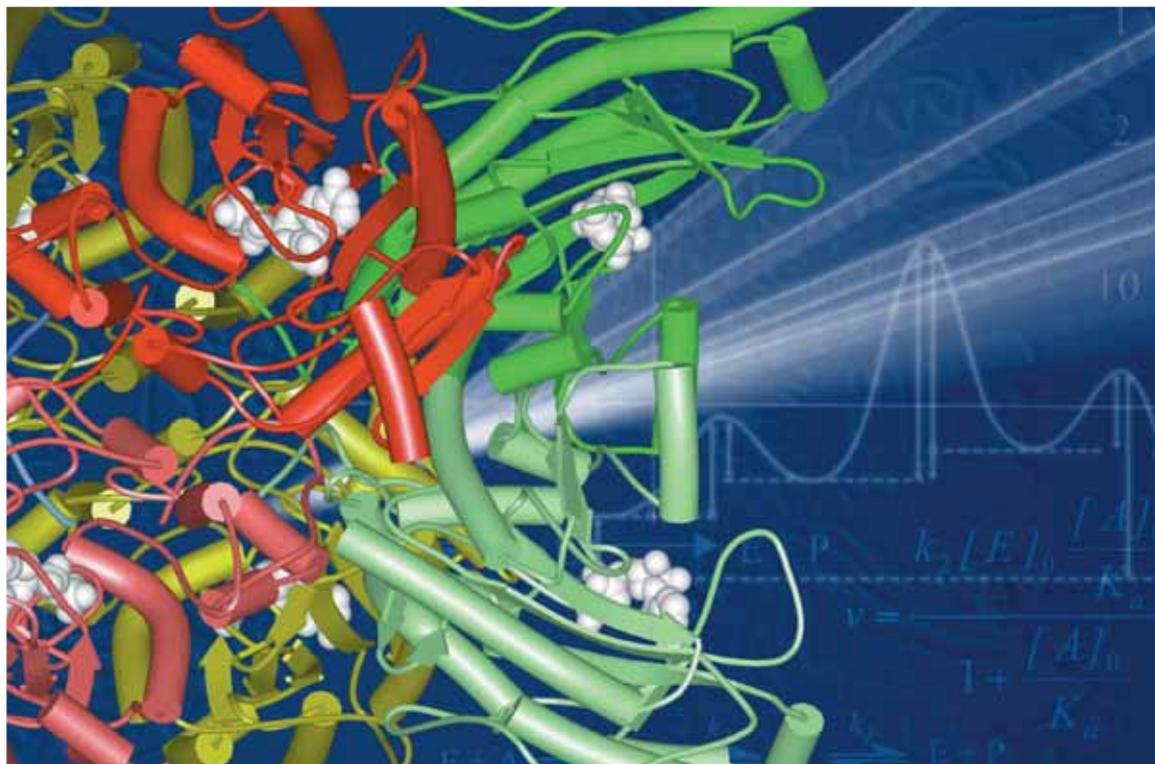




CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

■ Athel CORNISH-BOWDEN
Marc JAMIN
Valdur SAKS



CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

Grenoble Sciences

Grenoble Sciences poursuit un triple objectif :

- réaliser des ouvrages correspondant à un projet clairement défini, sans contrainte de mode ou de programme,
- garantir les qualités scientifique et pédagogique des ouvrages retenus,
- proposer des ouvrages à un prix accessible au public le plus large possible.

Chaque projet est sélectionné au niveau de Grenoble Sciences avec le concours de referees anonymes. Puis les auteurs travaillent pendant une année (en moyenne) avec les membres d'un comité de lecture interactif, dont les noms apparaissent au début de l'ouvrage. Celui-ci est ensuite publié chez l'éditeur le plus adapté.

(Contact : Tél. : (33)4 76 51 46 95 - E-mail : Grenoble.Sciences@ujf-grenoble.fr)

Deux collections existent chez EDP Sciences :

- la **Collection Grenoble Sciences**, connue pour son originalité de projets et sa qualité
- **Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques**, collection présentant des thèmes de recherche d'actualité, traités par des scientifiques de premier plan issus de disciplines différentes.

Directeur scientifique de Grenoble Sciences

Jean BORNAREL, Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1

Comité de lecture pour *Cinétique enzymatique*

- ▶ Serge CHESNE, Maître de Conférences à l'Université de La Réunion
- ▶ Jean-Marie FRÈRE, Professeur à l'Université de Liège
- ▶ Michel VAN DER REST, Professeur à l'École Nationale Supérieure de Lyon,
Directeur-adjoint de la Recherche

et

- ▶ Julien BRÉVIER

Grenoble Sciences reçoit le soutien du **Ministère de l'Éducation nationale**,
du **Ministère de la Recherche**, et de la **Région Rhône-Alpes**.

Réalisation et mise en pages : **Centre technique Grenoble Sciences**

Illustration de couverture : **Alice GIRAUD**

à partir d'une image originale représentant la structure de la créatine kinase fournie par le Professeur Theo WALLIMANN et le Docteur Uwe SCHLATTNER de ETH de Zurich (Suisse)

ISBN 2-86883-742-5

© EDP Sciences, 2005

©Portland Press, Ltd. London, 2004

This translation of portions of **FUNDAMENTALS OF ENZYME KINETICS** first published in (1995, 2004) is published by arrangement with Portland Press, London

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

Athel CORNISH-BOWDEN

Marc JAMIN

Valdur SAKS

Ouvrages Grenoble Sciences édités par EDP Sciences

Collection Grenoble Sciences

Chimie. Le minimum à savoir (*J. Le Coarer*) - Electrochimie des solides (*C. Déportes et al.*) - Thermodynamique chimique (*M. Oturan & M. Robert*) - Chimie organométallique (*D. Astruc*) - De l'atome à la réaction chimique (*sous la direction de R. Barlet*)

Introduction à la mécanique statistique (*E. Belorizky & W. Gorecki*) - Mécanique statistique. Exercices et problèmes corrigés (*E. Belorizky & W. Gorecki*) - La cavitation. Mécanismes physiques et aspects industriels (*J.P. Franc et al.*) - La turbulence (*M. Lesieur*) - Magnétisme : I Fondements, II Matériaux et applications (*sous la direction d'E. du Trémolet de Lacheisserie*) - Du Soleil à la Terre. Aéronomie et météorologie de l'espace (*J. Liliensten & P.L. Blelly*) - Sous les feux du Soleil. Vers une météorologie de l'espace (*J. Liliensten & J. Bornarel*) - Mécanique. De la formulation lagrangienne au chaos hamiltonien (*C. Gignoux & B. Silvestre-Brac*) - Problèmes corrigés de mécanique et résumés de cours. De Lagrange à Hamilton (*C. Gignoux & B. Silvestre-Brac*) - La mécanique quantique. Problèmes résolus, T. 1 et 2 (*V.M. Galitsky, B.M. Karnakov & V.I. Kogan*) - Analyse statistique des données expérimentales (*K. Protassov*) - Description de la symétrie. Des groupes de symétrie aux structures fractales (*J. Sivardière*) - Symétrie et propriétés physiques. Du principe de Curie aux brisures de symétrie (*J. Sivardière*)

Exercices corrigés d'analyse, T. 1 et 2 (*D. Alibert*) - Introduction aux variétés différentielles (*J. Lafontaine*) - Analyse numérique et équations différentielles (*J.P. Demailly*) - Mathématiques pour les sciences de la vie, de la nature et de la santé (*F. & J.P. Bertrandias*) - Approximation hilbertienne. Splines, ondelettes, fractales (*M. Attéia & J. Gaches*) - Mathématiques pour l'étudiant scientifique, T. 1 et 2 (*Ph.J. Haug*)

Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques (*J. Pelmont*) - Enzymes. Catalyseurs du monde vivant (*J. Pelmont*) - La plongée sous-marine à l'air. L'adaptation de l'organisme et ses limites (*Ph. Foster*) - Endocrinologie et communications cellulaires (*S. Idelman & J. Verdetti*) - Eléments de biologie à l'usage d'autres disciplines (*P. Tracqui & J. Demongeot*) Bioénergétique (*B. Guérin*)

L'Asie, source de sciences et de techniques (*M. Soutif*) - La biologie, des origines à nos jours (*P. Vignais*) - Naissance de la physique. De la Sicile à la Chine (*M. Soutif*) - Le régime oméga 3. Le programme alimentaire pour sauver notre santé (*A. Simopoulos, J. Robinson, M. de Lorgeril & P. Salen*) - Gestes et mouvements justes. Guide de l'ergomotricité pour tous (*M. Gendrier*)

Listening Comprehension for Scientific English (*J. Upjohn*) - Speaking Skills in Scientific English (*J. Upjohn, M.H. Fries & D. Amadis*) - Minimum Competence in Scientific English (*S. Blattes, V. Jans & J. Upjohn*)

Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques

Radiopharmaceutiques. Chimie des radiotraceurs et applications biologiques (*sous la direction de M. Comet & M. Vidal*) - Turbulence et déterminisme (*sous la direction de M. Lesieur*) Méthodes et techniques de la chimie organique (*sous la direction de D. Astruc*) - L'énergie de demain. Techniques, environnement et économie (*sous la direction de H. Nifenecker*)

PRÉFACE

Dans le contexte post-génomique actuel, la recherche en biologie doit faire face à de nouveaux défis et étendre ses domaines d'investigation vers des niveaux de complexité croissante. Il s'agit notamment de déterminer la structure et la fonction de toutes les protéines encodées dans les génomes étudiés, de comprendre les processus de contrôle de l'expression différentielle de ces protéines dans les différents types de cellules d'un organisme vivant, de mettre en évidence les interactions protéine/protéine en relation avec leur implication dans les phénomènes biologiques (protéomique) ou encore de décrire de manière quantitative le fonctionnement moléculaire d'un organisme dans ses états normaux et physiopathologiques. Ce dernier domaine d'étude constitue, dans la mouvance scientifique actuelle, l'étude du physiome ou physiologie génomique. Cette physiologie génomique a pour objectif de décrire le fonctionnement des organismes vivants en allant du génome vers le protéome et le métabolome jusqu'à la caractérisation du fonctionnement intégré des cellules, des tissus et des organes. Cette étude de systèmes métaboliques complexes repose sur le développement de modèles compréhensibles des systèmes biologiques par des méthodes de modélisation mathématique, un domaine aujourd'hui en plein essor, et sur l'utilisation de la cinétique enzymatique pour obtenir les données quantitatives nécessaires pour cette analyse. La cinétique enzymatique a pour objectif d'identifier et de décrire les mécanismes de réaction en étudiant leur vitesse et les flux métaboliques. En partant des enzymes isolés et en allant vers des systèmes métaboliques organisés et intégrés, les méthodes de cinétique enzymatique permettent de décrire de manière quantitative les propriétés catalytiques des enzymes et les mécanismes de leur régulation.

Historiquement, les lois gouvernant la vitesse des processus chimiques ont été découvertes empiriquement dans le courant du XIX^e siècle et les explications théoriques rendant compte des observations phénoménologiques sont apparues au début du XX^e siècle, sur la base des découvertes de la physique moléculaire, de la thermodynamique chimique et statistique et de la mécanique quantique. La cinétique enzymatique utilise les théories et les découvertes de la cinétique chimique pour la description et l'étude des mécanismes des réactions catalysées par des enzymes, les catalyseurs biologiques, qui sont essentiellement des protéines comportant des sites actifs catalytiques. Dans les études biochimiques fondamentales, les méthodes cinétiques sont combinées avec des études structurales et des méthodes de biologie moléculaire, telle la mutagenèse dirigée, afin d'aboutir à une description du

mécanisme réactionnel au niveau atomique. Ainsi, la cinétique enzymatique est un outil important et nécessaire dans de nombreuses études biochimiques mais sa nature quantitative et sa capacité à prévoir l'évolution d'un processus biochimique au cours du temps, en font également un élément de base de la biotechnologie.

La cinétique enzymatique constitue donc une part importante de la culture et de la connaissance biochimique que les étudiants en biologie, quelle que soit leur spécialisation, devraient acquérir au cours de leur cursus. Il existe plusieurs ouvrages classiques de cinétique enzymatique en anglais (SEGEL, CORNISH-BOWDEN, GUTFREUND) qui constituent une source de formation et d'information suffisamment détaillée et complète de ce type d'approche. Toutefois, la situation en langue française est différente. L'excellent ouvrage de J. PELMONT intitulé *Enzymes* donne une bonne description de l'enzymologie, mais principalement de ses aspects qualitatifs. Le but de notre ouvrage est de fournir un manuel de référence pour la cinétique enzymatique, complémentaire de celui de PELMONT. Dans ce but, nous avons traduit et adapté le livre d'Athel CORNISH-BOWDEN intitulé *Fundamentals of Enzyme Kinetics* en utilisant le matériel du cours d'enzymologie donné à l'Université Joseph Fourier de Grenoble par Valdur SAKS et Marc JAMIN. Ce livre commence par une description des principes simples de la cinétique chimique et de la thermodynamique et comprend une description détaillée de la cinétique dans des conditions d'état stationnaire pour les enzymes à un ou à plusieurs substrats, des phénomènes d'inhibition et d'activation, de la régulation allostérique et de la coopérativité dans les réactions enzymatiques. Il aborde les systèmes multienzymatiques et l'analyse du contrôle métabolique en présentant une analyse soignée des applications pratiques de ces méthodes. Nous espérons que ce nouvel ouvrage comblera le vide existant dans la littérature en langue française et sera utile aussi bien pour les étudiants de licence et de master que pour les chercheurs dans tous les domaines de la biologie.

Les auteurs remercient tout particulièrement Léonard CHAVAS qui, au cours de sa maîtrise de biochimie à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, a contribué de manière importante à la traduction et à l'adaptation des premiers chapitres de ce livre, ainsi que Madame Simone JERÔME et Monsieur Philippe MOTTET de la Bibliothèque des Sciences de l'Université Liège pour leur aide dans la consultation de documents concernant Victor HENRI.

Athel CORNISH-BOWDEN
Marc JAMIN
Valdur SAKS

1 – PRINCIPES DE BASE DE LA CINÉTIQUE CHIMIQUE

1.1. INTRODUCTION

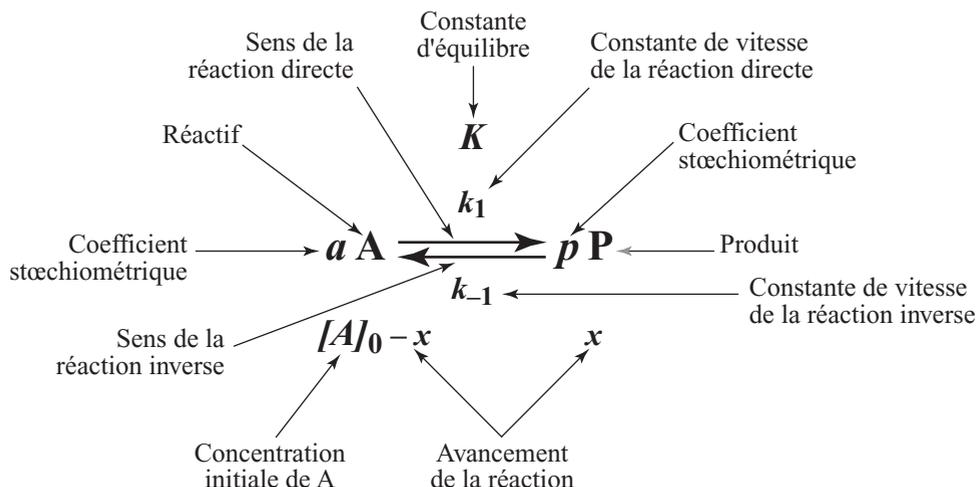
Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle central dans le monde vivant. Les réactions essentielles pour le fonctionnement d'un être vivant sont trop lentes et sans la présence de ces catalyseurs, la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui ne serait pas possible. Qu'il s'agisse de réactions simples comme la formation de bicarbonate à partir d'eau et de dioxyde de carbone ou de réactions complexes comme la réplication de l'ADN, chaque réaction chimique se déroulant au sein d'un être vivant est catalysée par un ou plusieurs enzymes spécifiques. Les enzymes sont des macromolécules, des protéines ou des ARN (les ARN catalytiques sont plus correctement dénommés ribozymes), qui reconnaissent spécifiquement certaines molécules et accélèrent les réactions de transformation de ces molécules suffisamment pour que leur vitesse devienne compatible avec le fonctionnement de l'organisme. Un second rôle essentiel joué par les enzymes est d'assurer le couplage physique entre réactions endergoniques et réactions exergoniques et de permettre ainsi de maintenir les systèmes biologiques dans des états hors d'équilibre, également indispensables pour le maintien de la vie.

La compréhension du mécanisme moléculaire des processus biologiques reste un des objectifs majeurs de la biologie moderne. En particulier, l'étude des réactions enzymatiques vise à comprendre les mécanismes réactionnels mais aussi à établir de manière quantitative comment un enzyme est capable d'accélérer spécifiquement une réaction chimique. Puisque les enzymes agissent en modifiant la vitesse des réactions, il est nécessaire d'étudier la cinétique des réactions pour comprendre leur mode d'action. Dans ce premier chapitre, nous allons commencer par rappeler les conventions et les concepts de base de la cinétique chimique, qui seront utiles pour la compréhension de la cinétique enzymatique : la vitesse de réaction, les notions de réaction élémentaire, d'ordre et de molécularité d'une réaction.

Les conventions d'écriture des réactions chimiques

Une réaction chimique est un processus au cours duquel une ou plusieurs substances chimiques (molécules) se transforment en une ou plusieurs autres substances chimiques, par un réarrangement des électrons et des liaisons entre les atomes

constitutifs. Ce processus implique généralement la rupture ou la formation de nouvelles liaisons chimiques. Une réaction chimique peut être représentée par une équation telle que celle de la figure 1.1 en respectant les conventions établies. Les substrats (réactifs) sont les substances qui disparaissent au cours de la réaction et sont représentées dans la partie gauche de l'équation. Les produits sont les substances qui apparaissent au cours de la réaction et sont représentées dans la partie droite de l'équation.



1.1 - Représentation schématique d'une réaction chimique et conventions d'écriture

Dans ce livre nous suivons autant que possible les recommandations du Nomenclature Committee de l'IUBMB (IUB, 1982). Néanmoins, comme ces recommandations permettent une certaine latitude et qu'elles ne couvrent pas toujours tous les cas dont nous aurons à traiter, il est utile de commencer par noter quelques points qui s'appliquent de manière générale à ce manuel. Premièrement, il est essentiel de reconnaître qu'une substance chimique et sa concentration sont deux entités différentes qui doivent être représentées par des symboles différents. Les recommandations permettent sans définition préalable, de représenter la concentration d'une substance par le symbole de la substance entouré de crochets, ainsi *[glucose]* représente la concentration de glucose, $[A]$ représente la concentration de la substance A... Dans ce livre, nous avons choisi d'utiliser cette convention qui peut, dans le cas d'équations complexes, compliquer la notation en raison de la multiplication des crochets et des parenthèses mais qui a l'avantage d'être utilisée couramment par les étudiants. Puisque l'un des objectifs de ce manuel est de fournir aux étudiants une première approche vers l'étude des systèmes enzymatiques, nous avons choisi d'utiliser cette notation courante. En cela, ce manuel diverge de la version originale en anglais qui utilise une notation simplifiée. Néanmoins, afin d'éviter toute confusion entre le texte et les symboles utilisés pour les grandeurs expérimentales, ces dernières seront écrites en italique.

Pour représenter les réactifs, nous utiliserons les recommandations de l'IUBMB et désignerons les substrats par les lettres A, B, C... et les produits par les lettres P, Q, R... Les coefficients stœchiométriques apparaissent comme des nombres qui précèdent les réactifs et les produits respectifs. La réaction est symbolisée par une flèche qui peut être simple (\longrightarrow) ou double (\rightleftharpoons) selon que la réaction est ou non réversible. Dans le cas d'une réaction réversible, le sens direct de la réaction est défini comme celui de la conversion des substrats en produits (il est représenté par la flèche dirigée vers la droite) alors que le sens inverse est défini comme celui de la conversion des produits en réactifs (il est représenté par la flèche dirigée vers la gauche). Dans le cas d'une réaction réversible, la définition du sens de la réaction est arbitraire, puisque la réaction peut également être décrite par l'équilibre inverse. Néanmoins, le sens de la réaction est important pour la définition des grandeurs thermodynamiques et doit être défini précisément lors de l'analyse du système.

Les constantes de vitesse et d'équilibre apparaissent en vis-à-vis des flèches correspondantes. Pour distinguer ces deux types de constantes, il est recommandé de suivre les conventions et de représenter les constantes d'équilibre par des lettres majuscules et les constantes de vitesse par des lettres minuscules. De plus, comme nous allons le voir, les réactions enzymatiques consistent presque toujours en deux ou plusieurs étapes, et puisque nous aurons besoin de symboles pour faire référence à ces différentes étapes, il est nécessaire de disposer d'un système adéquat d'indexation afin de préciser quel symbole fait référence à une étape donnée. Les recommandations de l'IUBMB n'imposent aucun système en particulier, mais au contraire impose de décrire le système utilisé. Parce que le même symbole, par exemple k_2 , peut être utilisé de diverses manières dans la littérature biochimique, il est prudent de toujours définir clairement ce qu'il signifie. Le système utilisé dans ce manuel est le suivant : pour une réaction comportant n étapes, celles-ci sont numérotées 1, 2 ... n ; un k minuscule et italique avec un indice positif désigne la constante de vitesse de la réaction directe dont le numéro correspond à l'indice, c'est-à-dire que, dans ce cas, k_2 est la constante de vitesse pour la réaction directe de la seconde étape de la réaction ; le même symbole mais avec un indice négatif est utilisé pour représenter la constante de vitesse de la réaction inverse, par exemple k_{-2} pour la seconde étape ; un K majuscule et italique avec un indice est utilisé pour représenter la constante d'équilibre (thermodynamique) de l'étape, désignée par l'indice et typiquement équivalente au rapport des constantes de vitesse, c'est-à-dire que $K_2 = k_2/k_{-2}$.

Lorsqu'elles sont nécessaires, des indications sur les concentrations des réactifs et des produits, ainsi que sur la relation entre celles-ci et l'avancement de la réaction, peuvent être indiquées par des symboles ou des valeurs placées en dessous des réactifs et des produits correspondants. Les catalyseurs sont régénérés à la fin de la réaction ; ils peuvent être incorporés dans l'équation à la fois dans les réactifs et dans les produits ou apparaître sous la forme d'une indication placée en vis-à-vis des flèches.

1.2. LES PRINCIPES DE BASE DE LA CINÉTIQUE CHIMIQUE

1.2.1. Vitesse de réaction et équation de vitesse

La vitesse d'une réaction chimique est une mesure de la rapidité avec laquelle la concentration des réactifs et des produits change au cours du temps. La vitesse de la réaction peut être définie à partir de la disparition des réactifs ou à partir de l'apparition du produit. Si la concentration d'un réactif, représentée par $[A]$, varie d'une quantité $\Delta[A]$ pendant l'intervalle de temps Δt , la vitesse est donnée par $v = -\Delta[A]/\Delta t$. En d'autres termes, la vitesse est la variation par unité de temps de la concentration de l'une des substances initiales ou finales.

Si la variation est considérée sur un temps infiniment court, nous obtenons la vitesse instantanée de la réaction :

$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = \frac{1}{p} \frac{d[P]}{dt} \quad [1.1]$$

où a et p représentent les coefficients stœchiométriques de la réaction limitant la vitesse. Les deux variations de la concentration définissent la vitesse de la réaction v , qui peut indifféremment être définie en termes d'apparition des produits ou de disparition des réactifs puisque chaque molécule de A consommée est convertie en une molécule P. Si la réaction implique plusieurs substrats ou plusieurs produits, la vitesse de la réaction peut être définie vis-à-vis de chacun de ceux-ci.

L'objectif d'une étude cinétique est de mesurer la vitesse de la réaction considérée, et, pour cela, il est nécessaire de disposer d'une méthode qui permette de suivre l'évolution de la concentration au cours du temps d'au moins un des réactifs ou des produits. Ces problèmes pratiques seront discutés dans le chapitre 4. Malheureusement, la mesure de la vitesse dans un seul ensemble de conditions expérimentales n'est pas suffisante pour déterminer le mécanisme d'une réaction. Pour mieux comprendre les mécanismes réactionnels, il est nécessaire d'établir les équations de vitesse de la réaction, c'est-à-dire d'établir des équations qui rendent compte de la dépendance de la vitesse vis-à-vis de la concentration des réactifs, $[A]$, et des produits, $[P]$ ou vis-à-vis de certains paramètres extérieurs comme la température, T , la pression, p , ou le pH .

$$v = f[A], [P], T, p, pH \dots \quad [1.2]$$

La condition nécessaire pour qu'une réaction chimique se produise entre les réactifs est que ces particules entrent en contact, c'est-à-dire qu'elles se rapprochent suffisamment les unes des autres pour que la réaction puisse se dérouler. On conçoit aisément que la vitesse d'une réaction soit proportionnelle au nombre de collisions entre ces particules. Puisque le nombre de collisions est d'autant plus élevé que la concentration des réactifs est élevée, la vitesse de la réaction est proportionnelle au produit des concentrations des réactifs. Ces considérations sont

synthétisées dans la loi d'action de masses établie par GULDBERG et WAAGE (1867) : à température constante, la vitesse d'une réaction est proportionnelle au produit des concentrations des réactifs où chacune des concentrations entrant dans ce produit est élevée à une puissance égale au coefficient stœchiométrique de ce réactif dans l'équation chimique de la réaction.

Ainsi, pour la réaction $2 A + B \longrightarrow P$ [1.3]

l'équation de vitesse est donnée par

$$v = k[A]^2[B] \quad [1.4]$$

où k est un coefficient de proportionnalité appelé constante de vitesse de la réaction. La loi d'action des masses peut se vérifier simplement en mesurant l'effet sur la vitesse de la réaction de la variation de la concentration d'un des réactifs.

1.2.2. Mécanisme de réaction et réactions élémentaires

Le mécanisme d'une réaction décrit comment la réaction se déroule. Pour un grand nombre de réactions, plusieurs mécanismes sont possibles. Le mécanisme retenu doit être en accord avec la loi de vitesse observée expérimentalement, mais plusieurs mécanismes peuvent avoir la même loi de vitesse. Les études cinétiques permettent d'écarter certains mécanismes mais ne permettent pas d'affirmer qu'un mécanisme est le mécanisme correct. Généralement, le mécanisme réactionnel retenu sera le mécanisme le plus simple qui soit en accord avec l'ensemble des données expérimentales et toutes les données expérimentales indépendantes doivent être utilisées pour définir le mécanisme le plus plausible.

Si la réaction se déroule en une seule étape, on parle de réaction élémentaire. Dans ce cas, l'ordre et la moléularité de la réaction s'évaluent facilement (voir § 1.2.3). Néanmoins, de nombreux mécanismes réactionnels sont constitués d'une combinaison de plusieurs étapes, qui s'additionnent pour donner la réaction globale. C'est notamment le cas des réactions faisant intervenir des catalyseurs.

1.2.3. Ordre et moléularité d'une réaction

Une réaction chimique peut être classée selon sa moléularité ou selon son ordre. La moléularité fait référence au nombre de molécules altérées au cours de la réaction. Une réaction de type $A \longrightarrow P$ est unimoléculaire (parfois appelée monomoléculaire), et une réaction de type $A + B \longrightarrow P$ est bimoléculaire. Les réactions de moléularité supérieure à deux sont extrêmement rares, mais, si elle existait, une réaction de type $A + B + C \longrightarrow P$ serait dite trimoléculaire (ou termoléculaire). L'ordre est une description de la cinétique de la réaction qui découle directement de la loi d'action des masses ; il définit le nombre de termes de concentration qui doivent être multipliés pour obtenir l'équation de vitesse de la réaction. Ainsi, dans une réaction de premier ordre, la vitesse est proportionnelle à la concentration d'un

seul réactif, dans une réaction de second ordre, elle est proportionnelle au produit de deux concentrations ou au carré de la concentration d'un seul réactif, et ainsi de suite.

Pour une réaction simple qui consiste en une seule étape ou pour chaque étape élémentaire d'une réaction complexe, l'ordre est généralement identique à la molécularité. Toutefois, beaucoup de réactions impliquent une série d'étapes unimoléculaires ou bimoléculaires, et la molécularité globale de la réaction ne correspond pas nécessairement à l'ordre global de la réaction. En fait, l'ordre d'une réaction complexe n'est généralement pas significatif, puisque la vitesse ne peut pas toujours être exprimée comme le produit de termes de concentrations. Comme nous le verrons dans les prochains chapitres, cette situation est quasiment universelle dans la cinétique enzymatique, et même la plus simple des réactions enzymatiques ne possède pas d'ordre simple. Néanmoins, le concept d'ordre de réaction est très important pour comprendre la cinétique enzymatique, parce que les étapes individuelles des réactions catalysées par des enzymes ont habituellement des ordres simples ; elles sont de premier ou de second ordre. La fixation d'une molécule de substrat sur une molécule d'enzyme est un exemple typique de réaction bimoléculaire de second ordre, alors que la conversion du complexe enzyme-substrat en produits ou en un intermédiaire est un exemple typique de réaction unimoléculaire du premier ordre.

Pour une réaction du premier ordre $A \longrightarrow P$, la vitesse v est exprimée par l'équation suivante :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k[A] = k([A]_0 - [P]) \quad [1.5]$$

dans laquelle $[A]$ et $[P]$ représentent respectivement les concentrations de A et P à n'importe quel temps t , et k représente la constante de vitesse de premier ordre. Le second terme de l'équation spécifie que la réaction est de premier ordre, puisqu'il montre que la vitesse est directement proportionnelle à la concentration du réactif A élevée à la puissance 1. Finalement, si au temps initial de la réaction, $t = 0$, la concentration $[A] = [A]_0$, la stœchiométrie permet de relier les valeurs de $[A]$ et de $[P]$ à tout moment de la réaction, en accord avec l'équation de conservation $[A] + [P] = [A]_0$, et permet d'écrire le dernier terme de l'équation.

L'équation [1.5] peut facilement être intégrée en isolant les deux variables $[P]$ et t , c'est-à-dire en plaçant tous les termes en $[P]$ dans la partie gauche de l'équation et tous les termes en t dans la partie droite.

$$\int \frac{d[P]}{[A]_0 - [P]} = \int k dt \quad [1.6]$$

Après intégration, nous obtenons :

$$-\ln([A]_0 - [P]) = kt + \alpha \quad [1.7]$$

où α est une constante d'intégration.

Celle-ci peut être évaluée en considérant qu'il n'y a pas de produit P au début de la réaction, c'est-à-dire que $[P] = 0$ quand $t = 0$. Alors, $\alpha = -\ln([A]_0)$, et l'équation [1.7] peut être réécrite :

$$\ln\left(\frac{[A]_0 - [P]}{[A]_0}\right) = -k t \quad [1.8]$$

En prenant l'exponentielle des deux côtés de l'équation, nous obtenons l'équation

$$\frac{[A]_0 - [P]}{[A]_0} = e^{-k t} \quad [1.9]$$

qui peut être réarrangée pour donner :

$$[P] = [A]_0(1 - e^{-k t}) \quad [1.10]$$

Il est important de noter que la constante d'intégration α est différente de zéro et qu'elle doit être évaluée et utilisée pour obtenir les équations [1.8] à [1.10]. Les constantes d'intégration doivent toujours être incluses et évaluées lors de l'intégration des équations de cinétique ; elles sont rarement nulles.

Le type le plus commun de réaction bimoléculaire est celui de la forme $A + B \rightarrow P + Q$, dans lequel deux sortes de molécules, A et B , réagissent pour donner des produits. Dans ce cas, il est commun que la vitesse soit donnée par une expression du second ordre de la forme :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B] = k([A]_0 - [P])([B]_0 - [P]) \quad [1.11]$$

où k est la constante de vitesse de second ordre. Il faut noter que le symbolisme conventionnel utilisé pour les constantes de vitesse ne prévoit pas de distinguer l'ordre de ces constantes. L'intégration est réalisée en séparant les variables $[P]$ et t :

$$\int \frac{d[P]}{([A]_0 - [P])([B]_0 - [P])} = \int k dt \quad [1.12]$$

Pour le lecteur ayant une expérience limitée en mathématiques, la manière la plus simple et la plus fiable de résoudre cette intégration est de consulter des tables d'intégrales standards. Dans ce cas précis, l'intégration peut également être réalisée en multipliant les deux côtés de l'équation par $([B]_0 - [A]_0)$ et en séparant la partie gauche de l'équation en deux intégrales simples :

$$\int \frac{d[P]}{[A]_0 - [P]} - \int \frac{d[P]}{[B]_0 - [P]} = \int ([B]_0 - [A]_0) k dt \quad [1.13]$$

De là, nous obtenons :

$$-\ln([A]_0 - [P]) + \ln([B]_0 - [P]) = ([B]_0 - [A]_0) k t + \alpha \quad [1.14]$$

En considérant que $[P] = 0$ au temps $t = 0$, nous obtenons une évaluation de la constante d'intégration $\alpha = \ln([B]_0/[A]_0)$ et l'équation devient :

$$\ln\left(\frac{[A]_0([B]_0 - [P])}{[B]_0([A]_0 - [P])}\right) = ([B]_0 - [A]_0)kt \quad [1.15]$$

ou

$$\frac{[A]_0([B]_0 - [P])}{[B]_0([A]_0 - [P])} = e^{([B]_0 - [A]_0)kt} \quad [1.16]$$

Un cas particulier de cette équation est intéressant : si $[A]_0$ est très petit par rapport à $[B]_0$, alors, à tout moment de la réaction, $[P]$ doit également être très petit par rapport à $[B]_0$ car $[P]$ ne peut jamais être plus grand que $[A]_0$. De cette manière, $([B]_0 - [A]_0)$ et $([B]_0 - [P])$ peuvent tous les deux être assimilés à $[B]_0$ et l'équation [1.16] peut être simplifiée comme suit :

$$[P] = [A]_0(1 - e^{-k[B]_0t}) \quad [1.17]$$

Cette équation a exactement la même forme que l'équation [1.10], qui est l'équation d'une réaction du premier ordre. Cette situation est connue comme une réaction de pseudo-premier ordre, et $k[B]_0$ est une constante de pseudo-premier ordre. Cette situation se présente si l'un des réactifs est le solvant, comme dans la majorité des réactions d'hydrolyse, mais il est parfois utile de se placer délibérément dans des conditions de pseudo-premier ordre de manière à simplifier l'évaluation de la constante de vitesse comme nous en discuterons au § 3.8.

Les réactions trimoléculaires comme $A + B + C \longrightarrow P$ n'impliquent habituellement pas une seule étape trimoléculaire, et ne sont donc pas des réactions d'ordre trois. Inversement, ces réactions se déroulent en deux ou plusieurs étapes élémentaires, comme $A + B \longrightarrow X$, suivi par $X + C \longrightarrow P$. Si une des étapes est plus lente que les autres, la constante de vitesse de la réaction est très proche de la constante de vitesse de l'étape la plus lente, qui est alors dénommée l'étape limitante de la réaction. Si aucune étape n'est clairement limitante, l'équation de vitesse sera vraisemblablement complexe et l'ordre de la réaction ne correspondra pas obligatoirement à un nombre entier. Quelques réactions trimoléculaires donne lieu à une cinétique d'ordre trois, avec $v = k[A][B][C]$, où k est une constante de troisième ordre, sans toutefois impliquer des collisions entre les trois réactifs qui sont des événements fondamentalement improbables. Dans un mécanisme à deux étapes, comme celui présenté ci-dessus, si la première étape est en équilibre rapide, la concentration de l'intermédiaire X peut être exprimée à partir de la constante d'équilibre : $[X] = K[A][B]$, où K est la constante d'équilibre pour la réaction entre A à B , c'est-à-dire la constante d'association de X . La vitesse de la réaction correspond à la vitesse de la seconde étape qui est donnée par l'équation :

$$v = k'[X][C] = k'K[A][B][C] \quad [1.18]$$

où k' est la constante de vitesse de second ordre pour la seconde étape. Dès lors, la constante apparente de vitesse de troisième ordre correspond en réalité au produit d'une constante de vitesse de second ordre et d'une constante d'équilibre.

On observe aussi quelques réactions d'ordre zéro, c'est-à-dire des réactions qui ont une vitesse constante, indépendante de la concentration de substrat. Une réaction peut être d'ordre zéro par rapport à l'un des substrats, signifiant simplement que ce réactif intervient dans la réaction en aval de l'étape limitante. Cependant, quelques réactions sont globalement d'ordre zéro, c'est-à-dire qu'elles ne dépendent de la concentration d'aucun réactif. Ce sont invariablement des réactions catalysées et sont observées uniquement si chaque réactif est présent en large excès de telle sorte que le catalyseur a atteint son efficacité maximum. Les cinétiques d'ordre zéro sont communément rencontrées dans les réactions enzymatiques, lorsque la vitesse approche sa valeur limite pour des concentrations élevées de substrat.

1.2.4. Détermination de l'ordre d'une réaction

La manière la plus simple de déterminer l'ordre d'une réaction consiste à mesurer la vitesse v pour différentes concentrations de substrat $[A]$. Ensuite, en traçant le graphique de $\log v$ en fonction de $\log [A]$, on obtient une droite dont la pente est égale à l'ordre de la réaction. Si les concentrations de tous les réactifs sont variées dans un rapport constant, la pente du graphique donne l'ordre global de la réaction. Toutefois, il est utile de connaître l'ordre respectif pour chacun des réactifs qui peut être obtenu en modifiant indépendamment la concentration de chaque réactif et en maintenant constante la concentration des autres. Dans ce cas, la pente de la droite est précisément égale à l'ordre partiel de la réaction pour le réactif dont la concentration est prise comme variable. Par exemple, si la réaction est du second ordre en A et du premier ordre en B, la vitesse est donnée par l'équation :

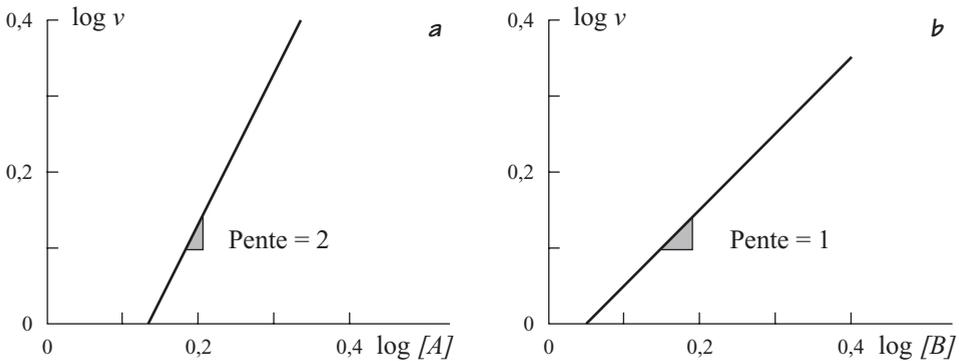
$$v = k[A]^2[B] \quad [1.19]$$

qui peut également s'écrire :

$$\log v = \log k + 2 \log [A] + \log [B] \quad [1.20]$$

Le graphique de $\log v$ en fonction de $\log [A]$ (dans des conditions où $[B]$ est maintenue constante) a une pente de 2, alors que le graphique $\log v$ en fonction de $\log [B]$ (en maintenant $[A]$ constant) a une pente de 1. Ces graphiques sont illustrés à la figure 1.2. Les caractéristiques et l'allure de différents graphiques pour les trois ordres différents de réaction les plus communément rencontrés, l'ordre 0, 1 et 2, sont présentées dans le tableau 1.1.

Il est important de réaliser que si les vitesses sont déterminées à partir des courbes d'évolution de la réaction (correspondant aux courbes de la variation de la concentration d'un réactif en fonction du temps), la concentration de chaque réactif varie. En conséquence, pour obtenir des résultats corrects, il est nécessaire soit de maintenir la concentration des réactifs dans un rapport stœchiométrique constant, permettant la détermination de l'ordre global de la réaction, soit (et c'est le cas le plus courant) d'avoir les réactifs « constants » présents en large excès au début de la réaction de telle sorte que la variation de leur concentration soit négligeable.



1.2 - Détermination de l'ordre de réaction

Les droites sont tracées pour une réaction du second ordre (a) et du premier ordre (b), impliquant que les pentes de ces droites valent respectivement 2 et 1.

Si aucune de ces alternatives n'est possible, la vitesse doit être déterminée à partir de la pente au temps initial, c'est-à-dire dans des conditions de vitesses initiales. Pratiquement, cette méthode est préférable pour réaliser les mesures cinétiques de réactions enzymatiques, car les courbes d'évolution des réactions catalysées par des enzymes n'obéissent généralement pas à des équations simples de vitesse pour de longues périodes de temps. La modélisation de la courbe complète d'évolution d'une réaction enzymatique requiert souvent d'utiliser une équation plus complexe que celle de la forme de l'équation intégrée de vitesse pour des vitesses initiales, du fait de la perte progressive d'activité de l'enzyme, d'inhibition par des produits ou d'autres phénomènes.

1.2.5. Dimensions des constantes de vitesse

L'analyse des équations aux dimensions est l'une des techniques les plus simples et les plus fiables pour détecter des erreurs algébriques et pour vérifier les résultats obtenus. Cette analyse dépend de quelques règles simples qui régissent la manière de combiner des quantités de dimensions différentes, et son application repose sur le fait que les erreurs algébriques conduisent fréquemment à des expressions dont les dimensions sont inhomogènes. On définit ainsi la dimension de concentration, exprimée en molarité (symbole M ou mol L^{-1}) et la dimension des vitesses de réaction (symbole M s^{-1}). Par conséquent, dans une expression telle que $v = k[A]$, la constante de vitesse k doit être exprimée en s^{-1} afin que les termes de gauche et de droite de l'équation aient les mêmes dimensions. Toutes les constantes de vitesse du premier ordre ont des dimensions de temps^{-1} , et par des raisonnements similaires, on démontre aisément que les constantes de vitesse du second ordre ont les dimensions de $\text{concentration}^{-1} \text{ temps}^{-1}$, que les constantes de vitesse de troisième ordre ont les dimensions de $\text{concentration}^{-2} \text{ temps}^{-1}$, et que les constantes d'ordre zéro ont les dimensions de $\text{concentration} \text{ temps}^{-1}$ (tableau 1.1).

Tableau 1.1 - Caractéristiques de réactions d'ordre 0, 1 et 2

Equation de vitesse	Ordre 0 $v_0 = k$	Ordre 1 $v_0 = k \cdot [A]$	Ordre 2 $v_0 = k \cdot [A]^2$
Graphique v en fonction de $[A]$			
Détermination de l'ordre de la réaction	$\log v_0 = \log k$	$\log v_0 = 1 \cdot \log [A] + \log k$	$\log v_0 = 2 \cdot \log [A] + \log k$
Graphique $\log v$ en fonction de $\log [A]$			
Détermination de la constante de vitesse	$[A]_t = [A]_0 - k \cdot t$	$\ln [A]_t = \ln [A]_0 - k \cdot t$	$1/[A]_t = 1/[A]_0 + k \cdot t$
Linéarisation du graphique $[A]$ en fonction du temps			
Unité de la constante de vitesse	$M \cdot s^{-1}$	s^{-1}	$M^{-1} \cdot s^{-1}$

La connaissance des dimensions des constantes de vitesse permet de vérifier très facilement l'exactitude des équations : la partie gauche et la partie droite de toute égalité (ou inégalité) doivent avoir les mêmes dimensions et tous les termes d'une somme doivent avoir les mêmes dimensions. Par exemple, si le terme $(1 + t)$ fait partie d'une équation, où t a la dimension du temps, alors, en toute rigueur, l'équation est incorrecte, même si la valeur de «1» correspond à un temps dont la valeur numérique est 1. Plutôt que de mélanger de cette manière des constantes et des variables dimensionnelles dans une équation, il est préférable d'écrire l'unité après le nombre, par exemple $(1s + t)$, où d'attribuer un symbole à la constante, par exemple $(t_0 + t)$. Bien que chacune de ces alternatives paraisse plus lourde que l'expression $(1 + t)$, elles évitent toute possibilité de confusion. L'équation [7.17] (§ 7.6.1) représente un cas dans lequel cette pratique est parfaitement justifiée.

Des quantités de dimensions différentes peuvent être multipliées ou divisées mais ne peuvent être ni additionnées ni soustraites. Ainsi, si k_1 est une constante de vitesse du premier ordre et si k_2 est une constante de vitesse du second ordre, une affirmation telle que $k_1 \gg k_2$ est aussi dépourvue de sens que l'affirmation $5 \text{ g} \gg 25^\circ\text{C}$. Cependant, une constante de vitesse de pseudo-premier ordre comme $k_2[A]$ a les dimensions de $\text{concentration}^{-1} \text{ temps}^{-1} \text{ concentration}$, c'est-à-dire de temps^{-1} , et a dès lors les dimensions d'une constante de vitesse de premier ordre. Dans ce cas, il est correct de comparer cette constante de pseudo-premier ordre avec d'autres constantes de vitesse du premier ordre.

Un autre principe important de l'analyse aux dimensions est de ne jamais utiliser une quantité ayant une dimension comme un exposant, ni d'en prendre le logarithme. Par exemple, $e^{-k t}$ est autorisé, à condition que k soit une constante de premier ordre, mais $e^{-k t}$ ne l'est pas. Une exception apparente à la règle est celle qui, pour des raisons pratiques, consiste à prendre le logarithme de ce qui apparaît être une concentration. Par exemple, le pH est souvent défini comme $-\log [H^+]$ (bien qu'en toute rigueur, le pH est défini à partir de l'activité du proton et non à partir de sa concentration molaire). Cette définition qui n'est pas strictement correcte représente une simplification de la définition plus rigoureuse qui consiste à définir le pH comme le rapport $-\log ([H^+]/[H^+]^\circ)$, où $[H^+]^\circ$ est la valeur de $[H^+]$ dans l'état standard, c'est-à-dire à $pH = 0$. Comme $[H^+]^\circ$ a une valeur numérique de 1, ce terme est habituellement omis de la définition. Dans tous les cas où, comme dans l'exemple précédent, on prend le logarithme d'une quantité ayant une dimension, un état standard est toujours impliqué dans la définition, qu'il soit précisé explicitement ou non (voir également la définition des constantes d'équilibre au chapitre 2).

L'analyse des dimensions est particulièrement utile comme un moyen de se rappeler les pentes et les ordonnées à l'origine de graphiques communément utilisés : toute intersection avec un axe doit avoir les mêmes dimensions que la variable qui est portée le long de cet axe, alors que la pente a toujours les dimensions de l'ordonnée (y) divisées par celles de l'abscisse (x). Ces règles sont illustrées dans la figure 1.3.

Pour les deux ensembles d'estimations, tracer le graphique des résidus en fonction de $[A]$. Une tendance est-elle apparente ? Si oui, quelle expérience doit être réalisée pour décider si la tendance est réelle et n'est pas un artéfact dû à une incertitude aléatoire ? Une conclusion peut-elle être tirée au sujet de la pondération qui serait appropriée pour l'analyse des moindres carrés ?

- 12.2 - Quelles seraient les estimations des paramètres obtenues à partir des données du problème 12.1 si la valeur de v pour $[A] = 1 \text{ mM}$ était $0,159 \text{ mM min}^{-1}$ plutôt que $0,219 \text{ mM min}^{-1}$?
- 12.3 - Supposons que certaines données aient été ajustées par la méthode des moindres carrés en utilisant les deux hypothèses de pondération discutées dans le texte, c'est-à-dire un coefficient de variation constant (§ 12.2.2) et une déviation standard constante (§ 12.2.3). Si les graphiques des résidus suggéraient non seulement que l'incertitude simple diminue lorsque la vitesse augmente, mais également que l'incertitude relative augmente dans les mêmes conditions, nous pourrions envisager d'utiliser un compromis dans le schéma de pondération en utilisant le facteur de pondération $w_i = v^3$ dans les équations [12.19] et [12.20]. Ecrire les expressions des paramètres de MICHAELIS et MENTEN dans lesquelles cette substitution est faite et tester le résultat pour le respect des dimensions.
- 12.4 - Intuitivement, nous pouvons penser qu'il est raisonnable que le coefficient de variation d'une quantité mesurée peut être approximativement constant si cette quantité mesurée est grande, mais qu'il n'est pas possible de mesurer une valeur de zéro exactement, c'est-à-dire qu'aux faibles valeurs la tendance serait en faveur d'une déviation standard constante. Est-ce cela qui est impliqué dans le compromis du schéma de pondération suggéré dans le problème 12.3 ?

