

# Cinétique enzymatique

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

## II. DEFINITION

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.

### **Les différentes phases d'une réaction enzymatique:**

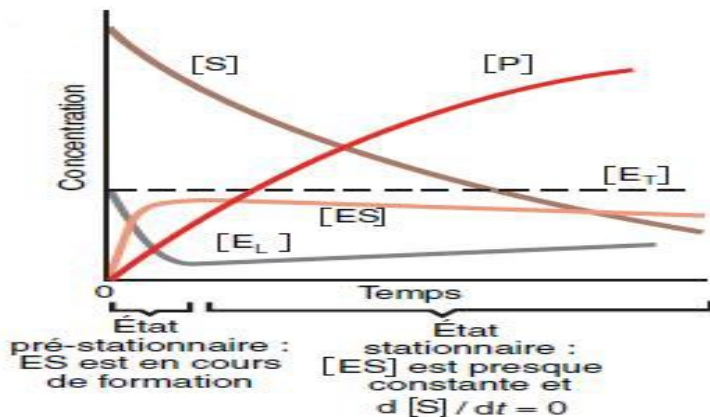
Soit la réaction catalysée par l'enzyme E qui transforme le substrat S en produit P:



-**La phase pré-stationnaire:** E mis en présence de S, combinaison E-S rapide (milliseconde)

-**La phase stationnaire:** enzyme saturée par S, la combinaison E-S à concentration maximale est constante

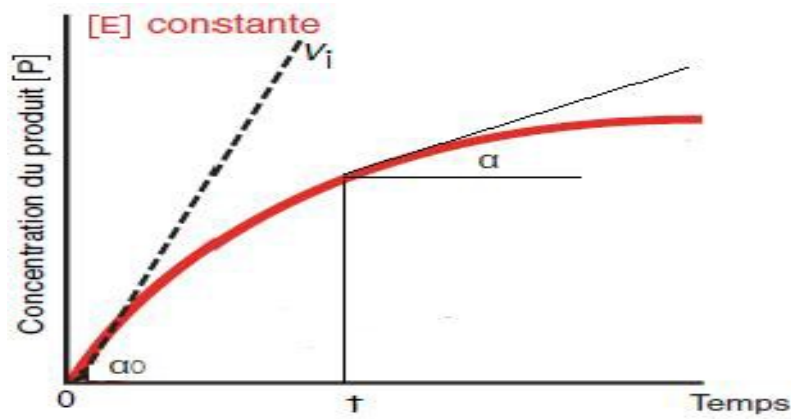
-**La phase post stationnaire:** concentration en S diminue significativement au bout d'un temps plus ou moins long



## III. Rappels de base:

### **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:

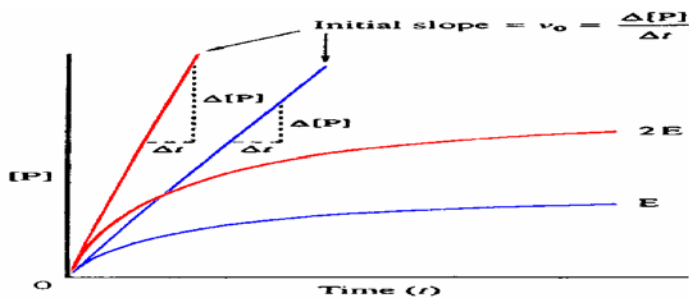


$$V = -\frac{dS}{dt} = \frac{dp}{dt} = k[S]$$

À l'instant t,  $v = t g \alpha$

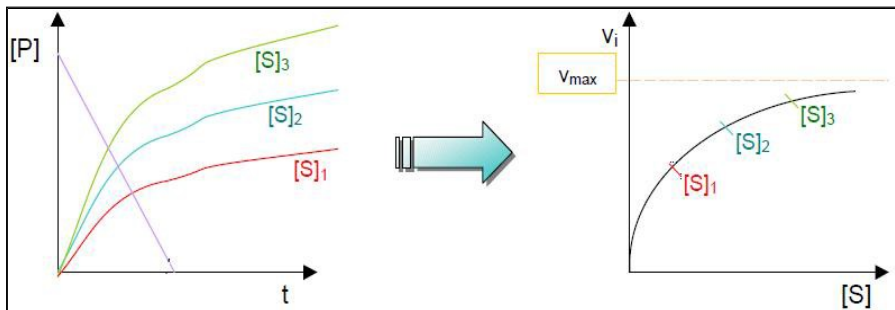
À l'instant t0, v est maximale, c'est la vitesse initiale de la réaction,  $v_i = t g \alpha_0$

**Influence de la concentration de l'enzyme sur  $v_i$ :**



**Influence de la concentration du substrat:**

À E cste, on répète la mesure de  $v_i$  à des concentrations croissantes de S:



**Ordre d'une réaction:**

La vitesse peut s'écrire :  $v = k[A]^\alpha [B]^\beta [C]^\gamma \dots$  Où

A, B, C .. sont les réactifs et les produits intervenant dans la réaction chimique.

k est appelée constante de vitesse

$\alpha, \beta, \gamma$  sont appelés les ordres partiels de réaction

$n = \alpha + \beta + \gamma + \dots$  n est appelé l'ordre (global) de la réaction

L'étude expérimentale des différentes courbes  $v = f([S])$ , permet de déterminer les ordres partiels de la réaction.

La manière la plus simple de déterminer l'ordre d'une réaction consiste à mesurer la vitesse v pour différentes concentrations de substrat [A].

Ensuite, en traçant le graphique de  $\log v$  en fonction de  $\log [A]$ , on obtient une droite dont la pente est égale à l'ordre de la réaction.

Soit une réaction élémentaire :  $A \rightarrow P$

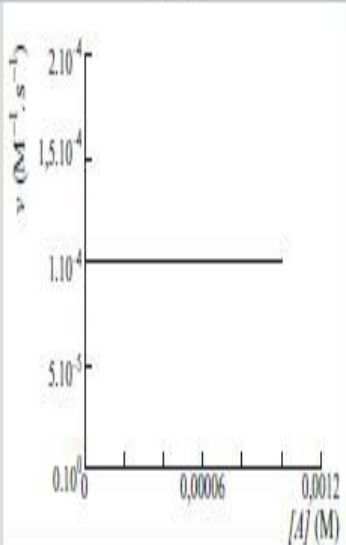
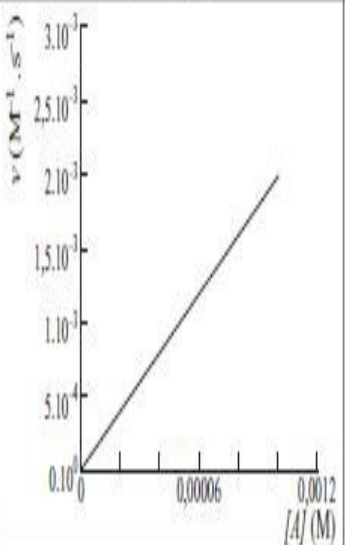
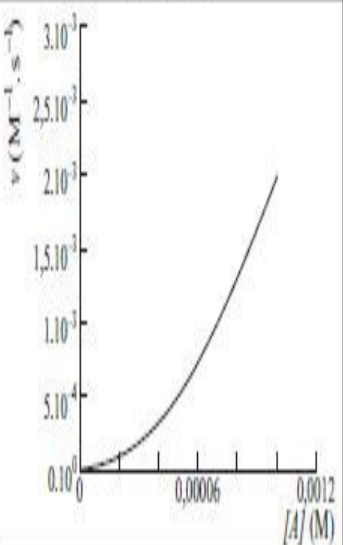
Si la réaction est **d'ordre zéro**, la vitesse de réaction ne dépend pas des concentrations des produits intervenant dans la réaction :

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

Si la réaction est de type I, la concentration des réactifs diminue exponentiellement en fonction du temps

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

Si la réaction est d'ordre II  $v_0 = k[A]^2$

	Ordre 0	Ordre 1	Ordre 2
Equation de vitesse	$v_0 = k$	$v_0 = k \cdot [A]$	$v_0 = k \cdot [A]^2$
Graphique $v$ en fonction de $[A]$			
Détermination de l'ordre de la réaction	$\log v_0 = \log k$	$\log v_0 = 1 \cdot \log [A] + \log k$	$\log v_0 = 2 \cdot \log [A] + \log k$
Unité de la constante de vitesse	$M \cdot s^{-1}$	$s^{-1}$	$M^{-1} \cdot s^{-1}$

## IV. Cinétique enzymatique

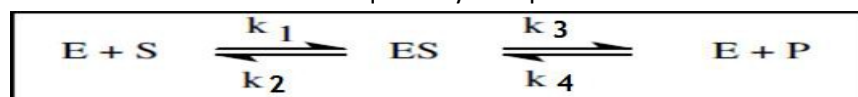
### Formule d'HENRI:

En 1902, Victor Henri suggère que dans la réaction enzymatique, l'hypothèse de la formation d'un complexe enzyme-substrat était nécessaire pour interpréter la forme hyperbolique des courbes vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat, les autres paramètres étant constants (concentration enzyme, température, pH, pression ..).

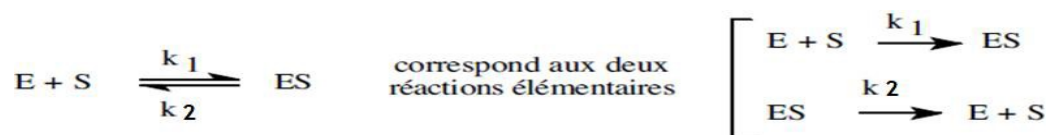
Ses travaux portaient sur la vitesse d'hydrolyse du saccharose par l'enzyme de la levure: l'**invertase** ( $\beta$ fructofuranosidase)

### L'hypothèse de Mickaelis-Menten:

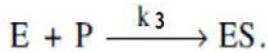
Le modèle de base de la cinétique enzymatique s'écrit ainsi :



où E est l'enzyme, S le substrat, P le produit de réaction et les  $k_i$  sont les constantes de vitesse des réactions élémentaires :



- 1) Les mesures cinétiques, la vitesse initiale ( $v_i$ ), pour  $[P] \cong 0$  et  $[S] \cong [S]_0$  où  $[S]_0$  est la concentration du substrat à l'instant initial. Cette hypothèse permet de négliger la réaction



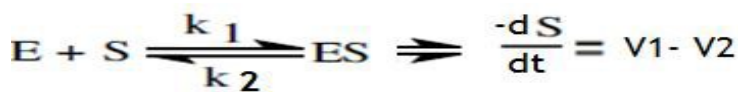
- 2)  $[S]_0$  est grande ( $\gg$ ) devant celle de l'enzyme  $[E]_0$ .  
 3) Dès l'addition de l'enzyme dans la solution de substrat, il s'établit un équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe (appelé complexe de Michaelis), on parle d'hypothèse du quasi-équilibre ou pré équilibre.

Le schéma réactionnel s'écrit ainsi:



La constante de Michaelis:

$v$  de disparition de S = à la différence de  $v_1$  et  $v_2$



La loi d'action de masse:  $v_1 = K_1 \cdot [E] \cdot [S]$  ;  $v_2 = K_2 [ES]$

La réaction:  $ES \rightarrow E + P$   $v_3 = K_3 \cdot [ES]$

$v$  de disparition de S =  $v$  d'apparition de P  $v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt}$

$$v_3 = v_1 - v_2 \quad \Rightarrow \quad K_3 \cdot [ES] = K_1 \cdot [E] \cdot [S] - K_2 [ES]$$

$$(K_2 + K_3)[ES] = K_1[E] \cdot [S]$$

$$\frac{K_2 + K_3}{K_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = K_m$$

C'est la constante de dissociation du complexe ES, elle mesure l'affinité de l'enzyme pour le substrat

L'équation de Michaelis-Menten:

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

$$[E] = [E]_T - [ES]$$

$$K_m \text{ devient donc: } K_m = \frac{([E]_T - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{[E]_T [S]}{[ES]} - [S]$$

$$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{Sachant que } v_i = v_3 = k_3 \frac{[E]_T [S]}{K_m + [S]}$$

Lorsque la solution est saturé en substrat,  $[ES] = [E]_T$  et donc  $v_i$  devient  $v_{max}$ :  $v_{max} = K_3 \cdot [E]_T$

$$v_i = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

C'est l'équation de Michaelis-Menten

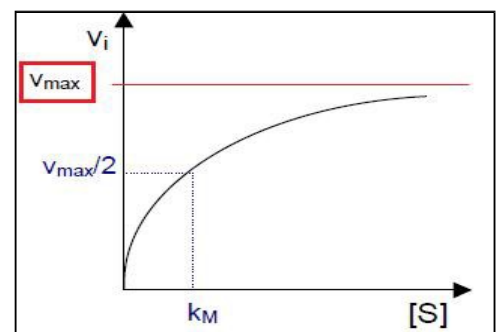
C'est l'équation de base de la cinétique enzymatique, elle décrit une hyperbole équilatère qui passe par l'origine et dont l'asymptote, lorsque  $s$  tend vers  $\infty$ , vaut  $v_i = v_{max}$

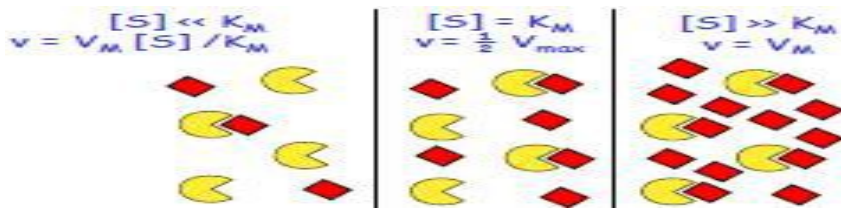
Quand  $[S] \ll K_m$

$V_i$  est une fonction linéaire de  $[S]$ . C'est donc en excès d'enzyme ( $[S] = 0.1 K_m$ ) que l'on dose un substrat.

Quand  $[S] \gg K_m$

$V_i$  est une fonction linéaire de  $[E]$ . c'est donc en excès de substrat ( $[E] = 100 K_m$ )





que l'on dose une enzyme.

**Méthodes de détermination de  $k_m$  et  $v_{max}$ :**

Expérimentalement  $v_{max}$  et  $K_m$  se déduisent de la  $v_i$  de la réaction dans une gamme de concentrations initiales de substrat.

Un grand nombre de méthodes de détermination de ces deux paramètres, tant graphiques que numériques, ont été mises au point:

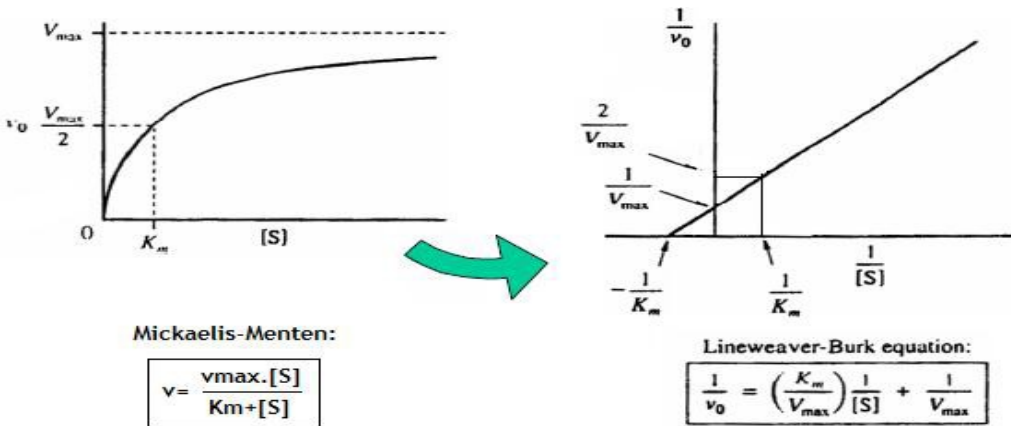
**Méthode arithmétique:**

Si  $v = v_{max}/2$   $K_m = [S]$

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

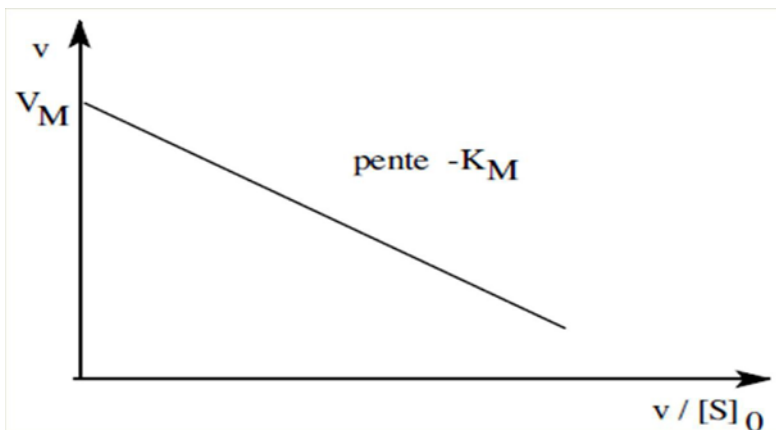
**v Méthode de Lineweaver et Burk:**

Cette équation s'obtient on inversant les deux membres de l'équation de Mickaelis-Menten: double inverse:



o ❖ **Méthode graphique d'Edie-Hofstee:**

Soit:  $v = v_{max} - K_m \frac{v}{[S]}$



### Signification des paramètres cinétiques:

#### ○ **Constante de Mickaelis Km:**

C'est la concentration du substrat lorsque l'enzyme est à demi saturation, i.e. lorsque la moitié des molécules de l'enzyme sont complexées au substrat.

Exprimé en M(mol/l), elle varie entre  $10^{-2}$  et  $10^{-8}$ , les valeurs les plus courantes  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$

Quand  $K_3$  est très petit devant  $K_2$  (dissociation de ES est plus rapide que la formation de P)  $K_m = \frac{K_2}{K_1}$

$K_m$  est donc inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

#### ♥ **vitesse maximale v<sub>max</sub>:**

C'est la vitesse de la réaction lorsque l'enzyme est à saturation, i.e. lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont complexées au substrat.

Elle permet de calculé la Kcat:

$K_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]}$  appelée également «turnover number»

( $min^{-1}$ ) : nombre de molécules de substrat converties en produits par unité de temps par un seul site actif de l'enzyme à saturation.

#### **L'efficacité catalytique:**

$K_m$  n'est pas satisfaisante:

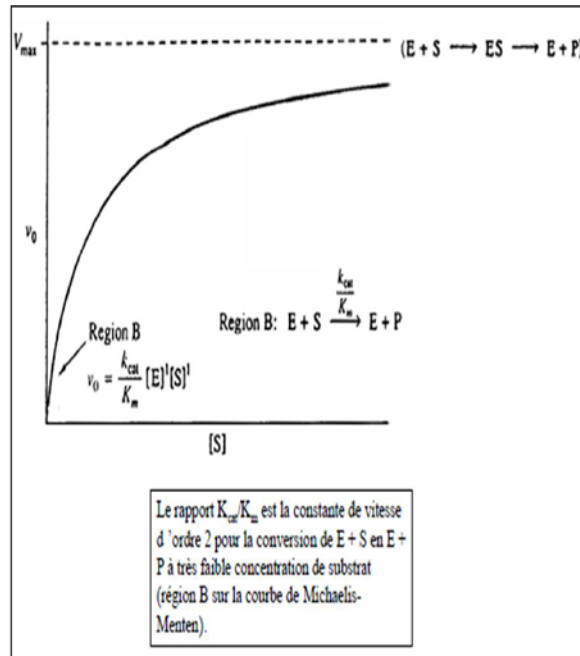
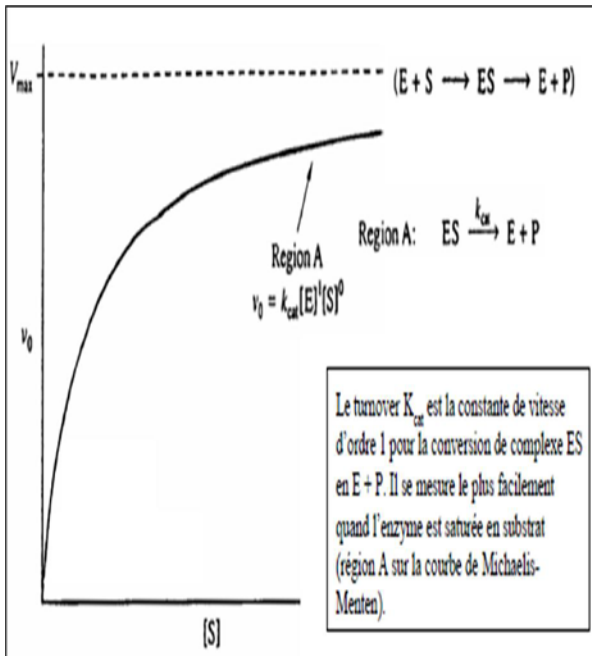
- Dépend de la concentration en S présents dans les cellules
- Une enzyme agissant en faible [S] a un  $K_m$  plus bas qu'une enzyme agissant en abondance de S

$K_{cat}$  n'est pas entièrement satisfaisante:

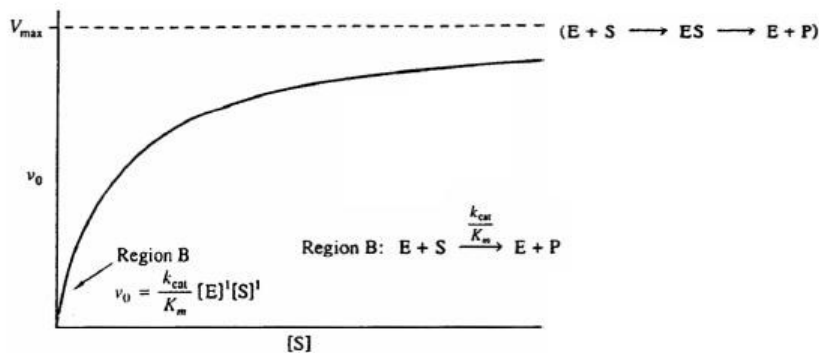
- 2enzymes catalysant des réactions différentes peuvent avoir la même  $K_{cat}$
- $K_{cat}$  reflète les propriétés enzymatique à saturation est moins utiles pour [S] basse.

l'efficacité est donnée par  $k_{cat}/K_m$ :

Quand  $[S] \ll K_m$ :  $v_0 = \frac{k_{cat} \cdot [E] T [S]}{K_m + [S]}$



efficacité et spécificité enzymatique



Le rapport  $k_{cat}/K_m$  est la constante de vitesse d'ordre 2 pour la conversion de E + S en E + P à très faible concentration de substrat (région B sur la courbe de Michaelis-Menten).

**V. Modulation de l'activité enzymatique:**

L'activité des enzymes peut être contrôlée par de nombreux processus :

- L'activité des enzymes dépend de leur concentration et de leur localisation dans la cellule, ou dans l'espace extracellulaire (fonction de la synthèse, dégradation des enzymes, de leur trafic intracellulaire et/ou de leur sécrétion).
- L'activité des enzymes dépend de leur environnement: concentration de substrat (cinétique + inhibition par excès de substrat), cofacteurs (ions, coenzymes), pH, température.

**Facteurs physique influençant la réaction enzymatique:**

- Effet du PH
- Effet de la température

**Facteurs chimiques influençant la réaction enzymatique:**



- Modifications covalentes
- Effecteurs: -activateur  
-inhibiteur

## Influence du pH:

### Sur l'enzyme:

Modification de l'état d'ionisation du site actif  
Modification de la structure III ou IV  
Dénaturation de la protéine aux pH extrêmes.

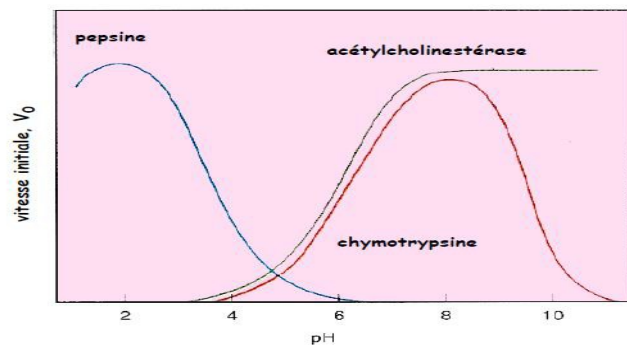
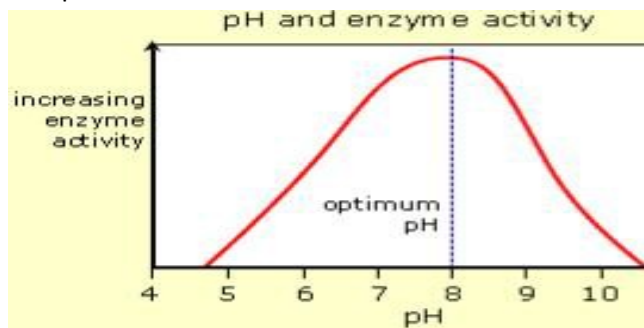
### Sur le substrat:

Modification de l'ionisation des groupements fonctionnels du S → empêche la liaison E-S

### Sur E-S:

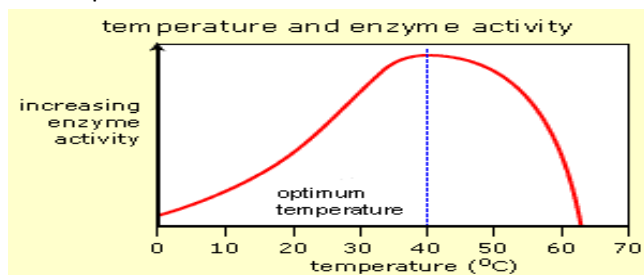
À un certain pH il y a dissociation du complexe

On définit pour chaque enzyme un pH optimal ou un intervalle de pH optimal (pH<sub>o</sub>) pour lequel l'activité enzymatique est optimale



## Effet de la température:

La vitesse d'une réaction double lorsque la température augmente de 10°C. Les réactions enzymatiques n'échappent pas à cette règle; toutefois les enzymes peuvent être dénaturées par une température élevée et perdre partiellement ou complètement leurs activités



## MODIFICATION COVALENTE

### REVERSIBLE:

phosphorylation/déphosphorylation

### Irréversible:

Protéolyse ménagée

On appelle zymogène le précurseur inactif d'une enzyme activée par protéolyse.

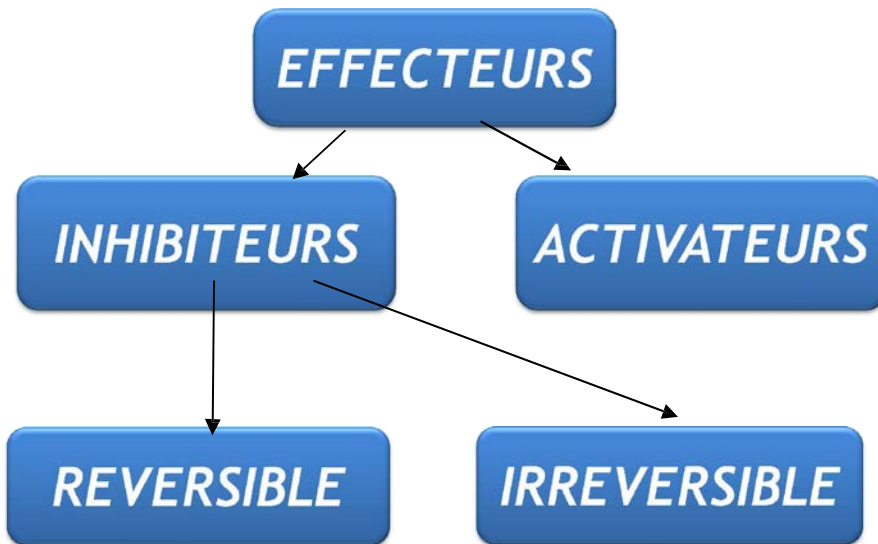
La plupart des protéases sont synthétisées sous forme de zymogènes.

L'élimination post sécrétoire de certains AA transforme les zymogènes inactifs en enzymes actives.

### Les agents chimiques effecteurs:

De nombreuses substances modifient l'activité d'une enzyme en s'y combinant, ce qui altère la liaison du substrat, ou/et altère sa constante catalytique.





**Les inhibiteurs:**

Tout effecteur qui en se liant à l'enzyme ralentit la vitesse de la réaction jusqu'à la stopper.

**Inhibiteurs irréversibles:**

Liaison covalente E-I : exemple : Aspirine

**LES INHIBITEURS SUICIDES:**

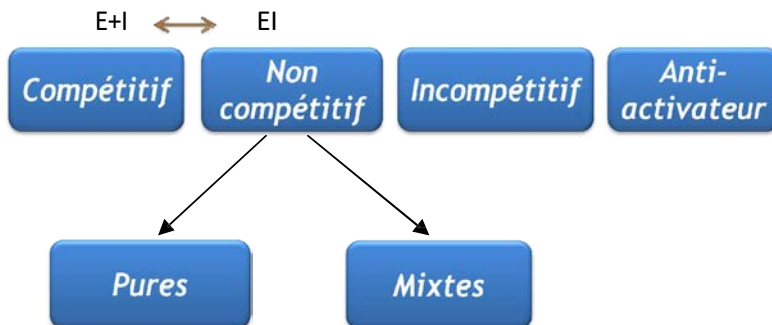
Constituent une classe spéciale d'inhibiteurs irréversibles

Ils sont inactifs jusqu'à ce qu'ils se lient au site actif de l'enzyme, ils effectuent alors les premières étapes de la réaction enzymatique mais au lieu d'être transformés en produit, ces inhibiteurs produisent une molécule très réactive qui se lie de manière irréversible à l'enzyme.

**Inhibiteurs réversibles:**

Ils ralentissent la vitesse de la réaction enzymatique

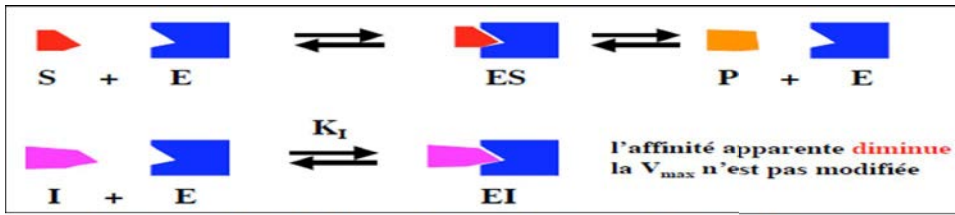
L'inhibition peut être levée dans des conditions réactionnelles particulières



**Inhibiteurs compétitifs:**

Possèdent une analogie structurale avec le substrat

Ils se lient de façon covalente au site actif de l'enzyme à la place du substrat, il y a formation de deux complexes

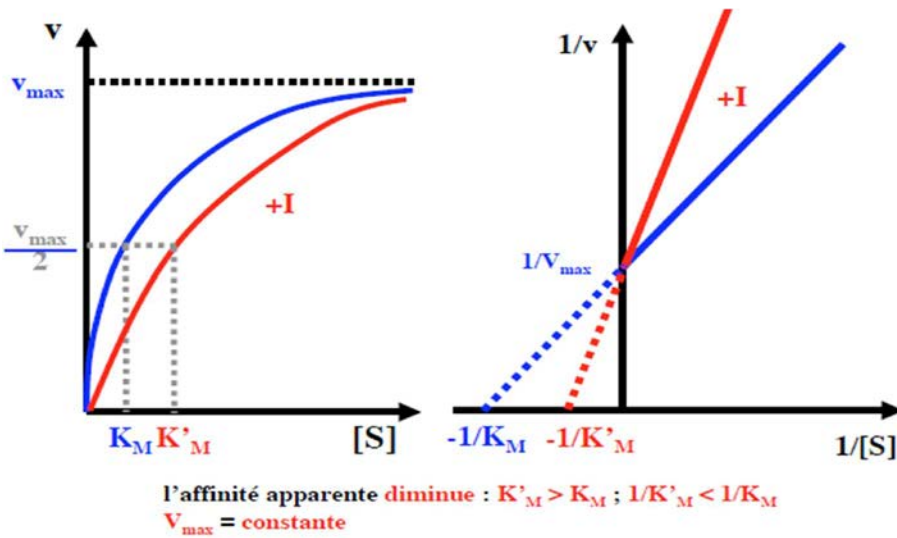


La vitesse de la catalyse enzymatique est ralentie par diminution des proportions du complexe ES

L'affinité de l'enzyme pour le substrat est, dc  $K_m$

$$K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

La  $v_{max}$  ne change pas, l'I peut être déplacé du complexe EI par excès de S



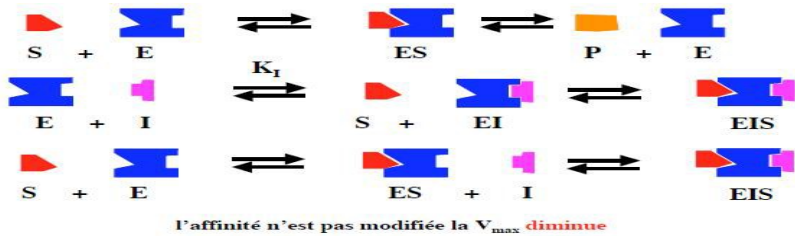
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

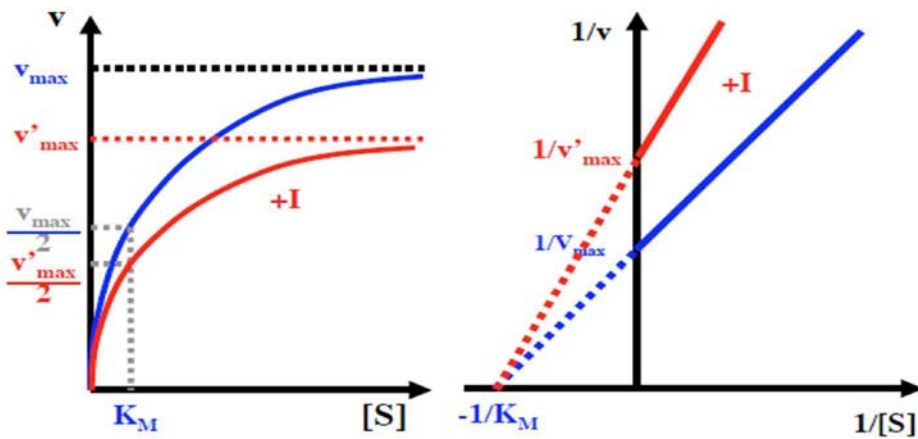
**a. Non compétitifs pures:**

Ne possèdent pas d'analogie structurale avec le substrat

Ils se lient sur l'enzyme en un site différent de celui du substrat, la liaison de l'inhibiteur n'affecte pas celle du substrat

3 complexes sont formés: ES, EI, et EIS





La  $v_{\max}$  diminue :  $v'_{\max} < v_{\max}$  ;  $1/v'_{\max} > 1/v_{\max}$   
 $K_M = \text{constante}$

$$V'_{\max} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

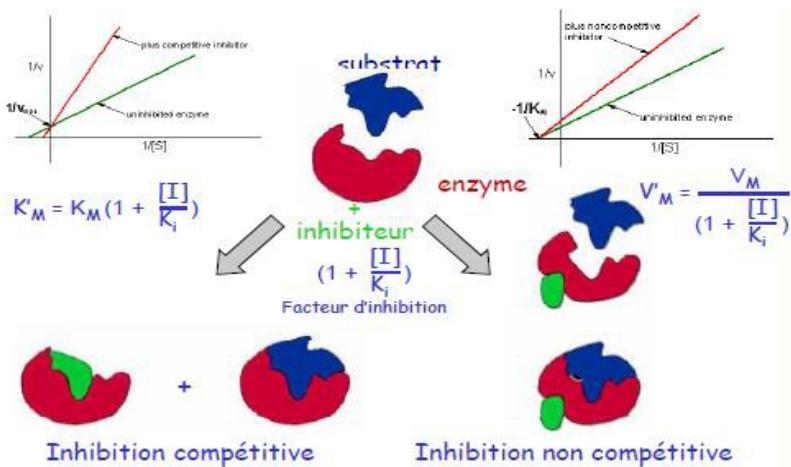
**b. Non compétitifs mixtes**

Ne possèdent pas d'analogie structurale

Ils se lient sur un site distinct mais proche de celui du substrat, donc la liaison de l'inhibiteur influence celle du substrat

La vitesse de la catalyse enzymatique est diminuée à la fois par diminution du turnover de l'enzyme et par diminution des proportions de ES

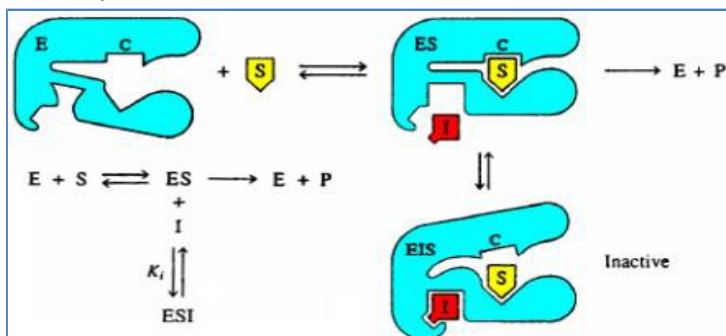
VMAX : diminuée KM : diminuée

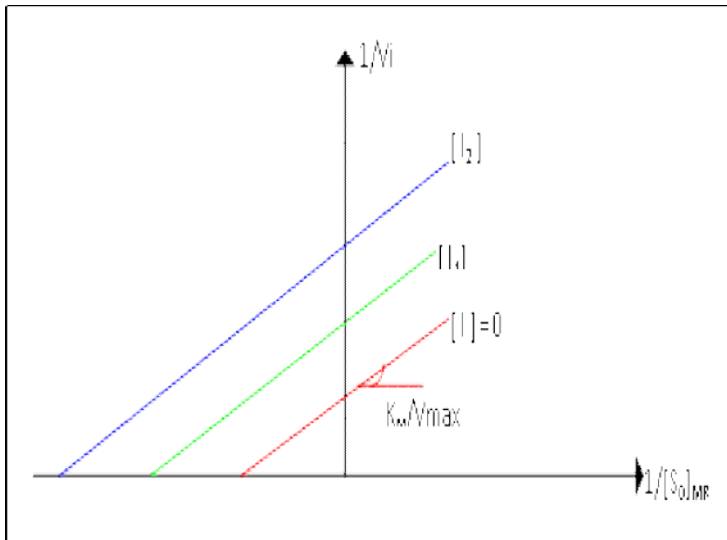


**Inhibiteurs incompétitifs:**

Ils ne se fixent pas à l'enzyme libre, mais uniquement à la combinaison ES

Les complexes formés sont ES et EIS





### Les Anti-activateurs :

Ce sont des inhibiteurs secondaires qui modifient l'activité enzymatique en réagissant avec un activateur présent dans le milieu:

Ex l'EDTA chélate les cations activateurs

Mg<sup>2+</sup> pour les kinases

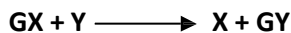
Zn<sup>2+</sup> pour l'anhydrase carbonique

Le NaF en présence de phosphate est un inhibiteur des enzymes activés par le Mg<sup>2+</sup> qu'il complexe sous forme de fluorophosphate de Mg

## VI. Cinétique enzymatique à plusieurs substrats:

Hormis quelques exemples de cinétique enzymatique à un seul substrat: réaction d'isomérisation, la majorité des cinétiques enzymatiques in vivo répondent à un mécanisme impliquant **deux ou plusieurs substrats**

Les enzymes adoptant ce modèle catalysent généralement le transfert du groupement G:



XG: 1er substrat      Y: 2ème substrat

X: 1er produit    GY: 2ème produit

La cinétique à deux et plusieurs substrats peut adopter trois mécanismes différents:

- Mécanisme à complexe ternaire(enzyme et deux substrats), à déplacement simple
- Mécanisme à complexe binaire, à déplacement double
- Mécanisme particulier *Theorell chance*.

### 1. Mécanisme à complexe ternaire:

Séquentiel, ou à transfert simple

Le groupement passe du substrat donneur vers le substrat accepteur

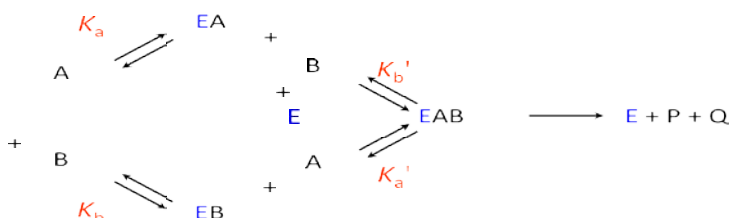
Tous les substrats doivent se fixer sur l'enzyme avant qu'aucun produit ne soit libéré

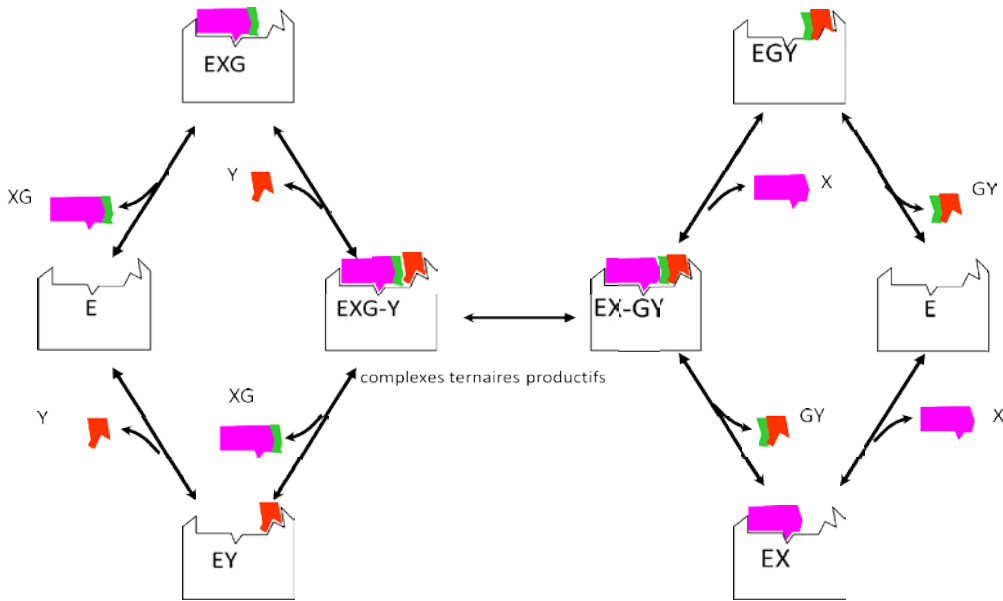
Selon l'existence d'un ordre précis de fixation de substrats ou de libération de produits, on distingue deux types:

- Bibi aléatoire
- Bibi ordonné

### Bibi aléatoire:

Il y a formation d'un complexe ternaire, mais la fixation du substrat et la libération du produit est aléatoire



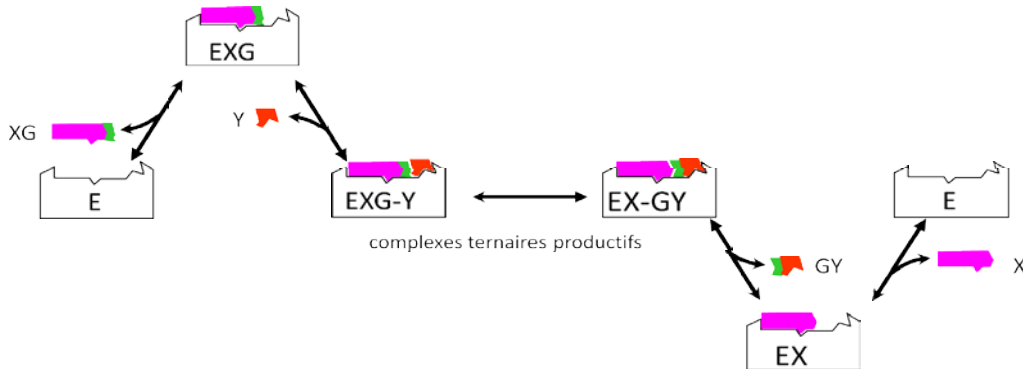


**Bibi ordonné:**

Il existe un ordre obligatoire de fixation

Ces mécanismes impliquent un ajustement induit, qui suggère que le second produit doit être un analogue structural du premier

Généralement le premier substrat est représenté par le Co-enzyme libre (co-substrat)

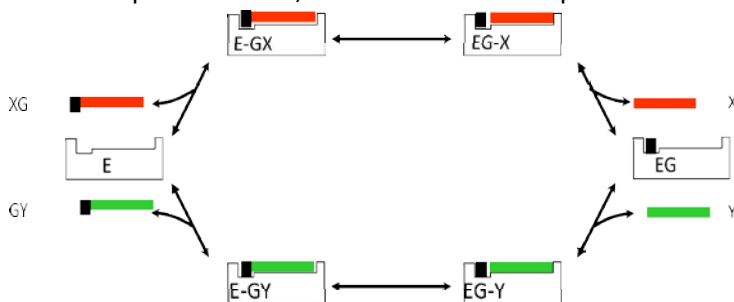


**2. Mécanisme à complexe binaire Ping Pong:**

Mécanisme à enzyme modifiée

Le terme ping-pong s'applique aux mécanismes dans lesquels un ou plusieurs produits sont libérés par l'enzyme avant que tous les substrats ne soient fixés

Pas de complexe ternaire, il existe un double déplacement:



**Mécanisme particulier: Theorell Chance**

Il adopte les mêmes équations que la mécanisme séquentiel

Le premier produit est relargué par la fixation du dernier substrat

La transformation rapide du complexe ternaire, et donc sa présence en très faible concentration, confère à ce mécanisme une ressemblance avec les réactions à complexes binaires

Un complexe ternaire se forme mais sa décomposition afin de libérer le premier produit est si rapide que la concentration du complexe ternaire est cinétiquement négligeable.