

CINETIQUE ENZYMATIQUE

Le modèle de Michaélis Menten

Notion de modèle

Un modèle est une « construction de l'esprit » imaginée par le scientifique pour expliquer les propriétés expérimentales observées.

(exemple : structure des enzymes)

Un modèle doit être le plus simple possible. Il doit comprendre le nombre minimum d'hypothèses nécessaires pour retrouver l'ensemble des propriétés expérimentales connues.

NB : La découverte de nouvelles propriétés amène à modifier le modèle (et parfois à l'abandonner)

Modèle cinétique

Un modèle cinétique est une séquence de réactions que l'on suppose se produire au niveau de l'enzyme au cours de la réaction



Pour valider un modèle cinétique, on établit

la loi de vitesse

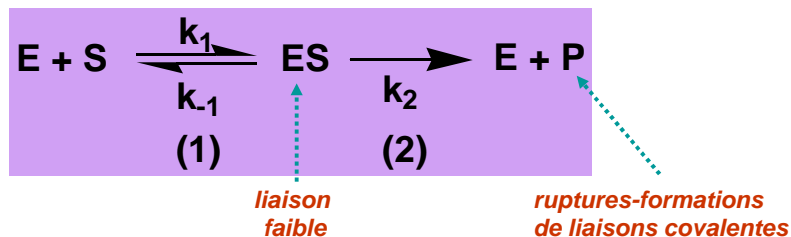
résultant du modèle et on la compare à la loi expérimentale.

Le modèle de Michaélis-Menten

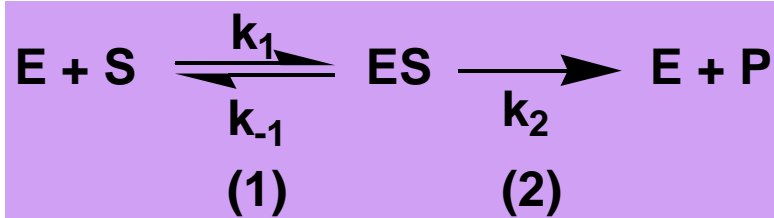


Michaélis et Menten ont proposé un modèle s'appuyant sur les hypothèses suivantes :

- La première étape de la transformation de S en P est la fixation de S par liaison faible sur E, la réaction étant réversible.
- La deuxième étape est la transformation de ES en EP, P étant immédiatement libéré. Cette étape correspond à des ruptures-formations de liaisons covalentes



Le Modèle Cinétique de Michaëlis (suite)



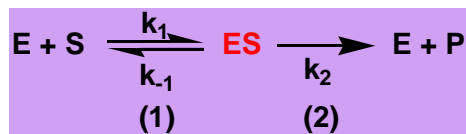
La vitesse de formation d'un complexe par liaison faible est beaucoup plus grande que celle d'une réaction impliquant des liaisons covalentes :

$$\text{donc } k_1 \gg k_2$$

NB : k_{-1} est souvent très supérieure à k_2 mais peut être du même ordre de grandeur si le nombre de liaisons faibles de ES est très grand.

État stationnaire et état de quasi-équilibre

État stationnaire : L'étape 1 étant très rapide, ES est instantanément à une concentration constante :



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

Il y a donc un pseudo équilibre entre E et ES

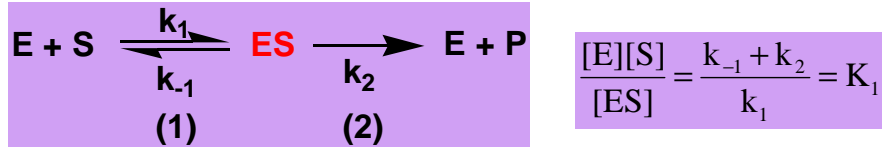
$$\frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_1$$

NB : Par convention les constantes d'équilibre seront toujours écrites dans le sens de la dissociation.

État de quasi-équilibre :

En général $k_{-1} \gg k_2$.

k_2 est négligeable,



La constante K_1 est alors égale à la constante d'équilibre de la réaction (1) et reliée à son $\Delta G'^{\circ}$

$$\frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_1$$

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K_1$$

Généralisation

Lorsqu'une enzyme travaille en quasi-équilibre, toutes les réactions de fixation de ligands par liaison faible sont instantanément en équilibre.

Établissement de la loi de vitesse

La loi de vitesse expérimentale donne l'activité/ml (a) en fonction des concentrations totales en enzyme ($[\text{E}]_T$) et substrat ($[\text{S}]_T$)

C'est donc en fonction de ces deux paramètres qu'il faut établir la loi correspondant au modèle.

$$[\text{S}]_T = [\text{S}] + [\text{ES}]$$

$$[\text{E}]_T = [\text{E}] + [\text{ES}]$$

Comme $[\text{E}]_T \ll [\text{S}]$ $[\text{S}]_T = [\text{S}]$

Il faut résoudre le système d'équations suivant :

$$a = k_2[\text{ES}]$$

$$[\text{E}]_T = [\text{E}] + [\text{ES}]$$

$$\frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} = K_1$$

$$[\text{E}]_T = [\text{ES}]\left(1 + \frac{K_1}{[\text{S}]}\right)$$

$$a = \frac{k_2[\text{E}]_T}{1 + \frac{K_1}{[\text{S}]}} = \frac{k_2[\text{E}]_T[\text{S}]}{K_1 + [\text{S}]}$$

Validation du modèle

Loi expérimentale

$$a = \frac{k_{\text{cat}}[E]_T[S]}{K_M + [S]}$$

Loi « théorique » résultant du modèle

$$a = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_1 + [S]}$$

Les lois expérimentale et « théorique » sont identiques à condition de poser :

$$K_1 = K_M \quad \text{et} \quad k_{\text{cat}} = k_2$$

Dans le modèle de Michaélis, K_M est donc la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. Ce n'est qu'une propriété du modèle et non la définition de K_M .

NB : vous remarquerez que la loi expérimentale comprend au numérateur un terme d'ordre 1 (en S) et au dénominateur un terme constant et un terme en S de coefficient 1. C'est sous cette forme qu'il faut toujours essayer d'exprimer la loi de vitesse résultant d'un modèle pour pouvoir valider le modèle.

Influence de la concentration de S

NB : ne pas oublier que de toute façon $[S] \gg [E]_T$

$$a = \frac{k_{\text{cat}}[E]_T[S]}{K_M + [S]}$$

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

- Si $[S] \gg K_M$: $[ES] \gg [E]_T$

Toute l'enzyme est accumulée sous forme de complexe **ES**.

[E] est négligeable

$[E]_T = [ES]$ On dit que l'enzyme travaille à saturation

[S] est aussi négligeable. Il en résulte que **$a = k_{\text{cat}}[E]_T$**

(La Vitesse est maximum)

- Si $[S] \ll K_M$: **$[E] = [E]_T$**

Toute l'enzyme est accumulée sous forme libre **E** et **[ES]** est

négligeable mais pas **[S]**. On dit que l'enzyme travaille hors saturation

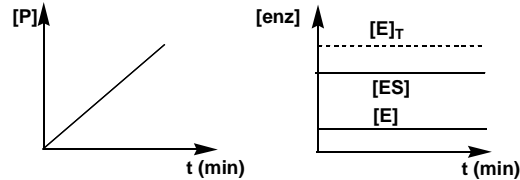
$$a = \frac{k_{\text{cat}}[E]_T[S]}{K_M + [S]}$$

La vitesse est proportionnelle à **[S]**.

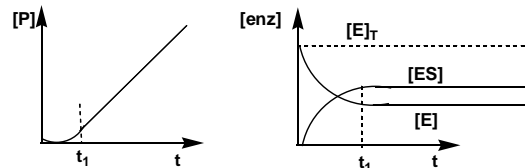
NB : Si $[S]$ est voisine de K_M , $[E]$ et $[ES]$ sont du même ordre de grandeur

État préstationnaire

Selon les hypothèses faites ci avant, les variations des concentrations de **P**, **E** et **ES** sont les suivantes :



En fait, à $t=0$, la concentration de **E** est égale à $[E]_T$. Celle de **ES** est nulle. Donc l'activité est nulle.



Avant $t = t_1$, l'état est dit préstationnaire.

t_1 doit être très faible puisqu'on ne le détecte pas dans les mesures usuelles de l'activité.

Des techniques dites de « cinétique rapide » ont permis de l'évaluer : t_1 est compris entre la nanoseconde et la milliseconde : $t_1 < 1 \text{ ms}$

Mécanisme à plusieurs étapes

Le modèle de Michaélis Menten comprend 2 étapes, l'une de fixation des substrats, une de modification covalente.

Il est suffisant pour retrouver les lois de vitesse obtenues expérimentalement

Cependant, les chercheurs ont rapidement supposé, puis vérifié expérimentalement, que les modifications covalentes se font en plusieurs étapes

En effet, les chimistes organiciens, avaient prouvé que la grande majorité des réactions organiques intervenant sans catalyseur ou avec des catalyseurs plus simples que les enzymes se font en plusieurs étapes. Il paraissait donc invraisemblable qu'il n'en soit pas de même avec un catalyseur enzymatique.

NB : Un mécanisme comprend donc de 1 à n étapes de modification covalente (+ 1 étape de fixation du substrat par liaison faible). Par simplification, on parle d'un mécanisme à n étapes.

Par exemple, le modèle simple de Michaélis est dit à 1 étape.

Mécanisme à plusieurs étapes (suite)

VERIFICATION EXPERIMENTALE : exemple de l'aspartate transaminase

l'aspartate transaminase catalyse la transformation du couple aspartate, α cétooglutarate (α KG) en oxaloacétate (OAA) et glutamate.

En utilisant le glutamate comme substrat, on observe lorsque l'enzyme travaille un pic de fluorescence.

Ce pic ne peut être détecté ni pour l'enzyme libre ni pour les substrats et produits. Il disparaît lorsque la réaction est terminée.

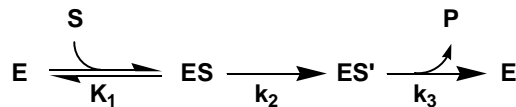
Il y a donc au cours de la réaction, un intermédiaire formé, présentant cette fluorescence, qui disparaît quand celle-ci est finie.

Le mécanisme de réaction comprend au moins deux étapes.

NB : Ce pic de fluorescence n'est pas observé avec l'aspartate.

Cela ne signifie pas qu'un intermédiaire voisin du précédent n'intervient pas. Simplement, celui-ci est présent à trop faible concentration pour être détecté.

Mécanisme à 2 étapes : Validation du modèle



Principe de l'état stationnaire appliqué à ES' :

$$d[ES']/dt = k_2[ES] - k_3[ES'] = 0 \quad [ES'] / [ES] = k_2 / k_3 = K_e$$

Établissement de la loi cinétique

$$a = \frac{d[P]}{dt} = k_3[ES']$$

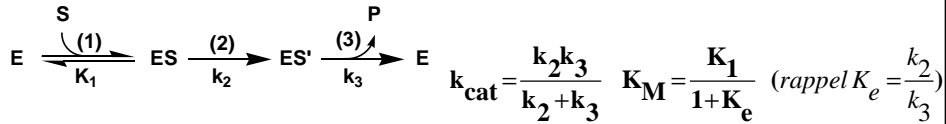
$$[E]_T = [E] + [ES] + [ES']$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_1 \quad \frac{[ES']}{[ES]} = K_e$$

$$a = \frac{k_3[E]_T}{\frac{K_1}{K_e[S]} + \frac{1}{K_e} + 1} = \frac{k_3[E]_T[S]}{\frac{K_1}{K_e} + (\frac{1}{K_e} + 1)[S]} = \frac{\frac{k_3}{1 + \frac{1}{K_e}}[E]_T[S]}{\frac{K_1}{1 + K_e} + [S]}$$

Donc $a = \frac{k_{cat}[E]_T}{K_M + [S]}$ avec $k_{cat} = \frac{k_3}{\frac{1}{K_e} + 1} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$ $K_M = \frac{K_1}{1 + K_e}$

Simplification du modèle

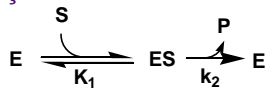


Les constantes k ont une très grande amplitude de variation (en général de 10^3 à 10^{12} min^{-1}). Il en résulte qu'en général la constante de l'une des étapes de modification covalente est très inférieure aux autres. L'étape correspondante est dite « **étape lente** »

Si (2) est l'étape lente : $k_2 < k_3$ $K_e < 1$

$$k_{cat} = k_2 \quad K_M = K_1$$

Le modèle peut être simplifié de la façon suivante :



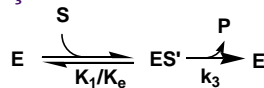
[ES'] << [ES] négligeable

L'enzyme s'accumule, selon les concentrations de substrat sous les formes E et ES

Si (3) est l'étape lente : $k_2 > k_3$ $K_e > 1$

$$k_{cat} = k_3 \quad K_M = \frac{K_1}{K_e}$$

Le modèle peut être simplifié de la façon suivante :



[ES'] >> [ES] négligeable

L'enzyme s'accumule, selon les concentrations de substrat sous les formes E et ES'

Simplification du modèle Conclusion et généralisation

Un modèle cinétique michaélien à plusieurs étapes peut se simplifier en un modèle à une étape de modification covalente.

Le complexe enzyme-substrat s'accumule sous la forme qui précède l'étape lente (les autres formes du complexe sont présentes à concentration négligeable)

Le k_{cat} de la réaction est égal au k de l'étape lente.

Donc :

- A saturation l'enzyme est sous forme de ce complexe
- Hors saturation, l'enzyme est sous forme libre E

Intermédiaire covalent

A la première étape, le substrat est lié par liaison faible sur l'enzyme
(E...S)

Aux étapes suivantes le substrat peut être lié par liaison faible ou covalente

Exemple : hydrolyse d'un ester par la trypsine ou la chymotrypsine :



A une première étape le groupe RCO est transféré depuis RCOOR' sur une Sérine du site actif. Le complexe RCOOE est hydrolysé à la deuxième étape



NB : Dans cet exemple, comme dans de nombreux autres cas, il ne s'agit que d'une partie du substrat.

La majorité des enzymes ont un mécanisme à intermédiaire covalent. Cependant, une minorité non négligeable ont un mécanisme où le substrat est fixé par liaison faible à toutes les étapes.