

Partie spécifique SV

Cinétique enzymatique

Propriétés des solutions- potentiel chimique

(Thermodynamique en biologie)

Thèmes spécifiques: SV-1

CINETIQUE

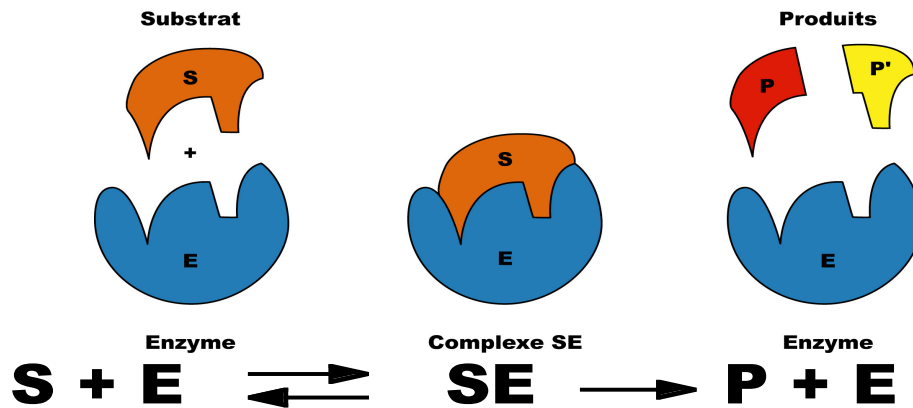
1. Introduction
2. Cinétique de réactions combinées
 - Equilibre
 - Réactions séquentielles
3. catalyse enzymatique: Michaelis-Menten
4. exemple: Anhydrase carbonique

Ce qu'il faut savoir (cinétique-SV)

1. Cinétique des réactions d'équilibre d'ordre 1 de type $A \rightleftharpoons B$
2. Rapport entre l'énergie d'activation d'une réaction et de sa réaction inverse
3. Limites de validité de l'équation de Michaelis-Menten
4. Application de la loi de Michaelis Menten
5. Effet d'un inhibiteur (réversible) compétitif

Catalyse enzymatique

Enzyme = catalyseur biologique = grandes protéines avec structure 3D



qui leur donne une cavité dans laquelle la réaction se déroule. La cavité est souvent spécifique à une molécule d'un réactif donné (substrat).

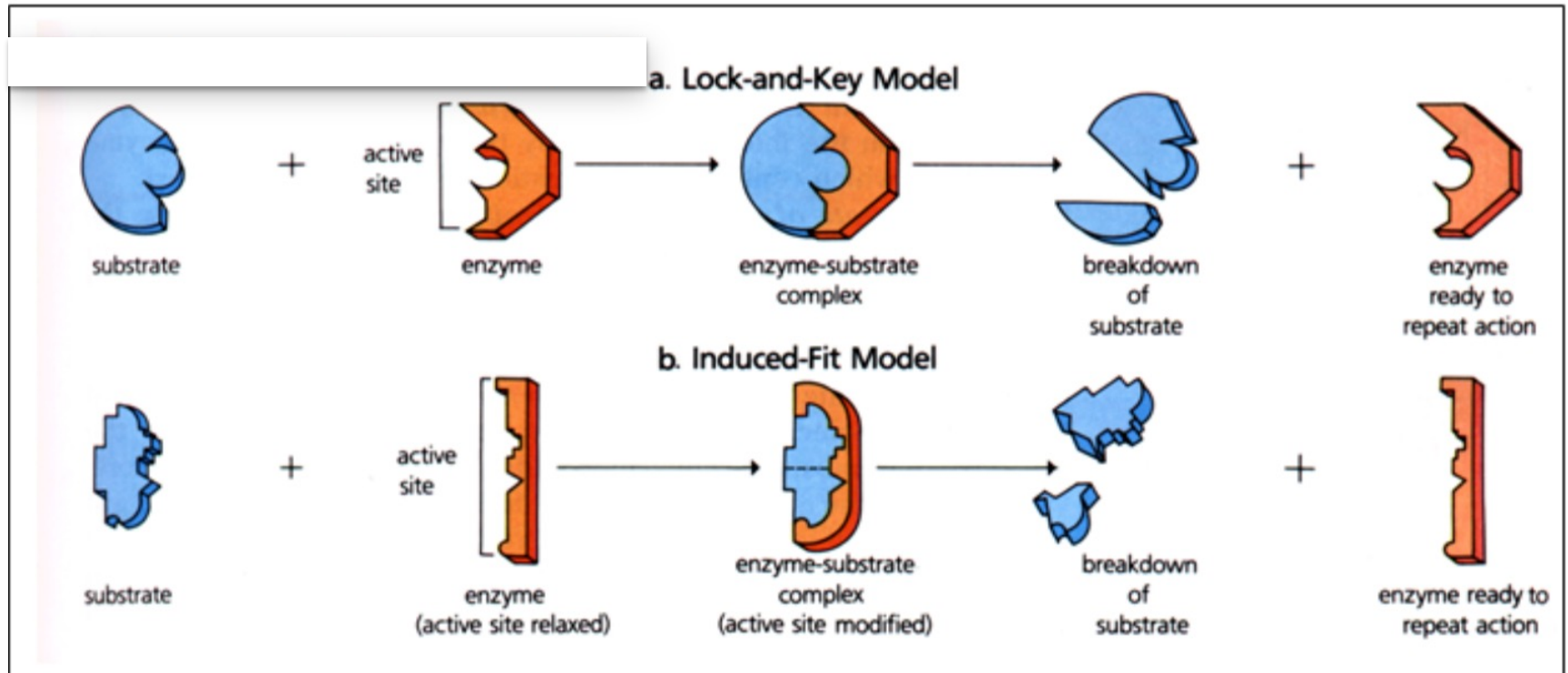
Reconnaissance spécifique du substrat
Modulable biologiquement

Interaction enzyme-substrat



Changement de configuration de la molécule qui abaisse l' E_a de la réaction et l'accélère d'un facteur allant de 10^7 à 10^{17} .

$2\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq}) \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}(\text{l}) + \text{O}_2(\text{g})$	Vitesse réaction Mol L ⁻¹ s ⁻¹	Énergie d'activation (kJ/mol)
Non catalysée	10^{-8}	71
Catalyseur inorganique	10^{-4}	50
catalase	10^7	8

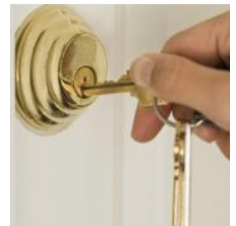


Spécificité de la catalyse: complexe enzyme-substrat

Modèle clé serrure (Emil Fisher (1852- 1919) Prix Nobel 1902

Modèle de l'ajustement induit (Daniel Koshland, 1958)

- la liaison entre l'enzyme et le substrat est relativement faible
- Suite à la liaison, l'enzyme et le substrat changent leur conformation



Mécanisme d'adaptation induite

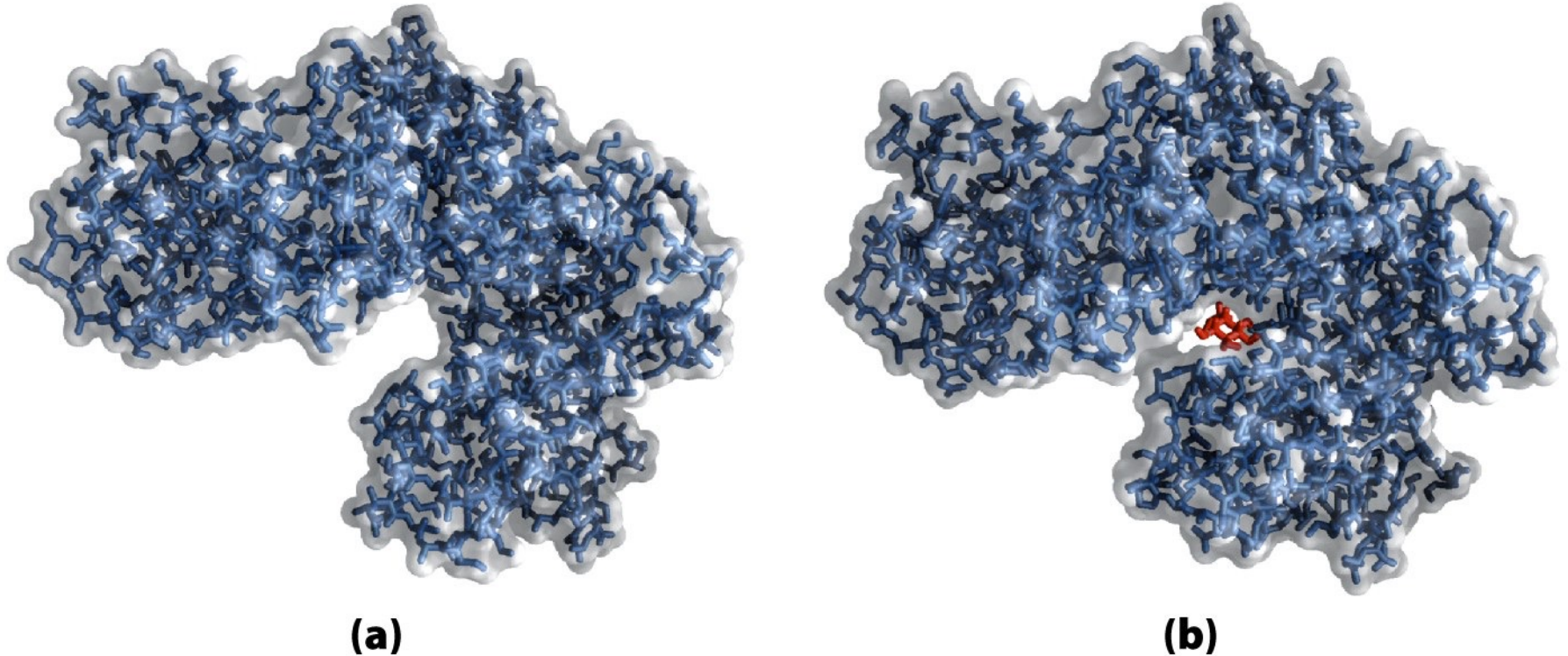
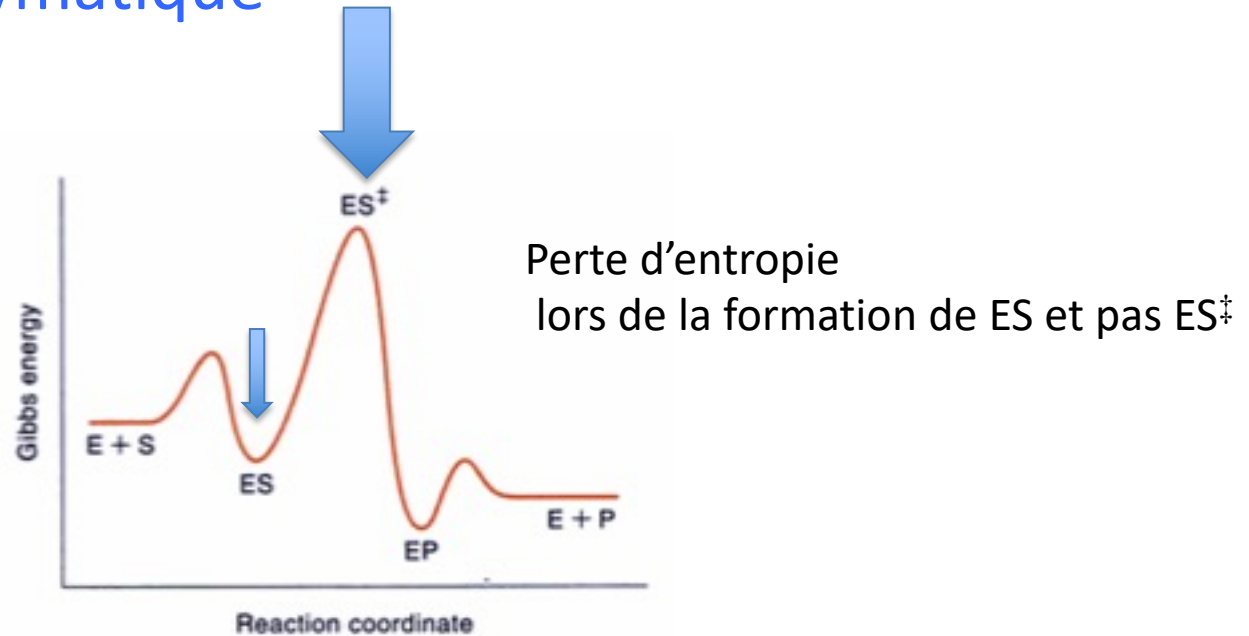


Figure 6-22
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Hexokinase has a U-shaped structure (PDB ID 2YHX). The ends pinch toward each other in a conformational change induced by binding of D-glucose (red).

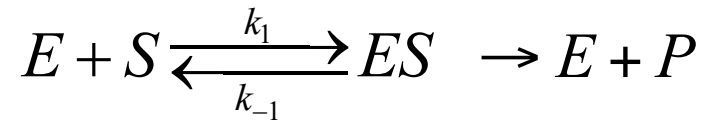
Catalyse enzymatique



Enzyme stabilise le substrat par des forces intermoléculaires (ponts hydrogène, électrostatique...)

Les interactions sont optimisées entre l'enzyme et le substrat dans l'état de transition $ES^\ddagger$ (structure intermédiaire entre S et P). Le complexe ES est ainsi stabilisé et la barrière d'activation entre ES et $ES^\ddagger$ est abaissée.

Cinétique de Michaelis-Menten



1) Equilibre

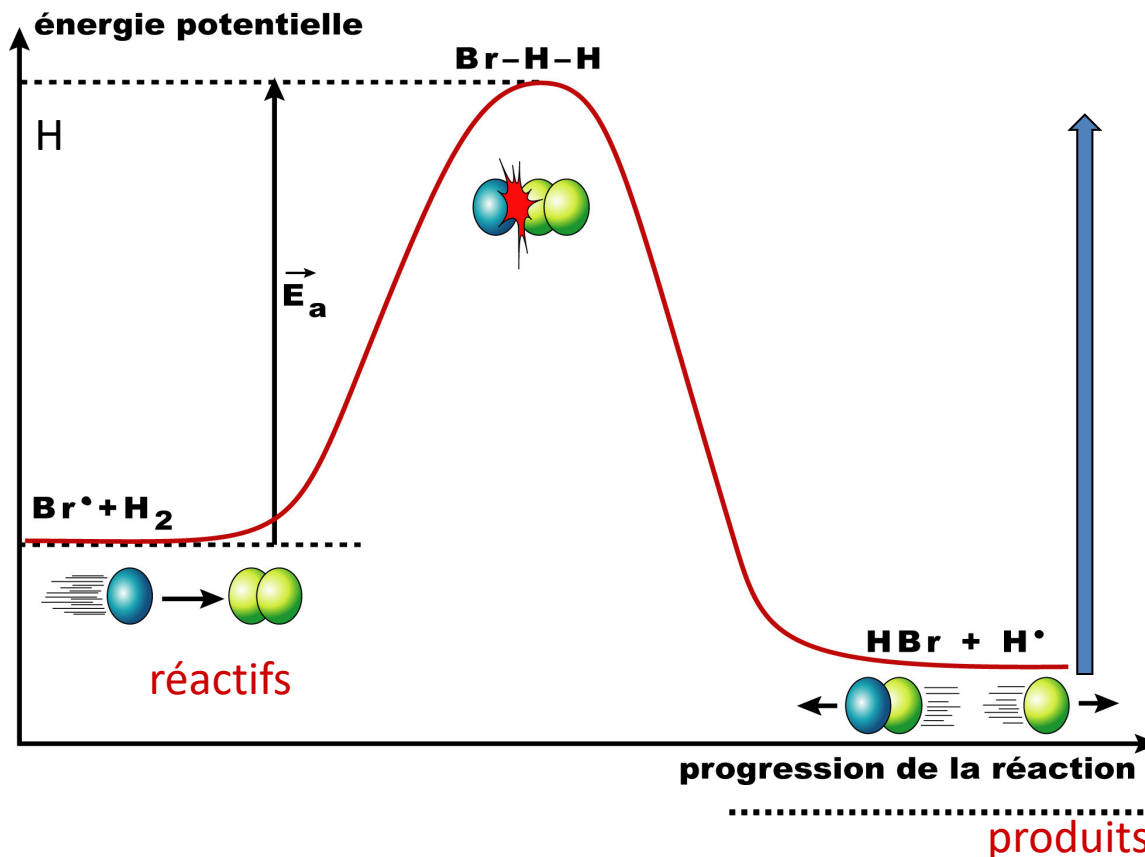
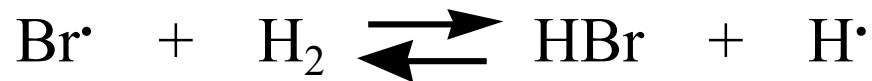


2) Réactions successives



Interprétation de l'énergie d'activation

énergie d'activation E_a = énergie du complexe activé (état de transition)



E_a inverse

$$\Delta_r H^0 = E_a - E_a$$

$$E_a \text{ inverse} = E_a \text{ direct} - \Delta_r H^0$$

De manière générale, on ne peut rien dire sur le facteur de fréquence de la réaction inverse. Le problème se simplifie si on considère que A_f est le même dans les deux sens

Théorie de l'état de transition

Annexe

$$k = A_f e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Description empirique

Pas de détail microscopique

Pas de lien avec la thermodynamique

A_f et E_a doivent être déterminés expérimentalement



Arrhénius (1859-1927)

Théorie de l'état de transition

Lien avec la thermodynamique:

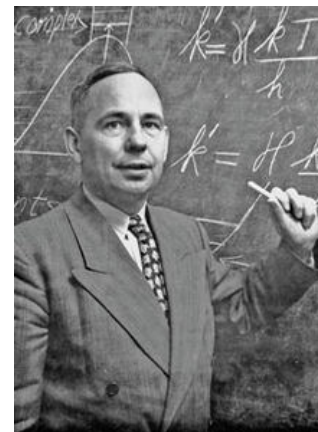
hypothèse: l'état de transition est en équilibre avec les réactifs

$$k = C e^{-\Delta_r G^{0*}/RT} = C e^{\frac{\Delta_r S^{0*}}{R}} e^{-\Delta_r H^{0*}/RT}$$

Entropie standard d'activation: ΔS^{0*}

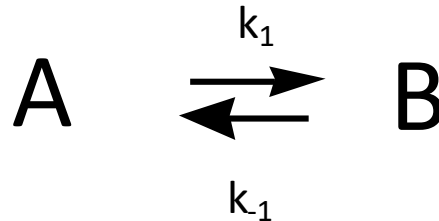
Enthalpie standard d'activation: ΔH^{0*}

$$\Delta H^{0*} \approx E_a$$



Eyring (1901-1981)

Réactions d'équilibre



Soit ordre 1 dans les deux sens
(réactions élémentaires)

Cinétique

$$v_1 = k_1 [A]$$

$$v_{-1} = k_{-1} [B]$$

À l'équilibre: $v_1 = v_{-1}$

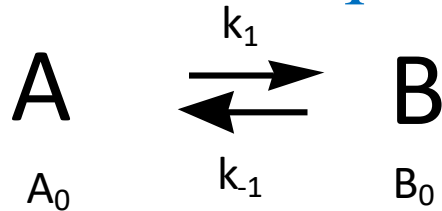
$$k_1 [A]_{eq} = k_{-1} [B]_{eq}$$

Thermodynamique

$$K = [B]_{eq}/[A]_{eq}$$

$$K = k_1/k_{-1}$$

Réactions d'équilibre



A l'équilibre:

$$d[A]/dt = 0$$

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_1[A] - k_{-1}[B]$$

Avec $[B] = [B]_0 + ([A]_0 - [A])$

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_1[A] - k_{-1}([B]_0 + [A]_0 - [A])$$

$$[A]_{eq} = \frac{k_{-1}}{k_1 + k_{-1}}([B]_0 + [A]_0)$$

En remarquant que $[A]_{eq}$ est une constante, on peut écrire la loi de vitesse pour $[A] - [A]_{eq}$

$$-\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d([A] - [A]_{eq})}{dt} = (k_1 + k_{-1})([A] - [A]_{eq})$$

Réaction de premier ordre avec une constante de vitesse apparente de $k_1 + k_{-1}$

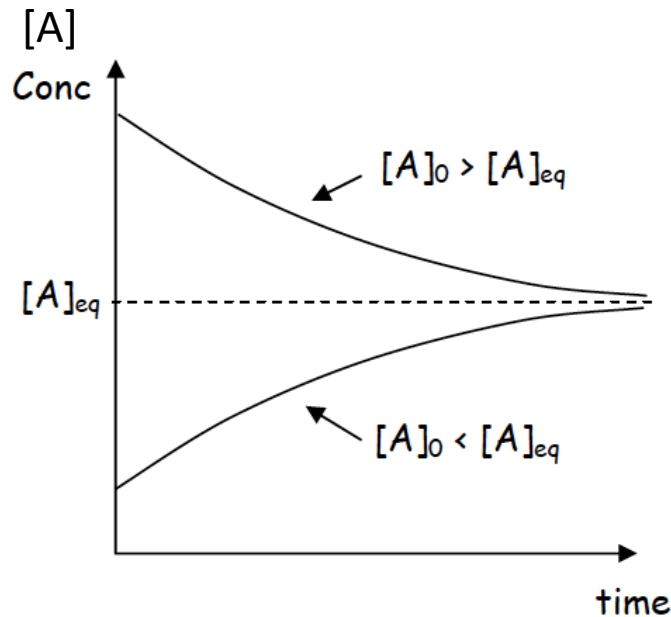
Solution

$$[A] - [A]_{eq} = ([A]_0 - [A]_{eq})e^{-(k_1 + k_{-1})t}$$

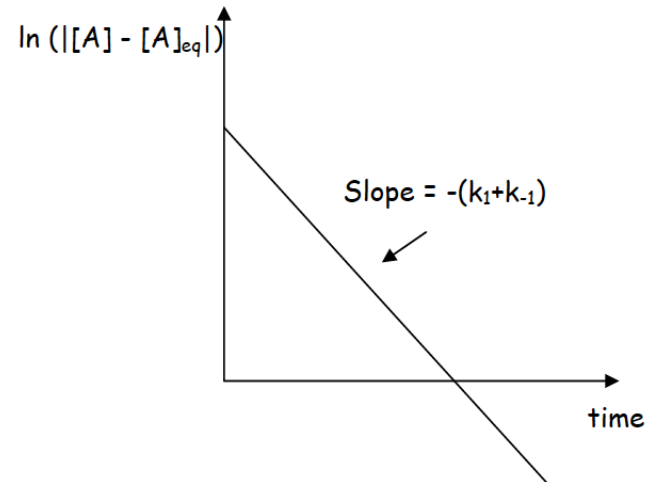
Réactions d'équilibre

$$[A] - [A]_{eq} = ([A]_0 - [A]_{eq})e^{-(k_1+k_{-1})t}$$

Cinétique d'ordre 1



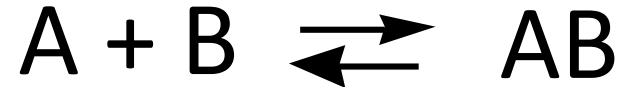
$$K_{eq} = k_1/k_{-1}$$



$$k_1 + k_{-1} = k_{obs}$$

Si on obtient K_{eq} , et k_{obs} expérimentalement: on peut obtenir k_1 et k_{-1}

Modification pour une réaction de 2^{ème} ordre: par exemple interactions récepteur/ligand



Réaction supposée élémentaire dans les deux sens

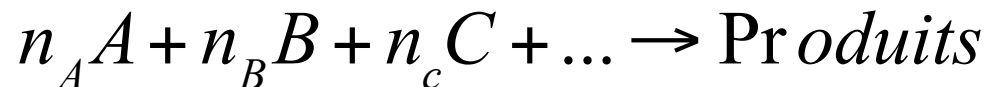
Formation du complexe $d[AB]/dt = k_a \cdot [A] \cdot [B]$ *Complicé dans le cas général

désintégration du complexe $-d[AB]/dt = k_d \cdot [AB]$

*Généralement le substrat est en grand excès par rapport au récepteur:
Cinétique de pseudo 1^{er} ordre

Méthode des réactifs en excès

rappel



But: rendre le problème similaire à un système à réactif unique

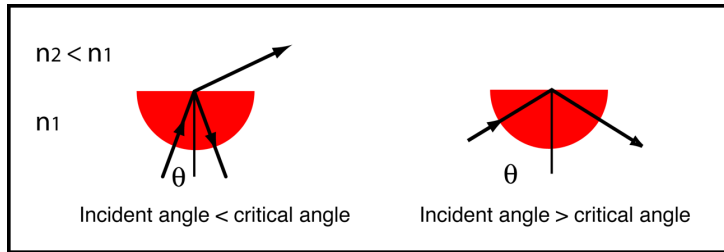
Pour $[A]_0 \ll [B]_0, [C]_0, \text{ etc.},$

$$[B] \approx [B]_0 \quad [C] \approx [C]_0 \quad \text{etc.}$$

$$- d[A] / dt \approx k[A]^\alpha [B]_0^\beta [C]_0^\gamma = k'[A]^\alpha$$

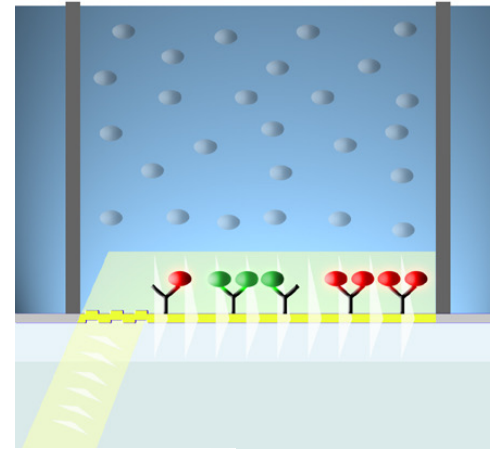
$$k' = k[B]_0^\beta [C]_0^\gamma \quad \text{Réaction de pseudo-ordre } \alpha$$

Des techniques expérimentales permettent de mesurer spécifiquement les molécules confinées à une surface



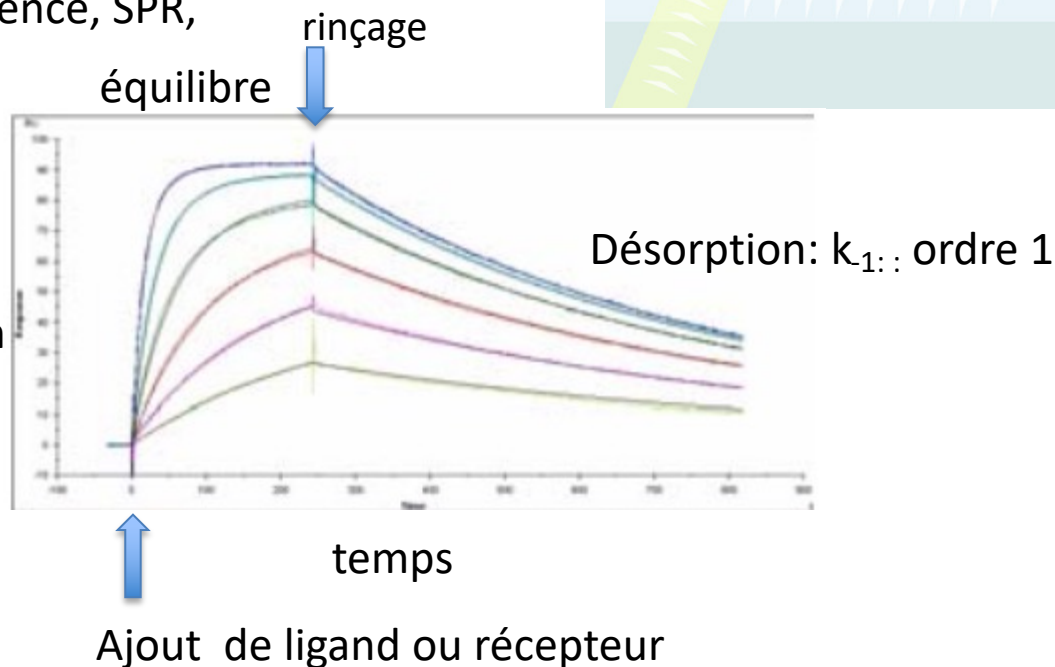
Techniques:

ATR -FTIR, grazing incidence, SPR,

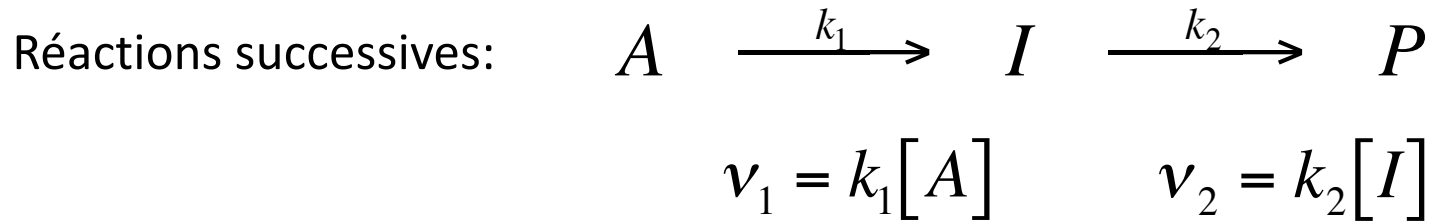


Cinétique
Adsorption/désorption

k_{obs}



Réactions en plusieurs étapes

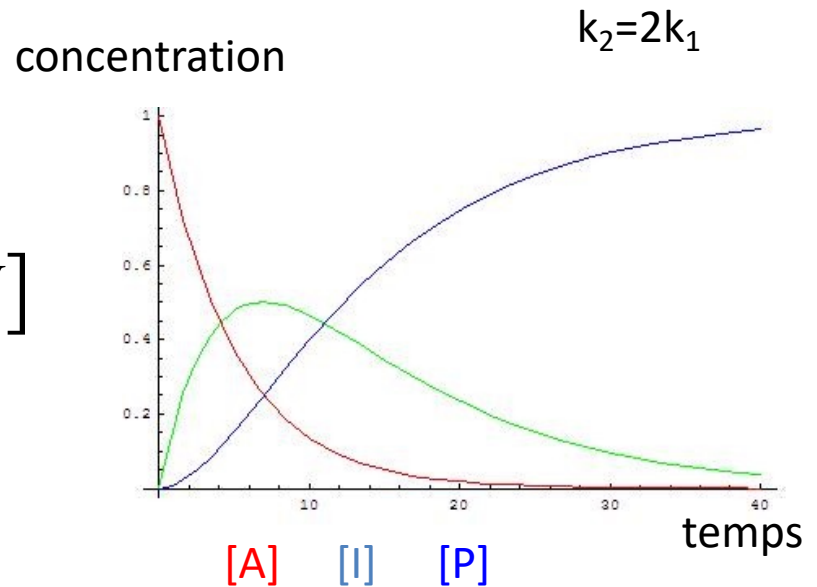


Cas général compliqué

$$-\frac{d[A]}{dt} = v_1 = k_1[A]$$

$$\frac{d[I]}{dt} = v_1 - v_2 = k_1[A] - k_2[I]$$

$$\frac{d[P]}{dt} = v_2 = k_2[I]$$



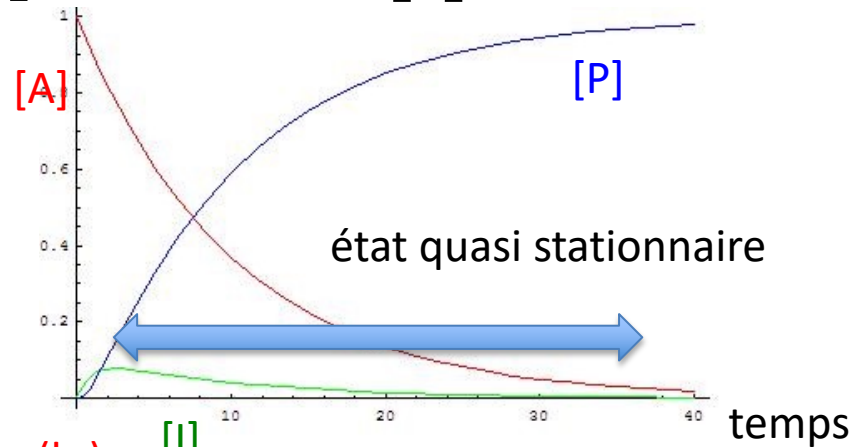
hypothèse: état quasi-stationnaire



$$v_1 = k_1[A] \quad v_2 = k_2[I]$$

$$k_2 \gg k_1$$

Très peu d'intermédiaire
et l'intermédiaire varie lentement



$$A(t) = A_0 e^{-k_1 t} \quad \text{Premier ordre : décroissance lente (} k_1 \text{)}$$

$$I(t) \approx \frac{k_1}{k_2} A(t) \quad \text{I petit et (après la partie initiale) décroît lentement (} k_1 \text{)}$$

$$P(t) \approx A_0 (1 - e^{-k_1 t}) \quad \text{Croissance lente (} k_1 \text{)}$$

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

Approximations



1) État (quasi) stationnaire (steady state):

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

La quantité de ES est faible et ne change pas beaucoup dans le temps

en pratique on mesure une vitesse approximativement constante v_0 sur une période courte ($< 1\text{min}$). La période pre-steady state est très courte ($\ll 1\text{s}$)

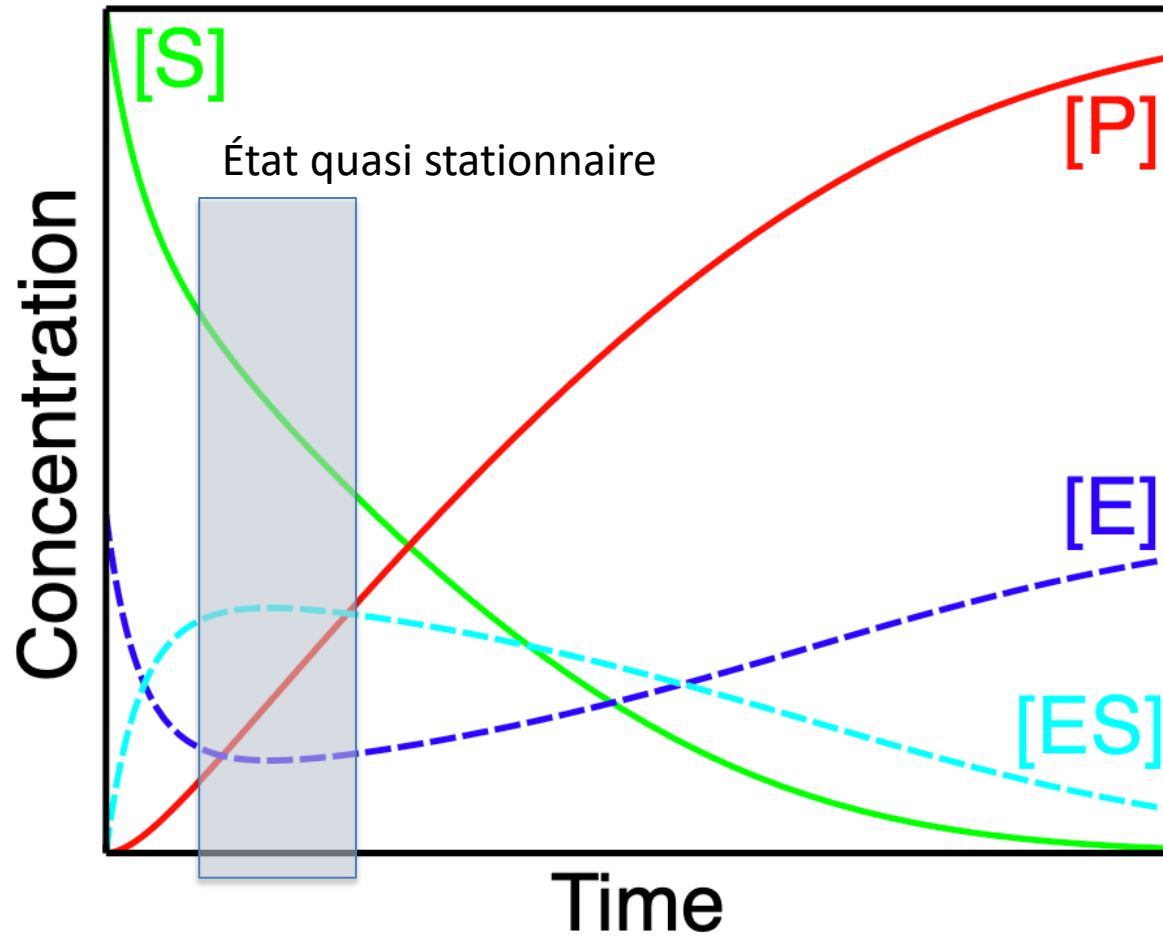
2) Réactions élémentaires

Pas de mécanisme compliqué (coopérativité etc.), un seul substrat par enzyme

3) La réaction inverse $P+E$ vers ES est généralement négligée (conditions initiales: $[P]_0$ très faible)

4) La quantité d'enzyme est faible par rapport à la quantité de substrat

Evolution des concentrations dans une réaction enzymatique
Suivant la loi de Michaelis Menten



Cinétique enzymatique

Réaction globale



Vitesse de réaction

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad \text{mais ES est un intermédiaire}$$

Hypothèse : état stationnaire

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

$d[ES]/dt < 0$, la concentration de ES diminue lentement

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

On pose $[E] = [E]_0 - [ES]$

$[E]$: enzyme libre

$[E]_0$: concentration totale enzyme

(= aussi à la concentration initiale)

$$k_1[ES].[S] + k_{-1}[ES] + k_2[ES] = k_1[E]_0[S]$$

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2}$$

Soit K_M

constante de Michaelis

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

$$[ES] = \frac{[E]_0.[S]}{K_M + [S]}$$

Relation de Michaelis - Menten

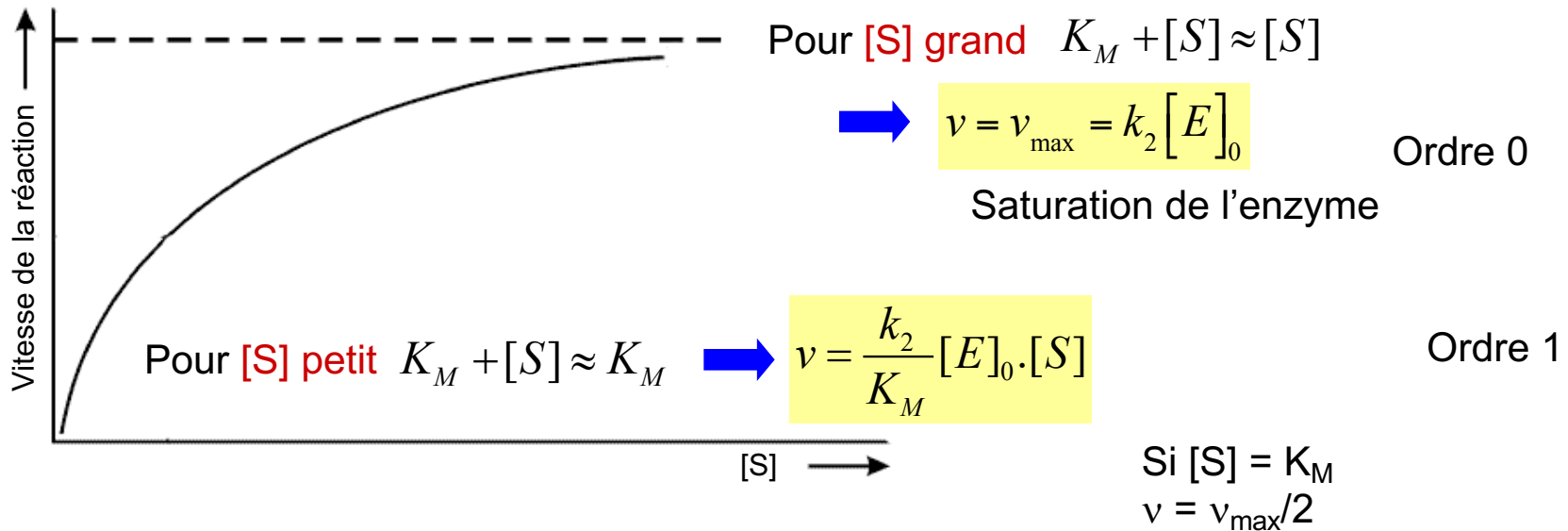
D'après les équations précédentes

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \approx \frac{k_2[E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]}$$



$$v \approx \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

relation de Michaelis-Menten





L'équation dérivée auparavant suppose que la réaction inverse (avec le constante de vitesse k_2) est négligeable
Ceci est vrai lorsque P est faible

- au début de la réaction
- si P est immédiatement consommé par une réaction suivante (cycle biologique)

La formule complète est la suivante:

$$v = \frac{(v_{\max} / K_M) \cdot [S] - (v'_{\max} / K'_M) \cdot [P]}{1 + [S] / K_M + [P] / K'_M}$$

$$v_{\max} = k_2[E]_0 \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$v'_{\max} = k_1[E]_0 \quad K'_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}}$$

En pratique, dans un test biologique, on mesure la vitesse **initiale** de la réaction enzymatique lorsque la concentration du complexe [ES] a atteint l'état stationnaire et la concentration de produit est encore négligeable. Si [P] tend vers 0, l'équation se réduit à sa représentation habituelle

Linéarisation:représentation Lineweaver-Burk : $1/V = f(1/[S])$

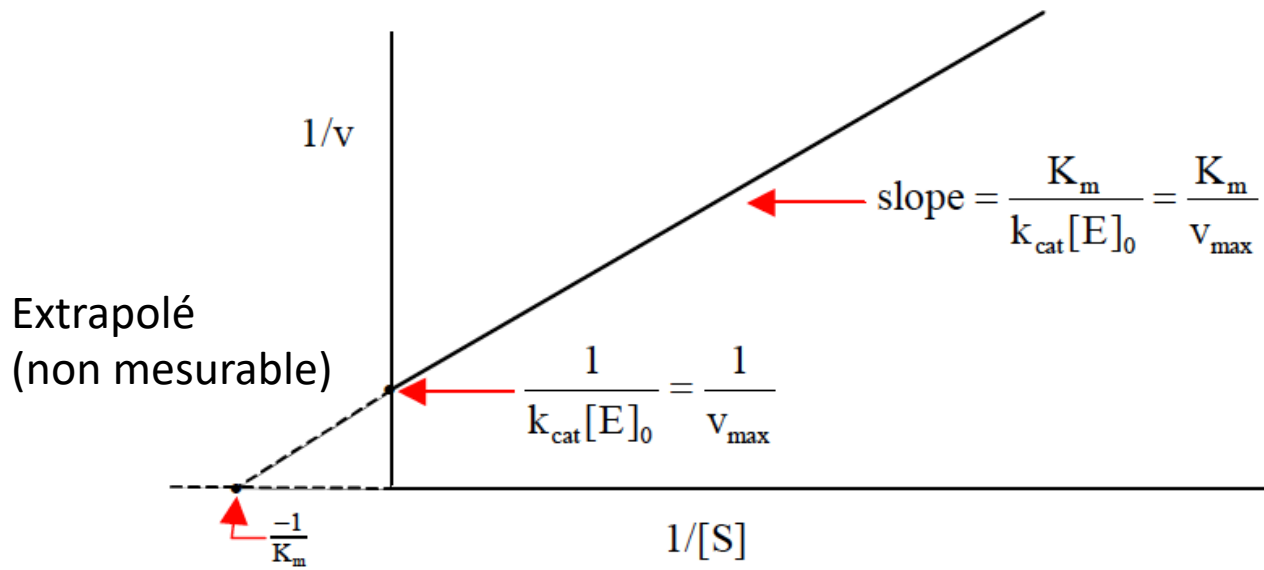
$$v = \frac{k_2[E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Notation biologique $k_{\text{cat}} = k_2$

$$v_{\text{max}} = k_2[E]_0$$

$$\frac{1}{v} = \frac{[S] + K_m}{K_{\text{cat}}[E]_0[S]} = \frac{1}{k_{\text{cat}}[E]_0} + \frac{K_m}{k_{\text{cat}}[E]_0} \cdot \frac{1}{[S]}$$

On peut obtenir K_M et V_{max} à partir des points expérimentaux reportés sur le graphe suivant



Définitions

- K_M : constante de Michaelis: représente la concentration de substrat à laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale.
Elle est caractéristique d'une enzyme et d'un substrat dans des conditions données de température, pression, pH .
- V_{max} : vitesse maximale théorique. Elle dépend directement de la concentration de l'enzyme. Toutes les molécules d'enzyme sont liées à un substrat.
- k_{cat} : La constante catalytique (turnover) d'une enzyme est le nombre de molécules de substrat converties en produit par molécule d'enzyme par unité de temps à V_{max} .
Dans le mécanisme de Michaelis-Menten, $k_{cat} = k_2 = V_{max}/[E]_0$
- ϵ : efficacité catalytique d'une enzyme est le rapport k_{cat}/K_M .
Lorsque l'efficacité d'une enzyme se rapproche des constantes de vitesse de diffusion de l'enzyme et du substrat (10^8 - 10^9 L mol⁻¹ s⁻¹), on parle de “perfection catalytique“

Enzymes proches de la perfection catalytique

TABLE 6–8		Enzymes for Which k_{cat}/K_m Is Close to the Diffusion-Controlled Limit (10^8 to $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		
Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1.1×10^0	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

Source: Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W. H. Freeman and Company, New York.

Table 6-8

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Thèmes spécifiques: SV-1

CINETIQUE

1. Introduction
2. Cinétique de réactions combinées
 - Equilibre
 - Réactions séquentielles
3. catalyse enzymatique: Michaelis-Menten
inhibition
4. exemple: Anhydrase carbonique

Inhibition compétitive

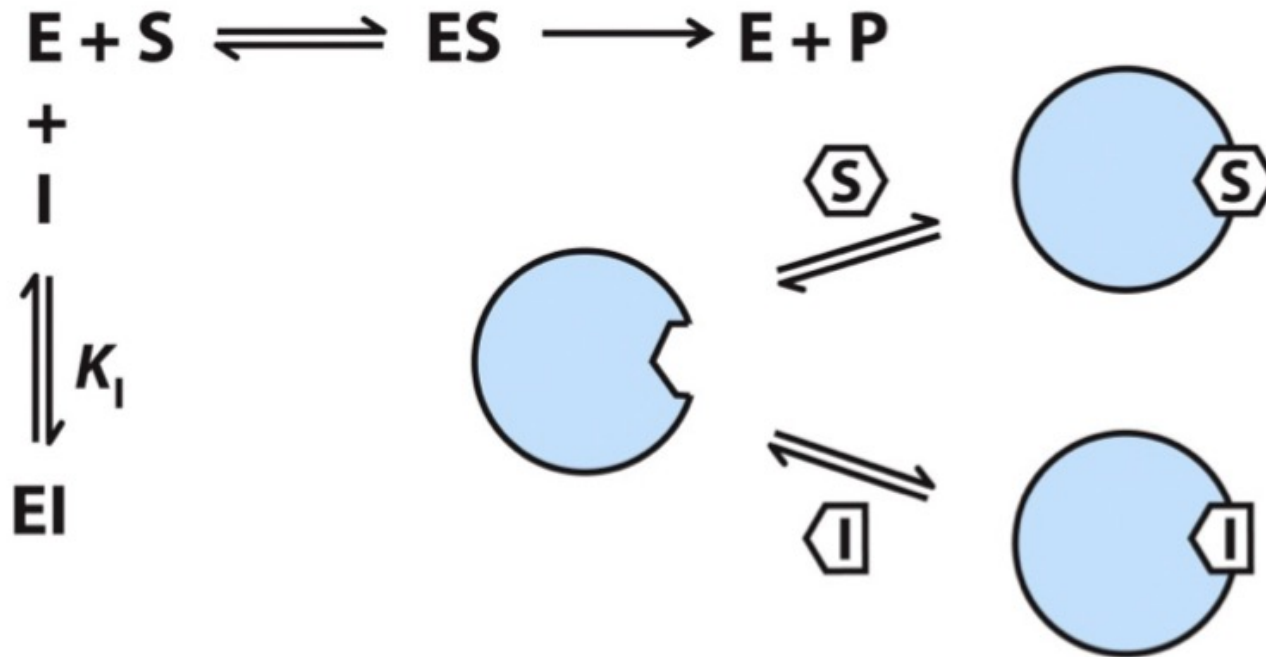


Figure 6-15a
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition

$K_i = [E][I] / [EI]$ K_i : aussi appelé constante d'inhibition. Si K_i petit, l'inhibition est forte

Pas de complexe ESI, l'enzyme ne peut pas se lier en même temps au substrat S et à l'inhibiteur I

Cas le plus simple (non exclusif): l'inhibiteur et le substrat se lient au même site .

Dans ce cas, il y a souvent une similarité structurelle entre l'inhibiteur et le substrat

Inhibition compétitive

Diminue la concentration active du substrat

K_M apparent augmente

V_{max} inchangé

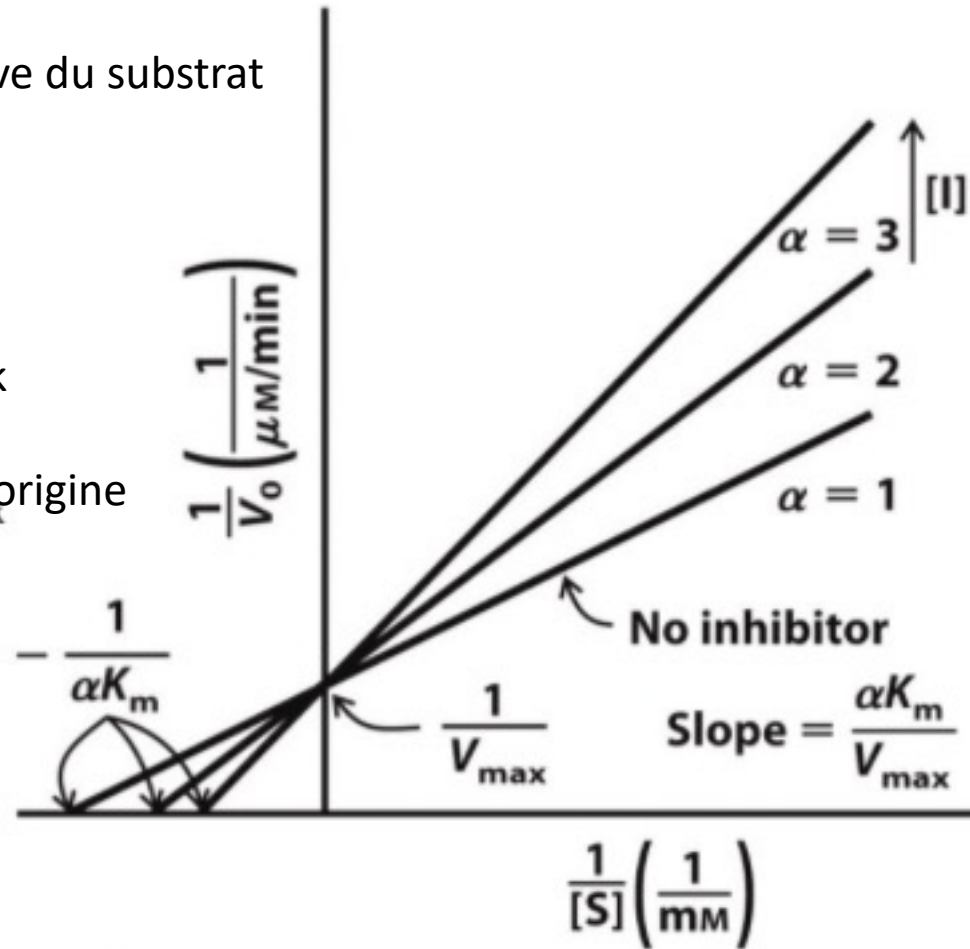
Représentation Lineweaver-Burk

Augmentation de la pente

Sans variation de l'ordonnée à l'origine

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

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{\alpha K_M + [S]}$$



Box 6-2 figure 1

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Inhibition compétitive

L'inhibiteur I se lie uniquement à l'enzyme et non au complexe ES.

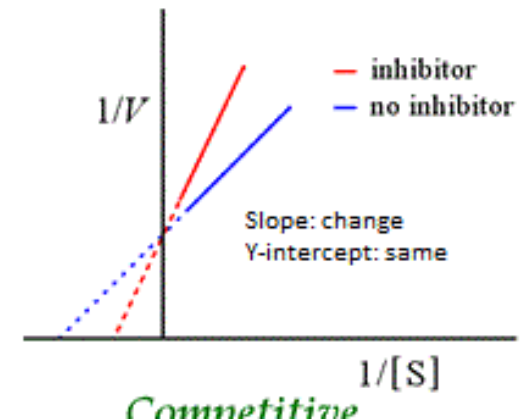
Orthogonalité de liaison du substrat et de l'inhibiteur. Il n'y a pas de complexe ESI

Dans le cas le plus simple et le plus courant, l'inhibiteur se lie au site actif de l'enzyme et empêche la fixation du substrat

LI

Augmentation de K_M apparent (diminue la concentration de [S] apparente)

Augmentation de K_M apparent; aucune influence sur $v_{\max}$



L'effet de l'inhibition est annulé aux grandes concentrations de substrat

Inhibition incompétitive (antcompétitive)

L'inhibiteur I se lie au complexe enzyme-substrat et bloque la réaction catalysée (k_{cat} , k_2)
Les sites de liaison de l'inhibiteur et du substrat sont différents

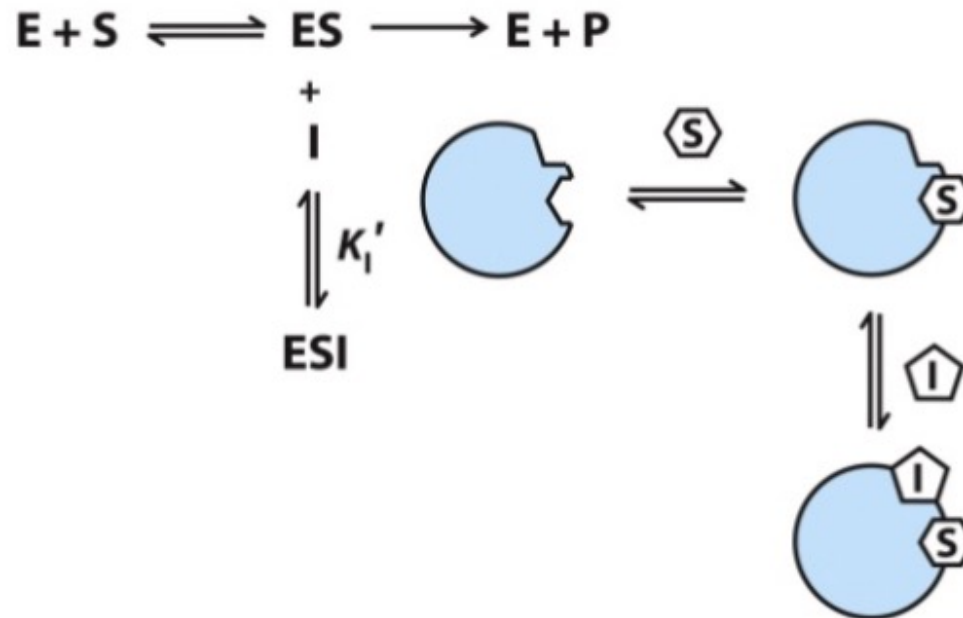
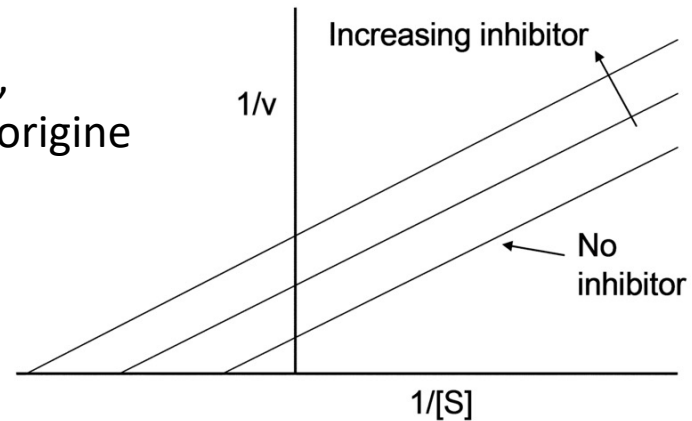


Figure 6-15b
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company

Inhibition incompétitive (antcompétitive)

Dans la représentation de Lineweaver-Burk,
La pente est inchangée mais l'ordonnée à l'origine
augmente



$V_{\max}$ diminue

K_M diminue de la même façon

(le rapport $K_M / V_{\max}$: reste constant en présence de
l'inhibiteur)

Inhibition mélangée

L'inhibiteur se lie à un site autre que le site actif
et sa présence limite la capacité du substrat à se lier au site actif

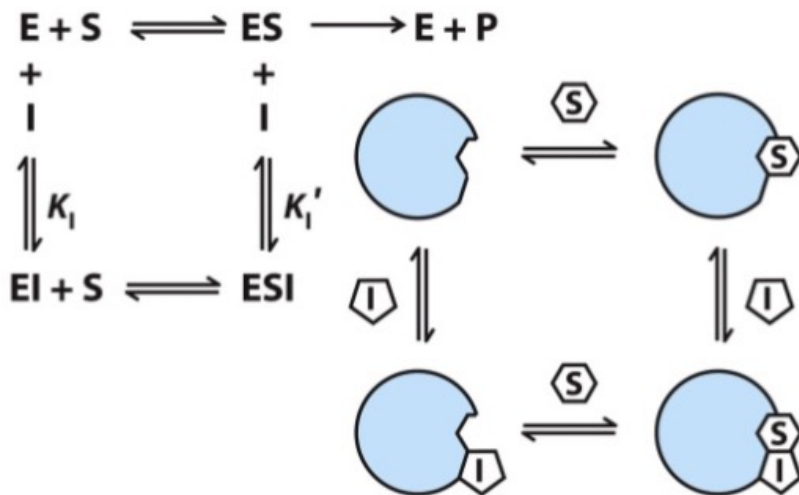
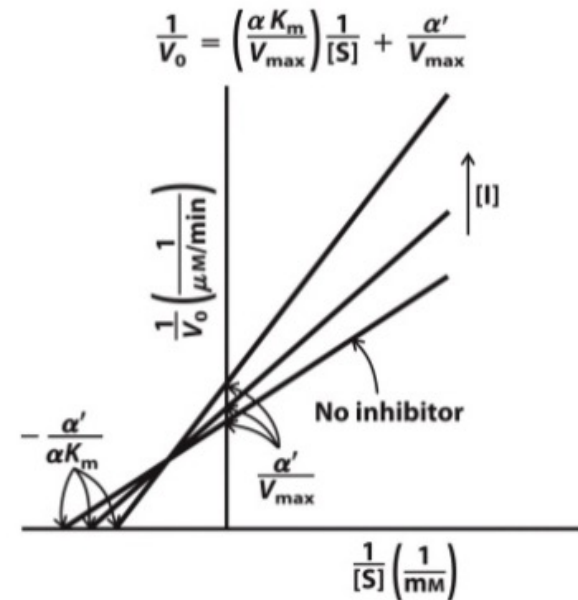


Figure 6-15c
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
© 2013 W.H. Freeman and Company

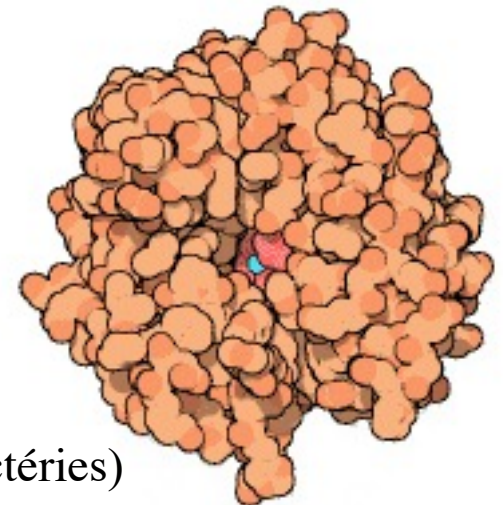


L'inhibiteur se lie à la fois à l'enzyme E et au complexe ES

Variation de la pente
et de l'ordonnée à l'origine

Anhydrase carbonique

Forme α
Mr: 30'000 Da
Site actif: Zn^{2+}



Structure

Plusieurs formes différentes, α (mammifères), β (plantes), γ (bactéries)

Dans les globules rouges (cytosol) du sang, pancréas, membrane gastrique, reins, cerveau
Et aussi en quantités plus faibles dans la salive, la rate, foie, muscles rouges

Physiologie

1. Transport principal du CO_2 dans le sang sous forme de HCO_3^- dans erythrocytes (environ 70%), et expiration dans les poumons

En cas d'hyperventilation, trop de CO_2 éliminé, le sang devient basique

2. En régulant la quantité de HCO_3^- , CO_3^{2-} , elle joue un rôle central dans la régulation du pH dans le sang et dans différents fluides corporels (salive neutre, sucs pancréatiques basique)

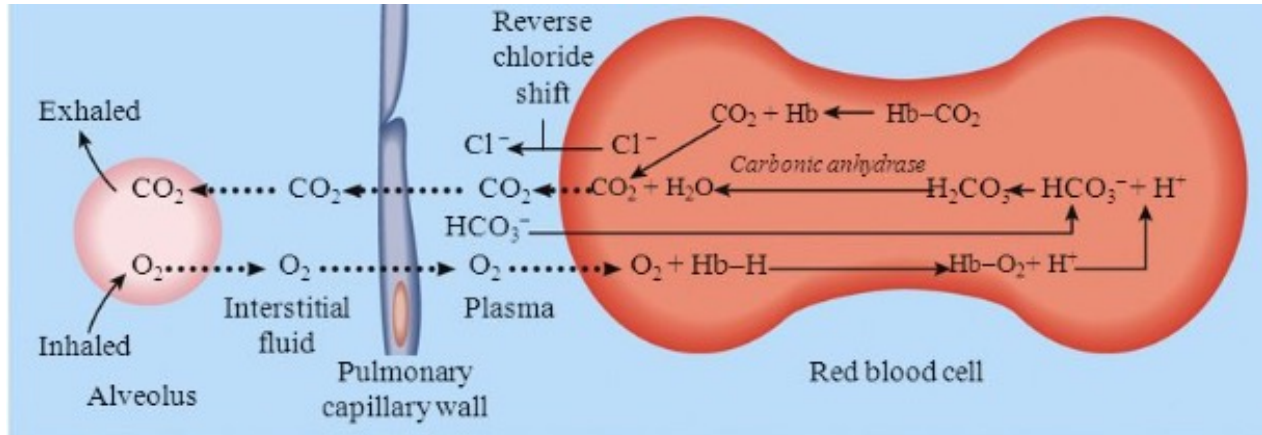
3. Influence la forme de certains organes (œil, reins)

Etc.

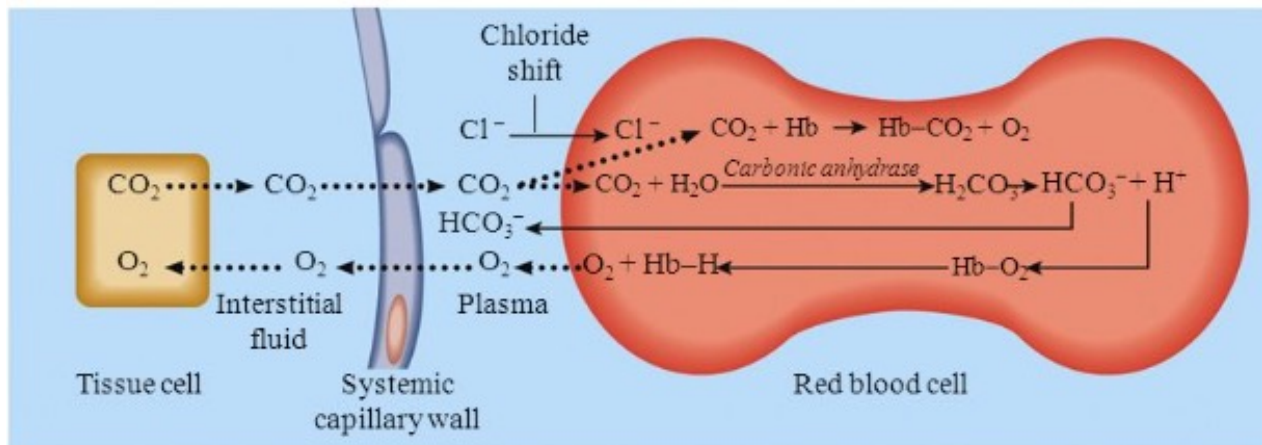
Calcification des coraux ou photosynthèse

(CO_2 est stocké dans les plantes sous forme d'ions carbonate)

Anhydrase carbonique

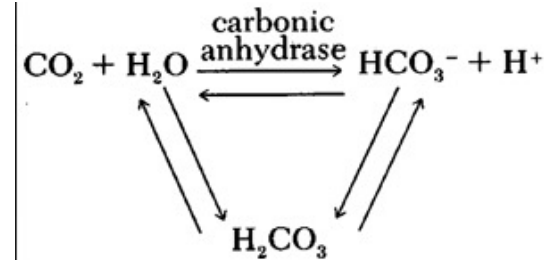


(a) Exchange of O_2 and CO_2 in pulmonary capillaries (external respiration)



(b) Exchange of O_2 and CO_2 in systemic capillaries (internal respiration)

Anhydrase carbonique



Réaction rapide sans l'enzyme (passe par le gaz carbonique H_2CO_3)

Réaction ultrarapide avec l'enzyme $k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 0.012 \text{ M}$ (substrat CO_2)

$$k_{\text{cat}} / K_M = 8.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Proche de la limite de diffusion
de CO_2 et de l'enzyme $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

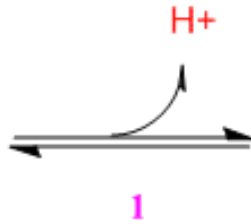
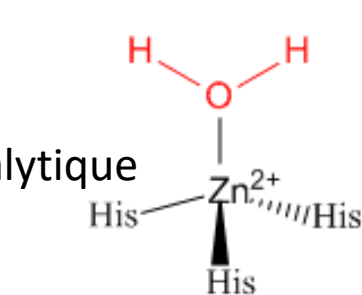
Pour une solution de 10^{-6} M anhydrase carbonique

$$V_{\text{max}} = (1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}) (1 \times 10^{-6} \text{ M}) = 1 \text{ M s}^{-1} : \text{production de } 1 \text{ mol/L en } 1 \text{ s}$$

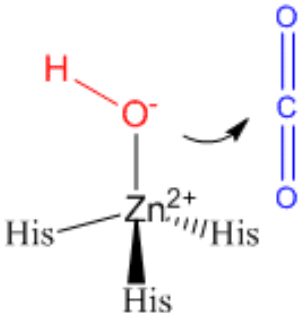
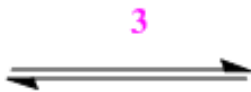
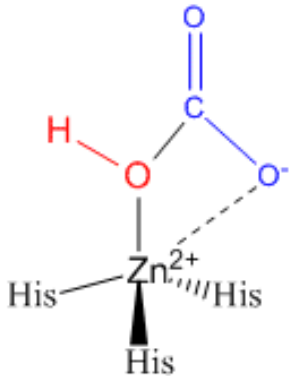
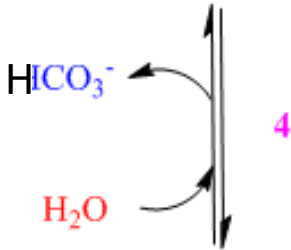
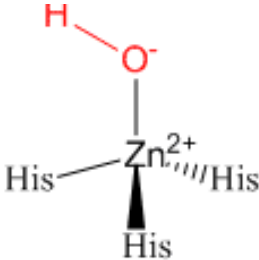
Haute concentration CO_2 : équilibre déplacé de gauche à droite: dans cellules

Faible concentration CO_2 : équilibre déplacé de droite à gauche: poumons

Molécule d' H_2O
liée au Zn^{2+}
a un pK_a de 7
dans le site catalytique
(au lieu de 14)



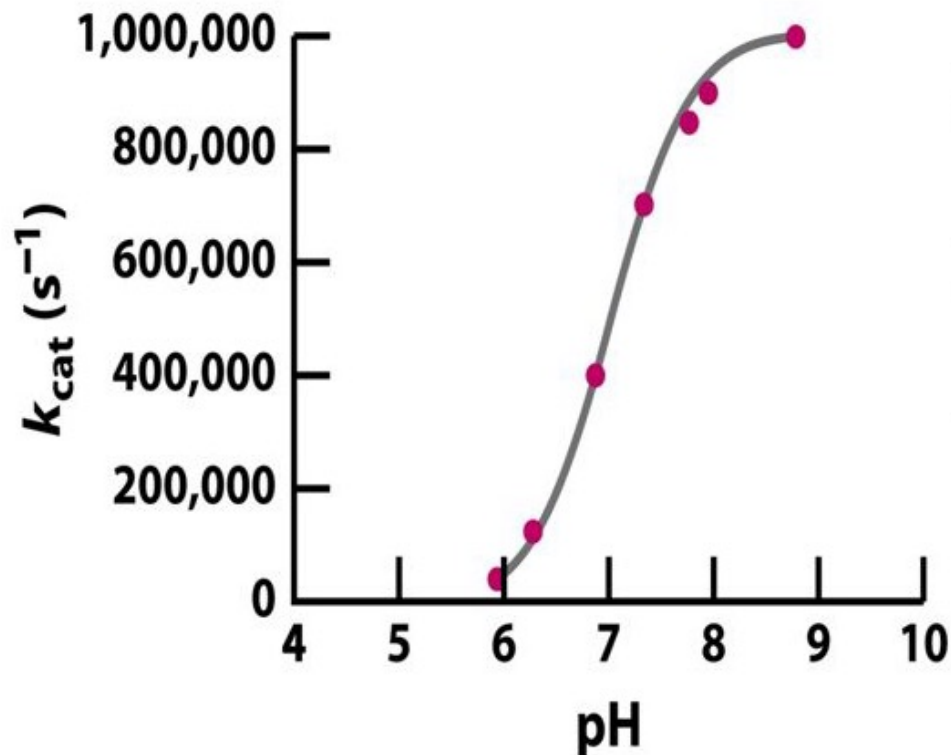
Formation de l'ion
hydroxyl lié au Zn^{2+}



Formation et libération de HCO_3^-
Suivi de régénération de H_2O
dans le complexe Zn^{2+}

Attaque nucléophile de OH^- sur CO_2

Major clue from pH profile

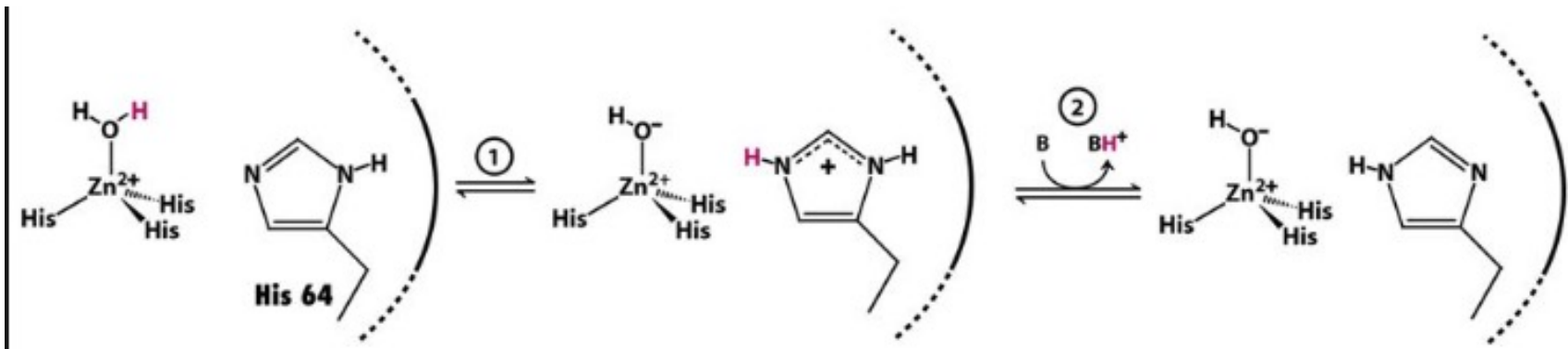


pH optimum environ 8

diminue lorsque pH baisse

Anhydrase carbonique II

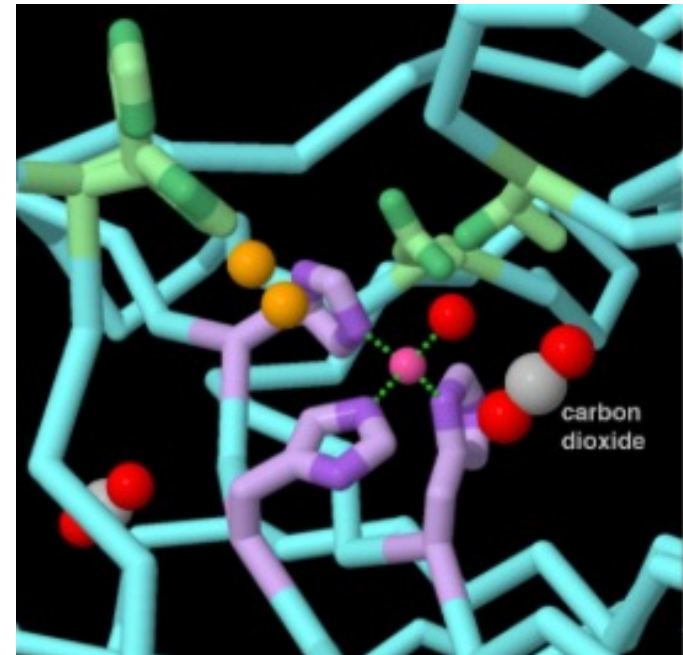
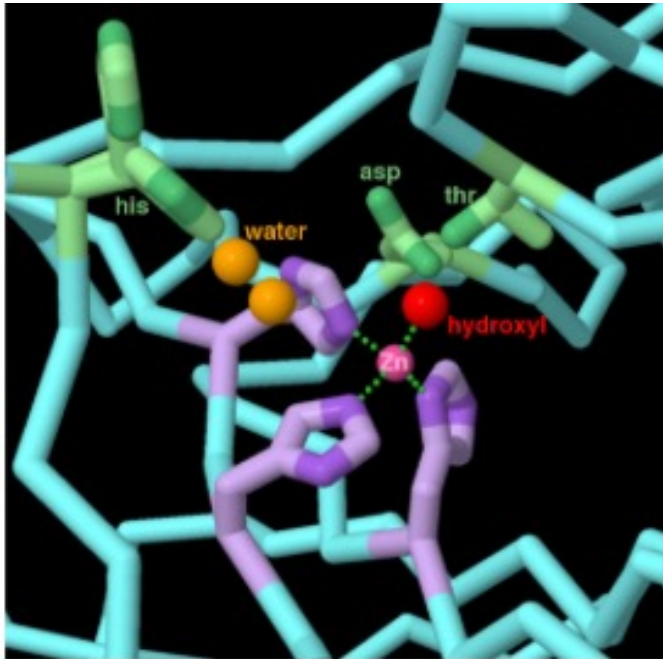
Réaction très rapide 10^6 s^{-1}



La réaction commence par la dissociation d'une molécule d'eau (liée au complexe de Zn^{2+}) en OH^- et H^+ .

Le proton est donné au groupe Histidine (pK_a environ 7) qui le transfère ensuite à une base (ou à un système tampon) à l'extérieur de l'enzyme.

Site actif de l'Anhydrase Carbonique

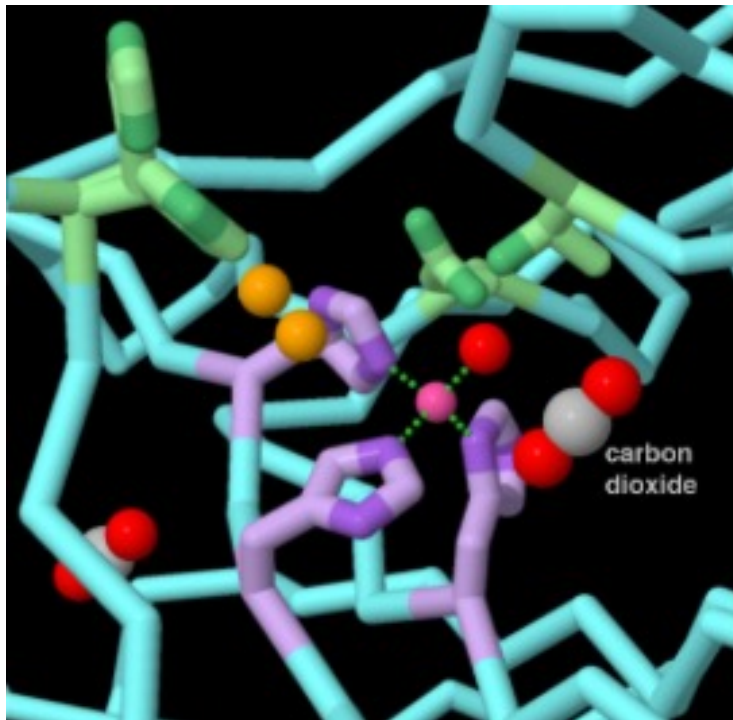


+ CO₂

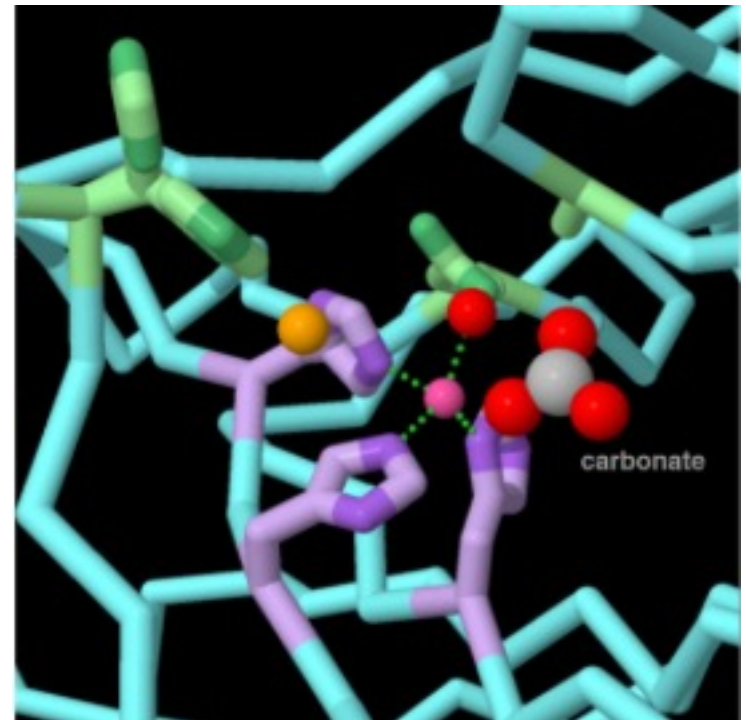
Source PDB101

Site actif de l'Anhydrase Carbonique

+ CO₂

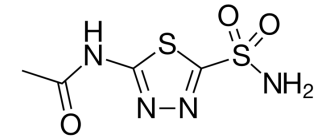
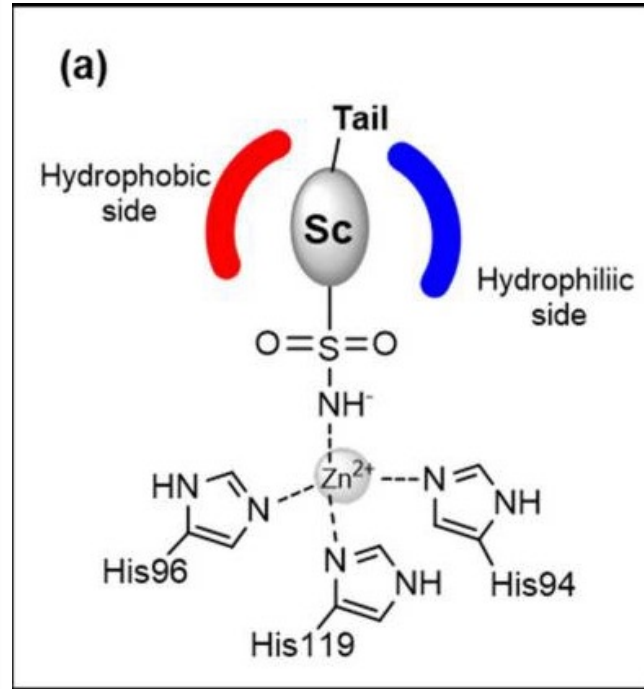
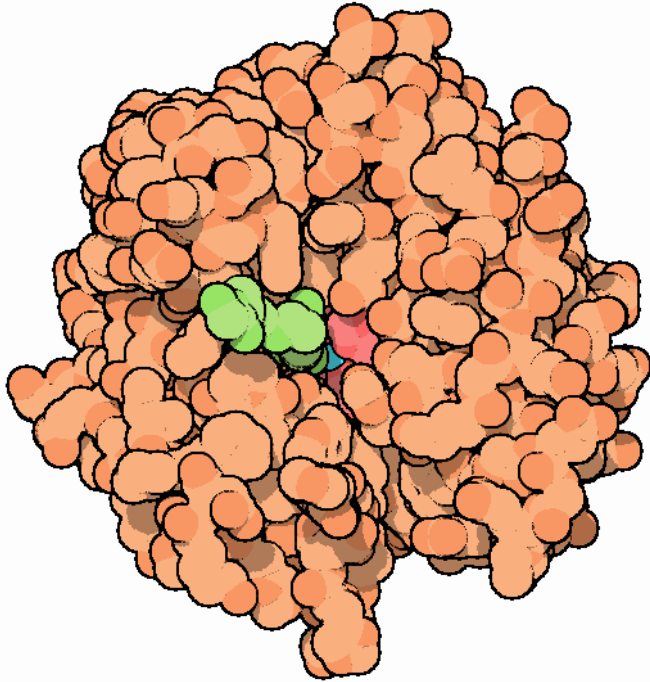


+ carbonate
(mutant utilisé pour bloquer la réaction)

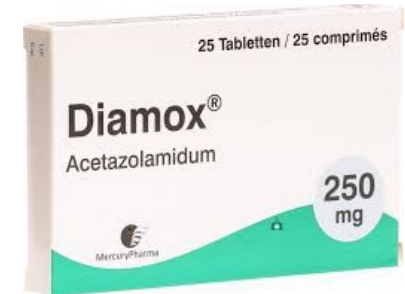


Une molécule de H₂O est transformée en hydroxyl

Un inhibiteur de l'anhydrase carbonique est utilisé pour le traitement du glaucome



Acetazolamide



L'inhibiteur sulfonamide (en vert) se lie à l'enzyme près du site actif et empêche les interactions entre l'eau et le Zn^{2+} et bloque ainsi l'activité de l'enzyme.

Il en résulte une baisse de la pression dans l'œil.

Aussi utilisé dans les cas d'hyperventilation dus à l'altitude (mal des montagnes).

Effet secondaire: l'usage prolongé est néfaste pour les reins.