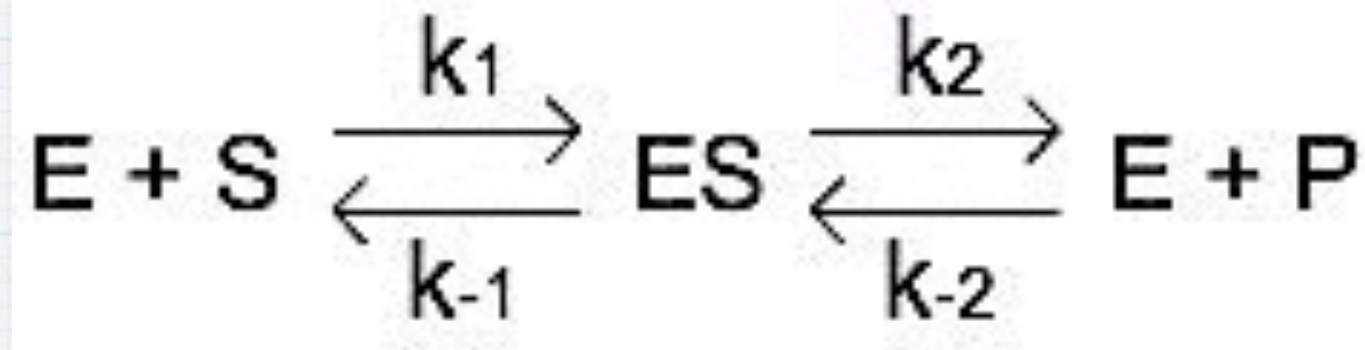


La cinétique michaélienne

1. Étude cinétique

Équation mise en jeu

E = enzyme S = substrat (ou ligand) ES = complexe enzyme-substrat P = produit



k_1 = constante d'association de E + S

k_{-1} = constante de dissociation du complexe ES

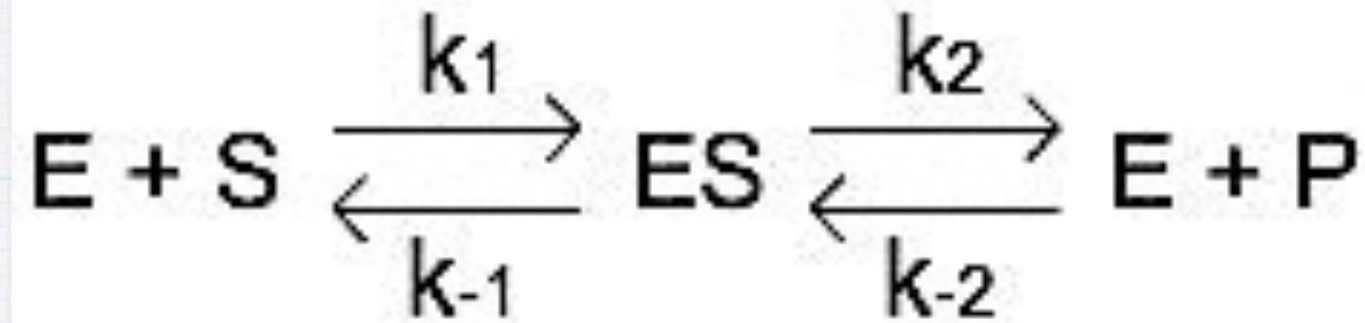
k_2 = constante de réaction de ES en E + P

k_{-2} = constante d'association de E + P

La vitesse de réaction dépend :

- des concentrations des différentes molécules ou complexes de molécules
- des constantes d'association et de dissociation de ces molécules entre elles.

Conditions du modèle

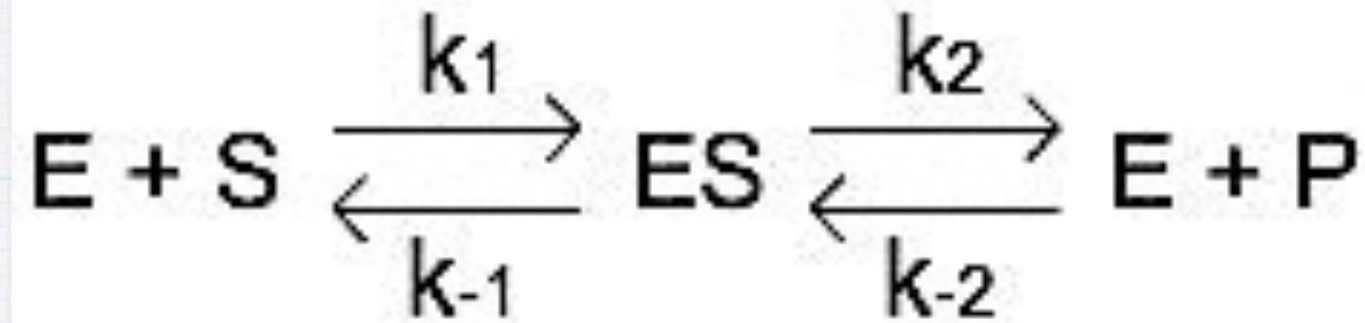


Travail sur la vitesse initiale : calcul de v_i

On est en début de réaction donc on peut considérer que la quantité de produit est infime donc la réaction retour

$E + P \rightarrow ES$ est négligeable.

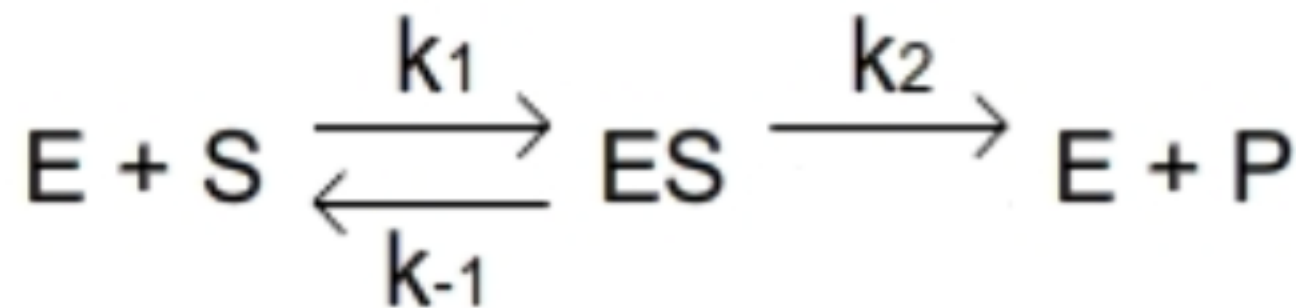
Conditions du modèle



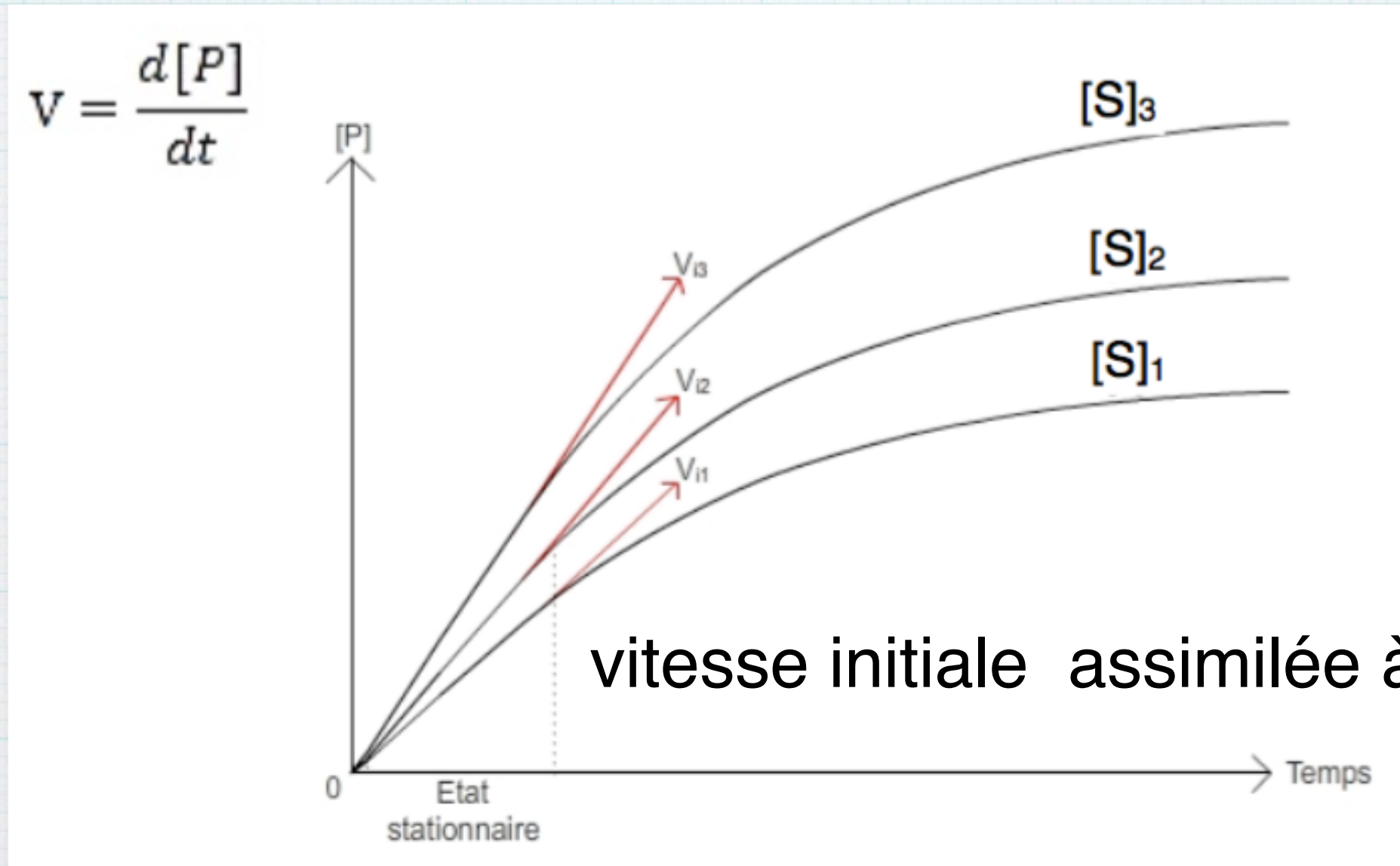
Travail sur la vitesse initiale : calcul de v_i

On est en début de réaction donc on peut considérer que la quantité de produit est infime donc la réaction retour

$E + P \rightarrow ES$ est négligeable.



Travail sur la vitesse initiale : calcul de V_i



Modélisation mathématique

**Conditions expérimentales particulières
= conditions de Michaelis-Menten**

Concentration en substrat $[S]$ très largement supérieure
à la concentration totale en enzyme $[E]_T$

Modélisation mathématique

**Conditions expérimentales particulières
= conditions de Michaelis - Menten**

Concentration en substrat [S] très largement supérieure à la concentration totale en enzyme $[E]_T$

Hypothèse d'un état quasi-stationnaire

Un équilibre des concentrations entre [E], [S] et [ES] se met en place très rapidement. Or, une fois à cet équilibre atteint, la concentration en complexe [ES] reste constante tant que [P] reste négligeable (ce qui est vrai d'après l'approximation précédente).

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

Modélisation mathématique

La vitesse de réaction est la vitesse d'apparition du produit

$$V_i = k_2 \cdot [ES]$$

Il faut donc déterminer [ES].

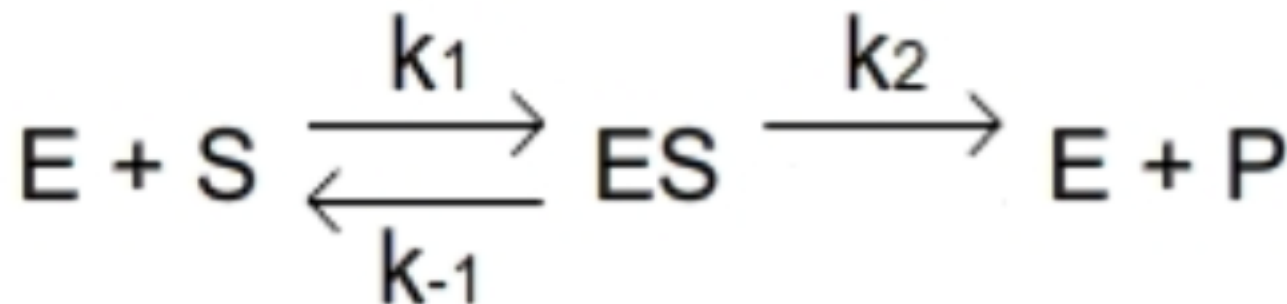
Modélisation mathématique

On cherche $[ES]$.

$[ES]$ correspond à l'apparition de ES moins la disparition de ES .

vitesse d'apparition de $ES = k_1 \cdot [E][S]$

vitesse de disparition de $ES = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES] = (k_{-1} + k_2) \cdot [ES]$



Hypothèse du régime stationnaire $\frac{d[ES]}{dt} = 0$

Cela signifie que la variation de ES est nulle donc

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

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

donc

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

Or la quantité totale d'enzyme est répartie en

- une fraction d'enzyme libre [E]
- une fraction d'enzyme couplée au substrat [ES]

$$\text{donc } [E] = [E]_T - [ES]$$

donc on remplace [E] dans l'équation précédente et on obtient :

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES]) \cdot [S]}{K_m}$$

on développe et on en tire [ES].

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES]) \cdot [S]}{K_m} = \frac{[E]_T \cdot [S] - [ES] \cdot [S]}{K_m}$$

$$K_m \cdot [ES] = [E]_T \cdot [S] - [ES] \cdot [S]$$

$$(K_m + [S]) [ES] = [E]_T \cdot [S]$$

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

La vitesse maximale est atteinte lorsque toutes les enzymes sont occupées c'est-à-dire liées à une molécule de substrat.

On a alors $[ES] = [E]_T$

donc comme $V_i = k_2 \cdot [ES]$

alors on peut écrire : $V_{\max} = k_2 \cdot [E]_T$

ce qui équivaut à : $[E]_T = \frac{V_{\max}}{k_2}$

On a donc $[ES] = E_T \frac{[S]}{[S] + K_m}$

et $V_{\max} = k_2 \cdot [E]_T$

$$V_i = k_2 \cdot [ES] = \underbrace{k_2 \cdot [E]_T}_{V_{\max}} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

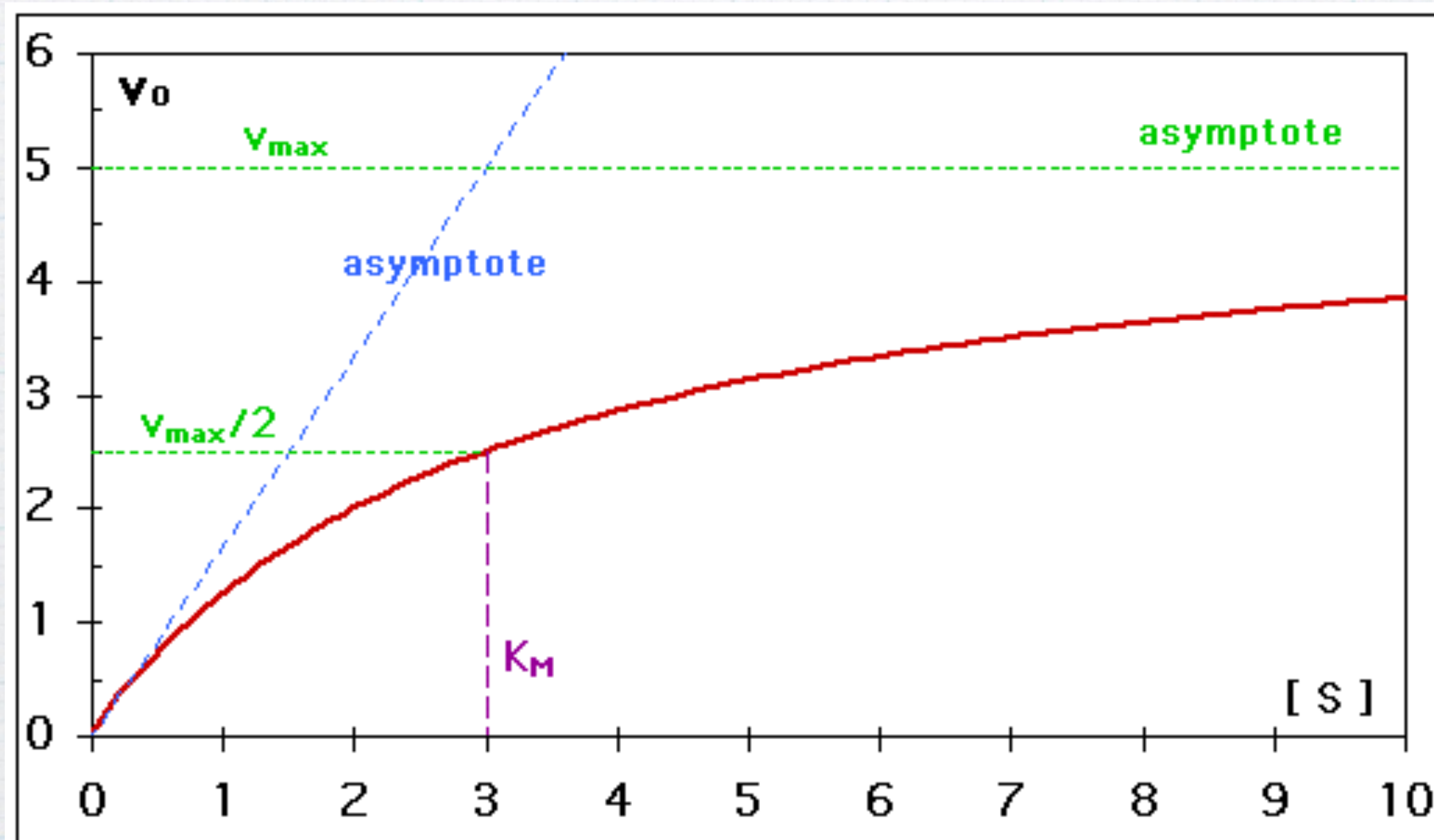
$$V_i = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Équation de Michaelis - Menten

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

avec

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



Paramètres cinétiques

V_{max} = vitesse de catalyse = vitesse de la réaction lorsque toutes les enzymes sont occupées donc cela représente l'activité enzymatique réelle.

Lorsque $V_i = 1/2 \cdot V_{max}$ alors $[S] = K_m$.

Cela signifie que K_m est la concentration en substrat pour laquelle on atteint la moitié de la V_{max} . C'est donc la $[S]$ pour se lier à la moitié des enzymes. Plus K_m est bas, plus cela signifie qu'il faut peu de substrat pour saturer l'enzyme : l'enzyme est donc très affine pour son substrat. À l'inverse, un fort K_m indique une faible affinité. **K_m représente l'inverse de l'affinité.**

constante de catalyse : **$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T}$** reflète l'**activité enzymatique**

La représentation en double inverse

L'analyse graphique montre ses limites. Pour déterminer K_m , il faut connaître V_{max} , obtenu pour une concentration infinie...

Pas pratique ni fiable...

Mais 1 divisé par une concentration infinie, c'est zéro.

Donc idée : représenter $1/V_i$ en fonction de $1/[S]$.

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

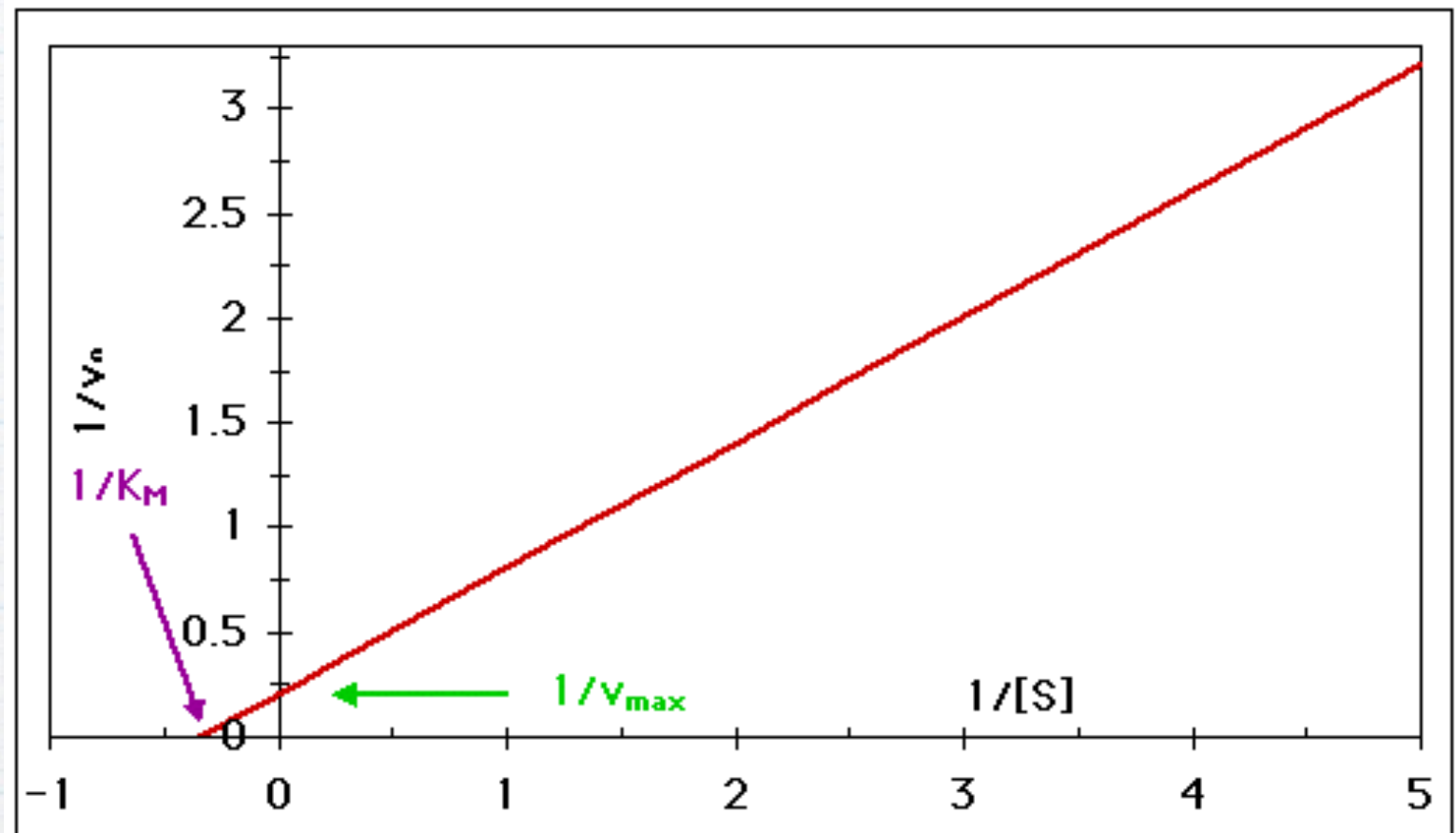
devient en $1/V_i$...

La représentation en double inverse

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

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

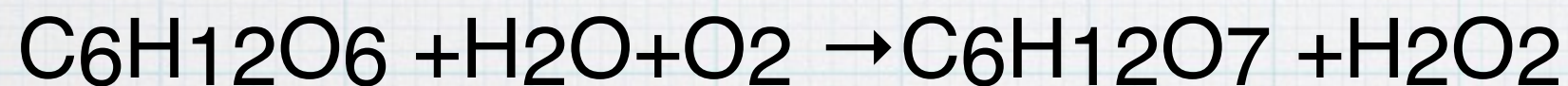
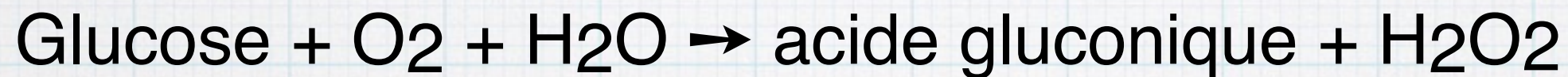
$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



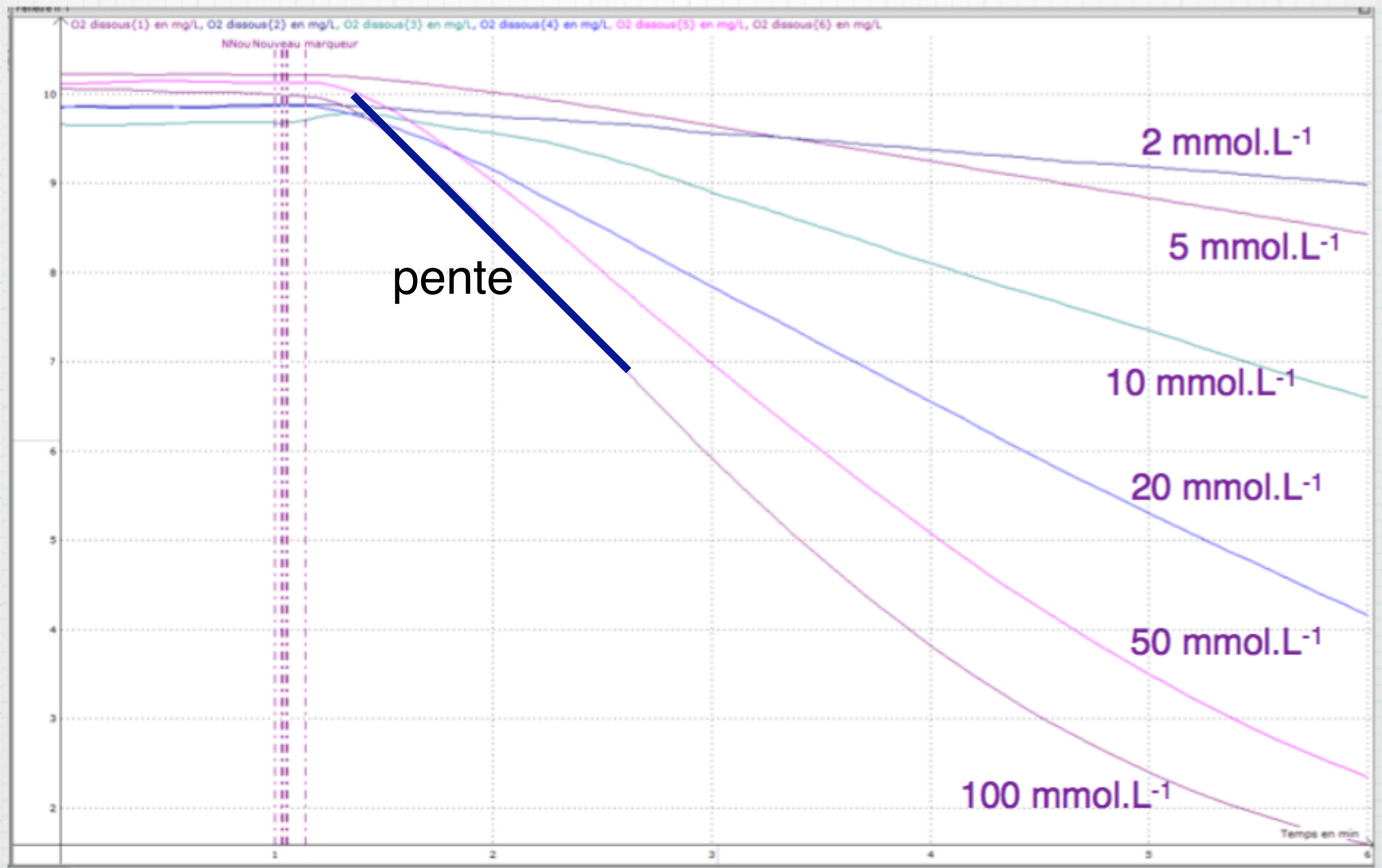
équation de droite qui croise l'axe des ordonnées en $1/V_{max}$
et l'axe des abscisses en $-1/K_m$

Étude de la glucose oxydase

La glucose-oxydase est spécifique du β -D-glucose. Elle catalyse son oxydation selon la réaction suivante :



Mesure de la consommation de O₂



Chaque courbe donne, par sa pente, la valeur de $-V_i$.

Étude de la glucose oxydase

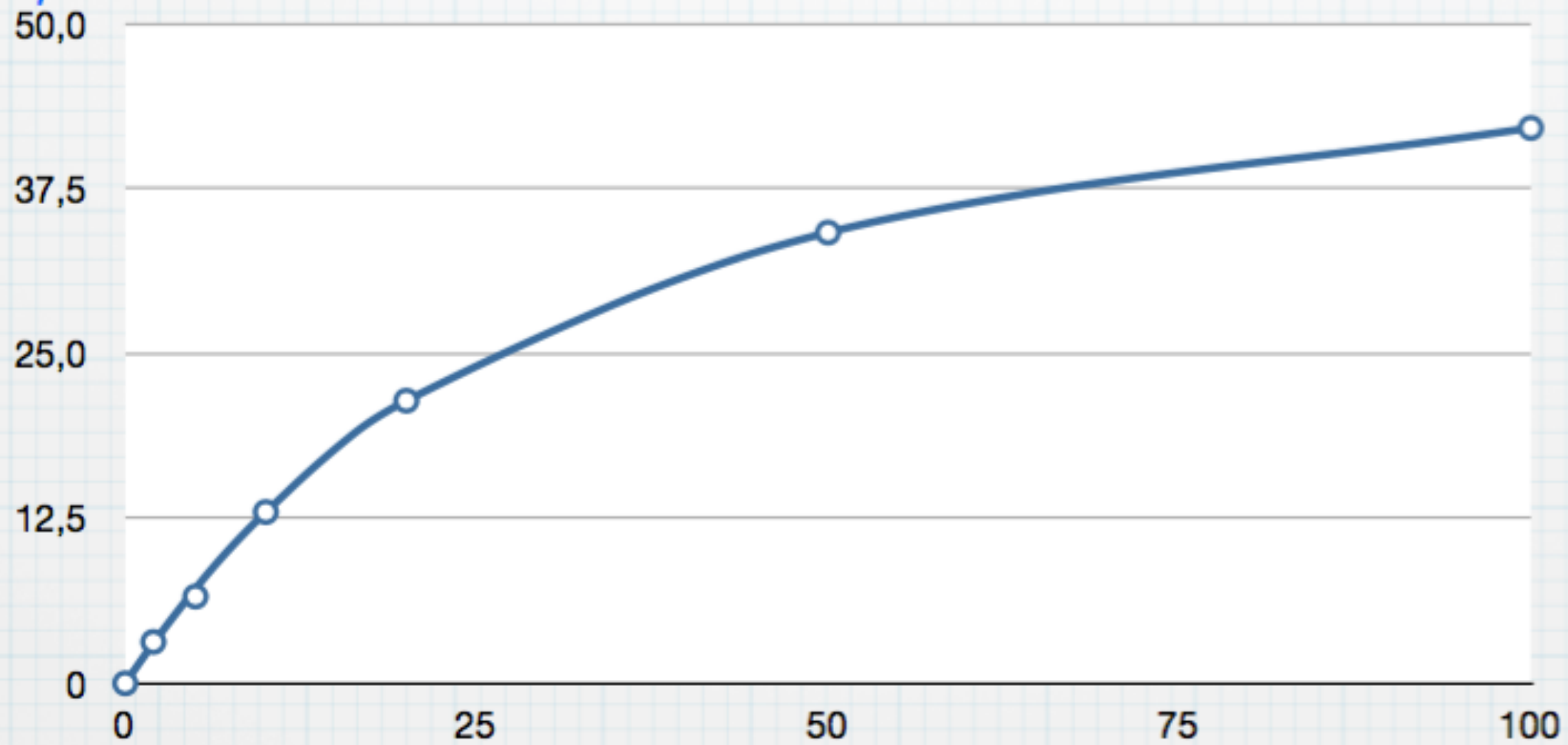
[glucose] en mmol.L ⁻¹	2	5	10	20	50	100
V _i en μmol.min ⁻¹	3,127	6,573	12,983	21,425	34,171	42,103

Avec un tableur, tracer les courbes :

- * V_i en fonction de [glucose]
- * 1/V_i en fonction de 1/[glucose]

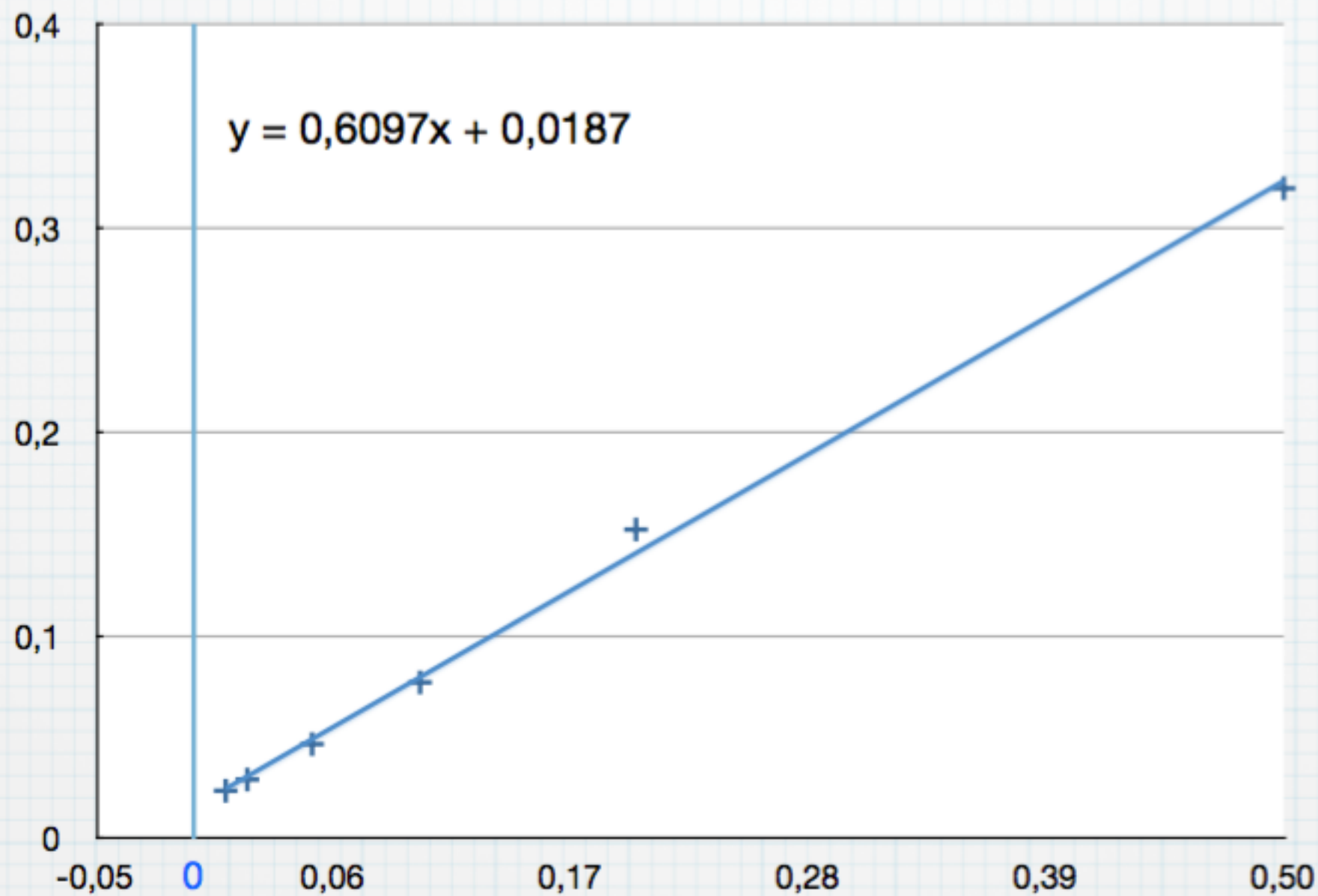
Déterminer les valeurs de K_m et V_{max}

V_i en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$



[glucose] en $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

$1/V_i$ en $\text{min} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$



$1/[glucose]$ en $\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1}$

$$\frac{1}{V_i} = 0,6097 \cdot \frac{1}{[S]} + 0,0187$$

à S infinie, $1/[S] = 0$ donc $1/V_{\max} = 0,0187$

$$\Rightarrow V_{\max} = 53,5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$$

La droite coupe l'axe des abscisses en $-1/K_M$

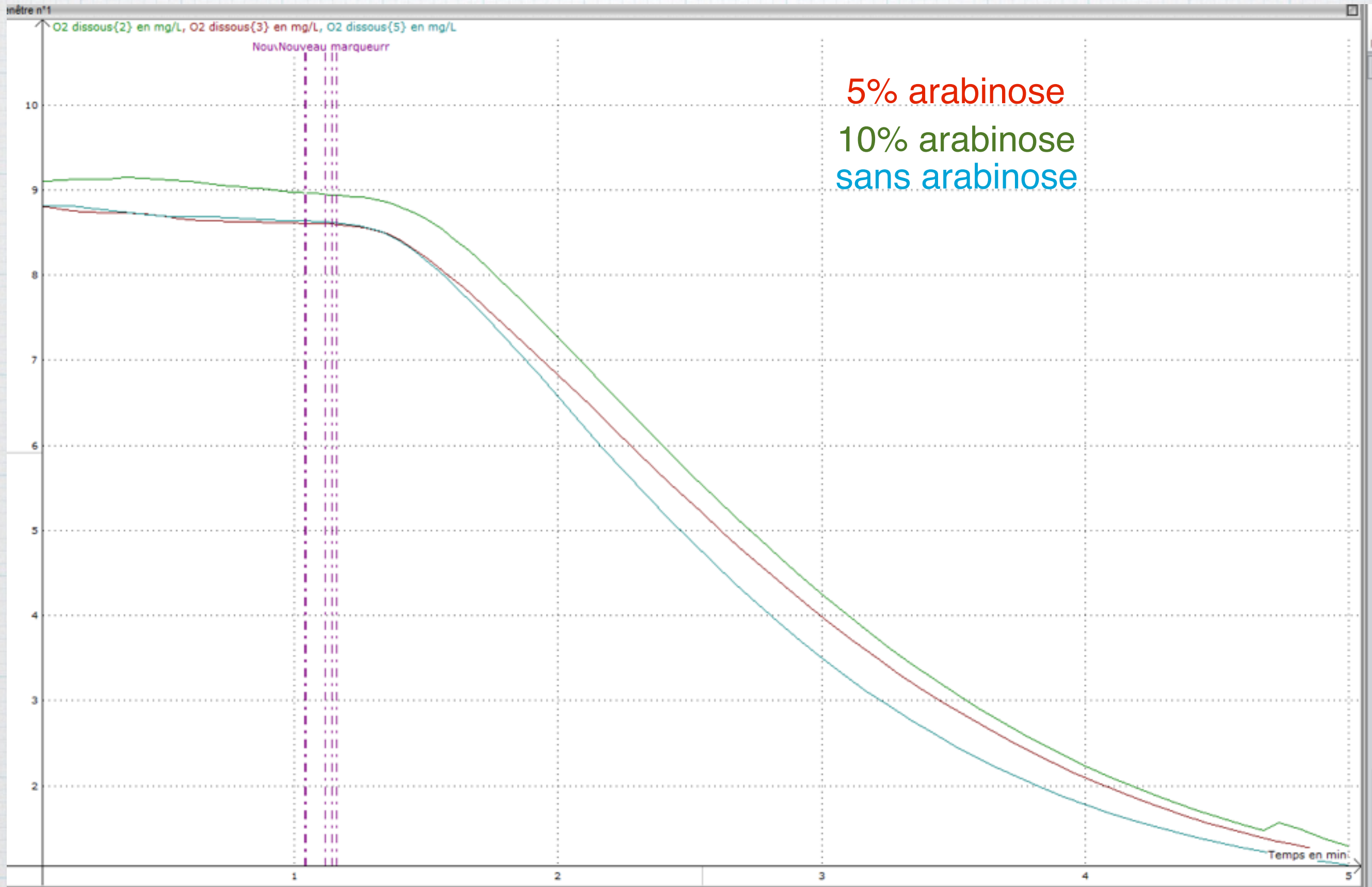
donc pour $1/V_i = 0$ càd $1/K_M = 0,6097/0,0187$

$$\Rightarrow K_M = 32,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$$

valeurs à pH 6

2. Action des inhibiteurs

En présence d'arabinose



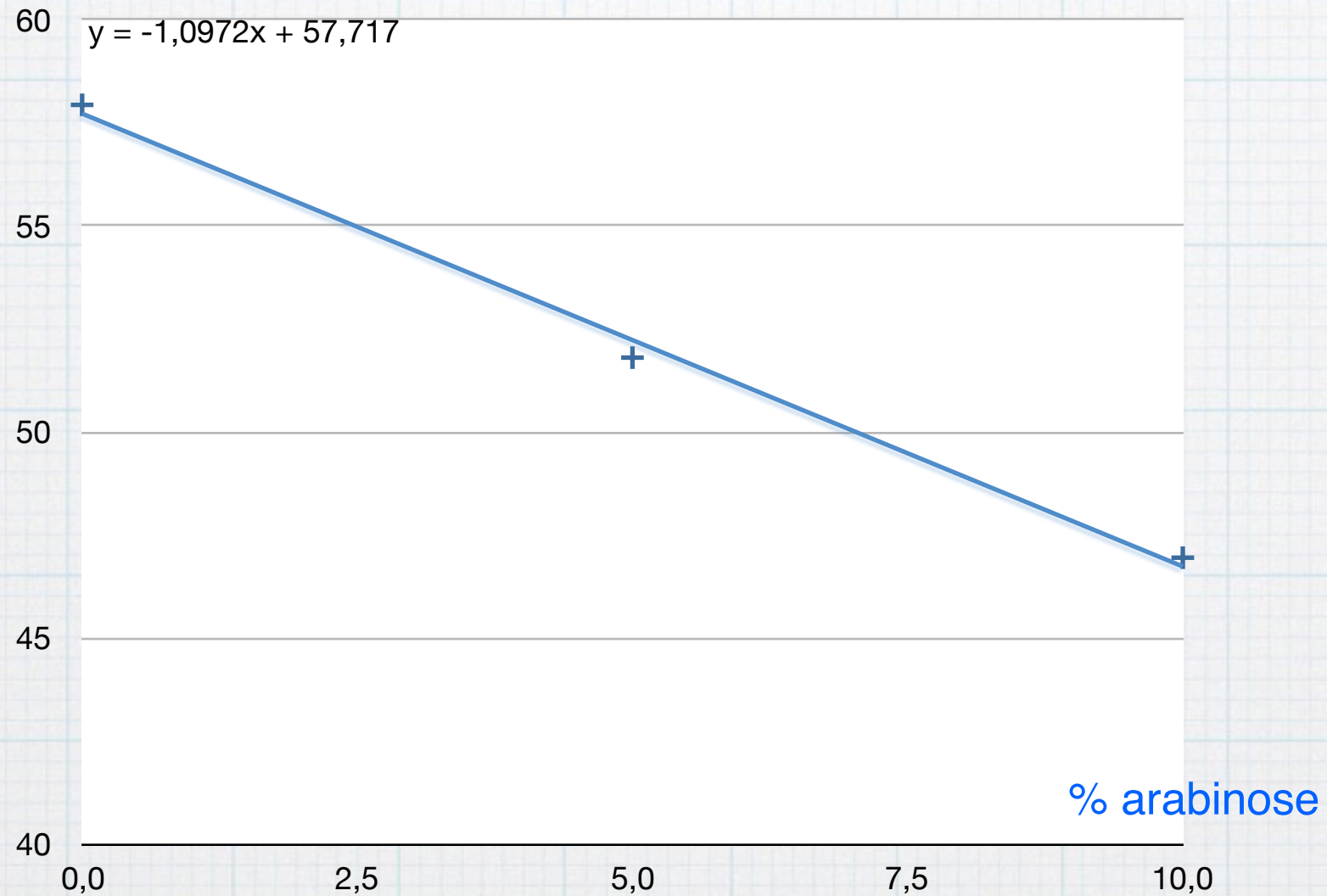
valeurs à pH 5

glucose à 100 mmol.L^{-1}

En présence d'arabinose

V_i en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$

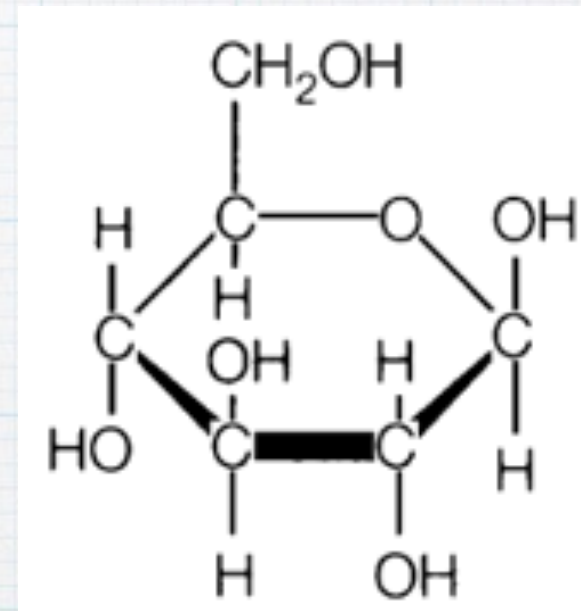
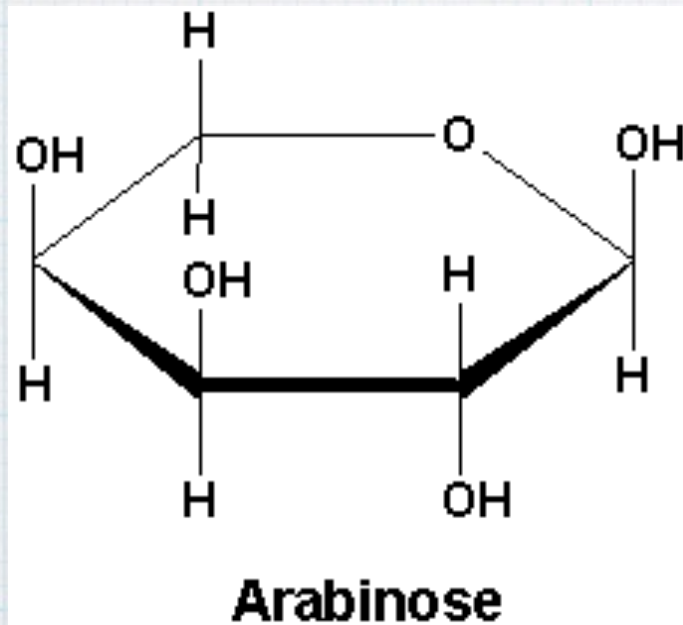
glucose à $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$



\Rightarrow arabinose = inhibiteur

valeurs à pH 5

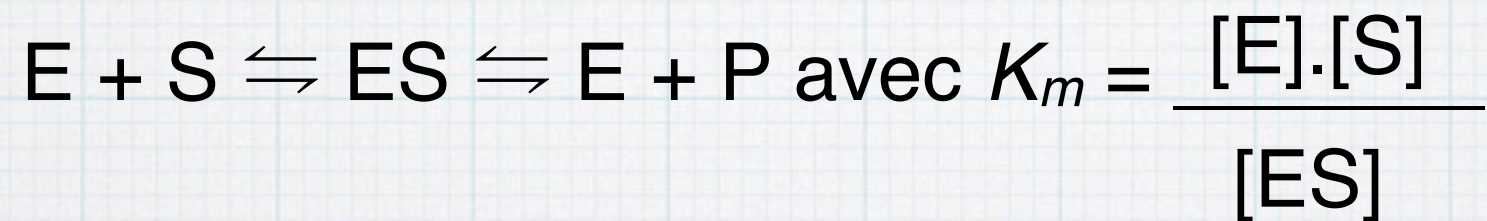
Étude de l'action de l'arabinose interprétation en terme de structure



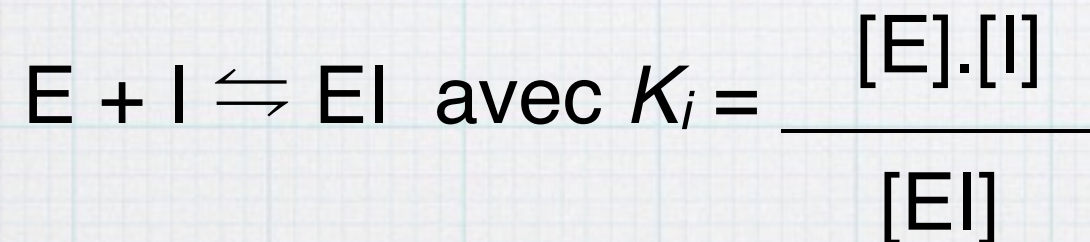
Glucose

Compétition avec le substrat

La présence d'un inhibiteur modifie la formation du complexe enzyme-substrat. En effet, il s'ajoute une réaction de liaison de l'inhibiteur, de constante de dissociation K_i .



mais aussi



$$\text{alors } [ES] = \frac{[E].[S]}{K_m} \text{ et } [EI] = \frac{[E].[I]}{K_i}$$

Compétition avec le substrat

L'enzyme totale est alors sous différentes formes :

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EI] = [E] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

On a également l'égalité :

$$V_i = k_2 \cdot [ES] \quad \text{et} \quad V_{max} = k_2 \cdot [E]_T \quad \text{donc} \quad \frac{V_i}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[E]_T}$$

$$V_i = V_{max} \frac{[ES]}{[E]_T}$$

Compétition avec le substrat

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

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

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

On retrouve bien une équation de Michaelis avec $K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$

Ce nouveau K'_m est supérieur au K_m donc l'affinité apparente diminue.

En présence d'arabinose

Hypothèse d'après la forme des composés

Arabinose = inhibiteur compétitif alors la v_{\max} ne change pas.

$$V_i = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

en faisant le rapport des vitesses, on élimine V_{\max} .

$$\frac{V_{i1}}{V_{i2}} = \frac{K_{M2} + [S]}{K_{M1} + [S]}$$

$$K_{M2} = \frac{V_{i1}}{V_{i2}} (K_{M1} + [S]) - [S]$$

A.N. : avec V_{i1} = vitesse sans inhibiteur, donc $K_{M1} = 32,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ et V_{i2} = vitesse pour 5% d'arabinose

$K_{M2} = 49,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ à 5% d'arabinose

même calcul pour V_{i3} , vitesse à 10% d'arabinose alors $K_{M3} = 66,2 \text{ mmol.L}^{-1}$

En présence d'arabinose

On obtient

$$K_{M1} = 32,6 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ sans arabinose}$$

$$K_{M2} = 49,8 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ à 5\% d'arabinose}$$

$$K_{M3} = 66,2 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ à 10\% d'arabinose}$$

$$\text{or } K'_M = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad \text{donc } K_i = \frac{K_M \cdot [I]}{K'_M - K_M}$$

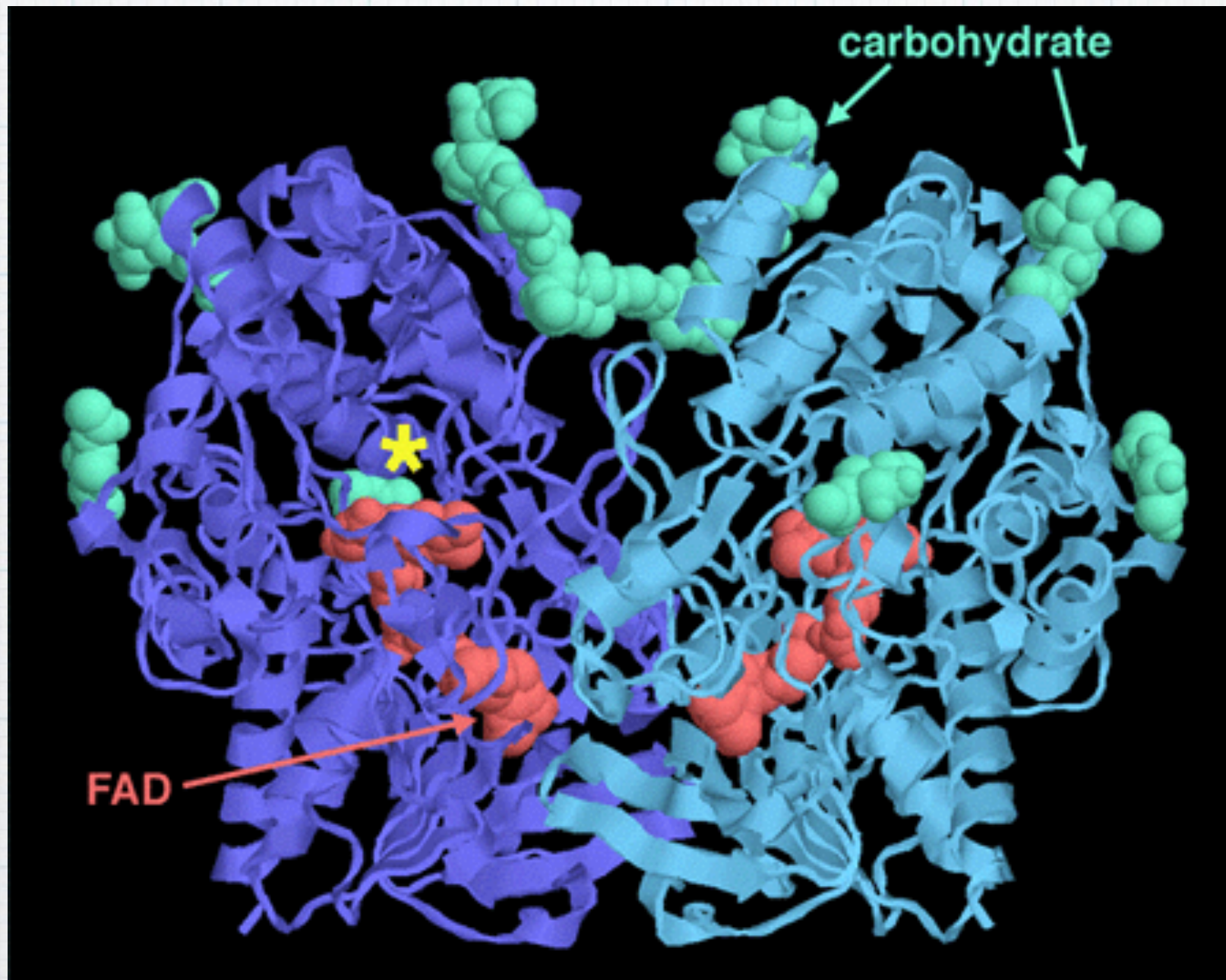
$$5 \text{ \% d'arabinose} \Rightarrow K_i = 631,1 \text{ mmol.L}^{-1}$$

$$10 \text{ \% d'arabinose} \Rightarrow K_i = 646,1 \text{ mmol.L}^{-1}$$

Donc l'arabinose a un K_i d'environ 640 mmol.L^{-1} . La glucose oxydase est peu affine pour l'arabinose.

Structure de l'enzyme

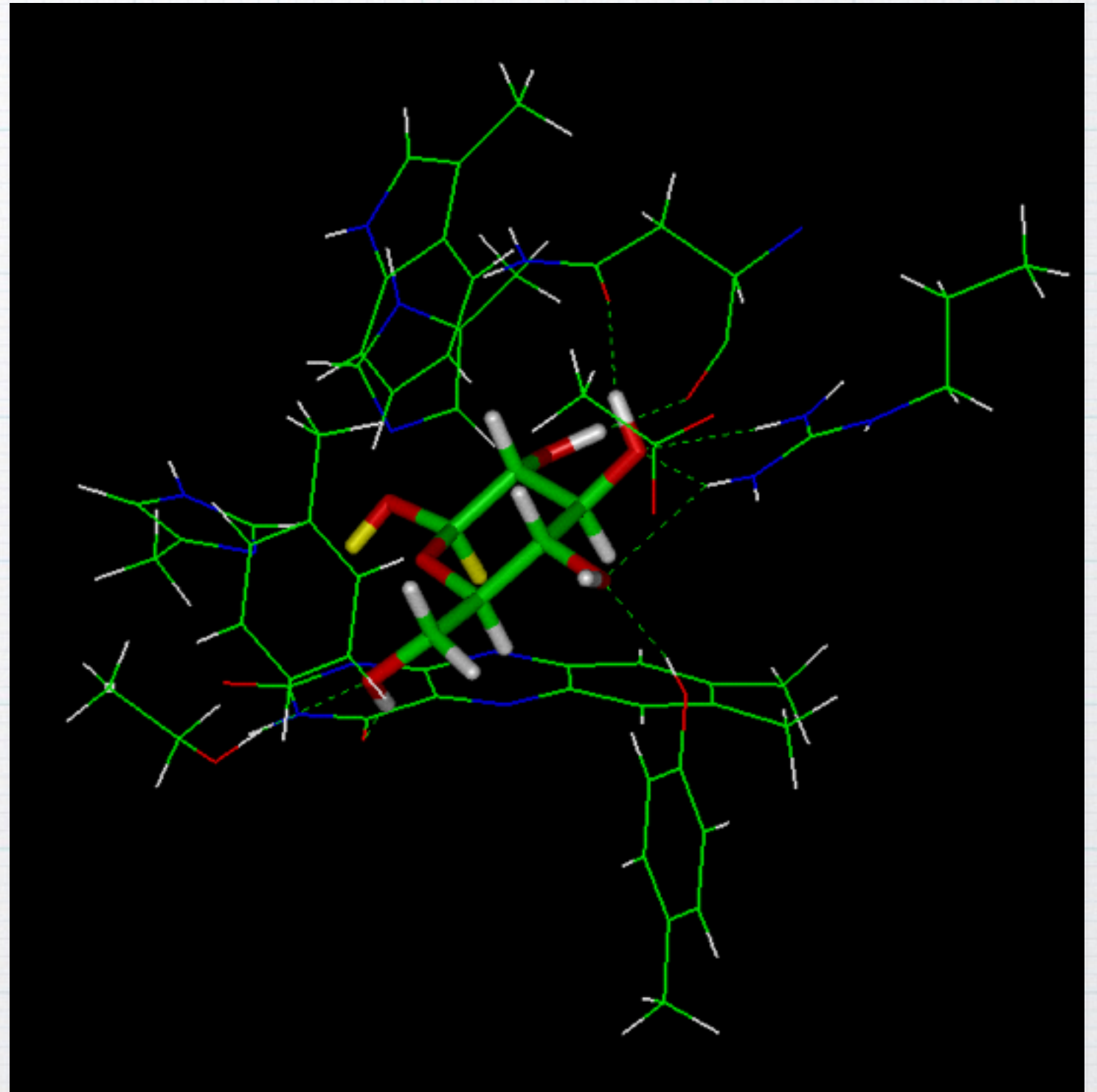
La glucose oxydase a été séquencée, cristallisée et observée aux RX. On en a déduit le modèle tridimensionnel ci-dessous. Le site actif (*) contient un coenzyme (du FAD) et une molécule de glucose juste au-dessus. L'enzyme est glycosylée (carbohydrates indiqués).



Structure de l'enzyme

La liaison entre la molécule de glucose et le site actif met en jeu des liaisons hydrogènes, comme visible sur le cliché ci-dessous. Ce sont essentiellement des atomes d'hydrogène du cycle du glucose qui établissent 9 liaisons H avec les résidus des acides aminés du site de liaison ainsi que 3 liaisons de type hydrophobes avec les acides aminés Tyr 68, Phe 414 et Trp 426.

Le carbone 1 et l'oxygène 1 (en jaune sur le document) sont alors proches du site actif constitué des acides aminés His 559 et His 516 (stabilisé par Glu 412).



Inhibition non compétitive

Cas de la ferrochélatase

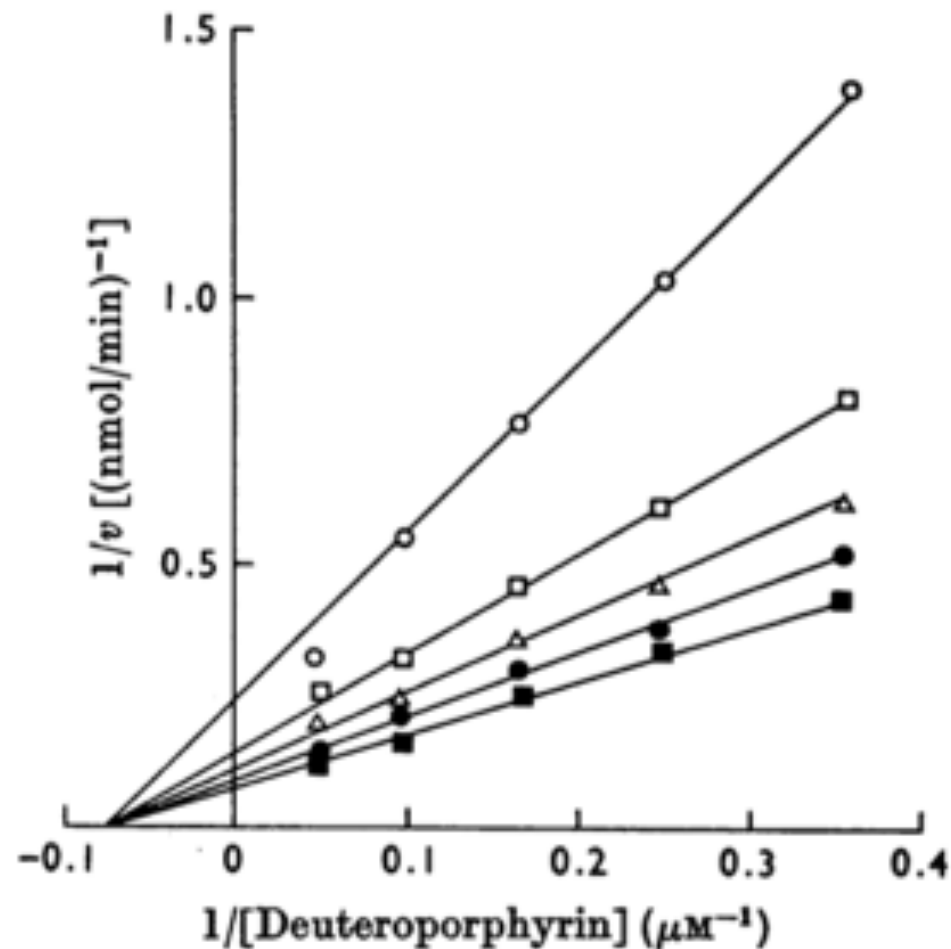
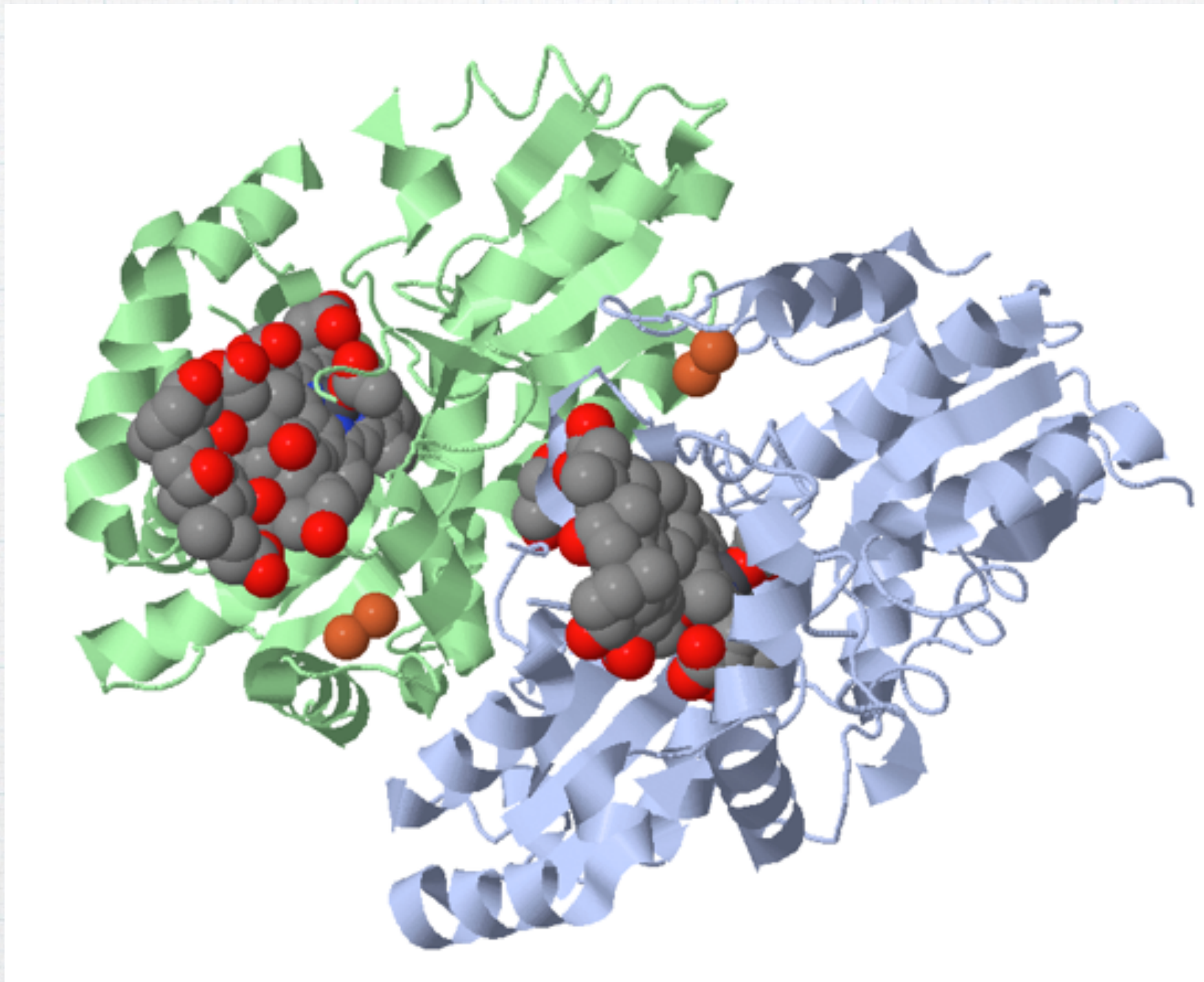


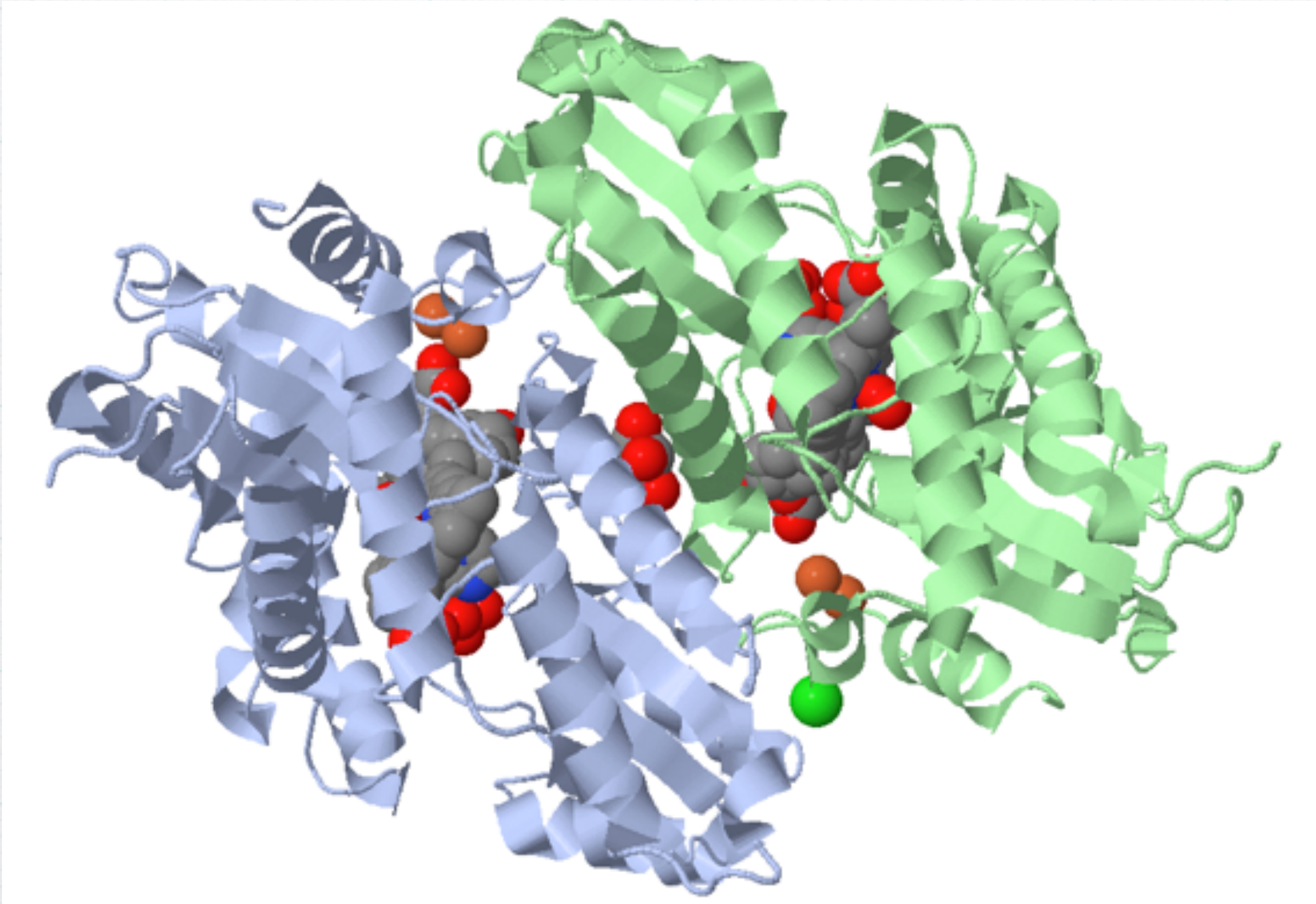
Fig. 8. Double-reciprocal plots of initial reaction velocity against deuteroporphyrin concentration to show the inhibition by Cd^{2+} of ferrochelatase from the particulate fraction of *R. spheroides*. Conditions for determination of rates of cobalt deuteroporphyrin formation were as described in Fig. 2. The concentration of Co^{2+} was 12.5 μM . The concentrations of Cd^{2+} were 7.0 μM (\circ), 3.5 μM (\square), 1.75 μM (\triangle) and 0.70 μM (\bullet); \blacksquare , control with no added Cd^{2+} .

Structure de la ferrochélatase



Ferrochélatase en présence de ses substrats (porphyrine et 2 ions Fe²⁺ par site actif)

Structure de la ferrochélatase



Ferrochélatase en présence de ses substrats (prophyrine et 2 ion Fe^{2+}) et du plomb Pb^{2+}

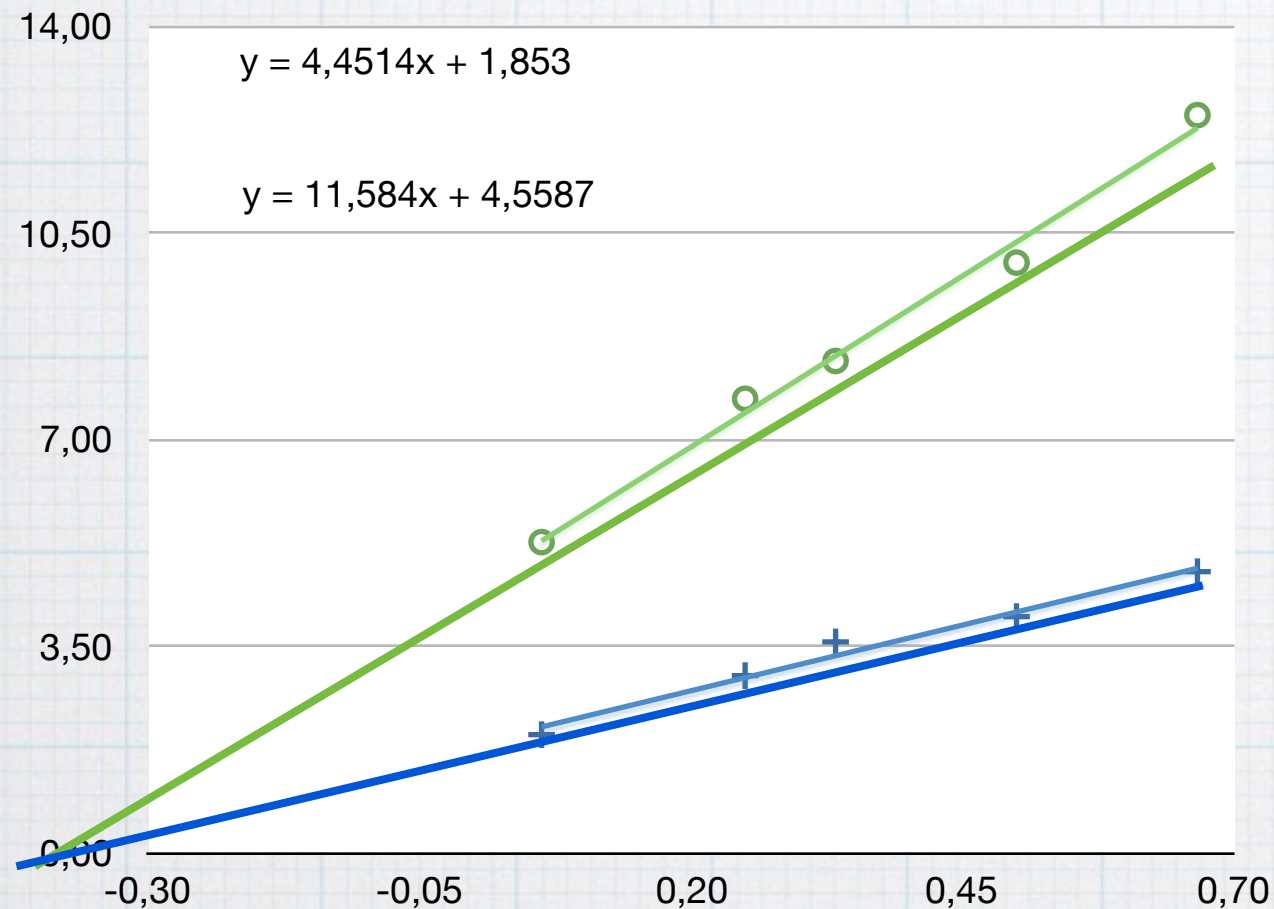
Exercice 4

La glutamate déshydrogénase est une enzyme michaelienne. On teste l'effet du salicylate sur cette enzyme.

[Glutamate] en mM	1,5	2	3	4	16
vitesse sans salicylate en mg de produit.min ⁻¹	0,21	0,25	0,28	0,33	0,5
vitesse avec salicylate en mg de produit.min ⁻¹	0,08	0,1	0,12	0,13	0,19

- Déterminez graphiquement à l'aide des données suivantes si l'inhibition est compétitive ou non compétitive.
- Calculez les constantes cinétiques V_{\max} et K_m de l'enzyme.
- Calculez le K_i du salicylate.

Correction de l'exercice 4



+ sans salicylate
○ avec salicylate
— Corrélation 1
— Corrélation 2

a) Même K_M donc même affinité
 $1/V_{\max}$ plus grand avec salicylate (donc V_{\max} plus faible).
=> Le salicylate est un inhibiteur non compétitif

b) $K_M : -1/K_M = -1,853/4,4514 = 0,416$
donc **$K_M = 2,4 \text{ mM}$**
 $V_{\max} : 1/V_{\max} = 1,853$
donc **$V_{\max} = 0,54 \text{ mg de produit.min}^{-1}$**

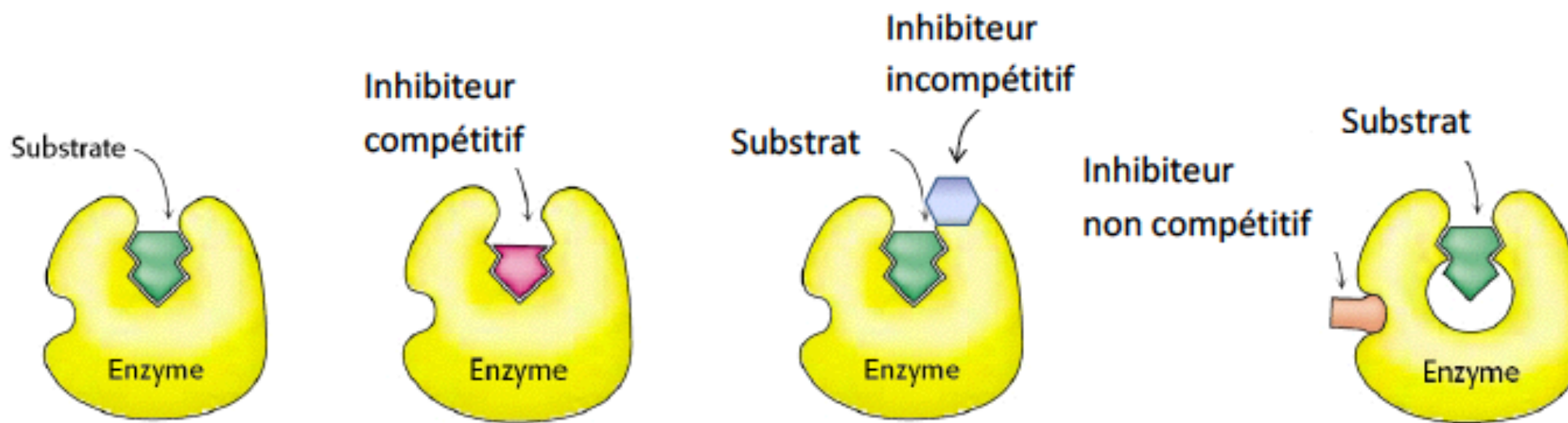
Exercice 5

A pH 7,7 et 25 °C, les cinétiques d'hydrolyse de l'O-nitrophényl-galactoside par la β -galactosidase de *Escherichia coli* ont été étudiées en absence ou en présence de l'un des composés suivants : l'O-nitrophényl- β -D-thiogalactoside (ONPTG), le maltose. La réaction est suivie en spectrophotométrie : on mesure l'absorbance à 410 nm.

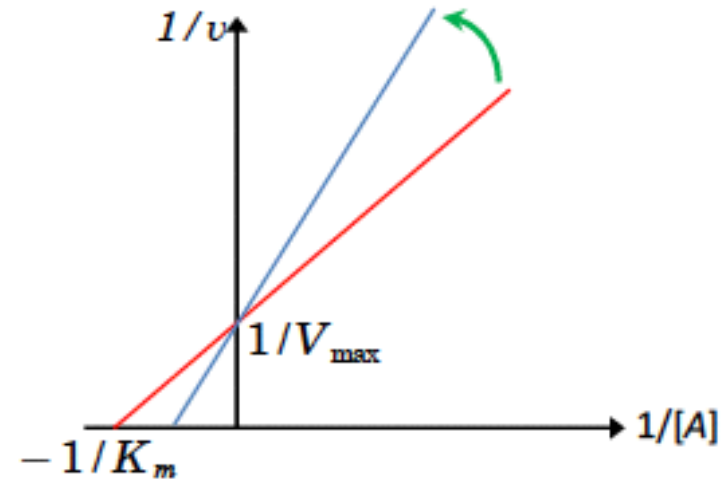
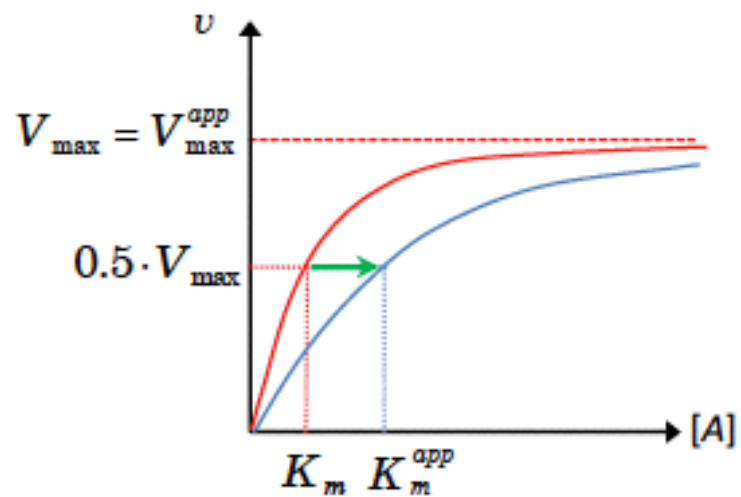
Les valeurs des vitesses initiales pour chacune des expériences sont données dans le tableau suivant (en variation de l'absorbance à 410 nm par minute).

[S ₀] M	V ₀	V ₀ en présence de ONPTG 3.10 ⁻⁴ M	V ₀ en présence de maltose 0,26 M
2,5 10 ⁻⁵	0,033	0,018	0,0165
5,0 10 ⁻⁵	0,055	0,033	0,0275
1,0 10 ⁻⁴	0,0825	0,055	0,041
2,5 10 ⁻⁴	0,118	0,091	0,059
5,0 10 ⁻⁴	0,138	0,118	0,069
1,0 10 ⁻³	0,15	0,138	0,075

1. Déterminer graphiquement la V_{max} et le K_m de l'enzyme.
2. Que pensez-vous de l'action des composés ONPTG et maltose ?



inhibition compétitive



inhibition noncompétitive

