

## Chapitre V : Cinétique enzymatique

### Introduction :

L'étude cinétique enzymatique permet de connaître mieux le fonctionnement d'une enzyme donnée. Elle donne de renseignements sur la formation du complexe enzyme-substrat et sur la notion d'affinité. Ces renseignements seront surtout utiles à la compréhension de certains mécanismes de régulation de chaînes métaboliques. De plus l'étude des inhibiteurs peut donner des renseignements précieux sur la nature du site actif de l'enzyme. Le substrat se combine avec l'enzyme pour former un complexe enzyme substrat puis la transformation en produit de réaction à lieu, produit qui est finalement libéré.

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

L'étude cinétique d'une réaction enzymatique consiste en l'étude de la vitesse de réaction et de l'influence de différents paramètres susceptibles de la modifier.

Dans une réaction enzymatique : il y a 3 paramètres variables fondamentaux qui sont :

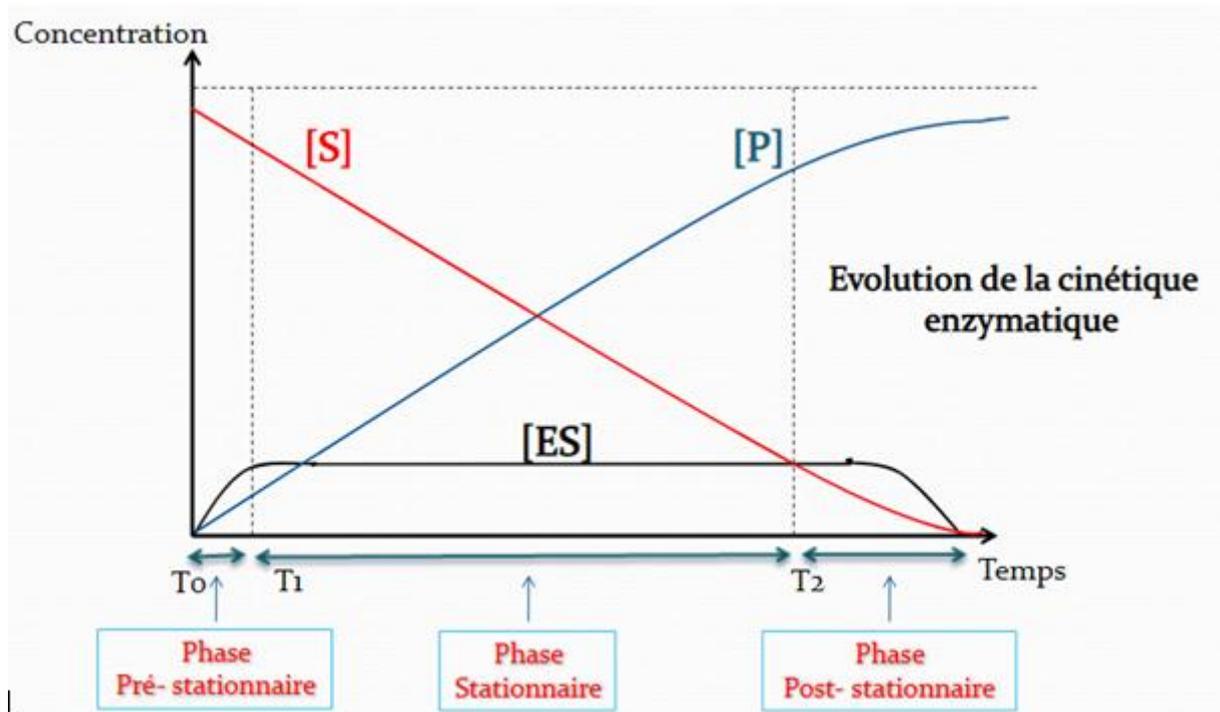
- La quantité d'enzyme dans le milieu,
- La quantité de substrat sur lequel l'enzyme va agir,
- Le temps de contact de l'enzyme et du substrat,
- pH, température

### 5.1 Phases de la réaction enzymatique

Lorsque une enzyme est mis en présence de son substrat généralement sous forme de solution. La combinaison enzyme-substrat(**E-S**) est rapide, cette situation est la plus simple, particulièrement lorsque le substrat est en large excès.

Cette étape initiale, appelée phase **préstationnaire**, sa durée est de l'ordre de milliseconde. A la fin de cette phase commence la **phase stationnaire**, pendant laquelle l'enzyme est saturée par son substrat (**S**) et la combinaison [**ES**] est à concentration maximale est constante et durant laquelle la vitesse de la réaction est constante et répond à une cinétique de l'ordre zéro(**0**). Dès que la concentration du substrat diminue de manière significative, ce qui apparaît au bout d'un temps plus au moins long selon l'enzyme (de quelque minutes à quelques heures), la vitesse de réaction décroît et l'on entre dans la **phase stationnaire**.

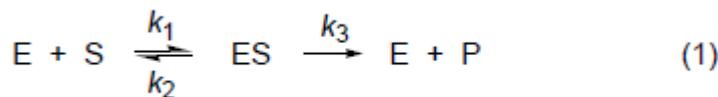
La figure ci-dessous schématise en terme de : substrat de combinaison –substrat[**ES**] et de produit [**P**]



## 5.2. Hypothèse de Michaelis et Menten

En 1913 Michealis et Menten ont établi une théorie générale du mécanisme d'action des enzymes et de la cinétique enzymatique.

Cette théorie admet que l'enzyme E réagit dans une première étape avec le substrat(S) pour former la combinaison(E-S), ce dernier se décompose dans une deuxième étape pour régénérer l'enzyme et libérer le produit(P) qui consiste en :



Cette réaction se décompose en 02 étapes:

### 1-Formation d'une combinaison enzyme-substrat (ES) :

La transformation du substrat en produit, se fait obligatoirement par le passage un état intermédiaire : le complexe enzyme substrat.

-étape rapide et réversible.



V1 et k1 sont les vitesse et constante de formation du complexe ES , V2 et k2 les vitesse et constante de dissociation du complexe ES.

## 2- Dissociation de la combinaison(ES) et formation du produit P:

- La deuxième étape correspond à la formation du produit à partir du complexe activé.
- Étape plus lente.



$V_3$  et  $k_3$  sont la vitesse et constante de formation du produit P.

A partir de l'équation ci-dessus(3) on peut conclure qu'il y a donc en définitive :

- Disparition du substrat **S**
- Apparition des produits(**P**) de la réaction.
- Régénération de l'enzyme **E**.

La vitesse de disparition du substrat  $S$  ( $-dS/dt$ ) (- parce que la  $[S]$  diminue) est égale à la vitesse de formation des produits de la réaction  $dP$  :

$$-dS/dt = dP/dt \quad (4)$$

Cette vitesse de disparition du substrat est égale à la différence des vitesses  $V_1$  et  $V_2$  de l'équation (2).

$$-dS/dt = V_1 - V_2$$

D'après la loi d'action de masse, on a :

$$V_1 = K_1 [E].[S]$$

$$V_2 = K_2[ES]$$

D'après l'équation (3), la vitesse d'apparition des produits de la réaction est :

$$dP/dt = V_3 = K_3[ES] \quad (5)$$

Puisque  $dP/dt = -dS/dt$  on a :  $V_1 - V_2 = V_3$

$$D'où : K_1[E].[S] - K_2 [ES] = K_3[ES] \quad \longrightarrow \quad K_1[E].[S] = [ES](K_2 + K_3)$$

$[E].[S]/[ES] = K_2 + K_3/K_1 = K_m$	(6)
--------------------------------------	-----

La constante  $K_m$  ou constante de dissociation de la combinaison  $[ES]$  qui remplace le terme  $K_2 + K_3/ K_1$  est appelé **constante de Michaelis** (exprimée en mole/litre).

La valeur de la constante de Michaelis est d'autant plus élevée que la dissociation de la combinaison  $[ES]$  est plus forte, donc que l'affinité de l'enzyme (E) pour le substrat (S) est plus faible.

Si  $K_m$  est faible, l'affinité de l'enzyme pour le substrat est grande et réciproquement.

### 5.3.Equation de Michaelis –Menten

**Soit**  $[ET]$  la concentration totale de l'enzyme présente dans le système réactionnel.  $[E]$  la concentration de l'enzyme libre et  $[ES]$  concentration de l'enzyme combinée avec le substrat. Donc, la concentration de l'enzyme libre  $[E]$  sera :

$$[E] = [ET] - [ES]$$

L'expression de la constante de Michaelis( équation 6), en substituant  $[E]$  par sa valeur et  $K_m$  devient :

$$K_m = [E].[S] / [ES] = ([ET] - [ES]).[S] / [ES]$$

$$\longrightarrow K_m = [ET][S] / [ES] - [ES][S] / [ES]$$

$$= [ET][S] / [ES] - [S]$$

Par réarrangement de l'équation ci-dessus

$$D'où K_m + [S] = [ET][S] / [ES]$$

$$\longrightarrow [ES] = [ET][S] / K_m + [S] \quad (7)$$

Où la vitesse  $V$  de la réaction enzymatique est égale à  $V_3$

$$V = V_3 = K_3 [ES] \quad (8)$$

Soit en remplaçant  $[ES]$  par sa valeur exprimée par l'équation (7)

$$V = K_3 [ET][S] / K_m + [S] \quad (9)$$

La vitesse de la réaction dépend donc :

- la concentration de l'enzyme  $[ET]$ .
- la concentration du substrat  $[S]$ .
- de la constante de Michaelis ( $K_m$ ).

D'après l'équation (8) on voit que cette vitesse sera maximale lorsque  $[ES]$  sera le plus grand possible, c'est-à-dire lorsque la totalité de l'enzyme sera combinée au substrat soit :

$$[ES] = [ET]$$

$$\text{Dans ce cas } V_{\max} = K_3 [ET] \quad (10)$$

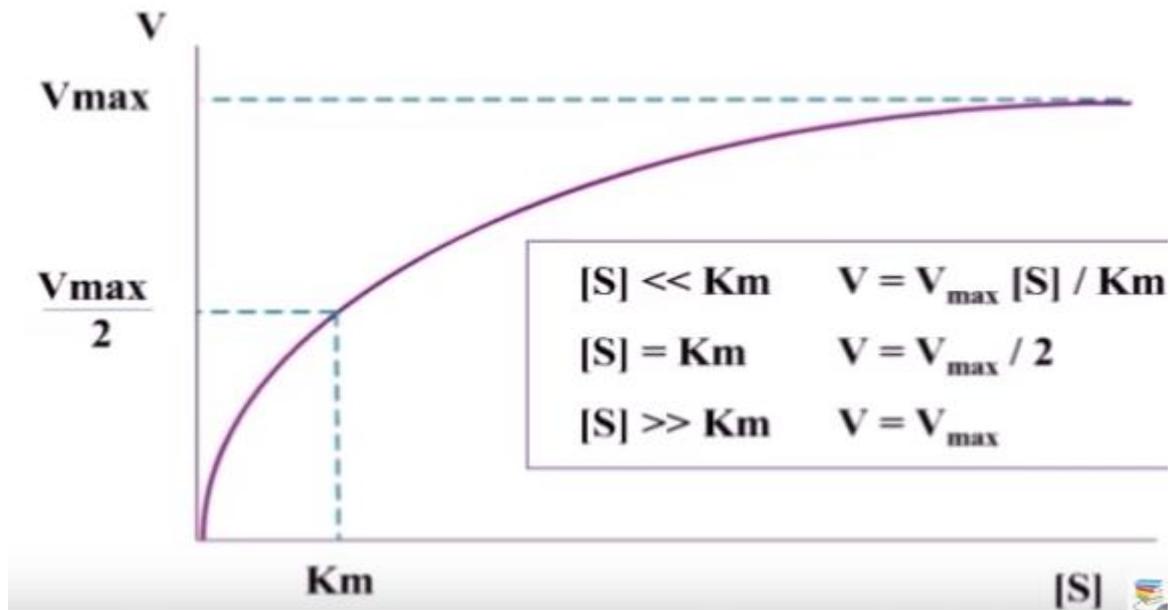
L'équation (9) qui exprime la vitesse de réaction à chaque instant devient

$$\boxed{V = v_{\max} \cdot [S] / K_m + [S]} \quad \text{équation de Michaelis} \quad (11)$$

L'équation de Michaelis-Menten décrit la courbe cinétique de  $V = f(S)$ :

- Pour des concentrations faibles de substrat, lorsque  $[S] \ll K_m$ ,  
 $V = [S]V_{\max}/K_m$  et la vitesse est directement proportionnelle à la concentration de substrat.
- Pour des concentrations élevées de substrat, lorsque  $[S] \gg K_m$ ,  $V = V_{\max}$  et la vitesse est indépendante de la concentration de substrat.
- La signification de la constante  $K_m$  est évidente. Lorsque  $[S] = K_m$ ,  
 $V = V_{\max} / 2$ .  $K_m$  est la concentration de substrat nécessaire pour que l'enzyme atteigne  $(1/2) V_{\max}$ .

### 5.3.1 Représentation graphique de l'équation Michaelis-Menten



Expression graphique de  $v = f(x)$

### 5.3.2 Méthodes de détermination de la constante de Michaelis ( $K_m$ )

#### 5.3.2.1. Méthode arithmétique :

Si dans l'équation (11) on suppose :

$$V = V_{\max}/2 \text{ on aura } V_{\max}/2 = V_{\max} \cdot [S] / (K_m + [S])$$

$$\begin{aligned} \longrightarrow 2V_{\max}[S] &= V_{\max}(K_m + [S]) \\ 2V_{\max}/V_{\max} &= (K_m + [S]) / [S] \\ 2[S] &= K_m + [S] \longrightarrow \boxed{K_m = [S]} \end{aligned} \quad (12)$$

De ce résultat on peut conclure que la constante de Michaelis ( $K_m$ ) est égale à la concentration du substrat  $[S]$  lorsque la vitesse ( $V$ ) de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale ( $V_{\max}$ ).

Pour toute réaction selon Michaelis-Menten:

$$K_m = [S] \Rightarrow v = V_{\max}/2$$

- donc,  $K_m$  est une mesure de  $[S]$  requise pour une catalyse effective.
- Plus  $K_m$  est grand, plus  $[S]$  est élevé pour réaliser une certaine vitesse de réaction.

#### 5.3.2.2. Méthodes graphiques

Une hyperbole est difficile à tracer manuellement.

-Des erreurs sur l'estimation de la  $V_{\max}$  sont possibles.

-Pour simplifier la représentation graphique de l'équation de MICHAELIS-MENTEN (équation 11), peut être transformée algébriquement en d'autres relations, des transformations les plus utilisées consistent simplement à prendre l'inverse de l'équation de Michaelis-Menten.

**A)-Méthode graphique de Lineweaver-Burk :**

$V = V_{max} \cdot [S] / K_m + [S]$  son inverse est :  $1/V = K_m + [S] / V_{max} \cdot [S]$   
 $1/V = K_m / V_{max} [S] + [S] / V_{max} [S]$  cette équation se simplifie en

$$\boxed{1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max}} \quad (13)$$

L'équation (13) est la relation de Lineweaver-Burk, qui représentée par une ligne droite de la forme :  $Y = a x + b$

Où  $1/V = f(1/[S])$  sa pente  $a = K_m/V_{max}$  son ordonnée d'origine :  $b = 1/V_{max}$

De l'équation (13) :

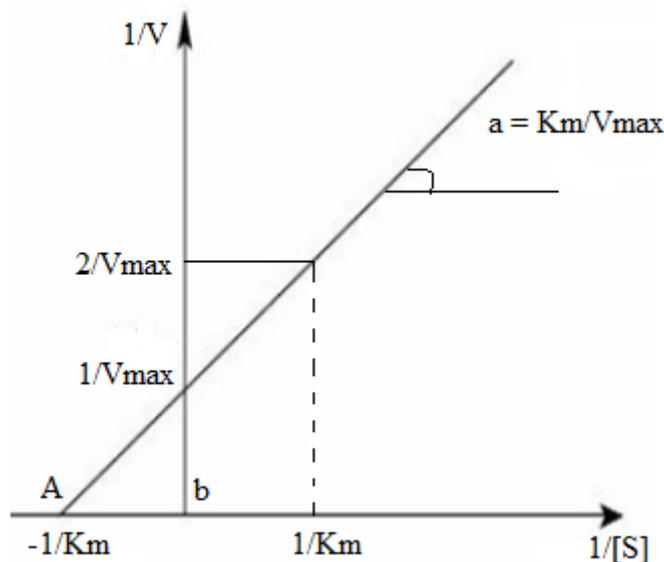
Pour  $1/V = 0 \longrightarrow K_m / V_{max} (1/[S]) = - 1/V_{max}$  d'où  $\boxed{1/[S] = - 1/K_m}$  Point A

Pour  $1/V = 2/V_{max}$

$2/V_{max} = K_m/V_{max}(1/[S]) + 1/V_{max} \longrightarrow \boxed{1/[S] = 1/K_m}$  point B

Pour  $1/S = 0 \longrightarrow 1/V = 1/V_{max}$

Donc la représentation graphique est la suivante :



-La détermination de la valeur de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) est donc immédiate, lorsque la droite de Lineweaver-Burk est tracée.

-pour cette présentation graphique, il suffit de 2 à 3 points pour la tracer.

-Cette méthode est très utilisée et importante sur le plan pratique : permet donc les calculs de  $V_{max}$  et  $K_m$ .

-Elle permet aussi la mise en évidence simple des inhibiteurs de la réaction enzymatique.

**Signification de la constante de Michaelis(Km) :**

Le Km définit bien l’affinité de l’enzyme pour son substrat et cette affinité dépend des constantes K1 et K2.

A l’opposé la vitesse de réaction dépend des produits(P), donc en définitive la vitesse de réaction dépend surtout de K3 c’est pour cette raison on donne le nom K catalytique pour le K3 selon la réaction(10)  $K_3 = V_{max} / ET$ .

**B)- Représentation Eadie-Hofstee**

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

A partir de l’équation de Michaelis-Menten  $V = V_{max}[S] / K_m + [S]$

On divise le numérateur et dénominateur par [S]

Soit  $V = V_{max} \cdot [S] / [S] / K_m + [S] / [S]$

→  $V = V_{max} / K_m / [S] + 1$

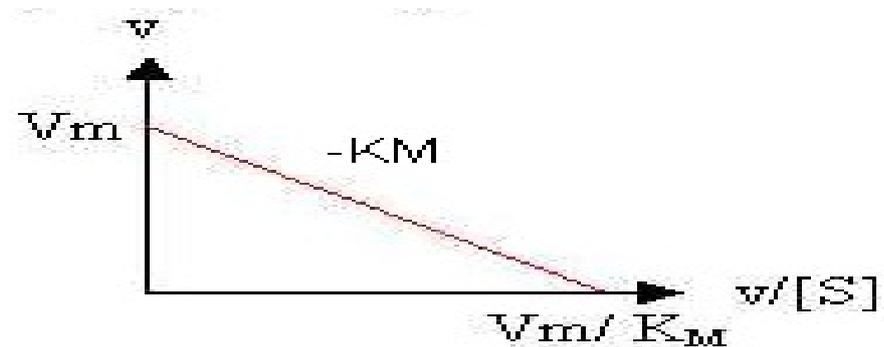
→  $V_{max} = V ( K_m / [S] + 1 )$

$V_{max} = V K_m / [S] + V$

→  $V = V_{max} - V K_m / [S] \text{ ou } V = - K_m V / [S] + V_{max}$

Si  $V/[S]=0$  →  $V = V_{max}$

Si  $V = 0$  →  $V/[S] = V_{max} / K_m$



**Représentation graphique d’Eadie-Hofstee**

Cette représentation est une droite de pente – Km et coupe l’axe des V au point Vmax et l’axe de V/[S] au point Vmax/ Km.

**C)- Représentation de Hanes-Woolf**

Cette représentation fût publiée par Charles Hanes et Barnet Woolf en 1932 :

$$[S]/v = f [S]$$

Cette méthode Résulte de la transformation de l'équation double inverse de Lineweaver-burk dans la forme ci-dessous :

$$1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max}$$

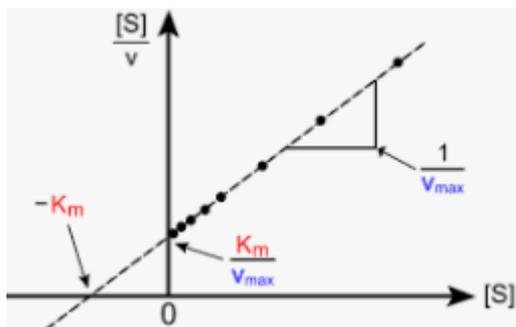
En multipliant les deux(02) membres de l'équation par [S] on obtiendra :

$$[S]/V = [S] \cdot K_m/V_{max} \cdot 1/[S] + [S]/ V_{max}$$

$$[S]/V = [S] /V_{max} + K_m/V_{max}$$

$$\text{Si } [S]/V = 0 \longrightarrow [S] = - K_m$$

$$\text{Si } [S] = 0 \longrightarrow [S]/ V = K_m/V_{max}.$$



### Représentation graphique de Hanes-Wolf

Cette représentation est une droite de pente de  $1/V_{max}$  et qui coupe l'axe des  $[S]$  au point ( $-K_m$ ).