

La cinétique enzymatique

Plan

- Introduction
- Généralités
- Vitesse initiale d'une réaction
- Etude de la cinétique Michaelis-Menten
- Représentation de Lineweaver et Burk
- Effet des inhibiteurs enzymatiques

Introduction

Presque toutes les réactions chimiques qui ont lieu dans les systèmes biologiques sont catalysées par des enzymes. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques hautement spécifiques, de nature protéiques. Pour quantifier une enzyme dans un milieu biologique, il faudrait connaître son poids et sa masse molaire à l'état pur, or cela n'est possible qu'avec un nombre restreint d'enzymes.

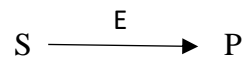
Pour pallier à ce problème pratique, on peut caractériser une enzyme en étudiant la vitesse de la réaction qu'elle catalyse.

I. Généralités

La cinétique est l'étude des vitesses des réactions chimiques. La cinétique enzymatique a pour but de déterminer les vitesses des réactions que l'enzyme catalyse, et à mesurer son affinité pour les substrats. Elle 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.1. Les différentes phases d'une réaction enzymatique

Soit la réaction catalysée par l'enzyme E qui transforme le substrat S en produit P:



- ❖ **La phase pré-stationnaire:** E mis en présence du S, combinaison E-S rapide (milliseconde)
- ❖ **La phase stationnaire:** enzyme saturée par le S, la combinaison E-S à concentration maximal est constante
- ❖ **La phase post stationnaire:** concentration en S diminue significativement au bout d'un temps plus ou moins long.

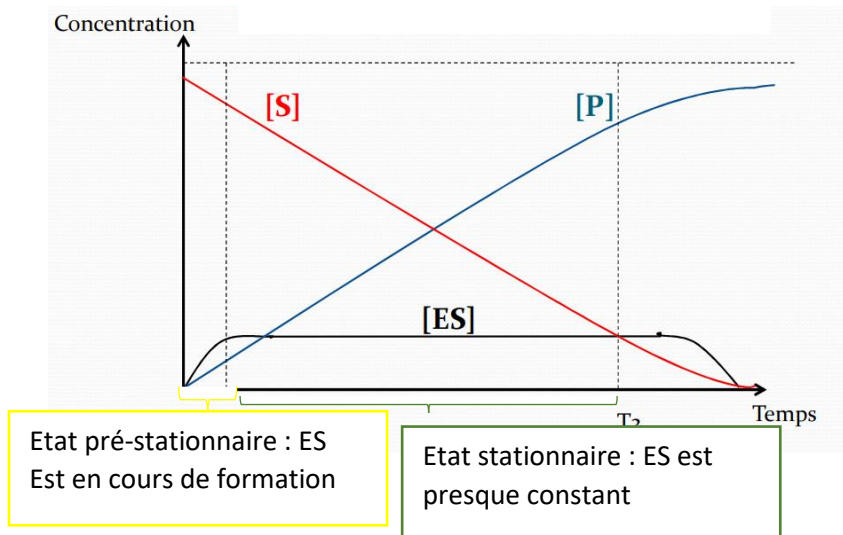


Figure 1 : Les différentes phases de la réaction enzymatique

II. Vitesse initiale de réaction

La vitesse d’une réaction est une mesure de la rapidité avec laquelle la concentration des réactifs et des produits change au cours du temps

S’exprime par:

- La quantité de substrat métabolisé par unité de temps

$$V = - dS / dt$$

-Ou par la quantité de produit formé par unité de temps

$$V = dP / dt$$

Pour des concentrations de [E] et de [S] données, on mesure la quantité de P formé en fonction du temps :

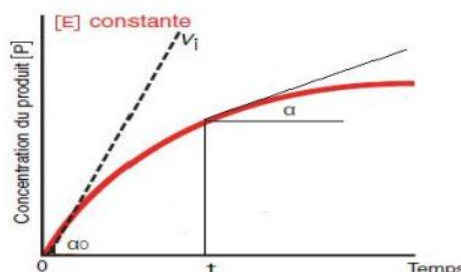


Figure 2 : Variation du produit P en fonction du temps

✚ A l’instant t, $V = Tg \alpha$.

✚ A l’instant t0 , V est maximale, c’est la vitesse initiale V_i de la réaction : $V_i = tg \alpha_0$

II.1. Facteurs influençant la cinétique enzymatique

1. Température

-chaque enzyme possède une température d'activité optimale

-la vitesse maximale (V_m) de la réaction augmente proportionnellement à la température jusqu'à atteindre un plateau maximal (T° optimal d'activité). Au-delà du plateau maximal, la vitesse de la réaction diminue et indique une dénaturation de la protéine enzymatique à des températures élevés

-Chez l'homme l'intervalle de température optimale est généralement entre 25-40°C

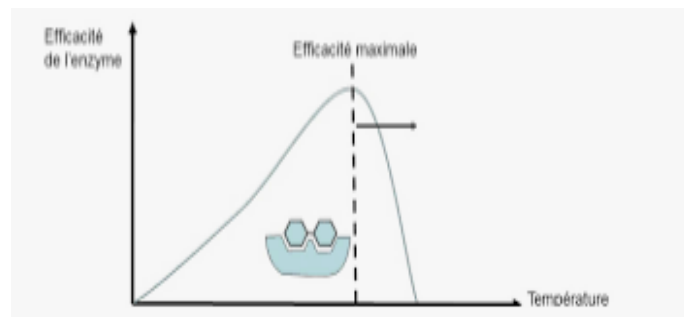


Figure 2 : Effet de la température sur l'activité enzymatique

2. pH du milieu

La cinétique enzymatique obtenue par la variation du pH donne le même aspect que celui obtenu avec la variation de la température sauf que le pH optimal varie en fonction de la structure de l'enzyme (constitué par des acides aminés). Ainsi, chez l'homme les zones de pH optimal peuvent être neutres, acides ou alcaline selon l'enzyme considérée.

Exemple : la lactodéshydrogénase (LDH) a une activité maximale à un pH neutre.

3. Concentration en enzymes

Lorsque la concentration en substrat $[S]$ est constante, la vitesse de la réaction augmente proportionnellement à l'augmentation de la concentration en enzymes

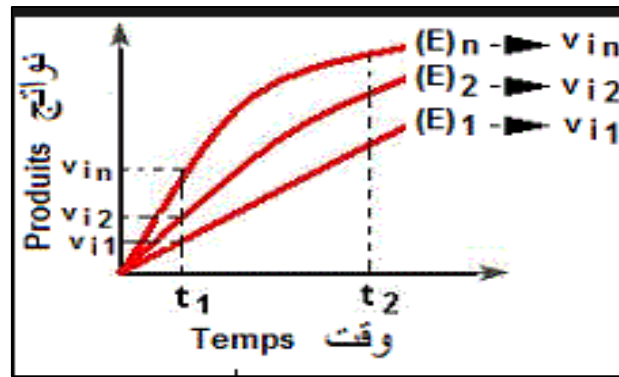


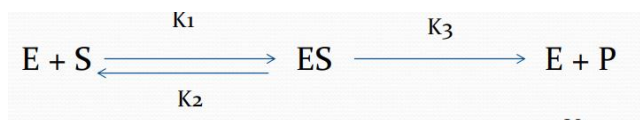
Figure 3 : Effet de la concentration des enzymes sur l'activité

4. Concentration en substrat

La vitesse d'une réaction enzymatique augmente proportionnellement à l'augmentation de la concentration du substrat S jusqu'à atteindre une valeur maximale (V_{max}) correspondant à la saturation des enzymes.

III. Etude de la cinétique Michaelis-Menten

Lors d'une réaction enzymatique, il y a deux étapes importantes. La première est la formation d'un complexe enzyme – substrat, puis, lors de la deuxième étape, il y a formation du produit et la libération de l'enzyme. Selon la réaction :



avec k = constante de vitesse.

- k_1 = constante de vitesse de formation du complexe ES
- k_2 = constante de vitesse de dissociation du complexe ES
- k_3 = constante de vitesse de formation de P

Conditions de l'équation de Michaelis-Menten :

- ✚ Concentration saturante du substrat
- ✚ Tout l'enzyme est sous forme ES

La courbe michaelienne est hyperbolique, les caractéristiques cinétiques sont :

- La vitesse maximale (V_m) est atteinte lorsque tout l'enzyme est saturé (complexe ES)
- La constante de michaelis K_m est égale à la concentration du substrat,
- lorsque $V = \frac{1}{2} V_m$, elle représente l'inverse de l'affinité

$$K_m = K_2 + K_3 / K_1$$

L'équation de Michaelis-Menten :

$$V_i = V_m [S] / K_m + [S]$$

Avec :

- v_i : vitesse initiale (c'est-à-dire en absence de produit) de la réaction enzymatique pour une concentration de substrat $[S]$ (en $\mu\text{mol}/\text{min}$) ;
- v_{max} : vitesse d'origine maximale mesurée pour une concentration **saturante** de substrat (en $\mu\text{mol}/\text{min}$);
- $[S]$: Concentration en substrat (en mol/L);
- K_M : Constante de Michaelis spécifique de l'enzyme. C'est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse d'origine de la réaction est égale à la moitié de la vitesse d'origine maximale $\frac{v_{max}}{2}$ (en mol/L)

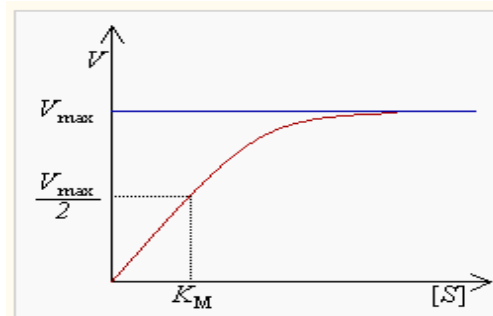


Figure 4 : Représentation de Michaelis-Menten

N.B :

Le K_m traduit l'affinité de l'enzyme pour son substrat. L'affinité représente la facilité qu'à un substrat de se lier à une enzyme. Ainsi, plus le K_m est grand, plus le complexe ES a tendance à se dissocier, et donc moins l'enzyme a d'affinité pour le substrat. Le K_m est donc inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

VI. Représentation de Lineweaver et Burke

-Une hyperbole est difficile à tracer manuellement.

- Des erreurs sur l'estimation de la V_{max} sont possibles.

-Pour simplifier la représentation graphique de l'équation de MICHAELIS MENTEN , on transforme l'hyperbole en droite.

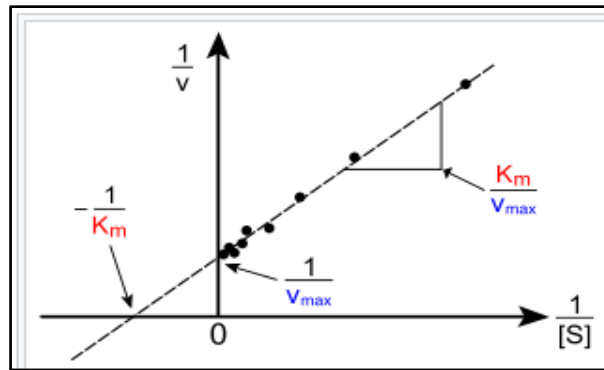


Figure 5 : Représentation de Lineweaver-Burk

Equation en double inverses de Lineweaver-Burk

$$1/V = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Cette équation est une équation de droite de la forme : $Y = aX + b$ ou $1/V = f(1/[S])$ Elle consiste en un tracé de $1/V$ en fonction de $1/[S]$.

- La droite qui en résulte coupe l'axe des ordonnées en $1/V_{max}$ et l'axe des abscisses en $-1/K_m$

Cette représentation présente l'avantage d'être plus facile à lire. En effet, on définit:

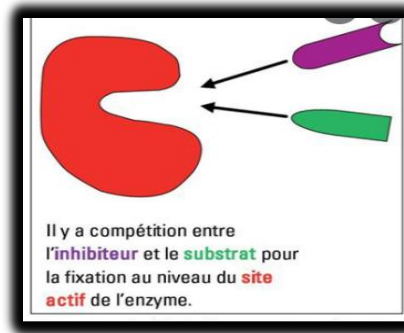
- V_{max} : par le point d'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées
- K_m : par le point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses.

V. Effet des inhibiteurs enzymatiques

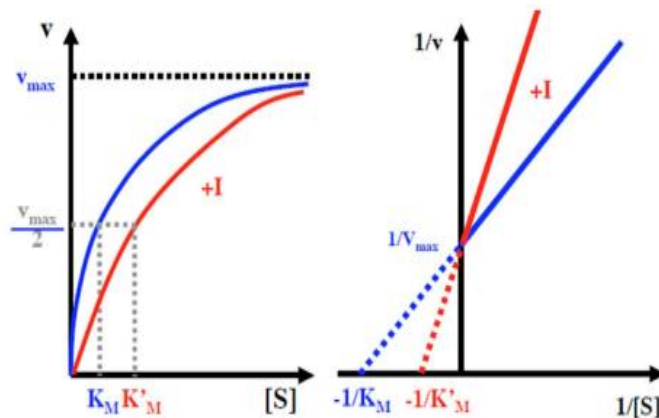
Les inhibiteurs sont des substances qui inactivent les enzymes; Il existe deux principaux types d'inhibition: Inhibition réversible des enzymes: l'activité enzymatique peut être retrouvée en enlevant l'inhibiteur. Inhibition irréversible des enzymes: l'inhibiteur lie l'enzyme de manière covalente, inactivant ce dernier de façon irréversible.

1. Inhibiteurs compétitifs

Un inhibiteur compétitif entre en compétition avec le substrat vis-à-vis du site actif formant le complexe enzyme-inhibiteur [E-I]. Cette inhibition peut être reversée par augmentation de la concentration en substrat [S].



Sur le plan cinétique, la V_m est inchangée, la K_m est augmentée.



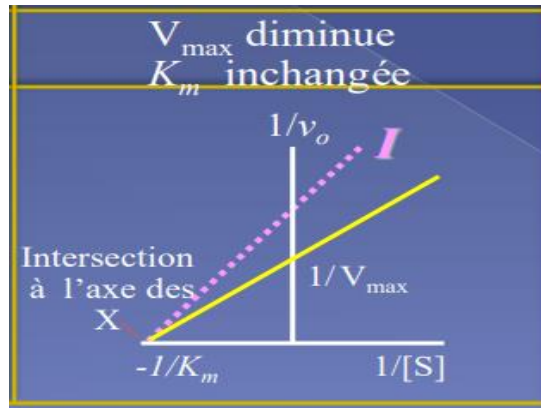
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Inhibiteurs non compétitifs

On parle d'inhibiteur non-compétitif lorsque l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme E et sur le complexe enzyme substrat ES en compétition avec le substrat. L'inhibiteur non-compétitif se fixe sur un site totalement différent du site actif de l'enzyme → pas de compétition entre le substrat et l'inhibiteur. Il se produit une diminution de la vitesse maximale sans aucune modification du K_m car il n'y a pas de compétition entre le substrat et l'inhibiteur pour le site actif.

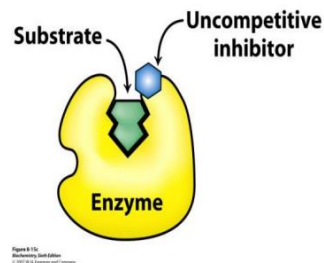


Cet inhibiteur déplace l'équation, K_m n'est pas modifiée. Une partie de ES reste bloquée sous forme ESI, donc V_{max} est diminuée



Inhibiteurs incompétitifs

L'inhibiteur incompétitif ne se fixe jamais à l'enzyme libre mais seulement à ES et empêche la formation des produits. La liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de l'enzyme, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme, et empêche la réaction.



L'inhibiteur est lié par le complexe E•S et forme ESI

Cet inhibiteur déplace l'équation, abaisse K_m . Une partie de ES reste bloquée sous forme ESI, donc V_{max} est diminuée.

