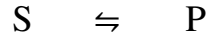


## Cinétique enzymatique à deux substrats

### I. Introduction :

#### a) Réaction enzymatique à un seul substrat :



Ces réactions à un seul substrat et un seul produit en réalité de telle réaction rares et restent limitées à quelques réaction d'isomérisation ou des réactions d'épimérase ou des mutase

Exemple :



Dihydroxyacéton -3- phosphate

Glyceraldehyde -3- phosphate

**Page facebook ; Domaine SNV : Biologie, Agronomie, Science Alimentaire, Ecologie**

Ce type de réaction est dit (**uni-uni**) c-à-d un système implique un seul substrat et un seul produit

#### b) Réaction enzymatique à deux substrats

- Elle représente la majorité des réactions enzymatiques ;
- Ces réactions donnent de cinétique plus complexe que les réactions à un seul substrat ;
- L'étude cinétique des réactions enzymatique à deux substrat à pour but de déterminer, l'ordre de fixation des substrats, les constantes cinétique caractérisant la fixation de chacun d'eux en présence et en absence de l'autre ;
- La vitesse maximale de la réaction (qui est mesurée quand la concentration des deux substrats est saturante ;

Selon les combinaisons de l'enzyme on distingue deux classes principales de réaction enzymatique

- *La première classe* correspond à des situations qui n'impliquent pas un ordre précis, obligatoire d'addition de substrat fixation aléatoires au hasard ;

- La deuxième classe implique des mécanismes avec un ordre obligatoire d'addition ou de fixation de substrat (mécanisme ordonné ou séquencé), deux mécanismes peuvent être définis : le **mécanisme séquencé ordonné**, le **mécanisme ping-pong**.

Un système de nomenclature (bi-bi) est un système impliquant deux substrats et deux produits.

Un système appelé (bi-uni) est un système impliquant deux substrats et un produit.

## II. Association au hasard (aléatoire)

Mécanisme réactionnel avec fixation au hasard : dans ce mécanisme, chacun des deux substrats est susceptible de s'associer à l'enzyme dans n'importe quel ordre c-à-d que l'un ou de l'autre des deux substrats) on distingue deux cas :

Ou bien les associations de substrat (A) et de substrat (B) à l'enzyme sont dépendantes, c-à-d que la fixation de A modifier l'affinité de l'enzyme pour fixé B et réciproquement,

Ou bien, elles sont indépendantes, c-à-d l'association de l'un des substrats s'effectue de la même manière en présence ou en absence de l'autre substrat.

### Représentation de Cleland

La manière schématique de représentation des mécanismes des réactions à deux ou plusieurs substrat a été introduite par Cleland en 1963, dans ce système, les différents états de l'enzyme sont décrits une ligne horizontale et des flèches verticales sont utilisées pour représenter la fixation des substances et la libération de produits.

Réaction :

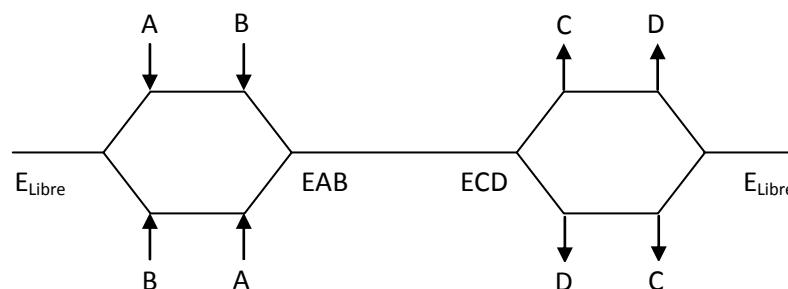
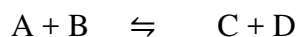
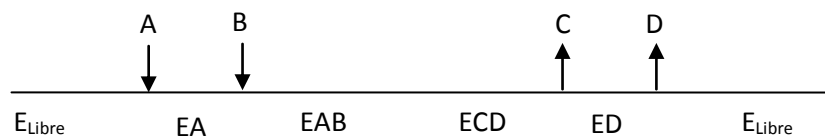


Schéma de la représentation du Cleland 1963

### III. Association ordonnée ou séquencée

Mécanisme ordonné ou séquencée ou bien : schéma réactionnelle avec fixation ordonnée ou séquencée,

- L'un des substrats doit se fixer en premier sur l'enzyme libre et permet alors la fixation de la deuxième substrat, avec un ordre obligatoire.
- Dans ce cas, la fixation obligatoire de A ensuit B pour donnée un complexe ternaire EAB, la suite de la réaction conduit à la libération de C issu de A et la libération de D issu de B.

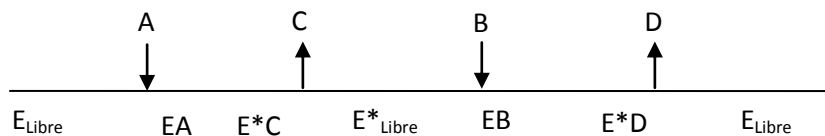


### IV. Mécanisme Ping-Pong

Schéma réactionnel de type Ping-Pong dans ce mécanisme, un premier substrat se fixe sur l'enzyme qui donne naissance à un premier produit, en suite le deuxième substrat se fixe pour donné naissance au deuxième produit,

Après fixation et transformation de A en C l'enzyme se trouve dans un état chimique modifier puisque le premier substrat a laisse un atome au même site A de l'enzyme ou plusieurs atomes ou groupement fonctionnelle dans la deuxième étape de la réaction cet atome, ces atomes ou groupements fonctionnelle sont transférées de l'enzymes au deuxième substrat

$E^*$  structure de l'enzyme modifiée



## Exemples

a) Mécanisme ordonné malate deshydrogénase

b) Mécanisme aléatoire (au hasard) créatine kinase

c) Mécanisme Ping-Pong

Toutes les réactions de transaminase procèdent par le mécanisme Ping-Pong et ont pour coenzyme le pyridoxal phosphate.

## V. Equation de vitesse initiale

### a- mécanisme aléatoire

- fixation dépendante

Selon l'hypothèse de quasi-équilibre l'équation de la vitesse de formation des produits la

$V_i = K [ES]$  réaction a un substrat

$V_i = K [EAB]$  réaction a deux substrats

### Schéma réactionnel



Dans ces deux cas on parle d'affinité et donc des  $K_m$

### Equation de conservation d'enzyme

$$[Et] = [E \text{ libre}] + [EB] + [EA] + [EAB]$$

En condition de vitesses initiales  $[C]$  et  $[D]$  sont négligeable

Il faut exprime  $[EA]$  et  $[EB]$  en fonction de celle de complexe productif  $[EAB]$

$$V_i = V_{max} / (1 + K_{mA} / [A] + K_{mB} / [B] + K_{sA} \cdot K_{mB} / [AB])$$

$$1 / V_i = (1 / V_{max}) (1 + K_{mA} / [A] + K_{mB} / [B] + K_{sA} \cdot K_{mB} / [AB])$$

- **Fixation indépendante**

Cette représentation graphique permet de déterminer le mécanisme d'association (de fixation),

Si les sites de fixation des deux substrats sont suffisamment distincts et s'il n'y a pas d'interaction entre eux la fixation de l'un n'est affectée par la fixation de l'autre par l'enzyme

**Schéma réactionnel**



Avec  $K_{SA} = K_{mA}$  et  $K_{SB} = K_{mB}$

La fixation de B sur l'enzyme libre se fait avec la même affinité que celle de la fixation de B sur le complexe EA, A se fixe à l'enzyme en présence ou en absence de B c-à-d que l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de A ne change pas

**Equation de conservation d'enzyme**

$$[Et] = [E \text{ libre}] + [EB] + [EA] + [EAB]$$

$$V_i = K [EAB]$$

Paramètres cinétique :  $K_{mA}$ ,  $K_{mB}$  et  $V_{max}$  ?

$$V_i = V_{max} / (1 + K_{mA} / [A] + K_{mB} / [B] + K_{SA} \cdot K_{mB} / [AB])$$

$$1 / V_i = (1 / V_{max}) (1 + K_{mA} / [A] + K_{mB} / [B] + K_{mA} \cdot K_{mB} / [AB])$$

### b- Mécanisme séquencé (ordonné)

- Schéma réactionnel



$$V_i = V_{\max} / (1 + K_{m_B} / [B] + K_{m_A} \cdot K_{m_B} / [AB])$$

$$1/V_i = (1/V_{\max}) (1 + K_{m_B} / [B] + K_{m_A} \cdot K_{m_B} / [AB])$$

- $K_{m_A}$ ,  $K_{m_B}$  et  $V_{\max}$  ?

Courbe  $1/V_i = f(1/[A])$  pour différentes concentration de B

Courbe  $1/V_i = f(1/[B])$  pour différentes concentration de A

### c- Mécanisme ping pong

- Schéma réactionnel



$$V_i = V_{\max} / (1 + K_{m_B} / [B] + K_{m_A} / [A])$$

$$1/V_i = (1/V_{\max}) (1 + K_{m_B} / [B] + K_{m_A} / [A])$$

$K_{m_A}$ ,  $K_{m_B}$  et  $V_{\max}$

Courbe  $1/V_i = f(1/[A])$  pour différentes concentration de B

Courbe  $1/V_i = f(1/[B])$  pour différentes concentration de A

