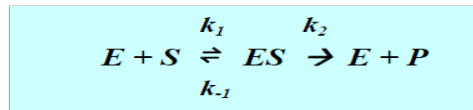


## II.2. Modèle cinétique à un substrat



Où E, S, ES et P symbolisent l'enzyme, le substrat, le complexe enzyme-substrat, et les produits respectivement.



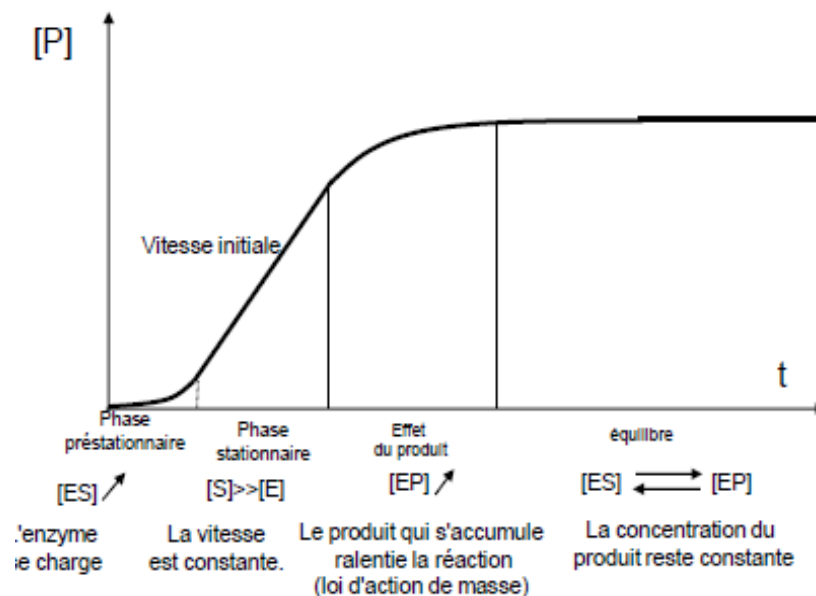
$k_1$  et  $k_{-1}$  sont les constantes de vitesse d'association et de dissociation du complexe ES

$k_2$  négligeable: condition de mesure de la vitesse initiale

$k_{cat}$  ( $k_2$ ) est la constante catalytique, c'est-à-dire la constante de vitesse de la réaction enzymatique



Apparition du produit au cours du temps

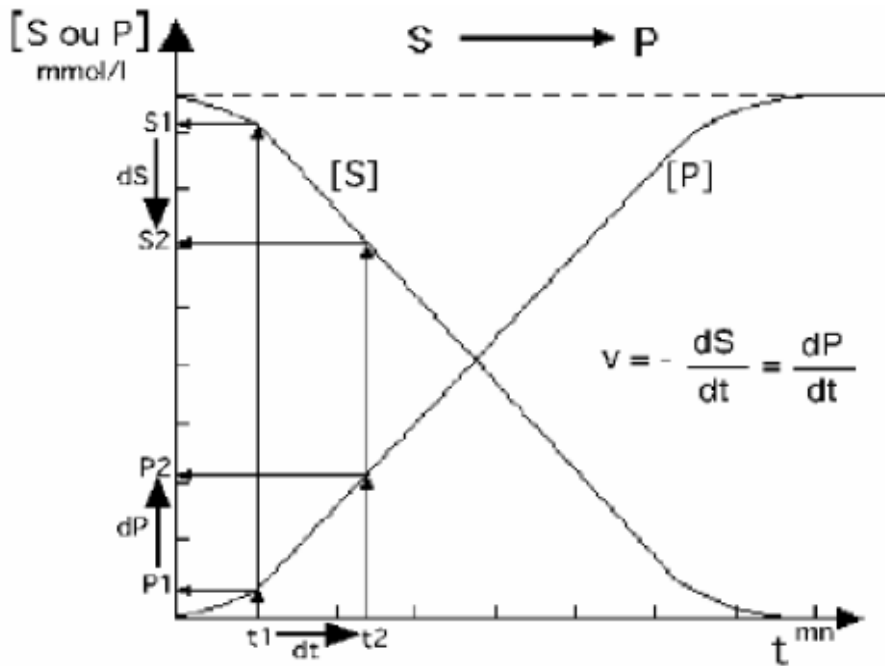


La vitesse peut être mesurée avec l'apparition du produit.

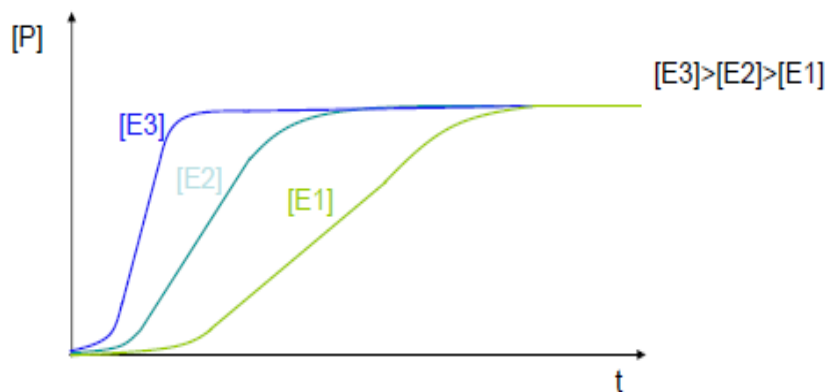
$$v = \frac{d[P]}{dt}$$

En enzymologie classique, on s'intéresse à la phase stationnaire (linéaire) en mesurant la vitesse initiale.

Il y a un maximum d'enzyme liée avec le substrat. D'où la vitesse maximale



Cinétique de l'apparition du produit en fonction de la concentration d'enzymes.



Plus il y a d'enzyme plus la réaction est rapide.  
Par contre cela ne change pas l'équilibre

Le taux de catalyse est donc :

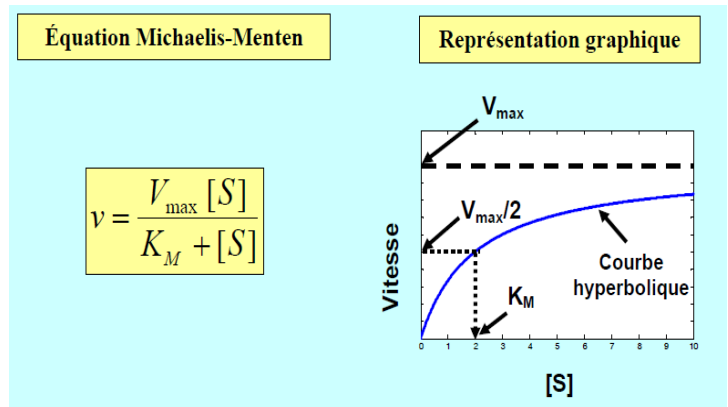
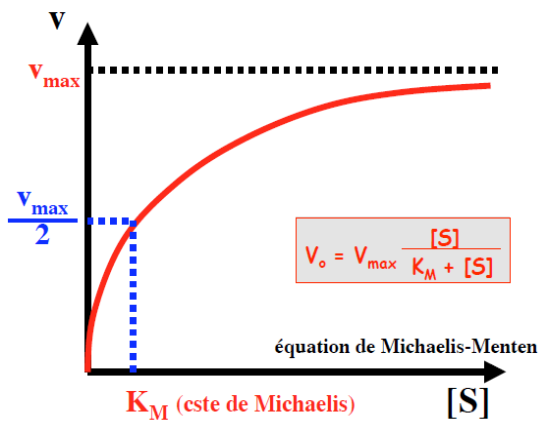
$$v = \frac{V_{MAX} [S]}{K_M + [S]}$$

Cette équation est connue sous le nom de l'équation de **Michaelis-Menten**

Le taux de catalyse est donc proportionnel :

- au taux de catalyse maximal,  $V_{MAX}$ , et

- à la fraction des enzymes qui sont occupés par un substrat [ES].

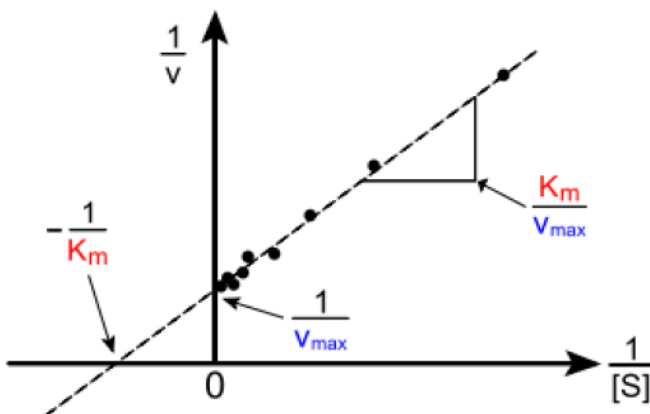


Où

$$V_{\max} = k_2 [E]_T \text{ et } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E]_T$$

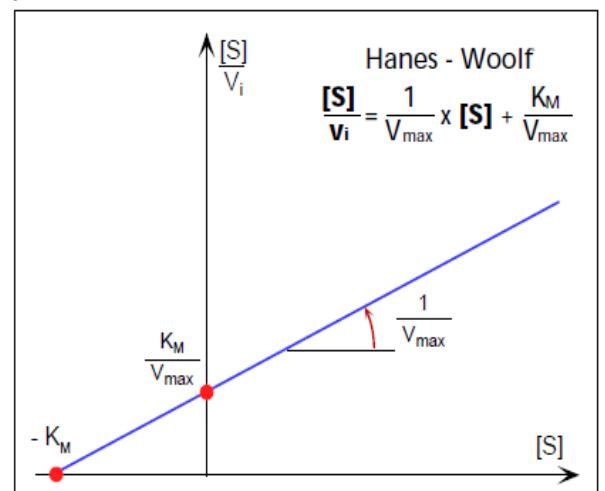
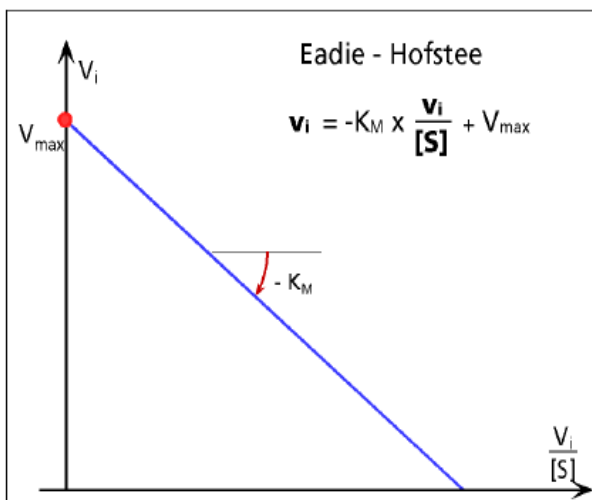
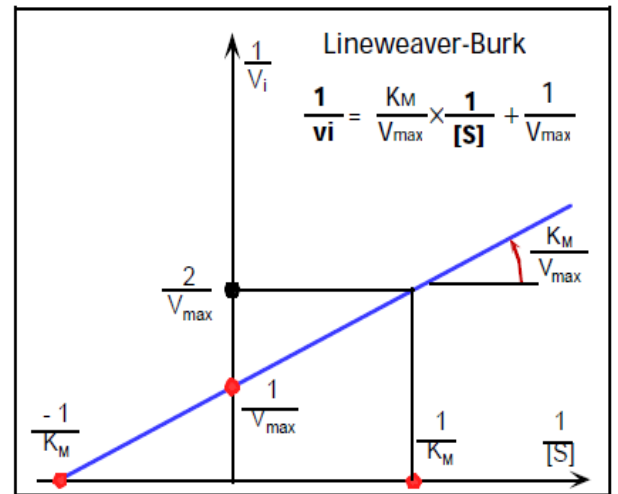
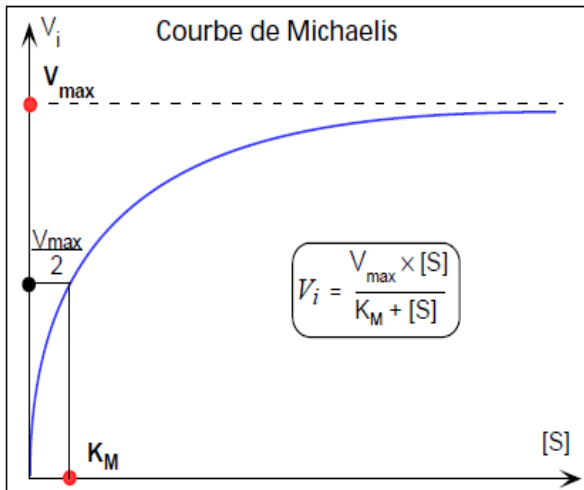
Traditionnellement les estimées des valeurs cinétiques  $v$ ,  $V_{\max}$  et  $K_M$  sont déterminées à partir de la représentation de Lineweaver et Burk :

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


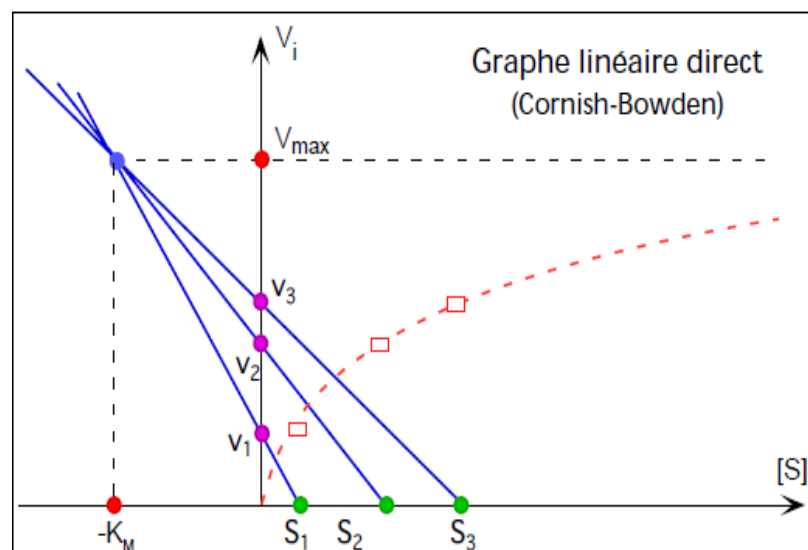
Les paramètres  $V_{\max}$  et  $K_M$  permettent de cerner trois aspects de la catalyse :

- 1) Caractérisation de la spécificité enzymatique.
- 2) Type de mécanisme : « état stationnaire » ou « équilibre rapide ».
- 3) Rôle métabolique de l'enzyme.

D'autres techniques de linéarisation ont été proposées et donnent des résultats intéressants.



Une démarche graphique et statistique : graphe linéaire direct (Cornish - Bowden 1974) conduit aux estimations les moins biaisées (Cf. logiciel régression ou les logiciels spécialisés dans l'enzymologie).



### II.2.1. Mesure de la constante catalytique et de l'efficacité enzymatique

a) Les paramètres cinétiques d'un enzyme permettent de mesurer son efficacité catalytique. Nous pouvons d'abord définir la constante catalytique ( $k_{cat}$ , ou le « turnover number ») comme étant le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps par chaque site actif, quand l'enzyme est saturée.

b) L'efficacité ou spécificité enzymatique peut être calculée lorsque l'enzyme est non-saturée,  $[S] \ll K_M$  c'est-à-dire quand beaucoup de sites sont libres. Dans les conditions physiologiques, il est très rare qu'un enzyme soit saturé, puisque la concentration du substrat est généralement inférieure au  $K_M$  de l'enzyme. Dans les conditions où la concentration d'enzyme libre est à peu près égale à la concentration d'enzyme total,  $K_M \gg [S]$ ,  $[E]_T \approx [E]$ ; donc

$$v \approx \frac{k_{cat}}{K_M} [S] [E]_T \approx \frac{k_{cat}}{K_M} [S] [E]$$

Le taux de catalyse dépend donc de la valeur de  $k_{cat}/K_M (M^{-1}s^{-1})$ , qui représente une pseudo constante bimoléculaire et il mesure l'efficacité catalytique de l'enzyme ou sa spécificité.

- s'il y a deux substrats,  $S_1$  et  $S_2$ , qui sont utilisés par le même enzyme.

$$v_{S_1} \approx \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{S_1} [E] [S_1] \quad v_{S_2} \approx \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{S_2} [E] [S_2]$$

- donc au même  $[S]$ ,

$$\frac{v_{S_1}}{v_{S_2}} \approx \frac{\left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{S_1}}{\left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{S_2}}$$

Le tableau ci-dessous montre les valeurs de  $K_M$ ,  $k_{cat}$ , et  $k_{cat}/K_M$  pour plusieurs enzymes et substrats.

Enzyme	Substrat	$K_M$ (M)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	$9.5 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^8$
Anhydrase carbonique	CO <sub>2</sub>	$1.2 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^6$	$8.3 \times 10^7$
	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	$2.6 \times 10^{-2}$	$4.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^7$
Catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^8$
Chymotrypsine	Ester éthylique de N-Acétyleglycine	$4.4 \times 10^{-1}$	$5.1 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-1}$
	Ester éthylique de N-Acétylevaline	$8.8 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-1}$	1.9
	Ester éthylique de N-Acétyletyrosine	$6.6 \times 10^{-4}$	$1.9 \times 10^2$	$2.9 \times 10^5$
Fumarase	Fumarate	$5.0 \times 10^{-6}$	$8.0 \times 10^2$	$1.6 \times 10^8$
	Malate	$2.5 \times 10^{-5}$	$9.0 \times 10^2$	$3.6 \times 10^7$
Uréase	Urée	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^4$	$4.0 \times 10^5$

### II.2.2. Rôle métabolique des enzymes

Le rôle de l'enzyme dans le métabolisme peut être évalué en comparaison avec son  $K_M$  et la concentration *in vivo* du substrat ;

- Par exemple, l'isozyme IV de la glucokinase provenant du foie possède un  $K_M$  à 10mM tandis que les isozymes I - III (qui se retrouvent partout dans le corps) ont tous des  $K_M \sim 40 \mu\text{M}$ .
- Chez un individu à jeun, les niveaux de glucose sanguins sont  $\sim 5\text{mM}$ . A cette concentration, les isozymes I-III fonctionnent "à planche" tandis que l'isozyme IV est seulement  $\sim 25\%$  activé. Après un repas d'hydrates de carbone, la concentration de glucose sanguin monte à 10mM et isozyme IV fonctionnera à  $V_{max}/2$ .
- A cause du  $K_M$  élevé de l'isozyme IV, le foie est capable de gérer le glucose supplémentaire en glucose-6-P.
- Cette réaction représente la première étape de glycolyse.

## II.2.3. Influence des paramètres réactionnels sur la vitesse initiale

### II.2.3.1. Influence de la concentration en enzyme

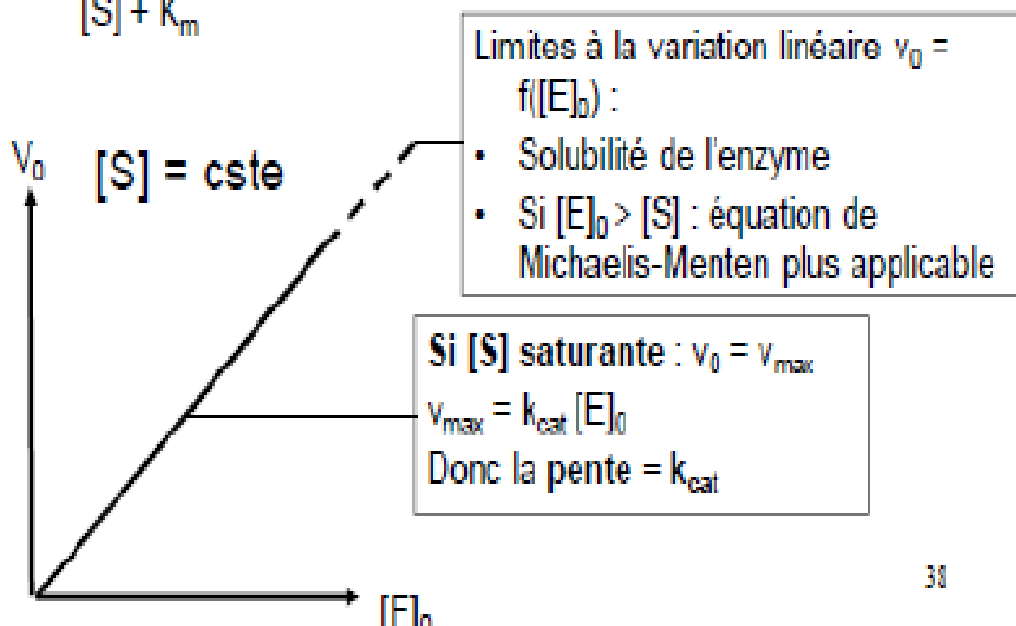
D'après l'équation de Michaelis-Menten, la vitesse initiale est proportionnelle à la concentration initiale en enzyme.  $V_0$  augmente quand la concentration en enzyme augmente, jusqu'à un certain seuil. Cela est dû à des problèmes de :

- Solubilité de l'enzyme
- Si  $[E]_0 > [S]$ , l'équation de Michaelis-Menten n'est plus applicable.

A concentration en substrat saturante, on a  $v_0 = v_{\max}$ , donc la pente de la droite est égale à  $k_{\text{cat}}$ .

Equation de Michaelis-Menten peut s'écrire :

$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}} [E]_0 [S]}{[S] + K_m}$$

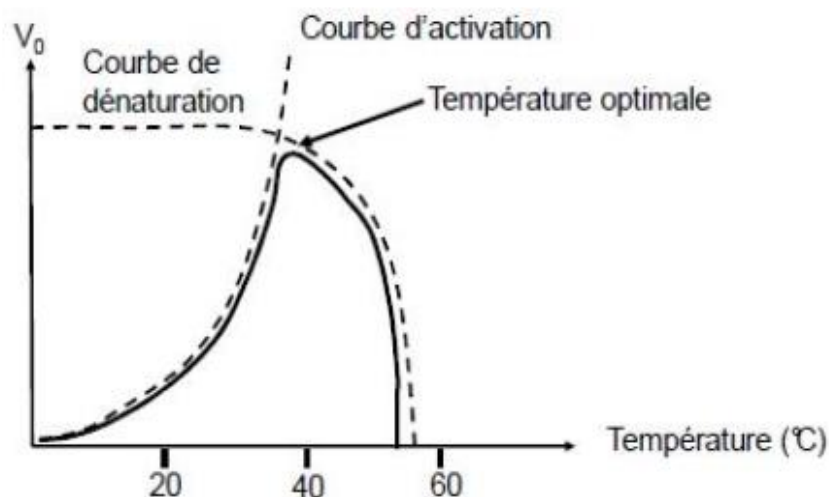


### II.2.3.2. Influence de la température

Les effets de la température sur l'activité d'une enzyme sont complexes, et peuvent être considérés comme le résultat de 2 forces agissant simultanément mais dans des sens opposés.

- Quand la température augmente, la vitesse de réaction augmente (apport d'énergie).
- Quand la température augmente, il se produit une inactivation (dénaturation) progressive de la protéine enzymatique, de telle sorte qu'il existe une température optimale apparente.

Les enzymes possèdent un pic d'activité à une température donnée : plus le milieu réactionnel est chaud, plus la réaction est facilitée, mais si trop de chaleur est apportée, l'enzyme est dénaturée.



La plupart des enzymes du milieu physiologique humain possèdent un pic à  $37,5^{\circ}\text{C}$ .

### II.2.3.3. Influence du pH

Les enzymes sont des protéines. Elles sont sensibles aux variations du pH du milieu. De fait, quand le pH change, l'état d'ionisation des groupements chargés, aussi bien dans le site actif de l'enzyme (en fonction du pKa propre à chaque résidu chargé participant à la constitution du site actif), que dans le substrat, varie. L'activité enzymatique dépend du pH et cette dépendance est spécifique à chaque enzyme.

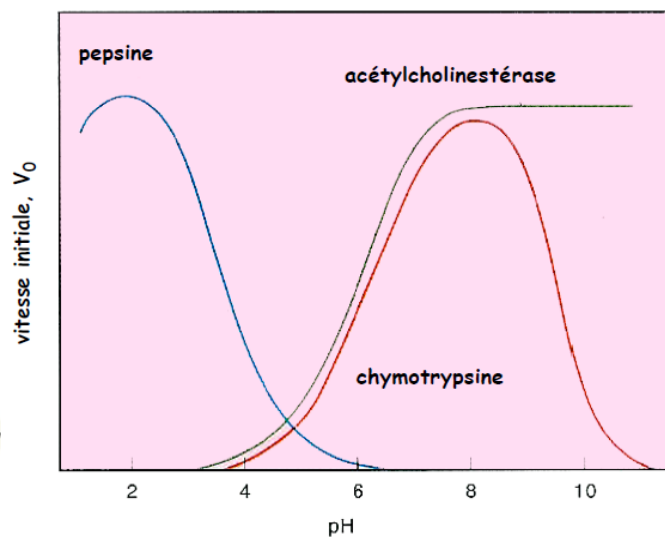
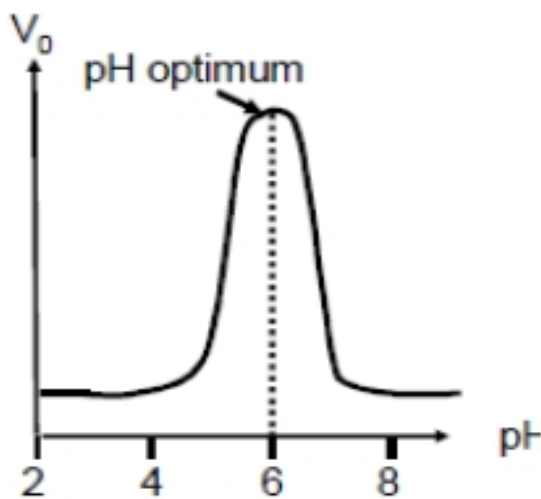


De même, les enzymes possèdent un pH optimal. Pour la plupart des enzymes, le pH optimal est situé autour de 6-8 (neutre), mais certaines peuvent observer un pic en milieu très acide (pepsine, 1.5-2) ou basique (arginase, 9.5-10).

Le changement de pH peut avoir plusieurs effets directs sur des réactions catalysées de façon enzymatique :

- Inactivation de l'enzyme
- Changement dans l'état d'ionisation du substrat
- Changement dans l'équilibre d'une réaction

L'effet indirect est celui du changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés, et qui sont essentielles pour l'expression de l'activité catalytique. L'effet du pH sur la vitesse d'un enzyme peut être complexe puisque  $V_{max}$  et  $K_m$  sont à la fois perturbés.



## II.2. Cinétique des enzymes à deux et plusieurs substrats

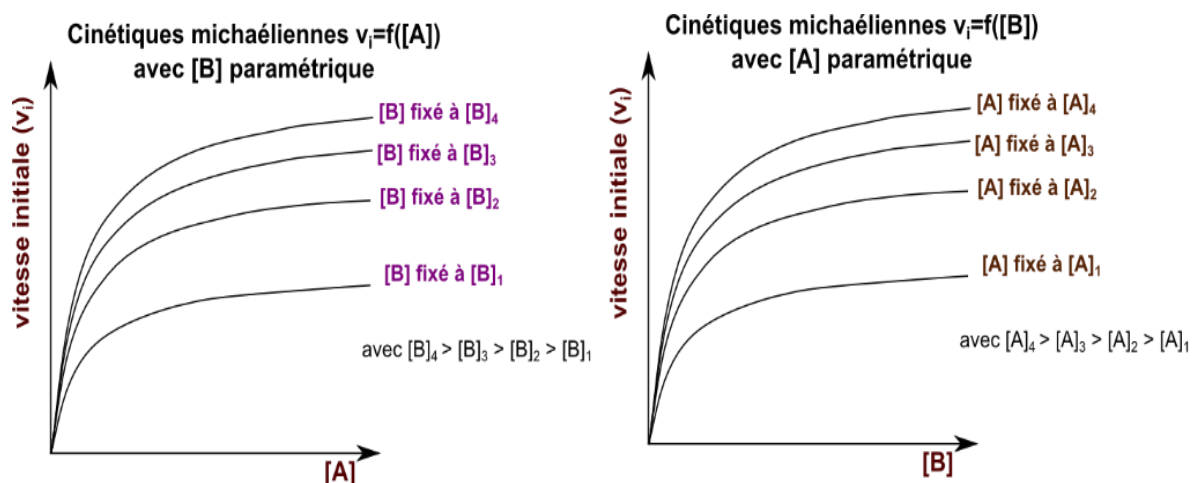
### II.2.1. Comportement Michaelien et réactions à plusieurs substrats

Les réactions enzymatiques qui ne mettent en jeu qu'un seul substrat et un seul produit sont rares puisqu'elles ne concernent que les isomérisations. La plupart des réactions enzymatiques impliquent 2 voire 3 substrats et libèrent 2 voire 3 produits. La pertinence du modèle Michaélien à un substrat et un produit va résider dans le fait qu'on va obtenir un comportement Michaélien à un seul substrat et un seul produit en se plaçant comme un observateur qui ne regarde qu'un substrat comme variable (le ou les autres substrats sont en concentration paramétrique constante dans le milieu réactionnel) et un seul produit de réaction.

### II.2.2. Approche expérimentale

L'étude cinétique des réactions enzymatiques à deux substrats a pour but de déterminer l'ordre de fixation des substrats, les constantes cinétiques caractérisant la fixation de chacun d'eux en présence et en absence de l'autre ainsi que la vitesse maximale de la réaction qui est mesurée quand les deux substrats sont à concentration saturante. L'approche expérimentale consiste à fixer la concentration du premier substrat A en excès (substrat fixe) et on mesure la vitesse en faisant varier B (substrat variable ou paramétrique) et ceci en phase stationnaire. On refait les mêmes expériences en fixant B et en variant A.

Si on obtient à chaque manipulation des hyperboles michaeliennes  $v_i=f([A])$  ou  $v_i=f([B])$ , on va dire que l'enzyme est Michaelienne. Ce qui s'illustre avec les 2 schémas :



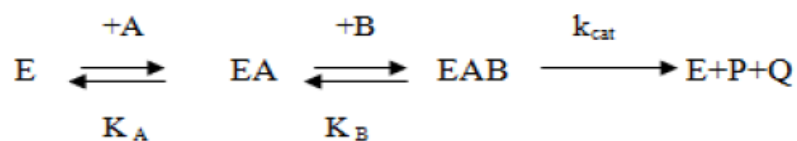
Mais, le traitement mathématique du cas général est complexe, c'est pourquoi on utilise la notation de Cleland (1963). On symbolise la réaction enzymatique à l'aide d'un trait horizontal, alors que les flèches symbolisent les substrats et les produits au cours du cycle de la réaction.

Trois mécanismes cinétiques classiques rencontrés avec les catalyses michaeliennes bi-bi, le mécanisme ordonné à complexe ternaire, le mécanisme à fixation aléatoire des substrats et à complexe ternaire et enfin le mécanisme ping-pong ou enzyme substituée à complexe binaire.

Les réactions à deux substrats sont catalysées par : oxydoréductases, transférases et ligases.

### II.2.3. Mécanisme ordonné (séquencé)

L'ordre de fixation est obligatoire. Le substrat A doit se fixer à l'enzyme libre E avant le substrat B. Le deuxième substrat B se lie après que le substrat A se lie.



$K_A$  et  $K_B$  sont les constantes d'équilibre des deux étapes :

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad K_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

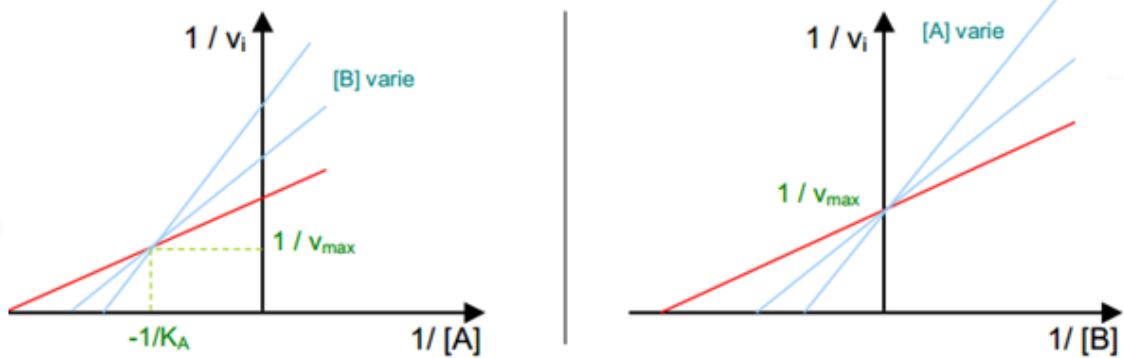
Quand on fixe A et on fait varier B, on obtient l'équation de vitesse :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A \cdot K_B}{[A][B]}} \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[B]} \left( K_B + \frac{K_A}{[A]} \cdot K_B \right) + \frac{1}{V_{max}}$$

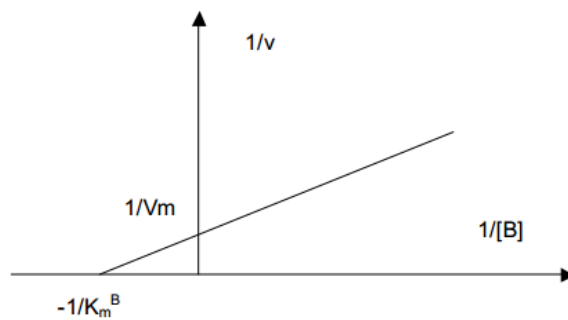
Quand on fixe A et on fait varier B, on obtient l'équation de vitesse :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[A]} \left[ \frac{K_A \cdot K_B}{[B]} \right] + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_B}{[B]} \right)$$

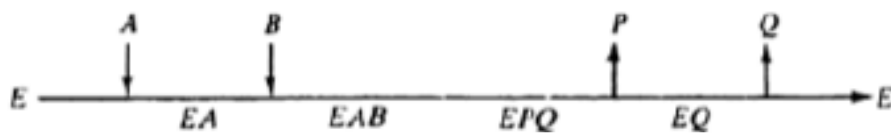
Représentations primaires :



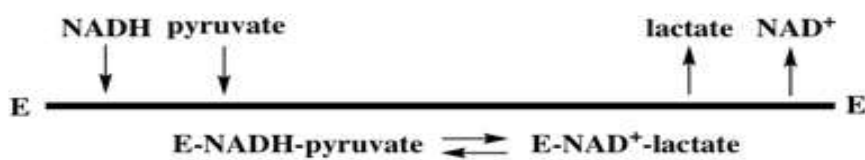
Représentation secondaire :



Représentation de Cleland :



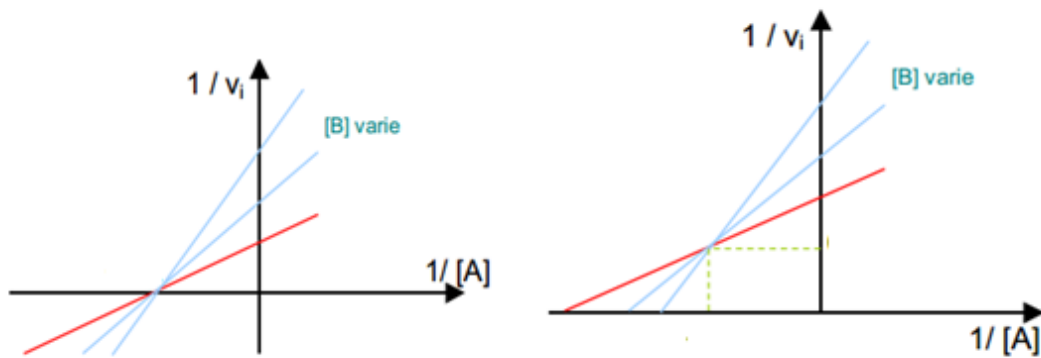
Exemple de bibi ordonné : Les déshydrogénases à  $NAD^+$



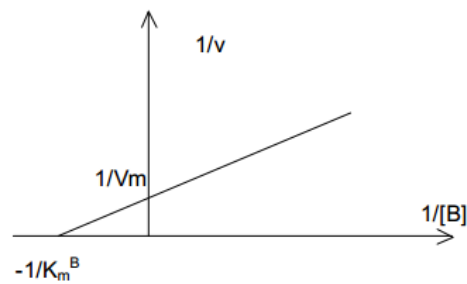
### II.2.4. Mécanisme aléatoire (au hasard)

Dans ce modèle chacun des substrats se fixe sur l'enzyme de manière aléatoire, aucun ordre d'arrivée n'est nécessaire mais la réaction finale n'a lieu que si les deux substrats sont présents dans le centre actif.

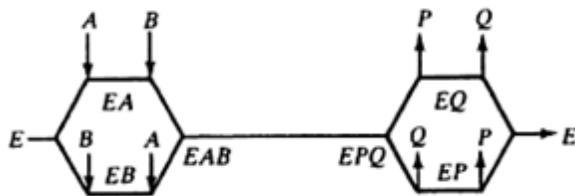
Représentations primaires :



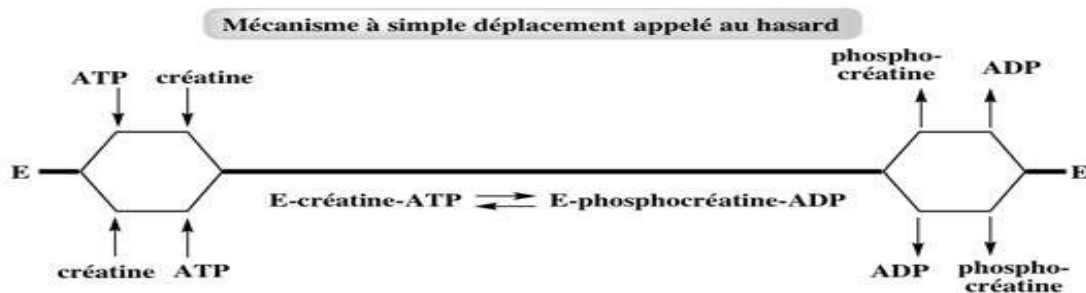
Représentation secondaire :



Représentation de Cleland :

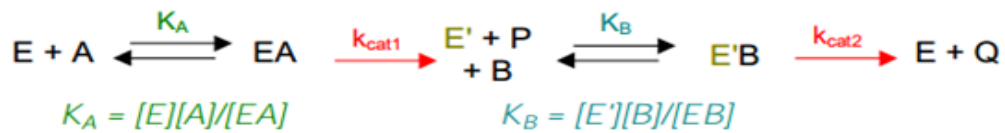


Exemple de bibi aléatoire : la créatine kinase (E.C. 2.7.3.2)



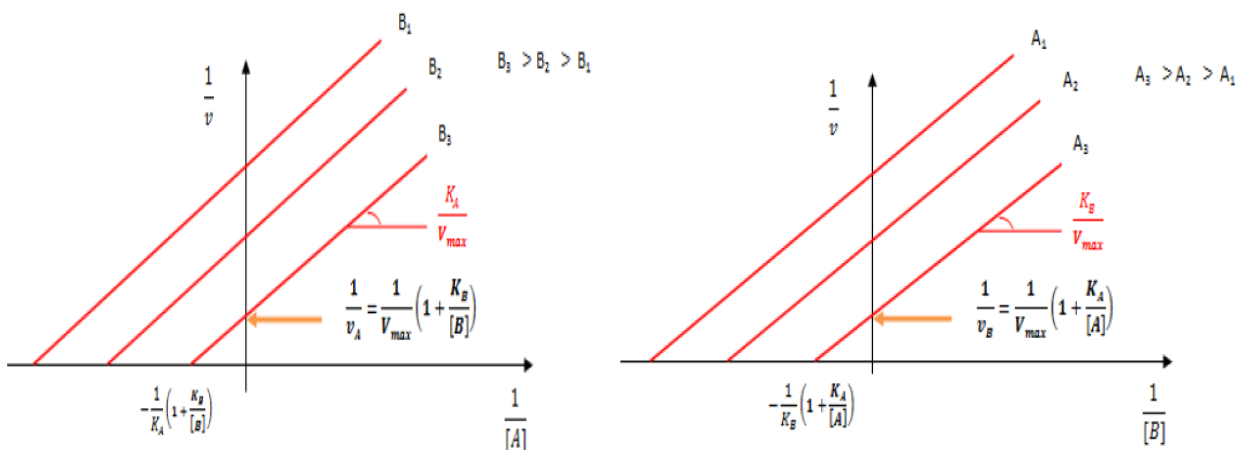
### II.2.5. Mécanisme ping-pong (Enzyme substituée)

Dans ce mécanisme, il n'y a pas de formation d'un complexe tertiaire EAB. L'enzyme, après avoir fixé un des substrats, le transforme et libère le produit correspondant. L'enzyme ensuite fixe l'autre substrat, le transforme et libère le second produit.

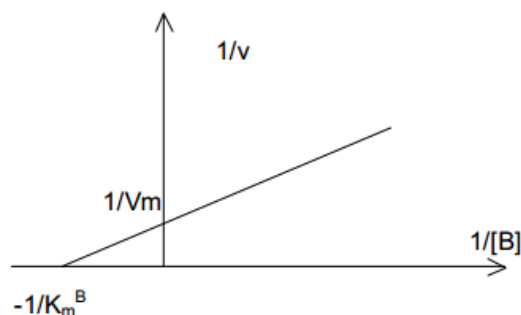


$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}} \qquad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} \right)$$

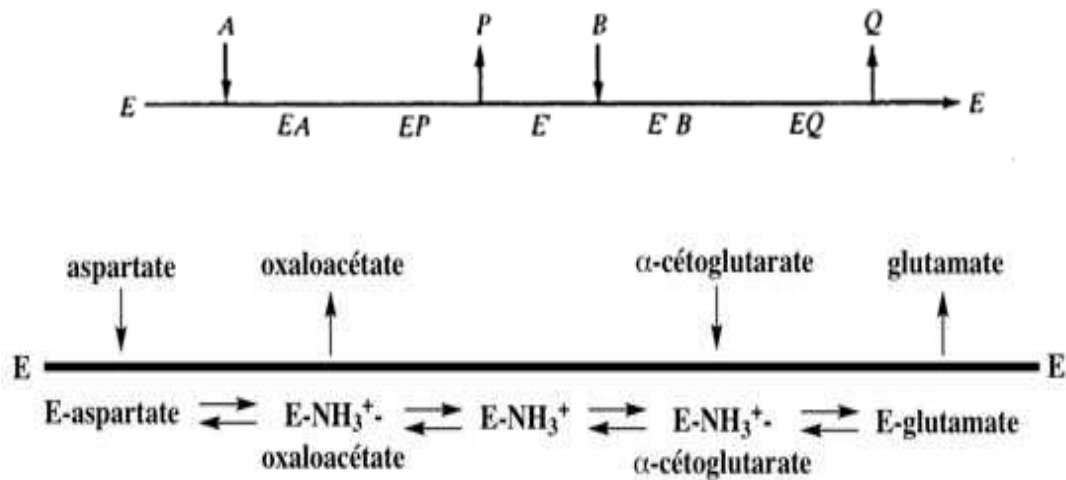
Représentations primaires :



Représentation secondaire :



Représentation de Cleland :



Exemple de bibi ping-pong : l'aspartate aminotransférase (ASAT)

## II.3. ACTIVITÉ CATALYTIQUE

### II.3. Historique

Les concentrations très faibles auxquelles les enzymes agissent et le fait qu'elles soient mélangées à d'autres protéines, empêchent, en général, de les doser au sens courant du terme (mesure de la concentration molaire ou massique). En revanche, il est possible de « doser » une enzyme en mesurant sa propriété fondamentale : sa capacité à catalyser une réaction dans des conditions données (catalytité ou « catalytic ability »).

On a utilisé longtemps des unités totalement arbitraires, par exemple : les unités Bodansky ou les unités Bessey pour la détermination de l'activité des phosphatases alcalines. En 1961 l'I.U.B. (International Union of Biochemistry) recommande l'emploi d'une « unité d'enzyme » : l'unité internationale (UI) qui est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute dans des conditions définies (1 UI est équivalent à 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

Dès 1966 l'I.U.P.A.C. - I.F.C.C.1 I.F.C.C propose le catal (cat) qui en 1972 devient le katal (kat) : quantité catalytique (et non pas d'enzyme !) d'un système qui catalyse suivant un schéma réactionnel décrit, la transformation d'une mole de substrat par seconde (1 kat est équivalent à 1  $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ ). En 1978 on adopte le terme d'activité catalytique (symbole z).

### II.3. Activité catalytique ou catabilité

Un « dosage » d'enzyme consiste donc à déterminer l'activité catalytique d'une préparation. L'activité catalytique d'une enzyme est la propriété mesurée par la vitesse de la réaction chimique catalysée, produite dans un système d'essai défini. L'activité catalytique, bien que mesurée par une vitesse de réaction est conceptuellement différente d'une vitesse de réaction, elle se rapporte à l'enzyme du système original contenant cette enzyme (sérum, extrait végétal,...) et non au mélange réactionnel. Il s'agit donc d'une grandeur extensive (elle double lorsque le système contenant l'enzyme double).

L'unité d'activité catalytique est le katal (kat), unité cohérente avec le Système International : (temps en secondes, quantité de matière en moles).

$$1 \text{ UI} \equiv 1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \equiv (\equiv \text{signifie équivalent à}) 16,67 \text{ nmol}\cdot\text{s}^{-1} \equiv 16,67 \text{ nkat}$$

L'activité catalytique se rapporte au catalyseur, enzyme pour ce qui nous concerne dans son système original et non dans le mélange réactionnel utilisé pour le "doser". La température de 30 °C a été retenue pour les mesures par la SFBC1. Plusieurs grandeurs peuvent être définies à partir de l'activité catalytique.

### II.3. Concentration d'activité catalytique

Cette grandeur (symbole  $b$ ) peut être abrégée en concentration catalytique (catc) ; l'unité est le  $\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ . Le volume auquel on se rapport est le volume du système contenant l'enzyme (sérum, érythrocytes, surnageant...) et non celui du système d'essai où se fait la mesure (mélange réactionnel). On aura donc :

$$b = V_{\text{max}} \times \frac{V_{\text{réact}}}{V_{\text{enz}}}$$

La mesure se réduit souvent à une mesure de variation d'absorbance en fonction du temps (NAD réduit qui se forme ou disparaît,...) ; on aura donc une formule du type :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \quad \Delta A/s = \epsilon \cdot l \cdot \Delta C/s \text{ soit : } v_i = \Delta C/s = \Delta A/s \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot l} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1} \text{ (attention aux unités de } \epsilon \text{ !!)}$$

Si le substrat est saturant alors  $v_i = V_{\text{max}}$ , on peut donc en déduire la concentration catalytique. On démontrera par exemple la relation suivante :



$b = \frac{\Delta A / \text{min}}{\varepsilon \cdot l} \times \frac{V_{\text{réact}}}{V_{\text{enz}}} \times 10^6 \quad \text{UI.L}^{-1}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\varepsilon</math> : coefficient d'extinction linéique molaire (<math>\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}</math>)</li> <li>• <math>V_{\text{réact}}</math> : volume du mélange réactionnel total où se fait la mesure.</li> <li>• <math>V_{\text{enz}}</math> : volume du milieu contenant l'enzyme à doser.</li> </ul>
---	--

## II.4. Activité catalytique spécifique

Encore appelée catabilité spécifique. Spécifique signifie ici « rapporter à une autre grandeur de la préparation enzymatique, souvent la masse, parfois le volume ». C'est l'activité catalytique d'une enzyme divisée par la masse de la protéine enzymatique elle-même, protéine purifiée ou pure. Cette dernière valeur n'étant en général pas connue on rapporte l'activité à la masse de protéine contenue dans le système.

Autre unité courante : UI.mg<sup>-1</sup>.

Z<sub>sp</sub> permet de suivre les progrès de la purification en enzyme ou enrichissement E.

$$Z_{\text{sp}} = \frac{z}{qm_{\text{protéines}}} = \frac{b}{\rho_{\text{protéines}}} \quad E = \frac{Z_{\text{sp}} \text{ étape } n}{Z_{\text{sp}} \text{ étape } n-1 \text{ ou } n0} \quad \text{avec } E > 1$$

## II.5. Activité catalytique molaire

Encore appelée catabilité molaire. Termes à éviter : activité enzymatique molaire (AEM), activité molaire spécifique (AMS). C'est l'activité catalytique rapportée à la quantité de matière de la protéine enzymatique exprimée en mole (cela suppose une enzyme obtenue à l'état pur).

$$Z_m = \frac{z}{qs_{\text{enzyme}}} = \frac{b}{[E_{\text{total}}]}$$

Cette grandeur exprime le nombre de molécules de substrat transformées par unité de temps et par molécule d'enzyme à saturation. Cette grandeur correspond au terme « turnover number » pour une enzyme à 1 seul site actif (les résultats sont parfois exprimés en s<sup>-1</sup>).

## II.5. Autres grandeurs

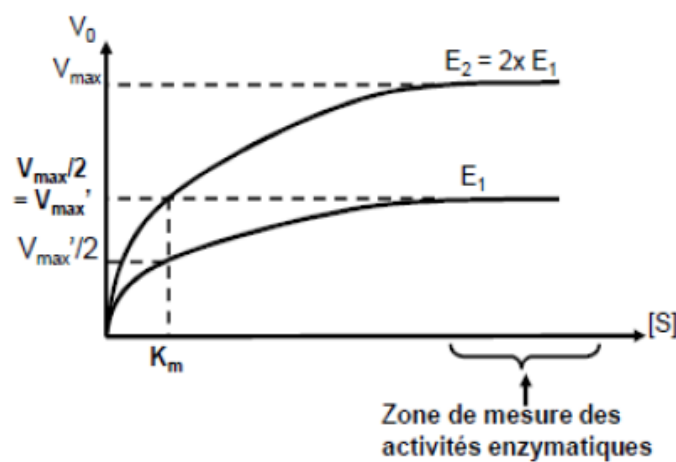
**Teneur d'activité catalytique (unités kat.kg<sup>-1</sup>)** : C'est l'activité catalytique d'une enzyme divisée par la masse du système.

## II.6. Mesure de l'activité des enzymes

### II.6.1. Conditions expérimentales

Les conditions conventionnelles de détermination des activités enzymatiques impliquent des conditions expérimentales où :

- La vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration en enzyme
- La vitesse de réaction n'est pas influencée par les variations en concentration en substrat : on travaillera alors en substrat saturant (quand  $[S] \gg k_m$ ,  $v_0 = v_{\max}$  et  $v_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0$ ).



En pratique :

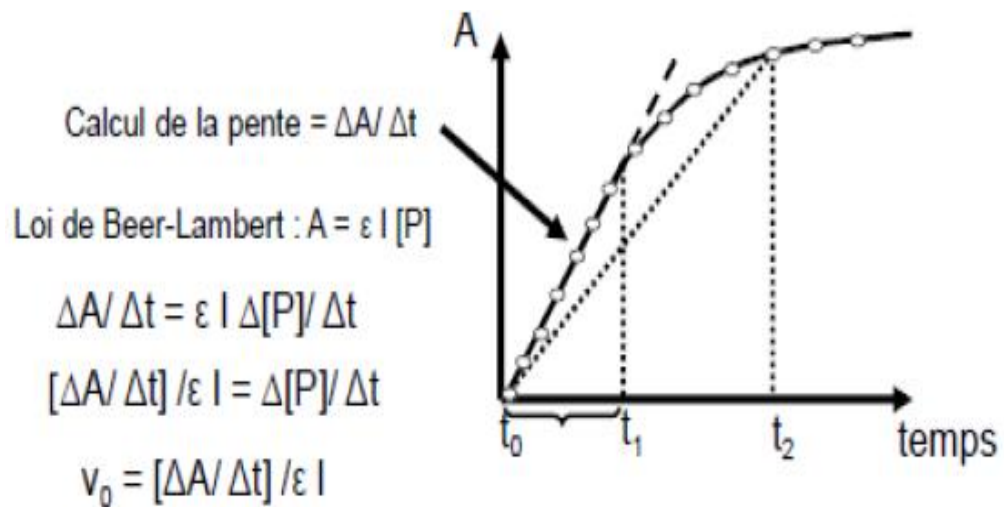
- Concentration du substrat : pour être à  $v_{\max}$  en pratique  $[S] > 10k_m$
- Utilisation d'un substrat naturel ou de synthèse (un chromogène par exemple, qui donnera un signal coloré)
- Travail à pH optimum, en milieu tamponné
- Thermostatisation (= température stable) à température optimum (souvent  $37^\circ\text{C}$ )

### II.6.2. Modalités de mesure

La concentration en produit et en S est calculée par la mesure d'absorbance du milieu réactionnel (signalisation du produit ou d'un co-substrat).

Le temps de mesure est très court (de quelques dizaines de secondes à quelques minutes), et la mesure est réalisée en cinétique (plusieurs mesures à intervalles réguliers).

Calcul de la vitesse initiale :



Avec  $\Delta A / \Delta t$  en  $\text{min}^{-1}$ ,  $\epsilon$  en  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $l$  en  $\text{cm}$   
 Donc  $v_0$  exprimé en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

59

La loi de Beer-Lambert montre qu'il y a une proportionnalité entre l'absorbance et la concentration de la molécule qui absorbe.