

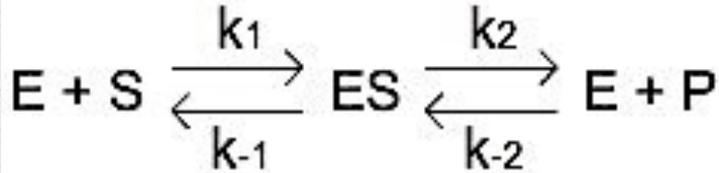
*SVE – Le métabolisme cellulaire*

# **La cinétique michaélienne**

# 1. Étude cinétique

# Équation mise en jeu

E = enzyme   S = substrat   ES = complexe enzyme-substrat   P = produit



$k_1$  = constante d'association de E + S

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

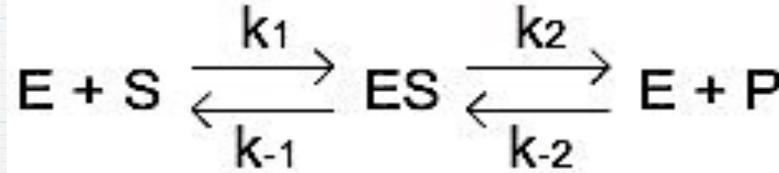
$k_2$  = constante de réaction de ES en E + P

$k_{-2}$  = 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

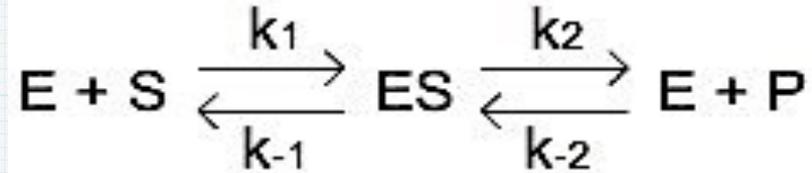


## Travail sur la vitesse initiale : calcul de $v_i$

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



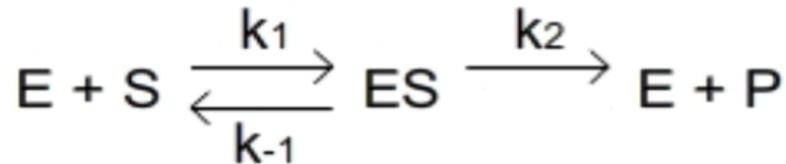
# Conditions du modèle



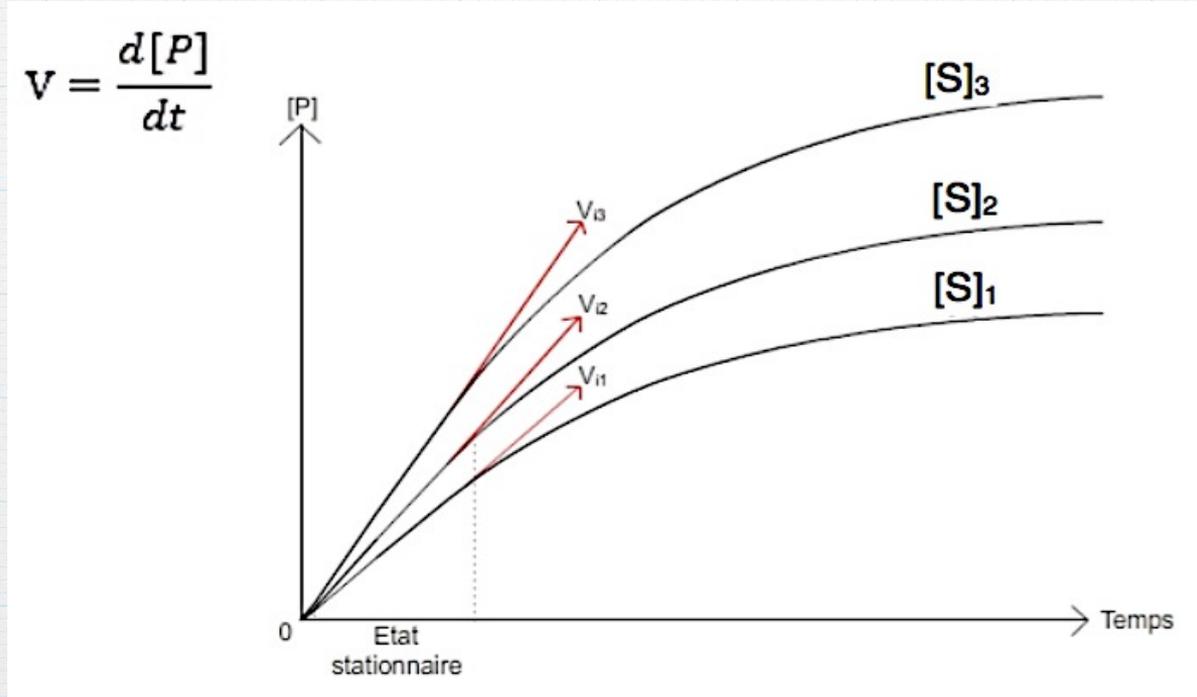
**Travail sur la vitesse initiale : calcul de  $v_i$**

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 $V_i$



vitesse initiale assimilée à une droite

# Modélisation mathématique

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

Concentration en substrat [S] très largement supérieure à la concentration totale en enzyme [E]<sub>T</sub>

**Hypothèse d'un état quasi-stationnaire**  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$

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).

# Modélisation mathématique

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

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

Il faut donc déterminer  $[ES]$ .

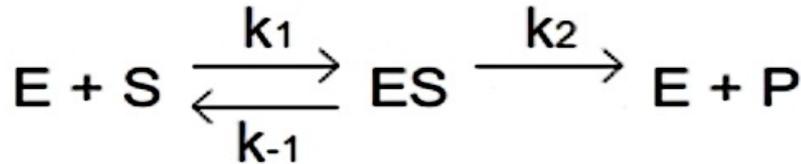
# Modélisation mathématique

On cherche [ES].

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

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

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



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

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

$V_{\max}$  ←

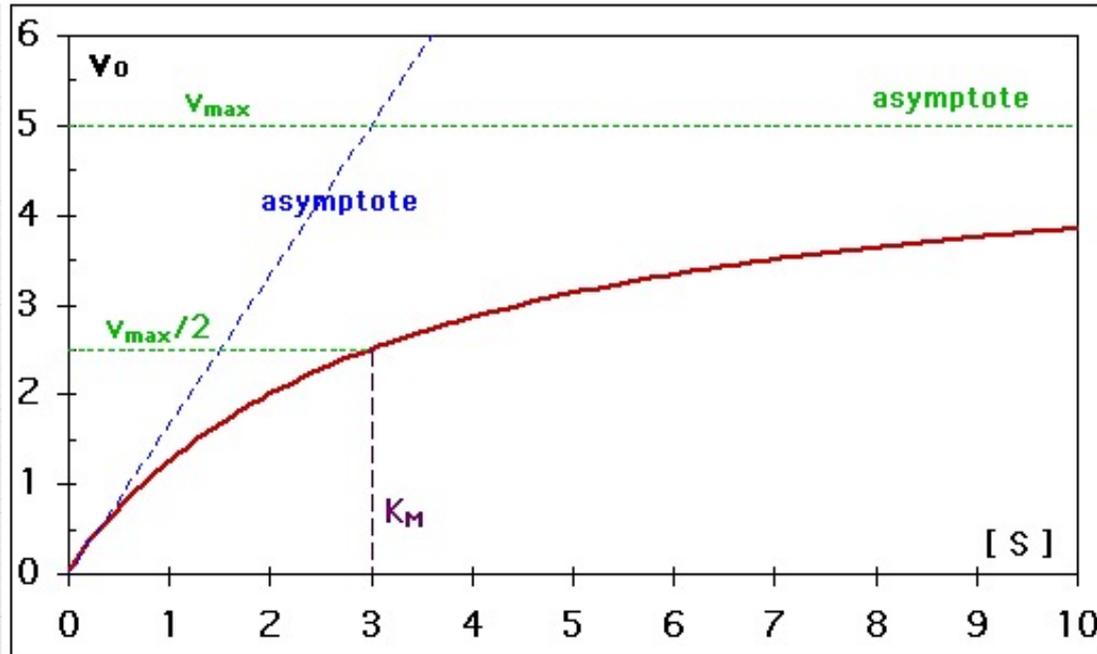
$$V_i = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

# 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<sub>max</sub>** = vitesse de catalyse = vitesse de la réaction lorsque toutes les enzymes sont occupées donc cela représente l'activité enzymatique réelle.

constante de catalyse : **K<sub>cat</sub>** =  $\frac{V_{\max}}{[E]_T}$  reflète l'**activité enzymatique**

## Paramètres cinétiques

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.**

# 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  $1/[S]$ .

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

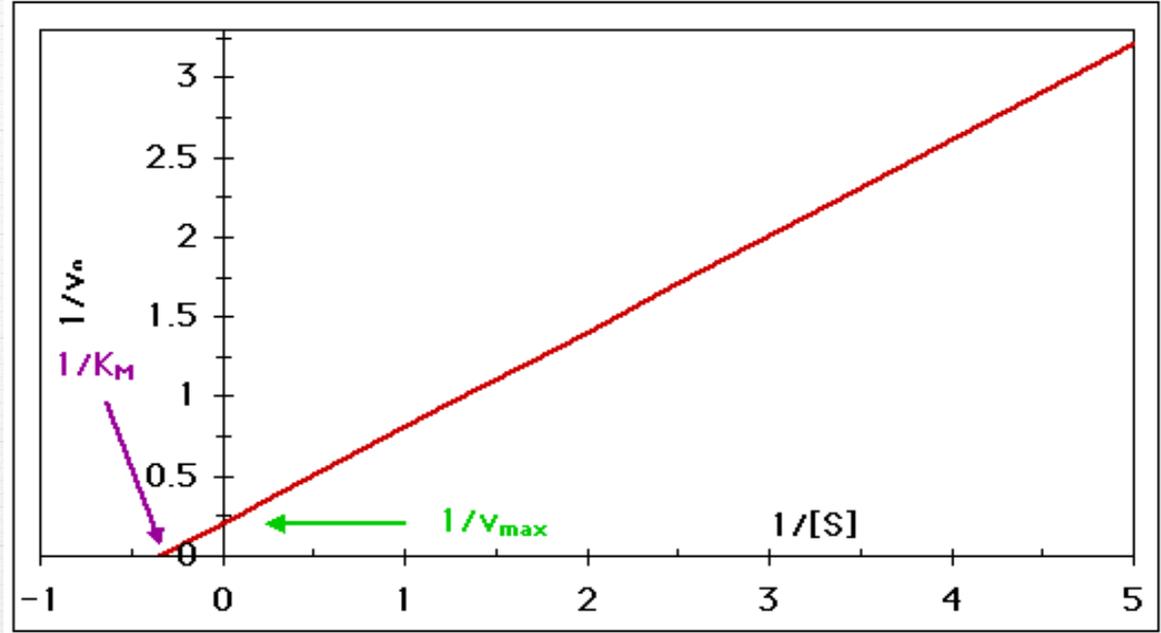
devient en  $1/V_i$ ...

# La représentation en double inverse

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

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

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

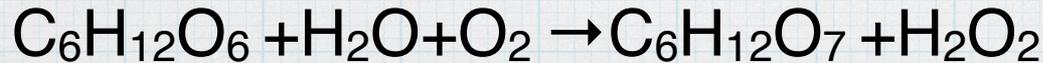
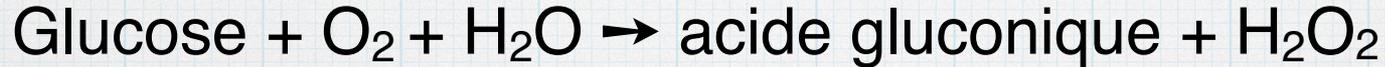


équation de droite qui croise l'axe des ordonnées en  $1/V_{max}$

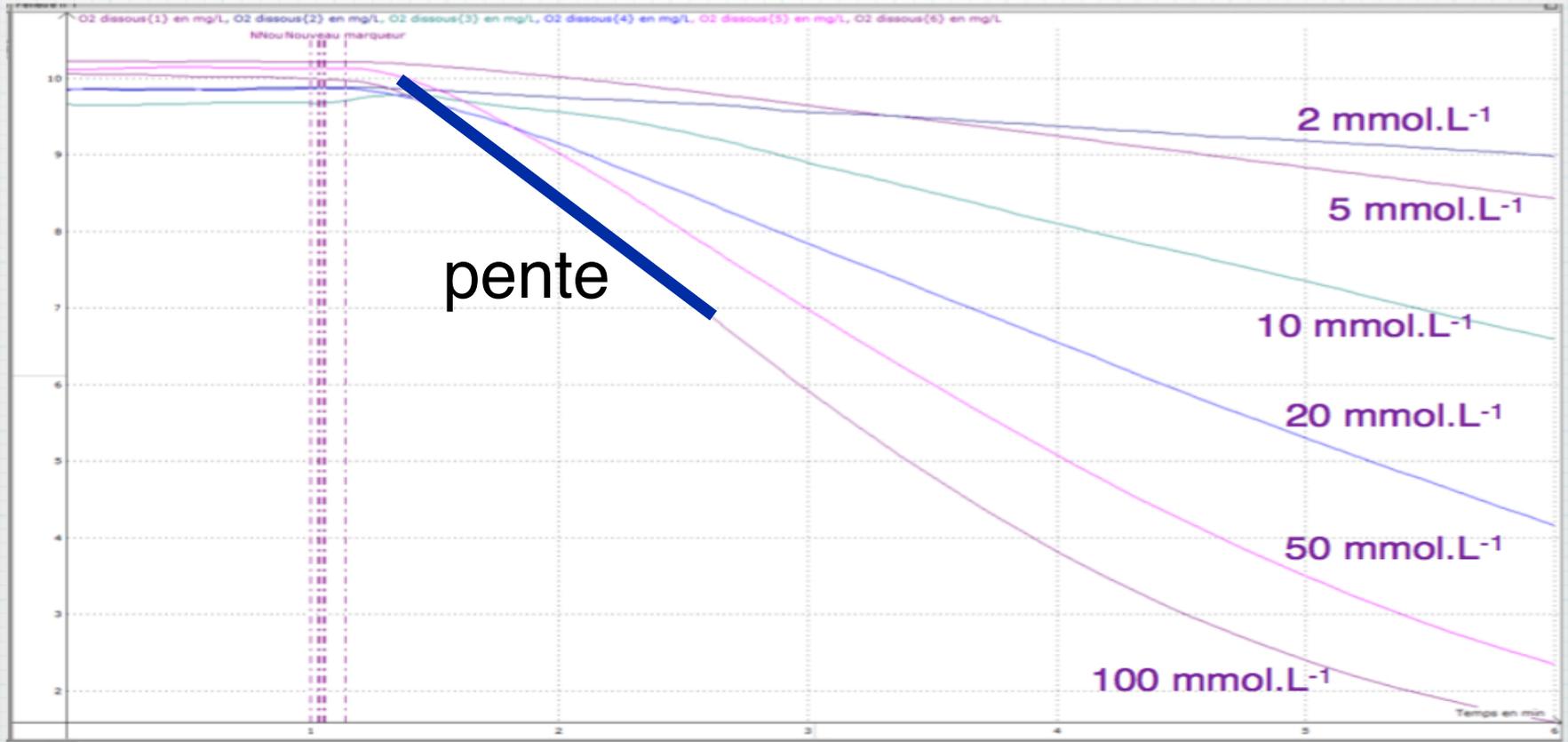
et l'axe des abscisses en  $-1/K_m$

# Étude de la glucose oxydase

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



# Mesure de la consommation de $O_2$



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

# Étude de la glucose oxydase

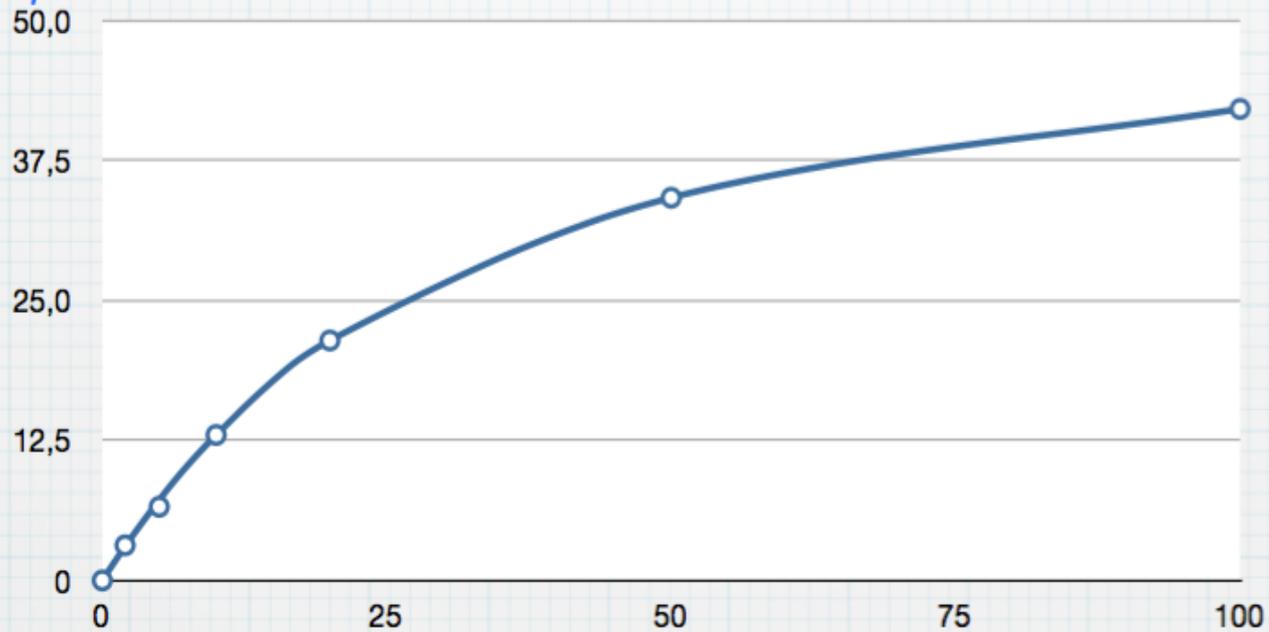
Avec un tableur, tracer les courbes :

[glucose] en mmol.L <sup>-1</sup>	2	5	10	20	50	100
V <sub>i</sub> en μmol.min <sup>-1</sup>	3,127	6,573	12,983	21,425	34,171	42,103

- V<sub>i</sub> en fonction de [glucose]
- 1/V<sub>i</sub> en fonction de 1/[glucose]

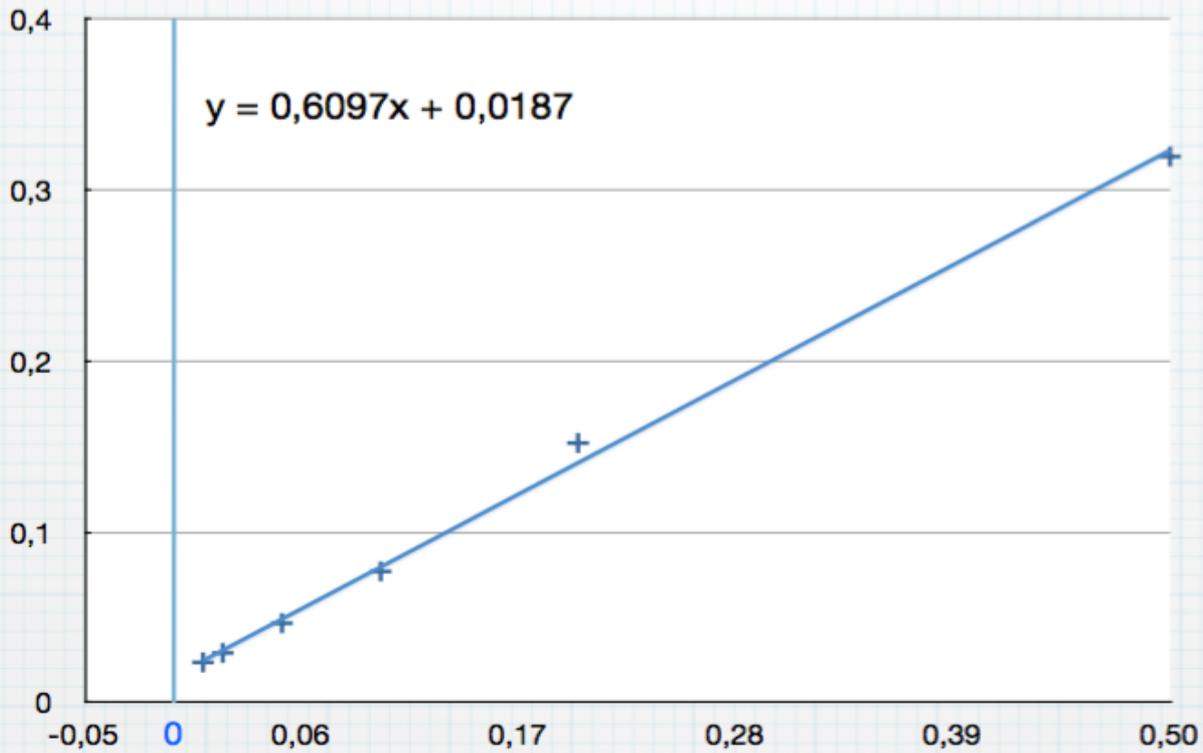
Déterminer les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$

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



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

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



$1/[glucose]$  en L.mmol<sup>-1</sup>

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

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**

# Exercice 1

Une lactase sert de matériel expérimental. Aux concentrations données de lactose, les vitesses initiales de la réaction sont les suivantes :

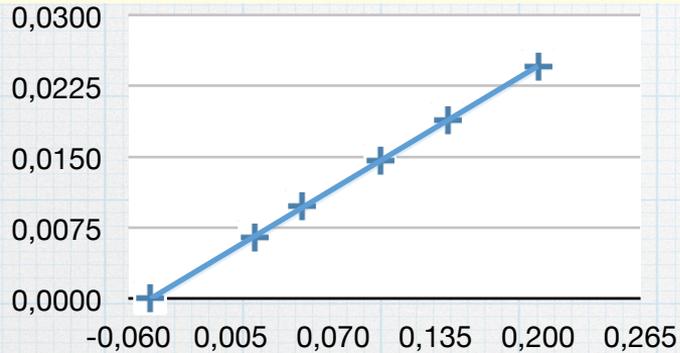
Concentration molaire de lactose	V en moles de lactose hydrolysé par minute et par mg d'enzyme
$50 \cdot 10^{-4}$	$155 \cdot 10^{-6}$
$20 \cdot 10^{-4}$	$103 \cdot 10^{-6}$
$10 \cdot 10^{-4}$	$68,5 \cdot 10^{-6}$
$7 \cdot 10^{-4}$	$53,0 \cdot 10^{-6}$
$5 \cdot 10^{-4}$	$40,6 \cdot 10^{-6}$

1. Déterminer graphiquement les constantes de l'équation de Michaelis relatives à ce système.
2. Sachant que la masse moléculaire de cette lactase est 135 000 Da, calculer l'activité moléculaire spécifique en moles de substrats hydrolysés par mole d'enzyme et par minute.

# Corrigé exercice 1

Méthode graphique des double-  
inverse

$1/v_i \times 10^6$



ordonnée à l'origine =  $0,0046 \cdot 10^6$  donc  
 $V_{\max} = 217 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  d'enzyme

abscisse à l'origine =  $0,046 \cdot 10^4$  donc  
 $K_M = 22 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

$V_{\max} = 217 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  d'enzyme.

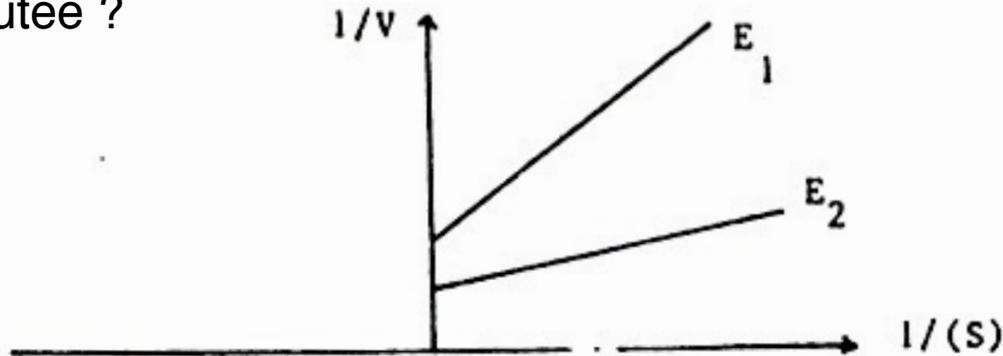
La lactase pèse  $135\,000 \text{ g} = 135 \cdot 10^6 \text{ mg} \cdot \text{mol}^{-1}$  donc pour une mol  
d'enzyme :

activité spécifique =  $217 \cdot 10^{-6} \times 135 \cdot 10^6 = 29\,300 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  d'enzyme

## Exercice 2

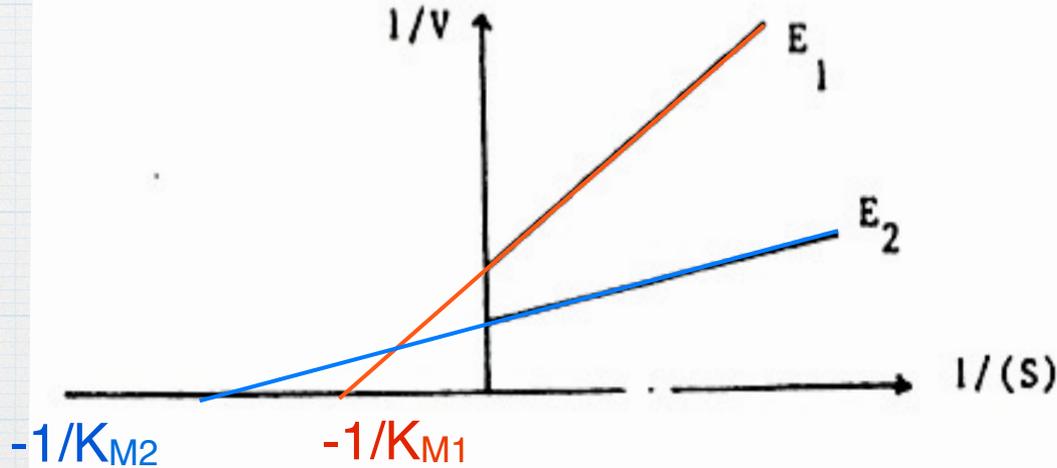
La figure ci-dessous montre les résultats d'une cinétique d'une enzyme E1 normale et de l'enzyme mutée E2. E2 ne diffère de E1 que par la substitution d'un radical valine par un autre acide aminé.

1. Commenter l'affinité de E1 et E2 pour S.
2. Une électrophorèse à pH7 montre que E2 migre plus rapidement vers l'anode. Quels acides aminés ont pu remplacer la valine dans la séquence de l'enzyme mutée ?



# Correction de l'exercice 2

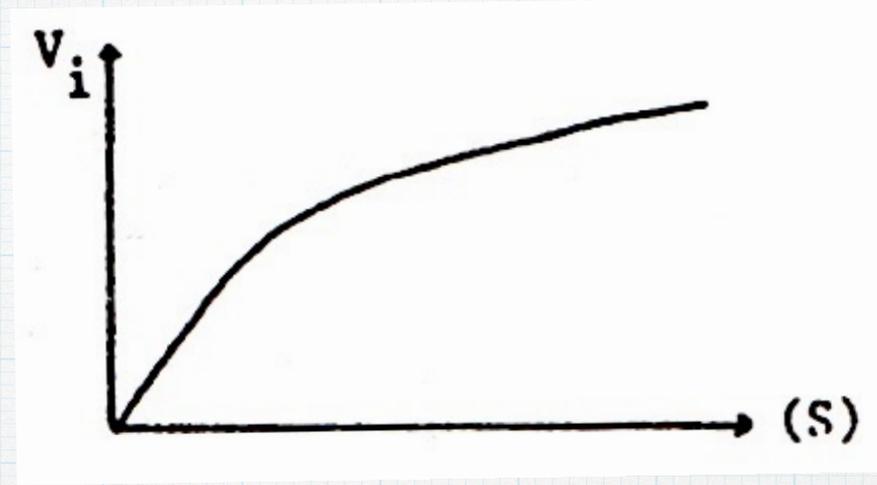
On prolonge les droites



Affinité de E2 plus grande que l'affinité de E1

E2 migre plus vers vers l'anode chargée + donc E2 possède davantage de charge - à pH7. Donc la valine aurait pu être remplacée par un acide aminé à résidu acide de type aspartate ou glutamate.

## Exercice 3

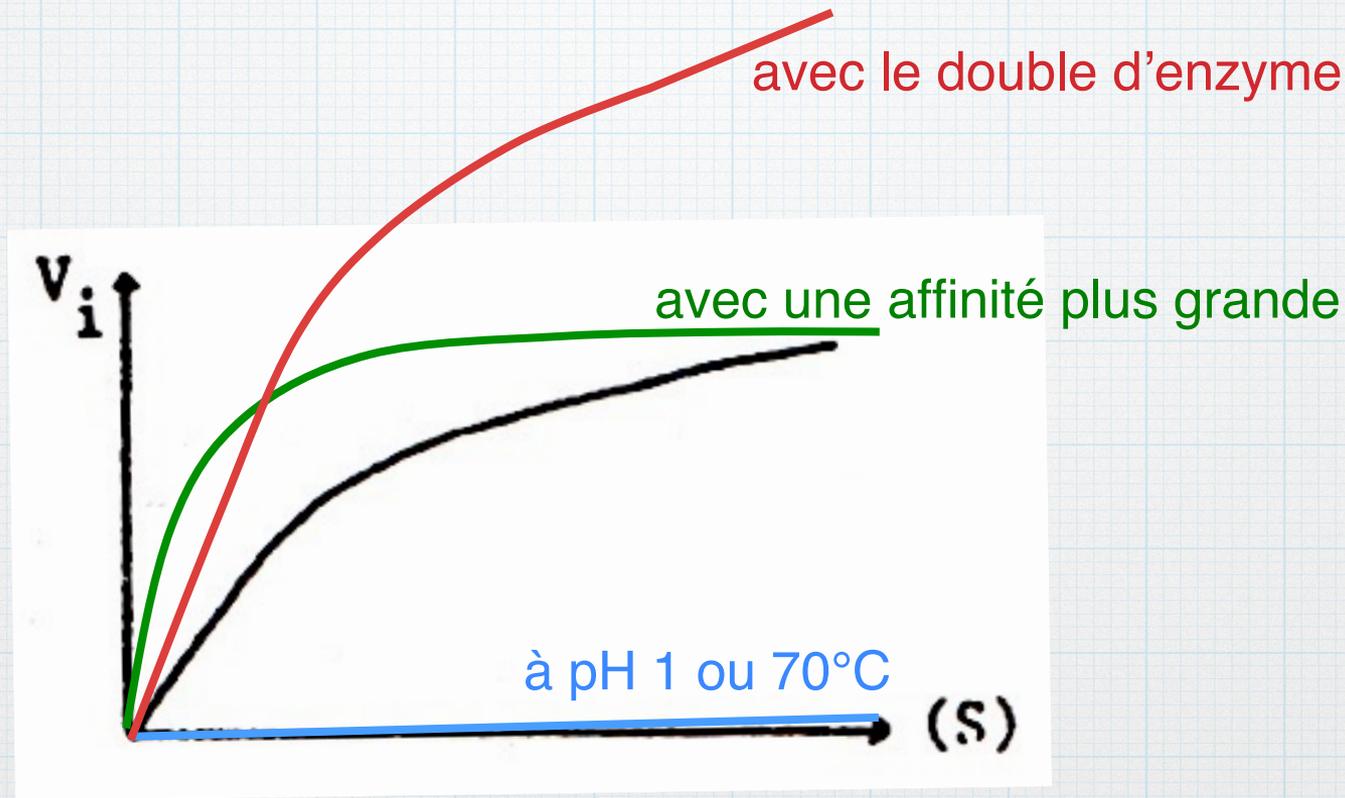


On étudie la variation de la vitesse d'une réaction en fonction de la concentration en substrat pour une concentration  $x$  d'enzyme.

Tracer sur le même graphique :

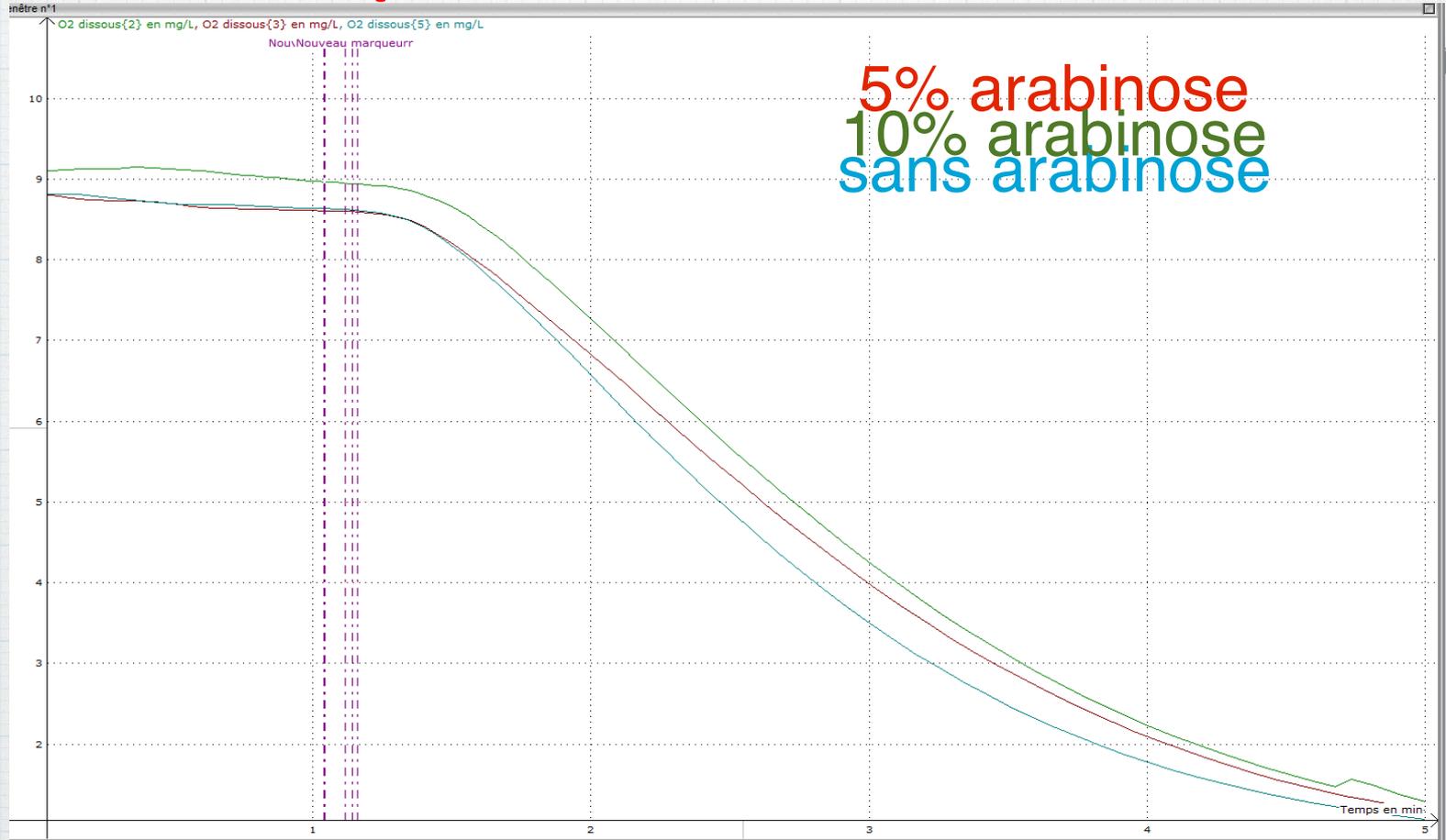
1. La courbe obtenue en présence d'une concentration double d'enzyme ( $2x$ ) ;
2. La courbe obtenue en présence d'une même concentration  $x$  d'enzyme qui aurait plus d'affinité pour le substrat ;
3. La courbe obtenue lorsque la réaction est effectuée à pH1 et à chaud ( $70^{\circ}\text{C}$ )

# Correction de l'exercice 3



## **2. Action des inhibiteurs**

# En présence d'arabinose



5% arabinose  
10% arabinose  
sans arabinose

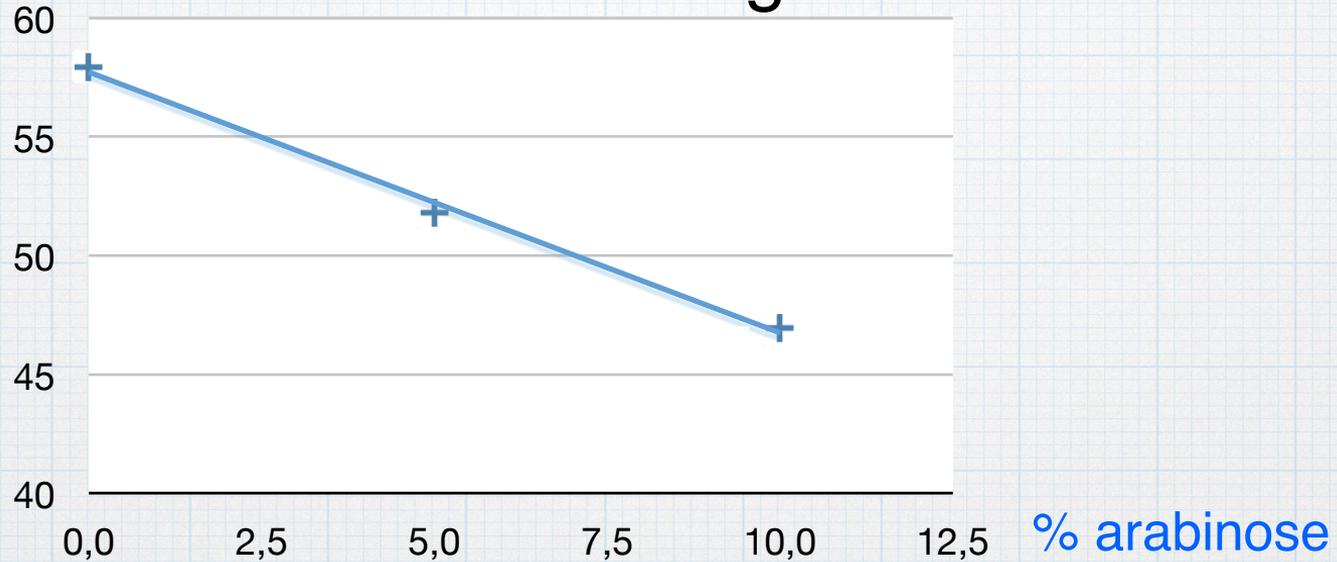
valeurs à pH 5

glucose à 100 mmol.L<sup>-1</sup>

# En présence d'arabinose

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

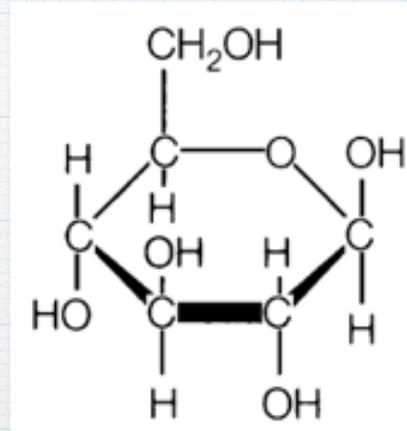
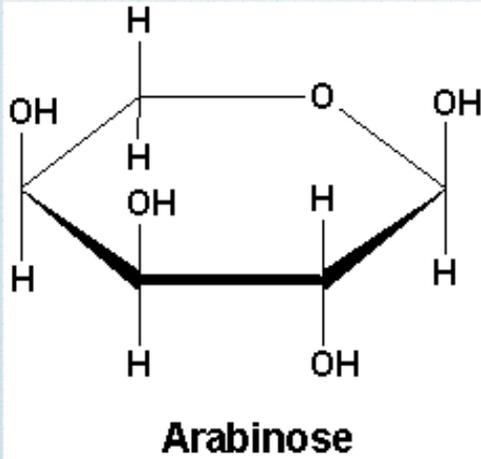
glucose à  $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$



$\Rightarrow$  arabinose = inhibiteur

valeurs à pH 5

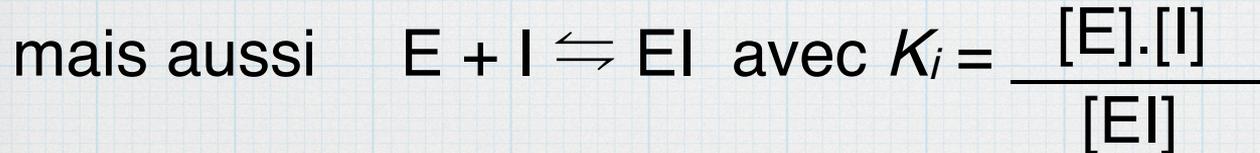
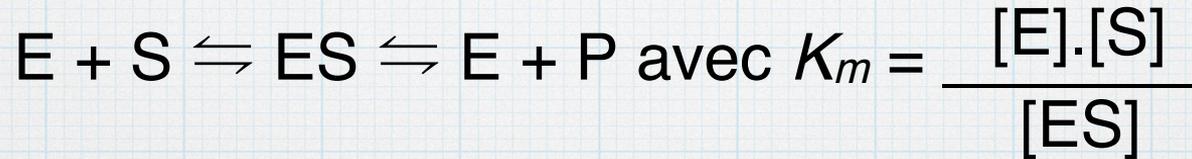
# Étude de l'action de l'arabinose interprétation en terme de structure



**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  $K_i$ .



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

# Compétition avec le substrat

L'enzyme totale est alors sous différentes formes :

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

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

On a également l'égalité :

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

# Compétition avec le substrat

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

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

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

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.

$$V_i = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$
 en faisant le rapport des vitesses, on élimine  $V_{\max}$ .

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

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**

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

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

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

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

$$\text{donc } K_i = \frac{K_M \cdot [I]}{K'_M - K_M}$$

## En présence d'arabinose

La masse molaire de l'arabinose est de  $150 \text{ g.mol}^{-1}$ .

5 % d'arabinose représente 5 g pour 100 mL de solution  
soit  $50 \text{ g.L}^{-1}$  c'est-à-dire  $333 \text{ mmol.L}^{-1}$

10 % d'arabinose représente donc  $666 \text{ mmol.L}^{-1}$

$$K_i = \frac{K_M \cdot [I]}{K'_M - K_M}$$

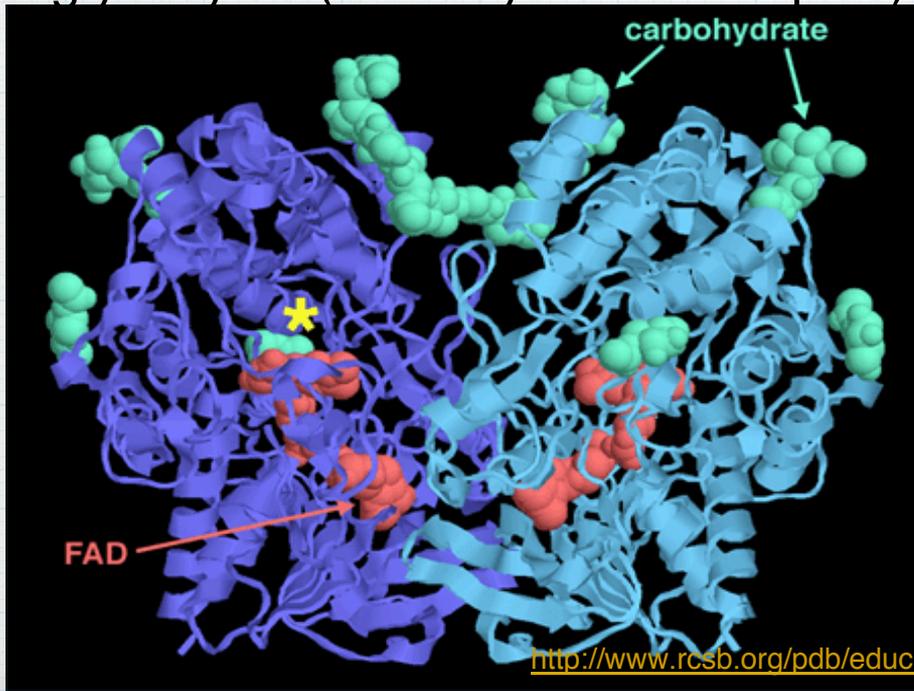
$$5 \text{ \% d'arabinose} \Rightarrow K_i = 631,1 \text{ mmol.L}^{-1}$$

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

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

# Structure de l'enzyme

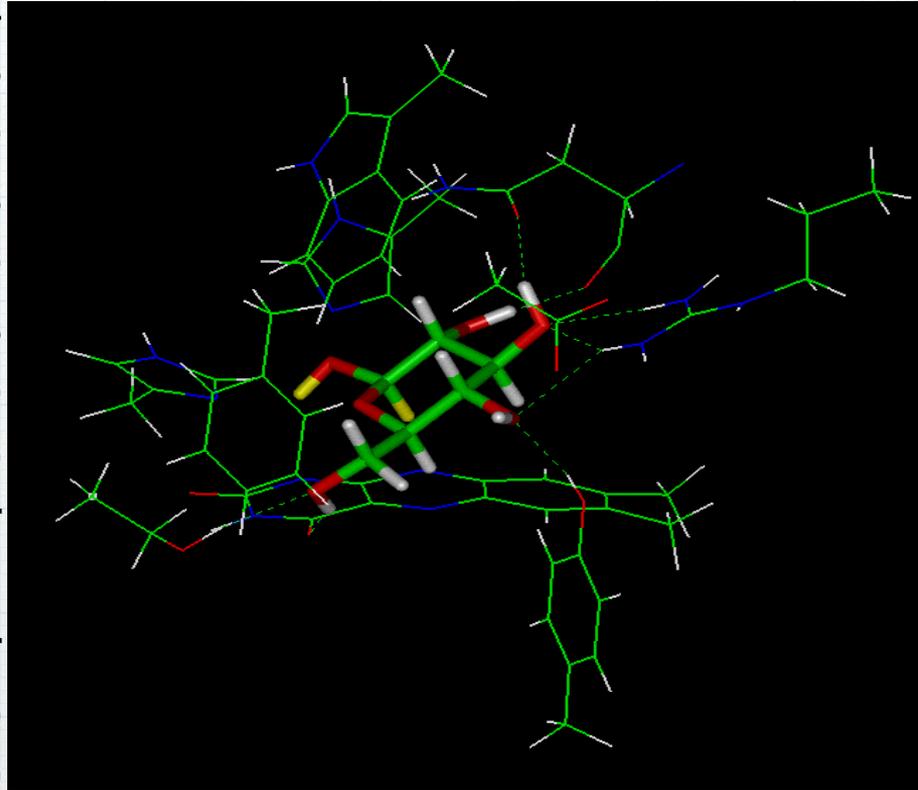
La glucose oxydase a été séquencée, cristallisée et observée aux RX. On en a déduit le modèle tridimensionnel ci-dessous. Le site actif (\*) contient un coenzyme (du FAD) et une molécule de glucose juste au-dessus. L'enzyme est glycosylée (carbohydrates indiqués).



# 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

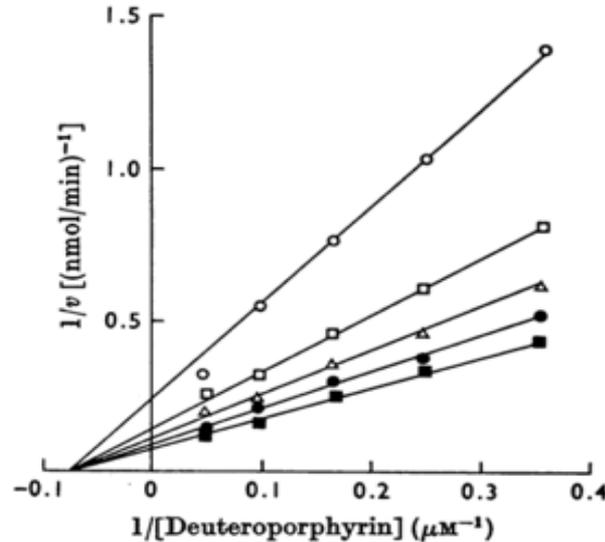
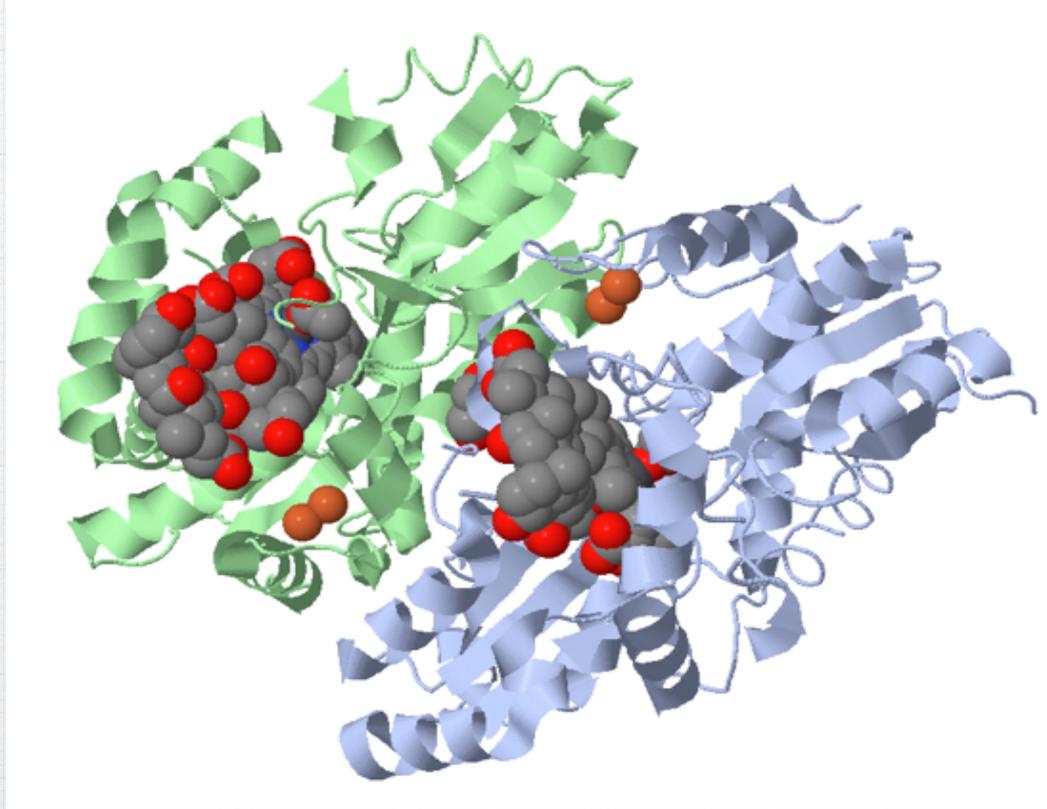


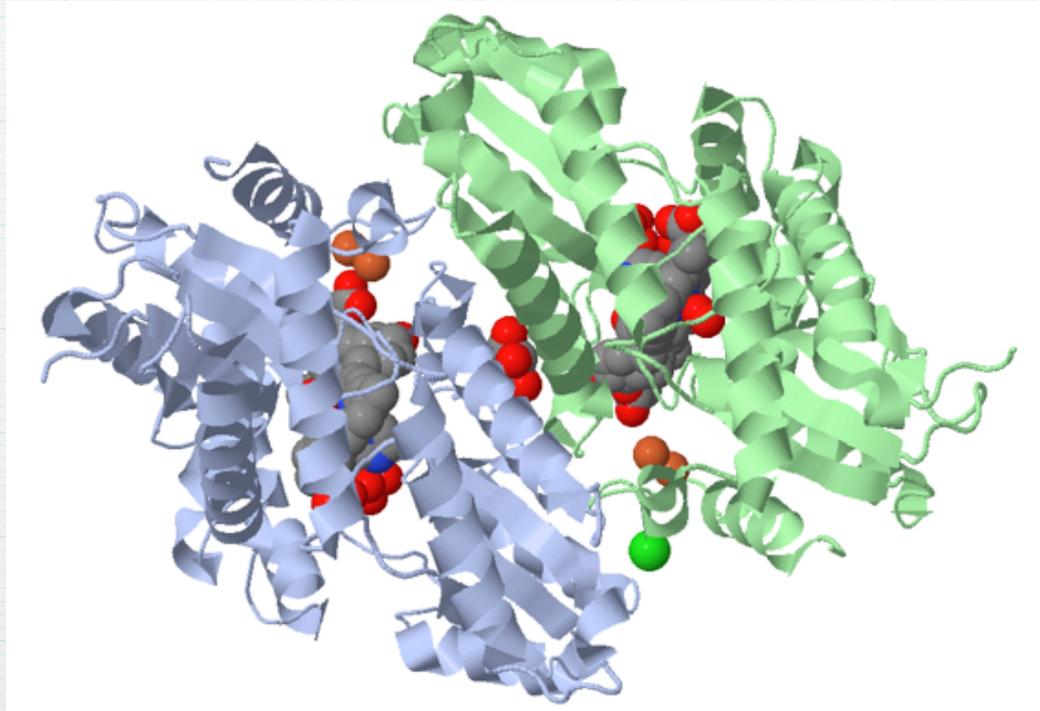
Fig. 8. Double-reciprocal plots of initial reaction velocity against deuteroporphyrin concentration to show the inhibition by  $\text{Cd}^{2+}$  of ferrochelatase from the particulate fraction of *R. spheroides*. Conditions for determination of rates of cobalt deuteroporphyrin formation were as described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

# Structure de la ferrochélatase



Ferrochélatase en présence de ses substrats (porphyrine et 2 ions  $\text{Fe}^{2+}$  par site actif)

# Structure de la ferrochélatase



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

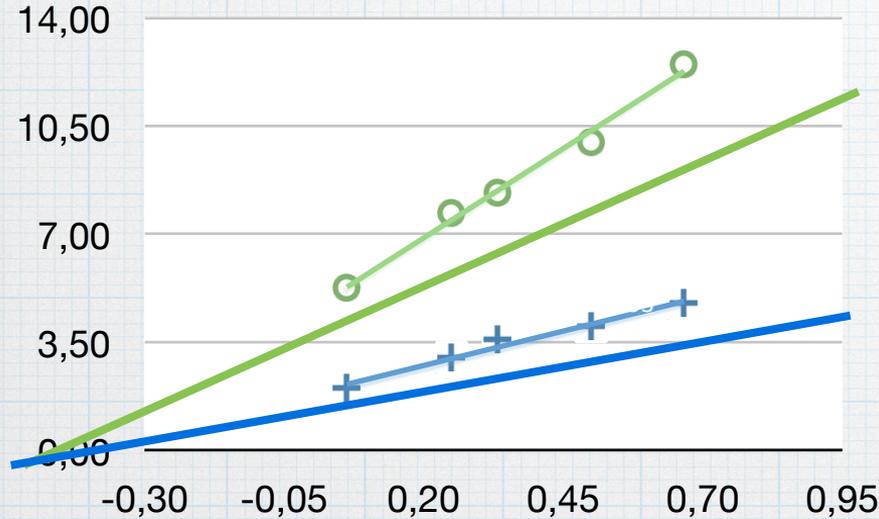
# Exercice 4

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 <sup>-1</sup>	0,21	0,25	0,28	0,33	0,5
vitesse avec salicylate en mg de produit.min <sup>-1</sup>	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

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  **$K_M = 2,4$  mM**

$V_{max}$  :  $1/V_{max} = 1,853$

donc  **$V_{max} = 0,54$  mg de produit.min<sup>-1</sup>**

# Exercice 5

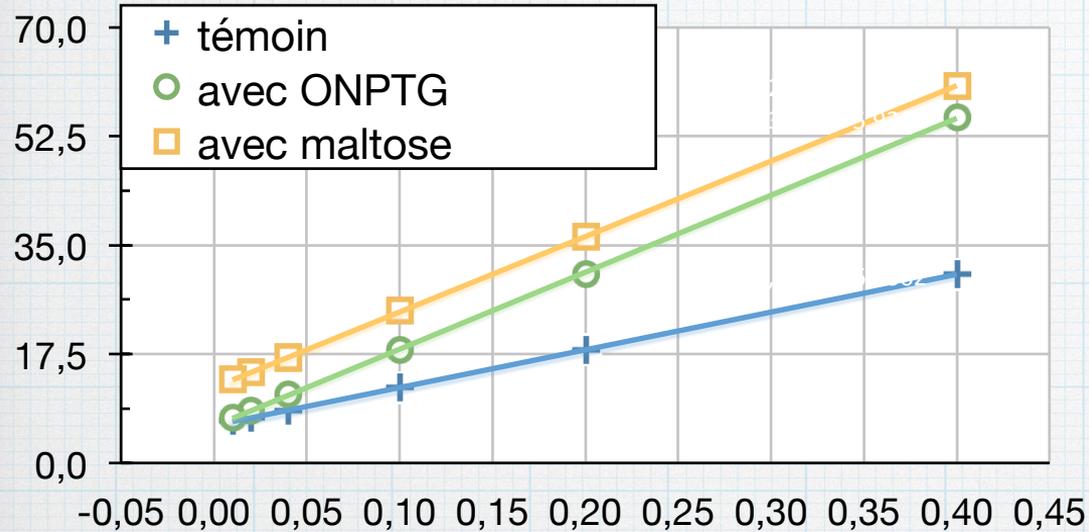
A pH 7,7 et 25 °C, les cinétiques d'hydrolyse de l'O-nitrophényl-galactoside par la  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* ont été étudiées en absence ou en présence de l'un des composés suivants : l'O-nitrophényl- $\beta$ -D-thiogalactoside (ONPTG), le maltose. La réaction est suivie en spectrophotométrie : 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 <sub>0</sub> ] M	V <sub>0</sub>	V <sub>0</sub> en présence de ONPTG 3.10 <sup>-4</sup> M	V <sub>0</sub> en présence de maltose 0,26 M
2,5 10 <sup>-5</sup>	0,033	0,018	0,0165
5,0 10 <sup>-5</sup>	0,055	0,033	0,0275
1,0 10 <sup>-4</sup>	0,0825	0,055	0,041
2,5 10 <sup>-4</sup>	0,118	0,091	0,059
5,0 10 <sup>-4</sup>	0,138	0,118	0,069
1,0 10 <sup>-3</sup>	0,15	0,138	0,075

1. Déterminer graphiquement la V<sub>max</sub> et le K<sub>m</sub> de l'enzyme.
2. Que pensez-vous de l'action des composés ONPTG et maltose ?

# Correction de l'exercice 5



$$K'_M = 2,085 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$V_{\max} = 0,165$$

$$K_M = 10^{-4} \text{ M}$$

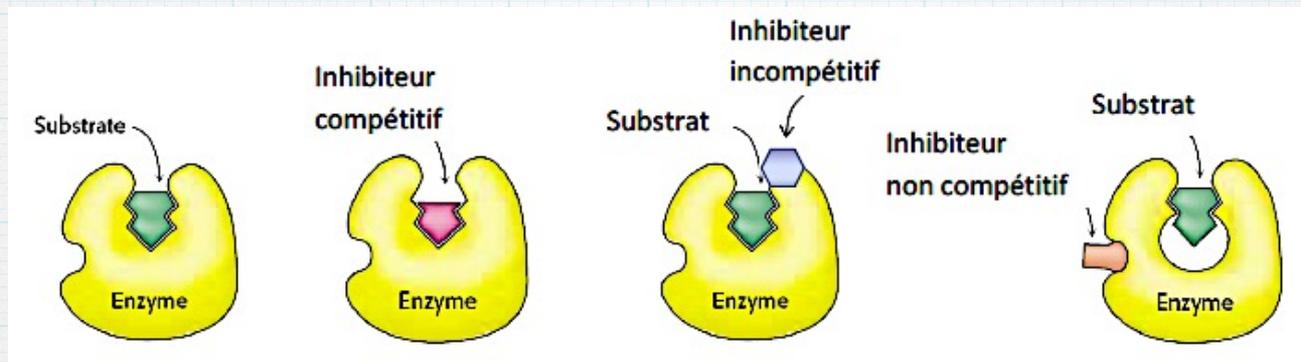
$$V_{\max} = 0,165$$

Si on prolonge les droites : l'ONPG montre une même  $V_{\max}$  mais un  $K_M$  plus grand donc l'affinité diminue. L'ONPG est un **inhibiteur compétitif**.

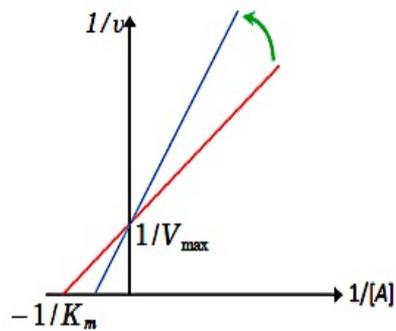
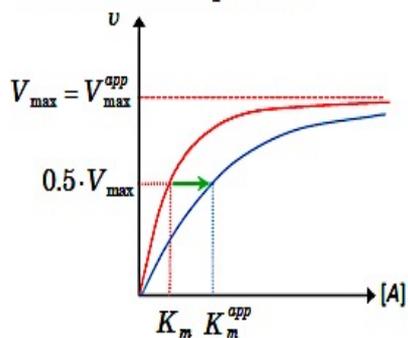
$K'_M$  vaut alors  $2,085 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  donc  $K_i = K_M \cdot [I] / (K'_M - K_M) = 2,76 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ .

Si on prolonge les droites : la maltose montre une plus faible  $V_{\max}$  et un  $K_M$  plus grand donc vitesse et affinité diminuent. La maltose est à la fois un inhibiteur compétitif et non compétitif.

# CONCLUSION



inhibition compétitive



inhibition noncompétitive

