

Chapitre 2: Spécificité enzymatique et régulation

II-1-Spécificité enzymatique : chaque enzyme a une double spécificité ; spécificité de substrat et spécificité de réaction qu'elle catalyse

II-1-1-La spécificité de substrat les enzymes ont des degrés de spécificité variable, certaines enzymes ont une spécificité absolue transformant un substrat unique en un produit unique (la glucokinase ne phosphoryle que le glucose). D'autres ont une spécificité plus large catalysant une réaction particulière mais sur une classe de substrats (l'hexokinase phosphoryle les divers hexoses y compris le glucose)

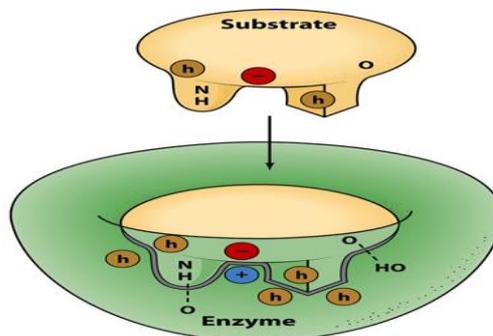
II-1-2-La spécificité de réaction : est invariable pour un substrat donné une enzyme ne catalyse qu'un seul type de réaction parmi l'ensemble des réactions qui sont possibles, par exemple le glucose peut être phosphorylé en glucose 6 phosphate (par la glucokinase) ou isomérisé en mannose (par la glucose épimérase), la glucokinase et la glucose isomérase possèdent la même spécificité de substrat mais possèdent des spécificités de réaction différentes

II-1-3-spécificité enzymatique et site actif : la double spécificité d'une enzyme s'explique par la configuration spatiale de son site actif

Le site actif est une crevasse tapissée par des acides aminés qui sont éloignés dans la structure primaire mais rapprochés par le repliement de la protéine enzymatique sur elle-même dans la structure tertiaire, pour former le site actif. Certains acides aminés sont impliqués dans la fixation de substrat (site de reconnaissance de substrat) et d'autres dans la catalyse (site catalytique)

a)- site de reconnaissance de substrat : (détermine la spécificité de substrat) est constitué de certains acides aminés qui sont associés d'une manière complémentaire (complémentarité géométrique et électronique) avec le substrat, cette association se fait par des interactions faibles (liaison ionique, liaison hydrogène, liaison hydrophobe)

b)- site catalytique : (détermine la spécificité de réaction) contient des acides aminés qui interviennent directement dans la catalyse (transformation de substrat en produit) et dans la majorité des cas possèdent des chaînes latérales ioniques ou réactives (His, Arg, Lys, Asp, Glu, Cys, Ser, Tyr)



Complémentarité géométrique et électronique entre enzyme et substrat.

Les groupes hydrophobiques sont symbolisés par un h dans un cercle et les lignes en pointillés figurent les liaisons hydrogènes.

11.2. Régulation de l'activité enzymatique

L'organisme doit pouvoir réguler les activités catalytiques de ses enzymes afin de coordonner ses nombreuses voies métaboliques. Cette régulation peut être réalisée de deux manières

11.2.1. Contrôle de la disponibilité en enzyme

Dans la cellule, la quantité de l'enzyme dépend à la fois du taux de sa synthèse et de sa dégradation. Chacune de ces taux est génétiquement contrôlée en réponse des conditions physiologiques changeantes.

Induction : activation de la synthèse d'une enzyme ;

Répression : arrêt de la synthèse d'une enzyme.

La réponse au contrôle génétique de la concentration en enzyme n'est pas immédiate. Elle survient de quelques minutes chez les bactéries qui se développent rapidement, ou de quelques heures chez les eucaryotes supérieurs.

Exp : chez *E.coli* induction de la biosynthèse de la β galactosidase en présence de lactose et répression en absence de lactose

11.2.2. Contrôle de l'activité enzymatique

a) - **Régulation par modification covalente** : l'activité enzymatique peut être réglé par la liaison covalente d'un groupement phosphate ou l'élimination de ce groupement, donc ces enzymes existe sous deux formes interconvertibles : forme phosphorylée et forme déphosphorylée certaines enzymes sont active sous for phosphorylé d'autre sont active sous forme déphosphorylés

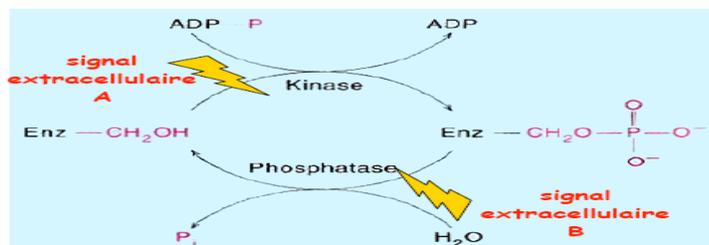
La phosphorylation (sur un residu ser, thr,tyr) est catalysée par des protéines kinases

La déphosphorylation est catalysé par des protéines phosphatases

Les phosphatases et les kinases sont soumises indirectement à un contrôle hormonal

Exp. Glycogène synthétase est activée par phosphorylation et inactivée par déphosphorylation

La glycogène phosphorylase est activée par déphosphorylation et inhibée par phosphorylation

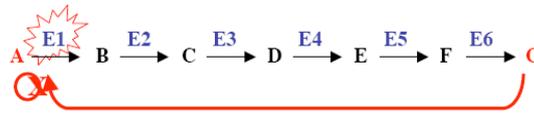


b) Régulation par changement conformationnel :

L'enzyme peut être inhibée ou activée par des interactions non covalentes avec de petites molécules régulatrices dites effecteurs allostériques (activateur ou inhibiteur), cette régulation est dite **allostérique** car l'activateur ou l'inhibiteur se lie à l'enzyme sur un **autre** site différent du site actif (du grec *allos*=autre).

La fixation de ces effecteurs sur le site allostérique provoque une légère modification de la **conformation** de l'enzyme au niveau du site actif ce qui entraîne une augmentation ou diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

Dans la régulation allostérique l'activateur est généralement un métabolite en amont de la réaction ou le substrat lui-même, l'inhibiteur est généralement un métabolite en aval de la réaction ou le produit lui-même, l'inhibition par le produit final d'une voie métabolique est appelé **retroinhibition** (feed back).



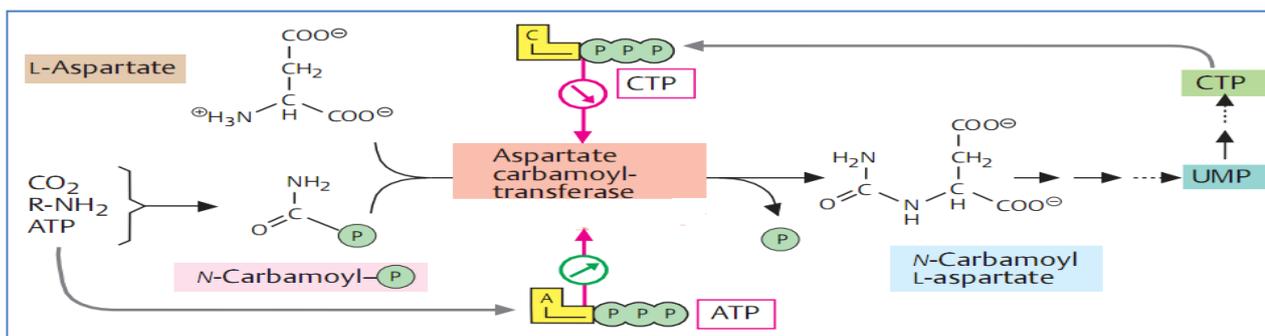
Les enzymes allostériques possèdent généralement deux à plusieurs sous unités, il existe au moins un site de fixation de substrat et un site de fixation d'effecteur allostérique.

Régulation allostérique de l'ATCase d'E.coli

L'Aspartate carbamoyl transférase (aspartate transcarbamoylase) catalyse le transfert d'un résidu carbamoyl du carbamoyl phosphate sur le groupement aminé de L-aspartate pour donner le N carbamoyl-L-aspartate qui est le précurseur des bases pyrimidiques.

L'ATCase est inhibée par le produit final de la voie métabolique le CTP (inhibiteur allostérique), elle est activée par l'ATP (activateur allostérique).

*Lorsque la vitesse de synthèse de CTP dépasse sa vitesse d'utilisation par les cellules, l'excès de CTP qui en résulte inhibe l'ATCase qui à son tour réduit la vitesse de synthèse de CTP (Retroinhibition)



Réaction catalysée par l'aspartate transcarbamoylase

*Inversement, si la concentration intracellulaire de CTP est abaissée, le CTP se dissocie de l'ATCase et lève l'inhibition de l'enzyme

*L'activation de l'ATCase par l'ATP permet de coordonner la vitesse de synthèse de nucléotides puriques et pyrimidiques pour la Biosynthèse des acides nucléiques (si la concentration en CTP et en ATP sont déséquilibrée en faveur d'ATP, l'ATCase est activée par l'ATP pour la synthèse des pyrimidines jusqu'à ce que l'équilibre soit rétabli). Par contre si la concentration de CTP est supérieur à celle de l'ATP, l'inhibition de l'ATCase par le CTP permet à la biosynthèse des purines de rétablir l'équilibre entre les bases puriques et pyrimidiques

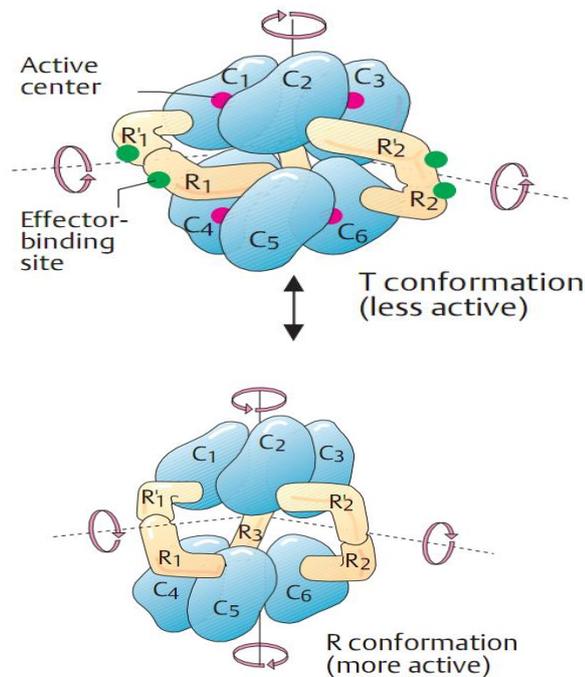
Changement conformationnel de l'ATCase :

L'ATCase d'E.coli est formée de 12 sous unité ; 6 sous unités catalytiques organisées en 2 série de trimères et 6 sous unités régulatrices organisées en 3 série de dimères ($2C_3 + 3R_2$).

Les trimères catalytiques sont attachés par les dimères de régulation, Chaque sous unité catalytique contient deux domaine celui de l'aspartate et de carbamoyl phosphate. Les effecteurs allostériques CTP et ATP se fixent sur le même site allostérique au niveau des sous unités régulatrices

La fixation de ces effecteurs sur le site allostérique entraîne des modifications conformationnelles dans les sous unités régulatrices et en conséquence dans les sous unités catalytiques et leurs sites actifs.

La fixation de l'ATP sur les sous unités régulatrices provoque une séparation des trimères catalytiques ($0,4 \text{ \AA}$) et le rapprochement des deux domaines des sous unités catalytiques ce qui permet la fixation des substrats et la formation de produit. Par contre, la fixation de CTP sur les sous unités régulatrices cause un rapprochement des trimères catalytiques ce qui empêche la catalyse.



Le changement conformationnel de l'ATCase

Chapitre 3 : Structure des enzymes

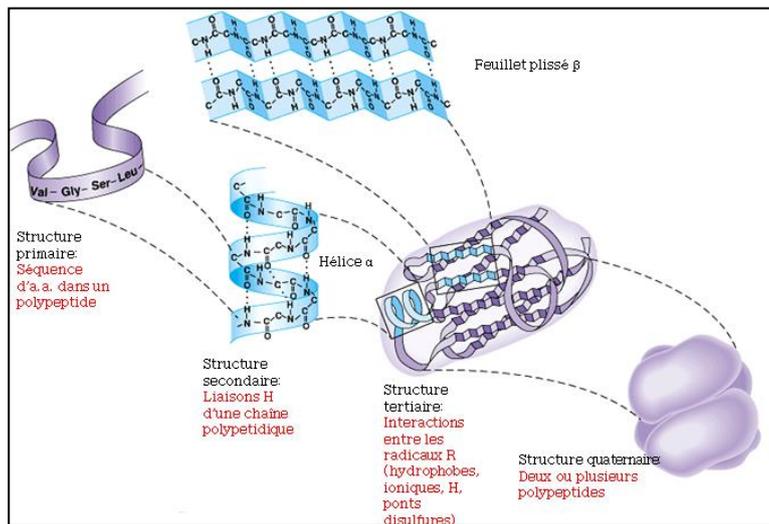
Structure générale des enzymes : Comme les protéines les enzymes sont caractérisées par différents niveaux d'organisations moléculaires

-La structure primaire : Correspond à l'enchaînement des acides Aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques

-La structure secondaire : elle est due aux relations dans l'espace de résidus proches les uns des autres dans la chaîne polypeptidiques, elle est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre les fonctions CO et NH des liaisons peptidiques, on distingue deux types de structure secondaire l'hélice α et le feuillet β .

-La structure tertiaire : elle est due aux relations dans l'espace de résidus éloignés les uns des autres dans la chaîne polypeptidiques. C'est la conformation tridimensionnelle biologiquement active. Elle est nécessaire pour la catalyse car elle permet la formation de site actif par rapprochement des acides aminés éloignés dans la structure primaire. La structure tertiaire est stabilisée par des liaisons (hydrogène, hydrophobe, ionique, covalente (pont s-s)) entre les chaînes latérales des résidus.

-La structure quaternaire : elle est due aux relations dans l'espace de différentes chaînes polypeptidiques (sous unités) elle est stabilisée par des liaisons hydrogène, hydrophobe et ionique.



Chez certaines enzymes (les oxydoréductases et les transférases) le mécanisme de la catalyse nécessite l'intervention de petites molécules de nature non protéique appelées cofacteurs :

1) ions métalliques : (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+})

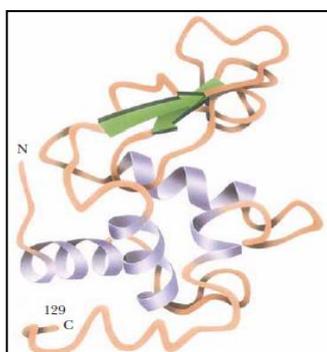
2) Coenzymes : petites molécules organiques qui dérivent généralement des vitamines (tableau 1), on distingue deux types de coenzymes

a-Coenzymes groupements prosthétiques : sont associés en permanence à la partie protéique de l'enzyme souvent par des liaisons covalentes

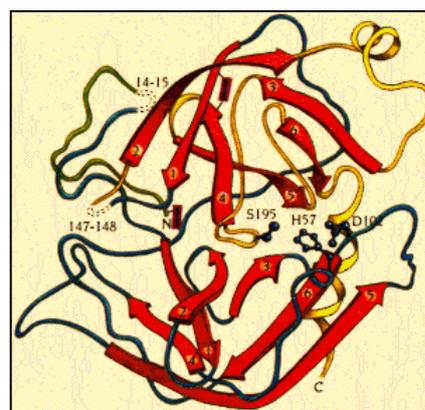
b-Coenzymes cosubstrats : s'associent transitoirement à la molécule d'enzyme comme le substrat

Le complexe enzyme cofacteur catalytiquement actif est appelé **holoenzyme**. la partie protéique de l'**holoenzyme** enzymatiquement inactive s'appelle apoenzymes

3-1- les enzymes monomériques : constituées d'une seule chaîne polypeptidique (1 seule sous unité) qui contient environ 100 à 300 résidus PM (13-35Kda), la plupart catalyse les réactions d'hydrolyse telles que le lysozyme (129 résidus) la chymotrypsine (241 résidus) la trypsine (223 résidus) la ribonucléase (124 résidus). Certaines de ces enzymes sont synthétisées sous forme de zymogène



Structure de lysozyme

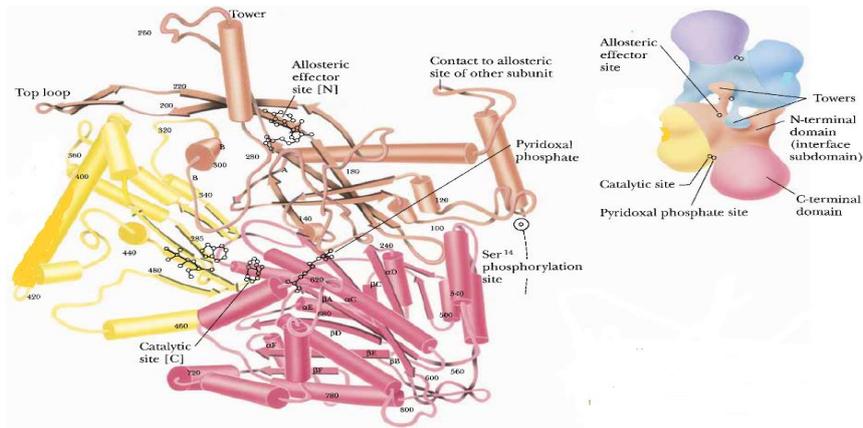


structure de la chymotrypsine

3-2-les enzymes oligomériques : adoptent une conformation quaternaire, ils sont constitués de deux à plusieurs sous unités qui sont liées entre elles par des liaisons non covalentes, les sous unités liées acquièrent des propriétés qu'elles ne peuvent pas avoir à l'état libre (une meilleure efficacité catalytique et capacité de régulation)

Exp : La glycogène phosphorylase du muscle est une enzyme oligomérique formée de deux sous unités identiques (842 résidus, 97,44 KDa), chacune des sous unités contient un site actif et un site allostérique près de l'interface avec la sous unité voisine et un site de phosphorylation sur la fonction OH de ser14, la glycogène phosphorylase est régulée

par deux mécanismes (modification covalente : activé par phosphorylation au niveau de ser14) et (régulation allostérique (ATP et glucose 1 phosphate; sont les inhibiteurs allostériques, l'AMP est l'activateur allostérique)).



Structure de a glycogène phosphorylase

3-4- les isoenzymes : sont des enzymes oligomériques qui présentent plusieurs forme de structures quaternaires selon les proportions relatives des sous unités, elles ont la même spécificité de substrat et les même spécificité de réaction mais d'activités distinctes. des tissus différents expriment des isoenzymes différents, ce qui permet une meilleur adaptation aux besoins métaboliques

Exp: lactate déshydrogénase (LDH) des mammifères

Structure de la LDH :

la LDH est un tétramère formé de 4 sous unités (poids moléculaire 144 KDa) chaque sous unité contient 334 résidus et porte un site actif, il existe deux sous unités qui diffèrent par quelques acides aminés, la sous unité H contient plus de résidus acides et moins de résidus basiques que la forme M donc elle est plus riche en charge négative. cette propriété est exploitée pour la séparation des isoenzymes par électrophorèse (la sous unité H migre plus vite, par contre la sous unité M est plus lente)

La LDH est présente sous forme de 5 isoenzymes selon l'association tetramérique des sous unités M et H : M4, M3H1, M2H2, M1H3, H4

La forme H4 : (heart) prédomine dans le cœur, elle est plus active dans le sens de formation de pyruvate parce que en présence d'oxygène le pyruvate entre dans le cycle de creps pour produire l'énergie (l'activité de muscle cardiaque est régulière=== tissus aérobie)

La forme M4 : (muscle) prédomine dans les tissus anaérobies (muscle squelettique), les cellules musculaire lors d'une forte activité oxydent rapidement le glucose et deviennent anaérobies, au cours de la glycolyse elles produisent le pyruvate et le NADH. Elles ont besoin de LDH afin que la glycolyse puisse continuer (la forme M est plus active dans le sens de formation de lactate ce qui permet la régénération du N AD+ nécessaire pour la glycolyse).

3-4-Les complexes multienzymatiques :

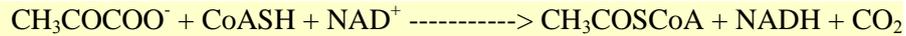
Sont formés par l'assemblage de plusieurs enzymes associées entre elles par des liaisons non covalente et qui catalyse des réactions successives d'une voie métabolique (le produit de la 1^{ère} enzyme est le substrat de la 2^{ème} enzyme, le produit de la 2^{ème} enzyme est le substrat de 3^{ème} enzymes etc)

Les complexes enzymatiques offrent les avantages suivants :

1- les vitesses des réactions sont limitées par la fréquence avec laquelle les enzymes rencontrent le substrat et lorsqu'une série de réaction se produit dans un complexe multienzymatique, la distance que doivent parcourir les substrats entre les sites actifs est réduite ce qui augmente la vitesse de la réaction

2-les complexes multienzymatiques offre les moyens de transférer (guider) les intermédiaires métaboliques entre les enzymes successives d'une voie métabolique et donc de minimiser les réactions aléatoires (parasitaires)

Exp : Le complexe multienzymatique le plus étudié est celui de la pyruvate deshydrogénase(PDH) qui catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl CoA



La PDH est un complexe multienzymatique formé de 3 enzymes et fonctionne avec 5 coenzymes différents

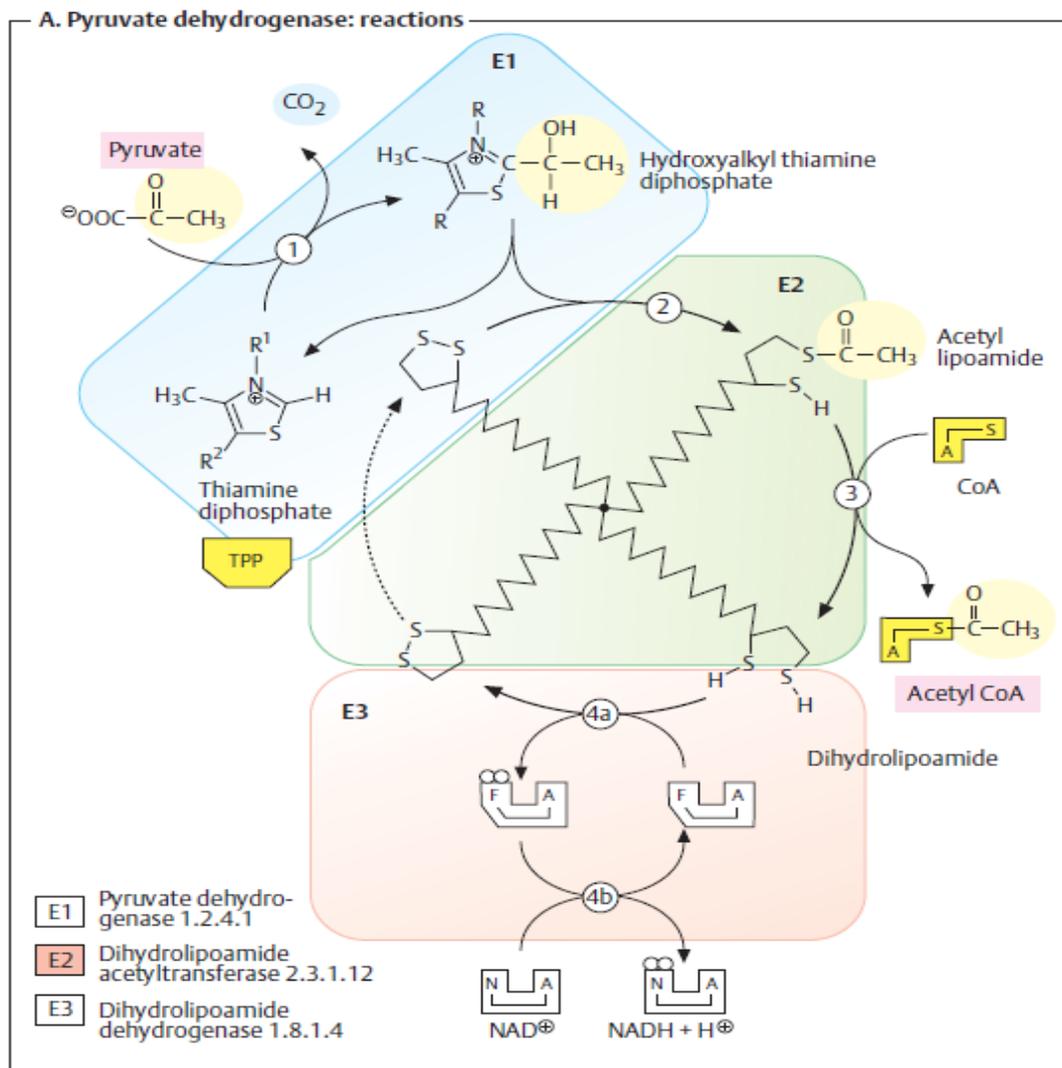
- 1)-La pyruvate deshydrogénase proprement dite (E1) coenzyme TPP (thiamine diphosphate).
- 2)-la dihydroliponamide acétyl transférase (E 2) coenzyme acide lipoïque et coenzyme A.
- 3)-la dihydroliponamide deshydrogénase (E 3) coenzyme FAD et NAD.

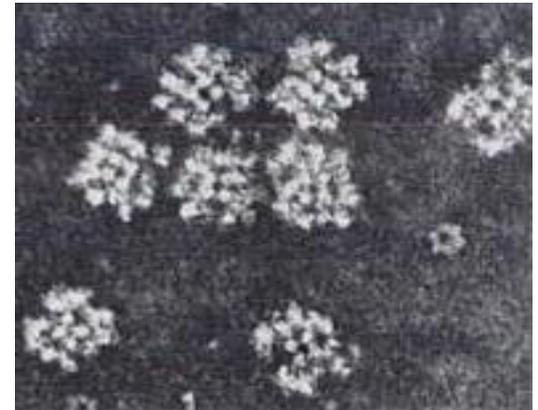
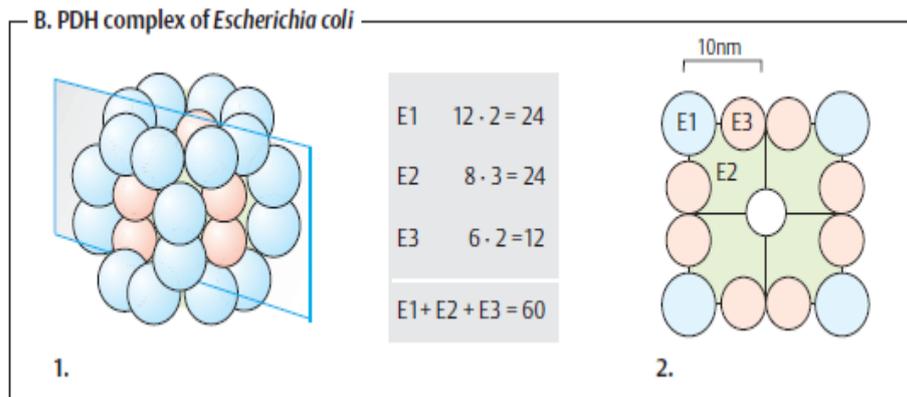
L'E1 catalyse la décarboxylation du pyruvate et le transfert de hydroxyéthyle formé sur le thiamine pyrophosphate, ensuite elle catalyse l'oxydation du groupement hydroxyéthyle lié au TPP en un résidu acétyl qui est transféré sur le liponamide de l'E2

L'E2 catalyse le transfert de résidu Acétyl du liponamide au coenzyme A pour former l'acétyl CoA

L'E3 catalyse la reoxydation du dihydroliponamide avec formation de FADH2 qui est oxydé pour réduire le NAD+ en NADH H+

Les coenzymes cosubstrats (coenzyme A et NAD) apparaissent dans l'équation de la réaction, les coenzymes groupements prosthétiques (TPP, acide lipoïque,FAD) participent à la réaction mais ne figurent pas dans le bilan.





Organisation structurale de la PDH

Micrographie électronique de la PDH d'E.coli

Chapitre 4: Purification des enzymes

4-1-purification des enzymes : La purification des enzymes est l'isolement d'une enzyme de son milieu naturel et l'élimination des protéines contaminantes dans l'objectif d'étudier ces propriétés (sa structure, sa cinétique), ou pour son utilisation en médecine (traitement, diagnostic) ou en industrie.

a) le choix de la source de l'enzyme : selon la facilité d'obtention de quantité suffisante d'enzyme on distingue

a-1-Des sources classiques : tissus d'animaux domestique tel que le poulet, bœuf, lapin, rat
(l'acétyl coA carboxylase est purifié à partir des glandes mammaires. phosphatase alcaline est purifié à partir des reins)

a-2-Des sources alternatives : par génie génétique on peut isoler le gène codant pour l'enzyme de son organisme d'origine et l'exprimer en grande quantité dans un microorganisme approprié mis en culture tel que E .coli ou la levure. Après plusieurs multiplications l'enzyme recherché peut représenter jusqu'à 30% des protéines totales de la cellule productrice ce qui facilite son isolement et sa purification

b) Méthodes d'extractions (solubilisation) de l'enzyme : l'enzyme peut être mise en solution par rupture de tissus ou de cellules sources, la technique d'extraction choisie dépend des caractéristiques mécaniques de tissus de départ (tissus musculaire, cerveau . . .) et la localisation intracellulaire de la protéine (cytosolique, mitochondriale, nucléaire. . .).

b-1- méthode mécanique et physique :

b-1-1- broyeur : instrument qui broie les tissus avec un piston de diamètre très ajusté qui va et vient à l'intérieur d'un tube cylindrique.

b-1-2-presse de french : appareil qui provoque l'ouverture des cellules en les forçant à passer sous haute pression à travers un petit trou.

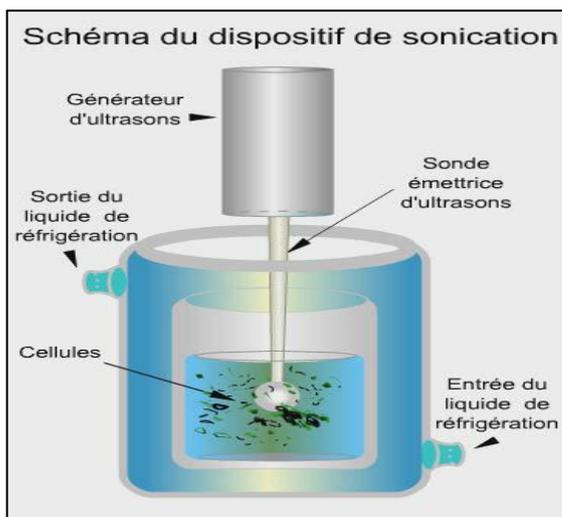
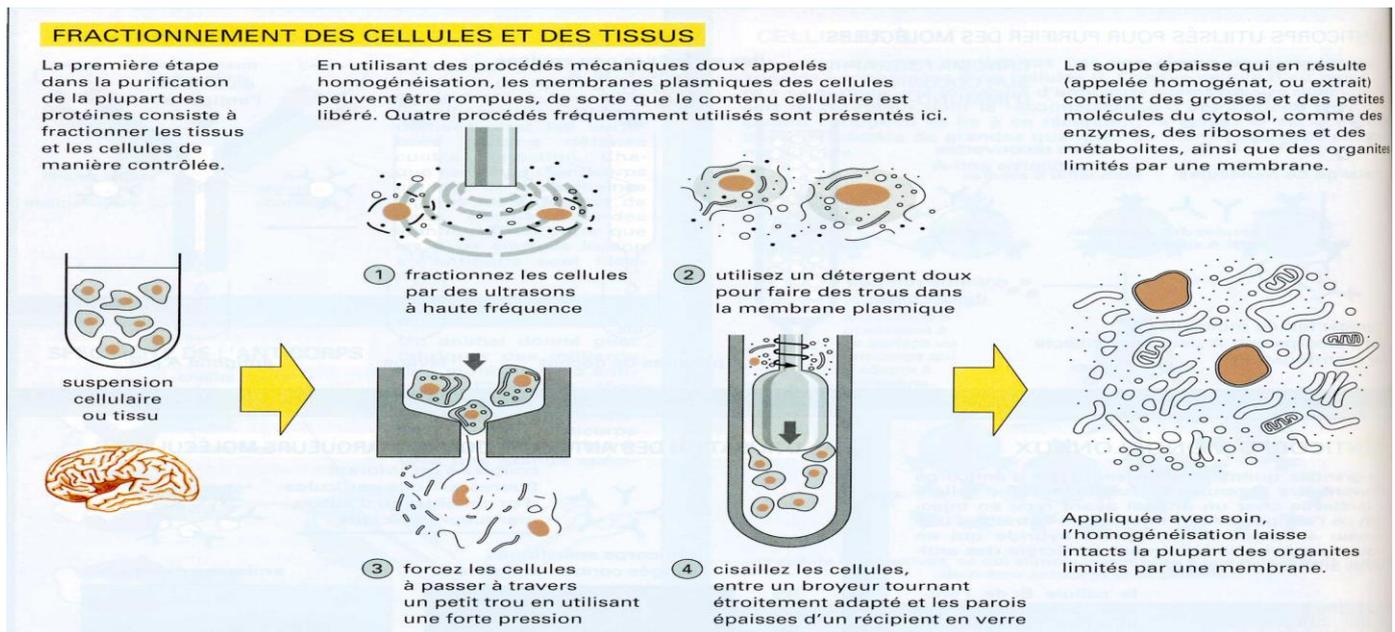
b-1-3-sonicateur : appareil qui génère des vibrations (ultrasons) qui provoquent la rupture des membranes cellulaires

b-2-méthode chimique et enzymatique :

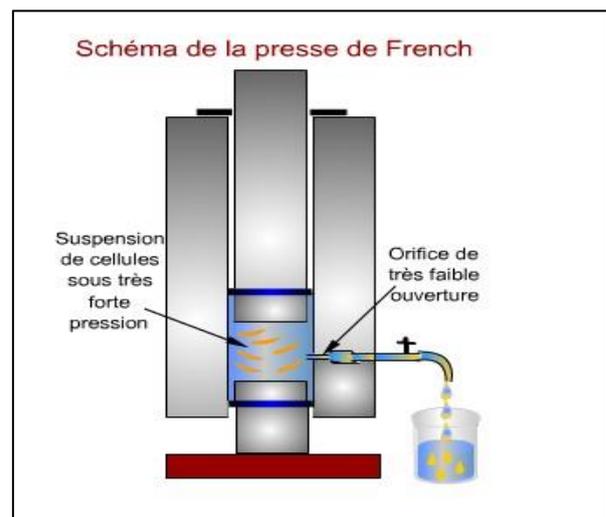
b-2-1-lyse osmotique : cette méthode consiste à mettre les cellules dans un milieu hypotonique, ce qui conduit au passage de l'eau vers le milieu intracellulaire par osmose et l'éclatement des cellules, cette technique est efficace avec les cellules animales et sans effet avec les cellules qui ont une paroi cellulaire (bactérie, cellule végétale)

b-2-2-lyse enzymatique : utilisé pour les cellules qui possèdent une paroi cellulaire, dans le cas des cellules végétales on utilise des cellulases qui dégradent la cellulose, dans le cas de la cellule bactérienne on utilise le lysozyme qui dégrade le peptidoglycane.

b-2-3-lyse par des solvants organiques : l'acétone et le toluène sont aussi utilisés pour lyser la cellule mais ils peuvent dénaturer l'enzyme recherchée.

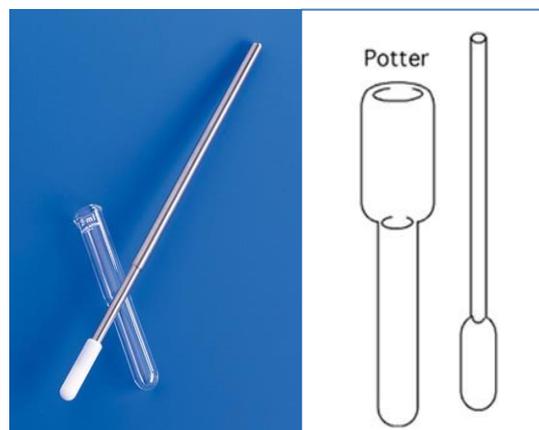


1

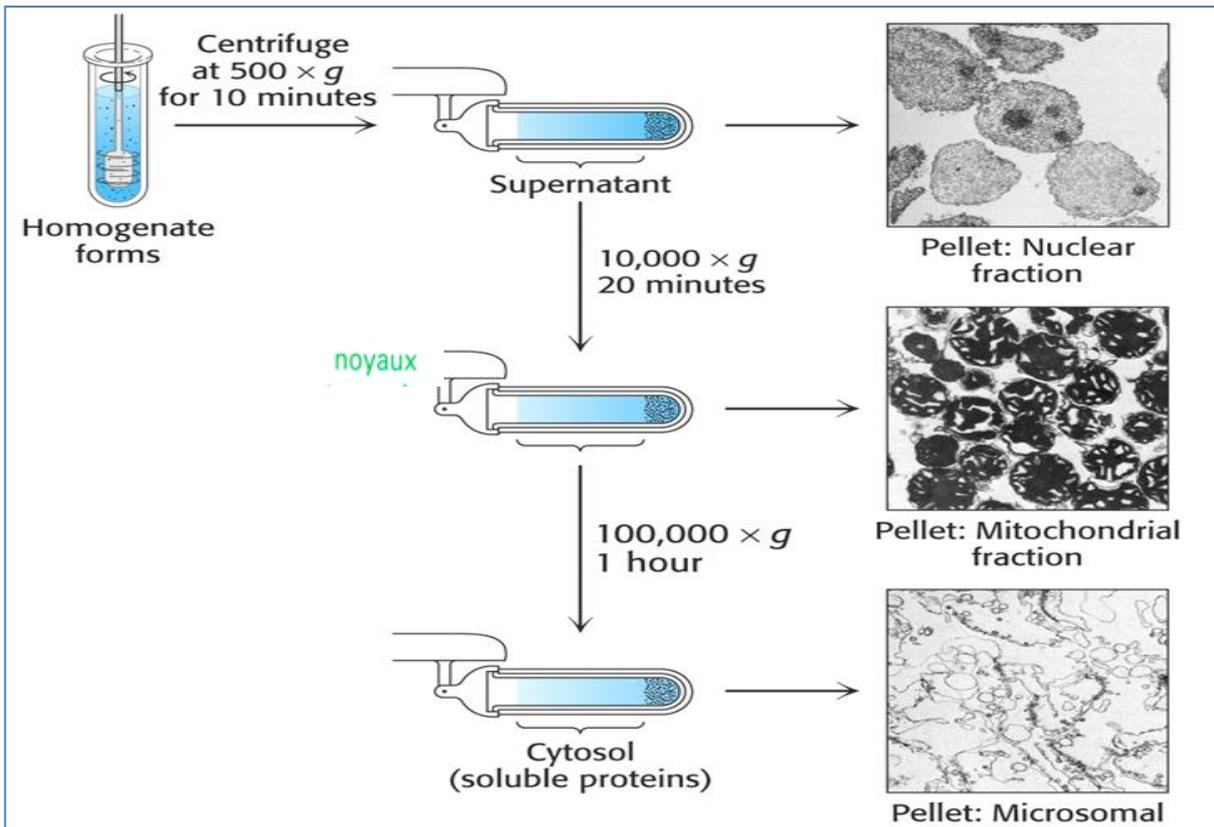


2

3 Broyeur



Après solubilisation, le lysat obtenu peut être filtré ou centrifugé afin d'éliminer les débris membranaire et récupérer le surnageant contenant l'enzyme recherchée, Mais lorsque l'enzyme est contenue dans des organites intracellulaires on doit récupérer ces organites par centrifugation différentielle (les organites cellulaires possèdent des densités différentes donc se sédimentent à des vitesses de centrifugation différentes, certain organite de la cellule sont plus dense que les autres donc se sédimente à basse vitesse de centrifugation). Ensuite, on traite ces organites de la même manière que les cellules.



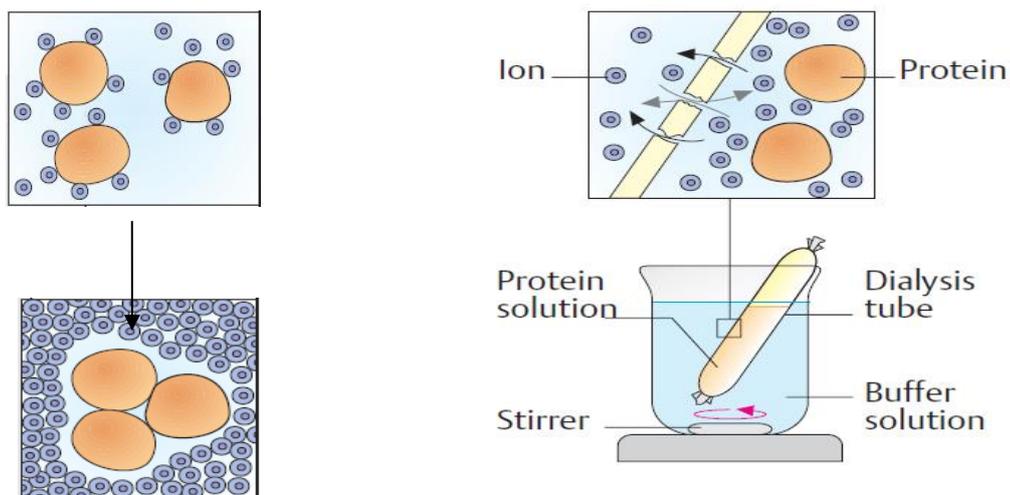
Séparation des organites cellulaires par centrifugation différentielle

Après ces étapes on obtient l'extrait brut total contenant l'enzyme recherchée (probablement très minoritaire) et d'autres protéines contaminantes.

c-méthodes de fractionnement (purification proprement dite)

L'enzyme recherchée est en mélange avec d'autres protéines contaminantes, elle est purifiée en se basant sur ces propriétés (solubilité, charge ionique, taille moléculaire et spécificité d'interaction avec d'autres molécules)

c-1-précipitation différentielle : cette technique est basée sur la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition en acide aminé (hydrophobe ou hydrophile) on peut en séparer plusieurs en fonction de leurs tendance à se précipité plus ou moins vite quand on change la force ionique (la concentration de sel) certaines protéines vont se précipité pour de faible concentration de sel d'autres nécessitent une concentration importante. Le sel le plus utilisé pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



Le précipité de protéine est resuspendu dans un petit volume de tampon et l'excès de sel est éliminé par dialyse qui est basé sur le fait que les molécules protéiques ne peuvent pas passer à travers une membrane semi-perméable par contre les sels peuvent traverser cette membrane.

c-2- chromatographie échangeuse d'ion (CEI) :

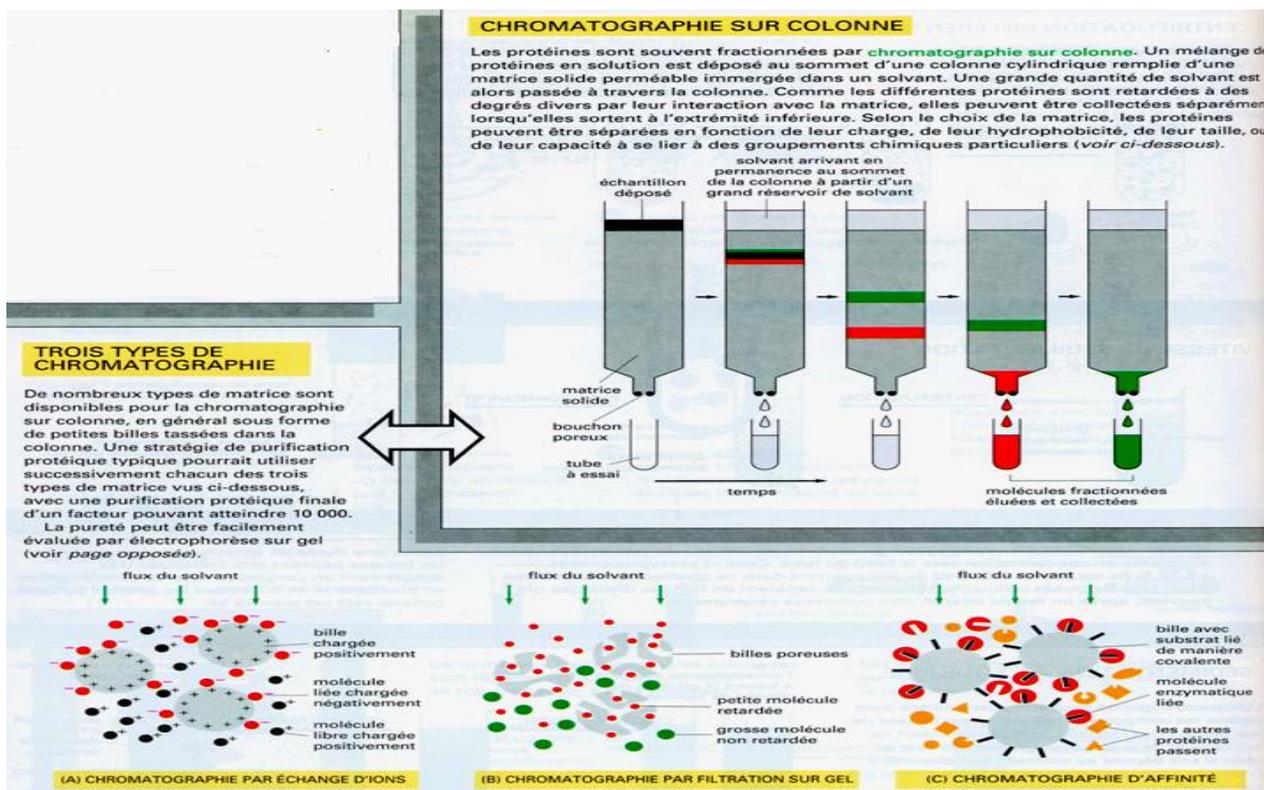
la CEI est basée sur la charge ionique de l'enzyme (qui dépend de sa composition en acide aminé acide et basique). La séparation est due aux interactions ioniques entre les groupes chargés de la phase stationnaire échangeuse d'ion et ceux des molécules de l'échantillon. Donc l'extrait brut contenant l'enzyme est déposé au sommet d'une colonne contenant une phase stationnaire chargé positivement (diéthylaminoéthyl cellulose DEAE-C) ou négativement (carboxyméthyle cellulose CM-C), Les protéines contaminantes sont éliminées avec le tampon de lavage par contre l'enzyme chargé est retenue par la phase stationnaire. L'élution (récupération de l'enzyme) se fait par changement de PH ou de la force ionique du tampon d'élution.

C-3- chromatographie par filtration sur gel (chromatographie d'exclusion stérique –CES-) :

La CES sépare les protéines en fonction de leurs tailles, on utilise pour cela une colonne de chromatographie remplie de billes poreuses (séphadex, sépharose). le mélange de protéines est déposés sur l'extrémité supérieure de la colonne, l'élution se fait en faisant passer à travers la colonne un flux de tampon, les grosses protéines ne peuvent pas pénétrer dans les billes et vont passer rapidement à travers la colonne, les molécules de taille moyenne et les petite protéines seront plus ou moins ralenties selon leurs taille (le volume d'élution est inversement proportionnel avec la taille moléculaire).

C-4-chromatographie d'affinité :

Elle est basée sur l'affinité ou la spécificité d'interaction de l'enzyme avec une molécule appelé ligand (substrat, inhibiteur, coenzyme.....) qui est fixé par covalence à la phase stationnaire. Quand l'extrait brut traverse la phase stationnaire, l'enzyme recherché se lie au ligand immobilisé tandis que les autres substances sortent de la colonne en même temps que le tampon de lavage. L'élution (récupération de l'enzyme) se fait par déstabilisation du complexe (enzyme-ligand) en changeant le PH ,la force ionique.



L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu SDS est le procédé le plus employé pour contrôler la pureté des protéines

-Dans l'électrophorèse native sur gel de polyacrylamide (PAGE) les molécules se déplacent dans un champ électrique, leurs vitesses de migration dépendent de leurs tailles et leurs charges

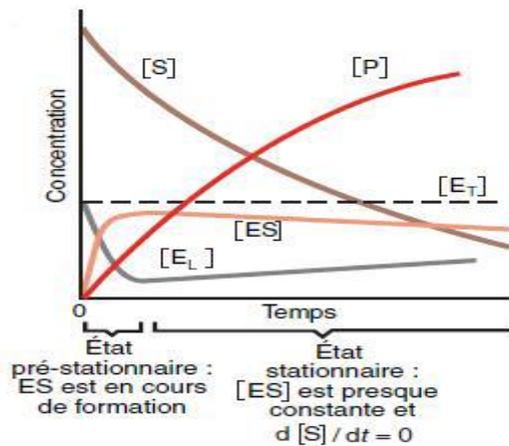
-Dans l'électrophorèse SDS-PAGE le mélange des protéines est traité de telle façon que leur migration ne dépend que de leur taille, on utilise pour cela le SDS (sodium dodecyle sulfate) la forte charge négative apportée par le SDS masque la charge intrinsèque de la protéine et leur donne une charge négative constante par unité de masse, toutes les protéines possèdent donc la même densité de charge et leur mobilité électrophorétique dépend seulement de la taille (PM)

L'apparition d'une seule bande sur le profil de migration électrophorétique indique que l'échantillon est pur donc dépourvu de protéines contaminantes

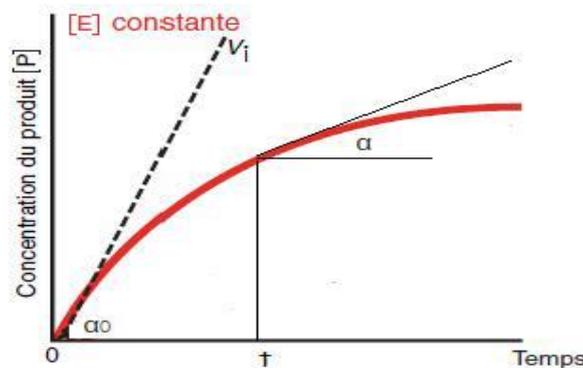
Chapitre 5 : cinétique des enzymes monomériques

La cinétique est l'étude des vitesses des réactions chimiques. La cinétique enzymatique a pour but de déterminer les vitesses des réactions que l'enzyme catalyse, et à mesurer son affinité pour les substrats Elle permet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biologiques et les mutations des enzymes en étudiant leur vitesse réactionnelle.

Les différentes phases d'une réaction enzymatique: Soit la réaction catalysée par l'enzyme E qui transforme le substrat S en produit P: S → P -La phase pré-stationnaire: E mis en présence du S, combinaison E-S rapide (milliseconde)
 -La phase stationnaire: enzyme saturée par S, la combinaison E-S à concentration maximal est constante -La phase post stationnaire: concentration en S diminue significativement au bout d'un temps plus ou moins long



Vitesse initiale de réaction: La vitesse d'une réaction est une mesure de la rapidité avec laquelle la concentration des réactifs et des produits change au cours du temps:



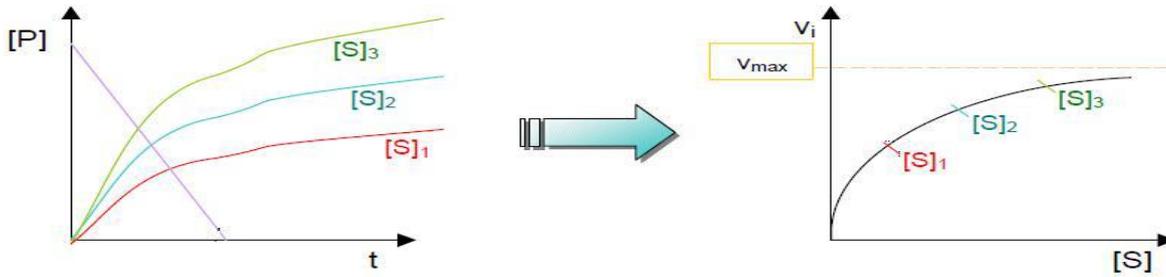
$$V = - \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = k [S]$$

À l'instant t, v = tgα

À l'instant t0, v est maximale, c'est la vitesse initiale de la réaction, vi = tg α0

Influence de la concentration du substrat:

À E constante, on répète la mesure de v_i à des concentrations croissantes de S:



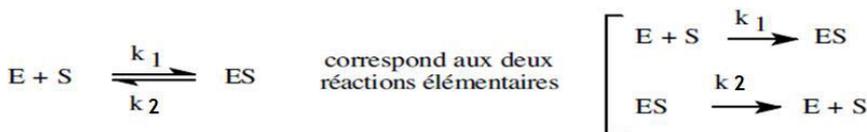
La vitesse initiale augmente avec l'augmentation de la concentration de substrat jusqu'à ce qu'elle devienne maximale V_{max} (c'est la vitesse initiale en présence d'un excès de substrat)

L'hypothèse de Mickaelis-Menten:

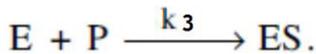
Le modèle de base de la cinétique enzymatique s'écrit ainsi :



où E est l'enzyme, S le substrat, P le produit de réaction et les k_i sont les constantes de vitesse des réactions élémentaires :



1) Les mesures cinétiques, la vitesse initiale (v_i), pour $[P] \cong 0$ et $[S] \cong [S]_0$ où $[S]_0$ est la concentration du substrat à l'instant initial. Cette hypothèse permet de négliger la réaction



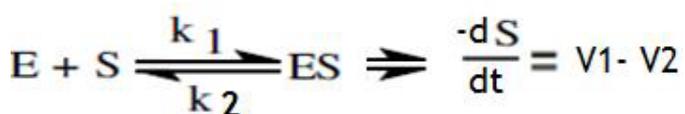
2) $[S]_0$ est grande (\gg) devant celle de l'enzyme $[E]_0$.

3) Dès l'addition de l'enzyme dans la solution de substrat, il s'établit un équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe (appelé complexe de Michaëlis), on parle d'hypothèse du quasi-équilibre ou pré équilibre.

Le schéma réactionnel s'écrit ainsi:



La constante de Mickaelis:



v de disparition de S = à la différence de v_1 et v_2

La loi d'action de masse: $v_1 = K_1 \cdot [E] \cdot [S]$; $v_2 = K_2 [ES]$

La réaction: $ES \rightarrow E + P$ $v_3 = K_3 \cdot [ES]$

$$v \text{ de disparition de S} = v \text{ d'apparition de P} \quad v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt}$$

$\longrightarrow (K_2+K_3)[ES] = K_1[E] \cdot [S] \longrightarrow \frac{K_2+K_3}{K_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = K_m$
 K_m est la constante de dissociation du complexe ES, elle mesure l'affinité de l'enzyme pour le substrat

$$K_m \text{ devient donc: } K_m = \frac{([E]_T - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{[E]_T [S]}{[ES]} - [S] \quad [ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{Sachant que } v_i = v_3 = k_3 [ES] \quad \text{et} \quad v_i = k_3 \frac{[E]_T [S]}{K_m + [S]}$$

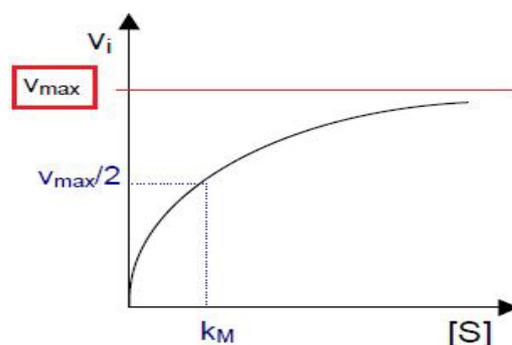
Lorsque la solution est saturé en substrat, $[ES] = [E]_T$ et donc v_i devient v_{max} : $v_{max} = K_3 \cdot [E]_T$

$$v_i = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

C'est l'équation de **Mickaelis-Menten**

C'est l'équation de base de la cinétique enzymatique, elle décrit une hyperbole équilatère qui passe par l'origine et dont l'asymptote, lorsque s tend vers ∞ , vaut $v_i = v_{max}$

Méthodes de détermination de K_m et V_{max} :



La détermination graphique de la K_m et de v_{max}

1-Pour déterminer les constantes K_m et V_{max} , il faut faire une étude cinétique, une première méthode consiste à tracer le graphique représentant les v_i en fonction de la concentration en substrat $[S]$ utilisé. D'après l'équation de Michaelis, on peut en effet déduire que v_i se rapproche asymptotiquement de v_{max} lorsque $[S]$ augmente. Par ailleurs, lorsque $[S] = K_m$, $v_i = v_{max}/2$. On peut donc déterminer graphiquement v_{max} , puis K_m . La difficulté vient du fait que la détermination graphique d'une asymptote est une nécessairement imprécise, entachant d'erreur la détermination de K_m et v_{max} .

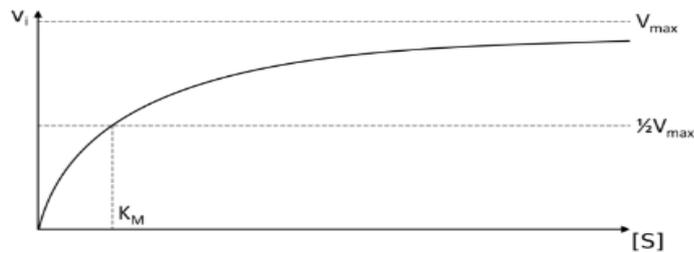


Figure 2 - Vitesses initiales en fonction de la concentration en substrat

La détermination graphique de l'asymptote, et donc de K_M et v_{max} , est peu précise.

2-Pour améliorer la précision de la détermination graphique de ces deux constantes, il existe des représentations graphiques qui linéarisent les résultats, permettant des extrapolations plus précises. La méthode la plus connue est celle de Lineweaver et Burk dans laquelle on représente $1/v_i = f(1/[S])$

$$v_i = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{v_i} = \frac{K_M + [S]}{v_{max}[S]}$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{v_{max}[S]} + \frac{[S]}{v_{max}[S]}$$

$$\Leftrightarrow \frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

On reconnaît une équation de droite de type $\frac{1}{v_i} = a \frac{1}{[S]} + b$, avec $a = \frac{K_M}{v_{max}}$ ce qui correspond à la pente de la droite) et $b = \frac{1}{v_{max}}$ (ce qui correspond à l'ordonnée à l'origine).

Cette représentation permet donc, à partir des mêmes données que précédemment, de déterminer graphiquement les valeurs de v_{max} et de K_M plus précisément qu'avec la représentation précédente.

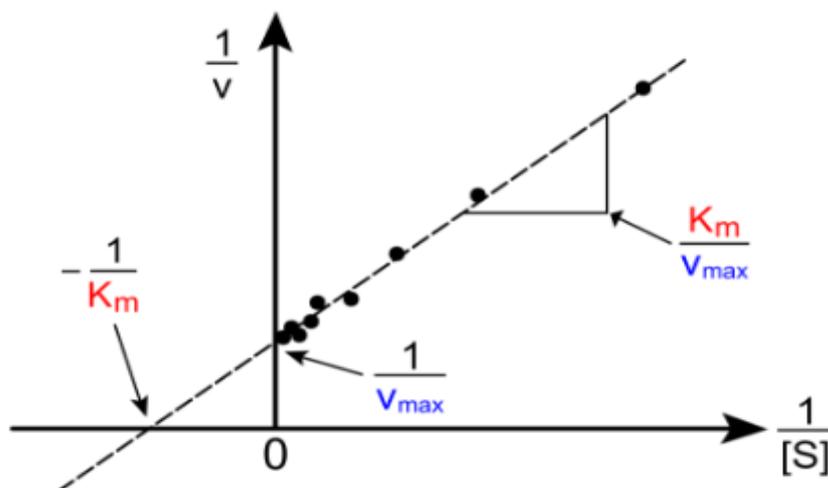


Figure 3 - Représentation de Lineweaver et Burk

Chaque point correspond à une mesure de v_i pour une concentration en substrat $[S]$ donnée. Les intersections avec les axes permettent de déterminer graphiquement K_M et v_{max} .