

Cinétique enzymatique à un seul substrat

Introduction :

Les études de cinétique enzymatique sont des méthodes qui permettent de déterminer le mode d'action des enzymes. En fait, l'étude de la variation de la vitesse en fonction de la concentration de substrat permet de caractériser les enzymes ; car elle met en évidence l'existence de relations mathématiques entre cette concentration et la vitesse ; d'où on peut tirer des valeurs caractéristiques de chaque enzyme.

1. Evolution de la réaction enzymatique :

La réaction enzymatique s'effectue en deux étapes :

1^{ère} étape : correspond à la formation d'un complexe enzyme-substrat selon une réaction réversible et rapide.

2^e étape : correspond à la décomposition de ce complexe en enzyme et produit. C'est l'étape la plus lente ; elle règle la vitesse de la réaction.



1.1. Variation de la quantité de produit formé en fonction du temps :

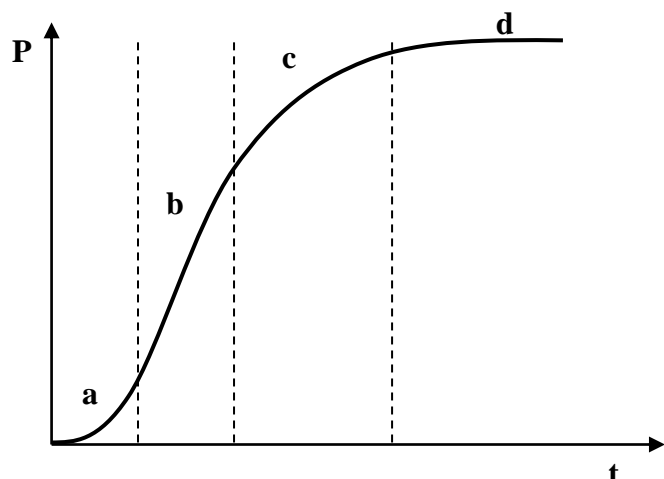
Cette cinétique montre plusieurs phases :

Phase préstationnaire (a) :

C'est la phase la plus courte pendant laquelle se forment les premières molécules de complexe ES jusqu'à ce que la concentration de ce complexe intermédiaire atteigne une valeur constante (phase stationnaire).

Phase stationnaire (b) :

C'est la phase pendant laquelle la vitesse d'apparition du produit P est constante. Selon la théorie de Michaelis-Menten, la concentration du complexe ES est constante.



Phase d'inhibition par les produits de la réaction (c) :

C'est la phase pendant laquelle la concentration des produits de la réaction n'est plus négligeable et, par conséquent, la réaction inverse tend à diminuer leur concentration.

Phase d'équilibre :

C'est la phase pendant laquelle l'équilibre est atteint. Les quantités de S et de P sont constantes. Dans ces conditions :

$$k_1 [S] = k_{-1} [P]$$

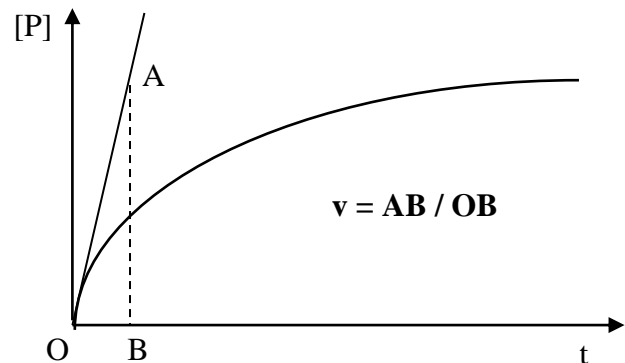
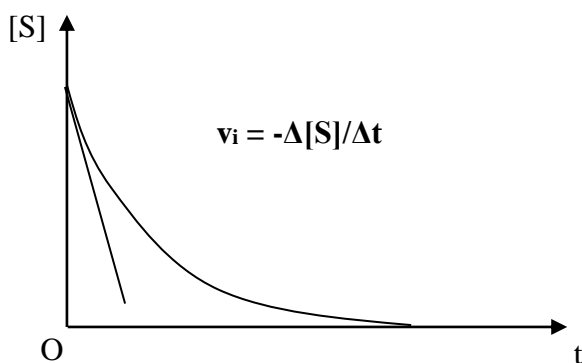
1. 2. Principe de la mesure des vitesses de la réaction enzymatique :

On mesure la vitesse d'une réaction en dosant la concentration de substrat qui disparaît ou la concentration du produit qui apparaît par unité de temps. Divers facteurs doivent être rigoureusement contrôlés (pH et température). En fait, en matière de catalyse enzymatique, on appelle la vitesse de la réaction « activité enzymatique ».

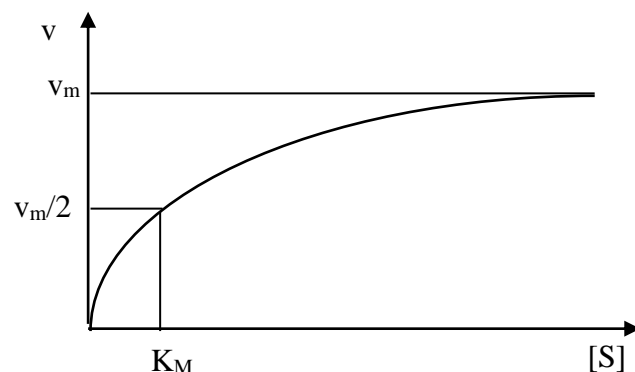
1. 3. Mesure de la vitesse initiale d'une réaction :

En pratique, après mise en contact de l'enzyme avec le substrat et dosage de la concentration du produit formé à des temps successifs, on trace la courbe de la variation de la vitesse en fonction du temps.

Ainsi, la vitesse initiale est mesurée par la pente de la tangente à cette courbe au temps 0.

**1. 4. Variation de la vitesse en fonction de la concentration en substrat :**

Pratiquement, les études cinétiques s'effectuent en présence d'un large excès de substrat (par exemple : 1000 fois plus de molécules de substrat que de molécules d'enzyme).



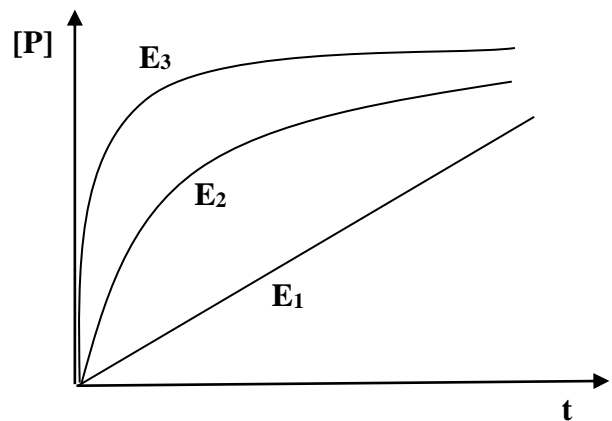
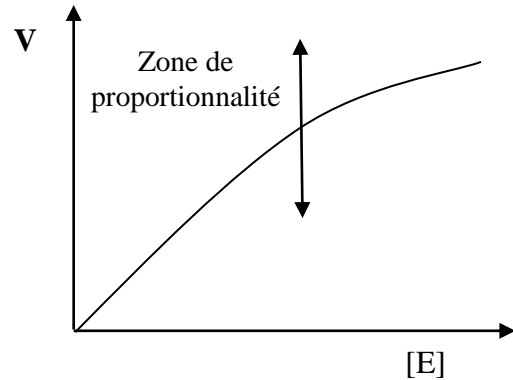
En traçant la courbe de la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat mise en présence de l'enzyme, on obtient une hyperbole, avec une montée rapide et une zone asymptotique qui correspond à la *vitesse maximale* (v_m).

1.5. Variation de la vitesse en fonction de la concentration de l'enzyme :

L'objectif d'étudier la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'enzyme est de déterminer la zone de proportionnalité.

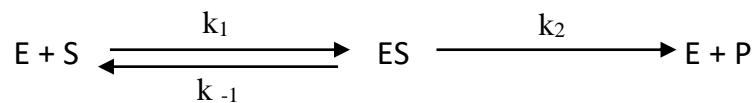
Dans cette zone, la réaction est d'ordre 1 par rapport à la concentration de l'enzyme et l'équation de Michaelis est applicable.

Il est important de savoir, qu'expérimentalement, il faut travailler dans ces conditions.



2. Équation de Michaelis-Menten-Henri (1913) :

La réaction enzymatique s'écrit :



Donc :

La vitesse de la formation du complexe ES : $v_1 = d[ES]/dt = k_1 [E] [S]$

La vitesse de la disparition du complexe ES : $v_2 = - d[ES]/dt = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$

A l'état stationnaire, la concentration du complexe ES reste constante :

$$v_1 = v_2 \implies k_1 [E] [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

$$\implies [E] [S] / [ES] = k_{-1} + k_2 / k_1 \dots\dots\dots (1)$$

On appelle ce rapport *constante de Michaelis* (K_M)

$K_M = k_{-1} + k_2 / k_1$

On a, à tout instant, la concentration d'enzyme totale est :

$$[E_t] = [E] + [ES] \text{ (équation de conservation de la protéine)}$$

Donc : $[E] = [E_t] - [ES] \dots \dots \dots (2)$

En remplaçant [E] par sa valeur dans l'équation (1) :

$$\begin{aligned} ([E_t] - [ES]) [S] / [ES] = K_M & \implies [E_t] [S] - [ES] [S] = K_M [ES] \\ & \implies K_M [ES] + [S] [ES] = [E_t] [S] \\ & \implies (K_M + [S]) [ES] = [E_t] [S] \\ & \implies [ES] = [E_t] [S] / (K_M + [S]) \dots \dots \dots (3) \end{aligned}$$

A l'équilibre dynamique, la vitesse de la réaction est celle de l'étape la plus lente (2^e étape : catalytique), elle est exprimée par :

$$v = k_2 [ES] \dots \dots \dots (4)$$

Quand on augmente [S], [ES] tend vers [E_t] et v tend vers la vitesse maximale v_m (v_m = k₂ [E_t]). Donc, en multipliant l'équation (3) par k₂ :

$$k_2 [ES] = k_2 [E_t] [S] / (K_M + [S])$$

D'où : $v = v_m [S] / (K_M + [S])$ c'est l'équation de **Michaelis-Menten-Henri**

La fonction de saturation :

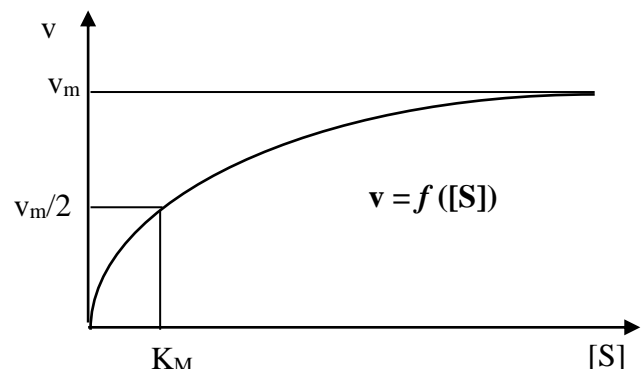
Elle est donnée par la formule suivante : $Y_s = [S] / [S] + K_m = v/v_m$

La fraction Y_s de sites actifs occupés par le substrat est égale à (v/v_m). La vitesse maximale est donc la capacité maximale de l'enzyme à catalyser la réaction considérée.

3. Les représentations graphiques :

3. 1. La représentation Michaelienne (hyperbolique, 1913) :

Ce type de courbe est difficile à tracer et à utiliser pour mesurer v_m et K_M. L'asymptote horizontale de l'hyperbole, pour les grandes valeurs de [S₀], permet d'avoir la valeur de v_m et celle de K_M.



3. 2. La représentation de Hanse- Woolf (1932) :

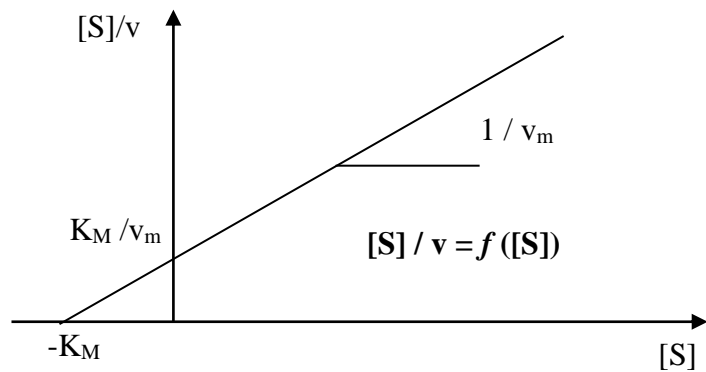
Elle utilise l'équation de Michaelis-Menten.

$$\text{On a : } v = v_m [S] / (K_M + [S])$$

$$\text{D'où : } K_M + [S] = v_m [S] / v$$

$$[S] / v = (K_M + [S]) / v_m$$

$$\boxed{[S] / v = [S] (1 / v_m) + K_M / v_m}$$



3. 3. La représentation de Lineweaver-Burk (1935) :

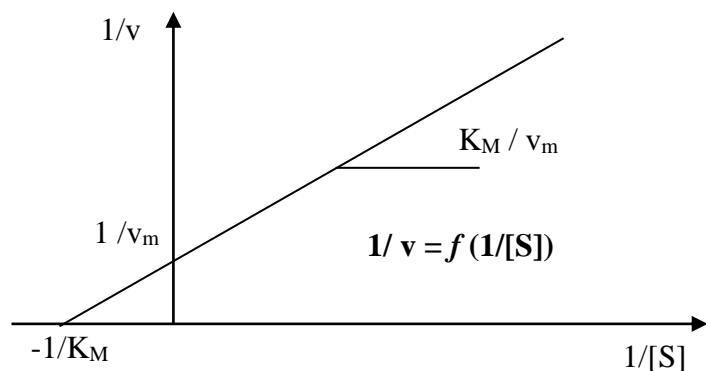
C'est la représentation des doubles inverses. Elle utilise la relation inverse de l'équation de Michaelis-Menten.

$$\text{On a : } v = v_m [S] / (K_M + [S])$$

$$\text{D'où : } 1/v = (K_M + [S]) / v_m [S]$$

$$1/v = K_M / v_m [S] + [S]/v_m [S]$$

$$\boxed{1/v = (K_M / v_m) (1/[S]) + 1/v_m}$$



Expérimentalement, il suffit de 5 à 6 mesures de $1/v$ avec des concentrations initiales de substrat différentes pour pouvoir tracer la droite représentative.

3. 4. La représentation d'Eadie-Hofstee (1942-1959) :

Comme les précédentes, cette représentation utilise aussi l'équation de Michaelis-Menten.

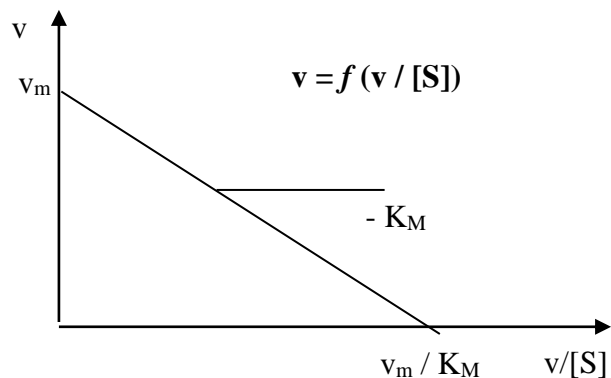
$$\text{On a : } v = v_m [S] / (K_M + [S])$$

$$\text{D'où : } v (K_M + [S]) = v_m [S]$$

$$v K_M + v [S] = v_m [S]$$

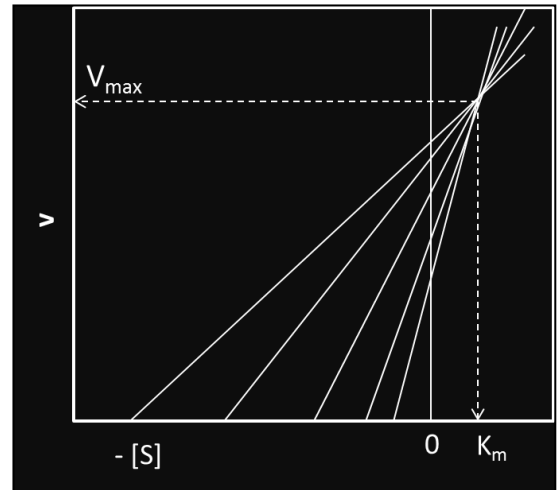
$$v [S] = v_m [S] - v K_M$$

$$\boxed{v = -K_M (v / [S]) + v_m}$$



3. 5. La représentation d'Eisenthal et Cornish-Bowden (1974) :

- ✓ Elle s'effectue en portant en ordonnée les valeurs de la vitesse (v) et en abscisse les valeurs négatives de la concentration en substrat ($-[S]$).
- ✓ Chaque couple de valeurs v et $[S]$ est relié par une droite.
- ✓ L'extrapolation de chaque droite permet l'obtention d'un seul point d'intersection dont l'abscisse est égale à K_m et l'ordonnée à V_{max} .



4. Signification des constantes cinétiques :

4. 1. La vitesse maximale (v_m) :

La vitesse maximale est obtenue lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont saturées par le substrat (le site actif de toutes les molécules d'enzyme est occupé par le substrat). Elle est exprimée par :

- Soit, l'unité internationale (**UI**), qui correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole (μM) de substrat par minute (min).
- Soit, le katal (**kat**), selon le système international (SI), qui correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une mole (M) de substrat par seconde (S).

$$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} = 10^{-6} / 60 \text{ M} \cdot \text{S}^{-1} = 16.67 \times 10^{-9} \text{ kat}$$

Donc

1UI = 16.67 nkat

4. 2. La constante de Michaelis (K_M) :

Par définition, K_M est la concentration de substrat qui fait prendre la réaction enzymatique une vitesse égale à la moitié de la vitesse maximale :

$$[S] = K_M \implies v = v_m/2$$

Elle traduit l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Elle varie de 10^{-8} à 10^{-2} . Donc plus K_M est faible plus l'affinité est grande. Autrement dit, il suffit d'une faible concentration de substrat pour que la vitesse maximale soit atteinte. Elle a la dimension d'une concentration (μM , M, ...)

4. 3. Constante catalytique (k_{cat}) :

C'est la constante de vitesse de la 2^e étape de la réaction enzymatique (étape catalytique donnant le produit) :

$$k_{cat} = k_2$$

Elle représente la fréquence à la quelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique lorsqu'elle est saturée en substrat (*turn over*) : $k_{cat} = v_m / [E_t]$

Elle donne la mesure de l'efficacité de la catalyse par l'enzyme étudiée. En fait, k_{cat} est une constante de vitesse du 1^{er} ordre, donc elle est mesurée en (t^{-1}). ($1/k_{cat}$) est la durée d'un cycle catalytique lorsque l'enzyme est saturée en substrat.

4. 4. La constante de spécificité (r_{sp}) :

Cette constante reflète la spécificité globale d'une enzyme vis-à-vis d'un substrat. Elle est donnée par la formule suivante :

$$r_{sp} = k_{cat} / K_M$$

Cette constante permet de sélectionner le ou les meilleurs substrats d'une enzyme, dans ce cas la valeur la plus élevée doit être recherchée.

5. Les activités enzymatiques :

5. 1. Activité catalytique (Z) :

Elle est appelée aussi *catabilité*. C'est la quantité d'enzyme capable de transformer une micromole de substrat par minute (UI) ou d'une mole par seconde (katal).

5. 2. Activité catalytique spécifique (Z_{sp}) :

Appelée aussi *catabilité spécifique*, c'est l'activité enzymatique rapportée à une autre grandeur de la préparation enzymatique, souvent la masse, parfois le volume. En fait, la masse utilisée est celle de la protéine enzymatique pure ou celle de la protéine contenue dans le système réactionnel.

Cette activité spécifique permet de suivre les progrès de la purification de l'enzyme (enrichissement E). Elle est exprimée en (UI.g⁻¹) ou (kat.kg⁻¹).

$$Z_{sp} = Z / \text{MasseProtéine}$$

5. 3. Activité catalytique molaire (Z_m) :

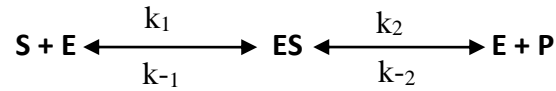
On l'appelle aussi *activité catalytique moléculaire* ou encore *nombre de renouvellement* (*turn over number*). C'est l'activité catalytique rapportée à la quantité de matière de la protéine enzymatique exprimée en mole. Cette grandeur exprime le nombre de molécules de substrat transformé par unité de temps et par molécule d'enzyme à la saturation. Elle est exprimée en (t^{-1}).

$$Z_m = Z / [\text{protéine}] = Z / [E_t]$$

6. Réversibilité de la réaction enzymatique – relation de Haldane :

La plupart des réactions sont des équilibres. Ces réactions restent réversibles en présence d'enzyme.

A partir d'un modèle Michaélien, un équilibre peut s'envisager sous la forme :



La constante d'équilibre globale est K_{eq} ; elle est égale à : $K_{eq} = [E] [P] / [E] [S]$

A l'équilibre, on a :

$$k_1 [E] [S] = k_{-1} [ES] \quad \text{et} \quad k_2 [ES] = k_{-2} [E] [P]$$

D'où :

$$[E] [S] = (k_{-1}/k_1) [ES] \quad \text{et} \quad [E] [P] = (k_2/k_{-2}) [ES]$$

Par conséquent :

$$K_{eq} = [E] [P] / [E] [S] = (k_2/k_{-2}) [ES] / (k_{-1}/k_1) [ES] = k_1 k_2 / k_{-1} k_{-2}$$

$$\text{Donc : } K_{eq} = k_1 k_2 / k_{-1} k_{-2}$$

Cette réaction enzymatique réversible comporte deux constantes de Michaelis :

- Pour la réaction aller ($S \longrightarrow P$) : $Km^S = k_{-1} + k_2 / k_1$
- Pour la réaction retour ($P \longrightarrow S$) : $Km^P = k_{-1} + k_2 / k_{-2}$

En outre, deux vitesses maximales sont définies dans les sens aller (v_m^S) et retour (v_m^P) :

$$v_m^S = k_2 [E_t] \quad \text{et} \quad v_m^P = k_{-1} [E_t]$$

Le calcul des rapports v_m/Km aboutit à :

$$v_m^S / Km^S = k_2 [E_t] / (k_{-1} + k_2 / k_1) = k_1 k_2 [E_t] / k_{-1} + k_2$$

$$v_m^P / Km^P = k_{-1} [E_t] / (k_{-1} + k_2 / k_{-2}) = k_{-1} k_{-2} [E_t] / k_{-1} + k_2$$

Le rapport de ces deux expressions (rapports) permet d'écrire :

$$(v_m^S / Km^S) / (v_m^P / Km^P) = (k_1 k_2 [E_t] / k_{-1} + k_2) / (k_{-1} k_{-2} [E_t] / k_{-1} + k_2) = k_1 k_2 / k_{-1} k_{-2}$$

Ce résultat constitue la relation de Haldane publiée en 1930 sous la forme :

$$v_m^S Km^P / v_m^P Km^S = k_1 k_2 / k_{-1} k_{-2} = K_{eq}$$