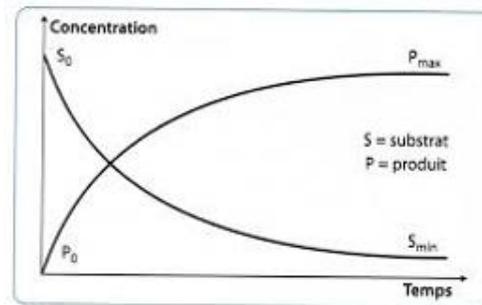


## X. Cinétique enzymatique

### X.1. Notions de base

#### X.1.1. Vitesse de réaction

La vitesse d'une réaction est une mesure de la rapidité avec laquelle la concentration des réactifs et des produits change au cours du temps.

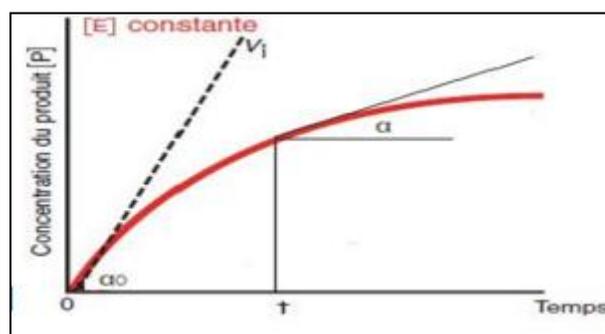


Au cours de la réaction, la concentration du substrat, diminue tandis que la concentration du produit augmente. La progression de cette réaction peut être exprimée sous forme d'une vitesse ( $v$ ), qui est soit la vitesse de disparition du substrat (S), soit la vitesse d'apparition du produit (P). Autrement dit, pour déterminer la vitesse de la réaction à un temps donné, on mesure la quantité de produit formé (ou celle du substrat disparu) à l'instant  $t$ , puis on calcule la vitesse de la réaction à un temps donné avec :

$$V = -d[S]/dt = +d[P]/dt$$

A l'instant  $t$ ,  $v = \text{tg}\alpha$

A l'instant  $t_0$ ,  $v$  est maximale, c'est la vitesse initiale de la réaction :  $v_i = \text{tg}\alpha_0$



#### X.1.2. Ordre d'une réaction

Les réactions chimiques sont classées en fonction du nombre de molécules réagissant entre elles pour former les produits, on parle alors d'ordre de réaction : réaction d'ordre zéro, d'ordre 1 ...

La manière la plus simple de déterminer l'ordre d'une réaction consiste à mesurer la vitesse  $v$  pour différentes concentrations de substrat [A]. Ensuite, en traçant le graphique de  $\log v$  en fonction de  $\log [A]$ , on obtient une droite dont la pente est égale à l'ordre de la réaction.

	Ordre 0	Ordre 1	Ordre 2
Equation de vitesse	$v_0 = k$	$v_0 = k \cdot [A]$	$v_0 = k \cdot [A]^2$
Graphique $v$ en fonction de $[A]$			
Détermination de l'ordre de la réaction	$\log v_0 = \log k$	$\log v_0 = 1 \cdot \log [A] + \log k$	$\log v_0 = 2 \cdot \log [A] + \log k$

Prenons une réaction unimoléculaire (qui ne met qu'un réactif en jeu) telle la conversion d'un composé A en un composé B :



La progression de cette réaction peut être décrite mathématiquement par une équation dans laquelle la vitesse de réaction est exprimée en fonction d'une constante (la constante de vitesse) et de la concentration  $[A]$  du réactif :

$$v = \frac{d[A]}{dt} = k [A]$$

Ici,  $k$  est la constante de vitesse exprimée en unités qui sont l'inverse d'une seconde ( $s^{-1}$ ). Cette équation montre que la vitesse de réaction est directement proportionnelle à la concentration du réactif A. Une telle réaction est dite d'ordre un car sa vitesse dépend de la concentration d'une seule substance.

Une réaction bimoléculaire, ou d'ordre deux, mettant en jeu deux réactifs, peut s'écrire :



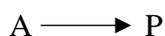
Son équation de vitesse est :

$$v = - \frac{d[A]}{dt} = - \frac{d[B]}{dt} = k [A] [B]$$

Ici,  $k$  est une constante de vitesse d'ordre deux exprimée en  $M^{-1} \cdot s^{-1}$ . La vitesse d'une réaction d'ordre deux est donc proportionnelle au produit de la concentration des deux réactifs.

**En résumé :** Soit la réaction :  $A \rightarrow P$

- **Ordre zéro :** la vitesse est indépendante de la concentration du substrat



- **Ordre 1 :** la vitesse dépend de la concentration du substrat



- **Ordre 2 :** la vitesse dépend de la concentration des deux substrats



### Exercice d'application 1

Déterminer la vitesse de la réaction  $X + Y \longrightarrow Z$  lorsque le milieu réactionnel contient X, 3  $\mu\text{M}$  et Y, 5  $\mu\text{M}$ , et que k pour cette réaction est de  $400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

#### Solution

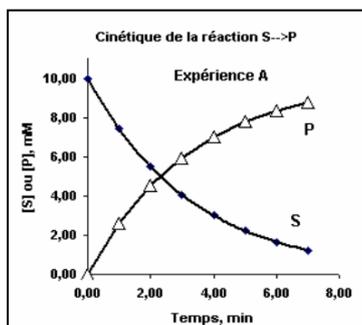
On utilise l'équation suivante, en s'assurant que toutes les unités sont cohérentes :

$$\begin{aligned}v &= k [X] [Y] \\ &= (400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) (3 \mu\text{M}) (5 \mu\text{M}) \\ &= (400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) (3 \times 10^{-6} \text{ M}) (5 \times 10^{-6} \text{ M}) \\ &= 6 \times 10^{-9} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1} = 6 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}\end{aligned}$$

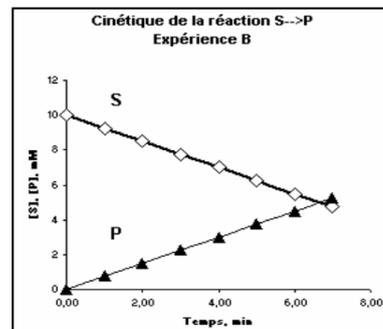
### Exercice d'application 2

Soient les expériences A et B suivantes :

#### Expérience A



#### Expérience B



**Expérience A :** La vitesse de la réaction n'est pas constante, la valeur absolue de  $d[S]/dt$  diminue ; ceci signifie que la vitesse de la réaction dépend de la concentration du substrat.

**Expérience B :** La vitesse de la réaction est constante ; ceci signifie que la vitesse de la réaction est indépendante de la concentration du substrat pendant toute la durée de l'expérience.

#### - Calcul de la vitesse de réaction

- Dans le cas de l'expérience A, la cinétique n'est pas linéaire, v n'est pas constante :

**La réaction est d'ordre 1 :** la concentration d'un produit de réaction au cours du temps suit une exponentielle croissante partant de 0 et qui tend vers une valeur limite horizontale.

$$v = k \times [S] \quad \text{Dans le cas de l'expérience B, la cinétique est linéaire, v est constante :}$$

**La réaction est d'ordre zéro :** réaction dont la vitesse ne dépend pas de la concentration des réactifs, la vitesse est donc constante.

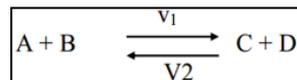
$$v = -d[S]/dt$$

$$v = k$$

### X.1.3. Constante d'équilibre d'une réaction

Toute réaction chimique est caractérisée par une constante d'équilibre K.

Soit la réaction qui conduit à un état d'équilibre :



$$V_1 = k_1 \cdot [A] \cdot [B]$$

$$V_2 = k_2 \cdot [C] \cdot [D]$$

L'équilibre de la réaction sera atteint lorsque  $V_1 = V_2$ . Ainsi, la constante d'équilibre de la réaction  $K$  s'écrit :

$$\boxed{K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}}$$

#### X.1.4. Les enzymes ne modifient pas l'équilibre de la réaction

Soit la réaction suivante :



$$K = \frac{[C]^\tau [D]^\delta}{[A]^\alpha [B]^\beta}$$

Cette constante  $K$  n'est pas modifiée au cours d'une réaction enzymatique. Elle reste constante.

La présence d'enzyme permet d'atteindre l'équilibre plus rapidement.

#### X.1.5. Activité enzymatique

On appelle mélange réactionnel le milieu dans lequel l'enzyme est active. Il comprend : le substrat, cofacteur et coenzyme éventuellement impliqués dans la réaction, le tampon (une solution qui maintient approximativement le même pH malgré l'addition de petites quantités d'un acide ou d'une base), et bien sûr l'enzyme.

L'activité d'une enzyme est la capacité d'activité catalytique dans des conditions expérimentales bien définies : concentration initiale en substrat, pH, température, concentration en enzyme. Elle se mesure :

- Soit par la vitesse de disparition d'un substrat
- Soit par la vitesse d'apparition d'un produit
- Soit par la vitesse d'utilisation d'un cofacteur.

#### • Expression de l'activité enzymatique (Unités de mesure)

Les unités conventionnelles sont :

- **L'unité internationale d'enzyme (U ou UI)** : Quantité d'enzyme qui transforme 1  $\mu$ mole de substrat /min
- **Katal (kat) et ses dérivés ( $\mu$ Kat, nKat)** : Quantité d'enzyme qui transforme 1 mole de substrat par seconde.

**Remarque :** 1U = 16,67 nKat

$$\text{Activité enzymatique} = \Delta \text{Abs. min}^{-1} \cdot V_t / \epsilon \cdot L \cdot V_e$$

**V<sub>t</sub>** : volume total

**V<sub>e</sub>** : volume de l'échantillon contenant l'enzyme

**ε** : coefficient d'extinction molaire

**L** : longueur du trajet optique fixée à 1 cm

### X.1.6. Activité enzymatique spécifique

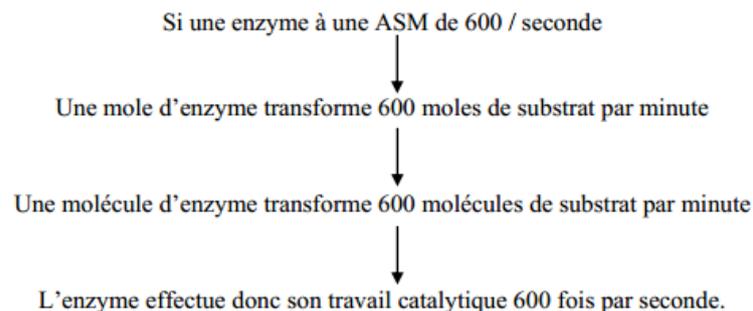
L'activité enzymatique spécifique est le nombre d'unités enzymatiques rapporté au poids total de protéines (en mg) :

$$A_{sp} = \text{activité enzymatique (U)} / \text{quantité de protéines (mg)}$$

### X.1.7. Activité spécifique moléculaire

C'est le nombre de moles de substrat transformées par 1 mole d'enzyme en 1 minute à 25 °C dans les conditions optimales de l'enzyme. Pour déterminer cette activité, l'enzyme doit être ultra pure et on doit connaître son poids moléculaire. Elle est exprimée en inverse du temps. Il s'agit donc d'une fréquence.

**Exemple :**



## X.2. Réaction enzymatique

### X.2.1. Définition et conditions

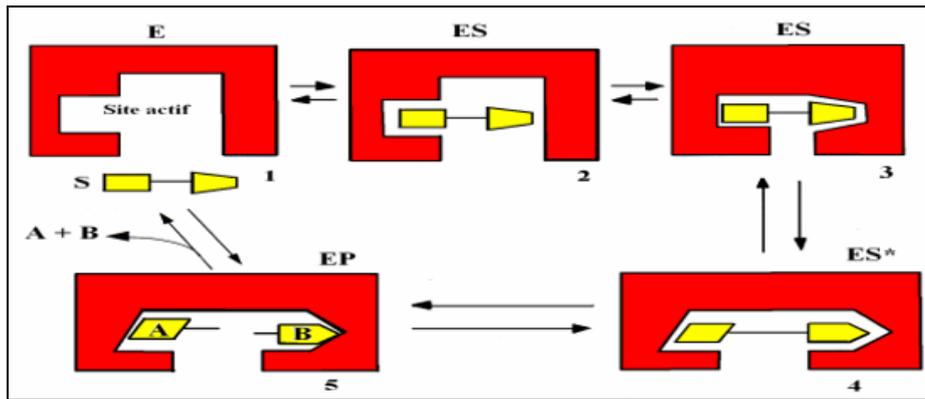
La réaction enzymatique est une réaction chimique qui se déroule dans la cellule ou le milieu cellulaire, en présence d'un biocatalyseur : l'enzyme. Les réactions enzymatiques sont douces, les enzymes "travaillent" à :

- Des températures inférieures à 100°C
- A pression atmosphérique
- A un pH proche de la neutralité.

### X.2.3. Déroulement de la réaction enzymatique

La réaction enzymatique suit un chemin différent de la réaction chimique :

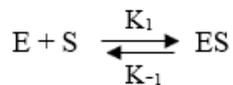




1. Les molécules libres de l'enzyme et du substrat en solution
2. Liaison primaire entre l'enzyme et le substrat sans altération dans la structure du substrat
3. La structure d'enzyme se modifie pour une meilleure adaptation du site actif au substrat
4. L'ensemble ES continue de se transformer créant les contraintes nécessaires pour que le substrat adopte la conformation de l'état de transition
5. La contrainte structurale ainsi créée fait basculer le substrat dans le sens de sa transformation en produit.

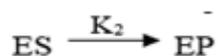
La réaction enzymatique peut se diviser en trois principales étapes :

### 1. Première étape



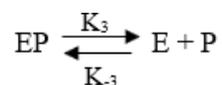
L'association de l'enzyme (E) et du substrat (S) conduisant à la formation d'un intermédiaire : complexe [ES], ce qui aboutit à un abaissement de la barrière de potentiel et une augmentation de la vitesse de réaction. Elle se produit au niveau du site actif. Cette reconnaissance dynamique est appelée adaptation induite.

### 2. Deuxième étape



La catalyse : le complexe ES subit un réarrangement interne qui va permettre la transformation du substrat en produit (P).

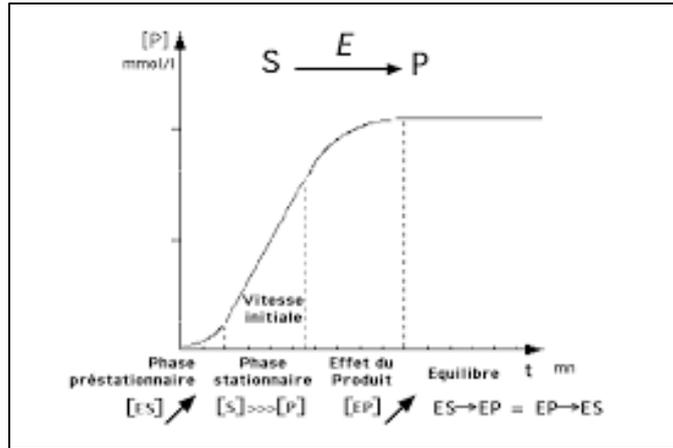
### 3. Troisième étape



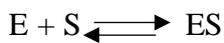
L'enzyme libère le produit de la réaction et retrouve son état initial.

Rappelons que le sens de déroulement de la réaction dépend de  $\Delta G^\circ$  qui elle-même dépend de l'état initial (S) et l'état final (P). Si S possède plus d'énergie que P, la réaction se fait spontanément dans le sens 1, la réaction est dite exergonique ( $\Delta G^\circ < 0$ ).

La réaction enzymatique passe par les phases suivantes :



- **Phase pré stationnaire** : E mis en présence du S, combinaison E-S rapide (milliseconde)



Il y a création de complexes ES supplémentaires (pas de création de produit à cette étape-là).

- **Phase stationnaire** : enzyme saturée par S, la combinaison E-S à concentration maximale est constante



La vitesse est constante dans le temps. Elle reste donc linéaire (n'évolue pas), à cause de ce complexe.

- **Phase effet du produit (post stationnaire)** : concentration en S diminue significativement au bout d'un temps plus ou moins long



Le produit va pouvoir se libérer

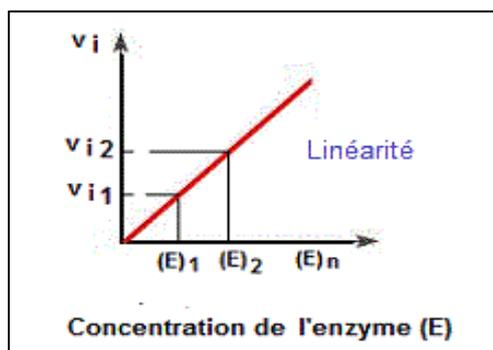
- **Phase d'équilibre (phase saturable)**

Il n'y a plus de création de P parce qu'il n'y a plus assez de S.

**Remarque** : la courbe ressemble presque à une sigmoïde.

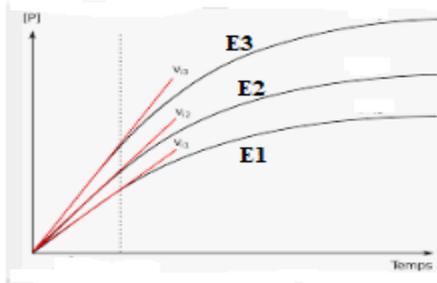
#### X.2.4. Influence de la concentration en enzyme

Comme on pourrait s'y attendre, plus il y a de catalyseur (enzyme), plus la réaction est rapide.



En effet, si on maintient la concentration en substrat constante, la vitesse de la réaction est d'abord proportionnelle à la concentration de l'enzyme, puis elle demeure constante pour des concentrations enzymatiques plus élevées.

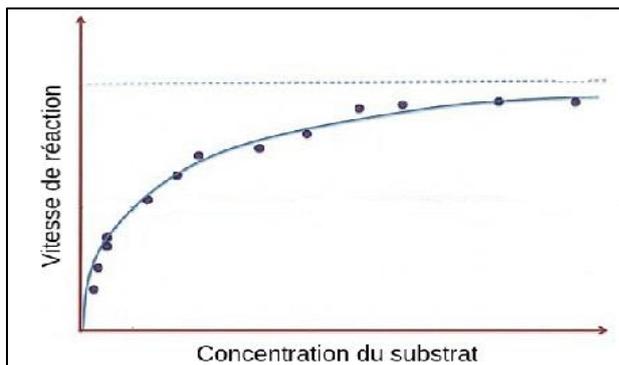
Si nous rajoutons plus de E, S constante, nous n'aurons pas plus de P, car nous avons une quantité limitée de S, la vitesse sera plus rapide :  $E \nearrow V \nearrow$ , mais la quantité de P reste identique.



$$[E3] > [E2] > [E1]$$

### X.2.5. Influence de la concentration en substrat

Lorsque la concentration de l'enzyme est maintenue constante, la vitesse de réaction varie en fonction de la concentration en substrat mais d'une façon non linéaire :

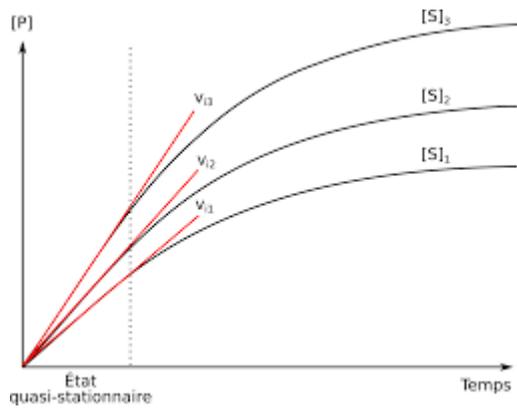


**Grphe de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat.** Des quantités variables de substrat sont ajoutées à une quantité fixe de l'enzyme. La vitesse de réaction est mesurée pour chaque concentration en substrat et reportée sur le graphe. La courbe obtenue a la forme d'une hyperbole, une fonction mathématique dans laquelle les valeurs augmentent tout d'abord de façon rapide avant de finalement tendre vers un maximum.

Lorsque de petites quantités de substrat sont ajoutées à la préparation enzymatique, on voit l'activité enzymatique augmenter de façon presque linéaire : une droite apparaît qui correspond à la fixation progressive du substrat sur l'enzyme.

Cependant, l'activité enzymatique augmente de façon moins marquée si l'on continue d'ajouter du substrat. Pour des concentrations très fortes en substrat, l'activité de l'enzyme tend vers un plateau qui correspond à sa valeur maximale : la courbe (hyperbole) tend vers une valeur maximale qui correspond à la vitesse maximale ( $V_{max}$ ).

Ce comportement montre que pour de faibles concentrations en substrat, l'enzyme convertit rapidement tout le substrat en produit mais que lorsque d'avantage de substrat est ajouté, l'enzyme est saturée en substrat c'est-à-dire qu'il y a bien davantage de molécules de substrat que d'enzyme, de sorte que tout le substrat ne peut pas être converti en un produit en un instant donné. La réaction va se ralentir. Autrement dit, ce n'est pas parce que l'on met plus de S que ça ira plus vite, contrairement au début de la réaction.



$$[S3] > [S2] > [S1]$$

**Remarque :** Toutes les réactions enzymatiques simples présentent une courbe hyperbolique de vitesse en fonction de la concentration en substrat, mais la forme exacte de la courbe dépend de l'enzyme, de sa concentration, de la concentration d'inhibiteurs de l'enzyme, du pH, de la température...