

TP EGE : DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES D'UNE ENZYME MICHAÉLIENNE

1. NOTION DE VITESSE INITIALE D'UNE RÉACTION ENZYMATIQUE

1.1. VITESSE (VOLUMIQUE) D'UNE RÉACTION ENZYMATIQUE

Soit la réaction enzymatique $S \rightarrow P$.

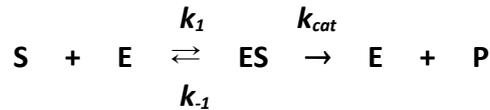
La vitesse (volumique) de la réaction est définie comme une **variation de concentration par unité de temps**.

La **vitesse instantanée** au temps t est $v_t = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t}$

Elle est obtenue par la **penne de la tangente à l'instant t à la courbe $[P]_{\text{formé}} = f(\text{temps})$ ou $[S]_{\text{consommé}} = f(\text{temps})$** .

1.2. SCHÉMA RÉACTIONNEL D'UNE RÉACTION ENZYMATIQUE

On utilise un modèle simplifié de la réaction enzymatique à 2 étapes :



Étape 1 : formation d'un complexe enzyme-substrat par association *non covalente, rapide et réversible*

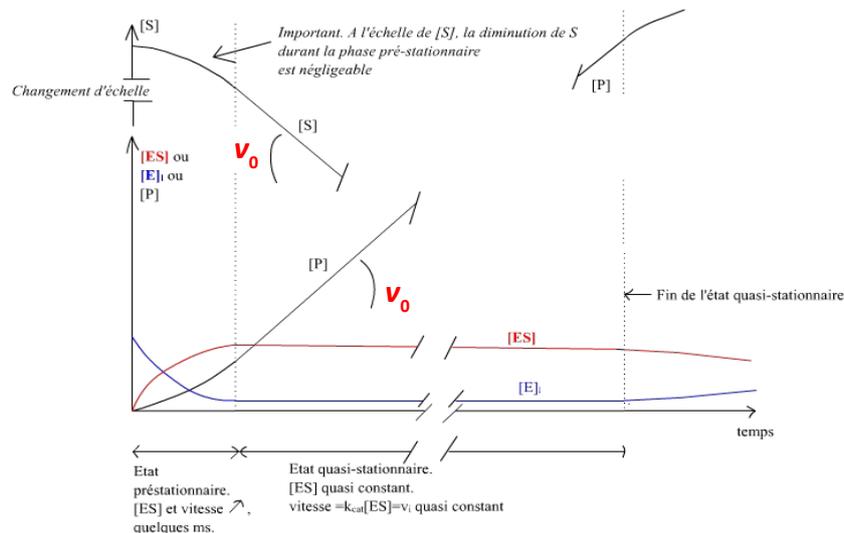
Étape 2 : transformation catalytique *plus lente* du substrat

Dans les conditions initiales, la quantité de produit apparue est considérée comme négligeable et la réaction retour $P + E \rightarrow ES$ est ignorée.

L'étape $ES \rightarrow E + P$ est donc l'étape limitante.

La **vitesse initiale** de la réaction peut donc s'écrire $v_i = k_{cat} \times [ES]$ (k_{cat} = constante de vitesse catalytique)

1.3. ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS AU COURS DU TEMPS



Au temps zéro vrai de la réaction, $[ES] = 0$ et la vitesse = 0.

Puis il se forme du complexe ES. Ainsi $[ES]$ augmente et la vitesse augmente.

Mais au fur et à mesure que $[ES]$ augmente, la vitesse de disparition de ES augmente aussi.

Ainsi on atteint un **état quasi-stationnaire** pour lequel **$[ES]$ devient quasi constant**.

La **vitesse initiale** $v_i = k_{cat} \times [ES]$ devient alors **quasi constante**.

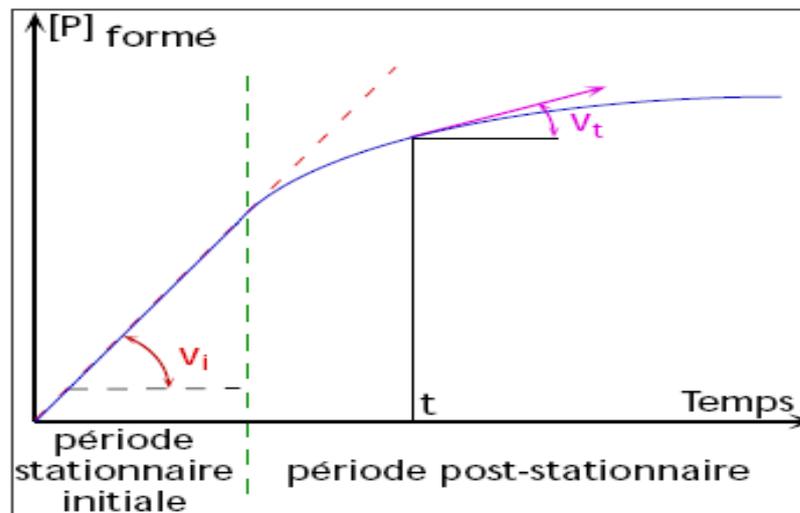
L'état quasi stationnaire se maintient tant que la diminution de $[S]$ n'est pas trop importante et tant que la réaction retour $E + P \rightarrow ES$ reste négligeable. Il peut durer plusieurs minutes.

Remarques :

- la durée de l'état préstationnaire est très brève ; elle est en général de l'ordre de quelques millisecondes (inaccessible avec les techniques classiques).
- Pour une même concentration en enzyme, la durée de la phase stationnaire augmente avec la concentration en substrat dans le milieu réactionnel.

1.4. CINÉTIQUE D'APPARITION D'UN PRODUIT (OU DE DISPARITION D'UN SUBSTRAT)

Lorsqu'on suit la cinétique d'apparition du produit, si la **concentration en substrat est grande devant la concentration en enzyme**, on obtient donc la courbe biphasique suivante :



La **vitesse initiale** de la réaction v_i correspond à la **vitesse instantanée au temps $t = 0$** .

Elle peut être considérée comme **constante pendant la phase stationnaire en condition initiale** et est donc obtenue par la relation :

$$v_i = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} \quad (\text{ou} \quad v_i = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} \quad \text{si l'on suit la disparition du substrat})$$

v_i correspond donc au coefficient directeur de la partie linéaire de la courbe $[P]_{\text{formé}} = f(\text{temps})$ ou $[S]_{\text{consommé}} = f(\text{temps})$.

2. CONDITIONS DE MESURE D'UNE VITESSE INITIALE D'UNE RÉACTION ENZYMATIQUE

Toutes les vitesses mesurées en enzymologie sont des vitesses initiales v_i .

La détermination d'une vitesse initiale v_0 se fait dans des **conditions opératoires définies** :

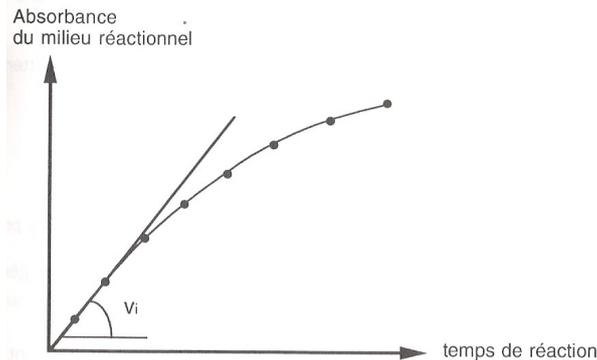
- **[S]₀ et [E]₀ et fixes.**
- **Température constante.**
Les constituants des milieux réactionnels doivent être préincubés pour assurer une constance de la température.
- **pH constant** par utilisation de systèmes tampons.
- **présence éventuelle de cofacteurs enzymatiques** (exemple : Mg^{2+}).
- **Utilisation d'un substrat permettant de suivre la réaction** (très souvent *analogue structural* du substrat naturel).

3. MÉTHODES DE DÉTERMINATION D'UNE VITESSE INITIALE D'UNE RÉACTION ENZYMATIQUE

3.1. MÉTHODE CINÉTIQUE EN SUIVI CONTINU

Il s'agit d'une méthode de mesure **en continu** que l'on peut mettre en œuvre, par exemple, quand le produit formé ou le substrat disparu présentent des caractéristiques d'absorption particulières.

L'absorbance sera proportionnelle à la concentration en produit ou en substrat si l'on reste dans le domaine de validité de la loi de BEER-LAMBERT.



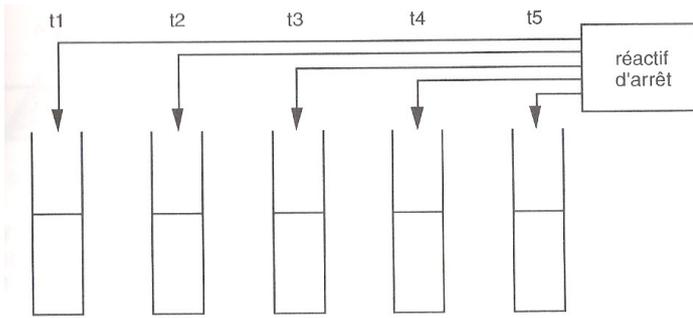
3.1. MÉTHODES CINÉTIQUES PAR POINTS, OU MÉTHODES DISCRÈTES

Une méthode cinétique par points peut être appliquée si la réaction ne peut être suivie en continu.

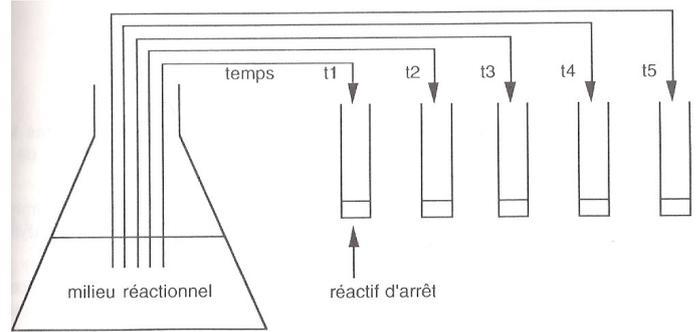
La réaction est arrêtée à différents temps en inactivant l'enzyme. Le produit formé ou le substrat disparu est alors dosé *a posteriori* (par exemple avec une réaction colorée).

Cette technique est la seule possible quand substrat et produit ne possèdent pas de caractéristiques spectrophotométriques particulières.

On peut utiliser 2 techniques :



Technique des « tubes décalés »



§ 1. th. 4. Technique des « prélèvements »

Ces techniques étant fastidieuses, il est possible, **quand on connaît la durée de la période stationnaire**, de ne réaliser que deux points → **méthode cinétique en deux 2 points**.

4. DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES D'UNE ENZYME MICHAÉLIENNE

Les paramètres cinétiques d'une enzyme michaélienne sont :

- **Vitesse initiale maximale, notée $v_{i,max}$:**
Vitesse initiale maximale atteinte pour la concentration $[E]_0$ et pour une concentration initiale en substrat $[S]_0$ très grande devant K_M (théoriquement : $[S]_0 \geq 100 K_M$; en pratique $[S]_0 \geq 10 K_M$) et dans les conditions opératoires définies.
- **Constante de MICHAÉLIS, notée K_M :**
Constante de dissociation (K_D) du complexe enzyme-substrat ES.
 Pour la plupart des enzymes michaéliennes, K_M renseigne sur l'affinité entre une enzyme et un substrat dans les conditions opératoires définies : l'affinité entre une enzyme et un substrat est d'autant plus grande que la valeur de K_M est faible.
- **Constante catalytique, notée k_{cat} :**
 k_{cat} est une **constante de vitesse du premier ordre exprimée en unité de temps⁻¹**.
 k_{cat} représente le **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, dans les conditions opératoires définies.**
 k_{cat} est aussi appelée **nombre de turn-over** pour les enzymes possédant un seul site catalytique.
 k_{cat} est donc 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.**
 $1/k_{cat}$ est le **temps requis par une molécule d'enzyme E pour transformer une molécule de substrat S en produit P, lorsque l'enzyme est saturée en substrat.**

K_M et $v_{i,max}$ peuvent être déterminées par différentes représentations graphiques.

Pour cela il faut au préalable **déterminer les vitesses initiales v_i pour des concentrations initiales en substrat $[S]_0$ différentes et dans les conditions opératoires définies.**