

1. Catalyse chimique et enzymatique

Les catalyseurs chimiques sont des substances qui: a) augmentent la vitesse des réactions qu'elles catalysent de manière non spécifique; b) agissent en très petites quantités; c) sont inchangées en fin de réaction. Les enzymes sont des protéines qui ont la particularité d'être douées du pouvoir de catalyse spécifique: ils peuvent augmenter les vitesses de certaines réactions chimiques sans cependant modifier le résultat final, c'est-à-dire l'équilibre obtenu en fin de réaction entre les réactants.

Un enzyme accélère la vitesse d'une réaction donnée (spécificité de réaction) et donc diminue considérablement le temps nécessaire à l'obtention de l'équilibre final. Exemple, la vitesse de la réaction de phosphorylation du glucose par l'ATP:



Le flèche indiquent la réversibilité de la réaction: si les deux réactants glucose et ATP sont mis en présence l'un de l'autre, la réaction se produit spontanément, mais très lentement, et du glucose 6-phosphate est formé jusqu'à l'obtention d'un équilibre tel que:

$[\text{Glucose 6-phosphate}] [\text{ADP}] [\text{Glucose}] [\text{ATP}] = K_{eq}$. (les crochets indiquent des concentrations et K_{eq} est la constante d'équilibre). L'hexokinase accélère la vitesse de la réaction spontanée qui devient 10 milliards de fois plus rapide mais elle ne modifie pas la constante d'équilibre K_{eq} .

2. Energie d'activation

Pour comprendre le mécanisme d'action d'un enzyme sur un substrat il faut noter que le substrat est habituellement une molécule stable et que sa transformation nécessite un apport énergétique qui permettra de dépasser une barrière énergétique. Une bonne analogie est celle représentée par une bille qui doit remonter le long d'une pente pour retomber de l'autre côté de cette colline énergétique.

Si on pousse la bille (substrat), quelques billes ou molécules de substrat dépassent le sommet de la colline c'est-à-dire que ces molécules de substrat se transforment en molécules de produit. La molécule de substrat lorsqu'elle se trouve au sommet de la colline énergétique, adopte une structure que l'on appelle état de transition. L'abaissement de l'énergie d'activation de la réaction est obtenu par différents processus :

- Stabilisation de l'état de transition : l'enzyme modifie l'environnement sur le site actif, de telle sorte que la distribution des charges électriques soit complémentaire de celle correspondant à l'état de transition.

- Formation par l'enzyme d'un composé intermédiaire covalent dont l'état de transition a une énergie plus faible.
- Formation par l'enzyme d'un chemin réactionnel comportant plusieurs états de transition dont l'énergie d'activation est plus faible
- . ■ Déformation ou réorientation du substrat par l'enzyme, conduisant à un état de transition d'énergie plus faible.

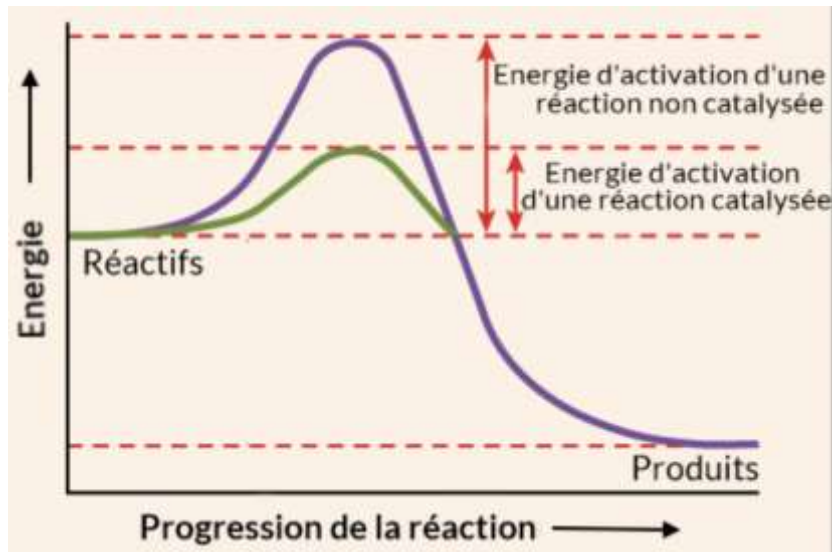


Figure 1 : Diagramme d'une réaction catalysée avec une enzyme (E), en présence de substrat (S)(substrat) avec une énergie d'activation plus faible que celle sans enzyme.

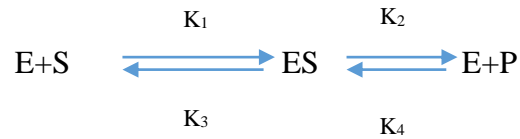
3. Cinétique enzymatique

La cinétique d'une réaction catalysée par un enzyme est modifiée par divers facteurs: la concentration de l'enzyme, la concentration du ou des substrats, le pH, la température, la présence (et alors la concentration) ou l'absence de cofacteurs, d'inhibiteurs, d'activateurs. La cinétique enzymatique apporte souvent des données intéressantes sur le mécanisme d'action d'un enzyme; elle apporte des données sur la réponse de l'enzyme à des variations de concentrations des substrats dans les cellules; enfin, elle permet de comprendre comment s'effectuent certaines régulations physiologiques de l'action enzymatique.

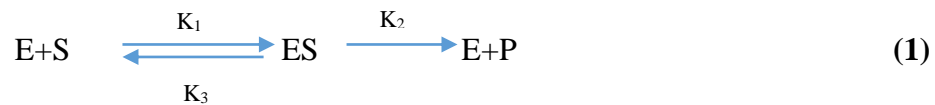
3.1.Réactions à un substrat

Cette réaction (dite Uni-Uni) représente le cas le plus simple. On envisage habituellement une situation dans laquelle la concentration en enzyme est très petite devant la concentration en substrat ($E \ll S$), k_1 , k_2 , k_3 , et k_4 étant les constantes de vitesse des différentes réactions possibles. Selon le modèle de Michaelis-Menten, l'enzyme (E) s'associe à un substrat (S) en

formant un complexe enzyme-substrat (ES) qui se dissocie pour générer un produit (P). La réaction peut alors être schématisée par :



Au début d'une réaction enzymatique, la quantité de produit P étant très inférieur à celle de ES, il est possible de négliger la réaction $E + P \rightarrow ES$ et on peut utiliser l'équation simplifiée:



3.1.1. Constante de Michaelis

Suivant la réaction (1) la vitesse de disparition du substrat ($-ds/dt$) est égale à la vitesse de formation des produits de la réaction (dp/dt).

$$-ds/dt = dp/dt \quad (2)$$

D'après la loi d'action de masse en a:

$$V_1 = k_1[E][S]$$

$$V_2 = k_2[ES]$$

La vitesse d'apparition des produits de réactions est

$$dp/dt = V_3 = k_3[ES] \quad (3)$$

Puisque $dp/dt = -ds/dt$ d'où $V_1 - V_2 = V_3$ et $V_1 = V_2 + V_3$

$$K_1[E][S] = K_2[ES] + K_3[ES]$$

$$K_1[E][S] = (K_2 + K_3) [ES]$$

$$[E][S] / [ES] = (K_2 + K_3) / K_1 = K_m \quad (4)$$

K_m est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (ES) est appelé constante de Michaelis-Menten. K_m définit l'affinité de l'enzyme par son substrat. Plus K_m est grande plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est faible et l'inverse. La constante de Michaelis K_m s'exprime en mol.L^{-1} . K_m a la dimension d'une concentration (entre 10^{-8} et $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$).

3.1.2. Equation de Michaelis-Menten

Soit $[E_T]$ la concentration d'enzyme présent dans le système. La concentration d'enzyme libre sera : $[E_L] = [E_T] - [ES]$

L'expression de la constante de Michaelis-Menten devient:

$$K_m = [E][S] / [ES] = ([E_T] - [ES]) \cdot [S] / [ES]$$

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

$$K_m + [S] = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad [ES] = \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

La vitesse de la réaction enzymatique est égale à V_3

$$V = V_3 = K_3[ES] \quad (6)$$

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

$$V = K_3 \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

La vitesse de la réaction dépend donc de $[E]$, $[S]$ et de K_m . D'après l'équation $V = K_3[ES]$, cette vitesse sera maximale lorsque $[ES]$ sera le plus grand possible. c'est à dire $[ES] = [E]$ dans ce cas:

$$[ES] = [E] \quad V_{max} = K_3[E] \quad (8)$$

L'équation 7 qui exprime la vitesse de réaction à chaque instant devient alors:

$$V = V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equation de Michaelis Menten} \quad (9)$$

$$V = f[S]. \quad (\text{Si } [S] = 0 \quad V = 0, \text{ si } [S] \uparrow \quad V = V_{max})$$

Où $[S]$ (en mol.L^{-1}) correspond à la concentration en substrat. V (en $\mu\text{mol.min}^{-1}$) à la vitesse initiale (en absence de produit P) de la réaction enzymatique pour une concentration de substrat $[S]$. Quant à V_{max} , cela correspond à la vitesse initiale maximale de la réaction quand tout l'enzyme (E total) est sous la forme $\{ES\}$, cas où le substrat est en large excès par rapport à l'enzyme. V_{max} représente l'activité catalytique de l'enzyme. Suivant ce modèle de Michaelis-Menten, les variations de la concentration en fonction de la vitesse initiale sont données sur la (Figure 2).

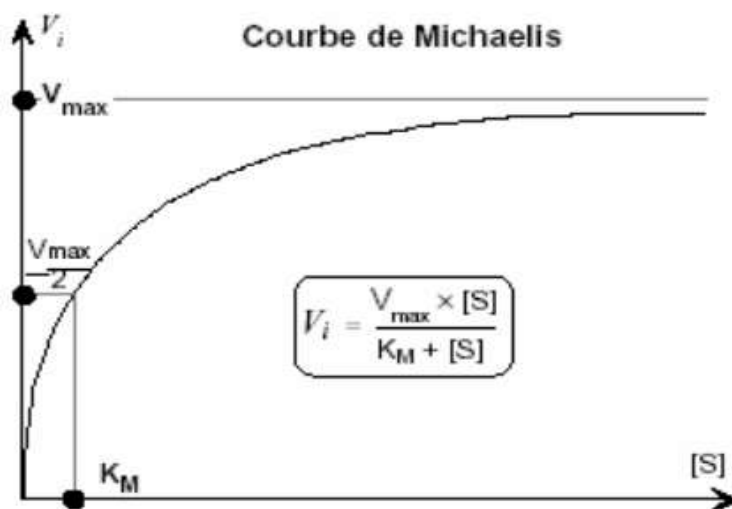


Figure 2: Courbe de Michaelis-Menten .

3.1.3. Détermination de la constante de Michaelis Menten

Si dans l'équation 9 on remplace $V = V_{max}/2$: On a. $V_{max}/2 = V_{max} \cdot [S]/(K_m + [S])$

$$2[S] = K_m + [S] \quad K_m = [S] \quad (10)$$

La constante K_m est la valeur de $[S]$ lorsque $v = V_{max}/2$

3.1.4. Méthode graphique de Linweaver et Burk

La réciproque de la réaction de Michaelis-Menten est également très utile:

$$1/V = (K_m + [S]) / (V_{max} [S])$$

qu'on peut aussi écrire

$$1/V = K_m / (V_{max} [S]) + [S] / (V_{max} [S])$$

et qui se simplifie en

$$1/V = K_m / (V_{max}[S]) + (1/V_{max}) \quad (11)$$

qu'on appelle aussi *équation de Linweaver-Burk*.

Cette équation est une équation d'une ligne droite de la forme

$y = ax + b$ ou $1/V = f(1/[S])$. La pente est $a = K_m/V_{max}$. Son ordonné à l'origine est $b = 1/V_{max}$ (Figure 3).

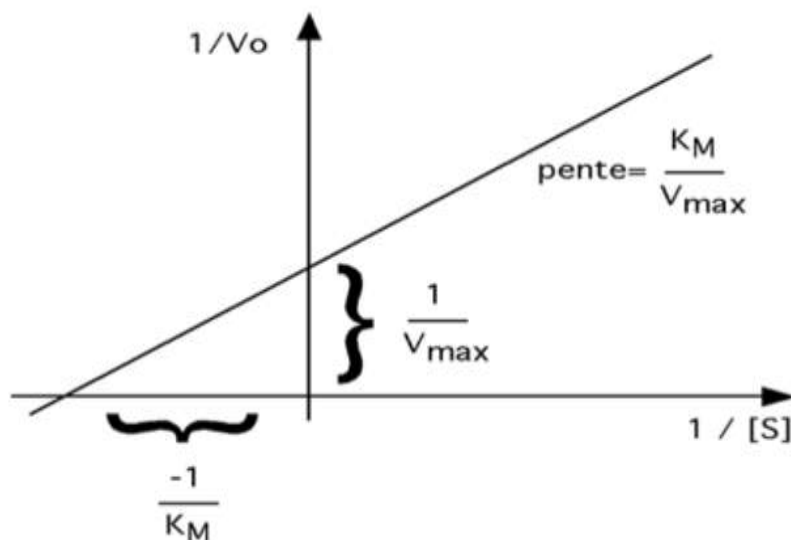


Figure 3: Représentation linéaire de Linweaver et Burk .

Ceci permet une détermination graphique de K_m : 2 points caractéristiques la rendent possible d'après l'équation (11)

Pour $1/V = 0 \longrightarrow 0 = K_m/V_{\max} \cdot (1/[S]) + 1/V_{\max}$
 $\longrightarrow 1/[S] = 1/K_m$

Pour $1/V = 2/V_{\max} \longrightarrow 2/V_{\max} = K_m/V_{\max} \cdot (1/[S]) + 1/V_{\max}$
 $\longrightarrow 2/V_{\max} - 1/V_{\max} = K_m/V_{\max} \cdot (1/[S])$
 $\longrightarrow 1/[S] = 1/K_m$

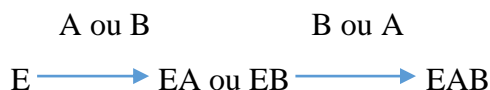
3.2. Réactions à deux substrats

Les réactions à deux substrats (ou à plusieurs substrats) donnent évidemment des cinétiques plus complexes que les réactions à un seul substrat. Elles peuvent être séparées en deux catégories selon qu'un complexe ternaire (enzyme plus les deux substrats) est ou non formé. Un complexe ternaire peut lui-même être formé de deux façons :

a) de façon ordonnée, c'est-à-dire que l'un des substrats se fixe obligatoirement avant l'autre :



b) de façon non ordonnée (au hasard) :



3.2.1. Inhibition des réactions enzymatiques

L'inhibition des réactions enzymatiques présente de très nombreuses applications en thérapeutique. Le tableau I montre les plus importants inhibiteurs utilisés en thérapeutique mais ce tableau s'enrichit chaque année de nouvelles substances.

Tableau I : Quelques inhibitions enzymatiques utilisées en thérapeutiques.

Inhibiteur	Enzyme cible	Maladie
Atorvastatine	HMG-CoA réductase	Athérosclérose
Allopurinol	Xanthine oxydase	Goutte
Oméprazole	Anhydrase carbonique	Glaucome
ciclosporine	Cyclophiline	Rejet de greffe
Méthotrexate	Dihydrofolate réductase	Cancer
Ibuprofène	Prostaglandine synthase	Inflammations diverses
Orlistat	Lipase gastro-intestinale	Obésité

3.2.1.1. Inhibitions facilement réversibles

L'inhibiteur se fixe sur la molécule d'enzyme (libre ou ayant déjà fixé le substrat) et il en est libéré à des vitesses qui sont de l'ordre de l'activité moléculaire de l'enzyme. On distingue parmi ces inhibiteurs trois types selon le mode de fixation de l'inhibiteur :

A. Inhibition compétitive

Inhibiteur compétitif se fixe sur l'enzyme libre, l'inhibiteur et le substrat entrent en compétition pour se lier aux pools de molécules d'enzyme libres. Ainsi, la valeur apparente de K_M augmente avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur, mais la valeur V_{max} reste constante à toutes les concentrations d'inhibiteurs. La Figure 4 explicite ces données et indique les modifications cinétiques induites par un inhibiteur compétitif.

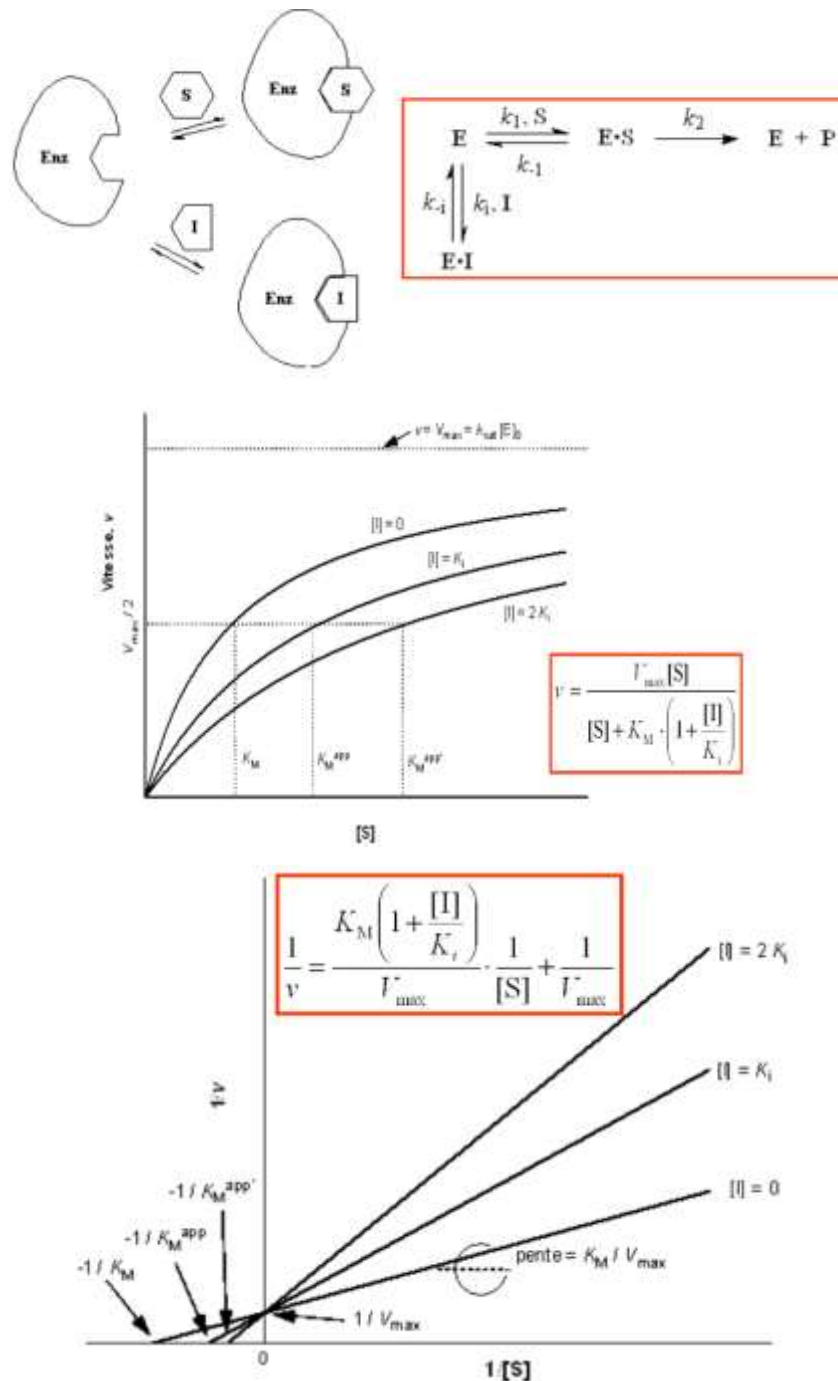


Figure 4 : Inhibition compétitive (A) représentation générale; (B) graphique Michaelis Menten; (C) graphique lineweaver et Burk.

B. Inhibition incompétitive

L'inhibiteur incompétitive se lie sur le complexe enzyme-substrat, La formation de complexe ES. Le complexe augmente l'affinité de l'inhibiteur pour le complexe ES, contribuant ainsi à une diminution valeurs apparentes de K_M et de V_{max} avec des concentrations croissantes de substrat. La Figure 5 explicite ces données et indique les modifications cinétiques induites par un inhibiteur incompétitif.

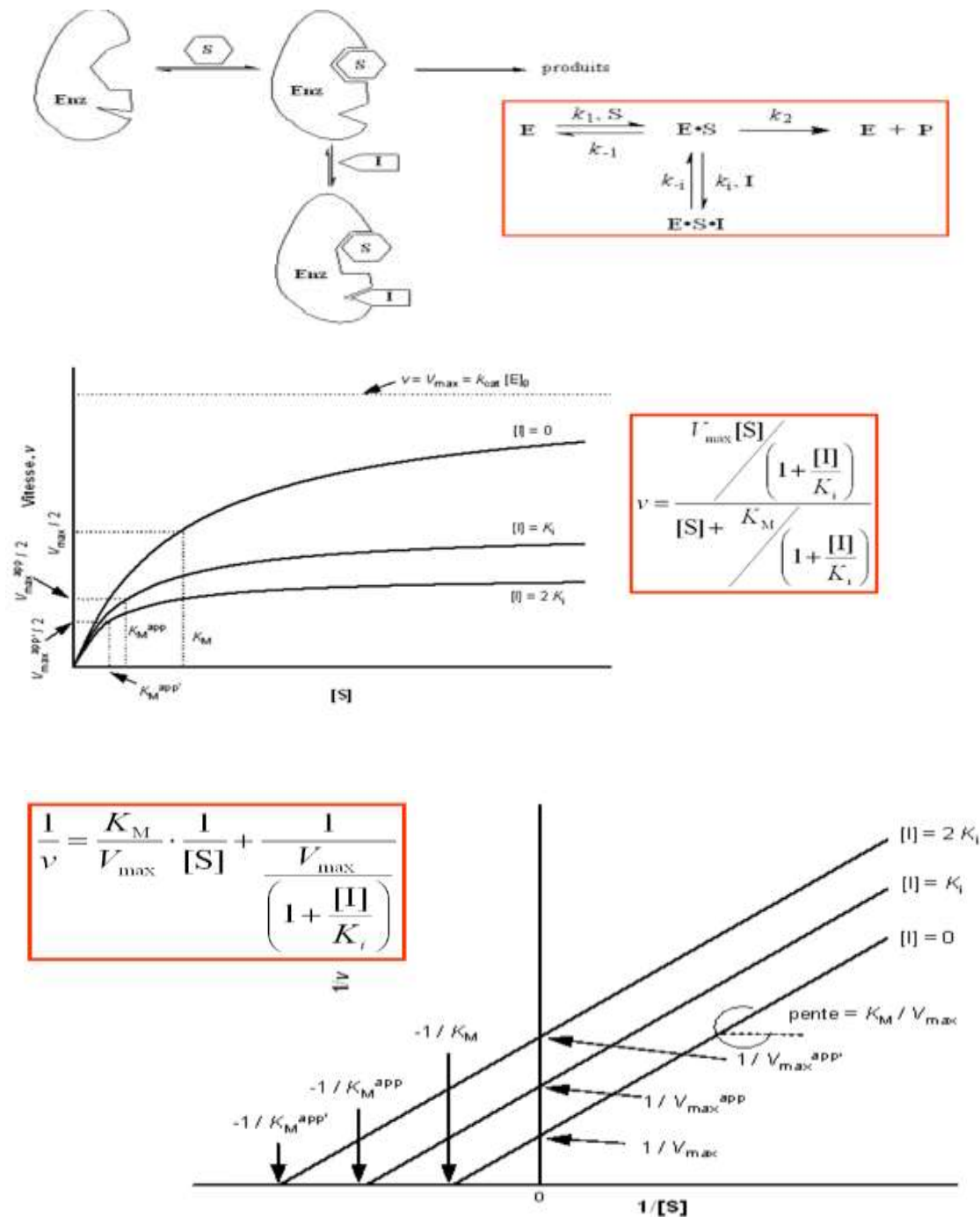


Figure 5 : Inhibition incompétitive (A) représentation générale; (B) graphique Michaelis Menten; (C) graphique lineweaver et Burk.

Inhibition non compétitive

L'inhibiteur non compétitif est lié à la fois sur l'enzyme libre et le complexe enzyme-substrat. Ce type d'inhibiteur a deux types différents constantes de dissociation, une pour le complexe binaire enzyme-inhibiteur (EI) et une pour le complexe ternaire enzyme-substrat-inhibiteur (ESI). Les inhibiteurs non compétitifs ne peuvent pas être surmontés par une concentration élevée en substrat. La Figure 6 explicite ces données et indique les modifications cinétiques induites par un inhibiteur non compétitif.

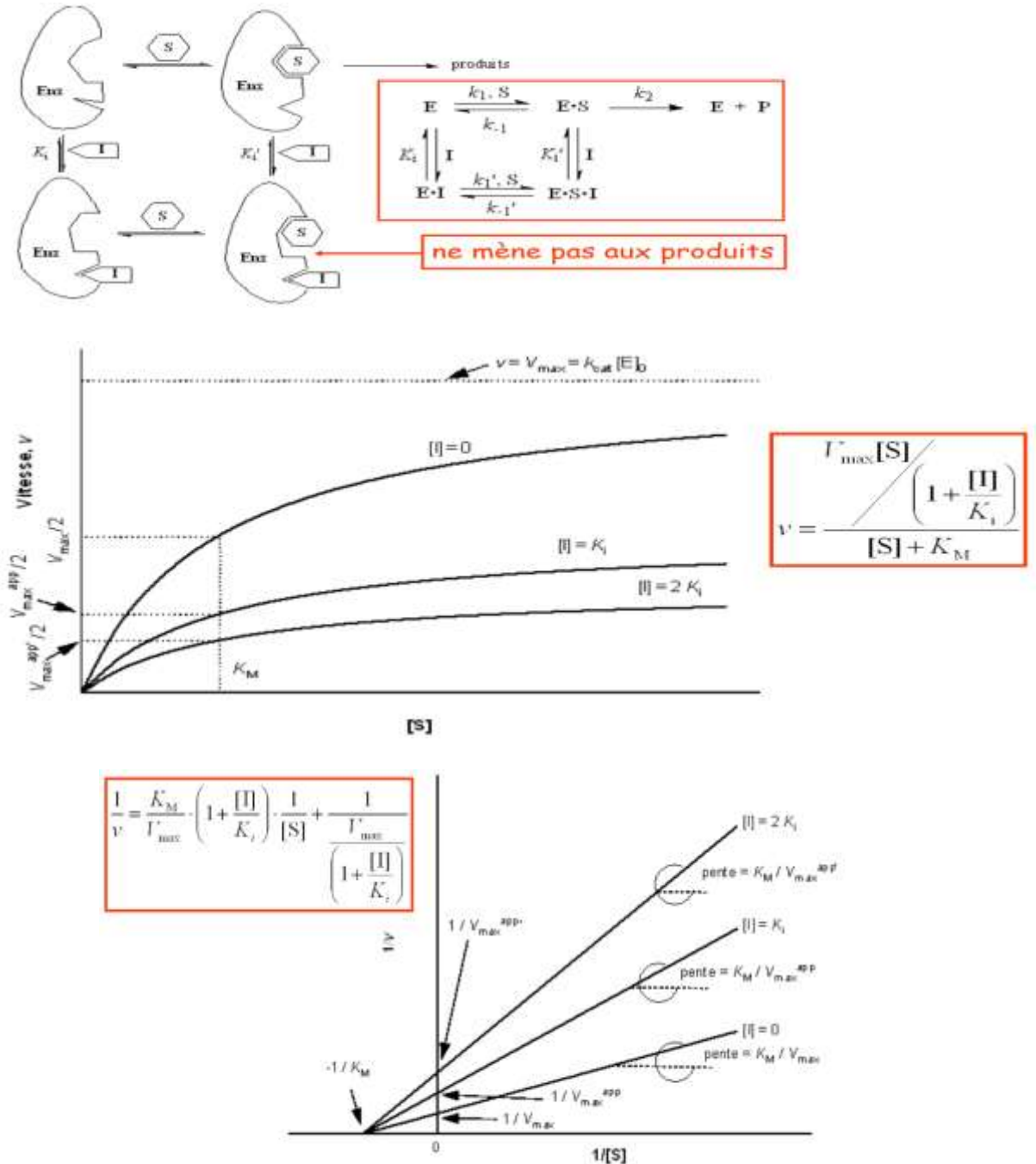


Figure 6 : Inhibition non compétitive (A) représentation générale; (B) graphique Michaelis Menten; (C) graphique lineweaver et Burk.