

UNIVERSITÉ DU SUD TOULON VAR
LICENCE DE BIOLOGIE

Enzymologie 1 (B32)
Licence Biologie 2^{ème} année

2017

Démonstration des équations de Mickaëlis et Menten en présence d'inhibiteurs

V. Garlatti
garlatti@univ-tln.fr
Bureau U 123

I. LES INHIBITEURS COMPÉTITIFS

A. Le traitement au quasi-équilibre

1. Hypothèse

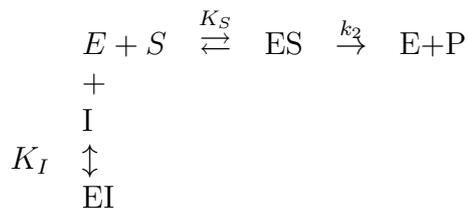
:

En 1913, Lenor Mickaelis et Maud Menten, reprenant le travail de Victor Henri firent l'hypothèse que $k_{-1/1} \gg k_2$ 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 : $K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$.

2. Etablir le système d'équation

:

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



Si on regarde cette réaction, on peut établir plusieurs inconnues : la vitesse initiale de réaction que l'on cherche, la concentration en substrat libre, la concentration en enzyme libre, la concentration en complexe enzyme substrat, la concentration en inhibiteur libre, la concentration en complexe EI et la concentration en produits.

Par contre, on connaît la concentration en enzyme, en substrat, en inhibiteur 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 $[E]_0$, $[S]_0$, $[I]_0$ 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 substrat et en enzyme sont connues** : ce sont celles qui ont été mises dans le tube : facile. $[S]_{tot} = [S]_0$ $[E]_{tot} = [E]_0$

- Au temps zéro, **il n'y 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. La concentration en substrat libre est donc quasiment la concentration en substrat

mise au départ. Cela est un point important pour les calculs d'équation. De même, l'inhibiteur est en concentration bien supérieure à la concentration en enzyme donc la concentration en complexe EI est négligeable devant la concentration en I.

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

A $t=0$, il y a très peu de produit formé et le complexe ES est négligeable devant le substrat libre donc : $[S]_{tot} = [S]_0 = [S]$ (1)

$$[I]_{tot} = [I] + [EI]$$

A $t=0$, la concentration en complexe EI est négligeable devant l'inhibiteur libre donc : $[I]_{tot} = [I]_0 = [I]$ (2)

2. les constantes d'équilibre :

Ici, on s'est placé dans le cas du quasi-équilibre donc comme nous l'avons vu :

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (3)$$

De plus, l'enzyme forme un complexe avec l'inhibiteur donc :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (4)$$

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

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] \quad (5)$$

Ici ES et EI ne sont pas négligeables devant E.

5. La vitesse de réaction :

D'après les données de cinétique chimique :

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad (6)$$

3. Résolution du système d'équation

6. On mouline dans le but de se débarrasser des valeurs auxquelles on n'a pas accès : $[E]$, $[ES]$, $[S]$, $[I]$, $[EI]$ et de ne faire apparaître que ce qu'on connaît : $[E]_0$, $[I]_0$, et $[S]_0$.

a. On se débarrasse d'une inconnue : $[S]$. d'après les équations (1) et (2) $[S]_0 = [S]$ et $[I]_0 = [I]$. On remplace dans les équations 3, 4, 5 et 6.

$$K_S = \frac{[E][S]_0}{[ES]} \quad (3)$$

$$K_I = \frac{[E][I]_0}{[EI]} \quad (4)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (5)$$

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad (6)$$

b. On se débarrasse de la concentration en complexe EI. Pour cela, on utilise l'équation (4) :

$$[EI] = \frac{[I]_0[E]}{K_I} \quad (4)$$

On remplace dans l'équation 5

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[E]}{K_I} \quad (5)$$

c. On se débarrasse de $[E]$ en utilisant l'équation (3)

$$[E] = \frac{K_S[ES]}{[S]_0} \quad (4)$$

on remplace dans (5)

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[E]}{K_I} \quad (5)$$

$$[E]_0 = [E](1 + \frac{[I]_0}{K_I}) + [ES] \quad (5)$$

$$[E]_0 = \frac{K_S[ES]}{[S]_0} * (1 + \frac{[I]_0}{K_I}) + [ES] \quad (5)$$

$$[E]_0 = [ES] * (\frac{K_S}{[S]_0} * (1 + \frac{[I]_0}{K_I}) + 1) \quad (5)$$

d. On se débarrasse de [ES] en utilisant l'équation (5)

$$[E]_0 = [ES] * (\frac{K_S}{[S]_0} * (1 + \frac{[I]_0}{K_I}) + 1) \quad (5)$$

$$[ES] = \frac{[E]_0}{(\frac{K_S}{[S]_0} * (1 + \frac{[I]_0}{K_I}) + 1)} \quad (5)$$

On remplace dans (6)

$$V_0 = \frac{k_2 * [E]_0}{(\frac{K_S}{[S]_0} * (1 + \frac{[I]_0}{K_I}) + 1)} \quad (6)$$

Le numérateur et le dénominateur sont multipliés par $[S]_0$

$$V_0 = \frac{k_2 * [E]_0 * [S]_0}{K_S * (1 + \frac{[I]_0}{K_I}) + [S]_0} \quad (6)$$

Ici on trouve : $k_{cat} = k_2$ et $K_S * (1 + \frac{[I]_0}{K_I}) = K_M^{app}$

B. Le traitement à l'état stationnaire

1. Modèle d'évolution de la concentration en espèces au cours de la réaction

:

L'état stationnaire n'est pas une hypothèse mais une étape de la réaction chimique qui a été définie par Briggs et Haldane en 1925. Si on étudie de plus près l'évolution de la concentration en produit ou en substrat au cours du temps, on peut voir qu'il y a une étape d'accélération de la réaction que nous n'avons pas signalé jusque là qui est dite période pré-stationnaire. Elle ne dure que 100 ms au maximum et est donc indétectable dans les conditions expérimentales classiques.

La période suivante est la période stationnaire qui doit son nom au comportement des différentes espèces :

- La vitesse d'apparition du produit et de disparition du substrat est constante. En effet, la courbe est un segment de droite dans cette période.

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \text{constante} = v_0$$

- La concentration en enzyme libre E et en complexe ES sont constantes.

$$\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[E]}{dt} = 0$$

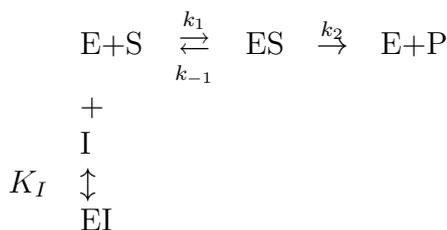
Enfin, nous avons un ralentissement sur la période post-stationnaire puis un plateau lorsque la réaction est terminée.

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.

2. Obtention du système d'équation

:



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 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. La concentration en substrat libre est donc quasiment la concentration en substrat mise au départ. Cela est un point important pour les calculs d'équation. De même, l'inhibiteur est en concentration bien supérieure à la concentration en enzyme donc la concentration en complexe EI est négligeable devant la concentration en I.

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

A $t=0$, il y a très peu de produit formé et le complexe ES est négligeable devant le substrat libre donc : $[S]_{tot} = [S]_0 = [S]$ (1)

$$[I]_{tot} = [I] + [EI]$$

A $t=0$, la concentration en complexe EI est négligeable devant l'inhibiteur libre donc : $[I]_{tot} = [I]_0 = [I]$ (2)

2. Les constantes d'équilibre :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (3)$$

3. Les relations de l'état stationnaire :

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

4. L'équation de conservation de l'enzyme :

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] \quad (5)$$

Ici ES et EI ne sont pas négligeable devant E.

5. La vitesse de réaction :

D'après les données de cinétique chimique :

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad (6)$$

3. Résolution du système d'équation

6. On mouline dans le but de se débarrasser des valeurs auxquelles on n'a pas accès : $[E]$, $[ES]$, $[S]$, $[I]$, $[EI]$ et de ne faire apparaître que ce qu'on connaît : $[E]_0$, $[I]_0$, et $[S]_0$.

a. On se débarrasse de $[S]$ $[I]$ grâce aux l'équation 1 et 2 et on remplace dans 3 et 4.

$$K_I = \frac{[E][I]_0}{[EI]} \quad (3)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

b. On se débarrasse de $[EI]$ grâce à l'équation (3)

$$[EI] = \frac{[I]_0[E]}{K_I} \quad (3)$$

On remplace dans l'équation 5

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[E]}{K_I} \quad (5)$$

c. On se débarrasse de $[E]$ grâce à l'équation 5.

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[E]}{K_I} \quad (5)$$

$$[E]_0 = [E]\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + [ES] \quad (5)$$

$$[E] = \frac{[E]_0 - [ES]}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)} \quad (5)$$

on remplace

$$0 = k_1[S]_0 * \left(\frac{[E]_0 - [ES]}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)}\right) - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

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

$$0 = k_1[S]_0 * \left(\frac{[E]_0 - [ES]}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)}\right) - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

$$0 = k_1[S]_0 * \left(\frac{[E]_0}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)}\right) - k_1[S]_0 * \left(\frac{[ES]}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)}\right) - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

$$0 = k_1[S]_0 * \left(\frac{[E]_0}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)}\right) - [ES]\left(\left(\frac{k_1[S]_0}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)}\right) - (k_{-1} + k_2)\right) \quad (4)$$

$$k_1[S]_0 * \left(\frac{[E]_0}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)}\right) = [ES]\left(\left(\frac{k_1[S]_0}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)}\right) + (k_{-1} + k_2)\right) \quad (4)$$

On multiplie tous les facteurs par $1 + \frac{[I]_0}{K_I}$

$$k_1[S]_0 * [E]_0 = [ES]\left(k_1[S]_0 + (k_{-1} + k_2) * \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)\right) \quad (4)$$

$$\frac{k_1[S]_0 * [E]_0}{\left(k_1[S]_0 + (k_{-1} + k_2) * \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)\right)} = [ES] \quad (4)$$

On divise numérateur et dénominateur par k_1

$$\frac{[S]_0 * [E]_0}{([S]_0 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} * (1 + \frac{[I]_0}{K_I}))} = [ES] \quad (4)$$

On remplace dans (6)

$$V_0 = \frac{k_2 * [S]_0 * [E]_0}{([S]_0 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} * (1 + \frac{[I]_0}{K_I}))}$$

Ici on trouve : $k_{cat} = k_2$ et $K_M^{app} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} * (1 + \frac{[I]_0}{K_I})$ or dans le modèle sans inhibiteur $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ donc $K_M^{app} = K_M * (1 + \frac{[I]_0}{K_I})$

II. LES INHIBITEURS INCOMPÉTITIFS

A. Le traitement au quasi-équilibre

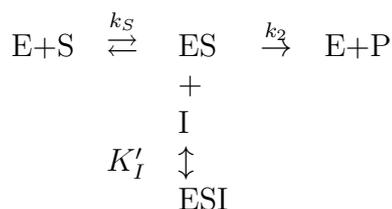
1. Hypothèse

:

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 : $K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$.

2. Etablir le système d'équation :

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



Si on regarde cette réaction, on peut établir plusieurs inconnues : la vitesse initiale de réaction que l'on cherche, la concentration en substrat libre, la concentration en enzyme libre, la concentration en complexe enzyme substrat, la concentration en inhibiteur libre, la concentration en complexe ESI et la concentration en produits.

Par contre, on connaît la concentration en enzyme, en substrat, en inhibiteur 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 $[E]_0$, $[S]_0$, $[I]_0$ 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 substrat et en enzyme sont connues** : ce sont celles qui ont été mises dans le tube : facile. $[S]_{tot} = [S]_0$ $[E]_{tot} = [E]_0$

- Au temps zéro, **il n'y 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. La concentration en substrat libre est donc quasiment la concentration en substrat mise au départ. Cela est un point important pour les calculs d'équation. De même, l'inhibiteur est en concentration bien supérieure à la concentration en enzyme donc la concentration en complexe ESI est négligeable devant la concentration en I.

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

A $t=0$, il y a très peu de produit formé et le complexe ES et ESI est négligeable devant le substrat libre donc : $[S]_{tot} = [S]_0 = [S]$ (1)

$$[I]_{tot} = [I] + [ESI]$$

A $t=0$, la concentration en complexe ESI est négligeable devant l'inhibiteur libre donc : $[I]_{tot} = [I]_0 = [I]$ (2)

2. les constantes d'équilibre :

Ici, on s'est placé dans le cas du quasi-équilibre donc comme nous l'avons vu :

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (3)$$

De plus, l'enzyme forme un complexe avec l'inhibiteur donc :

$$K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (4)$$

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

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ESI] \quad (5)$$

Ici ES et ESI ne sont pas négligeables devant E.

5. La vitesse de réaction :

D'après les données de cinétique chimique :

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad (6)$$

3. Résolution du système d'équation

6. On mouline dans le but de se débarrasser des valeurs auxquelles on n'a pas accès : $[E]$, $[ES]$, $[S]$, $[I]$, $[ESI]$ et de ne faire apparaître que ce qu'on connaît : $[E]_0$, $[I]_0$, et $[S]_0$.

a. On se débarrasse d'une inconnue : $[S]$. d'après les équations (1) et (2) $[S]_0 = [S]$ et $[I]_0 = [I]$. On remplace dans les équations 3, 4, 5 et 6.

$$K_S = \frac{[E][S]_0}{[ES]} \quad (3)$$

$$K'_I = \frac{[ES][I]_0}{[ESI]} \quad (4)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ESI] \quad (5)$$

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad (6)$$

b. On se débarrasse de la concentration en complexe ESI. Pour cela, on utilise l'équation (4) :

$$[ESI] = \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (4)$$

On remplace dans l'équation 5

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (5)$$

c. On se débarrasse de [E] en utilisant l'équation (3)

$$[E] = \frac{K_S[ES]}{[S]_0} \quad (4)$$

on remplace dans (5)

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (5)$$

$$[E]_0 = \frac{K_S[ES]}{[S]_0} + [ES] + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (5)$$

d. On se débarrasse de [ES] en utilisant l'équation (5)

$$[E]_0 = [ES] \left(\frac{K_S}{[S]_0} + 1 + \frac{[I]_0}{K'_I} \right) \quad (5)$$

$$\frac{[E]_0}{\left(\frac{K_S}{[S]_0} + 1 + \frac{[I]_0}{K'_I} \right)} = [ES] \quad (5)$$

On remplace dans (6)

$$V_0 = \frac{k_2 * [E]_0}{\left(\frac{K_S}{[S]_0} + 1 + \frac{[I]_0}{K'_I} \right)} \quad (6)$$

Le numérateur et le dénominateur sont multipliés par $[S]_0$

$$V_0 = \frac{k_2 * [E]_0 [S]_0}{(K_S + [S]_0 * (1 + \frac{[I]_0}{K'_I}))} \quad (6)$$

Le numérateur et le dénominateur sont divisés par $1 + \frac{[I]_0}{K'_I}$

$$V_0 = \frac{\frac{k_2}{(1 + \frac{[I]_0}{K'_I})} * [E]_0 [S]_0}{\frac{K_S}{(1 + \frac{[I]_0}{K'_I})} + [S]_0} \quad (6)$$

Ici on trouve : $k_{cat}^{app} = \frac{k_2}{(1 + \frac{[I]_0}{K'_I})}$ et $K_M^{app} = \frac{K_S}{(1 + \frac{[I]_0}{K'_I})}$

B. Le traitement à l'état stationnaire

1. Modèle d'évolution de la concentration en espèces au cours de la réaction :

L'état stationnaire n'est pas une hypothèse mais une étape de la réaction chimique qui a été définie par Briggs et Haldane en 1925. Si on étudie de plus près l'évolution de la concentration en produit ou en substrat au cours du temps, on peut voir qu'il y a une étape d'accélération de la réaction que nous n'avons pas signalé jusque là qui est dite période pré-stationnaire. Elle ne dure que 100 ms au maximum et est donc indétectable dans les conditions expérimentales classiques.

La période suivante est la période stationnaire qui doit son nom au comportement des différentes espèces :

- La vitesse d'apparition du produit et de disparition du substrat est constante. En effet, la courbe est un segment de droite dans cette période.

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \text{constante} = v_0$$

- La concentration en enzyme libre E et en complexe ES sont constantes.

$$\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[E]}{dt} = 0$$

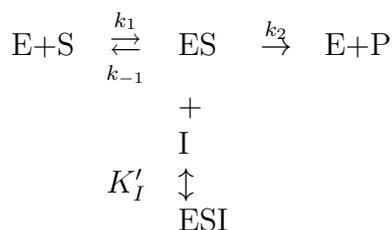
Enfin, nous avons un ralentissement sur la période post-stationnaire puis un plateau lorsque la réaction est terminée.

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.

2. Obtention du système d'équation

:



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 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 ou ESI. La concentration en substrat libre est donc quasiment la concentration en substrat mise au départ. Cela est un point important pour les calculs d'équation. De même, l'inhibiteur est en concentration bien supérieure à la concentration en enzyme donc la concentration en complexe ESI est négligeable devant la concentration en I.

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

A t=0, il y a très peu de produit formé et le complexe ES et ESI est négligeable devant le substrat libre donc : $[S]_{tot} = [S]_0 = [S]$ (1)

$$[I]_{tot} = [I] + [ESI]$$

A t=0, la concentration en complexe ESI est négligeable devant l'inhibiteur libre donc : $[I]_{tot} = [I]_0 = [I]$ (2)

2. Les constantes d'équilibre :

$$K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (3)$$

3. Les relations de l'état stationnaire :

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

4. L'équation de conservation de l'enzyme :

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ESI] \quad (5)$$

Ici ES et ESI ne sont pas négligeable devant E.

5. La vitesse de réaction :

D'après les données de cinétique chimique :

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad (6)$$

3. Résolution du système d'équation

6. On mouline dans le but de se débarrasser des valeurs auxquelles on n'a pas accès : $[E]$, $[ES]$, $[S]$, $[I]$, $[ESI]$ et de ne faire apparaître que ce qu'on connaît : $[E]_0$, $[I]_0$, et $[S]_0$.

a. On se débarrasse de $[S]$ $[I]$ grâce aux l'équation 1 et 2 et on remplace dans 3 et 4.

$$K'_I = \frac{[ES][I]_0}{[ESI]} \quad (3)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

b. On se débarrasse de $[ESI]$ grâce à l'équation (3)

$$[ESI] = \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (3)$$

On remplace dans l'équation 5

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (5)$$

c. On se débarrasse de $[E]$ grâce à l'équation 5.

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (5)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES]\left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right) \quad (5)$$

$$[E] = [E]_0 - [ES]\left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right) \quad (5)$$

On remplace dans (4)

$$0 = k_1[E][S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

$$0 = k_1[S]_0 * ([E]_0 - [ES]\left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)) - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

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

$$0 = k_1[S]_0 * [E]_0 - k_1[S]_0 * [ES]\left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right) - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

$$0 = k_1[S]_0 * [E]_0 - [ES](k_1[S]_0 * \left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right) + (k_{-1} + k_2)) \quad (4)$$

$$k_1[S]_0 * [E]_0 = [ES](k_1[S]_0 * \left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right) + (k_{-1} + k_2)) \quad (4)$$

$$\frac{k_1[S]_0*[E]_0}{(k_1[S]_0*(1+\frac{[I]_0}{K_I}))+k_{-1}+k_2)} = [ES] \quad (4)$$

On remplace dans (6)

$$V_0 = \frac{k_1*k_2*[S]_0*[E]_0}{(k_1[S]_0*(1+\frac{[I]_0}{K_I}))+k_{-1}+k_2)} \quad (6)$$

On divise par $k_1 * (1 + \frac{[I]_0}{K_I})$

$$V_0 = \frac{\frac{k_2}{(1+\frac{[I]_0}{K_I})}*[S]_0*[E]_0}{([S]_0+\frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1*(1+\frac{[I]_0}{K_I})})} \quad (6)$$

Ici on trouve : $k_{cat} = \frac{k_2}{(1+\frac{[I]_0}{K_I})}$ et $K_M^{app} = \frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1*(1+\frac{[I]_0}{K_I})}$ or dans le modèle sans inhibiteur $K_M = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$

$$\text{donc } K_M^{app} = \frac{K_M}{1+\frac{[I]_0}{K_I}}$$

III. LES INHIBITEURS MIXTES

A. Le traitement au quasi-équilibre

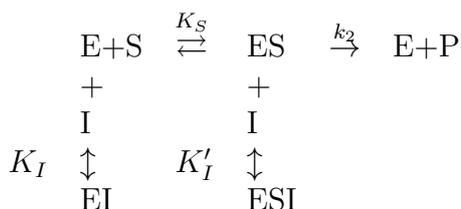
1. Hypothèse

:

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 : $K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$.

2. Etablir le système d'équation :

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



Si on regarde cette réaction, on peut établir plusieurs inconnues : la vitesse initiale de réaction que l'on cherche, la concentration en substrat libre, la concentration en enzyme libre, la concentration en complexe enzyme substrat, la concentration en inhibiteur libre, la concentration en complexe ESI, la concentration en complexe EI et la concentration en produits.

Par contre, on connaît la concentration en enzyme, en substrat, en inhibiteur 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 $[E]_0$, $[S]_0$, $[I]_0$ 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 substrat et en enzyme sont connues** : ce sont celles qui ont été mises dans le tube : facile. $[S]_{tot} = [S]_0$ $[E]_{tot} = [E]_0$

- Au temps zéro, **il n'y 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 ou ESI. La concentration en substrat libre est donc quasiment la concentration en substrat mise au départ. Cela est un point important pour les calculs d'équation. De même, l'inhibiteur est en concentration bien supérieure à la concentration en enzyme donc la concentration en complexe ESI est négligeable devant la concentration en I.

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

A $t=0$, il y a très peu de produit formé et le complexe ES et ESI est négligeable devant le substrat libre donc : $[S]_{tot} = [S]_0 = [S]$ (1)

$$[I]_{tot} = [I] + [ESI]$$

A $t=0$, la concentration en complexe ESI est négligeable devant l'inhibiteur libre donc : $[I]_{tot} = [I]_0 = [I]$ (2)

2. les constantes d'équilibre :

Ici, on s'est placé dans le cas du quasi-équilibre donc comme nous l'avons vu :

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (3)$$

De plus, l'enzyme forme un complexe avec l'inhibiteur donc :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (4)$$

$$K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (5)$$

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

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad (6)$$

Ici ES, EI et ESI ne sont pas négligeables devant E.

5. La vitesse de réaction :

D'après les données de cinétique chimique :

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad (7)$$

3. Résolution du système d'équation

6. On mouline dans le but de se débarrasser des valeurs auxquelles on n'a pas accès : $[E]$, $[ES]$, $[S]$, $[I]$, $[ESI]$ et de ne faire apparaître que ce qu'on connaît : $[E]_0$, $[I]_0$, et $[S]_0$.

a. On se débarrasse d'une inconnue : $[S]$. d'après les équations (1) et (2) $[S]_0 = [S]$ et $[I]_0 = [I]$. On remplace dans les équations 3, 4, 5 et 6.

$$K_S = \frac{[E][S]_0}{[ES]} \quad (3)$$

$$K_I = \frac{[E][I]_0}{[EI]} \quad (4)$$

$$K'_I = \frac{[ES][I]_0}{[ESI]} \quad (5)$$

b. On se débarrasse de la concentration en complexe EI. Pour cela, on utilise l'équation (4) :

$$[EI] = \frac{[I]_0[E]}{K_I} \quad (4)$$

On remplace dans l'équation 5

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[E]}{K_I} + [ESI] \quad (5)$$

c. On se débarrasse de la concentration en complexe ESI. Pour cela, on utilise l'équation (5) :

$$[ESI] = \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (5)$$

On remplace dans l'équation 6

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[E]}{K_I} + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (6)$$

d. On se débarrasse de $[E]$ en utilisant l'équation (3)

$$[E] = \frac{K_S[ES]}{[S]_0} \quad (3)$$

on remplace dans (6)

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[E]}{K_I} + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (6)$$

$$[E]_0 = [E]\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + [ES] + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (6)$$

$$[E]_0 = \frac{K_S[ES]}{[S]_0} * \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + [ES] + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (6)$$

e. On se débarrasse de $[ES]$ en utilisant l'équation (6)

$$[E]_0 = [ES] * \left(\frac{K_S}{[S]_0} * \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + 1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right) \quad (6)$$

$$\frac{[E]_0}{\frac{K_S}{[S]_0} * \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + 1 + \frac{[I]_0}{K'_I}} = [ES] \quad (6)$$

On remplace dans (7)

$$V_0 = \frac{k_2 * [E]_0}{\frac{K_S}{[S]_0} * \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + 1 + \frac{[I]_0}{K'_I}} \quad (7)$$

On multiplie dénominateur et numérateur par $[S]_0$

$$V_0 = \frac{k_2 * [E]_0 * [S]_0}{K_S * \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + [S]_0 * \left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)} \quad (7)$$

On divise dénominateur et numérateur par $\left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)$

$$V_0 = \frac{\frac{k_2}{1 + \frac{[I]_0}{K_I'}} * [E]_0 * [S]_0}{K_S * \frac{(1 + \frac{[I]_0}{K_I'})}{1 + \frac{[I]_0}{K_I'}} + [S]_0} \quad (7)$$

Ici on trouve : $k_{cat}^{app} = \frac{k_2}{1 + \frac{[I]_0}{K_I'}}$ et $K_M^{app} = K_S * \frac{(1 + \frac{[I]_0}{K_I'})}{1 + \frac{[I]_0}{K_I'}}$

B. Le traitement à l'état stationnaire

1. Modèle d'évolution de la concentration en espèces au cours de la réaction :

L'état stationnaire n'est pas une hypothèse mais une étape de la réaction chimique qui a été définie par Briggs et Haldane en 1925. Si on étudie de plus près l'évolution de la concentration en produit ou en substrat au cours du temps, on peut voir qu'il y a une étape d'accélération de la réaction que nous n'avons pas signalé jusque là qui est dite période pré-stationnaire. Elle ne dure que 100 ms au maximum et est donc indétectable dans les conditions expérimentales classiques.

La période suivante est la période stationnaire qui doit son nom au comportement des différentes espèces :

- La vitesse d'apparition du produit et de disparition du substrat est constante. En effet, la courbe est un segment de droite dans cette période.

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \text{constante} = v_0$$

- La concentration en enzyme libre E et en complexe ES sont constantes.

$$\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[E]}{dt} = 0$$

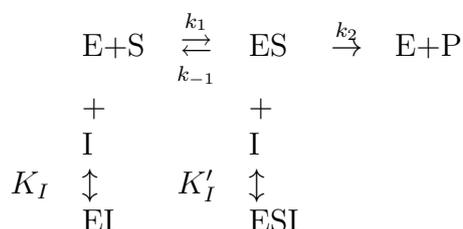
Enfin, nous avons un ralentissement sur la période post-stationnaire puis un plateau lorsque la réaction est terminée.

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.

2. Obtention du système d'équation

:



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 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 ou ESI. La concentration en substrat libre est donc quasiment la concentration en substrat mise au départ. Cela est un point important pour les calculs d'équation. De même, l'inhibiteur est en concentration bien supérieure à la concentration en enzyme donc la concentration en complexe ESI ou EI est négligeable devant la concentration en I.

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

A t=0, il y a très peu de produit formé et le complexe ES est négligeable devant le substrat libre donc : $[S]_{tot} = [S]_0 = [S]$ (1)

$$[I]_{tot} = [I] + [EI] + [ESI]$$

A t=0, la concentration en complexe EI comme ESI est négligeable devant l'inhibiteur libre donc : $[I]_{tot} = [I]_0 = [I]$ (2)

2. Les constantes d'équilibre :

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (3)$$

$$K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (4)$$

3. Les relations de l'état stationnaire :

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (5)$$

4. L'équation de conservation de l'enzyme :

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad (6)$$

Ici ES, EI et ESI ne sont pas négligeable devant E.

5. La vitesse de réaction :

D'après les données de cinétique chimique :

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad (7)$$

3. Résolution du système d'équation

6. On mouline dans le but de se débarrasser des valeurs auxquelles on n'a pas accès : $[E]$, $[ES]$, $[S]$, $[I]$, $[EI]$, $[ESI]$ et de ne faire apparaître que ce qu'on connaît : $[E]_0$, $[I]_0$, et $[S]_0$.

a. On se débarrasse de $[S]$ $[I]$ grâce aux l'équation 1 et 2 et on remplace dans 3, 4 et 5.

$$K_I = \frac{[E][I]_0}{[EI]} \quad (3)$$

$$K'_I = \frac{[ES][I]_0}{[ESI]} \quad (4)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (5)$$

b. On se débarrasse de [EI] grâce à l'équation (3)

$$[EI] = \frac{[I]_0[E]}{K_I} \quad (3)$$

On remplace dans l'équation 6

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[E]}{K_I} + [ESI] \quad (6)$$

c. On se débarrasse de [ESI] grâce à l'équation (3)

$$[ESI] = \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (4)$$

On remplace dans l'équation 6

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[E]}{K_I} + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (6)$$

d. On se débarrasse de [E] grâce à l'équation 6.

$$[E]_0 = [E] + [ES] + \frac{[I]_0[E]}{K_I} + \frac{[I]_0[ES]}{K'_I} \quad (6)$$

$$[E]_0 = [E]\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + [ES] * \left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right) \quad (6)$$

$$[E]_0 - [ES] * \left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right) = [E]\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) \quad (6)$$

$$\frac{[E]_0 - [ES] * \left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)} = [E] \quad (6)$$

On remplace dans (5)

$$0 = k_1[E][S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (5)$$

$$0 = k_1[S]_0 * \left(\frac{[E]_0 - [ES] * \left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)}\right) - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (5)$$

e. On se débarrasse de [ES] grâce à l'équation (5).

$$0 = k_1[S]_0 * \left(\frac{[E]_0 - [ES] * \left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)}\right) - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (5)$$

$$0 = \frac{k_1}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}} [S]_0 [E]_0 - k_1 [S]_0 * [ES] * \frac{\left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)} - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (5)$$

$$\frac{k_1}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}} [S]_0 [E]_0 = [ES] * \left(k_1 [S]_0 * \frac{\left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)} + (k_{-1} + k_2)\right) \quad (5)$$

$$\frac{\frac{k_1}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}} [S]_0 [E]_0}{\left(k_1 [S]_0 * \frac{\left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)} + (k_{-1} + k_2)\right)} = [ES] \quad (5)$$

On remplace dans (7)

$$V_0 = \frac{\frac{k_2 * k_1}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}} [S]_0 [E]_0}{\left(k_1 [S]_0 * \frac{\left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)} + (k_{-1} + k_2)\right)} \quad (7)$$

$$V_0 = \frac{\frac{k_2 * k_1}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}} * [S]_0 * [E]_0}{\left(k_1 [S]_0 * \frac{\left(1 + \frac{[I]_0}{K'_I}\right)}{\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right)} + (k_{-1} + k_2)\right)} \quad (7)$$

On divise numérateur et dénominateur par $\frac{k_1 * (1 + \frac{[I]_0}{K_I})}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}}$

$$V_0 = \frac{\frac{k_2}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}} [S]_0 * [E]_0}{[S]_0 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} * \frac{1 + \frac{[I]_0}{K_I}}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}}} \quad (7)$$

Ici on trouve : $k_{cat} = \frac{k_2}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}}$ et $K_M^{app} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} * \frac{1 + \frac{[I]_0}{K_I}}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}}$ or dans le modèle sans inhibiteur $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

$$\text{donc } K_M^{app} = K_M * \frac{1 + \frac{[I]_0}{K_I}}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}}$$