

Chapitre 4 : Cinétique enzymatique et ordre des réactions chimiques

Définition de la cinétique enzymatique :

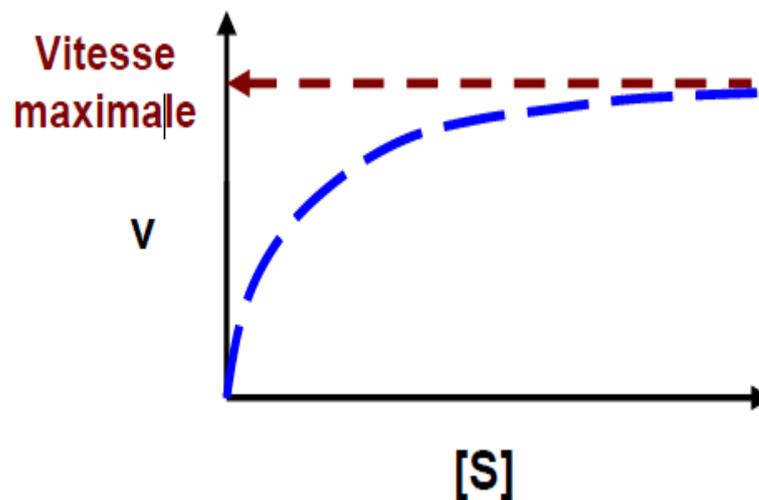
C'est l'étude **des vitesses de réactions** et de leurs **modifications**, en réponse aux changements **des conditions expérimentales**.

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



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 ordre zéro 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, où E, S, ES, et P symbolisent l'enzyme, substrat, le complexe enzyme-substrat et le produit, respectivement.

Les réactions chimiques peuvent être classées en fonction **du nombre de molécules** qui réagissent entre elles pour former les produits.

- Réaction monomoléculaires
- Réactions bimoléculaires.
- Réactions trimoléculaires.

1-Notion d'ordre des réactions :

La classification des réactions est basée sur des caractères cinétiques, d'après **l'ordre de la réaction**: réaction d'ordre 0, premier ordre, deuxième ordre et du troisième d'ordre, suivant **la nature de la relation** entre la vitesse de la réaction et la concentration d'un des réactifs dans des conditions données :

- Réaction du premier ordre.
- Réaction du deuxième ordre.
- Réaction du troisième ordre.

a-Réaction d'ordre 0 :

C'est une réaction au cours de laquelle la **quantité de substrat transformé par unité de temps** est **constamment indépendante de sa concentration**. C'est la même quantité de substrat qui disparaît quand on fait des prélèvements toutes les minutes.

$$v = k = \text{constante}$$

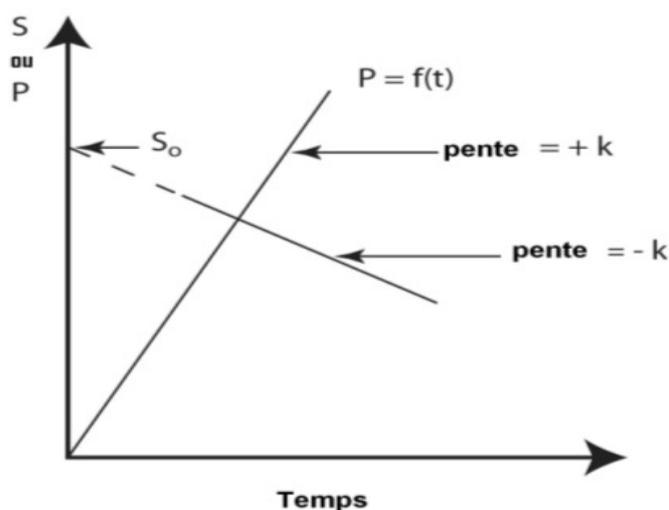


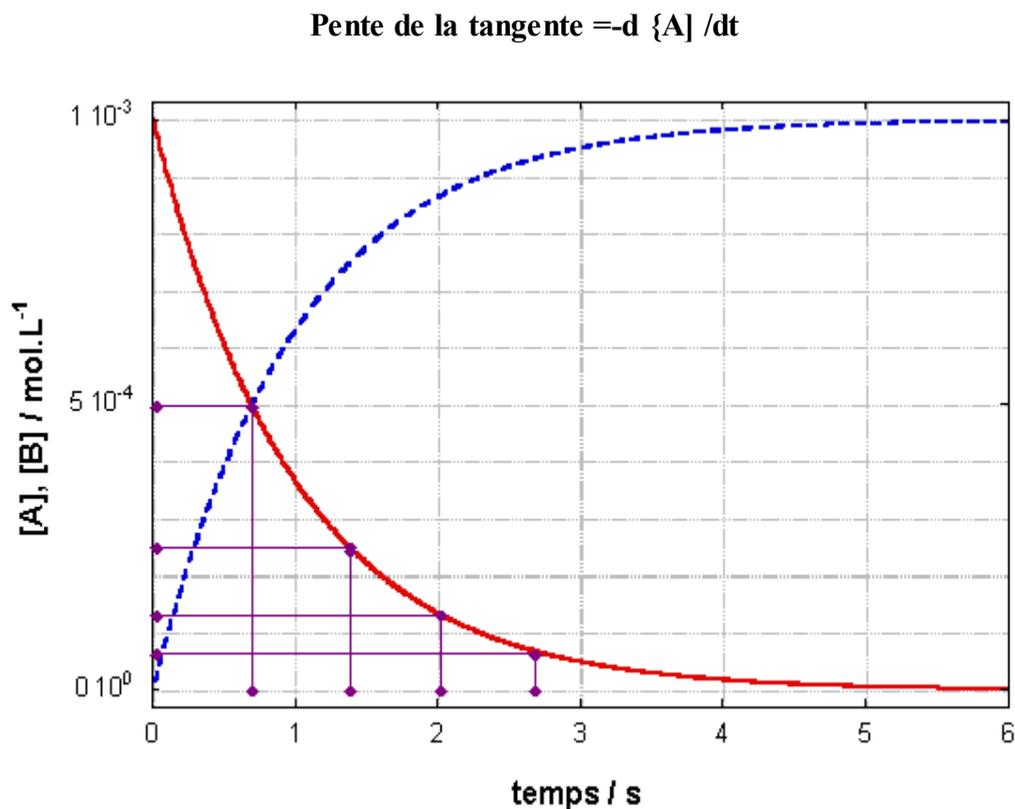
Figure 1. Variation des concentrations du substrat et du produit avec le temps pour une réaction cinétique d'ordre zéro.

b-Réaction du premier ordre :

La concentration de substrat disparu ou de produit formé par unité de temps est proportionnelle à la quantité de substrat présent lors de la mesure.

La vitesse de disparition du substrat décroît constamment.

$A \xrightarrow{k} B$, on a par définition $v = k[A] = -d[A]/dt = d[B]/dt$



La forme intégrée de cette équation est : $\log [A_0]/[A] = kt/2,303$

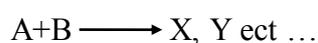
A_0 concentration au temps 0 et A concentration au temps t

$$t_{1/2} = \ln 2/k = 0,693/k$$

- $t_{1/2}$ est appelé le temps de la demi-réaction ou demi-vie.

c-Réaction du second ordre (ou d'ordre 2) :

La vitesse de réaction dépend de deux concentrations c.a.d $n=2$, la réaction est la suivante:



La vitesse est égale à : $V = -d[A]/dt = -d[B]/dt = k[A][B]$

L'intégration dans l'intervalle de temps t donne :

$$1/[A_0] - 1/[A] = \log [B_0][A]/[A_0][B] = kt/2,303$$

La pente de la droite est : $k ([A_0] - [B_0]) / 2,303$

Si $[A_0] = [B_0]$ la vitesse est $V = -d[A]/dt = k[A]^2$

d'où $d[A]/[A]^2 = kdt$ et en intégrant on obtient

$$1/[A] = kt + 1/[A_0]$$

Une représentation de $1/[A] = f(t)$ est une droite de pente k . Pour une réaction d'ordre deux, la constante de vitesse k a les dimensions de $(M^{-1} s^{-1})$.

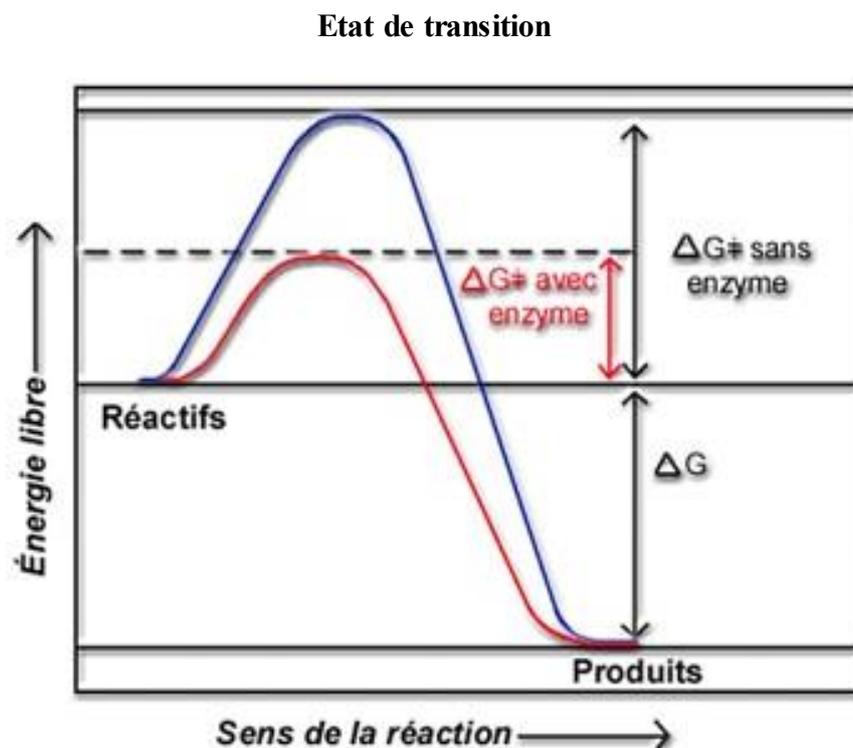
d- Réaction du troisième ordre :

Ces réactions sont **rare**s sont celles dont la vitesse est proportionnelle au produit de trois concentrations.

2-Energie libre d'activation

L'énergie d'activation ou l'énergie libre d'activation (ΔG^*) est l'énergie qui doit être absorbée par les réactifs pour que leurs liaisons soient brisées.

Les réactifs doivent atteindre un état de transition instable dans lequel les liaisons sont plus fragiles et plus faciles à briser.



3-Etat de transition = état activé

La réaction ne se fera que si les réactifs se heurtent avec suffisamment de force pour libérer de l'énergie capable de rompre les liaisons.

Pour que le métabolisme se fasse dans une cellule il faut toujours que l'état de transition soit atteint, autrement on ne pourrait jamais dégrader les macromolécules pour en retirer l'énergie dont on a besoin.

L'énergie d'activation est une barrière essentielle puisqu'elle prévient la dégradation spontanée des macromolécules cellulaires riches en énergie (telles que les graisses, les protéines et les polysaccharides).

Les enzymes permettent d'abaisser **l'énergie d'activation** et permettent ainsi que la réaction puisse se dérouler dans les conditions permettant la vie (dans la cellule ou à proximité).

4-Réactions enzymatiques :

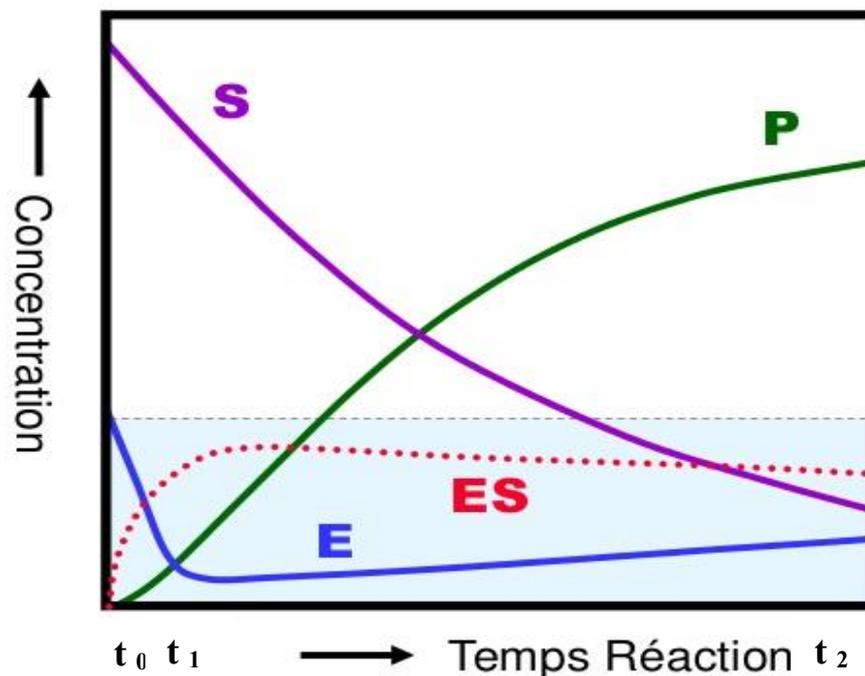
1. Les phases de la réaction enzymatique :

Solution avec excès de S



Cette étape initiale est appelée **phase pré-stationnaire** (milliseconde). A la fin de cette étape commence la **phase stationnaire** où l'enzyme est saturé par son substrat et la combinaison (enzyme substrat) est à une concentration maximale et constante et la vitesse de cette réaction est constante donc une cinétique d'ordre 0. Cette vitesse est dite initiale. Dès que la concentration du substrat diminue de manière significative, la vitesse décroît et on est dans la **phase post-stationnaire**.

Constante ES à l'état stable



Evolution d'une cinétique enzymatique.

$t_0 \longrightarrow t_1$: phase pré-stationnaire

$t_1 \longrightarrow t_2$: phase stationnaire

$t_2 \longrightarrow \infty$: phase post-stationnaire.

Différentes phases Caractéristiques	Pré-stationnaire	Stationnaire	Post -stationnaire
	Enzyme mise en présence d'excès de substrat. Combinaison ES très rapide.	Enzyme saturée par le substrat. Combinaison ES est à concentration maximale constante. Vitesse de la réaction est constante: Vitesse initiale (Reste constante tant que le substrat est à concentration saturante de l'enzyme)	Diminution de S de manière significative au bout d'un temps plus au moins long selon l'enzyme.

La vitesse d'une réaction enzymatique s'exprime par la quantité de substrat (dx) métabolisé pendant l'unité de temps (dt): $V = dx/dt$

Cette vitesse dépend :

- De la concentration de l'enzyme [E]
- De la concentration du substrat [S]
- De l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

2. Influence de la concentration du substrat :

Si [S] augmente et que [E] est constante on constate que la V augmente progressivement pour atteindre une valeur maximale et constante : V_{max}

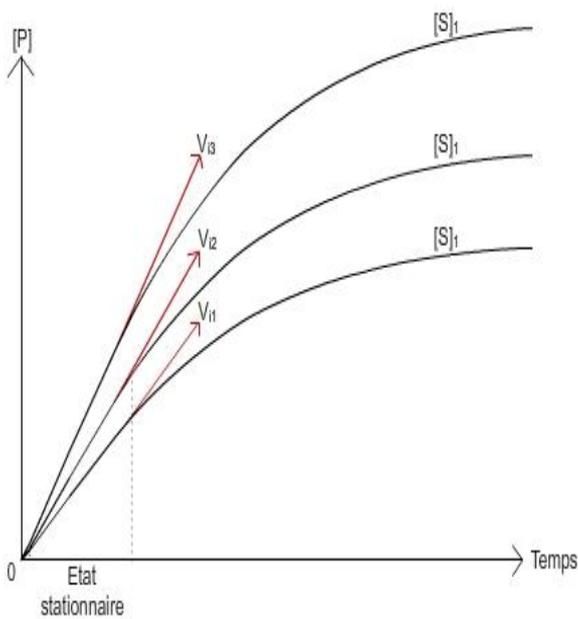


Figure 1 : Graphique primaire représentant la concentration en produit apparu au cours d'une réaction chimique catalysée par une enzyme michaélienne en fonction du temps

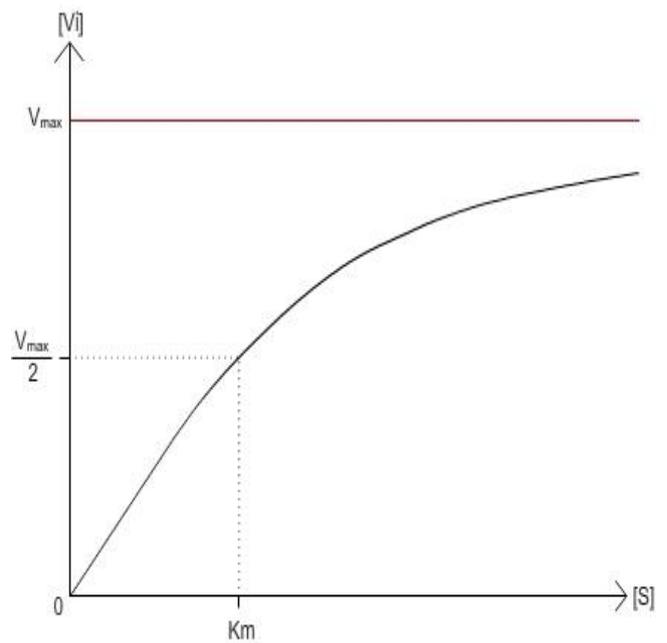
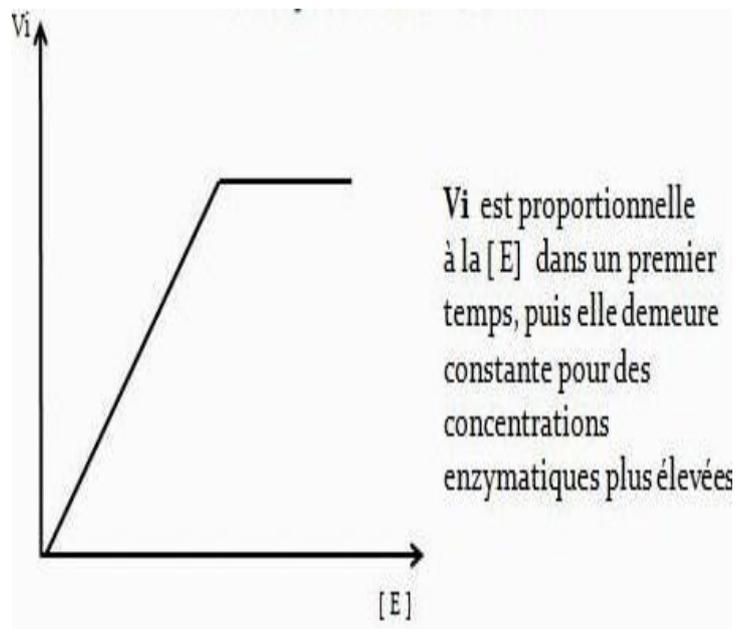
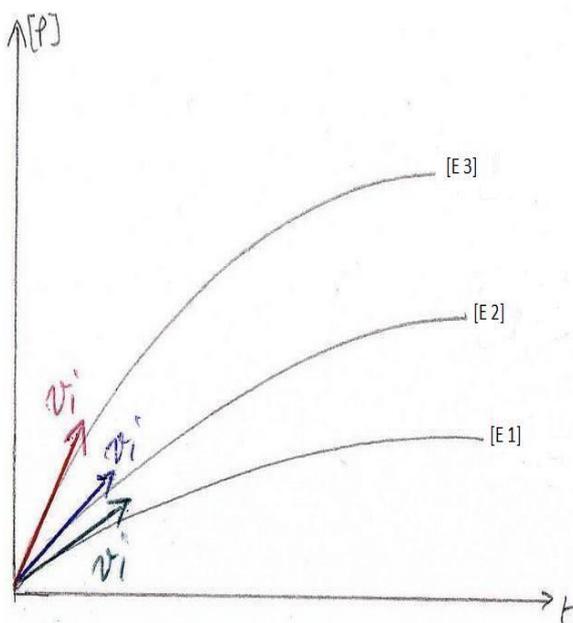


Figure 2 : Représentation graphique des Vi en fonction de la concentration en substrat

3. Influence de la concentration de l'enzyme :

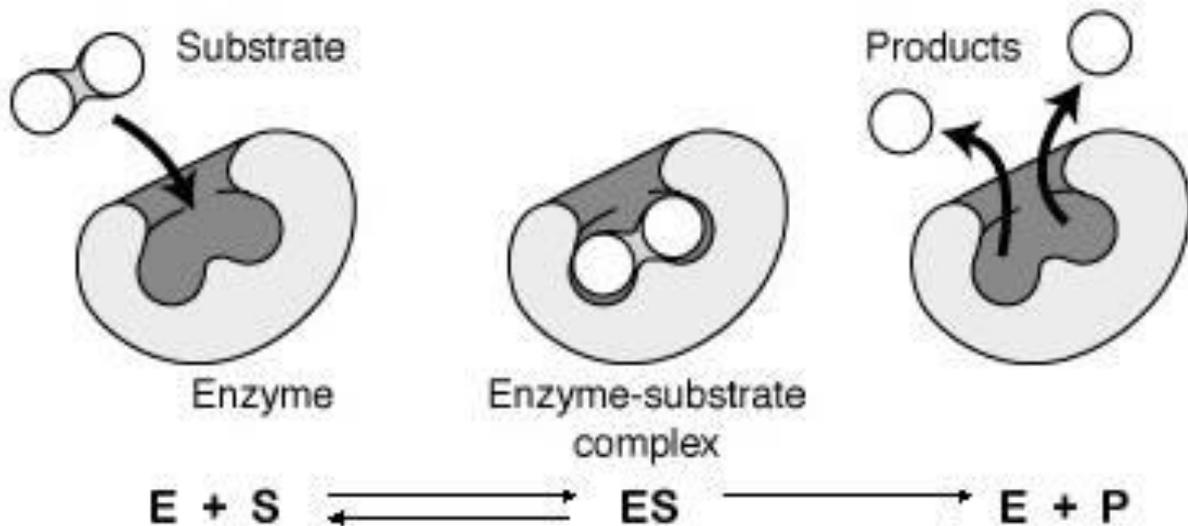
La vitesse initiale est d'abord **proportionnelle à la concentration de l'enzyme** puis elle demeure **constante** pour les concentrations enzymatiques **plus élevées**.



Influence de la concentration croissante de l'enzyme pour une même concentration de substrat.

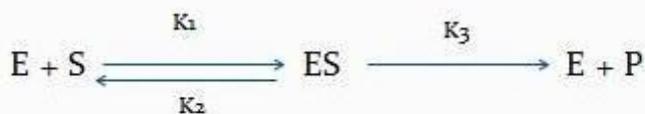
4. Hypothèse MICHAELIS –MENTEN :

Victor Henri en 1905 puis Michaelis et Menten en 1913 ont établi l'équation d'une réaction enzymatique:



Cette réaction se décompose en 2 étapes:

- formation d'une combinaison Enzyme-Substrat
- Dissociation de la combinaison



- Formation du complexe ES: $E + S \xrightleftharpoons[v_2]{v_1} ES$
(Etape rapide et réversible)

- Dissociation du complexe ES: $ES \xrightarrow{v_3} E + P$
 - Disparition de S
 - Apparition de P
 - Régénération de E

5. Constante de Michaelis :

Vitesse de disparition du substrat est : $V = - ds/dt$

D'après la loi d'action de masse:

$$V_1 = k_1 [E] [S]$$

$$V_2 = k_2 [ES]$$

Vitesse d'apparition des produits: $dP/dt = V_3 = k_3 \cdot [ES]$

La vitesse de disparition des substrats est égale à la vitesse d'apparition du produit :

$$dS/dt = dP/dt$$

La vitesse de disparition des substrats : $- dS/dt = V_1 - V_2$

$$V_1 - V_2 = V_3$$

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

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

K_m: Constante de dissociation du complexe ES, c'est la **Constante de Michaelis**.

Valeur de **K_m** est d'autant **plus élevée** que la:

- dissociation du complexe **ES est forte**
- Et donc que **l'affinité de l'enzyme pour son substrat est faible**.

6. Equation de Michaelis :

$[E_T]$ =enzyme total la concentration de l'enzyme libre sera :

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

$$K_m = [E] \cdot [S] / [ES] = ([E_T] - [ES]) \cdot [S] / [ES]$$

$$K_m = [E_T] [S] / [ES] - [ES] [S] / [ES]$$

$$(ES \neq 0)$$

$$K_m + [S] = [E_T] [S] / [ES]$$

$$[ES] = E_T [S] / K_m + [S]$$

$$(ES \neq 0)$$

La vitesse de la réaction enzymatique est égale à V_3 : $V = V_3 = k_3 [ES] = k_3 [E_T] [S] / K_m + [S]$

V = La vitesse de la réaction enzymatique = V_3

$$V = V_3 = k_3 [ES]$$

$$V = \frac{k_3 \cdot [E_T] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

La vitesse de la réaction dépend:

- ✓ De la concentration de l'enzyme [E]
- ✓ De la concentration du substrat [S]
- ✓ De la concentration de Michaelis (K_m).

La vitesse sera **maximale** lorsque [ES] sera **grand** c.a.d lorsque **la totalité de l'enzyme** sera **combiné au substrat**:

$$[ES] = [E_T] \quad \text{donc} \quad V_M = k_3 [E_T]$$

L'équation qui exprime la vitesse de la réaction à chaque instant est :

$$V = V_M \cdot [S] / K_m + [S] \quad \text{équation de Michaelis}$$

$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

7. Méthodes de détermination de la constante de Michaelis :

a- Méthode arithmétique:

$$V = V_{max}/2 \quad K_m = [S]$$

Si dans l'équation on pose $V = V_m/2$

$$\text{on a } V_m/2 = V_M \cdot [S] / K_m + [S]$$

$$2[S] = K_m + [S]$$

$K_m = [S]$ la constante de Michaelis est égale à la concentration du substrat lorsque la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale

Signification de la constante de Michaelis

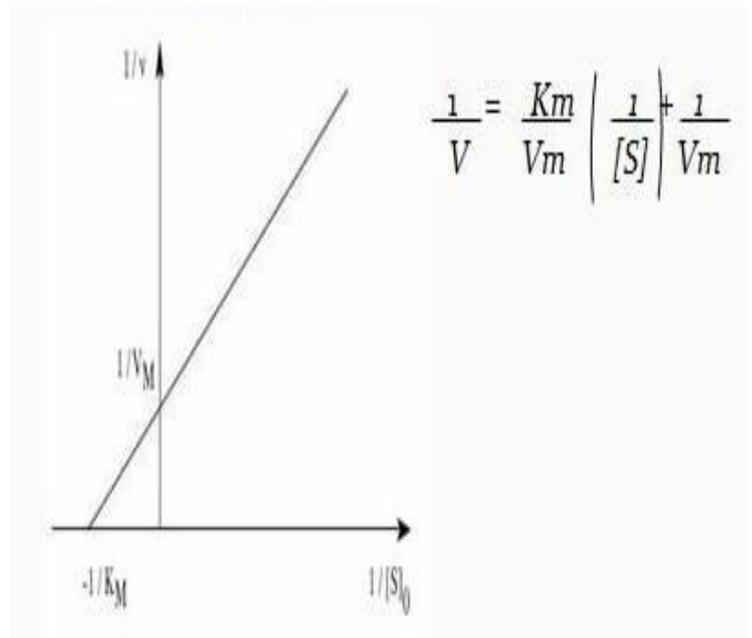
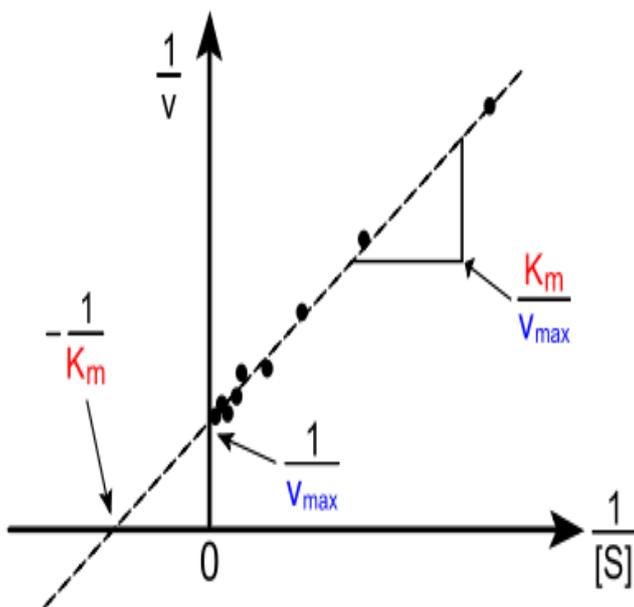
- $K_m = k_2 + k_3/k_1$ k_m est une concentration.
- mole/litre ou molécule gramme /litre.

b-1. Méthode graphique de Line Weaver et Burk:

L'équation de Michaelis peut s'écrire sous la forme:

$1/V = K_m/V (1/[S]) + 1/V_m$ c'est l'équation de Line weaver et Burk sous la forme d'une équation d'une droite $y=a+b$.

Ou $1/V = f(1/[S])$ sa pente $a = K/V_m$ son ordonné e t $b = 1/V_m$



$$1/V = K_m/V_m (1/[S]) + 1/V_m \quad \text{pour } 1/V = 0$$

$$K_m/V_m (1/[S]) = - 1/V_m \quad V_m \neq 0$$

$$\text{D'où } 1/[S] = - 1/K_m$$

$$\text{Pour } 1/V = 2/V_m$$

$$2/V_m = K_m/V_m (1/[S]) + 1/V_m$$

$$1 = K_m (1/[S]) \quad V_m \neq 0$$

$$1/[S] = 1/K_m$$

b-2. Méthode graphique d'Eadie Hofstee:

