

## Chapitre VII - Cinétique enzymatique à deux substrats

### Introduction

Les réactions enzymatiques à un seul substrat sont rares. Les enzymes catalysent des réactions entre 2 ou 3 substrats. Dans les réactions à deux substrats, il peut y avoir ou non la formation d'un complexe ternaire entre l'enzyme et les deux substrats, suivant le chemin réactionnel. 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.

### 7.1 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.

### 7.2 - Etude des vitesses initiales de la réaction :

Les mécanismes déterminant les réactions enzymatiques à deux (02) substrats(S) peuvent être subdivisés en deux catégories :

\* **Mécanismes séquentiels** (ou à simple déplacement) et

\* **Mécanisme non séquentiel** : système où un produit est relargué entre les additions successives des substrats exemple : système à double déplacement dit "ping-pong".

#### 7.2.1. 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).

#### 7.2.1.1 - Mécanisme bibi ordonné

Lorsqu'une réaction enzymatique implique **deux substrats** ou **un substrat et un coenzyme libre**, les phases de la réaction enzymatique au niveau moléculaire se compliquent : on parle de cinétique à deux substrats.

Dans ce mécanisme, les deux substrats se combinent avec l'enzyme par un ordre bien déterminé.

Pour certaines enzymes :

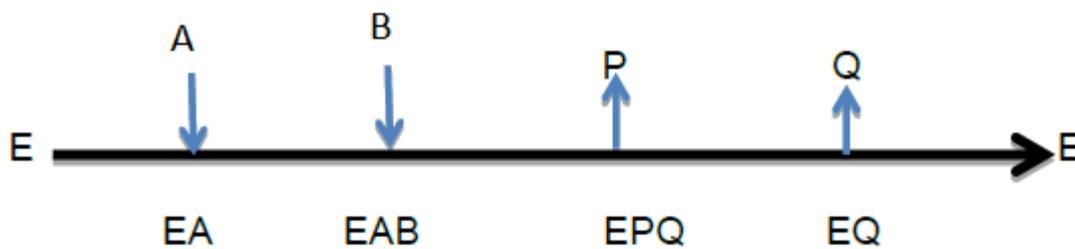
- il se forme d'abord un premier complexe entre le premier substrat **A** et l'enzyme.

-Ce complexe Enzyme-Substrat **A** forme ensuite un complexe avec le second substrat pour donner un complexe ternaire : **Enzyme-Substrat A-Substrat B**.

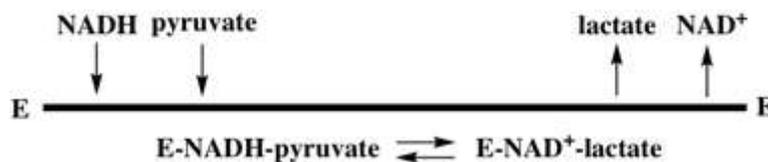
-Ce complexe ternaire est alors transformé par l'action de l'enzyme en un complexe Enzyme-Produit **Y**-Produit **Z** qui se dissocie en libérant dans l'ordre le produit **Y** et le produit **Z**.

L'enzyme libre n'ayant pas d'affinité pour le substrat B, le complexe ne peut pas se former dans un ordre différent : c'est ce qui justifie l'appellation **bi bi ordonné** qu'on donne à ce mécanisme illustré ci-dessous : On symbolise la

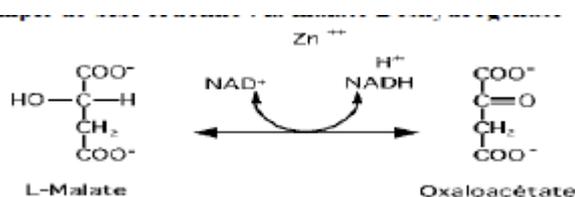
réaction enzymatique suivant la présentation de Cleland à l'aide d'un trait horizontal, alors que les flèches symbolisent les substrats et les produits au cours du cycle de la réaction.



Ce mode de fixation est très fréquent dans les réactions de déshydrogénases par exemple la réaction suivante :



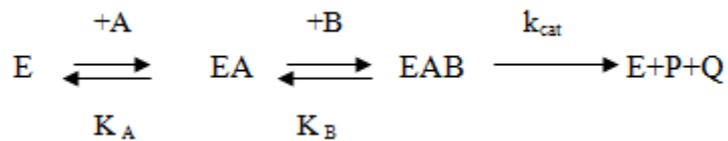
Exemple de BiBi ordonné : enzyme malate déshydrogénase



La malate déshydrogénase est une enzyme, catalyse l'oxydation du malate en oxaloacétate en réduisant simultanément un coenzyme  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$ .

• Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type **bi bi ordonné** : l'enzyme n'a pas d'affinité pour le malate si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme  $\text{NAD}^+$  en un premier complexe ; puis le complexe ternaire **Enzyme- $\text{NAD}^+$ -Malate** se transforme en un complexe Enzyme- $\text{NADH}$ -Oxaloacétate ; ce dernier complexe se dissocie en libérant l'oxaloacétate puis le  $\text{NADH}$ . (forme réduite du  $\text{NAD}^+$ )

Le mécanisme de cette réaction est le suivant :



$K_A$  et  $K_B$  représentent les constantes d'équilibre des deux premières étapes :

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \qquad K_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

Dans le cas où  $[A]$  est constante et  $[B]$  variable on obtient l'équation de vitesse suivante :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A \cdot K_B}{[A][B]}}$$

Soit en double inverse :

A) En cas la  $[A]$  est constante on obtient l'équation suivante :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[B]} \left( K_B + \frac{K_A}{[A]} \cdot K_B \right) + \frac{1}{V_{max}}$$

### Présentation graphique primaire de l'équation de double inverse

On trace  $1/V = f(1/[B])$  pour différentes concentrations de A, on obtient un ensemble de droites se coupant sur l'axe des ordonnées. Du moment que B ne se fixe que sur le complexe EA, 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 (**Figure. 1**).

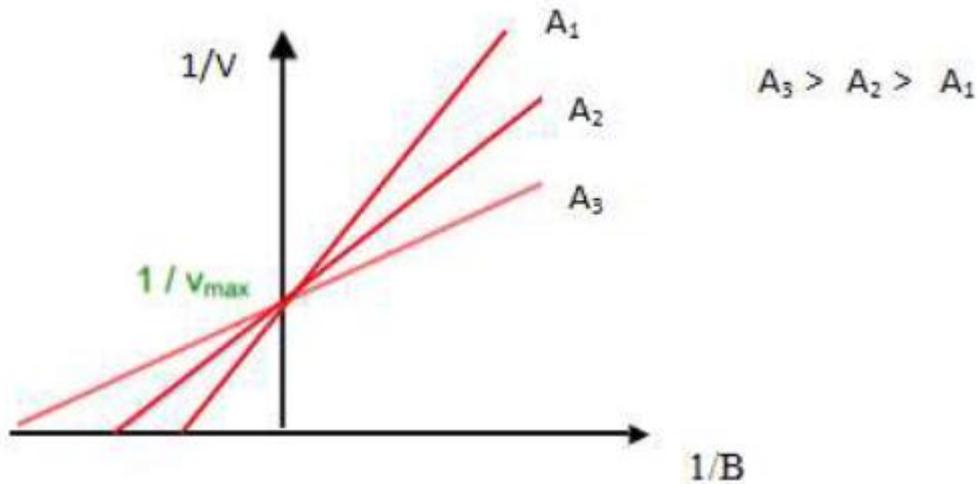


Figure 1. Représentation Primaire :  $1/V = f(1/B)$

Puis on trace  $1/V = f(1/A)$  pour différentes concentrations de B, on obtient un ensemble de droites se coupant sur l'axe des ordonnées. Du moment que B ne se fixe que sur le complexe EA, 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 (Figure. 2).

On met :  $[B] = Cte$  et la représentation graphique se fait en fonction de A (Figure.2)

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[A]} \left[ \frac{K_A \cdot K_B}{[B]} \right] + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_B}{[B]} \right)$$

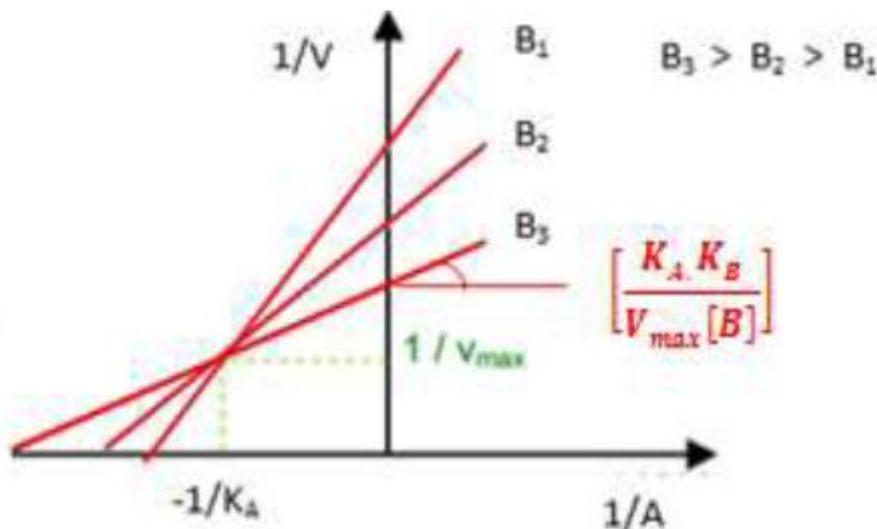
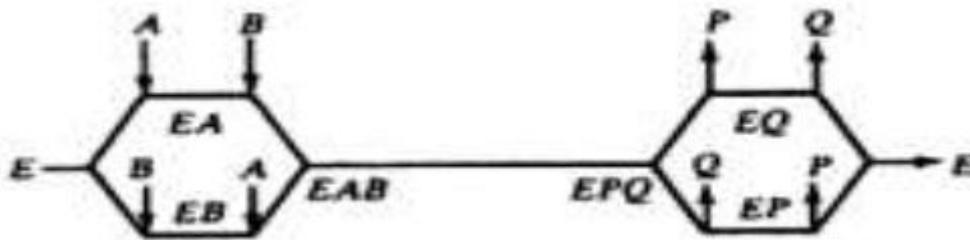


Figure2. Représentation Primaire :  $1/V = f(1/A)$

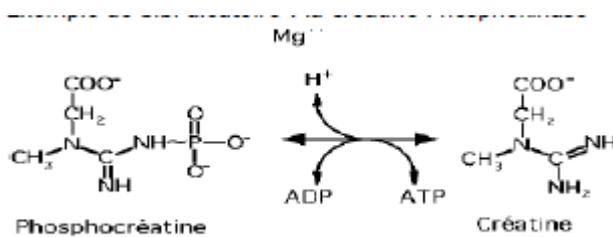
### 7.2.1.2. Mécanisme au hasard ou non ordonné (aléatoire)

Les 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). La réaction implique l'existence de quatre constantes d'équilibre **KA, KB, K'A** et **K'B**. Dans ce mécanisme, la fixation des deux substrats peut être soit dépendante ou indépendante. Dans le premier cas(**dépendante**), le plus fréquent, l'association de **A** et **B** à l'enzyme dépend l'une de l'autre alors que dans le second cas(**indépendante**), l'association de A et B à l'enzyme est indépendante.

La représentation de ce mécanisme réactionnel selon Cleland est la suivante :



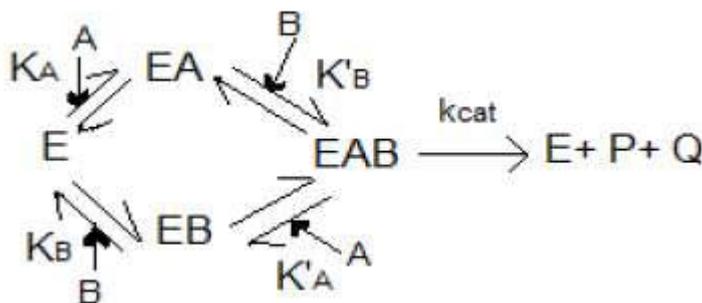
Exemple du mécanisme BiBi Aléatoire : la créatine phosphokinase



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.

**A). Association dépendante :** C'est-à-dire que la fixation de **A** modifie l'affinité de l'enzyme pour B et réciproquement



$$v = k[EAB]$$

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \qquad K'_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

$$K_B = \frac{[E][B]}{[EB]} \qquad K'_A = \frac{[EB][A]}{[EAB]}$$

$K_A$  : constante de dissociation de EA ;  $K_B$  : constante de dissociation de EB  
 $K'_A$  : constante de dissociation de EAB ;  $K'_B$  : constante de dissociation de EAB  
 Pour chaque concentration de A ou de B, la vitesse en fonction de A ou de B suit la loi de Michaelis et la vitesse maximale est obtenue lorsque l'enzyme est saturé en A et en B:

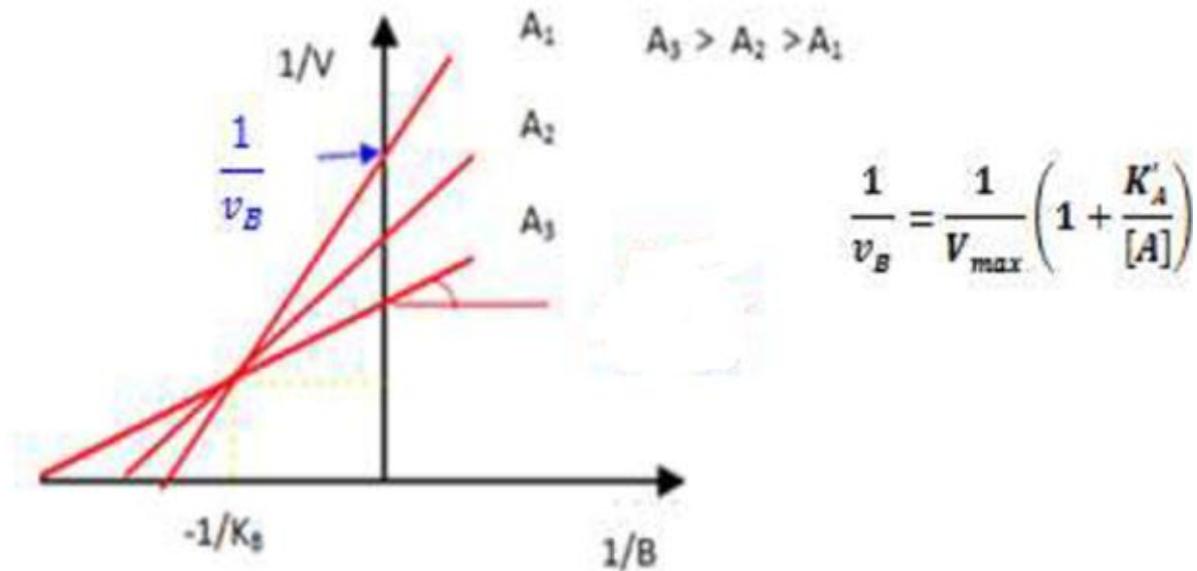
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K'_A}{[A]} + \frac{K'_B}{[B]} + \frac{K_A K'_B}{[A][B]} \right)$$

### Représentations graphiques :

A )- [ A ] = constante et [B] variable  $1/v = f(1/[B])$  permet de tracer la **figure3**.

$$\frac{1}{v} \text{ en fonction de } \left(\frac{1}{[B]}\right) : \frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} * \frac{1}{[B]} \left( K'_B + \frac{K_A K'_B}{[A]} \right) + \frac{1}{v_{max}} \left( 1 + \frac{K'_A}{[A]} \right) \dots\dots\dots 1$$

$$\frac{1}{v} \text{ en fonction de } \left(\frac{1}{[A]}\right) : \frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} * \frac{1}{[A]} \left( K'_A + \frac{K_A K'_B}{[B]} \right) + \frac{1}{2v_{max}} \left( 1 + \frac{K'_B}{[B]} \right) \dots\dots 2$$



**Figure 3. Représentation Primaire :  $1/V = f(1/B)$**

Quand on prend  $[B] = \text{constante}$ , on trace la représentation primaire  $1/v = f(1/A)$

- Les graphes primaires permettent de déterminer de nouvelles valeurs
- Ces valeurs sont reportées dans le graphe secondaire pour le substrat A (**Figure 4**) et le graphe secondaire pour le substrat B.
- Elles permettent de déterminer les paramètres cinétiques

A l'intersection de chaque droite avec l'axe des ordonnées, on lit  $1/[B]=0$  dans l'équation ci-dessus( **équation 1**)

$$\text{On obtient } \frac{1}{v_B} = \frac{1}{v_{\max}} \left( 1 + \frac{K'_A}{[A]} \right)$$

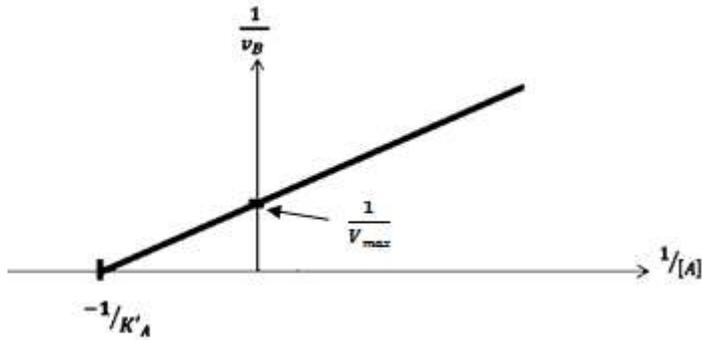
$$\text{Donc } \frac{1}{v_B} = \frac{K'_A}{v_{\max}} * \frac{1}{[A]} + \frac{1}{v_{\max}} \text{ (équation de la forme } y = ax + b)$$

$$\text{Quand } \frac{1}{[A]} = 0 \longrightarrow \frac{1}{v_B} = \frac{1}{v_{\max}}$$

$$\text{Quand } \frac{1}{v_B} = 0 \longrightarrow \frac{1}{[A]} = -\frac{1}{K'_A}$$

Si on porte  $\frac{1}{v_B} = f\left(\frac{1}{[A]}\right)$ , on obtient la représentation secondaire (**Figure 4**) qui permet de mesurer  $V_{\max}$  et  $K_B$ .

**Par la même façon on trace la représentation secondaire pour  $\frac{1}{v_A} = f\left(\frac{1}{[B]}\right)$**



**Figure 4. Représentation secondaire  $1/v_B = f(1/A)$**

Deux cas se présentent :

- Premier cas : Lorsque l'ordonnée est positif par rapport au point d'intersection :

o Si  $K'_A < K_A$  , la fixation de B augmente l'affinité de EB pour A

o Si  $K'_B < K_B$  , la fixation de A augmente l'affinité de EA pour B

Et donc on obtient une fixation dépendante positive car la fixation du premier substrat facilite la fixation du second substrat.

- Deuxième cas : Lorsque l'ordonnée est négatif par rapport au point d'intersection :

o Si  $K'_A > K_A$  , la fixation de B diminue l'affinité de EB pour A

o Si  $K'_B > K_B$  , la fixation de A diminue l'affinité de EA pour B

**B). Association indépendante :**

Dans le cas d'une fixation indépendante :  $K_A = K'_A$  et  $K_B = K'_B$

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} = \frac{[EB][A]}{[EAB]}$$

$$K_B = \frac{[E][B]}{[EB]} = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]} \right)$$

$\frac{1}{v}$  en fonction de  $\left(\frac{1}{A}\right)$ :  $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[A]} \left( K_A + \frac{K_A K_B}{[B]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{K_B}{[B]} + \frac{1}{V_{max}}$  (Figure 5)

$$\frac{1}{v} \text{ en fonction de } \left(\frac{1}{B}\right): \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[B]} \left(K_B + \frac{K_A}{[A]}\right) + \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{K_A}{[A]} + \frac{1}{V_{max}} \text{ (Figure 7)}$$

Représentations graphiques :

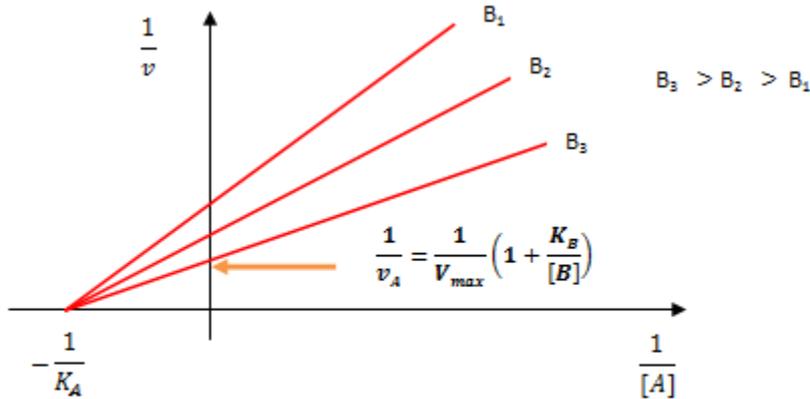


Figure 5. Représentation Primaire :  $1/v = f(1/A)$

Une représentation secondaire (Figure 6) est effectuée depuis les points d'intersection avec l'axe des ordonnées dans la figure 5 et permet de tracer le graphe selon l'équation :

$$\frac{1}{v_A} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

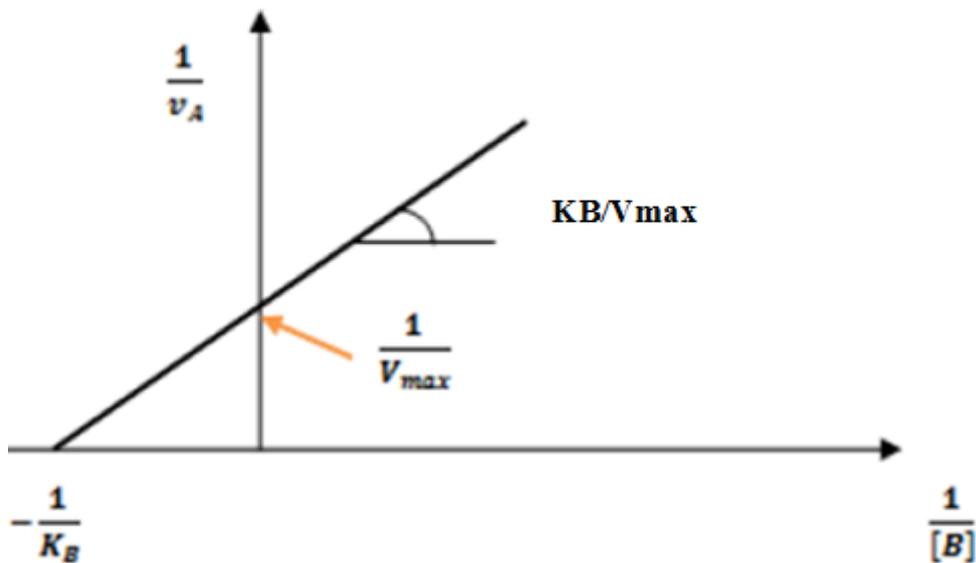


Figure 6. Représentation secondaire  $1/v_A = f(1/B)$

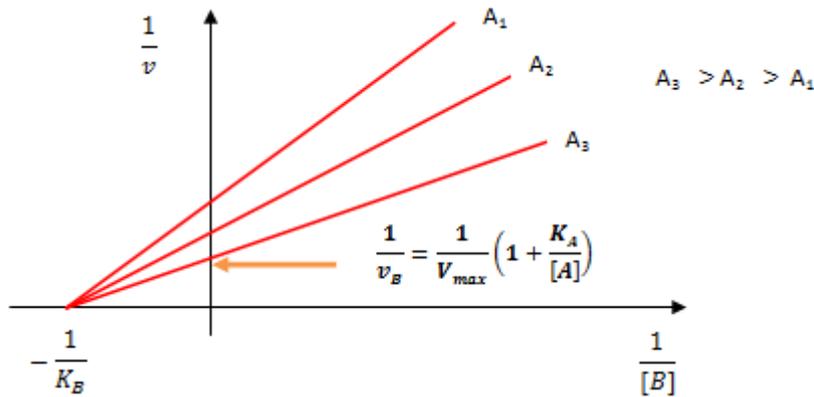


Figure 7. Représentation primaire  $1/v$   $f= (1/B)$

### 7.2.2. Réactions à double déplacements impliquant la formation d'un complexe binaire

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.

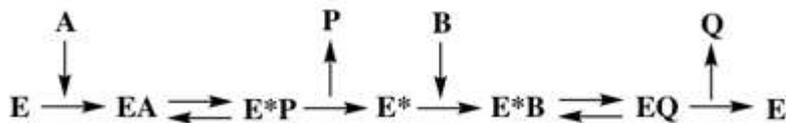
#### 7.2.2.1. Mécanisme Pin-Pong (appartient aux réactions ordonnées)

C'est un mécanisme séquencé, où la réaction sera catalysée en deux temps.

**a)**-Le complexe formé entre l'enzyme et le substrat A est transformé d'abord en **enzyme + produit Y**, mais l'enzyme **E** a été chimiquement modifiée en enzyme **E\*** au cours de cette première partie de la réaction.

**b)**-L'enzyme **E\*** ayant une affinité pour le deuxième substrat, va former un deuxième complexe **Enzyme E\*-Substrat B** qui va être transformé en **complexe Enzyme-Produit Z** dans cette seconde partie de la réaction où l'enzyme va retrouver sa forme chimique **initiale**. Il n'y a jamais de complexe ternaire dans un tel mécanisme, mais l'enzyme (ou un coenzyme lié à sa structure) subit une transformation réversible et provisoire qui permet le lien entre les deux substrats selon la séquence réactionnelle illustrée ci-dessous.

C'est ce qui justifie l'appellation de ping-pong qu'on donne à ce mécanisme.



Si on considère uniquement la réaction dans le sens de gauche à droite et on se place dans les conditions initiales qui permettent de négliger la réaction inverse, on aboutit à l'équation suivante On a

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}}$$

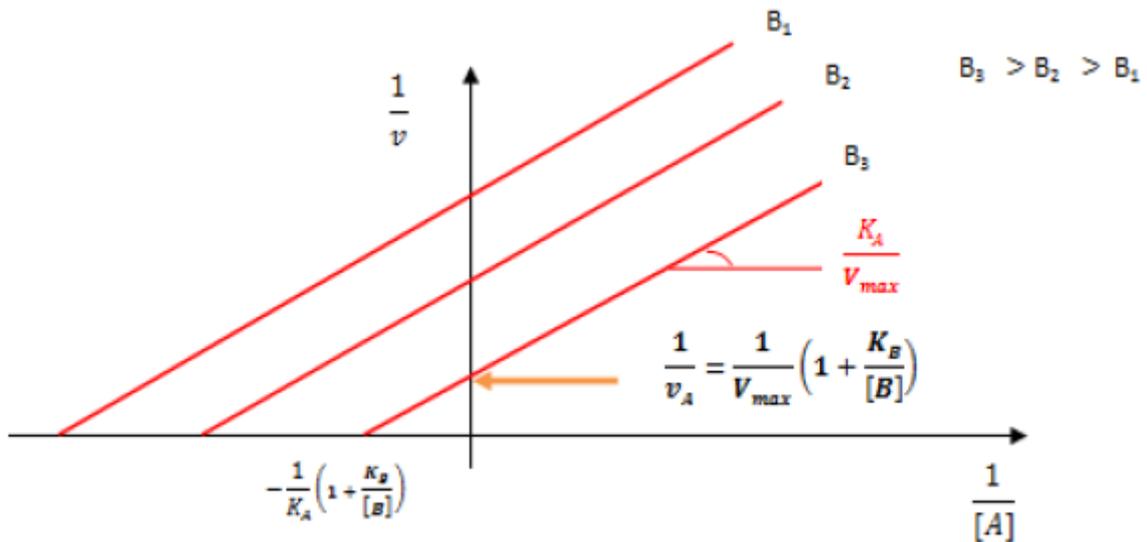
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} \right)$$

Soit en double inverse :

**Présentations graphiques primaires :**

On trace  $1/v = f(1/[A])$  pour différentes  $[B]$ , on obtient un ensemble de droites parallèles de pente  $K_A / V_{max}$  à partir de l'équation suivante :

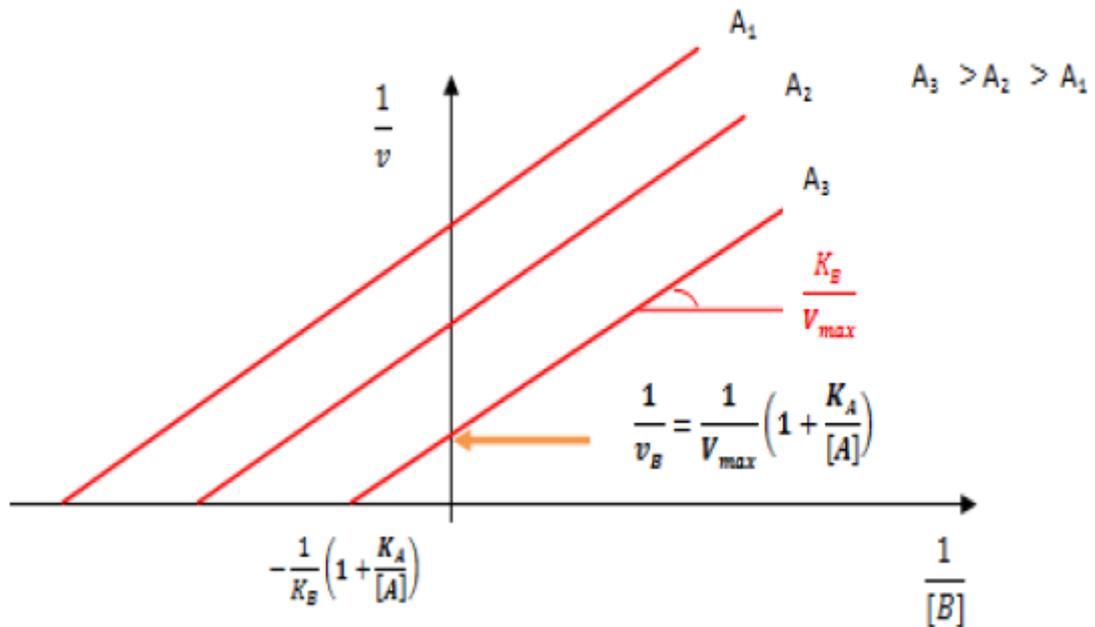
$$\frac{1}{v} = \frac{K_A}{V_{max}} * \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_B}{[B]} \right)$$



**Figure 8. Représentation primaire  $1/v$  f  $(1/A)$**

Puis on trace  $1/v = f(1/[B])$  pour différentes  $[A]$ , on obtient un ensemble de droites de pente  $K_B / V_{max}$  à partir de l'équation suivante :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_B}{V_{max}} * \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_A}{[A]} \right)$$



**Figure 9. Représentation primaire  $1/v$  f ( $1/B$ )**

Puis on lit les valeurs de  $1/V$  aux points d'intersection avec l'axe des ordonnées pour chaque concentration ( soit en A ou en B). Ensuite on trace la présentation secondaire.

### Présentation secondaire

A partir de  $1/v = f([A])$  pour différentes concentration de  $[B]$ , on lit les valeurs de  $1/v$  aux points d'intersection avec l'axe des ordonnées et on trace la valeur de ces  $1/v$  en fonction des valeurs de  $1/[B]$ .

$$\frac{1}{V} = \frac{K_A}{V_{max}} * \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

**A l'intersection de chaque droite avec l'axe des ordonnées , on lit  $1/[A]=0$  dans l'équation ci-dessus**

$$\text{Donc on obtient : } 1/V_A = \frac{1}{v_{max}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

$$\text{Donc } \frac{1}{v_A} = \frac{K_B}{v_{max}} * \frac{1}{B} + \frac{1}{v_{max}} \text{ ( de la forme } y = ax + b)$$

Quand  $1/B = 0$  alors  $1/V_A = 1/v_{max}$

Quand  $1/V_A = 0$  alors  $1/[B] = -1/K_B$

Si on porte  $1/v_A = f(1/B)$ , on obtient la représentation secondaire (**Figure 10**), celle-ci permet de mesurer  $V_{max}$  et  $K_B$



L'ASAT catalyse le transfert de la fonction amine de l'aspartate vers l' $\alpha$ -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' $\alpha$ -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.