

Cours d'Enzymologie



Destiné aux étudiants **L3 Génétique**

Année universitaire 2022-2023

Conçu par Dr. BECHKRI S.
Maitre de Conférences catégorie A
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Université Frères Mentouri Constantine 1

X.3. Introduction à la cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique (du grec *kinetos*, signifiant 'en mouvement') a pour objet de déterminer les vitesses des réactions que l'enzyme catalyse, et à mesurer son affinité pour les substrats. Même sans avoir isolé aucune enzyme, les chercheurs pouvaient faire une analyse mathématique de leur activité en mesurant les concentrations de substrats et de produits de la réaction et en observant comment ces quantités changeaient au cours du temps.

Les enzymologistes étudient en général les stades précoces d'une réaction, lorsque la concentration en substrat commence à peine à décroître et que la concentration en produit commence à peine à croître (pour les cinétiques enzymatiques, on calcule toujours v_0 qui est la vitesse de la réaction au temps 0). Il n'y aurait aucun intérêt à attendre jusqu'à ce que la réaction soit terminée (c'est-à-dire qu'elle atteigne l'équilibre) car les concentrations en substrat et en produit ne changent plus à ce moment-là. En effet, dans une cellule, de nombreuses réactions n'atteignent jamais l'équilibre car il y a arrivée permanente de nouveaux substrats et les produits sont utilisés dès leur production.

X.4. Objectifs de la cinétique enzymatique

- Traduire l'activité de l'enzyme
- Identifier et décrire les mécanismes des réactions enzymatiques, en étudiant leur vitesse, c'est à dire leur évolution en fonction du temps.
- Décrire quantitativement les propriétés catalytiques des enzymes et les mécanismes mis en place pour leur régulation.

X.5. Cinétique Michaelienne

En 1913, Michaëlis et Menten (M.M) ont établi l'équation d'une réaction de vitesse enzymatique qui permet de :

- Décrire la cinétique (et donc la vitesse) d'une réaction catalysée par **une enzyme agissant sur un substrat unique**, pour donner un produit
- Décrire la forme hyperbolique du graphe de la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale en substrat.

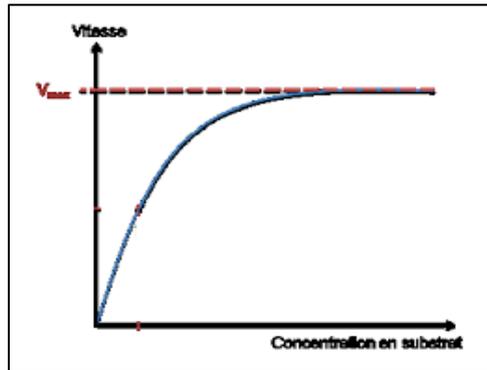
Afin de se mettre dans les conditions requises par le modèle de Michaelis-Menten :

- La concentration du substrat doit être bien supérieure à la concentration de l'enzyme (afin que la concentration du complexe ES soit constante et que la formation du complexe ES soit limitée par l'affinité de E pour S, et non pas la quantité de S disponible),
- Les mesures doivent être effectuées dans la phase de vitesse initiale, avant que le produit ne commence à s'accumuler et que la réaction inverse ne devienne significative.

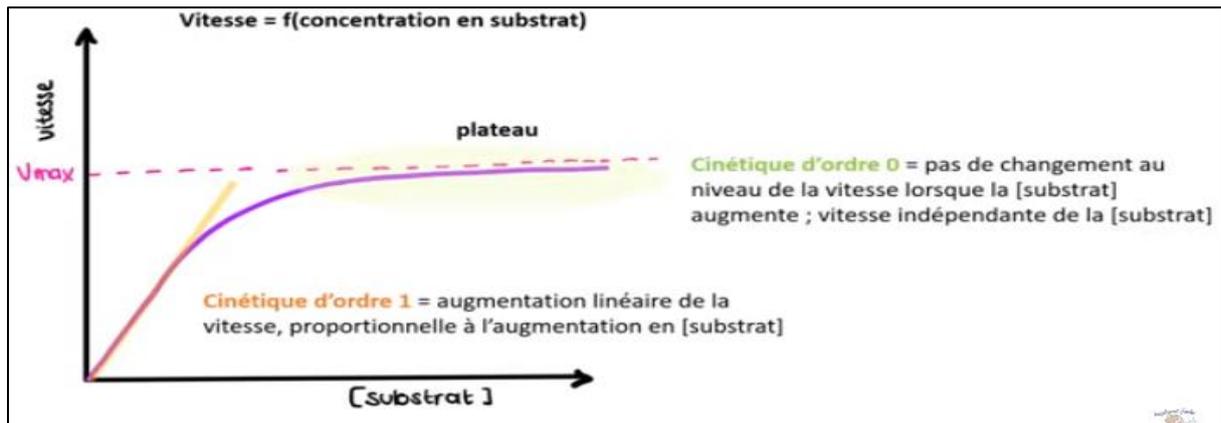
X.5.1. La constante de Michaëlis Menten (M.M)

La concentration en substrat influe sur la vitesse de la réaction. Lorsque la concentration en substrat augmente, la vitesse initiale de la réaction augmente jusqu'à atteindre un plateau : vitesse initiale maximale (V_{max}).

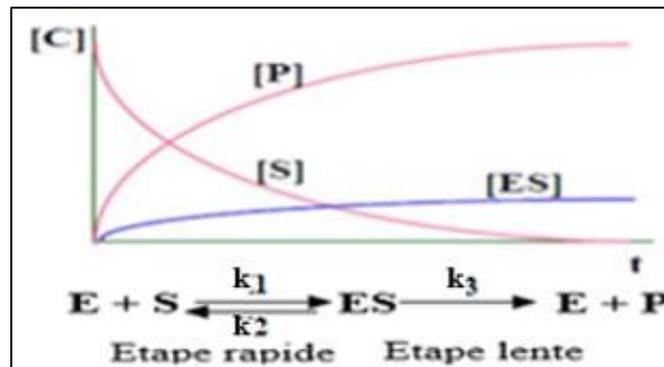
V_{max} est la vitesse maximale que peut atteindre la réaction lorsque l'enzyme est saturée de substrat (lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont complexées au substrat).



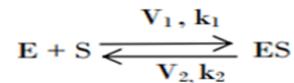
La courbe peut être subdivisée de la manière suivante :



- La cinétique d'ordre 1 peut être décrite par l'équation de droite : $y = ax + b$, avec :
 $y =$ vitesse ; $a =$ pente ; $x = [S]$; $b =$ intersection sur l'axe y (axe des ordonnées).
- La cinétique d'ordre 0 ne peut pas être décrite par une équation de droite. C'est pour cela que nous aurons recours à l'équation de Michaelis-Menten pour redécrire la courbe.

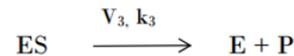


- En début de réaction, [S] est toujours en très large excès par rapport à [E] : [S] >>> [E]
- La formation du complexe [ES] est une étape rapide et réversible :



v_1 et k_1 sont les vitesse et constante de formation du complexe ES, v_2 et k_2 les vitesse et constante de dissociation du complexe ES.

- La formation du produit à partir du complexe activé est une étape plus lente :



v_3 et k_3 sont la vitesse et constante de formation du produit P.

D'après la loi d'action des masses :

$$v_1 = k_1 [E] [S]$$

$$v_2 = k_2 [ES]$$

$$v_3 = k_3 [ES]$$

Selon l'hypothèse de l'état quasi stationnaire (Briggs-Haldane), le complexe [ES] se dissocie aussi souvent en E + S qu'il est transformé en P. La [ES] reste constante ($d[ES]/dt = 0$) et :

Vitesse de formation de [ES] = Vitesse disparition de [ES]

Vitesse de formation de [ES] = $k_1 [E][S]$

Vitesse disparition de [ES] = $k_2 [ES] + k_3 [ES]$: car [ES] disparaît soit en se dissociant en E+S, soit en se transformant en E+P

$$k_1 [E] [S] = k_2 [ES] + k_3 [ES]$$

$$k_1 [E] [S] = [ES] (k_2 + k_3)$$

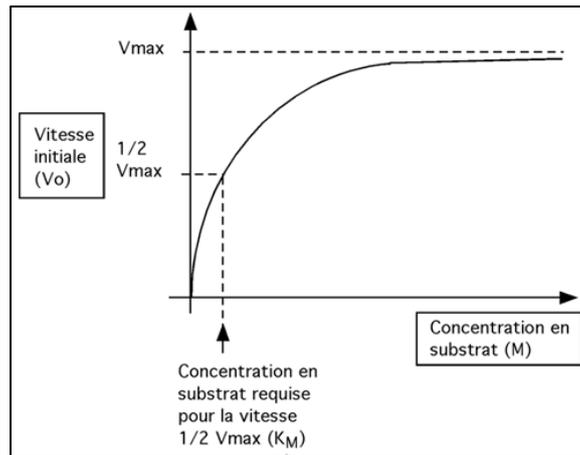
$$\frac{[E] [S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_M$$

Constante de Michaelis-Menten (M.M)

Remarque : lorsque k_3 est très petit devant k_2 (dissociation de ES plus rapide que la formation de P) : $K_M = k_2/k_1$

Comme nous venons de le démontrer, la K_M est une combinaison de trois constantes de vitesse, mais elle peut être bien plus aisément déterminée à partir des données expérimentales :

K_M est la concentration de substrat qui sature l'enzyme à moitié (lorsque la moitié des molécules de l'enzyme sont complexées au substrat). Autrement dit, c'est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est à la moitié de son maximum.



K_M (exprimée en mole/litre) est la constante de dissociation du complexe [ES], elle est donc l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

K_M indique l'efficacité avec laquelle une enzyme sélectionne son substrat pour le convertir en produit et définit l'affinité de l'enzyme pour son substrat :

- Si K_M diminue, l'affinité de E pour S augmente (E est efficace pour des concentrations faibles de S ; la liaison E-S est forte)
- Si K_M augmente, l'affinité de E pour S diminue (E est moins efficace ; la liaison E-S est faible).

X.5.2. La constante catalytique

Il est intéressant de savoir avec quelle rapidité une enzyme travaille après s'être fixée à son substrat. Autrement dit, à quelle vitesse le complexe [ES] est transformé en E + P.

Puisque c'est le complexe [ES] qui permet d'obtenir l'enzyme libre E et le produit P, la constante de vitesse de la réaction k_3 est appelée k_{cat} (k catalytique). La constante catalytique décrit la rapidité d'action d'une enzyme.

On peut alors définir la vitesse initiale v_0 comme dépendante de la formation du complexe [ES] :

$$v_0 = k_{cat} [ES]$$

La vitesse de la réaction devient maximale lorsque toutes les molécules d'enzyme sont occupées par le substrat ; dans ce cas la concentration en E libre est égale à 0 : $[E] = 0$, $[ET] = [ES]$

Dans ce cas de vitesse maximale :

$$V_{max} = k_{cat} [E_T] \longrightarrow [E_T] = V_{max}/k_{cat}$$

k_{cat} est aussi appelé **nombre de turnover** (min^{-1}) : nombre de molécules de substrat convertie en produit par unité de temps par un seul site actif de l'enzyme à saturation. En d'autres termes, le turnover de la réaction est le nombre de fois que l'enzyme travaille par unité de temps.

Le nombre de turnover est une constante de vitesse d'ordre un, elle a donc pour unité des s^{-1}

Exemples :

Enzyme	$k_{cat} (s^{-1})$
Nucléase staphylococcale	95
Cytidine désaminase	299
Triose phosphate isomérase	4300
Cyclophiline	13000
Cetostéroïde isomérase	66000
Anhydrase carbonique	1000000

X.5.3. L'équation de Michaëlis Menten (M.M)

L'enzyme est soit sous forme libre E, soit complexée au substrat ES :

$$[E_T] = [E] + [ES]$$

$[E_T]$: concentration totale de l'enzyme

$$[E] = [E_T] - [ES]$$

$$K_M = \frac{[E] [S]}{[ES]} = \frac{([E_T] - [ES]) [S]}{[ES]}$$

$$K_M = \frac{[E_T] [S] - [ES] [S]}{[ES]}$$

$$K_M = \frac{[E_T] [S]}{[ES]} - \frac{[ES] [S]}{[ES]}$$

Or, $V_{max} = k_{cat} [E_T] \longrightarrow [E_T] = V_{max}/k_{cat}$

$$K_M = \frac{V_{max} [S]}{k_{cat} [ES]} - [S]$$

Puisque $v_0 = k_{cat} [ES]$

$$K_M + [S] = \frac{V_{max} [S]}{v_0}$$

On cherche à exprimer v_0 :

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

L'équation de Michaelis Menten

De type $y = a.x$ $a = \text{pente} = V_{max}/K_M + [S]$

L'équation de Michaelis-Menten (M.M) représente l'équation de vitesse pour une réaction enzymatique à un substrat. Elle permet d'établir une relation entre la vitesse, la concentration en substrat et l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Cette équation est la description mathématique de la courbe hyperbolique.

- **Premier cas.** $[S] \gg \gg K_M$: Concentration en substrat très élevée, K_M négligeable :

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

$$v_0 = V_{\max}$$

Dans ce cas, la vitesse maximale va être atteinte lorsque tous les sites enzymatiques vont être saturés en substrat ; la vitesse est indépendante de [S]

- **Deuxième cas. $v_0 = V_{\max}/2$**

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$1 = \frac{2 [S]}{K_M + [S]}$$

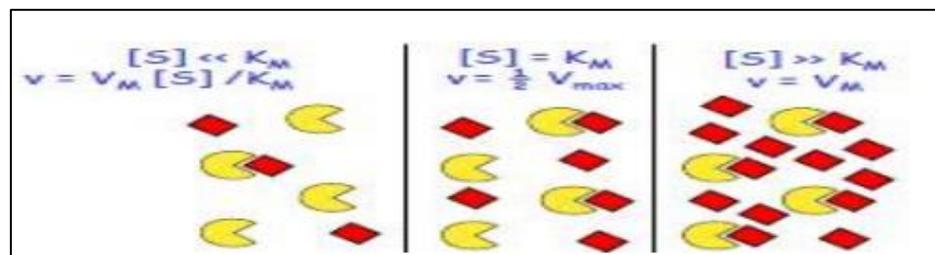
$$K_M + [S] = 2 [S]$$

$$K_M = 2 [S] - [S]$$

$K_M = [S]$: la vitesse de réaction (v_0) est égale à la moitié de sa valeur maximale

- **Troisième cas. $[S] \ll K_M$**

$v = V_{\max}[S] / K_M$: La vitesse est directement proportionnelle à [S]. Le substrat est limitant



Formules à retenir :

Constante de Michaëlis : $K_M = \frac{[E] [S]}{[ES]}$

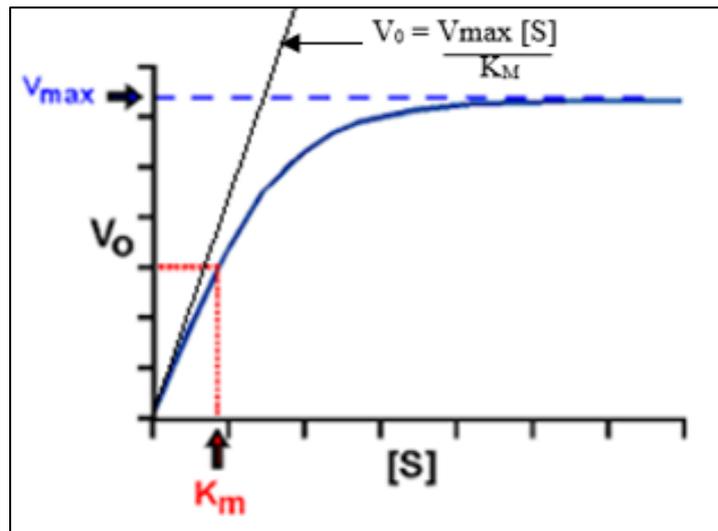
Vitesse initiale : $v_0 = k_{\text{cat}} [ES]$

Vitesse initiale maximale : $V_{\max} = k_{\text{cat}} [E_T]$

Concentration en enzyme totale : $[E_T] = [E] + [ES]$

Equation de Michaelis-Menten : $v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$

X.5.4. Représentation (courbe) de Michaëlis Menten



Exercice d'application

Une réaction enzymatique a un K_M de 1 mM et une V_{max} de $5 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$

Quelle est la vitesse de réaction lorsque la concentration du substrat est de 0,25 mM ?

Solution

On utilise l'équation de Michaelis-Menten :

$$v_0 = \frac{(5 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1})(0,25 \text{ mM})}{(1 \text{ mM}) + 0,25} = 1 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$$

X.5.5. Différentes conditions expérimentales de la cinétique enzymatique

- Se placer en $[S]$ saturante, condition non limitante

Le S est en excès. Sa concentration ne limitera pas la réaction enzymatique : $[S] \gg [E]$

- Se placer en $[E]$ non saturante, condition limitante

La $[E]$ est fixe. Cette concentration va limiter la réaction enzymatique.

X.6. L'efficacité catalytique

L'efficacité catalytique d'une enzyme dépend de l'activité avec laquelle elle se fixe à ses substrats et à quelle vitesse elle les convertit en produits. Une mesure de l'efficacité catalytique doit donc rendre compte à la fois des événements de liaison et de ceux de catalyse (spécificité et efficacité). L'efficacité catalytique se mesure par :

$$k_{cat}/K_M \text{ (exprimé en } \text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$$

Elle indique la façon dont la vitesse varie en fonction de la fréquence de combinaison entre l'enzyme et le substrat. La valeur de k_{cat}/K_M , bien mieux que K_M ou k_{cat} pris isolément, représente la capacité globale de l'enzyme à convertir le substrat en produit. Plus k_{cat}/K_M est élevée, plus l'enzyme est efficace.

Exemple 1 :

Enzyme	Substrat	K_M	K_{cat}/K_M
Fumarase	Fumarate	0.005	1.6×10^8
	Malate	0.025	3.6×10^7

La fumarase a plus d'affinité pour le fumarate que pour le malate. Donc, l'enzyme est plus efficace sur le fumarate que sur le malate.

Exemple 2 :

La valeur de k_{cat}/K_M de la triose phosphate isomérase est de $2,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. C'est pourquoi on dit de cette enzyme qu'elle a atteint la **perfection catalytique** car elle catalyse la réaction aussi vite qu'elle rencontre son substrat. Par contre, de nombreuses enzymes effectuent leurs tâches physiologiques à des valeurs plus modestes de k_{cat}/K_M

X.7. Détermination de K_M et V_{max} : Méthode de Lineweaver-Burk (méthode des doubles inverses)

Les données cinétiques sont en général collectées en ajoutant de petites quantités d'une enzyme à des quantités variables de substrat et en suivant l'apparition d'un produit au cours du temps dans le milieu réactionnel.

Le graphe de la vitesse en fonction de la concentration en substrat peut servir à estimer visuellement les paramètres cinétiques K_M et V_{max} . Cependant, une hyperbole est difficile à tracer manuellement, des erreurs sur l'estimation de la V_{max} sont possibles.

En effet, les courbes hyperboliques, telle la représentation de M.M ($v = f [S]$), conduisent facilement à des erreurs d'interprétation car il est difficile d'estimer la limite supérieure de la courbe (V_{max}) et ne permettent pas de donner avec précision V_{max} et K_M .

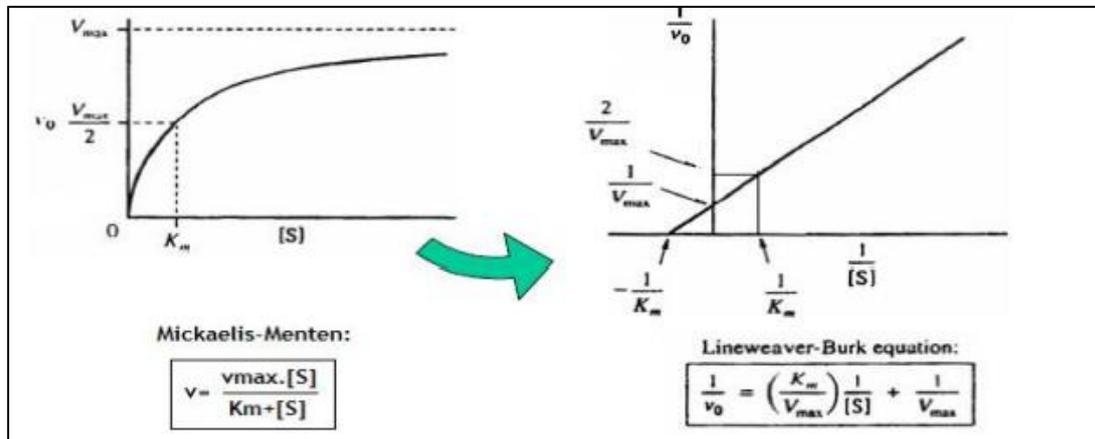
Afin de déterminer V_{max} et K_M de façon plus précise, il est nécessaire d'effectuer une des étapes suivantes :

1. L'analyse des données avec un programme informatique d'ajustement de courbe qui calcule mathématiquement la limite supérieure de la vitesse de la réaction
2. La transformation des données pour obtenir une représentation graphique linéaire. La plus connue des transformations linéaires de la courbe de la vitesse en fonction de la concentration en substrat, est appelée représentation de Lineweaver-Burk, dont l'équation est :

$$1/V = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Cette équation est une équation de droite de la forme : $y = ax + b$ ou $1/v = f(1/[S])$ et consiste donc en un tracé de $1/v$ en fonction de $1/[S]$

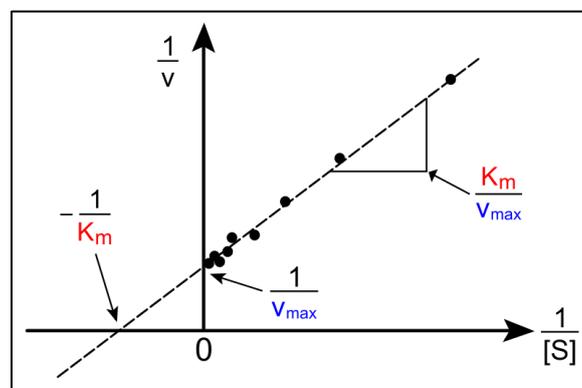
Elle est utilisée pour simplifier la représentation graphique de l'équation de Michaelis-Menten, en transformant l'hyperbole en droite et présente donc l'avantage d'être plus facile à lire. Puisqu'elle s'obtient en inversant les deux membres de l'équation de Michaelis-Menten, on lui attribue l'appellation de doubles inverses ($1/v = f(1/[S])$).



Le graphe de $1/v_0$ en fonction de $1/[S]$ est une ligne droite dont la pente vaut K_M/V_{\max} . En prolongeant la droite, le point d'intersection avec l'axe $1/[S]$ correspond à $-1/K_M$.

On définit :

- V_{\max} : par le point d'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées
- K_M : par le point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses.



$1/K_M$ exprime l'affinité de l'enzyme pour le substrat :

- Lorsque K_M diminue, $1/K_M$ augmente, l'affinité augmente
- Lorsque K_M augmente, $1/K_M$ diminue, l'affinité diminue.

Exemple : l'hexokinase a une affinité dix fois plus grande pour le glucose que pour le fructose :

K_M glucose = 0.15 et K_M fructose = 1.5

Une représentation de Lineweaver-Burk, qu'elle soit tracée à la main ou par ordinateur, offre l'avantage de pouvoir rapidement estimer visuellement K_M et V_{\max} . Les représentations linéaires sont aussi plus appropriées que les courbes pour comparer plusieurs ensembles de

données, que ce soit pour des préparations d'enzymes différentes ou pour une même enzyme en présence de différentes concentrations d'un inhibiteur.

Exercice d'application

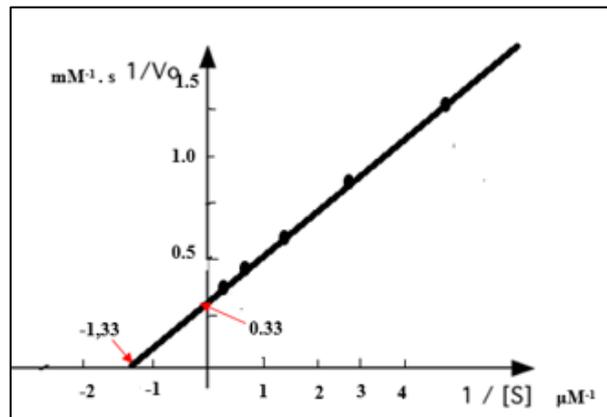
La vitesse d'une réaction enzymatique a été mesurée pour plusieurs concentrations du substrat. Calculer les valeurs de K_M et V_{max} de cette réaction.

[S] (μM)	v_0 ($\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$)
0,25	0,75
0,5	1,20
1,0	1,71
2,0	2,18
4,0	2,53

Solution

On calcule les valeurs inverses des concentrations en substrat et des vitesses, puis on trace une représentation de $1/v_0$ en fonction de $1/[S]$ (représentation de Lineweaver-Burk)

$1/[S]$ (μM^{-1})	$1/v_0$ ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}$)
4,0	1,33
2,0	0,83
1,0	0,58
0,5	0,46
0,25	0,40



Le point d'intersection sur l'axe $1/[S]$ (qui est égal à $-1/K_M$) a une valeur de $-1,33 \mu\text{M}^{-1}$

$$K_M = \left[\frac{1}{-1,33 \mu\text{M}^{-1}} \right] = 0,75 \mu\text{M}$$

Le point d'intersection sur l'axe $1/v_0$ (qui est égal à $1/V_{max}$) a une valeur de $0,33 \text{mM}^{-1}\cdot\text{s}$

$$V_{max} = \frac{1}{0,33 \text{mM}^{-1}\cdot\text{s}} = 3,0 \text{Mm}\cdot\text{s}^{-1}$$