

# Introduction à la cinétique enzymatique

<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>2. BREFS RAPPELS</b>	<b>1</b>
2.1. LA RÉACTION CHIMIQUE	1
2.1.1. Degré d'avancement	1
2.1.2. Vitesse de la réaction	1
2.1.3. Ordre d'une réaction	2
2.1.4. Cas particulier des réactions élémentaires	2
2.2. LA CATALYSE	5
<b>3. CINÉTIQUE ENZYMATIQUE</b>	<b>5</b>
3.1. LA CATALYSE ENZYMATIQUE	6
3.2. LE MODÈLE DE BASE DE LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE	8
3.2.1. Modèle de Michaëlis-Menten	9
3.2.2. Modèle de Briggs-Haldane	10
<b>4. LES CONSTANTES CINÉTIQUES</b>	<b>11</b>
4.1. LA SIGNIFICATION DES CONSTANTES CINÉTIQUES	11
4.1.1. Vitesse maximale	11
4.1.2. Constante catalytique	12
4.1.3. Constante de Michaëlis, constante de dissociation	12
4.1.4. Constante de spécificité	13
4.1.5. Quelques valeurs de constantes catalytique, de Michaëlis, de spécificité	13
4.2. LA DÉTERMINATION DES CONSTANTES CINÉTIQUES	14
4.2.1. Mesure de la vitesse initiale	14
4.2.2. Représentation hyperbolique (Michaëlis-Menten)	15
4.2.3. Représentation de Lineweaver-Burk	15
4.2.4. Représentation Eadie-Hofstee	16
4.2.5. Représentation de Hanes-Woolf	16
4.2.6. Représentation de Eisenthal et Cornish-Bowden (graphe linéaire direct)	17
4.2.7. Quelques commentaires sur ces représentations	18
<b>5. DOSAGE ENZYMATIQUE</b>	<b>19</b>
5.1. ACTIVITÉ ENZYMATIQUE	19
5.1.1. Activité enzymatique (ou catalytique)	19
5.1.2. Activité enzymatique (ou catalytique) spécifique	20
<b>6. CE QUI N'A PAS ÉTÉ DIT</b>	<b>20</b>

# Introduction à la cinétique enzymatique

## 1. Introduction

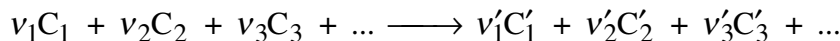
Presque toutes les réactions chimiques qui ont lieu dans les systèmes biologiques sont catalysées par des enzymes qui constituent la classe de protéines à la fois la plus vaste et la plus spécialisée. Ils représentent l'instrument primaire direct de l'expression de l'action du gène puisqu'ils catalysent les milliers de réactions chimiques qui constituent le métabolisme intermédiaire des cellules. Dans ce chapitre introductif, nous aborderons uniquement les paramètres cinétiques des mécanismes enzymatiques les plus simples.

## 2. Brefs rappels

Voici un bref rappel de notions, définitions que vous avez vues dans les cours de chimie.

### 2.1. La réaction chimique

Soit la réaction chimique suivante en phase homogène :



où  $C$  et  $\nu$  représentent respectivement le composé et le coefficient stœchiométrique. Les composés  $C_i$  et  $C'_i$  sont respectivement appelés les réactifs (ou réactants) et les produits.

#### 2.1.1. Degré d'avancement

Au cours de cette transformation, le nombre de moles des différents constituants ne peuvent varier indépendamment. Nécessairement, nous avons :

$$\frac{dn'_1}{\nu'_1} = \frac{dn'_2}{\nu'_2} = \dots = -\frac{dn_1}{\nu_1} = -\frac{dn_2}{\nu_2} = \dots = d\xi \quad (\text{I})$$

où  $\xi$  est le **degré d'avancement de la réaction** et où les  $dn$  représentent les variations du nombre de moles du constituant considéré.

#### 2.1.2. Vitesse de la réaction

La **vitesse de la réaction** est définie par la vitesse d'accroissement de l'avancement rapportée à l'unité de volume :  $v = \frac{1}{V} \frac{d\xi}{dt}$ . La vitesse peut être aussi exprimée par rapport aux variations de concentrations des composés en utilisant l'équation (I) :

$$\frac{1}{v'_1} \frac{dn'_1}{V dt} = \frac{1}{v'_2} \frac{dn'_2}{V dt} = \dots = -\frac{1}{v_1} \frac{dn_1}{V dt} = -\frac{1}{v_2} \frac{dn_2}{V dt} = \dots = \frac{1}{V} \frac{d\xi}{dt} \quad (\text{II})$$

Le rapport  $\frac{1}{V} \frac{dn}{dt}$  représente la variation de la concentration en fonction du temps. L'équation (II) peut s'écrire aussi :

$$\frac{1}{v'_1} \frac{d[C'_1]}{dt} = \frac{1}{v'_2} \frac{d[C'_2]}{dt} = \dots = -\frac{1}{v_1} \frac{d[C_1]}{dt} = -\frac{1}{v_2} \frac{d[C_2]}{dt} = \dots = \frac{1}{V} \frac{d\xi}{dt} \quad (\text{III})$$

où les [C] représentent les concentrations des différents composés.

Notons que la vitesse d'une réaction a la **dimension d'une concentration par unité de temps** [(mole/litre) temps<sup>-1</sup>] (M s<sup>-1</sup>).

### 2.1.3. Ordre d'une réaction

Dans le cas le plus général, la loi de vitesse caractéristique d'une réaction chimique ne peut pas être établie à priori, mais seulement à partir de l'expérience. Phénoménologiquement, la vitesse peut s'écrire :  $v = k[A]^\alpha [B]^\beta [C]^\gamma \dots$  où les A, B, C .. sont les réactifs et les produits intervenant dans la réaction chimique.

- **k** est appelée **constante de vitesse** (c'est une constante pour les paramètres thermodynamiques : température, pression, concentrations initiales déterminées). Sa dimension est dépendante de la loi de vitesse.

-  $\alpha, \beta, \gamma$  sont appelés les **ordres partiels de réaction** par rapport à l'espèce chimique pour laquelle ils sont exposants. Dans le cas le plus général, ils ne sont pas égaux aux coefficients stœchiométriques des réactifs et des produits.

-  $n = \alpha + \beta + \gamma + \dots$  n est appelé l'**ordre (global)** de la réaction

L'étude expérimentale des différentes courbes  $v = f([A])$ , .. permet de déterminer les ordres partiels de la réaction.

### 2.1.4. Cas particulier des réactions élémentaires

Les réactions élémentaires sont des réactions ou processus qui

- ne peuvent être décomposée en étapes plus simples
- reflètent un évènement moléculaire, une collision réactive telle que celle modélisée dans le cadre de la théorie des collisions (M. Trautz, W.C.McC Lewis et Jean Perrin dans les années 1910-1920), complétée par Lindemann, puis par Henry Eyring.

Toute réaction élémentaire est caractérisée par les propriétés suivantes:

- 1 - son ordre global est aussi sa molécularité. Il indique le nombre de molécules actuellement impliquées dans le processus moléculaire dont la réaction en est la manifestation

- 2 - l'ordre d'une réaction élémentaire est toujours entier
- 3 - la vitesse d'une réaction élémentaire ne dépend jamais de la concentration d'un produit, mais uniquement des réactifs
- 4 - l'ordre partiel par rapport à un réactif A est égal au coefficient stœchiométrique (entier) de A
- 5 - une réaction élémentaire n'a pas d'intermédiaire stable
- 6 - sa constante de vitesse satisfait la loi d'Arrhénius (voir cours de Chimie)

*Nous supposons dans la suite que pour toutes les études cinétiques, ce sont des réactions élémentaires qui interviennent dans les différents schémas réactionnels.*

### **Réaction d'ordre zéro (ou nul)**

Soit une réaction élémentaire :  $A \longrightarrow P$

Si la réaction est d'ordre zéro, la vitesse de réaction ne dépend pas des concentrations des produits intervenant dans la réaction :  $v = k = -\frac{d[A]}{dt}$ , d'où en intégrant :

$$[A] = [A]_0 - kt, \text{ où } [A]_0 \text{ est la concentration de A à l'instant } t_0 = 0$$

La concentration des réactifs diminue linéairement en fonction du temps, et évidemment celle des produits augmente linéairement en fonction du temps.

*Une représentation de  $[A] = f(t)$  est une droite de pente  $-k$ .*

*Pour une réaction d'ordre zéro, la constante de vitesse  $k$  a les dimensions de  $[(\text{mole/litre}) \text{ temps}^{-1}]$  ( $\text{M s}^{-1}$ ).*

### **Réaction du premier ordre (ou d'ordre 1)**

Soit une réaction élémentaire :  $A \longrightarrow P$

Si la réaction est d'ordre 1 par rapport à A, la vitesse de réaction s'écrit :

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A], \text{ d'où } \frac{d[A]}{[A]} = -kdt \text{ et en intégrant :}$$

$$\text{Ln} \left( \frac{[A]}{[A]_0} \right) = -kt \text{ ou encore } [A] = [A]_0 e^{-kt}, \text{ ou encore } \text{Ln}([A]) = -kt + \text{Ln}([A]_0)$$

où  $[A]_0$  est la concentration de A à l'instant  $t_0 = 0$ .

La concentration des réactifs diminue exponentiellement en fonction du temps, et évidemment celle des produits augmente exponentiellement en fonction du temps.

On a l'habitude de définir pour une réaction d'ordre 1 le **temps de demi-vie** (appelé aussi temps de demi-réaction) : temps nécessaire pour consommer la moitié de la concentration du réactif.

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln}(2)}{k} = \frac{0,693}{k}$$

*Une représentation de  $\text{Ln}([A]) = f(t)$  est une droite de pente  $-k$*

*Pour une réaction d'ordre un, la constante de vitesse  $k$  a les dimensions de  $[\text{temps}^{-1}]$  ( $\text{s}^{-1}$ )*

### **Réaction du second ordre (ou d'ordre 2)**

Soit une réaction élémentaire :  $A + A \longrightarrow P$

Si la réaction est d'ordre 2 par rapport à A, la vitesse de réaction s'écrit :

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2, \text{ d'où } \frac{d[A]}{[A]^2} = -kdt \text{ et en intégrant :}$$

$$\frac{1}{[A]} = kt + \frac{1}{[A]_0}, \text{ où } [A]_0 \text{ est la concentration de A à l'instant } t_0=0.$$

La concentration des réactifs diminue hyperboliquement en fonction du temps, et évidemment celle des produits augmente hyperboliquement en fonction du temps.

*Une représentation de  $1/[A] = f(t)$  est une droite de pente  $k$*

*Pour une réaction d'ordre deux, la constante de vitesse  $k$  a les dimensions de  $[(\text{litre/mole}) \text{ temps}^{-1}]$  ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).*

### **Détermination de l'ordre d'une réaction (méthode différentielle)**

Dans les paragraphes précédents, pour chaque ordre de réaction, nous avons déterminé une représentation particulière  $f[A]=g(t)$  qui est linéaire et permet de déterminer la constante de vitesse. Si nous avons non pas des mesures expérimentales  $([A], t)$  mais des mesures  $[v, t]$  où  $v$  est la vitesse de la réaction, la relation à étudier est  $v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^n$  où  $n$  est l'ordre de

la réaction :

$$v = k[A]^n \Rightarrow \text{Ln}(v) = \text{Ln}(k) + n\text{Ln}([A]),$$

*Une représentation de  $\text{Ln}(v)$  en fonction de  $\text{Ln}([A])$  est une droite de pente  $n$  (ordre de la réaction) et d'ordonnée à l'origine  $\text{Ln}(k)$ .*

*Remarque* : si à la place des logarithmes népériens, nous avons utilisé les logarithmes décimaux (Log), la relation aurait été identique.

## 2.2. La catalyse

Dès 1835, Jöns Jacob Berzelius appela **catalyse** l'augmentation de la vitesse d'une réaction due à la présence de substances particulières qui sont inchangées à la fin de la réaction.

En 1895 Wilhelm Ostwald définit un catalyseur comme :

- une substance qui modifie la vitesse d'une réaction sans modifier le bilan énergétique global
- et ajouta en 1902 : une substance que l'on retrouve inchangée à la fin de la réaction.

On dit que la catalyse est **homogène** si le catalyseur fait partie de la même phase que le système réactionnel, et dans le cas contraire on parle de catalyse **hétérogène**.

Un catalyseur est une substance :

- 1) que l'on retrouve **inchangée** à la fin de la réaction
- 2) qui **modifie la vitesse des réactions thermodynamiquement possibles** (voir cours de thermodynamique chimique : énergie libre de Gibbs ou enthalpie libre) puisqu'il ne modifie pas l'énergie du système réactionnel
- 3) qui modifie de la même manière la vitesse de deux réactions opposées selon la règle de réversibilité, et permet d'atteindre plus rapidement un équilibre chimique.

## 3. Cinétique enzymatique

En 1752, René-Antoine Ferchault de Réaumur observe que des aliments solides étaient convertis en une matière fluide par l'effet d'un "ferment" sécrété par l'estomac, observation confirmée par Lazzaro Spallanzani. En 1833, Anselme Payen et Jean-François Persoz montrent qu'après un traitement à l'éthanol du malt, l'extrait aqueux a la capacité d'hydrolyser l'amidon : cet extrait qui catalysait le passage d'un état insoluble à un état soluble fut dénommé **diastase** (du grec διασπασιζ = séparation). En 1836 Theodor Schwann démontrait la présence dans un extrait d'estomac d'un ferment protéolytique, qu'il appela **pepsine**.

De nombreuses études sur la fermentation par des levures furent menées par Louis Pasteur, Justus von Liebig, Georg Ernst Stahl, Marcelin Berthelot. En 1878 Wilhelm Kunhe proposa le nom d'**enzyme** pour qualifier ces ferments et en 1898 Duclaux proposa le suffixe "**ase**".

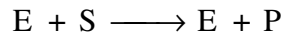
En 1897, Gabriel Bertrand observa que certains enzymes requièrent des facteurs dialysables pour leur activité : il les nomma "**coenzymes**".

Le début du XX<sup>ème</sup> siècle voit une débauche de travaux de purification des enzymes qui permettent l'élucidation de nombreuses voies métaboliques et confirment que les enzymes sont des protéines : expériences de cristallisation de l'uréase par James Summer en 1926, de la pepsine et de la chymotrypsine par John Northrop en 1933, de la ribonucléase A par Moses Kunitz en 1940. Enfin en 1965, David Phillips et son équipe publient la première structure tridimensionnelle d'un enzyme, le lysozyme (purifié à partir du blanc d'œuf).

### 3.1. La catalyse enzymatique

En 1893, Wilhelm Ostwald montra que les enzymes sont des catalyseurs et en 1894 Emil Fisher posa l'acte fondateur de la notion de **stéréospécificité** dans le phénomène de catalyse enzymatique sous l'image d'une clé qui ouvre une serrure et une seule.

Les mécanismes moléculaires de la catalyse enzymatique ne posent pas de problèmes différents de ceux de la réactivité chimique. Soit la réaction élémentaire catalysée :



où E est l'**enzyme** (catalyseur protéique que l'on retrouve dans le bilan des produits), S est le **substrat** et P le produit. Les propriétés importantes de l'enzyme sont :

- 1) il est retrouvé inchangé à la fin de la réaction
- 2) il modifie la vitesse des réactions thermodynamiquement possibles (il ne modifie pas l'énergie du système réactionnel)
- 3) il est stéréospécifique du substrat (à la différence de nombreux catalyseurs chimiques)
- 4) notons que certains enzymes n'ont d'activité catalytique qu'en présence de leur **cofacteur**, composé non protéique

Le facteur d'accroissement de la vitesse de la réaction par un enzyme peut aller jusqu'à la valeur de  $10^{17}$  fois (cas de la phosphatase alcaline). Vous avez vu en chimie ou vous verrez dans la suite (3<sup>ème</sup> année de licence) le modèle de l'état de transition de Henry Eyring qui rend compte de l'accroissement de la vitesse d'une réaction par un catalyseur..

Enzyme	Facteur d'accroissement
Chymotrypsine	$10^7$
Lysozyme	$2 \cdot 10^8$
Uréase	$10^{14}$
Phosphatase alcaline	$10^{17}$

La stéréospécificité des enzymes vis à vis de leurs substrats ainsi que le nombre de ces derniers dans les métabolismes des cellules, impliquent une grande diversité des catalyseurs enzymatiques. Les enzymes ont des noms courants qui témoignent plus des circonstances de leurs découvertes que d'une classification logique.

Pour remédier à cela, la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie a proposé une nomenclature, ajoutée au nom courant, qui tient compte des types de réaction que l'enzyme catalyse : elle s'écrit sous la forme **E.C.X.X.X.X** (E.C. abréviation de "Enzyme Commission").

Le premier X indique le type de réaction catalysée, c'est la **classe** de l'enzyme :

N°	Classe de l'enzyme
X=1	Oxydoréductases (transfert d'électrons : oxydoréduction)
X=2	Transférases (transfert d'un groupe fonctionnel d'une molécule à une autre)
X=3	Hydrolases (coupure de liaisons par hydrolyse)
X=4	Lyases (coupure de liaison par élimination)
X=5	Isomérases (changement dans la configuration de la molécule de substrat)
X=6	Ligases (condensation de deux molécules)

Le deuxième X indique la nature du substrat, *prenons la classe des hydrolases (3)* :

- 3.1 Acting on ester bonds
- 3.2 Glycosylases
- .....
- .....
- 3.11 Acting on Carbon-Phosphorus Bonds
- 3.12 Acting on Sulfur-Sulfur Bonds
- 3.12 Acting on Carbon-Sulfur Bonds

Dans les *hydrolases agissant sur des liaisons ester (3.1)* :

- 3.1.1 Carboxylic Ester Hydrolases
- 3.1.2 Thiolester Hydrolases
- 3.1.3 Phosphoric Monoester Hydrolases
- .....
- .....
- 3.1.30 Endoribonucleases Active with either Ribo- or Deoxyribonucleic Acids and Producing 5'-Phosphomonoesters
- 3.1.31 Endoribonucleases Active with either Ribo- or Deoxyribonucleic Acids and Producing 3'-Phosphomonoesters

Dans les *carboxyl ester hydrolases (3.1.1)* :

- 3.1.1.1 carboxylesterase
- 3.1.1.2 arylesterase
- 3.1.1.3 triacylglycerol lipase
  
- 3.1.1.78 polyneuridine-aldehyde esterase
- 3.1.1.79 hormone-sensitive lipase

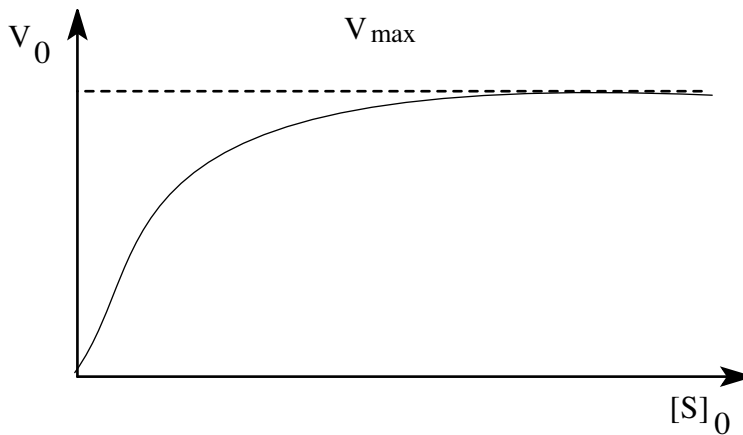
Exemple : la lipase pancréatique qui hydrolyse les triglycérides a comme nomenclature :

**E.C.3.1.1.3**



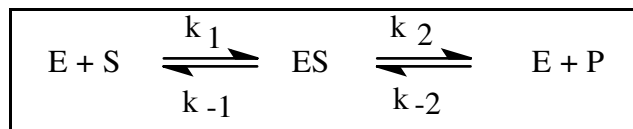
### 3.2. Le modèle de base de la cinétique enzymatique

En 1902, Victor Henri et Adrian Brown suggérèrent indépendamment que dans la réaction enzymatique, l'hypothèse de la formation d'un complexe enzyme-substrat était nécessaire pour interpréter la forme hyperbolique des courbes **vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale de substrat**, les autres paramètres étant constants (concentration enzyme, température, pH, pression ..). La réaction était d'ordre zéro par rapport au substrat au-dessus d'une certaine concentration.

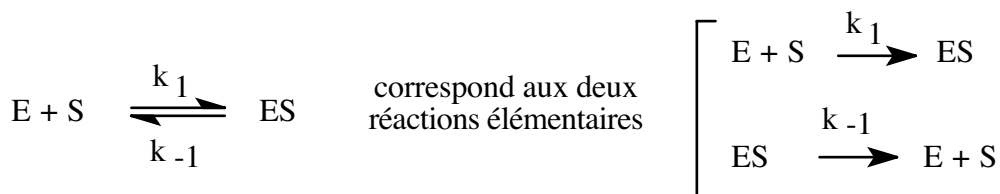


Relation entre la vitesse initiale et la concentration initiale du substrat

Le modèle de base de la cinétique enzymatique s'écrit ainsi :



où E est l'enzyme, S le substrat, P le produit de réaction et les  $k_i$  sont les constantes de vitesse des réactions élémentaires :



Ce cas correspond aux réactions réversibles ou équilibres.

Nous allons maintenant voir le traitement de ce système réactionnel en le simplifiant par des hypothèses expérimentales ou ad hoc.

### 3.2.1. Modèle de Michaëlis-Menten

En 1913, suite aux travaux de Victor Henri, Maud Menten et Leonor Michaëlis résolurent le système réactionnel en posant les hypothèses simplificatrices suivantes, suggérées par les études expérimentales :

- 1) les mesures de cinétique seront toujours faites pour des concentrations de produit très faible : c'est la mesure de la **vitesse initiale** ( $v_i$ ) pour  $[P] \cong 0$  et  $[S] \cong [S]_0$  où  $[S]_0$  est la concentration du substrat à l'instant initial. Cette hypothèse permet de négliger la réaction élémentaire  $E + P \xrightarrow{k_{-2}} ES$ .
- 2) la concentration totale du substrat  $[S]_0$  est grande ( $\gg$ ) devant celle de l'enzyme  $[E]_0$ .
- 3) dès l'addition de l'enzyme dans la solution de substrat, il s'établit un équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe (appelé **complexe de Michaëlis**), on parle d'hypothèse du quasi-équilibre ou pré-équilibre.

Le schéma réactionnel s'écrit ainsi :



et pour calculer la vitesse d'apparition du produit, le système d'équations à résoudre est :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{(a) } v = k_2[ES] \\ \text{(b) } K = \frac{[E][S]}{[ES]}, \text{ avec } K = \frac{k_{-1}}{k_1} \text{ constante de dissociation du complexe ES} \\ \text{(c) } [S]_0 = [S] + [ES] + [P] \\ \text{(d) } [E]_0 = [E] + [ES] \end{array} \right.$$

en remplaçant  $[E]$  tiré de l'équation (d) dans l'équation (b),

en simplifiant l'équation (c) en tenant compte des hypothèses (1) et (2) ( $[S]_0 \cong [S]$ ) et en remplaçant  $[S]$  toujours dans l'équation (b),

nous obtenons une équation simplifiée :  $[ES] = \frac{[E]_0 [S]_0}{K + [S]_0}$

d'où, en remplaçant  $[ES]$  dans l'équation (a), le système approximé ( $v$  est dans ce cas  $v_i$ , **vitesse initiale**, hypothèse (1)), se réduit à :

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K + [S]_0}, \text{ soit } V_{\text{Max}} = k_2 [E]_0 \text{ et } K_S = K = \frac{k_{-1}}{k_1}, \text{ la vitesse s'écrit sous la forme :}$$

$$\boxed{v = \frac{V_{\text{Max}} [S]_0}{K_S + [S]_0}} \text{ appelée l'équation de Michaëlis-Menten.}$$

$V_{Max}$  est noté en abrégé  $V_M$ . Le rapport  $\frac{V_M}{[E]_0}$ , ici égal à  $k_2$  est noté  $k_{cat}$ , **constante catalytique** de l'enzyme.  $K$ , constante de dissociation du complexe enzyme-substrat est traditionnellement noté  $K_S$ .

*Note* : ce modèle est aussi appelé modèle de Henri-Michaëlis-Menten.

*Attention* : l'usage a consacré l'élimination de l'indice  $i$  pour la vitesse (initiale) qui rappelait la condition d'approximation et aussi de l'indice  $0$  pour la concentration initiale de substrat  $[S]_0$ . Nous garderons l'indice  $0$  pour la concentration de substrat pour ne pas oublier ces deux conditions.

### 3.2.2. Modèle de Briggs-Haldane

En 1925, George Briggs et John Haldane ont montré que l'on obtenait une équation similaire à celle de Michaëlis-Menten avec des hypothèses moins restrictives : il n'est pas nécessaire de poser la condition (3) : établissement d'un équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe pour résoudre le système simplement. Il suffit de supposer que le système réactionnel est dans un **état stationnaire** (ou quasi-stationnaire). Ceci signifie que la vitesse de disparition du complexe Michaëlien (ES) est nulle  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ ,

donc sa concentration constante  $[ES] = Ct$ .

C'est le cas de la plupart des expériences de cinétique, où on peut considérer qu'après un état pré-stationnaire très court, l'état stationnaire est atteint.

Toujours, pour le même schéma réactionnel avec les conditions (1), (2) et de l'état stationnaire :



le système d'équations à résoudre est :

$$\left\{ \begin{array}{l} (a') \quad v = k_2[ES] \\ (b') \quad 0 = \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \\ (c') \quad [S]_0 = [S] + [ES] + [P] \\ (d') \quad [E]_0 = [E] + [ES] \end{array} \right.$$

en utilisant l'équation (d') pour remplacer  $[E]$  dans l'équation (b'),

en simplifiant l'équation (c') en tenant compte des hypothèses (1) et (2) (c)  $[S]_0 \cong [S]$

$$k_1([E]_0 - [ES])[S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (b'')$$

en calculant [ES] à l'aide de (b'') et en le remplaçant dans (a'), on obtient pour le système approximé ( $v$  est dans ce cas  $v_i$ , **vitesse initiale**) :

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{\frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1} + [S]_0}, \text{ soit } V_M = k_2[E]_0 \text{ et } K_M = \frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1} \text{ la vitesse s'écrit sous la}$$

forme : 
$$v = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0}$$
 équation de Briggs-Haldane

Cette équation de Briggs-Haldane est **traditionnellement aussi appelée équation de Michaëlis-Menten**, en hommage. La constante  $K_M = \frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1}$  est appelée **constante de**

**Michaëlis**.

Remarquons que si  $k_2$  est petit devant  $k_{-1}$ , l'équation de Briggs-Haldane est identique à celle de Michaëlis-Menten ( $K_M = K_S$ ).

Pour la **plupart de tous les enzymes**,  $k_2$  est effectivement petit devant  $k_{-1}$ .

Le rapport  $\frac{V_M}{[E]_0}$ , ici égal à  $k_2$  est noté  $k_{cat}$ , **constante catalytique** de l'enzyme (idem précédemment).

*Attention* : l'usage a consacré l'élimination de l'indice  $i$  pour la vitesse (initiale) qui rappelait la condition d'approximation et aussi de l'indice  $0$  pour la concentration initiale de substrat  $[S]_0$ . Ces deux conditions ne doivent jamais être oubliées lors de l'utilisation de l'équation ci-dessus.

## 4. Les constantes cinétiques

Les équations de Michaëlis-Menten ou de Briggs-Haldane ont été obtenues par la résolution d'un système d'équations simplifié par l'introduction d'hypothèses :

- 1) la vitesse mesurée doit être la vitesse initiale de la réaction
- 2) la concentration du substrat doit être grande devant celle de l'enzyme
- 3) hypothèse du pré-équilibre ou hypothèse de l'état stationnaire

### 4.1. La signification des constantes cinétiques

#### 4.1.1. Vitesse maximale

$V_M = k_2[E]_0 = k_{cat}[E]_0$  est la **vitesse maximale initiale**  $v$  atteinte pour la concentration  $[E]_0$  et pour une concentration très grande de  $[S]_0$  devant  $K_M$  :

$$v = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0} \text{ si } [S]_0 \rightarrow \infty \Rightarrow v \rightarrow V_M$$

La vitesse maximale est l'asymptote de la branche hyperbolique représentant l'équation de Michaëlis-Menten dans le modèle de Michaëlis-Menten ou de Briggs-Haldane.

Expérimentalement, ceci est réalisé si  $[S]_0 \gg K_M \Rightarrow v = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0} \cong V_M$

Cette branche hyperbolique  $v = v_i = f([S]_0)$  est appelée **courbe de saturation** de l'enzyme par le substrat.

*Note* : dans la suite, lorsque nous parlerons de la vitesse de la réaction enzymatique,  $v$  désignera toujours la vitesse initiale, sauf spécification contraire.

#### 4.1.2. Constante catalytique

$k_{cat}$  (ou  $k_2$ ) est une **constante de vitesse du premier ordre** (unité  $s^{-1}$ , c'est une fréquence).  $k_{cat}$  représente la fréquence à laquelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique (en anglais "turn over") lorsque l'enzyme est saturé en substrat ( $k_{cat} = \frac{V_M}{[E]_0}$ ).

$\frac{1}{k_{cat}}$  est la durée d'un cycle catalytique lorsque l'enzyme est saturé en substrat.

La valeur de  $k_{cat}$  donne la **mesure de l'efficacité de la catalyse** par l'enzyme sur le substrat.

#### 4.1.3. Constante de Michaëlis, constante de dissociation

Dans la relation de Briggs-Haldane, la constante de Michaëlis  $K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$  est égale à

$\frac{k_{-1}}{k_1}$  dans le cas où  $k_{-1} \gg k_2$ . Si  $k_{-1}$  est grand devant  $k_2 = k_{cat}$ , cela signifie que le

complexe **ES se dissocie en relarguant le substrat libre à une vitesse nettement plus grande qu'il ne subit l'acte catalytique**. En ce cas, la valeur de la constante de Michaëlis est égale à la valeur de la constante de dissociation du complexe ES en S et E, elle traduit l'affinité du substrat pour l'enzyme : les expressions de la vitesse pour le modèle de Michaëlis-Menten et de Briggs-Haldane sont identiques. Nous remarquons que dans le modèle de Michaëlis-Menten l'hypothèse d'équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe est plus restrictive, elle est un cas particulier du modèle de Briggs-Haldane. **L'affinité du substrat pour l'enzyme est d'autant plus grande que la valeur de la constante de Michaëlis est petite.**

Lorsque la valeur de  $[S]_0$  est égale à la valeur de  $K_M$ , la valeur de la vitesse initiale est égale

à :  $v = \frac{V_M [S]_0}{[S]_0 + [S]_0} = \frac{V_M}{2}$   $[S]_0 = K_M \Rightarrow v = \frac{V_M}{2}$

et ce dans le modèle de Michaëlis-Menten ou de Briggs-Haldane.

#### 4.1.4. Constante de spécificité

La constante catalytique  $k_{cat}$  mesure l'efficacité de la catalyse par l'enzyme sur le substrat et la constante de Michaëlis mesure l'affinité de l'enzyme pour le substrat dans les cas où  $k_{-1} \gg k_{cat}$ . Un 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. C'est le rapport  $r_{sp} = \frac{k_{cat}}{K_M}$  qui reflète la spécificité globale d'un enzyme vis à vis d'un substrat, appelé **constante de spécificité**.

$$r_{sp} = \frac{k_{cat}}{K_M} = k_{cat} \frac{k_1}{k_{-1} + k_{cat}} = k_1 \left( \frac{k_{cat}}{k_{-1} + k_{cat}} \right) \leq k_1$$

La limite supérieure de  $r_{sp} = \frac{k_{cat}}{K_M}$  est la constante de vitesse d'association de l'enzyme E et du substrat S :  $k_1$ . Cette constante a pour limite la vitesse de diffusion des macromolécules dans le milieu réactionnel qui est de l'ordre de  $(10^8 - 10^9)s^{-1}M^{-1}$ .

#### 4.1.5. Quelques valeurs de constantes catalytique, de Michaëlis, de spécificité

Enzyme	Substrat	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ (M)	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1}M^{-1}$ )
Acétylcholine estérase	Acétylcholine	$1,4 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^8$
Anhydrase Carbonique II	CO <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	$1 \cdot 10^6$ $4 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^{-2}$ $2,6 \cdot 10^{-2}$	$8,3 \cdot 10^7$ $1,5 \cdot 10^7$
$\beta$ -lactamase	benzylpénicilline	$2 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^7$
Catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$4 \cdot 10^7$	1,01	$4 \cdot 10^7$
Fumarase	Fumarate Malate	$8 \cdot 10^2$ $9 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^{-6}$ $2,5 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^8$ $3,6 \cdot 10^7$
Penicillinase	Benzylpenicilline	$2 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^7$
Chymotrypsine	Ester éthylique N-acétylglycine Ester éthylique N-acétyltyrosine	$5,1 \cdot 10^{-2}$  $1,9 \cdot 10^2$	$4,4 \cdot 10^{-1}$  $6,6 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-1}$  $2,9 \cdot 10^5$

Ces quelques valeurs témoignent

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

## 4.2. La détermination des constantes cinétiques

Nombreuses sont les techniques physiques ou chimiques qui permettent de suivre les paramètres d'une cinétique, pour en citer quelques-unes :

- spectrophotométrie
- fluorescence
- titrimétrie
- radioactivité
- dosages immunologiques

Généralement, les expériences sont établies pour mesurer la variation de concentration du substrat ou du produit en fonction du temps et cela pour une concentration donnée d'enzyme et différentes valeurs de la concentration en substrat. La connaissance des valeurs de ces différents paramètres nous permet de déterminer les constantes cinétiques.

De manière classique, il faut calculer tout d'abord la vitesse initiale ( $[P]=0$ ) et ensuite utiliser une représentation dérivée de l'équation de Briggs-Haldane.

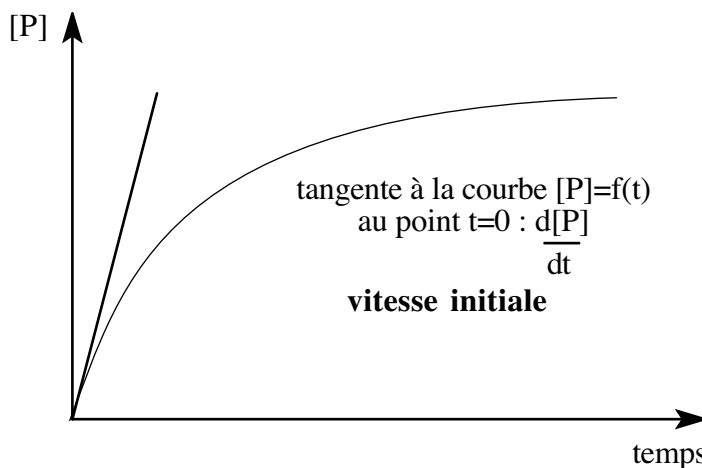
Nous supposons que les paramètres (température, pH, force ionique, etc..) sont identiques pour un ensemble de mesures concernant un enzyme et un substrat particuliers.

Il faudra toujours avoir en mémoire que l'équation de Michaëlis-Menten ou de Briggs-Haldane ont été calculées dans des conditions particulières :

(1)  $[P]=0$ , (2)  $[S]_0 \gg [E]_0$  et (3) soit pré-équilibre soit état stationnaire.

### 4.2.1. Mesure de la vitesse initiale

Pour une concentration d'enzyme donnée, on calcule la vitesse initiale pour une concentration de substrat totale donnée en traçant la courbe  $[P] = f(t)$  ou encore  $([S]_0 - [S]) = f(t)$ .



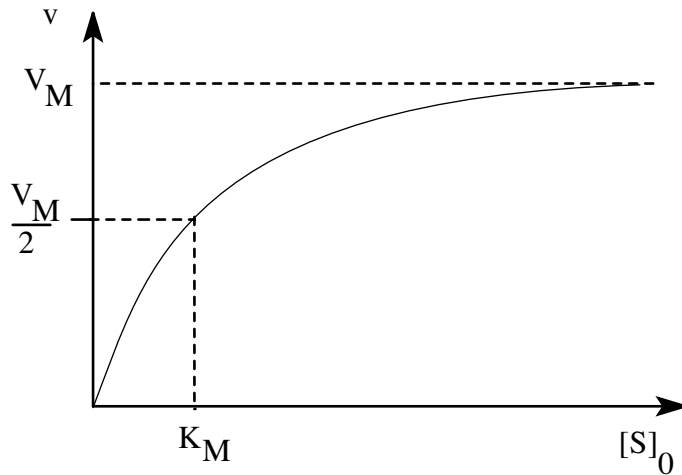
Evolution de la concentration du produit en fonction du temps

La vitesse initiale est la tangente  $\frac{d[P]}{dt}$  à la courbe  $[P] = f(t)$  au point  $t=0$ .

La dimension de la vitesse est une concentration par unité de temps, l'unité est ( $M s^{-1}$ ), toutefois les biochimistes ont **l'habitude de prendre comme unité des  $\mu\text{mole/litre par minute}$  ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )**.

#### 4.2.2. Représentation hyperbolique (Michaëlis-Menten)

A partir des résultats expérimentaux, mesure des vitesses initiales pour chaque concentration totale de substrat  $[S]_0$ , pour une concentration donnée d'enzyme, nous pouvons tracer  $v=f([S]_0)$  qui est une hyperbole.

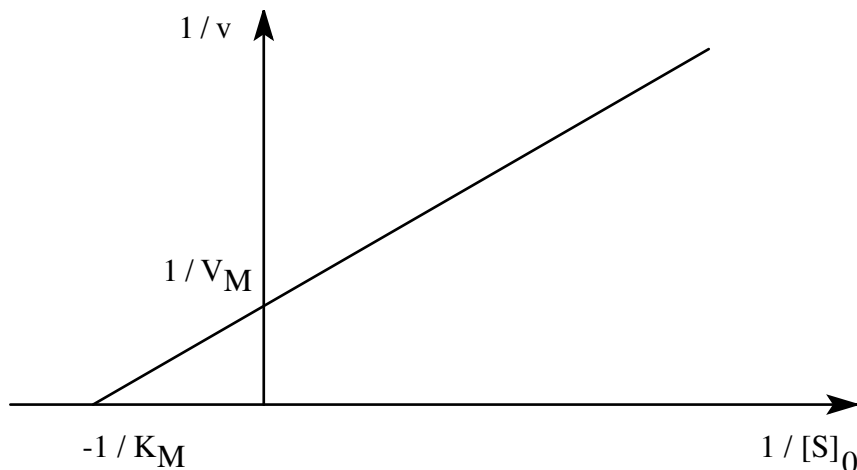


L'asymptote horizontale de l'hyperbole pour les grandes valeurs de  $[S]_0$  permet d'avoir la valeur de  $V_M$  et la valeur de  $K_M$  qui est la valeur de  $[S]_0$  pour  $v = \frac{V_M}{2}$

#### 4.2.3. Représentation de Lineweaver-Burk

C'est la représentation la plus utilisée qui fût publiée en 1935 par Hans Lineweaver et Dean

Burk :  $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[S]_0}\right)$ .





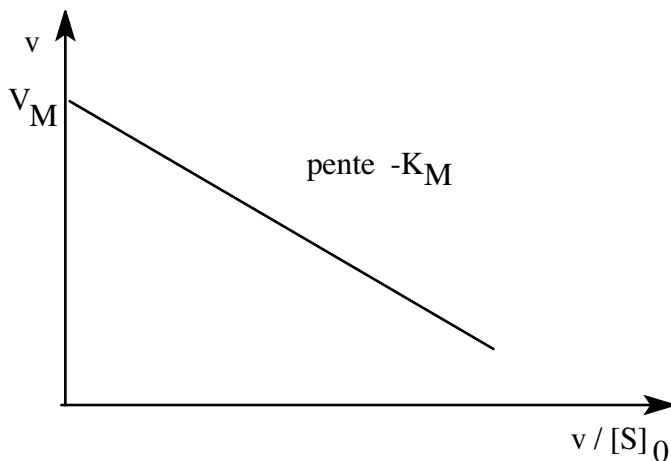
$$v = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]_0}{V_M [S]_0} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_M} \left( \frac{1}{[S]_0} \right) + \frac{1}{V_M}$$

Cette représentation est une droite qui coupe l'axe des  $\frac{1}{v}$  au point  $\frac{1}{V_M}$  et l'axe des  $\frac{1}{[S]_0}$  au point  $\frac{-1}{K_M}$ .

#### 4.2.4. Représentation Eadie-Hofstee

Cette représentation fût publiée par George Eadie en 1942 et Baren Hofstee en 1959 :

$$v = f \left( \frac{v}{[S]_0} \right)$$

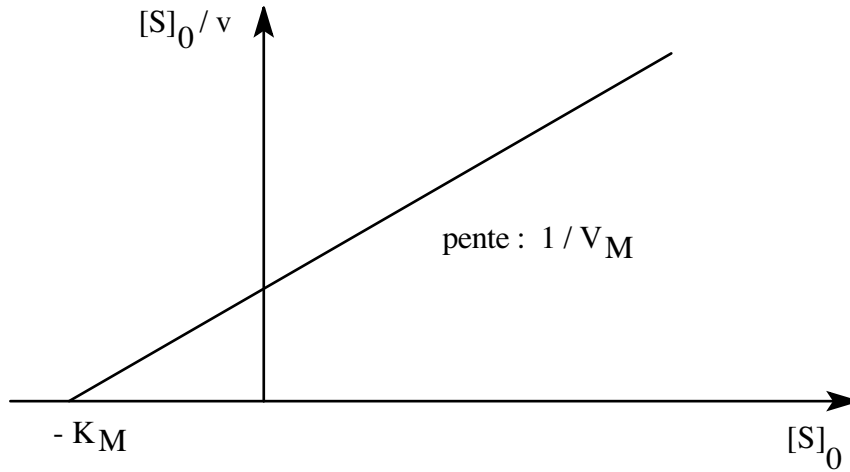


$$v = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0} \Rightarrow v(K_M + [S]_0) = V_M [S]_0 \Rightarrow v = -K_M \left( \frac{v}{[S]_0} \right) + V_M$$

Cette représentation est une droite de pente  $-K_M$  et qui coupe l'axe des  $v$  au point  $V_M$ .

#### 4.2.5. Représentation de Hanes-Woolf

Cette représentation fût publiée par Charles Hanes et Barnet Woolf en 1932 :  $\frac{[S]_0}{v} = f([S]_0)$



$$v = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0} \Rightarrow v(K_M + [S]_0) = V_M [S]_0 \Rightarrow K_M + [S]_0 = V_M \frac{[S]_0}{v}$$

$$\Rightarrow \frac{[S]_0}{v} = \frac{1}{V_M}([S]_0) + \frac{K_M}{V_M}$$

Cette représentation est une droite de pente  $\frac{1}{V_M}$  et qui coupe l'axe des  $[S]_0$  au point  $(-K_M)$ .

#### 4.2.6. Représentation de Eisenthal et Cornish-Bowden (graphe linéaire direct)

Cette représentation fût publiée par Robert Eisenthal et Athelstan Cornish-Bowden en 1974. Pour chaque couple de vitesse initiale et concentration initiale de substrat  $(v_j, [S]_{0,j})$ , la droite, définie par le couple (j) de points  $[(-[S]_{0,j}, 0) : (0, v_j)]$ , est tracée dans le repère cartésien  $(v, [S])$ .

L'équation générique est :

$$v = a_j[S] + b_j, \text{ avec pour chaque droite : } b = v_j \text{ et } a = \frac{v_j}{[S]_{0,j}}$$

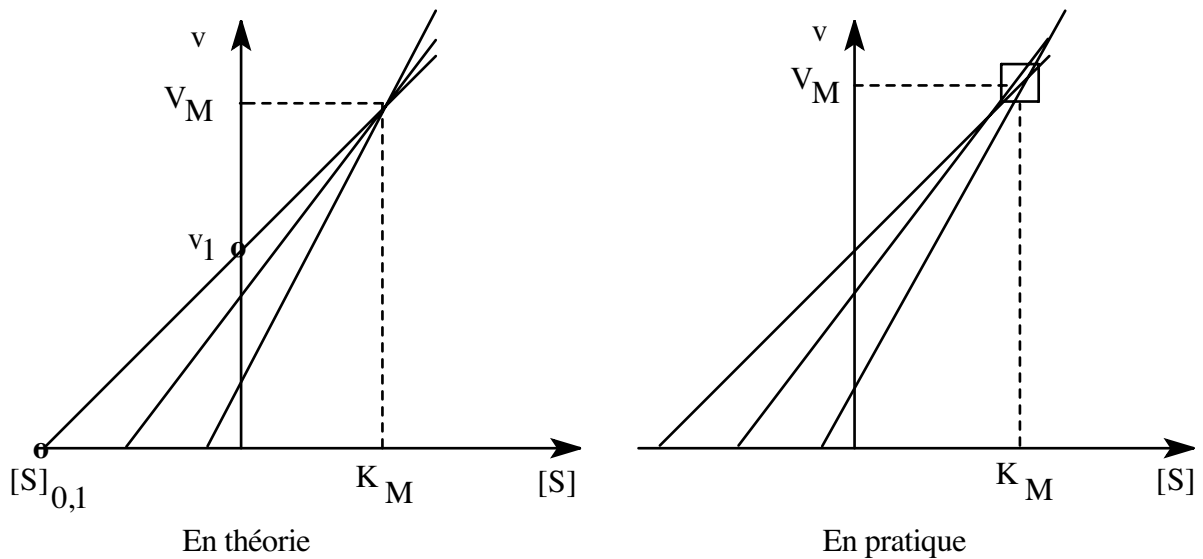
$$\Rightarrow v = \frac{v_j}{[S]_{0,j}} [S] + v_j$$

pour chacune de ces droites, calculons la valeur de  $v$  pour la valeur de  $[S]$  égale à  $K_M$ , en

utilisant la relation de Briggs-Haldane :  $v_j = \frac{V_M [S]_{0,j}}{K_M + [S]_{0,j}}$

$$v = \frac{v_j}{[S]_{0,j}} K_M + v_j = v_j \left( 1 + \frac{K_M}{[S]_{0,j}} \right), \text{ en utilisant la relation de Briggs-Haldane :}$$

$$v = \frac{V_M [S]_{0,j}}{K_M + [S]_{0,j}} \left( \frac{[S]_{0,j} + K_M}{[S]_{0,j}} \right) = V_M$$



Théoriquement, nous avons un **faisceau de droites concourantes en un même point** de coordonnées :  $(K_M, V_M)$ . Pratiquement les droites concourent dans un petit rectangle et on prend le milieu des côtés pour déterminer  $(K_M, V_M)$ .

#### 4.2.7. Quelques commentaires sur ces représentations

Les calculs et programmes informatiques permettent d'utiliser directement les points expérimentaux et de calculer une vitesse initiale pour chaque concentration de substrat et ensuite de tracer l'hyperbole de saturation, de calculer son asymptote et d'en déduire les valeurs de  $V_M$  et  $K_M$  ainsi que la valeur de la constante catalytique si on connaît la concentration de l'enzyme et par suite la constante de spécificité.

Dans le cas où nous procédons avec une calculatrice et une feuille de papier millimétré, nous allons calculer la vitesse initiale (pente de la tangente à la courbe  $[P]=f(t)$ ) et ensuite utiliser une des représentations linéaires pour calculer les valeurs de  $V_M$  et  $K_M$ .

Les représentations de Lineweaver-Burk et Eadie-Hofstee ont une coordonnée en  $1/[S]_0$ , cela signifie que les mesures les plus précises seront concentrées dans la même région (voisines de l'axe vertical) et peu de mesures avec une erreur relativement grande existeront pour des faibles valeurs de concentration de substrat : le tracé à la règle de la "meilleure" droite sera entaché d'erreur.

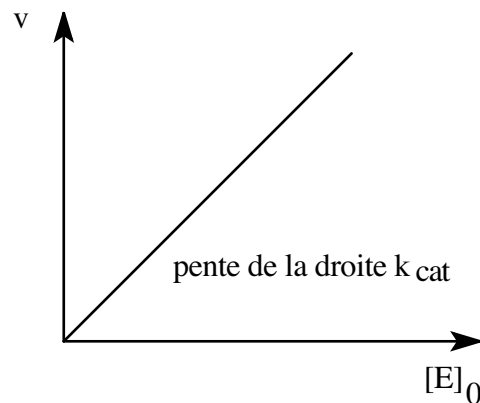
La représentation de Hanes-Woolf améliorera la détermination des valeurs expérimentales par une distribution plus équilibrée des points expérimentaux. Celle de Eisenthal et Cornish-Bowden donnera les meilleures estimations des valeurs de  $V_M$  et  $K_M$ . Toutefois, malgré ses

imprécisions sur les estimations des valeurs des constantes cinétiques, la représentation de Lineweaver-Burk est la plus utilisée.

## 5. Dosage enzymatique

Nous avons vu précédemment la relation entre la vitesse maximum, la constante catalytique et la concentration totale de l'enzyme :  $V_M = k_{cat}[E]_0$ .

Si nous nous plaçons dans des conditions expérimentales où  $[S]_0 \gg [E]_0$  et  $[S]_0 \gg K_M$  la **vitesse mesurée est la vitesse maximum** et elle est **proportionnelle à la concentration totale d'enzyme**. C'est donc une méthode qui peut être utilisée pour doser la concentration et par suite la quantité d'enzyme présente dans la solution.



### 5.1. Activité enzymatique

#### 5.1.1. Activité enzymatique (ou catalytique)

Cette unité a été définie pour estimer la quantité de l'activité catalytique d'une préparation ou d'un échantillon d'enzyme lorsque l'enzyme ne peut être défini que par rapport à son activité catalytique.

Une unité d'activité enzymatique (abréviation U.I. ou U.E.) est définie comme la quantité d'enzyme qui produit la transformation d'une micromole de substrat par minute à 25°C ( $\mu\text{mole min}^{-1}$ ). La mesure de l'activité dans des conditions où  $[S]_0 \gg [E]_0$  et  $[S]_0 \gg K_M$  permet de doser les quantités d'enzyme présentes dans des échantillons.

*Remarque* : dans le système international (S.I.), l'unité officielle est le **katal (kat)** : quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 mole de substrat par seconde. Les biochimistes préfèrent utiliser les unités internationales (U.I. ou U.E.)

$$1 \text{ U.I.} = 1 \text{ U.E.} = 0,0166 \mu\text{kat} = 16,6 \text{ nkat}$$

### 5.1.2. Activité enzymatique (ou catalytique) spécifique

C'est l'activité d'une préparation d'enzyme, normalisée par unité de masse exprimée classiquement en  $\mu\text{g} : \mu\text{mole}$  de substrat par minute par milligramme de l'échantillon ( $\mu\text{mole min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ).

Dans le cas d'un échantillon pur, et si la quantité d'enzyme est exprimée en  $\mu\text{mole}$ , on retrouve la constante catalytique, exprimée dans ce cas en ( $\text{min}^{-1}$ ) (voir 4.1.2).

## 6. Ce qui n'a pas été dit

C'est la fin de cette introduction à la cinétique enzymatique, les points suivants n'ont pas été abordés, certains ont été vus en chimie, d'autres seront traités dans les années suivantes :

- 1) le modèle des collisions et du complexe activé pour l'interprétation des phénomènes de catalyse. Le modèle des collisions cinétiques a été développé par M. Trautz, W.C.McC Lewis et Jean Perrin dans les années 1910-1920), complétée par Lindemann, et le modèle du complexe activé publié en 1935 par Henry Eyring
- 2) des schémas réactionnels non Michaeliens : les enzymes n'obéissent pas tous au modèle de base décrit ici
- 3) les diagrammes d'état des enzymes, c'est à dire l'étude de l'influence de la température, du pH, de la force ionique, etc.. sur les constantes cinétiques des enzymes
- 4) la dépendance vis à vis de la présence de coenzymes ou cofacteurs pour certains enzymes
- 5) la régulation de l'activité enzymatique par des phénomènes de coopérativité positive ou négative (le plus connu étant le modèle allostérique – coopérativité positive), la régulation par des effecteurs
- 6) des modèles de schéma réactionnel pour des catalyses enzymatiques en présence d'inhibiteurs, ou des catalyses à plusieurs substrats
- 7) les mécanismes moléculaires qui interviennent dans la catalyse enzymatique.