

Cinétique Michaelienne

L'étude de la cinétique enzymatique nous permet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biologiques et les mutations des enzymes en étudiant leur vitesse réactionnelle.

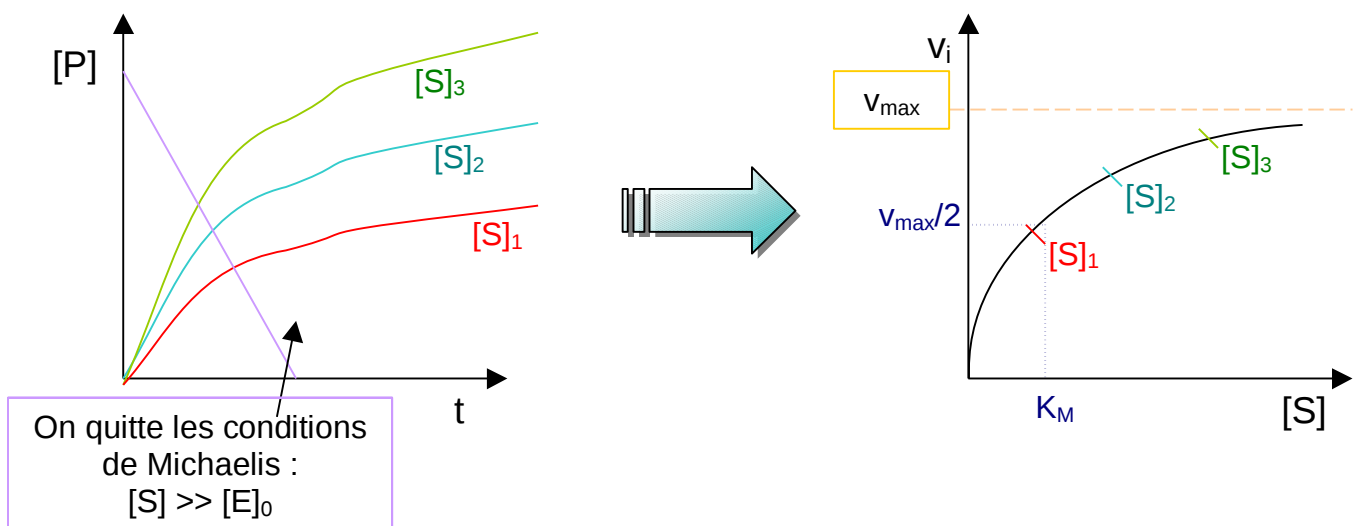
On peut comprendre alors comment les modifications de l'environnement de l'enzyme peuvent affecter son fonctionnement.

I Détermination de l'activité enzymatique

A. Vitesse initiale

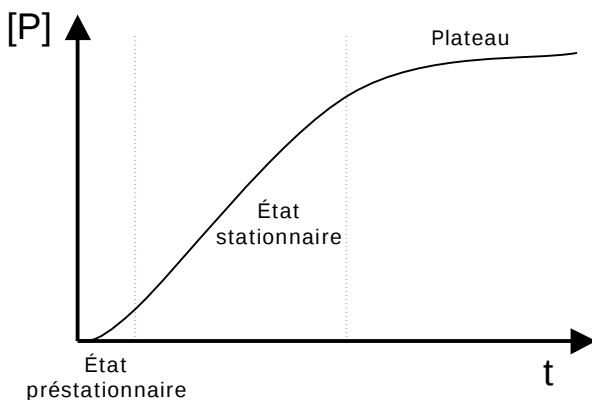
C'est la vitesse au début de la réaction de transformation du substrat en produit par les enzymes, c'est-à-dire lorsque seulement moins de 10% de substrat est consommé ($[S] \approx cte$). Elle est caractéristique de l'enzyme.

B. Concentration en substrat



C. Déroulement de la réaction

Celle-ci s'effectue en 3 étapes :

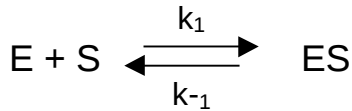


Lors de l'état stationnaire, la concentration en produit évolue linéairement et la pente de la droite donne la vitesse initiale.

II Interprétation de Michaelis

A. Cinétique

1 Équilibre rapide



La cinétique nous donne :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] \quad \text{or} \quad d[ES] = 0 \quad ([ES] = \text{cte})$$

On a donc la **constante de dissociation** : $k_D = [E][S] / [ES] = k_{-1} / k_1$

1 État stationnaire



Dans les conditions de Michaelis ($[S] \gg [E]$), l'approximation de l'état quasi-stationnaire pour le complexe ES nous donne :

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

B. Équation de Michaelis

On obtient la **constante de Michaelis** : $k_M = [E][S] / [ES] = (k_{-1} + k_2) / k_1$

Soit $[E_T] = [E] + [ES]$, alors on a

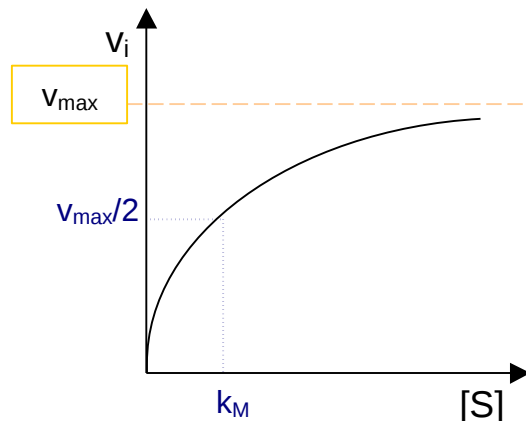
$$v_i = k_2[ES] = \frac{k_2[E_T][S]}{k_M + [S]}$$

Remarque : lorsque la solution est saturée en substrat, $[E_T] = [ES]$ et $v_i = v_{\max}$.

1 Courbe de Michaelis

à Ainsi pour $[S] = k_M$ on a $v_i = v_{\max}/2$

$$v_i = \frac{v_{\max} [S]}{k_M + [S]}$$



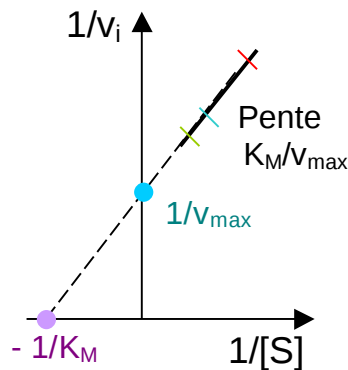
C. Obtention des paramètres

q Ajustement des données à l'équation de Michaelis (par ordinateur)

q Obtention de $v_{\max}$ et k_M

q Linéarisation par une double réciproque : $1/v_i = f(1/[S])$

q On obtient $1/v_{\max}$ et $-1/k_M$



D. Représentation réelle des paramètres

On appelle k_2 le *turn over*, qui représente le nombre de cycles catalytiques par seconde. Plus k_2 est élevée, plus l'enzyme est efficace.

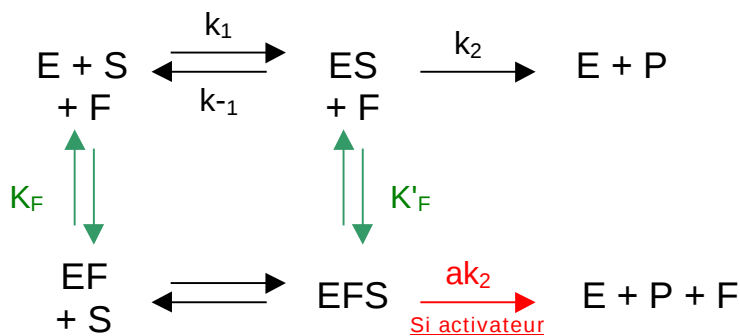
On appelle k_M l'affinité, qui représente la facilité qu'a un substrat de se lier à une enzyme. Plus k_M est petit, plus le substrat se liera facilement à l'enzyme.

On définit alors k_2/k_M (ou $v_{\max}/k_M$), qui permet de déterminer si la réaction sera favorable et efficace entre l'enzyme et le substrat. Plus cette valeur est élevée, plus la réaction est favorable.

III Réactions avec effecteur linéaire

On considère F, un effecteur linéaire. Il peut se lier à l'enzyme sur un site unique, en activant ou en inhibant l'activité enzymatique.

Le mécanisme réactionnel sera de ce type :

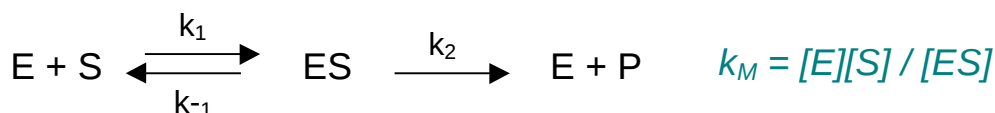


à On considère que la fixation de F sur l'enzyme est très rapide et que lors de la mesure, les fixations ont atteint l'équilibre.

è On utilisera les constantes d'équilibre et non les constantes de vitesse de toutes les réactions impliquant F.

A. Inhibition

1 Cinétique :





1 Compétition :

On distingue alors plusieurs cas :

- q Inhibition compétitive : la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme empêche la fixation du substrat et inversement ($K_I \ll K'_I$)

$$k'_M = k_M \times (1 + [I] / k_I)$$

- q Inhibition non compétitive : la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme n'empêche pas la fixation du substrat, mais empêche sa transformation ($K_I = K'_I$)

$$v'_{\max} = v_{\max} / (1 + [I] / k_I)$$

- q Inhibition incompétitive : l'inhibiteur ne se lie qu'au complexe enzyme/substrat ($K'_I \ll K_I$)

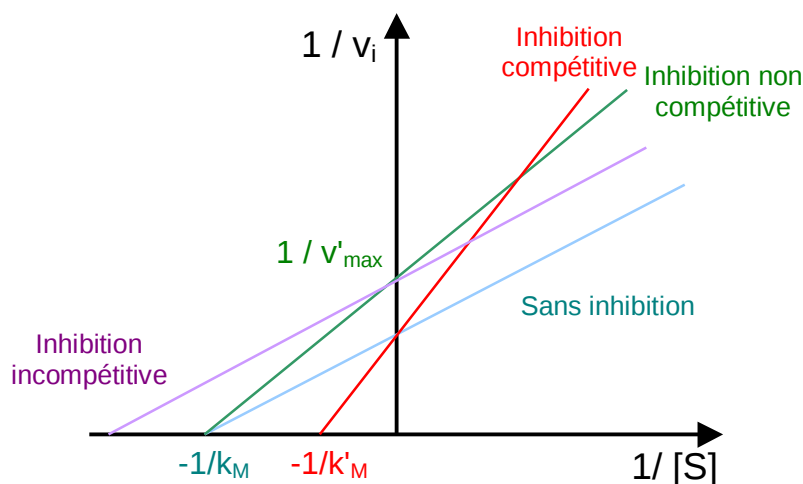
$$k'_M = k_M / (1 + [I] / k'_I)$$

$$v'_{\max} = v_{\max} / (1 + [I] / k'_I)$$

- q Inhibition mixte : ($K'_I @ K_I$)

$$k'_M = k_M \times [(1 + [I] / k_I) / (1 + [I] / k'_I)]$$

$$v'_{\max} = v_{\max} / (1 + [I] / k'_I)$$



1 Nature des inhibiteurs :

Dans le cas des inhibiteurs compétitifs, ceux-ci peuvent :

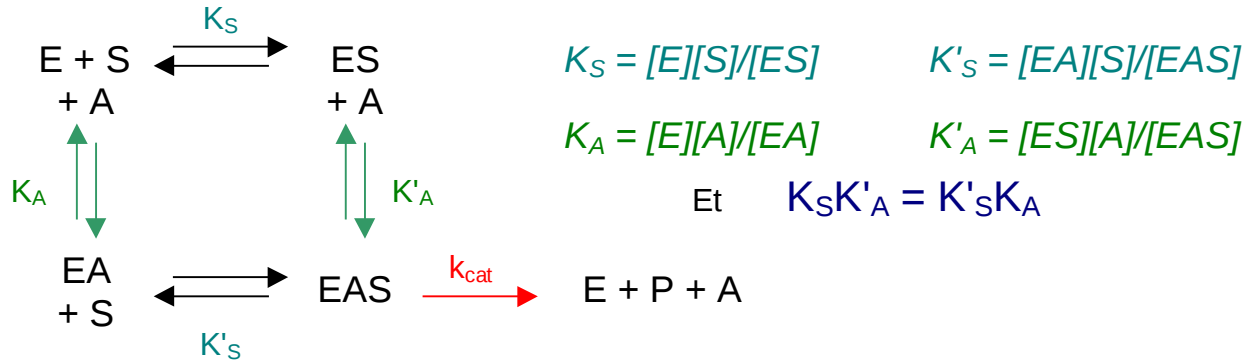
- à Présenter une similarité structurale avec la substrat
- à Établir le même type d'interactions avec l'enzyme
- à Présenter une analogie avec un état de transition

Ex : l'AZT pour traiter le SIDA : c'est un inhibiteur de la transcriptase inverse

- à Il se substitue à la thymine

B. Activateurs

On observe plusieurs cas, selon que l'activateur et le substrat se fixent au hasard ou d'une manière séquentielle à l'enzyme.



q Fixation indépendante : la fixation des deux substrats se fait sur des sites différents, et la fixation de l'un ne modifie pas la fixation de l'autre ($K_A = K'_A$ et $K_S = K'_S$)

$$v'_{max} = v_{max} / (1 + K_A / [A])$$

$$k'_M = K_S$$

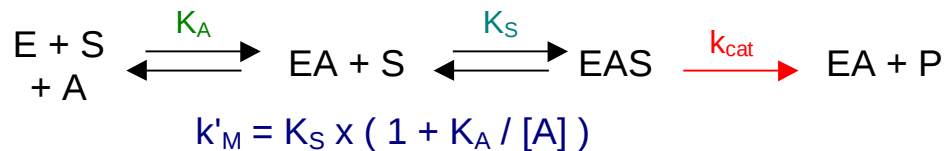
q Fixation dépendante : la fixation d'un des ligands affecte l'affinité de l'enzyme pour l'autre ligand ($K_A \neq K'_A$ et $K_S \neq K'_S$)

$$k'_M = K'_S \times [(1 + K_A / [A]) / (1 + K'_A / [A])]$$

$$v'_{max} = v_{max} / (1 + K'_A / [A])$$

q Fixation séquentielle :

q L'activateur se lie en premier, puis vient le substrat.

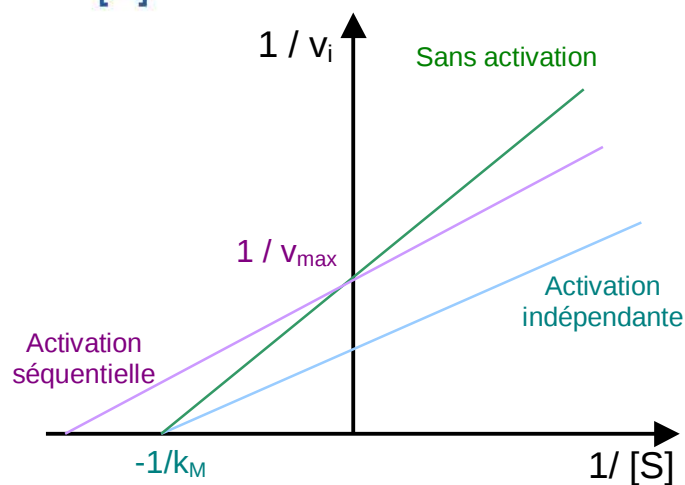


q Le substrat se lie en premier, puis vient l'activateur.



à On obtient :

$$v_i = \frac{v_{max} [S]}{\frac{K_A}{[A]} \times (K_S + [S]) + [S]}$$



IV Enzymes à deux substrats

Ce type d'enzymes est un cas courant. Ce sont souvent des transférases.
Malheureusement, l'équation de leur vitesse de réaction est plus compliquée ...

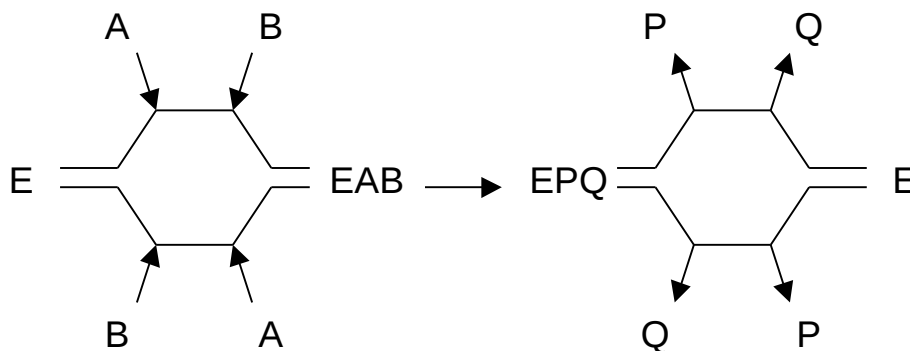
Les systèmes enzymatiques ne sont pas forcément une succession de réactions bien caractérisées, mais des événements plus ou moins simultanés dont la succession n'est pas facile à déterminer. Ainsi, des cas différents peuvent conduire à des comportements cinétiques voisins difficiles à différencier.

A. Systèmes séquentiels

1) Fixation au hasard ou bi-bi aléatoire

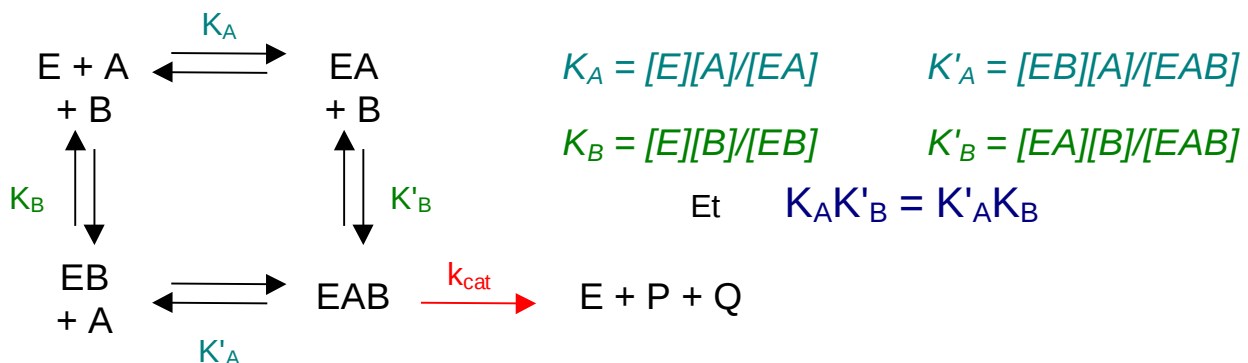
L'enzyme possède deux sites de fixation, un pour chaque substrat et son produit. La réaction ne peut avoir lieu que lorsque les deux substrats sont présents.

1 Schématisation de Cleland :



1 Cinétique :

à Conditions : $[A]$ et $[B] \gg [E_T]$ et $[P]_i + [Q]_i = 0$



On considère que la fixation d'un substrat peut modifier le site de fixation de l'autre substrat ($K_A @ K'_A$ et $K_S @ K'_S$). La vitesse déterminante est k_{cat} ($k_{cat} \ll$ constantes).

$$V_i = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K'_A}{[A]} + \frac{K'_B}{[B]} + \frac{K_A K'_B}{[A][B]}}$$

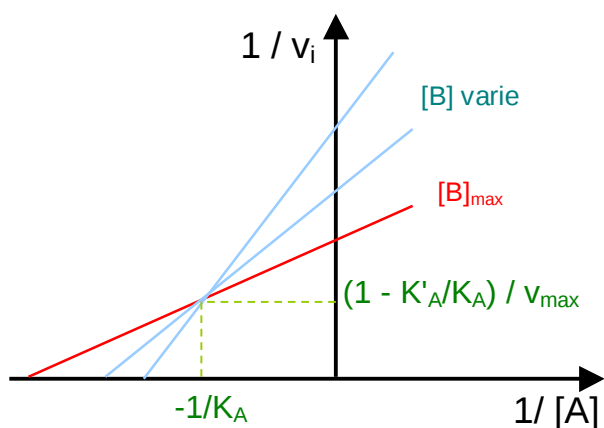
On obtient :

1 Interprétation :

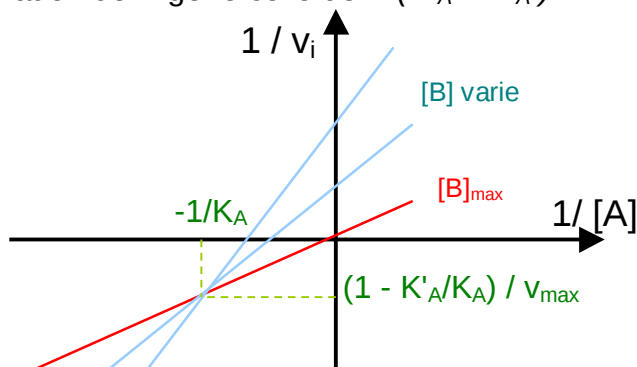
K_A et K_B sont les constantes de dissociation de A et de B. K'_A et K'_B sont les constantes de Michaelis de A et de B : lorsque $[B] \gg [E]$, le substrat A adopte un comportement de Michaelis, et inversement.

1 Linéarisation :

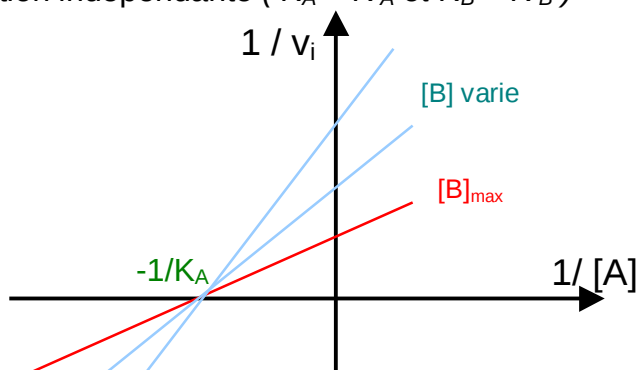
q La fixation de B facilite celle de A ($K_A > K'_A$)



q La fixation de B gêne celle de A ($K_A < K'_A$)



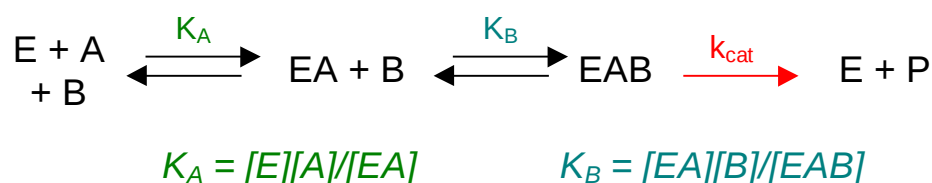
q Fixation indépendante ($K_A = K'_A$ et $K_B = K'_B$)



2) Mécanisme ordonné ou bi-bi ordonné

L'ordre de fixation des substrats est imposé.

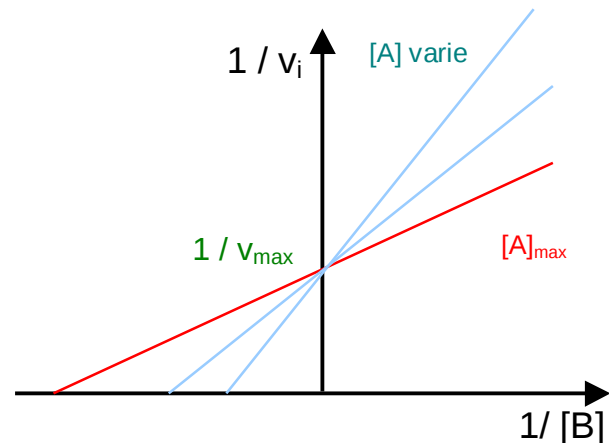
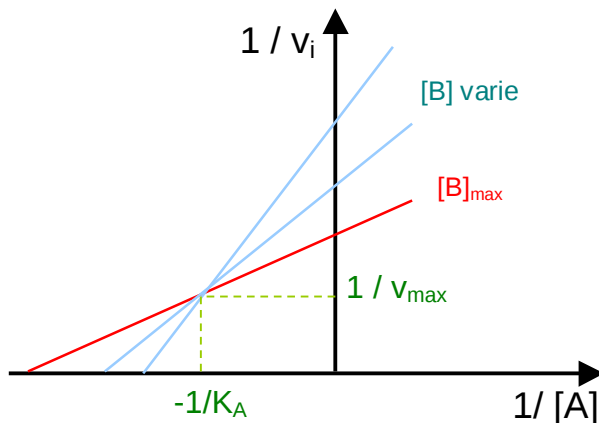
1 Cinétique :



$$v_i = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]}}$$

On obtient :

1 Linéarisation



Remarque : [A] et [B] n'ont pas les mêmes conséquences :

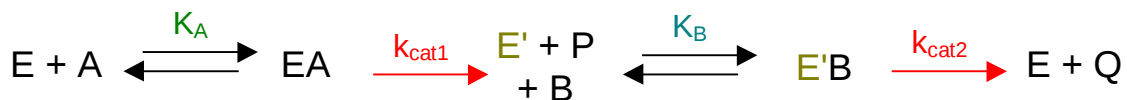
- à A peu concentré et B concentré : $v_i = v_{\max} / 2$
- à A concentré et B peu concentré : $v_i = v_{\max} / 12$

3) Mécanisme non séquentiel : ping pong

Le premier substrat est fixé et transformé, puis le deuxième substrat est ensuite transformé. La première réaction modifie l'enzyme de manière à permettre la seconde réaction avec le deuxième substrat.

C'est souvent le cas avec les kinases qui reçoivent un groupement phosphate d'une première molécule pour le transmettre à une deuxième.

1 Cinétique :



$$K_A = [E][A]/[EA]$$

$$K_B = [E'][B]/[E'B]$$

À l'équilibre, $v_i = k_{cat1} [EA] = k_{cat2} [E'B]$

$$v_i = \frac{\frac{k_{cat1} \times k_{cat2}}{k_{cat1} + k_{cat2}} [E_0]}{\frac{k_{cat2}}{k_{cat1} + k_{cat2}} \times \frac{K_A}{[A]} + 1 + \frac{k_{cat1}}{k_{cat1} + k_{cat2}} \times \frac{K_B}{[B]}}$$

à On obtient :

On peut heureusement simplifier cette équation par les termes qui suivent :

$$\begin{aligned} [E_0] * k_{cat1} k_{cat2} / (k_{cat1} + k_{cat2}) &= v_{\max} \\ K_A * k_{cat2} / (k_{cat1} + k_{cat2}) &= K_M^A \\ K_B * k_{cat1} / (k_{cat1} + k_{cat2}) &= K_M^B \end{aligned}$$

$$V_i = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_M^A}{[A]} + \frac{K_M^B}{[B]}}$$

On a alors l'équation suivante :

1 Linéarisation :

