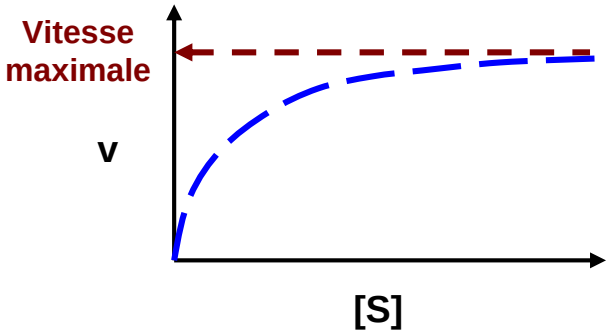
La Cinétique Enzymatique

Les réactions chimiques dans les cellules sont faites par des enzymes. Les mesures cinétiques sont parmi les outils les plus puissants pour élucider les mécanismes enzymatiques. C'est donc un des aspects les plus importants de l'enzymologie; ces mesures nous informent sur la spécificité de la réaction enzymatique et sur les caractéristiques physiques de l'enzyme. En pratique, ces mesures sont essentielles en biochimie clinique, puisqu'elles permettent de détecter des anomalies pathologiques.

L'étude de la cinétique enzymatique a commencé en 1902 quand Adrian Brown a examiné la vitesse d'hydrolyse de saccharose par l'enzyme invertase

$$\text{saccharose} + H_2O \rightleftharpoons \text{glucose} + \text{fructose}$$

Brown a démontré que lorsque la concentration de saccharose S dépasse celle de l'enzyme, la vitesse de la réaction devient indépendante de la concentration de saccharose ou <u>ordre zéro</u> par rapport au saccharose.



Il a donc proposé que la réaction globale est composée de deux réactions élémentaires : le substrat forme d'abord un complexe avec l'enzyme, puis ce complexe se décompose en produit et enzyme. Soit

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} E\,S \xrightarrow{k_2} E + P$$

où E, S, ES, et P symbolisent l'enzyme, substrat, <u>le complexe enzyme-substrat</u> et le produit, respectivement

Selon ce modèle, *lorsque la concentration de substrat devient suffisamment importante afin de capter toute l'enzyme sous forme ES, <u>la deuxième étape de la réaction est limitante</u> et la réaction globale devient insensible aux augmentations supplémentaires en concentration de substrat*.

Les principes généraux des réactions chimiques s'appliquent aux réactions enzymatiques. Dans une réaction chimique, le taux de catalyse (v) est défini par le changement dans la concentration du produit final par unité de temps. Le taux de catalyse est proportionnel à la concentration du substrat.

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

Dans une réaction enzymatique, le taux de catalyse (v) est aussi la variation dans la concentration du produit final par unité de temps.

La vitesse globale de la réaction est définie de façon similaire par

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES]$$

La vitesse de production de ES est la différence entre les vitesses des réactions élémentaires décrivant la formation de ES et sa disparition

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] - k_{-1}[ES] - k_2 [ES]$$

Cette équation différentielle ne peut pas être intégrée de façon explicite pour tous les cas sans des approximations simplifiées:

1. Équilibre rapide

En 1913, Léonure Michaelis et Maud Menten ont fait l'approximation que $k_{-1} >> k_2$ pour que la première étape de la réaction soit toujours en équilibre rapide.

Donc, $K_S = k_{-1} / k_1 = [E][S] / [ES]$ qui est la constante de dissociation du substrat de l'enzyme.

Le complexe non-covalent ES entre enzyme et substrat est connu par le nom de complexe Michaelis.

2. État stationnaire

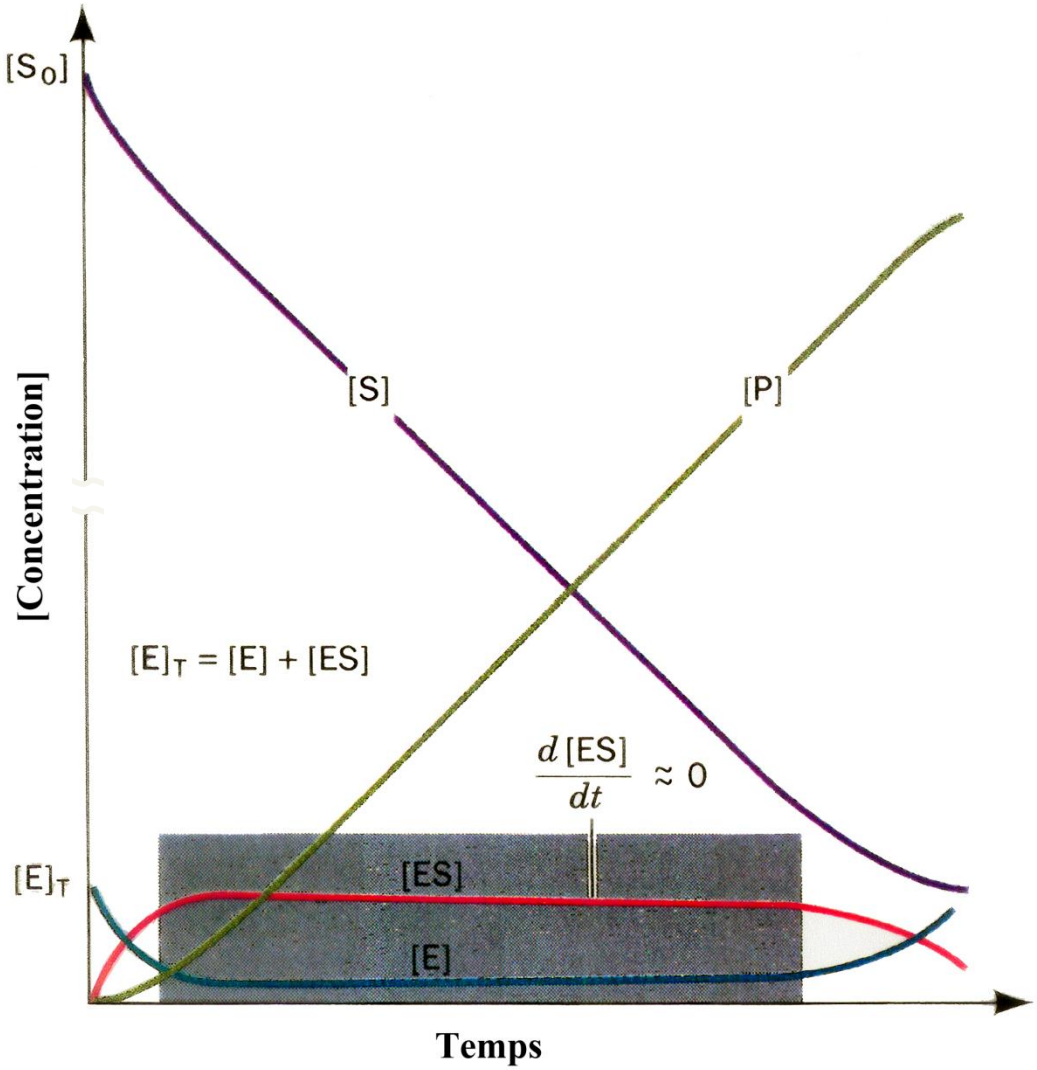
La concentration d'ES est relativement constante pendant la majorité de la réaction, si [S] >> [E]. (Voir courbes d'évolution des composés ci-bas et noter les régimes stationnaire et transitoire)

Ceci implique que la vitesse de formation de ES doit être égale à sa disparition. Par conséquent, d[ES]/dt = 0.

Désignation connue sous forme d'approximation de l'état stationnaire proposé d'abord par Briggs et Haldane en 1925.

L'approximation de l'état stationnaire en assumant que la réaction est à l'état stable, c'est-à-dire que [ES] est stable est moins restrictive que celle de Michaelis-Menten et sera utilisée dans le développement de la relation entre [S] et v.

Courbes d'évolution



Évolution des composés lors d'une réaction de Michaelis-Menten simple. À l'exception de la phase transitoire de la réaction, qui précède le rectangle ombré, les pentes des courbes d'évolution de [E] et [ES] sont pratiquement égales à 0 tant que [S] >> $[E]_T$ (à l'intérieur du rectangle ombré).

Les concentrations de [E] et [ES] ne sont pas de façon générale mesurable. Mais la concentration totale de l'enzyme $[E]_T$ = [E] + [ES] peut être facilement déterminée.

Vu que la vitesse v = k_2 [ES] comment peut-on définir [ES] ?

Selon la prémisse que [ES] est stable durant la réaction, la formation de [ES] est égale à sa décomposition. Donc,

$$k_1 [E][S] = k_2 [ES] + k_{-1} [ES]$$

et $$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_{-1} + k_2)/k_1} = \frac{[E][S]}{K_M}$$

où **K_M = $(k_{-1} + k_2)/k_1$ représente la constante de Michaelis-Menten**.

Comment peut-on définir les valeurs de [E] et [S] ?

Pour les conditions stationnaires, il faut que la concentration du substrat soit beaucoup plus grande que celle de l'enzyme. Donc la portion de substrat associée au complexe ES est négligeable. Par conséquent, [S] est très près de [S] totale.

Par contre, [E] = $[E]_T$ - [ES]

En remplaçant [E] dans l'équation précédente, nous obtenons une équation dans laquelle toutes les valeurs sont mesurables.

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

d'où: $$[ES] = \frac{[E]_T [S]}{K_M + [S]}$$

Nous pouvons remplacer la valeur de [ES] dans l'équation originale v = k_2 [ES] pour obtenir :

$$v = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M + [S]}$$

Le taux de catalyse <u>maximal</u> definit par V_{max} = k_2 $[E]_T$ ($M.s^{-1}$) car, le taux de catalyse maximal est obtenu lorsque tous les sites de liaison sont <u>saturés</u>, c'est-à-dire lorsque la concentration du substrat est plus grande que le K_M.

Dans ces conditions, le ratio [S]/([S] + K_M) tend vers 1.

Le ratio [S]/([S] + K_M) représente la fraction des enzymes occupés par un substrat puisque

$$f_{ES} = \frac{[ES]}{[E]_T} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad \text{et} \quad \frac{v}{k_2 [E]_T} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \rightarrow \frac{v}{V_{MAX}} = f_{ES}$$

Le taux de catalyse est donc : $$\boxed{v = \frac{V_{MAX}[S]}{K_M + [S]}}$$

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, f_{ES}.

Implicite dans le modèle michaelienne est que la formation du produit P à partir du complexe ES soit irréversible, qui n'est pas réaliste. Afin d'assurer que la vitesse de retour, E + P en ES, soit négligeable expérimentalement, elle doit être mesuré avant qu'il y ait une accumulation importante en concentration de P.

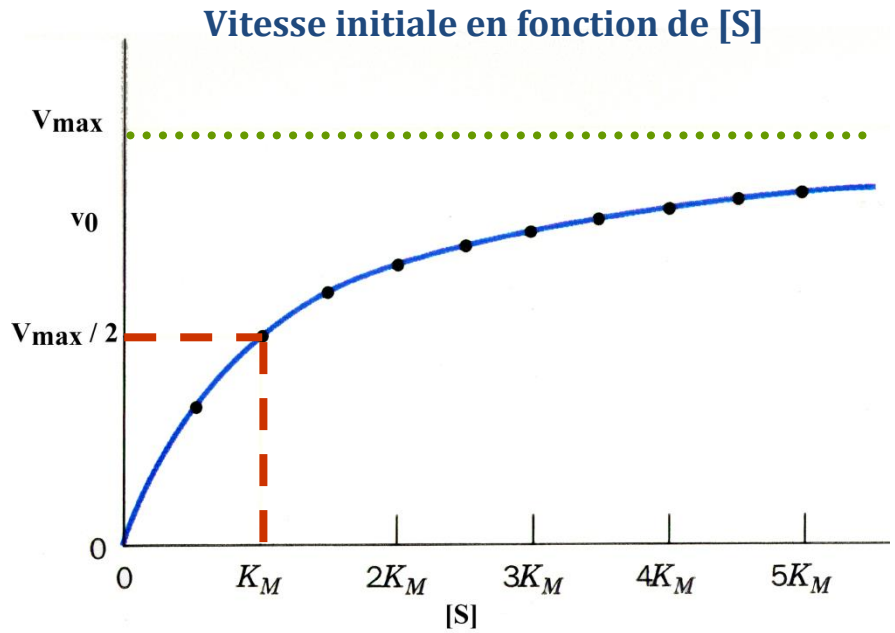
La vitesse <u>initiale</u> de la réaction **dans le régime d'état stationnaire** (pas transitoire) satisfait la condition d'irréversibilité et elle est définie par la mesure de v à t = 0.

Donc, $v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt}\right)_{t=0}$, représente la vitesse <u>initiale</u> et qui s'exprime en fonction des quantités expérimentalement mesurable $[E]_T$ et [S].

L'utilisation de la vitesse initiale, mesurée dans l'intervalle correspondant au moins que 10% consommation de substrat, minimise non seulement des facteurs potentiels de complications comme la réaction réversible, mais également l'inhibition de l'enzyme par produit et l'inactivation progressive de l'enzyme.

<u>Signification de la constante de Michaelis</u>

L'équation de Michaelis-Menten est l'équation de base des cinétiques enzymatiques est connue mathématiquement comme une courbe hyperbolique. Selon l'équation, lorsque [S] est égale à K_M, $v = V_{max}/2$. C'est donc dire que K_M est égal à la concentration du substrat à laquelle le taux de catalyse est la moitié du taux maximal. La valeur du K_M varie avec les enzymes, la nature du substrat, le tissu où l'enzyme a été isolé, le pH, la température, etc.



Variation de la vitesse initiale, v_0, en fonction de la concentration en substrat pour une réaction Michaelis-Menten simple. Les points sont disposés à des intervalles de $0.5K_M$ pour des concentrations en substrat comprises entre 0.5 - $5K_M$.

La constante de Michaelis peut être exprimée comme

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_S + \frac{k_2}{k_1}$$

Le K_M peut être égal à la constante de dissociation K_S, **si et seulement si** la dissociation du complexe ES en E et S est beaucoup plus rapide que la formation de E et P. Dans ces conditions, $k_{-1} >> k_2$ et $K_M \approx K_S$. Ceci permet de mesurer l'affinité de l'enzyme pour le substrat; un K_M élevé signifie une faible association alors qu'un K_M faible indique une forte association.

Les valeurs K_M sont souvent proches des concentrations physiologiques de leur substrat. Le taux de catalyse étant extrêmement sensible à la concentration du substrat près du K_M, une variation mineure dans la concentration du substrat peut changer toute une voie métabolique.

<u>Analyse des données cinétiques.</u>

À haute concentration de S, $v_0 \approx V_{MAX}$ mais même à [S] = $10K_M$, v_0 = $0.91V_{MAX}$. Donc aujourd'hui des analyses non linéaires sont utilisées pour obtenir des estimations expérimentales de V_{MAX} et K_M.

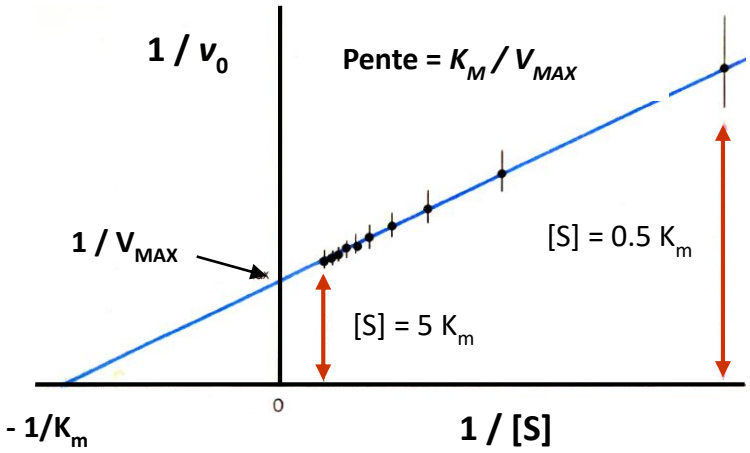
Traditionnellement les estimées des valeurs cinétiques, V_{max} et K_M ont été obtenues à partir d'une méthode proposée par Lineweaver et Burk et connue sous ce

nom. Une courbe de v en fonction de [S] permet de définir les valeurs de K_M et V_{max}, directement en utilisant l'équation réciproque et tracer une courbe 1/v en fonction de 1/[S]. Une ligne droite sera obtenue.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{MAX}} + \frac{K_M}{V_{MAX}[S]}$$

À partir de cette courbe, comme indiqué, nous pouvons directement calculer les valeurs de V_{max} sur l'axe et de K_M à partir de la pente de la courbe.

Représentation en doubles réciproques (Lineweaver-Burk)



Les points sont obtenus à partir des données de la figure précédente. Notez l'effet important de petites erreurs pour [S] faibles (1/[S] élevées) et le rapprochement des points pour [S] élevées. Barres d'erreurs de ± 0.05 V_{MAX}

<u>Mesure de la constante catalytique et de l'efficacité enzymatique.</u>

a) Les paramètres cinétiques d'un enzyme permettent de mesurer son <u>efficacité catalytique</u>. 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 saturé.

$$k_{cat} = \frac{V_{MAX}}{[E]_T}$$

La valeur de k_{cat} (s^{-1}) = k_2, dans les réactions possédant un mécanisme de type Michaelis-Menten. La valeur inverse $1/k_{cat}$ représente le temps requis pour convertir 1 molécule de substrat en produit.

b) L'efficacité enzymatique peut être calculée lorsque l'enzyme est non-saturé, [S] << 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, $[E] \approx [E]_T$, on a

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

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.

Est-ce qu'il y a une limite à l'efficacité catalytique ? De l'équation ci-haut on a :

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_2}{K_M} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$$

Cette quantité est maximale si $k_2 >> k_{-1}$, ça veut dire que la formation des produits obtenus à partir d'ES est très vite par rapport à la décomposition de ES en substrat et enzyme et on obtient $k_{cat} / K_M \approx k_1$.

Cette constante de deuxième ordre k_1 ne peut pas dépasser la fréquence avec laquelle le substrat combine avec l'enzyme.

La limite de la valeur k_1 est la vitesse de diffusion avec laquelle le substrat rencontre l'enzyme.

Certains enzymes ont atteint une efficacité catalytique tellement grande qu'elles ne sont que limitées par le coefficient de diffusion des molécules (10^8 à 10^9 $M^{-1}s^{-1}$). Le tableau sur la prochaine page montre les valeurs de K_M, k_{cat}, et k_{cat}/K_M pour plusieurs enzymes et substrats. À savoir, la catalase, l'acétylcholinestérase, la fumarase, et possiblement l'anhydrase carbonique remplissent cette condition et ont donc pratiquement atteint la perfection catalytique.

C'est donc dire que l'enzyme combine avec le substrat aussitôt qu'il le rencontre. Vu que le site actif de l'enzyme est une surface restreinte comment le substrat est-il guidé au site actif reste une question à laquelle la réponse n'est pas encore claire.

Enzyme	Substrat	K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	$9.5x10^{-5}$	$1.4x10^{4}$	$1.5x10^{8}$
Anhydrase carbonique	CO_2	$1.2x10^{-2}$	$1.0x10^{6}$	$8.3x10^{7}$
	HCO_3^-	$2.6x10^{-2}$	$4.0x10^{5}$	$1.5x10^{7}$
Catalase	H_2O_2	$2.5x10^{-2}$	$1.0x10^{7}$	$4.0x10^{8}$
Chymotrypsine	Ester éthylique de N-Acétylglycine	$4.4x10^{-1}$	$5.1x10^{-2}$	$1.2x10^{-1}$
	Ester éthylique de N-Acétylvaline	$8.8x10^{-2}$	$1.7x10^{-1}$	1.9
	Ester éthylique de N-Acétyltyrosine	$6.6x10^{-4}$	$1.9x10^{2}$	$2.9x10^{5}$
Fumarase	Fumarate	$5.0x10^{-6}$	$8.0x10^{2}$	$1.6x10^{8}$
	Malate	$2.5x10^{-5}$	$9.0x10^{2}$	$3.6x10^{7}$
Uréase	Urée	$2.5x10^{-2}$	$1.0x10^{4}$	$4.0x10^{5}$

À noter en cas des substrats pour chymotrypsine, l'enzyme démontre la meilleure efficacité envers le substrat de l'ester éthylique de N-acétyltyrosine.