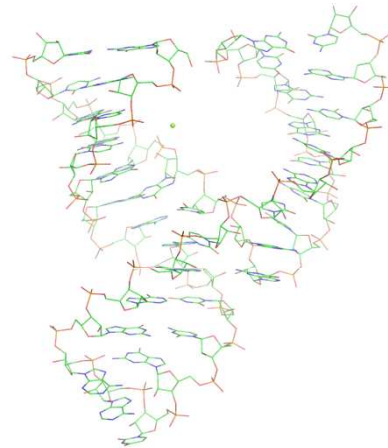


LES ENZYMES

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques.

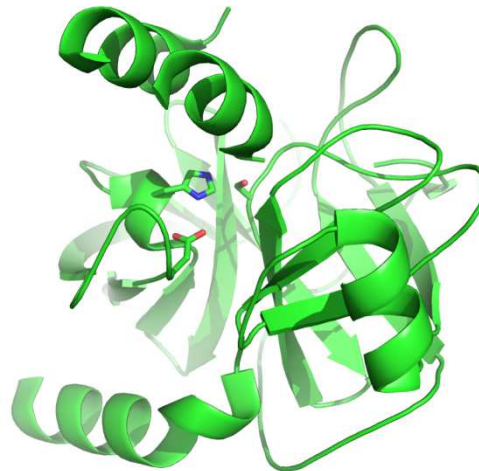
Il existe deux types d'enzymes.

Les ribozymes (ARN)



ex
RNA ribozyme.
Clivage autocatalytique

**Les enzymes
protéiques**



Ex trypsine.
Protéase à serine

Les enzymes sont des catalyseurs extrêmement efficace

ADC = arginine decarboxylase
STN = staphylococcal nuclease
FUM = fumarase
PEP = carboxypeptidase B
CMU = chorismate mutase
CAN = carbonic anhydrase

$t_{1/2} =$

1 minute

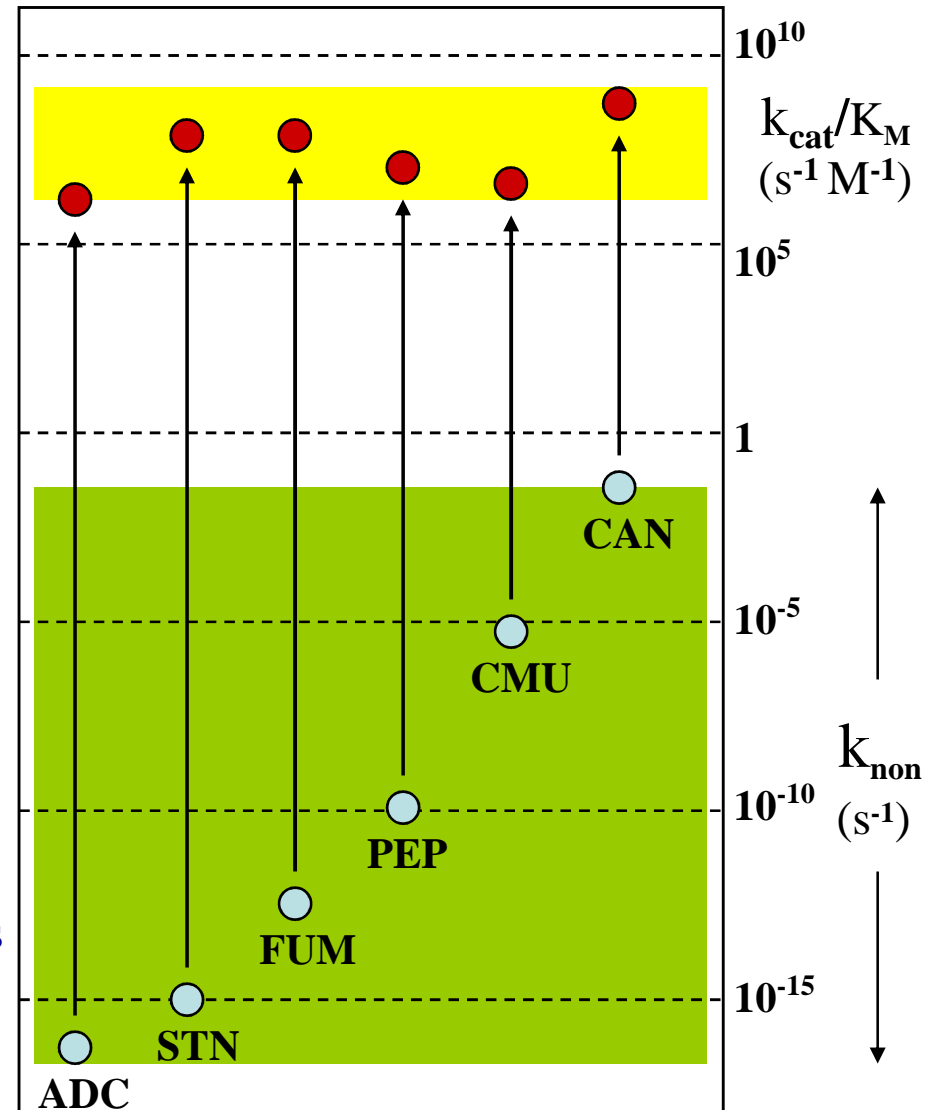
1 week

100 years

1 million years

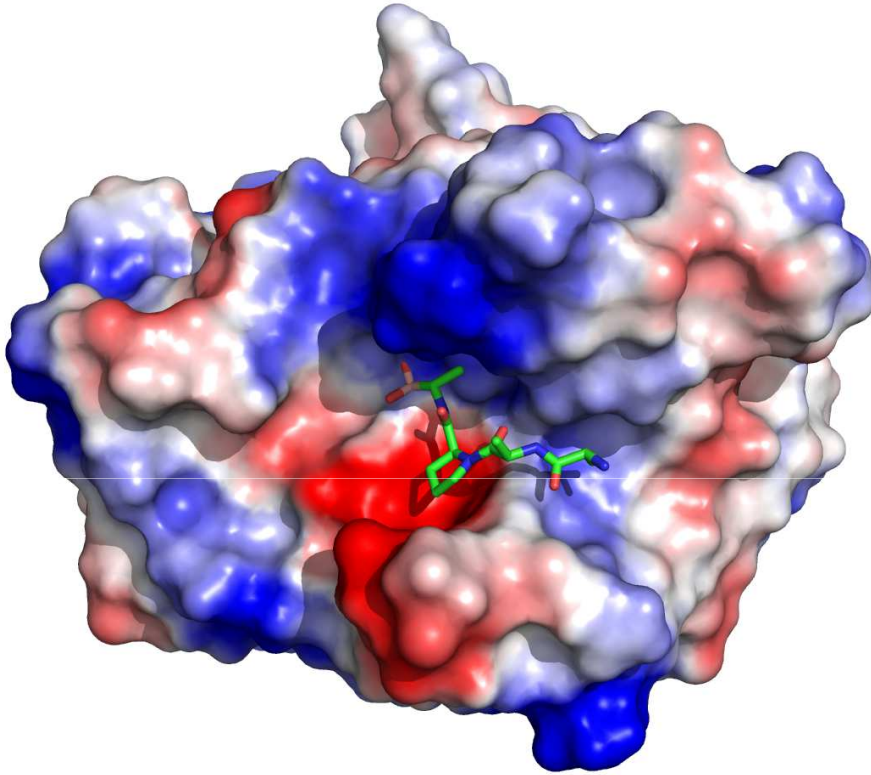
4 billion years

Source: R. Wolfenden 2001
Acc. Chem. Res.



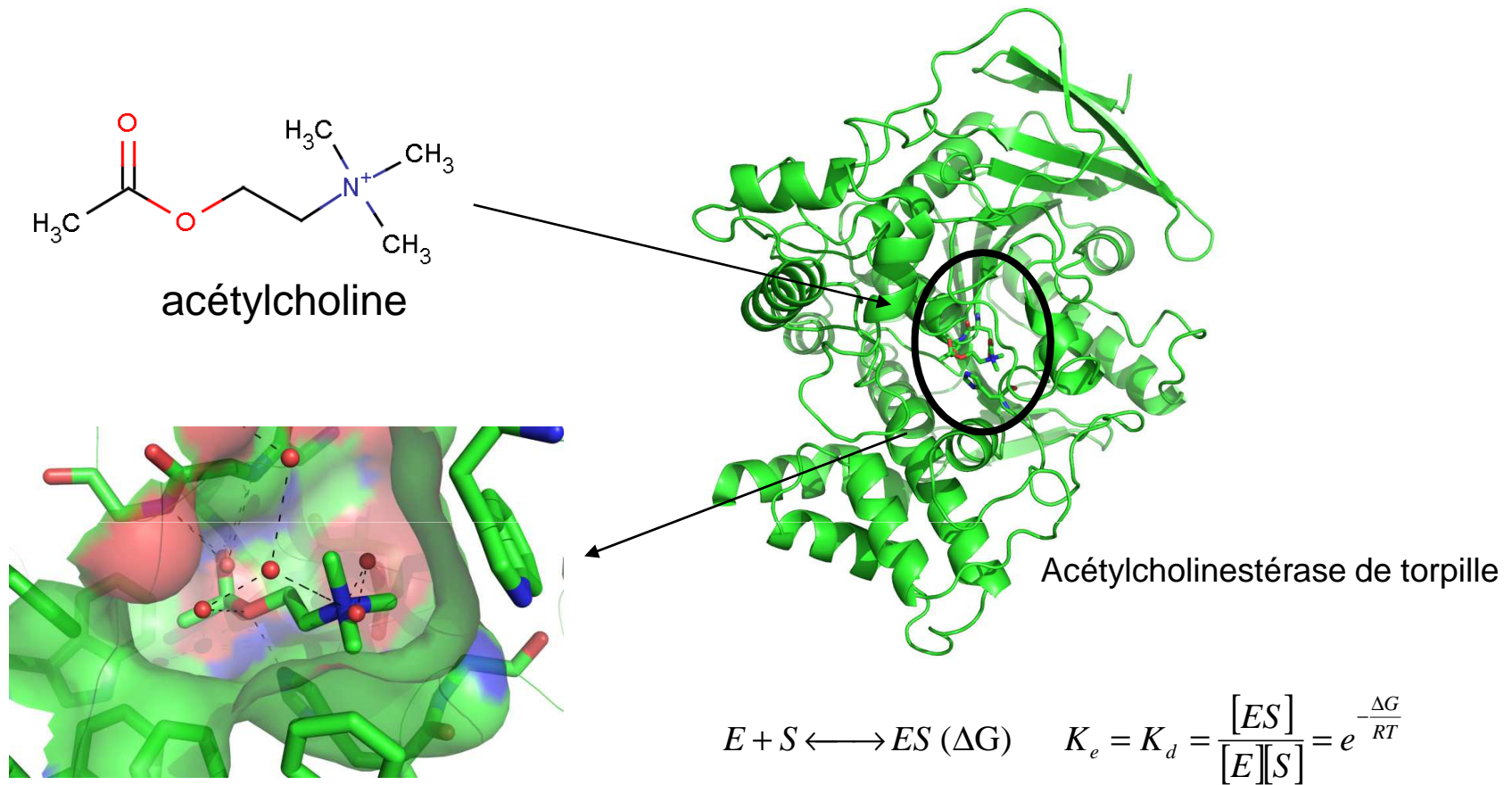
Elle peuvent accélérer une réaction des milliards de milliards de fois

Les enzymes peuvent être extrêmement spécifiques



Grace aux interaction avec les substrats (formes, géométrie, nature chimique)
Elle peuvent discriminer des formes chimiques très proche, les énantiomères ...

Les enzymes peuvent avoir une très grande affinité pour le substrat

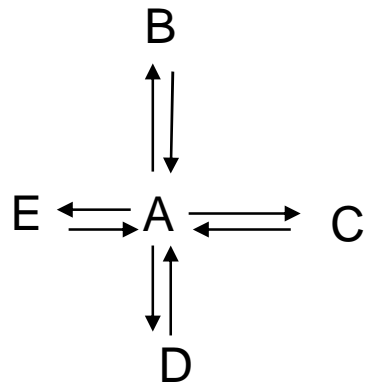


Grace au nombreuses interactions que l'enzyme peut faire avec le substrat (hydrophobe, liaisons ioniques, liaisons hydrogène, ...) le substrat peut être fixé a de très faible concentration (< mM, μ M) .

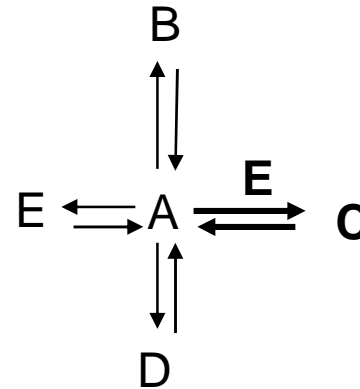
Une enzyme peut être très efficace à de très faible concentration.

Les enzymes servent à réguler le métabolisme

On a un substrat A qui peut former le produit B,C,D,E



Grace à une enzyme,
on peut canaliser une
réaction



De plus, il faut savoir que l'activité d'une enzyme peut être régulée par des effecteurs (inhibiteurs ou effecteur).

Les concentrations de produit ou de substrat (ou autre ligand) peuvent aussi moduler l'activité d'une enzyme (allostérie). C'est un moyen de rétrocontrôle d'une voie métabolique

La quantité d'enzyme est aussi régulée par la transcription.

Toutes ces régulations subtiles permettent à l'organisme de contrôler le métabolisme

Tout ce qui se fixe sur une protéines est appelé **ligand**.

Le ligand peut être nécessaire à la réaction enzymatique, avoir un rôle structurale ...

Cela inclus, le substrat, le produit

Les cofacteurs

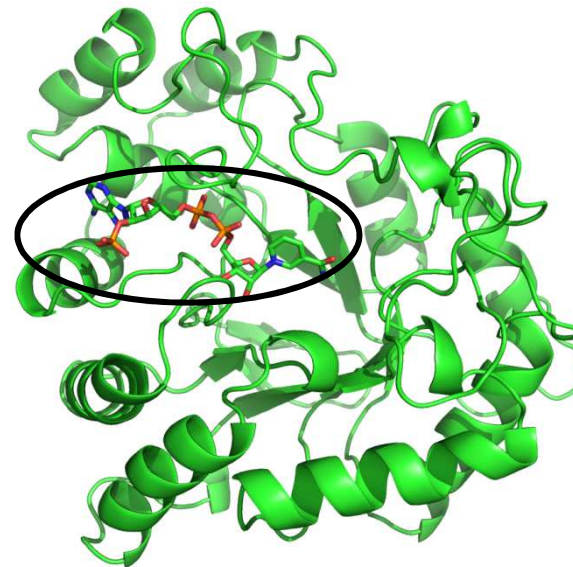
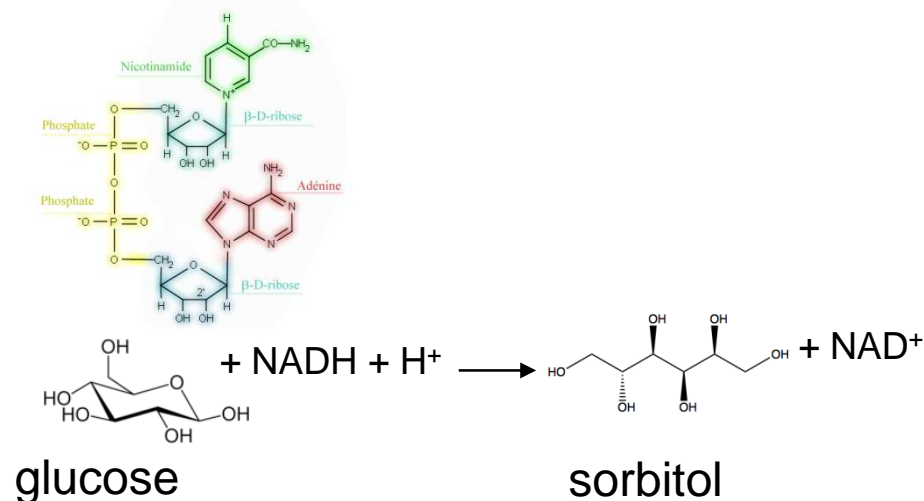
A part les hydrolase, les enzymes ont parfois besoin de fixer une autre partie non protéique pour catalyser une réaction (transfert d'électrons, de protons, d'hydrure, de groupe phosphate,...).

Cette partie appelle cofacteurs. Cella peut être un métal, un nucléotide...

Dans ce cas la partie protéique s'appelle **l'apoenzyme**

La partie non protéique s'appelle **le cofacteur** (nécessaire à la réaction enzymatique).

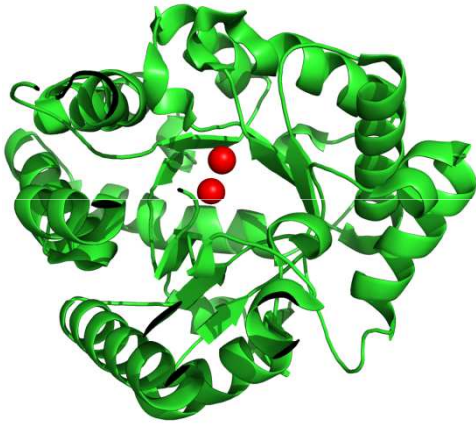
L'association de la partie protéique (apoenzyme) et de la partie non-protéique (cofacteur) constitue **l'holoenzyme**.



Ex Nicotinamide adénine dinucléotide NAD dans l'aldose réductase

Les cofacteurs peuvent être labile ou fortement fixés à l'enzyme.

On appelle **groupe prosthétique** les cofacteurs qui sont fortement liés à l'enzyme (parfois avec une liaison covalente).
L'enzyme les régénère à la fin de la réaction.



Le site actif de la phosphotriesterase est constitué de 2 atomes de zinc

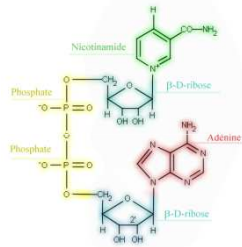
Les autres cofacteurs labiles se dissocient et sont régénérés par d'autres enzymes.

Ex ATP

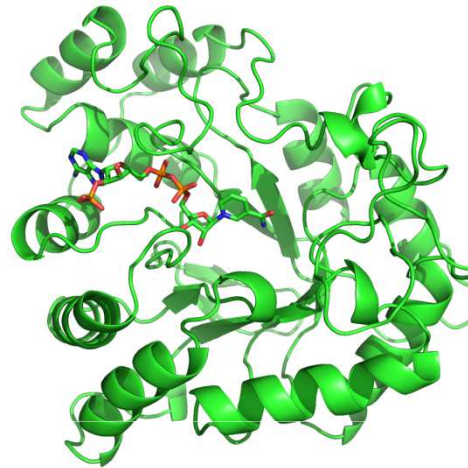
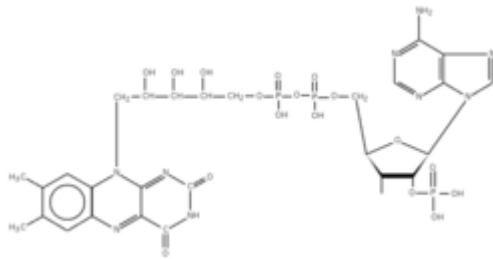
Les coenzymes

Si le cofacteur est d'origine organique (vitamine, nucléotide,...), le cofacteur est appelé **coenzyme**.

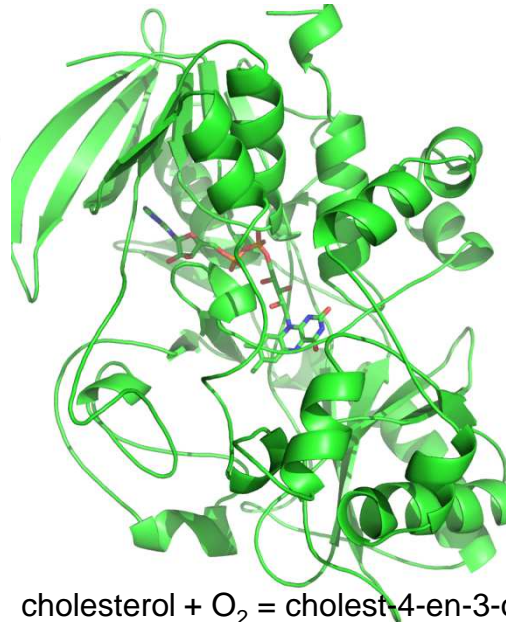
Ex coenzyme labile: le NAD



Ex coenzyme prosthétique:
la Flavine adenine dinucléotide (FAD)



Aldose réductase

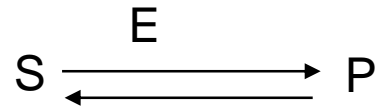


Cholestérol oxydase

Le coenzyme est profondément enfoui dans l'enzyme.

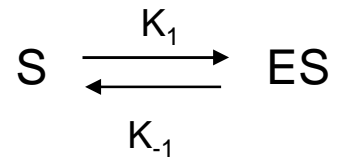


Mécanisme général d'une enzyme

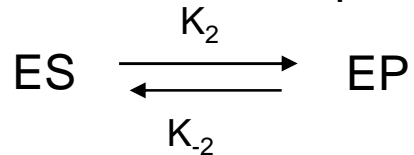


Une enzyme (E) transforme un substrat (S) en produit (P).

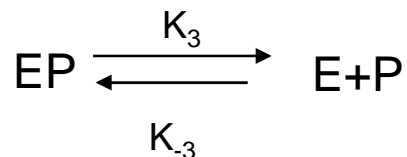
-Première étape. Le substrat se fixe sur l'enzyme



-La deuxième étape: la catalyse . Le substrat est transformé en produit

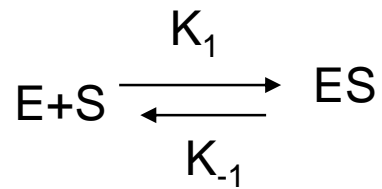


-Troisième étape. Le produit est relâché



Si il y a plusieurs substrats. La réaction se fera étape par étape (et non simultanément) pour être efficace. C'est une succession de réaction du premier ordre.
On revient toujours à ce système générale

Equilibre



A l'équilibre

$$K_1[\text{E}][\text{S}] = K_{-1}[\text{ES}]$$

$$K_{-1}/K_1 = [\text{E}][\text{S}] / [\text{ES}]$$

$$\text{Or } K_d = [\text{E}][\text{S}] / [\text{ES}]$$

K_d = constante de dissociation

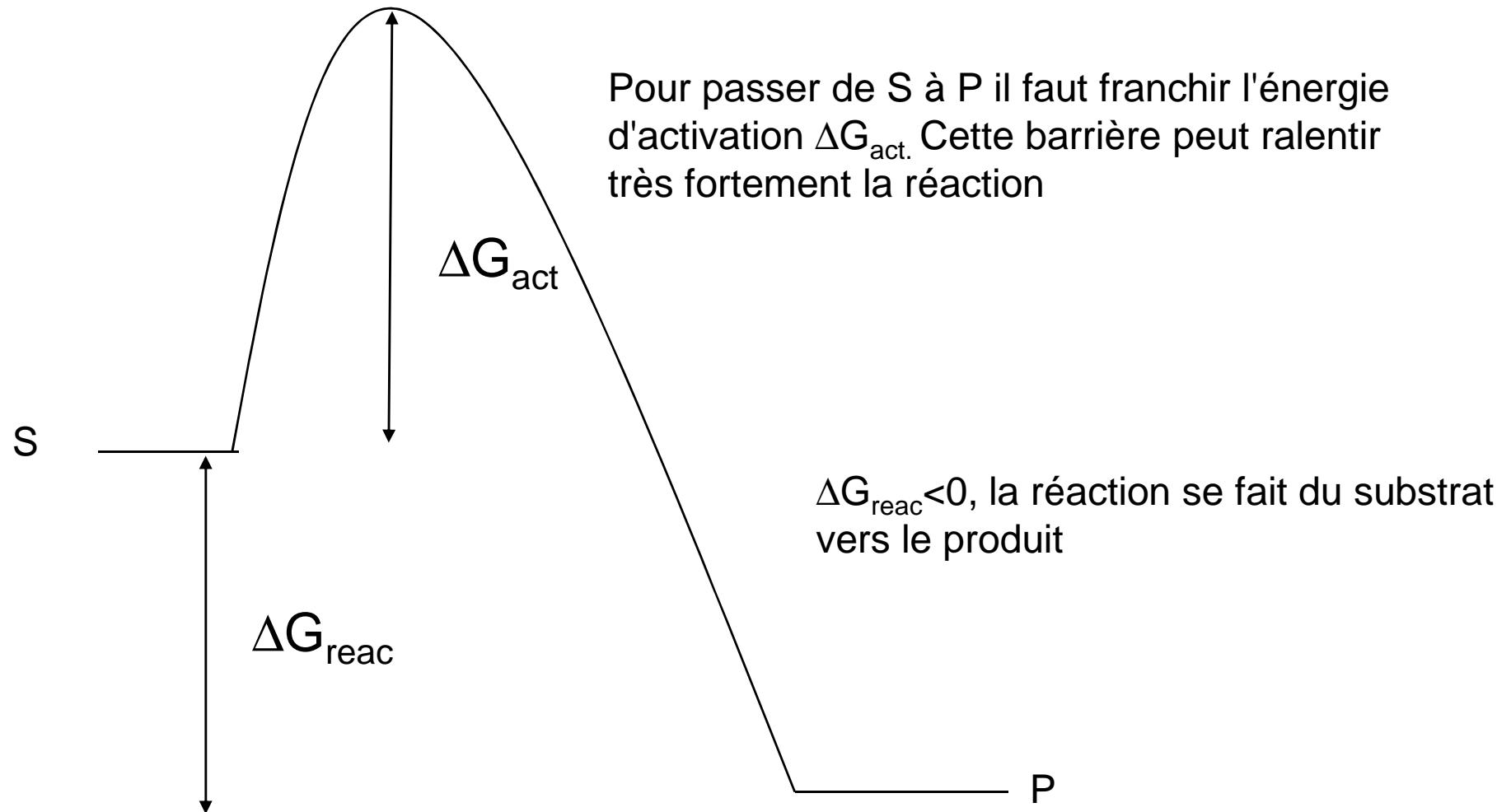
$$\text{Par conséquent } K_d = K_{-1}/K_1$$

$$\text{Si } [\text{S}] = K_d, [\text{ES}] = [\text{E}]$$

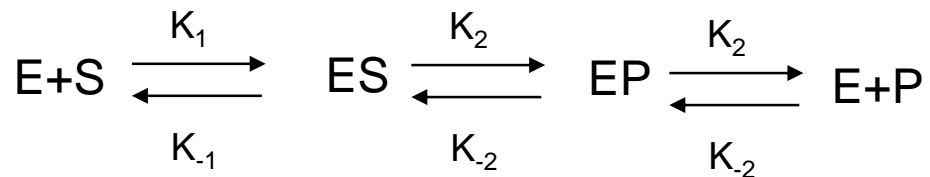
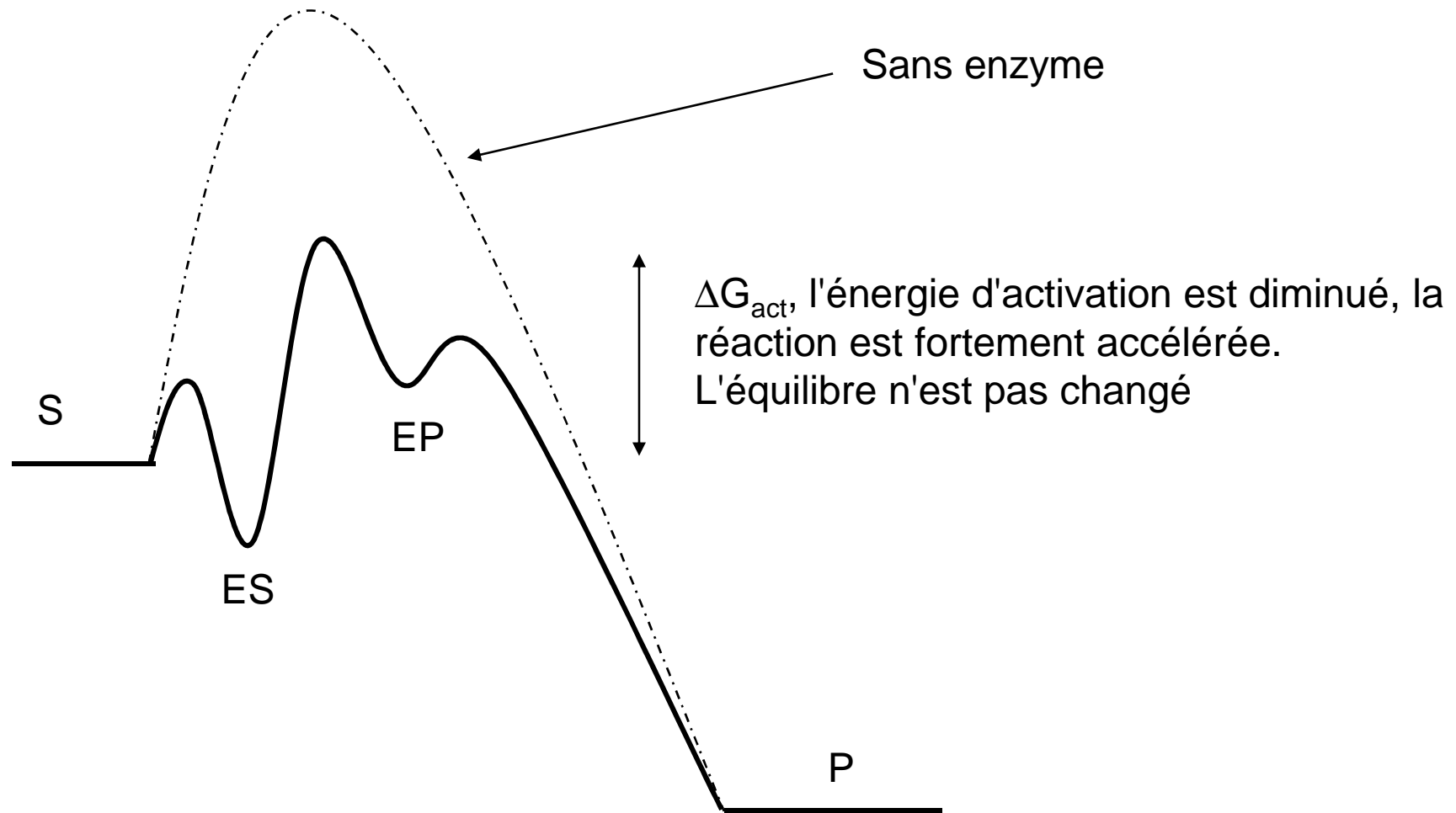
Il y a autant d'enzyme libre que d'enzyme liée au substrat

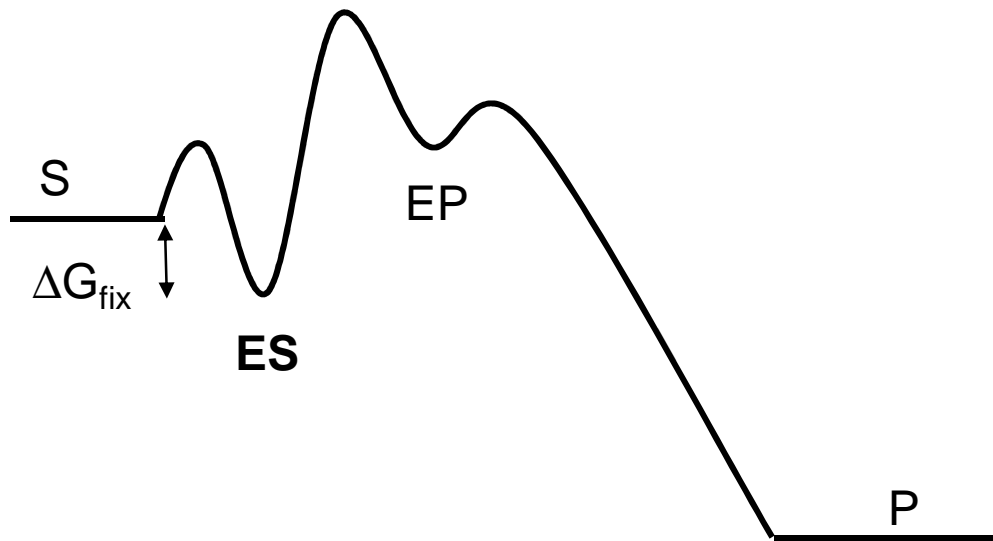
Diagramme énergétique

Sans enzyme le diagramme énergétique d'une réaction est



Avec Enzyme





Pour fixer le substrat, il y a une petite barrière d'énergie. Il faut chasser des molécules d'eau. Il faut que l'enzyme fasse des changements conformationnelles ...

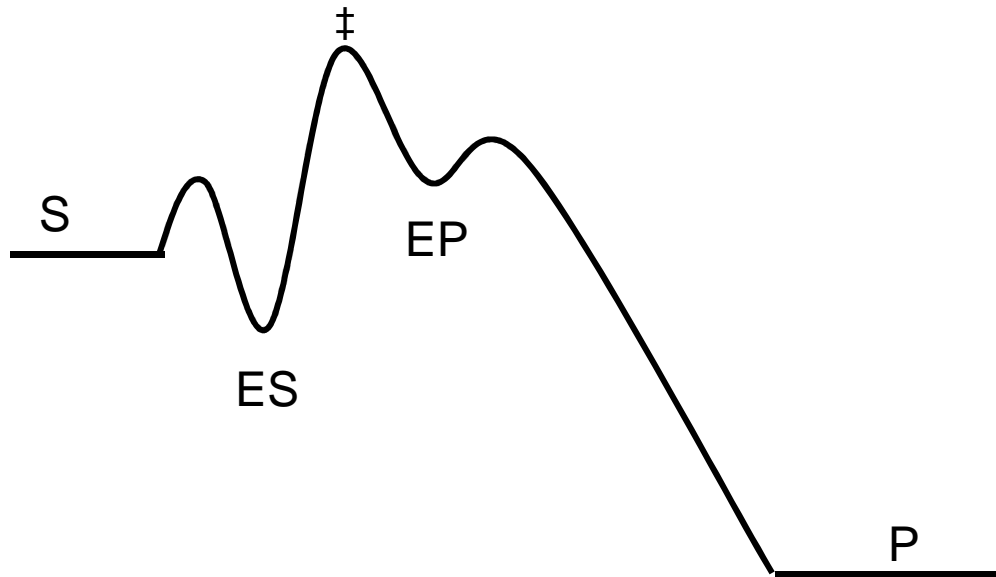
L'énergie thermique est suffisante pour passer cette barrière. Parfois, les enzymes ont un champ électrique afin d'orienter et d'attirer le substrat (ex acétylcholinestérase). Les enzymes psychrophiles sont plus flexibles que les enzymes mésophiles.

ES

En fixant le substrat, on augmente l'ordre: C'est défavorable.

Pour compenser cette perte entropique, le substrat fait des interactions énergiquement favorables avec l'enzyme (liaisons ioniques, liaisons hydrogène, stacking, interactions hydrophobe ...).

L'énergie dégagée (ΔH) augmente l'entropie du milieu ($\Delta S = \Delta H / T$)



L'énergie d'activation de la réaction est abaissée.

Effet entropique

Les substrats sont fixés. Il y a augmentation de la concentration locale des réactif et comme les substrats sont correctement orienté pour la reaction, il y a plus de chance qu'ils réagissent.

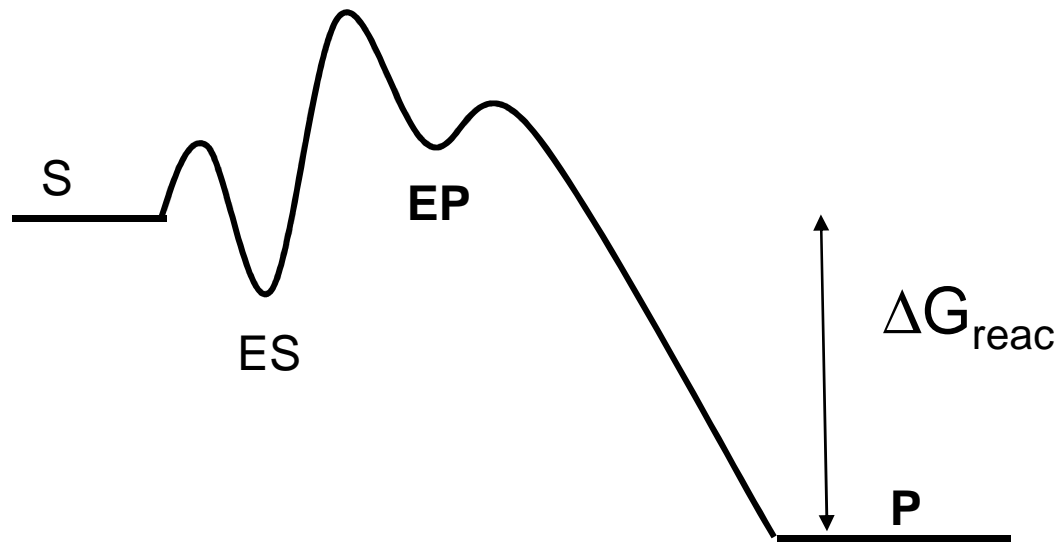
C'est un effet entropique favorable.

Effet énergétique

L'enzyme peut parfois déstabiliser le substrat, déformation géométrique, polarisation d'une liaison, attaque d'une liaison ...

Stabilisation de l'état intermédiaire: charge, liaisons,...

Au final l'énergie d'activation est abaissée et il y a réaction



Le produit est formé.

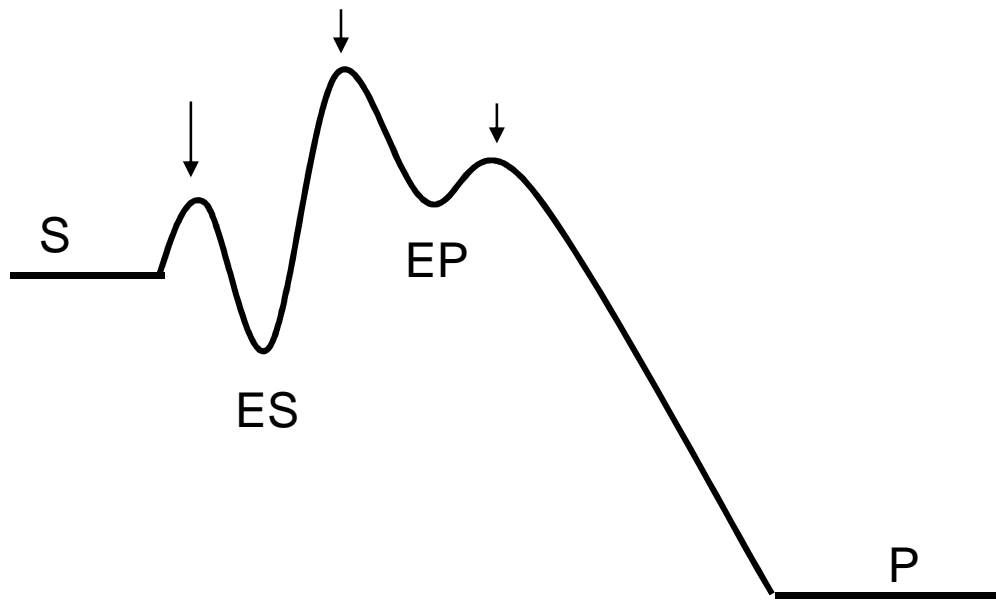
Souvent, le produit a une affinité plus faible que le substrat.

De plus, au début de la réaction comme il n'y a pas encore de produit dans la solution, le produit sortira plus facilement (effet entropique)

Comme pour l'arrivée du substrat, le produit pour sortir doit franchir une barrière d'énergie. Déplacement de molécules d'eau, mouvements de la protéine.

Quelque soit le chemin, à la fin on récupère l'énergie de la réaction.

Cette énergie peut être couplée à d'autres réactions non favorables (ex ATP)



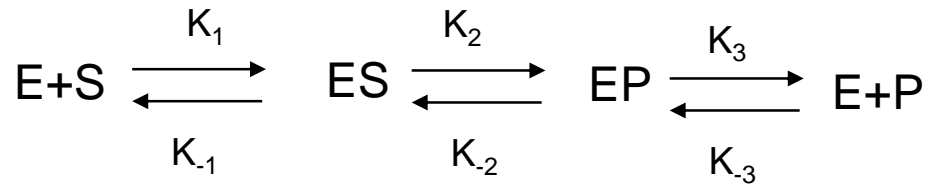
Les états ES et EP sont métastable et peuvent être piégés. (concentration P et S, T° , ...)

Les autres états intermédiaires sont beaucoup plus difficiles à piéger (cryoenzymologie)

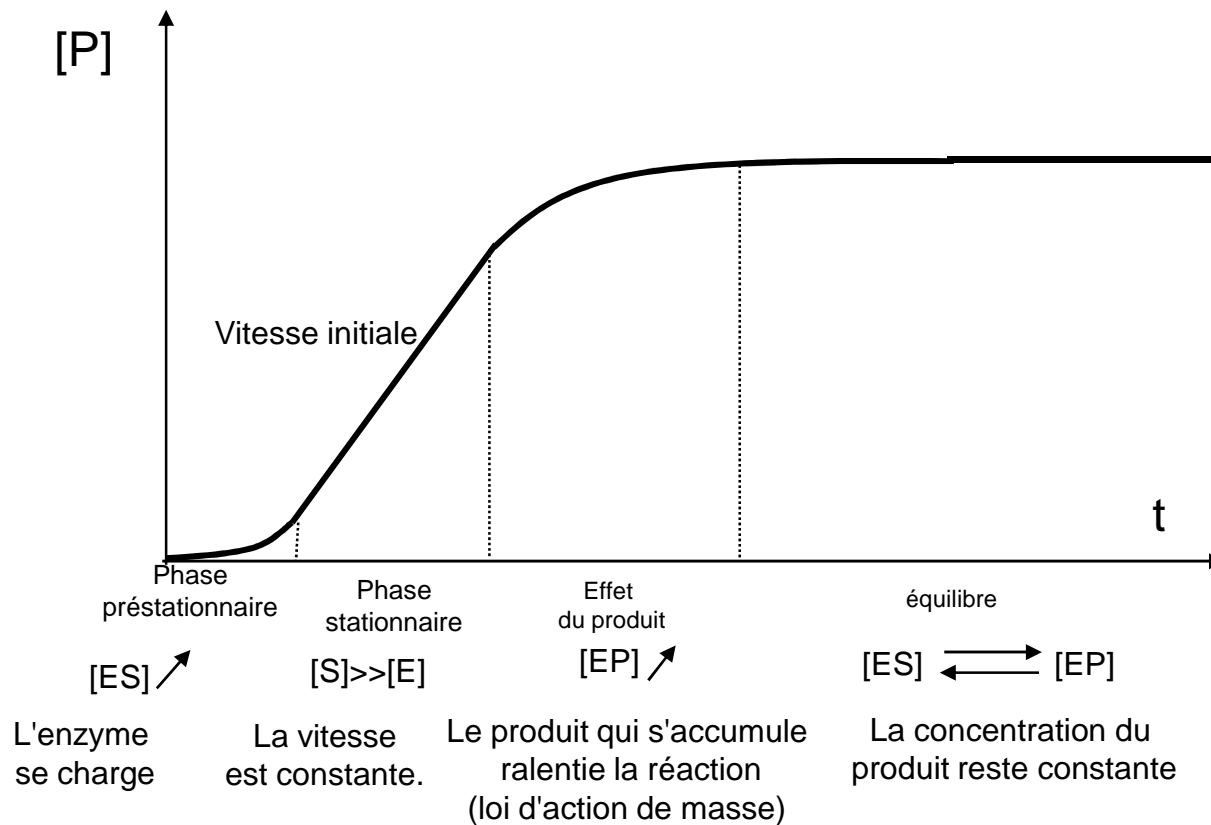
Par microcalorimétrie on peut facilement mesurer l'enthalpie (ΔH) pour la fixation du substrat, du produit ou de la réaction).

Par contre il est difficile d'avoir accès à l'enthalpie libre (ΔG). Il faudra avoir accès au désordre. (changement de conformation, déplacement des molécules d'eau,...)

Cinétique d'une enzyme au cours du temps



Apparition du substrat au cours du temps



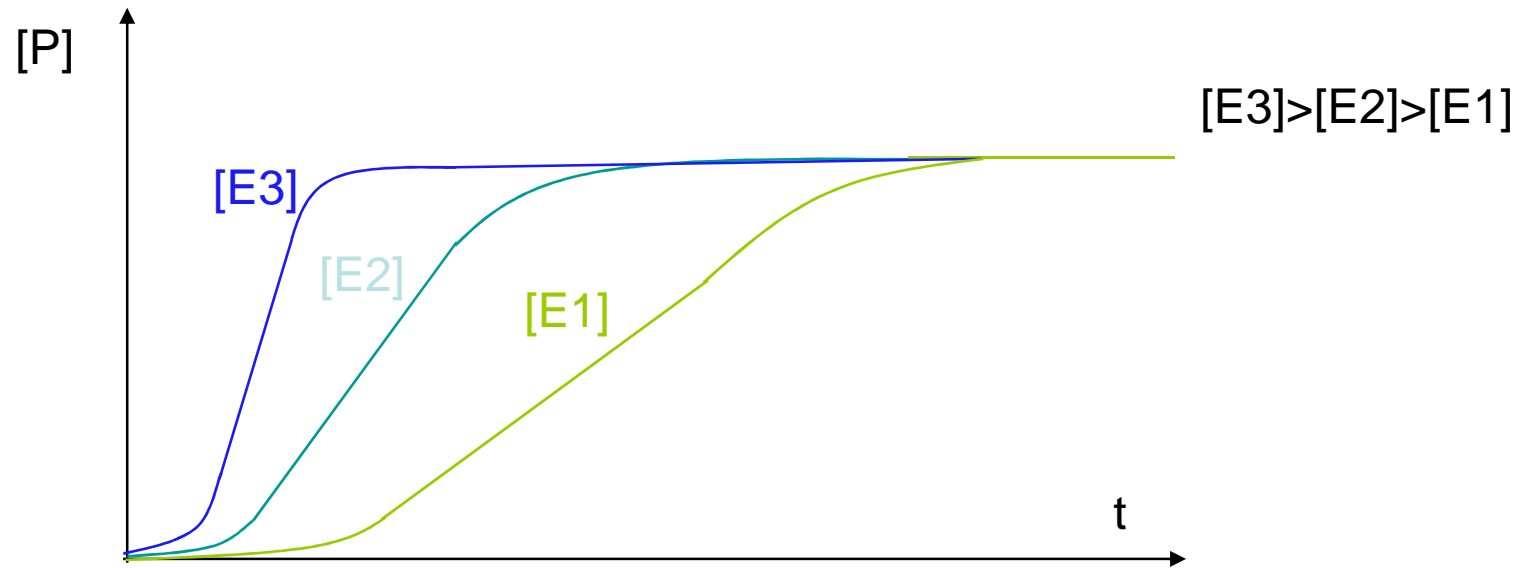
La vitesse peut être mesurée avec l'apparition du produit.

$$v = \frac{d[P]}{dt}$$

En enzymologie classique, on s'intéresse à la phase stationnaire (linéaire) en mesurant la vitesse initiale.

Il y a un maximum d'enzyme liée avec le substrat. D'où la vitesse maximale

La cinétique en fonction de la concentration d'enzyme



Plus il y a d'enzyme plus la réaction est rapide.
Par contre cela ne change pas l'équilibre

Unité de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique d'une solution est le nombre de mole de substrat qu'elle dégrade par seconde

Katal (Kat)

L'unité officielle de la mesure de l'activité enzymatique est le **Katal**.

C'est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde

L'unité international (U.I)

On trouve aussi une autre unité très usuel " **l'unité international**"

C'est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une μ mole de substrat par minute

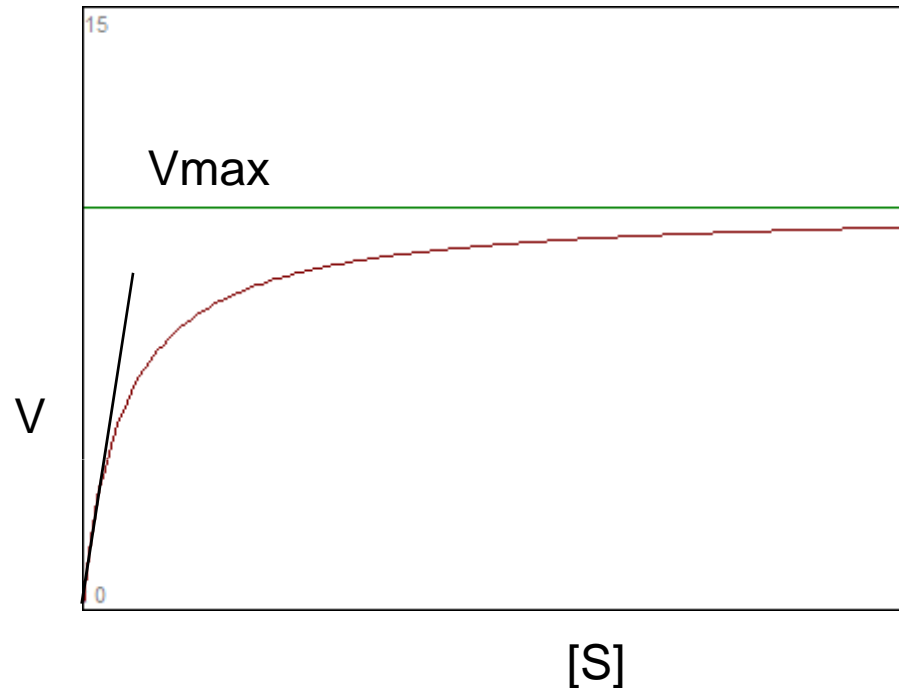
$$1\text{UI} = 16\text{nKat.}$$

Dosage

La mesure de l'activité enzymatique d'une solution permet de doser une enzyme

Il faut faire la mesure dans des conditions définies (pH, T°(souvent 25°), [S], ...) et connaître l'activité de l'enzyme

Cinétique (phase stationnaire) en fonction de la concentration du substrat



Plus il y a de substrat, plus l'enzyme est rapide.
C'est la loi d'action de masse.

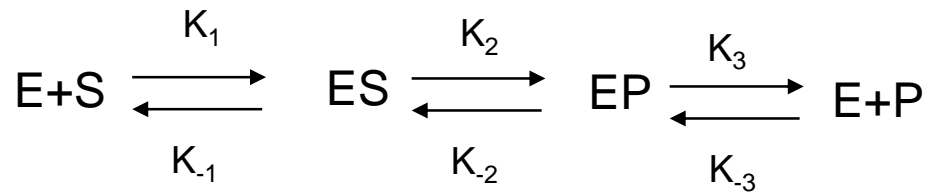
Néanmoins, c'est augmentation n'est pas
infini (comme tout processus biologique), et
l'enzyme finit par saturer à la vitesse V_{max} .
(réaction d'ordre 0)

Attention, pour les mesure on atteint V_{max} de
façon asymptotique. En réalité, il est difficile de
mesurer V_{max} car il faut beaucoup de substrat
pour vraiment atteindre V_{max} (en théorie $[S]=\infty$)

A faible concentration la vitesse est linéaire
en fonction de la concentration de substrat.
C'est une réaction d'ordre 1

courbe cinétique (V en fonction de $[S]$) classique des enzyme Michaelienne.
C'est une hyperbole

Modèle de Michaelis-Menten (1913)

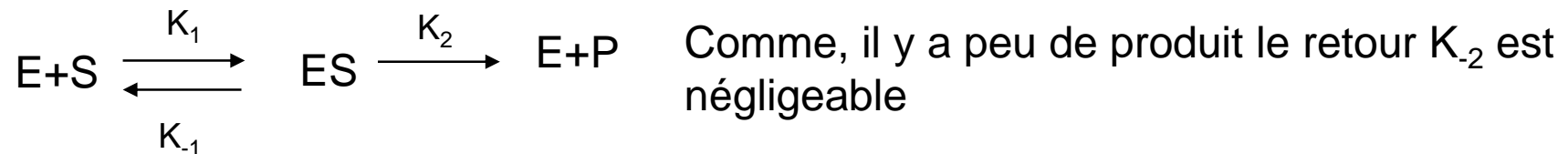


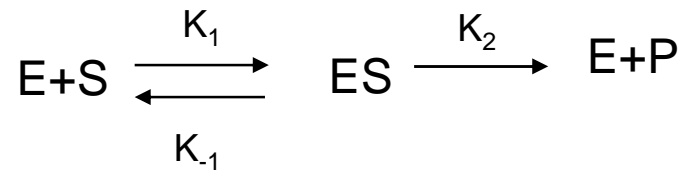
Conditions (phase stationnaire).

- 1 On travaille à de très faible concentration de substrat $[S] \gg [P]$
- 2 Il y a beaucoup plus de substrat que d'enzyme que $[S] \gg [E]$
- 3 les formes libres de l'enzyme et de l'enzyme lié au substrat sont en équilibre (rapide).

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

Avec ces conditions, on peut simplifier la réaction





Par conservation, on doit avoir:

$$[S]_{\text{ini}} = [S] + [ES] + [P] \quad \text{or } [S] \gg [E] \text{ et } [S] \gg [P]$$

Donc la concentration de substrat peut être considérée comme constante

$$[S] = [S]_{\text{ini}}$$

$$[E]_{\text{tot}} = [E] + [ES]$$

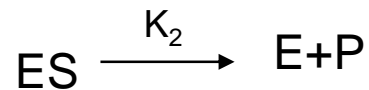
L'équilibre étant rapide, la concentration de l'enzyme fixée au substrat est reliée à la constante de dissociation

$$K_d = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

En remplaçant [S] et [E] par leurs valeur

$$K_d = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([E]_{tot} - [ES])[S]_{ini}}{[ES]} = \frac{[E]_{tot} [S]_{ini}}{[ES]} - [S]_{ini}$$

$$[ES] = \frac{[E]_{tot} [S]_{ini}}{K_d + [S]_{ini}}$$



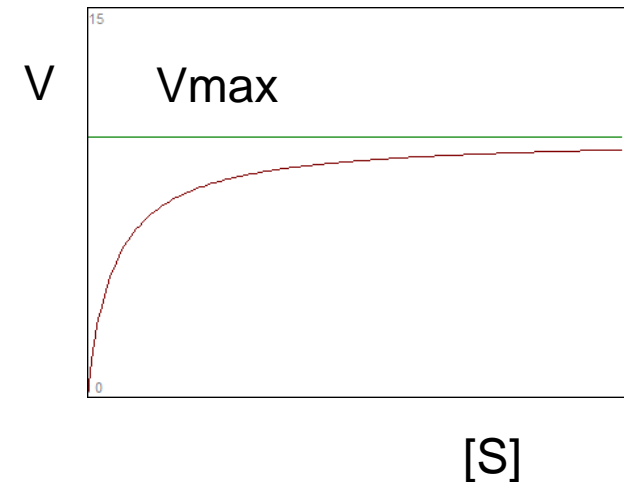
La deuxième partie de la réaction est une réaction du premier ordre

$$V = k_2[ES] = k_2 \frac{[E]_{tot} [S]_{ini}}{K_d + [S]_{ini}}$$

On définit $V_{max} = k_2[E]_{tot}$

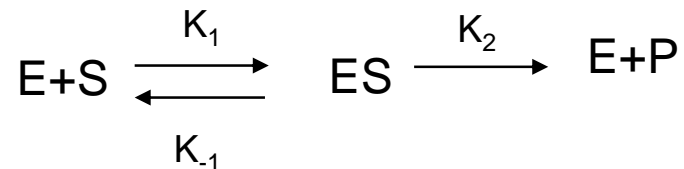
$$V = \frac{V_{max} [S]_{ini}}{K_d + [S]_{ini}}$$

C'est l'équation de Michaelis-Menten



On peut définir la constante catalytique $K_{cat} = K_2 = \frac{V_{max}}{[E]_{tot}}$
 Elle est indépendante de la concentration d'enzyme

Modèle de Briggs-Haldane (1925)



Dans ce modèle, on tient compte de l'équilibre de ES avec E+S et E+P.

Si on est en phase stationnaire, ES est constant.

Ainsi

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$k_1([E]_{tot} - [ES])[S]_{ini} - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$

$$k_1[E]_{tot}[S]_{ini} = [ES](k_1[S]_{ini} + (k_{-1} + k_2))$$

$$[ES] = \frac{[E]_{tot}[S]_{ini}}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} + [S]_{ini}} = \frac{[E]_{tot}[S]_{ini}}{K_M + [S]_{ini}}$$

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

$$K_{cat} = K_2 = \frac{V_{max}}{[E]_{tot}}$$

De la même façon que précédemment

$$V = k_2[ES] = k_2 \frac{[E]_{tot}[S]_{ini}}{K_M + [S]_{ini}}$$

$$\text{avec } V_{max} = k_2[E]_{tot}$$

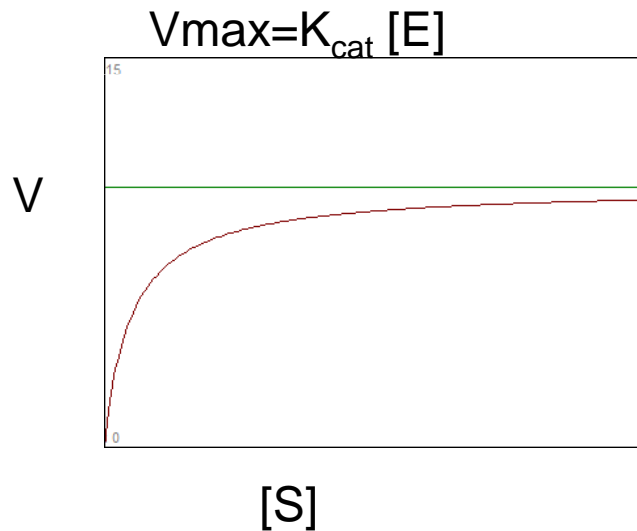
$$\boxed{V = \frac{V_{max}[S]_{ini}}{K_M + [S]_{ini}}}$$

La vitesse en fonction de la concentration de substrat est donné par l'équation de Michaelis-Menten

$$V = \frac{k_{cat} [S]_{ini}}{K_M + [S]_{ini}} [E]$$

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

K_M est la constante de Michaelis (M)
 $K_{cat} = k_2$ (s^{-1})



Si la vitesse de réaction (k_2) est faible par rapport avec la vitesse de dissociation k_{-1}

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \approx \frac{k_{-1}}{k_1} = K_d$$

On retrouve le modèle précédent

analyse

$$V = \frac{k_{cat} [S]_{ini}}{K_M + [S]_{ini}} [E]$$

Unité
E,S: Mol
V: Mol/S
Kcat : s ⁻¹ ·Mol ⁻¹
K _M : Mol

La vitesse est proportionnelle la concentration d'enzyme

Kcat représente l'efficacité catalytique de l'enzyme, c'est le turnover

Km représente l'affinité du substrat pour l'enzyme

Si [S]=Km

$$0 = k_1 [E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$= k_1 [E]k_m - (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$[E]k_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} [ES]$$

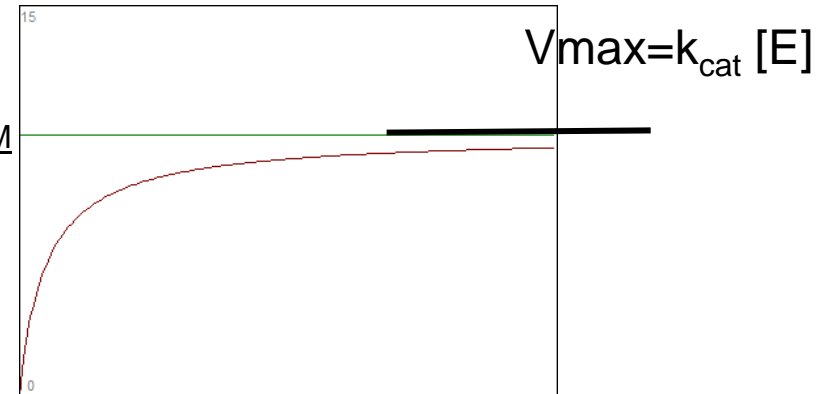
$$[E] = [ES]$$

50% des enzyme sont liés au substrat

A très grande concentration de substrat, $[S] \gg K_M$

$$V = \frac{k_{cat} [S]_{ini}}{K_M + [S]_{ini}} [E] \approx k_{cat} [E] = V_{max}$$

Avec la mesure de V_{max} on a accès à k_{cat}



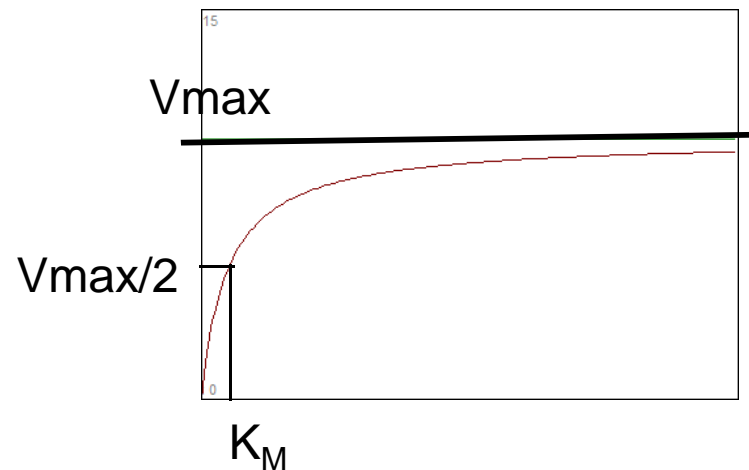
K_M représente approximativement la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat. Si on est largement au dessus de cette valeur, l'enzyme est saturé par le substrat, il y a un maximum d'enzyme en condition pour effectuer la réaction. C'est la vitesse maximale

$$[S]=K_M$$

$$V = \frac{k_{cat} [S]_{ini}}{K_M + [S]_{ini}} [E] = \frac{k_{cat} K_M}{K_M + K_M} [E] = \frac{k_{cat} [E]}{2} = \frac{V_{max}}{2}$$

Au la concentration $[S]=K_M$, la moitié des enzymes ont fixé le substrat. Ainsi la vitesse est $V_{max}/2$.

On peut facilement déduire K_M , à partir de la courbe.
 K_M correspond au point où la vitesse est $V_{max}/2$

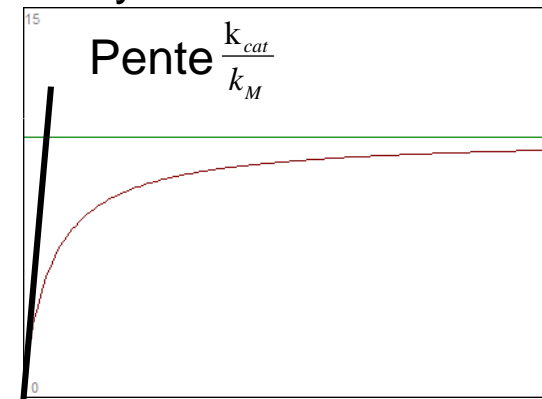


A très faible concentration de substrat, $[S] \ll K_M$

$$V = \frac{k_{cat} [S]_{ini}}{k_M + [S]_{ini}} [E] \approx \frac{k_{cat}}{k_M} [S]_{ini} [E]$$

La vitesse est proportionnelle à la concentration de substrat et d'enzyme (réaction du premier ordre) avec le rapport $\frac{k_{cat}}{k_M}$

Ce rapport mesure la spécificité et l'efficacité de l'enzyme



le nombre d'enzymes d'enzyme liées au substrat approximativement donné par K_M

$$K_M \approx \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}, [ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$

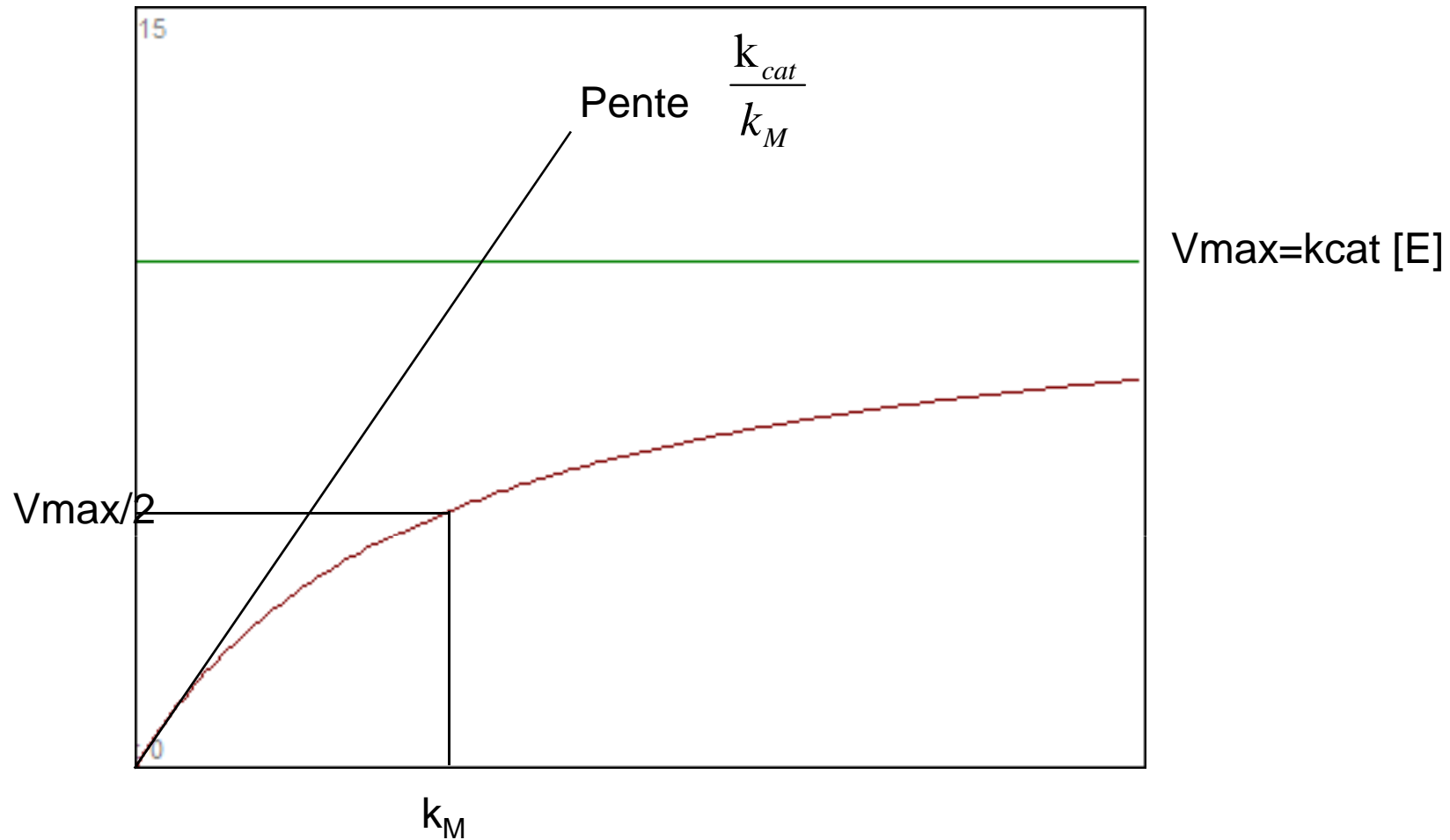
Chaque enzyme réagit avec la vitesse k_{cat}

D'ou
$$V = \frac{k_{cat}}{k_M} [S]_{ini} [E]$$

A faible concentration de substrat, l'efficacité d'une enzyme est donné par le rapport $\frac{k_{cat}}{k_M}$

L'enzyme doit avoir une bonne affinité pour la substrat (faible K_M) et une grande réactivité pour le substrat (K_{cat} élevé)

En générale, biologiquement les enzymes fonctionnent à faible concentration de substrat



$$[S] \gg K_M \quad v_o = v_{max}$$

v_o indépendante de $[S]$,
saturation, asymptote

$$[S] \ll K_M \quad v_o = v_{max} \cdot [S] / K_M$$

dépendance linéaire de $[S]$,
substrat limitant, asymptote

$$[S] = K_M \quad v_o = v_{max} / 2$$

demi-saturation de l'enzyme

Exemple de constante de Mikaelis (k_M)

Enzyme	Substrat	K_M (mM)
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	0.095
Anhydrase carbonique	CO_2	12
	HCO_3^-	26
Catalase	H_2O_2	25
Chymotrypsine	N-acétylglycine éthyl ester	440
	N-acétylvaline éthyl ester	88
	N-acétyltyrosine éthyl ester	0.66
Fumarase	Fumarate	0.005
	Malate	0.025
Uréase	Urée	25
Lysozyme	hexa N acetylglucosamine	0.006

K_M représente l'affinité du substrat pour l'enzyme.

Si $[S]=K_M$, La moitié des enzymes auront le substrat fixé.

K_M peut prendre des valeurs très varié.

En générale ($K_M=K_d$), plus K_M sera petit plus l'énergie de liaison du substrat (ΔG) sera importante.

Exemple de constantes catalytiques (Kcat)

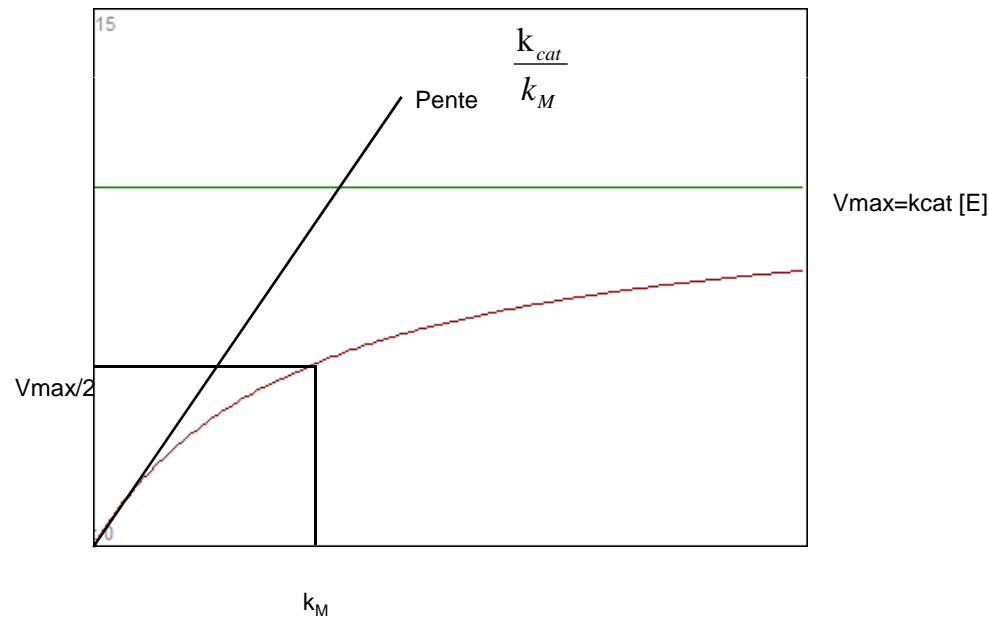
Enzyme	Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	0.095	14 000
Anhydrase carbonique	CO ₂	12	1 000 000
	HCO ₃ ⁻	26	400 000
Catalase	H ₂ O ₂	25	40 000 000
Chymotrypsine	N-acétylglycine éthyl ester	440	0.051
	N-acétylvaline éthyl ester	88	0.17
	N-acétyltyrosine éthyl ester	0.66	190
Fumarase	Fumarate	0.005	800
	Malate	0.025	900
Uréase	Urée	25	10 000
Lysozyme	hexa N acetylglucosamine	0.006	0.5

Kcat représente l'activité catalytique de l'enzyme.

La catalase qui a la plus grande activité catalytique connue, chaque enzyme est capable de dégrader 40 millions de molécules par seconde

K_m et K_{cat} individuellement ne sont pas suffisant pour déterminer si une enzyme est efficace envers un substrats.

A faible concentration de substrats comme c'est souvent le cas. La vitesse catalytique est déterminé par la le rapport K_{cat}/K_M



Enzyme	Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ .s ⁻¹)
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	0.095	14 000	147 368 421
Anhydrase carbonique	CO ₂	12	1 000 000	83 333 333
	HCO ₃ ⁻	26	400 000	15 384 615
Catalase	H ₂ O ₂	1100	40 000 000	36 363 636
Chymotrypsine	N-acétylglycine éthyl ester	440	0.051	0.1
	N-acétylvaline éthyl ester	88	0.17	1.9
	N-acétyltyrosine éthyl ester	0.66	190	287 878
Fumarase	Fumarate	0.005	800	160 000 000
	Malate	0.025	900	36 000 000
Uréase	Urée	25	10 000	400 000
Lysozyme	hexa N acetylglucosamine	0.006	0.5	83 333

On peut remarquer pour le lysozyme que malgré un mauvais Kcat, l'enzyme est efficace grâce un bon K_M .

De même l'anhydrase carbonique et la catalase ont une très mauvaise affinité pour leur substrat mais une très bonne constante catalytique. Ce qui en font les enzymes parmi les plus efficaces

Grace à ces analyse ont peut déterminer les substrats "le plus physiologique" et l'activité probable de l'enzyme. (Une enzyme peut avoir plusieurs activité.)

Ex chymotrypsine

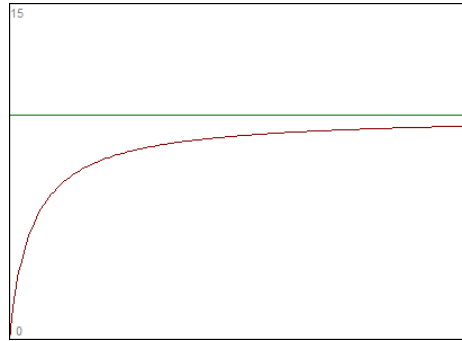
Vitesse maximale, perfection catalytique

La vitesse de réaction ne peut être plus importante que la vitesse de fixation du substrat sur l'enzyme. Cette vitesse est limitée par la vitesse de diffusion. Dans l'eau cette constante de vitesse est de l'ordre de $10^9 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$. Les enzymes dont l'activité catalytique approche cette valeur ont atteint la perfection catalytique.

Enzyme	Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	0.095	14000	147 368 421
Anhydrase carbonique	CO_2	12	1 000 000	83 333 333
Catalase	H_2O_2	1100	40 000 000	36 363 636
Fumarase	Fumarate	0.005	800	160 000 000

Linéarisation

$$V = \frac{k_{cat} [S]_{ini}}{k_M + [S]_{ini}} [E]$$



A partir de ce graphe, il est difficile de déterminer rapidement et précisément K_{cat} et K_M .
La courbe n'est pas linéaire, on est rarement à saturation (K_{cat}).

représentation de Lineweaver-Burk

On va représenter cette courbe en double inverse $1/V$ en fonction de $1/S$

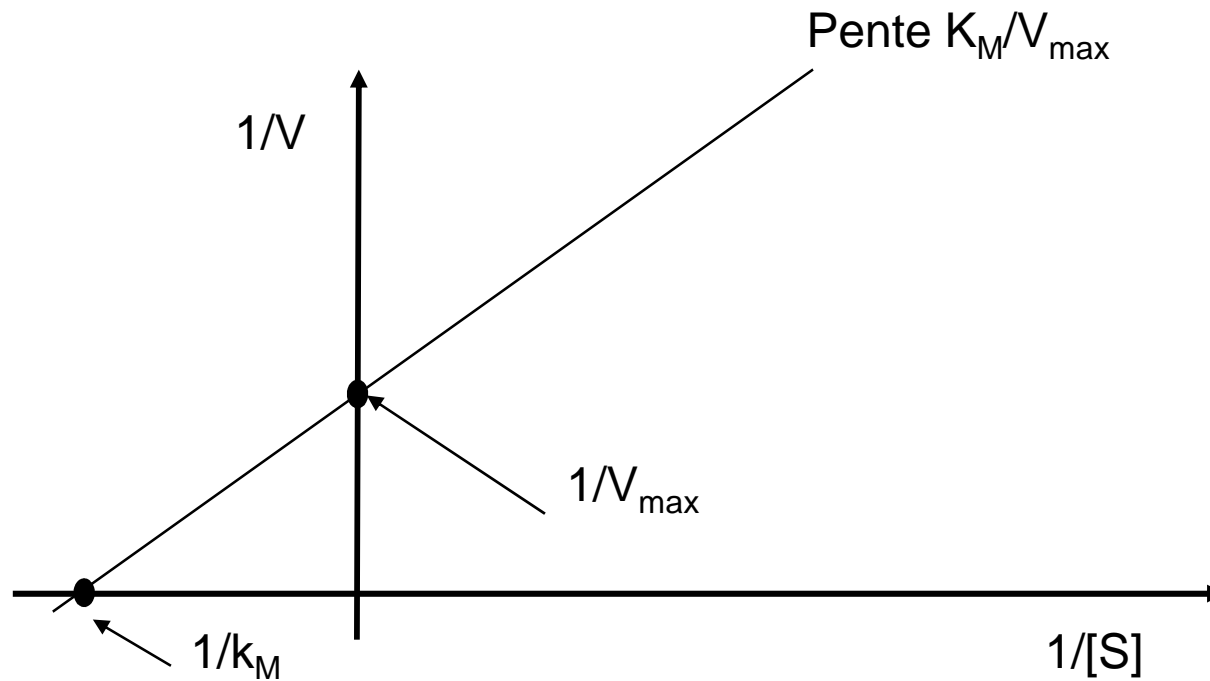
$$\frac{1}{V} = \frac{k_M + [S]_{ini}}{k_{cat} [S]_{ini} [E]} = \frac{k_M}{k_{cat} [E]} \cdot \frac{1}{[S]_{ini}} + \frac{1}{k_{cat} [E]} = \frac{k_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_{ini}} + \frac{1}{V_{max}}$$

$Y = aX + b$	$Y = 1/V$	$a \text{ (pente)} = K_M/V_{max}$
	$X = 1/S$	$b \text{ (ordonnée à l'origine)} = 1/V_{max}$

représentation de Lineweaver-Burk

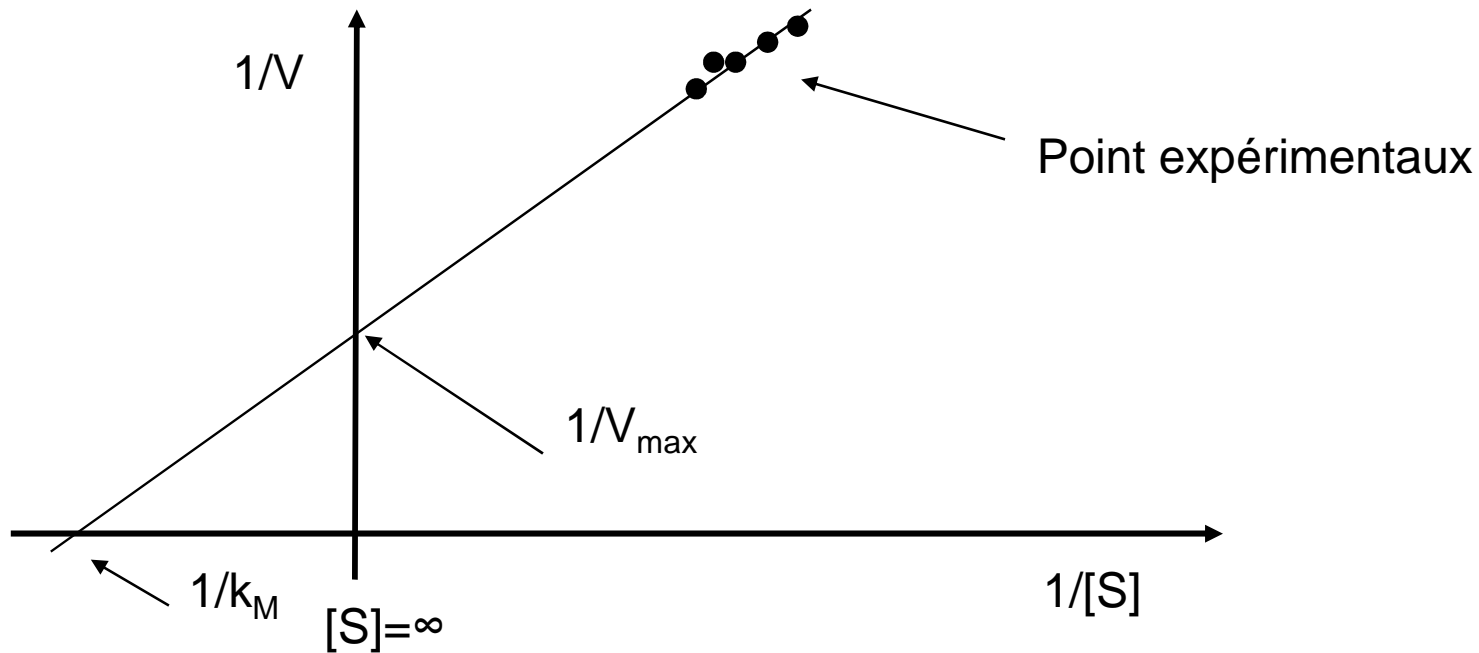
$$\frac{1}{V} = \frac{k_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_{ini}} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$Y = aX + B$$



Dans cette représentation,
la droite coupe l'axe des x en $1/K_M$
La droite coupe l'axe des y en $1/V_{\max}$
La pente de la droite est K_M/V_{\max}

Soucis



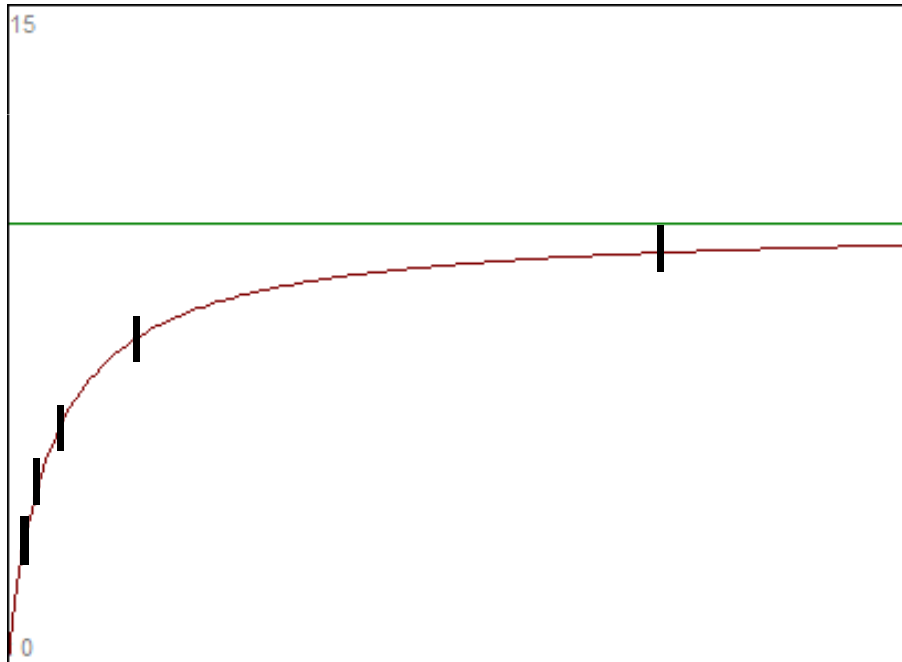
Les point intéressant serait vers l'origine, or il corresponde à des valeurs de substrat très grande.

Ainsi, on a souvent des point expérimentaux éloignés de l'origine, ce qui rend l'interprétation peu précise

Il existe d'autre représentation

Il existe d'autres représentation d'autres changement de variables, pour obtenir une droite.

En générale, on ne fait pas de représentation linéaire. L'ordinateur calcul directement les valeur Kcat et KM par modélisation.

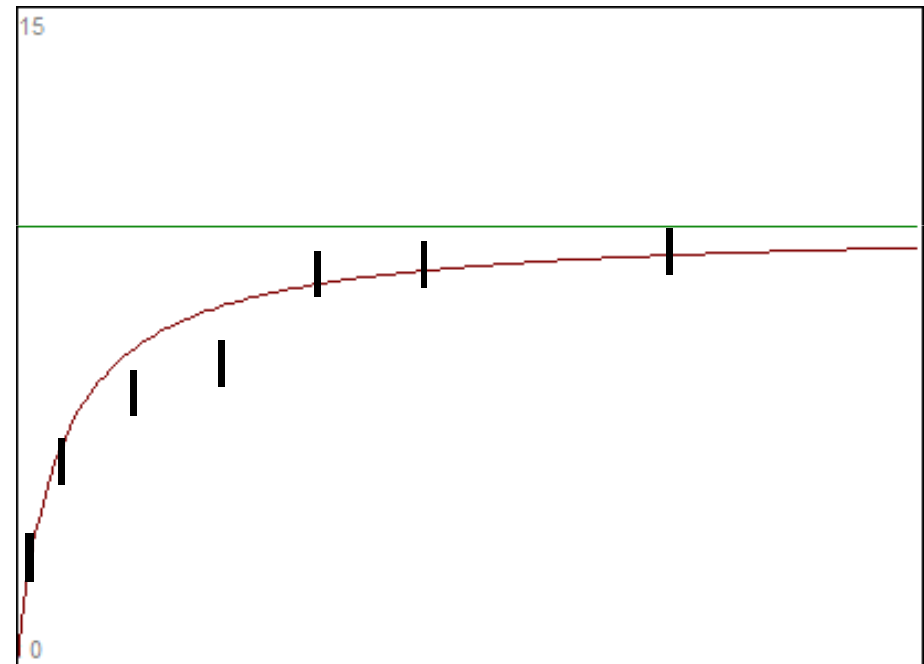
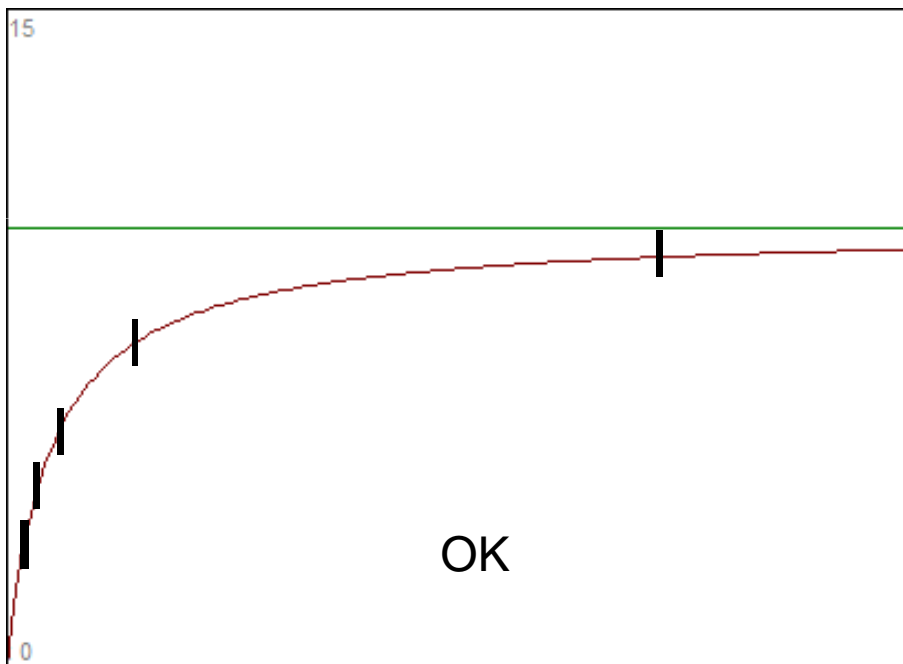


$$V_{\max}=10$$
$$K_M=3$$

$$K_{cat}=V_{\max}/[E]$$

Enzyme non Mikaelienne

Parfois l'enzyme n'est pas Mikaelienne (ex allostérie, voir plus tard).
Le modèle déterminé n'est plus valable. On ne peut déterminer directement les paramètres cinétiques. Il faut vérifier que le modèle "fit" les mesures.
Linéaire en Lineweaver-Burk ou sur la courbe



Le modèle Mikaelien n'explique pas les points expérimentaux. Les erreurs expérimentales non plus.
Il faut proposer un nouveau modèle (voir plus tard)

Pourquoi mesurer K_{cat} et K_M ?

Caractérisation

On peut mesurer ces constantes pour caractériser une enzyme envers un substrats.

Spécificité de l'enzyme

En testant différents substrats on peut déterminer les type de substrat reconnu par l'enzyme (K_M) et on peut voire l'efficacité K_{cat}) de la reaction selon la nature chimique su substrat (ex type de liaison).

Rôle physiologique de l'enzyme

Le rapport K_{cat}/k_M peut nous aider à trouver le ou les substrats naturels de l'enzyme (ère génomique).

Mutation rationnelle et mécanisme enzymatique.

En testant différents mutants on peut déterminer les acide aminés impliqués dans la reconnaissance (il modifie le K_M) et ceux directement impliqué dans la reaction (il modifie K_{cat}).

Biotechnologie

La compréhension du mécanisme et la caractérisation de l'enzyme permet d'avoir un intérêt biotechnologique.

Stabilisation (T° , pH, Sel,..)

Mutants plus actif, ...

Attention sans la structure ces interprétations peuvent être hasardeuses.

Une mutation peut changer la conformation d'une enzyme sans être directement impliqué.

K_{cat} et K_M sont intimement liés. En modifiant un acide aminé spectateur, on peut changer la réactivité de l'enzyme.

(Changement conformationnel, changement des propriétés physicochimiques, flexibilité, ...)

En changeant la réactivité on change K_M (effet important si K_{-1} est comparable à

$$K_{cat}) \quad K_M = \frac{(k_{-1} + k_{cat})}{k_1}$$

D'autre part un acide aminé réactif est aussi lié à la fixation du substrat