

LES ENZYMES

GBA3

pascale.chalier@umontpellier.fr

PLAN

I. INTRODUCTION Définition, Utilisation, Propriétés, Classification

II. COMPLEXE ENZYME-SUBSTRAT

III. CINETIQUE DES REACTIONS ENZYMATIQUES

III.1 Rappel de cinétique chimique

III.2 Cinétique des réactions enzymatique à un SUBSTRAT

IV. REVERSIBILITE de LA REACTION

V. MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

VI. EXEMPLE d'ACTION ENZYMATIQUE

I- INTRODUCTION

Un enzyme ou une enzyme ????

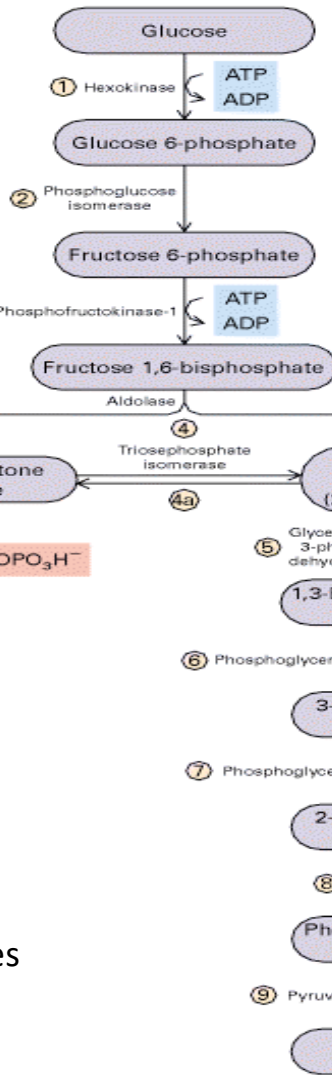
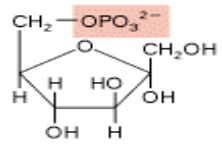
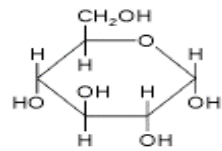
D'après l'académie française : genre masculin

D'après l'académie des sciences : genre féminin

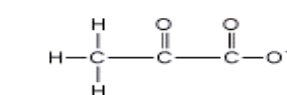
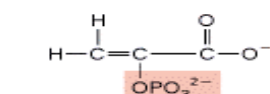
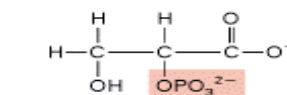
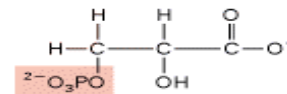
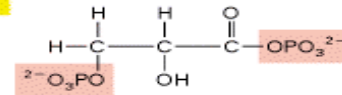
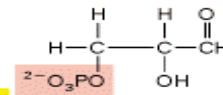
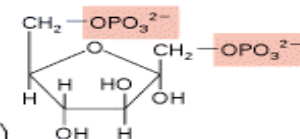
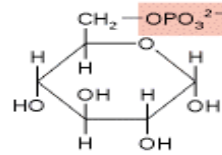
Enzymes => Catalyseurs qui permettent que les réactions biologiques se fassent rapidement à T°C et pression douces ou modérées => indispensables à la vie cellulaire

Pratiquement toutes les réactions biologiques sont catalysées par des enzymes et se font à des vitesses compatibles avec la durée de vie d'une cellule.

Les êtres vivants animaux végétaux, micro-organismes possèdent un très grand nombre d'enzymes qui sont impliqués dans les voies métaboliques.

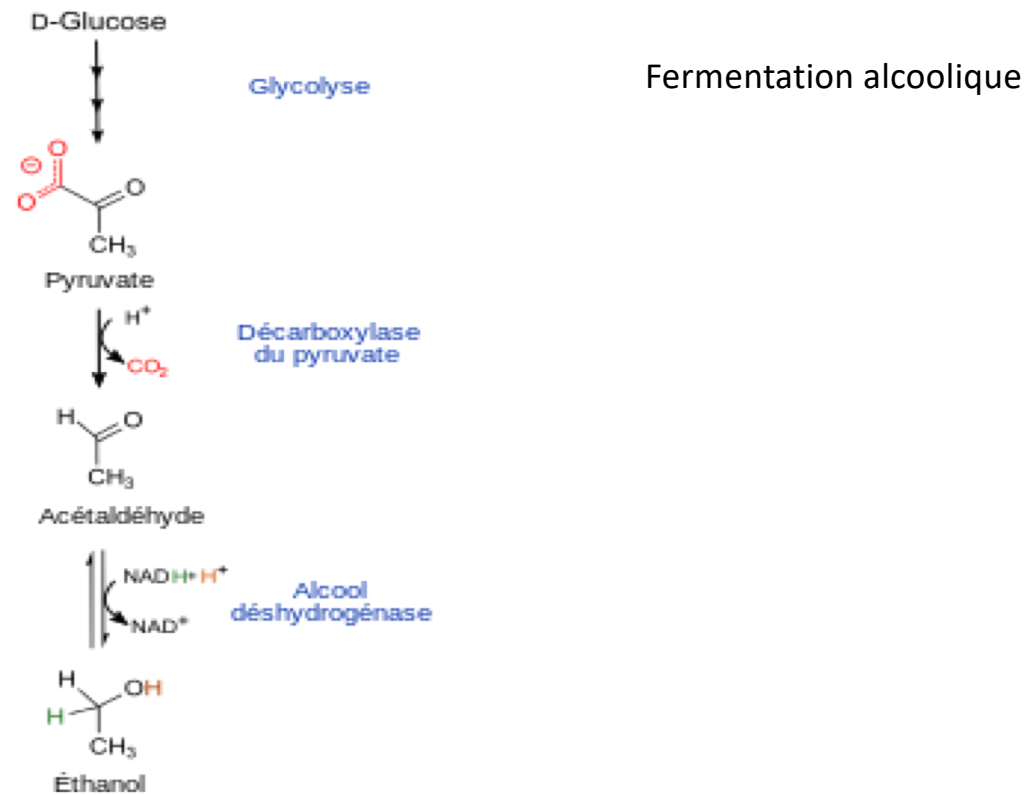


Glycolyse : combien de réaction ?
combien d'enzymes ?



3 kinases

L'utilisation d'un microorganisme implique la mise en jeu de son équipement enzymatique.



Définition générale des enzymes

- **Les enzymes sont des protéines particulières de haut PM**
=> **pourvues d'activité catalytique**



Structure spécifique

Apoenzyme = partie protéique de l'enzyme

Holoenzyme = Apoenzyme + co-facteur et/ou un co-enzyme

Co-facteurs : composés minéraux ou organiques nécessaires pour la réaction enzymatique.

Ions métalliques : stabilisateurs de nombreux enzymes (ex Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}/Fe^{2+} , Cu^{2+}/Cu^{1+})

Electrophiles ; polarisent la liaison à attaquer et la rendent plus accessible par exemple à une hydrolyse
groupe hémique (Fer, Fe^{3+}) peroxydase, catalase

Co-enzymes : molécules biologiques indispensables à la réaction
liés

La biotine (vitamine), liée de manière covalente aux carboxylases => apportée par l'alimentation
les aminotransférases nécessitent du phosphate pyridoxal (vitamines B6)

libres

NAD^+ , $NADP^+$, FAD (oxydo-réduction) (AMP , ATP transfert) considérés comme des substrats. Ils ne sont pas liés à l'enzyme, donc dialysables et à une concentration différente de celle de l'enzyme

Pourquoi utiliser des enzymes

Premier extrait enzymatique = découvert par A Payen et J.F Persoz en 1833

Extrait de malt traité à l'éthanol => récupération d'une substance labile à la chaleur mais qui hydrolyse l'amidon
« **diastase** »

En 1836 mise en évidence dans l'estomac d'un **ferment protéolytique, qui a été dénommé « la pepsine »**.

Toujours d'actualité

Remplacer les catalyseurs chimiques toxiques

Diminuer le taux de déchets des réactions

Compatibles avec le développement durable : actives sur de nombreux produits et biodégradables elles même, mais récupérables et réutilisables

Utilisables sans purification (préparation enzymatique ou fermentation) car spécifique

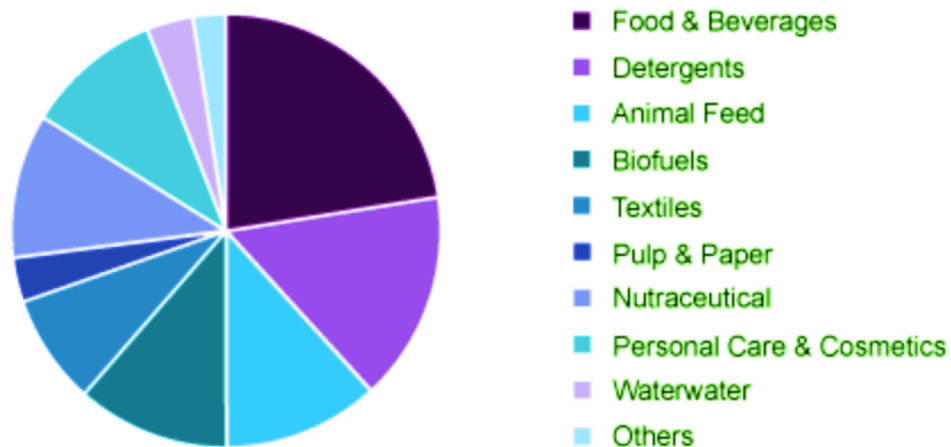
Actives dans des conditions douces mais aussi dans des conditions extrêmes

Plus de 3000 enzymes répertoriées = > 5% utilisées

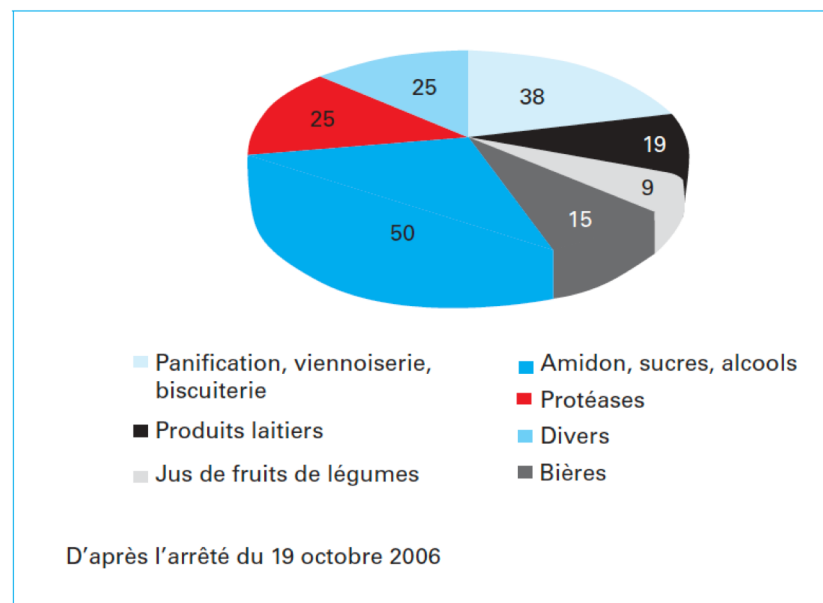
Marché en expansion => 10 milliard d'Euros

=> demande d'autorisation pour mise sur le marché (organisme génétiquement modifiés)

Utilisation des enzymes



Enzymes autorisés en alimentaire



Les producteurs d'enzymes : BASF (Germany), DuPont (US), Associated British Foods (UK), Novozymes (Denmark), DSM (Netherlands), Dyadic International (US), Megazymes (Irlande).

Utilisation des enzymes

⇒ Industrie alimentaire, industrie du textile, industrie pharmaceutique, industrie de la détergence

Quelques exemples d'utilisations

- **Industrie des jus de fruits** : pectinase et hemicellulase pour augmenter le rendement en jus, le clarifier
- **Industrie du fromage** : - provoquer la prise en masse ou coagulation => présure riche en chymosine = protéase mais aussi Pepsine, tryptosine etc... + hydrolyse des lipides Lipase (micro-organismes)
- **Fabrication du yaourt** => lactase hydrolyse du lactose par les bactéries
- **Industrie de l'amidonerie** : hydrolyse de l'amidon : amylase, glucosidase, isomérase
- **Industrie panaiere** : protéase (hydrolyse du gluten)
- **Industrie de la viande** : papaine (attendrir la viande)
- **Cœnologie** : glycosidase pour libérer des composés d'arôme sous forme de précurseurs
utilisation de levures à forte activité enzymatique production d'alcool
- **Prédigestion** des aliments pour bébé

- **Formulation des détergents** (lessives) : protéases (trypsine), amylases, carotène-oxygénase
- **Blanchiment du coton** (perhydrolase,) décoloration du denim (laccase), traitement du denim ou autres tissus (cellulase)
- **Production de bioéthanol** à partir d'amidon

⇒ Applications analytiques/diagnostics (dosage de molécules, biocapteurs, essais immuno-enzymatiques)

■ **Tableau 1 : Enzymes industrielles et leurs utilisations.**

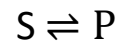
Enzyme	Application	Secteur
Protéase	Dégradation des protéines	Détergents
Cellulase	Dégradation du cellulose	Détergents
Lipase	Dégradation des lipides	Détergents
Amylase	Dégradation de l'amidon	Détergents
Amylase	Conversion de l'amidon en glucose	Traitement de l'amidon
Glucoamylase	Conversion de l'amidon en glucose	Traitement de l'amidon
Glucose Isomérase	Production du sirop de glucose à haute teneur en fructose	Traitement de l'amidon
Xylanase	Améliorer l'assimilation des nutriments chez les volailles	Aliments pour animaux
Phytases	Améliorer la disponibilité des nutriments	Aliments pour animaux
Protéases	Améliorer la digestion des protéines	Aliments pour animaux
Xylanase	Élimination du lignine « blanchiment biologique »	Papeterie
Arabinanase	Élimination du trouble après macération	Traitement des fruits et légumes
Amylase	Élimination du trouble d'amidon dans les jus	Traitement des fruits et légumes
Polygalacturonanase	Augmenter le rendement en jus	Traitement des fruits et légumes
Hydrolases	Casser les gels de biopolymères	Gaz et pétrole
Chymosine	Caillage lors de la production de fromages	Produits laitiers
Uréase	Élimination de l'urée	Vin
Pectinase	Augmenter le rendement en jus	Vin
Protéase	Attendrissement des viandes	Boucherie
Amylase	Désencollage	Textiles
Amylase	Contrôle de procédé	Boulangerie
Beta-glucanase	Éviter les problèmes de filtration	Bière
Protéase	Augmenter le rendement de surface	Tannerie

Définition des enzymes

- **Les enzymes sont des catalyseurs.**

Ils respectent les lois de la catalyse chimique

⇒ sont soumis aux mêmes contraintes cinétiques (vitesse) et thermodynamiques (équilibre)



Substrat = substance entrant dans la réaction=réactant

Produit= substance qui résulte de la réaction

Agissent dans ou hors cellules dans les conditions compatibles avec la vie

Température => faible protéines généralement thermolabiles

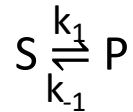
Pression atmosphérique (exceptions organismes marins)

L'enzyme ne figure pas quantitativement parmi les produits de la réaction.

Propriété des enzymes

- Ne modifie pas la nature de la réaction, ni son équilibre ni son bilan thermodynamique.

La réaction doit être possible en l'absence de l'enzyme.



k_1 = constante de vitesse de formation de P

k_{-1} = constante de vitesse de disparition de P

A l'équilibre toute réaction est caractérisée par une

$$\text{constante d'équilibre } K_{eq} = \frac{[P]}{[S]} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

En présence d'enzyme



La constante d'équilibre de la réaction ne change pas

⇒ Concentration en E reste inchangée pendant la réaction

- **Accélère la vitesse de la réaction sans changer la constante d'équilibre.**

la constante de vitesse de formation du produit (k_1) augmente considérablement en présence d'une enzyme

- **Si K constante d'équilibre de la réaction ne change pas alors k_{-1} augmente du même facteur que k_1 :**

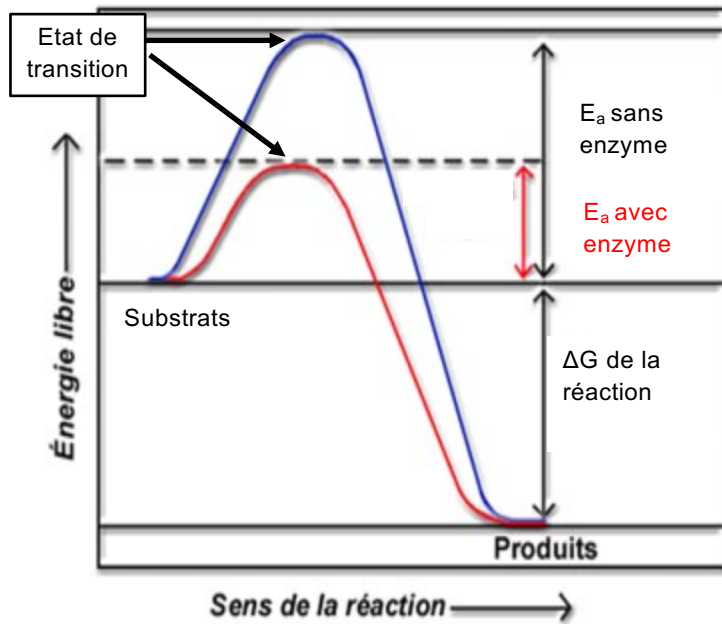
Exemple

en absence d'enzymes : $k_1 = 10^{-3} \text{ min}^{-1}$; $k_{-1} = 10^{-5} \text{ min}^{-1}$

$$K_{eq} = \frac{10^{-3}}{10^{-5}} = 100$$

En présence d'enzymes k_1 et k_{-1} augmentent d'un même facteur $k_1 = 1 \text{ min}^{-1}$ et $k_{-1} = 10^{-2} \text{ min}^{-1}$

=> La vitesse augmente car les enzymes diminuent l'énergie d'activation de la réaction



Variations d'énergie libre sans catalyseur (courbe bleue)

Variations d'énergie libre avec catalyseur (courbe rouge)

La vitesse de réaction dépend du nombre de molécules de substrats qui atteint l'état de transition par unité de temps. Ce nombre de molécules peut être augmenté par diminution de l'énergie d'activation grâce aux catalyseurs chimiques ou biologiques.

Une enzyme permet d'abaisser l'énergie d'activation (E_a) d'une réaction chimique sans changer la variation d'énergie libre de la réaction (ΔG)

Réaction exothermique ou endo ?

$$\Delta G_0 = -RT \ln K_{eq} \text{ à } T=25^\circ\text{C} \text{ et Pression atmosphérique}$$

Unité de ΔG_0 ?

$$\Delta G = - \text{ou } + RT \ln K_{eq}$$

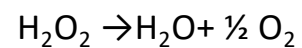
Avec T en Kelvin

et $R = 8,314 \text{ J.mol}^{-1}\text{T}^{-1}$

=> Pouvoir catalyseur élevé comparativement au catalyseur chimique

Décomposition du peroxyde d'hydrogène

Catalyseur	E _a (kJ/mol)	k de vitesse relative
sans	75,6	1,0
platine	49,1	2,1 10 ³
catalase	8,4	3,5 10 ⁸

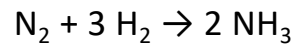


Réaction	Catalyseurs	E _a (kJ/mol)	k relative
Saccharose + H ₂ O → Glucose + Fructose	Acide	107	1,0
	Invertase	46	5,6 10 ¹⁰
Acide linoléique + O ₂ → Hydroperoxyde d'a. linoléique	-	150	1,0
	Cu ²⁺	40	1,0 10 ²
	Lipoxygénase	16,7	1,0 10 ⁷

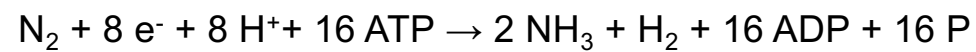
La concentration en enzyme nécessaire est peu élevée 10⁻⁸ à 10⁻⁶M

=> Enzymes permettent d'adoucir les conditions de la réaction

Réduction N_2 en NH_3 => fixation biologique de l'azote



Catalyseur	T° C	Pression (atm)
fer	550	250
Nitrogénase/hydrogénase	27	1



$$\Delta G^{\circ} = - 33,5 \text{ kJ/mol}$$

- **La réaction catalysée par les enzymes est spécifique.** Avantage par rapport à un catalyseur chimique les réactions secondaires indésirables sont fortement limitées

=> spécifiques d'une réaction et spécifiques d'un substrat.

➤ Spécificité de la réaction

- Une déshydrogénase catalyse une réaction de déshydrogénation :

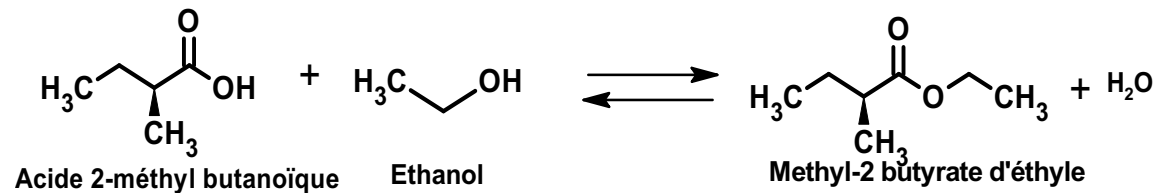
Exemple : alcool déshydrogénase (ADH)



NAD^+ : Nicotinamide adénine dinucléotide, cofacteur sous forme oxydée

NADH, H^+ : co-facteur réduit

- Une hydrolase catalyse une réaction d'hydrolyse. Il existe des cas particuliers. Une lipase peut catalyser une réaction d'hydrolyse ou une réaction d'estérification en fonction des conditions



➤ Spécificité de substrat

spécificité à l'égard d'une gamme plus ou moins étroite de substrats structurellement proches.

3 classe d'enzymes :

- **Spécificité large** : par exemple les enzymes qui hydrolysent => peptidases, phosphatases, estérases, lipases.
l'enzyme reconnaît un grand nombre de substrats du moment qu'ils contiennent la liaison chimique ciblée.
- **Spécificité absolue** (ou étroite) : par exemple l'uréase ou glucose isomérase

- **Une classe intermédiaire** montrant des spécificités de groupe: par exemple => hexokinases qui phosphorylent les aldohexoses
- Il peut y avoir une **spécificité pour le co-facteur** : par exemple le NAD^+ est 170 fois plus efficace que le NADP^+ comme co-enzyme (ou co-substrat) dans la réaction d'oxydation du lactate par la lactate déshydrogénase du muscle

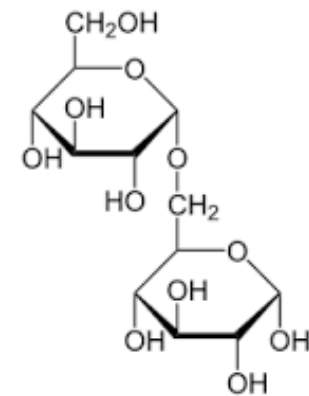
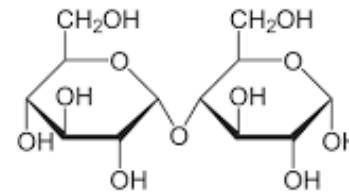
Trypsine clive la liaison ester ou peptidique des groupes carbonyles appartenant à la lysine ou arginine

Chymotrypsine => tyrosine, phenylalanine, tryptophane

Spécificité relative de substrat d'une α -glucoamylase

Substrat	% relatif d'activité
Maltose	100
Isomaltose	4
Maltotriose	41,5
Amylose	30,9
Amylopectine	4,4
Cellobiose –Saccharose	0

maltose

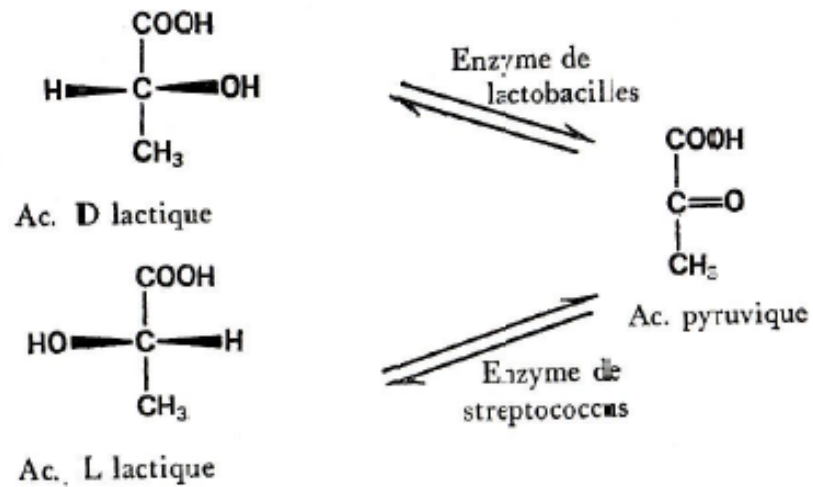


isomaltose

➤ **Stéréospécificité du substrat et de la réaction**

- **Propriété essentielle des enzymes qui les distinguent des catalyseurs chimiques .**

Les molécules organiques possèdent au moins un carbone asymétrique. Elles sont chirales et peuvent exister sous 2 formes isomériques, ou d'énantiomères D et L.

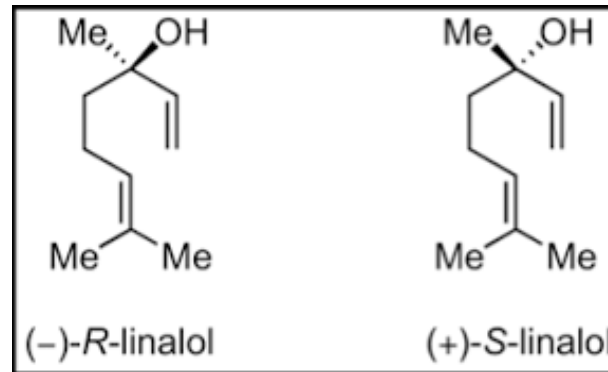


Exemple de la lactate déshydrogénase

la LDH de *Leuconostoc mesenteroides*, reconnaît à la fois l'acide L et D-lactique comme substrat

Enantio-sélectivité de la synthèse dans les fruits ou plantes : biosynthèse du linalol, du menthol

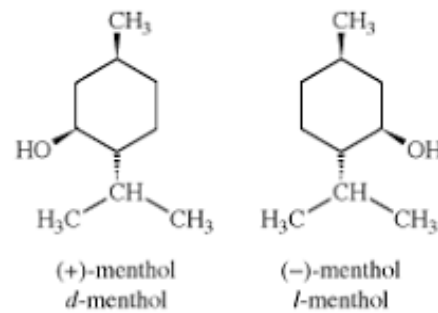
Isoprène actif
↓
Géranyl pyrophosphate → Système enzymatique



(odeur lavande)

(odeur florale, agrume)

=> Menthol



Naturel => l-menthol

- **Possibilité de régulation de l'activité catalytique**

=> par des ions, ou d'autres molécules qui modulent la réaction enzymatique.

On parle alors d'« effecteurs » => activateurs, inhibiteurs ou les deux ensemble

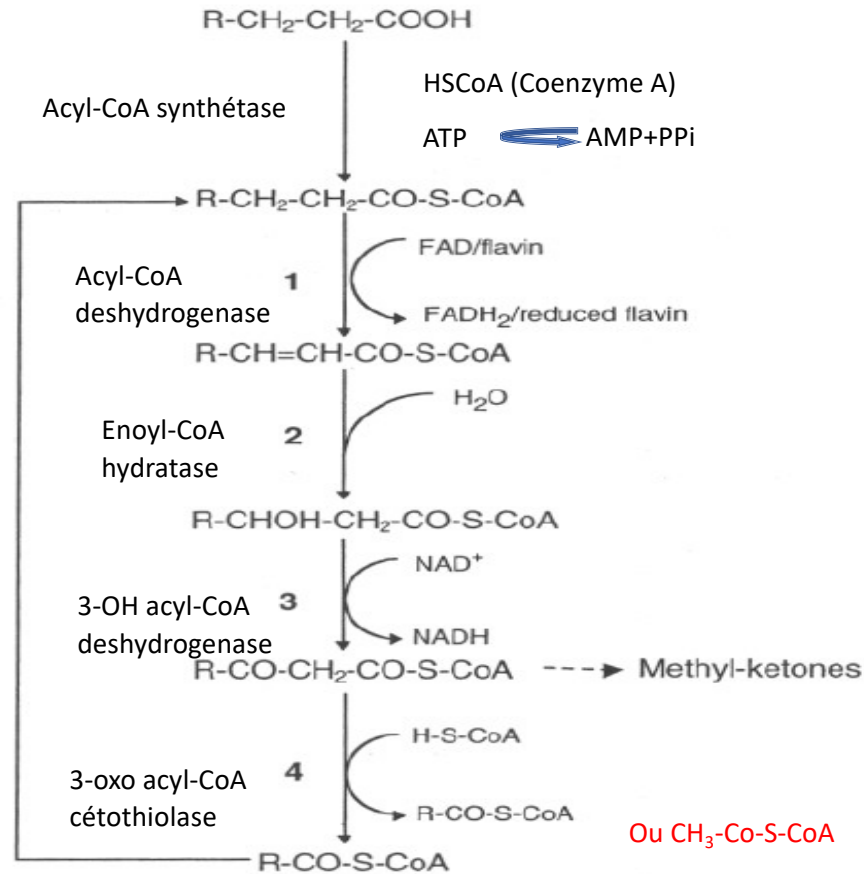
L'activité peut être augmentée ou diminuée grâce à des changements dans la structure covalente de la protéine

Exemple : la phosphorylase du muscle qui catalyse l'hydrolyse du glycogène pour générer du glucose est activée par phosphorylation d'un résidu sérine sur chaque sous-unité de l'enzyme.

Isoenzymes (isozymes) : il s'agit d'enzymes qui diffèrent par la séquence en acides aminés mais catalysent la même réaction.

Habituellement ces enzymes présentent des paramètres cinétiques différents ou propriétés régulatrices non identiques.

Système enzymatique : lorsque plusieurs enzymes participent à une réaction comportant elle-même plusieurs stades ou étapes => **β -oxydation des acides gras**



➤ Un cycle comporte 4 étapes. A la fin de chaque cycle, la molécule perd 2 atomes de carbone sous forme d'acétyl-Co-A ($CH_3-Co-S-CoA$)

Synthèse des enzymes : spécificité

Certaines enzymes possèdent la propriété d'enclencher leur propre synthèse à partir d'un précurseur inerte, appelé zymogène.

Ex Pepsine et trypsine, précurseurs sont le pepsinogène et le trypsinogène.

Trypsinogène, enzyme produite par le pancréas => active que sur le lieu où elle est nécessaire, l'intestin.

Le trypsinogène ne peut se convertir en trypsine qu'en présence de molécules de trypsine existantes, dans l'intestin.

Classification

Nomenclature fonctionnelle

Nom du substrat de l'enzyme et type de réaction catalysée

Si 1 seul substrat : on commence par le substrat puis ensuite la réaction et le suffixe ase
pyruvate carboxylase, isocitrate lyase

Si 2 substrats : substrat donneur puis substrat accepteur et réaction
pyrophosphate glucose phosphotransférase

Classification

Nomenclature officielle : Obligatoire dans les documentations techniques et scientifiques

L'union internationale de la biochimie a proposé en 1964 une classification des enzymes basée sur la réaction catalysée et non sur la composition de l'enzyme.. Elle s'écrit : **E.C.X.X.X.X** (E.C : **Enzyme commission**)

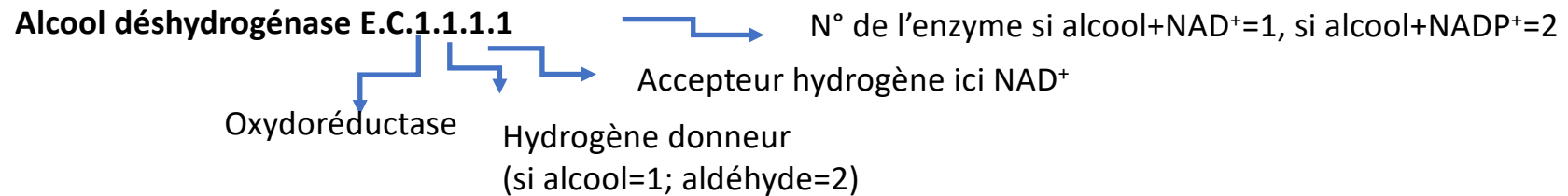
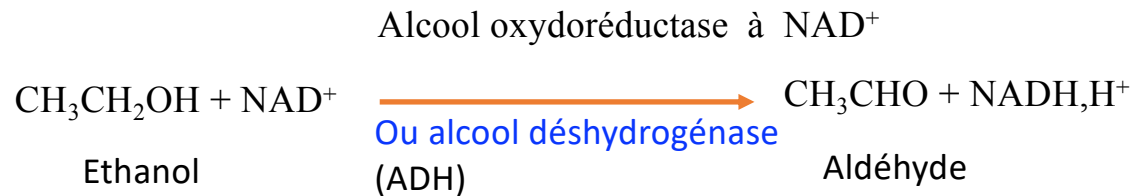
6 groupes et chaque groupe d'enzyme désigné par un nombre formé de 4 chiffres séparés par un point

- **Le premier X indique l'appartenance à l'un des six groupes :**

N°	Enzymes	catalysent	
1	<u>Oxydo-réductases</u>	Transfert d'électrons et protons	coenz
2	<u>Transférases</u>	Transfert de groupements fonctionnels	coenz
3	<u>Hydrolases</u>	Clivage d'une liaison covalente (C-O, C-N,C-C)	
4	<u>Lyases</u>	Addition de groupes au niveau d'une double liaison ou élimination de groupes avec création d'une double liaison= au préalable clive des liaisons C-C, C-N, C-O	coenz
5	<u>Isomérases</u>	Transfert de groupes dans une même molécule, formation d'isomères	
6	<u>Ligases</u>	Formation de liaisons par réactions de condensation couplées à l'utilisation d'énergie (hydrolyse de l'ATP)	coenz

- Le deuxième et le troisième X constituent des sous-classes qui précisent d'abord le type de réaction, puis le type de substrat
- Le dernier X est le n° d'ordre de l'enzyme dans le sous-groupe considéré et désigne un substrat particulier

Exemple :



- La plupart des enzymes utilisés en industrie alimentaire sont des hydrolases (E.C.3...), suivi par les isomérases (E.C.5...), oxydoréductases (E.C.1...) produites par biotechnologies !

classe	enzyme	EC	Substrat	Co-facteurs
Oxydoréductase	Alcool déshydrogénase	1.1.1.1	Ethanol	NAD
	Acide ascorbique oxydase	1.10.3.3 Phenol, O ₂	Acide ascorbique	Cuivre
	Lipoxygénase	1.13.11.12		
Transférase	Hexokinase Ribonucléase (Exo) Trypsine	2.7.1.1 2.7.7.16 => 3.1.27.5. 3.4.21.4	Glucose ARN Protéine à sérine	ATP
Hydrolase	Glycosidase α -amylase cellulase	3.2.1.1 3.2.1.4	Amidon cellulose	
lyases	Pectine lyases	4.2.2.10	Pectines	
Isomérase	Glucose 6- phosphate isomérase	5.3.1.9	Glucose-6-P	

II – LE COMPLEXE ENZYME-SUBSTRAT (ES)

La forte spécificité des enzymes induit l'existence d'un contact étroit entre enzyme et substrat

⇒ différence de dimensions entre l'enzyme et le substrat

⇒ poids moléculaire d'une protéine élevé

Existence d'un complexe E-S a été supposée pour la 1^{ère} fois par Henri et Brown

(cas de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase)

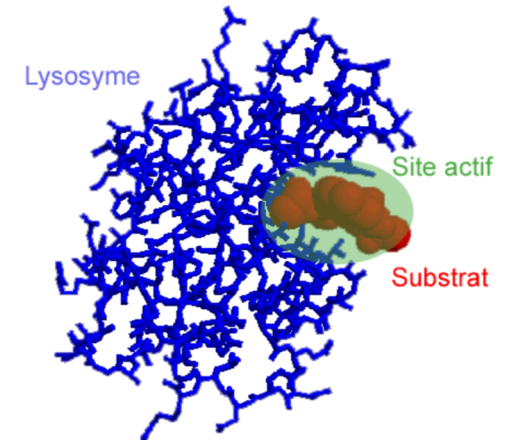


⇒ Saccharose MM 342 g/mole

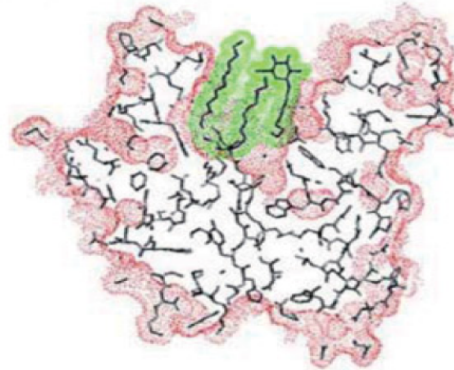
⇒ Invertase MM 80 Kda

=> une zone spécifique

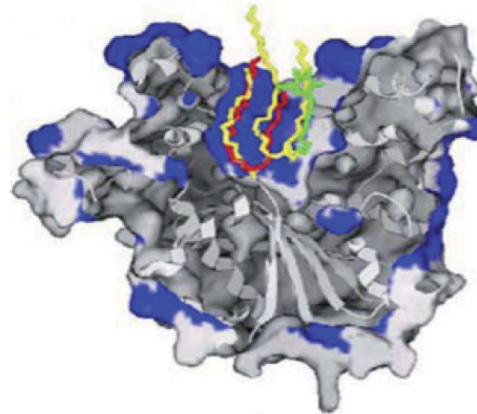
Cette zone est à la fois le site de reconnaissance entre le substrat et l'enzyme et le site actif ou centre actif où a lieu la réaction



Exemple de site actif sur une lipase
Constitué de 4 aa
Histidine, sérine, glutamine et asparagine



(a)



(b)

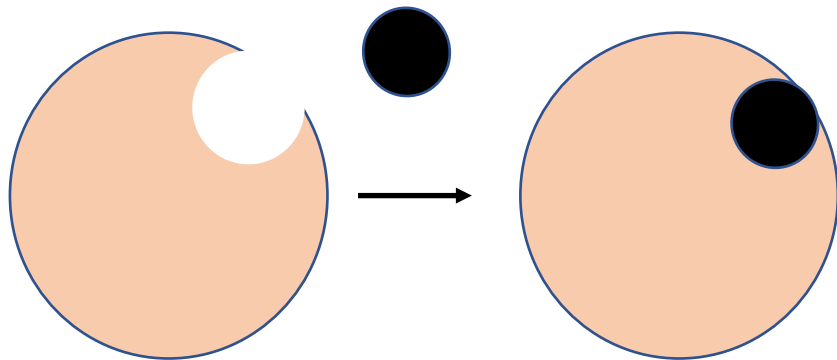
Un rail hydrophobe à la surface de la protéine permet au substrat hydrophobe (triglycéride) de se placer à proximité du site actif, constitué de quatre acides aminés. L'histidine qui interagit avec l'oxygène lié au glycéride, la sérine dont l'hydroxyle interagit avec le carbone portant le carbonyle et les fonctions amines de résidus glutamine et asparagine. Les composants indiqués en vert jaune et rouge sont des inhibiteurs utilisés pour étudier le mode de fixation du substrat à l'enzyme

Complexe ES et site actif

Le site actif = une crevasse de nature plutôt hydrophobe avec une constante diélectrique plus faible que celle de l'extérieur ce qui facilite les interactions ioniques, électrostatiques.
constitués d'acides aminés particuliers en nombre restreint **his, ser, cys, lys, asp et glu**

Disposition particulière : détermine la molécule qui peut se fixer
Participe à la reconnaissance du substrat et à la réaction

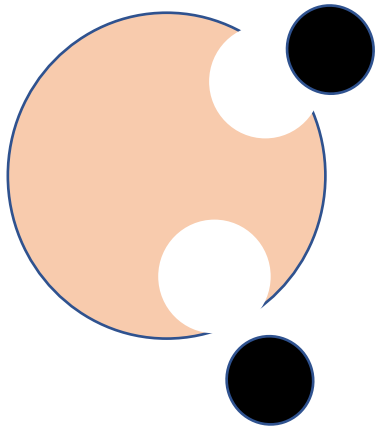
Le complexe ES fait intervenir des liaisons de faible énergie (van der waals, électrostatiques et liaisons H)
caractérisé par une constante d'association K_A



cas le + simple : 1 enzyme avec 1 site

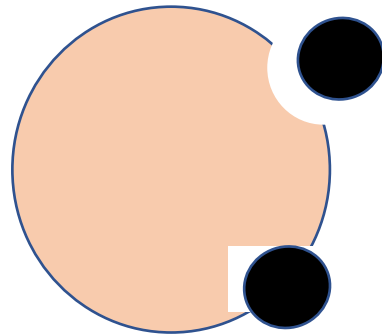
Il y a aussi fixation du co-enzyme ou co-facteur

Complexe ES et site actif

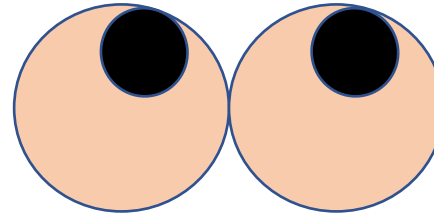


Plusieurs sites actifs sans interactions

Plusieurs sites actifs avec interactions



1 site actif par enzyme ou sous unité



Affinité différente entre chaque site et le substrat

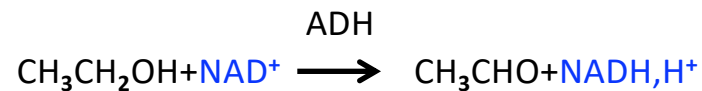
Mise en évidence du complexe enzyme-substrat

- Disparition rapide du complexe ES : msec
- Faible concentration en enzyme (souvent de l'ordre de 10^{-5} M)

Comment contourner cette difficulté et éviter que la réaction aille à son terme

- **cas d'enzymes à co-facteurs ou utilisant plusieurs substrats** => on ne met en présence de l'enzyme qu'une seule molécule

Exemple : alcool déshydrogénase (ADH) ici de seulement le NAD^+

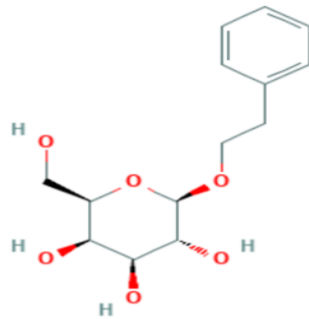


- **Si un seul substrat => utilisation d'un analogue de substrat** (composé possédant une forte analogie structurale avec le substrat)

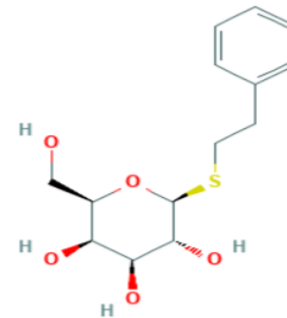
Celui-ci se fixe sur le site actif de l'enzyme mais ne peut être dégradé par l'enzyme

Exemple : β -galactosidase

=> hydrolyse le lactose, les éthers du galactose, les galactosides comme le phényl éthyl- β -D-galactoside, mais pas les thiogalactosides.



Phényléthyl- β -D-galactoside

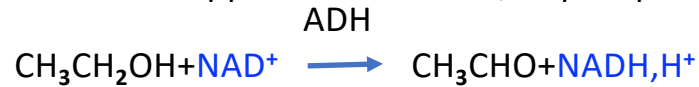


Phényléthyl- β -D-thiogalactoside

- **2 techniques analytiques simples permettent de suivre l'existence d'un complexe ES** (sur certaines enzymes, cristallographie par rayon X a montré ce complexe)

a. La spectrophotométrie

Exemple **de l'ADH** : On mesure l'apparition du NADH,H+ par spectrophotométrie à 340 nm

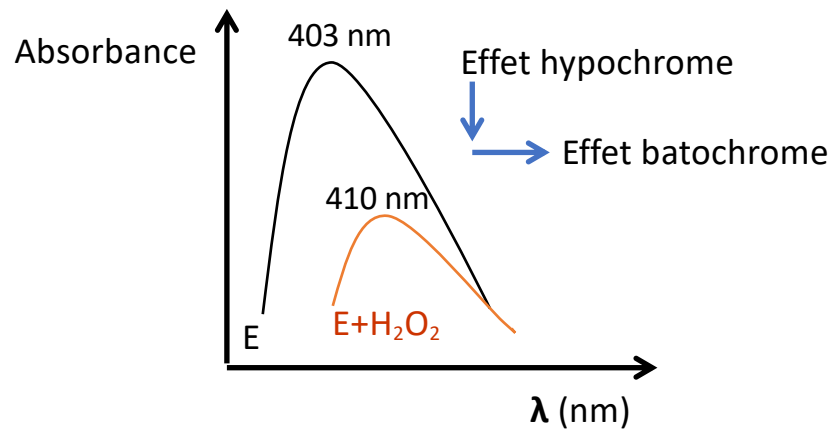


Exemple avec **la catalase** $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + 1/2 \text{O}_2$

Cette enzyme possède un spectre d'absorbance caractéristique (max. à 403 nm).

L'addition de H_2O_2 déplace ce maximum d'absorbance à 410 nm).

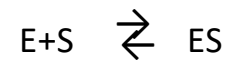
On peut donc suivre par spectrophotométrie la formation du complexe ES :



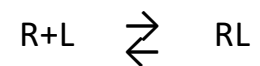
b. La dialyse à l'équilibre

Utilisée pour suivre l'interaction de petites molécules (substrat, hormone, anticorps, médicaments...) avec des récepteurs ou sites actifs des macromolécules (enzymes, protéines, antigènes...)

Cas spécifique



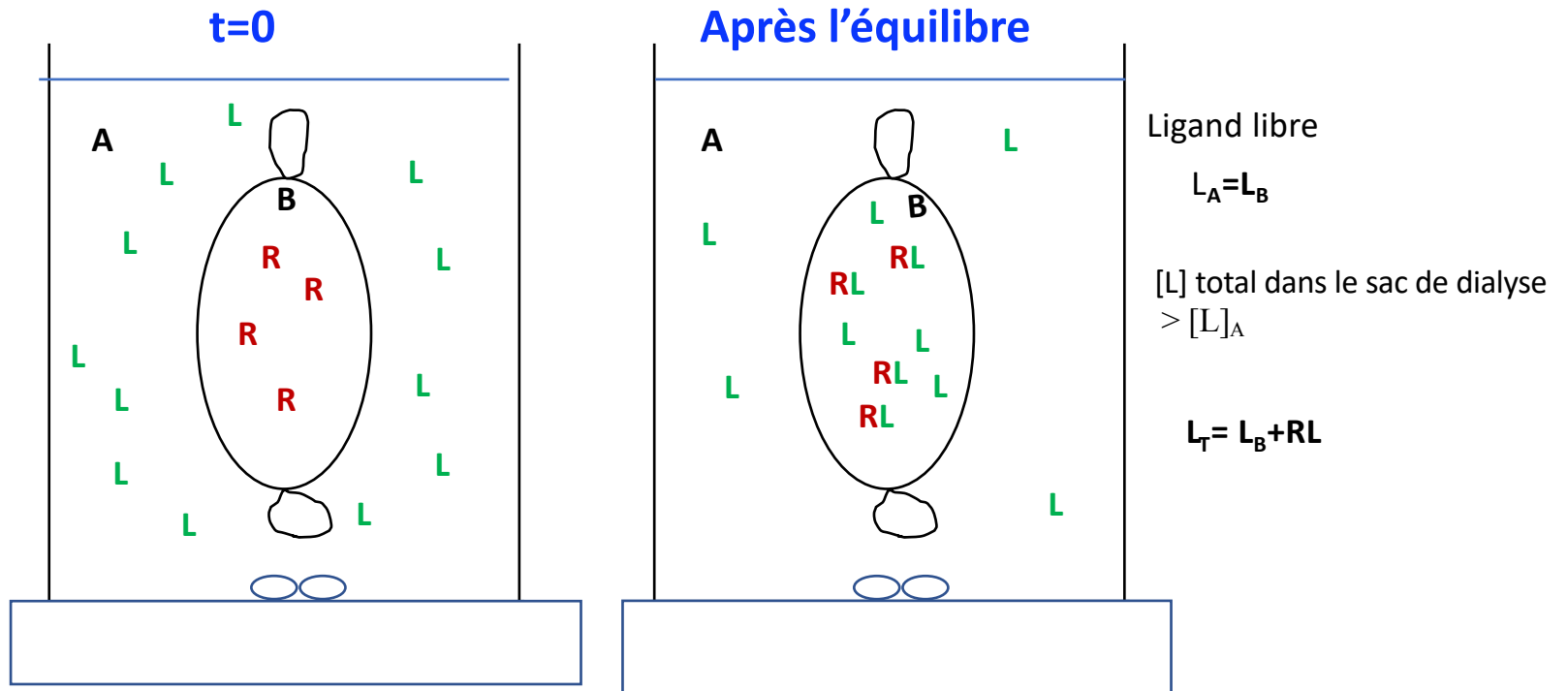
Cas général



R: récepteur

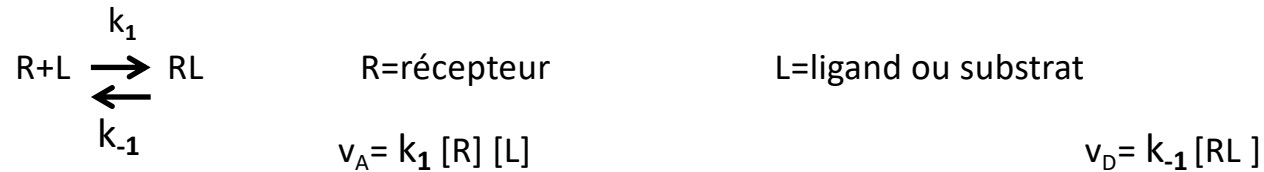
L : ligand

La dialyse à l'équilibre



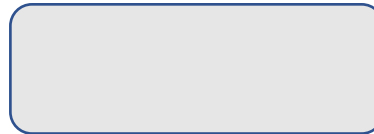
- Au début : l'enzyme (R=récepteur) dissous dans un tampon est placé dans un sac de dialyse, ou R mais perméable à l'eau et au substrat ici ligand (L).
- Le sac est immergé dans une solution de ligand.
- Au cours du temps : On détermine la radioactivité (si analogue de substrat marqué) ou la concentration à différents temps de dialyse jusqu'à ce que l'on est atteint l'équilibre dans les 2 compartiments.
- Equilibre concentration en ligand libre identique dans les 2 compartiments

Association récepteur / ligand ou enzyme/substrat => spécificité



A l'équilibre, les vitesses de formation (ou d'association) et de dissociation du complexe sont égales :

$$V_A = V_D \quad \rightarrow \quad k_1 [R] [L] = k_{-1} [RL] \quad \rightarrow \quad K_A = \frac{[RL]}{[R][L]}$$



K_A constante d'association du complexe [RL] en (M^{-1})

K_D inverse de K_A

K_D constante de dissociation du complexe [RL] en (M)

K_A va permettre de mesurer l'affinité entre l'enzyme et le substrat

+ K_A sera élevée plus l'affinité sera forte

A contrario, si K_D est élevée alors l'affinité est faible

Si $[R] = [RL]$ alors le récepteur est à moitié saturé

Equation de Scatchard => Détermination de n et de K_A

Hypothèse: n nombre de site supposés identiques et sans interactions par molécule d'enzyme

Soit [E] la concentration de l'enzyme et (Rt) la concentration en récepteurs totaux

Alors on peut écrire

$$R_t = n [E] = [R] + [RL]$$

$$[R] = n[E] - [RL]$$

On peut avoir accès à RL mais plus difficilement à R

$$n [E] - [RL] = \frac{K_D [RL]}{[L]}$$

→

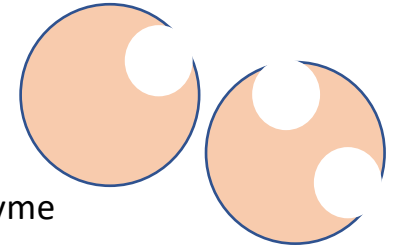


n = nombre de récepteurs par molécule d'enzyme
ou nombre de sites

$$K_D = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad \rightarrow \quad [R] = \frac{K_D \times [RL]}{[L]}$$

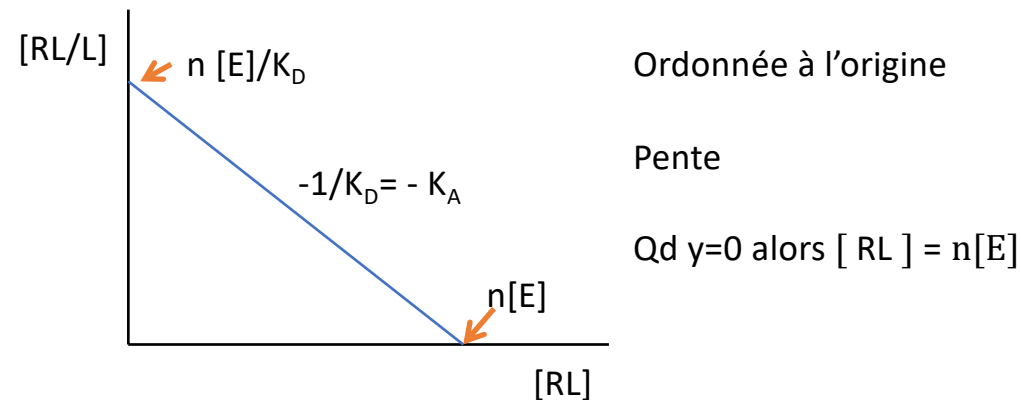
En divisant par K_D

Equation de Scatchard



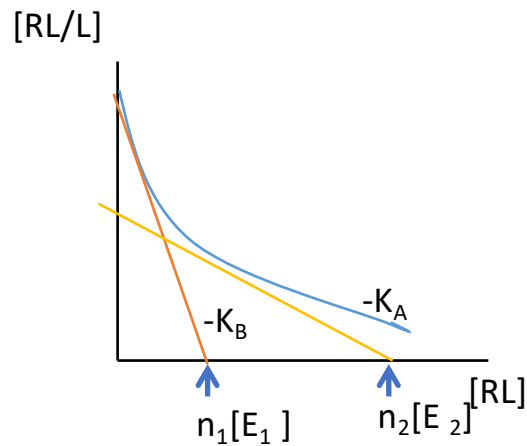
$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{n[E]}{K_D} - \frac{[RL]}{K_D}$$

Représentation graphique de l'équation de Scatchard => **équation d'une droite**
Détermination de n et de Ka



- La valeur de n est un nombre entier : 1,2,3....
- Si valeur supérieure à 1
- => plusieurs sites équivalents et sans interactions entre eux
- => l'enzyme est constituée de l'assemblage de sous-unités (enzyme oligomérique...) et 1 site par sous unité

Si l'enzyme renferme 2 types de récepteurs différents, capables de fixer le ligand avec des affinités différentes, il y aura 2 segments définissant la courbe :



Ce cas peut se rencontrer si l'on utilise des préparations biologiques peu purifiées qui contiennent une protéine d'une haute affinité et une protéine non spécifique de faible affinité.



Exercice

I. L'adénylate kinase permet de convertir l'AMP en ADP par transfert d'un résidu phosphoryle de l'ATP.



La stœchiométrie de fixation de l'AMP peut être étudiée en travaillant en absence d'ATP.

L'expérience a été réalisée par dialyse à l'équilibre.

On a mis d'un côté de la membrane 400 µL de tampon contenant 800 µg d'enzyme, de l'autre 400 µL d'une solution d'AMP à différentes concentrations. A l'équilibre, 250 µL de solution ont été prélevés de part et d'autre de la membrane, et les concentrations d'AMP mesurées :

I.1. Déterminer les constantes d'association et de dissociation des sites de fixation de l'AMP sur l'adénylate kinase et nombre de site de fixation

N .b. L'enzyme a une masse moléculaire égale à 27 500 Da.

[AMP] dans le compartiment sans l'enzyme (µM)	4	20	36	74	156	220
[AMP] dans le compartiment avec l'enzyme (µM)	10,5	44	70	120	212	280

On peut déterminer également le nombre de site (récepteur) et K_D en utilisant d'autres équations

$$n [E] - [RL] = \frac{K_D [RL]}{[L]} \quad (\text{Récepteurs libres})$$

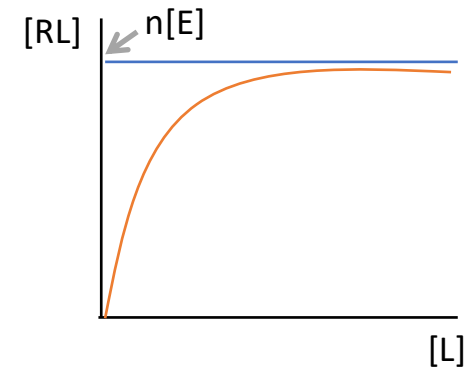
$$\Rightarrow n [E] = [RL] + \frac{K_D [RL]}{[L]}$$

$$n [E] = [RL] \left(1 + \frac{K_D}{[L]}\right)$$

$$[RL] = \frac{n[E]}{\frac{K_D}{[L]} + 1}$$

$$[RL] = \frac{n [E][L]}{K_D + [L]}$$

Cette équation établit une relation entre $[L]$ libre et $[L]$ combiné avec le récepteur $[RL]$

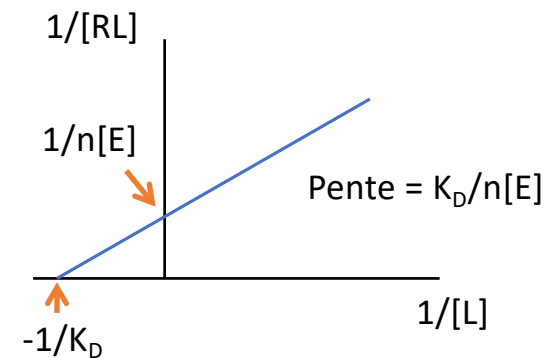


Lorsque L augmentent les récepteurs se saturent jusqu'à un maximum

L'équation peut être linéarisé en passant aux inverses :

$$\frac{1}{[RL]} = \frac{K_D + [L]}{n[E][L]} = \frac{K_D}{n[E][L]} + \frac{[L]}{n[E][L]}$$

$$\frac{1}{[RL]} = \frac{K_D}{n[E]} \frac{1}{[L]} + \frac{1}{n[E]}$$



Il est aussi possible d'obtenir une droite et les valeurs de n et de K_A en traçant $U = f(RL/L)$

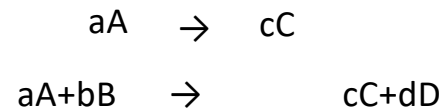
Avec $U = [RL]/[E]$ ou $U = [RL]/[P]$

$$\frac{[RL]}{[E]} = f\left(\frac{[RL]}{[L]}\right)$$

III. Cinétiques des réactions enzymatiques

III.1. Rappel de Cinétique chimique

- Même lois pour la cinétique chimique et la cinétique enzymatique

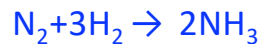


- L'équation chimique classique apporte une information à la fois :

- qualitative => quelles sont les substances qui réagissent - les réactifs : A,B
=> quelles sont celles qui se forment - les produits : C,D.

La nature des réactifs et des produits est spécifiée par leur formule.

- quantitative => dans quelle proportion ces substances réagissent entre elles spécifiée par les coefficients stoechiométriques a,b,c,d.



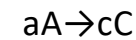
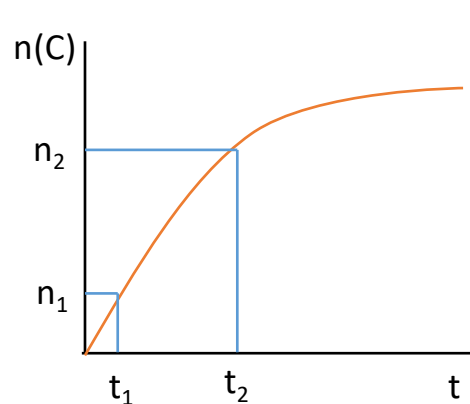
- le diazote N_2 réagit avec le dihydrogène H_2 pour former de l'ammoniac NH_3 ,
- les proportions consommées et produites sont respectivement 1, 3 et 2, les quantités de chaque substance étant exprimées en mole

- **Définition de la vitesse moyenne d'une réaction**

Etude cinétique => mesure de la vitesse d'une réaction considérée.

suivre l'évolution de la concentration au cours du temps, d'au moins un des réactifs ou des produits

La vitesse peut être définie en terme d'apparition des produits ou disparition des réactifs puisque chaque molécule A consommée est convertie en une molécule C



On suit l'évolution de la formation du produit C au cours du temps :
 $n(C) = f(t)$ n = nombre de moles

Vitesse moyenne de la réaction (v_m) entre t_1 et t_2 :

$$v_m = \frac{n_2 - n_1}{t_2 - t_1}$$

- **Vitesse instantanée (ou vitesse initiale) (grandeur extensive)**

$$v_i = \frac{dn_C}{dt} = \lim_{t_2 \rightarrow t_1} \left(\frac{n_2 - n_1}{t_2 - t_1} \right) \quad \rightarrow$$

Unité pour v_i : mole/temps

- **Vitesse spécifique instantanée (par unité de volume) (ou encore grandeur intensive)**

$$v_C = \frac{1}{V} \frac{dn_C}{dt} \quad \text{Unité pour } v_B : \text{mole/volume/temps}$$

A volume constant on a :

$$v_C = \frac{d[C]}{dt} \quad d[C] > 0 \text{ car } [C] \quad \nearrow$$

v_C est la vitesse d'apparition du produit C

$$v_A = - \frac{d[A]}{dt}$$

v_A est la vitesse de disparition du réactif

1 mole de A disparaît

1 mole de C apparaît.

Cas des réactions enzymatiques

A l'équilibre :

$$- d[A] = d[C]$$

$$v_A = v_C$$

Réaction à plusieurs substrats ou bi-moléculaire



a, b, c, d sont les coefficients stœchiométriques

Soit v la vitesse de la réaction à un temps donné en mol.sec⁻¹

Elle peut s'exprimer en fonction de n'importe quel constituant en tenant compte du coefficient stœchiométrique et formation ou disparition

$$v_A = - \frac{d[A]}{dt}$$

$$v_B = - \frac{d[B]}{dt}$$

v_A différent de v_B ou v_C ou v_D

$$v_C = + \frac{d[C]}{dt}$$

$$v_D = + \frac{d[D]}{dt}$$

$$v(t) = - \frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = - \frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = + \frac{1}{c} \frac{d[C]}{dt} = + \frac{1}{d} \frac{d[D]}{dt}$$

- **Loi de vitesse** : relation entre toutes les concentrations, plus effet des facteurs environnementaux purement phénoménologique; doit être établie expérimentalement

Sous forme simple

$$v = k [A]^\alpha [B]^\beta$$

α = ordre partiel par rapport à A

β = ordre partiel par rapport à B

$n = \alpha + \beta$ = ordre total ou global de la réaction

k = constante de vitesse

α et β sont des ctes indépendante de la concentration et du temps

Il est possible que $\alpha = a$

Ordre des réactions



$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = k [A]^\alpha$$

dans le cas d'une réaction enzymatique on supposera que $a=b=1$

La vitesse possède un ordre α par rapport à A.

Si $\alpha = 0$: Réaction d'ordre zéro ou nul

Lorsque la vitesse ne dépend pas de la concentration d'un réactif, on dit que la réaction est d'ordre zéro par rapport à ce réactif.

$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = k [A]^0$$

Soit : $v = \text{cte}$

Unité de v : $[(\text{mole/litre})] \cdot \text{t}^{-1}$
(M s^{-1} ou M min^{-1})

Unité de A : M (mole/litre)



Réaction d'ordre zéro ou nul et temps de la réaction

On suppose que $a=1$

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k$$

$$-d[A] = k dt$$

On intègre entre 0 et t :

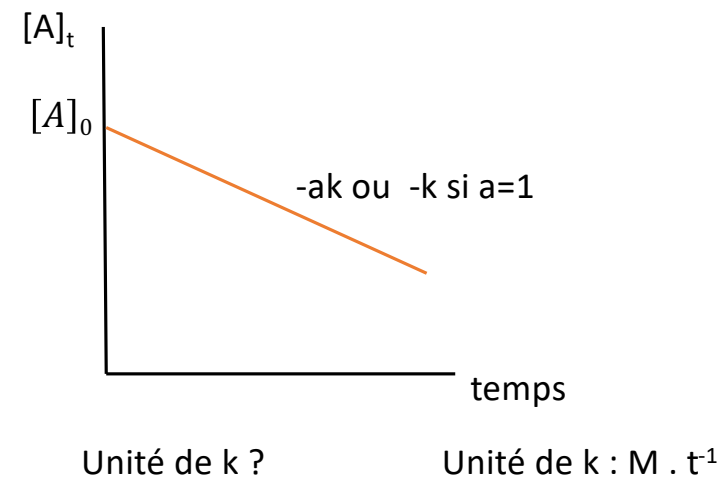
$$\int_{[A]_0}^{[A]_t} d[A] = -k \int_{t_0}^t dt$$

$$[A]_t - [A]_0 = -kt$$

$$[A]_t = [A]_0 - kt$$

si on considère a (coeff. stœchiométrique)

$$[A]_t = [A]_0 - a.kt$$



Si réaction d'ordre 1 ($\alpha = 1$):



$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = k [A]^1$$

Donc la vitesse est directement proportionnelle à [A]

$$\frac{d[A]}{[A]} = -k dt$$

si $a = 1$ $\frac{d[A]}{[A]} = -k dt$

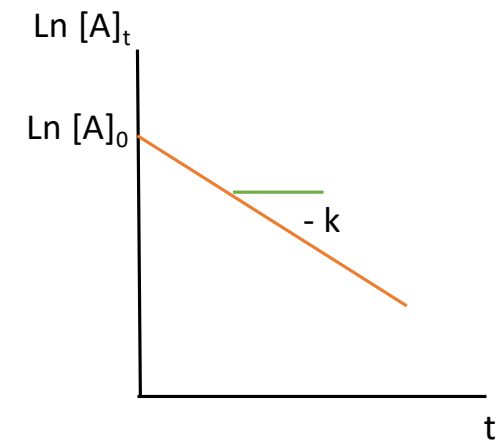
$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = -k \int_{t_0}^t dt$$

$$\ln [A]_t - \ln [A]_0 = -kt$$

$$\ln [A]_t = \ln [A]_0 - kt$$

$$\ln \frac{[A]_t}{[A]_0} = -kt$$

$$[A]_t = [A]_0 \cdot e^{-kt}$$



Unité de k ?

Réaction d'ordre 2 ($\alpha = 2$)



On pose qu'une 1 mole de A réagit avec 1 mole de B :

$$[A]_0 = [B]_0$$

$$[A]_t = [B]_t$$

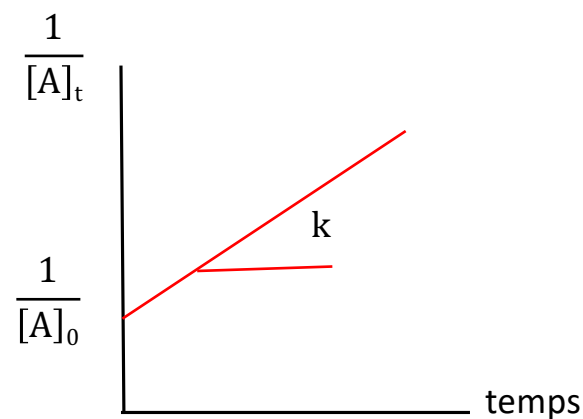
La vitesse dépend de A et B , on suppose que les ordres sont égaux à 1

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k [A]^\alpha [B]^\beta = k [A]^1 [B]^1 = k [A]^2$$

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k [A]^2 \quad -\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]^2} = k \int_{t=0}^t dt$$

$$\frac{1}{[A]_t} - \frac{1}{[A]_0} = kt$$

$$\boxed{\frac{1}{[A]_t} = \frac{1}{[A]_0} + kt}$$



Unité de $k \Rightarrow M^{-1}.t^{-1}$

Pour connaître l'ordre de réaction,

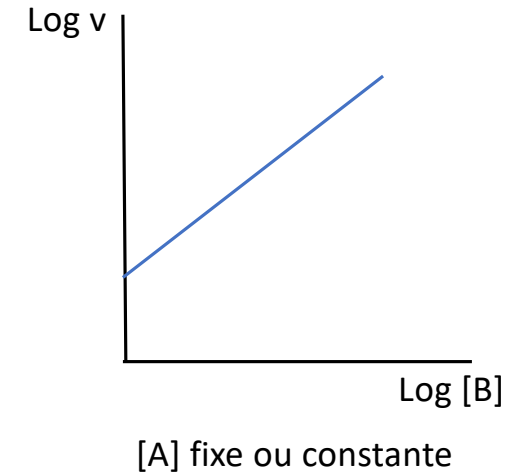
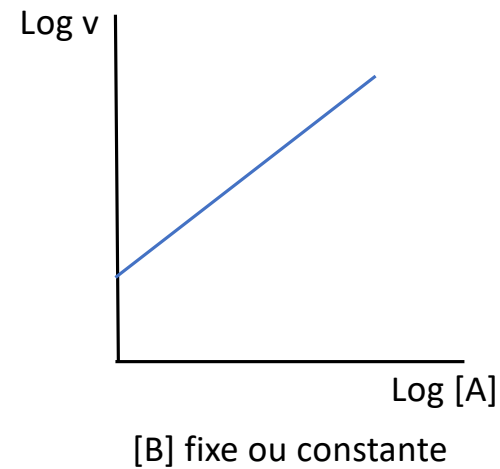
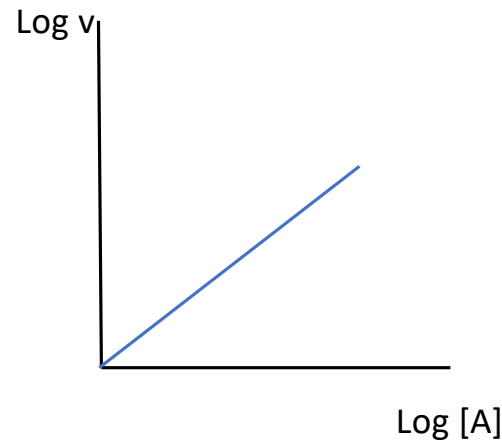
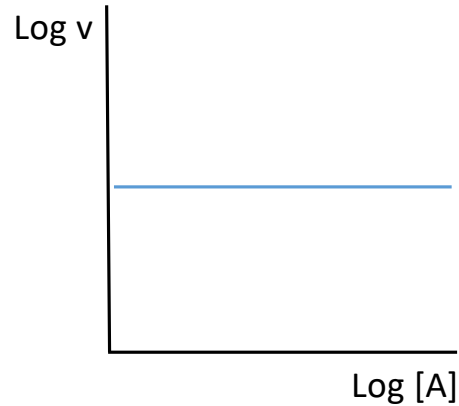
on mesure la vitesse (v) pour différentes concentrations de substrat A, puis on trace le graphe $\text{Log}v = f(\text{log}[A])$. On obtient une droite dont la pente est égale à l'ordre de la réaction

Soit :

$$v = -d[A]/dt = k[A]^n \quad \mathbf{n \text{ est l'ordre de la réaction}}$$

$$v = k[A]^n$$

$$\text{Log}(v) = \text{log}(k) + n \text{log}[A]$$



Vrai aussi en ln

Temps de demi-réaction ($t_{1/2}$) : temps nécessaire à la disparition de la moitié de la concentration initiale du réactif

Ordre 0

$$[A]_t = [A]_0 - kt$$

quand $[A]_t = \frac{[A]_0}{2}$ Alors $t = t_{1/2}$

$$0,5 A_0 = k t_{1/2}$$

$$t_{1/2} = 0,5A_0/k$$

Unité de k : M. t⁻¹

Ordre 1

$$\ln \frac{[A]_0/2}{[A]_0} = \ln \frac{1}{2} = -k t_{1/2}$$

$$\ln 2 = k t_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \ln 2/k = 0,693/k$$

Unité de k : t⁻¹

Ordre 2 avec A=B

$$[A]_t = \frac{[A]_0}{2}$$

$$\frac{1}{\frac{[A]_0}{2}} - \frac{1}{[A]_0} = k t_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k [A]_0}$$

Unité de k : M⁻¹. t⁻¹

III. 2 Cinétiques des réactions enzymatiques à 1 substrat

=> **Réactions enzymatiques : dépendante de la concentration en enzyme et de la concentration en substrat**

Mais aussi des conditions dans les quelles se fait la réaction (température, pH, force ionique, présence de substance inhibitrice ou activatrice...)

Objectif

Déterminer quelle est la quantité de produit formé ou de substrat consommé au cours du temps dans les conditions choisies pour une concentration donnée en substrat et en enzyme.

Comment évolue la réaction en fonction de la concentration en enzyme et en substrat ?

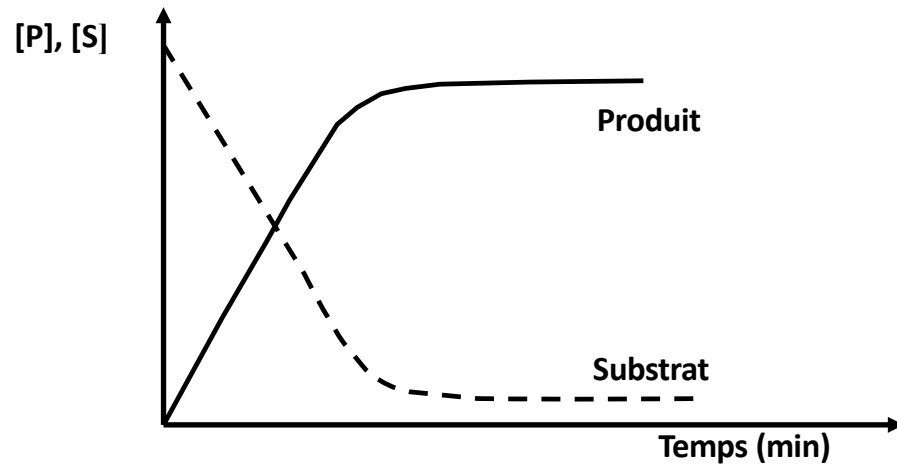
Par simplification => réaction avec un seul substrat et formation d'un seul complexe

=>cas des réactions enzymatiques avec les isomérases, les hydrolases (H_2O n'est pas considéré comme substrat) et avec la plupart des lyases.

Conclusions=> applicables à des cinétiques enzymatiques à plusieurs substrats.

Vitesse de réaction catalysée par une enzyme

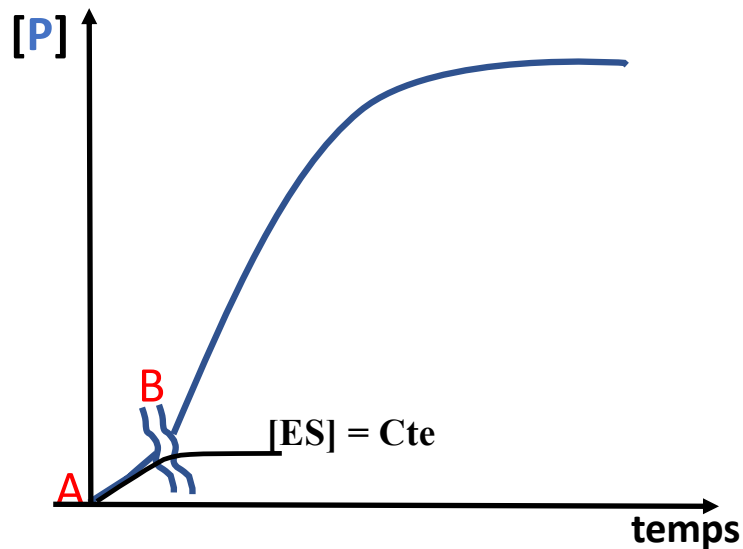
La mesure d'une vitesse se fait
soit par le suivi de la production de P
soit par le suivi de la disparition de S en fonction du temps
Caractérisée par une constante de vitesse et un ordre de réaction



*Mélange de 10^{-6} M d'enzyme et de 0,1 M de substrat
dans un tampon phosphate de sodium 0,2 M pH 6,0 et à 25 ° C*

Vitesse de la réaction enzymatique

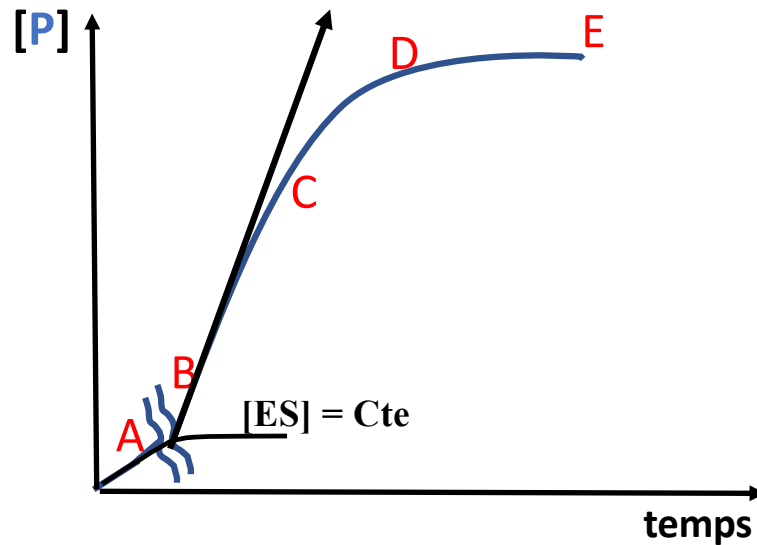
L'avancement de la réaction est caractérisée par plusieurs phases



A-B : correspond à la phase d'induction ou **phase pré-stationnaire**, temps (rapide en ms) nécessaire pour la formation complexe ES.

La vitesse de sa formation est contrôlée par la diffusion du substrat vers l'enzyme.

$$v = k_1 [E] [S]$$



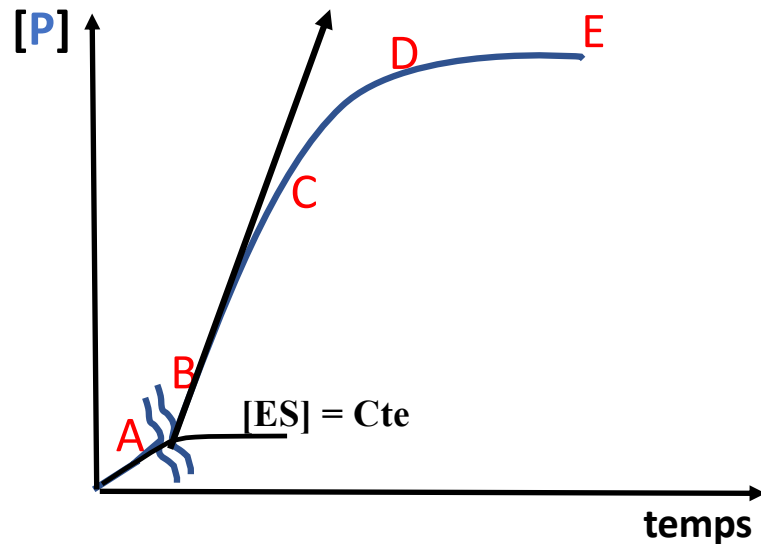
B-C : dite **phase stationnaire**

[P] et [S] varient linéairement avec le temps
 $\rightarrow dP/dt$ et $-dS/dt$ sont constants
 car [ES] constant

$$v_i = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} = k[ES] = k(\text{cte})$$

vitesse ne dépend que de la formation du complexe ES qui est constant
 k est une constante de proportionnalité ou vitesse spécifique de la réaction

=> mesure de v_i **vitesse initiale**
 unité en mol/temps ou molaire/temps ou UA /temps .

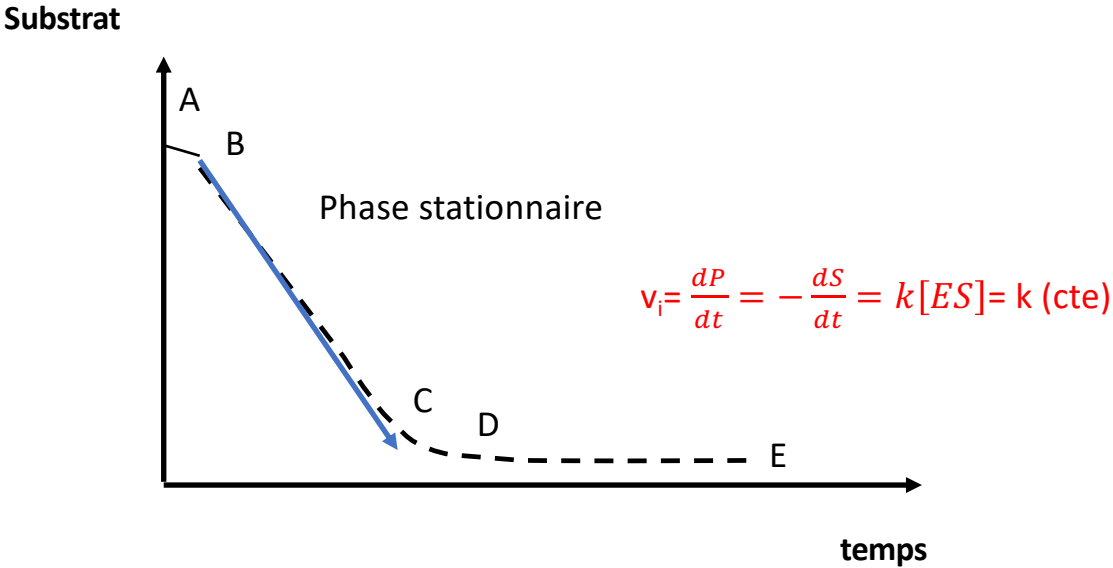


C-D : dite **phase post-stationnaire**. décroissance de la vitesse de réaction dépend d'un ou de plusieurs facteurs :

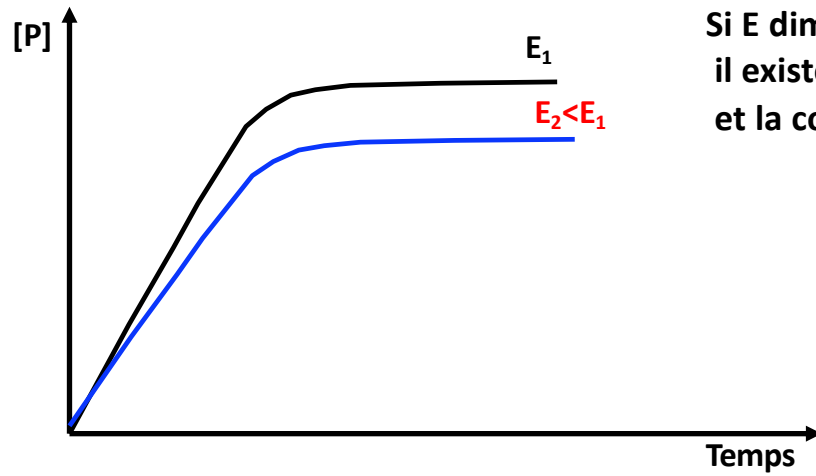
- Diminution de $[S]$ donc **l'enzyme n'est plus saturée en substrat**
- Instabilité de l'enzyme
- Inhibition par les produits de la réaction

D-E : **Phase d'équilibre**. La concentration en $[P]$ et $[S]$ ne varie plus en fonction du temps : les vitesses sont nulles. => **Cinétique d'ordre 0**

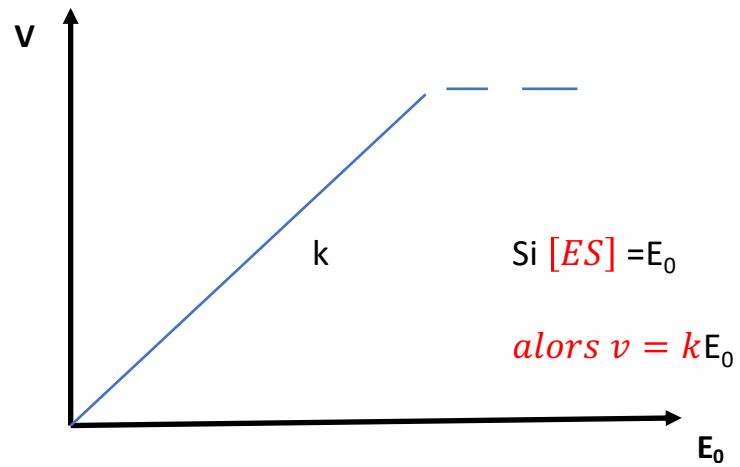
Les différentes phases en fonction de la disparition du substrat



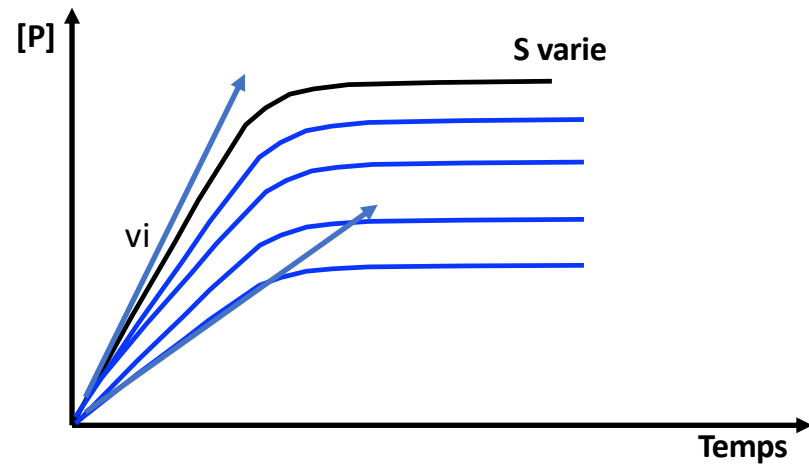
Que se passe t'il si E change ?



Si E diminue, la vitesse initiale diminue
il existe une relation linéaire entre la vitesse initiale
et la concentration en enzyme



Que se passe t'il si S change ?



vi varie mais pas de façon linéaire

Détermination de la vitesse de la réaction enzymatique

Les vitesses des réactions catalysées par les enzymes sont le plus souvent déterminées par la méthode dite de « vitesse initiale »

- La [P] est très faible ou négligeable mais pas nulle, la réaction inverse ($P \rightarrow S$) n'est pas encore installée.
on considère que la réaction n'est pas réversible
- S_0 est en excès $[S]_0 \gg E_0$
- Dans les conditions de « vitesse initiale » : $[S]_0 \approx [S]$ car la disparition de S n'excède pas 5% de S_0
 $[S]_0 = [S] + [ES]$ mais la formation du complexe est limitée par E_0 on a $[ES]_{\max} = E_0$
 $[S_0] \gg [ES]$
- L'instabilité de la réaction n'intervient pas : la perte de vitesse est faible

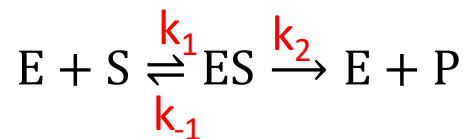
Écriture de l'équation de vitesse

- Approche de l'état stationnaire (modèle de Briggs-Haldane 1925)
- Approche de l'état d'équilibre rapide, qui est un cas particulier de l'approche de l'état stationnaire (Michaelis et Menten 1913)

Approche de l'état stationnaire

On pose les hypothèses suivantes :

- 1. On considère qu'il n'existe qu'un seul complexe central : ES**
- 2. On ne s'intéresse qu'aux vitesses initiales (v_i). On se place donc au début de la phase stationnaire**



k_1 : constante de vitesse d'association ES

k_2 : constante de vitesse de dissociation de ES

k_{-1} : constante de vitesse de dissociation ES

- 3. $[S]$ est largement excédentaire par rapport à $[E]$, soit $[S]_0 \gg [E]$**

$$v_i = \frac{dP}{dt} = k_2 [ES]$$

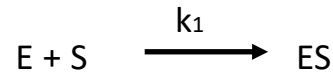
Comment accéder à ES et k_2 ?

[ES] \approx Cte durant la phase stationnaire c'est à dire

$$\frac{d[ES]}{dt} = -\frac{d[ES]}{dt}$$



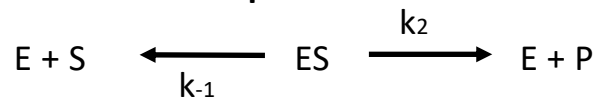
la vitesse de formation de ES



$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S]$$

Cinétique d'ordre 2 :
dépend à la fois de E et de S

la vitesse de décomposition de ES



$$-\frac{d[ES]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

Cinétique d'ordre 1
ne dépend que de ES



➡ A tout instant il se forme autant de [ES] qu'il s'en décompose

$$k_1 [E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$



On considère que $[S] = [S]_0$

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



Difficile de mesurer [E] et [ES] d'où une expression en fonction de [E₀]

$$v = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

Equation de conservation de l'enzyme :

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

$$[E] = [E]_0 - [ES]$$

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



la vitesse initiale est dépendante de [ES] :

$$v_i = \frac{dP}{dt} = k_2 [ES] = k_2 \left(\frac{k_1 [E]_0 [S]_0}{k_1 [S]_0 + (k_{-1} + k_2)} \right)$$

La vitesse maximale est atteinte quand [E₀] = [ES] :

$$V_{\max} = k_2 [E_0]$$

lorsque tous les sites actifs de l'enzyme sont combinés au substrat

On ne peut pas avoir accès aux constante de vitesse

$$v = \frac{V_{max} * [S_0]}{[S_0] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

K_m : constante de Michaelis

k_{-1} et k_2 : cte de vitesses de disparition de ES

k_1 : cte de formation de ES

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

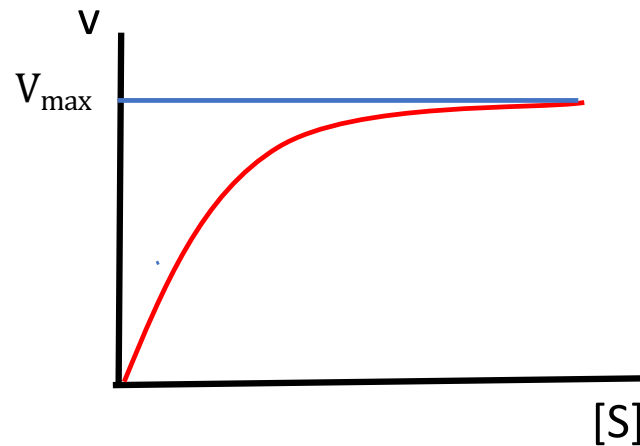
$$v = \frac{V_{max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

Equation de Michaelis–Menten

Représentation graphique de l'équation de Michaëlis-Menten

$$v = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

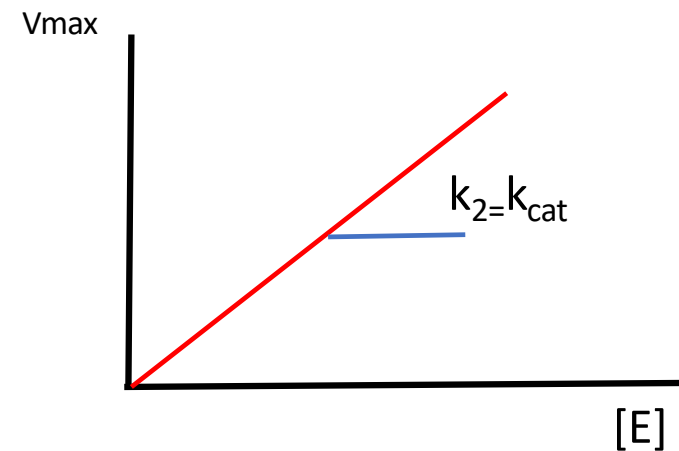
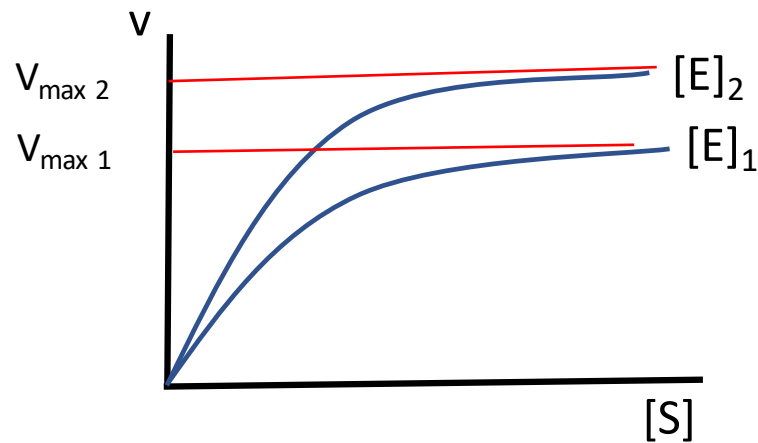


⇒ équation d'une branche d'hyperbole
⇒ tend vers une asymptote = V_{max}

v fonction de V_{max} et de K_m

$$V_{\max} = k_2 [E]_0$$

Correspond à une concentration en substrat infinie V_{\max} ne peut être qu'approchée



k_2 constante de la vitesse d'apparition des produits, appelée aussi constante catalytique (k_{cat}) ou constante de l'activité moléculaire ou turn-over number.

⇒ renseigne sur le taux de renouvellement nombre de mole de substrat transformé par unité de temps par mole d'enzyme.

⇒ k_{cat} peut atteindre 10^7 min^{-1} . (k_{cat} pour la catalase : $5 \cdot 10^6 \text{ min}^{-1}$)

signification de K_m

- K_m est une cte de dissociation apparente dans les conditions de l'approche de l'état stationnaire
- K_m est une cte indépendante de la $[E]_0$
- K_m a les dimensions d'une concentration et s'exprime en mol. L⁻¹ (M)
 K_m comprise généralement entre 10⁻⁸ et 10⁻² M.

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

$$K_m \cong K_D = \frac{1}{K_A} \quad K_D : \text{cte de dissociation et } K_A : \text{cte d'affinité}$$

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

L'affinité de l'enzyme pour le substrat augmente lorsque le K_D est faible et par analogie le K_m

k_1 et k_2 sont des ctes de réaction d'ordre 1, s'expriment en t⁻¹.

k_1 est une cte de réaction d'ordre 2, s'exprime en M⁻¹ t⁻¹

Réaction d'ordre 1 : $v = (k_1 + k_2) [ES]$

$$k = \cancel{M} \cdot t^{-1} / \cancel{M}$$

Dimension donc en t⁻¹

Réaction d'ordre 2 : $v = k_1 [E] [S]$

$$k = \cancel{M} \cdot t^{-1} / \cancel{M} \cdot \cancel{M}$$

Dimension donc en M⁻¹ t⁻¹

Relations spécifiques entre S_0 et K_m

si $S_0 = K_m$

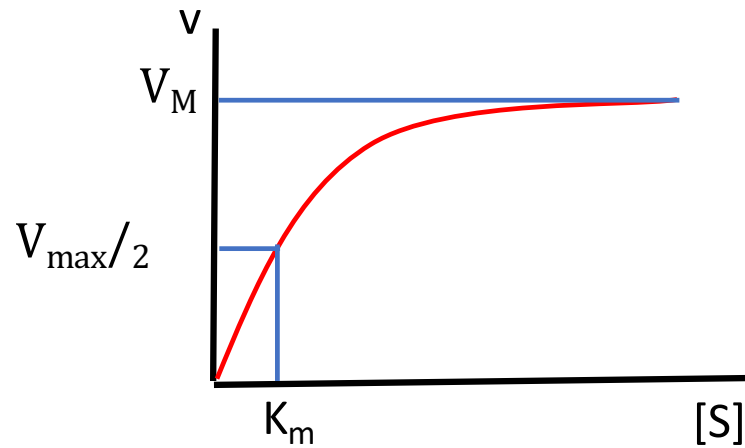
$$v = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_m + [S]_0}$$

alors \rightarrow

$$v = \frac{V_{\max}}{2}$$

si $v = V_{\max}/2$ alors $S = K_m$



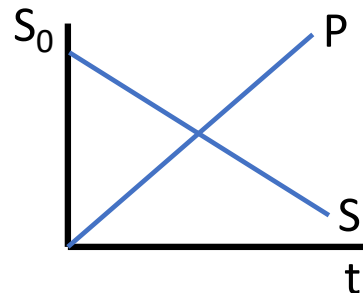
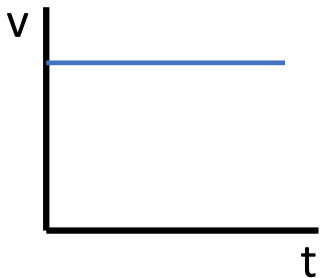
$$S_0 \gg K_m$$

$$S_0 \gg 100 K_m$$

Dans ce cas K_m peut être négligé devant S_0 :

$$v = \frac{V_M [S]_0}{K_m + [S]_0} \quad \longrightarrow \quad v = V_M = k_2 [E]_0$$

L'enzyme est saturée en substrat. La vitesse est constante et indépendante de la $[S]$.
Ordre zéro par rapport au substrat.



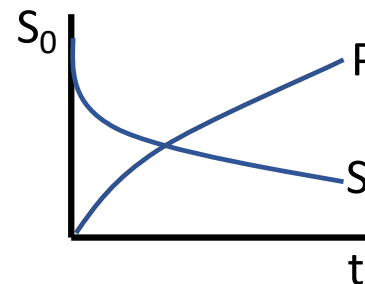
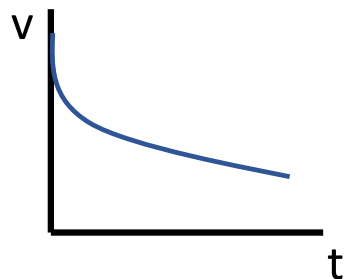
$$S_0 \ll K_m$$

On peut simplifier la relation de la façon suivante :

$$v = \frac{V_M [S]_0}{K_m} \quad \text{ou encore} \quad v = \text{cte} \times [S]_0$$

=> Réaction d'ordre 1 par rapport à S_0

Si $[S]$ non saturant => vitesse (v) diminue au fur à mesure que $[S]$ diminue



Détermination graphique de V_m et K_m

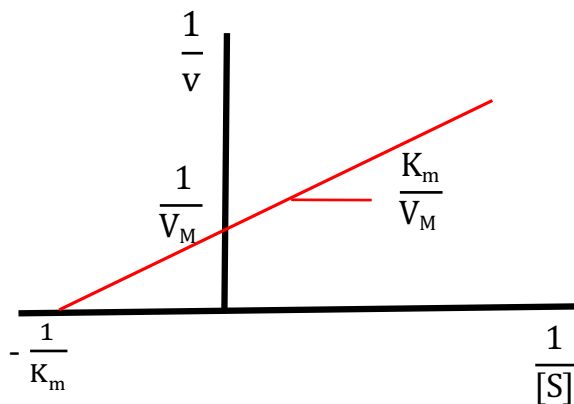
Méthode de Lineweaver et Burk (1934) (ou double inverse) $1/v=f(1/S)$

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

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

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

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



$$\text{Si } \frac{1}{v} = 0$$

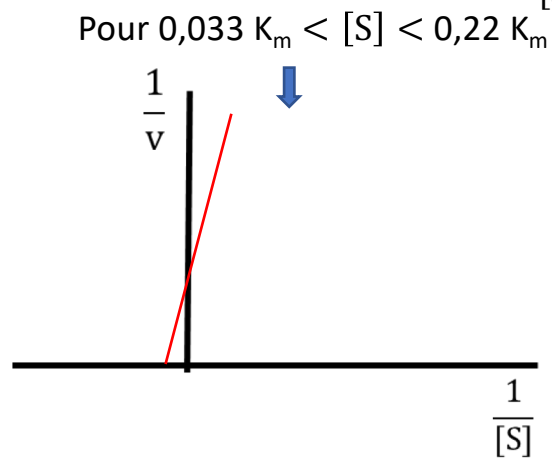
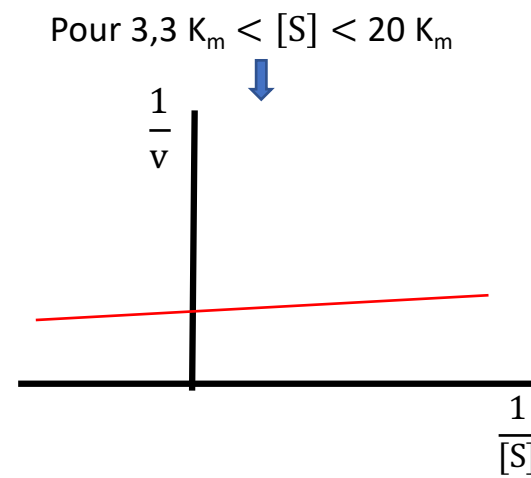
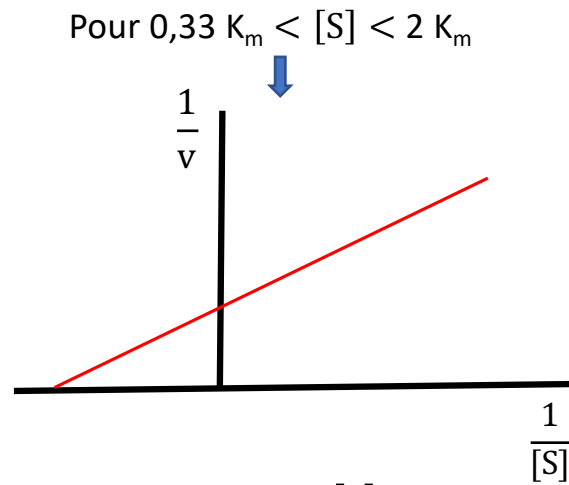
$$\frac{K_m}{V_M} \frac{1}{[S]} = -\frac{1}{V_M}$$

Alors

$$\frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_m}$$

Confirme l'unité de K_m

➤ Pour déterminer précisément les valeurs V_M et K_m , $[S]$ doit être proche de valeur de K_m

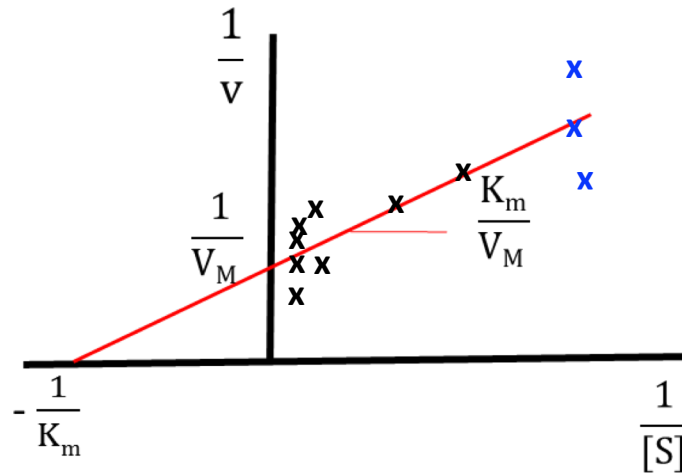


Inconvénient de la méthode double inverse :

- Une erreur sur la détermination de la vitesse aux faibles [S] amplifie les erreurs car on utilise l'inverse de la vitesse

Exemple pour $S = 1 \cdot 10^{-5} M \Rightarrow V$ mesurée = 0,05 mole/ml/min alors que V réelle = 0,075 mole/min/ml

A fortes [S] on a souvent un nuage de points



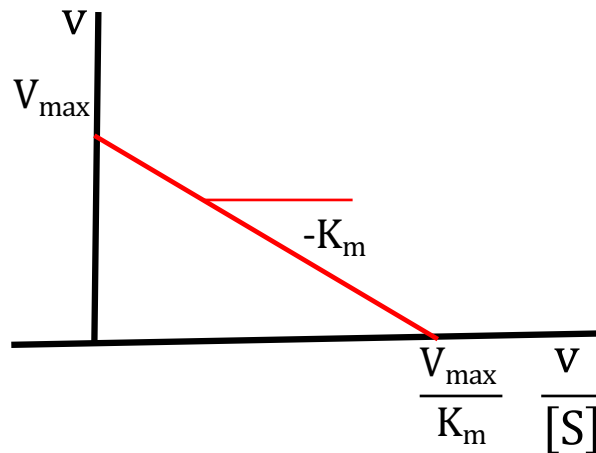
Méthode Eadie-Hofstee

$$v=f(v/[S])$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$v = \frac{V_{\max}}{\frac{K_m}{[S]} + 1} \longrightarrow V_{\max} = \frac{v K_m}{[S]} + v \longrightarrow v = V_{\max} - \frac{v K_m}{[S]}$$

$$v = - \frac{v K_m}{[S]} + V_{\max}$$



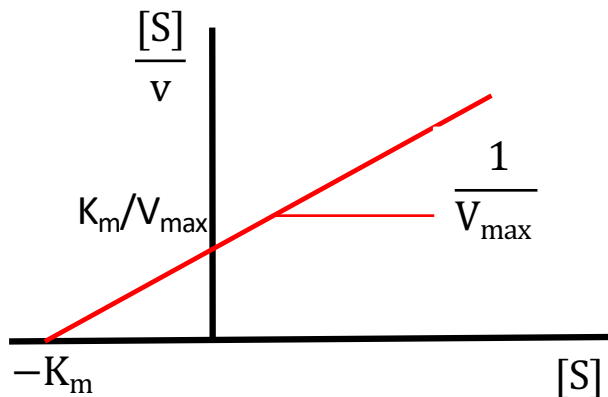
- Si $[S] \ll K_m$ droite presque verticale
- Si $[S] \gg K_m$ droite presque horizontale

Méthode Hanes-Woolf. $[S]/v=f([S])$

On part de la relation en double inverse :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \times [S]$$

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}}$$



- Si $[S] \ll K_m$ droite presque horizontale
- Si $[S] \gg K_m$ droite presque verticale

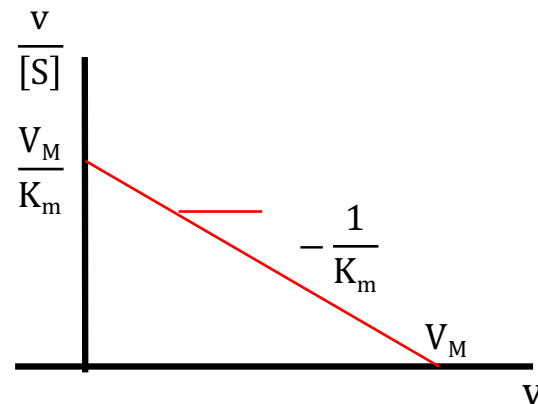
Dans la plupart des cas, cette méthode est considérée comme la plus fiable des méthodes de linéarisation

Méthode Eadie-Scatchard. $v/[S] = f(v)$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \longrightarrow \quad v K_m + v[S] = V_{\max} [S]$$

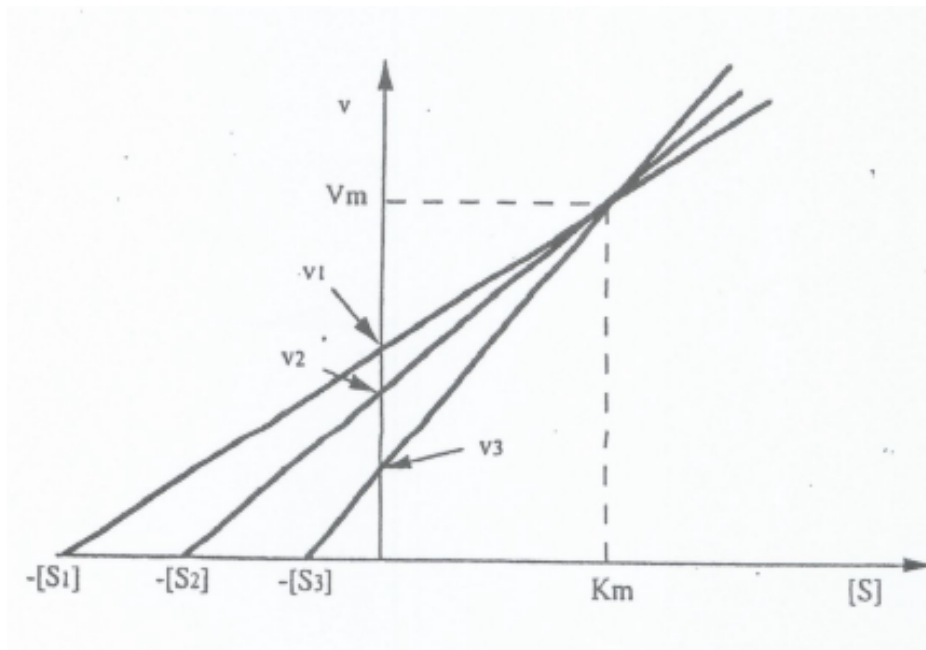
$$\div [S] K_m$$

$$\frac{v}{[S]} = \frac{V_M - v}{K_m} \quad \longrightarrow \quad \boxed{\frac{v}{[S]} = -\frac{1}{K_m} v + \frac{V_M}{K_m}}$$



Méthode d'Eisenthal-Cornish-Bowden (ou diagramme linéaire)

- On mesure la vitesse initiale pour chaque $[S]$ et on porte les valeurs sur un graphe
On obtient un faisceau de droites concurrentes en un même point permettant de déterminer directement les valeurs de K_m et V_m sur le graphique (cas théorique)



- Mais dans la pratique les droites ne se coupent pas en un point.

Détermination de K_m et V_M par intégration de l'équation de vitesse

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$



$$V_{\max} \int_{t_0}^t dt = - \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{K_m + [S]}{[S]} d[S] \longrightarrow V_M \int_{t_0}^t dt = -K_m \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{d[S]}{[S]} - \int_{[S]_0}^{[S]} d[S]$$

à $t=0$

$$V_{\max} t = -K_m \ln \frac{[S]}{[S]_0} - ([S] - [S]_0)$$



pour n'importe quel taux de S

On peut calculer le temps de la réaction,



Représentation graphique

$$V_{\max} t = K_m \ln \frac{[S]_0}{[S]} + [S]_0 - [S]$$

$$V_{\max} = \frac{1}{t} K_m \ln \frac{[S]_0}{[S]} + \frac{[S]_0 - [S]}{t} \quad \longrightarrow \quad \frac{1}{t} K_m \ln \frac{[S]_0}{[S]} = V_M + \frac{[S]_0 - [S]}{t}$$

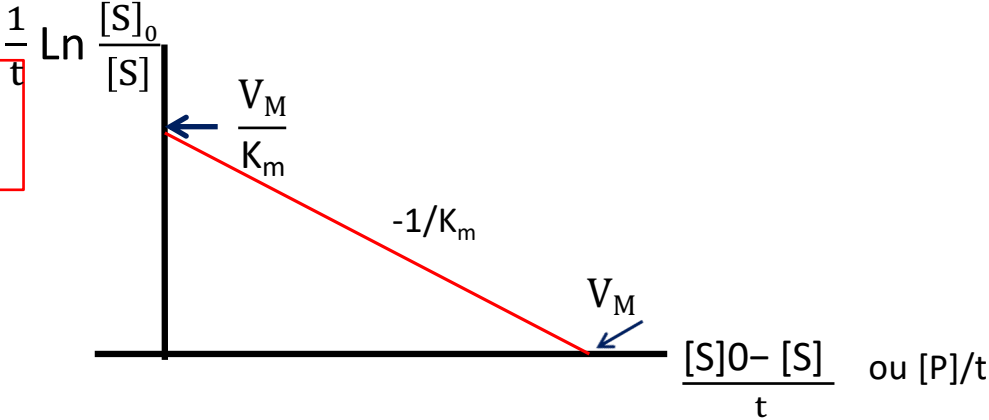
$$\frac{1}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]} = \frac{V_M}{K_m} + \frac{[S]_0 - [S]}{K_m t}$$



$$\frac{1}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]} = - \frac{1}{K_m} \left(\frac{[S]_0 - [S]}{t} \right) + \frac{V_M}{K_m}$$

$$[S]_0 - [S] = P$$

$$\frac{1}{t} \ln [P] = - \frac{1}{K_m} \left(\frac{[P]}{t} \right) + \frac{V_M}{K_m}$$



Les méthodes modernes par calculs

Les conditions de l'équation de Henri, Michaelis & Menten ou l'équation de Briggs-Haldane
=> approximations qui ne sont cependant pas systématiquement respectées in vivo :

- la condition $[S_0] \gg [E_0]$ n'est pas respectée : macromolécules en surpopulation
- dans les tous premiers instants d'une réaction enzymatique, la variation des concentrations n'est pas linéaire
- la concentration du produit peut ne pas être négligeable => accumulation du fait d'une étape située en aval dont la vitesse est limitante
- le produit peut être substrat (réaction réverse)
- le produit peut agir comme un inhibiteur

Les équations différentielles ne peuvent alors pas être simplifiées

=> méthodes d'analyse numérique, bien souvent par itération

Plus récemment, la fonction ω de Lambert a été utilisée pour analyser les valeurs des paramètres cinétiques :
à partir de la forme intégrée de l'équation de Henri, Michaelis & Menten :

$$V_{\text{Max}} \cdot t = K_M \cdot \ln([S_0]/[S]) + ([S_0] - [S])$$

on obtient une solution de la forme : $[S]_t = K_M \cdot \omega\left\{\frac{[S_0]}{K_M} \cdot \exp\left(\frac{[S_0] - V_{\text{Max}} \cdot t}{K_M}\right)\right\}$

Intérêt de la connaissance de valeurs de K_m et V_M

- La valeur de K_m permet d'avoir une idée approximative de la concentration en substrat dans la cellule
Si $[S] \ll K_m$, la vitesse sera très sensible à des changements de $[S]$ mais surtout le potentiel catalytique sera gaspillé car $v \ll V_{max}$
Pas de sens physiologique à maintenir $[S] \gg K_m$ puisque la vitesse ne pourra être supérieure à V_M ,
Quand $[S] \gg K_m$, la vitesse est insensible à de faibles variations en $[S]$

la différence de vitesse entre $S=K_m$ et $S=100 K_m$ est seulement de 2

- K_m : constante caractéristique d'une enzyme donnée et d'un substrat, sa valeur permet de comparer les enzymes de différents organismes ou de différents tissus d'un même organisme ou d'un même tissu à différents stades de développement.
- Les valeurs de K_m , V_M , k_{cat} permettent de déterminer le meilleur substrat pour l'enzyme, l'efficacité catalytique de l'enzyme...
Efficacité k_{cat}/K_m ou V_m/K_m si même concentration en E_0
- En connaissant la valeur de K_m , les conditions de mesure d'activité peuvent être établies ($[S] \gg K_m$)

Le rapport (k_{cat} / K_M) ou constante de spécificité ou efficacité

1er cas : une enzyme qui fixerait "facilement" un substrat même à de faibles concentrations (K_M faible) pourrait catalyser très lentement la réaction (k_{cat} faible).

2ème cas : inversement, une enzyme qui ne serait saturée qu'à de fortes concentrations de substrat (K_M élevé) pourrait accomplir très souvent l'acte catalytique (k_{cat} élevée).

⇒ l'un ou l'autre de ces deux paramètres ne permettent pas de caractériser **l'efficacité réelle** d'une enzyme.

⇒ **une forte efficacité : fixation du substrat à de faibles concentrations et une catalyse fréquente :**

c'est donc le rapport (k_{cat} / K_M) qui reflète l'efficacité d'une enzyme à catalyser une réaction.

la valeur maximale du rapport (k_{cat} / K_M) est obtenue quand $[k_{\text{cat}} / (k_{-1} + k_{\text{cat}})] = 1$

La limite du rapport (k_{cat} / K_M) est donc la constante de vitesse d'association [enzyme - substrat], soit k_1 .

Exemple de Valeurs de K_m et k_{cat} pour certaines enzymes et leur substrat

Enzyme	Substrat	K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	9.5×10^{-5}	1.4×10^4	1.5×10^8
Anhydrase carbonique	CO_2	1.2×10^{-2}	1.0×10^6	8.3×10^7
	HCO_3^-	2.6×10^{-2}	4.0×10^5	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	4.0×10^8
Chymotrypsine	Ester éthylique de N-Acétyleglycine	4.4×10^{-1}	5.1×10^{-2}	1.2×10^{-1}
	Ester éthylique de N-Acétylevaline	8.8×10^{-2}	1.7×10^{-1}	1.9
	Ester éthylique de N-Acétyletyrosine	6.6×10^{-4}	1.9×10^2	2.9×10^5
Fumarase	Fumarate	5.0×10^{-6}	8.0×10^2	1.6×10^8
	Malate	2.5×10^{-5}	9.0×10^2	3.6×10^7
Uréase	Urée	2.5×10^{-2}	1.0×10^4	4.0×10^5

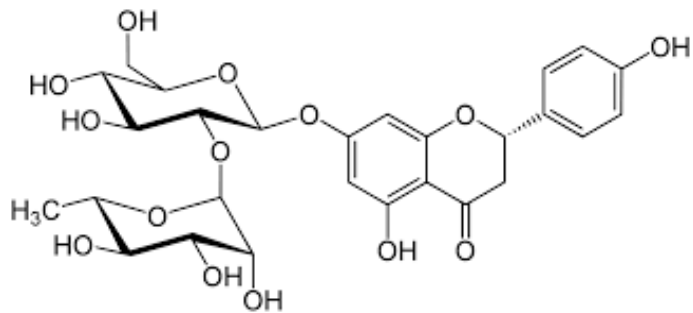
✓ On note que ces valeurs sont très variables selon les enzymes

✓ Pour une enzyme, plus la valeur K_m est faible, meilleur est l'affinité

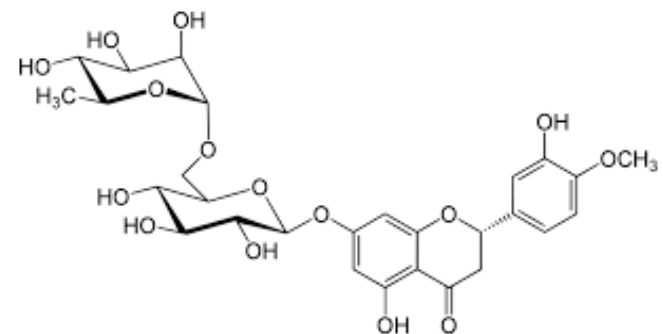
✓ Pour la chymotrypsine, meilleure efficacité envers l'ester éthylique de N-acétyletyrosine

Valeurs de V_M et K_m d'une rhamnosidase d'*A.niger* pour différents substrats

substrat	V_{max} en mm/min	K_m (mM)	Efficacité catalytique = V_m/K_m
Naringine	66	0,045	1,46
Hespéridine	624	0,96	0,65



Naringine



Hespéridine

- La valeur de V_M , seule, ne permet pas de conclure sur l'efficacité catalytique de l'enzyme
- Le rapport V_M/K_m renseigne sur l'efficacité catalytique (min^{-1}).