

## ***Cinétique enzymatique à deux substrats***

### ***Introduction :***

Dans le chapitre précédent, l'analyse des réactions catalysées par des enzymes prend seulement en considération les réactions à un substrat et un produit. Cependant, la plupart des réactions biochimiques impliquent deux substrats ou plus, et deux produits ou plus.

En fait, 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.

### ***1. Classification des mécanismes réactionnels :***

Il existe deux classifications ; cinétique et chimique.

#### ***1.1. Classification cinétique :***

Selon le type du complexe formé, on distingue deux mécanismes :

##### ***1. 1. 1. Mécanisme séquentiel :***

Lorsque la réaction enzymatique n'intervient qu'après formation d'un complexe *ternaire* entre l'enzyme et les deux substrats. La fixation des substrats peut elle-même être :

***Ordonnée*** : l'un des substrats se fixe nécessairement en premier lieu. C'est toujours le même substrat qui se fixe le premier.

***Au hasard (aléatoire)*** : l'un ou l'autre des substrats se fixant en premier lieu. Sa présence pouvant soit ne pas modifier, soit faciliter, soit défavoriser la fixation de l'autre.

##### ***1. 1. 2. Mécanisme ping-pong (alternatif) :***

Lorsque la réaction enzymatique s'effectue après formation d'un complexe binaire actif. C'est un mécanisme particulier dans lequel la fixation du premier substrat est suivie par la transformation de celui-ci en produit de réaction, ce qui modifie aussi l'enzyme.

Lorsque le premier produit quitte l'enzyme, elle devient prête à recevoir le second substrat qu'elle ne pouvait pas fixer auparavant. Elle le fixe, le transforme et le second produit de réaction la quitte. Ainsi, elle revient à son état initial.

#### ***1.2. Classification chimique :***

Cette classification permet d'expliquer le déroulement de la réaction chimique. Donc, selon les combinaisons de l'enzyme aux substrats on trouve :

### 1.2.1. Réactions à simple déplacement :

Elles impliquent la formation d'un complexe ternaire. Les conditions expérimentales sont :

- ✓ La réaction reverse est négligée,
- ✓ Les deux substrats A et B doivent être présents simultanément,
- ✓ L'association des substrats à l'enzyme peut s'effectuer de différentes manières.

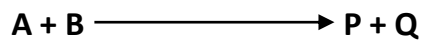
### 1.2.2. Réactions à double déplacement :

Certaines réactions du métabolisme impliquant deux substrats se produisent sans que la réaction nécessite la formation d'un complexe ternaire. C'est le cas de beaucoup de réaction de transfert de groupes qui mettent en jeu que la formation de complexes binaires.

Ainsi, l'enzyme est modifié ; le groupe est transféré deux fois, premièrement du substrat A vers l'enzyme libre E et ensuite de l'enzyme substituée vers le second substrat B.

## 2. Approche expérimentale :

Dans la plupart des cas, une réaction enzymatique appartient au type :



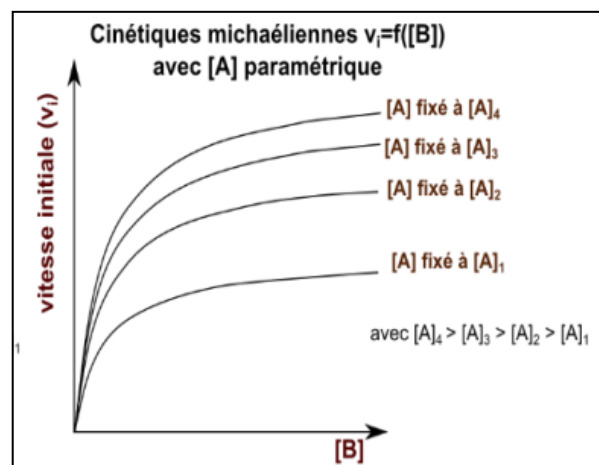
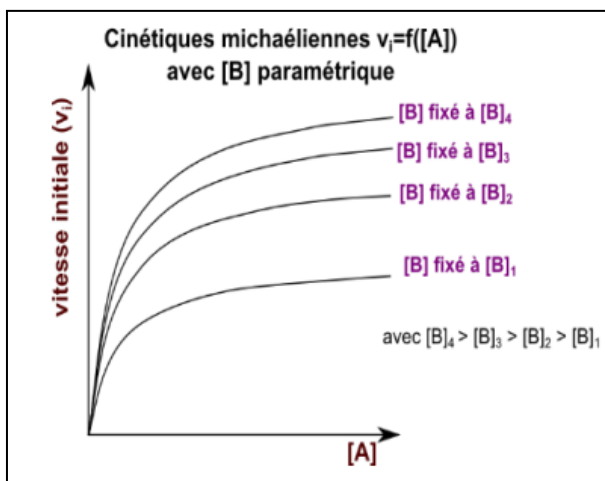
Pour en étudier la cinétique, on se place dans des conditions artificielles. On mesure les variations de vitesse de la réaction en présence de concentrations très élevées du composé **B** lorsqu'on fait varier la concentration de **A**, puis on fait de même avec une concentration élevée, non limitante de **A**. Ainsi, on se ramène à une cinétique à un seul substrat. On définit une constante de Michaelis  $K_A$  et  $K_B$  pour chaque substrat. Autrement dit, l'étude cinétique est réalisée en deux étapes :

### 2.1. Première étape :

On effectue l'expérience avec le premier substrat (A) en excès, on l'appelle le substrat fixe et on mesure la vitesse en faisant varier B (substrat variable) et ceci en phase stationnaire.

### 2.2. Deuxième étape :

On prend B en excès et on fait varier A pour mesurer les vitesses en phase stationnaire. Les deux étapes (cinétiques) sont de type Michaelien, mais le traitement mathématique est complexe et c'est pourquoi on utilise la notation de Chelaud (1963). Le résultat ; deux réactions du type Michaelien, mais le traitement mathématique est plus compliqué.

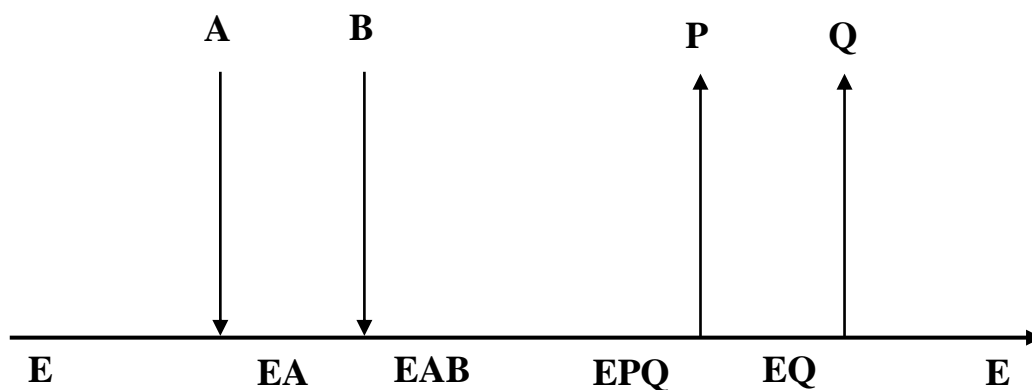


### 3. Diagramme de CLELAND (1963) :

Pour mieux comprendre les mécanismes réactionnels, on utilise des schémas dits de **Cleland** pour rendre plus clairs les événements qui se déroulent lorsqu'il y a plusieurs substrats.

Ce diagramme est formé d'une droite horizontale représentant la surface de l'enzyme et son évolution au cours du cycle réactionnel, des flèches aboutissant à cette droite désignant les substrats dans leur ordre de fixation et des flèches qui partent de la droite indiquant l'ordre de départ des produits de la réaction.

Exemple :



Cet exemple représente un mécanisme séquentiel ordonné.

**N.B.**

Si on considère que les enzymes ont un comportement michaelien et que la réaction catalytique se fait en une seule étape cinétique après la formation du complexe ternaire EAB pour donner E+P+Q :

$K_A$  est la constante de dissociation de l'équilibre :  $EAB \rightleftharpoons EB + A$

$K_B$  est la constante de dissociation de l'équilibre :  $EAB \rightleftharpoons EA + B$

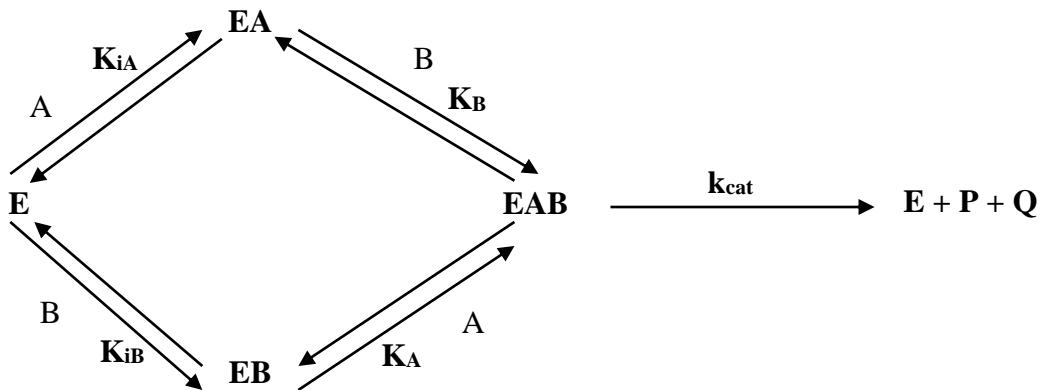
L'étude de la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de chacun des substrats permet de déterminer les constantes cinétiques de la réaction et l'ordre de fixation des substrats.

Les représentations de  $(1/v)$  en fonction de l'inverse de la concentration d'un des substrats (la concentration de l'autre substrat étant maintenue constante) sont linéaires lorsque l'enzyme est michaelienne ; on les appelle *représentations primaires*.

## ÉTUDE DES MÉCANISMES RÉACTIONNELS

### 1. Mécanismes séquentiels :

Le schéma général d'un mécanisme séquentiel ainsi que les constantes d'équilibre qui permettent de rendre compte des cinétiques s'écrivent :



Avec :  $K_{iA} = \frac{[E][A]}{[EA]}$  et  $K_{iB} = \frac{[E][B]}{[EB]}$

$K_A = \frac{[EB][A]}{[EAB]}$  et  $K_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$

On dénomme ces constantes d'équilibre  $K_i$ , car chacun des substrats présents en l'absence de l'autre se comporte comme un inhibiteur compétitif.

#### 1.1. Mécanisme d'une fixation au hasard (aléatoire) :

Dans ce cas, l'un ou l'autre des substrats se fixe en premier. L'enzyme possède deux sites de fixation, un pour chaque substrat et la réaction ne peut avoir lieu que lorsque les deux substrats sont présents.

Deux cas doivent être considérés :

- Les associations de **A** et de **B** à l'enzyme sont dépendantes ; c'est-à-dire que la fixation de **A** modifie l'affinité de l'enzyme pour **B** et réciproquement.
- Les associations sont indépendantes : l'association de l'un des substrats s'effectue de la même manière en l'absence du second.

##### 1.1.1. Association dépendante :

C'est le cas le plus général. La fixation de A modifie l'affinité de l'enzyme pour B et réciproquement. On définit quatre constantes d'équilibres  $K_{iA}$ ,  $K_A$ ,  $K_{iB}$  et  $K_B$ .

##### ❖ Cinétique :

A l'équilibre :  $[A]$  et  $[B] \gg [E_t]$  et  $K_{iA} \cdot K_B = K_{iB} \cdot K_A$

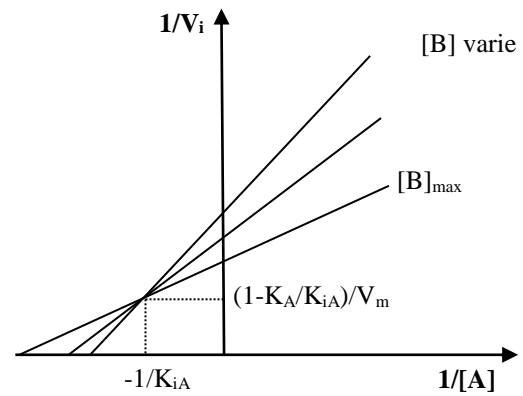
L'équation de vitesse est de la forme :  $v = v_m / (1 + K_A/[A] + K_B/[B] + K_{iA} \cdot K_B/[A][B])$

❖ **Représentation graphique:**

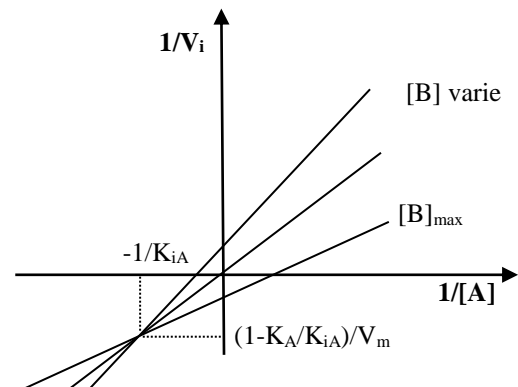
**1<sup>er</sup> cas :** [B] = constante et [A] variable :

Représentation primaire :

- **Dépendance positive** ( $K_{iA} > K_A$ ):  
La fixation de B est facilitée par la présence de A.

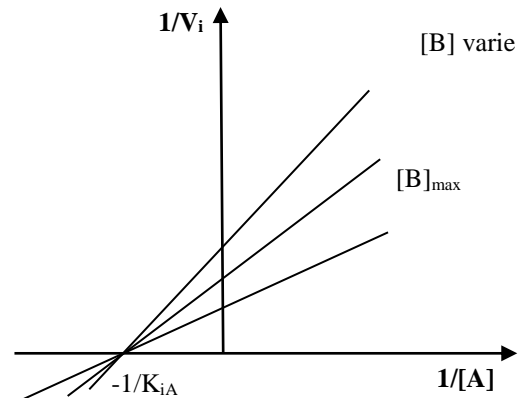


- **Dépendance négative** ( $K_{iA} < K_A$ ):  
La fixation de B est gênée par la présence de A.

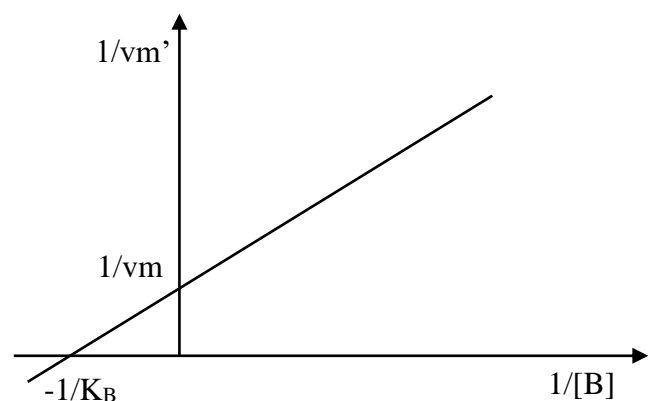
**1.1.2. Association indépendante :**

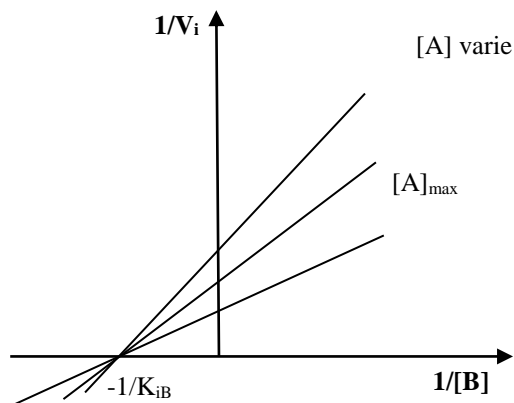
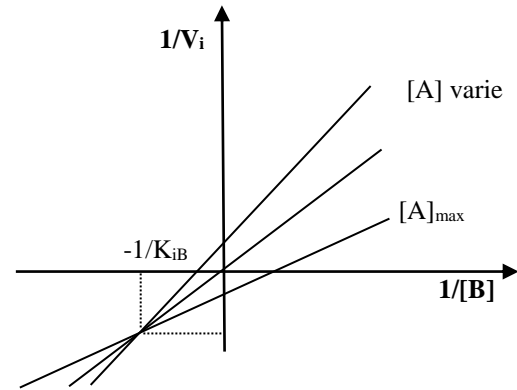
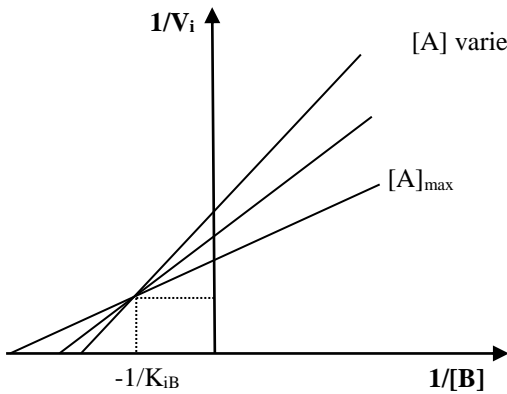
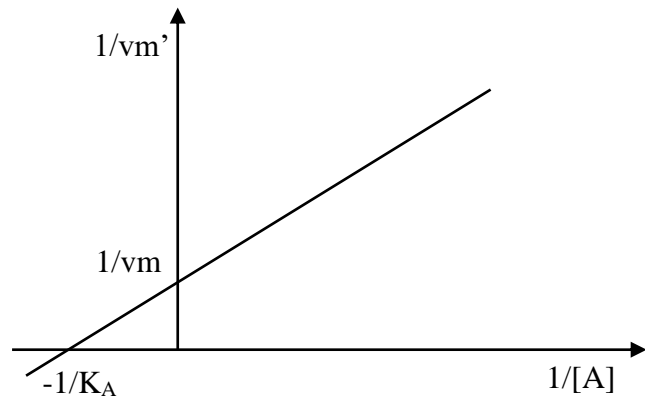
Si les sites de fixation des deux substrats sont suffisamment distincts et s'il n'y a pas d'interactions entre eux, la fixation de l'un n'affectera pas l'association de l'autre. Donc il y a deux constantes d'équilibres car : ( $K_{iA}=K_A$  et  $K_{iB}=K_B$ ) et l'équation de vitesse devient :

$$v = v_m / (1 + K_A/[A] + K_B/[B] + K_A \cdot K_B/[A][B])$$

Représentation secondaire :

Il consiste à porter graphiquement  $1/vm' = f(1/[B])$  sachant que  $v_i'$  est la vitesse maximale déterminée à partir de la représentation primaire  $1/v_i = f(1/[A])$ .



**2<sup>e</sup> cas : [A] = constante et [B] variable :**Représentation primaire :Représentation secondaire :**Exemple :**

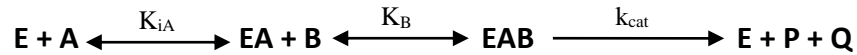
Hexokinase (EC 2.7.4.3) catalyse la réaction suivante :



## 1. 2. Mécanisme d'une fixation bi-bi ordonnée (obligatoire) :

### ❖ Cinétique :

Le schéma général de la réaction est le suivant :



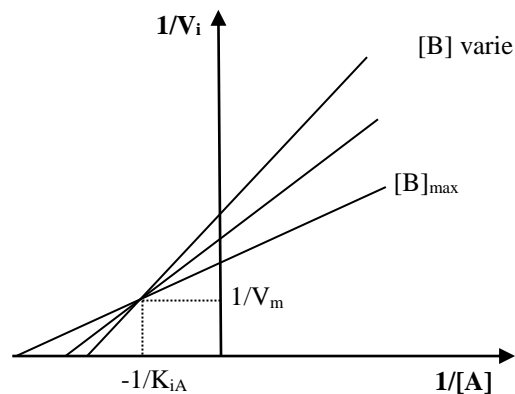
- ✓ Si A est le premier substrat fixé, le complexe EB n'existe pas ;
- ✓ B n'a aucune affinité pour l'enzyme libre (B ne peut se fixer que sur le complexe EA) ;
- ✓ A ne peut se dissocier du complexe EAB ( $K_A=0$ ).
- ✓ Le détachement des produits lui-même est ordonné ; le 2<sup>e</sup> produit correspond au 1<sup>er</sup> substrat ;
- ✓ L'équation de vitesse se simplifie :

$$v = v_m / (1 + K_B/[B] + K_{iA} \cdot K_B/[A][B])$$

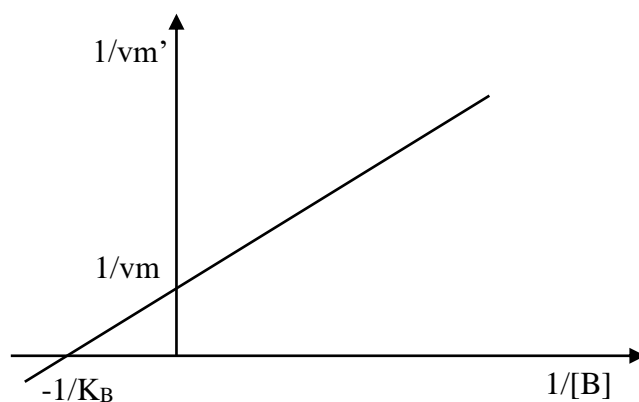
### ❖ Représentation graphique :

**1<sup>er</sup> cas** : [B] = constant et [A] variable :

Représentation primaire :



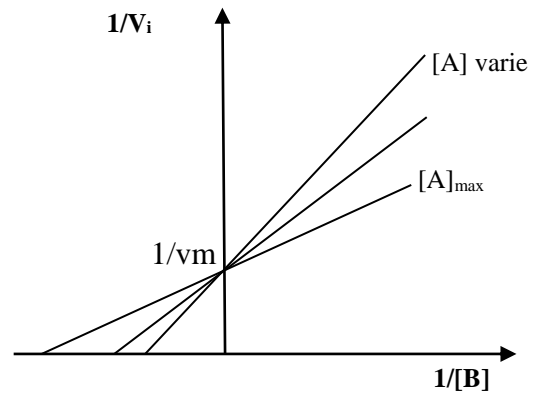
Représentation secondaire :



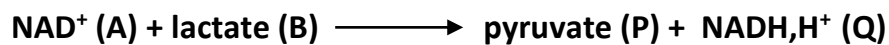
**2<sup>e</sup> cas : [A] = constant et [B] variable****Représentation primaire :**

Cette représentation permet l'identification du mécanisme séquentiel ordonné.

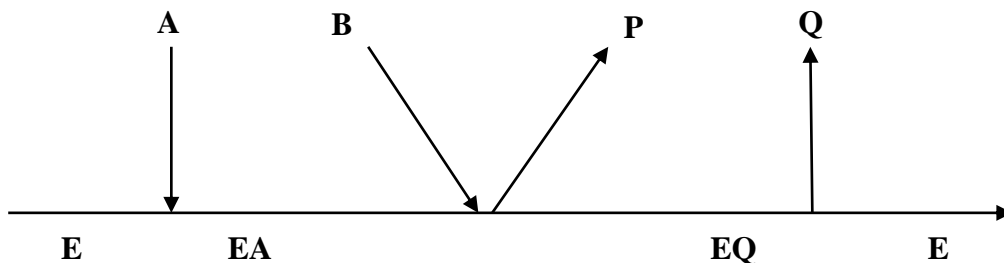
Dans ce cas, il n'y a pas de représentation secondaire.

**Exemple :**

Lactate déshydrogénase LDH (EC 1.1.1.27) catalyse la réaction suivante :

**Mécanisme Theorell-Chance :**

- ✓ C'est un cas particulier du mécanisme ordonné.
- ✓ Il est décrit pour quelques déshydrogénases (alcool déshydrogénase, lactate déshydrogénase)

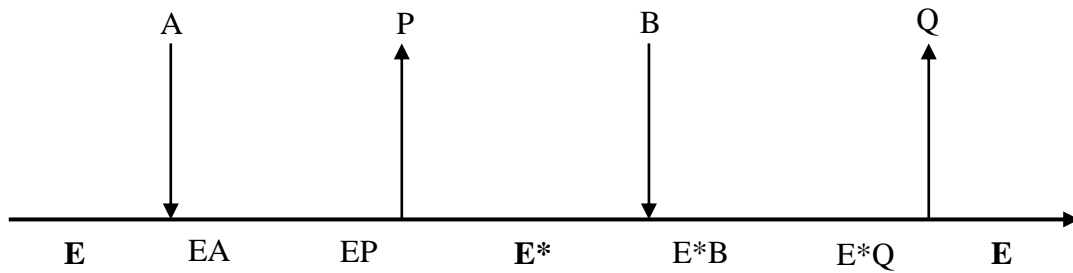
**❖ Caractéristiques :**

- ✓ Le 2<sup>e</sup> substrat établit un contact très court avec le 1<sup>er</sup> complexe EA et fournit aussi tôt le 1<sup>er</sup> produit;
- ✓ Les constantes de dissociation du 2<sup>e</sup> substrat et du 1<sup>er</sup> produit sont très élevés par rapport à ceux du 1<sup>er</sup> substrat et du 2<sup>e</sup> produit ;
- ✓ La durée de vie du complexe EAB est très courte par rapport à celle de EA et EQ (complexe éphémère) ;
- ✓ La relation des vitesses avec A et B et celle du mécanisme bi-bi ordonné :

$$v = v_m / (1 + K_B/[B] + K_{iA} \cdot K_B/[A][B])$$

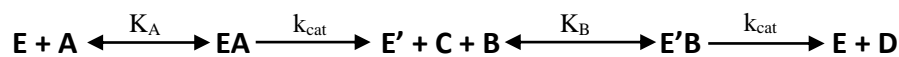


## 2. Mécanisme non séquentiel (alternatif) : ping-pong :



### ❖ Cinétique :

- ✓ La réaction ne nécessite pas la formation d'un complexe ternaire.
- ✓ L'enzyme, après avoir fixé le premier substrat, le transforme et libère le produit correspondant.
- ✓ L'enzyme, fixe ensuite l'autre substrat, le transforme et libère le second produit.
- ✓ Dans ce mécanisme, intervient, entre les étapes de fixation des deux substrats, une étape irréversible en absence des produits de la réaction :



La 1<sup>ère</sup> réaction modifie l'enzyme de manière à permettre la seconde réaction avec le 2<sup>e</sup> substrat.

La vitesse est donnée par l'équation suivante :

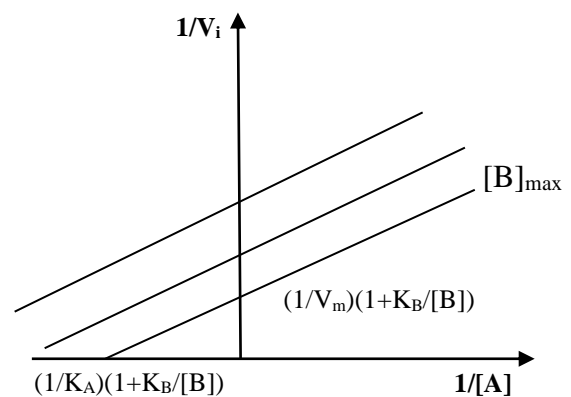
$$v = v_m / (1 + K_A/[A] + K_B/[B])$$

### ❖ Représentation graphique :

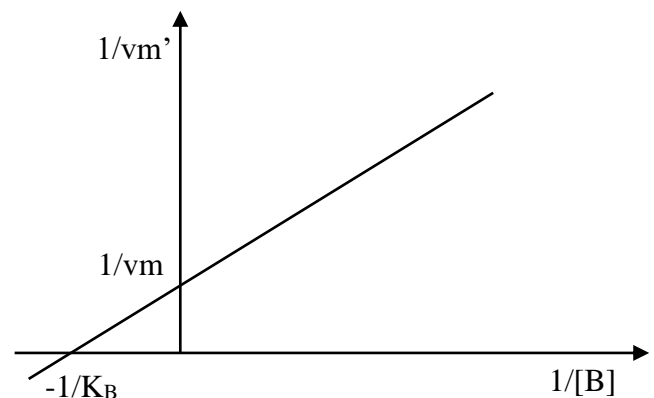
1<sup>er</sup> cas : [B] = constante et [A] variable

Représentation primaire :

Cette représentation permet l'identification du mécanisme ping-pong.

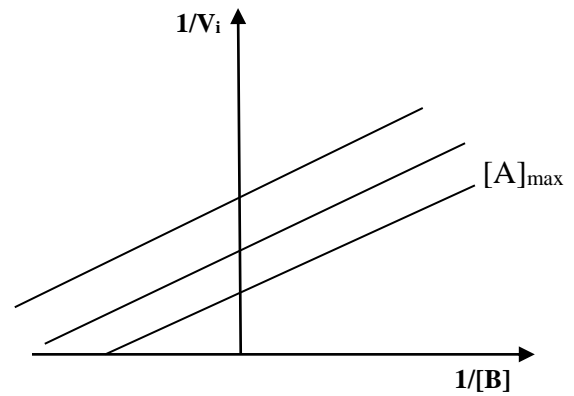


Représentation secondaire :

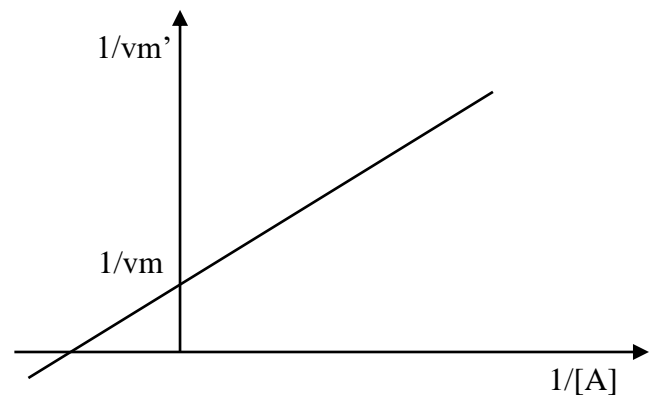


**2<sup>e</sup> cas : [A] = constante et [B] variable**

Représentation primaire :



Représentation secondaire :



**Exemple :**

Glucose oxydase (EC 1.1.3.4) catalyse la réaction suivante :

