**Chapitre 02 .Cinétique homogène**

Une catalyse est dite **homogène** lorsque le catalyseur et les réactifs forment une seule phase, généralement liquide ou gazeuse.

**1.Équation de Michaelis-Menten**

L’équation de Henri qui est à l’origine de l’équation de vitesse de Michaelis-Menten repose sur l’observation suivante : la vitesse initiale d’une réaction est directement proportionnelle à la concentration de la préparation enzymatique, mais augmente de manière non linéaire avec la concentration du substrat, jusqu’à une vitesse maximale limite. L’établissement de l’équation de Henri est fondé sur les hypothèses suivantes :

– l’enzyme est un catalyseur ;

– l’enzyme et le substrat réagissent rapidement pour former un complexe enzyme-substrat ;

– un seul substrat et un seul complexe enzyme-substrat sont impliqués et le complexe enzyme-substrat se brise pour donner directement l’enzyme libre et le produit ;

l’enzyme, le substrat et le complexe enzyme-substrat sont en équilibre. De plus, la vitesse de dissociation de *ES* en *E* + *S* est beaucoup plus rapide que la vitesse de coupure de *ES* pour former *E* + *P* ;

– la concentration du substrat est beaucoup plus élevée que celle de l’enzyme ; ainsi, la formation du complexe *ES* n’altère pas la valeur de la concentration de *S* ;

– la vitesse globale de la réaction est limitée par la coupure du complexe *ES* pour former l’enzyme libre et le produit ;

– la vitesse est mesurée dans les premiers instants de la réaction de telle manière que la réaction inverse ne soit pas significative.

La réaction totale s’écrit :

K+2

k+1

E + S ES E + P

K-1

La réaction de Michaleis Menten :

***V*M** est la vitesse maximale de la réaction qui permet d’obtenir la constante cinétique de la réaction lorsque la concentration des sites actifs [ E ]T est connue car VM = k +2 [ ET ].

La constante cinétique *k* +2 est appelée *turnover* . Le *turnover* d’une enzyme est le nombre de molécules de substrat transformées en produit par unité de temps, lorsque l’enzyme est totale-ment saturée par le substrat.

*K* M est appelée constante de Michaelis. Pour la plupart des enzymes, la valeur de *K* M dépend du substrat ainsi que des conditions expérimentales dans lesquelles s’effectue la réaction (température, force ionique et pH) , de *K* M a deux significations :

* elle correspond à la concentration en substrat pour laquelle la moitié des sites actifs sont occupés.

F= V/VM= [S]/[S]+KM

* cette valeur est fonction des constantes de vitesse de chacune des étapes du schéma de catalyse.

**KM= k-1+K+2/K+1**

Si on considère un cas limite dans lequel *k* –1 est beaucoup plus grand que *k* +2 cela signifie que la dissociation de *ES* en *E* et *S* est beaucoup plus rapide que la formation de *E* et *P* .

La constante de dissociation du complexe *ES* est alors donnée par :

**KM=K-1/K+1**

*K*M est donc égal à la constante de dissociation du complexe *ES* lorsque *k*+2 est beaucoup plus petit que *k*–1 . Si cette condition est satisfaite, *K*M est une mesure de la stabilité du complexe *ES* : une valeur de *K*M élevée indique une liaison faible du substrat avec l’enzyme alors qu’une valeur faible indiquera une liaison forte entre l’enzyme et son substrat. Il faut insister sur le fait que *K*M donne l’affinité du complexe enzyme-substrat seulement lorsque *k*–1 est beaucoup plus grand que *k*+2 : cela est le cas pour la plupart des enzymes.

La représentation de *V* en fonction de *S* étant une hyperbole, il est assez difficile de déterminer directement *V*M et *K*M. La linéarisation de l’équation permet une représentation plus précise :

Si l’on trace la représentation de Lineweaver et Burk, 1/*V* = f(1/[*S*]), on doit obtenir une droite de pente *a* = *K*M/*V*M dont l’intersection avec l’axe des ordonnées est égale à 1/*V*M. De plus, l’intersection avec l’axe des abscisses peut être déterminée lorsque 1/*V* = 0 et est égale à

– 1/*K*M

**2. Inhibition/activation**

N’importe quelle substance qui réduit la vitesse d’une réaction catalysée par une enzyme peut être considérée comme un inhibiteur. L’inhibition de l’activité enzymatique est un des principaux moyens de régulation des cellules vivantes et une des procédures de diagnostic des enzymologistes. L’étude de l’inhibition d’une enzyme nous renseigne sur sa spécificité, sur l’architecture physique et/ou chimique de son site actif et sur le mécanisme cinétique de la réaction.

**2.1. Inhibition compétitive**

Un inhibiteur compétitif est une substance qui se combine avec l’enzyme libre d’une manière qui empêche la liaison du substrat. Ainsi, l’inhibiteur et le substrat s’excluent mutuellement, du même site, par une vraie compétition. La nature des inhibiteurs compétitifs est variable : il peuvent être des analogues non métabolisables du substrats, des dérivés du substrat, un autre substrat de l’enzyme ou un produit de la réaction. Par exemple, la succinate deshydrogénase est l’enzyme qui catalyse l’oxydation de l’acide succinique en acide fumarique : l’acide malonique ressemble suffisamment à l’acide succinique pour se combiner avec le site actif de l’enzyme. Toutefois, comme l’acide malonique n’a qu’un seul groupe méthylène, la réaction d’oxydoréduction n’a pas lieu. L’acide malonique est un inhibiteur compétitif de la succinate deshydrogénase.

La présence d’un inhibiteur compétitif augmente simplement le *K*M apparent de l’enzyme pour le substrat, la vitesse maximale de la réaction est inchangée.

**2.2. Inhibition non compétitive**

Un inhibiteur non compétitif classique n’a pas d’effet sur la liaison du substrat avec l’enzyme et *vice versa*. L’inhibiteur et le substrat se lient de manière réversible, au hasard et de manière indépendante sur différents sites de l’enzyme. Ainsi *I* peut se lier à *E* ou *ES* et *S* à *E* ou *EI*. La liaison d’un des deux n’a aucun effet sur la dissociation du complexe formé avec l’autre. Toutefois, le complexe *ESI* ou *EIS* est inactif.

Un inhibiteur non compétitif classique diminue donc *V*M mais n’a pas d’effet sur *K*M.

**2.3. Activateur des enzymes**

Les activateurs sont des composés qui augmentent la vitesse d’une réaction catalytique sans être eux-mêmes impliqués dans la réaction catalysée par l’enzyme. Il existe deux types de molécules activatrices : les activateurs non essentiels, c’est-à-dire que la réation se produit même si l’activateur n’est pas présent, ce qui est le cas des ions inorganiques et les systèmes dans lesquels le vrai substrat est un complexe substrat-activateur. Dans ce cas, les activateurs (groupements prosthétiques ou cofacteurs) sont nécessaires à l’activité catalytique de l’enzyme. À l’exception des groupes prosthétiques ou cofacteurs, les activateurs ne sont pas spécifiques et plusieurs familles de molécules peuvent avoir le même effet d’activation sur une enzyme : par exemple, les amylases sont activées par une grande variété d’anions.

**3. Allostérie (modèle de Monod)**

Si la liaison d’une molécule de substrat sur la protéine (qui possède plusieurs sites actifs) induit des changements de structures qui modifient l’affinité des sites vacants, la courbe de vitesse ne suivra plus la cinétique de Michaelis-Menten et l’enzyme sera classée en enzyme allostérique. En général, les enzymes allostériques ont des courbes de vitesse sigmoïdes. La liaison d’une molécule de substrat facilite la liaison de la suivante en augmentant l’affinité des sites de liaison vacants. Ce phénomène est appelé liaison coopérative, ou coopérativité positive, par rapport à la fixation du substrat.

Deux types de modèles ont été proposés pour les enzymes allostériques : le **modèle séquentiel** et le **modèle concerté**. Le modèle séquentiel, comme son nom le suggère, suppose des changements séquentiels ou progressifs dans l’affinité des sites vacants, au fur et à mesure de l’occupation des sites. Le modèle concerté suppose que l’enzyme sous forme d’un mélange en équi-libre d’un oligomère à forte affinité et un oligomère à faible affinité. Les ligands (substrat, activateur, inhibiteur) agissent en déplaçant l’équilibre en faveur d’un état ou de l’autre. Durant la transition, la conformation de toutes les sous-unités change en même temps et l’oligomère garde sa symétrie. Ce modèle, proposé par Monod et ses collaborateurs en 1965, repose sur les points suivants :

* les protéines allostériques sont polymériques et contiennent des unités minimales identiques (protomères) arrangées de manière symétrique ;
* chaque protomère possède un et un seul site actif de liaison pour n’importe quel ligand (substrat, inhibiteur ou activateur) ;
* l’oligomère peut exister dans au moins deux conformations différentes qui sont en équilibre. Les différentes conformations peuvent provenir d’un réarrangement de la structure quaternaire ou d’un changement de la structure tertiaire des protomères. La transition entre une conformation ou l’autre est un événement tout ou rien. Ainsi, la symétrie de l’oligomère est conservée dans la transition ;
* l’affinité d’un site de liaison pour un ligand donné dépend de la conformation du protomère. La liaison d’un ligand sur une conformation particulière provoque un déplacement de l’équilibre entre les conformations de l’oligomère, vers la conformation qui possède la meilleure affinité pour ce ligand. Comme chaque oligomère possède plusieurs sites de liaison, et que le changement de conformation de la faible affinité vers la forte affinité se produit simultanément pour tous les sites, on obtient une courbe sigmoïde.

**4. Effet du pH et de la température**

**4.1. Effet du pH**

L’activité enzymatique dépend fortement du pH et pour la plupart des enzymes. On distingue facilement une étroite zone dite de pH optimum où la vitesse de réaction est la plus grande, de part et d’autre de laquelle la vitesse décroît notablement. Cet effet peut être dû à trois actions indépendantes :

* un effet de dégradation irréversible des pH extrêmes sur l’enzyme, comportant, soit la dénaturation qui, par rupture de liaison non covalente, modifie la structure spatiale de l’enzyme, soit même la rupture de liaisons covalentes.
* un effet sur l’état d’ionisation du substrat s’il possède des groupes polaires que l’on peut éventuellement déduire du comportement d’analogues dépourvus de ces groupes ;
* enfin, un effet sur l’état d’ionisation de l’enzyme qui est le plus intéressant pour l’étude des enzymes.

La relation entre l’activité et le pH se traduit en général par une courbe en cloche.

**4.2. Effet de la température**

Il faut tout d’abord distinguer deux phénomènes radicalement différents quant à leur origine : l’inactivation par dénaturation ther mique et l’effet habituel de la température sur la vitesse de réaction (activation des molécules).

**4.2.1. Activation de la réaction**

La vitesse initiale d’une réaction enzymatique dans la zone de température utilisable pour du matériel biologique, de 0 à 50 oC environ, Cette approche est assurée exclusivement, et au hasard, par l’agitation moléculaire qui suit les lois de la cinétique des gaz. Le nombre des collisions croît avec la température, mais d’une façon très faible, qui ne peut en aucune façon expliquer l’augmentation de vitesse de réaction. L’énergie de ces collisions, par contre, croît d’une façon importante et est à l’origine de cette augmentation de vitesse.

**4.2.2.Dénaturation thermique**

C’est une transformation, sous l’effet de la chaleur, de la forme active de l’enzyme en une ou des formes dénaturées. Au-delà d’une certaine température, l’agitation thermique des molécules de solvant du milieu provoque la rupture plus ou moins importante de l’organisation structurale de la protéine nécessaire à l’activité catalytique entraînant la perte de la structure tertiaire.

Cette dénaturation est suivie par la mesure du temps de demi-vie de l’enzyme qui correspond, pour une température donnée, La plupart des enzymes montrent des vitesses d’inactivation thermique notables à partir de 30-35 La plupart des enzymes montrent des vitesses d’inactivation thermique notables à partir de 30-35 oC. Toutefois certaines sont particulièrement résistantes : il faut atteindre des températures de 70-80 oC et même 110-120 oC pour des amylases provenant d’organismes thermophiles pour obtenir une dénaturation de la protéine.. Toutefois certaines sont particulièrement résistantes : il faut atteindre des températures de 70-80 et même 110-120 oC pour des amylases provenant d’organismes thermophiles pour obtenir une dénaturation de la protéine.