

## 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  $S \rightarrow P$ .

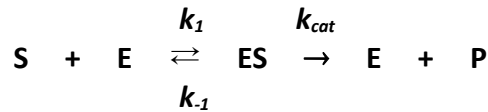
La vitesse (volumique) de la réaction est définie comme une **variation de concentration par unité de temps**.

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*

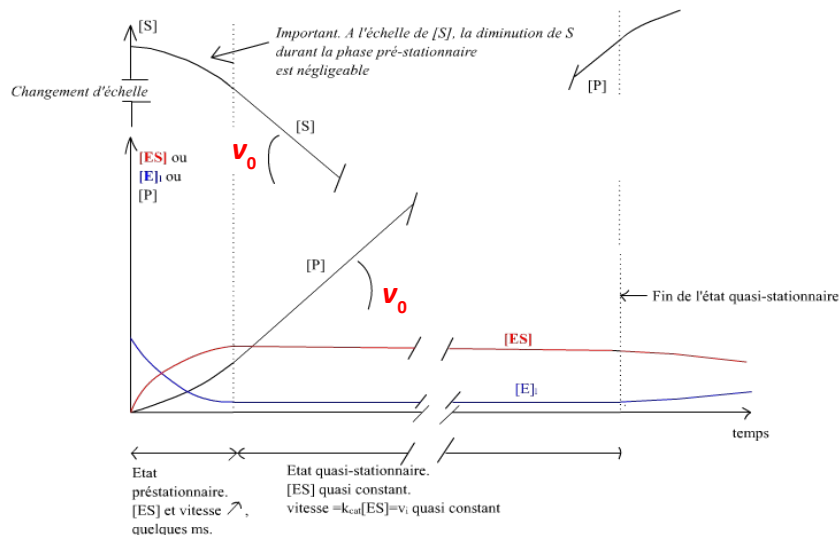
Étape 2 : transformation catalytique *plus lente* du substrat

**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**.

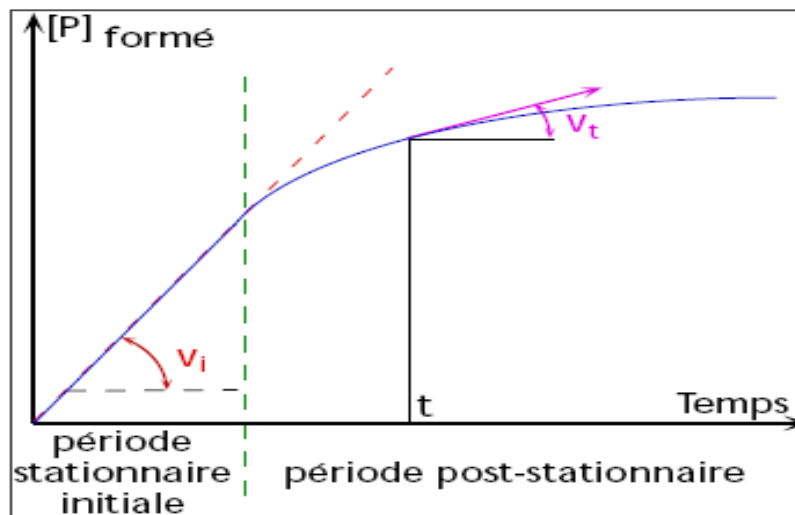
L'état quasi stationnaire se maintient tant que la diminution de  $[S]$  n'est pas trop importante et tant que la réaction retour  $E + P \rightarrow ES$  reste négligeable. Il peut durer plusieurs minutes.

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** :

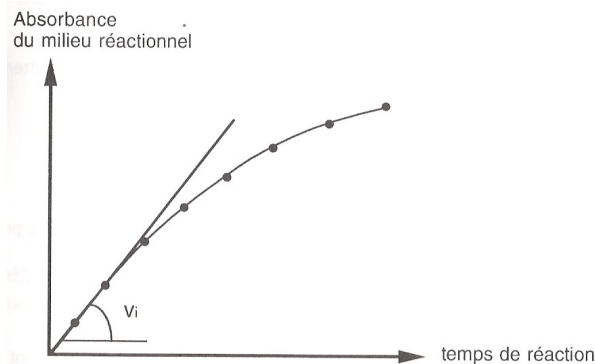
- **$[S]_0$  et  $[E]_0$  et fixes.**
- **Température constante.**  
Les constituants des milieux réactionnels doivent être préincubés pour assurer une constance de la température.
- **pH constant** par utilisation de systèmes tampons.
- **présence éventuelle de cofacteurs enzymatiques** (exemple :  $Mg^{2+}$ ).
- **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.



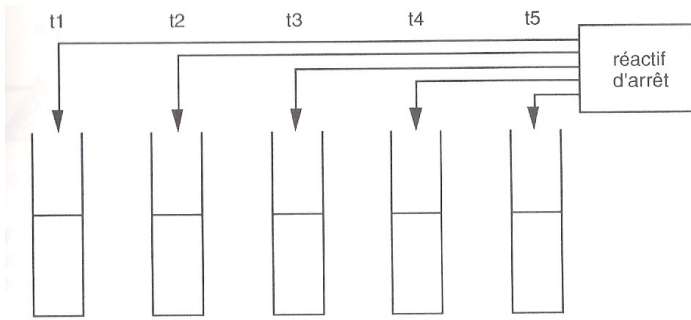
#### 3.1. MÉTHODES CINÉTIQUES PAR POINTS, OU MÉTHODES DISCRÈTES

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

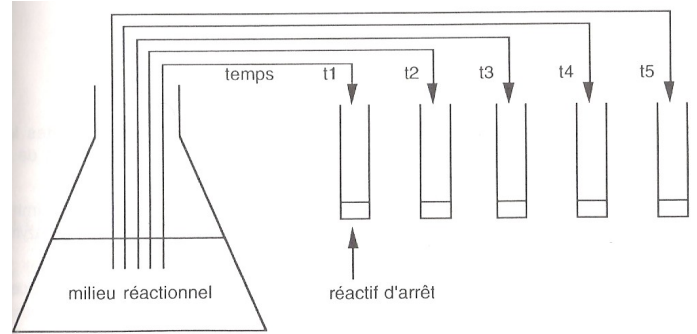
**La réaction est arrêtée à différents temps en inactivant l'enzyme.** Le produit formé ou le substrat disparu est alors dosé *a posteriori* (par exemple avec une réaction colorée).

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<sup>-1</sup>**.  
 $k_{cat}$  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.**