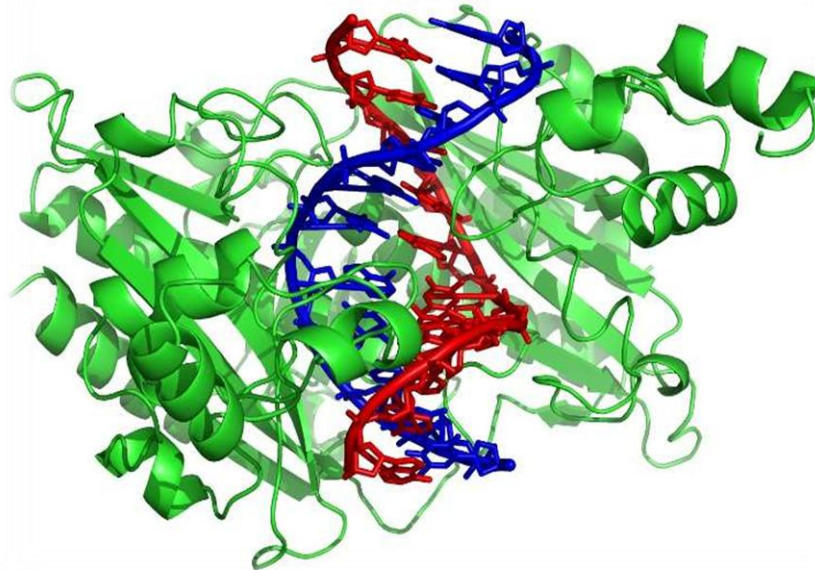


Cinétique enzymatique



Dr Berzou

Année universitaire : 2022/2023

□ Objectif

- Définir la vitesse initiale, la vitesse maximum, la constante de MICHAELIS.
- Activité enzymatique.

I. Introduction

- La cinétique chimique est l'étude de la vitesse à laquelle la réaction a lieu.
- Certaines réactions sont totales et très rapides voire instantanées, comme les explosions.
- D'autres sont tellement lentes qu'elles durent plusieurs années (comme la formation de la rouille), voire plusieurs siècles (comme la formation du charbon ou du pétrole).

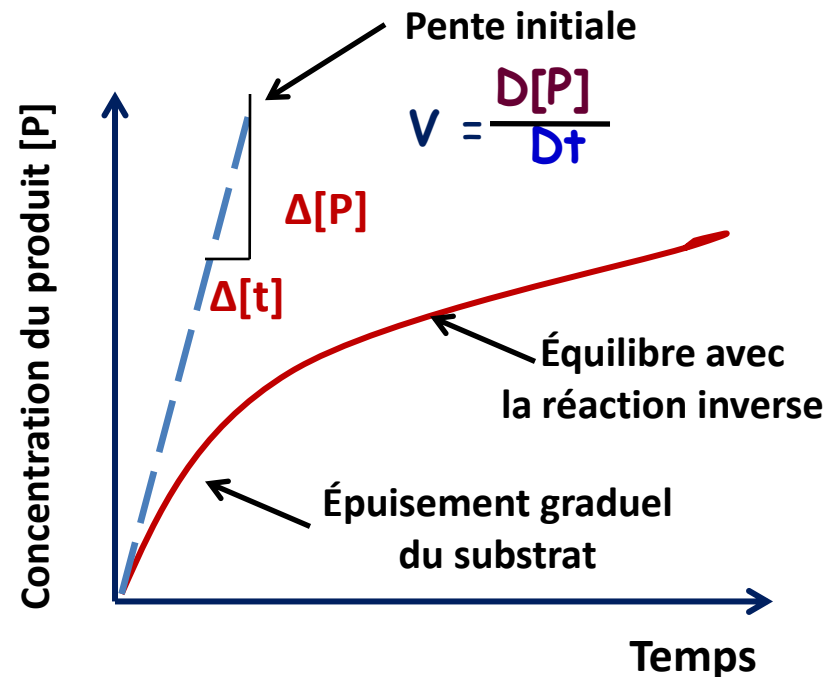
1. Vitesse de réaction

➤ Les expériences de cinétique enzymatique donnent des relations entre la **vitesse de réaction V**, c'est-à-dire la quantité de **substrat S** disparu ou la quantité de **produit P** formé par unité de temps au cours d'une réaction.

$$V = - \frac{D[S]}{Dt} = \frac{D[P]}{Dt}$$

➤ Plusieurs facteurs influent sur la vitesse d'une réaction :

- 1- Concentration en substrats
- 2- Température
- 3- Les catalyseurs



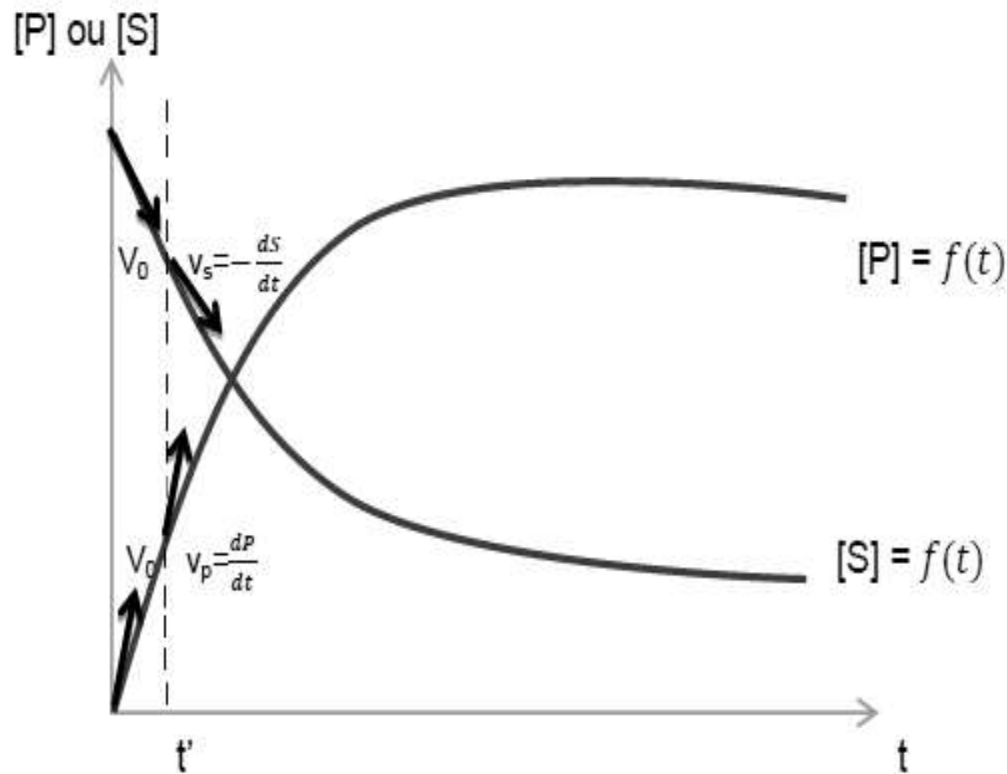


Fig. 1 Vitesse de réaction et la notion de vitesse initiale V_0

➤ La vitesse enzymatique ou le taux catalytique est définie par la quantité de substrat transformé (dS) par unité de temps (dt) ou la quantité de produit apparu (dP) par unité de temps (dt).

1.2- Phases de la réaction enzymatique

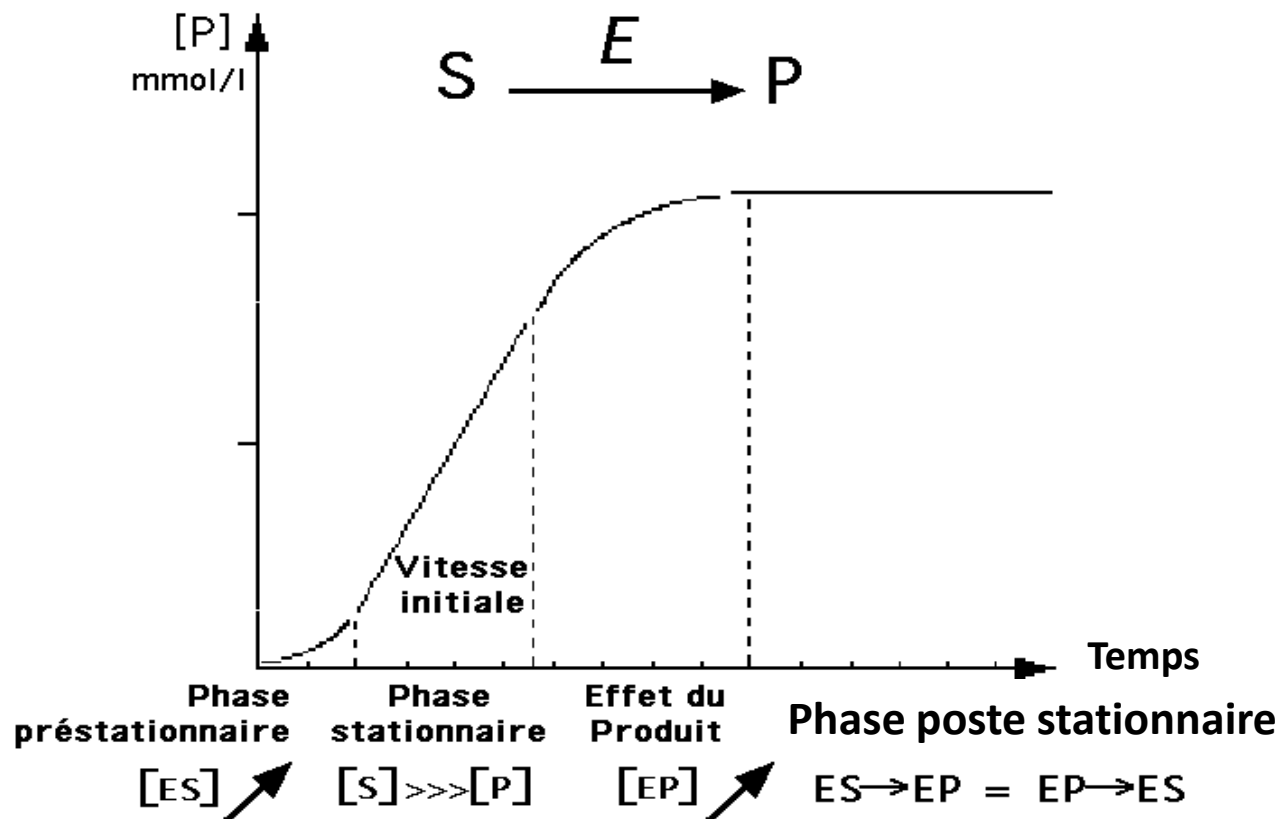
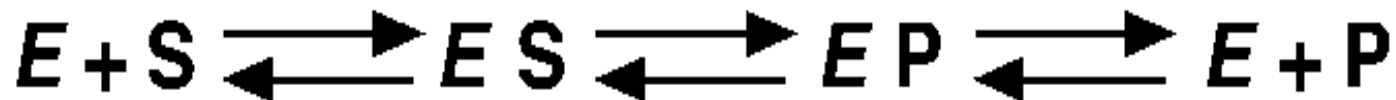


Fig. 2 Phases de la réaction enzymatique



➤ Une enzyme (E) transforme un substrat (S) en produit (P).

1. Phase pré-stationnaire: Le substrat se fixe sur l'enzyme.

2. Phase stationnaire

- Enzyme saturée par le substrat
- Combinaison ES est à concentration maximale constante.
- Vitesse de la réaction est constante: Vitesse initiale (Reste constante tant que le substrat est à concentration saturante de l'enzyme).

3. Phase post-stationnaire

- Diminution de S de manière significative au bout d'un temps plus au moins long selon l'enzyme.

➤ **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**

1.3- Vitesse initiale

➤ Durant la phase stationnaire, la vitesse est constante : on l'appelle **vitesse initiale**.

➤ C'est une phase de la réaction où un nombre maximum des molécules de l'enzyme sont liées à des molécules de substrat.

$$V_0 = \frac{[\text{Enzyme + Substrat}]}{[\text{Enzyme totale}]}$$

➤ Le rapport enzyme lié sur enzyme total est maximum. Dans ces conditions, l'efficacité catalytique de l'enzyme est la plus grande, donc la **vitesse initiale** est la plus grande de toutes les vitesses qu'on peut mesurer en fonction des phases de la réaction.

➤ La vitesse de la réaction enzymatique augmente avec la concentration de substrat jusqu'à atteindre la vitesse maximale V_{max} (saturation de l'enzyme par S).

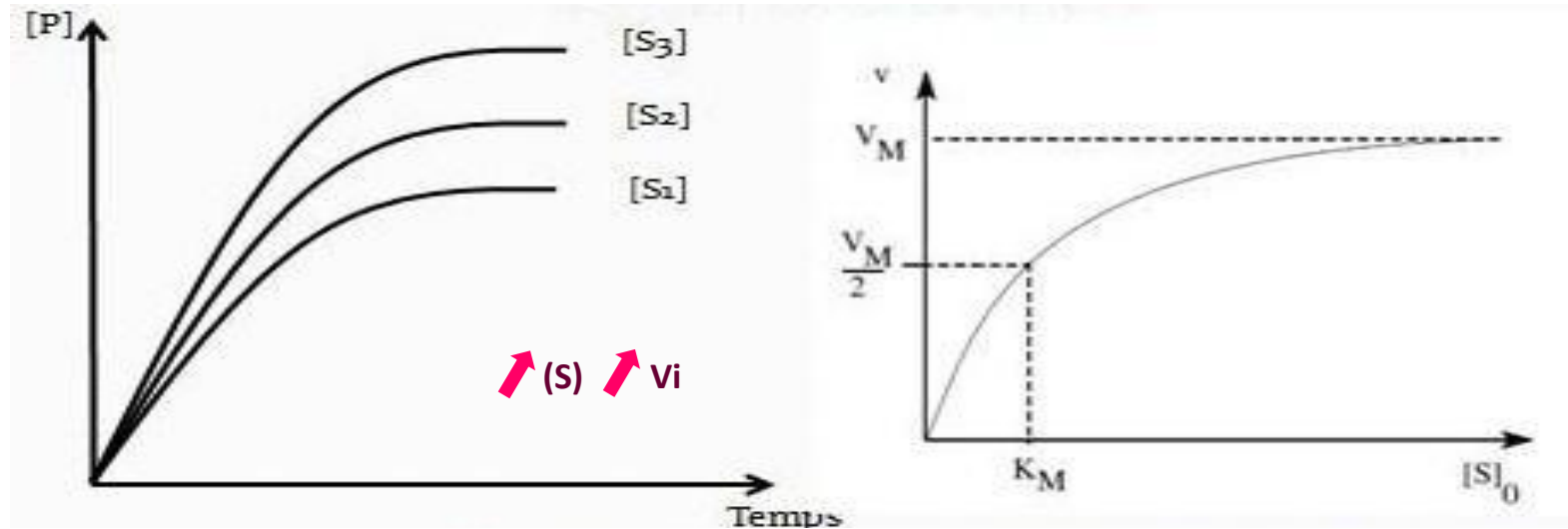


Fig.3 Influence de la concentration en substrat sur la vitesse initiale

➤ Lorsque la concentration l'enzyme augmente => vitesse initiale augmer aussi.

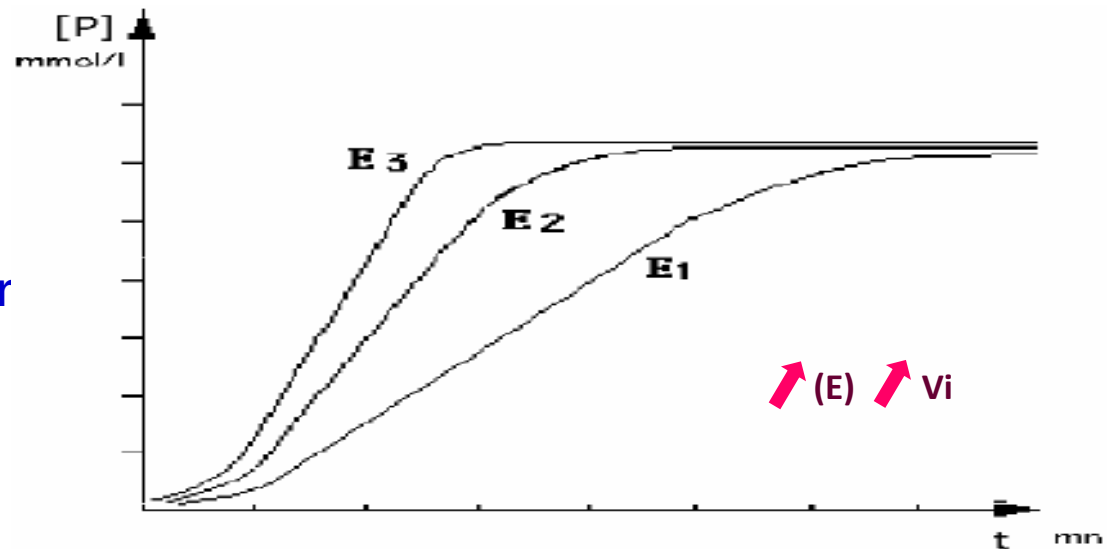
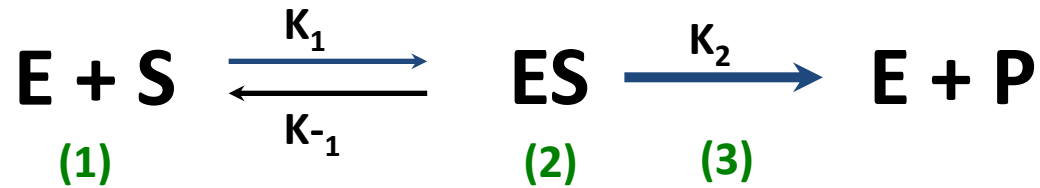


Fig. 4 Influence de la concentration en enzyme

1.3 Théorie du complexe stéréospécifique & propriétés cinétiques des enzymes



à $t=0$, la concentration du complexe enzyme-substrat, $[\text{ES}]$, est égale à 0

à $t=0$, la concentration en produit est égale à 0

k_1 : Constante de vitesse pour la formation d'ES : constante d'association E-S

k_{-1} : Constante de vitesse pour la décomposition d'ES en E + S : constante de dissociation E-S

k_2 : La constante de vitesse de la seconde étape, la constante catalytique (k_{cat}) ou turnover de l'enzyme, détermine la vitesse de la réaction enzymatique. C'est la constante de vitesse pour la décomposition d'ES vers la formation des produits.

2. Équation de michaelis-menten

- En 1903 Victor Henri a publié le premier modèle mathématique qui décrit avec succès les résultats des cinétiques enzymatiques.
- En 1913, Michaelis et Menten dans une publication plus renommée ont repris et adapté le travail de Henri pour pouvoir calculer facilement les paramètres de la cinétique enzymatique.
- L'équation de Michaelis-Menten, plus justement l'équation de Henri-Michaelis-Menten, constitue aujourd'hui la clef de voûte de l'analyse enzymatique.

Leonor Michaelis



Maud Leonora Menten



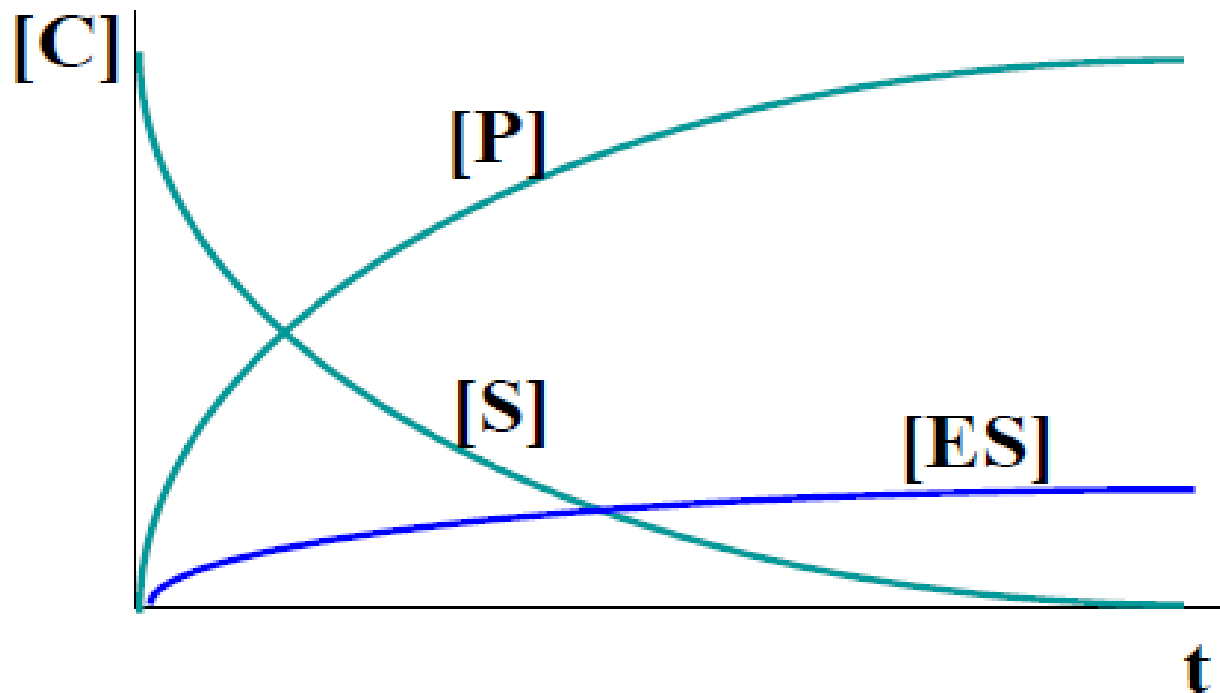
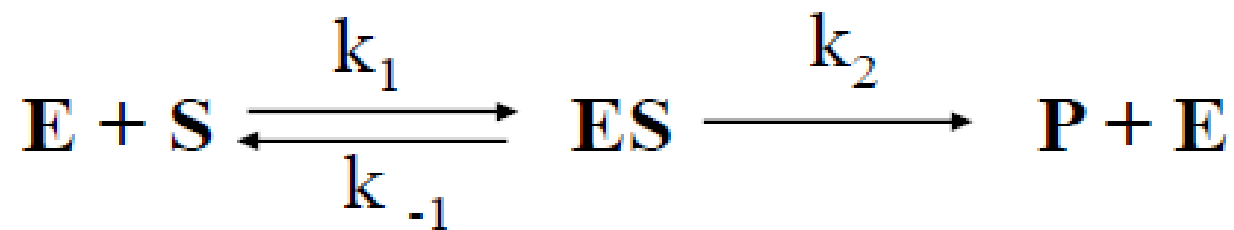


Fig. 5 Modèle Michaelis et Menden



❖ 2.1 calcul mathématique de la vitesse l'équation de Michaelis-Menten



➤ La vitesse d'apparition du produit P (vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme) dépend de k_2 et de la concentration en ES.

$$V_i = k_{\text{cat}} [\text{ES}] \dots\dots\dots(1)$$

➤ On considère que V_i est une fraction de V_{max} et on s'appuie sur les considérations ci-après à la concentration saturante de substrat, $V_i = V_{\text{max}}$; de plus, tout l'enzyme est complexé et donc $[\text{ES}] = [\text{ET}]$

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [\text{ET}] \dots\dots\dots(2)$$

➤ La $[\text{ES}]$ dépend de sa vitesse de formation et de sa vitesse de disparition.

➤ D'après la loi d'action des masses :

$$V_{\text{formation ES}} = k_1 [\text{E}] [\text{S}]$$

$$V_{\text{disparition ES}} = k_{-1} [\text{ES}]$$

➤ La vitesse de disparition du substrat est égale à la différence des vitesses V_1 et V_2 (V_d et V_f).

➤ [ES] se forme à partir de [E] + [S] et se décompose soit en [E] + [S], soit en [E] + [P]

➤ Vitesse de formation de ES: $V_f = k_1 \cdot [E] \cdot [S]$

➤ Vitesse de dégradation de ES: $V_d = (k_{-1} + k_2) \cdot [ES]$

➤ à l'état stationnaire de ES = constante, [ES] atteint rapidement une valeur constante (condition dite de «*steady state*»)

➤ Donc $V_d = V_f$

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

$$[ES] = [E] \cdot [S] \cdot \frac{k_1}{(k_{-1} + k_2)} = [E] \cdot [S] / K_m \longrightarrow [ES] = [E] \cdot [S] / K_m \quad (3)$$

$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1 = \text{constante de Michaelis \& Menten}$

K_m : constante de Michaélis, constante de dissociation du complexe enzyme- substrat.

➤ Soit : $[Et]$ la concentration totale de l'enzyme. La concentration libre de l'enzyme sera : $[E] = [Et] - [ES]$

$$[ES] = [E] \cdot [S] / K_M$$

$$[ES] = ([E]_T - [ES]) \cdot [S] / K_M = [E]_T \cdot [S] / K_M - [ES] \cdot [S] / K_M$$

$$[ES] + [ES] \cdot [S] / K_M = [E]_T \cdot [S] / K_M$$

$$[ES] \cdot (1 + [S] / K_M) = [E]_T \cdot [S] / K_M$$

$$[ES] \cdot (K_M + [S]) / K_M = [E]_T \cdot [S] / K_M$$

$$[ES] \cdot (K_M + [S]) = [E]_T \cdot [S]$$

$$[ES] = [E]_T \cdot [S] / (K_M + [S])$$

l'équation pour la vitesse initiale:

$$[ES] = \frac{[E]_T \cdot [S]}{(K_M + [S])} \dots\dots\dots (4)$$

➤ $V_i = k_2 \cdot [ES] \dots\dots (1)$ en remplaçant [ES]

➤ **D'après l'équation (1)**, la vitesse sera maximale ($V_{\max}$) lorsque [ES] sera maximale : lorsque la totalité de l'enzyme est combinée au substrat : $[ES] = [E_t]$

➤ $V_i = k_2 \cdot [ES] \dots \longrightarrow [ES] = \frac{V_i}{k_2}$ en remplaçant [ES] dans l'équation 4

$$[ES] = \frac{[E]_T \cdot [S]}{(K_M + [S])} \longrightarrow \frac{V_i}{k_2} = \frac{[E]_T \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$$V_i = \frac{\textcircled{K_2 [E]_T} [S]}{(K_M + [S])} \longrightarrow V_{\max}$$

➤ **Donc on écrit la vitesse initiale**

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

➤ **L'équation de Michaelis-Menten**

2.2. Signification de la vitesse maximale $V_{\max}$ et constante de Michaelis K_m

2.2.1 $V_{\max}$

- Correspond à la vitesse initiale quand l'enzyme est saturée par son substrat.
- Renseigne sur l'efficacité catalytique de l'enzyme $V_{\max} = k_2[Et] \Rightarrow V_{\max} = k_{\text{cat}}[Et]$.

2.2.2. K_{cat} ou K_2

- Est une constante catalytique. Elle est proportionnelle au nombre de réactions que peut effectuer une molécule d'enzyme pour transformé un nombre de molécules de substrat en produit par unité de temps (le «*turn-over number*»). Elle renseigne l'efficacité catalytique de l'enzyme : la fréquence de l'acte catalytique sec^{-1} .

$$\begin{array}{c} \text{μmole de P. mL}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \quad \nearrow \quad V_{\max} = \underset{\text{sec}^{-1}}{\underset{\nearrow}{k}}_{\text{cat}} [E]_{\text{T}} \quad \text{μmole de E} \cdot \text{mL}^{-1} \end{array}$$

2.2.3 K_M

- K_M est la concentration en substrat pour laquelle l'enzyme fonctionne à la moitié de sa vitesse maximale $V_i = 1/2 V_{\max}$
- K_M est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme.

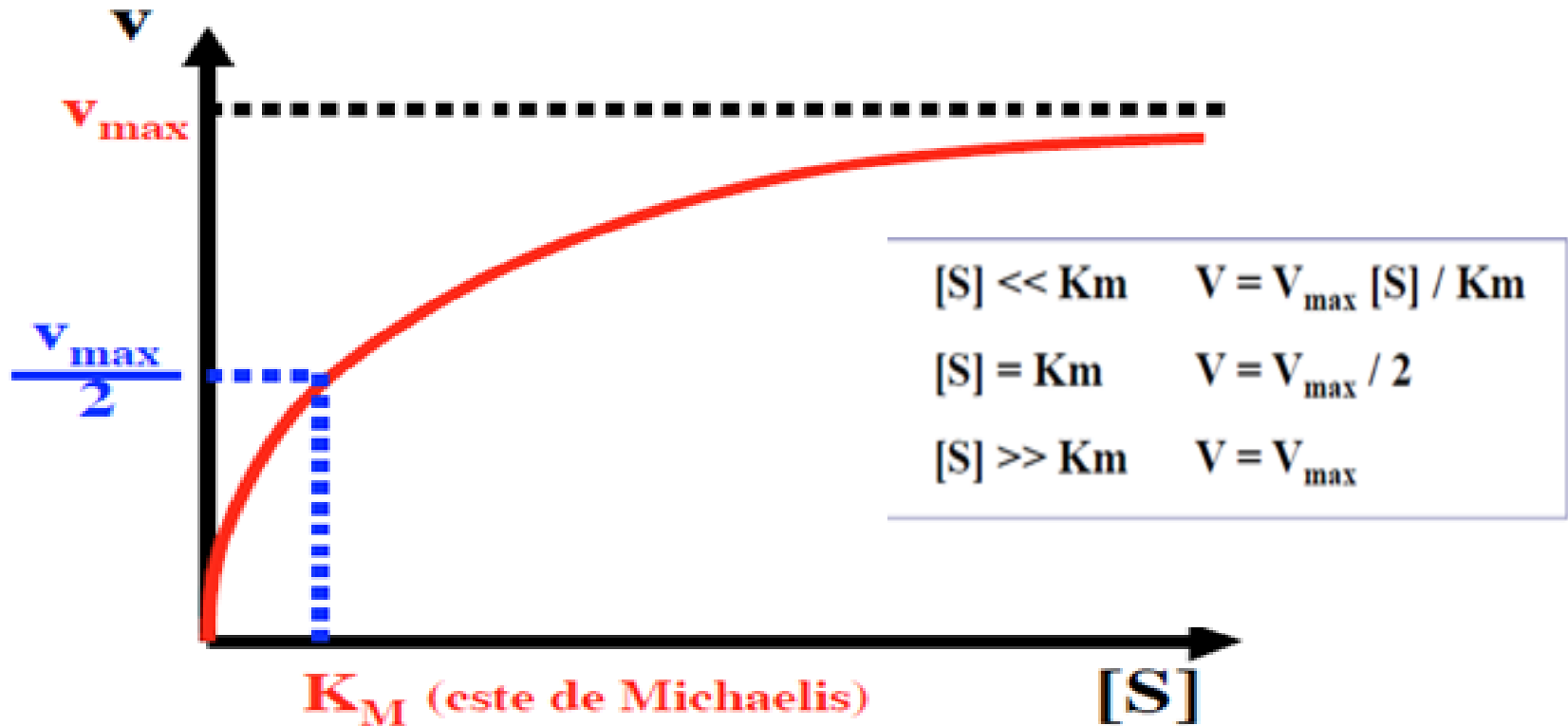


Fig. 6 Représentation hyperbole de Michaelis

- K_M : index de l'affinité de l'enzyme pour le substrat .
- plus K_M est petit plus l'affinité est grande.
- plus K_M est grand plus l'affinité est faible.
- l'affinité est inversement proportionnelle à la valeur de K_M

3. Représentations linéaires

➤ Lineweaver - Burk

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

➤ Si on écrit l'équation en double inverse :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} \times [S]}$$

➤ C'est l'équation d'une droite sous forme : $y = ax + b$

Ou $1/V = f(1/[S])$ ou : $a = K_m/V_{\max}$, $b = 1/V_{\max}$

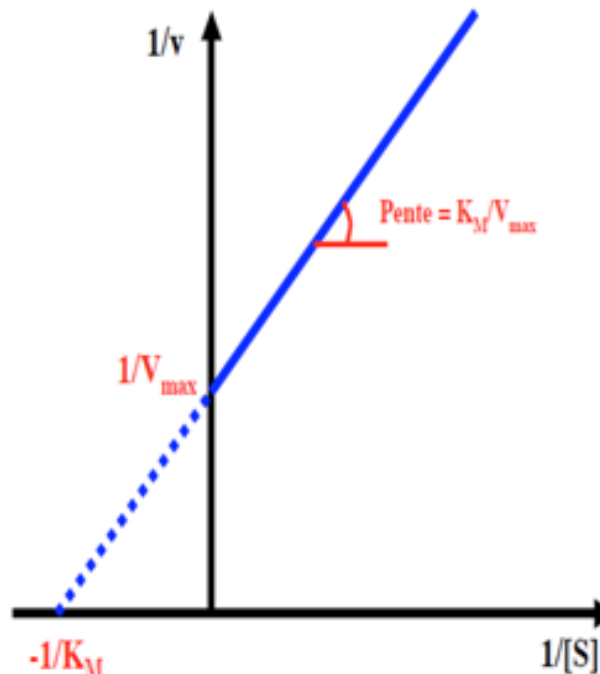


Fig. 6 Représentation en double inverse de Lineweaver - Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_M} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_M}$$

➤ Eadie Hofstee

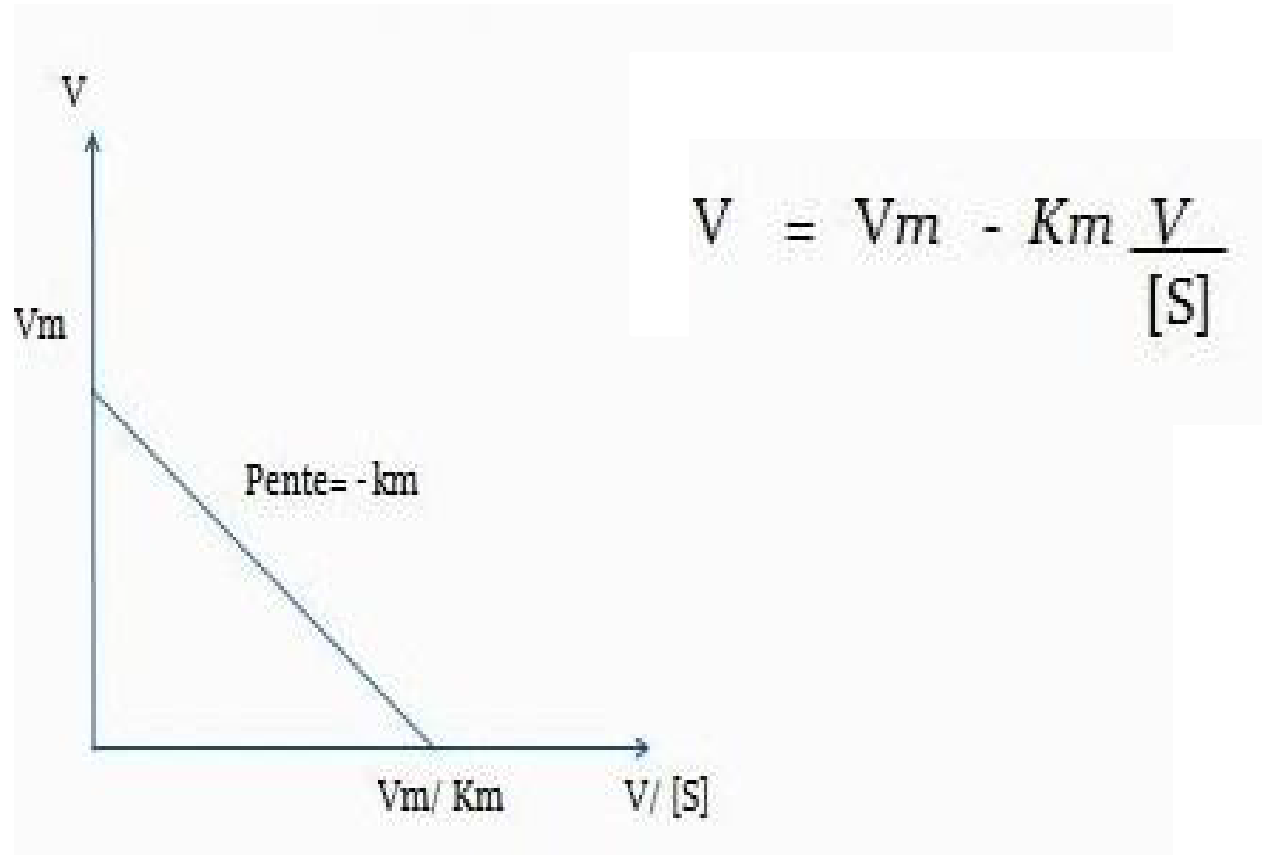


Fig.7 Méthode graphique d'Eadie Hofstee

4-Définition des unités enzymatiques

4.1- Unité internationale:

➤ Quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une micromole (μmole) de substrat par min, dans des conditions optimales de mesure ou de dosage.

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

4.2- Katal

➤ Le nombre de rotations (Kcat) est le nombre de molécules de substrat transformées par molécule d'enzyme par seconde (ou le nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme).

4.3- Activité spécifique (AS) :

❖ **Nombre d'unités d'activité par unité de masse (UI/mg de protéine).** L'activité spécifique caractérise une préparation d'enzyme partiellement purifiée.

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

4.4- Activité spécifique moléculaire (ASM) :

❖ **Nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme et par seconde.** C'est une caractéristique de l'enzyme et ne peut se calculer que si la préparation enzymatique est pure.

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

k_{cat}/K_M : est l'efficacité catalytique de l'enzyme.

$1/K_{\text{cat}}$: est la durée , en "s" de l'acte catalytique.

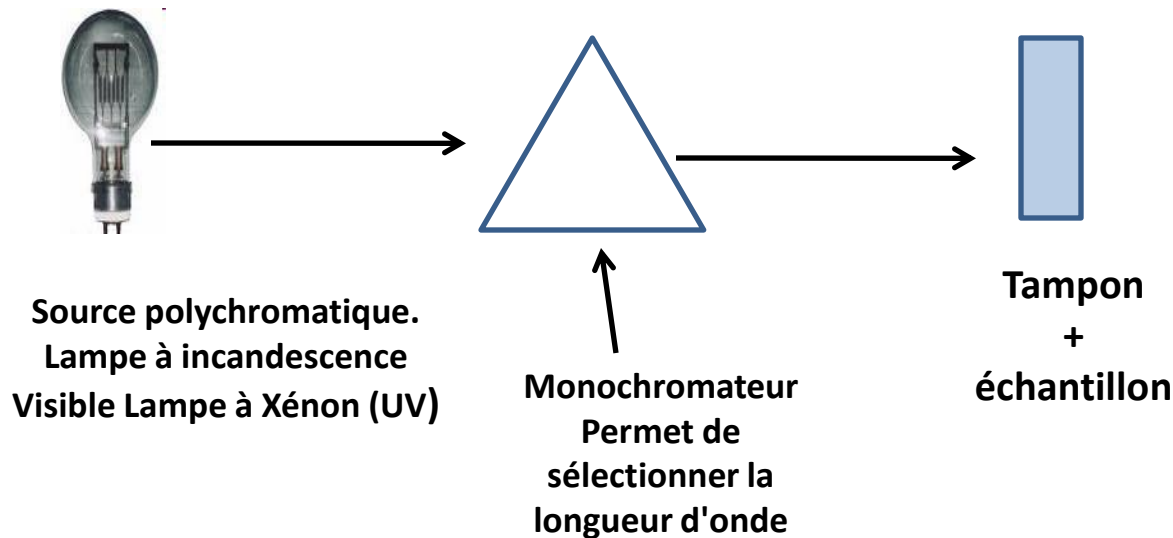
K_{cat} : donne la mesure de l'efficacité de l'acte catalytique.

❖ Lorsqu'un enzyme peut utiliser plusieurs substrats, k_{cat}/K_M permet d'estimer quel sera le substrat le plus utilisé par la protéine.

❑ Détermination de l'activité enzymatique :

❖ Les enzymes étant des protéines, sont quantifiées avec toutes les méthodes courantes de quantification des protéines. Les méthodes les plus couramment utilisées pour la quantification des enzymes sont la spectrophotométrie dans l'UV-visible, la fluorescence ou l'électrophorèse.

❖ Principe de la Spectrophotométrie : Loi de Beer Lambert



❖ L'équation de la Loi de Beer Lambert :

➤ Principe :

$$D_o = \epsilon \cdot C \cdot L$$

$$C = D_o \cdot 1 / \epsilon \cdot 1 / L$$

➤ **Activité enzymatique en UI/l** = $\Delta D_o / \Delta t \cdot 1 / \epsilon \cdot 1 / L \cdot V_t / V_e \cdot 10^6$

➤ **D_o** : L'absorbance qui n'a pas d'unité car dérivant d'une fonction logarithmique

➤ **ϵ** : est le coefficient d'extinction molaire (unités : $M^{-1} cm^{-1}$)

➤ **C** : la concentration de la molécule (M)

➤ **L** : le trajet optique (cm)

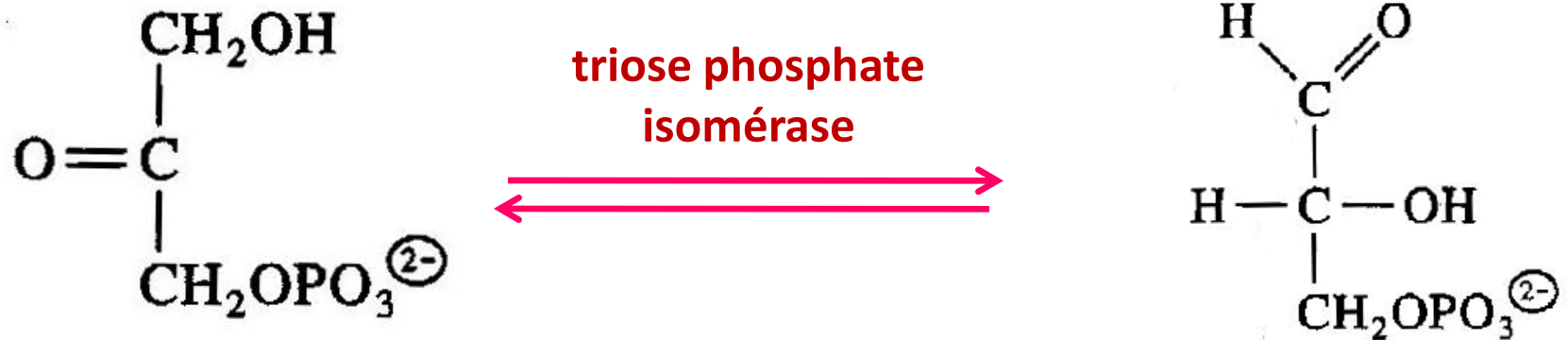
➤ **V_t** : volume du mélange réactionnel total ou se fait la mesure

➤ **V_e** : volume du milieu contenant l'enzyme à doser

II. Cinétique enzymatique à deux substrats

1. Réaction enzymatique à un seul substrat

❖ Ces réactions à un seul substrat et un seul produit en réalité de telle réaction rares et restent limitées à quelques réaction d'isomérisation ou des réactions d'épimérase ou des mutase.



❖ Ce type de réaction est dit (uni-uni) c-à-d un système implique un seul substrat et un seul produit .

2. Réaction enzymatique à deux substrats

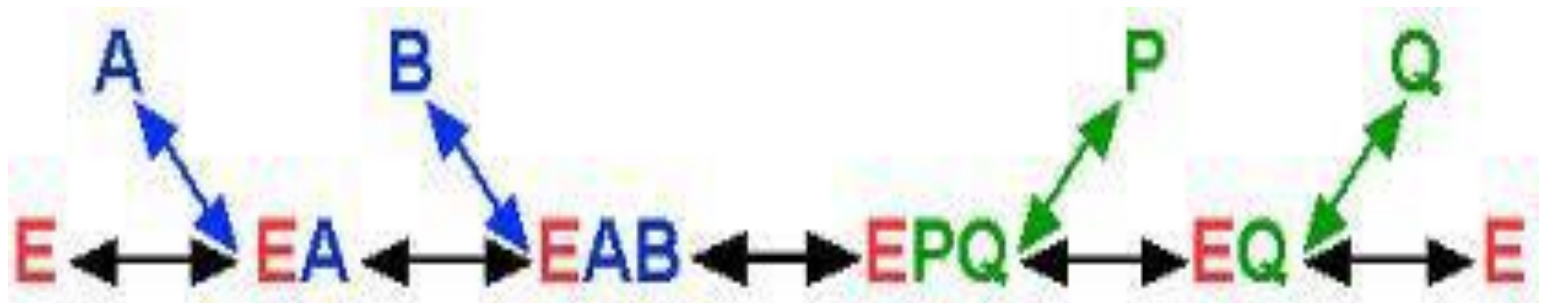
- ❖ Elle représente la majorité des réactions enzymatiques.
- ❖ Ces réactions donnent de cinétique plus complexe que les réactions à un seul substrat.
- ❖ L'étude cinétique des réactions enzymatique à deux substrat à pour bute de déterminer, l'ordre de fixation des substrats, les constantes cinétique caractérisant la fixation de chacun d'eux en présence et en absence de l'autre.
- ❖ La vitesse maximale de la réaction (qui est mesurée quand la concentration des deux substrats est saturante ;

➤ **Trois mécanismes décrivent cette dernière**

1. **Bi- Bi ordonné** : fixation ordonnée des substrats.
2. **Bi-Bi alternatif** : fixation alternatif ou hasard des substrats.
3. **Ping- pong** : fixation aléatoire des substrats.

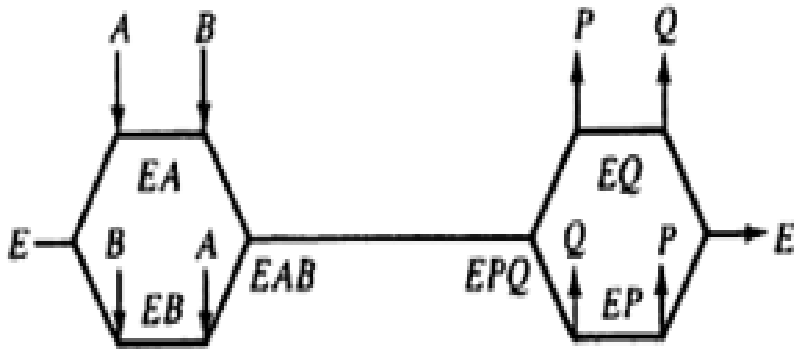
2.1 Mécanismes séquentiels

➤ On parle de mécanisme séquentiel lorsque la réaction enzymatique n'intervient qu'après formation d'un complexe entre l'enzyme et les deux substrats. La fixation des substrats peut elle même être ordonnée ou se produire au hasard .

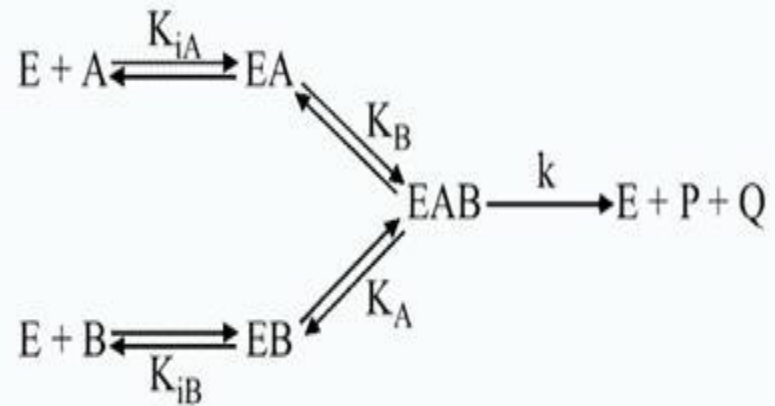


2.1.1 Association au hasard (aléatoire)

➤ Est un **mécanisme réactionnel** avec fixation au hasard. Deux **substrats**, A et B, se fixent de manière **aléatoire** sur l'**enzyme libre E** (c'est-à-dire qu'il n'y a pas de fixation privilégiée de l'un ou l'autre des deux substrats) avec une constante de dissociation K_A et K_B , respectivement.

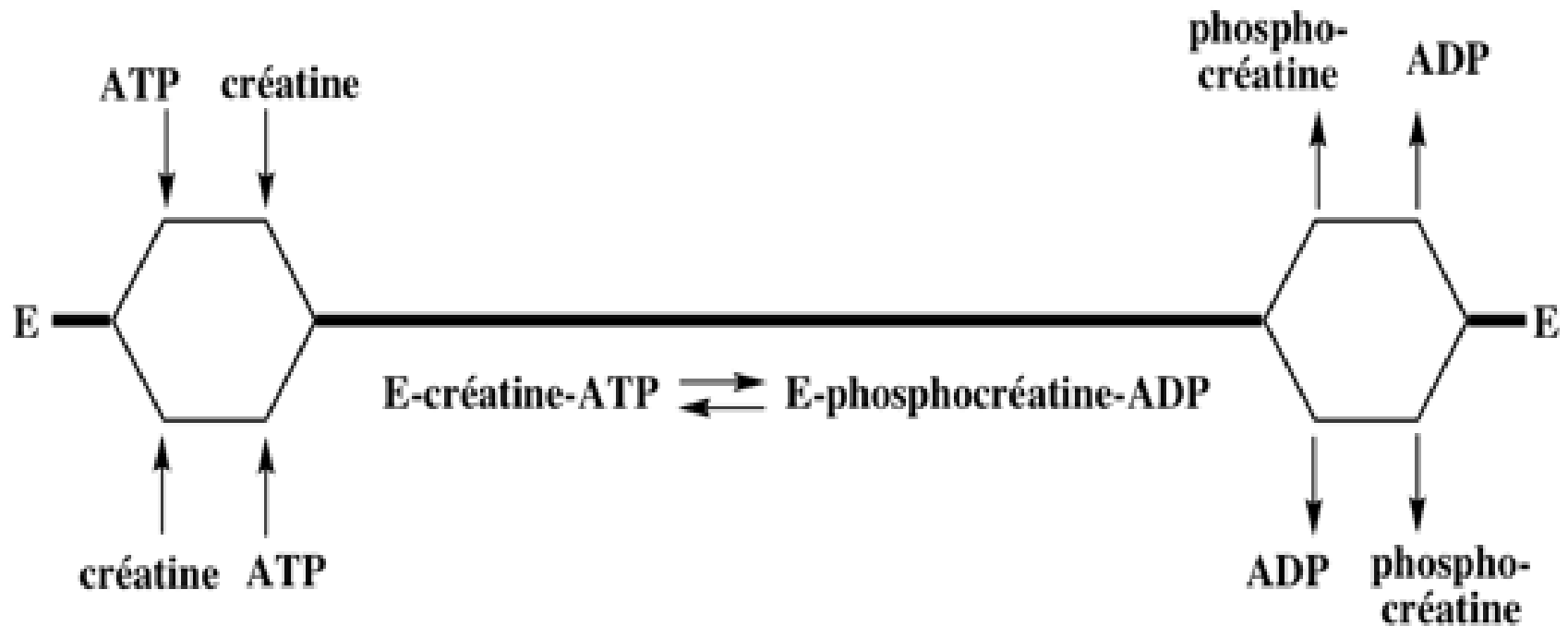


Représentation de Cleland (1963)



➤ Exemple : **Créatine kinase** Il s'agit d'un mécanisme **Bi Bi au hasard**.

Mécanisme à simple déplacement appelé au hasard



E. Jaspard (2013)

2.1.2 Association ordonnée ou séquencée

➤ Dans un tel système, l'ordre de fixation est obligatoire. Le substrat A doit se fixer à l'enzyme libre E avant le substrat B. En d'autres termes, le substrat B ne peut se fixer qu'au complexe EA. Représentation de Cleland.



Exp: Les déshydrogénase à NAD^+ : dans le cas de la Lactate déshydrogénase (mécanisme Bi Bi ordonné), le coenzyme se fixe toujours en premier et le lactate est toujours relégué en premier.

Mécanisme à simple déplacement appelé ordonné

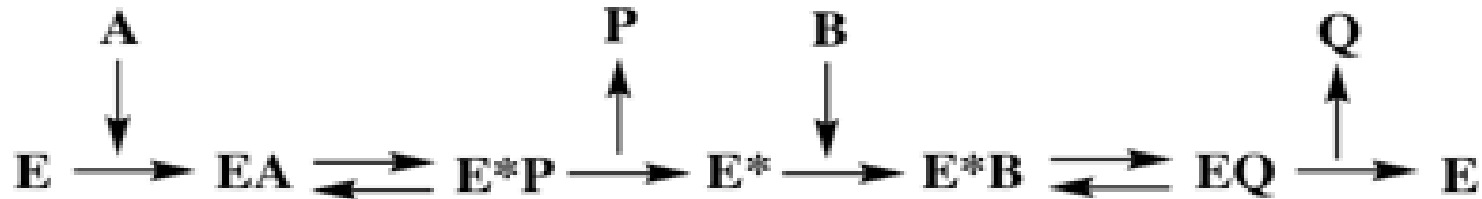


2.2 Mécanisme Ping-Pong

- C'est le mécanisme **ping-pong** qui se distingue des précédents par le fait qu'il intervient, entre les étapes de fixation **des deux substrats**, une **étape irréversible** en absence des produits de la réaction.
- L'enzyme, après avoir fixé un des substrats, le transforme et libère le produit correspondant.
- L'enzyme ensuite fixe l'autre substrat, le transforme et libère le second produit.

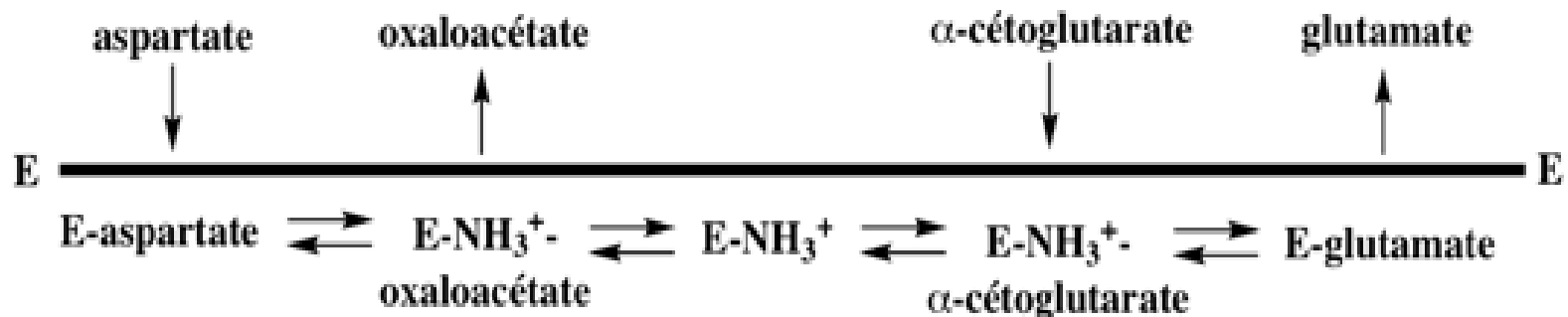


Mécanisme à double déplacement appelé ping-pong



E. Jaspard (2013)

➤ Exemples d'enzymes **Les aminotransférases** : mécanisme **Bi Bi Ping Pong** (figure ci-dessous)



E. Jaspard (2013)