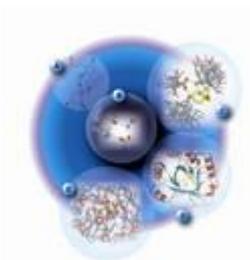


Enzymologie

Document destiné aux étudiants de :

Licence Microbiologie, Licence Biotechnologie, Licence Biochimie,
et Licence Alimentation Nutrition et Pathologies

Dr. SOUAGUI Samiha (Maître de conférences classe B)



Année universitaire : 2020/2021

Sommaire

Liste des figures

Préface

Chapitre I : Les propriétés des enzymes

I.	Généralités sur les enzymes	1
II.	Définition d'une enzyme (biocatalyseur)	1
III.	Propriétés des enzymes	1
	1) La nature protéique	1
	2) Les conditions de réactions douces.....	2
	3) La spécificité.....	2
	a) <i>Spécificité vis-à-vis du substrat</i>	2
	b) <i>Spécificité vis-à-vis de la réaction</i>	3
	4) <i>La dénaturation</i>	3
IV.	Structure et conformation des enzymes	3
	a) Les enzymes holoprotéiques	4
	b) Les enzymes hétéroprotéiques	4
	c) Les complexes multienzymatiques	5
IV.	Les facteurs de la réaction enzymatique	5
	1) Le substrat.....	5
	2) Le produit.....	5
	3) Le cofacteur	5
	4) L'inhibiteur	5
V.	La notion du site actif	6

Chapitre II : Rappels sur la cinétique chimique

	1) <i>Réactions élémentaires</i>	7
	2) <i>Réactions à multi étapes (complexes)</i>	7
I.	Molécularité et Ordre de la réaction	7
	1) Equation de vitesse et ordre de la réaction	7
	2) Réaction d'ordre zéro.....	8
	➤ <i>Notion de demi-vie ($t_{1/2}$)</i>	9
	3) Réaction d'ordre un (ordre 1)	10
	4) Réaction d'ordre deux (ordre 2).....	11
II.	Recherche (détermination) de l'ordre de la réaction	12
	1) Méthode différentielle de VANT'HOFF	13
	2) Méthode par intégration.....	13
	3) Méthode du temps de demi-réaction.....	13

Chapitre III : Cinétique enzymatique à un seul substrat

I.	Modèle de Michaelis-Menten et ses limites	15
	1) Les différentes phases de la réaction enzymatique.....	16
	2) Notion de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique	17
	I.2.1 Variation de la vitesse initiale.....	17
	I.2.2 Equation de vitesse de Michaelis-Menten	19
	3) la perfection catalytique d'une enzyme	21
II.	Détermination des paramètres cinétiques	22

II.1 Représentations graphiques de l'équation de Michaelis-Menten (M-M).....	22
III. Influence des facteurs physicochimiques sur la réaction enzymatique	24
1) Effet de la température	24
2) Effet du pH	25
3) Effet des effecteurs enzymatiques	26
III.3.1. Les activateurs.....	26
III.3.2. Les inhibiteurs.....	26
IV. Mesure de l'activité enzymatique.....	27

Chapitre IV : Les Inhibiteurs réaction enzymatique

I. L'inhibition réversible	29
I.1 Inhibition compétitive (I.C)	29
a) <i>Le mécanisme réactionnel</i> de l'Inhibition Compétitive (I.C)	31
b) L'équation de vitesse de l'I.C.	32
c) Les représentations graphiques de l'inhibition Compétitive.....	33
d) Détermination graphique de la Constante d'inhibition (K_I) dans le cas d'une I.C).....	34
e) Le paramètre IC_{50}	35
I.2 L'inhibition Incompétitive (I.I.C).....	36
a) Le mécanisme réactionnel de l'inhibition Incompétitive (I.I.C).....	37
b) L'équation de vitesse pour l'I.I.C.	38
c) Représentation Graphiques de l'I.I.C.....	39
d) Détermination graphique de K_I pour l'I.I.C.	40
e) Le paramètre IC_{50} pour l'I.I.C.....	41
I.3 Inhibition non compétitive (I.N.C).....	42
a) Mécanisme réactionnel de l'inhibition Non Compétitive (I.N.C).....	43
b) L'équation de vitesse de l'I.N.C.	45
c) Représentations graphiques de l'I.N.C (Cas de l'I.N.C. pure).....	46
d) Détermination de la constante d'inhibition K_I pour l'I.N.C pure	47
e) Le paramètre IC_{50} pour l'I.N.C.....	48
f) L'inhibition non-compétitive « mixte »	49
g) Détermination de la constante d'inhibition K_I et K_I' pour l'I.N.C mixte	51
II. Les inhibiteurs irréversibles (ou poisons catalytiques).....	52
II.1 Mesure de l'efficacité.....	52
II.1.1 Réactifs du site actif (Marquage par affinité).....	53
II.1.2 Inhibiteurs basés sur le mécanisme (substrats du type « suicide »)	58
II.2 Inhibition par excès de substrat.....	61

Chapitre V : Les enzymes à deux substrats

I. Approche expérimentale	66
II. Mécanisme séquentiel ou à simple déplacement	66
1) Mécanisme Bi-Bi ordonné.....	66
2) Mécanisme Bi-Bi aléatoire (au hasard)	71
III. Mécanisme non séquentiel ou à double déplacement (<i>Ping-Pong</i>).....	80

Références bibliographiques

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
1	Variation de la concentration de réactant en fonction du temps pour une réaction d'ordre zéro.	9
2	Représentations graphique de l'évolution de la concentration de réactant en fonction du temps pour une réaction d'ordre 1.	10
3	Représentations graphique de l'évolution de la concentration de réactant en fonction du temps pour une réaction d'ordre 2.	11
4	vitesse et ordre d'une réaction chimique.	12
5	Tracé $\ln v = f(\ln [A])$.	13
6	Courbe de l'évolution des composés lors d'une réaction enzymatique.	16
7	Variation de la concentration en produit en fonction du Temps.	17
8	Influence de la concentration en enzyme sur : la concentration en produit (a) ; la vitesse de la réaction (b)	18
9	Influence de la concentration croissante du substrat sur : la concentration en produit (a) ; la vitesse de la réaction (b).	18
10	Représentation de Michaelis-Menten montrant la variation de la vitesse en fonction la concentration du substrat $v = f([S])$	22
11	Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Lineweaver et Burk $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$	23
12	Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Eadie-Hofstee $v = f\left(\frac{v}{[S]}\right)$.	23
13	Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Hanes et Wolf (ou de Dixon et Hanes) $\frac{[S]}{v} = f([S])$.	24
14	Effet de la température sur l'activité catalytique d'une enzyme.	25
15	Effet du pH sur l'activité catalytique d'une enzyme.	25
16	Représentation schématique de l'I.C.	29
17	Représentation schématique alternative de l'inhibition compétitive (<i>L'encombrement stérique</i>)	30
18	Représentation schématique alternative de l'I.C (<i>changement de conformation de l'enzyme</i>).	30
19	Réaction catalysée par la succinate déshydrogénase.	31
20	Représentation graphique Michaelis-Menten de l'I.C.	33
21	Représentation graphique de Lineweaver-Burk pour un I.C	34
22	Détermination graphique de la constante d'inhibition K_I pour I.C.	35
23	Représentation schématique et schéma du type Michaelis-Menten de l'inhibition Incompétitive (I.I.C).	36
24	Inhibition de la phosphatase alcaline par la L-phénylalanine (I.I.C)	37
25	Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition incompétitive (I.I.C)	38
26	Représentation graphique du type Lineweaver-Burk pour un I.I.C	40
27	Détermination graphique de K_I pour un inhibiteur Incompétitif (I.I.C)	41
28	L'inhibition de la bisphosphatase de fructose par l'AMP (I.N.C)	43
29	Représentation schématique de l'inhibition non-compétitive (I.N.C)	43
30	Schéma réactionnel de type Michaelis-Menten de l'I.N.C.	44
31	Graphique du type Lineweaver-Burk ($1/v = f(1/[S])$) pour un I.N.C pure	47

32	Détermination graphique de la constante d'inhibition (K_I) pour un I.N.C pure	48
33	Schéma réactionnel de l'inhibition non compétitive mixte	49
34	Représentation Graphique des doubles inverses de l'I.N.C mixte ($K_I < K_I'$)	50
35	Représentation Graphique des doubles inverses de l'I.N.C mixte ($K_I > K_I'$)	50
36	Détermination graphique de K_I' pour un I.N.C mixte	51
37	Détermination graphique de K_I pour un I.N.C mixte	52
38	Schéma réactionnel d'une inhibition irréversible du type marquage par affinité	55
39	Mécanisme d'inactivation par un inhibiteur irréversible du type marquage par affinité	55
40	Schéma du mécanisme réactionnel de l'inhibition par excès de substrat.	62
41	Profil de l'inhibition par excès de substrat	63
42	Représentation des doubles inverses dans le cas d'une inhibition par excès de substrat.	64
43	Détermination de la constante d'inhibition (K_{ss}) pour l'inhibition par excès de substrat	64
44	Représentation Primaire $1/V = f(1/[A])$.	70
45	La représentation graphique secondaire $1/v_A = f(1/[B])$.	70
46	Représentation Primaire : $1/V = f(1/[B])$	71
47	Représentation Primaire : $1/v f(1/[A])$ du mécanisme Bi-Bi aléatoire	76
48	Représentation secondaire $1/v_A f(1/[B])$ du mécanisme Bi-Bi aléatoire	76
49	Représentation primaire $1/v_A f(1/[B])$ du mécanisme Bi-Bi aléatoire	77
50	Représentation Secondaire $1/v_B = f(1/[A])$ du mécanisme Bi-Bi aléatoire.	78
51	Représentation Primaire d'un mécanisme Bi-Bi aléatoire (Fixation indépendante)	79
52	Représentation graphique du mécanisme séquentiel Bi-Bi aléatoire (Fixation dépendante positive)	79
53	Représentation graphique du mécanisme séquentiel Bi-Bi aléatoire (Fixation dépendante négative)	80
54	Représentations primaires $1/v = f(1/[S])$ pour un mécanisme Ping-Pong	84
55	Représentation secondaire $1/v_A f(1/[B])$ d'un mécanisme Ping-Pong	85

Depuis l'Antiquité, les enzymes ont joué un rôle central dans de nombreux processus. Ces dernières décennies ont vu une remarquable expansion de nos connaissances et de notre utilisation de ces biocatalyseurs dans un large éventail de recherches fondamentales et d'applications industrielles et divers procédés industriels basés totalement ou partiellement sur les enzymes ont été mis au point.

L'application des enzymes va de la production d'aliments transformés tels que le pain, le fromage, le jus et la bière, aux produits pharmaceutiques et aux produits chimiques fins, au traitement du cuir et des textiles, comme adjuvants de processus dans les détergents, ainsi qu'à l'ingénierie environnementale. Ces biomolécules sont devenues, de ce fait, des auxiliaires technologiques incontournables et les répercussions sur les plans économique et environnemental ne sont plus à démontrer. En effet, en raison de leurs rôles et de leurs diverses applications technologiques bien caractérisées, les enzymes font l'objet d'études intensives et leurs modalités d'action sont de mieux en mieux connues. Par ailleurs, l'obtention de produits de qualité optimale suppose une bonne maîtrise de l'action de ces enzymes par la connaissance, non seulement de leur structure et fonctionnement, mais aussi de l'influence de certains effecteurs physico-chimiques comme les conditions d'utilisation (température, pH, présence d'interférant...).

Destiné aux étudiants de licences en microbiologie, biotechnologie microbienne, biochimie, alimentation nutrition et pathologies et à toute personne s'intéressant à ce volet de la biochimie, ce polycopié fournit un aperçu plus approfondi des principes fondamentaux de l'enzymologie. Il est axé autour de cinq chapitres.

Après quelques généralités et une définition des enzymes, un aperçu sur les propriétés de ces macromolécules est exposé dans le premier chapitre. Le second chapitre présente quelques rappels sur la cinétique chimique qui doivent être considérés dans l'étude des réactions enzymatiques.

La cinétique enzymatique constitue une part importante de la culture et de la connaissance biochimique que les étudiants en biologie, quelle que soit leur spécialisation, devraient acquérir au cours de leur cursus. Elle a pour objectif d'identifier et de décrire mathématiquement, les mécanismes de réaction en étudiant leur vitesse et les flux métaboliques. Ainsi, le troisième chapitre se veut plus spécifique et concerne la cinétique des enzymes à un seul substrat.

En outre, l'un des domaines les plus passionnants de l'enzymologie moderne est peut-être l'application d'inhibiteurs enzymatiques en tant que médicaments en médecine humaine et vétérinaire. De nombreux médicaments couramment utilisés aujourd'hui fonctionnent en inhibant des enzymes spécifiques. L'aspirine, par exemple, l'un des médicaments les plus largement utilisés dans le monde, obtient son efficacité anti-inflammatoire en agissant comme un inhibiteur de l'enzyme prostaglandine synthase. En effet, le quatrième chapitre de ce polycopié décrit les différents types d'inhibiteurs de la réaction enzymatiques tandis que le dernier chapitre est consacré aux enzymes à doubles substrats.

J'espère que ce polycopié comblera le vide existant dans la littérature en langue française dans l'enzymologie et sera utile pour les étudiants de licence dans tous les domaines de la biologie.

Dr. SOUAGUI S.

Chapitre I

Propriétés des enzymes



L'appréciation des protéines, des phénomènes catalytiques et de la fonction des enzymes ont un grand rôle à jouer dans les progrès de la biologie moderne pour laquelle la compréhension du mécanisme moléculaire des processus biologiques reste un des objectifs majeurs. En particulier, l'étude des réactions enzymatiques qui vise à comprendre les mécanismes réactionnels et à établir de manière quantitative comment une enzyme est capable d'accélérer spécifiquement une réaction chimique.

L'*enzymologie* est donc une discipline essentielle pour décrire et comprendre les réactions catalysées du monde vivant. C'est la partie de la biochimie qui étudie les propriétés structurales, fonctionnelles des enzymes ainsi que *leur cinétique* (décrit la vitesse des réactions enzymatiques).

I. Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des facteurs discrets omniprésents dans la cellule et indispensables à son métabolisme. Ce dernier est constitué par un grand nombre de réactions chimiques, très diverses dont certaines sont des réactions de dégradation de la matière organique (*catabolisme*) et d'autres sont des réactions de biosynthèse (*anabolisme*) et sans la présence de ces catalyseurs, la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui ne serait pas possible. Ces réactions s'effectuent à *des vitesses remarquables* alors qu'elles ont lieu dans des *conditions physiologiques* (*douces et peut favorables : T° douce et pH au voisinage de la neutralité*). Cependant, la présence des enzymes dans la cellule, augmente considérablement la vitesse des réactions et ces biomolécules (*biocatalyseurs*) jouent donc *un rôle vital et fondamental*.

II. Définition d'une enzyme (biocatalyseur)

C'est une substance qui, à faible concentration, modifie la cinétique d'une réaction chimique (augmente la vitesse), sans subir de modifications ni modifier le résultat (produits). *A la fin de la réaction, le biocatalyseur est retrouvé dans son état initial* : même concentration et même structure.

III. Propriétés des enzymes

Les enzymes sont *des macromolécules à haut poids moléculaire* (10 mille à plusieurs millions Da) caractérisées par :

1. **La nature protéique** : À l'exception des *abzymes* (anticorps) et des *ribozymes* (ARN) dotés d'une activité catalytique, toutes les enzymes sont de nature protéique.
2. **Les conditions de réactions douces** : Les enzymes catalysent les réactions



chimiques dans des conditions douces ($T^{\circ} < 100^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} \approx$ neutralité et pression atmosphérique)

3. **La spécificité** : Les biocatalyseurs sont caractérisés par *leur grande efficacité* et leur double *spécificité* (vis-à-vis du substrat et de la réaction). Habituellement, une enzyme catalyse une seule réaction ou un ensemble de réactions étroitement associées. Comparées aux réactions chimiques, les produits secondaires sont rares dans une transformation enzymatique.

a) **Spécificité vis-à-vis du substrat** : Une enzyme agit sur un seul substrat (S) ou un groupe de substrat ayant des particularités structurales communes. Cette spécificité n'est pas absolue, elle peut être large ou étroite. On distingue :

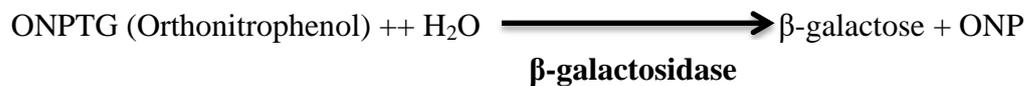
- ✓ **Une spécificité absolue** : lorsqu'une enzyme n'agit que sur un seul (S), elle est dite **hautement spécifique** (ou **de type A**) et reconnaît le (S) mais pas son isomère (stéréospécificité).

Exemple : L'uréase : n'hydrolyse que l'urée.

La fumarase : agit seulement sur l'Acide fumarique mais pas sur son isomère (Acide maléique).

- ✓ **Une spécificité du groupe** : lorsqu'une enzyme agit sur un ensemble de (S) ayant un groupement similaire, elle est dite de **type B**.

Exemple : la **β -galactosidase** : hydrolyse la liaison osidique des molécules β galactosides.



- ✓ **Une Aspécificité** : lorsqu'une enzyme agit sur des (S) autre que le sien mais à des vitesses très lentes, elle est dite **de type C**. Ce type d'enzyme est rare dans la nature.

Exemple : Les carboxypeptidases.

b) **Spécificité vis-à-vis de la réaction**



Pour un (S) donné, une enzyme *ne catalyse qu'une seule réaction* parmi toutes celles qui sont possibles.

Exemple : Sur **un même AA (S)**, plusieurs enzymes auront différentes réactions :



4. La dénaturation : l'activité biologique des protéines est fortement liée à leur conformation. Ainsi, un changement de cette dernière mène à la perte de l'activité catalytique. Cette dénaturation peut être due à divers facteurs :

a) **Chimiques :** tels que l'urée ; le β -mercaptoethanol, sel, le chlorure de guanidium,...etc.

b) **Physiques :** à l'exception des *extrêmozymes*, la T° et le *pH* (la majorité des enzymes sont stables à $6 < \text{pH} < 9$) peuvent dénaturer les protéines.

IV. Structure et conformation des enzymes : comme dans toute protéine on distingue une structure :

- ✓ **Primaire :** correspondante à l'agencement (l'enchaînement) des acides aminés (AAs) liés par une liaison peptidique. Cette structure conditionne le repliement de la protéine lorsque celle-ci se trouve dans sa configuration native.
- ✓ **Secondaire :** qui est la forme adoptée par les AAs dans l'espace (hélice α ou feuillet β).
- ✓ **Tertiaire :** c'est la conformation biologiquement active de la protéine. C'est l'arrangement dans l'espace des structures secondaires. La stabilisation de cette structure se fait par des liaisons faibles (ioniques, hydrophobes) ou covalentes (pont dissulfure).

Remarque : Dans une protéine globulaire, généralement, les chaînes latérales hydrophobes sont repoussées à l'intérieur de la structure et forment le « *Corré hydrophobe* » alors que les résidus polaires hydrophiles forment la surface de la structure.

- ✓ **Quadratique :** c'est l'union de 2 ou plusieurs structures *III^{aires}*. Elle correspond à l'assemblage, par des liaisons faibles de plusieurs sous-unités appelées « *monomères* » ou « *protomère* ». La protéine est dite *homopolymère* (l'hexokinase) lorsque les sous-unités (SU) sont identiques et *hétéropolymères* (l'isocitrate déshydrogénase végétale) lorsque les SU



sont différentes.

Selon la composition des enzymes, Il existe deux grands groupes :

- ✓ Les **Holoenzymes** : enzymes entièrement protéiques.
- ✓ Les **enzymes hétéroprotéiques** : formées d'une partie protéique « *apoenzyme* » et d'une partie non protéique « *cofacteur* ».

1) Les **enzymes holoprotéiques** : Il s'agit de protéines globulaires pouvant être formées :

- ✓ D'une seule chaîne polypeptidique (monomère), qui sont le plus souvent des enzymes secrétées (extracellulaires).
- ✓ De plusieurs chaînes polypeptidiques organisées en *Oligomère* qui sont des polymères formés de 2 à 10 *protomères* (S-U) ; *identiques* ou *différents* (*isoenzymes*). Lorsque les S-U sont identiques, chacune porte 1 site actif et la dissociation de cette enzyme polymérique s'associe souvent d'une perte de l'activité catalytique.

• Les **isoenzymes** sont des enzymes polymériques formées de plusieurs S-U de structures différentes et agissant sur le même (S).

Exemple : Dans le même organisme, la LDH (Lactate déshydrogénase) possède 2 types de protomères (S-U :

- Forme **H** : prédominante dans le cœur (*Heart*)
- Forme **M** : prédominante dans le muscle

Cette enzyme existe sous plusieurs formes tétramériques : H₄, H₃M, H₂M₂, HM₃ et M₄ dans des proportions variables, selon le tissu et l'état normal ou pathologique.

2) Les **enzymes hétéroprotéiques** : Il s'agit des enzymes à *cofacteurs*. Ces derniers correspondent à des groupes non protéiques directement liés à la structure de l'enzyme pour être active. Les cofacteurs sont soit de nature :

- **inorganique** (tels que les ions métalliques) ou
- **organique** : appelé spécifiquement « *coenzymes* » (NAD, FAD, vitamines).

3) Les **complexes multienzymatiques** : c'est l'association de *différentes activités enzymatiques au sein d'une même entité moléculaire*. Il s'agit soit d'un complexe formé de :

- ✓ **plusieurs SU** pouvant avoir chacune un site catalytique spécifique.



- ✓ **Ou de plusieurs enzymes** qui catalysent les réactions d'une même voie métabolique (*enzymes polyfonctionnelles*).

Exemple : la Pyruvate décarboxylase est un complexe comprenant 3 enzymes et 5 cofacteurs.

La Tryptophane synthétase est un complexe comprenant 2 S-U de formule générale $\alpha_2\beta_2$



La 1^{ère} réaction libérant l'Indol est catalysée par les SU α_2 puis les SU β_2 récupèrent l'Indol et l'additionnent à la Serine pour donner le Trp. La somme des 2 réactions forme la réaction globale.

IV. Les facteurs de la réaction enzymatique

- 1) **Le substrat :** C'est une molécule, qui dans une réaction, est définitivement transformée (modifiée) grâce à l'action catalytique d'une enzyme.
- 2) **Le produit :** Ce sont les molécules produites au cours de la réaction enzymatique (résultats de la catalyse).
- 3) **Le cofacteur (*Effecteur positif*):** C'est un *atome* (Mg, Zn, Mn, Fe, ...etc.) ou une *molécule non protéique* (NAD, FAD, Co A) qui interviennent dans la réaction comme *activateurs*. Ces molécules ne sont pas définitivement transformées, elles interviennent pour transformer le substrat (S), recevoir le produit (P) ou comme participant à la réaction.
- 4) **L'inhibiteur (*Effecteur négatif*):** C'est un *atome* ou *molécules* pouvant *inhiber* (*diminuer la vitesse*) la réaction enzymatique. Son action peut se situer sur l'enzyme (E) et/ou sur son substrat (S). Les principaux types d'inhibiteurs sont :
 - ✓ **Irréversibles :** forment des liaisons covalentes avec les AAs du site actif.
 - ✓ **Réversibles :** Se fixent soit sur le site actif par analogie structurale (I.C) soit sur un autre site spécifique (I.N.C) mais bloquent la formation du complexe ES.
 - ✓ **A effet mixtes :** Se fixent sur des sites spécifiques au niveau de l'enzyme et pas d'analogie structurale.
 - ✓ **Inhibition par excès de Substrat (S) :** Mauvaise liaison E-S.
 - ✓



V. La notion du site actif

C'est la *région fonctionnelle* de la molécule qui *accueille le (S)* permettant ainsi sa transformation et c'est la région où s'exerce *l'activité catalytique*. Il présente généralement :

- ✓ *Un site de fixation* : permettant *la reconnaissance du (S)*, son *orientation* et sa *fixation*.
- ✓ *Un site catalytique* : C'est l'ensemble des AAs où *se réalise la catalyse*.

Chapitre II
Rappels sur la cinétique
chimique



La cinétique enzymatique est une branche de la cinétique chimique et, par conséquent, elle obéit aux mêmes lois que cette dernière. Il nous est donc nécessaire de revoir les principes de la cinétique chimique afin de les appliquer ensuite aux réactions enzymatiques.

1) Réactions élémentaires

Une réaction de stœchiométrie $A \longrightarrow P$ peut passer à travers une séquence de réactions élémentaires de type $A \longrightarrow I_1 \longrightarrow I_2 \longrightarrow P$. Où A désigne les substrats, P les produits et I_1 et I_2 symbolisent les intermédiaires de la réaction. La caractérisation des réactions élémentaires décrivant la réaction totale constitue la description du mécanisme réactionnel.

2) Réactions à multi étapes (complexes)

Pour une réaction de type $A \longrightarrow I \longrightarrow P$ où I est un intermédiaire de la réaction, il y a un complexe actif par étape élémentaire réactionnelle. Si une des étapes est très lente, cette étape agit comme embouteillage au point de vue de la réaction globale et **la vitesse de cette réaction élémentaire détermine la vitesse globale.**

I. Molécularité et Ordre de la réaction

La molécularité d'une réaction est le nombre de molécules de réactants (réactifs) impliqués dans une étape élémentaire. En effet, une réaction peut être unimoléculaire qui inclut l'isomérisation des molécules ($A \longrightarrow B$) et la décomposition de celles-ci ($A \longrightarrow B+C$), bimoléculaire incluant deux molécules comme par exemples les réactions d'association ($A+B \longrightarrow AB$, $2A \longrightarrow A_2$), des échanges $A+B \longrightarrow C+D$, $2A \longrightarrow C+D$) ou enfin des réactions trimoléculaires (ou termoléculaires) qui sont rares comme toutes les réactions à molécularité supérieure. Ces réactions peuvent correspondre à la situation suivante : $A+B+C \longrightarrow P$.

Pour des réactions ne comportant qu'une seule étape (élémentaire), **l'ordre de la réaction** est généralement égal à la molécularité. Les réactions chimiques complexes, par contre, n'ont pas d'ordre précis. C'est aussi le cas des réactions enzymatiques, même les plus simples, pour lesquelles l'ordre reste complexe.

Il est important de noter que l'ordre d'une réaction se réfère à l'expression de la vitesse de celle-ci tandis que la molécularité au mécanisme théorique.

I.1 Equation de vitesse et ordre de la réaction

La connaissance de la vitesse d'une réaction chimique est d'une grande importance sur le plan pratique : elle permet de déterminer avec précision le degré d'avancement, la durée et le rendement d'une réaction donnée. Très souvent, la vitesse de la réaction permet aussi



d'obtenir des informations sur le mécanisme cinétique. La vitesse d'une réaction est définie par une variation de concentration en molécules de réactant ou de produit par unité de temps.

À température constante, les vitesses des réactions élémentaires varient avec la concentration de façon simple. Mettons



La vitesse de ce processus est proportionnelle à la fréquence à laquelle les molécules réactives entrent en collision (se rencontrent simultanément) et qui est représentée par les produits des concentrations des réactifs. Ceci s'exprime par l'équation de vitesse suivante :

$v = k [\mathbf{A}]^a [\mathbf{B}]^b \dots [\mathbf{Z}]^z$ où k est une constante de proportionnalité et est identifiée comme constante de vitesse.

L'ordre de la réaction est défini par $(a + b + \dots + z)$, la somme des exposants.

Exemple : Dans une réaction du type : $\mathbf{A} + 3\mathbf{B} \longrightarrow 2\mathbf{C}$

La vitesse de cette réaction est exprimée comme suit : $v = \frac{-d[\mathbf{A}]}{dt} = \frac{-1}{3} \frac{d[\mathbf{B}]}{dt} = \frac{1}{2} \frac{d[\mathbf{C}]}{dt}$

Il est admis que la vitesse de cette réaction est proportionnelle à la quantité de réactant présent élevée à la puissance n : $v = k[\mathbf{A}]^n$. Où n étant l'ordre de la réaction et k la constante de vitesse de cette réaction.

Donc l'expression de la vitesse instantanée (ou *vélocité*) de la réaction est :

$$v = \frac{-d[\mathbf{A}]}{dt} = k[\mathbf{A}]^n.$$

L'ordre d'une réaction est déterminé expérimentalement en mesurant la variation de la concentration de l'un des réactants ou celle des produits en fonction du temps ; autrement dit, la vitesse instantanée de la réaction. Soit ;

$$v = \frac{-d[\mathbf{A}]}{dt} = + \frac{d[\mathbf{P}]}{dt} = k[\mathbf{A}]^n$$

L'intégration des équations différentielles décrivant la variation de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration des réactants est très utile dans la détermination de la constante de vitesse et de l'ordre des réactions.

I.2 Réaction d'ordre zéro

Soit une réaction élémentaire d'ordre zéro par rapport à (A): $\mathbf{A} \longrightarrow \mathbf{P}$

Ici, la vitesse de réaction ne dépend pas des concentrations des produits intervenant dans la réaction :

$$v = \frac{-d[\mathbf{A}]}{dt} = + \frac{d[\mathbf{P}]}{dt} = k_0[\mathbf{A}]^0$$



Comme $[A]^0 = 1$, la vitesse *est indépendante de la concentration des réactants et produits*)

$$v = k_0$$

L'intégration de l'équation : $v = \frac{-d[A]}{dt} = k_0[A]^0$ entre le temps ($t=0$) où la concentration initiale est $[A]_0$ et un temps quelconque (t) correspondant à la concentration $[A]_t$ est :

$$\int_{[A]_0}^{[A]_t} d[A] = -k_0 \int_0^t dt$$

Ce qui donne après intégration : $[A]_t = -k_0 t + [A]_0$

La concentration des réactifs diminue linéairement en fonction du temps, et évidemment celle des produits augmente linéairement en fonction du temps. Une représentation de $[A] = f(t)$ est une droite de pente ($-k$) (**Fig. 1**).

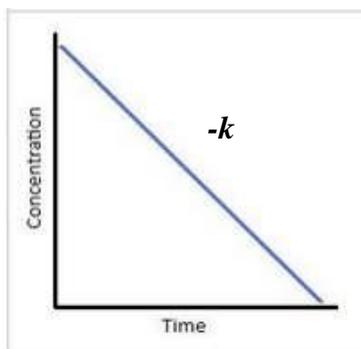


Figure 1 : Variation de la concentration de réactant en fonction du temps pour une réaction d'ordre zéro.

k est exprimée en ($M. s^{-1}$).

➤ *Notion de demi-vie* ($t_{1/2}$)

La demi-vie (ou la période) d'une réaction chimique correspond au temps- noté $t_{1/2}$ - pour lequel la concentration du ou des réactant (s) est égale à la moitié de la concentration initiale. Autrement dit, c'est le temps au bout duquel la moitié du réactif a disparu (transformé), soit :

$$\text{A } t_{1/2}, \text{ on a } [A] = [A]_0 - \frac{[A]_0}{2} = \frac{[A]_0}{2}$$

En remplaçant dans la loi cinétique d'une réaction à ordre zéro on trouve on trouve :

$$[A]_{t_{1/2}} = -k_0 t_{1/2} + [A]_0$$

Et comme $[A]_{t_{1/2}} = \frac{[A]_0}{2}$, le temps de demi-vie est : $t_{1/2} = \frac{0.5 [A]_0}{k}$

I.3 Réaction d'ordre un (ordre 1)

Soit la réaction $A \longrightarrow P$, une réaction irréversible pour laquelle (A) est transformé en (P). Celle-ci représente une réaction **de premier ordre ou unimoléculaire**.



$$\text{Ici, on a : } v = \frac{-d[A]}{dt} = + \frac{d[P]}{dt} = k_1[A]^1$$

Après intégration, entre $[A]_0$ pour t_0 et $[A]_t$ pour t , on aura :

$$\int_{[A]_0}^{[A]_t} \frac{d[A]}{[A]} = -k_1 \int_{t_0}^t dt.$$

L'intégrale de $\frac{d[A]}{[A]}$ correspond à $\ln [A]$ dont la constante au temps zéro est $\ln [A]_0$, ce qui conduit à :

$$\ln \frac{[A]_t}{[A]_0} = -k_1 t \text{ ou aussi } [A] = [A]_0 e^{-k_1 t}$$

Soit

$$\ln [A]_t = \ln [A]_0 - k_1 t$$

Si la réaction est biomoléculaire de type : $A + B \longrightarrow P$ on obtient :

$$v = \frac{-d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = k_1[A][B]$$

k_1 est la constante de vitesse d'ordre 1 (s⁻¹).

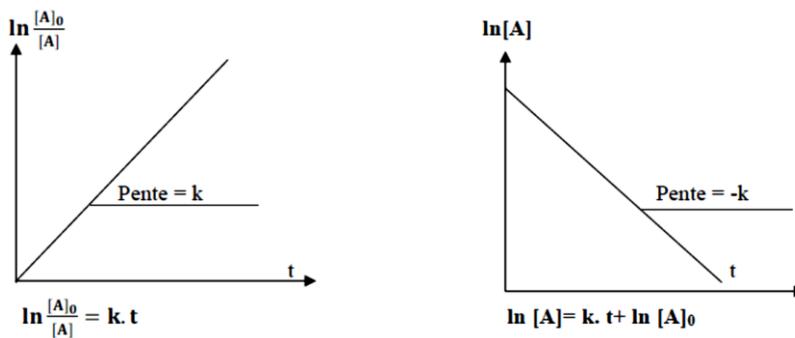


Figure 2 : Représentations graphique de l'évolution de la concentration de réactant en fonction du temps pour une réaction d'ordre 1.

➤ *Temps de demi-vie pour une réaction d'ordre 1*

$$\text{Quand } [A] = \frac{[A]_0}{2}, \quad \ln \frac{[A]_0}{\frac{[A]_0}{2}} = -k_1 t$$

$$\text{Donc } t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1} = \frac{0.693}{k_1}$$

Montrant que la **demi-vie**, $t_{1/2}$, d'une réaction unimoléculaire est indépendante de la concentration initiale en substrat.

Exemple: $\text{saccharose} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{glucose} + \text{fructose}$

$$V = k [\text{saccharose}] [\text{H}_2\text{O}] = k_1 [\text{saccharose}]$$

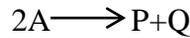


I.4 Réaction d'ordre deux (ordre 2)

Une réaction de **deuxième ordre** ou **biomoléculaire** peut s'écrire sous forme :



Ou alors sous sa forme la plus simple lorsque les molécules régissantes sont identiques :



La vitesse de ces réactions est proportionnelle au produit des concentrations des deux réactifs ou au carré de la concentration d'un seul réactif.

La vitesse correspondante à ce mécanisme est :

$$v = \frac{-d[A]}{dt} = k_2[A]^2$$

L'intégration entre $[A]_0$ pour t_0 et $[A]_t$ pour t conduit à :

$$\int_{A_0}^A \frac{d[A]}{[A]^2} = -k_2 \int_{t_0}^t dt.$$

D'où :

$$\frac{1}{[A]_t} = \frac{1}{[A]_0} + k_2 t$$

Ou alors : $\frac{1}{A_0 - B_0} \ln \frac{[B_0][A]}{[A_0][B]} = k_2 t$ (quand les deux molécules réactantes sont différentes).

Le tracé $\frac{1}{[A]_t} = f(t)$ permet d'obtenir une droite de pente positive égale à k .

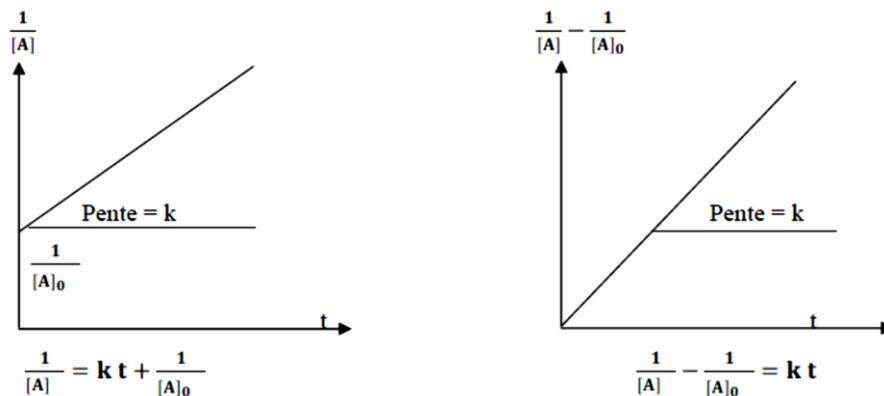


Figure 3 : Représentations graphique de l'évolution de la concentration de réactant en fonction du temps pour une réaction d'ordre 2.

➤ Temps de demi-vie ($t_{1/2}$) pour une réaction d'ordre 2

Quand $[A] = \frac{[A]_0}{2}$, pour une réaction deuxième ordre,

La demi-vie $t_{1/2} = \frac{1}{[A]_0 k_2}$, dépend de la concentration initiale

Ceci est caractéristique de n'importe quelle réaction biomoléculaire.

NB : À noter que les constantes de vitesse (k) possèdent des unités différentes selon l'ordre de

la réaction. Puisque la vitesse s'exprime en $M.s^{-1}$,

- Pour une réaction d'ordre 0 ; k_0 est exprimée en $M.s^{-1}$
- Pour une réaction d'ordre 1 ; k_1 est exprimée en s^{-1}
- Pour une réaction d'ordre 2 ; k_2 est exprimée en $M^{-1}s^{-1}$.

Figure récapitulant la notion de la vitesse et de l'ordre de la réaction.

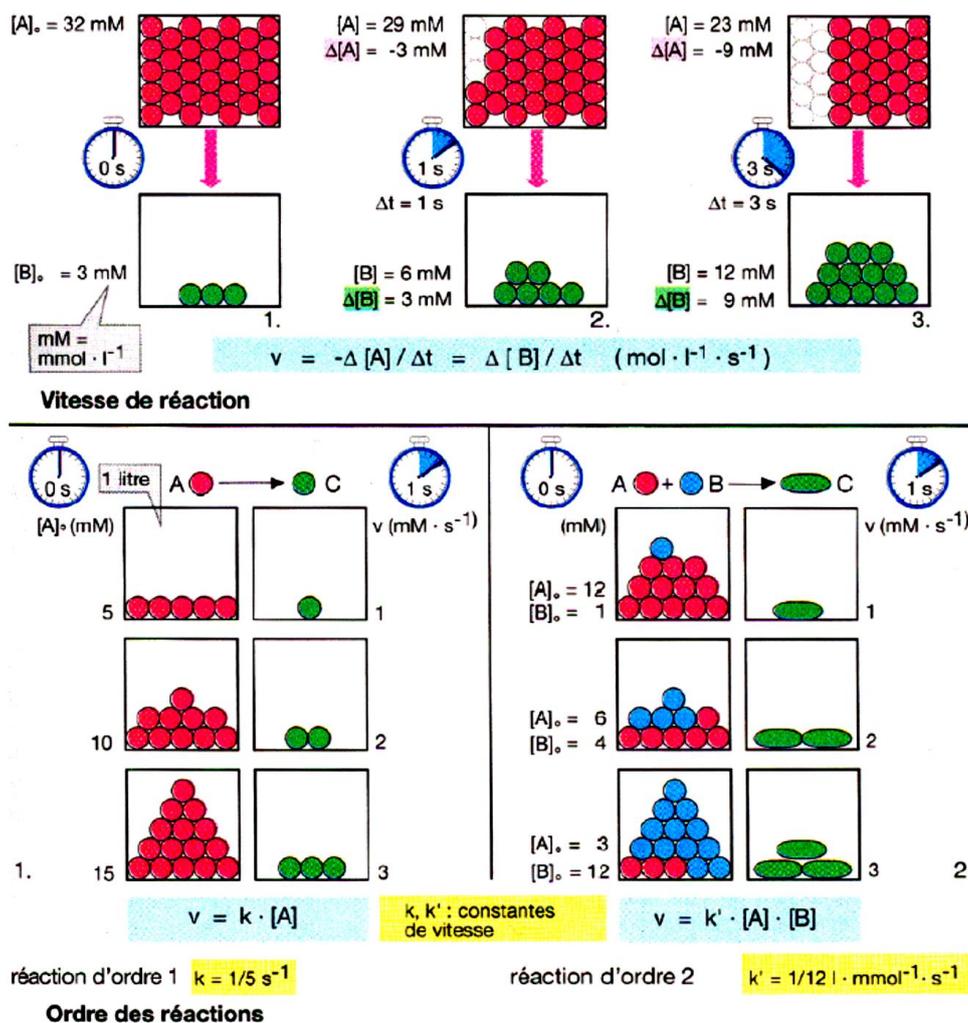


Figure 4 : vitesse et ordre d'une réaction chimique.

II. Recherche (détermination) de l'ordre de la réaction

La détermination de l'ordre d'une réaction s'effectue par la mesure des vitesses initiales obtenues à différentes concentrations de réactants. Il y a plusieurs méthodes pour procéder dont les plus importantes sont :

- La méthode différentielle
- La méthode par intégration
- La méthode du temps de demi-réaction ($t_{1/2}$).



II.1 Méthode différentielle de VANT'HOFF

Pour une réaction du type $A \longrightarrow P$ d'ordre n (à déterminer) :

$$\text{On a : } v = k [A]^n$$

$$\text{D'où : } \ln v = n \ln[A] + \ln k \text{ ou bien } \log v = n \log[A] + \log k$$

Le tracé $\ln v = f(\ln [A])$ (ou bien $\log v = f(\log [A])$) est une droite du type $y = a x + b$ (Fig. 5)

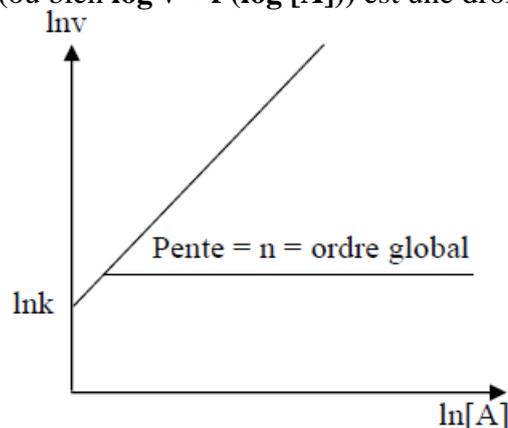


Figure 5 : Tracé $\ln v = f(\ln [A])$.

II.2 Méthode par intégration

Dans ce cas, on étudie la variation de la concentration en fonction du temps pour des valeurs hypothétiques de l'ordre.

$$n = 0 \quad [A] = f(t) \rightarrow [A] = -k t + [A]_0$$

$$n = 1 \quad \ln[A] = f(t) \rightarrow \ln \frac{[A]_0}{[A]} = k \cdot t$$

$$n = 2 \quad [A]^{-1} = f(t) \rightarrow \frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = k t$$

Si l'une des représentations donne une droite (fonction linéaire) alors on aura déterminé l'ordre de la réaction.

II.3 Méthode du temps de demi-réaction

➤ Première méthode

Cette méthode consiste à supposer l'ordre ensuite calculer le $t_{1/2}$ théorique et le comparer avec le $t_{1/2}$ expérimental.

$$n = 0 : [A] = -k t + [A]_0 \rightarrow t_{1/2} = \frac{[A]_0}{2k}$$

$$n = 1 : \ln \frac{[A]_0}{[A]} = k t \rightarrow t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

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



➤ *Deuxième méthode*

D'une manière générale, il a été établi que pour une réaction d'ordre n :

$$[A]_0^{1-n} \text{ cste} = k t_{1/2} \dots\dots\dots(1)$$

Une autre expérience réalisée à la même température avec une concentration initiale $[A]_0'$:

$$[A]_0'^{1-n} \text{ cste} = k t'_{1/2} \dots\dots\dots(2)$$

Donc en divisant (2)/(1) on obtient :

$$\frac{t'_{1/2}}{t_{1/2}} = \left(\frac{[A]_0'}{[A]_0} \right)^{1-n}$$

Chapitre III

Cinétique enzymatique à un seul substrat



Les réactions chimiques de la vie sont sous la dépendance des enzymes. Ces catalyseurs remarquables sont tous très spécifiques pour des réactions données. Dans l'ensemble, cependant, les enzymes sont très versatiles, dans la mesure où les quelques milliers d'enzymes actuellement connues catalysent des réactions aussi diverses que : hydrolyses, polymérisation, transfert de groupement fonctionnels, oxydoréduction, déshydratation, et isomérisation, pour ne citer que les types de réactions les plus courantes catalysées par les enzymes.

Depuis leur découverte, les enzymes ont constitué un centre d'intérêt très convoité par les biochimistes mais aussi par les chimistes pour essayer de comprendre comment les enzymes peuvent catalyser et accélérer les réactions cellulaires. Grâce au modèle proposé par Michaelis-Menten qui a le mérite de s'appliquer à un grand nombre de mécanismes enzymatiques, il est possible de déterminer, en fonction du substrat, les paramètres cinétiques propres à chaque enzyme et d'en tirer des informations très utiles.

Ces macromolécules ne sont pas des surfaces passives sur lesquelles se déroulent les réactions, mais plutôt des machines moléculaires qui mettent en œuvre des mécanismes très variés. Par exemple, certaines enzymes n'agissent que sur des réactions à un seul substrat, d'autres catalysent des réactions à deux substrats différents dont l'ordre de liaison peut être imposé ou indifférent. Certaines enzymes forment des liaisons covalentes avec des complexes intermédiaires de leur substrats alors que d'autres n'en font pas.

Les mesures de cinétiques des réactions enzymatiques sont parmi les moyens d'approche les plus performants pour élucider les mécanismes catalytiques des enzymes. Dans ce chapitre en tant qu'outil pour étudier les mécanismes enzymatiques, nous commencerons par exposer la théorie de base de la cinétique enzymatique. Cette dernière est l'étude *des vitesses de réactions et de leurs modifications*, en réponse aux changements *des conditions expérimentales*.

I. Modèle de Michaelis-Menten et ses limites

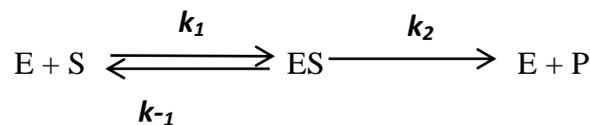
Michaelis et Menten ont étudié l'effet de la concentration de substrat (saccharose) ou de la concentration d'enzyme (invertase) sur la vitesse de la réaction. En se positionnant au début de la réaction, ils ont obtenus des courbes typiques d'une cinétique enzymatique.

Le modèle de Michaelis-Menten (M-M ou de Michaelis-Menten-Henri), sert généralement de base aux études cinétiques des enzymes non allostériques en milieu homogène. Il permet de décrire la cinétique d'une réaction catalysée ; aussi bien par les



enzymes agissant sur un seul substrat que par certaines enzymes a deux substrats. Ce modèle relie la vitesse de la réaction à la concentration de substrat et à des paramètres constants, caractéristiques de l'enzyme. Il est adapté à de nombreuses enzymes, mais ne permet cependant pas de rendre compte de comportements complexes, comme la multiplicité des substrats ou l'existence de plusieurs sites actifs présentant des comportements coopératifs ou anti-coopératifs (allostérie).

Le schéma réactionnel de ce modèle impose une restriction, il comprend deux étapes dont la première est rapide et réversible (caractérisée par la formation d'un complexe ES entre l'enzyme et le substrat), et la seconde lente et irréversible (correspond à la dissociation de ES pour régénérer l'enzyme et donner le produit P).



Où **S** : c'est le substrat de la réaction

E : Enzyme

ES : le complexe Enzyme-Substrat

P : le produit de la réaction

k_1 : la constante de vitesse de formation du complexe ES ; k_{-1} : la constante de la vitesse de dissociation du complexe ES et k_2 : la constante de la vitesse de formation du produit (elle est aussi appelée la *constante catalytique* (*k_{cat}*), activité moléculaire ou Turn Over number).

I.1. Les différentes phases de la réaction enzymatique

Globalement, la réaction enzymatique est scindée en trois phases (**Fig. 6**).

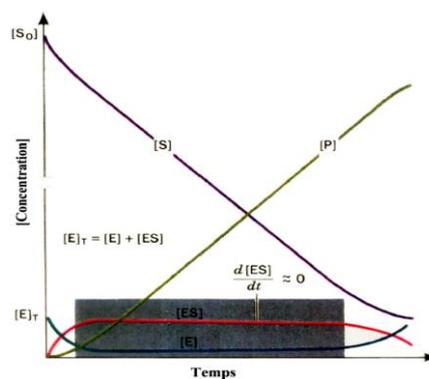


Figure 6 : Courbe de l'évolution des composés lors d'une réaction enzymatique.

Nous distinguons ainsi une :

- a) **Phase Pré-stationnaire** : En cette étape l'enzyme mise en présence d'excès de substrat et la combinaison (ES) est très rapide.



b) **Phase Stationnaire** : C'est l'étape caractéristique de la réaction. En cette phase :

- l'Enzyme (E) est saturée par le substrat (S) ;
- la Combinaison (ES) est à concentration maximale Constante $\frac{d[ES]}{dt} = 0$;
- la Vitesse de la réaction est constante: Vitesse initiale (v_i demeure constante tant que le substrat est à concentration saturante de l'enzyme).

c) **Phase Post stationnaire** : Ici, il y a une diminution de [S] de manière significative au bout d'un temps plus au moins long selon l'enzyme.

I.2. Notion de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique

Elle correspond au début de la réaction, quand peu de (S) est transformé, sa concentration est connue ($[S] \approx [S]_0$), l'enzyme (E) est sous sa forme native (la liaison ES est optimale) et la conversion de (P) en (S) est négligeable (presque pas d'accumulation de P au début de la réaction). Dans les conditions optimales, la vitesse de la réaction s'exprime par:

- La quantité de substrat métabolisé par unité de temps : $v = \frac{-d[S]}{dt}$
- ou par la quantité de produit formé par unité de temps $v = \frac{d[P]}{dt}$

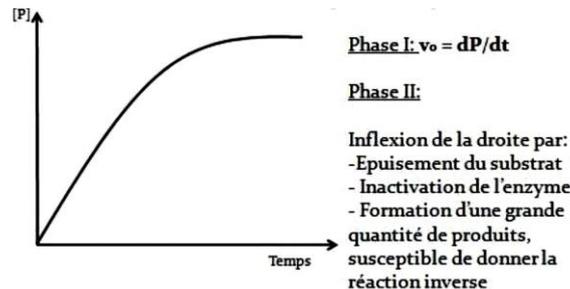


Figure 7 : Variation de la concentration en produit en fonction du Temps.

Il est indispensable

- ✓ D'étudier la vitesse initiale de réaction dans les conditions où la : $[S] \gg \gg [E]$
- ✓ Si le temps de la réaction est très court, la modification de [S] est négligeable, et [S] peut être considérée comme constante.

I.2.1 Variation de la vitesse initiale

a) **Effet de la concentration d'enzyme** : $v_i = f([E])$

En variant la concentration en enzyme pour une concentration constante de substrat (fixe), la formation de produit en fonction du temps (v_i) reste linéaire (Fig. 8), plus il y a d'enzyme, plus la réaction est rapide. Si la concentration en enzyme est exprimée en mg/L, on parle d'activité spécifique de l'enzyme. La cinétique est d'ordre 1 par rapport à l'enzyme: $v_i = k[E]$

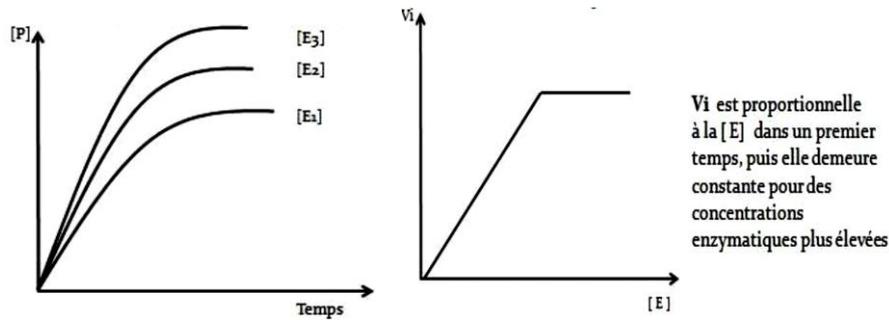


Figure 8: Influence de la concentration croissante en enzyme sur : la concentration en produit (a) ; la vitesse de la réaction (b).

b) Effet de la concentration du substrat : $v_i = f([S])$

En variant la concentration en substrat pour une concentration fixe en enzyme, la vitesse initiale augmente de façon parabolique quand la concentration initiale en substrat augmente (Fig. 9).

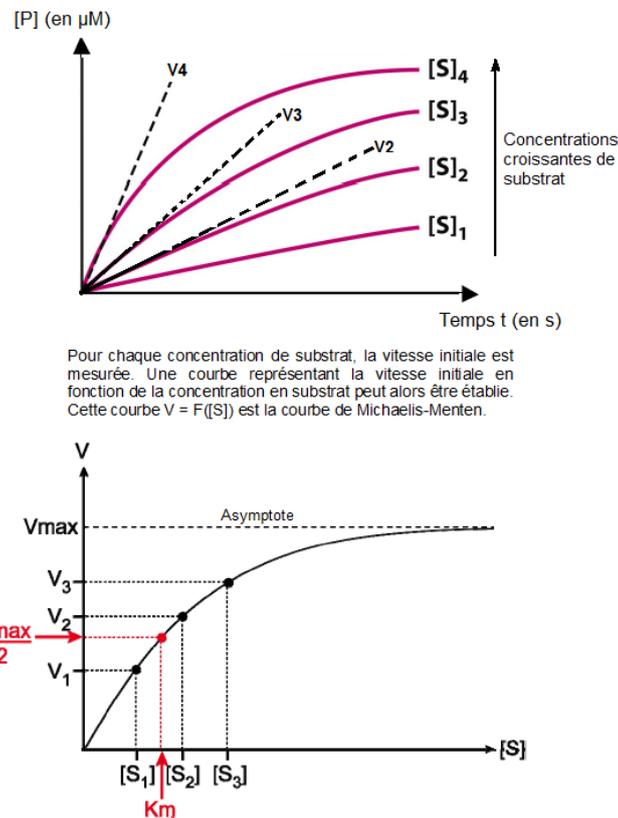


Figure 9 : Influence de la concentration croissante du substrat sur : la concentration en produit (a) ; la vitesse de la réaction (b).

La représentation $v_i = f([S])$ a une allure hyperbolique et

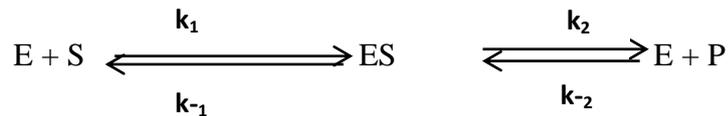
- A de Faibles quantités de S: la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en substrat: Réaction d'ordre 1.
- Quand [S]augmente ([S] est saturante) : l'enzyme est en pleine activité et tous les sites actifs sont saturés. La vitesse de la réaction est indépendante de la concentration en



substrat: Réaction *d'ordre 0*. En effet, en pratique, la détermination d'une activité enzymatique se fait lorsque [S] est saturante (en excès)

1.2.2 Equation de vitesse de Michaelis-Menten

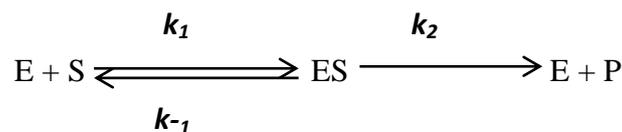
L'étude mathématique de la cinétique enzymatique découle du schéma réactionnel d'Henri-Michaelis-Menten selon lequel l'activité catalytique est liée à la formation d'un complexe (ES) spécifique et transitoire.



Avec k_1 ; k_{-1} ; k_2 et k_{-2} sont les constantes de vitesse des réactions. L'analyse de Michaelis-Menten se fait en considérant ces réactions comme des réactions d'ordre 1 et sous deux hypothèses simplificatrices :

- **Hypothèse de la vitesse initiale** : on se place dans des conditions initiales où il n'y a pas de produit (P). La catalyse est alors très déplacée dans le sens de la synthèse des produits, la réaction inverse dont la vitesse est $k_{-2}[E][P]$ est alors pratiquement inexistante, puisque $[P] \approx 0$.
- **Hypothèse de l'état stationnaire** : on suppose que le premier équilibre dans l'équation ci-dessus, dépendant des constantes cinétiques k_1 et k_{-1} est très rapide devant l'étape de catalyse proprement dite, déterminée par k_2 , qui est en général limitante. Ceci revient à dire qu'à tout instant on a: $\frac{d[ES]}{dt} = 0$.

Le système se simplifie alors de la manière suivante :



Selon ce système :

- la vitesse de formation du complexe (ES) est $v = k_1 [E][S]$;
- la vitesse de disparition (d'élimination) du complexe (ES) est $v = (k_{-1} + k_2) [ES]$;
- pendant la phase stationnaire, la concentration du complexe enzyme-substrat [ES] est constante ($\frac{d[ES]}{dt} = 0$).

Donc la vitesse de formation de ce complexe [ES] doit être égale à celle de dissociation :

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

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

Dans le cas où $k_{-1} \gg k_2$, l'expression (1) se simplifie à K_s (puisque k_2 est négligeable



devant k_{-1} :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1})}{k_1} = k_s$$

k_s : est la constante de dissociation du complexe (ES).

Par ailleurs, l'enzyme totale est présente sous deux formes, libre (E_{libre}) et complexée (ES)

donc : $[E]_T = [E]_{\text{libre}} + [ES]$

D'où $[E]_{\text{libre}} = [E]_T - [ES]$

En remplaçant [E] par sa valeur ($[E]_T - [ES]$) dans l'équation (1) on aura :

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

Après réarrangement et simplification, l'expression devient :

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

En divisant sur (k_1) on obtient

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

D'où

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (2)$$

➤ La constante de Michaelis

Le rapport des constantes k_1 ; k_{-1} et k_2 est aussi *une constante*, elle correspond à la dissociation du complexe (ES). Cette dernière est définie *comme la constante de Michaelis* :

K_m .

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

Cette constante a la dimension d'une concentration et s'exprime en molarité (M : mol/ L⁻¹).

Ainsi l'équation (2) devient :

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

Or

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES]$$

D'où

$$v = k_2 \frac{[E]_T [S]}{K_m + [S]}$$

$$v = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

➤ La vitesse maximale (V_{max})

Cette valeur est obtenue pour des fortes concentrations en (S), lorsque l'enzyme *est saturée* (se trouve entièrement sous forme ES).

Donc : $V_{\text{max}} = k_2 [E]_T$

Ainsi l'équation (3) sera :



$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{L'équation de Michaelis-Menten})$$

C'est l'équation de base de la cinétique enzymatique

➤ **Signification de K_m**

La constante de Michaelis se définit simplement pour la concentration en substrat quand la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale.

Elle représente l'affinité d'une enzyme (E) vis-à-vis d'un substrat (S). En effet, si une enzyme a un K_m faible, il suffit d'une faible concentration de substrat pour que la vitesse maximale soit atteinte (l'enzyme a une affinité élevée pour son substrat et une forte efficacité catalytique). Au contraire si la constante de Michaelis a une valeur importante, c'est que l'enzyme a une faible affinité pour son substrat.

La valeur de K_m est très variable, car elle dépend de :

- la nature de l'enzyme ;
- la nature du substrat ;
- et du pH et de la température (T°).

Elle peut également s'exprimer comme suit :

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

Nous constatons que d'après cette expression K_m dépend essentiellement de K_s (ou K_D étant le complexe de dissociation du complexe ES).

Donc quand $k_2 < k_{-1}$ (c'est-à-dire, que $\frac{k_2}{k_1} \ll k_s$), K_m permet d'exprimer l'affinité d'une enzyme vis-à-vis d'un substrat.

1.3 la perfection catalytique d'une enzyme

Nous pouvons définir la constante catalytique d'une enzyme qui correspond à $\frac{k_{cat}}{K_m}$ qui permet d'évaluer l'efficacité catalytique d'une enzyme. En se basant sur cette valeur, on peut comparer et classer différentes enzymes. La limite requière de ce rapport est la constante k_1 qui a pour limite la vitesse de diffusion de (S) dans le milieu réactionnel (fréquence à laquelle les molécules d'enzyme et de substrat se rencontrent en solution) est de l'ordre de 10^8 à 10^9 M^{-1}/s . Les enzymes dont le rapport $\frac{k_{cat}}{K_m}$ se rapproche de cette valeur sont dites à perfection catalytique.



II. Détermination des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques pour l'équation de Michaelis-Menten (M-M) sont : K_m et V_{max} . Il existe plusieurs moyens de les déterminer. Notons que pour des $[S]$ très élevées, la vitesse initiale de la réaction (v_i) est très proche de la vitesse maximale de celle-ci (V_{max}). Cependant, il est pratiquement très difficile de mesurer V_{max} avec précision d'après le tracé directe $v_i = f([S])$. Dans l'équation :

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \text{ Et à } [S] = 10 K_m$$

La vitesse initiale (v_i) n'est égale qu'à 91% de la vitesse maximale (V_{max}) :

- A $[S] = 10 K_m$: $v = \frac{V_{max} 10 K_m}{K_m + 10 K_m} = \frac{10}{11} V_{max}$

D'où $v \approx 0,91 V_{max}$

Donc la valeur obtenue par extrapolation sur le graphique $v_i = f([S])$ sera sous-estimée.

II.1 Représentations graphiques de l'équation de Michaelis-Menten (M-M)

Différentes représentations graphiques sont possibles pour l'équation de M-M dont les plus importantes sont :

II.1.1 La représentation $v = f([S])$

La courbe qui traduit les variations de (v) en fonction de $[S]$ selon cette équation est une branche d'hyperbole équilatère qui tend asymptotiquement vers V_{max} (**Fig. 10**)

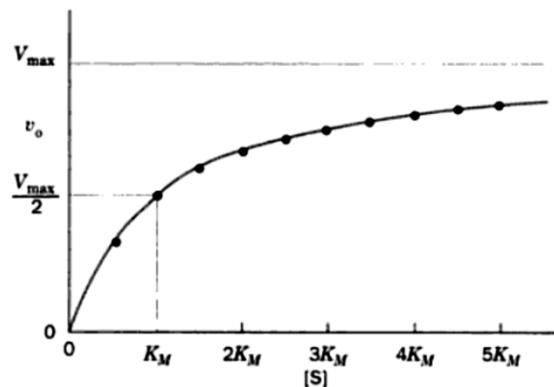


Figure 10 : Représentation de Michaelis-Menten montrant la variation de la vitesse en fonction la concentration du substrat $v = f([S])$.

II.1.2 Les représentations linéaires de l'équations de M-M

La nature hyperbolique de la relation de M-M nécessite le recours à différentes régressions linéaires standards permettant la détermination avec précision de K_m et de V_{max} (ou V_m) à partir des vitesses obtenues en variant les concentrations de (S).

a) Représentation de Lineweaver-Burk (doubles réciproques ou doubles inverses) : $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$

C'est la représentation la plus utilisée pour linéariser l'équation de M-M. A partir de celle-ci



l'inverse de la vitesse peut s'écrire :

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

En portant $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$, une droite du type $y = ax + b$, de pente (a) $\frac{K_m}{V_{max}}$ et d'ordonnée à l'origine (b) $\frac{1}{V_{max}}$ est obtenue (Fig. 11).

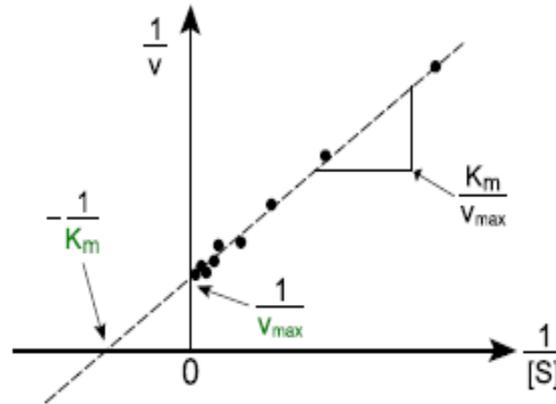


Figure 11 : Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Lineweaver et Burk

$$\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$$

L'intérêt de cette représentation est de fournir directement, par extrapolation de la droite obtenue, les paramètres cinétiques V_{max} et K_m . En effet, pour :

$$\frac{1}{[S]} = 0 \text{ (C'est-à-dire } [S] \text{ est infini), } \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}$$

$$\text{Et pour } \frac{1}{v} = 0, \frac{1}{[S]} = \frac{-1}{K_m}$$

b) Représentation d'Eadie-Hofstee : $v = f\left(\frac{v}{[S]}\right)$

C'est le tracé de v en fonction de $\left(\frac{v}{[S]}\right)$ qui correspond à une droite de pente $(-K_m)$ et d'ordonnée à l'origine V_{max} (Fig. 12)

$$V_m = \frac{V[[S] + K_m]}{[S]_0} = V + \frac{V}{[S]} K_m$$

$$V = V_m - K_m \frac{V}{[S]_0}$$

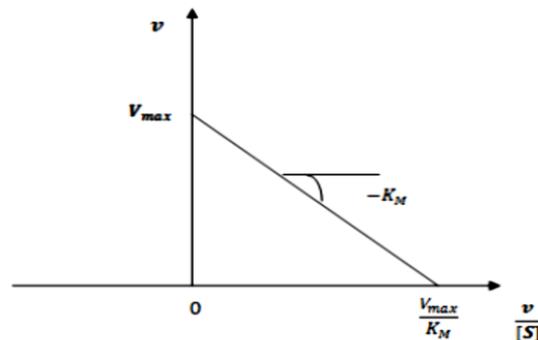


Figure 12 : Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Eadie-Hofstee $v = f\left(\frac{v}{[S]}\right)$.



c) Représentation de Hanes et Wolf (ou de Dixon et Hanes) $\frac{[S]}{v} = f([S])$

En multipliant par $[S]$ les deux membres de l'équation de $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$, on aura :

$$\frac{[S]}{v} = \left(\frac{1}{V_{max}} \right) [S] + \frac{K_m}{V_{max}}$$

C'est le tracé de $\left(\frac{[S]}{v} \right)$ en fonction de $[S]$ qui correspond à une droite de pente $\left(\frac{1}{V_{max}} \right)$ et d'ordonnée à l'origine $\frac{K_m}{V_{max}}$ (Fig. 13)

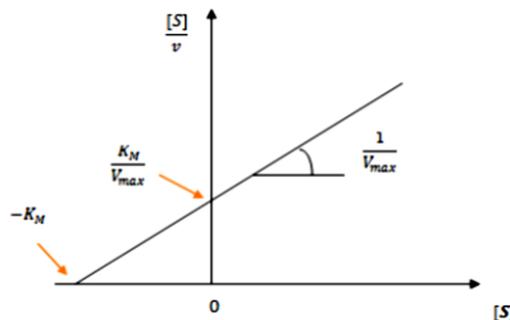


Figure 13 : Représentation linéaire de la cinétique enzymatique selon Hanes et Wolf (ou de Dixon et Hanes) $\frac{[S]}{v} = f([S])$.

III. Influence des facteurs physicochimiques sur la réaction enzymatique

Les réactions enzymatiques sont influencées par divers facteurs comme la température (T°), le pH, la force ionique, la pression, etc. Expérimentalement l'absence de contrôle de ces paramètres peut amener des erreurs et des résultats non reproductibles.

III.1. Effet de la température

Généralement la vitesse d'une réaction double lorsque la température (T°) augmente de 10°C . Les catalyseurs chimiques comme les enzymes ne font pas exception à cette règle. Toutefois, une enzyme comme toute macromolécule peut être dénaturée par une température élevée et perdre son activité catalytique (partiellement ou complètement). En effet, l'augmentation et la diminution de l'efficacité catalytique d'une enzyme résulte de deux phénomènes différents, visibles lors du tracé de l'activité en fonction de la température (Fig. 14).

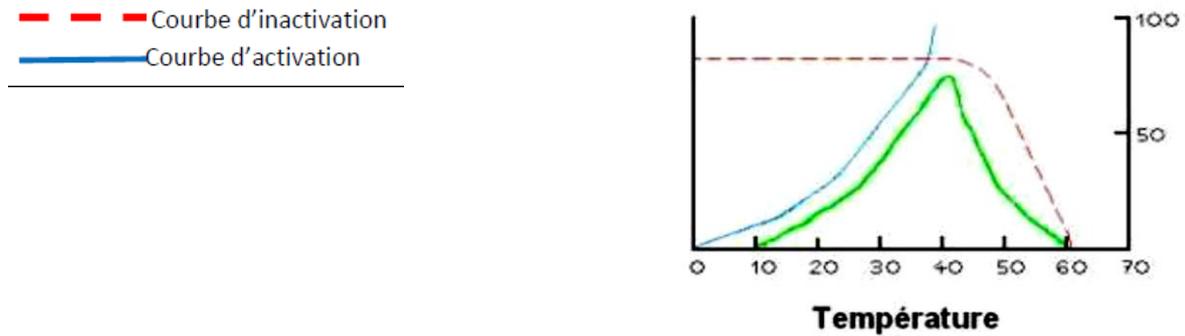


Figure 14 : Effet de la température sur l'activité catalytique d'une enzyme.

Deux effets de la température sur la réaction enzymatique sont distingués:

✓ *Activation de la catalyse par une basse température* : ici, la T° accélère la réaction en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation.

✓ *Diminution de l'activité catalytique à une température élevée* : à fortes températures la protéine se dénature et perd donc son activité enzymatique.

L'activité enzymatique augmente jusqu'à une température optimale (varie d'une enzyme à un autre.) puis diminue pour atteindre une activité nulle à des températures élevées (enzyme dénaturée).

III.2. Effet du pH

Le pH du milieu réactionnel influence de manière très importante l'activité catalytique des enzymes. Dans la plupart des cas, la courbe de l'activité par rapport au pH montre un profil en forme de cloche (**Fig. 15**).

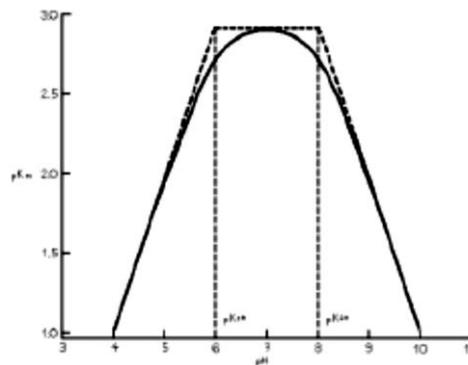


Figure 15 : Effet du pH sur l'activité catalytique d'une enzyme.

Nous constatons d'après cette courbe que la diminution de l'activité catalytique de part et d'autre du pH optimal résulte de plusieurs effets :

✓ Le pH peut affecter la stabilité de l'enzyme, celle-ci peut, dans certains cas, être inactivée irréversiblement. En effet, aux valeurs extrêmes, le pH dénature l'enzyme en modifiant l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés (des groupements fonctionnels).



- ✓ Le pH peut affecter les paramètres cinétiques de l'enzyme en modifiant les états d'ionisation du substrat et/ou ceux de l'enzyme. Ainsi la formation du complexe enzyme-substrat (ES) est influencée en modifiant l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés du site actif et du substrat.

III.3. Effet des effecteurs enzymatiques

L'activité des enzymes peut être contrôlée par des agents modulateurs, ou effecteurs qui sont des substances chimiques ou organiques qui modifient l'activité des enzymes. On distingue :

III.3.1. Les activateurs : qui par leur liaison avec l'enzyme *accélèrent la vitesse* de la réaction enzymatique telle que :

- a) **certains ions métalliques** qui par leur fixation par coordinance à des atomes d'oxygène, d'azote, des groupements COOH, NH₂ des enzymes confèrent une grande stabilité dans le site actif de l'enzyme. Ils favorisent:

- une bonne conformation de l'enzyme ;
- la fixation du substrat ;
- et participent de manière directe à la catalyse

Exemple: Kinases activées par Mg⁺²

- b) **Activation des pro-enzymes inactifs**

La plupart des enzymes protéolytiques sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, l'élimination d'une séquence d'acides aminés les rend actifs

Trypsinogène \longrightarrow Trypsine + Hexapeptide

- c) **Activation par fixation covalente d'un groupement chimique** : Par addition d'un groupement chimique, le plus souvent le phosphate

Phosphorylase *b* (**inactive**) \longrightarrow Phosphorylase *a* (**active**)

*Phosphorylation d'un résidu seryl par une kinase:
Phosphorylase b kinase*

III.3.2. Les inhibiteurs : qui par leur liaison avec l'enzyme *ralentissent* la vitesse de la réaction enzymatique. Ils peuvent être :

- a) **irréversibles**: se lient de façon irréversible avec l'enzyme et agissent brutalement en dénaturant l'enzyme

Exemple: 5Fluoro-uracile utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse inhibe la *thymidilate synthase*; enzyme qui intervient dans la synthèse de la thymine (ADN) ; ce qui cause l'arrêt de la multiplication des cellules tumorales.



- b) **réversibles**: Perturbent la cinétique et peuvent stopper la réaction et l'inhibition peut être levée dans des conditions réactionnelles particulières. Ce type d'inhibiteurs a un grand intérêt puisqu'ils permettent une étude très fine des mécanismes moléculaires de la catalyse.

IV. Mesure de l'activité enzymatique

La caractérisation des systèmes enzymatiques repose sur la mesure de l'activité enzymatique et de suivre l'évolution de la réaction au cours du temps.

- 1) **L'activité enzymatique**, exprimée en *unité internationale* ou **UI**, est définie comme la quantité d'enzyme catalysant la libération d'une micromole de produit ou la disparition d'une micromole de substrat par minute, dans des conditions optimales de mesures. Une nouvelle unité de l'activité enzymatique découlant du système international (SI) a été introduite. Il s'agit du **katal** qui correspond à la quantité d'enzyme catalysant la libération **d'une mole de substrat en une seconde**. Ainsi, le **katal** est équivalent à **6. 10⁷ UI**.
- 2) **L'activité totale** : correspond à l'activité exprimée en UI contenue dans la préparation d'enzyme. C'est-à-dire à l'activité rapportée par cm³ (ml) multipliée par le volume de l'extrait exprimé dans les mêmes unités.

Exemple : Un prélèvement de 50µl d'une préparation enzymatique de 2,8 cm³ possède une activité de 0.012 UI, le calcul de l'activité totale est le suivant :

$$\text{Activité totale} = \frac{0,012 \times 2,8}{0,05} = 0,672 \text{ UI}$$

L'activité totale permet le calcul du rendement d'une purification en considérant l'activité finale par rapport à celle initiale.

- 3) **L'activité spécifique** : correspond au nombre d'UI d'enzyme par unité de masse en protéines (*UI/ mg de protéines*). Ce rapport est d'une grande importance dans la purification des enzymes. En effet, plus la purification de l'enzyme est poussée et plus l'activité spécifique est importante. L'activité spécifique augmente avec la purification et atteint une valeur maximale lorsque l'enzyme est parfaitement pure.
- 4) **L'activité molaire spécifique** : correspond au nombre de mole de substrat transformées (ou de produit libérées) par 1 mole d'enzyme et par unité de temps (*minute ou seconde*). Elle est donc exprimée en sec⁻¹ ou min⁻¹.
- 5) **Le taux de purification d'une fraction** : est le rapport de son activité spécifique et l'activité spécifique de l'extrait initial.

Chapitre IV

Les Inhibiteurs de la réaction enzymatique



Toute molécule qui modifie la vitesse d'une réaction enzymatique est appelée un effecteur. Les effecteurs qui augmentent l'activité enzymatique sont des activateurs. A l'inverse, ceux qui la diminuent sont des inhibiteurs. Certaines molécules peuvent, selon les conditions, se comporter comme un activateur ou un inhibiteur.

L'inhibition (*et l'activation*) de l'activité enzymatique est un mode de régulation primordial des voies métaboliques dans la cellule, d'autant que les inhibiteurs naturels peuvent prendre de multiples formes : antibiotiques, toxines, drogues, poisons...etc. et de nombreux inhibiteurs d'enzymes sont souvent utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour combattre certaines maladies. En outre, plusieurs raisons nécessitent l'étude de l'inhibition des enzymes, par exemple pour décrire le mécanisme catalytique notamment lorsqu'une enzyme agit sur plusieurs substrats, mieux connaître la spécificité d'une enzyme ainsi que pour obtenir des données physiques et chimiques concernant le site actif.

Un inhibiteur d'enzyme est une substance, non transformée par l'enzyme, qui, lorsqu'elle est présente dans le mélange réactionnel, réduit ou affaiblit la vitesse de la réaction catalysée par le biocatalyseur sur un substrat (ralenti la réaction).

Les enzymes peuvent être désactivées de manière irréversible par plusieurs facteurs tels que la chaleur ou par l'action de certains réactifs chimiques (qui se fixent de manière covalente) tels que les ions métalliques, en induisant leur dénaturation ce qui implique généralement la modification covalente d'un groupe essentiel de l'enzyme et qui ne peuvent être levées par dialyse ou dilution. Elles peuvent être également inhibées (sans être dénaturées) par la liaison réversible des inhibiteurs naturels ou synthétiques, l'association comme la dissociation s'effectuant à une vitesse élevée et ce type d'inhibition peut être levée en éliminant l'inhibiteur du milieu réactionnel.

Dans ce chapitre, nous discutons d'abord les inhibiteurs réversibles qui sont des substances qui forment avec l'enzyme des complexes dynamiques dont les propriétés catalytiques sont différentes de celles de l'enzyme libre suivi par un aperçu sur les inhibiteurs irréversibles.

➤ La constante d'inhibition (K_I)

L'affinité d'un inhibiteur pour une enzyme est donnée par la constante d'inhibition K_I qui représente la concentration d'inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés. Ainsi, l'affinité d'un inhibiteur est d'autant plus grande que la K_I est faible. Elle est exprimée en mole/ litre (M), correspondant aussi à la constante de dissociation du complexe Enzyme-Inhibiteur (Enz-I). K_I peut être déterminée par différentes méthodes chromatographiques, spectroscopiques, cinétiques, de dialyse à l'équilibre, ... etc.

I. L'inhibition réversible

L'inhibition réversible comporte trois types :

- Inhibition compétitive (I.C) ;
- Inhibition incompétitive (I.I.C) ;
- Inhibition non compétitive (I.N.C)

I.1 Inhibition compétitive (I.C)

Dans ce type d'inhibition, l'inhibiteur se lie à l'enzyme libre et empêche le substrat pour occuper le site actif. L'inhibition compétitive, ainsi appelée puisque le substrat (S) et l'inhibiteur (I) sont en compétition pour occuper le même site de fixation (le site actif). Ils ne peuvent donc se trouver ensemble sur l'enzyme (pas de formation de complexe (ESI)). Le plus souvent, l'inhibiteur a la même structure que le substrat (analogie structurale) ou lorsqu'au moins une partie de l'inhibiteur possède une structure semblable à celle du substrat (**Fig. 16**).

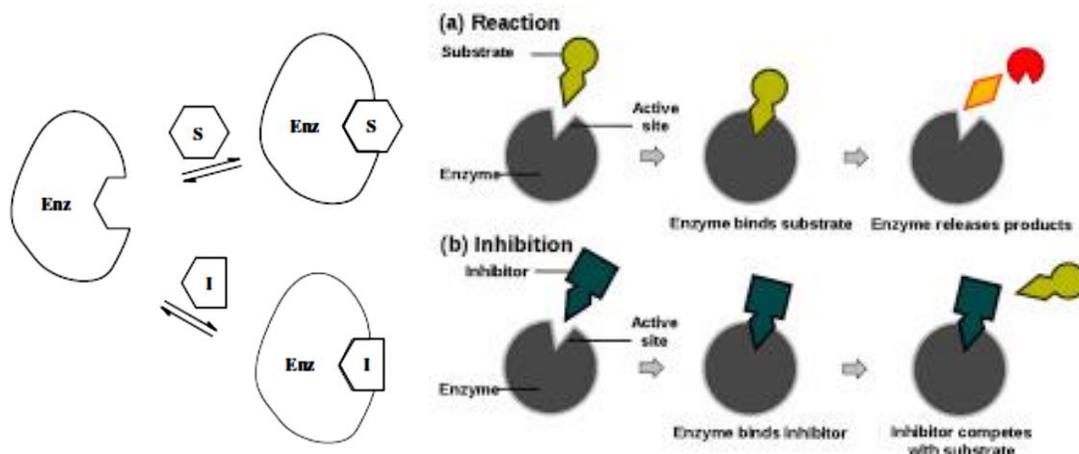


Figure 16 : Représentation schématique de l'I.C.

A part la compétition directe, il existe d'autres types de liaisons qui donnent lieu à l'inhibition compétitive par exemple :

- **L'encombrement stérique** : La liaison de l'inhibiteur à l'enzyme sur un site près du site actif empêche la liaison E-S (**Fig. 17**).

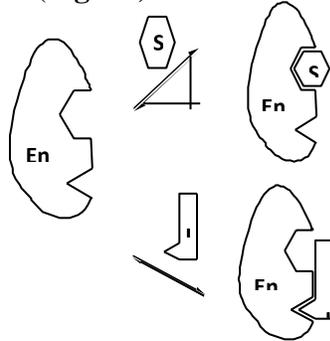


Figure 17 : Représentation schématique alternative de l'inhibition compétitive (**L'encombrement stérique**)

- **Changement de la conformation de l'enzyme après la liaison de l'inhibiteur** sur un son site : lorsque la liaison de l'inhibiteur (I) à l'enzyme libre (E), sur un site éloigné du site actif induit un changement de conformation de l'enzyme, ce qui empêche la liaison naturelle du substrat (S) (**Fig. 18**). L'un des principaux modes de régulation des voies métaboliques est la **rétro-inhibition**: un métabolite (souvent terminal) d'une voie métabolique donnée inhibe une enzyme qui catalyse la première (ou l'une des premières) étape(s) de cette voie. Cependant, le substrat et l'inhibiteur n'ont pas (ou peu) d'homologie structurale. c'est le changement conformationnel de l'enzyme induit par la fixation de l'inhibiteur qui empêche celle du substrat (et réciproquement). Les enzymes sujettes à ce mode de régulation sont souvent des enzymes multimériques à régulation allostérique : par exemple, l'aspartate transcarbamylase, la glutamine synthétase

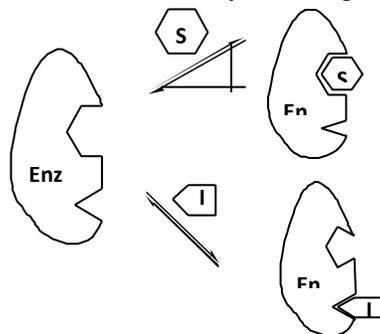


Figure 18 : Représentation schématique alternative de l'inhibition compétitive (**changement de conformation de l'enzyme**).

NB : Dans tous les cas, l'inhibition compétitive est un mécanisme où la fixation de l'inhibiteur **empêche**



celle du substrat (et réciproquement) : la fixation du substrat et celle de l'inhibiteur sont donc mutuellement exclusive

✓ **Exemple de l'inhibition Compétitive** (ou spécifique) :

Dans la réaction catalysée par la succinate déshydrogénase, le succinate est oxydé en fumarate, comme illustre dans la figure 19 suivante

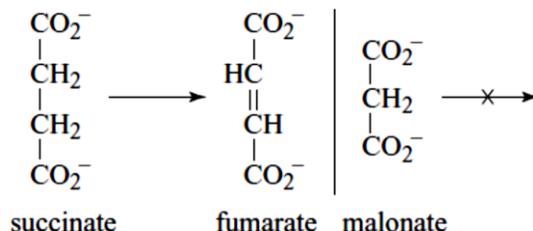
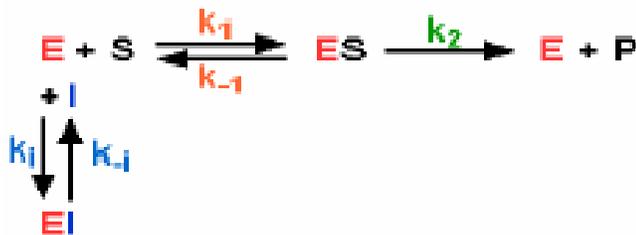


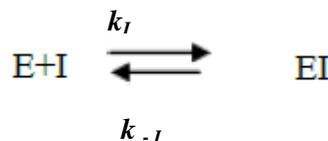
Figure 19: Réaction catalysée par la succinate déshydrogénase

Bien que le succinate et le malonate aient une structure suffisamment proche pour se fixer sur le même site de l'enzyme, le malonate ne possède pas le groupement diméthylène qui lui permettrait de subir la réaction de déshydrogénation. En effet, le malonate en se fixant sur le site actif de l'enzyme, forme un complexe abortif, incapable de réagir.

a) **Le mécanisme réactionnel de l'Inhibition Compétitive (I.C).** est représenté comme suit :



Puisque « I » n'est pas chimiquement modifié, on peut définir la constante d'inhibition K_I analogue à la constante K_m :



Selon cette équation, $K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$

Et l'enzyme totale se présente sous trois formes : E_{libre} , ES et EI



Ainsi, $[E]_T = [E]_{\text{libre}} + [ES] + [EI]$.

b) L'équation de vitesse de l'I.C

Dans ce type de réaction, seule le complexe ES est actif (évoluer pour la formation du produit) alors que la seule réaction que puisse subir EI est sa dissociation pour redonner E et I. Lorsque l'enzyme est partiellement sous forme EI, une élévation de la concentration du substrat (S) déplace l'équilibre $E + I \rightleftharpoons EI$ vers la gauche (inhibition réversible).

Lorsque [S] est saturante, la vitesse de la réaction est égale à V_{max} . Toutefois, il faut une concentration supérieure de substrat pour atteindre $V_{\text{max}}/2$, en d'autres termes, la constante K_m est plus élevée en présence d'un IC (Inhibiteur Compétitif) comparée à celle de la cinétique de la même enzyme sans inhibiteur. L'équation qui définit une inhibition linéaire compétitive et qui s'applique à tout mécanisme d'inhibition compétitive, est :

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

On a $v = K_{\text{cat}} \cdot [ES]$

Par ailleurs : $K_s = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$ et $K_I = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$

Comme $[E]_t = [E]_{\text{libre}} + [ES] + [EI]$,

$$[E]_t = [E] + [E] \cdot \frac{[S]}{K_s} + [E] \cdot \frac{[I]}{K_I}$$

$$v/[E]_t = K_{\text{cat}} \cdot \frac{[ES]}{[E]_t} = \frac{K_{\text{cat}} [E] [S]}{\frac{K_s}{[E] + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][I]}{K_I}}}$$

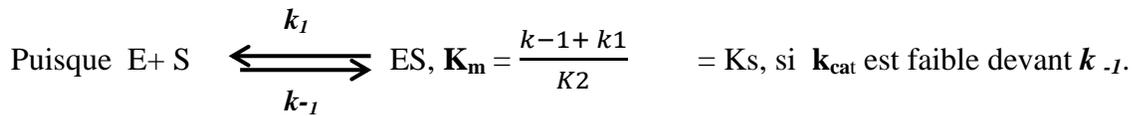
Après simplification et réarrangement :

$$v/[E]_t = \frac{K_{\text{cat}} \frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[I]}{K_I}} = \frac{K_{\text{cat}} [S]}{K_s + [S] + K_s \frac{[I]}{K_I}} \quad (K_s = K_m)$$

Soit encore

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

Pour ce type d'inhibition la constante de Michaelis-Menten apparente $K_m^{\text{app}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$



Par conséquent, la constante de Michaelis-Menten apparente K_m^{app} dépend de la concentration d'inhibiteur et de K_I . De plus, K_I représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour doubler le K_m . Ainsi l'expression de la vitesse dans le cas d'une inhibition compétitive est :

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

Par contre, la présence de l'inhibiteur rend l'enzyme moins affine pour son substrat (S) mais n'affecte pas V_{max} ; on peut toujours surmonter l'effet de l'inhibiteur en augmentant la concentration du substrat.

Selon cette équation, la fonction $v = f([S])$ est une relation Michaelienne ;

- ✓ si $[S]$ tend vers l'infinie ($[S] \longrightarrow \infty$) : v tend vers V_{max} ($v \longrightarrow V_m$) ce qui confirme qu'un I.C est sans effet sur la vitesse maximale de la réaction.

Finalement, lorsque $[I] = 0$, l'équation se simplifie à l'équation Michaelis-Menten.

c) Les représentations graphiques de l'inhibition Compétitive

➤ de Type Michaelis-Menten

La représentation graphique de $v = f([S])$, en présence d'un I.C, montre que :

- ✓ $V_m^{app} = V_m = \text{Constante}$
- $K_m^{app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$ c'est-à-dire que K_m^{app} augmente ($K_m^{app} > K_m$).

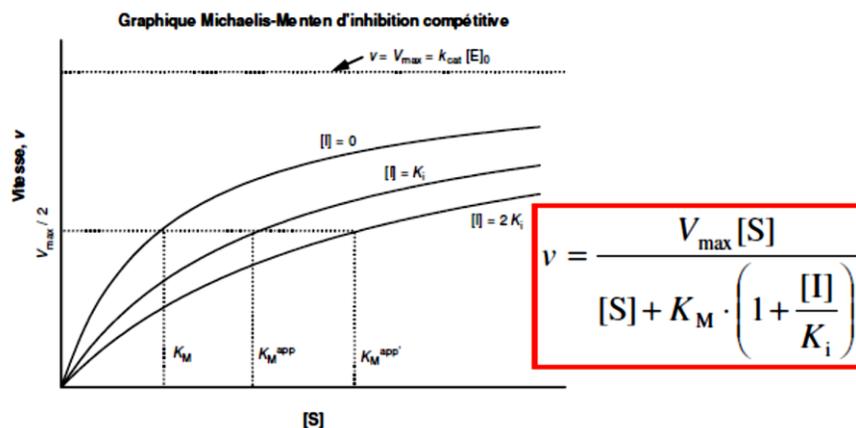


Figure 20 : Représentation graphique Michaelis-Menten de l'I.C.

- Représentation graphique de Lineweaver-Burck (Doubles-inverses) de l'I.C

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

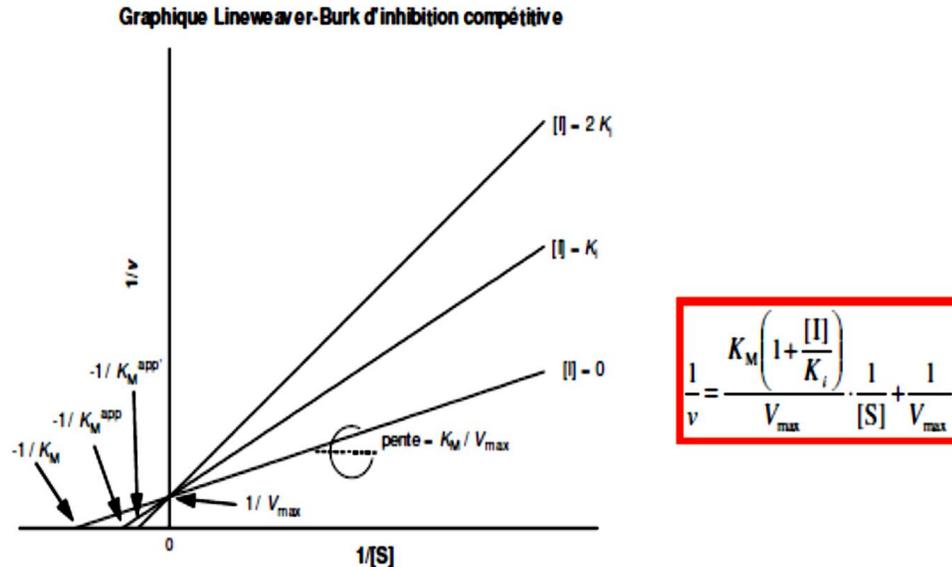


Figure 21 Représentation graphique de Lineweaver-Burk (Doubles-inverses) pour un inhibiteur compétitif (l'I.C).

d) Détermination graphique de la Constante d'inhibition (K_i) dans le cas d'une inhibition compétitive

Dans le cas d'une inhibition purement compétitive (c'est à dire, seulement les valeurs de K_m et non celles de V_{\max} qui varient en fonction de la concentration d'inhibiteur), on peut déterminer la valeur de K_i à l'aide de deux différents graphiques :

- ✓ Une méthode est basée sur le traitement des données provenant du graphique de Lineweaver-Burk. Il s'agit de la préparation d'un graphique secondaire (parfois appelé un «re-plot») des *pent*es du graphique Lineweaver-Burck (LB) versus la concentration d'inhibiteur



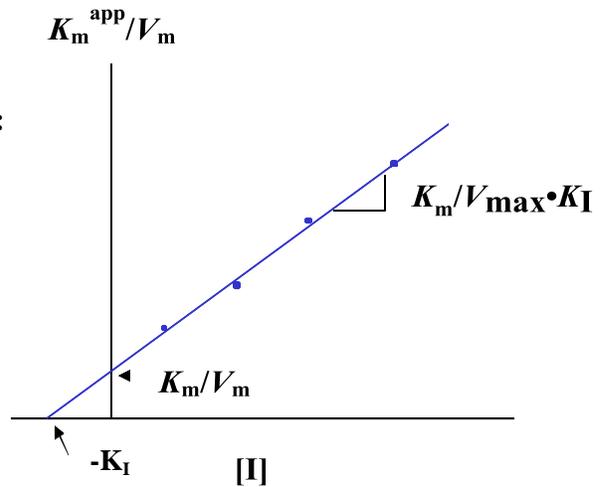
$$K_m^{app}/V_m = f([I])$$

L'abscisse à l'origine donne la valeur de K_i :

$$K_m^{app}/V_m = f([I])$$

$$K_m^{app}/V_m = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}{V_m}$$

$$= \frac{K_m}{V_m} + \frac{K_m}{V_m \cdot K_I} \cdot [I]$$



✓ La deuxième méthode est aussi directe, si on avait déjà calculé les valeurs de K_m^{app}

$$K_m^{app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

$$= K_m + (K_m / K_I) [I]$$

L'abscisse à l'origine donne la valeur de K_i

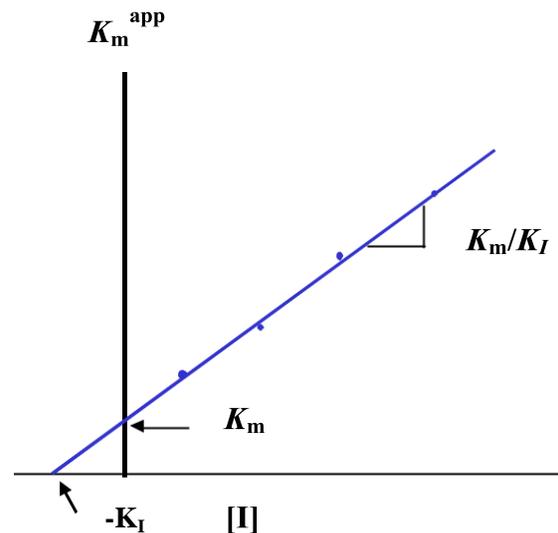


Figure 22 : Détermination graphique de la constante d'inhibition K_I pour I.C.

e) Le paramètre IC_{50}

La valeur de IC_{50} est la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle jusqu'à 50 % de sa valeur maximale non- inhibée. Une valeur d' IC_{50} toute seule ne permet pas de conclusions mécanistiques, mais peut être utilisée comme un indice d'efficacité d'inhibition par rapport à d'autres inhibiteurs *si les valeurs d' IC_{50} sont déterminées dans les mêmes conditions réactionnelles.*

✓ Alors, dans le cas d'inhibition compétitive (I.C),

Quand $[I] = IC_{50} \longleftrightarrow v = \frac{1}{2} \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$

D'où : $\frac{V_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_I}\right) + [S]} = \frac{1}{2} \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$

Alors $K_m \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_I}\right) + [S] = 2 (K_m + [S])$

Donc $IC_{50} + \frac{K_I}{K_m} [S] + K_I$

NB : $IC_{50} > K_I$

Notez que l' IC_{50} s'approche de la valeur de K_I aux très basses concentrations de substrat.

I.2 l'inhibition Incompétitive (I.I.C, anti-compétitive ou (inhibition catalytique)

Dans ce type d'inhibition réversible, l'inhibiteur ne se lie pas à l'enzyme libre, mais **au complexe enzyme-substrat (E-S) pour donner un complexe ternaire (ESI) inactif**. C'est un cas contraire à l'inhibition compétitive qui s'appelle l'inhibition incompétitive (anti-compétitive « uncompetitive ») ou *par blocage du complexe intermédiaire*. Cette appellation décrit mieux le mécanisme : l'enzyme et le substrat forment d'abord le complexe enzyme substrat (le complexe intermédiaire), puis l'inhibiteur se fixe à ce complexe (**Fig. 23**).

Les inhibiteurs incompétitifs se lient au complexe E·S, réduisant ainsi la vitesse de formation du produit. Il y a une diminution du K_m et de V_{max} de la réaction enzymatique.

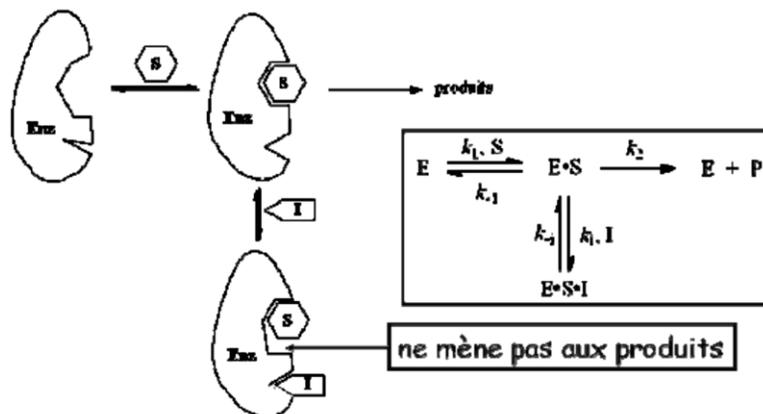


Figure 23 : Représentation schématique et schéma du type Michaelis-Menten de l'inhibition Incompétitive (I.I.C).

✓ Exemple de l'I.I.C

Ce type d'inhibition est assez commun pour les enzymes à plusieurs substrats (où la liaison d'un inhibiteur dans le site de liaison d'un substrat donne lieu à l'inhibition incompétitive par rapport à l'autre substrat) mais très rare pour les enzymes à un seul substrat.

- La phosphatase alcaline est une enzyme qui est inhibée de façon incompétitive par la L-phénylalanine (Fig. 24).

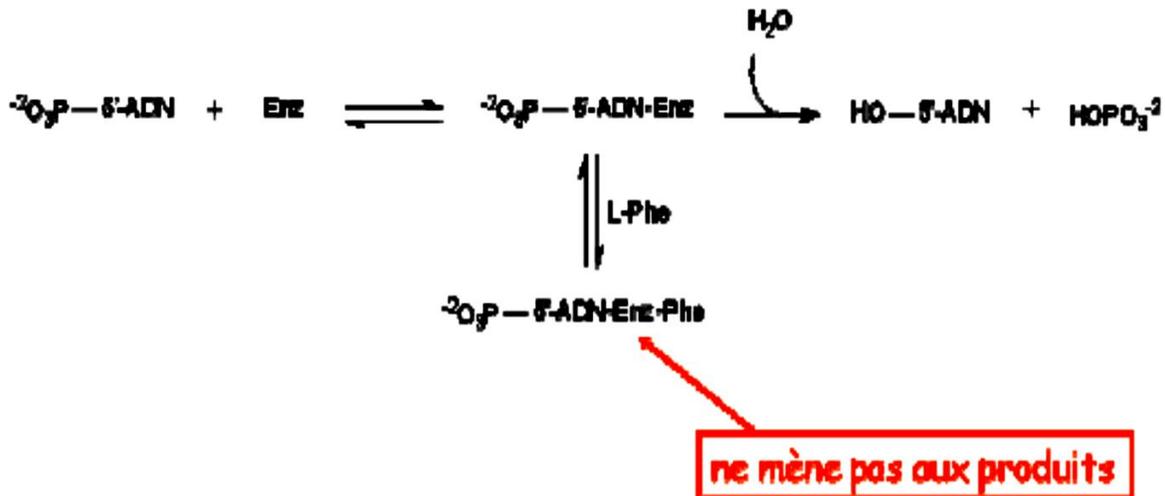


Figure 24 : Inhibition de la phosphatase alcaline par la L-phénylalanine (I.I.C).

- Un autre exemple d'une grande importance clinique est l'inhibition de la monophosphatase du myo-inositol par l'ion Li^+ . Cet ion est utilisé pour traiter certains cas de dépression et sa sélectivité pour les cellules présentant une activité excessive de transduction du signal est consistante avec le caractère Incompétitif de l'inhibition. De tels mécanismes ne sont cependant pas particulièrement communs et l'inhibition Incompétitive se rencontre principalement comme un type d'inhibition par le produit qui est commun dans les réactions impliquant plusieurs substrats et plusieurs produits.

a) Le mécanisme réactionnel de l'inhibition Incompétitive (I.I.C)

Encore une fois, dans le cadre du mécanisme Michaelis-Menten, cette inhibition est représentée par un équilibre additionnel (Fig. 25).

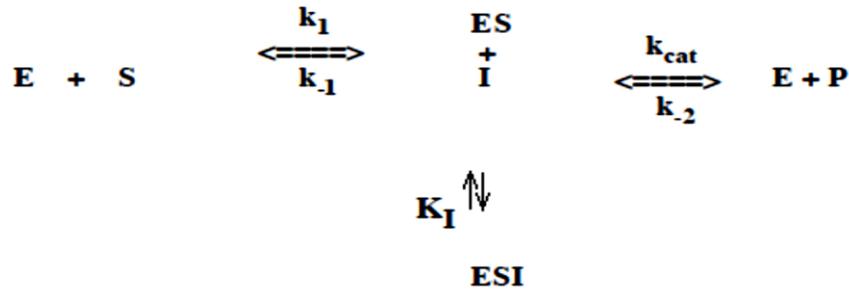


Figure 25 : Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition incompétitive (I.I.C).

b) L'équation de vitesse pour l'I.I.C

Encore une fois, dans le cadre du mécanisme Michaelis-Menten, cette inhibition est représentée par un équilibre additionnel.

Ici, l'enzyme est présente sous trois formes,

Conservation de masse : $[E]_0 = [E]_{\text{libre}} + [E \cdot S] + [E \cdot S \cdot I]$

Avec approximation de l'état stationnaire : $K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$

Et la constant d'inhibition : $K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$

Alors $[E]_0 = \frac{(k_2 + k_{-1})[E \cdot S]}{k_1[S]} + [E \cdot S] + \frac{[E \cdot S][I]}{K_i}$

D'où $[ES] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{k_2 + k_{-1}}{K_1[S]} + \frac{[I]}{K_I}} = \frac{[E]_0 \cdot [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) [S] + \frac{k_2 + k_{-1}}{K_1}}$

Donc $k_2 [ES] = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) [S] + \frac{k_2 + k_{-1}}{K_1}} = \frac{\frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}}{\left[S \right] + \frac{K_1}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}}$

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

Et $K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{K_1}$



Donc

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

En posant $V_m^{app} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$ et $K_m^{app} = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$

L'expression de vitesse de l'inhibition Incompétitive devient :

$$v = \frac{V_{mapp} \cdot [S]}{K_{mapp} + [S]}$$

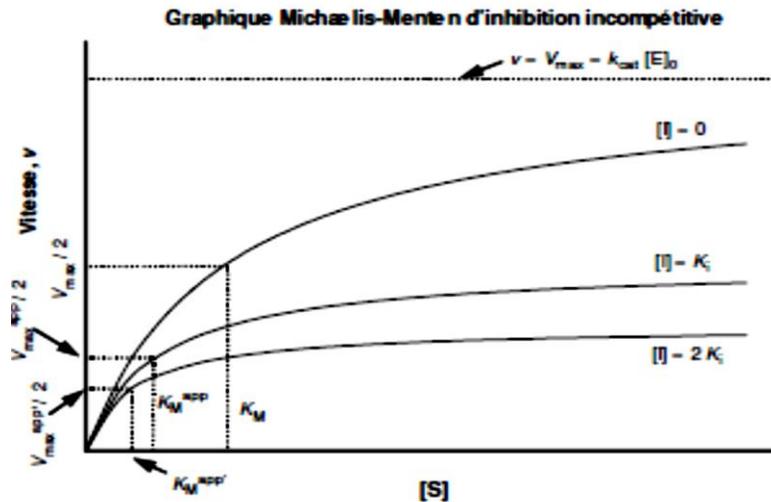
Alors on voit que le V_{max} aussi que le K_m sont diminués par le facteur : $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$

c) Représentation Graphiques de l'I.I.C

➤ **Type Michaelis-Menten :**

$v = f([S])$

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + \frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}}$$



➤ **Type Lineweaver-Burk**

$1/v = f(1/[S])$

Le modèle prédit un changement équivalent du K_m et du V_{max} , résultant en des droites de pentes identiques dans le graphique de Lineweaver-Burk (Fig. 26).

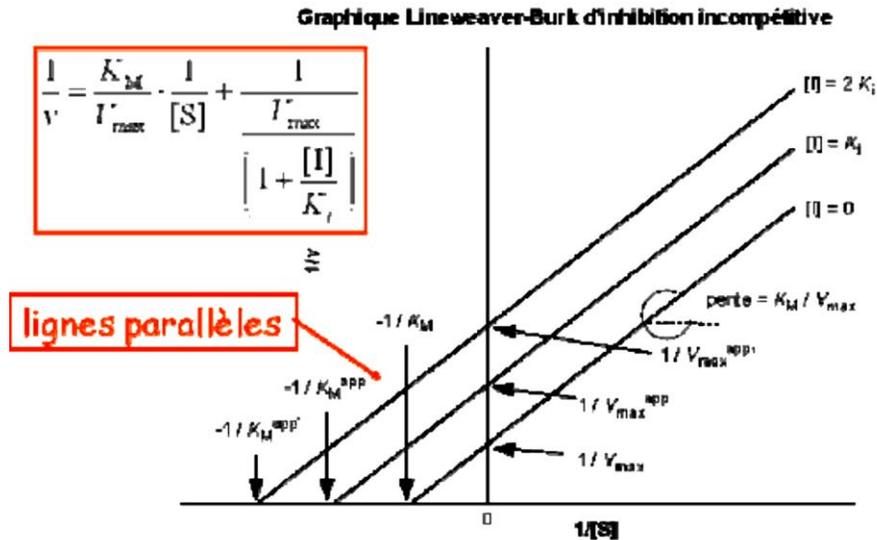


Figure 26 : Représentation graphique du type Lineweaver-Burk pour un inhibiteur incompétitif.

d) Détermination graphique de K_I pour l'I.I.C.

Pour l'inhibition purement incompétitive (c'est à dire, les valeurs de K_m et les valeurs de V_{max} diminuent par le même facteur en fonction de la concentration d'inhibiteur), on peut déterminer la valeur de K_I . Pour ce faire, on prend les Valeurs de $1/K_m^{app}$ ou de $1/V_m^{app}$ obtenues directement sur des axes x et y du graphique Lineweaver-Burk, ou, plus précisément, calculées après la régression non- linéaire des graphiques Michaelis-Menten. De toute façon, ces valeurs sont utilisées pour construire un deuxième type de graphique :

- Un graphique $1/K_m^{app} = f([I])$

On a
$$K_m^{app} = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

D'où
$$1/K_m^{app} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}{K_m} = \frac{1}{K_m} + \left(\frac{1}{K_m \cdot K_I}\right) [I]$$

- Ou bien Un graphique $1/V_m^{app} = f([I])$

- On a
$$V_m^{app} = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$



➤ D'où $1/V_m^{app} = \frac{(1 + \frac{[I]})}{V_m} = \frac{1}{V_m} + \left(\frac{1}{V_m \cdot KI}\right) [I]$.

Ainsi les graphiques obtenus sont représentés dans la figure 27 ci-dessous.

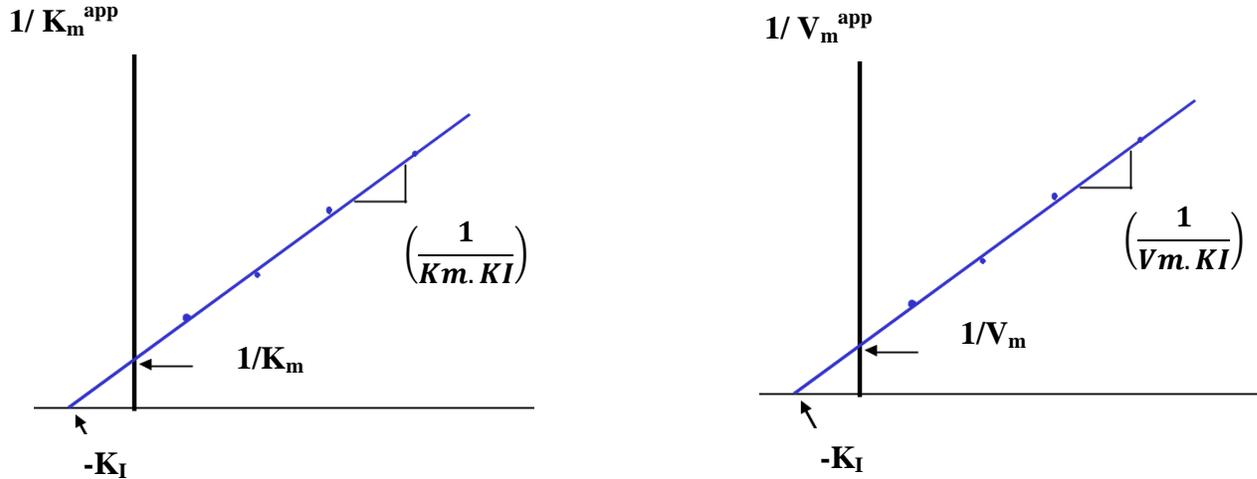


Figure 27 : Détermination graphique de K_I pour un inhibiteur Incompétitif (I.I.C).

e) Le paramètre IC_{50} pour l'I.I.C

➤ On a I.I.C : $V_m^{app} = \frac{V_m}{(1 + \frac{[I]})}$ et quand $[I] = IC_{50} : v = 1/2 V_{max}$

Donc :

$$v = \frac{V_{max} [S]}{\left(1 + \frac{[I]}\right) [S] + K_M} = \frac{1}{2} \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M}$$

$$\frac{1}{[S] + K_M} = \frac{2}{\left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right) [S] + K_M}$$

$$IC_{50} = K_i + \frac{K_i K_M}{[S]}$$

N.B. : $IC_{50} > K_i$

$$IC_{50} = KI + \frac{KIKm}{[S]}$$

Notons que l' IC_{50} s'approche de la valeur de K_i aux très hautes concentrations de substrat.

À première vue, il semble bizarre que l'effet d'inhibition incompétitive augmente avec la



concentration *augmentant* de substrat. Mais ce phénomène s'explique si on considère que la liaison du substrat, favorisée aux hautes concentrations, favorise la formation du complexe E•S, qui est susceptible à l'inhibition. Ceci explique aussi pourquoi le K_m diminue pour un substrat ; l'équilibre de liaison est déplacé vers le complexe E•S par la diminution de sa concentration lors de la formation du complexe E•S•I.

I.3 Inhibition non compétitive (I.N.C).

Ce type d'inhibiteur ne ressemble généralement pas au substrat naturel. L'inhibiteur non compétitif (I.N.C) se lie à l'enzyme à un site autre que le site actif, causant ainsi un changement réversible dans la structure tertiaire de l'enzyme qui interfère la vitesse de conversion du substrat en produit sans modifier l'affinité de l'enzyme (E) pour son substrat (S).

L'inhibiteur (I) peut interagir avec l'enzyme libre ou avec le complexe (E•S). Pour simplifier, nous pouvons considérer que l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur étant la même que l'enzyme soit libre ou déjà complexée au substrat. Dans ce type d'inhibition, puisque l'enzyme possède deux sites distincts (site actif et le site de fixation de l'inhibiteur) ; en présence de l'inhibiteur, un complexe ternaire (E.S.I) est formé et il en résulte que l'inhibition ne peut pas être déplacée par augmentation de la concentration de substrat tel qu'il est le cas pour l'I.C.

Comme la quantité d'enzyme active semble diminuer lorsque [I] augmente, l'inhibiteur non compétitif (I.N.C) occasionne, par conséquent, une diminution de la vitesse maximale de la réaction (V_{max}).

➤ *Exemple de l'inhibition non-compétitive*

L'inhibition non-compétitive des enzymes de plusieurs substrats est commune, mais l'inhibition non-compétitive d'une enzyme d'un seul substrat est plutôt rare. L'inhibition de la bisphosphatase de fructose par le AMP est non-compétitive par rapport au substrat 1,6-bisphosphate de fructose (**Fig. 28**)

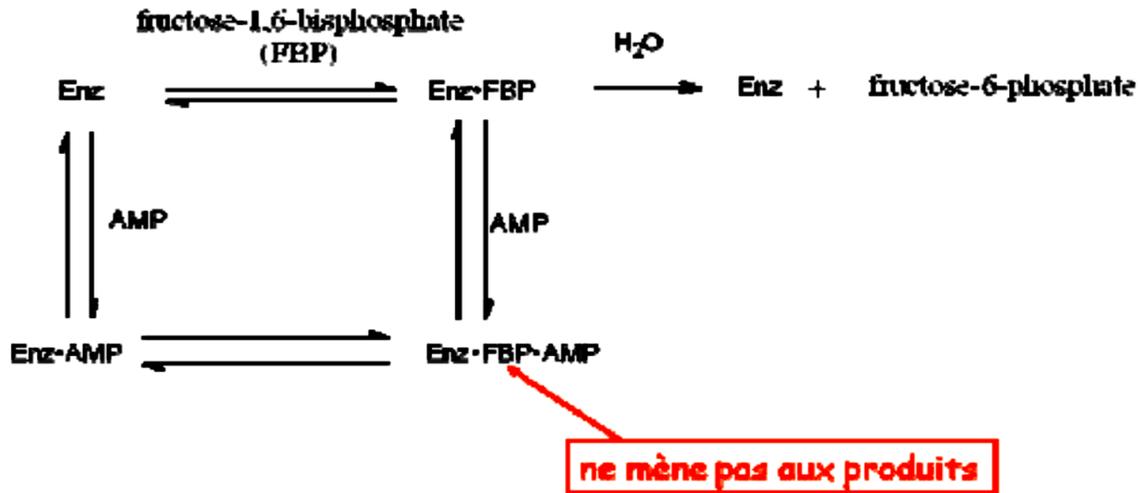


Figure 28: L'inhibition de la bisphosphatase de fructose par le AMP (I.N.C).

a) Mécanisme réactionnel de l'inhibition Non Compétitive (I.N.C)

Dans l'I.N.C, l'ordre de fixation de S et de I sur E est indifférent : ES peut aussi bien se former avant EI ou l'inverse (Fig. 29 et Fig. 30).

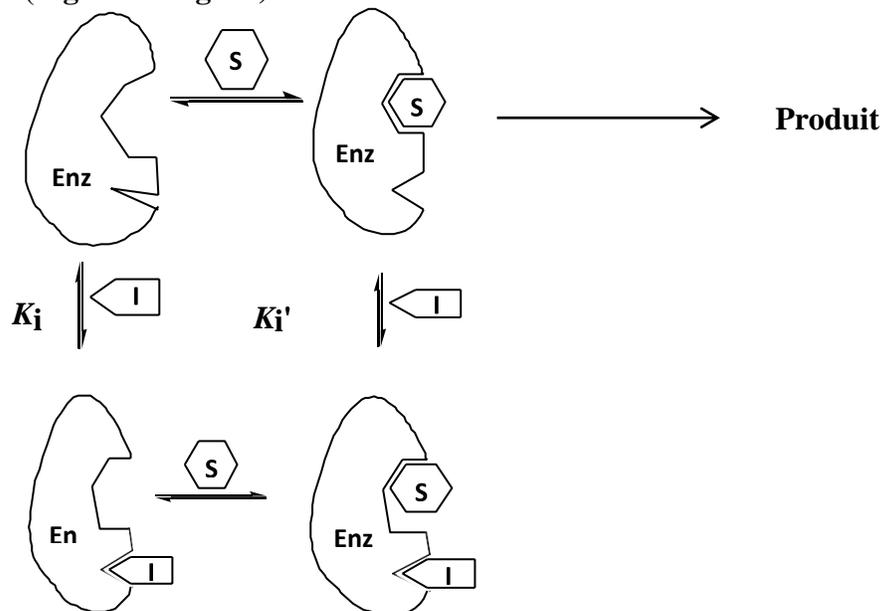


Figure 29 : Représentation schématique de l'inhibition non-compétitive (I.N.C).

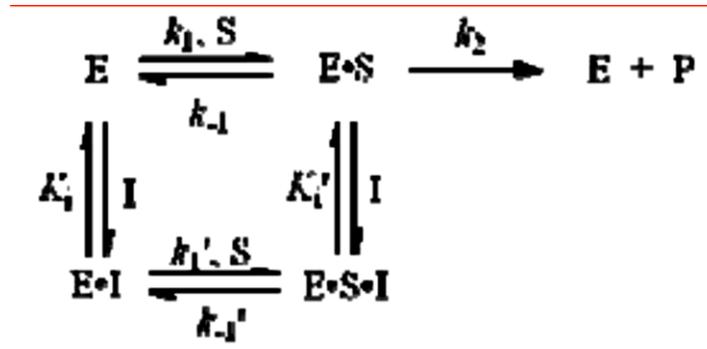


Figure 30 : Schéma réactionnel de type Michaelis-Menten de l'inhibition non-compétitive(I.N.C).

Dans ce schéma réactionnel, nous notons :

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}, \text{ (issu de l'équilibre } E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES)$$

$$K_m' = \frac{[EI][S]}{[ESI]}, \text{ (issu de l'équilibre } EI + S \xrightleftharpoons[k_{-1}']{k_1'} ES)$$

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = K_I^{EI} \text{ (issu de l'équilibre } E + I \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ESI)$$

$$K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]} = K_I^{ESI} \text{ (issu de l'équilibre } ES + I \xrightleftharpoons[k_{-1}']{k_1'} ESI)$$

N B : Dans ce cas de figure, on définit deux constantes d'inhibition (K_I et K_I') qui peuvent être identiques ou non.



b) L'équation de vitesse de l'I.N.C

D'après le schéma réactionnel de ce type d'inhibition, nous remarquons qu'il y a **deux voies pour parvenir au complexe ESI** (via la fixation de l'I sur le complexe (ES) ou bien la fixation du substrat sur le complexe binaire EI). Dans ce système, seul le complexe (ES) évolue vers la formation du produit (P) alors les complexes (EI) et (ESI) étant inactifs et puisque l'affinité de l'inhibiteur (I.N.C) est indépendante du substrat (S), l'affinité de l'enzyme (E) pour ce dernier (K_m) ne varie pas et reste constante ainsi la diminution de l'activité catalytique de l'enzyme se traduit par la diminution de la vitesse maximale de la réaction (V_{max}).

Dans un traitement rigoureux du schéma cinétique, il faut appliquer l'approximation de l'état stationnaire à tous les espèces enzymatiques, et on arrive à une solution qui est aussi intuitive : l'inhibition non-compétitive représente une combinaison de l'inhibition compétitive et l'inhibition incompétitive.

D'après le schéma réactionnel de l'I.N.C on a :

$$v = K_{cat} [ES]$$

$$V_{max} = K_{cat} [E]_{Totale} \text{ (ou } [E]_0)$$

$$[E]_T = [E]_0 = [E]_{libre} + [ES] + [EI] + [ESI]$$

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

Dans l'I.N.C, nous distinguons deux cas de figure :

a) l'inhibition non-compétitive « simple ou pure » : Dans le cas où l'affinité de l'inhibiteur est indépendante de la présence de substrat (i.e. $K_I = K_I'$), le K_m n'est pas modifié par la présence de l'inhibiteur mais **la V_{max} est diminué** par le facteur $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$.

$$\text{On a donc } K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_m, \quad \frac{[EI][S]}{[ESI]} \text{ et } K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

et comme $[E]_T = [E]_0 = [E]_{libre} + [ES] + [EI] + [ESI]$



$$\text{Alors } [E]_T = [E]_{\text{libre}} + \frac{[E][S]}{K_m} + \frac{[E][I]}{K_I} + \frac{[E][I][S]}{K_I K_s}$$

$$\frac{v}{[E]_T} = \frac{K_{cat} \frac{[E][S]}{K_s}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_m} + \frac{[E][I]}{K_I} + \frac{[E][I][S]}{K_I K_s}}$$

$$\text{D'où } v = \frac{V_{\max} \frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[I]}{K_I} + \frac{[I][S]}{K_I K_m}}$$

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

En divisant le numérateur et le dénominateur sur $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$

$$\text{On aura } v = \frac{\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} [S]}{K_m + [S]}$$

En posant $V_m^{\text{app}} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$ l'expression de vitesse pour l'I.N.C simple s'écrit :

$$V = \frac{V_{\max \text{ app}} [S]}{K_m + [S]}$$

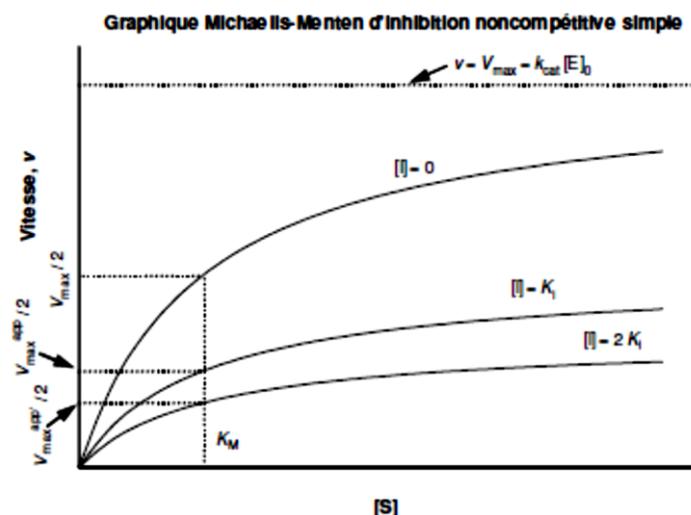
c) Représentations graphiques de l'I.N.C (Cas de l'I.N.C. pure)

1) Représentation du Type Michaelis-Menten $v = f([S])$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

$$V = \frac{V_{\max \text{ app}} [S]}{K_m + [S]}$$

- V_{\max} diminue
- K_m = constante



2) Représentation du Type Lineweaver-Burk $1/v = f(1/[S])$



Dans ce cas, la représentation des doubles inverses obtenue par la transformation de la relation :

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

On aura:
$$1/v = \frac{K_m}{V_{max} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

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

Ou encore
$$1/v = \frac{K_m}{V_{max\ app}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max\ app}}$$

où $V_{max,app} = V_{max} / \{1 + [I]/K_I\}$

Pour différentes concentrations d'inhibiteur, la représentation de Lineweaver-Burk montre un faisceau de droites concourant sur l'axe des abscisses à une valeur de $-1/K_m$ (Fig. 31).

Dans le cas où $1/v = 0$, la relation $1/v = \frac{K_m}{V_{max\ app}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max\ app}}$ devient après réarrangement : $0 = \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$

Cette équation implique que $[S] = -K_m$ ou $[I] = -K_I$

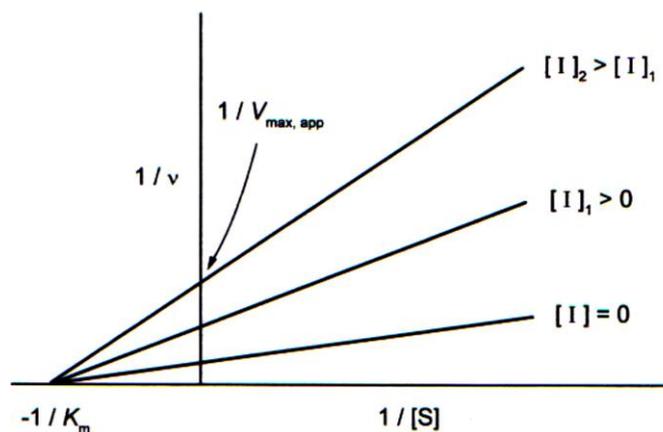


Figure 31 : Graphique du type Lineweaver-Burk ($1/v = f(1/[S])$) pour un inhibiteur non compétitif pure .

d) Détermination de la constante d'inhibition K_I pour l'I.N.C pure



On a: I.N.C (pure):
$$\frac{1}{V_{max\ app}} = \frac{(1 + \frac{[I]}{K_I})}{v_{max}}$$

Donc,
$$\frac{1}{V_{max\ app}} = \frac{1}{v_{max} K_I} [I] + \frac{1}{v_{max}}$$

Le tracé $1/V_{max}^{app} = f([I])$ représenté dans la figure 32 ci-dessous, **donne la valeur de la constante d'inhibition** (quand $1/V_{max}^{app} = 0$ c'est-à-dire sur l'axe y = 0)

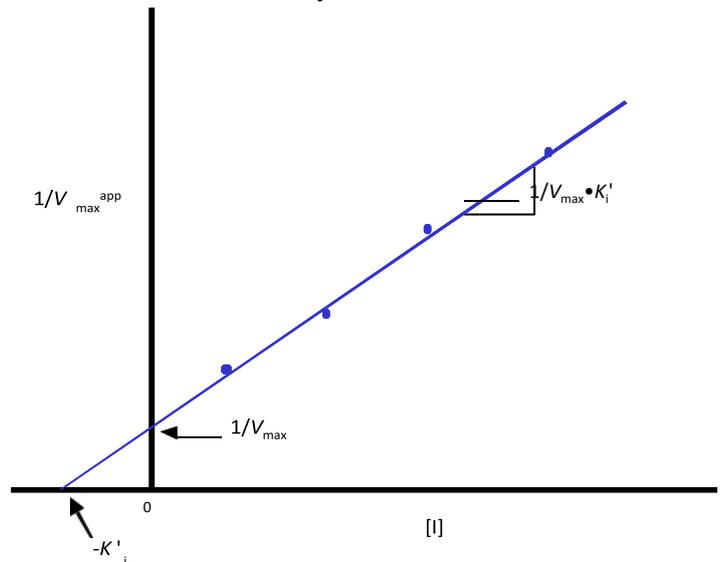


Figure 32 : Détermination graphique de la constante d'inhibition (K_I) pour un I.N.C pure.

e) Le paramètre IC_{50} pour l'I.N.C

Dans le cas rare où l'affinité d'un inhibiteur pour l'enzyme libre est identique à son affinité pour le complexe enzyme-substrat, (c'est à dire $K_I = K_I'$), l'effet de l'inhibiteur est manifesté seulement dans la valeur de V_{max} et est indépendant de la concentration de substrat. Donc, K_I représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer le V_{max} par une moitié, ce qui est identique à la définition de l' IC_{50} .

Alors, dans le cas d'inhibition non-compétitive simple (pure),

On a
$$v = \frac{V_{max\ app}[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{(1 + \frac{[I]}{K_I})} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$
 et quand $[I] = IC_{50} : v = \frac{1}{2} \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$

Alors,
$$\frac{1}{2} \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{(1 + \frac{IC_{50}}{K_I})} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$
 (quand $[I] = IC_{50}$)

Donc
$$\left(1 + \frac{IC_{50}}{K_I}\right) = 2$$



$$D'o\grave{u} \frac{IC50}{KI} = 1$$

$$Donc \quad K_I = IC_{50}$$

NB : seulement V_{max} est affectée par I, cet effet est indépendant de [S].

f) L'inhibition non-compétitive « mixte »

L'inhibition non compétitive *mixte* se différencie de la relation précédente (I.N.C. pure) **à la fois par une modification** de V_{max} et de K_m apparent. Ici, l'affinité de l'inhibiteur (I) dépend de la présence du substrat (S) (c'est-à-dire $K_I \neq K_I'$) donc K_m est affectée selon K_I et K_I' alors que V_{max} est toujours diminuée par le facteur $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$.

Dans ce cas, les équilibres $E + S \rightleftharpoons ES$ et $EI + S \rightleftharpoons ESI$ ne sont pas régis par la même constante K_S (ou K_m), c'est aussi le cas des équilibres $E + I \rightleftharpoons EI$ et $ES + I \rightleftharpoons ESI$ (Fig. 33)

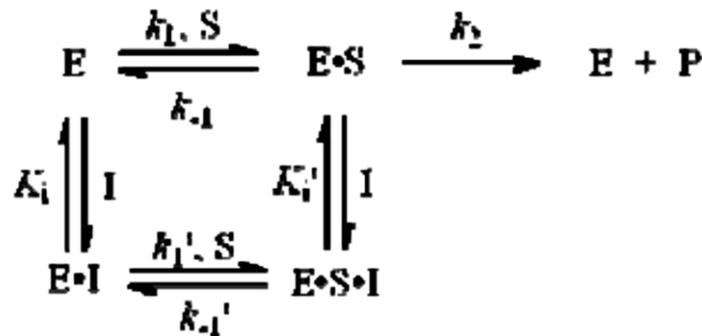


Figure 33 : Schéma réactionnel de l'inhibition non compétitive mixte.

$$On \text{ a donc } K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}, \quad K_m' = \frac{[EI][S]}{[ESI]} \text{ et } K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}, \quad K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$\text{et comme } [E]_T = [E]_0 = [E]_{libre} + [ES] + [EI] + [ESI]$$

$$\text{Alors } [E]_T = [E]_{libre} + \frac{[E][S]}{K_m} + \frac{[E][I]}{K_I} + \frac{[E][I][S]}{K_I K_s}$$

$$\frac{v}{[E]_T} = \frac{K_{cat} \frac{[E][S]}{K_m}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_m} + \frac{[E][I]}{K_I} + \frac{[E][I][S]}{K_I K_s}}$$

$$D'o\grave{u} \quad v = \frac{V_{max} \frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[I]}{K_I} + \frac{[I][S]}{K_I K_m}} = \frac{V_{max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right)}$$



Soit

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

Dans cette expression nous remarquons que $K_I \neq K_I'$ donc nous distinguons deux cas :

- 1^{er} cas $K_I < K_I'$

Lorsque $K_i < K_i'$, l'augmentation de $[I]$ *augmente* aussi la valeur apparente de K_m (i.e. le K_m^{app}) ce qui représente un cas semblable à l'inhibition compétitive (I.C). Les courbes de Lineweaver- Burk ont alors l'allure suivante :

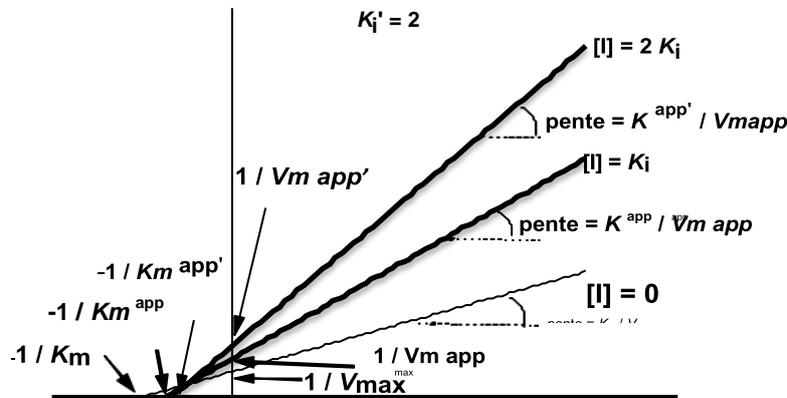


Figure 34 : Représentation Graphique des doubles inverses de l'I.N.C mixte ($K_I < K_I'$).

- 2^{ème} cas $K_I > K_I'$

Lorsque $K_i' < K_i$, l'augmentation de $[I]$ entraîne une *diminution du K_m^{app}* , ce qui représente un cas semblable à l'inhibition incompétitive (I.I.C) la représentation $1/v = f(1/[S])$ donne l'allure suivante :

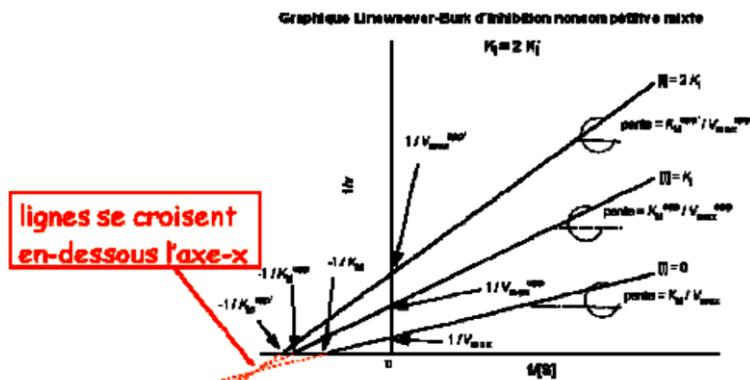




Figure 35 : Représentation Graphique des doubles inverses de l'I.N.C mixte (cas $K_I > K_I'$).

Nous remarquons que la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite sont affectées par l'inhibiteur. En effet, pour différentes concentrations en inhibiteur (I), le tracé $1/v = f(1/[S])$ fournit un faisceau de droites concourantes.

- Si $K_I < K_I'$: le point d'intersection des droites possède **une ordonnée supérieure à 0** (les lignes se croisent au-dessus de l'axe des x).
- Si $K_I > K_I'$: ce point à une **ordonnée inférieure à 0** (les lignes se croisent au-dessous de l'axe des x).

➤ **Détermination de la constante d'inhibition K_I et K_I' pour l'I.N.C mixte**

- a) Pour déterminer la valeur de K_I' , on prend les valeurs de $1/V_{max}$, soit obtenues directement des ordonnées à l'origine du graphique Lineweaver-Burk, ou, plus précisément, calculées après la régression non-linéaire des graphiques Michaelis-Menten. On construit ensuite un deuxième type de graphique (Fig. 36).

A partir de l'expression $V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right)}$, nous obtenons $1/V_{max}^{app} = f([I])$.

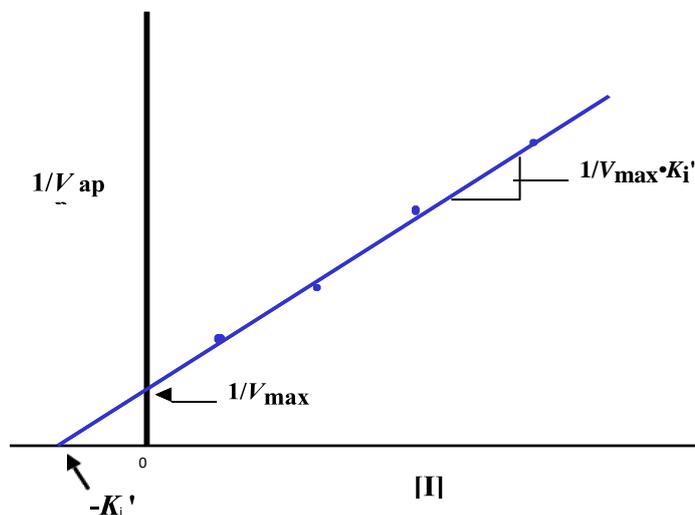


Figure 36: Détermination graphique de K_I' pour un I.N.C mixte.

- b) Pour déterminer la valeur de K_I , on prend les valeurs de $\frac{K_{mapp}}{V_{maxapp}}$, soit obtenues directement des pentes du graphique Lineweaver-Burk, ou, plus précisément, calculées après la régression non-linéaire des graphiques Michaelis-Menten. On construit ensuite un deuxième type de graphique secondaire (Fig. 37).



$$\left| \frac{K_M^{app}}{V_{max}^{app}} \right| = \left| \frac{\frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}{1 + \frac{[I]}{K_I'}}}{\frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I'}}}}{\frac{1 + \frac{[I]}{K_I'}}{1 + \frac{[I]}{K_I'}}} \right| = \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

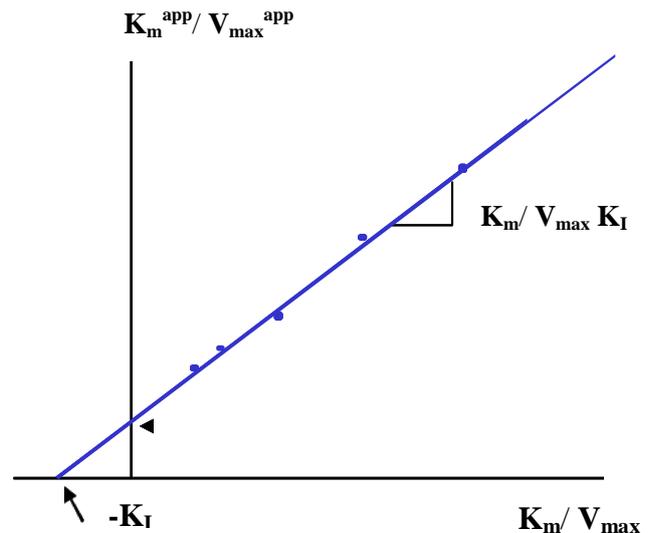


Figure 37: Détermination graphique de K_I pour un I.N.C mixte.

Notez que le $IC_{50} = K_i$ dans trois cas :

- 1) inhibition non-compétitive (simple)
- 2) inhibition compétitive lorsque $[S] \longrightarrow 0$
- 3) inhibition incompétitive lorsque $[S] \longrightarrow \infty$

II. Les inhibiteurs irréversibles (ou poisons catalytiques)

Ce sont des substances qui, en se combinant avec l'enzyme (généralement par liaisons covalentes sur le site actif puisque, comme les I.C, ils ressemblent souvent au substrat), éliminent complètement son activité. De nombreux enzymes sont « empoisonnés » par des traces de métaux lourds, et pour cette raison, les études cinétiques sont couramment réalisées en présence d'agents complexant comme l'EDTA.

Dans certains cas, les inhibiteurs irréversibles peuvent aussi être utilisés de façon positive. En effet, les réactions effectuées avec ce type d'inhibiteurs ont été exploitées pour confronter des résultats cinétiques, préciser les mécanismes enzymatiques ou identifier les aminoacides participants à la catalyse. Par exemple, l'empoisonnement par les composés de mercure (II) a souvent été utilisé pour mettre en évidence l'implication de groupes sulfhydryles dans le site catalytique des enzymes

II.1 Mesure de l'efficacité

Pour des raisons pharmacologiques ou scientifiques, on recherche souvent les inhibiteurs les plus puissants des enzymes. Pour les inhibiteurs réversibles, on utilise le K_I comme indice d'efficacité (l'inhibiteur réversible est d'autant efficace que K_I est le plus faible



possible) alors que pour les inhibiteurs irréversible l'efficacité est mesurée par le K_I et K_{inact} .
Nous distinguons deux types d'inhibiteurs irréversibles :

- 1) **Les réactifs du site actifs** (marquage par affinité),
- 2) **Les inhibiteurs basés sur le mécanisme** (substrat « suicide »).

II.1. 1 Réactifs du site actif (Marquage par affinité)

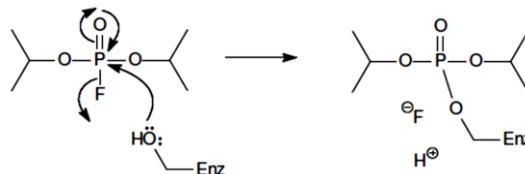
Ces inhibiteurs (les réactifs du site actif) présentent une spécificité envers un groupement fonctionnel des acides aminés du site actif. Ils peuvent être des analogues de substrat pour favoriser sa liaison dans le site actif, qui comprennent aussi un groupement réactif (pharmacophore) typiquement un électrophile qui réagit avec un nucléophile dans le site actif. Ces inhibiteurs possèdent un seul site saturable et réagissent de manière stœchiométrique (1 mol d'I/mol de E).

- L'enzyme est protégée contre cette inhibition par le substrat (ou co-facteur).
- La perte d'activité suit une cinétique de premier ordre, parce que l'enzyme est consommée comme un réactif pendant la réaction.
- L'inhibition est accompagnée de la modification covalente de l'enzyme c'est-à-dire :
 - L'enzyme demeure inactive après la séparation de l'inhibiteur.
 - L'inhibiteur reste lié à la protéine après dialyse ou filtration sur gel (ou sur membrane) même après la dénaturation de l'enzyme.
 - La formation du complexe EI empêche l'accès de (S) et l'activité de l'enzyme dépend de la fraction de l'enzyme qui reste sous la forme libre.
 -

✓ Exemples de l'inhibition par Marquage par affinité

a) *DIFP (Diisopropylfluorophosphate)*

Le DIFP est un composé hautement toxique qui possède la particularité d'associer de manière covalente au résidu sérine du site actif des protéases (chymotrypsine, trypsine, élastase, thrombine, ...etc.) et de certaines estérases comme les cholinestérases.

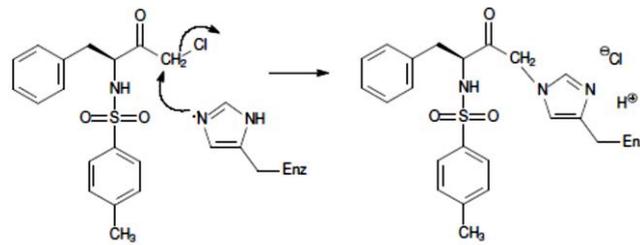


• *TPCK (Tosylphenylalaninechloromethylketone)*

Le TPCK ressemble aux amides et les esters de la phénylalanine, mais le groupement

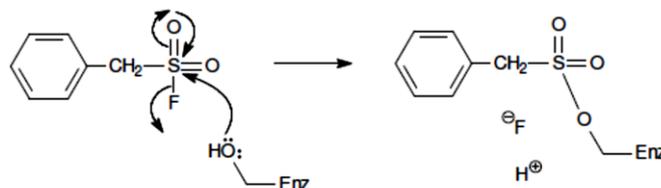


chlorométhyle effectue une alkylation, par exemple, de la His57 de la chymotrypsine et aussi avec la Cys25 de la papaïne:



- *Le PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)*

Le PMSF est souvent utilisé pour inhiber des protéases et réagit de manière similaire :



- Autres exemples d'inhibiteur irréversibles par marquage d'affinité

Enzyme	Substrat	Marqueur par affinité
Triosephosphate isomerase		
Triosephosphate isomerase		
Lysozyme		
Isoleucyl-tRNA synthetase	Ile-tRNA ^{Ile}	

➤ Analyse cinétique

L'étude des inhibiteurs irréversibles conduit très souvent à utiliser une concentration d'inhibiteur très supérieure à celle de l'enzyme : $[I] \gg [E]$. Dans ces conditions, la concentration de l'inhibiteur (I) est quasiment constante au cours de la réaction, par conséquent : $[I] = [I]_0$ (Sine, 2010).



Les mesures précises de la vitesse à laquelle la perte d'activité s'effectue dans un processus d'inhibition irréversible, fournissent une information utile qui est plus simple, et donc plus facile à interpréter, que celle fournie par les expériences conventionnelles de cinétique.

En général, dans l'inhibition irréversible de type marquage par affinité figure la liaison rapide à l'équilibre de l'inhibiteur suivie de la formation lente et irréversible d'un complexe inactif (Fig. 38) :

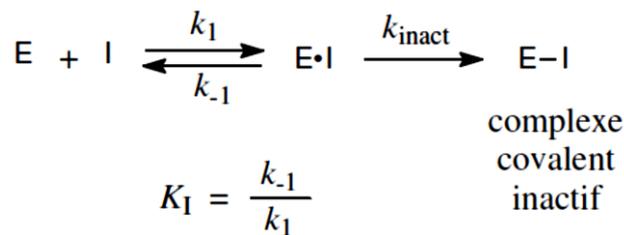


Figure 38 : Schéma réactionnel d'une inhibition irréversible du type marquage par affinité.

a) Mécanisme d'inactivation

La protection de l'enzyme par le substrat indique que l'inhibiteur se lie au site actif de l'enzyme (en compétition avec le substrat) (Fig. 39)

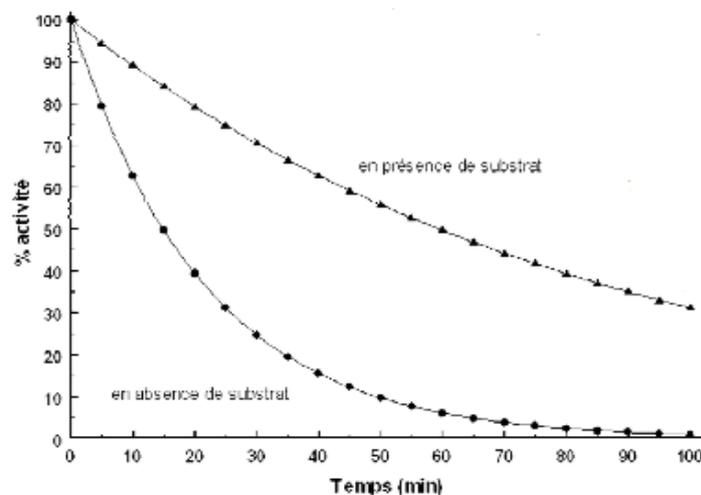


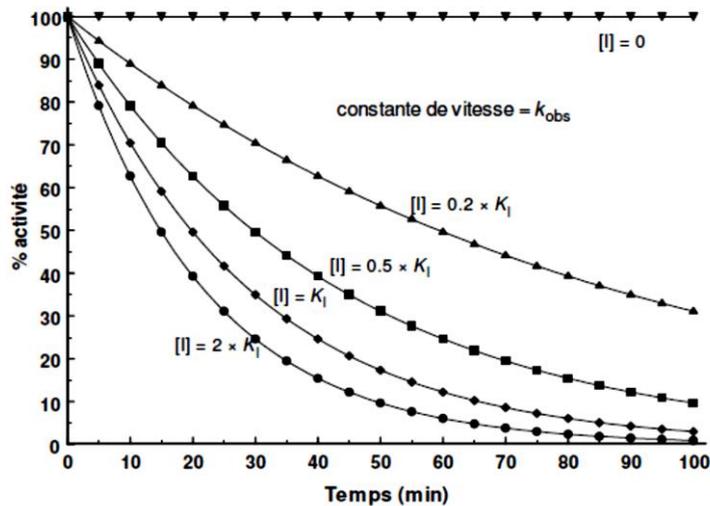
Figure 39: Mécanisme d'inactivation par un inhibiteur irréversible du type marquage par affinité.

Cependant, la protection par le substrat n'est que partielle parce que la formation du complexe covalent E-I est irréversible et celle de E•S est réversible. La présence du substrat retarde donc la formation de E-I mais ne l'élimine pas complètement.

- La proportion d'enzyme sous forme E•I augmente avec la concentration de I. (E•I) s'inactive avec le temps suivant une cinétique du premier ordre (lors de la



consommation de l'enzyme comme un réactif). La valeur de ***k_{inact}*** peut être déterminée expérimentalement en mesurant tout d'abord la perte d'activité en fonction du temps (***k_{obs}***) à différentes concentrations d'inhibiteur :



L'activité enzymatique qui reste en fonction du temps est proportionnelle à la concentration totale des formes d'enzyme qui ne sont pas inactivées :

$$\varepsilon = [\mathbf{E}] + [\mathbf{E} \cdot \mathbf{I}] \quad (\text{Fraction des formes inactivées de E})$$

Et $[\mathbf{E}]_T = [\mathbf{E}] + [\mathbf{E} \cdot \mathbf{I}] + [\mathbf{E} - \mathbf{I}]$

$$K_I = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[\mathbf{E}][\mathbf{I}]}{[\mathbf{E} \cdot \mathbf{I}]}$$

La constante d'inhibition

D'où $[\mathbf{E}] = \frac{[\mathbf{E} \cdot \mathbf{I}] K_I}{[\mathbf{I}]}$

En remplaçant $[\mathbf{E}]$ tirée de cette dernière expression, dans celle de la fraction des formes inactivées d'enzyme on aura :

$$\begin{aligned} \varepsilon &= [\mathbf{E}] + [\mathbf{E} \cdot \mathbf{I}] \\ &= \frac{[\mathbf{E} \cdot \mathbf{I}] K_I}{[\mathbf{I}]} + [\mathbf{E} \cdot \mathbf{I}] \\ &= [\mathbf{E} \cdot \mathbf{I}] \left(1 + \frac{K_I}{[\mathbf{I}]} \right) \\ \text{Donc } [\mathbf{E} \cdot \mathbf{I}] &= \frac{\varepsilon}{\left(1 + \frac{K_I}{[\mathbf{I}]} \right)} \end{aligned}$$

b) L'expression de vitesse de l'inactivation

La vitesse de l'inactivation (c'est-à-dire de la disparition des formes actives de l'enzyme) est donnée par :



$$-\frac{d\varepsilon}{dt} = \text{Kinat} [E \cdot I]$$

Alors,

$$-\frac{d\varepsilon}{[E \cdot I]} = \text{Kinat} dt$$

$$\text{Or } [E \cdot I] = \frac{\varepsilon}{\left(1 + \frac{KI}{[I]}\right)}$$

Donc

$$-\frac{d\varepsilon}{[E \cdot I]} = -\frac{d\varepsilon}{\varepsilon} \left(1 + \frac{KI}{[I]}\right) = \text{Kinat} dt$$

$$-\frac{d\varepsilon}{\varepsilon} = \frac{\text{Kinat}}{\left(1 + \frac{KI}{[I]}\right)} dt$$

En faisant l'intégrale de cette équation entre $t = 0$ (où $\varepsilon = [E]_T$) et t (où $\varepsilon = \varepsilon$) on obtient :

$$-\int_{[E]_T}^{\varepsilon} \frac{d\varepsilon}{\varepsilon} = \frac{\text{Kinat}}{\left(1 + \frac{KI}{[I]}\right)} \int_0^t dt$$

$$\text{Alors } -[\ln \varepsilon - \ln [E]_T] = \frac{\text{Kinat}}{\left(1 + \frac{KI}{[I]}\right)} t$$

$$\text{Donc } -\ln \frac{\varepsilon}{[E]_T} = \frac{\text{Kinat}}{\left(1 + \frac{KI}{[I]}\right)} t$$

D'où on voit que pour la disparition d'activité, la constante de vitesse de la réaction au premier ordre est :

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}}}{\left(1 + \frac{KI}{[I]}\right)}$$

$$\text{De plus } \frac{1}{K_{\text{obs}}} = \frac{1}{K_{\text{inact}}} + \left(\frac{KI}{K_{\text{inact}}}\right) \cdot \frac{1}{[I]}$$

c) Détermination de K_{inact}

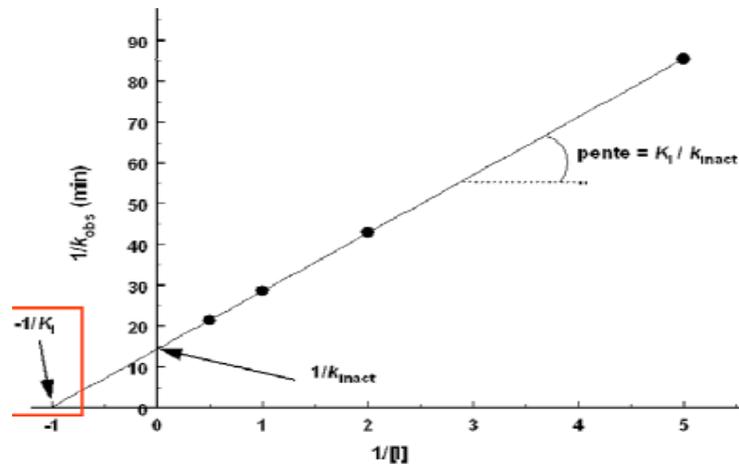
D'après l'expression suivante

$$\frac{1}{K_{\text{obs}}} = \left(\frac{KI}{K_{\text{inact}}}\right) \cdot \frac{1}{[I]} + \frac{1}{K_{\text{inact}}}$$

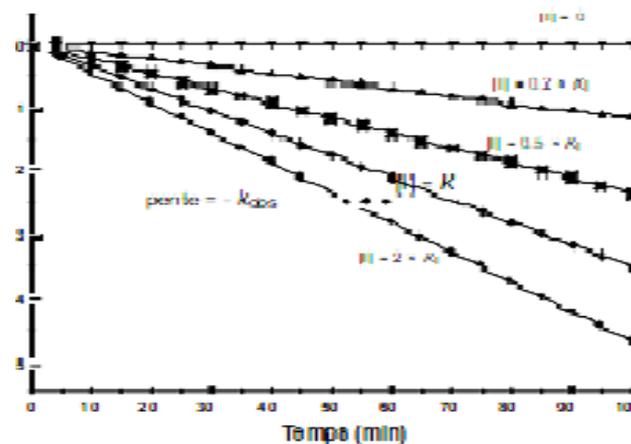
On voit que le graphique $\frac{1}{K_{\text{obs}}} = f\left(\frac{1}{[I]}\right)$ donne **une ligne droite** de pente $\left(\frac{KI}{K_{\text{inact}}}\right)$ et



l'ordonnée à l'origine est $\frac{1}{K_{inact}}$



- Le K_{inact} est donc la constante de vitesse maximale d'inaction (lorsque la totalité de l'enzyme est sous forme $E \cdot I$) et le K_I est la concentration de l'inhibiteur qui donne une moitié de la vitesse maximale d'inactivation.
- La constante de vitesse d'inactivation (k_{obs}) est déterminée pour chaque concentration d'inhibiteur.



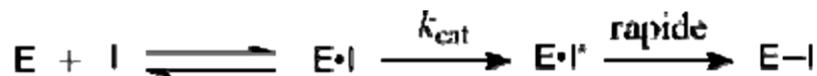
- Notez aussi que l'inactivation de l'enzyme par une réaction du premier ordre indique la formation d'un complexe intermédiaire ($E \cdot I$), tandis que l'inactivation selon une réaction du deuxième ordre indiquerait la réaction entre E et I libres en solution.

II.1.2 Inhibiteurs basés sur le mécanisme (substrats du type « suicide »)

Ces inhibiteurs appelés aussi inactivateurs « suicides », peuvent se lier de manière covalente à l'enzyme (parfois une liaison stable non covalente est engagée entre l'inhibiteur et l'enzyme), modifier ou détruire certains groupements fonctionnels



nécessaires à l'activité catalytique. Ils sont caractérisés par la *nécessité* d'une activité catalytique de l'enzyme pour générer l'espèce réactive (c'est-à-dire qu'ils doivent être activés par l'enzyme). En effet, mis en présence d'enzyme, l'inhibiteur suicide subit les premières étapes de la catalyse mais au lieu d'être transformé en produit, il est converti en un composé très réactif (souvent des espèces électrophiles) capable de se combiner de manière irréversible à celle-ci. L'inhibiteur fonctionne donc en partie comme un substrat:



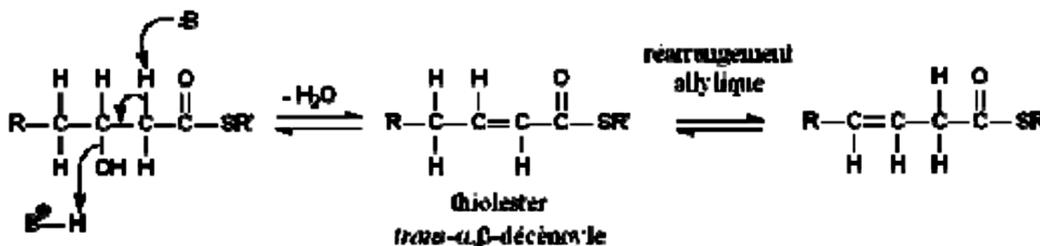
La plupart de ces inhibiteurs ne sont pas de très bons substrats avec des K_{cat} de $10^3 - 10^5$ fois plus faibles que le substrat naturel. De façon générale, l'étape limitante est au niveau de k_{cat} .

Les caractéristiques de l'inhibition sont les mêmes que celles des réactifs du site actif (marqueurs par affinité), en incluant notamment la cinétique de saturation et la réaction d'inactivation du premier ordre. La différence des mécanismes d'inactivation se situe au niveau de la participation de l'activité catalytique de l'enzyme (k_{cat}) au processus d'inactivation (**le besoin de transformation enzymatique**).

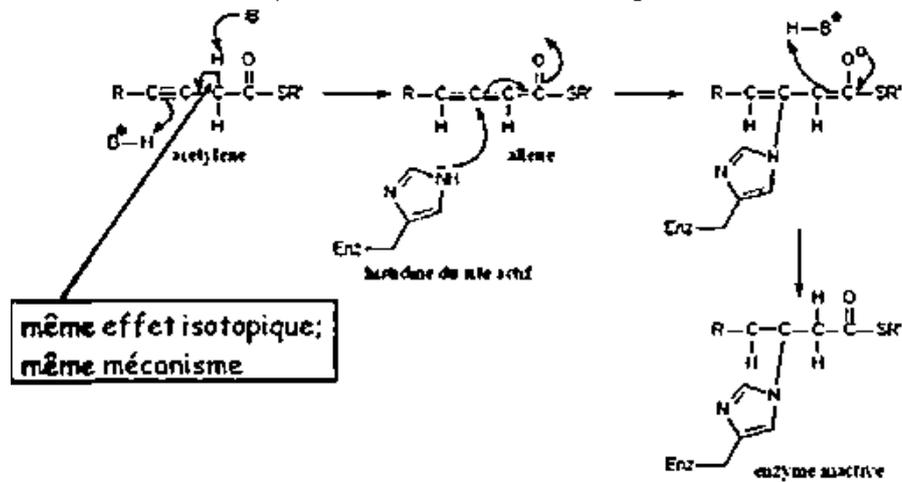
➤ **Exemples de l'inhibition par de réactions « suicides » :**

a) **Inhibition de la déshydrase de thiolester β -hydroxydécanoyle par un analogue acétylène**

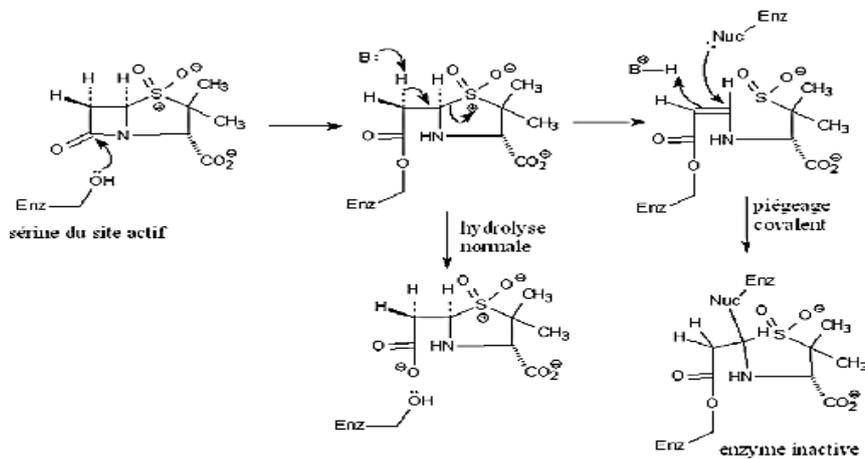
La réaction normale qui a lieu pendant la synthèse des Acides gras est comme suit :



Dans la réaction suicide avec un analogue acétylène, un résidu histidine est modifié de manière covalente :

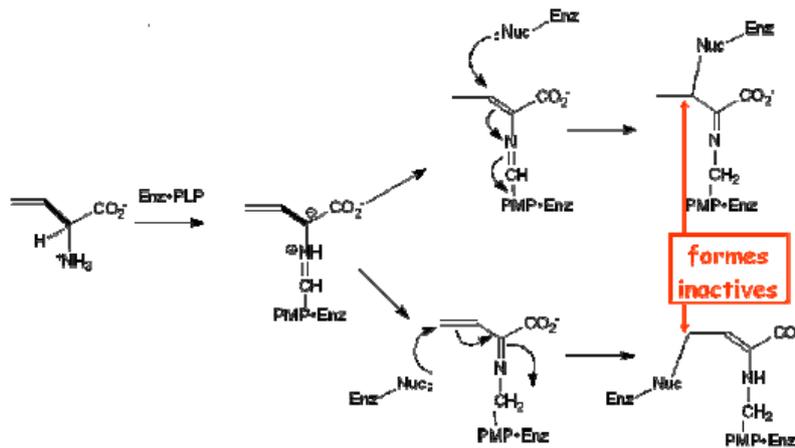


b) Inhibition de la β -lactamase par des analogues de pénicilline



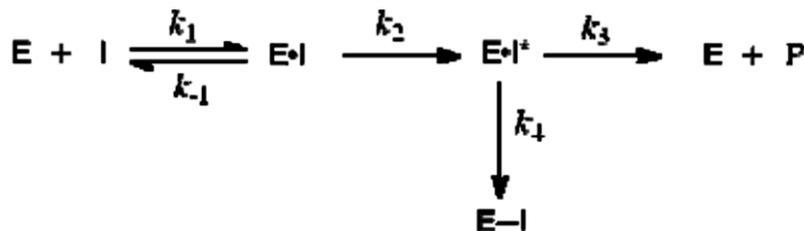
c) Inhibition des transaminases par un analogue d'acide aminé

Après réaction avec le phosphate de pyridoxal, la vinylglycine peut réagir avec un résidu nucléophile dans le site actif de l'enzyme :



➤ Réaction avec inhibiteur irréversible et formation de produit

Dans la plupart des cas où l'inhibition est relié au mécanisme de la réaction native, une certaine quantité d'inhibiteur est transformée en produit, *sans inactivation de l'enzyme*. Considérons le schéma mécanistique suivant :



Le rapport $r = \frac{k_3}{k_4}$ (ce qui représente la proportion molaire pour l'inactivation) définit le nombre de fois que le substrat suicide est transformé en produit analogue pour chaque réaction menant à l'inactivation. La valeur de r est constante et indépendante de la concentration de substrat ou d'enzyme puisqu'elle représente le partage d'un intermédiaire commun.

II.2. Inhibition par excès de substrat

Pour de nombreuses réactions enzymatiques, une diminution de l'activité peut s'observer dès que la concentration du substrat dépasse un certain seuil. Le schéma réactionnel de l'inhibition provoquée par une concentration relativement élevée de substrat implique la formation d'un complexe ternaire inactif (ESS). Parmi les exemples (fructose-1,6-diphosphatase, ribulose biphosphatase, carboxypeptidase, carboxylase,...etc.) illustrant ce mécanisme, le plus connu est celui de l'acétylcholinestérase. Cette enzyme a en effet la



capacité de fixer une deuxième molécule de substrat après que la première soit partiellement liée au site actif. La fixation d'une seconde molécule de substrat par l'acylenzyme constitue une autre possibilité d'abaisser la vitesse de la réaction. Cette diminution de la vitesse de la réaction est due principalement à une insertion inadéquate du substrat dans le site actif (Fig. 40)

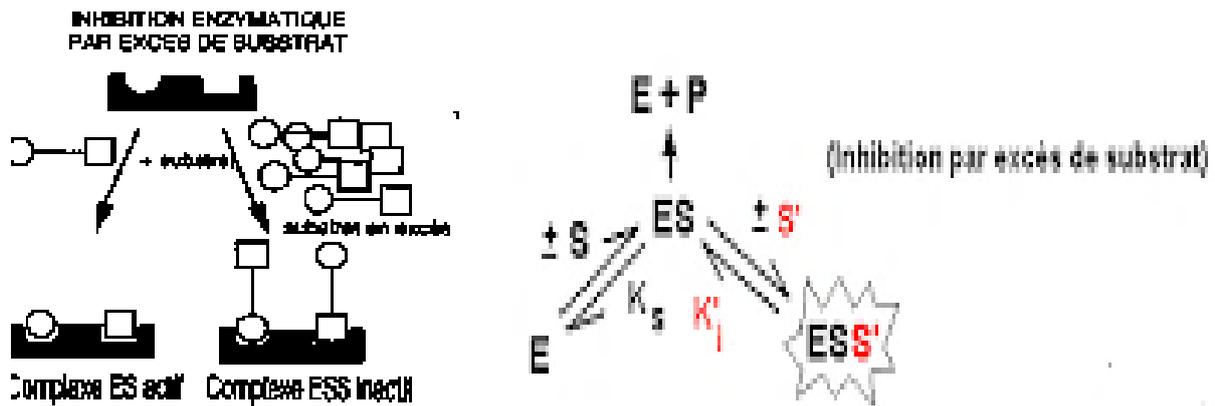
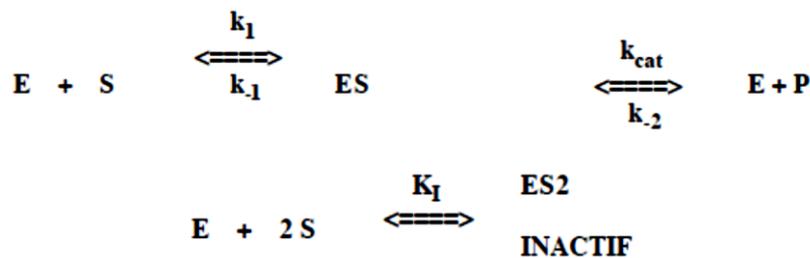


Figure 40 : Schéma du mécanisme réactionnel de l'inhibition par excès de substrat.

Le mécanisme réactionnel de l'inhibition par excès de substrat s'écrit comme suit :



Par ailleurs, les relations :

$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1}$, $k_{cat} = k_2$ et $[E]_T = [E] + [ES] + [ESS]$. Permettant d'obtenir :

$$\frac{v}{[E]_T} = \frac{k_{cat} [ES]}{[E] + [ES] + [ESS]}$$

$$\frac{v}{[E]_T} = \frac{k_{cat} \frac{[E][S]}{K_S}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_S} + \frac{[E][S][S]}{K_{SS}}} = \frac{v}{[E]_T} = \frac{k_{cat} \frac{[E][S]}{K_S}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_S} + \frac{[E][S][S]}{K_{SS}}}$$

Après simplification et réarrangement on aura :

$$\frac{v}{[E]_T} = \frac{k_{cat} [S]}{K_S + [S] + \frac{[S]^2}{K_{SS}}}, \text{ et comme } V_{max} = k_{cat} [E]_T$$



Par conséquent, l'expression de la vitesse de la réaction est :

$$v = \frac{Vmax [S]}{Ks + [S] + \frac{[S]^2}{KSS}}$$

Cette relation peut être écrite sous forme :

$$v = \frac{Vmax}{\frac{Ks}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{KSS}}, \text{ qui aux fortes concentrations de substrat devient :}$$

$$v = \frac{Vmax}{1 + \frac{[S]}{KSS}}$$

En d'autres termes, la vitesse v est égale à une fraction de la vitesse maximale (V_{max}) ; v variant de manière inverse par rapport à $[S]$ montre un profil caractéristique aux fortes concentrations de substrat (**Fig. 41**)

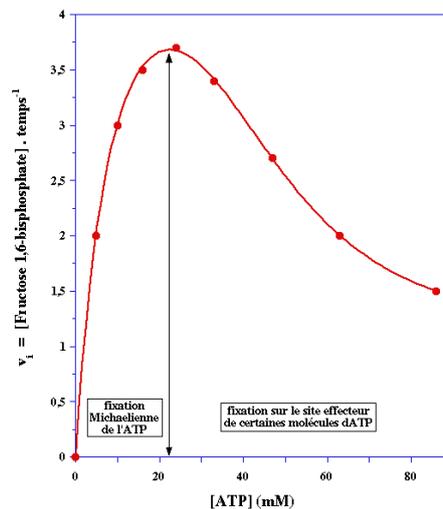


Figure 41: Profil de l'inhibition par excès de substrat

Aux faibles concentrations de substrat, le terme $\frac{[S]^2}{KSS}$ de l'expression de vitesse de la réaction est négligeable devant $[S]$ et permet d'obtenir l'équation de Michaelis-Menten :

$$v = \frac{Vmax [S]}{Km + [S]}$$

Il en découle que la représentation de Lineweaver-Burk montre une linéarité uniquement pour des concentrations faibles ou modérées de substrat (**Fig. 42**)

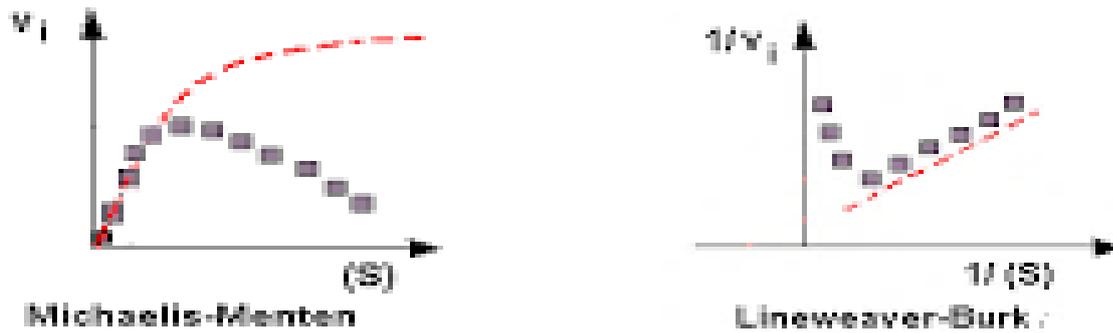


Figure 42 : Représentation des doubles inverses dans le cas d'une inhibition par excès de substrat.

La partie non linéaire de la courbe des doubles inverses correspond à l'inhibition décrite par la relation :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[S]}{K_{ss}}}$$

L'inverse de cette relation est :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max} K_{ss}} [S] + \frac{1}{V_{max}}$$

La représentation $1/v = f(1/[S])$ est linéaire pour les fortes concentrations de substrat. La partie non linéaire de la courbe, située à des concentrations de substrat faibles ou modérées, correspond à l'équation de Michaelis-Menten (Fig. 43). Cette représentation permet de déterminer la constante d'inhibition K_{ss} (abscisse à l'origine de la droite extrapolée).

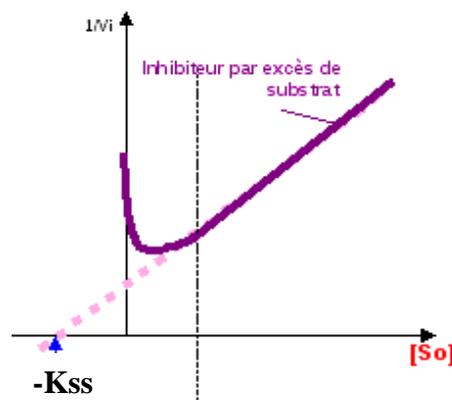


Figure 43 : Détermination de la constante d'inhibition (K_{ss}) pour l'inhibition par excès de substrat.

Chapitre V

Les enzymes à deux substrats



En réalité, les réactions enzymatiques simples n'impliquant qu'un substrat et qu'un produit sont rares et restent limitées à quelques réactions d'isomérisation, comme la conversion du glucose 1-phosphate en glucose 6-phosphate catalysée par la phosphoglucomutase. La majorité des réactions implique plusieurs substrats et libère plusieurs produits. Ainsi, par exemple, la lactate déshydrogénase (EC1.1.1.27), la créatine kinase (EC2.7.3.2) et l'alcool déshydrogénase de levure (EC 1.1.1.1) utilisent deux substrats.

L'étude cinétique des réactions enzymatiques à deux substrats a pour but de déterminer l'ordre de fixation des substrats, les constantes cinétiques caractérisant la fixation de chacun d'eux en présence et en absence de l'autre ainsi que la vitesse maximale de la réaction qui est mesurée quand les deux substrats sont à concentration saturante.

Nous traiterons dans ce chapitre, la cinétique d'une réaction à deux substrats et deux produits (système **Bi-Bi**) de type :



Ce type de réaction est particulièrement commun en biochimie : dans une compilation de toutes les réactions enzymatiques connues, environ 60% des réactions appartiennent aux trois premières classes d'enzymes (réactions d'oxydoréduction, de transfert de groupe et d'hydrolyse), sont toutes décrites par le mécanisme de l'équation [1]. Des réactions plus complexes ont également été identifiées dans lesquelles quatre ou cinq substrats peuvent être impliqués, mais celles-ci peuvent être la plupart du temps étudiées en généralisant les principes établis pour les réactions à deux substrats et deux produits.

Selon le mécanisme réactionnel, les réactions enzymatiques impliquant deux substrats et libérant deux produits (Bi-Bi) sont subdivisées en deux classes :

1. **Les réactions à mécanisme séquentiel (ou à simple déplacement)** : C'est un système où les substrats doivent se fixer à l'enzyme avant que n'importe lequel des produits soit relargué (il y a formation d'un complexe ternaire : EAB). Ces réactions se subdivisent à leurs tours, en mécanisme séquentiel ordonné et mécanisme séquentiel au hasard (aléatoire).
2. **Les réactions non séquentiel, dit également « à double déplacement » (ou mécanisme Ping-Pong)** : C'est un système où un produit est relargué entre les additions successives des substrats. Au cours de ce type de réactions, les combinaisons ES sont des binaires.



I. Approche expérimentale

Afin d'étudier une réaction enzymatique à deux substrats, nous procédons en deux étapes :

1.1 Première étape

On effectue l'expérience avec le premier substrat (A) en excès (appelé le substrat « *fixe* ») et on mesure la vitesse en faisant varier le substrat B (*substrat variable*) et ceci en phase stationnaire.

1.2 Deuxième étape

On prend B en excès et on fait varier A pour mesurer les vitesses en phase stationnaire. Les deux étapes (cinétiques) sont de type Michaelienne, mais le traitement mathématique est complexe et c'est pourquoi on utilise la notation de **Cleland (1963)**.

➤ Représentation de Cleland

La manière schématique de représentation des mécanismes des réactions à deux ou plusieurs substrats a été introduite par **Cleland en 1963**. Dans ce système, les différents états de l'enzyme sont décrits en une ligne horizontale et des flèches verticales sont utilisées pour représenter la fixation des substrats et la libération de produits.

II. Mécanisme séquentiel ou à simple déplacement

Dans ce type de réaction, les deux substrats se combinent à l'enzyme avant la libération du premier produit. Il y a donc *formation d'un complexe ternaire* qui rassemble l'enzyme et les deux substrats en un seul complexe (**EAB**). Le mécanisme séquentiel se subdivise en deux types, ordonné et au hasard (aléatoire), selon la fixation des substrats (A et B) et la libération des produits (P et Q). Un grand nombre de réactions Bi-Bi sont des réactions de transfert de groupes.

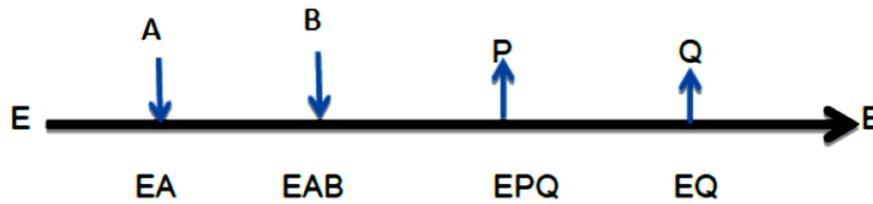
II.1 Mécanisme Bi-Bi ordonné : Dans ce système, la fixation des (S) et la libération des produits *est ordonnée (ordre imposé)*. Le substrat (A) se fixe obligatoirement au stade initial, car (A) présente une grande affinité pour (E). La présence ou l'absence de (B), ne la modifie pas alors que l'affinité de (B) pour (E) est pratiquement nulle (**K_B est infinie**) et n'est significative que pour le complexe (EA). Donc (B) ne peut se fixer que secondairement donnant ainsi naissance à la combinaison ternaire (EAB). La suite de la réaction conduit à la libération du produit (P) qui a moins d'affinité avec l'enzyme puis le produit (Q) (qui a plus



d'affinité pour l'enzyme que P). C'est un mode observé en particulier avec les déshydrogénases.

a) Représentation de Cleland

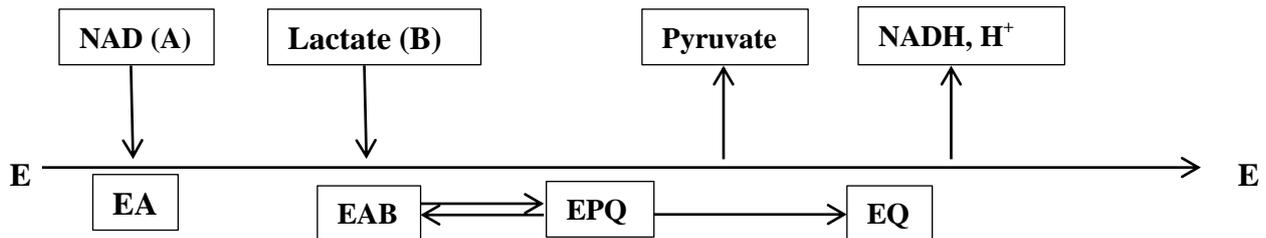
Le chemin réactionnel du mécanisme Bi-Bi ordonné est représenté par Cleland comme suit :



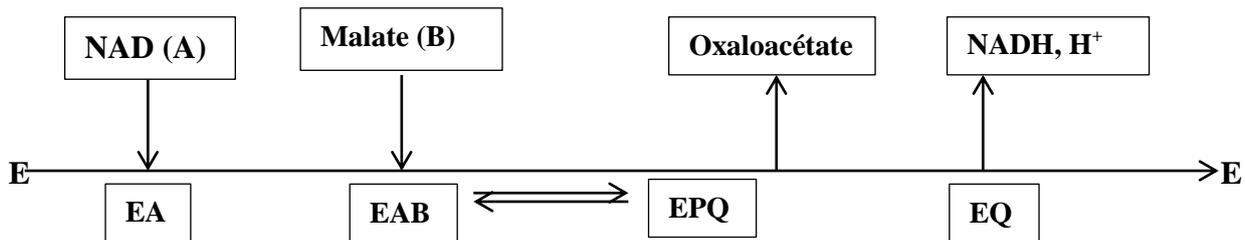
Représentation de Cleland du mécanisme Bi-Bi ordonné.

Exemples :

- ✓ **Cas de lactate déshydrogénase (LDH).** Certains enzymes nécessitent la présence d'un coenzyme dissociable. Pour l'analyse, le coenzyme peut être considéré comme un second substrat.



- ✓ **L'oxydation du malate en oxaloacétate par La malate déshydrogénase.**



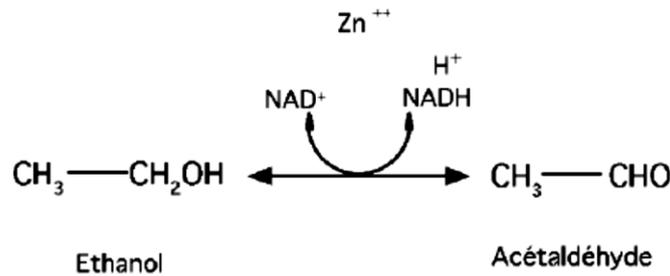
La malate déshydrogénase est une enzyme, qui catalyse l'oxydation du malate en oxaloacétate en réduisant simultanément un coenzyme NAD^+ en NADH.

- Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour le malate si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD^+ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire **Enzyme- NAD^+ -Malate** se transforme en un complexe Enzyme-NADH-Oxaloacétate ; ce dernier se dissocie en libérant l'oxaloacétate puis le NADH



(Forme réduite du NAD⁺).

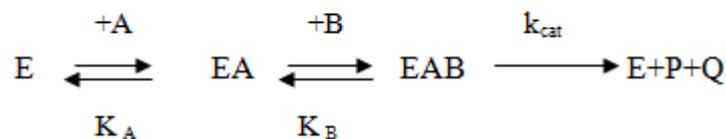
✓ L'alcool Déshydrogénase :



L'alcool déshydrogénase est une enzyme, qui catalyse l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde en réduisant simultanément un coenzyme NAD⁺ en NADH.

• Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bi bi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour l'alcool si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD⁺ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme-NAD⁺-Ethanol se transforme en un complexe Enzyme-NADH-Acétaldéhyde ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'acétaldéhyde puis le NAD réduit (NADH).

b) **Cinétique du mécanisme Bi-Bi ordonné :** Le schéma réactionnel de ce mécanisme est le suivant :



- En se plaçant à l'état stationnaire dans les conditions de la vitesse initiale de la réaction (où [P]= [Q]= 0M.) et parla méthode dite de l'équilibre rapide on a :
- La concentration de l'enzyme totale est égale à : $[E]T = [E] + [EA] + [EAB]$.
- La vitesse de la réaction correspond à la vitesse de transformation du complexe (EAB) en produits (Pet Q). Elle est exprimée en : $v = kcat[EAB]$
- La vitesse maximale de la réaction est égale à : $vmax = kcat[E]T$
- les constantes d'équilibre des deux étapes K_A et K_B sont :

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \qquad K_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

D'où $[EA] = \frac{[A]}{K_A} [E]$ et $[EAB] = \frac{[B]}{K_B} [EA] = \frac{[B]}{K_B} \frac{[A]}{K_A} [E]$

Alors $\frac{v}{[E]T} = kcat \frac{[EAB]}{[E]T}$



$$= \frac{k_{cat} \frac{[B]}{K_B} \frac{[A]}{K_A} [E]}{[E] + \frac{[A]}{K_A} [E] + \frac{[B]}{K_B} \frac{[A]}{K_A} [E]}$$

En divisant sur [E] on aura : $\frac{v}{[E]T} = \frac{k_{cat} \frac{[B]}{K_B} \frac{[A]}{K_A}}{1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[B]}{K_B} \frac{[A]}{K_A}}$

Donc $[E]T \frac{k_{cat}[A][B]}{K_A K_B} = v \left(1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A][B]}{K_A K_B} \right)$

Or $V_{max} = k_{cat}[E]T$

Donc $v = \frac{V_{max} \frac{[A][B]}{K_A K_B}}{\left(1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A][B]}{K_A K_B} \right)}$

En divisant le numérateur et le dénominateur sur $\left(\frac{[A][B]}{K_A K_B} \right)$ on aura : $v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A \cdot K_B}{[A][B]}}$

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}}$$

c) **Représentations graphiques** : Soit en double inverse $1/v = f(1/[S])$. Nous fixant l'un des deux substrats (A ou B) et nous variant l'autre.

o à $[B] = Cte$: la représentation graphique se fait en fonction de A [$1/v = f(1/[A])$]

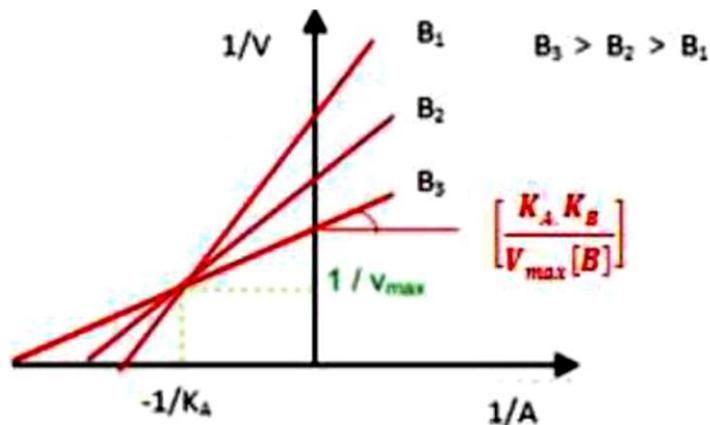
On a : $v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}}$ d'où $\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}}{V_{max}}$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]} \right)$$

$$= \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_B}{[B] V_{max}} + \frac{K_A K_B}{[A][B] V_{max}}$$

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{V_{max}} + \frac{K_A K_B}{[B] V_{max}} \right) \frac{1}{[A]} + \left(1 + \frac{K_B}{[B]} \right) \frac{1}{V_{max}}$$

Le tracé des représentations primaires $1/V = f(1/A)$ pour différentes concentrations de B, représenté dans la **figure 44**, donne un faisceau de droites qui se coupent sur l'axe des ordonnées (au-dessus de l'axe des abscisses), en un point d'ordonnée $1/V_{max}$. Dans ce cas, l'abscisse du point d'intersection est $-1/K_A$. A des concentrations saturante en (B) ($[B]=\infty$), les points d'intersection de la droite $1/v = f(1/[B])$ avec l'axe des ordonnées (y) et celui des abscisses (x) donnent : $1/V_{max}^A$ (la vitesse mesurée est égale à V_m , même aux faibles valeurs de A) et $-1/K_m^A$ respectivement.



✓

Figure 44: Représentation Primaire $1/V = f(1/[A])$.

- Quand $1/[A]=0$: $\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{K_m B}{[B]}\right) \frac{1}{V_{max}} = \frac{1}{V_{max} app}$
- Quand $[A] = -K_A$: $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}$

A partir des valeurs de V pour $(1/[A]=0)$ (c'est-à-dire les valeurs de $1/V_{max}^{app}$ pour chaque concentration de B), on trace un graphique secondaire, qui représente la droite

$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{K_m B}{[B]}\right) \frac{1}{V_{max}}$, qui a l'allure des droites Michaeliennes. Elle permet de déterminer K_m^B (Fig. 45).

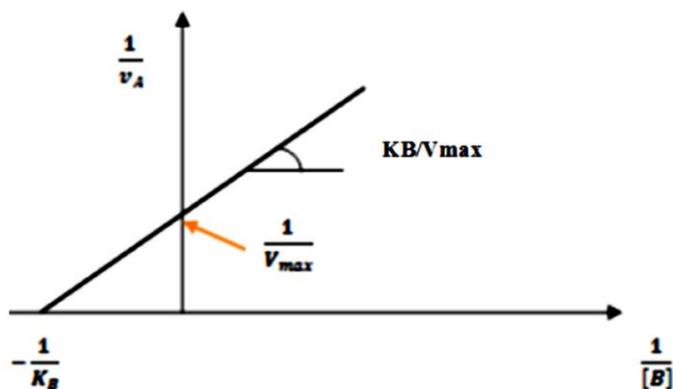


Figure 45 : La représentation graphique secondaire $1/v_A = f(1/[B])$.

- En cas la [A] est constante, la représentation graphique se fait donc en fonction de (B) : $1/v = f(1/[B])$ ([A] = cte).

On a:

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}\right) \frac{1}{V_{max}}$$



Alors,

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{KB}{V_{max}} \frac{1}{[B]} + \frac{KAKB}{V_{max}[A]} \frac{1}{[B]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{KmB}{V_{max}} \left(1 + \frac{KA}{[A]}\right) \frac{1}{[B]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{KmB}{V_{max}} \left(1 + \frac{KA}{[A]}\right) \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Nous remarquons qu'à des concentrations saturantes en (A) ($[A]=\infty$),

$$\frac{1}{v} = \frac{KmB}{V_{max}} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Alors, $\forall [A]$, quand $1/[B] = 0$:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}}$$

L'indépendance de V_{max} à la concentration du substrat (A), indique que ce dernier se fixe initialement à l'enzyme.

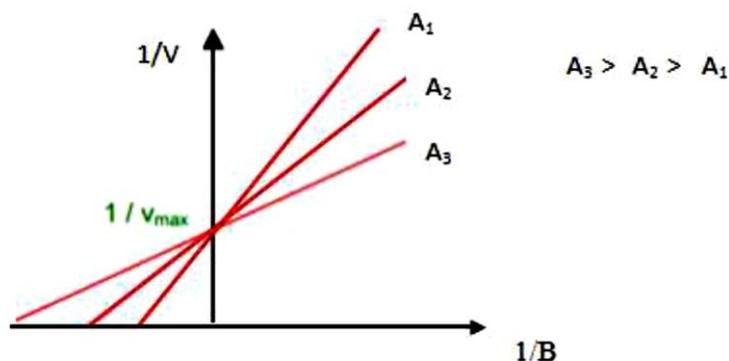


Figure 46: Représentation Primaire : $1/V = f(1/[B])$

Le tracé $1/V = f(1/[B])$ pour différentes concentrations de A, montre un ensemble de droites qui se coupent sur l'axe des ordonnées (des y) (puisque'il n'y a qu'un seul point : $1/v = cte$, il n'y a donc pas de représentation secondaire) (**Fig. 46**). Du moment que B ne se fixe que sur le complexe (EA), sa présence en excès déplace l'équilibre entre E et A vers les formes complexées et toute l'enzyme est alors sous la forme EA-B; on mesure ainsi la vitesse maximale.

II.2 Mécanisme Bi-Bi aléatoire (au hasard)

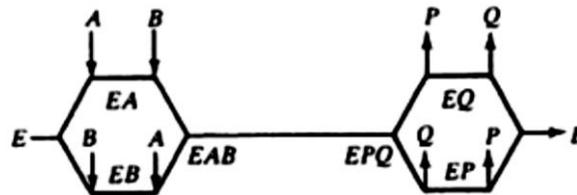
Pour ce mécanisme, les deux substrats, A et B, se fixent à l'enzyme libre E sans aucun ordre (de manière *aléatoire*) c'est-à-dire qu'il n'y a pas de fixation privilégiée de l'un ou l'autre des deux substrats) pour construire le complexe ternaire (EAB) puisque l'enzyme libre



présente des affinités équivalentes pour les deux substrats et la fixation d'un substrat en 1^{ère} position, dépend de la concentration de ce dernier (c.-à-d. c'est le substrat se trouvant en plus grande concentration qui se fixera en 1^{er}).

a) Représentation de Cleland

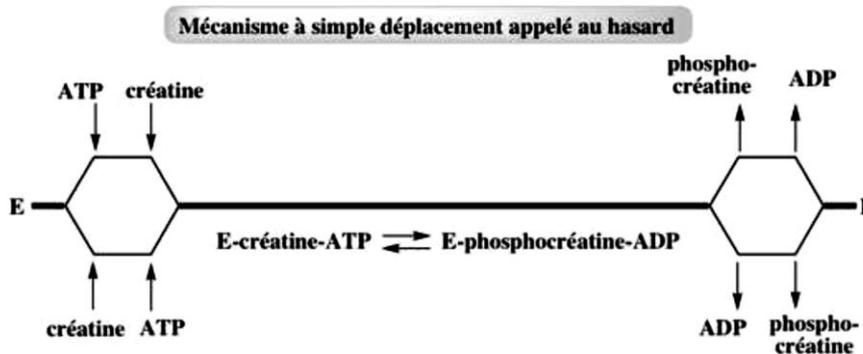
La représentation de ce mécanisme réactionnel selon Cleland est la suivante :



Représentation de Cleland d'un mécanisme Bi-Bi aléatoire

- ✓ **Exemple de bibi aléatoire:** Un bon nombre de réactions enzymatiques à deux substrats s'effectuent selon un mécanisme Bi-Bi séquentiel aléatoire comme celui de l'adénylate kinase (EC2.7.4.3), la glutathion S-transférase, la citrate synthétase (EC 4.1.3.7), l'hexokinase (EC 2.7.1.1) et la créatine kinase (EC 2.7.3.2).

➤ **la créatine Phosphokinase**



La créatine phosphokinase (CPK), catalyse le transfert d'un radical phosphoryl du substrat, le phosphate de créatine, vers un coenzyme transporteur, l'ADP.

- L'affinité de l'enzyme pour ces deux corps chimiques étant voisine, la liaison de l'enzyme avec chacun d'entre eux se fait dans un ordre qui dépend uniquement des concentrations.

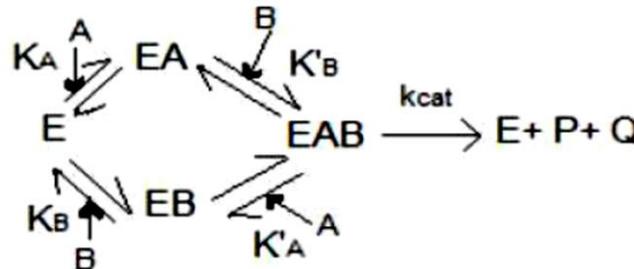


b) Cinétique du mécanisme Bi-Bi aléatoire.

Selon l'hypothèse de quasi-équilibre l'équation de la vitesse de formation des produits la

$$V_i = K [ES] \text{ réaction a un substrat}$$

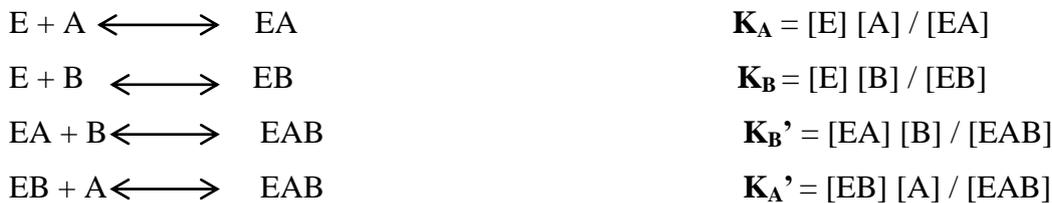
$$V_i = K [EAB] \text{ réaction a deux substrats}$$



Dans ce mécanisme, la fixation des deux substrats peut être soit :

- ✓ Dépendante : Dans le cas où la fixation de (A) modifie l'affinité de l'enzyme pour fixer (B) et réciproquement,
- ✓ Ou bien indépendante, dans le cas où l'association de l'un des substrats s'effectue de la même manière en présence ou en absence de l'autre substrat.

La réaction implique l'existence de quatre constantes d'équilibre K_A , K_B , K'_A et K'_B :



K_A : constante de formation du complexe EA ; K_B : constante de formation du complexe EB, autrement dit, c'est les constante d'équilibres entre l'enzyme libre et les substrats.

K'_A et K'_B : constantes de dissociation de EAB ou les constantes de Michaelis des substrats A et B respectivement, c'est à dire les concentrations [substrat] pour lesquelles la vitesse (mesurée à concentration saturante de l'autre substrat) est égale à la moitié de la vitesse maximale.

A partir de ces relations, nous tirons :

$$[EA] = \frac{[A]}{K_A} [E]$$

$$[EB] = \frac{[B]}{K_B} [E]$$

$$[EAB] = \frac{[B]}{K'_B} [EA] = \frac{[A]}{K'_A} [EB]$$



Il faut exprimer [EA] et [EB] en fonction de celle de complexe productif [EAB]. En effet, en remplaçons [EB] et [EA] dans l'expression de [EAB] par leurs expressions tirées de celles de K_A et K_B précédentes, on aura :

$$[EAB] = \frac{[B]}{K_B'} \frac{[A]}{K_A} [E] = \frac{[A]}{K_A'} \frac{[B]}{K_B} [E]$$

Nous remarquons que $K_A' K_B = K_B' K_A$

Dans ce type de système, le nombre des formes de l'enzyme est plus élevé que celui précédent (Bi-Bi ordonné). Ainsi l'enzyme peut être sous forme : E, EA, EB ou EAB.

D'où $[E]_T = [E] + [EA] + [EB] + [EAB]$.

Pour simplifier les calculs, nous nous plaçons dans les conditions de vitesse initiale (P et Q ne sont pas encore formés).

On $v = k_{cat} [E]_T$ a
et $V_{max} = k_{cat} [EAB]$

$$\begin{aligned} \text{Alors, } \frac{v}{V_{max}} &= \frac{[EAB]}{[E]_T} = \frac{\frac{[A][B]}{K_A' K_B} [E]}{[E] \left(1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[B]}{K_B} + \frac{[A][B]}{K_A' K_B}\right)} \\ &= \frac{\frac{[A][B]}{K_A' K_B}}{\left(1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[B]}{K_B} + \frac{[A][B]}{K_A' K_B}\right)} \end{aligned}$$

En divisant sur $\left(\frac{[A][B]}{K_A' K_B}\right)$ on aura :

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{1}{\left(\frac{[A][B]}{K_A' K_B}\right) + \frac{[A]}{K_A} \left(\frac{[A][B]}{K_A' K_B}\right) + \frac{[B]}{K_B} \left(\frac{[A][B]}{K_A' K_B}\right) + 1}$$

$$\text{Alors, } \frac{v}{V_{max}} = \frac{1}{\left(\frac{K_A' K_B}{[A][B]} + \frac{K_B'}{[B]} + \frac{K_A'}{[A]} + 1\right)}$$

$$\text{D'où : } v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_B'}{[B]} + \frac{K_A'}{[A]} + \left(\frac{K_A' K_B}{[A][B]}\right)}$$

$$\text{Donc } \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B'}{[B]} + \frac{K_A'}{[A]} + \frac{K_A' K_B}{[A][B]}\right)$$

Pour chaque concentration de A ou de B, la vitesse en fonction de A ou de B suit la loi de Michaelis et la vitesse maximale est obtenue lorsque l'enzyme est saturé en A et en B:



$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K'_A}{[A]} + \frac{K'_B}{[B]} + \frac{K_A K'_B}{[A][B]} \right)$$

➤ à [B] saturantes : [A] = K_A'

$$v = \frac{V_{max}}{(1 + 1 + 0 + 0)} = \frac{V_{max}}{2}$$

Donc $K_A' = K_m^A$

➤ à [A] saturantes : [B] = K_B'

De même $v = \frac{V_{max}}{2}$ et $K_B' = K_m^B$

$$\text{Alors, } v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m^B}{[B]} + \frac{K_m^A}{[A]} + \left(\frac{K_m^B K_A}{[A][B]} \right)}$$

c) Représentations graphiques $1/v = f(1/[S])$

1) à [B] constante, $1/v = f(1/[A])$ (Fig. 47)

On a :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]} + \left(\frac{K_m^B K_A}{[A][B]} \right)} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]} + \left(\frac{K_m^A K_B}{[A][B]} \right)}$$

$$\text{Donc } \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]} + \frac{K_m^A K_B}{[A][B]} \right)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right) + \frac{K_m^A}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]} \right) \frac{1}{[A]}$$

Cette équation est linéaire du type : $y = a x + b$ (quand B est constante)

Nous remarquons également que :

● [B] = ∞ (saturante) :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m^A}{V_{max}} \frac{1}{[A]} \quad (\text{Puisque } \frac{K_m^B}{[B]} \text{ et } \frac{K_B}{[B]} \longrightarrow 0)$$

● [B] = limitante : expression complète de l'équation

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right) + \frac{K_m^A}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]} \right) \frac{1}{[A]}$$

● $\frac{1}{[A]} = 0$: $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right)$

● [A] = KA : $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right) + \frac{K_m^A}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]} \right) \frac{1}{[A]}$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]} + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{(K_A) K_m^B}{(-K_A)[B]} \right)$$



Après simplification on aura :

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{KmA}{[A]}\right) \frac{1}{Vmax} \text{ Ou } \frac{1}{v} = \left(1 - \frac{KmA}{KA}\right) \frac{1}{Vmax} \text{ (puisque } [A] = -KA)$$

Donc quand $[A] = -KA, \forall [B], \frac{1}{v} = cte.$

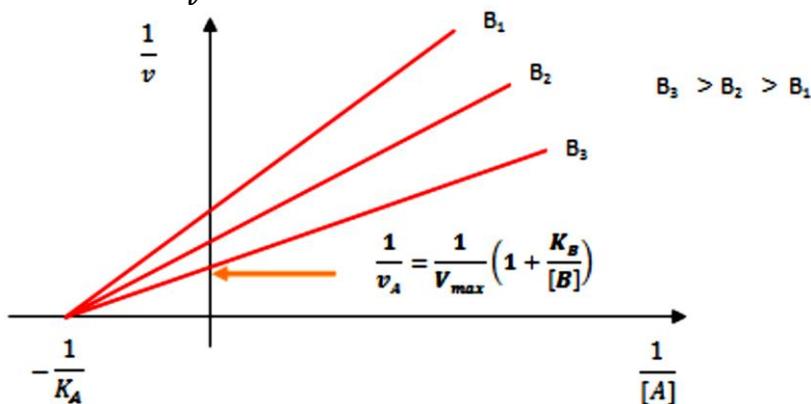


Figure 47 : Représentation Primaire : $1/v$ f ($1/[A]$) du mécanisme Bi-Bi aléatoire

Nous remarquons que ce graphique *ne permet pas de déterminer* K_B alors que celle de K_A, K_m^A , et V_{max} *est possible*. Il est donc nécessaire de tracer un graphique secondaire pour déterminer K_B et ce, en prenant les valeurs de $1/v$ pour les différentes concentrations en (B) quand $1/[A] = 0$ d'où :

$$\frac{1}{v} = \frac{KmB}{Vmax} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{Vmax}$$

La représentation secondaire (Fig. 48) est effectuée donc depuis les points d'intersection avec l'axe des ordonnées dans la figure 47 précédente et permet de tracer le graphe selon l'équation : à $[A]$ constante, $1/v = f(1/[B])$

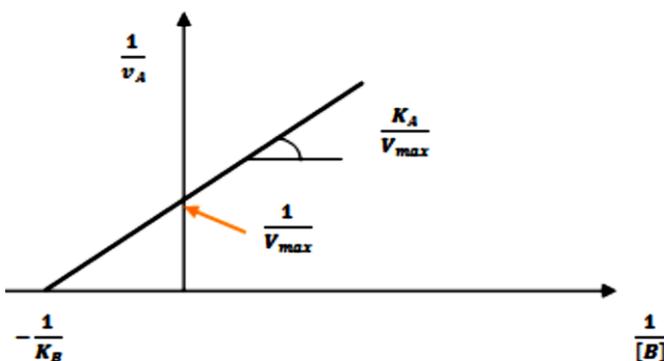


Figure 48 : Représentation secondaire $1/v_A$ f ($1/[B]$) du mécanisme Bi-Bi aléatoire.



2) à [A] constante : nous traçons $1/v = f(1/[B])$ (Fig. 49)

$$\text{On a } \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{KmA}{[A]} + \frac{K_mB}{[B]} + \frac{KmA K_B}{[A][B]} \right)$$

$$\text{Ou bien } \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{KmA}{[A]} + \frac{K_mB}{[B]} + \frac{K_mB K_A}{[A][B]} \right)$$

Pour écrire cette équation en fonction de (B) on aura :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_mB}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_A}{[A]} \right) \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{KmA}{[A]} \right)$$

Cette équation est du type $y = a x + b$

$$\text{Où } y = \frac{1}{v} ;$$

$$a = \frac{K_mB}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_A}{[A]} \right) ;$$

$$x = \frac{1}{[B]} ;$$

$$\text{Et } b = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{KmA}{[A]} \right)$$

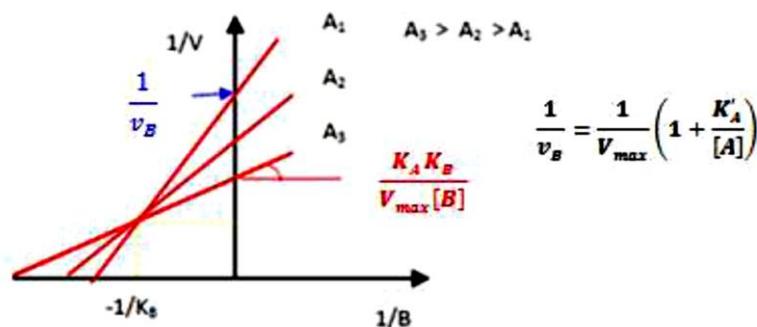


Figure 49 : Représentation primaire $1/v_A f(1/[B])$ du mécanisme Bi-Bi aléatoire
 Nous remarquons également que :

$$\bullet [A]=\infty \text{ (saturante) : } \frac{KmA}{[A]} \longrightarrow 0 \text{ et } \frac{K_A}{[A]} \longrightarrow 0$$

D'où l'équation précédente devient :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_mB}{V_{max}} \frac{1}{[B]} \text{ C'est la représentation des doubles inverse de l'équation de Michaelis-}$$

Menten pour 1 seul substrat.

$$\bullet [B]= - K_B : \text{ on aura}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{KmA}{[A]} + \frac{K_mB}{(-K_B)} - \frac{KmA K_B}{[A]K_B} \right)$$



Après simplification, l'équation devient :

$$\frac{1}{v} = \left(1 - \frac{K_m B}{K_B}\right) \frac{1}{v_{max}} ; \text{ Et ce } \forall [A]$$

Comme pour le mécanisme précédent (séquentiel Bi-Bi ordonné), cette représentation primaire permet de déterminer les valeurs des paramètres : K_B , K_m^B . Ainsi afin de déterminer tous les paramètres cinétiques (K_A et V_{max}), il faut tracer la représentation secondaire effectuée depuis les points d'intersection avec l'axe des ordonnées dans la figure 49 précédente et ce, en prenant les valeurs de $1/v$ pour les différentes concentrations en (A) quand $1/[B]=0$ qui permet de tracer le graphe selon l'équation : $1/v_B = f(1/[A])$

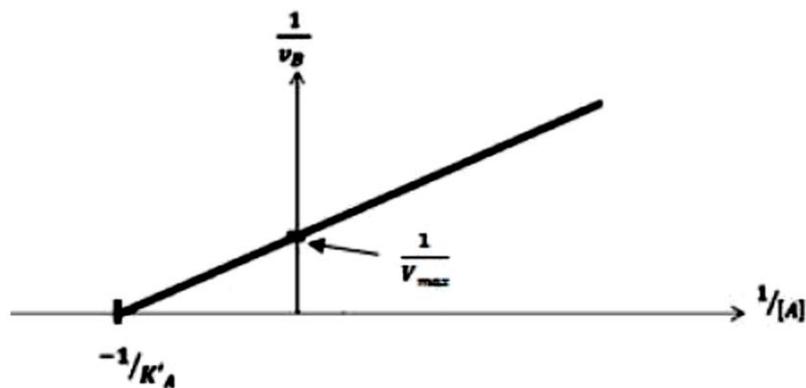


Figure 50: Représentation Secondaire $1/v_B = f(1/[A])$ du mécanisme Bi-Bi aléatoire.

Cette représentation est une droite; elle s'extrapole sur l'axe des abscisses à $(-1/K_A)$, K_A étant la constante de Michaelis de A (c'est-à-dire donne K_m^A) et V_{max} étant la vitesse mesurée lorsque les deux substrats sont saturants.

Dans ce mécanisme, nous distinguons deux cas :

a) Fixation indépendante ($K_A=K_A'$ et $K_B = K_B'$)

Les sites de fixation des deux substrats sont suffisamment distincts et il n'y a pas d'interaction entre eux. D'où la fixation de l'un des deux substrats, n'affecte pas la fixation de l'enzyme pour l'autre. D'où la fixation de l'un des deux substrats, n'affecte pas la fixation de l'enzyme pour l'autre.

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} = K_A' = \frac{[EB][A]}{[EAB]}$$

ET

$$K_B = \frac{[E][B]}{[EB]} = K_B' = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$



Les droites de la représentation primaire se coupent sur l'axe des abscisses (**Fig. 51**).

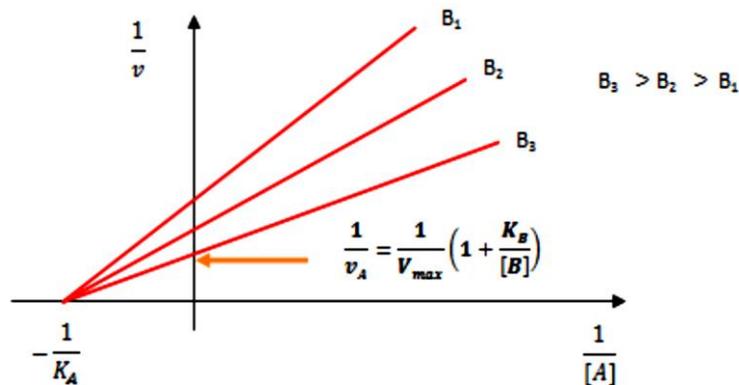


Figure 51: Représentation Primaire d'un mécanisme Bi-Bi aléatoire (*Fixation indépendante*)

b) **Fixation dépendante** ($K_A \neq K_A'$ et $K_B \neq K_B'$) C'est-à-dire que la fixation de A modifie l'affinité de l'enzyme pour B et réciproquement.

Ici, deux cas se présentent :

- **Premier cas** : Lorsque l'ordonnée est positive par rapport au point d'intersection (c'est-à-dire une fixation **dépendante positive** où que la fixation du second substrat est facilitée par la présence du premier). Les représentations primaires se croisent au-dessus de l'axe des abscisses (**Fig. 52**).

- Si $K_A > K_A'$, la fixation de B augmente l'affinité de EB pour A
- Si $K_B > K_B'$, la fixation de A augmente l'affinité de EA pour B

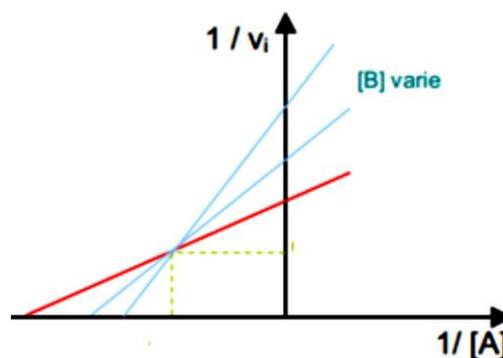


Figure 52: Représentation graphique du mécanisme séquentiel Bi-Bi aléatoire (*Fixation dépendante positive*)

- **Deuxième cas** : Lorsque l'ordonnée est négative par rapport au point d'intersection (c'est-à-dire une fixation **dépendante négative** où que la fixation du second substrat est diminuée par la présence du premier) :

- Si $K'_A > K_A$, la fixation de B diminue l'affinité de EB pour A
- Si $K'_B > K_B$, la fixation de A diminue l'affinité de EA pour B

Les représentations primaires se croisent au-dessous de l'axe des abscisses (**Fig. 53**).

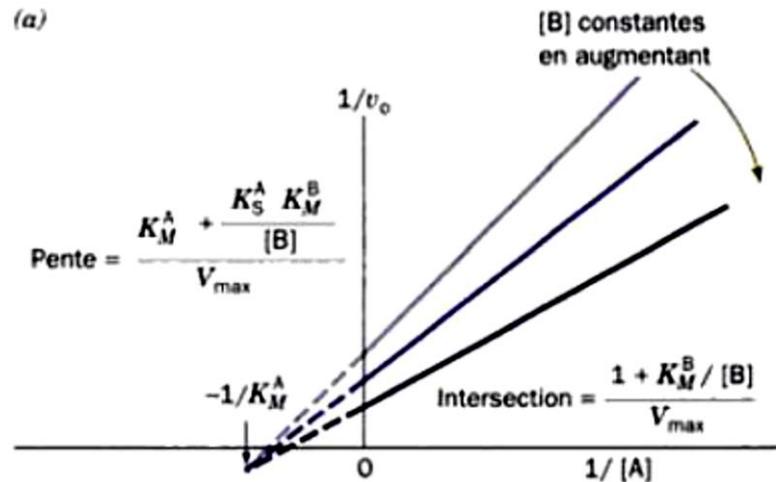


Figure 53: Représentation graphique du mécanisme séquentiel Bi-Bi aléatoire (*Fixation dépendante négative*)

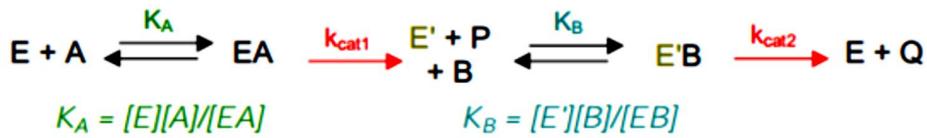
III. Mécanisme non séquentiel ou à double déplacement (*Ping-Pong*)

Certaines réactions du métabolisme impliquant deux substrats se produisent sans que la réaction nécessite la formation d'un complexe ternaire. C'est le cas de beaucoup de réaction de transfert de groupes qui mettent en jeu que la formation de complexes binaires. Ce mécanisme est aussi dit « *à enzyme modifiée* ». Ici, il n'y a pas de formation de complexe ternaire (EAB) mais du complexe binaire entre l'enzyme et l'un des substrats ou l'enzyme et l'un des produits. En effet, il y a réactivité entre l'enzyme et le premier substrat qui se fixe sur celle-ci (formation d'un complexe binaire EA), puis catalyse du substrat fixé en un produit (1^{er} produit de la réaction : **P**), *transformation de l'enzyme* (c'est-à-dire *demi-réaction*) catalysée par (E). Dans ce cas, il apparaît un intermédiaire constitué d'une forme modifiée de l'enzyme (**E'**) qui souvent porte un fragment du premier substrat. La nouvelle configuration de l'enzyme transformée (**E'**) présente une affinité vis-à-vis du deuxième substrat (**B**). Ainsi, un complexe binaire (**E'B**) se formera suivi par une catalyse du substrat (**B**) pour former le deuxième produit de la réaction (**Q**). Enfin, il y aura libération de (**Q**) et *l'enzyme retrouvera sa forme initiale* (E).

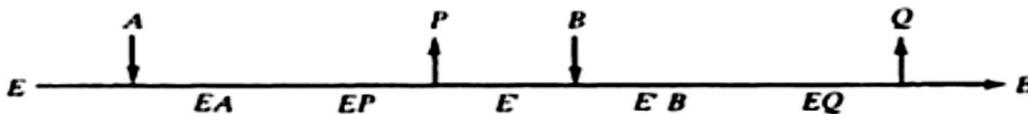
Le mécanisme à *enzyme modifié* est un mécanisme ordonné, mais cette caractéristique est moins notable qu'avec les enzymes à complexe ternaire puisqu'il existe un seul ordre



possible en accord avec le mécanisme et qu'il n'existe pas d'alternative où la fixation soit aléatoire. Le chemin réactionnel de ce système est représenté selon Cleland comme suit :



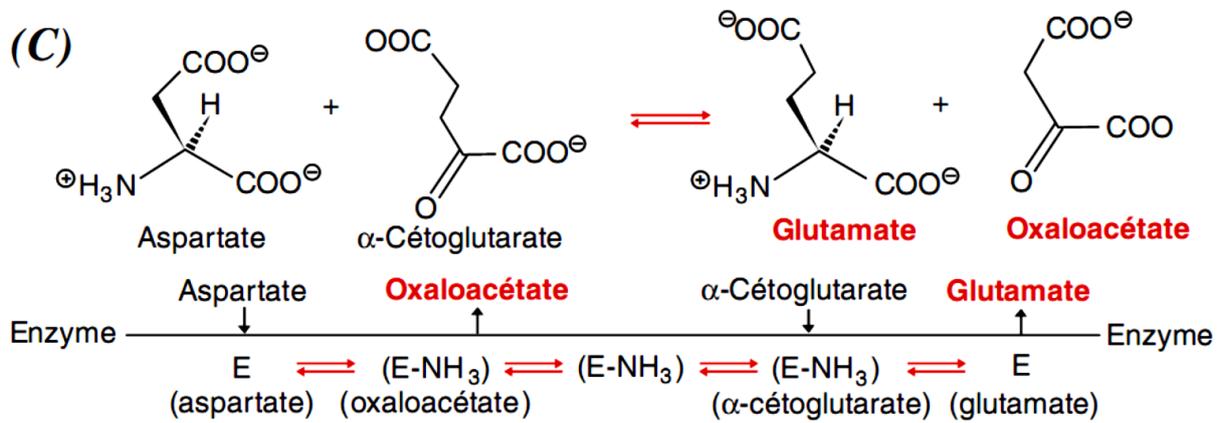
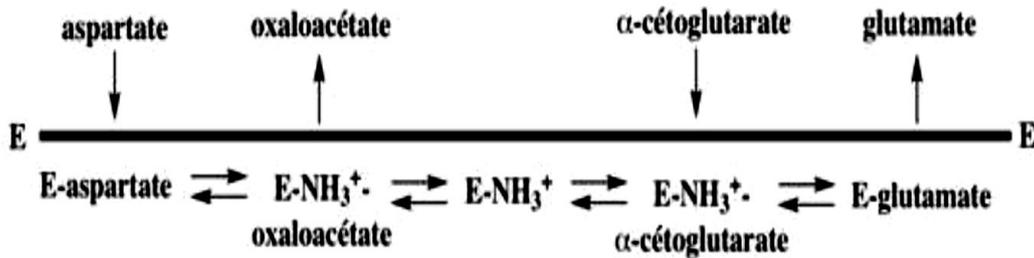
a) Représentation de Cleland



b) Exemples d'enzymes à mécanisme Ping-Pong

Ce mécanisme est rencontré dans le transfert d'un groupe amine entre un aminoacide et un acide α-cétonique, l'oxydation de certains substrats par des déshydrogénases à FAD et dans les réactions faisant appel à une catalyse covalente, comme, par exemple, les réactions d'hydrolyse des chaînes polypeptidiques par les sérines protéases.

- les aminotransférases : l'aspartate aminotransférase (ASAT)

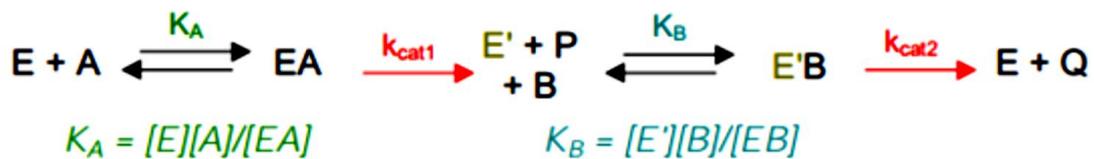




L'ASAT catalyse le transfert de la fonction amine de l'aspartate vers l' α -cétoglutarate qu'elle transforme en glutamate.

- Dans un premier temps, l'ASAT se lie à l'aspartate puis transfère la fonction amine sur un coenzyme lié : le phosphate de pyridoxal qui devient phosphate de pyridoxamine sans cesser d'être lié à l'enzyme. L'enzyme se dissocie alors de l'oxaloacétate.
- Dans le second temps, l'enzyme liée au phosphate de pyridoxamine, forme un complexe, avec l' α -cétoglutarate, puis transfère la fonction amine du coenzyme qui redevient phosphate de pyridoxal, vers le second substrat qui est transformé en glutamate. Enfin, le complexe ASAT glutamate se dissocie : l'enzyme et son coenzyme lié ont recouvré leurs structures initiales.

c) Equation de vitesse



Dans ce schéma réactionnel, si on considère uniquement la réaction dans le sens de gauche à droite et on se place dans les conditions initiales qui permettent de négliger la réaction inverse, on aboutit à une équation de la vitesse en fonction de la concentration des substrats qui fait apparaître un comportement *Michaelien*, en utilisant l'approximation de l'état stationnaire ou celle du quasi-équilibre.

Comme ce schéma peut se décomposer en deux réactions enzymatiques (demi-réactions) simples :



Deux constantes de Michaelis-Menten Km^A et Km^B s'appliquent respectivement aux réactions ci-dessus. Généralement la dernière étape de la réaction est considérée limitante, la vitesse v s'écrit par conséquent :

$$v = k_{cat} [E'B]$$

$$\text{Par ailleurs: } Km^A = \frac{[E][A]}{[EA]} = + \frac{(k_{-A}) + k_{cat1}}{k_A} \text{ et } Km^B = \frac{[E'][B]}{[E'B]} = + \frac{(k_{-B}) + k_{cat2}}{k_B}$$

Si les équilibres entre E et EA, d'une part, et E' et E'B, d'autre part, sont rapide alors k_{cat1} et k_{cat2} sont *négligeables* devant les autres constantes de vitesse.

La concentration d'enzyme totale $[E]_T = [E] + [EA] + [E'] + [E'B]$.



Si l'on considère la concentration de E' est constante au cours de la réaction (état stationnaire), la vitesse globale d'apparition de E' est égale à la vitesse globale de disparition, ce qui revient à écrire :

$$k_{cat1} [EA] = k_{cat2} [E'B].$$

$$\text{Ou encore } \frac{k_{cat1}}{k_{cat2}} = \frac{[E'B]}{[EA]} = \frac{\frac{[E'] [B]}{K_{mB}}}{\frac{[E] [A]}{K_{mA}}} = \frac{[E'] [B] K_{mA}}{[E] [A] K_{mB}}$$

Et après réarrangement,

$$[E] = \frac{k_{cat2} K_{mA}}{k_{cat1} K_{mB}} \frac{[B]}{[A]} [E']$$

La normalisation de la vitesse permet d'écrire :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_{mB}}{[B]} + \frac{K_{mA}}{[A]}}$$

d) Représentations graphiques (Soit en double inverse)

On a :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]} + \frac{K_{mA}}{[A]} \right)$$

D'où :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]} \right) + \frac{K_{mA}}{V_{max}} \frac{1}{[A]} \quad (1/v = f(1/[A]))$$

Ou bien :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_{mA}}{[A]} \right) + \frac{K_{mB}}{V_{max}} \frac{1}{[B]} \quad (1/v = f(1/[B]))$$

Les représentations primaires de $1/V = f(1/[A])$ ou $f(1/[B])$ sont des droites parallèles (**Fig. 54**).

On trace $1/V = f(1/[A])$ pour différentes $[B]$, (ou l'inverse), on obtient un ensemble de droites parallèles de pente K_A / V_{max} (ou K_B / V_{max}) à partir de l'équation précédente :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]} \right) + \frac{K_{mA}}{V_{max}} \frac{1}{[A]} \quad \text{Ou} \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_{mA}}{[A]} \right) + \frac{K_{mB}}{V_{max}} \frac{1}{[B]}$$

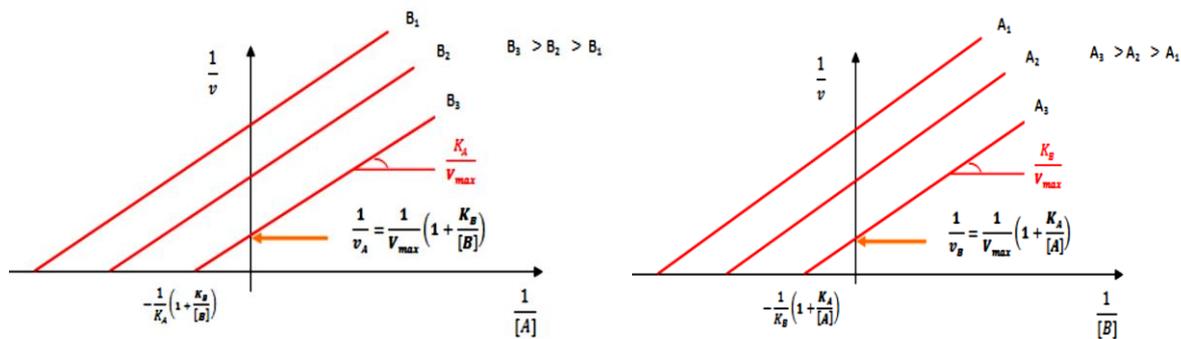


Figure 54 : Représentations primaires $1/v = f(1/[S])$ pour un mécanisme Ping-Pong.

Comme précédemment, les intersections avec l'axe des ordonnées correspond à $1/V_A$ ou $1/V_B$; l'inverse de la vitesse mesurée à concentration saturante du substrat considéré.

Dans l'équation
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} \left(1 + \frac{K_m B}{[B]} \right) + \frac{K_m A}{v_{max}} \frac{1}{[A]}$$

- **Quand $1/[A]=0$:** $\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} \left(1 + \frac{K_m B}{[B]} \right)$
- **Quand $\frac{1}{v} = 0$:** $\frac{1}{[A]} = \frac{-1}{K_m A} \left(1 + \frac{K_m B}{[B]} \right)$
- **Quand $[B] = \infty$ (concentration saturante) :** $\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m A}{v_{max}} \frac{1}{[A]}$ (*Représentation de Lineweaver-Burk pour une cinétique Michaelienne à un seul substrat*).

● **Représentation secondaire**

A partir de la représentation primaire $1/v = f([A])$ pour différentes concentration de $[B]$ (ou $1/v = f([B])$ pour différentes concentration de $[A]$), on lit les valeurs de $1/v$ aux points d'intersection avec l'axe des ordonnées et on trace la valeur de ces $1/v$ en fonction des valeurs de $1/[B]$ (ou de $1/[A]$).

Si on porte $1/v_A = f(1/B)$, on obtient la représentation secondaire (**Fig. 55**), celle-ci permet de mesurer : V_{max} et K_m^B

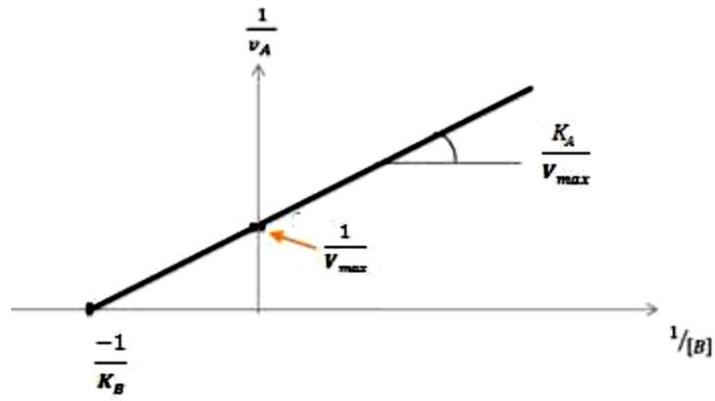


Figure 55: Représentation secondaire $1/v_A$ *f* ($1/[B]$) d'un mécanisme Ping-Pong.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Bugg TDH. (2012).** Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. third edition: John Wiley & Sons, Inc. 290 p.
- Cornish-Bowden A., Jamin M. et Saks V. (2005).** Cinétique enzymatique. Publié par EDP Sciences dans la collection Grenoble Science dirigée par Jean Bornarel. Portland Press, Ltd. London. 462 p. ISBN 2-86883-742-5
- Fersht A. (1985).** *Enzyme Structure and Mechanism*, W.H. Freeman, New York. 475 p. ISBN 0-7167-1614-3 ou ISBN 0-7167-1615-1
- George P. Dinos and Charalambos Coutsogeorgopoulos (1997)** Kinetic study of irreversible inhibition of an enzyme consumed in the reaction it catalyses. Application to the inhibition of the puromycin reaction by spiramycin and hydroxylamine, *J. Enzyme Inhibition*, **12:2**, 79-99, DOI: 10.3109/14756369709035811
- Horton RH, Moran LA., Ochs R., Rawn J. et Scrimgeour K. (1994)** Principes de Biochimie- Ed. De Boeck. 742 p, ISBN-10 : 280411578X
- Jeffrey W. Keillor, (2005).** Inhibition des réactions enzymatiques. Université de Montréal, Faculté des arts et des sciences, Département de chimie.
- Leskovac V. (2004).** Comprehensive Enzyme Kinetics. Publié par Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. 438p. ISBN: 0-306-48390-4
- Lunn FA., Macleod TJ., Bearne SL. (2008).** Mutational analysis of conserved glycine residues 142,143 and 146 reveals Gly142 is critical for tetramerization of CTP synthase from *Escherichia coli*. *Biochem J.*; **412 (1)**:113-21. doi: 10.1042/BJ20071163. PMID: 18260824.
- Mikkelsen SR. and Cortòn E. (2004).** Bioanalytical Chemistry, John Wiley & Sons, Inc. 357p. ISBN:9780471623625 |DOI:10.1002/0471623628
- Papamichael E.M. and Theodorou L.G. (2006).** Enzyme Kinetics and Modeling of Enzymatic Systems. In: Pandey A., Webb C., Soccol C.R., Larroche C. (eds) Enzyme Technology. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-35141-4_3
- Pelmont J. (1993).** Enzymes. EDP Sciences dans la collection Grenoble Science dirigée par Jean Bornarel. Publié par l'office des publications universitaires (Alger). 605p. ISBN 2.7061.0363.9.
- Pelmont J. (1995).** Enzymes catalyseurs du monde vivant. Publié par EDP Sciences dans la collection Grenoble Science 2^{ème} édition. 1040 p.
- Punekar N. S. (2018).** Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 560p. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0_2
- Segel IH. (1993).** Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems. John Wiley & Sons New York / London/ Sydney/ Toronto. 992 p. ISBN: 978-0-471-30309-1
- Simm AM., Loveridge EJ., Crosby J., Avison MB., Walsh TR. and Bennett PM. (2005).** Bulgecin A: a novel inhibitor of binuclear metallo-beta-lactamases. *Biochem J.* **387(Pt3)**:585-590. doi:10.1042/BJ20041542.
- Sine J-P. (2010).** Enzymologie et Applications. (Eds) Ellipses, Paris. 462p
- Voet D et Voet J.G. (2005).** Biochimie 2^{ème} Edition. Edité Par De Boeck Supérieur, 1600 p. ISBN 10: 2804147959 / ISBN 13: 9782804147952
- Walsh, C. (1982).** Suicide substrates: mechanism-based enzyme inactivators *Tefrhdmn*, **38 (7)**: 871-909.

Références bibliographiques

Site internet :

<http://ead.univangers.fr/~jaspard/Page2/COURS/4EnzymologieLicence/3CoursINHIBITEURS/1CoursInhibition.htm>