

Cinétique enzymatique à deux substrats.

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.

I - Etude des vitesses initiales de la réaction :

-les mécanismes séquentiels (ou à simple déplacement) qui se subdivisent en mécanisme séquentiel ordonné ou mécanisme séquentiel au hasard

- Séquentiel : la réaction enzymatique n'intervient qu'après formation d'un complexe entre l'enzyme et les deux substrats (complexe ternaire).

-Non séquentiel : système où un produit est relargué entre les additions successives des substrats exemple : système à double déplacement dit "ping-pong" **1- Nomenclature des systèmes :**

Les réactions sont classées : **Uni, Bi, Ter ou Quad** en fonction du nombre de substrats ou de produits.

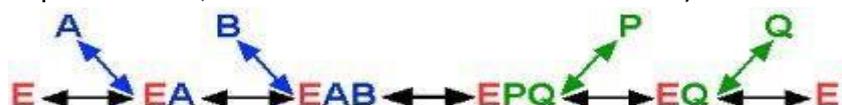
Bi Bi : système impliquant 2 substrats et 2 produits..

Bi Uni (ou Uni Bi) : système impliquant 2 substrats et 1 produit (ou l'inverse). Exemple : Bi Bi ordonné.

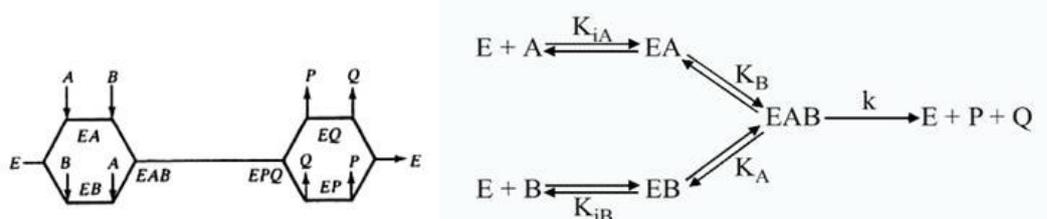
Iso : système impliquant une isomérisation de l'enzyme (changement de conformation $E \rightleftharpoons E'$). Exemple : Iso ping-pong.

2-Mécanismes séquentiels :

On parle de mécanisme séquentiel lorsque la réaction enzymatique n'intervient qu'après formation d'un complexe entre l'enzyme et les deux substrats. La fixation des substrats peut elle même être ordonnée (l'un des substrats se fixant nécessairement en premier lieu) ou se produire au hasard (l'un ou l'autre des substrats se fixant en premier, sa présence pouvant soit ne pas modifier, soit défavoriser la fixation de l'autre)



*** Fixation au hasard :** Deux substrats, A et B, se fixent de manière aléatoire sur l'enzyme libre E (c'est-à-dire qu'il n'y a pas de fixation privilégiée de l'un ou l'autre des deux substrats) avec une constante de dissociation K_A et K_B , respectivement. **Représentation de Cleland :**



Le schéma et les constantes qui permettent de rendre compte des cinétiques s'écrivent

E-A et E-B sont appelés les complexes binaires et E-A-B le complexe ternaire. On peut définir les **deux constantes d'équilibre** caractérisant les complexes binaires :

On dénomme ces constantes d'équilibre K_i , car chacun des substrats, présent en l'absence de l'autre, se comporte comme un inhibiteur compétitif (avec K_i comme constante d'inhibition), si l'enzyme peut catalyser une réaction entre deux autres substrats.

K_{iA} et K_{iB} étant les constantes d'équilibres définies précédemment entre l'enzyme libre et les substrats. $K_{iA} = ([E][A])/[E-A]$ et $K_{iB} = ([E][B])/[E-B]$

K_A et K_B sont les constantes de Michaelis des substrats A et B, c'est à dire les [substrat] pour lesquelles la vitesse (mesurée à concentration saturante de l'autre substrat) est égale à la moitié de la vitesse maximale. Si l'on peut faire l'hypothèse du quasi-équilibre pour la fixation des substrats et s'il n'existe qu'une seule étape cinétique pour la transformation de E-A-B en E + P + Q; K_A est égale à la constante de dissociation de l'équilibre $E-A-B \rightleftharpoons E-B + A$ et K_B à celle de l'équilibre $E-A-B \rightleftharpoons E-A + B$. $K_A = ([A][EB])/[EAB]$ $K_B = ([B][EA])/[EAB]$ $K_{iA} K_B = K_A K_B$

L'équation de vitesse est de la forme : $V = K_{cat} [Et]/1+(K_A/[A]+K_B/[B]+K_{iA}.K_{iB}/[A][B])$

Les représentations des $1/V$ en fonction de l'inverse de l'un des substrats (ex: $1/[A]$), la concentration de l'autre étant maintenue constante, sont linéaires lorsque l'enzyme est *Mickaelien*. On les appelle les représentations primaires. Les droites obtenues dans une représentation primaire sont concourantes pour les mécanismes séquentiels.

L'abscisse du point d'intersection de concours des droites de la représentation primaire en fonction de $1/[A]$ est égale à $-1/K_{iA}$.

L'ordonnée du point d'intersection est égale à : $1/(K_{cat} [Et]) \times 1 - (K_A/K_{iA})$.

$E-A-B \rightleftharpoons E-B + A$. On parle alors de **fixation indépendante** si $K_A=K_{iA}$ et **de fixation dépendante dans le cas contraire** ($K_A \neq K_{iA}$). Elles se coupent sur l'axe des abscisses dans le cas d'une fixation indépendante, au dessus de cette axe si la fixation du second substrat est facilitée par la présence du premier, au dessous dans le cas contraire.

L'intersection avec l'axe des ordonnées des droites obtenues dans les représentations primaires varie avec la concentration de l'autre substrat.

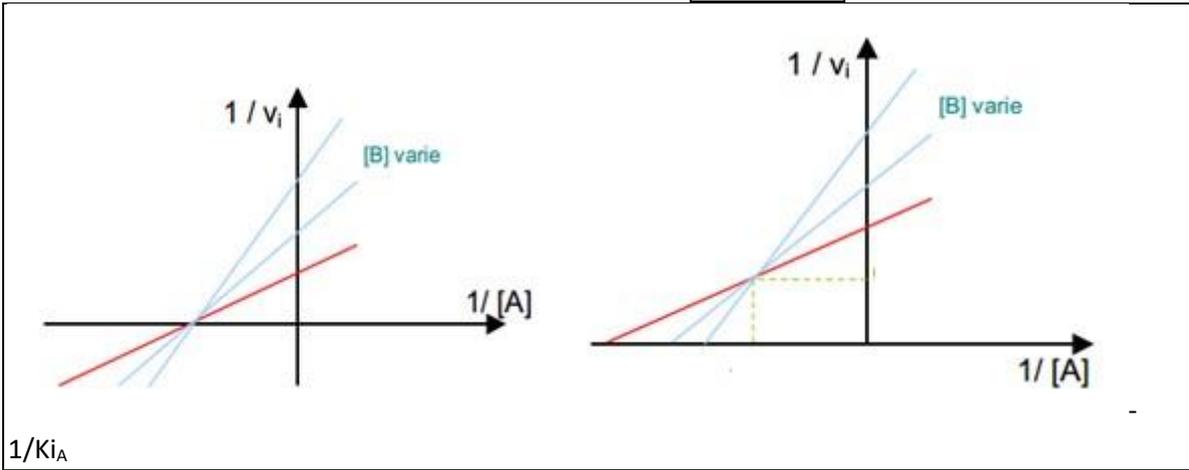
Ainsi, l'ordonnée à l'origine des droites :

$$1/V = f(1/[A]), \text{ correspond à } 1/V_a = K_{cat} \cdot [Et] / 1 + (K_B/[B]).$$

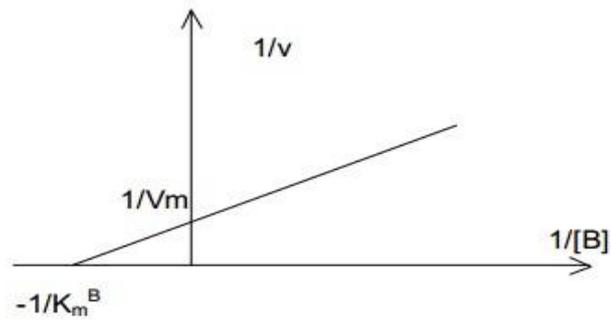
Elle représente l'inverse de la vitesse mesurée à concentration saturante de A et à la concentration utilisée de B.

La représentation de $1/V_a = f(1/[B])$ (appelée représentation secondaire) est une droite; elle s'extrapole sur l'axe des abscisses à $-1/K_B$, K_B étant la constante de *Michaelis* de B. L'intersection avec l'axe des ordonnées de la représentation secondaire correspond à : $1/K_{cat} \cdot [Et] = 1/V_m$, V_m étant la vitesse mesurée lorsque les deux substrats sont saturants.

$-1/K_{IA}$
$-1/K_{IA}$

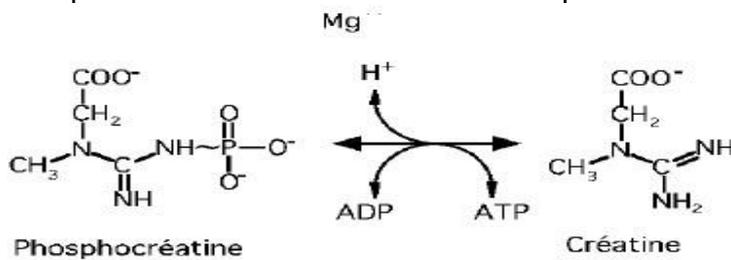


Représentation Primaire (indépendante et dépendante) $1/V = f(1/A)$



Représentation Secondaire

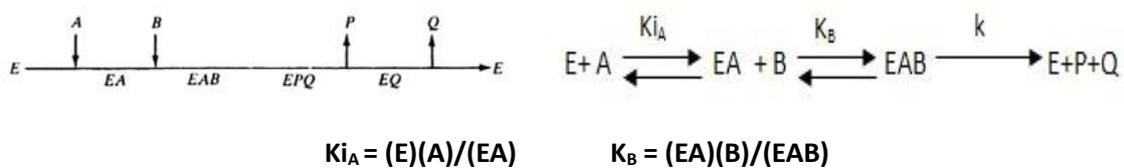
Exemple de bibi aléatoire : la créatine Phosphokinase



La créatine phosphokinase (CPK), catalyse le transfert d'un radical phosphoryl du substrat, le phosphate de créatine, vers un coenzyme transporteur, l'ADP.

• L'affinité de l'enzyme pour ces deux corps chimiques étant voisine, la liaison de l'enzyme avec chacun d'entre eux se fait dans un ordre qui dépend uniquement des concentrations

**** Fixation ordonnée :** Dans un tel système, l'ordre de fixation est obligatoire : le substrat A doit se fixer à l'enzyme libre E avant le substrat B. En d'autres termes, le substrat B ne peut se fixer qu'au complexe EA. **Représentation de Cleland**



Si A est le substrat qui se fixe le premier, la constante K_{iB} est infinie (B n'a aucune affinité pour l'enzyme libre) et $K_A = 0$ (A ne pouvant se dissocier du complexe E-A-B, la constante d'équilibre de dissociation est nulle).

$k_{iB} = 0$ et $K_A = 0$ cela signifie que B ne peut se fixer sur son site enzymatique que si A se trouve déjà fixé

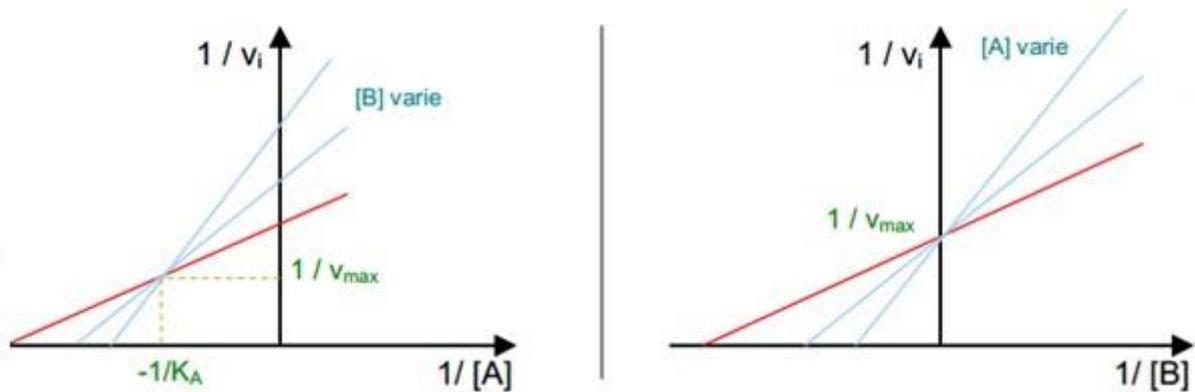
L'équation de vitesse se simplifie: $V = K_{cat} \cdot [Et] / 1 + (K_B/[B]) + (K_{iA} \cdot K_B/[A][B])$ ($K_A=0$)

Les faisceaux de droites concourantes des représentations primaires se coupent au-dessus de l'axe des abscisses, en un point d'ordonnée $1/V_m$. Dans le cas de la représentation en fonction de $1/[A]$; l'abscisse du point d'intersection est $-1/K_{iA}$.

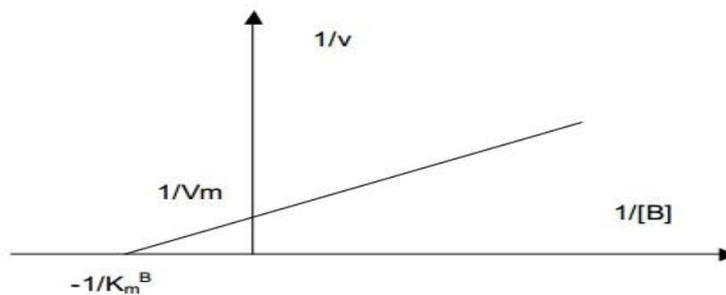
Les droites de la représentation primaire de $1/V = f(1/[B])$ se coupent sur l'axe des ordonnées (puisque $1/K_{iA} = 0$): aux concentrations saturantes de B, la vitesse mesurée est égale à V_m , même aux faibles valeurs de A.

Etant donnée que B ne se fixe que sur le complexe E-A, sa présence en excès déplace l'équilibre entre E et A vers les formes complexées et tout l'enzyme est alors sous la forme EA-B; on mesure ainsi la vitesse maximale.

$-1/K_{iA}$

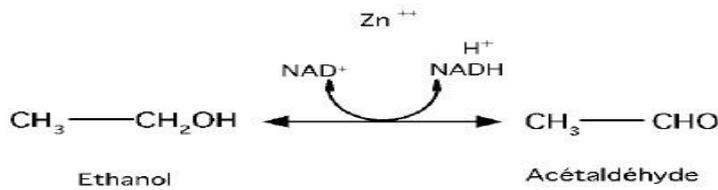


Représentation Primaire : $1/V = f(1/A)$



Représentation Secondaire

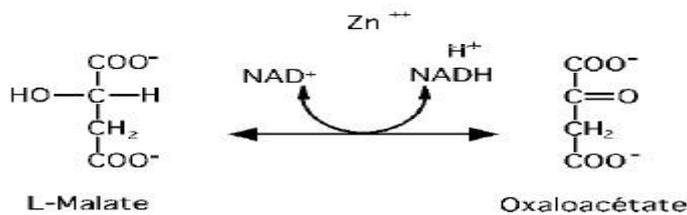
Exemple de bibi ordonné : l'alcool Déshydrogénase :



L'alcool déshydrogénase est une enzyme, catalyse l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde en réduisant simultanément un coenzyme NAD⁺ en NADH.

- Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour l'alcool si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD⁺ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme-NAD⁺-Ethanol se transforme en un complexe Enzyme-NADH-Acétaldéhyde ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'acétaldéhyde puis le NAD réduit.

Exemple de bibi ordonné : la malate Déshydrogénase



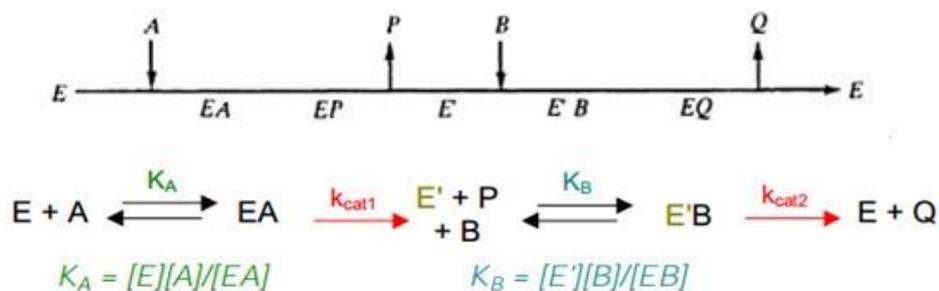
La malate déshydrogénase est une enzyme, catalyse l'oxydation du malate en oxaloacétate en réduisant simultanément un coenzyme NAD⁺ en NADH.

- Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type bibi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour le malate si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme NAD⁺ en un premier complexe ; puis le complexe ternaire Enzyme-NAD⁺-Malate se transforme en un complexe Enzyme-NADH-Oxaloacétate ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'oxaloacétate puis le NAD réduit.

Mécanisme ping-pong :

Si la réaction enzymatique ne nécessite pas la formation d'un complexe ternaire, 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. C'est le mécanisme *ping-pong* qui se distingue des précédents par le fait qu'il intervient, entre les étapes de fixation des deux substrats, une étape irréversible en absence des produits de la réaction.

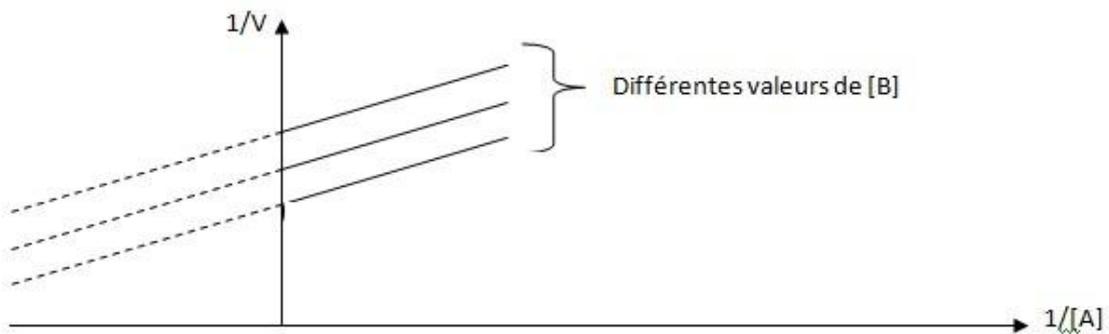


L'équation de la vitesse en fonction de la concentration des substrats fait apparaître un comportement *Mickaelien*, en utilisant l'approximation de l'état stationnaire ou celle du quasi-équilibre.

Elle est de la forme : $V = K_{cat} [Et] / 1 + (K_A/[A] + K_B/[B])$

Les représentations primaires de $1/V = f(1/[A])$ ou $f(1/[B])$ sont des droites parallèles. Comme précédemment, les intersections avec l'axe des ordonnées correspondent à $1/V_a$ ou $1/V_b$; l'inverse de la vitesse mesurée à concentration saturante du substrat considéré.

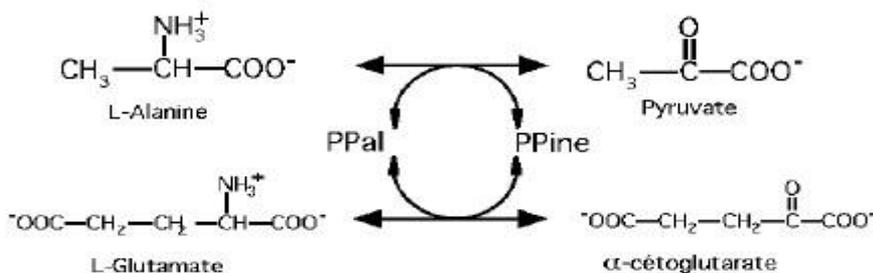
L'étude des variations de V_a en fonction de $[B]$ permet de déterminer la constante de *Mickaelis* de B et la vitesse maximale de la réaction, celle mesurée lorsque les deux substrats sont saturants.



Représentation secondaire : $1/V_i = f(1/B)$, intersection avec axe des y : $1/V_{max} = 1/K_{cat}$, et avec l'axe des x : $-1/K_B$ (K_{MB} pour le substrat B)

Pour le substrat A : $\text{tg}(\alpha(\text{pente})) = (1/V_{max}) \cdot K_{MA} = K_{MA}/V_{max}$

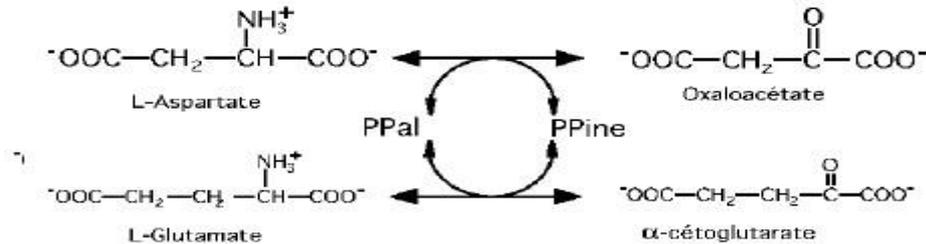
Exemple de ping-pong : l'alanine aminotransférase = ALAT



L'ALAT catalyse le transfert de la fonction amine de l'alanine vers l'α-cétoglutarate qu'elle transforme en glutamate.

- Dans un premier temps, l'ALAT se lie à l'alanine puis transfère la fonction amine sur un coenzyme lié : le phosphate de pyridoxal qui devient phosphate de pyridoxamine sans cesser d'être lié à l'enzyme. L'enzyme se dissocie alors du pyruvate.
- Dans le second temps, l'enzyme liée au phosphate de pyridoxamine, forme un complexe avec l'α-cétoglutarate, puis transfère la fonction amine du coenzyme qui redevient phosphate de pyridoxal, vers le second substrat qui est transformé en glutamate. Enfin, le complexe ALAT glutamate se dissocie : l'enzyme et son coenzyme lié ont recouvré leurs structures initiales.

- l'aspartate aminotransférase = ASAT



L'ASAT catalyse le transfert de la fonction amine de l'aspartate vers l' α -cétoglutarate qu'elle transforme en glutamate.

- Dans un premier temps, l'ASAT se lie à l'aspartate puis transfère la fonction amine sur un coenzyme lié : le phosphate de pyridoxal qui devient phosphate de pyridoxamine sans cesser d'être lié à l'enzyme. L'enzyme se dissocie alors de l'oxaloacétate.
- Dans le second temps, l'enzyme liée au phosphate de pyridoxamine, forme un complexe avec l' α -cétoglutarate, puis transfère la fonction amine du coenzyme qui redevient phosphate de pyridoxal, vers le second substrat qui est transformé en glutamate. Enfin, le complexe ASAT glutamate se dissocie : l'enzyme et son coenzyme lié ont recouvré leurs structures initiales.

II - Etude des inhibiteurs :

L'existence de schémas différents, donnant des équations de vitesse à dépendance similaire vis-à-vis des concentrations des substrats, oblige à compléter l'étude pour analyser le mécanisme cinétique des réactions.

L'une des méthodes cinétiques souvent utilisée est l'étude des effets des inhibiteurs sur la vitesse de la réaction soit d'analogues des substrats, soit des produits de la réaction.

1) Etude des analogues de substrat :

L'étude de ces inhibiteurs obéit aux mêmes règles que celles des réactions à un seul substrat.

-On observe un effet inhibiteur à forte [S] lorsque le substrat et l'inhibiteur sont présents ensemble sur au moins une forme d'enzyme. On l'observe aussi même lorsque l'inhibiteur et le substrat ne sont jamais présents ensemble, chaque fois que l'excès de substrat ne peut empêcher la fixation de l'inhibiteur.

-On observe un effet inhibiteur à faible [S] si l'inhibiteur se fixe sur au moins une forme d'enzyme présente lorsque la [S] tend vers 0.

L'inhibiteur est de type compétitif lorsque l'effet inhibiteur disparaît à forte [S], de type un compétitif lorsqu'il n'y a pas d'effet inhibiteur à faible [S], et de type non compétitif lorsque l'effet inhibiteur existe aussi bien à forte qu'à faible [S].

L'application de ces règles simples au cas des mécanismes à deux substrats permet de définir le type d'inhibiteur observé pour les analogues, dans les différents schémas, lors des mesures de vitesses initiales:

a) *Fixation séquentielle au hasard, avec approximation du quasi-équilibre :*

- Un analogue de A est compétitif vis-à-vis de A (sa fixation est exclusive de celle de A); non compétitif vis-à-vis de B (il peut s'associer à l'enzyme, que B soit fixé ou non).
- Un analogue de B est non compétitif vis-à-vis de A, compétitif vis-à-vis de B.

b) *Fixation séquentielle ordonnée, avec approximation du quasi-équilibre, A étant le premier substrat :*

- Un analogue de A est compétitif vis-à-vis de A et vis-à-vis de B (un excès de B empêche la fixation de l'inhibiteur par déplacement d'équilibre).
- Un analogue de B est un-compétitif vis-à-vis de A (la forme d'enzyme sur laquelle il se fixe devient très minoritaire lorsque la [A] tend vers 0) et compétitif vis-à-vis de B.

c) *Fixation séquentielle ordonnée, avec approximation de l'état stationnaire, A étant le premier substrat :*

- Un analogue de A est compétitif vis-à-vis de A, non compétitif vis-à-vis de B (l'excès de B n'empêche la fixation de l'analogue).
- Un analogue de B est un-compétitif vis-à-vis de A, compétitif vis-à-vis de B.

d) *Mécanisme ping-pong :*

- Un analogue de A est compétitif vis-à-vis de A, un-compétitif vis-à-vis de B (la forme d'enzyme sur laquelle il se fixe devient très minoritaire lorsque la [B] tend vers 0).
- Un analogue de B est un-compétitif vis-à-vis de A, compétitif vis-à-vis de B.