

Cours d'Enzymologie



Destiné aux étudiants **L3 Génétique**

Année universitaire 2022-2023

Conçu par Dr. BECHKRI S.
Maitre de Conférences catégorie A
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Université Frères Mentouri Constantine 1

XII.2. Les réactions à plusieurs substrats

Les réactions enzymatiques à un seul substrat sont rares. La majorité des cinétiques enzymatiques *in vivo* répondent à un mécanisme impliquant deux ou plusieurs substrats.

XII.2.1. Nomenclature des systèmes

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

- **Bi Uni** (ou Uni Bi) : système impliquant 2 substrats et 1 produit (ou l'inverse).
- **Bi Bi** : système impliquant 2 substrats et 2 produits.
- **Iso** : système impliquant une isomérisation (changement de conformation) de l'enzyme.

XII.2.2. Mécanismes des réactions enzymatiques à deux (02) substrats

Plus de la moitié (environ 60%) de toutes les réactions biochimiques connues impliquent deux substrats : $A + B \longrightarrow P + Q$

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
- La vitesse maximale de la réaction qui est mesurée quand les deux substrats sont à concentration saturante.

XII.2.3. Catégories des réactions enzymatiques à deux substrats

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

- Mécanismes séquentiels (ou à simple déplacement)
- Mécanismes non séquentiels (ou à double déplacement).

a. Mécanismes séquentiels

On parle de mécanisme séquentiel lorsque la réaction enzymatique n'intervient qu'après formation d'un complexe ternaire entre l'enzyme et les deux substrats. Tous les substrats doivent se fixer sur l'enzyme avant qu'aucun produit ne soit libéré. La fixation des substrats peut être :

- Ordonnée
- Au hasard (ou aléatoire).

➤ Mécanisme Bi-Bi ordonné

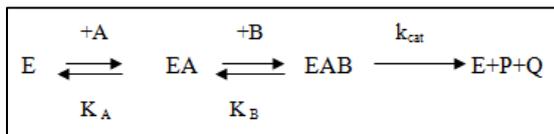
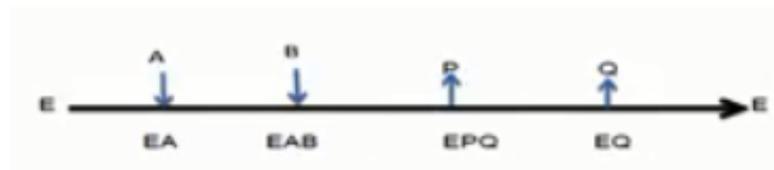
Dans ce mécanisme, il existe un ordre obligatoire de fixation : l'un des substrats se fixe nécessairement en premier lieu avant l'autre. Généralement, le premier substrat est représenté par le coenzyme libre. Dans ce cas :

- 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.

Ainsi, 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 BiBi ordonné qu'on donne à ce mécanisme.

Notation de Cleland (1963) : on représente la réaction enzymatique à l'aide d'un trait horizontal. Les flèches symbolisent les substrats et les produits au cours de la réaction.

Dans un mécanisme Bi Bi ordonné :

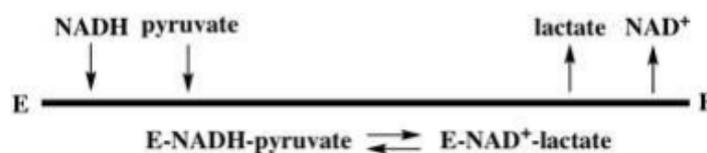


$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad K_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

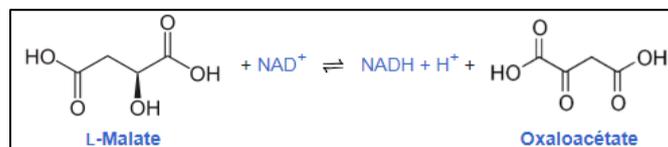
K_A et K_B : constantes de dissociation des complexes [EA] et [EAB] respectivement.

Exemples des réactions de déshydrogénases

Exemple 1 : réaction de la lactate déshydrogénase



Exemple 2 : réaction de la malate déshydrogénase



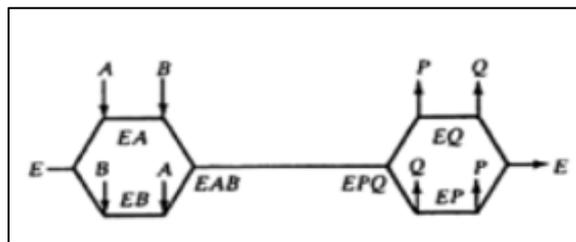
La malate déshydrogénase est une enzyme qui catalyse l'oxydation du malate en oxaloacétate en réduisant simultanément un coenzyme NAD^+ en $NADH$. Cette réaction se déroule selon un mécanisme de type BiBi ordonné : l'enzyme n'a pas d'affinité pour le malate si elle n'est pas préalablement associée au 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 NADH.

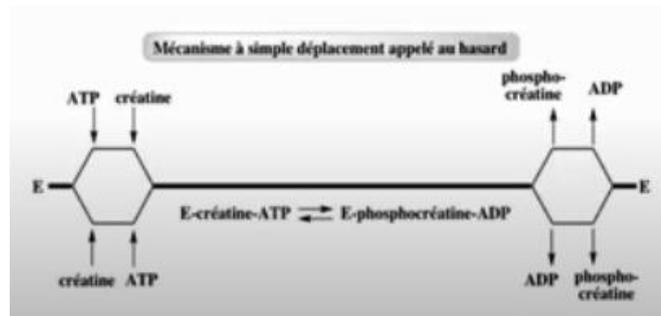
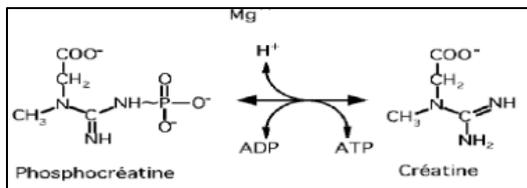
➤ **Mécanisme au hasard ou non ordonné (aléatoire)**

Dans ce mécanisme, les substrats peuvent se lier dans un ordre indifférent, il n'y a pas de fixation privilégiée de l'un ou l'autre des deux substrats, tant qu'ils finissent par être au même moment dans le site actif. Il y a formation d'un complexe ternaire, mais la fixation du substrat et la libération du produit est aléatoire.

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



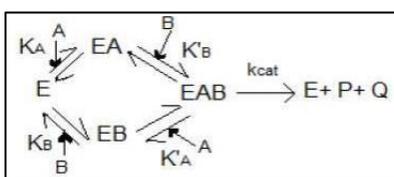
Exemple de la créatine phosphokinase (E.C 2.7.3.2) :



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.

Dans le mécanisme Bi Bi aléatoire, la fixation des deux substrats peut être : dépendante ou indépendante.

- **Association dépendante** (la plus fréquente) : l'association de A et B à l'enzyme dépend l'une de l'autre. C'est-à-dire que la fixation de A modifie l'affinité de l'enzyme pour B et réciproquement



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

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

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 saturée en A et en B.

- **Association indépendante** : l'association de A et B à l'enzyme est indépendante.

$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} = \frac{[EB][A]}{[EAB]}$$
$$K_B = \frac{[E][B]}{[EB]} = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$
$$K_A = K'_A \text{ et } K_B = K'_B$$

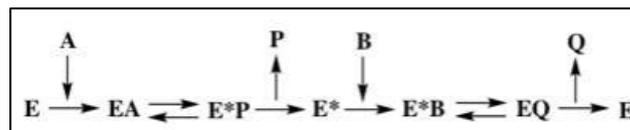
b. Réactions à double déplacements impliquant la formation d'un complexe binaire

Certaines réactions du métabolisme, impliquant deux substrats, se produisent sans que la réaction nécessite la formation d'un complexe ternaire mais mettent en jeu la formation de complexes binaires.

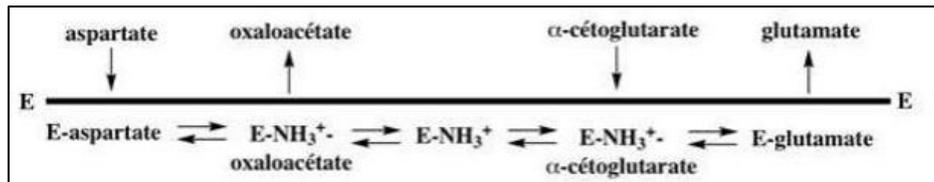
➤ Mécanisme Pin-Pong ou mécanisme à enzyme modifiée

Dans un mécanisme ping pong, un des substrats se fixe et un produit est libéré avant que l'autre substrat ne se fixe et que le deuxième produit ne soit libéré. Il n'y a pas de complexe ternaire. C'est un mécanisme où la réaction sera catalysée en deux temps :

- 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.
- 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 que l'on donne à ce mécanisme.



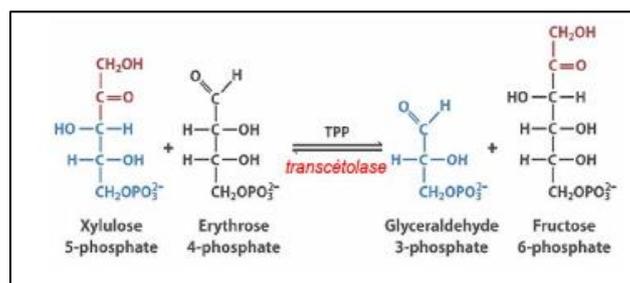
Exemple 1 : Aspartate Aminotransférase (ASAT)



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 un 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 retrouvé leurs structures initiales.

Exemple 2 : Réaction de transfert catalysée par la transcétolase



La transcétolase catalyse une réaction ping pong : le fructose-6-phosphate se fixe en premier et cède un fragment à deux atomes de carbone à l'enzyme, le premier produit de réaction (l'érythrose-4-phosphate) quitte le site actif avant que le deuxième substrat (le glycéraldéhyde-3-phosphate) se fixe et reçoive le fragment à deux atomes de carbone pour former le deuxième produit (le xylulose-5-phosphate).

Remarque : Chacun des substrats interagit avec l'enzyme avec un K_M caractéristique.

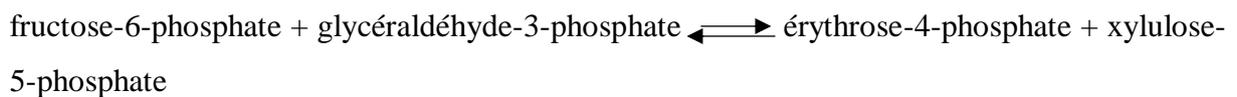
c. Mécanisme particulier : Theorell Chance.

Il adopte les mêmes équations que le mécanisme séquentiel. Le premier produit est relargué par la fixation du dernier substrat. La transformation rapide du complexe ternaire, et donc sa présence en très faible concentration, confère à ce mécanisme une ressemblance avec les réactions à complexes binaires. Un complexe ternaire se forme mais sa décomposition afin de libérer le premier produit est si rapide que la concentration du complexe ternaire est cinétiquement négligeable.

XII.3. Les réactions à plusieurs étapes

Une réaction catalytique peut comporter plusieurs étapes, comme l'illustre la réaction catalysée par la transcétolase, la réaction comporte un intermédiaire dans lequel le fragment à deux atomes de carbone détaché du fructose-6-phosphate, reste fixé à l'enzyme en attendant l'arrivée du deuxième substrat. La réaction à plusieurs étapes de la transcétolase peut être subdivisée en une série d'étapes au mécanisme simple.

Chaque étape de ce processus a ses constantes de vitesse directe et inverse caractéristiques. Par conséquent, k_{cat} pour la réaction globale :



est une fonction complexe de nombreuses constantes de vitesse individuelles (ce n'est que pour une réaction très simple que $k_{\text{cat}} = k_2$). Malgré tout, la signification de k_{cat} , qui est le nombre de turnover de l'enzyme, est la même que pour une réaction à une étape.

Les constantes de vitesse des différentes étapes d'une réaction à plusieurs étapes peuvent parfois être mesurées durant les phases initiales de la réaction, c'est-à-dire avant que l'équilibre ne soit atteint. Cela nécessite des instruments capables de mélanger rapidement les réactifs et de suivre ensuite le mélange réactionnel à des intervalles de temps allant de 1 s à 10^{-7} s.