaison peptidique	Acétylcholine estérase chymotrypsine	3.1.1.7 3.4.4.5
EC 4 Lyases 4.1 sur liaison C-C 4.6 sur P-O	Glutamate décarboxylase Adénylate cyclase	4.1.1.15 4.6.1.1
EC 5 Isomérases 5.1 Racémases, épimérases	UDP-glc-4-épimérase	5.1.3.2
EC 6 Ligases 6.1 Forment C-O	Alanyl-ARNt-synthétase	6.1.1.7

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>o = Reduction equivalent</p> <p>Ared + Box ⇌ Aox + Bred</p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C ₁ -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	<p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	<p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	<p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerases cis trans Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP</p> <p>X = A, G, U, C</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

FIGURE 4.7 – Classification officielle des enzymes : quelques exemples

- Lyase : coupe une liaison sans qu'il n'y ait ni hydrolyse, ni oxydo-réduction. Peut importe le sens de la réaction (coupure ou formation) c'est une lyase. Si vraiment la réaction en sens inverse est prépondérante (c'est à dire la liaison) on parle parfois de synthase.
- Ligases : utilisent l'ATP ou des sources d'énergie similaires à l'ATP pour leur réaction. Dans ce cas, si la réaction de ligation est prépondérante, on parlera de synthétase.

II. Principe des études en cinétique enzymatique

A. Pourquoi faire des études cinétiques ?

Les études cinétiques peuvent avoir deux objectifs : un objectif fondamental, comprendre le fonctionnement d'un enzyme ou un objectif pratique : connaître les conditions optimales de fonctionnement pour une utilisation industrielle par exemple.

On va pouvoir déterminer *via* ces études :

- Un mécanisme réactionnel : quel substrat se fixe quand et quand est-ce que le produit est libéré (on verra cela surtout avec les réactions à plusieurs substrats)
- Les constantes cinétiques de la réaction : affinité, efficacité catalytique, activité enzymatique
- Les conditions d'action : pH optimal, température optimale, besoin ou non de la présence d'un ion, d'un cofacteur.

Ces résultats peuvent être comparés aux fonctions physiologiques de l'enzyme.

B. Comment fait-on ?

1 Que mesure-t-on ?

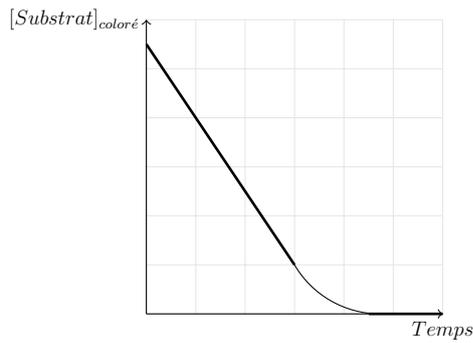
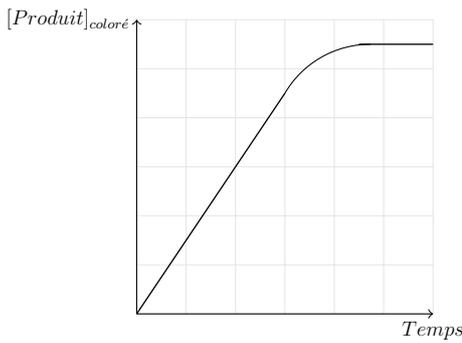
Par définition, une étude cinétique est l'étude de l'évolution d'un processus au cours du temps. Dans le cas d'un enzyme, il nous faut suivre l'avancement de la réaction au cours du temps afin de déterminer une vitesse de réaction. Tout l'enjeu des études de cinétique enzymatique est de mesurer des vitesses de réactions enzymatiques dans différentes conditions.

Pour mesurer la vitesse de réaction, il faut être capable de suivre l'évolution de la réaction dans le temps. Pour cela, on peut suivre l'apparition du produit ou la disparition du substrat. Il faut donc que l'une de ces deux molécules soit identifiable :

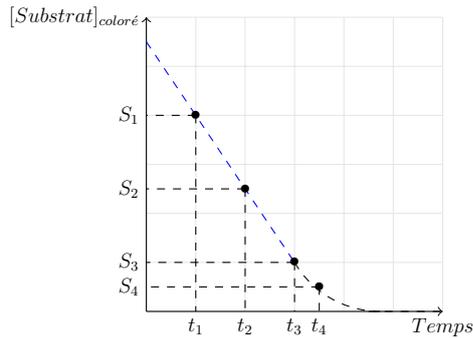
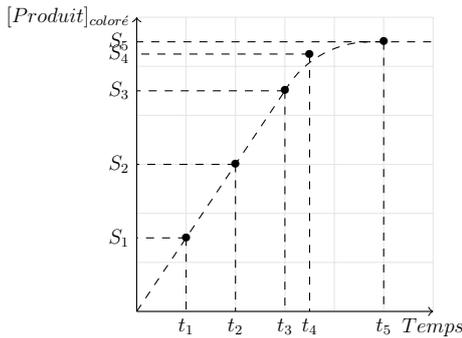
- le substrat ou le produit est une molécule naturellement colorée, ou fluorescente ou détectable avec une sonde (oxygène par exemple) : NADH/NAD
- on possède un dérivé du substrat qui est catalysé par l'enzyme et qui est soit coloré soit fluorescent soit qui peut libérer un produit coloré ou fluorescent dans certaines conditions.
- On utilise une réaction connue rapide qui transforme le produit en une molécule détectable. Cette réaction aura lieu immédiatement après la réaction étudiée, dans un temps négligeable et ne modifiera pas la réaction étudiée.

2 Comment mesure-t-on ?

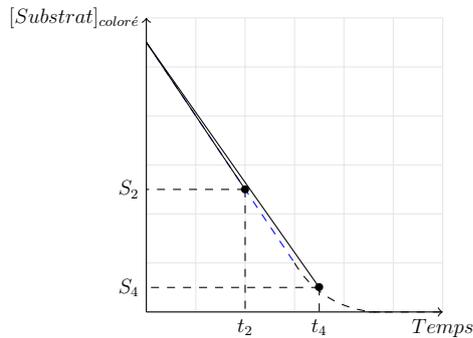
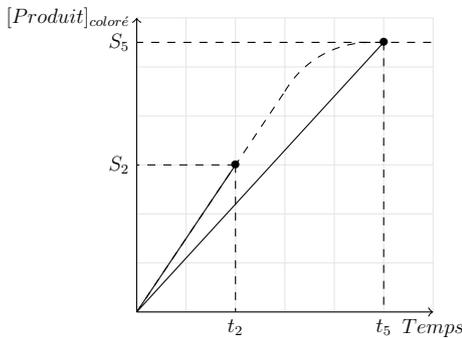
On peut suivre de **façon continue** la libération du produit ou la disparition du substrat : par exemple avec un spectrophotomètre.



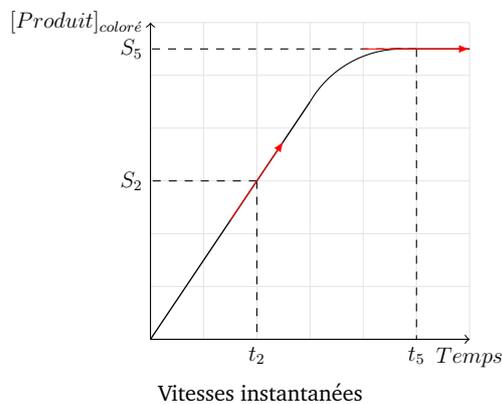
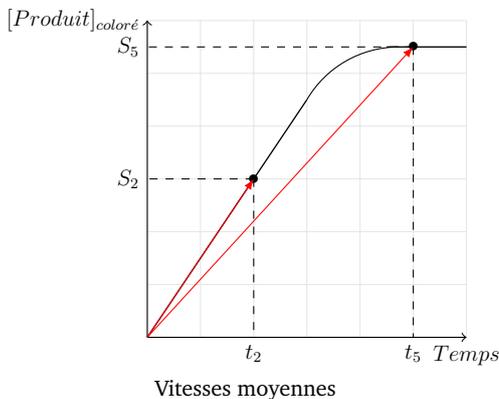
- On peut faire des mesures dites **point par point** au cours du temps en arrêtant la réaction à différents temps pour mesurer la concentration en produit ou en substrat à chaque temps.



- On peut choisir un temps fixe au bout duquel on arrête la réaction et on mesure le produit ou le substrat : on parle de mesure **en point final**.



3 Quelle vitesse de réaction choisir ?



Ici, nous avons les courbes d'apparition du produit ou de disparition du substrat en fonction du

temps. On peut voir d'abord une phase d'augmentation du produit et de disparition du substrat qui semble linéaire puis un ralentissement et enfin un plateau. Dans ce cas ce plateau correspond au moment où la réaction est terminée.

Par définition, la vitesse est la quantité de substrat consommé ou de produit apparu par unité de temps. On peut mesurer deux types de vitesse :

- **La vitesse moyenne** entre deux temps : $\bar{V}_{t_1-t_2} = \frac{\Delta(P)}{\Delta(t)} = \frac{P_1-P_2}{t_1-t_2}$

- **La vitesse instantanée à t1** correspond à la valeur de la dérivée au point d'abscisse t1 : $v = \frac{dP}{dt}$. Pour cela, on trace la tangente à la courbe en ce point : la vitesse instantanée est la pente de cette tangente. On peut observer que cette vitesse nette diminue en cours de réaction : il y a moins de substrat disponible ce qui ralentit la réaction.

Toute la subtilité des mesures cinétiques revient à se demander : quelle vitesse mesure-t-on ? A quel moment on mesure la vitesse de réaction : est-ce qu'on mesure une vitesse moyenne au bout d'un temps arbitraire (méthode en point final) ? est-ce qu'on mesure la vitesse nette à un temps donné ?

Qu'en pensez vous ?

C. Rappels de cinétique chimique

Réactions élémentaires et mécanisme réactionnel

Une réaction globale $A \rightarrow B$ peut faire intervenir plusieurs réactions élémentaires $A \rightarrow I_1 \rightarrow I_2 \rightarrow B$. Cela revient à décrire un mécanisme réactionnel.



Dans cette écriture k_1 et k_{-1} sont les constantes de vitesse respectives des réactions en sens direct (A vers P) et inverse (P vers A). Les constantes de vitesses s'écrivent toujours avec un k minuscule, x est l'avancement de la réaction. Cette écriture est vraie que la réaction sont terminée ou non. Pour une réaction à l'équilibre la réaction est terminée quand les concentrations en réactifs et en produits sont stables.

A l'équilibre de la réaction, on peut écrire la réaction de la façon suivante :



K_{eq} est la constante d'équilibre de la réaction. Elle est égale à $K_{eq} = \frac{[P]_f^p}{[A]_f^a}$.

Vitesse de réaction

Par définition la vitesse de réaction est soit la vitesse de disparition du réactif soit la vitesse d'apparition du produit. Pour la réaction précédente, on a :

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \quad (4.5)$$

La vitesse de réaction est proportionnelle avec la fréquence à laquelle les molécules réagissent. Si on prend la réaction élémentaire suivante :

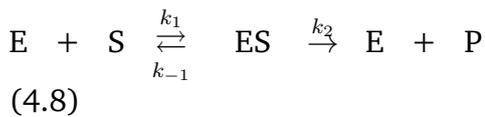


La vitesse est alors le produit des concentrations des réactifs à la puissance de leurs coefficients stoechiométriques :

$$v = k_1[A]^a[B]^b \dots [Z]^z = \prod_{i=0}^n X_i^{x_i} \quad (4.7)$$

III. Étude d'une réaction enzymatique irréversible à un seul substrat et un seul produit

Ce modèle est le premier modèle des études de cinétique enzymatique et certainement le plus simple. Nous allons pouvoir étudier les équations de vitesse et comment on les détermine ainsi qu'étudier les hypothèses à l'origine de ce modèle.



k_1 , k_{-1} et k_2 sont ici les constantes de vitesse de la réaction.

A. L'équation de Mickaelis Menten et conditions d'étude

1 Notion de vitesse initiale

Nous avons vu précédemment, que la vitesse évolue en même temps que le substrat diminue : plus ça va, moins ça va. Il faut donc choisir des modalités de mesure qui nous affranchissent de cette décroissance de vitesse au cours du temps. Pour cela, on mesure la vitesse au temps zéro de la réaction. Cela a plusieurs avantages :

- Au temps zéro de la réaction la **concentration en substrat et en enzyme sont connues** : ce sont celles qu'on a mis dans le tube : facile. $[S]_{tot} = [S]_0$ $[E]_{tot} = [E]_0$

- Au temps zéro, **on a pas de produit** (sauf si on en met dans le tube), ouf, celui-là, on l'oublie. $[P] = [P]_0 = 0$

- La plupart du temps, les **enzymes sont nécessaires en très faibles quantités** pour dégrader de grosses quantités de substrat. On peut supposer que la majorité du substrat est sous forme libre et très peu sous forme ES liée à l'enzyme car la quantité d'enzyme est négligeable par rapport à quantité de substrat. On peut donc assimiler la concentration en substrat libre à la concentration en substrat qu'on a mis dans le tube. Cela est un point important pour les calculs d'équation.

$$[S]_{tot} = [S] + [ES] + [P]$$

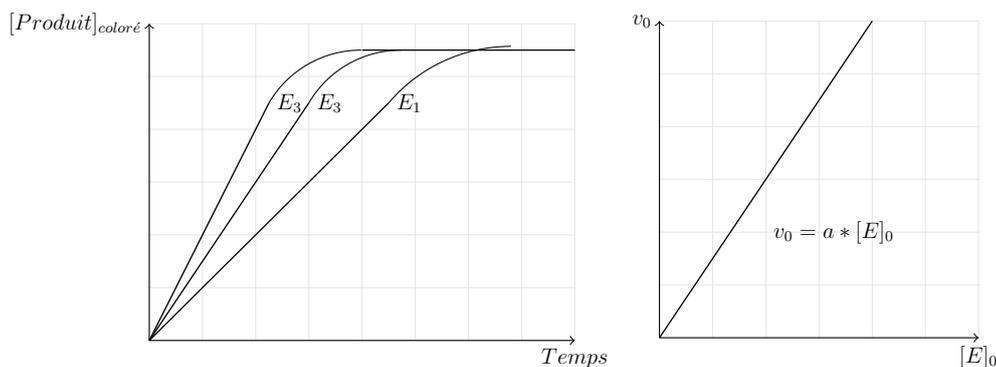
A $t=0$, il n'y a pas de produit et le complexe ES est négligeable devant le substrat libre dont : $[S]_{tot} = [S]_0 = [S]$

Ce qui va nous intéresser dans la mesure des vitesses de réaction, dans un premier temps, est d'avoir une idée de la quantité de substrat que peut consommer une certaine quantité d'enzyme dans un temps donné. C'est comme un coureur avant une course : si on lui donne trop de pâtes : il risque de vomir et de pas courir vite, si on ne lui on donne pas assez, il va avoir faim et il va se traîner. Dans notre cas, on va regarder la vitesse de réaction en fonction de la quantité d'enzyme et de la quantité de substrat mises dans le tube (soit $[E]_0$ et $[S]_0$).

2 Influence des concentrations en enzyme et en substrat

a. Influence de la concentration en enzyme : plus il y a de monde, plus ça va vite, c'est comme les déménagements.

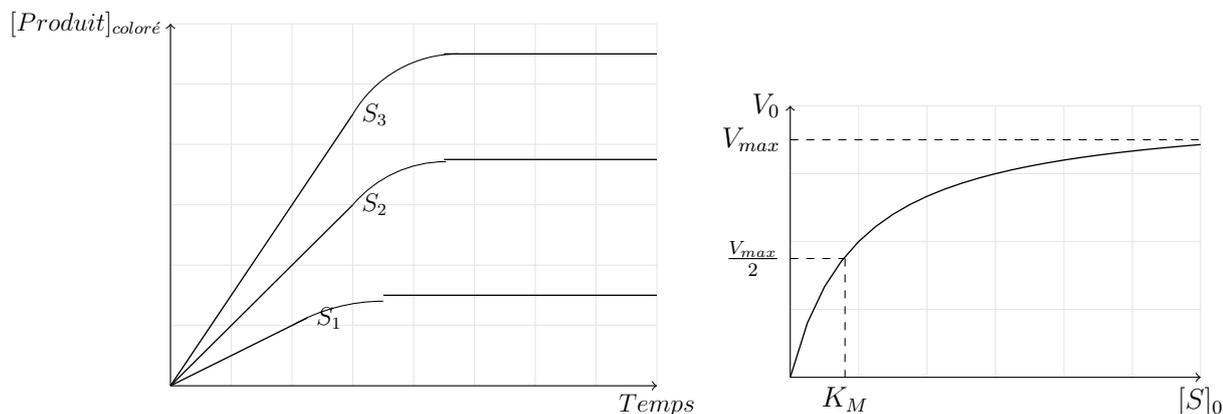
Pour établir l'influence de la concentration en enzyme, on mesure la vitesse initiale de la réaction v_o à différentes concentrations en enzyme pour une concentration en substrat fixe. Une fois qu'on a les vitesses pour différentes concentrations en enzyme, on trace la courbe v_o en fonction de $[E]_0$. On fixe une concentration en substrat.



Conclusion : La vitesse initiale de réaction est proportionnelle à la concentration en enzyme de départ.

b. Influence de la concentration en substrat

Dans ce cas, on mesure la vitesse de réaction avec une concentration en enzyme fixe mais on modifie la concentration initiale en substrat pour chaque expérience. On se place en conditions de vitesse initiale, et on obtient une courbe de la v_o en fonction de $[S]_0$.



Dans ce cas, la vitesse de réaction n'est pas directement proportionnelle à la concentration en substrat. Lorsque la concentration en substrat est très élevée, la vitesse n'augmente plus : l'enzyme est saturée, elle ne peut plus aller plus vite. On parle de vitesse maximale notée V_{max} . Pour avoir une idée de la concentration en substrat nécessaire au fonctionnement de l'enzyme, on note K_M , constante de Mickaelis, une concentration en substrat remarquable pour laquelle la vitesse de l'enzyme est la moitié de la vitesse maximale. Cette courbe est appelée courbe de Mickaëlis et Menten. L'équation de cette courbe est :

$$V_0 = \frac{k_{cat}E_0[S]_0}{K_M + [S]_0} = \frac{V_{max}[S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (4.9)$$

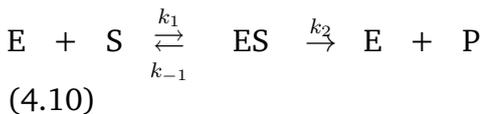
Les enzymes qui suivent cette équation de vitesse sont appelées enzymes Mickaéliennes.

3 Obtention de l'équation de Mickaelis et Menten : traitement mathématique

Il s'agit ici d'expliquer comment a été trouvée l'équation de Mickaelis et Menten.

Il existe deux types de traitements mathématiques pour obtenir ce type d'équation qui se basent sur deux approches différentes : le traitement du quasi-équilibre et le traitement à l'état stationnaire. Le traitement par quasi-équilibre est le premier historiquement à être apparu et, comme nous le verrons, est une version « simplifiée » qui n'est pas applicable à toutes les enzymes mais qui est souvent pratique. Le traitement à l'état stationnaire est plus complet, plus complexe aussi et ne trouve pas toujours d'équation utilisable pour les modèles enzymatiques complexes.

Nous allons travailler dans le contexte d'une réaction irréversible c'est-à-dire qu'on a pas de réaction de formation du substrat à partir du produit.



a. Le traitement au quasi-équilibre

Hypothèse : En 1913, Lenor Mickaelis et Maud Menten, reprenant le travail de Victor Henri firent l'hypothèse que $k_{-1/1} \gg \gg k_2$ soit que l'étape limitante en terme de vitesse est la formation du produit. Ceci est une hypothèse au sens propre du terme, on suppose qu'il existe des enzymes dont l'étape de formation du produit de réaction est beaucoup plus lente que l'équilibre de réaction entre le substrat libre et le complexe enzyme substrat. On suppose donc que, dès la mise en contact des réactifs, l'équilibre se met en place et on a donc un rapport entre ES, S et E qui dépend de la constante thermodynamique de cet équilibre : $K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$.

Quand on se place dans cette hypothèse on tient plus compte des constantes de vitesse du premier équilibre de réaction et on écrit :



En regardant cette réaction, plusieurs inconnues sont visibles la vitesse initiale de réaction (notre objectif), la concentration en substrat libre, la concentration en enzyme libre, la concentration en complexe enzyme substrat et la concentration en produits.

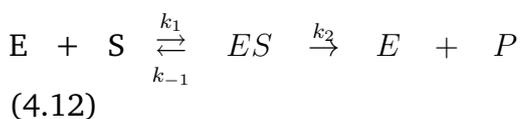
Par contre, on connaît la concentration en enzyme, en substrat et en produit qui ont été mises dans le tube.

L'objectif est de s'affranchir de toutes les concentrations inconnues pour exprimer la vitesse initiale en fonction uniquement des concentrations connues $[E]_0$, $[S]_0$ et des constantes thermodynamiques ou de vitesse spécifiques à chaque enzyme. Pour cela, nous allons nous servir des expressions de vitesse de réaction déterminées dans les études de cinétique chimique, des lois de conservation de la matière, de l'hypothèse émise ainsi que des particularités de la vitesse initiale.

1. Conditions expérimentales et de vitesses initiales : Au temps zéro de la réaction les **concentrations en s**

Petite analogie : J'ai fait une rigole dans mon jardin afin d'y faire circuler de l'eau entre le robinet et ma piscine. J'ouvre le robinet d'eau : il faudrait un certain temps pour que la rigole se remplisse. Mais une fois un certain niveau d'eau atteint, il va rester le même : il y a autant d'eau qui entre dans la rigole, que d'eau qui en sort : c'est un état stationnaire. Quand je coupe l'eau, l'eau va baisser : c'est l'état post-stationnaire pour disparaître : fin de réaction.

Grâce à la description de l'état stationnaire, nous allons pouvoir donner une expression de la vitesse initiale de réaction sans avoir à formuler d'hypothèse restrictive. Ici, nous tenons compte de toutes les constantes de vitesses puisque nous ne faisons aucune hypothèse sur leurs valeurs.



1. Conditions expérimentales et de vitesses initiales :

- Au temps zéro de la réaction les **concentrations en substrat et en enzyme sont connues** : ce sont celles qu'on a mis dans le tube : facile. $[S]_{tot} = [S]_0$ $[E]_{tot} = [E]_0$ (2)

- Au temps zéro, **on a pas de produit** (sauf si on en met dans le tube), ouf celui-là on l'oublie. $[P] = [P]_0 = 0$

- La plupart du temps, les **enzymes étant nécessaires en très faibles quantités** pour dégrader de grosses quantités de substrat. On peut supposer que la majorité du substrat est sous forme libre E et très peu sous forme ES. On peut donc assimiler la concentration en substrat libre à la concentration en substrat qu'on a mis dans le tube. Cela est un point important pour les calculs d'équation.

$$[S]_{tot} = [S] + [ES] + [P]$$

A $t=0$, il n'y a pas de produit et le complexe ES est négligeable devant le substrat libre donc : $[S]_{tot} = [S]_0 = [S]$ (2)

2. on écrit les constantes d'équilibre :

Ici on n'en a pas.

3. On écrit les relations de l'état stationnaire :

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$$

4. On écrit l'équation de conservation de l'enzyme :

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (4)$$

Ici ES n'est pas négligeable devant E.

5. La vitesse de réaction :

D'après les données de cinétique chimique :

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad (5)$$

6. On mouline dans le but de se débarrasser des valeurs auxquelles on n'a pas accès : $[E]$, $[ES]$, $[S]$ et de ne faire apparaître que ce qu'on connaît : $[E]_0$ et $[S]_0$. On pose le système d'équation puis on les élimine les unes après les autres en finissant par l'équation de vitesse.

a. On se débarrasse de $[S]$ grâce à l'équation 2 et on remplace.

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$$

b. On se débarrasse de $[E]$ grâce à l'équation (4)

$$[E]_0 - [ES] = [E] \quad (4)$$

On remplace dans (3) $\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1([E]_0 - [ES])[S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$

c. On se débarrasse de $[ES]$ grâce à l'équation 3.

$$0 = k_1([E]_0 - [ES])[S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$$

$$k_1([E]_0[S]_0) - (k_1[S]_0 + (k_{-1} + k_2))[ES] \quad (3)$$

$$[ES] = \frac{k_1([E]_0[S]_0)}{k_1[S]_0 + (k_{-1} + k_2)} \quad (3)$$

$$[E]_0 - [ES] = [E] \quad (4)$$

on remplace

$$v_0 = \frac{(k_2[E]_0[S]_0)}{[S]_0 + \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}}$$

— B. Signification des constantes cinétiques et activité enzymatique

1 Les paramètres cinétiques

La constante de Mickaëlis :

K_M est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale. Ainsi, si un enzyme a un K_M faible, il aura une efficacité catalytique maximum pour une faible concentration en substrat. La valeur de K_M est très variable selon l'enzyme et le substrat.

K_S est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat, plus il diminue pour l'affinité de l'enzyme pour le substrat augmente. K_M permet aussi d'avoir une idée de l'affinité de l'enzyme pour le substrat pour peu que $k_2 \ll k_{-1}$.

La constante catalytique :

Lorsque $[S]_0 \gg \gg \gg K_M$ (dernière partie de la courbe de Mickaëlis), l'enzyme est saturée en substrat et, en négligeant dans l'équation K_M devant $[S]_0$, on trouve donc que la vitesse de la réaction ne dépend plus que de la concentration en enzyme. Le paramètre est la constante catalytique de l'enzyme (elle s'affranchit de la notion d'affinité pour le substrat puisque celui-ci est saturant). **Cette valeur est aussi appelée turnover number de l'enzyme car elle est égale au nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps par une seule enzyme à saturation.** Elle est exprimée en temps^{-1} .

Elle se confond avec k_2 dans le modèle que nous venons de voir mais ce n'est pas toujours le cas, dans des modèles plus complexes, elle dépend de différentes constantes cinétiques.

Efficacité catalytique

Quand la concentration en substrat est très faible, c'est à dire $[S]_0 \ll \ll K_M$ (première partie de la courbe de Mickaëlis et Menten) , alors $\frac{k_{cat}}{K_M}$ est la constante de vitesse apparente de la réaction quand le substrat est en faible quantité : la vitesse de la réaction enzymatique varie en fonction de la fréquence de rencontre entre le substrat et l'enzyme. L'expression de $\frac{k_{cat}}{K_M}$ permet de mesurer l'efficacité catalytique de l'enzyme.

2 Activités enzymatiques

Ce qu'on appelle activité enzymatique est la capacité de l'enzyme à transformer le substrat en produit dans un laps de temps donné. Il existe plusieurs façons d'exprimer cette activité.

Activité moléculaire : le nombre de rotations (k_{cat}) est le nombre de molécules de substrat transformées par molécule d'enzyme par seconde (ou le nombre de moles de substrat transformées par mole d'enzyme par seconde).

L'activité molaire est le nombre de moles de substrat transformées par mole d'enzyme par minute ($k_{cat} \times 60$)

Activité enzymatique d'un échantillon : lorsqu'on reçoit un échantillon contenant un enzyme, le plus souvent ce qui nous intéresse n'est pas sa concentration ou sa pureté mais sa capacité à transformer le substrat soit son activité. **Cette activité s'exprime en quantité de substrat pouvant être transformé par unité de temps dans des conditions de pH, tampon, température optimales et dans des conditions où l'enzyme est à saturation** (conditions V_{max}). Il existe deux unités, l'une est couramment utilisée le U, mais n'est pas l'unité officielle internationale, c'est le katal.

1U = 1 mol de substrat transformée. mn^{-1}

1 katal (ou kat) = 1 mole de substrat transformée. s^{-1} peu pratique car souvent l'activité est de l'ordre du nkatal.

Activité spécifique : l'activité spécifique est l'activité de l'enzyme rapportée à la masse de protéines présente dans l'échantillon : $U.mg^{-1}$ de protéine par exemple. On la note A_S .

Exemple :

lot d'enzyme 1 : pureté 90 donc $A_S = 1 U.mg^{-1}$

lot d'enzyme 2 : pureté 100

donc $A_S = 1 U.mg^{-1}$

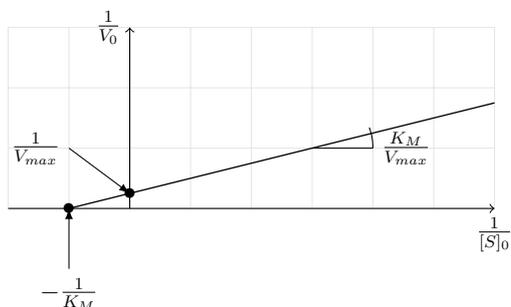
Ces deux échantillons ont une même K_M mais une activité A différente.

C. Méthodes graphiques d'obtention des paramètres cinétiques

La courbe de Micaëlis-Menten telle qu'on l'a vue précédemment, permet de déterminer K_M et V_{max} mais ne permet pas de les déterminer de façon précise d'un point de vue statistique : le plus souvent la V_{max} vraie n'est pas observée. On utilise donc des régressions linéaires.

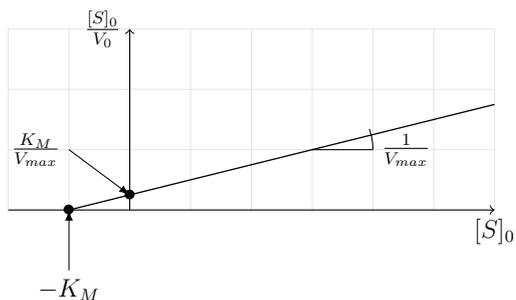
1 Représentation en double inverse ou représentation de Lineweaver et Burk

La représentation en double inverse de Lineweaver-Burk est la représentation que nous utiliserons le plus car elle est facile à obtenir et les paramètres cinétiques faciles à lire. Par contre, cette représentation a le désavantage de maximiser les erreurs de mesure sur les petites concentrations en substrat et de les minimiser sur les fortes concentrations en substrat.



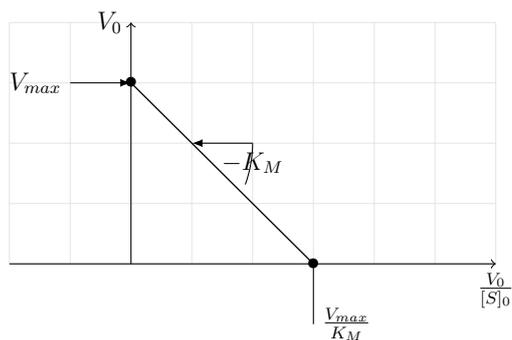
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} * \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

2 Graphique de Hanes



Intérêt : les écart-types ne sont pas déformés ils correspondent bien pour chaque point aux écart-types sur la courbe de Micaëlis et Menten.

3 Graphique d'Eadie et Hofstee



$$V_0 = V_{max} - K_M * \frac{V_0}{[S]_0}$$

Limite : les écart-types sont un peu déviés.

D. Des conditions expérimentales pas toujours simples à obtenir

Maintenant que la notion de cinétique Mickaëlienne a été vue et que les conditions de validité des équations ont été abordées, nous allons faire le point rapidement sur les aspects pratiques de ces études.

1 Mesure de l'activité enzymatique

a. Méthodes continues et discontinues de mesure

Nous avons déjà abordé ce point :

Méthodes continues : on suit directement l'apparition du produit ou la dégradation du substrat dans le temps.

Méthodes discontinues : on prélève un échantillon à différents temps pendant la réaction, on arrête celle-ci et on mesure le produit formé ou le substrat restant.

La méthode continue est toujours préférable parce qu'on s'affranchit un peu de l'erreur expérimentale sur le timing : zut j'ai deux secondes de retard, mince arrêtez de me parler ect ect .

b. Estimation de la vitesse initiale

Si en théorie mesurer la vitesse initiale est possible, en pratique on est souvent trop lent et la plupart des expérimentateurs mesurent une vitesse moyenne de début de réaction. Or les équations ne sont valables que pour une vitesse initiale.

En pratique cette vitesse initiale peut être obtenue si l'avancement de la réaction est mesuré pour une variation inférieure à 1 pourcent de l'avancement total. Par exemple, j'ai un enzyme qui transforme totalement une molécule de substrat en une molécule de produit. L'avancement maximal : plus de substrat, donc il faut mesurer la vitesse initiale dans un délais où moins d'1 pourcent du substrat est consommé.

Il est important de tracer bien la tangente à l'origine et non pas une tangente à partir des cinq premiers points par exemple. Tracer cette tangente correctement peut se révéler très complexe.

2 Choix des conditions expérimentales

Les conditions expérimentales dépendent des informations que vous voulez obtenir :

- Si vous voulez déterminer la quantité d'enzyme et son activité dans un échantillon, on se met dans des conditions où les autres facteurs que la concentration en enzyme ont très peu d'influence.
- Si vous voulez déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme, il faudra au contraire couvrir une gamme de conditions dans lesquelles on peut identifier la contribution de chaque facteur dans la vitesse de réaction.

a. Choix de la concentration en substrat

Paramètres cinétiques :

Dans l'idéal, pour avoir une mesure précise des paramètres cinétiques, il faut une gamme de concentration en substrat la plus large possible centrée sur K_M . Réaliser des tests à très haute concentration en substrat supérieure à $10K_M$ est important pour avoir une bonne estimation de V_{max} . En pratique, ces mesures peuvent poser des soucis :

- inhibition de la réaction par le substrat
- problème de solubilité du substrat
- problème de coût du substrat
- problèmes de mesure : en effet, si on mesure par exemple l'absorbance du produit formé ou du substrat consommé, pour les fortes concentrations, on risque de dépasser la zone de linéarité du spectrophotomètre.

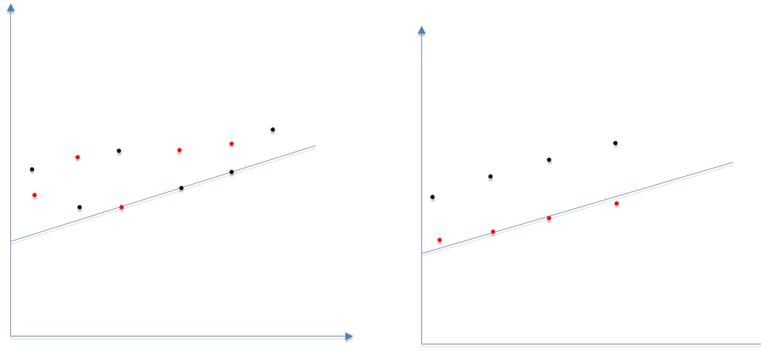
Pour les petites concentrations en substrat, il n'est pas nécessaire de descendre en dessous de valeurs inférieures à $0,2 K_M$ dans la mesure où on a toujours un point fixe qui est $[S]_0 = 0$. Par contre, multiplier les mesures à de faibles concentrations peut être intéressant en fonction de l'erreur réalisée sur chaque mesure.

Activité d'un échantillon

Pour mesurer l'activité catalytique d'un échantillon, il faut se placer dans des conditions où l'activité enzymatique ne dépend que de l'enzyme et non pas du substrat. Il faut donc choisir une concentration en substrat saturante en pratique de préférence supérieure à $10K_M$.

b. Choix des conditions physico-chimiques

Le plus souvent il est recommandé de travailler dans des conditions de température, de pH et de force ionique proches des conditions physiologiques mais il existe aussi de bonnes raisons de parfois faire les études dans des conditions légèrement différentes. Par exemple, certains enzymes purifiés dénaturent très vite à 37°C et des mesures à 25°C par exemple peuvent se révéler plus adaptées. Pour le pH, on conseille souvent de travailler au pH optimum de l'enzyme où elle n'est pas perturbée par de faibles variations de pH.



c. Réplicats des mesures

Dans les études cinétiques, il est rare que les résultats expérimentaux ne correspondent pas au modèle. Lorsqu'on se trouve à des écarts par rapport au modèle on peut se poser la question du besoin de considérer un modèle plus complexe (réversible à la place d'irréversible par exemple) ou d'une erreur expérimentale. Pour cela, il faut être en mesure d'estimer l'erreur effectuée sur chaque mesure. Pour chaque point, on va donc réaliser idéalement plusieurs fois la même mesure. On peut également estimer la qualité des mesures lorsqu'on réalise la régression linéaire de Lineweaver et Burk par calcul du coefficient de corrélation r^2 .

Lorsqu'on mesure plusieurs fois le même point, on peut savoir si l'erreur vient du manipulateur ou si elle est inhérente à la méthode. Si elle est inhérente à la méthode, on aura une dispersion aléatoire des différentes mesures. Si elle est due à une erreur de l'expérimentateur on aura par exemple une série de mesure dont les points seront systématiquement éloignés des autres.

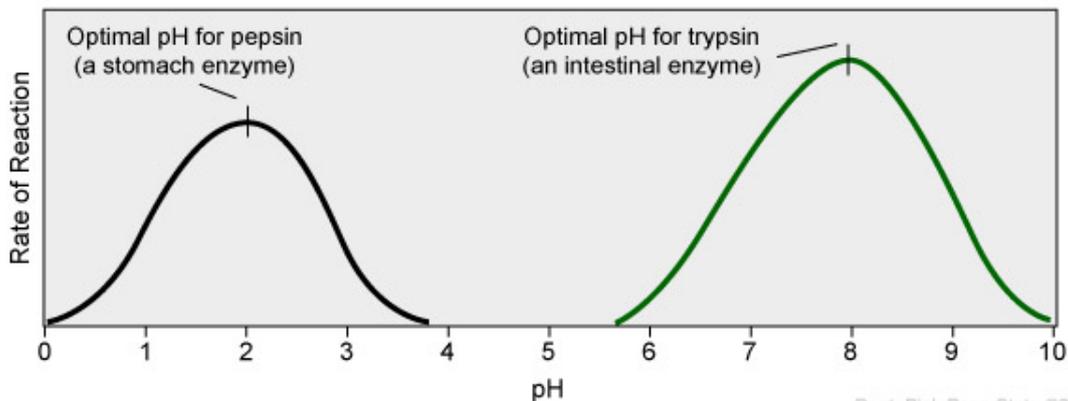
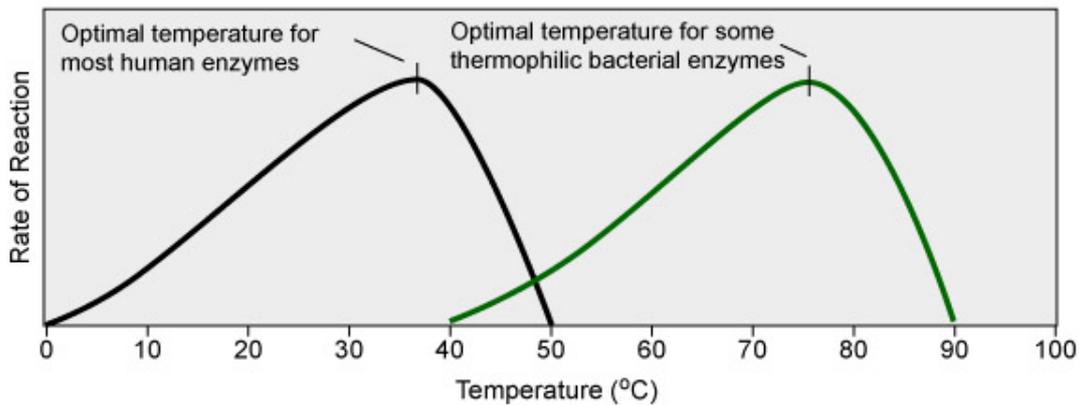
IV. Les paramètres influençant l'activité enzymatique

A. Les paramètres physico-chimiques

1 Température

L'effet de la température sur les réactions enzymatiques est dû à deux phénomènes. Tout d'abord, en augmentant la température on augmente l'énergie fournie au système et ainsi on augmente la vitesse de la réaction. D'un autre côté, les enzymes sont des protéines et les protéines sont dénaturées à trop fortes températures. La plupart des enzymes sont actives à des températures inférieures à 40°C. Les enzymes des hyperthermophiles résistent à la dénaturation à 100°C. La vitesse de réaction augmente donc avec la température jusqu'à atteindre la température de dénaturation de l'enzyme.

Optimal Temperature and pH



2 pH

Le pH influence énormément l'activité d'un enzyme. La plupart des protéines ne sont actives que une zone de pH étroite compris entre 5 et 9. Le pH agit sur plusieurs facteurs : la liaison du substrat à l'enzyme, l'activité catalytique de l'enzyme, l'ionisation du substrat et les variations de structure de l'enzyme. En effet, l'état d'ionisation des résidus impliqués dans la fixation du substrat, dans la catalyse ou dans la structure de l'enzyme change avec le pH. v_0 varie avec le pH selon une courbe

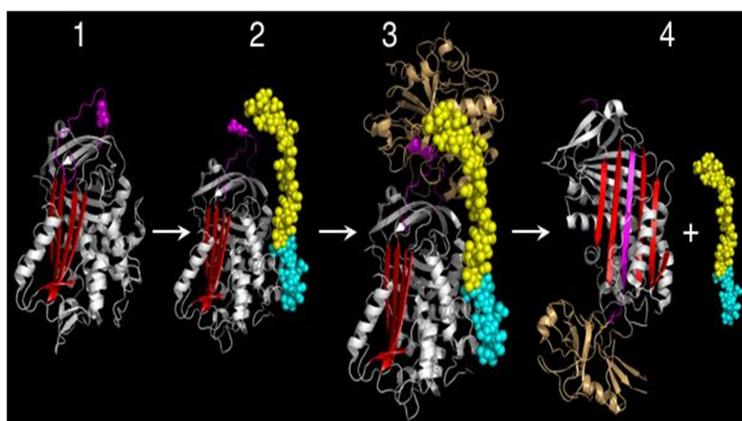
en cloche centrée sur un pH optimal. Les explications précises de cette courbe en cloche ne seront pas traitées cette année.

B. Les régulateurs

1 Les inhibiteurs irréversibles

Les inhibiteurs irréversibles sont ce qu'on peut appeler des poisons. Ce sont des molécules qui se fixent à l'enzyme et impliquent, le plus souvent, une fixation covalente d'un groupe essentiel de l'enzyme. Ils ne peuvent être supprimés que par dialyse ou par dilutions. Ce sont des poisons catalytiques : ils éliminent totalement son activité. Pour étudier ces inhibiteurs, on mesure la vitesse d'inactivation de l'enzyme.

Les inhibiteurs irréversibles peuvent être soit des inhibiteurs qui font des liaisons covalentes avec l'enzyme soit des inhibiteurs qui ont une telle affinité, qu'ils ne se dissocient pas. Parmi les inhibiteurs irréversibles importants biologiquement, on peut citer les substrats suicides. Ce sont des inhibiteurs qui sont reconnus par l'enzyme, catalysés, mais le produit de la réaction est un complexe enzyme-substrat covalent. C'est le cas des serpinés, une classe d'inhibiteurs qui bloquent les protéases à sérine. Certaines serpinés sont des inhibiteurs de la voie de la coagulation ou de la cascade du complément.



1. Antitrombine native
2. Antitrombine en présence d'héparine
3. Fixation de la thrombine (protéase à sérine)
4. Catalyse de l'anti-thrombine : complexe covalente entre l'enzyme et l'inhibiteur : inactivation des deux

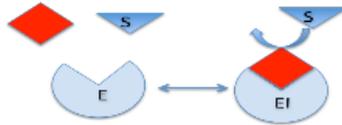
FIGURE 4.9 – Inhibition de la thrombine, (protéase à sérine de la coagulation) par l'anti-thrombine (de la famille des serpinés) 1. Antitrombine native 2. Antitrombine en présence d'héparine 3. Fixation de la thrombine (protéase à sérine) 4. Catalyse de l'anti-thrombine : complexe covalente entre l'enzyme et l'inhibiteur : inactivation des deux.

2 Les inhibiteurs réversibles

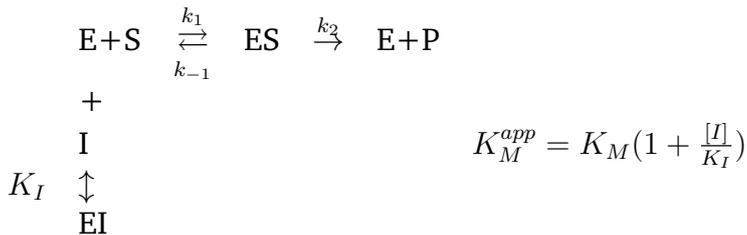
Les inhibiteurs réversibles peuvent se fixer à l'enzyme mais aussi s'en dissocier. Beaucoup d'inhibiteurs biologiques sont des inhibiteurs réversibles. Ils ont l'avantage de diminuer l'activité de l'enzyme sans pour autant l'inactiver totalement. Un certain nombre d'inhibiteurs sont aussi utilisés en pharmacologie. Par exemple, le Tamiflu est un inhibiteur réversible de la neuraminidase du virus de la grippe.

a. Compétitifs

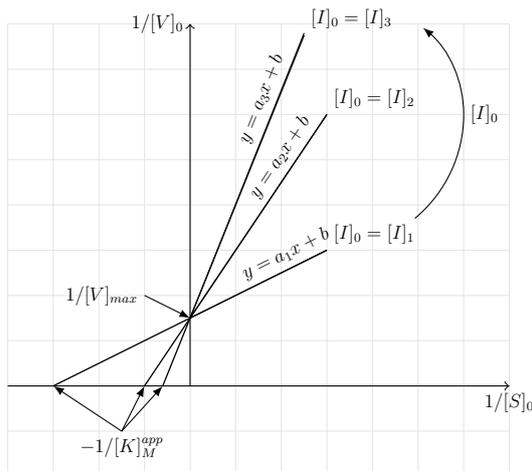
La forme générale de l'équation de vitesse en présence d'un inhibiteur réversible est la même que celle de l'enzyme seule. La différence réside dans l'expression des constantes de Micaëlis qui sont dites apparentes : K_M^{app} et de la constante de vitesse maximale, elle aussi dite apparente V_{max}^{app} . Le terme apparent indique le fait que ces constantes vont dépendre de la concentration en inhibiteur.



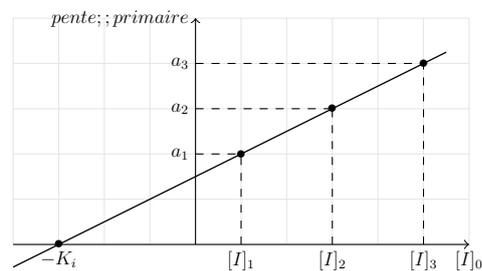
MODÈLE ET CONSTANTES CINÉTIQUES



GRAPHIQUES



GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[S]_0}\right)$



GRAPHIQUE SECONDAIRE : $pente = f([I]_0)$

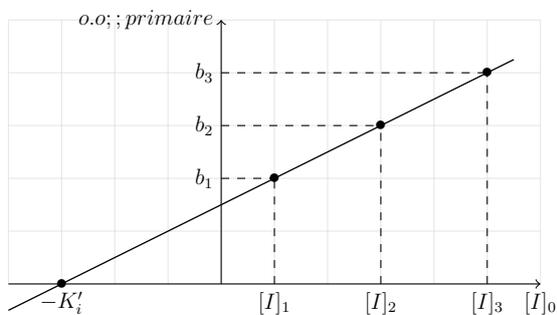
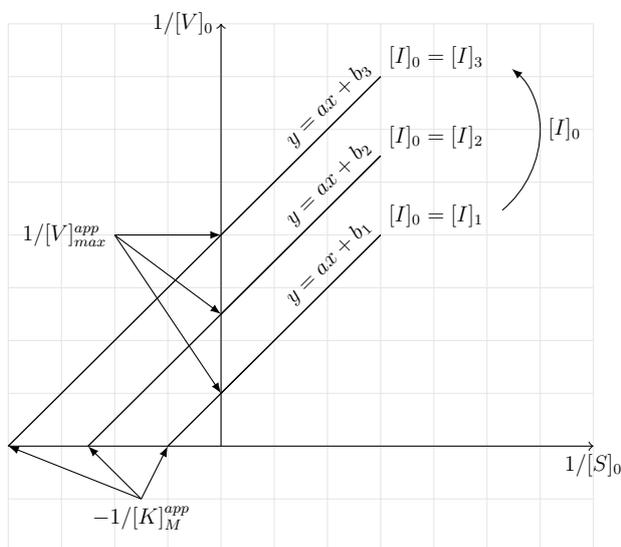
b. Les inhibiteurs dits incompétitifs



MODÈLE ET CONSTANTES CINÉTIQUES

$$\begin{array}{l}
 + \\
 I \\
 K'_I \updownarrow \\
 ESI \\
 \\
 K_M^{app} = \frac{K_M}{(1 + \frac{[I]}{K'_I})} \\
 V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{(1 + \frac{[I]}{K'_I})} \\
 \frac{K_M^{app}}{V_{max}^{app}} = \frac{K_M}{V_{max}}
 \end{array}$$

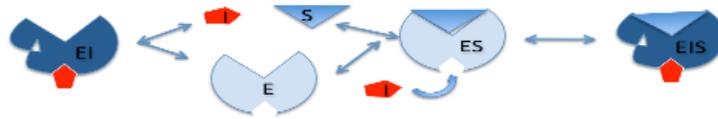
GRAPHIQUES



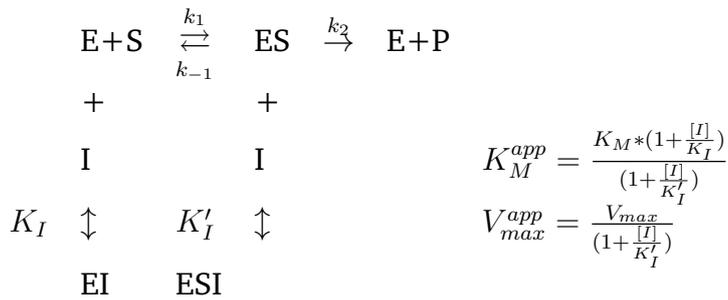
GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[S]_0}\right)$

GRAPHIQUE SECONDAIRE : $o.o. = f([I]_0)$

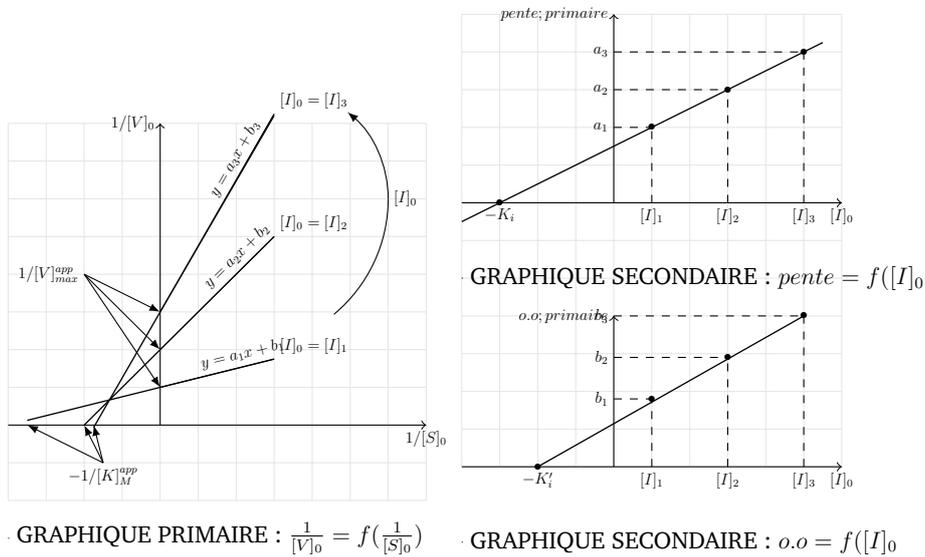
c. Les inhibiteurs dits non compétitifs ou mixtes



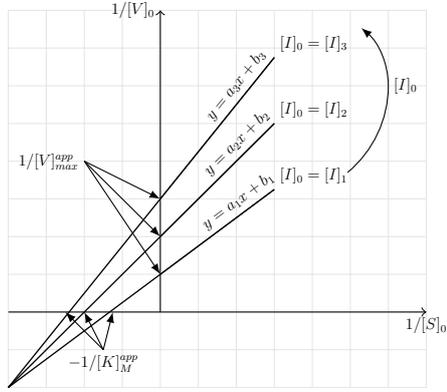
MODÈLE DE L'INHIBITION MIXTE ET CONSTANTES CINÉTIQUES



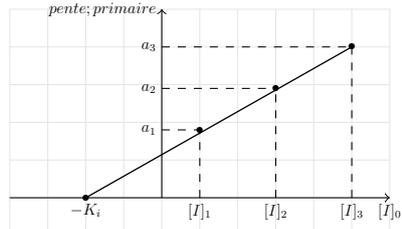
GRAPHIQUES : $K_i < K'_i$



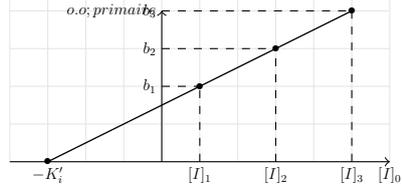
GRAPHIQUES : $K_i > K'_i$



· GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[S]_0}\right)$

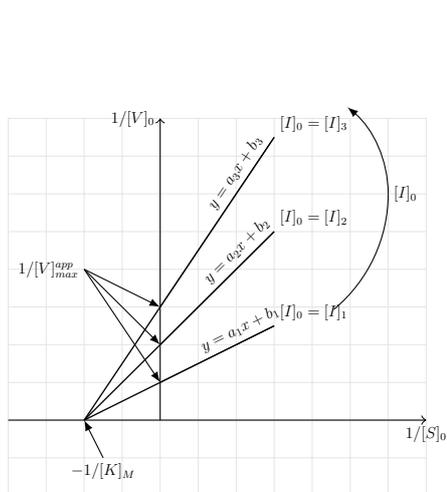


· GRAPHIQUE SECONDAIRE : $pente = f([I]_0)$

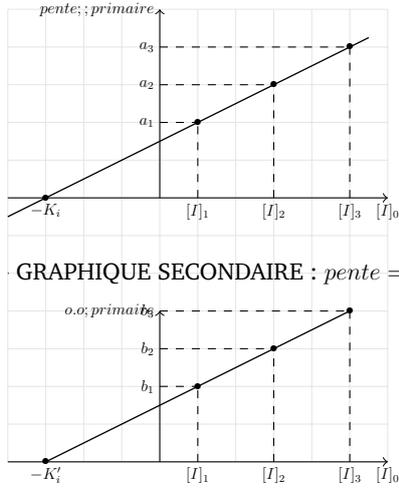


· GRAPHIQUE SECONDAIRE : $o.o = f([I]_0)$

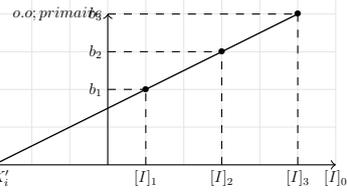
MODÈLE DE L'INHIBITION NON COMPÉTITIVE ET CONSTANTES CINÉTIQUES : comme précédemment mais avec $K'_I = K_I$ ce qui fait que $K_M^{app} = K_M$.



· GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[S]_0}\right)$



· GRAPHIQUE SECONDAIRE : pente = f([I]₀)



· GRAPHIQUE SECONDAIRE : o.o = f([I]₀)

3 Les activateurs

Il existe diverses significations du terme activateur. Ici nous considérerons comme activateur une espèce moléculaire qui, en se combinant à l'enzyme, a pour effet d'augmenter l'activité sans que lui-même soit modifié. Ne seront pas traités : les activations protéolytiques, les phosphorylations, les effets du magnésium (Mg^{2+}).

a. Activation spécifique

Dans ce modèle l'enzyme libre sans activateur est inactif. Ce cas est peu fréquent.

MODÈLE ET CONSTANTES CINÉTIQUES

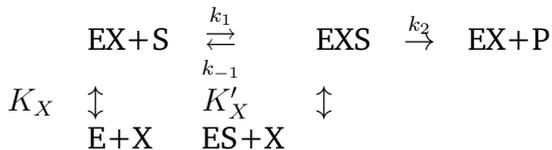


$$K_X \begin{array}{c} \updownarrow \\ E+X \end{array} \quad K_M^{app} = K'_M \left(1 + \frac{[K_X]}{[X]}\right)$$

$$v_o = \frac{V'_{max}[S]_0}{K_M^{app} + [S]_0} \quad (4.13)$$

b. Activation mixte

Dans ce cas l'activation est nécessaire à la catalyse.



$$V_0 = \frac{V'_{max}*[S]_0}{K'_M \left(1 + \frac{K_X}{[X]}\right) + [S]_0 \left(1 + \frac{K'_X}{[X]}\right)} \quad (4.14)$$

On peut utiliser les mêmes graphiques et les mêmes méthodes que dans le cas d'une inhibition.

C. Régulation de l'activité d'une protéine par modification covalente

L'activité des protéines en générale est dépendent de modification post-traductionnelles qui peuvent les activer ou les inhiber ou faciliter leur destruction. Parmi les modifications covalentes les plus connues on a :

Clivage : certains enzymes sont produits sous forme de zymogènes inactifs. Pour les activer, il faudra qu'une partie de la protéine soit clivée. Ceci peut être réalisé par une protéase : c'est le cas des protéases à sérine de la coagulation ou du complément.

Phosphorylation : la phosphorylation d'un enzyme par une kinase permet d'activer ou d'inactiver l'enzyme. La déphosphorylation par une phosphatase, aura l'effet inverse. Ce processus est particulièrement important dans les voies de transduction du signal et ne se limite pas aux enzymes.

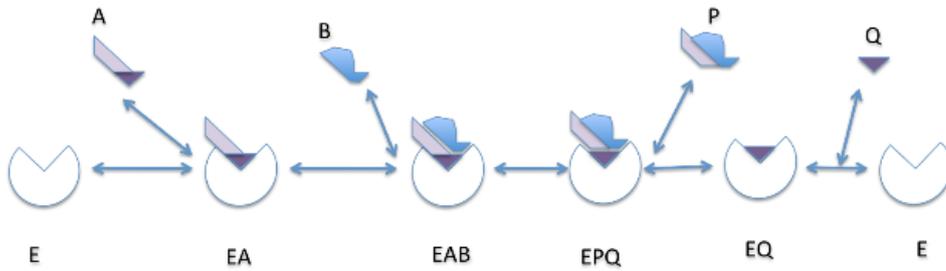
V. Les réactions irréversibles à plusieurs substrats

Les réactions à un seul substrat et un seul produit sont en réalité très rares. La majorité des réactions impliquent plusieurs substrats et libèrent plusieurs produits, mais le développement de la cinétique est simplifié sur la base de deux constatations :

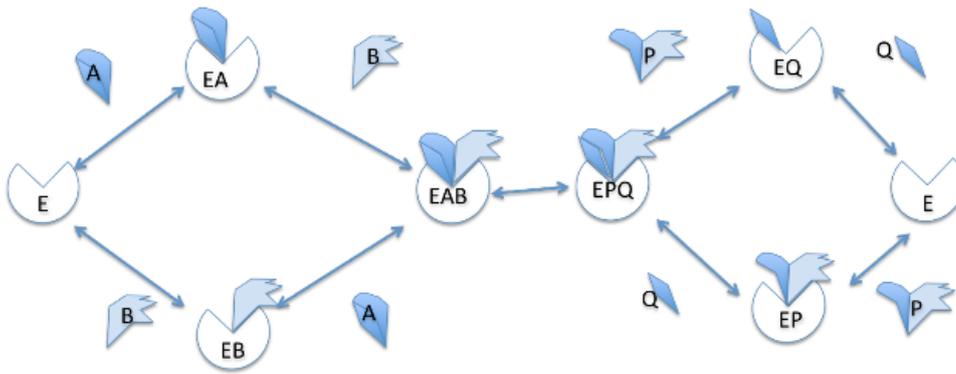
- Les enzymes hydrolytiques sont considérées comme des réactions à un seul substrat car l'eau est large excès.
- La majorité des enzymes se comportent comme des enzymes à un seul substrat si la concentration en un seul substrat varie. On va avoir des constantes de Micaëlis apparentes pour le substrat qui varie.

A. Les types de mécanismes

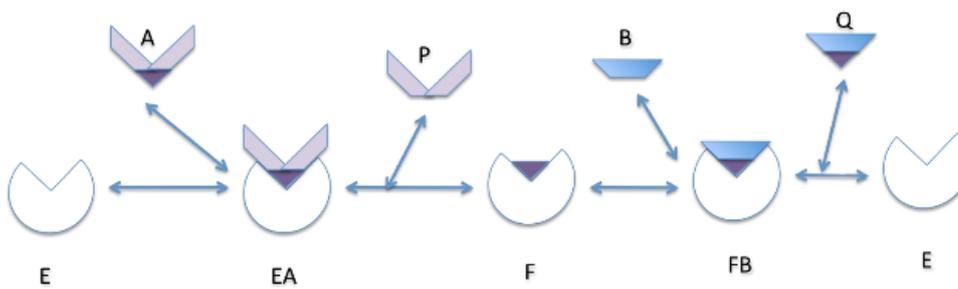
Les équations de vitesse et l'allure des courbes dépendent du mécanisme considéré : c'est à dire l'ordre dans lequel les substrats sont fixés et les produits libérés.



Mécanisme séquentiel ordonné



Mécanisme séquentiel aléatoire



Mécanisme à enzyme modifié/ ping-pong

1 Les processus séquentiels

Dans ces mécanismes l'enzyme n'est pas modifié en cours de catalyse et les substrats sont fixés avant que les produits soient libérés. Il existe deux représentations des mécanismes : la représentation de Cleland et la représentation de King-Altman.

2 Les processus non séquentiels ou à enzyme modifiée

Les mécanismes où un produit ou plusieurs sont libérés avant que tous les substrats aient été ajoutés sont appelés ping-pong. Il existe un intermédiaire dans lequel l'enzyme est modifiée covalamment par le substrat.

B. Les équations de vitesse et le traitement des données

1 Méthode

a. Équations de vitesse

Les équations de vitesse peuvent être obtenues soit par la méthode du quasi-équilibre soit par la méthode à l'état stationnaire en faisant les hypothèses adéquats :

- pour la méthode du quasi-équilibre : on néglige tout ce qui n'est pas à l'équilibre c'est-à-dire les réactions de formation des produits puisque nous sommes dans le cas de réactions irréversibles
- pour la méthode à l'état stationnaire : il n'y a pas de constante de vitesse d'association produit/enzyme ni de formation des substrats. On applique l'état stationnaire pour tous les complexes enzyme-substrat.

On obtient des résultats légèrement différents. Parfois, le quasi-équilibre est juste un cas particulier de l'état stationnaire parfois il donne des courbes étonnamment différentes.

Il existe d'autres méthodes qui permettent d'obtenir plus facilement les équations de vitesses quand les substrats et les produits deviennent trop nombreux.

b. Obtention des données

La vitesse initiale de réaction dépend ici dans le cas de réactions irréversibles de la concentration en deux substrats A et B. Les données vont être traitées en deux temps :

Tout d'abord, on mesure les vitesses initiales de réaction en fonction de la concentration initiale en substrat $[A]_0$. Pour cela, on met dans chaque tube une concentration constante et connue en $[B]_0$.

Puis on mesure les vitesses initiales de réaction en fonction de la concentration initiale en substrat $[B]_0$. Pour cela, on met dans chaque tube une concentration constante en $[A]_0$.

Si on fait une étude relativement complète, on va obtenir le comportement de l'enzyme en fonction de la concentration en $[A]_0$ à différentes concentrations fixées en $[B]_0$ et vice versa. On trace donc d'abord :

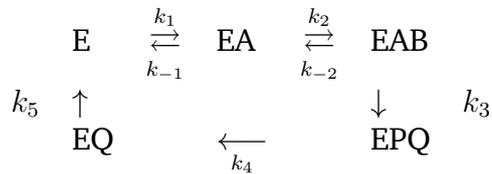
- un graphique primaire : représentation de Lineweaver et Burk le plus souvent. $\frac{1}{v_0}$ en fonction de $\frac{1}{[A]_0}$. Sur ce graphique, on va avoir cette droite pour différentes concentrations en $[B]_0$.
- un graphique secondaire dans lequel on trace la valeur de l'ordonnée à l'origine en fonction de la concentration en $[B]_0$.

On fait la même chose dans l'autre sens. Cela ressemble beaucoup aux études menées pour les inhibiteurs.

2 Les équations de vitesse et les graphiques d'un mécanisme séquentiel bi-bi ordonné

Cas général : traitement à l'état stationnaire

MODÈLE

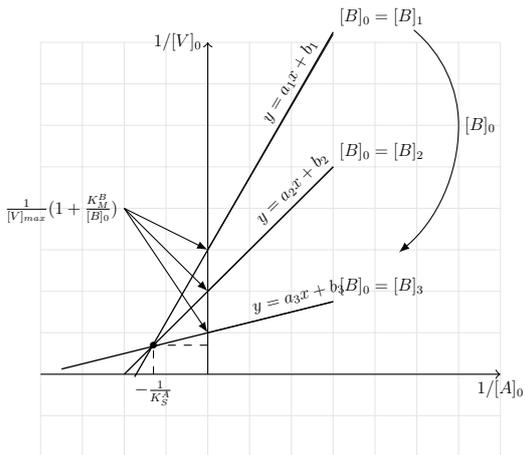


$$K_s^A = \frac{k_{-1}}{K_2}; K_M^A = \frac{k_3}{K_1}; K_M^B = \frac{k_{-2} + K_3}{K_2}; V_{max} = k_3 * [E]_0$$

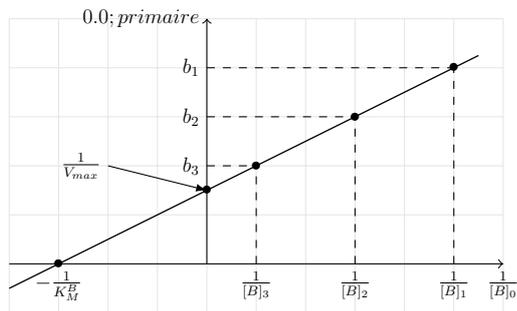
EQUATION : k_{-3} , k_{-4} et k_{-5} négligeables car la réaction est irréversible

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M^A}{V_{max}[A]} + \frac{K_M^B}{V_{max}[B]} + \frac{K_s^A K_M^B}{V_{max}[A][B]} \quad (4.15)$$

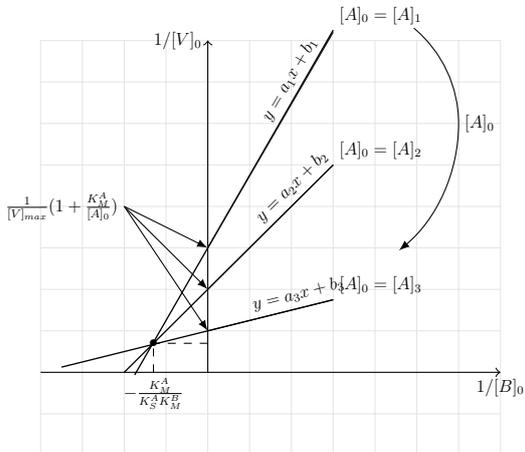
GRAPHIQUES



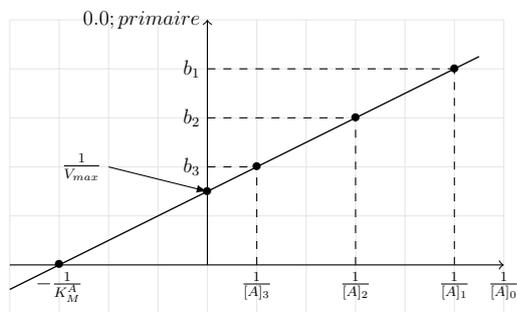
GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[A]_0}\right)$



GRAPHIQUE SECONDAIRE : $o.o = f\left(\frac{1}{[B]_0}\right)$



GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[B]_0}\right)$



GRAPHIQUE SECONDAIRE : $o.o = f\left(\frac{1}{[A]_0}\right)$

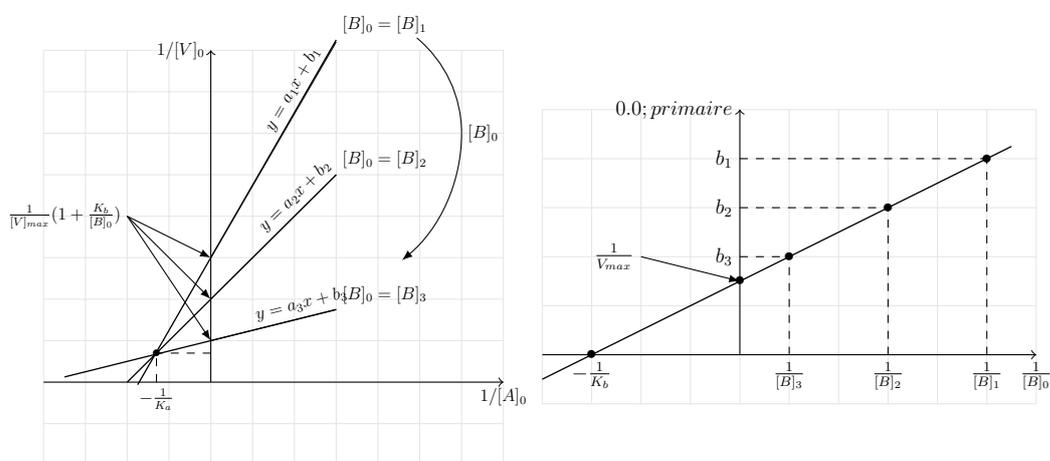
Cas particulier : traitement au quasi équilibre

Pour le quasi-équilibre, on néglige les réactions de formation du produit (3, 4 et 5) car on se place dans le cas d'une réaction irréversible. On ne tient donc compte que des constantes d'équilibre de formation de EA et de EAB.

EQUATION : Soit K_a et K_b les constantes d'équilibres des réactions de fixation de A et de B.

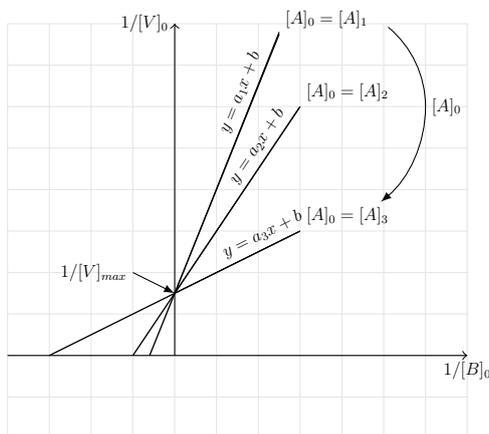
$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_b}{V_{max}[B]} + \frac{K_a K_b}{V_{max}[A][B]} \quad (4.16)$$

GRAPHIQUES



GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[A]_0}\right)$

GRAPHIQUE SECONDAIRE : $0.0; \text{primaire} = f\left(\frac{1}{[B]_0}\right)$



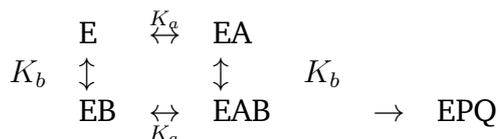
GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[B]_0}\right)$

3 Les équations de vitesse et les graphiques d'un mécanisme séquentiel bi bi aléatoire

Ce mécanisme traité par la méthode de l'état stationnaire ne permet pas d'obtenir une équation de type Mickaëlis Menten et donc de traiter les données. Par contre, si on se place dans le cas particulier d'un enzyme dont les équilibres de formation des complexes enzyme-substrat sont rapides et donc dont l'étape limitante est la formation des produits, on arrive par la méthode du quasi-équilibre à obtenir des équations.

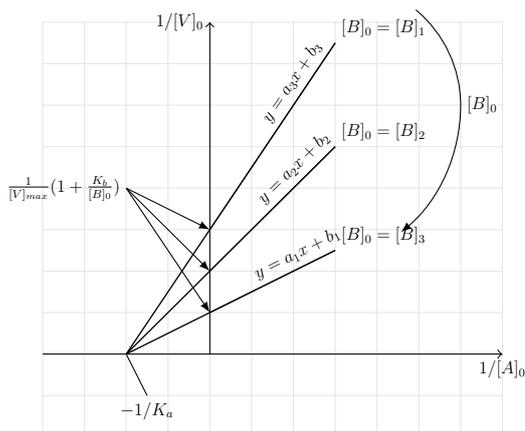
Cas particulier : traitement au quasi équilibre aléatoire indépendant

MODÈLE

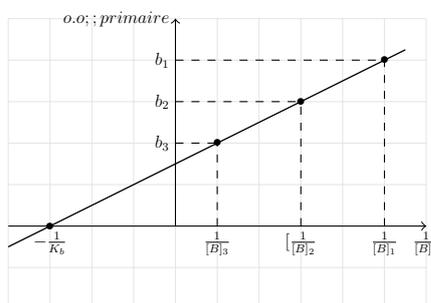


EQUATION :

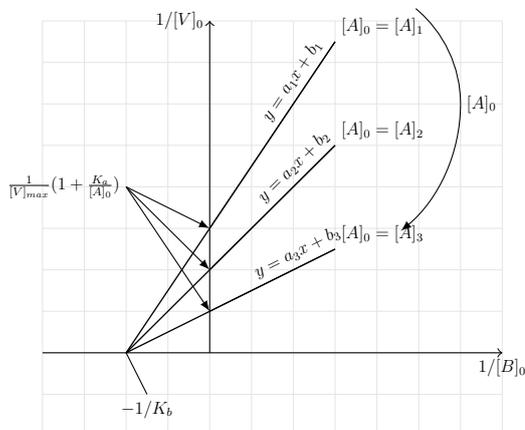
$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_a}{V_{max}[A]} + \frac{K_b}{V_{max}[B]} + \frac{K_a K_b}{V_{max}[A][B]} \quad (4.17)$$



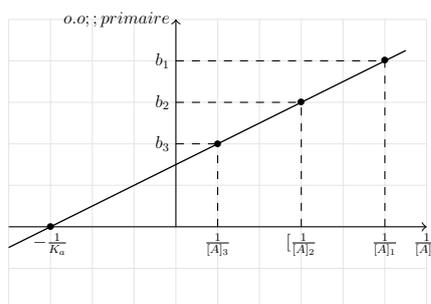
GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[A]_0}\right)$



GRAPHIQUE SECONDAIRE : $o.o. = f\left(\frac{1}{[B]_0}\right)$



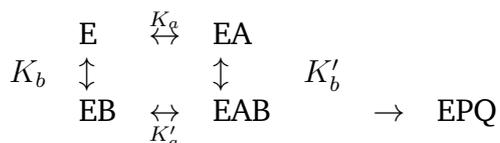
GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[B]_0}\right)$



GRAPHIQUE SECONDAIRE : $o.o. = f\left(\frac{1}{[A]_0}\right)$

Cas particulier : traitement au quasi équilibre aléatoire dépendant

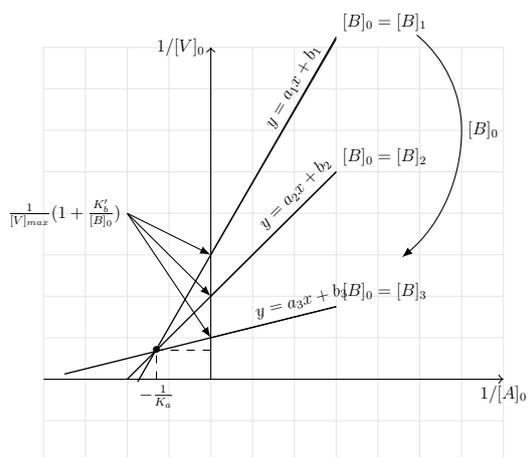
MODÈLE



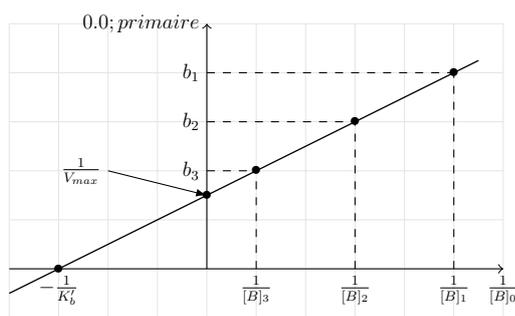
EQUATION : Soit K_a et K_b les constantes d'équilibres des réactions de formation de EA et de EB et Soit K'_a et K'_b les constantes d'équilibres des réactions de formation de EAB à partir de EB et de EAB à partir de EA. On a $K_a K'_b = K'_a K_b$.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K'_a}{V_{max}[A]} + \frac{K'_b}{V_{max}[B]} + \frac{K_a K'_b}{V_{max}[A][B]} \quad (4.18)$$

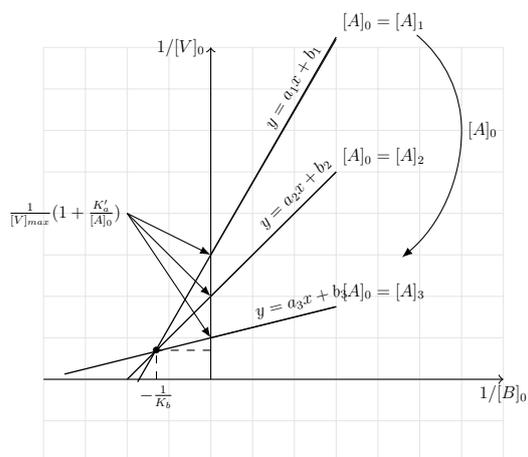
GRAPHIQUES



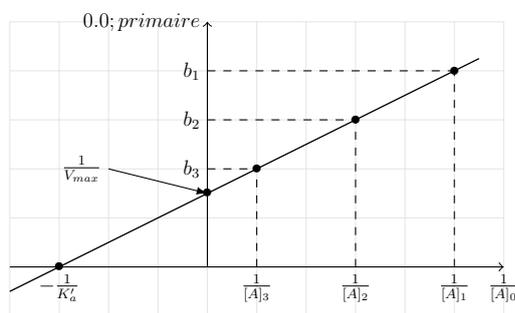
GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[A]_0}\right)$



GRAPHIQUE SECONDAIRE : $o.o = f\left(\frac{1}{[B]_0}\right)$



GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[B]_0}\right)$

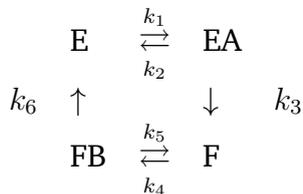


GRAPHIQUE SECONDAIRE : $o.o = f\left(\frac{1}{[A]_0}\right)$

4 Les équations de vitesse et les graphiques d'un mécanisme bi-bi ping pong

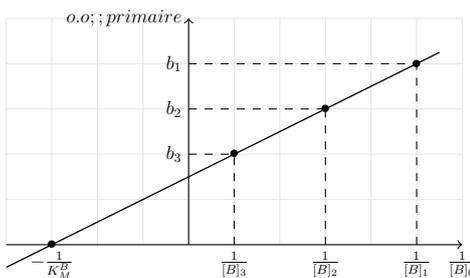
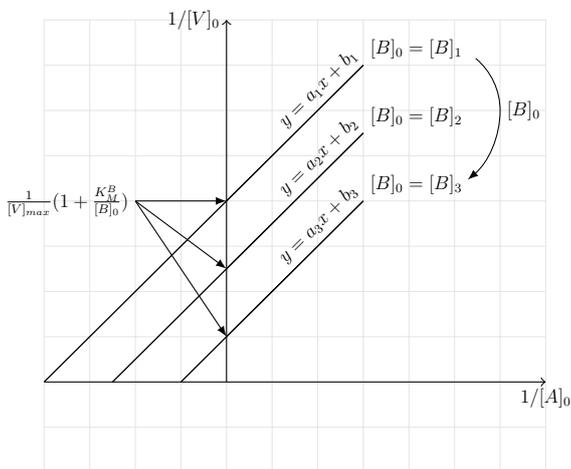
Cas général : traitement à l'état stationnaire :

MODÈLE



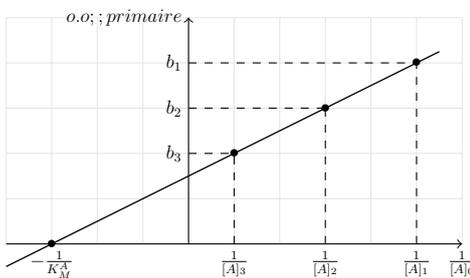
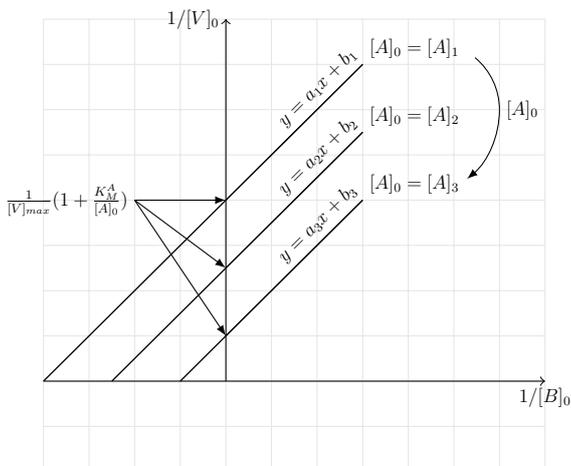
EQUATION : $K_M^A = \frac{k_6(k_2+k_3)}{k_2(k_3+k_6)}$; $K_M^B = \frac{k_3(k_5+k_6)}{k_4(k_3+k_6)}$; $V_{max} = \frac{k_6k_2}{(k_3+k_6)} * [E]_0$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M^A}{V_{max}[A]} + \frac{K_M^B}{V_{max}[B]} \tag{4.19}$$



GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[A]_0}\right)$

GRAPHIQUE SECONDAIRE : $o.o. = f\left(\frac{1}{[B]_0}\right)$



GRAPHIQUE PRIMAIRE : $\frac{1}{[V]_0} = f\left(\frac{1}{[B]_0}\right)$

GRAPHIQUE SECONDAIRE : $o.o. = f\left(\frac{1}{[A]_0}\right)$

Cas particulier : traitement au quasi équilibre : On trouve les même formes d'équations et donc de graphiques à la différence près que K_M^A et K_M^B sont remplacés par les constantes d'équilibre de

formation de EA et FB K_a et K_b .

WHOLE BIBLIOGRAPHY

[1] Voet D. et Voet J. Sous la dir. de WILEY. 4th. 2011.