

LA CINETIQUE ENZYMATIQUE :

Etudier la cinétique enzymatique permet de comprendre les caractéristiques de la catalyse, la régulation de l'activité des enzymes (les conditions physiologiques optimales par exemple...), les effets des effecteurs naturels (qui modifient l'activité de l'enzyme) et artificiels comme les médicaments.

L'activité enzymatique se mesure par la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme :



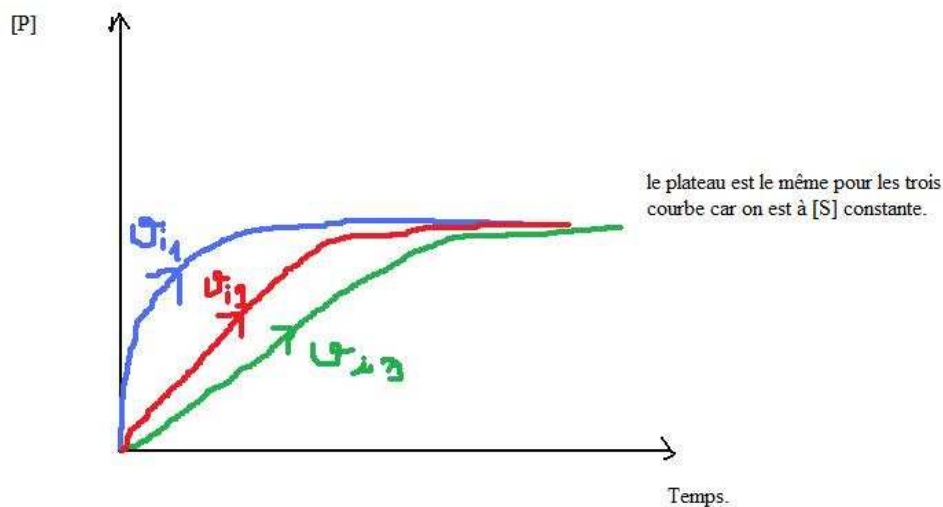
A pH et à température constants, la vitesse sera fonction des concentrations en enzyme et en substrat.

I) Les paramètres de la cinétique ([E] et [S]) :

Avant de commencer cette partie, il faut savoir que les graphes primaires donnent les graphes secondaires.

A) A [S] constante et élevée et à [E] variable :

Graphes primaires :



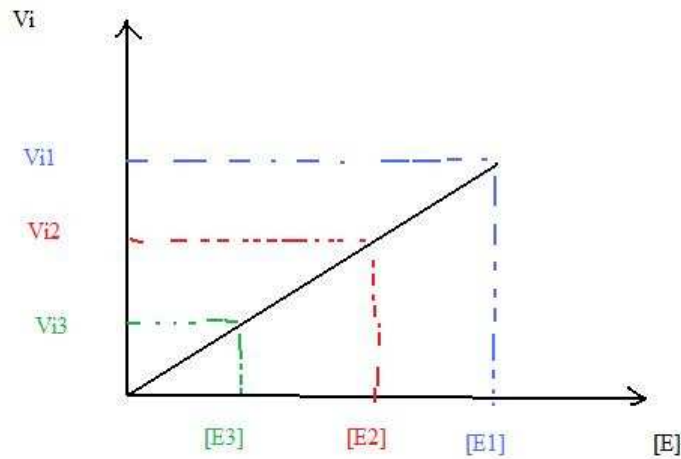
$$[E1] > [E2] > [E3]$$

pouvez rajouter un « s » à courbe sur ce schéma, à propos du plateau)

(vous

On remarque que plus la concentration en enzyme est élevée, plus la vitesse initiale est haute. Cependant, le plateau qui correspond en fait à l'épuisement du substrat sera le même pour les deux courbes car [S] est constant. Enfin, pour les temps courts, les vitesses initiales sont constantes (les courbes sont des droites donc $d[P]/dt$ est constante). Cela signifie en fait que la concentration en espèce active [ES] est constante.

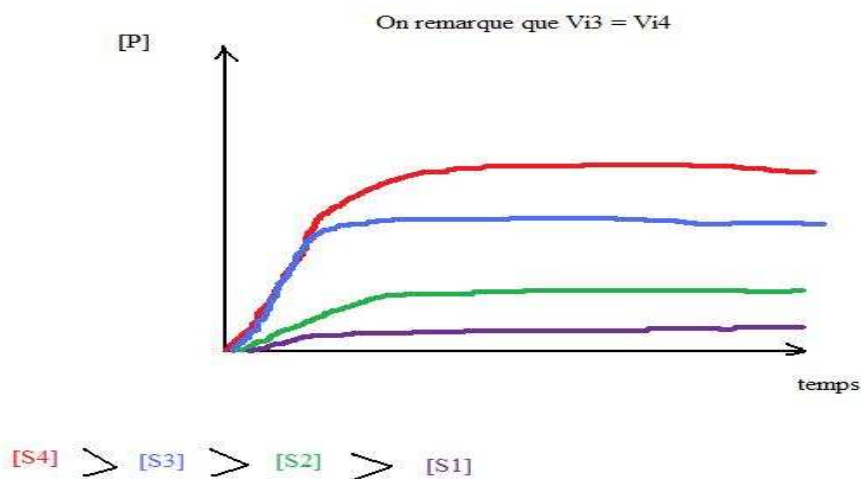
A partir de ce graphe primaire, on peut tracer le graphe secondaire suivant :



On voit alors que la vitesse initiale v_i est proportionnelle à la concentration en enzyme. Cela permet de mesurer une quantité d'enzyme (on parle de dosage enzymatique).

B) A $[E]$ constant et à $[S]$ variable :

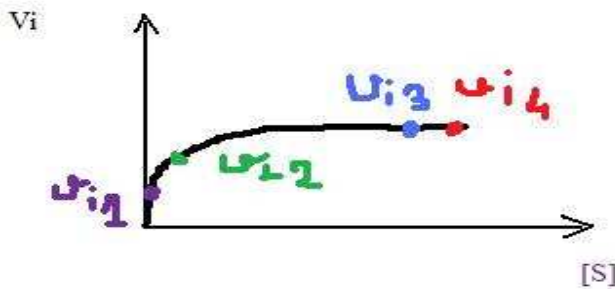
Graphe primaire :



On remarque que plus la concentration en substrat augmente, plus la concentration finale en produit est grande (c'est très con ça comme remarque en fait...).

De plus, plus la concentration initiale en substrat est grande, plus la vitesse initiale sera importante jusqu'à ce qu'elle atteigne une certaine limite (la v_{max}).

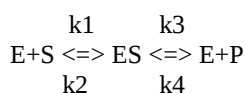
A partir de ce graphe primaire, on peut tracer le graphe secondaire suivant :



On obtient alors une hyperbole pour les enzymes dites michaeliennes qui sont en fait la majorité des enzymes (il en est autrement des enzymes allostériques vues ultérieurement). Cette hyperbole possède une asymptote correspondant à sa vitesse initiale maximale (v_{max}) et on peut définir la constante de Michaelis qui est la concentration en substrat nécessaire pour obtenir $v_i = v_{max}/2$.

C) L'équation de Michaelis :

On a $v_i = f([S])$ qui est une hyperbole, on va donc chercher l'équation de cette hyperbole :



La première réaction est réversible mais dans la seconde, $K_3 \gg K_4$ donc on néglige K_4 devant K_3 .

Après moult mais en vain formules, on obtient : $K_m = (K_2 + K_3) / (K_1)$ et $V_i = (V_{max}) / (1 + K_m / [S])$
Ce qui est bien l'équation d'une hyperbole.

D) Ce que signifient K_m et v_{max} :

On a $K_m = (K_2 + K_3)/K_1$

Le plus souvent, $K_3 \ll K_2$ ce qui signifie que l'étape catalytique (la transformation de S en P) est limitante et que la première réaction est en fait totalement réversible (plein de substrat se fixent aux enzymes, puis se détachent sans avoir été transformés en produit ; la catalyse est donc en fait assez rare).

On obtient alors $K_m = K_2/K_1$ qui est en fait la constante de dissociation de ES en E+S.

K_m est donc en fait un paramètre qui tient compte de l'affinité de E pour S : en effet, plus la K_m est élevée, plus l'affinité est faible (plus on aura du mal à atteindre $v_{max}/2$ puis v_{max}).

Pour v_{max} , on a vu que $v_{max} = K_3[E]$

K_3 étant la constante catalytique responsable de la transformation de ES en E+P, v_{max} est donc le paramètre qui rendra compte de la capacité catalytique de E à [E] constant.

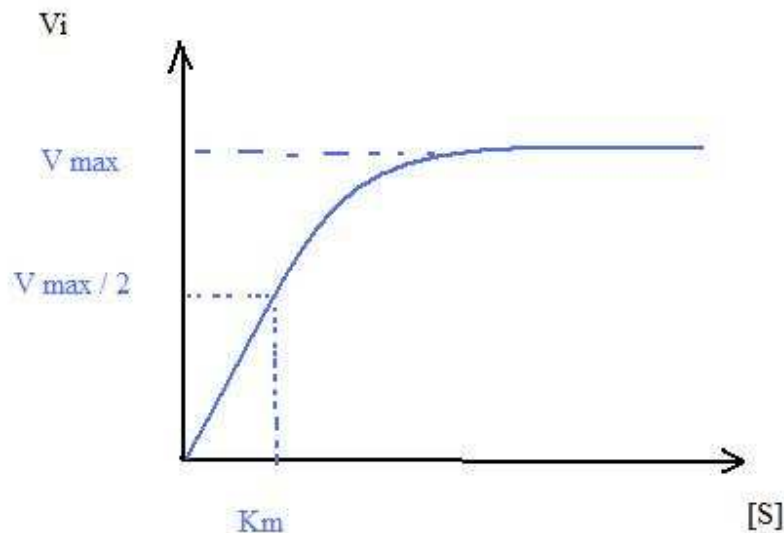
Il faut faire attention : v_{max} n'est pas une constante puisqu'elle dépend de [E], v_{max} est donc proportionnelle à [E].

La K_m qui indique l'affinité de l'enzyme pour le substrat est donc en rapport avec le site de fixation de l'enzyme. C'est une vraie constante indépendante de la concentration d'enzyme. Enfin, elle s'exprime en mmol/L puisque c'est une concentration.

La v_{max} qui indique la capacité catalytique de l'enzyme est donc en rapport avec le site catalytique de l'enzyme n'est pas une vraie constante, elle augmente avec [E]. C'est donc une constante pour [E] donnée. Enfin, elle s'exprime en mmol/mn puisque c'est une vitesse de réaction.

II) Les méthodes graphiques pour déterminer v_{max} et K_m :

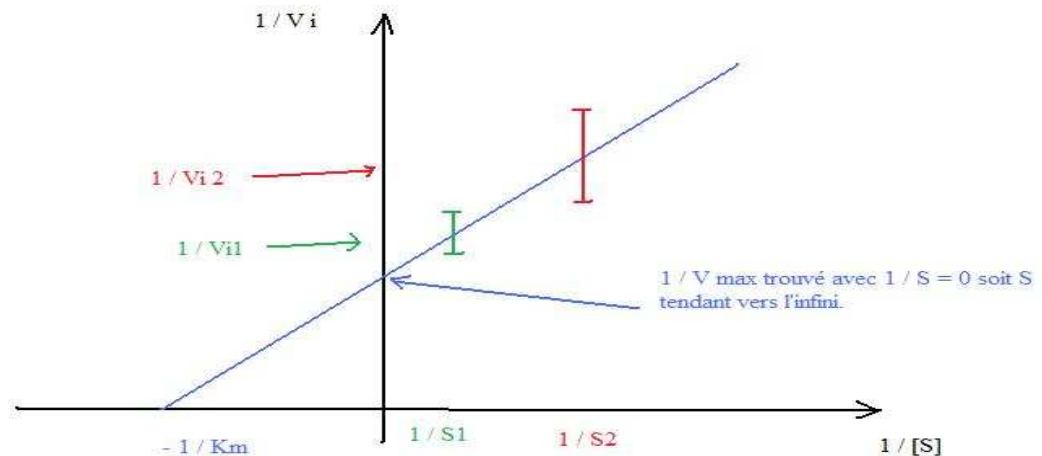
On peut réaliser une représentation en coordonnées directes (ou représentation de Michaelis) :



Malheureusement, cette représentation est inadaptée car la v_{max} est sous-estimée (le plateau ne fait que tendre vers l'asymptote qui a la valeur de v_{max} sans jamais l'atteindre). On a en fait besoin d'une représentation linéaire avec laquelle on pourra faire des extrapolations.

On peut réaliser une représentation en coordonnées inverses, c'est la représentation de Lineweaver et Burk :

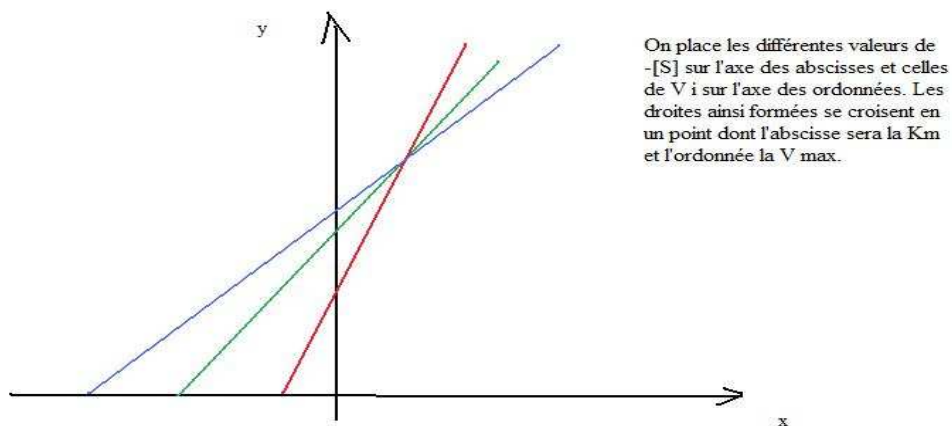
On aura alors $1/v_i = f(1/[S])$. On obtient alors une droite qui nous permet de trouver graphiquement de manière assez précise $-1/K_m$ et $1/v_{max}$.



Malheureusement, pour un $1/[S]$ faible, l'erreur est faible mais pour un $1/[S]$ élevé, la barre d'erreur devient plus grande. De plus, pour que cette méthode soit valable, il faut beaucoup de points expérimentaux.

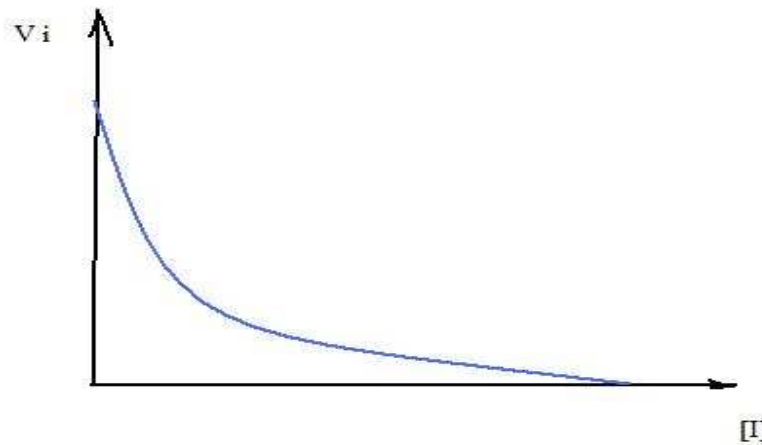
Enfin, on peut effectuer une représentation de Cornish-Bowden :

Il s'agit de tracer trois droites différentes grâce à trois expériences telles que si $x = K_m$, $v_i = v_{max}$ pour trois concentrations en substrat différentes. On obtient alors un faisceau de droites avec un seul point remarquable dont l'abscisse sera la K_m et l'ordonnée la v_{max} . C'est une méthode très adaptée pour un petit nombre de mesures car lorsque l'on obtient une droite aberrante, on la remarque rapidement car elle sera très éloignée du faisceau.



III) Les inhibiteurs d'enzymes :

Les inhibiteurs d'enzymes sont des substances qui inhibent l'activité de l'enzyme (sans blague !). On peut tracer le graphe suivant à $[E]$ et $[S]$ constantes :



Si on obtient une parabole décroissante, c'est que la substance est bien un inhibiteur de l'enzyme. Cependant, il en existe différentes classes et ce genre de courbe n'est pas suffisante pour déterminer à quelle classe appartiendra l'inhibiteur.

A) Les inhibiteurs irréversibles :

Ils se lient de façon covalente à l'enzyme et peuvent être

des poisons comme le DFP (diisopropyl fluorophosphate) qui va se fixer sur la sérine du site catalytique de l'acétyl choline estérase pour l'inhiber, empêchant ainsi la dégradation d'acétyl choline dans la fente synaptique et entraînant ainsi des paralysies pouvant toucher le diaphragme et causant une asphyxie.

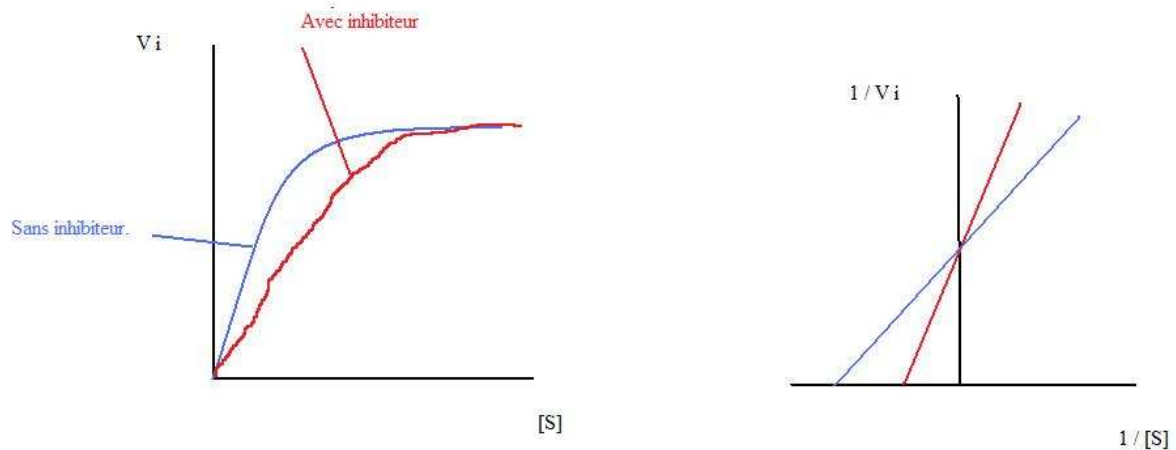
des médicaments comme la pénicilline qui inhibe la glycosyl trans peptidase qui sert à la synthèse des paroi bactériennes. La pénicilline est donc un antibiotique puisqu'elle lutte contre les bactéries.

B) Les inhibiteurs réversibles compétitifs :

Ce sont des inhibiteurs qui présentent une analogie structurale avec le substrat, ils seront donc reconnus par le site de fixation de l'enzyme mais il n'y aura pas de catalyse. Ils augmentent la K_m en laissant la v_{max} inchangée. Ils peuvent également être des médicaments ou des poisons.

On a alors soit $I+E+S \Rightarrow ES$ (espèce active) $\Rightarrow E+P$
 soit $I+E+S \Rightarrow EI$ (espèce inactive)

La compétition entre le substrat et l'inhibiteur sera fonction de leurs concentrations respectives.

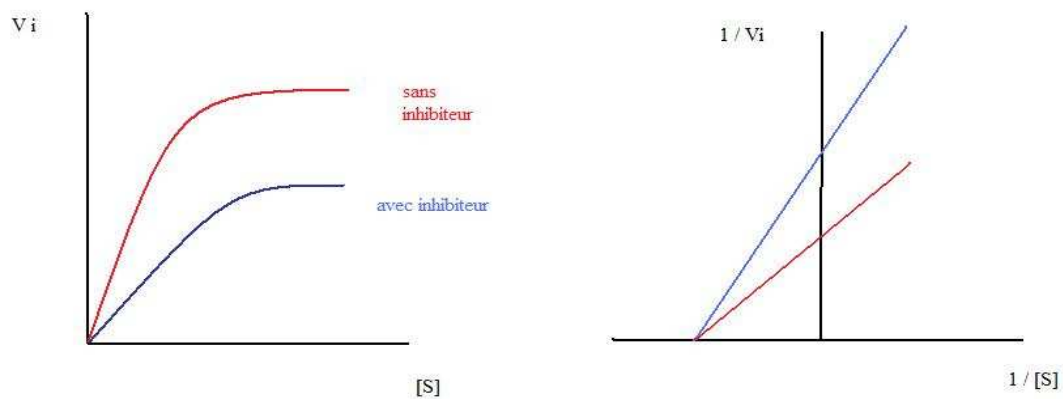


A $[S]$ saturant, on a levée de l'inhibition car $[S] \gg [I]$ mais si on est à $[S]$ faible, alors, l'inhibiteur aura un grand pouvoir. Ces inhibiteurs sont faciles à fabriquer car on part de la structure du substrat que l'on connaît.

C) Les inhibiteurs réversibles non compétitifs :

Ils n'ont aucune analogie de structure avec le substrat et se fixeront ailleurs que sur le site actif, ils ont un site spécifique de fixation. Un exemple d'inhibiteur réversible non compétitif est le plomb qui va inhiber la ferrochelatase qui sert à la synthèse d'hème entraînant une intoxication (intoxication au plomb, c'est le saturnisme). Il diminueront la v_{max} et laisseront la K_m inchangée. Ils peuvent également être des médicaments ou des poisons.

On aura alors $E+I \rightleftharpoons EI+S \rightleftharpoons EIS$ (on parlera de complexe ternaire inactif). En se fixant sur son propre site de fixation, l'inhibiteur n'empêche pas la liaison entre l'enzyme et le substrat mais empêchera la catalyse du substrat.



La K_m sera donc inchangée puisque le substrat se fixe normalement, l'affinité est toujours la même.

Il faut savoir qu'un inhibiteur non compétitif a une action indépendante de $[S]$ (quelque soit $[S]$, l'inhibition sera exprimée). Il peut donc s'adapter à toutes les situations, que $[S]$ soit forte ou pas. Cependant, ces inhibiteurs sont plus difficiles à fabriquer que les compétitifs car on ne sait pas quelle structure il faut leur donner.

C) Des inhibiteurs à effets mixtes :

Ils ne présentent pas d'analogie structurale avec le substrat et se fixent sur un site spécifique, tout comme les inhibiteurs non compétitifs, mais leur action sera de diminuer la v_{max} ET d'augmenter la K_m .

D) L'inhibition par excès de substrat :

Enfin, pour clore ce long chapitre, il faut noter que certaines protéines seront inhibées si la concentration en substrat est trop forte car il y aura une mauvaise liaison entre l'enzyme et le substrat ; on obtiendra alors le graphe suivant :

