

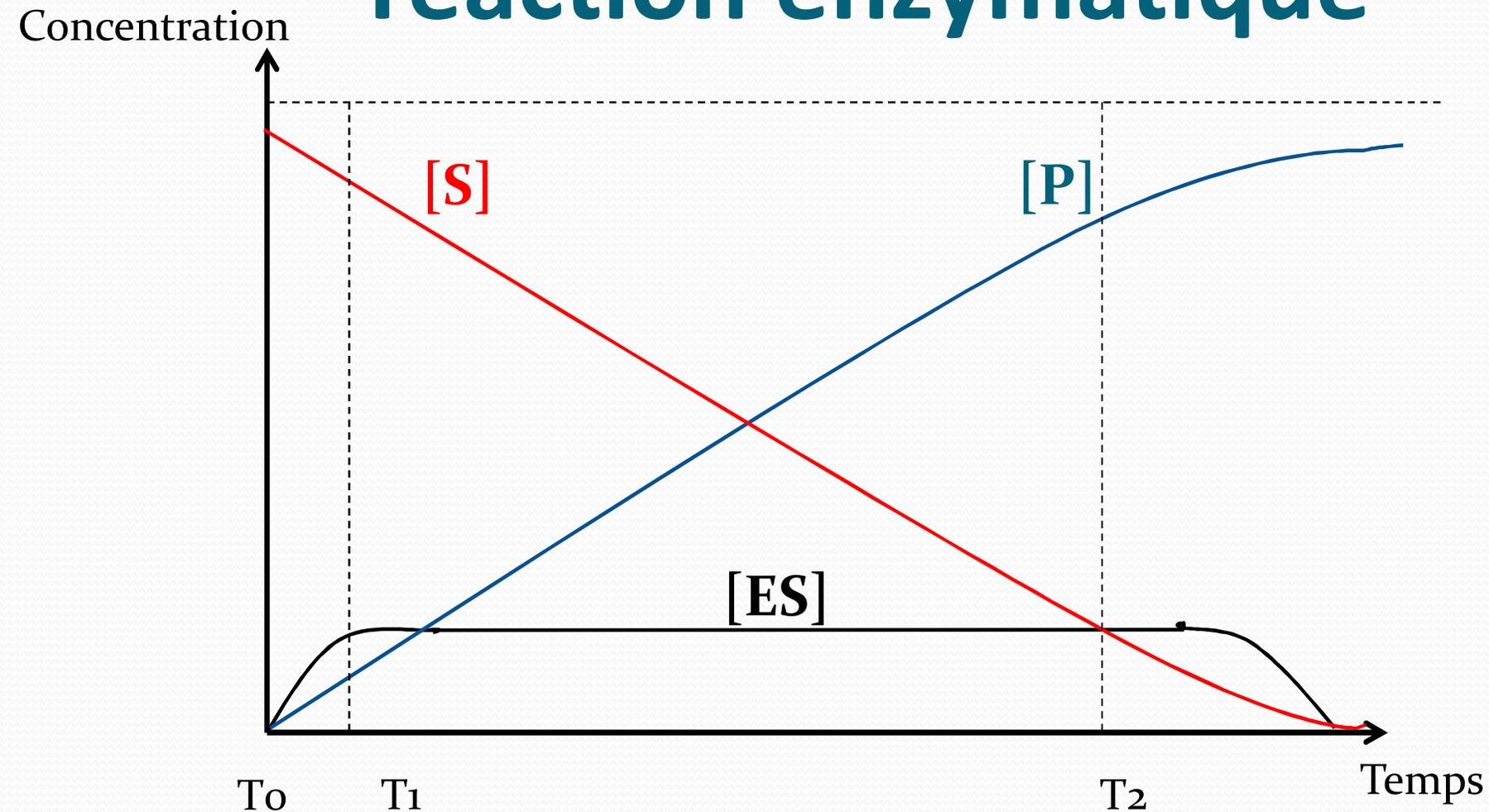


La Cinétique enzymatique
À
Un substrat

Définition de la cinétique enzymatique

C'est l'étude **des vitesses de réactions**
et de
leurs modifications
en réponse
aux changements **des conditions expérimentales**

Les différentes phases de la réaction enzymatique



Evolution de la cinétique enzymatique

Les différentes phases de la réaction enzymatique

Différentes phases	Pré-stationnaire	Stationnaire	Post stationnaire
Caractéristiques	<p>Enzyme mise en présence d'excès de substrat</p> <p>Combinaison ES très rapide</p>	<p>Enzyme saturée par le substrat</p> <p>Combinaison ES est à concentration maximale</p> <p>Constante</p> <p>Vitesse de la réaction est constante:</p> <p>Vitesse initiale</p> <p>(Reste constante tant que le substrat est à concentration saturante de l'enzyme)</p>	<p>Diminution de S de manière significative au bout d'un temps plus au moins long selon l'enzyme</p>

Les différentes phases de la réaction enzymatique

S ↑ : La vitesse de la réaction est indépendante de la concentration en substrat: **Réaction d'ordre 0**

Faible quantité de S: La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en substrat:
Réaction d'ordre 1

Travailler en concentration saturante en substrat

Définition de la vitesse d'une réaction enzymatique

S'exprime par:

-La quantité de substrat métabolisé par unité de temps

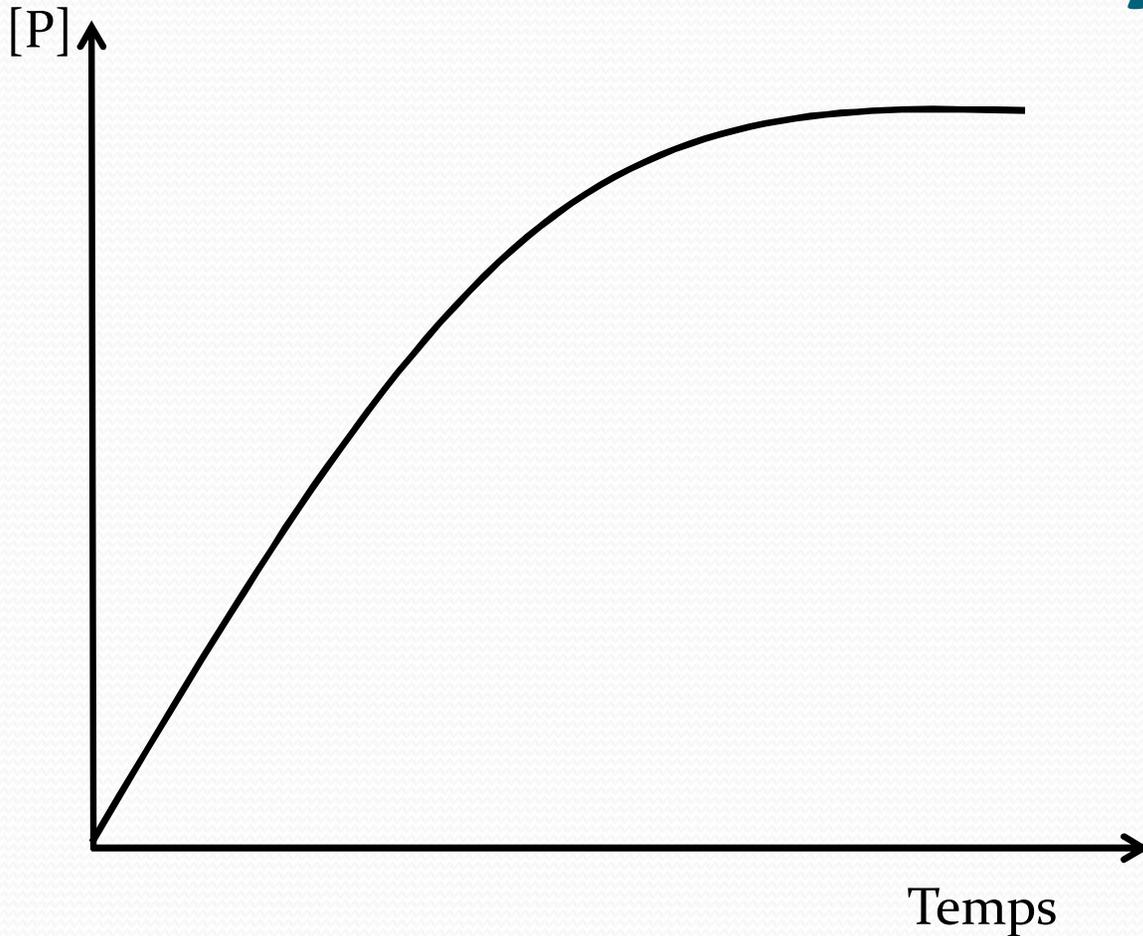
$$V = - dS / dt$$

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

$$V = dP / dt$$

(Dans les conditions optimales)

Définition de la vitesse d'une réaction enzymatique



Phase I: $v_o = dP/dt$

Phase II:

Inflexion de la droite par:
-Epuisement du substrat
- Inactivation de l'enzyme
- Formation d'une grande quantité de produits, susceptible de donner la réaction inverse

Définition de la vitesse d'une réaction enzymatique

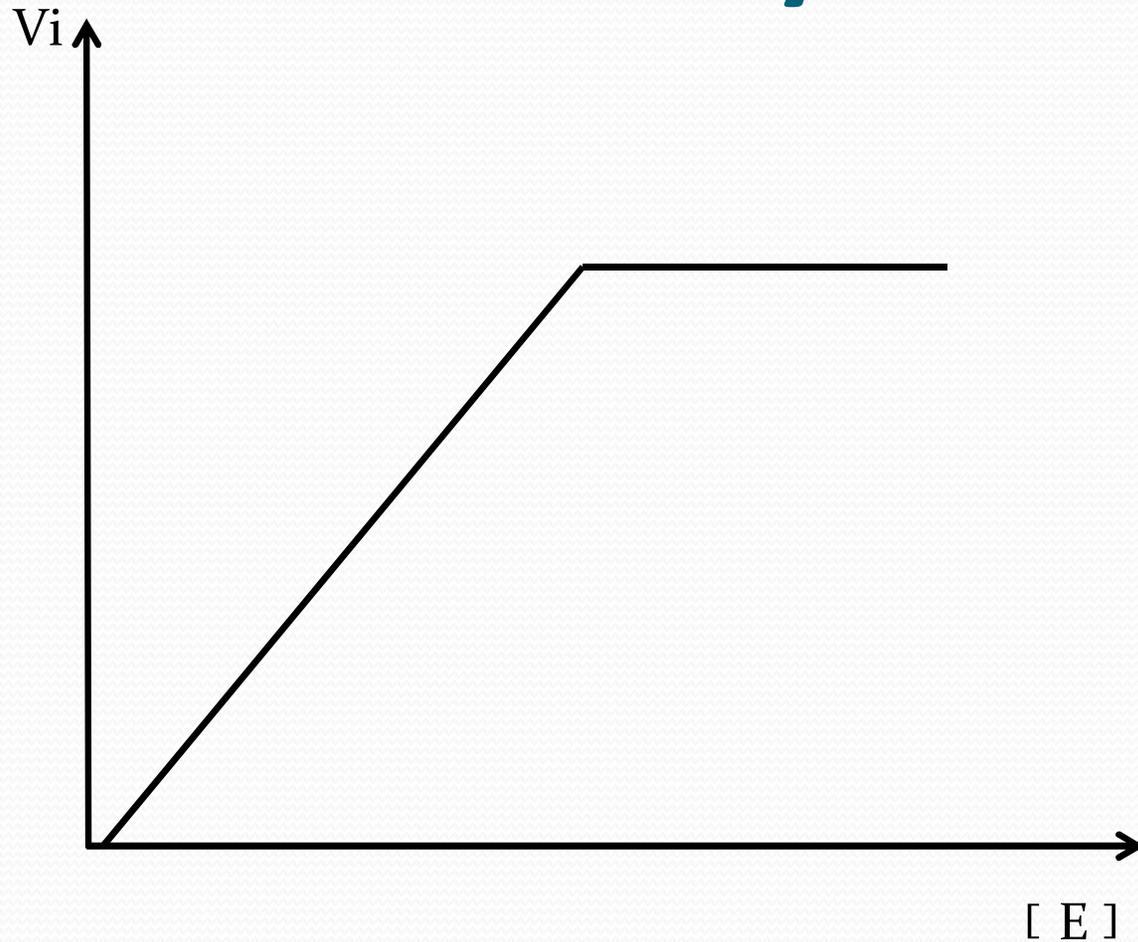
Il est indispensable

D'étudier **la vitesse initiale** de réaction dans les conditions
ou la

$$[S] > [E]$$

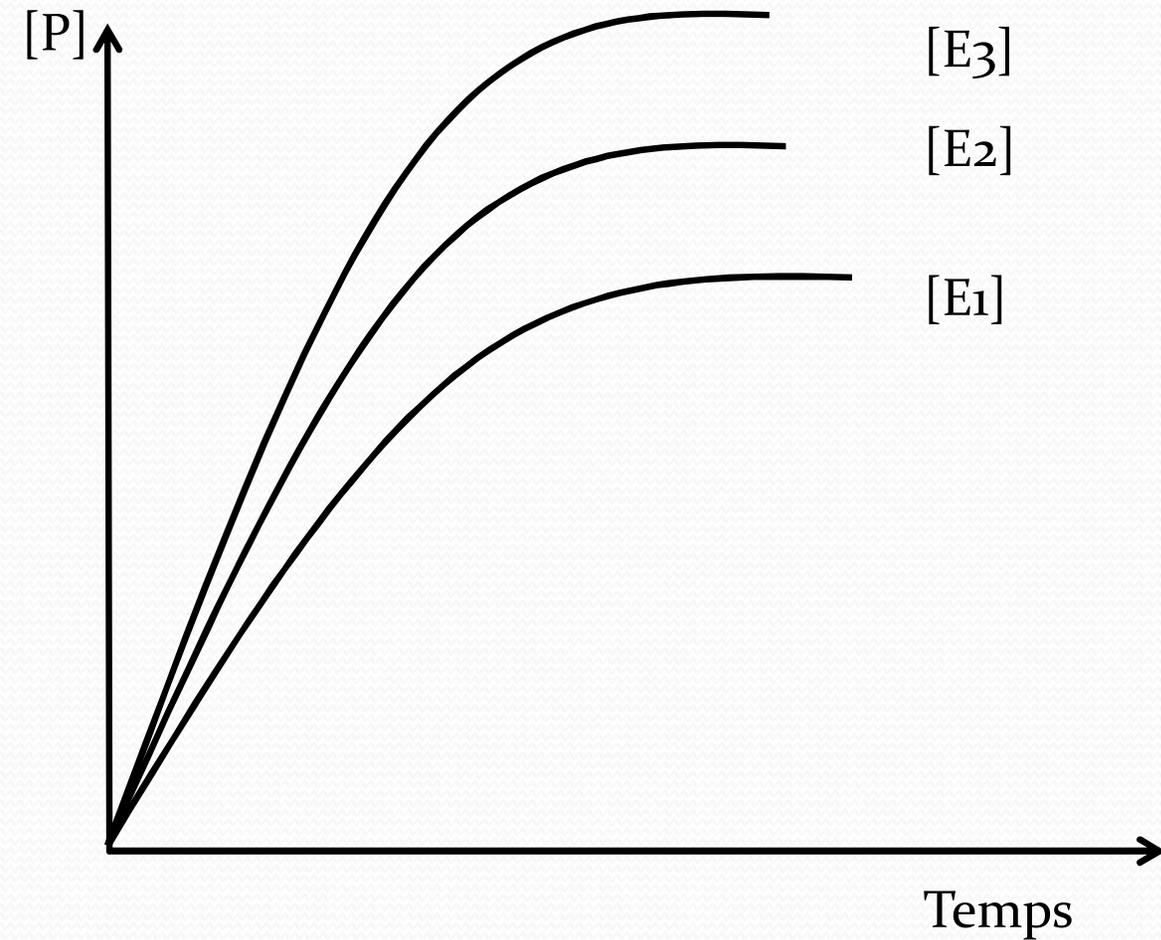
Si le temps de la réaction est très court, la modification de $[S]$ est négligeable,
et $[S]$ peut être considéré comme **constante**

Influence de la concentration en enzyme sur la V_i

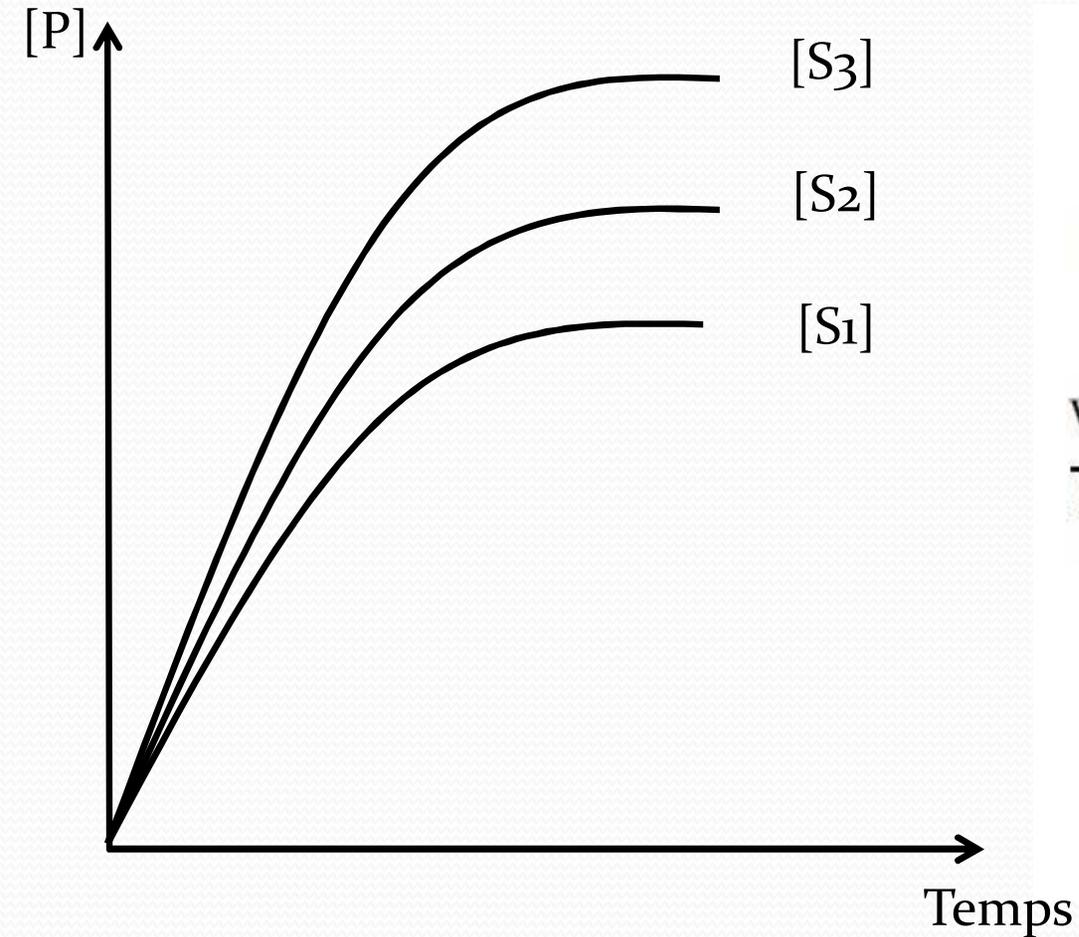


V_i est proportionnelle à la $[E]$ dans un premier temps, puis elle demeure constante pour des concentrations enzymatiques plus élevées

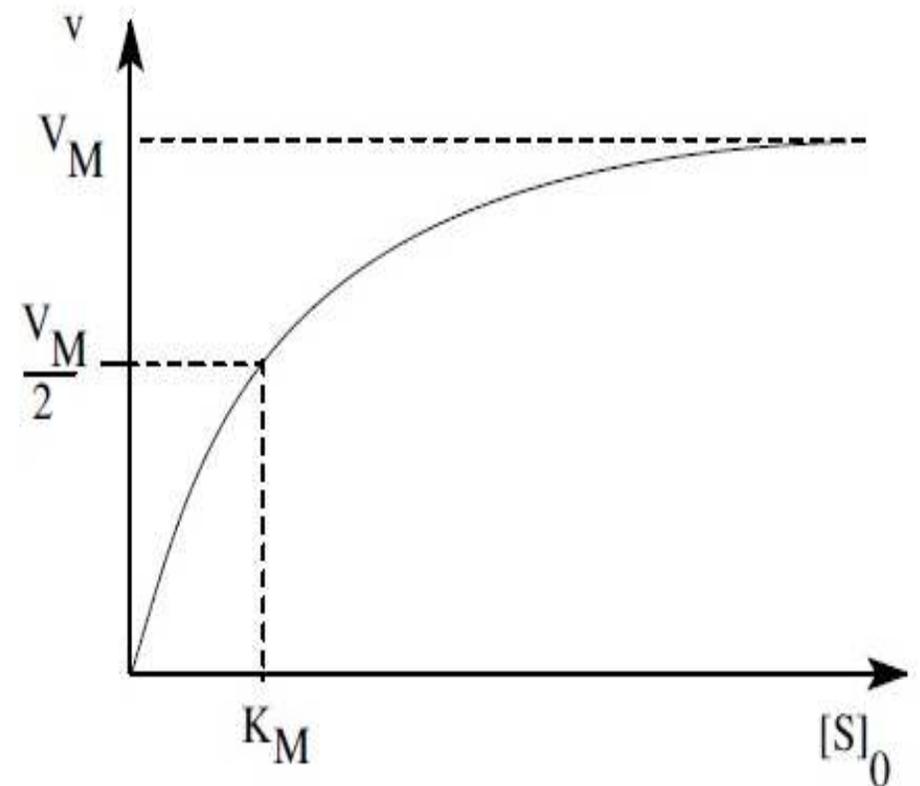
Influence de la concentration en enzyme sur la concentration en produit



Influence de la concentration croissante du substrat sur:



La concentration du produit formé



La vitesse initiale de la réaction

Influence de la concentration croissante du substrat

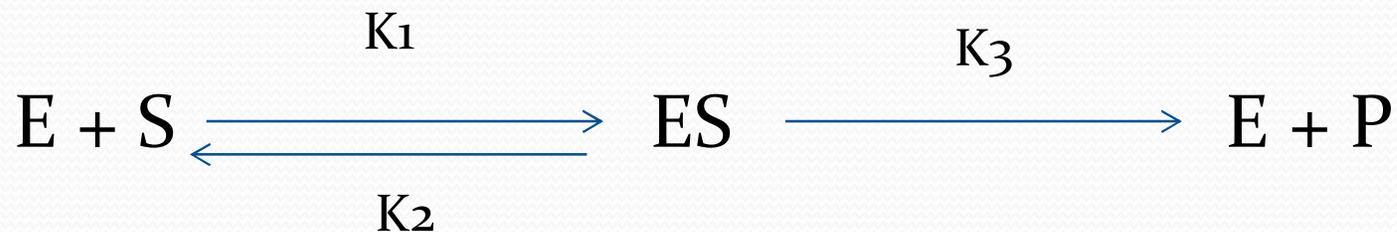
[S] est saturante

L'enzyme est en pleine activité et tout les sites actifs sont saturés

En pratique,

Détermination d'une activité enzymatique lorsque [S] est saturante (en excès)

Hypothèse de Michaelis-Menten



- Formation du complexe ES: $\text{E} + \text{S} \xrightleftharpoons[\text{V}_2]{\text{V}_1} \text{ES}$
(Etape rapide et réversible)
- Dissociation du complexe ES: $\text{ES} \xrightarrow{\text{V}_3} \text{E} + \text{P}$
 - Disparition de S
 - Apparition de P
 - Régénération de E

La constante de Michaelis

D'après la loi d'action de masse:

$$V_1 = k_1 [E][S]$$

$$V_2 = k_2 [ES]$$

Vitesse d'apparition des produits: $dP/dt = V_3 = k_3 [ES]$

La vitesse de disparition des substrat est égale à la vitesse d'apparition du produit

$$- dS/dt = dP/dt$$

La vitesse de disparition des substrat = $- dS/dt = V_1 - V_2$

La constante de Michaelis

$$V_1 - V_2 = V_3$$

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_3) [ES]$$

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_m$$

K_m : constante de dissociation du complexe ES
constante de Michaelis

Valeur de K_m est d'autant plus élevée que la:

- dissociation du complexe ES est forte
- Et donc que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est faible

L'équation de Michaelis

[Et]: Concentration de l'enz présente dans le système

$$[E] = [Et] - [ES]$$

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([Et] - [ES])[S]}{[ES]}$$

$$K_m + [S] = \frac{[Et][S]}{[ES]} \quad [ES] = \frac{[Et][S]}{K_m + [S]}$$

V = vitesse de la réaction enzymatique = V_3

$$V = V_3 = k_3 [ES]$$

$$V = \frac{k_3 [Et][S]}{K_m + [S]}$$

L'équation de Michaelis

La vitesse de la réaction dépend de la:

- concentration en enzyme totale
- Concentration en substrat
- De la constante de Michaelis

La vitesse est maximale lorsque [ES] sera la plus grande possible:

Lorsque la totalité de l'enzyme sera combiné au substrat

$$[Et] = [ES] \quad V_m = K_3 [Et]$$

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

Interprétation et intérêts

1- $V = \frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$

$K_m = [S]$ lorsque la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse max

2- Quand la concentration initiale en substrat est très supérieure à K_m (K_m négligeable)

$$V_i = V_m = k_{\text{cat}}[E_t]$$

(k_{cat} est l'efficacité catalytique)

3- Quand la concentration initiale en substrat est très inférieure à K_m ($[S]$ négligeable)

$$V_i = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \cdot [E_t][S]$$

k_{cat}/K_m : la constante de spécificité

Interprétation et intérêts

K_m est fonction des constantes de vitesse de chacune des étapes de la catalyse:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

Si $k_2 > k_3$: dissociation de ES est plus rapide que la formation de E et P

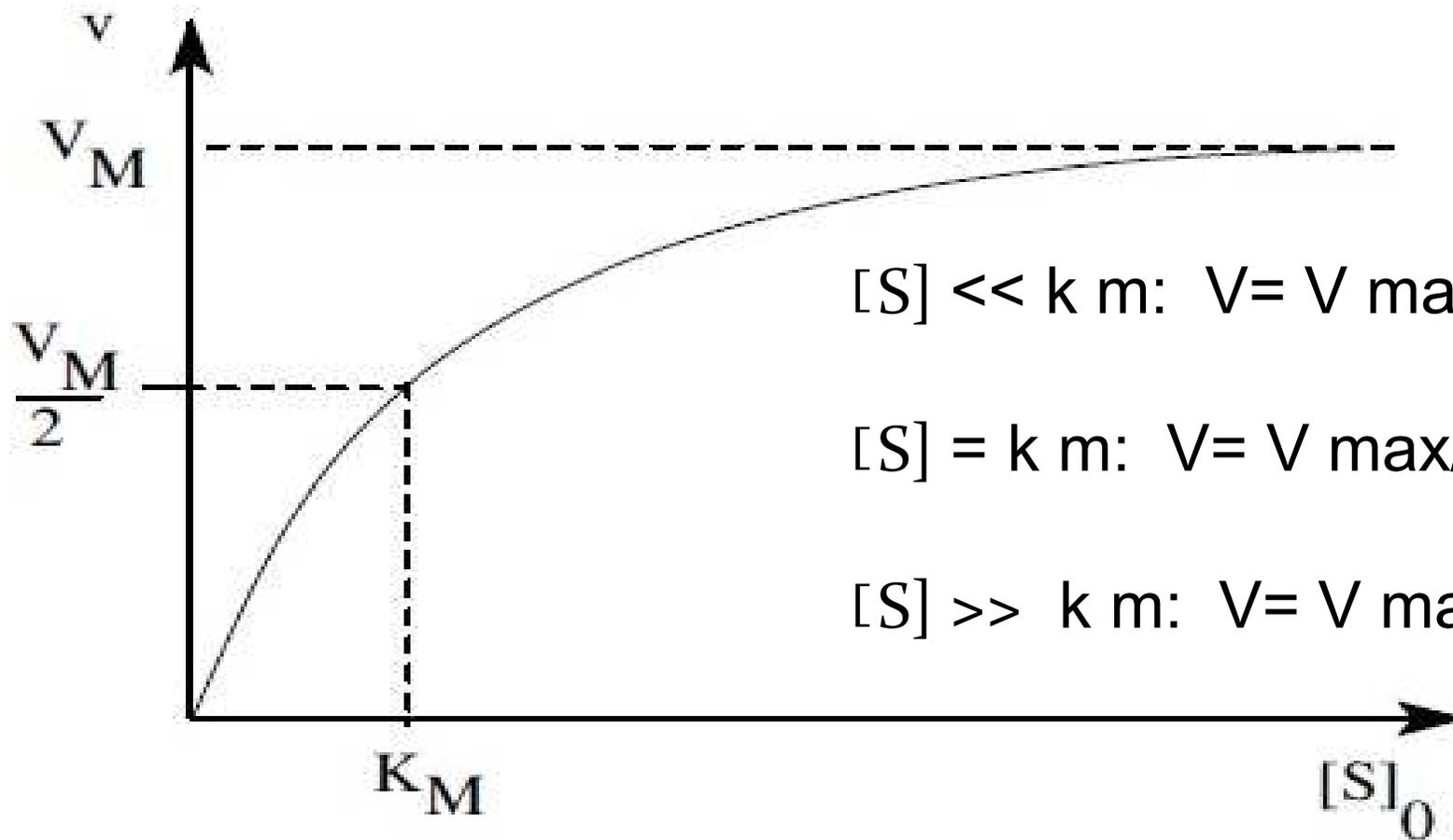
$$K_m = k_2/k_1 = \text{constante de dissociation } K_s$$

K_m : mesure de la stabilité du complexe ES

K_m élevé: liaison faible

K_m faible : liaison forte

Interprétation et intérêts



$[S] \ll k_m$: $V = V_{\max} \cdot [S] / K_m$

$[S] = k_m$: $V = V_{\max} / 2$

$[S] \gg k_m$: $V = V_{\max}$

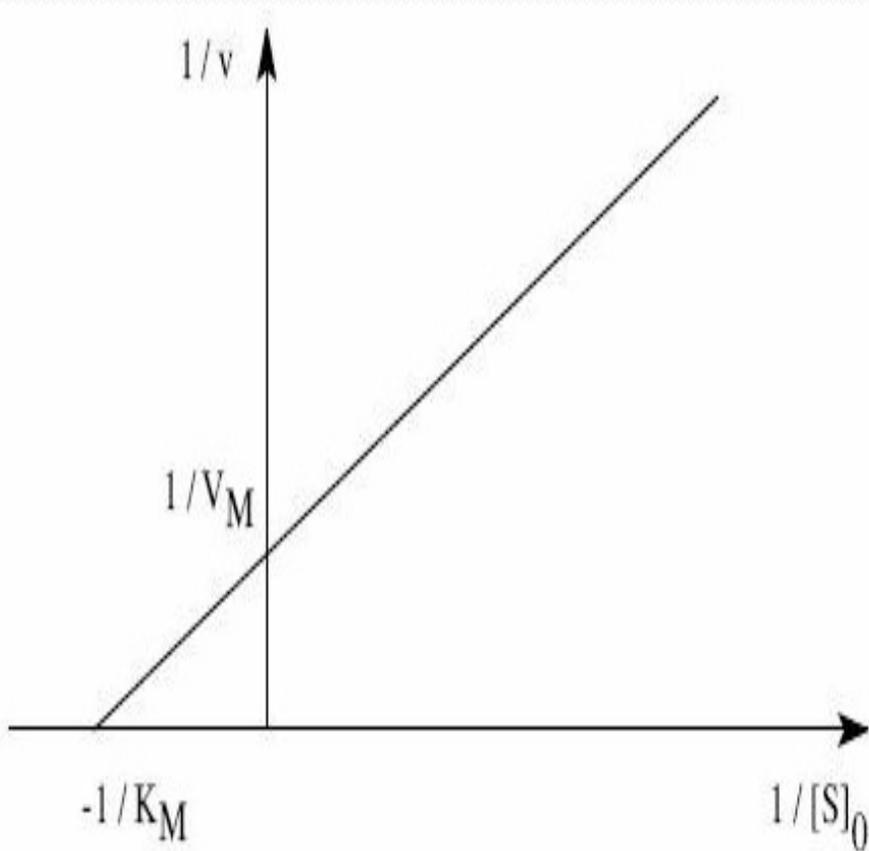
Méthode de détermination de la constante de Michaelis

1- Méthode arithmétique:

$$V = V_{\max}/2 \quad K_m = [S]$$

Méthode de détermination de la constante de Michaelis

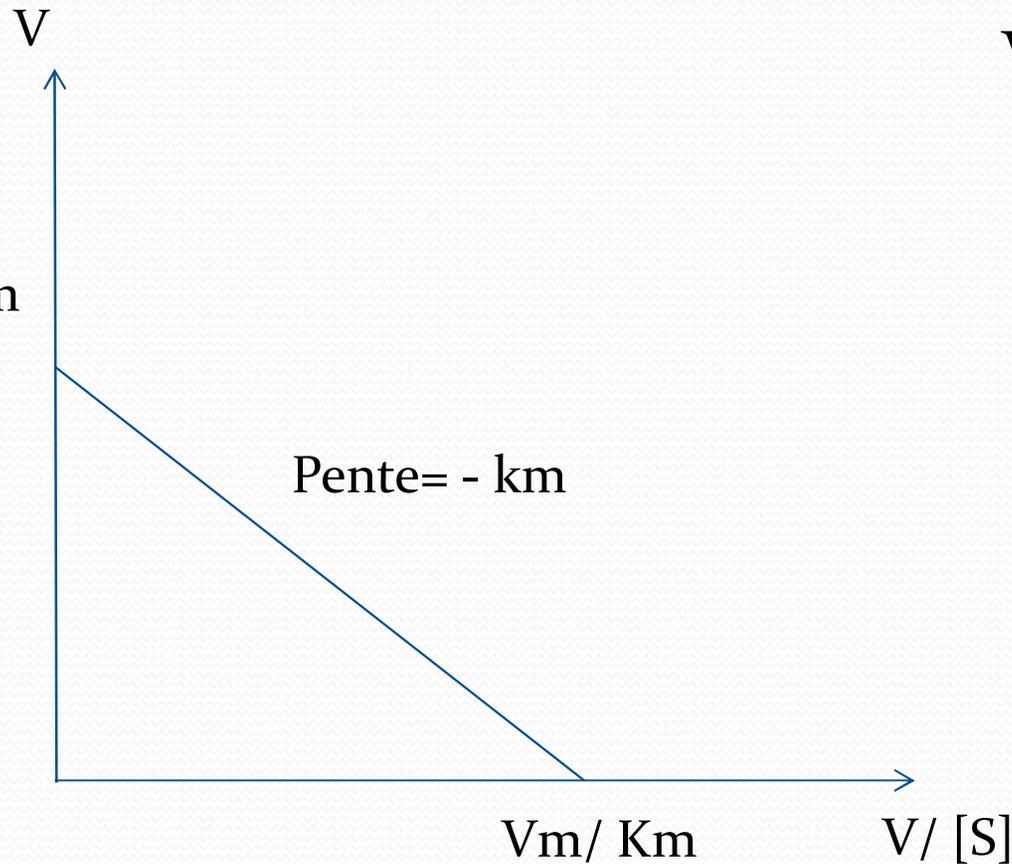
2- Méthode graphique de Line weaver et Burk:



$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_m}$$

Méthode de détermination de la constante de Michaelis

2- Méthode graphique d'Eadie Hofstee:



$$V = V_m - K_m \frac{V}{[S]}$$

Définition des unités enzymatiques

Unité internationale:

Quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une micromole de substrat par min, dans des conditions optimales de mesure

$$\text{UI} = \mu \text{ mol/min} = \text{Activité enzymatique} = V_{\text{max}} \\ \text{UI/ unité de volume}$$

Katal: Quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole de substrat par seconde

Définition des unités enzymatiques

Activité spécifique:

Nombre de molécules de substrat transformées par min et par milligramme d'enzyme

$$\frac{\mu \text{ mol/min}}{\text{mg de protéine}} = \frac{\text{UI}}{\text{mg de protéine}}$$

Mesure le degré de pureté d'une préparation enzymatique

Définition des unités enzymatiques

Activité spécifique moléculaire:

Nombre de molécules de substrat transformées par min et par molécule d'enzyme

$$\frac{\mu \text{ mol/min}}{\mu \text{ mol de protéine}} = \frac{\text{UI}}{\mu \text{ mol de protéine}}$$

Détermination de l'activité enzymatique

En cinétique:

$$D_o = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad C = D_o \cdot 1 / \varepsilon \cdot 1 / l$$

Activité enzymatique en UI/l =

$$\Delta D_o / \Delta t \cdot 1 / \varepsilon \cdot 1 / l \cdot V_t / V_e \cdot 10^6$$

Δt : temps de mesure en min

ε : coefficient d'absorption molaire

l : trajet optique

V_t : volume du mélange réactionnel total ou se fait la mesure

V_e : volume du milieu contenant l'enzyme à doser