

# **Les facteurs influençant la cinétique enzymatique**

Des facteurs peuvent influencer le mécanisme catalytique d'une enzyme michaelienne soit en l'activant, soit en l'inhibant.

On distingue alors : - **les effecteurs physico-chimiques**,  
- **les effecteurs biochimiques**.

Un effecteur est un corps chimique qui, par liaison avec l'enzyme, modifie la vitesse de la réaction :

- soit en l'accélération : on parle alors d'**activateur**.
- soit en la ralentissant : on parle alors d'**inhibiteur**.

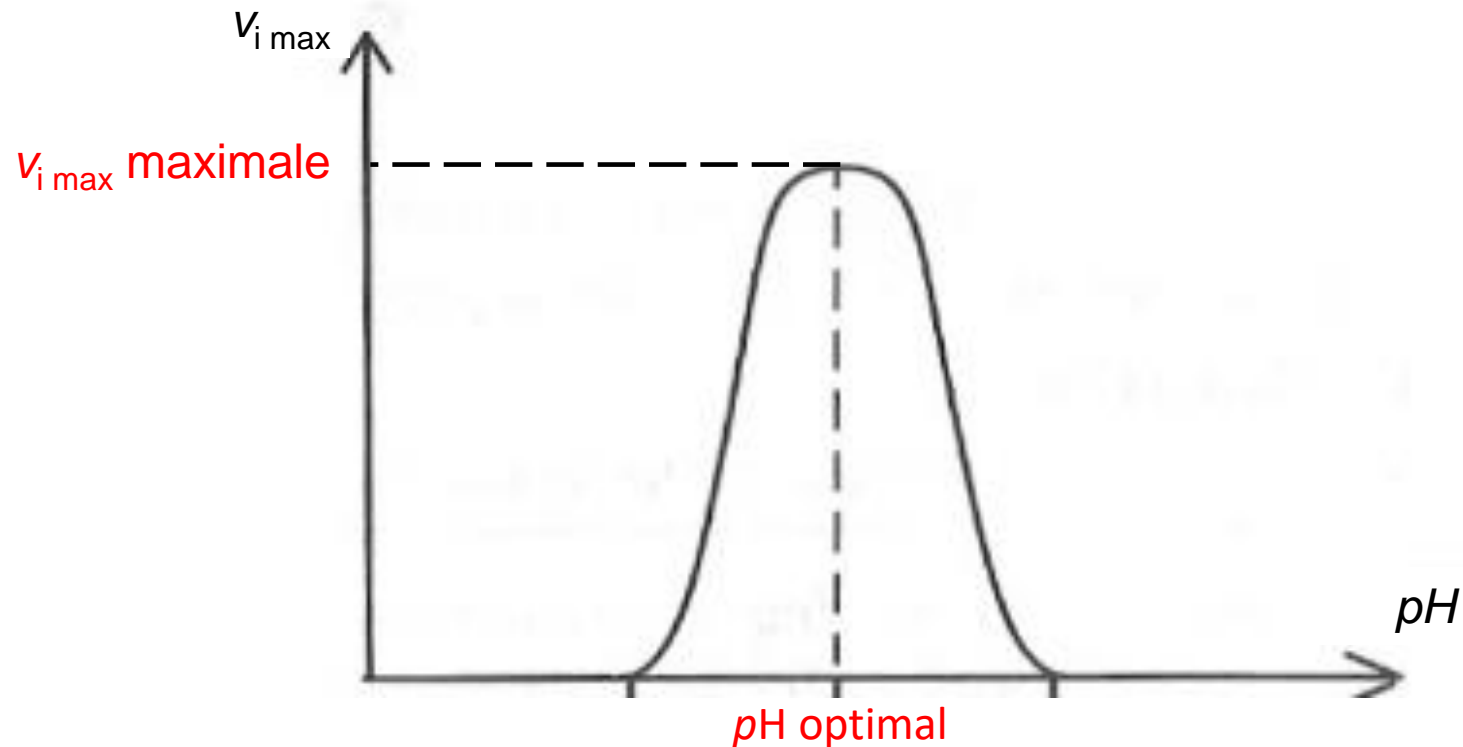
## **1. Effecteurs physico-chimiques**

Il s'agit principalement : - **du pH**,  
- **de la température**.

Ces effecteurs physico-chimiques agissent de la même manière sur les enzymes michaeliennes et les enzymes allostériques.

## 1.1. Influence du pH

La représentation graphique  $v_{i \max} = f(\text{pH})$  représente l'influence du pH sur l'activité enzymatique :



**pH optimal** = **pH pour lequel l'activité enzymatique est maximale.**

Il est propre à chaque enzyme

L'allure de cette courbe suggère l'existence de deux groupes ionisables de  $pK_a$  différents impliqués dans la catalyse (pour qu'il y ait catalyse, il faut que ces deux résidus d'acides aminés se trouvent dans des états d'ionisation inversés : un protoné l'autre déprotoné).

Le  $pH$  influence l'activité enzymatique :

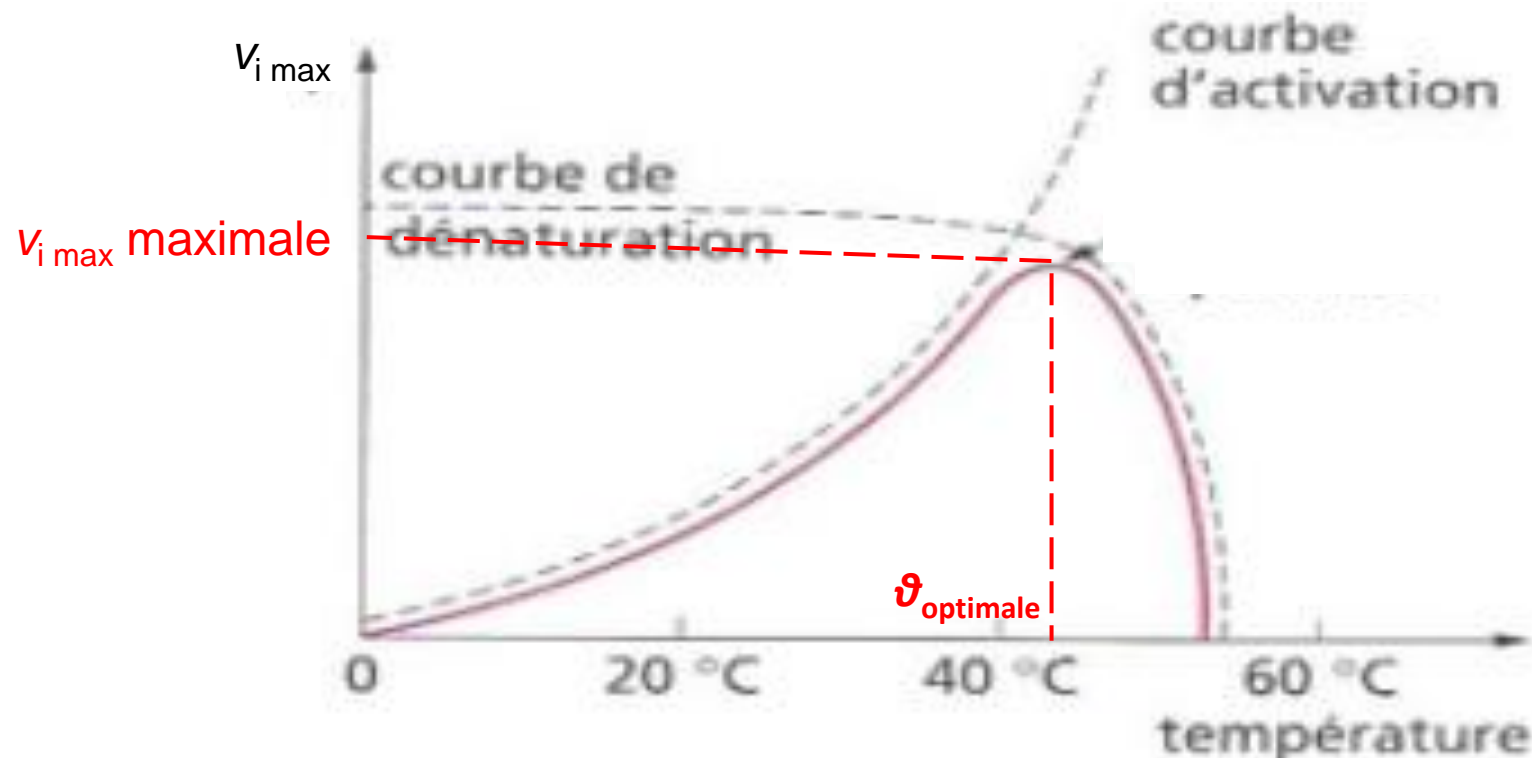
- soit en favorisant la liaison entre l'enzyme E et le substrat S pour former le complexe ES.
- soit en influençant directement le mécanisme catalytique de l'enzyme.
- soit en influençant l'état d'ionisation du substrat, si celui-ci est ionisable.
- soit en modifiant la conformation de l'enzyme à cause des groupements ionisables.

Il faut atteindre les valeurs extrêmes de  $pH$  pour qu'il y ait une dénaturation de l'enzyme par attaque acide ou basique, sinon, le plus souvent, c'est une **inhibition réversible**.

## 1.2. Influence de la température

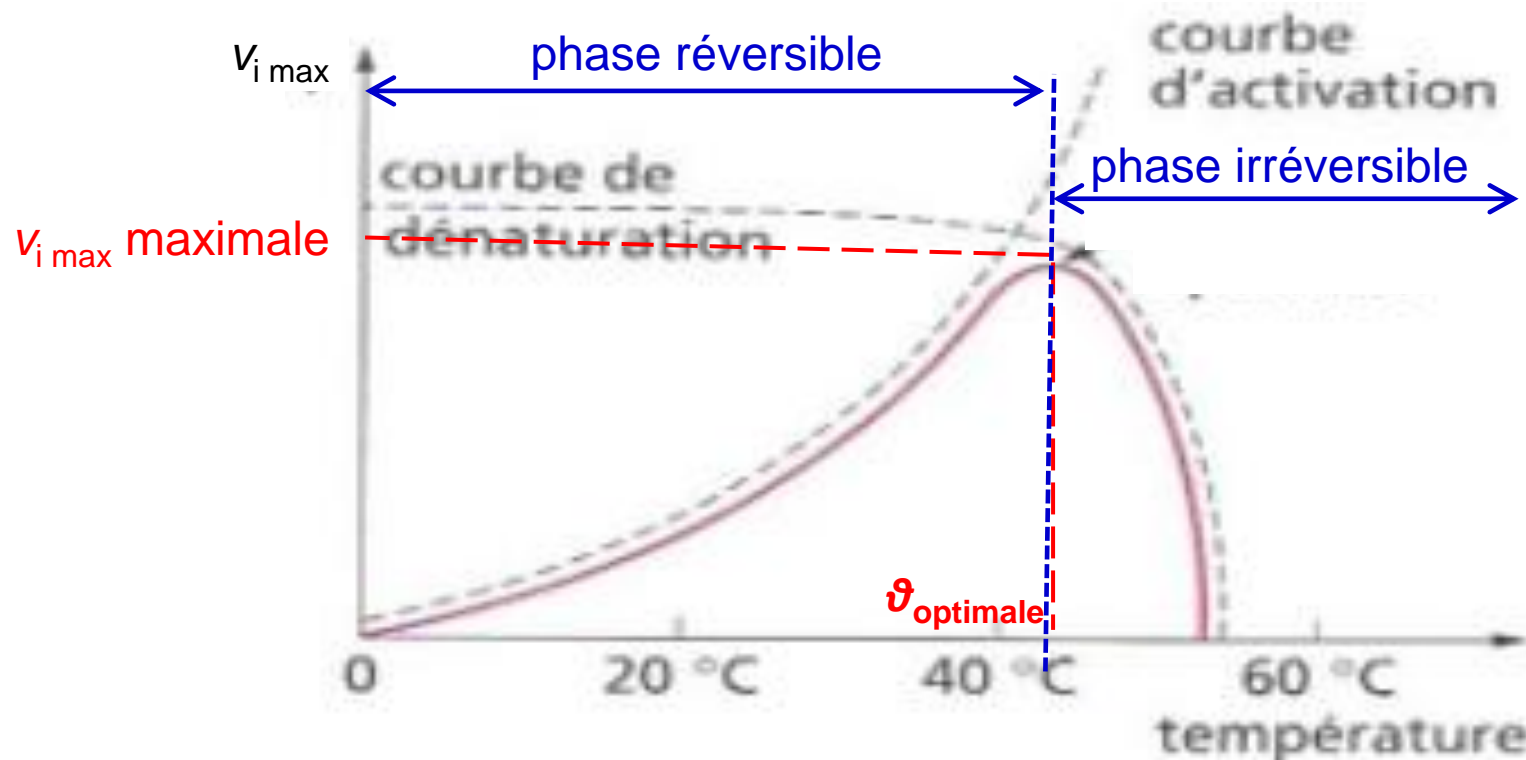
### 1.2.1. Variation de la $v_{i\max}$ d'une réaction avec la température

La représentation graphique  $v_{i\max} = f(\vartheta)$  représente l'influence de la température sur l'activité enzymatique :



**Température optimal ( $\vartheta_{\text{optimale}}$ ) = température pour laquelle l'activité enzymatique est maximale.**

Elle est propre à chaque enzyme.



On obtient une courbe biphasique avec :

- **une phase réversible** : pour des températures  $\leq \vartheta_{\text{optimale}}$

En augmentant la température, on augmente l'activité enzymatique selon le courbe d'activation.

- **une phase irréversible** : pour des températures  $> \vartheta_{\text{optimale}}$

Si on augmente la température au-delà de la température optimale de l'enzyme, celle-ci est dénaturée et ne peut plus fonctionner.

## 1.2.2. Détermination de l'énergie d'activation $E_a$

L'influence de la température sur la constante de vitesse de la réaction  $k$  est donnée par la loi d'ARRHÉNIUS :

$$k = A \times e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

Avec : -  $A$  : facteur pré-exponentiel, ou facteur de fréquence = constante.

-  $E_a$  : énergie d'activation, en  $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,

-  $R$  : constante des gaz parfaits =  $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ,

-  $T$  : température, en Kelvin ( $273,15 + T^\circ\text{C}$ ).

Dans des conditions saturantes en substrat ( $[\text{S}]_0 \geq 100 K_M$  en théorie,  $[\text{S}]_0 \geq 10 K_M$  en pratique) :

$$v_i = v_{i \max} = k_{\text{cat}} \times [\text{E}]_0 = A \times e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \times [\text{E}]_0$$

On peut alors écrire :

$$\log_e(v_{i \max}) = \log_e(A) - \frac{E_a}{R \cdot T} + \log_e([\text{E}]_0)$$

En simplifiant, on obtient :  $\log_e(v_{i \max}) = -\frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} + \text{constante}$  (équation d'une droite affine)

En mesurant  $v_{i \max}$  à différentes températures  $T$ , on pourra tracer la droite  $\log_e(v_{i \max}) = f(1/T)$  et **déterminer l'énergie d'activation  $E_a$** .

### 1.2.3. Cinétique de dénaturation thermique d'une enzyme

La dénaturation thermique est une réaction d'ordre 1 par rapport à l'enzyme :  $E_{\text{active}} \rightarrow E_{\text{dénaturée}}$

Expérimentalement, l'étude de la dénaturation thermique d'une enzyme se fait en deux étapes :

1. L'enzyme est exposée à une température dénaturante précise pendant des durées variables  $d$ .
2. On détermine l'activité résiduelle de l'enzyme  $z_{(\text{substrat})}(d)$  à une température non dénaturante.

La représentation graphique  $z_{(\text{substrat})}(d) = f(d)$  est la cinétique de dénaturation thermique de l'enzyme pour la température dénaturante testée.

La cinétique de dénaturation thermique d'une enzyme à une température donnée dépend de la concentration initiale en enzymes actives :

$$\frac{\Delta[E]}{\Delta t} = -k_D \times [E]$$

Avec : -  $[E]$  : concentration en enzymes actives.

-  $k_D$  : constante de vitesse de la dénaturation thermique de l'enzyme.

Donc : 
$$\frac{\Delta[E]}{[E]} = -k_D \times \Delta t$$



En intégrant, on obtient :  $\log_e \left( \frac{[E]_{(d)}}{[E]_0} \right) = -k_D \times d$

Avec : -  $[E]_{(d)}$  : concentration en enzymes restées actives après une durée d'exposition  $d$  à la température dénaturante testée.

-  $[E]_0$  : concentration initiale en enzymes actives (ou non exposées à la température dénaturante testée).

-  $d$  : durée d'exposition des enzymes à la température dénaturante testée.

En condition saturante en substrat, on aura :

$$\log_e \left( \frac{v_{i \max (d)} \text{ résiduelle après } d \text{ minutes d'exposition à la température dénaturante testée}}{v_{i \max (0)} \text{ de l'enzyme non exposée à la température dénaturante testée}} \right) = -k_D \times d$$

Donc :  $\log_e \left( \frac{z_{(\text{substrat}) (d)}}{z_{(\text{substrat}) (0)}} \right) = -k_D \times d$

La représentation graphique  $\log_e \left( \frac{z_{(\text{substrat}) (d)}}{z_{(\text{substrat}) (0)}} \right) = f(d)$  permet alors de déterminer  $k_D$ .

**Temps de demi-vie  $t_{1/2}$  = temps d'exposition à la température dénaturante testée nécessaire pour dénaturer la moitié des enzymes.**

On a donc :  $\log_e \left( \frac{[E]_0/2}{[E]_0} \right) = -k_D \times t_{1/2}$  d'où  $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_D}$

## **2. Effecteurs biochimiques**

### **2.1. Activateurs enzymatiques**

Les activateurs sont généralement des **ions métalliques** qui s'associent à l'enzyme (qu'elle soit michaelienne ou allostérique) et qui ont pour effet d'augmenter la vitesse de la réaction enzymatique.

Ce sont principalement des **cations métalliques mono ou divalents** :  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , *etc.*

Certains de ces ions servent de **cofacteurs enzymatiques**.

## 2.2. Inhibiteurs enzymatiques réversibles

Un inhibiteur michaélien est un ligand, non transformé par l'enzyme michaélienne, qui modifie le comportement cinétique de cette enzyme.

On distingue :- les inhibiteurs compétitifs (IC).  
- les inhibiteurs non-compétitifs (INC).

Ces inhibiteurs agissent de manière réversible.

### 2.2.1. Inhibiteur compétitif

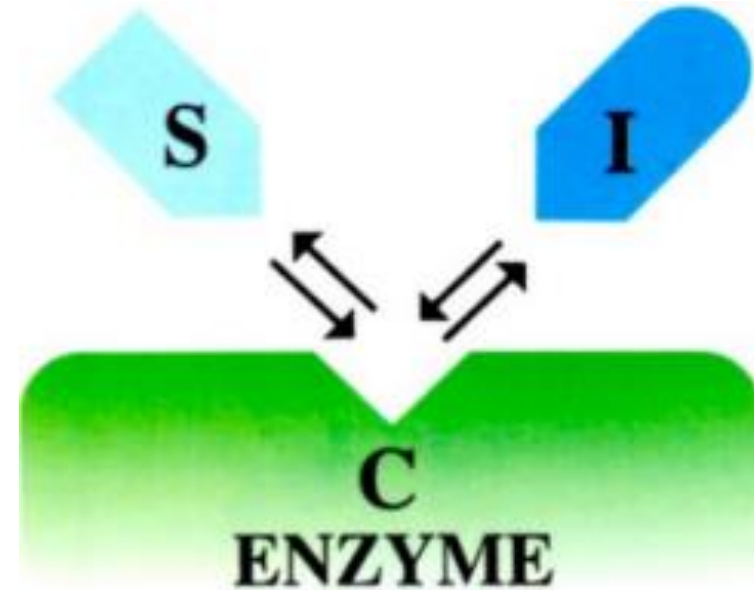
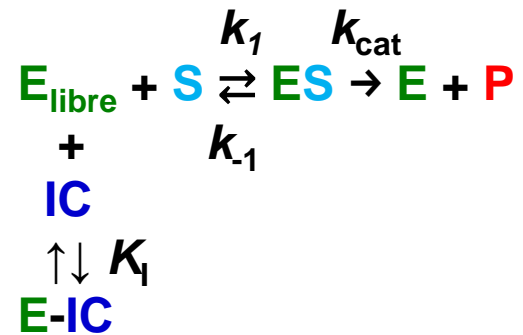
L'inhibiteur compétitif ne peut pas se combiner avec l'enzyme en même temps que le substrat.

Il se lie de manière réversible au site actif de l'enzyme et en bloque l'accès au substrat. Il diminue donc la concentration d'enzyme libre  $[E]_{\text{libre}}$ .

En général il ressemble chimiquement au substrat. D'ailleurs, si une enzyme a plusieurs substrats possibles, ceux-ci peuvent aussi agir comme inhibiteurs compétitifs réciproques.

Les meilleurs inhibiteurs sont souvent en fait des analogues de l'état de transition de la réaction.

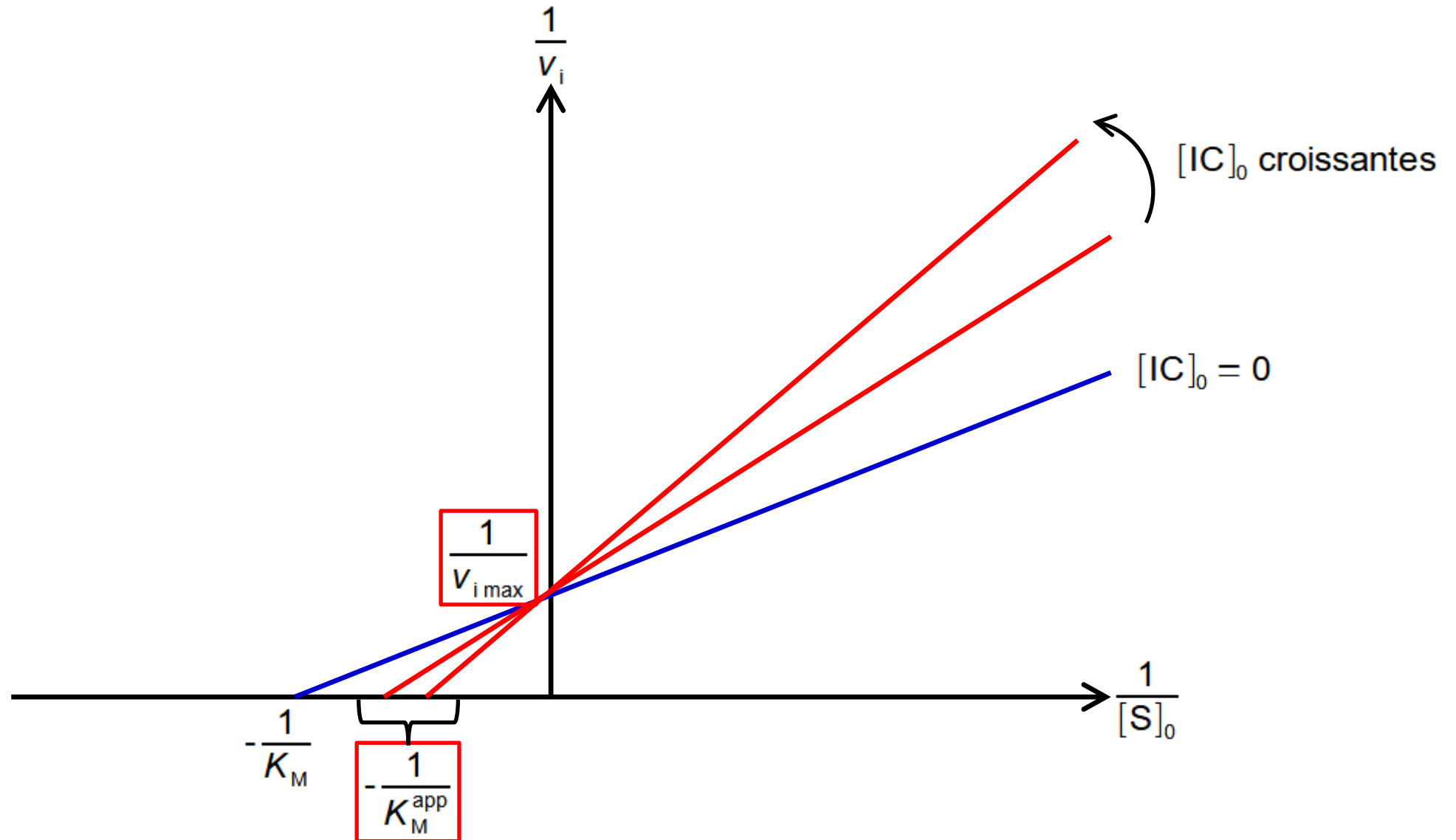
Le mécanisme réactionnel est le suivant :



L'inhibition compétitive d'une enzyme michaélienne peut être expliquée par plusieurs modèles :

- ✓ IC et S entrent en compétition à cause d'une analogie structurale.
- ✓ L'encombrement stérique de l'IC empêche la fixation du S.
- ✓ Le S et l'IC ont en commun un groupe qui se fixe à l'enzyme sur un 3<sup>ème</sup> site de fixation.
- ✓ Les sites de fixation du S et de l'IC se recouvrent.
- ✓ La fixation de l'IC induit un changement de conformation de l'enzyme qui déforme le site de fixation du S, et inversement.

L'étude cinétique d'une réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur compétitif donne la représentation graphique suivante (représentation affine en double inverse de LINEWEAVER-BURK) :



D'après cette représentation :

- $v_{i \max}$  reste identique en présence ou en absence d'inhibiteur compétitif.
- $K_M^{\text{app}}$  varie en fonction de  $[IC]_0$  : plus  $[IC]_0$  est grande, plus  $1/K_M^{\text{app}}$  est petit, donc plus  $K_M^{\text{app}}$  est grande, donc l'affinité entre le substrat S et l'enzyme E est plus faible.

Dans l'équation de MICHAÉLIS-MENTEN,  $K_M$  est remplacée par  $K_M^{\text{app}}$  avec :

$$- K_M^{\text{app}} = K_M \times \left( 1 + \frac{[IC]_0}{K_I} \right) \text{ avec : facteur d'inhibition} = 1 + \frac{[IC]_0}{K_I}$$

$$- K_I : \text{constante de dissociation du complexe enzyme-IC} = \text{constante d'inhibition} : K_I = \frac{[E]_{\text{libre}} \times [IC]_0}{[EIC]}$$

Donc on obtient la relation suivante :

$$v_i = v_{i \max} \times \frac{[S]_0}{K_M \cdot \left( 1 + \frac{[IC]_0}{K_I} \right) + [S]_0}$$

Un nombre croissant de médicaments sont des inhibiteurs compétitifs.

Leur développement est facilité par l'identification d'une enzyme-cible, sa purification et sa cristallisation.

La connaissance précise de la structure permet l'adaptation plus précise au site actif, afin de diminuer le risque d'effets indésirables sur des enzymes apparentées.

Exemples de médicaments :

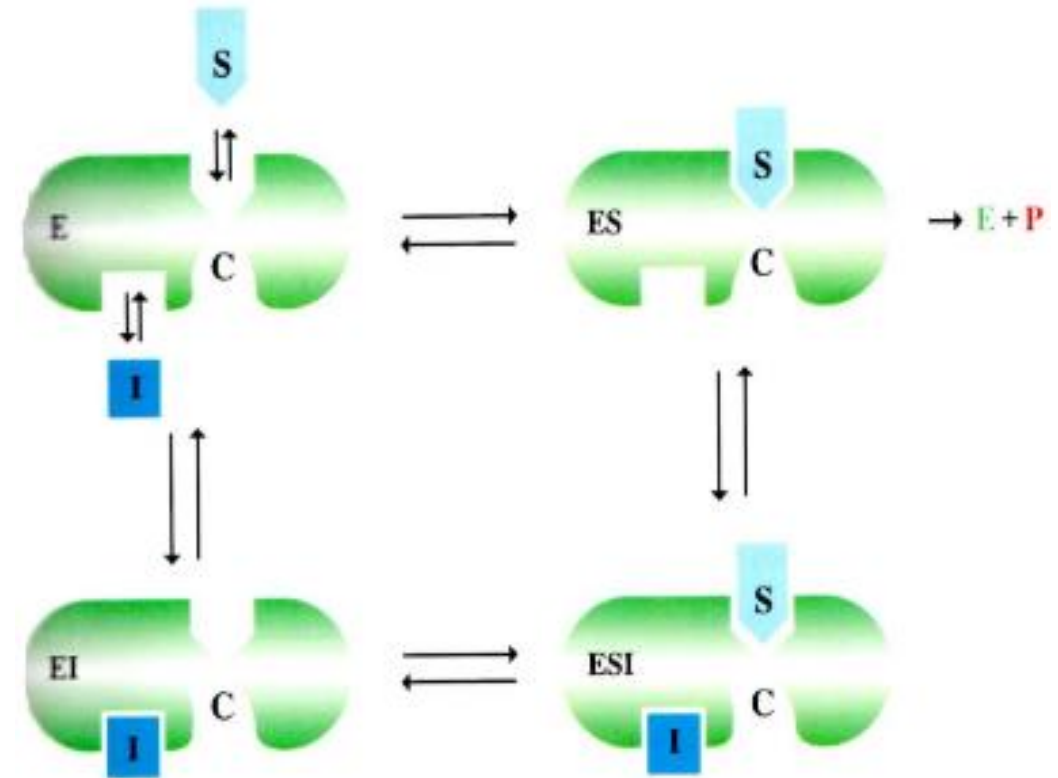
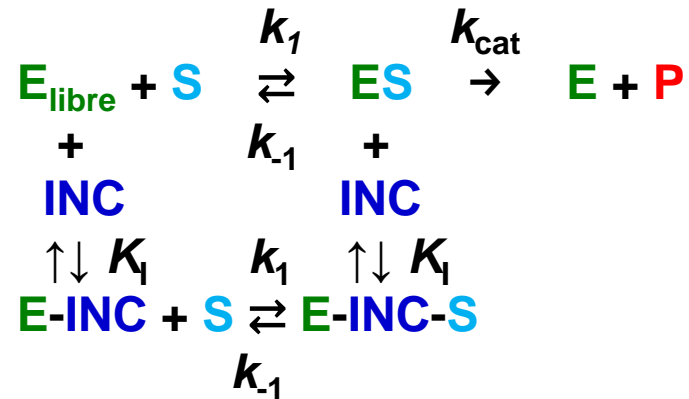
- Le **méthotrexate**, un analogue structurel du **tétrahydrofolate**, est un inhibiteur compétitif de la **dihydrofolate réductase**, sur laquelle il se fixe mille fois mieux que le substrat naturel. C'est un médicament anticancéreux.
- **Zanamivir (Relenza®)**, utilisé par inhalation, et **GS4104 (Tamiflu®)** forme utilisable oralement de la substance active, GS4071, sont des inhibiteurs compétitifs ( $K_i < 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de la **neuraminidase** du virus de la grippe. Le virus a besoin de cet enzyme pour se détacher de la cellule qui l'a produit.
- Le **citrate de sildenafil (Viagra®)** est un analogue de la **GMP cyclique** et, par conséquence, est un inhibiteur compétitif de la **phosphodiesterase de type 5 (PDE5)** spécifique de la GMPc. Il augmente l'effet du signal transmis par le NO dans les corps caverneux du pénis et renforce l'érection. *Sélectivité* : plus efficace sur PDE5 que sur PDE6 (10x), PDE1 (> 80x), PDE2, PDE3, et PDE4 (> 1000x). PDE6 est impliquée dans la vision des couleurs, PDE3 dans la contraction cardiaque, ce qui explique certains effets secondaires.

## 2.2.2. Inhibiteurs non compétitifs (INC)

Un INC n'a aucune influence sur la fixation du substrat S au site actif de l'enzyme E, et réciproquement.

Les sites de fixation du S et de l'INC sont distincts.

Le mécanisme réactionnel est le suivant :

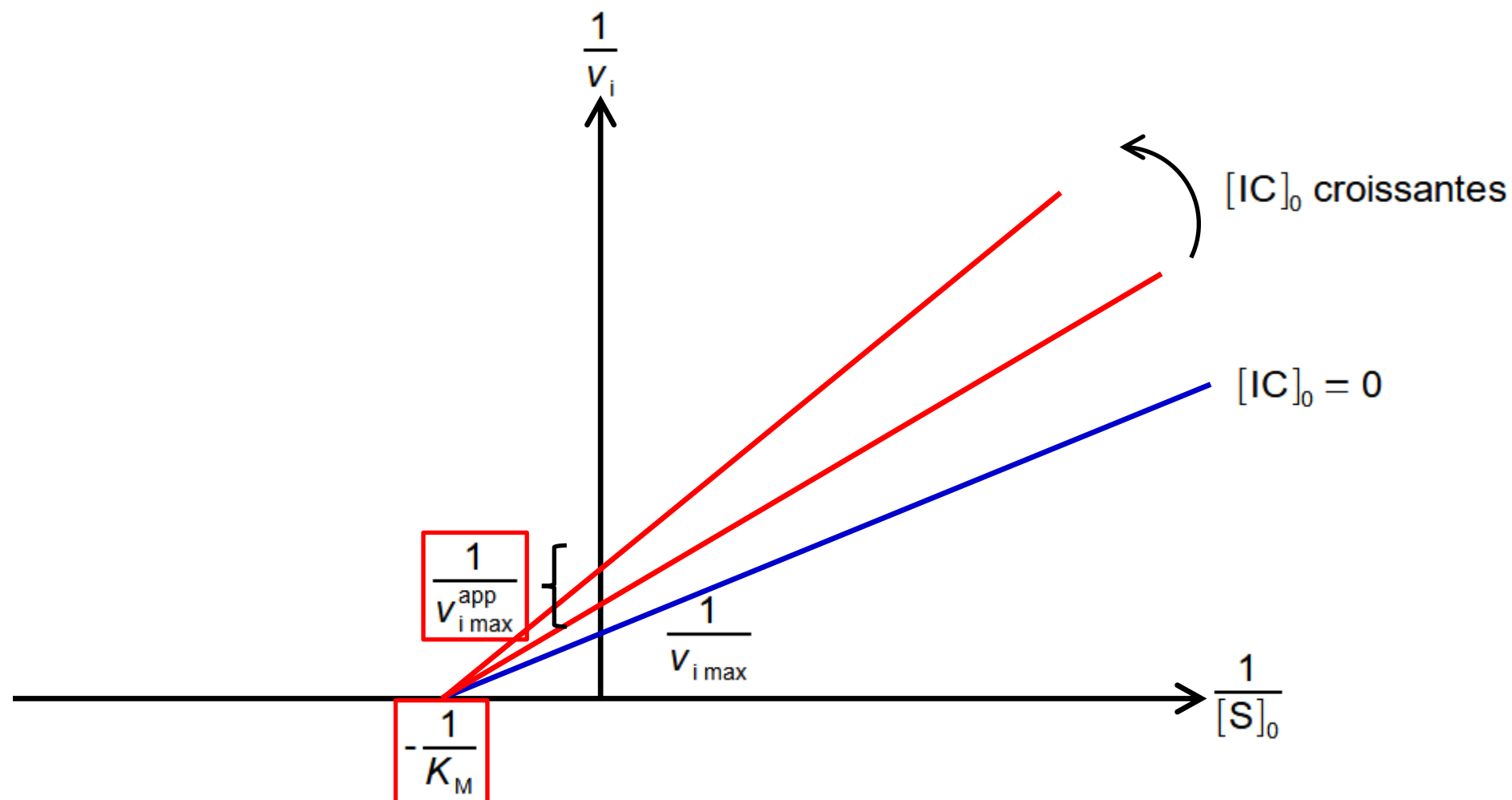




**La fixation de l'INC ne modifie pas la manière dont se fixe le S.**

L'INC empêche les ajustements conformationnels du site actif qui devraient avoir lieu pour qu'il y ait catalyse. Le complexe ternaire E-S-INC est inactif.

L'étude cinétique d'une réaction enzymatique en présence d'un inhibiteur non compétitif donne la représentation graphique suivante (représentation affine en double inverse de LINEWEAVER-BURK) :



D'après cette représentation :

- $v_{i \max}^{\text{app}}$  varie en fonction de  $[\text{INC}]_0$  : plus  $[\text{INC}]_0$  est grande, plus  $1/v_{i \max}^{\text{app}}$  est grand, donc plus  $v_{i \max}^{\text{app}}$  est faible.
- $K_M$  reste identique en présence ou en absence d'inhibiteur non compétitif.

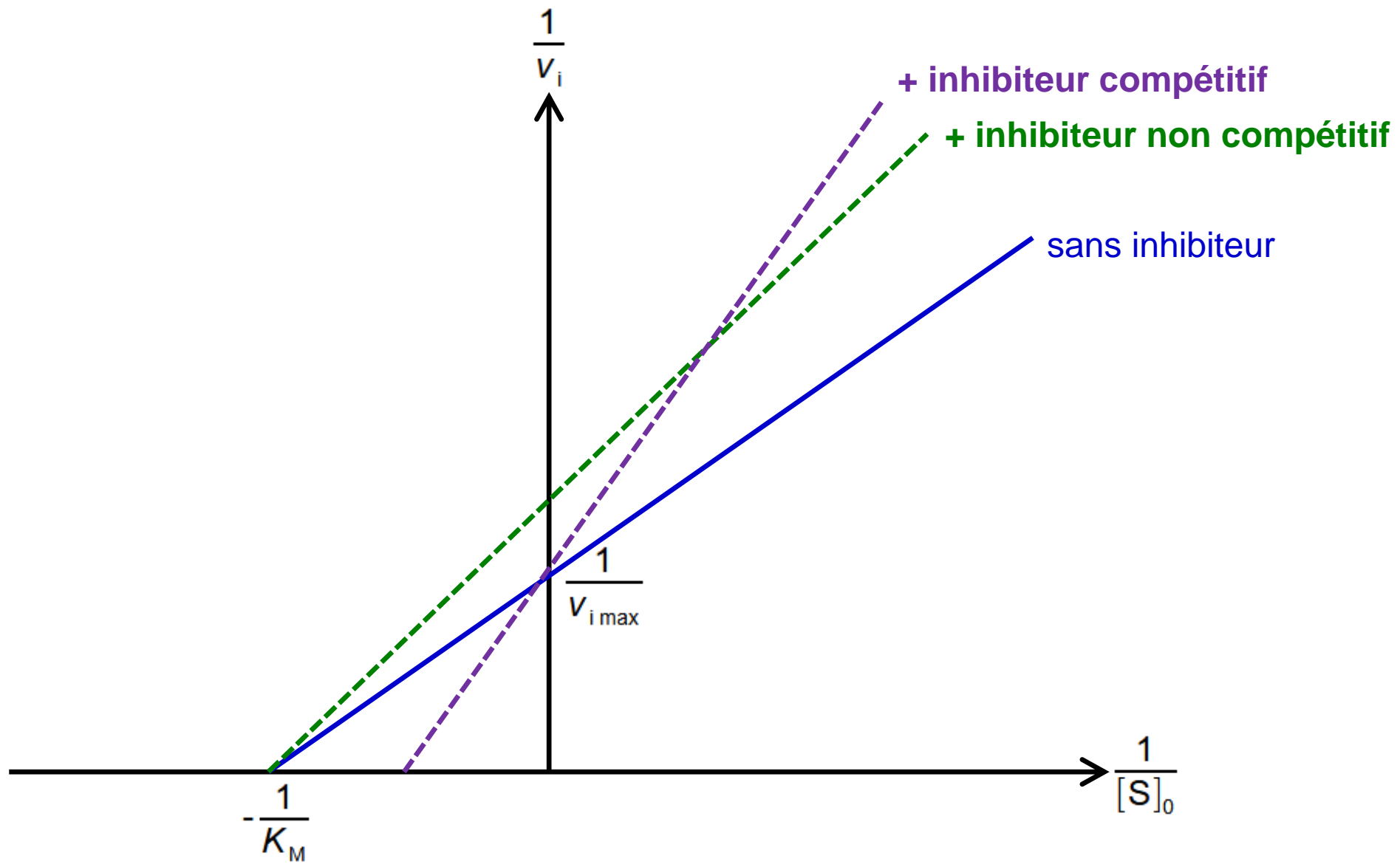
Dans l'équation de MICHAÉLIS-MENTEN,  $v_{i \max}$  est remplacée par  $v_{i \max}^{\text{app}}$  avec :

$$- v_{i \max}^{\text{app}} = \frac{v_{i \max}}{1 + \frac{[\text{INC}]_0}{K_i}} \quad \text{avec : facteur d'inhibition} = 1 + \frac{[\text{INC}]_0}{K_i}$$

$$- K_i : \text{constante de dissociation du complexe enzyme-IC} = \text{constante d'inhibition} : K_i = \frac{[\text{E}]_{\text{libre}} \times [\text{INC}]_0}{[\text{E-INC}]}$$

Donc on obtient la relation suivante : 
$$v_i = \frac{v_{i \max}}{1 + \frac{[\text{INC}]_0}{K_i}} \times \frac{[\text{S}]_0}{K_M + [\text{S}]_0}$$

	$v_{i \max}$ ou $v_{i \max}^{\text{app}}$	$K_M$ ou $K_M^{\text{app}}$	$v_i$
<b>SANS INHIBITEUR</b>	$v_{i \max}$	$K_M$	$v_i = v_{i \max} \times \frac{[S]_0}{K_M + [S]_0}$
<b>INHIBITEUR COMPÉTITIF</b>	$v_{i \max}$ inchangé	$K_M^{\text{app}} > K_M$ $K_M^{\text{app}} = K_M \times \left( 1 + \frac{[IC]_0}{K_I} \right)$	$v_i = v_{i \max} \times \frac{[S]_0}{K_M \cdot \left( 1 + \frac{[IC]_0}{K_I} \right) + [S]_0}$
<b>INHIBITEUR NON COMPÉTITIF</b>	$v_{i \max}^{\text{app}} < v_{i \max}$ $v_{i \max}^{\text{app}} = \frac{v_{i \max}}{1 + \frac{[INC]_0}{K_I}}$	$K_M$ inchangé	$v_i = \frac{v_{i \max}}{1 + \frac{[INC]_0}{K_I}} \times \frac{[S]_0}{K_M + [S]_0}$



## 2.3. Inhibiteurs enzymatiques irréversibles

Ces substances se fixent sur l'enzyme de manière irréversible, en général par liaison covalente. Leur effet est de diminuer la quantité totale d'enzyme libre disponible, leur effet sur la cinétique ressemble donc à l'inhibition non-compétitive (**Attention à ne pas confondre !**).

Comme les inhibiteurs compétitifs, les inhibiteurs irréversibles ressemblent souvent au substrat, ce qui leur permet de se fixer sur le site actif de l'enzyme, où ils peuvent réagir avec un groupe exposé, souvent d'ailleurs impliqué dans la catalyse enzymatique.

On développe donc souvent un tel inhibiteur à partir de la structure d'un substrat ou inhibiteur compétitif connu, en ajoutant un groupe réactif. (parfois photoactivable).

Les inhibiteurs irréversibles sont utilisés comme médicaments :

- Des inhibiteurs de la reverse transcriptase virale (RT) utilisés contre des virus (en particulier le VIH) sont des analogues de nucléosides (comme l'emtricitabine qui, après phosphorylation, est un analogue de la désoxycytidine-5'-triphosphate) ou de nucléotides (comme le ténofovir qui est un analogue de la désoxyadénosine-5'-triphosphate) qui sont incorporés correctement dans l'ADN (Truvada<sup>®</sup>). Il rendent l'ADN inutilisable comme substrat pour la RT, donc stoppent la réplication de l'ADN viral.
- Le darunavir (Prezista<sup>®</sup>) est un inhibiteur de la dimérisation et de l'activité catalytique de la protéase du VIH-1. Il inhibe de façon sélective le clivage des polyprotéines encodées Gag-Pol du VIH dans les cellules infectées par le virus, empêchant ainsi la formation de particules virales matures et infectieuses.
- La pénicilline modifie de manière covalente la transpeptidase des bactéries les empêchant de synthétiser le peptidoglycane de leur paroi, les rendant plus fragile et les empêchant de se diviser.
- L'aspirine modifie chimiquement la cyclooxygénase qui est l'enzyme impliquée dans la synthèse de prostaglandines qui sont des médiateurs de l'inflammation.

Certains gaz de combat, comme le sarin, agissent comme inhibiteur irréversible en modifiant l'acétylcholinestérase, qui est nécessaire pour inactiver le neurotransmetteur acétylcholine.

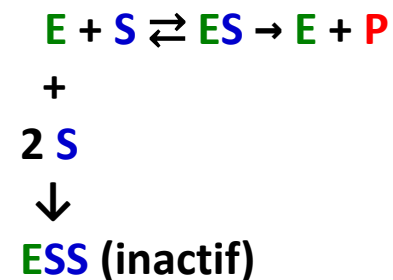
Les inhibiteurs irréversibles peuvent concernés les enzymes michaéliennes et les enzymes allostériques.

## 2.4. Inhibition par excès de substrat

Ce type d'inhibition par le substrat lui-même peut avoir lieu quand il est en très grande concentration.

En général, le site de fixation du substrat est dans ce cas de grande dimension et contient plusieurs sous-sites, chacun fixant une partie du substrat.

Le mécanisme réactionnel est le suivant :

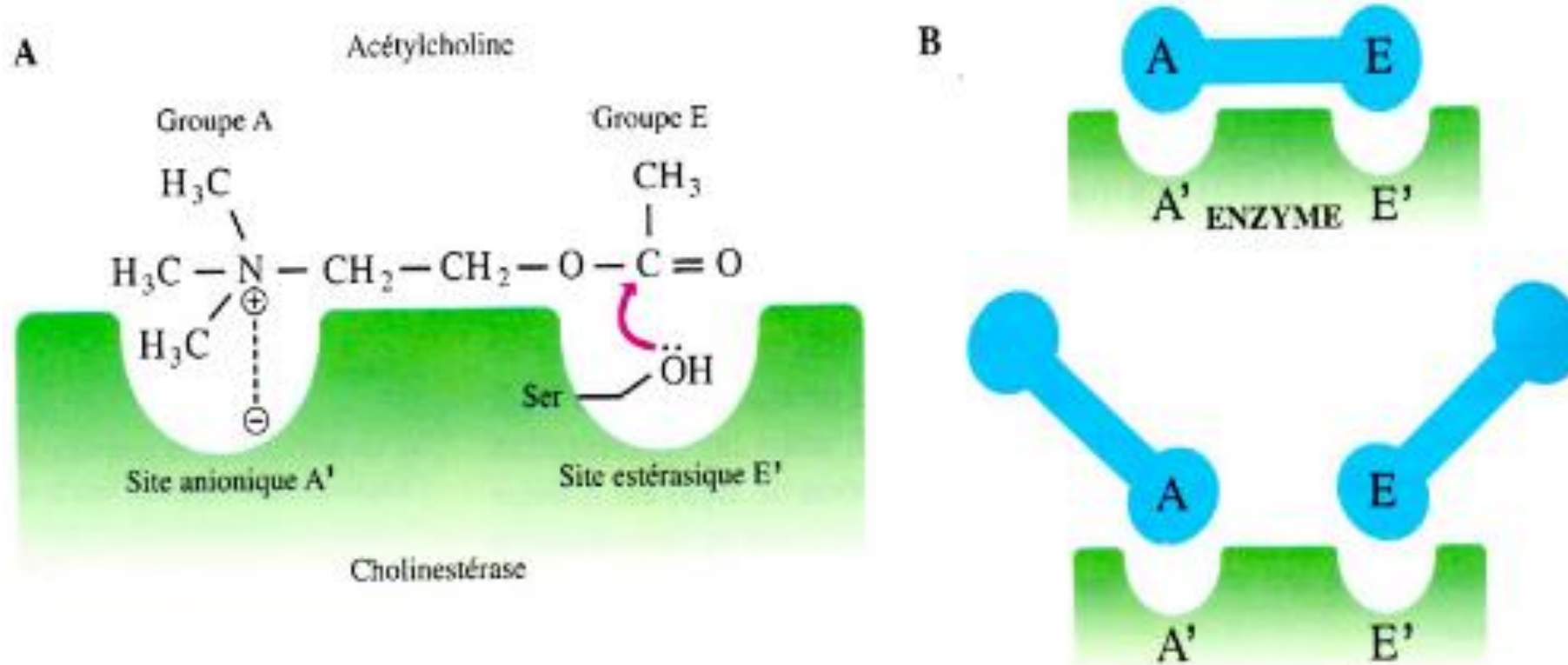


L'acétylcholinestérase est un exemple d'enzyme sujette à inhibition par excès de son substrat, l'acétylcholine. Le site actif de cette enzyme a été caractérisé, et il existe deux sous-sites de fixation de l'acétylcholine, distants de 0,7 nm :

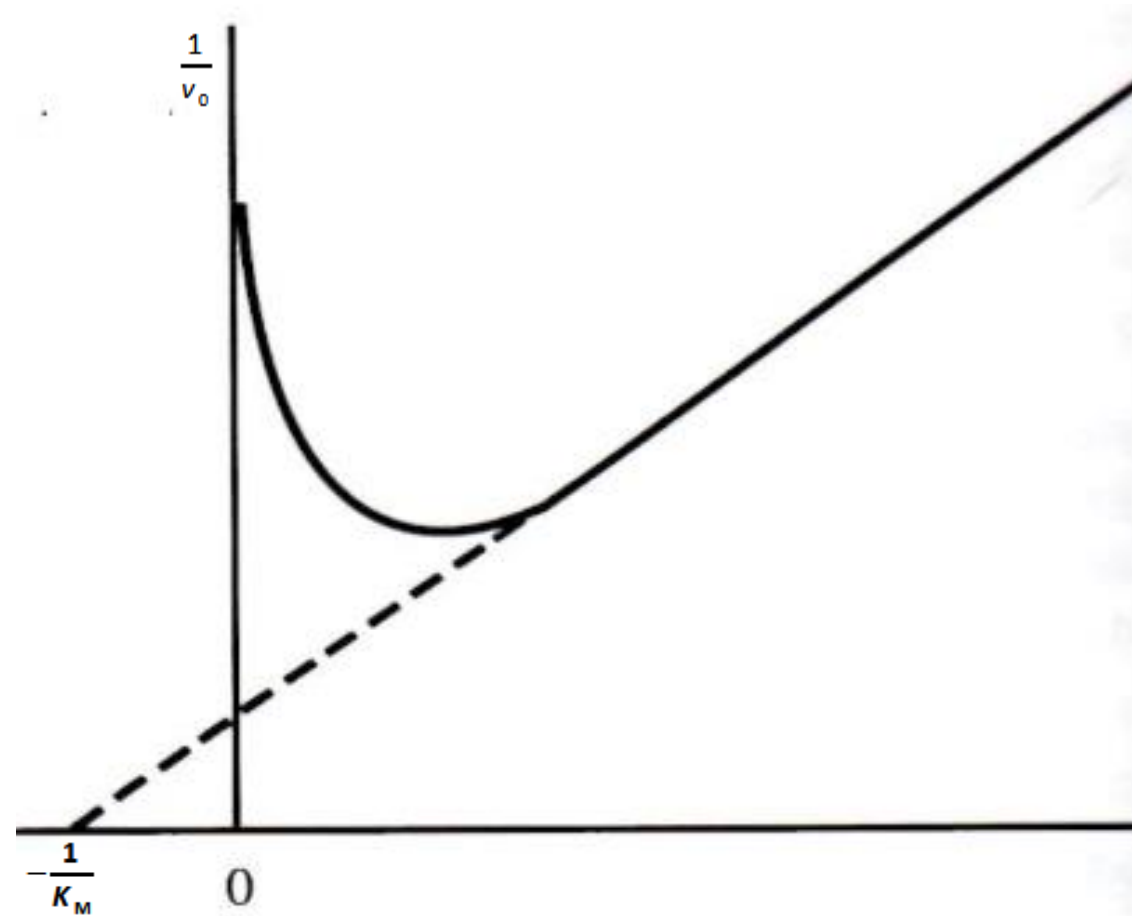
- le sous-site anionique qui porte une charge négative et qui interagit avec la charge positive portée par l'ammonium quaternaire du substrat.
- le sous-site estérasique (contenant les résidus catalytiques sérine et histidine) et qui interagit avec la liaison ester du substrat.

Quand la concentration du substrat est faible, chaque partie du substrat interagit avec le sous-site qui lui est dédié.

Quand la concentration du substrat est forte, une molécule de substrat n'interagit plus que partiellement avec l'un ou l'autre des sous-sites, chaque sous-site étant cependant occupé par une molécule de substrat.



L'étude cinétique d'une inhibition par excès de substrat donne le graphe suivant (représentation de affine en double inverse de LINEWEAVER-BURK) :



L'inhibition par excès de substrat concerne les enzymes michaéliennes et les enzymes allostériques.