

LA CINÉTIQUE ENZYMATYQUE MICHAEÉLIENNE À UN SEUL SUBTRAT

L'une des approches expérimentales du mode d'action des enzymes est l'étude cinétique des réactions qu'elles catalysent. À l'issue de cette étude, on a pu mettre en évidence des propriétés communes à un certain nombre d'enzymes, ce qui a permis de différencier deux catégories d'enzymes : les **enzymes michaéliennes** et les **enzymes allostériques**.

Le terme d'enzyme michaélienne traduit donc un **comportement cinétique commun** à un certain nombre d'enzymes. Outre les découvertes historiques, l'**étude cinétique d'une réaction enzymatique** est fondamentale car elle apporte une multitude de renseignements sur les potentialités catalytiques de l'enzyme, sur sa spécificité et indirectement sur son mode d'action au niveau moléculaire, et sur les nombreux facteurs qui influencent cette cinétique. Ces études cinétiques ont permis notamment de définir des **paramètres cinétiques** qui permettent de caractériser les enzymes en fonction des conditions dans lesquelles elles se trouvent. Ces constantes cinétiques sont largement exploitées lors d'utilisations *in vitro*.

Dans un premier temps nous verrons quelques notions de cinétiques nécessaires à l'étude cinétique des réactions enzymatiques.

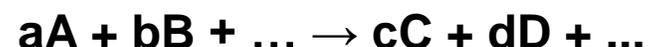
Puis, nous verrons comment déterminer la vitesse d'une réaction enzymatique.

Enfin, nous aborderons les caractéristiques des enzymes michaéliennes

1. Notions de cinétique

1.1. Notion de vitesse de réaction

Soit la réaction suivante :



- Avec :
- A et B : réactifs (ou réactants). Dans le cas d'une réaction enzymatique, on parlera de substrats.
 - C et D : produits.
 - a, b, c, d : coefficients stœchiométriques respectifs de chaque composé.

La vitesse de cette réaction, notée v , est donnée par :

$$v = -\frac{1}{a} \times \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\frac{1}{b} \times \frac{\Delta[B]}{\Delta t} = \frac{1}{c} \times \frac{\Delta[C]}{\Delta t} = \frac{1}{d} \times \frac{\Delta[D]}{\Delta t}$$

v est donc une variation de concentration par unité de temps.

La dimension/unité de v est donc $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{unité de temps}^{-1}$.

1.2. Notion d'ordre de réaction

Si au temps $t = 0$ on mélange A et B, la vitesse de réaction v peut aussi s'écrire :

$$v = k \times [A]^\alpha \times [B]^\beta$$

Avec : - $[A]$, $[B]$: concentrations respectives des composés A et B, en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

- α , ordre de la réaction par rapport au composé A.
- β , ordre de la réaction par rapport au composé B.
- $\alpha + \beta$ est l'ordre global de la réaction.
- k = constante de vitesse de la réaction.

✓ Réaction d'ordre global 0 (ou nul) :

Soit la réaction enzymatique élémentaire : $S \rightarrow P$

Pour une réaction d'ordre 0, on a : $v = k \times [S]^0 = k \times 1 = k = \text{constante}$

Dans le cas d'une réaction d'ordre 0, v ne dépend pas de la concentration initiale en substrat mais de la concentration en enzyme.

En enzymologie, on considère que l'ordre de la réaction est nul **lorsque $[S]_0 \geq 100 K_M$ ($\geq 10 K_M$ en pratique).**

(K_M = constante de MICHAELIS)

✓ **Réaction d'ordre global 1 :**

Soit la réaction enzymatique élémentaire : $S \rightarrow P$

Pour une réaction d'ordre 1, on a : $v = k \times [S]^1 = k \times [S]$

La réaction est dite monomoléculaire.

Dans le cas d'une réaction d'ordre 1, **v dépend de la concentration initiale en substrat.**

En enzymologie, on considère que l'ordre de la réaction est 1 **lorsque $[S]_0 < 0,1 K_M$.** On est alors dans les **conditions initiales.**

✓ **Réaction d'ordre global 2 :**

Soit la réaction enzymatique élémentaire : $S + S \rightarrow P$

Pour une réaction d'ordre 2, on a : $v = k \times [S]^2$

La réaction est dite bimoléculaire (avec des substrats identiques ou différents).

En enzymologie, on rencontre principalement des réactions d'ordre 0 et 1.

1.3. Constante de vitesse de réaction : unités et influence de la température

Pour une réaction d'ordre 0, la constante de vitesse k s'exprime en mol·L⁻¹·unité de temps⁻¹.

Pour une réaction d'ordre 1, la constante de vitesse k s'exprime en unité de temps⁻¹.

Pour une réaction d'ordre 2, la constante de vitesse k s'exprime en L·mol⁻¹·unité de temps⁻¹.

L'influence de la température sur la constante de vitesse k est donnée par la loi d'ARRHÉNIUS :

$$k = A \times e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

Avec : - A : facteur pré-exponentiel, ou facteur de fréquence = constante.

- E_a : énergie d'activation, en J·mol⁻¹.

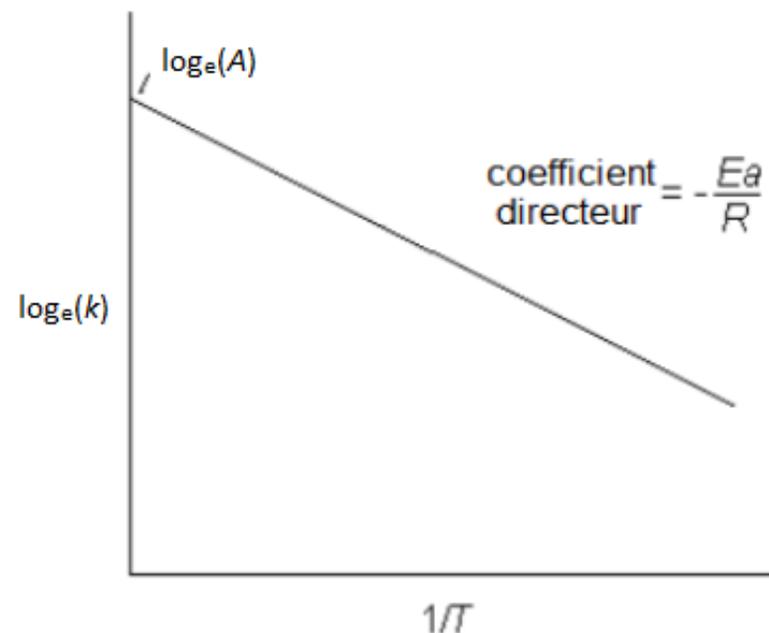
- T : température, en Kelvin (273,15 + T°C).

- R : constante des gaz parfaits = 8,314 J·mol⁻¹·K⁻¹.

On en déduit alors : $\log_e(k) = -\frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} + \log_e(A)$

$$(y = a \cdot x + b)$$

On obtient une fonction affine : $\log_e(k) = f\left(\frac{1}{T}\right)$



D'après ce graphe, la température T influence la constante de vitesse d'une réaction : plus ($1/T$) augmente, plus $\log_e(k)$ diminue ; donc plus T augmente, plus k augmente.

Remarque : cette loi n'est applicable en enzymologie que pour des températures généralement comprises entre 273 K (0°C) et 333 K (60°C) puisque au-delà intervient la dénaturation thermique des enzymes.

De plus, en déterminant le coefficient directeur de la droite affine, on peut calculer l'énergie d'activation E_a .

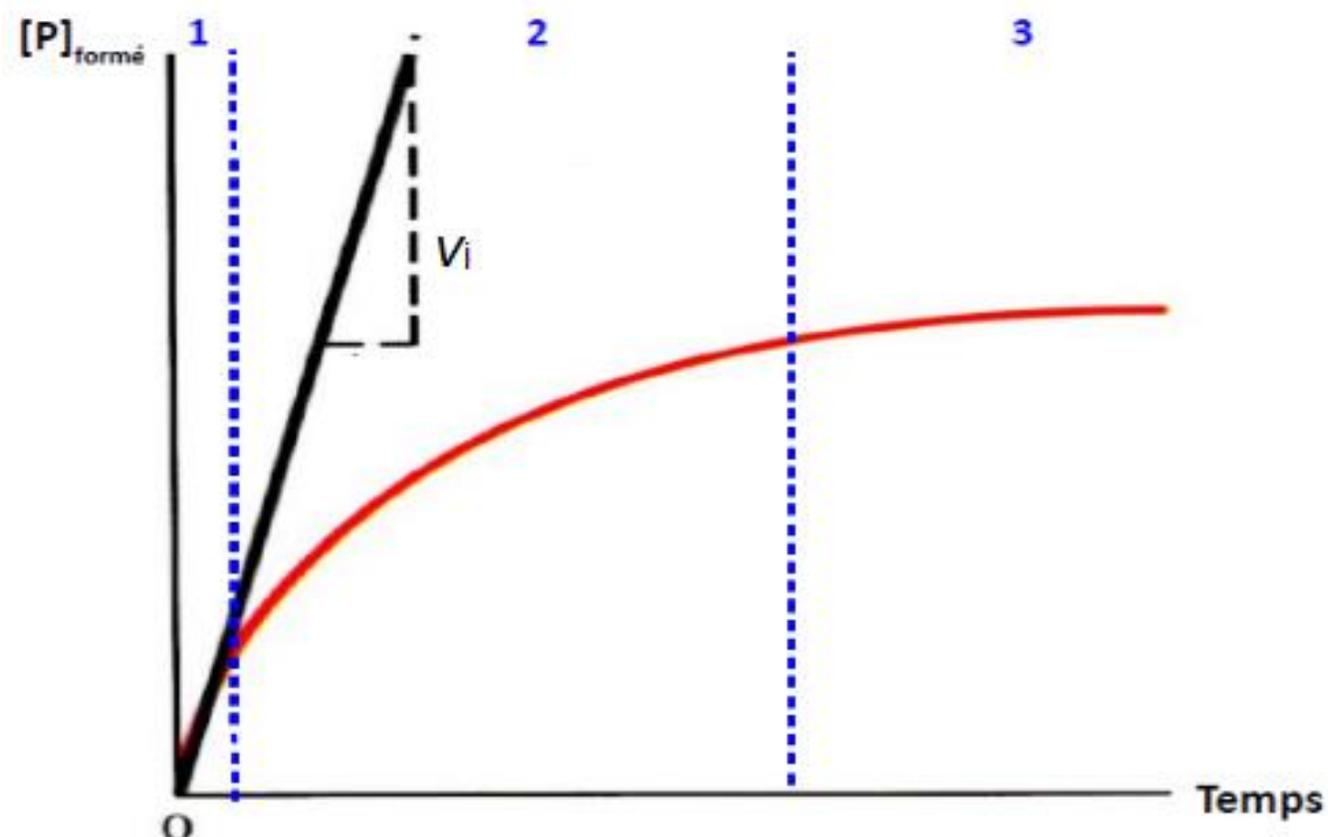
2. Mise en évidence du comportement cinétique des enzymes michaéliennes

2.1. Détermination d'une vitesse initiale v_i

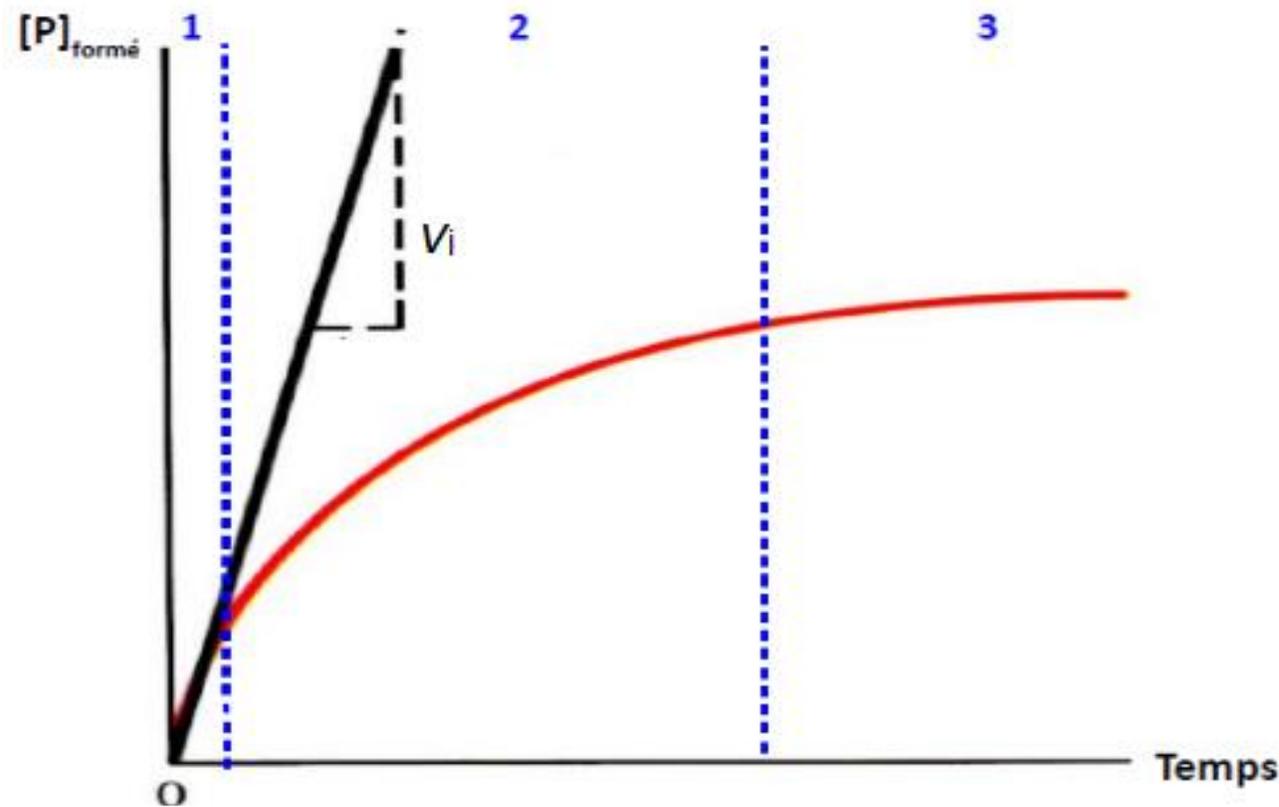
Soit la réaction enzymatique suivante : $S + E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$

On peut suivre la réaction enzymatique en déterminant la quantité de produit formé en fonction du temps dans les conditions opératoires suivantes :

- $[S]_0$ fixe,
- $[E]_0$ fixe ($[E]_0 \ll [S]_0$),
- température et pH constants,
- absence d'inhibiteur.



Cette courbe est la branche ascendante d'une hyperbole qui présente trois parties :

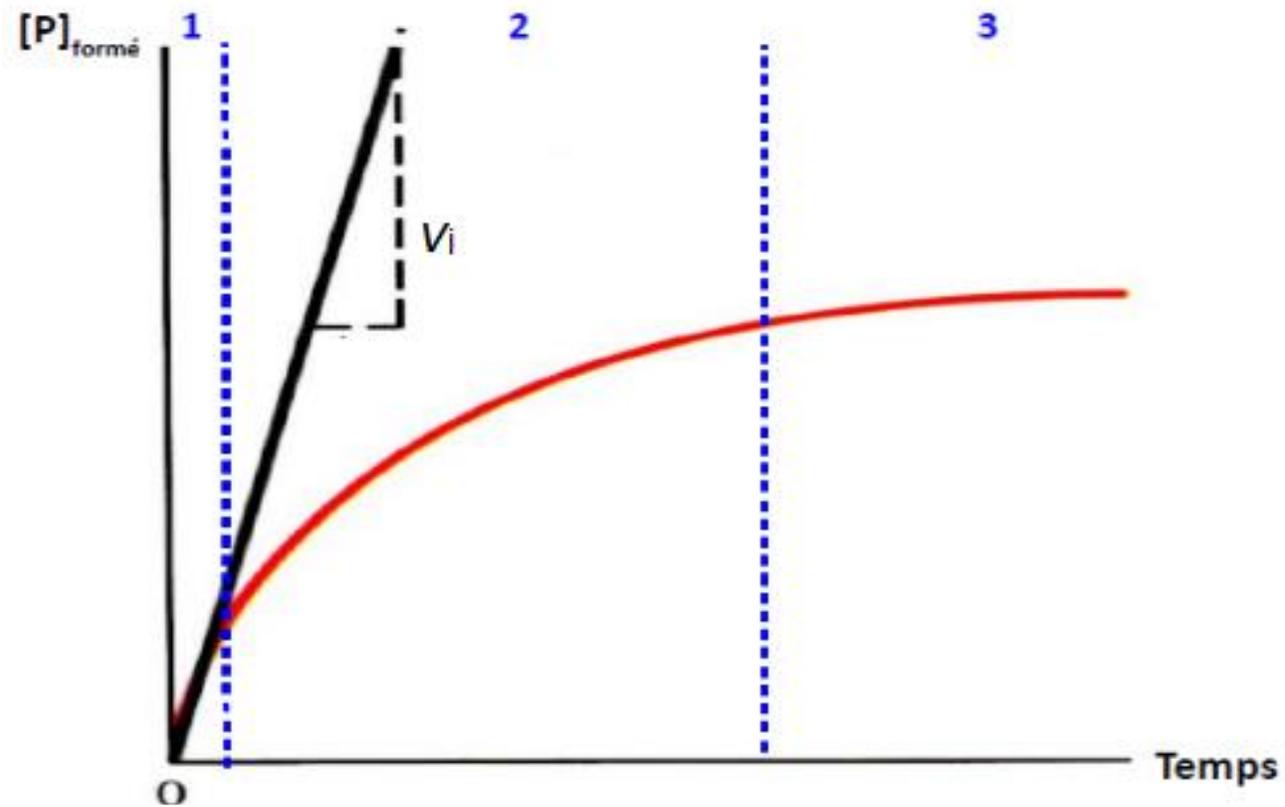


✓ 1^{ère} partie : la phase stationnaire :

Pendant un temps très bref, en tout début de réaction, l'accumulation du produit est linéaire en fonction du temps, ce qui signifie que la vitesse de réaction est constante pendant cette période initiale où $[S] \gg [P]$. On peut alors tracer la tangente à l'origine qui est confondue à cette partie de la courbe.

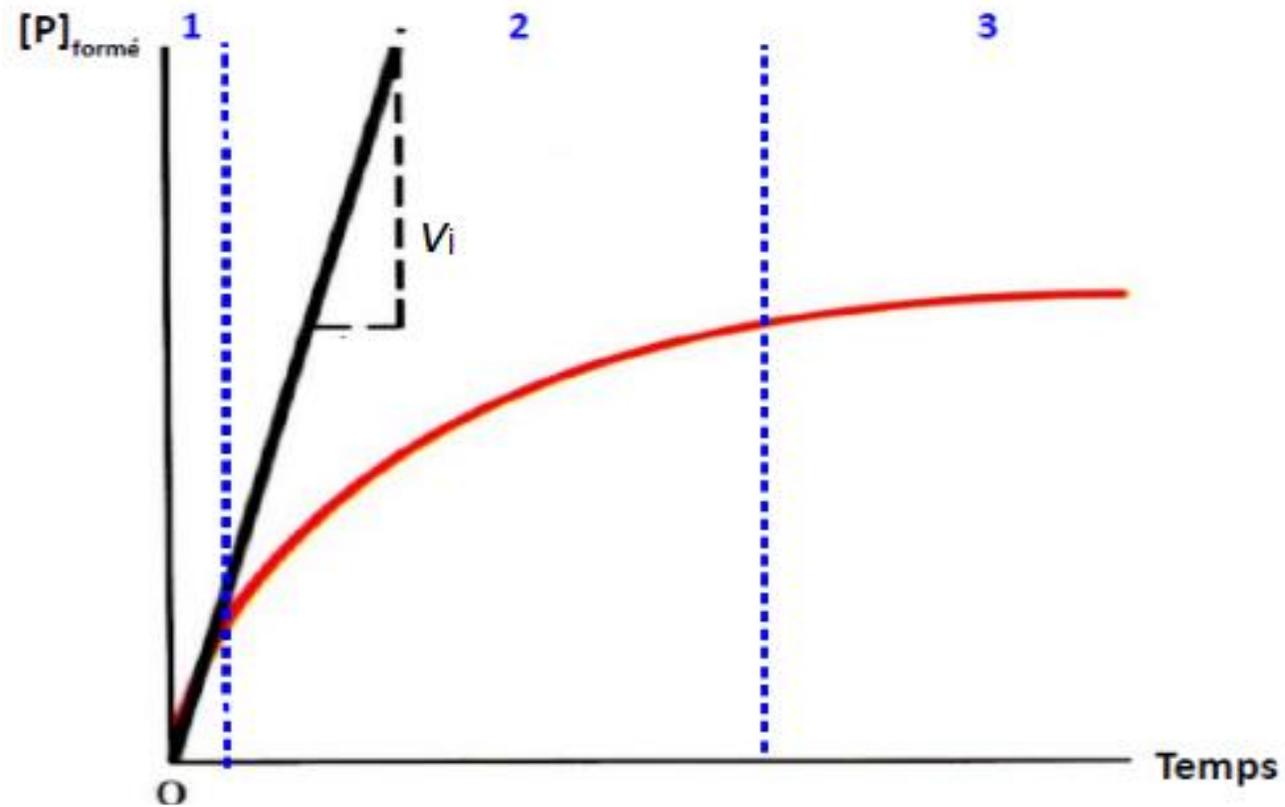
Vitesse initiale v_i = coefficient directeur de la tangente à l'origine de la courbe $[P]_{\text{formé}} = f(\text{temps})$.

Phase stationnaire = période pendant laquelle la tangente à l'origine est confondue avec la courbe $[P]_{\text{formé}} = f(\text{temps})$, c'est à dire lorsque la vitesse $v = v_i = \text{constante et maximale}$



✓ 2^{ème} partie :

On observe un ralentissement de la vitesse de réaction v .



✓ 3^{ème} partie : la phase post-stationnaire :

La vitesse de la réaction v est nulle. On peut l'expliquer par la transformation totale du substrat en produit, ou par un état d'équilibre de la réaction (autant de produit formé que de produit retransformé en substrat).

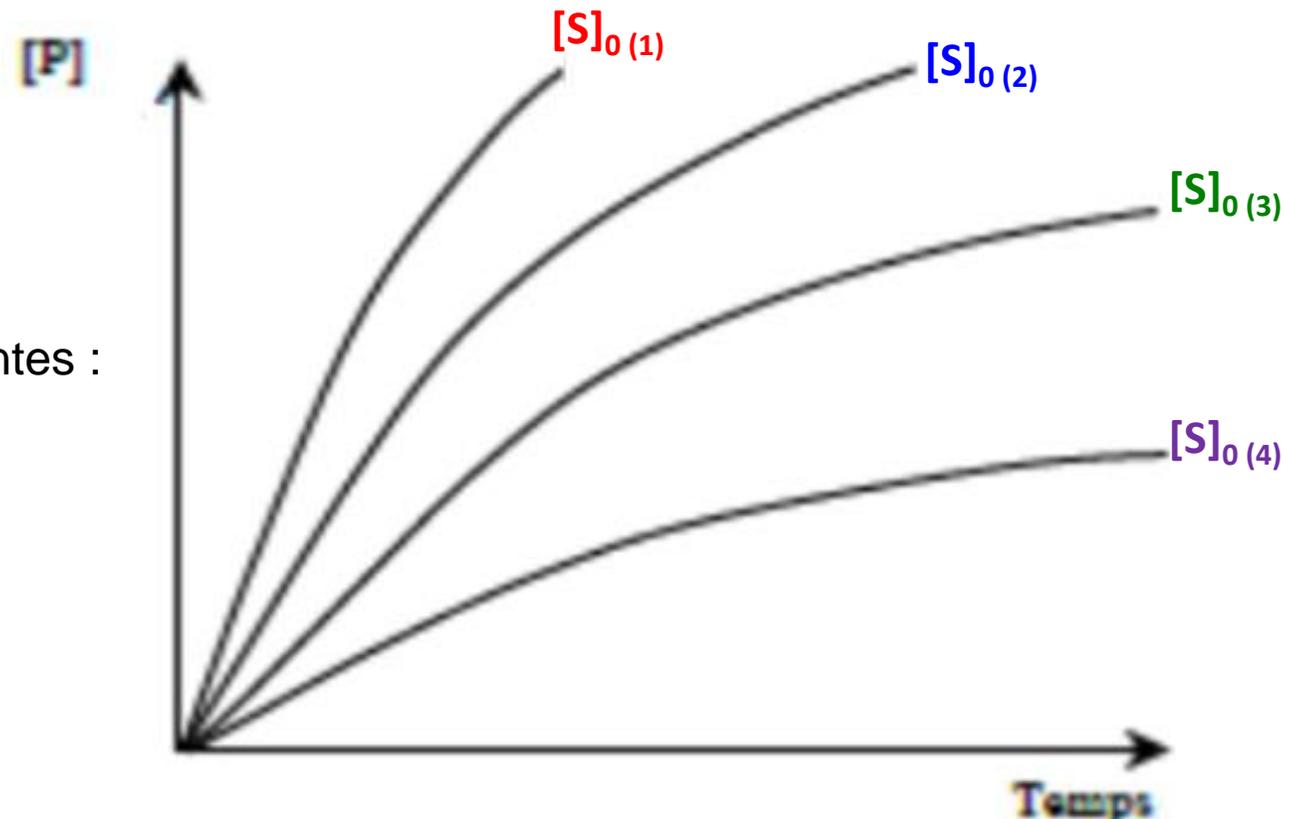
2.2. Relation entre v_i et $[S]_0$

Soit la réaction enzymatique suivante : $S + E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$

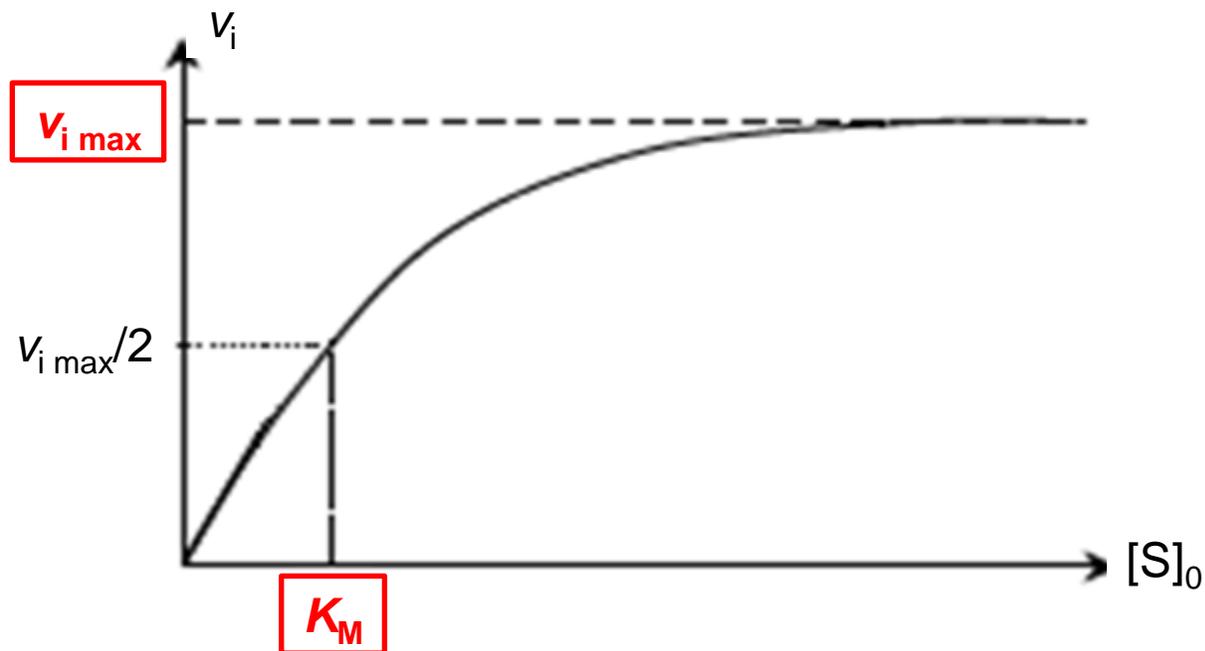
On réalise des expériences de suivis de la réaction enzymatique, dans les conditions opératoires suivantes :

- plusieurs $[S]_0$ testées : $[S]_{0(1)} > [S]_{0(2)} > [S]_{0(3)} > [S]_{0(4)}$,
- $[E]_0$ fixe ($[E]_0 \ll [S]_0$),
- température et pH constants,
- absence d'inhibiteur.

On obtient alors les courbes $[P]_{\text{formé}} = f(\text{temps})$ suivantes :



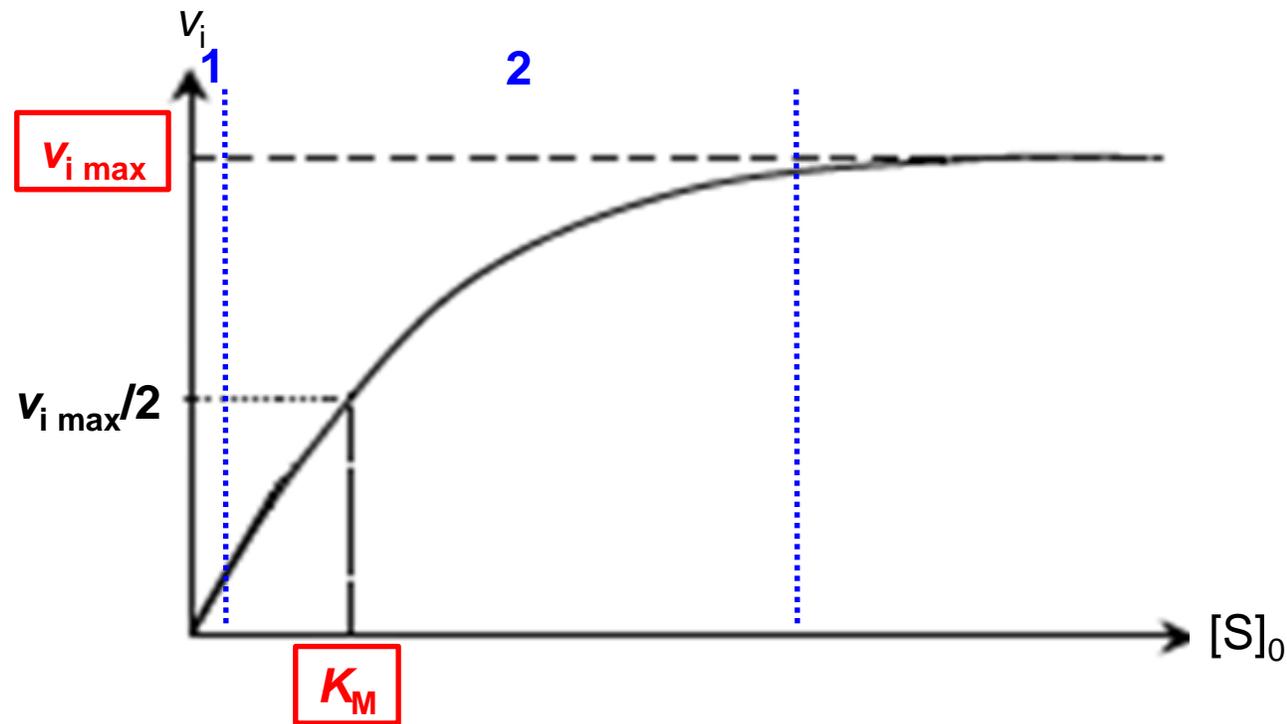
On peut alors déterminer les vitesses initiales v_i pour chaque $[S]_0$ et tracer le graphe $v_i = f([S]_0)$:



Cette courbe nous permet de déterminer deux paramètres cinétiques des enzymes michaéliennes :

- ✓ $v_{i \max}$ = vitesse initiale maximale = vitesse initiale de la réaction lorsque toute l'enzyme est sous forme de complexe ES, c'est-à-dire à des concentration initiales en substrat $[S]_0$ saturantes..
 $v_{i \max}$ est généralement exprimée en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.
- ✓ K_M = constante de MICHAÉLIS = valeur de $[S]_0$ lorsque $v_i = v_{i \max} / 2$.
 K_M est généralement exprimée en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

La courbe obtenue est la branche ascendante d'une hyperbole avec trois parties :



✓ 1^{ère} partie : lorsque $[S]_0 < 0,1 K_M$:

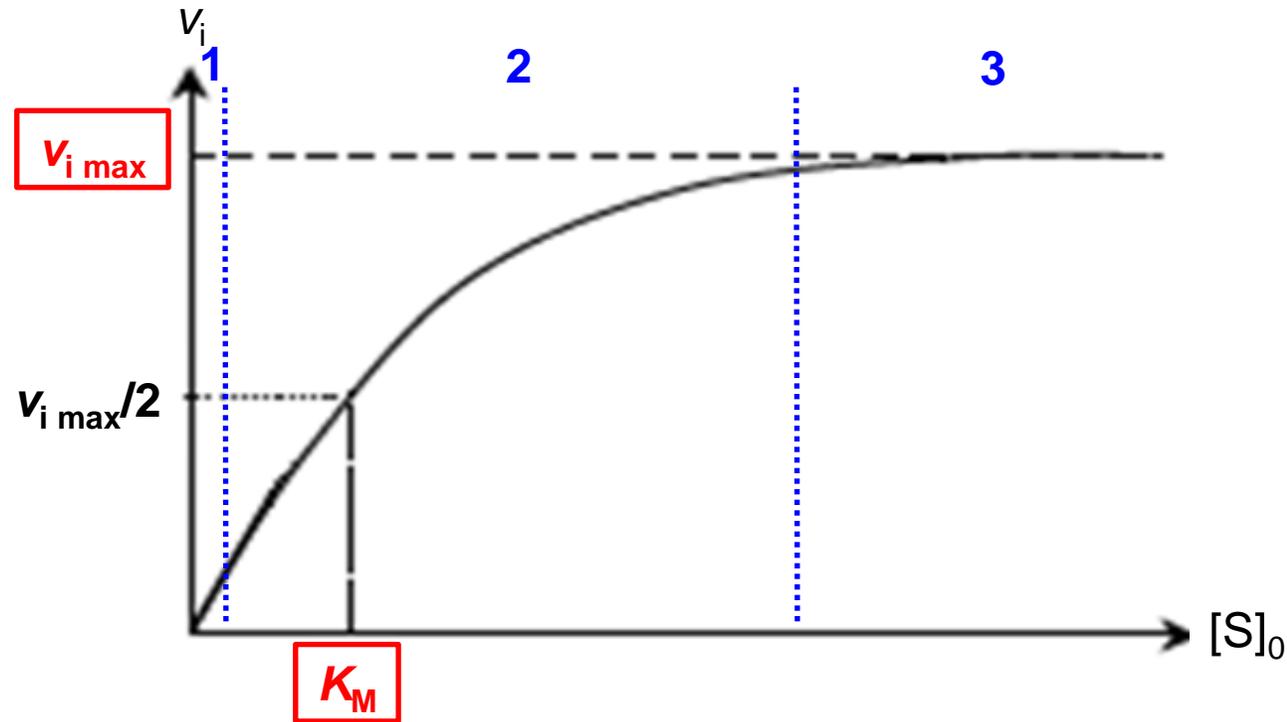
On observe une partie linéaire : la vitesse v_i est proportionnelle à $[S]_0$.

La réaction est donc d'ordre 1 par rapport au substrat $[S]_0$: $v_i = k \times [S]_0$.

On doit être dans cette partie de la courbe pour réaliser les dosages enzymatique cinétique de substrat.

✓ 2^{ème} partie : lorsque $0,1 K_M \leq [S]_0 < 100 K_M$ ($< 10 K_M$ en pratique) :

Zone intermédiaire. La vitesse initiale v_i augmente non linéairement avec $[S]_0$.



✓ 3^{ème} partie : lorsque $[S]_0 \geq 100 K_M$ ($\geq 10 K_M$ en pratique) :

La concentration initiale en substrat $[S]_0$ est saturante.

On observe que $v_i = \text{constante} = v_{i \max}$.

La réaction est d'ordre 0 par rapport au substrat, donc la vitesse $v_{i \max}$ ne dépend plus de la $[S]_0$.

Par contre $v_{i \max}$ dépend de la $[E]_0$: $v_{i \max} = k_{\text{cat}} \times [E]_0$.

On observe un plateau de saturation qui a permis de mettre en évidence la formation d'un complexe enzyme-substrat stéréospécifique.

Cette partie de la courbe est utilisée pour le dosages cinétiques des enzymes.

Une enzyme michaelienne est une enzyme dont l'étude cinétique correspond à une courbe de saturation $v_i = f([S]_0)$ (également appelée courbe de MICHAÉLIS-MENTEN), et dont l'équation est :

$$v_i = v_{i \max} \times \frac{[S]_0}{K_M + [S]_0}$$

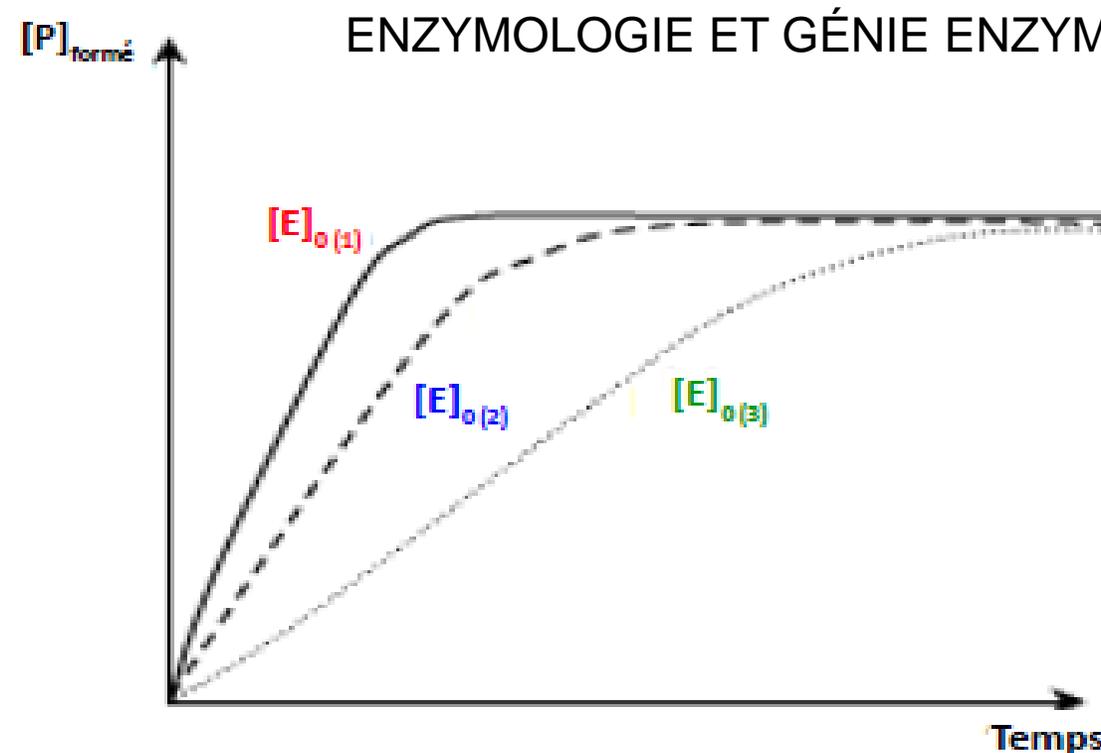
2.3. Relation entre $v_{i \max}$ et $[E]_0$

Soit la réaction enzymatique suivante : $S + E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$

On réalise des expériences de suivis de la réaction enzymatique, dans les conditions opératoires suivantes :

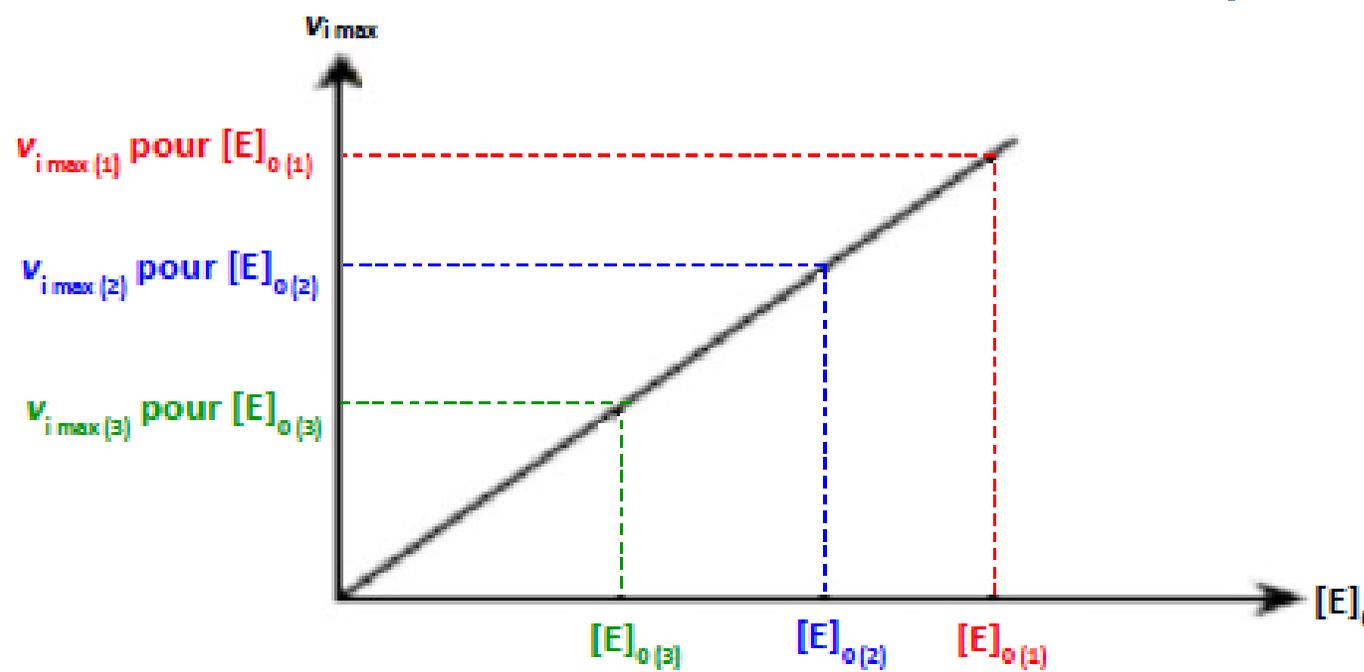
- $[S]_0$ fixe et saturante, c'est-à-dire $[S]_0 \geq 100 K_M$ ($K_M =$ constante de MICHAÉLIS) ($\geq 10 K_M$ en pratique).
Dans cette condition les v_i sont des $v_{i \max}$.
- plusieurs $[E]_0$ testées : $[E]_{0(1)} > [E]_{0(2)} > [E]_{0(3)}$. ($[E]_0 \ll [S]_0$)
- température et pH constants.
- absence d'inhibiteur.

On obtient es courbes $[P]_{\text{formé}} = f(\text{temps})$ suivantes :



On peut alors déterminer les vitesses initiales maximales $v_{i \text{ max}}$ pour chaque $[E]_0$ et tracer le graphe $v_{i \text{ max}} = f([E]_0)$:

Dans ces conditions, on observe que $v_{i \text{ max}}$ est proportionnelle à $[E]_0$: $v_{i \text{ max}} = k_{\text{cat}} \times [E]_0$.

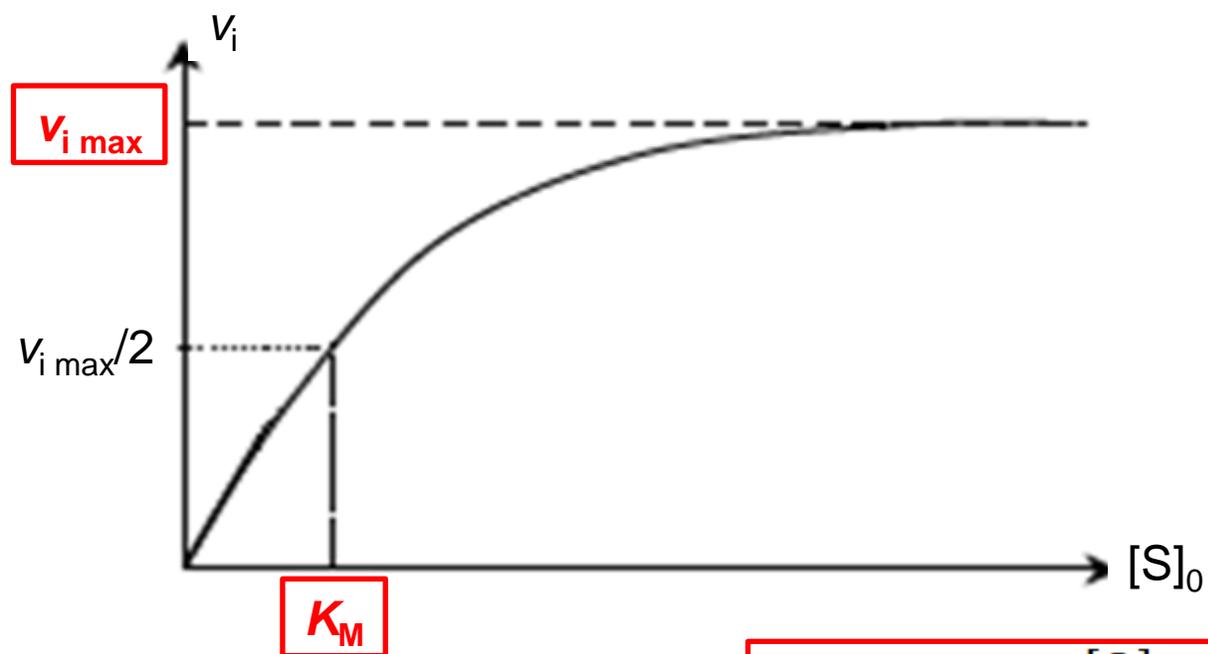


3. Caractéristiques des enzymes michaéliennes

3.1. Déterminations graphiques des paramètres cinétiques des enzymes michaéliennes

3.1.1. Représentation hyperbolique de MICHAÉLIS-MENTEN

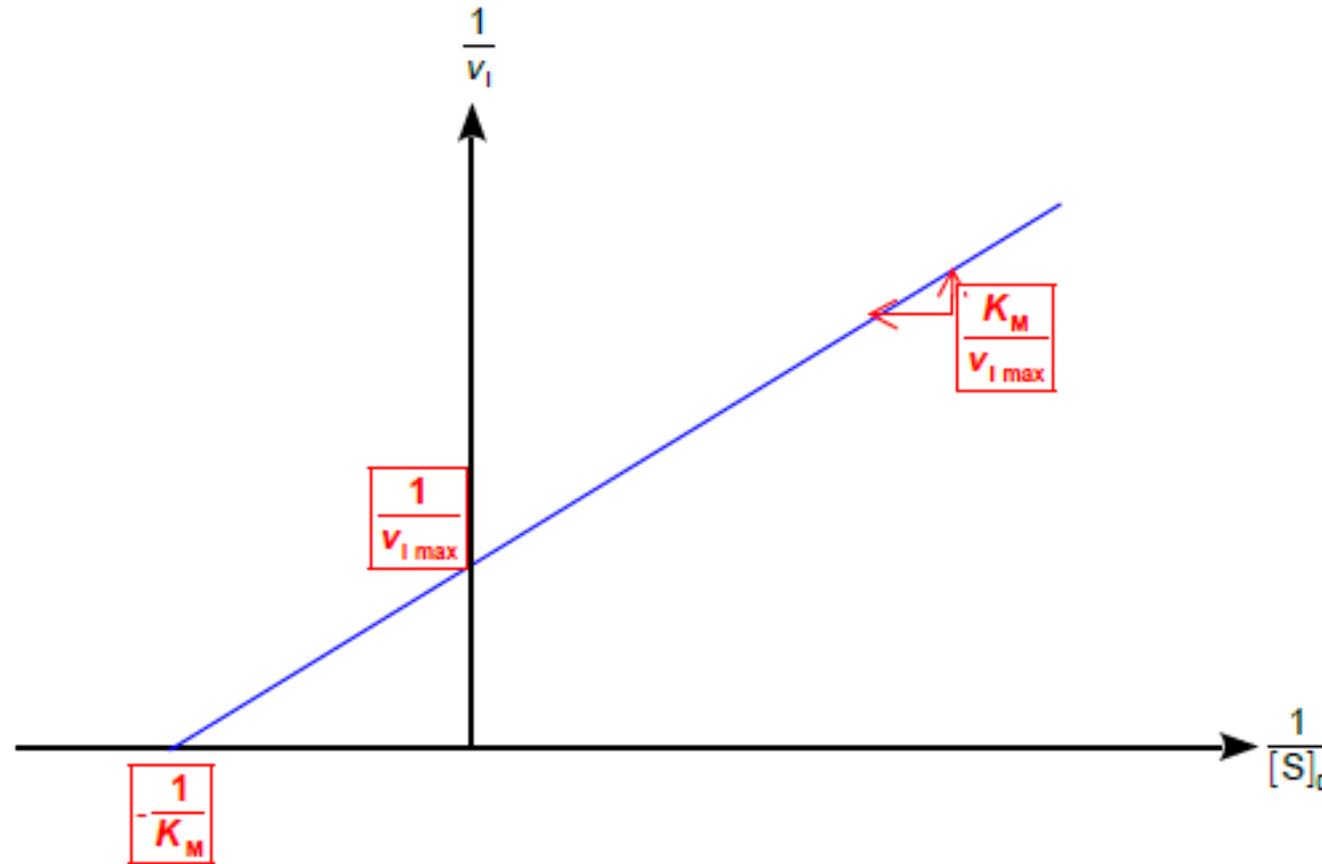
La représentation hyperbolique de **MICHAÉLIS-MENTEN** correspond à la courbe de saturation : $v_i = f([S]_0)$



On obtient la branche ascendante d'une hyperbole d'équations : $v_i = v_{i \max} \times \frac{[S]_0}{K_M + [S]_0}$ ou $v_i = k_{\text{cat}} \times [E]_0 \times \frac{[S]_0}{K_M + [S]_0}$

3.1.2. Représentation affine en double inverse de LINEWEAVER-BURK

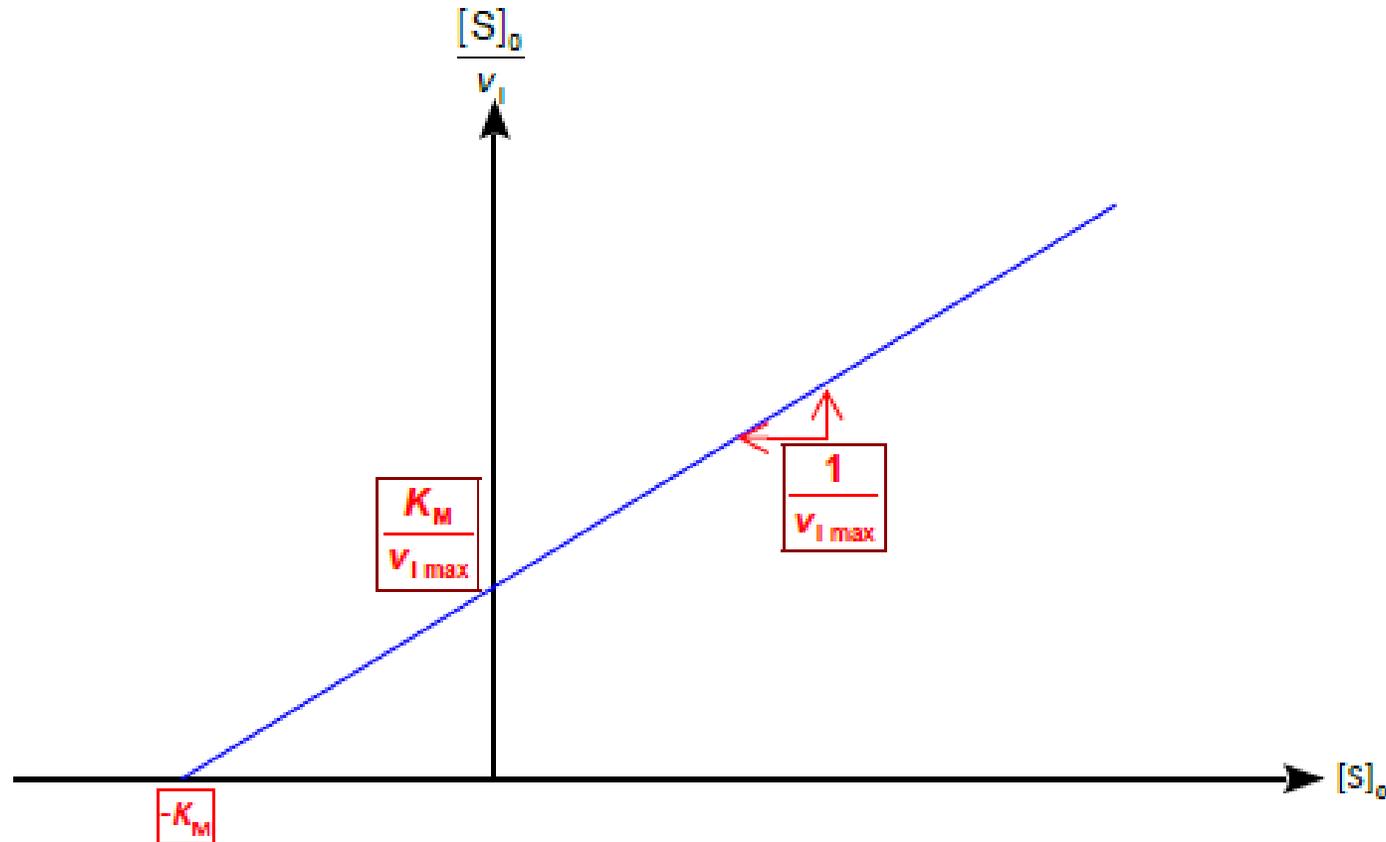
La représentation affine en double inverse de **LINEWEAVER-BURK** correspond au graphique : $\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[S]_0}\right)$



On obtient une droite affine d'équation : $\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{v_{i \max}} \times \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{v_{i \max}}$

3.1.3. Représentation affine de HANES-WOOLF

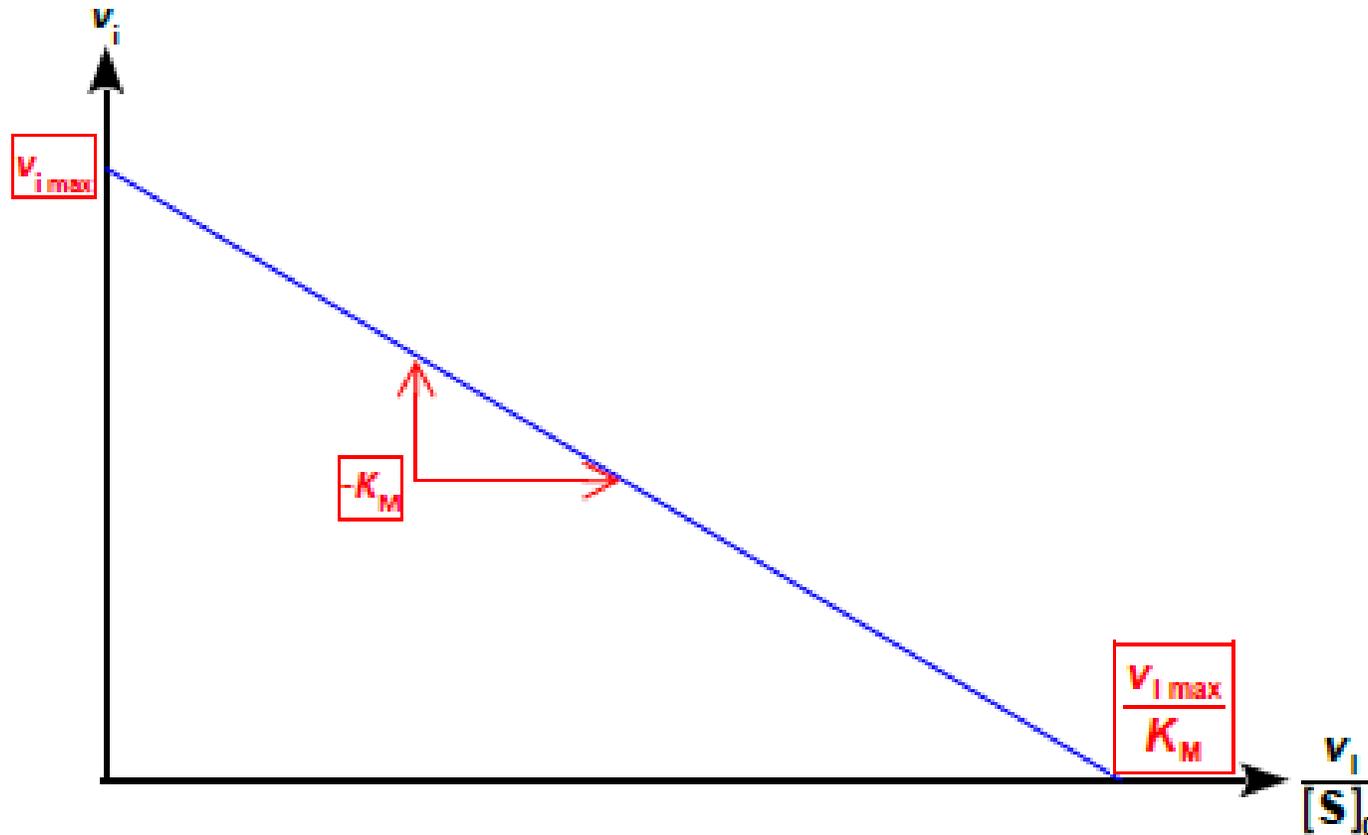
La représentation de HANES-WOOLF correspond au graphe : $\frac{[S]_0}{v_i} = f([S]_0)$



On obtient une droite affine d'équation : $\frac{[S]_0}{v_i} = \frac{1}{v_{i \max}} \times [S]_0 + \frac{K_M}{v_{i \max}}$

3.1.4. Représentation affine d'EADIE-HOFSTEE

La représentation d'EADIE HOFSTEE correspond au graphe : $v_i = f\left(\frac{v_i}{[S]_0}\right)$



On obtient une droite affine d'équation : $v_i = -K_M \times \left(\frac{v_i}{[S]_0}\right) + v_{i \max}$

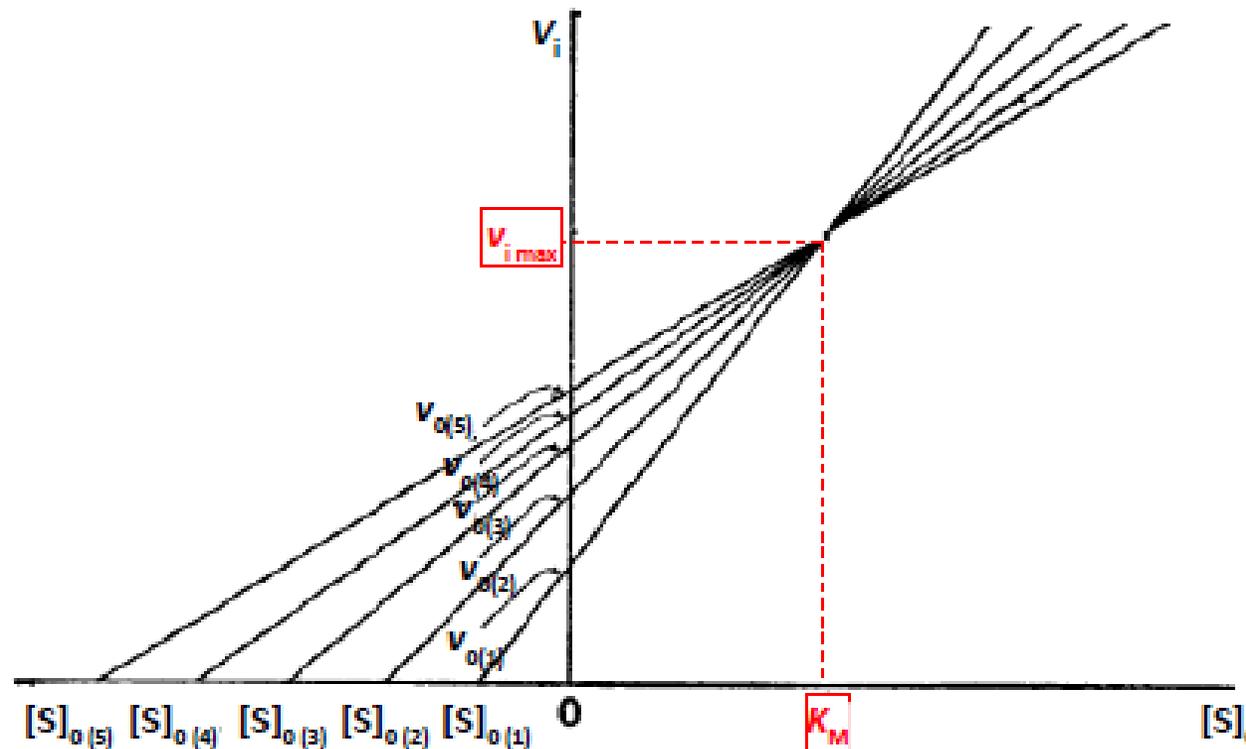
3.1.5. Représentation d'EISENTHAL et CORNISH-BOWDEN

La représentation d'EISENTHAL et CORNISH-BOWDEN correspond au graphe : $v_i = f([S]_0)$

L'axe des abscisses correspond à $[S]_0$ et l'axe des ordonnées correspond à v_i .

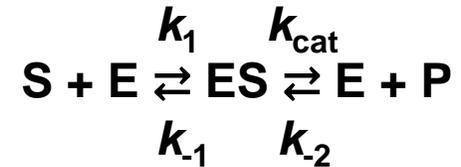
- on reporte la valeur "négative" de chaque concentration initiale en substrat sur l'axe des abscisses.
- on reporte la valeur correspondante de chaque vitesse initiale v_i mesurée sur l'axe des ordonnées.
- on trace les droites passant par ces couples de valeurs.

Leur point d'intersection de ces droites a pour coordonnées $(K_M; v_{i \max})$.



3.2. Significations physiques des paramètres cinétiques des enzymes michaéliennes

Soit la réaction enzymatique suivante :



On suppose que cette réaction est catalysée par une enzyme michaélienne dont le comportement cinétique est donné par l'équation de MICHAELIS-MENTEN :

$$v_i = v_{i \text{ max}} \times \frac{[\text{S}]_0}{K_M + [\text{S}]_0} \quad \text{ou} \quad v_i = k_{\text{cat}} \times [\text{E}]_0 \times \frac{[\text{S}]_0}{K_M + [\text{S}]_0}$$

On peut alors identifier plusieurs paramètres cinétiques :

- la vitesse initiale maximale $v_{i \text{ max}}$,
- la constante de MICHAELIS K_M ,
- la constante catalytique k_{cat} .

3.2.1. Signification de la vitesse initiale maximale $v_{i \max}$

$$v_{i \max} = k_{\text{cat}} \times [E]_0$$

$v_{i \max}$ = vitesse initiale maximale atteinte pour une concentration $[E]_0$ et pour des concentrations initiales en substrat $[S]_0$ saturantes. (théoriquement : $[S]_0 \geq 100 K_M$; en pratique $[S]_0 \geq 10 K_M$).

La valeur de la vitesse initiale maximale est l'asymptote horizontale de la branche ascendante de l'hyperbole de la représentation graphique de MICHAÉLIS-MENTEN $v_i = f[S]_0$.

Donc lorsque $[S]_0$ tend vers l'infini, v_i tend vers $v_{i \max}$.

3.2.2. Signification de la constante catalytique k_{cat}

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{i \max}}{[E]_0}$$

k_{cat} = constante de vitesse du premier ordre exprimée en unité de temps⁻¹ de la réaction $ES \rightarrow E + P$.
= nombre de molécules de substrat S transformées en produit P par molécule d'enzyme et par unité de temps et lorsque l'enzyme est saturée en substrat, c'est-à-dire lorsqu'elle fonctionne à $v_{i \max}$.

k_{cat} est aussi appelée **nombre de turn-over** pour une enzyme possédant un seul site catalytique.

k_{cat} est une mesure directe de l'efficacité de l'activité catalytique d'une enzyme sur son substrat : plus la valeur de k_{cat} est grande, plus les événements catalytiques au sein du complexe enzyme-substrat ES sont rapides.

$\frac{1}{k_{\text{cat}}}$ est le temps requis par une molécule d'enzyme pour transformer une molécule de substrat en produit, lorsque l'enzyme est saturée en substrat.

La valeur de k_{cat} , pour la plupart des enzymes, est comprise entre 1 et 10^4 s^{-1} .

3.2.3. Signification de la constante de MICHAÉLIS K_M

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

Dans la majorité des enzymes michaéliennes, les vitesses de formation et de dissociation du complexe enzyme-substrat ES sont grandes par rapport à celle de la conversion du substrat S en produit P.

Lorsqu'il est ainsi, k_{cat} est donc négligeable devant k_1 et k_{-1} .

K_M = constante d'équilibre qui équivaut à la constante de dissociation (K_D) du complexe enzyme-substrat ES.

Donc K_M devient : **$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} = \text{constante de dissociation du complexe enzyme-substrat ES } (K_D) = \frac{[E]_{\text{libre}} \times [S]}{[ES]}$**

K_M = mesure de la force de liaison du complexe enzyme-substrat ES, et donc de l'affinité du substrat pour l'enzyme.

Un K_M faible signifie que k_1 est plus grand que k_{-1} , et donc que le substrat se lie fortement à l'enzyme pour laquelle il a une forte affinité.

L'affinité d'un substrat pour l'enzyme est d'autant plus grande que le K_M est faible, et inversement.

Pour d'autres enzymes michaéliennes, comme la catalase ou la peroxydase par exemple, il s'est avéré que k_{cat} était grand par rapport à k_{-1} . On a alors :

$$K_M = \frac{k_{cat}}{k_1}$$

Dans ce cas, K_M ne correspond plus à la constante de dissociation K_D du complexe enzyme-substrat ES. La signification de K_M devient alors plus complexe.

Les valeurs de K_M se situent entre 10^{-1} et 10^{-7} mol.dm⁻³.

Dans tous les cas, la valeur de K_M correspond à la valeur de la $[S]_0$ pour laquelle on a $v_i = \frac{v_{i \max}}{2}$

3.2.4. Signification de la constante de spécificité r_{sp}

$$r_{sp} = \frac{k_{cat}}{K_M}$$

La constante catalytique k_{cat} mesure l'efficacité de la catalyse par l'enzyme sur le substrat, et la constante de MICHAÉLIS K_M mesure l'affinité de l'enzyme pour le substrat (lorsque k_{cat} est négligeable devant k_1 et k_{-1}).

Une enzyme peut avoir une très grande affinité mais avec une constante catalytique faible et inversement. L'un des deux paramètres ne suffit pas à caractériser le couple enzyme/substrat.

Constante de spécificité r_{sp} = reflète la spécificité globale d'une enzyme vis-à-vis d'un substrat.

$$r_{sp} = \frac{k_{cat}}{K_M} = k_{cat} \times \frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat}} = k_1 \times \frac{k_{cat}}{k_{-1} + k_{cat}}$$

La limite supérieure de r_{sp} est la constante de vitesse d'association de l'enzyme E et du substrat S : k_1 ($r_{sp} \leq k_1$)

Cette constante a donc pour limite maximale la vitesse de diffusion des macromolécules dans le milieu réactionnel qui est de l'ordre de 10^8 - 10^9 mol⁻¹·L·s⁻¹.

Certaines enzymes, comme l'anhydrase carbonique, l'acétylcholine-estérase et la triose-phosphate isomérase, ont une valeur de r_{sp} comprise entre 10^8 et 10^9 mol⁻¹·L·s⁻¹, ce qui montre que ces enzymes ont atteint ce qu'on appelle la **perfection cinétique**.

ENZYME	SUBSTRAT	k_{cat} (en s^{-1})	K_M (en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	r_{sp} (en $\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)
Acétylcholine-estérase	Acétylcholine	$1,4\cdot 10^4$	$9\cdot 10^{-5}$	$1,56\cdot 10^8$
Anhydrase carbonique	CO_2	$1\cdot 10^6$	$1,2\cdot 10^{-2}$	$8,34\cdot 10^8$
	HCO_3^-	$4\cdot 10^5$	$2,6\cdot 10^{-2}$	$1,54\cdot 10^8$
β -lactamase	Benzylpénicilline	$2\cdot 10^3$	$5\cdot 10^{-5}$	$4\cdot 10^7$
Pénicillinase	Benzylpénicilline	$2\cdot 10^3$	$5\cdot 10^{-5}$	$4\cdot 10^7$
Catalase	H_2O_2	$4\cdot 10^7$	1,01	$3,96\cdot 10^7$
Fumarase	Malate	$8\cdot 10^2$	$5\cdot 10^{-6}$	$1,6\cdot 10^8$
Chymotrypsine	Ester éthylique de la N-acétylglycine	$5,1\cdot 10^{-2}$	$4,4\cdot 10^{-1}$	$1,16\cdot 10^{-1}$
	Ester éthylique de la N-acétyltyrosine	$1,9\cdot 10^2$	$6,6\cdot 10^{-4}$	$2,88\cdot 10^5$

Ces quelques valeurs témoignent

- ✓ d'une part, de la diversité des valeurs selon les enzymes.
- ✓ d'autre part, de la spécificité d'une enzyme vis-à-vis d'un de ses substrats.