

# Mécanismes BiBi

# Réactions BiBi (Enzymes michaeliennes)



Par convention A' est l'analogue de A et B' celui de B

**Par exemple, pour une déshydrogénase A et A' seront les deux formes du coenzyme, B et B' les métabolites substrat et produit.**

Pour faire une étude complète de l'activité on fait des préparations correspondant à :

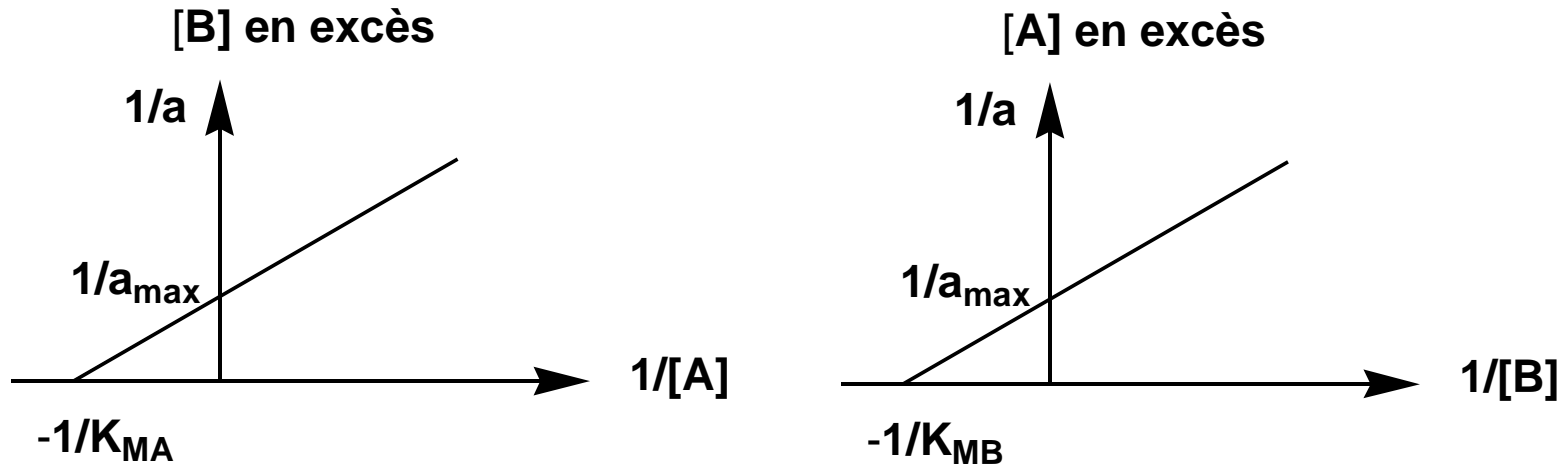
- 5 concentrations de A encadrant  $K_{MA}$  + 1 contenant A en excès
- 5 concentrations de B encadrant  $K_{MB}$  + 1 contenant B en excès

**On obtient ainsi 36 préparations dont on mesure l'activité.**

Pour analyser les résultats, on trace les réseaux de courbes  $1/a=f(1/[A])$  à [B] fixé, saturant ou non et  $1/a=f(1/[B])$  à [A] fixé, saturant ou non.

# Variation de l'activité en fonction des concentrations de A ou B

**l'autre substrat étant en excès**



Le couple enzyme substrat est donc caractérisé par 3 constantes vraies :

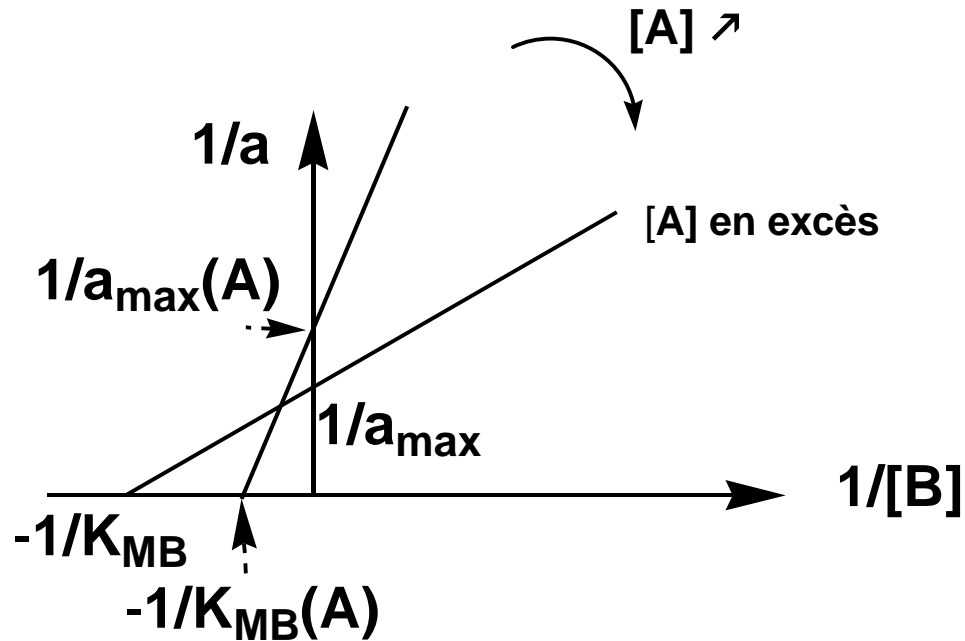
$K_{MA}$ ,  $K_{MB}$ ,  $k_{cat}$

- $a_{\max}$  est l'activité si **A et B sont en excès**
- $K_{MA}$  est la concentration de A pour laquelle l'activité est la moitié de l'activité maximum, **B étant en excès.**
- $K_{MB}$  est la concentration de B pour laquelle l'activité est la moitié de l'activité maximum, **A étant en excès.**
- NB : Une réaction bibi peut être catalysée par une enzyme allostérique. Elle peut aussi être allostérique par rapport à l'un des substrats et michaelienne par rapport à l'autre.

# Variation de l'activité en fonction des concentrations de A ou B

## **l'autre substrat étant hors saturation**

- Allure générale de la courbe  $1/a=f(1/[B])$  à A fixé non saturant.



**Le système est donc caractérisé par les constantes apparentes  $K_{MB}(A)$ ,  $a_{\max}(A)$ .**

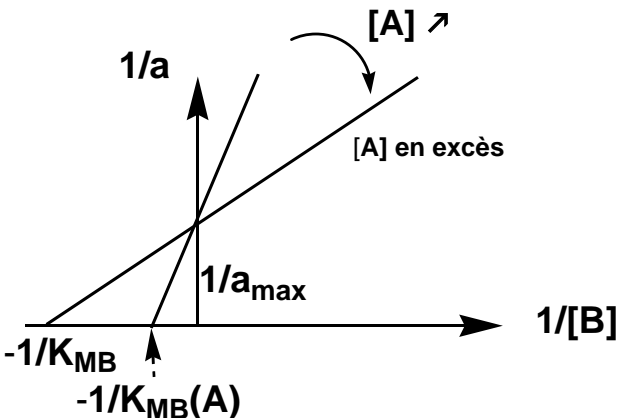
De même, à B fixé non saturant, le système est caractérisé par les constantes apparentes  $K_{MA}(B)$ ,  $a_{\max}(B)$ .

# Variation de l'activité en fonction des concentrations de A ou B

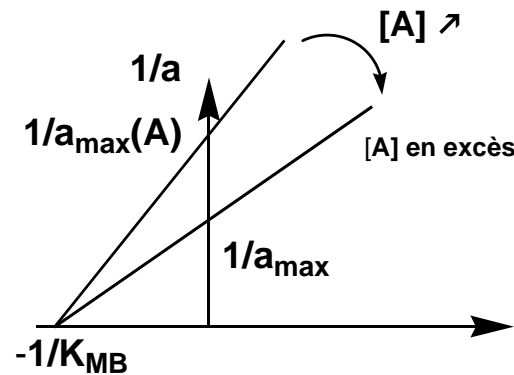
## Cas limites

Le plus souvent les courbes obtenues correspondent à un des 3 cas limites suivants

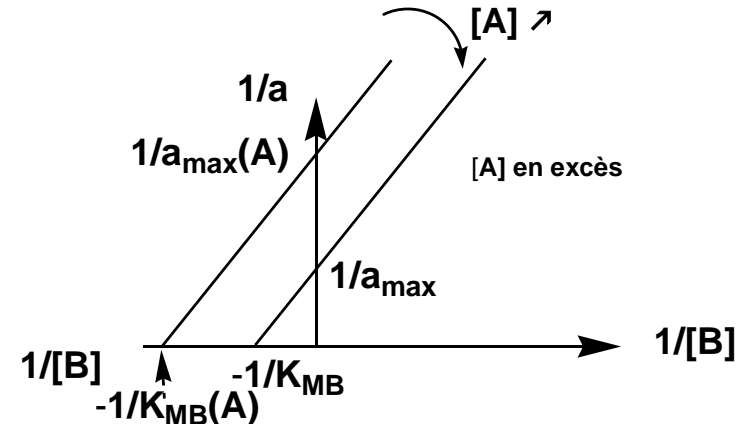
$a_{\max}(A)$  constant



$K_{MB}(A)$  constant



$k_{\text{cat}}(A)/K_{MB}(A)$  constant



**NB : Pour une enzyme donnée, les courbes  $1/a=f(1/[A])$  et  $1/a=f(1/[B])$  peuvent être différentes.**

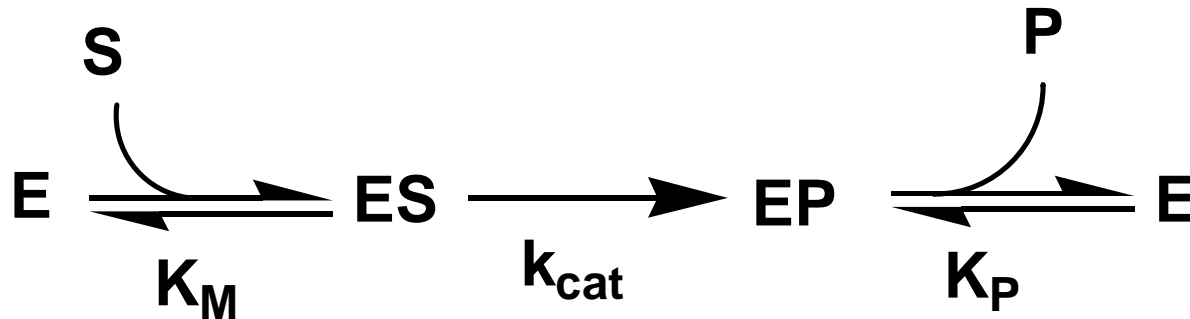
Il y a donc plusieurs mécanismes de fixation de A et B selon les enzymes.

# Mécanismes de fixation

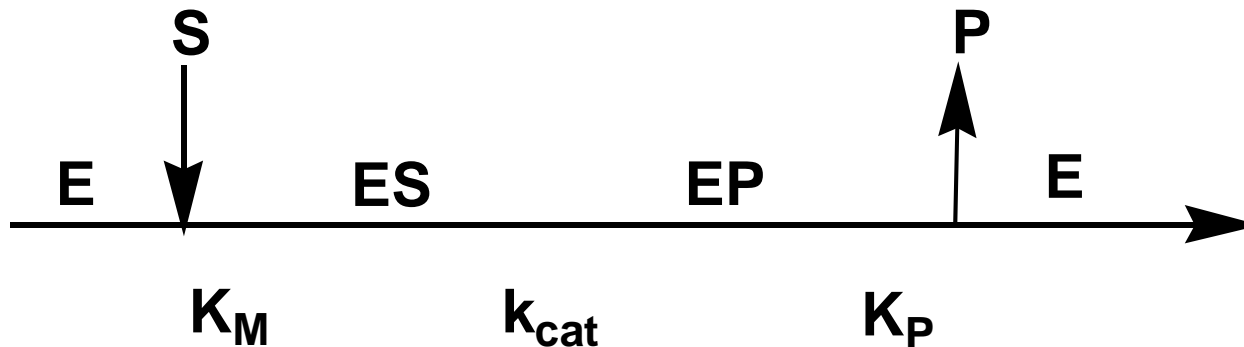
## Représentation de Cleland

Réaction :  $S \rightleftharpoons P$

- Représentation classique :



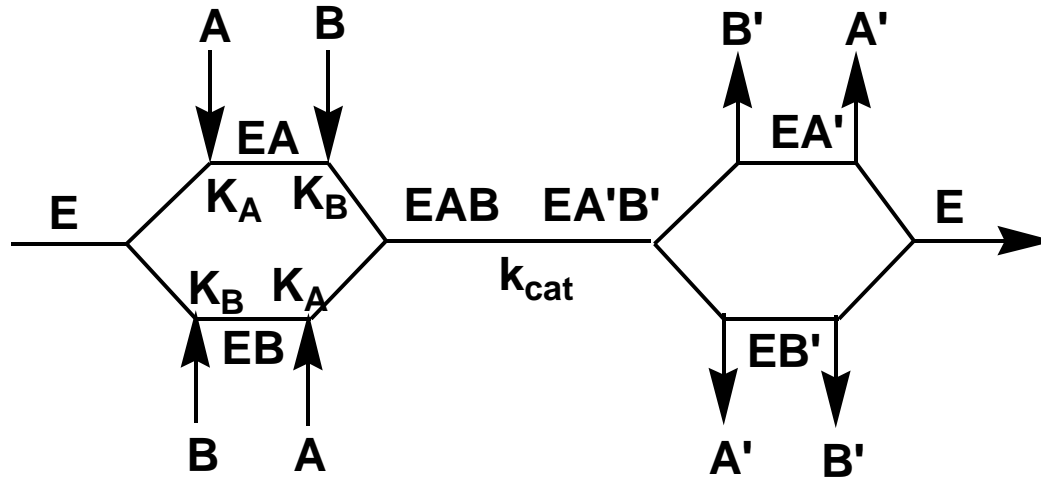
- Représentation de Cleland



# Mécanismes de fixation

- **Mécanisme aléatoire indépendant**

- L'enzyme fixe indifféremment A ou B en premier :



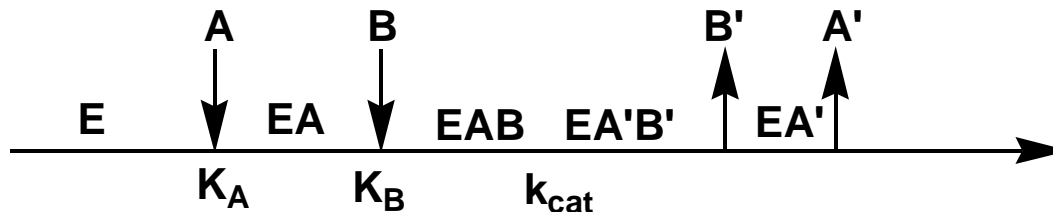
Observation :

$$K_{MA}(B) = K_{MA}$$

$$K_{MB}(A) = K_{MB}$$

- **Mécanisme ordonné**

- L'enzyme fixe A et B dans un ordre déterminé :



Observation

$$k_{cat}(A) = k_{cat}$$

$$K_{MA}(B) = K_{MA}$$

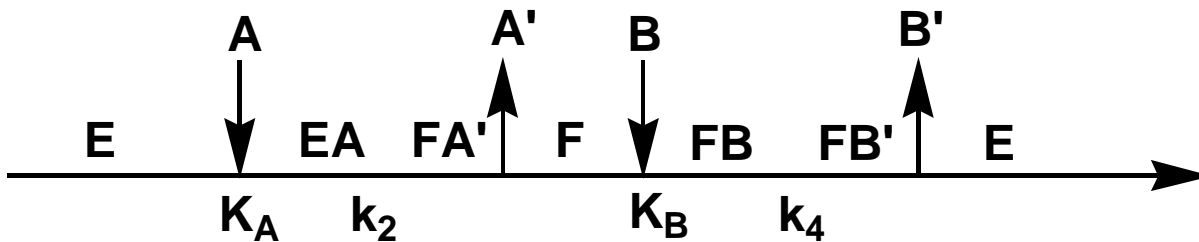
Il y a deux mécanismes ordonnés possibles selon que A ou B se fixe en premier

Il existe un mécanisme intermédiaire dit aléatoire dépendant : les deux chemins existent mais l'un est préférentiel.

# Réactions BiBi

## Mécanismes de fixation (*suite*)

- Mécanisme ping pong



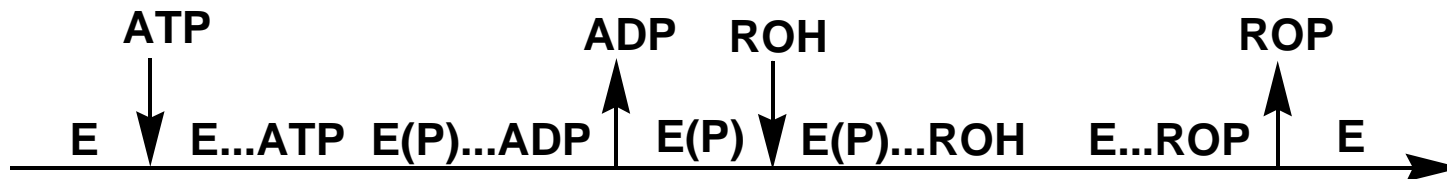
### Observation

$$\frac{k_{\text{cat}}(\text{A})}{K_{\text{MB}}(\text{A})} = \frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{MB}}}$$

$$\frac{k_{\text{cat}}(\text{B})}{K_{\text{MA}}(\text{B})} = \frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{MA}}}$$

E et F sont deux états de l'enzyme correspondant en général à une modification covalente d'un reste d'acide aminé ou d'un groupe prosthétique

Exemple d'une kinase :  $\text{ROH} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{ROP} + \text{ADP}$



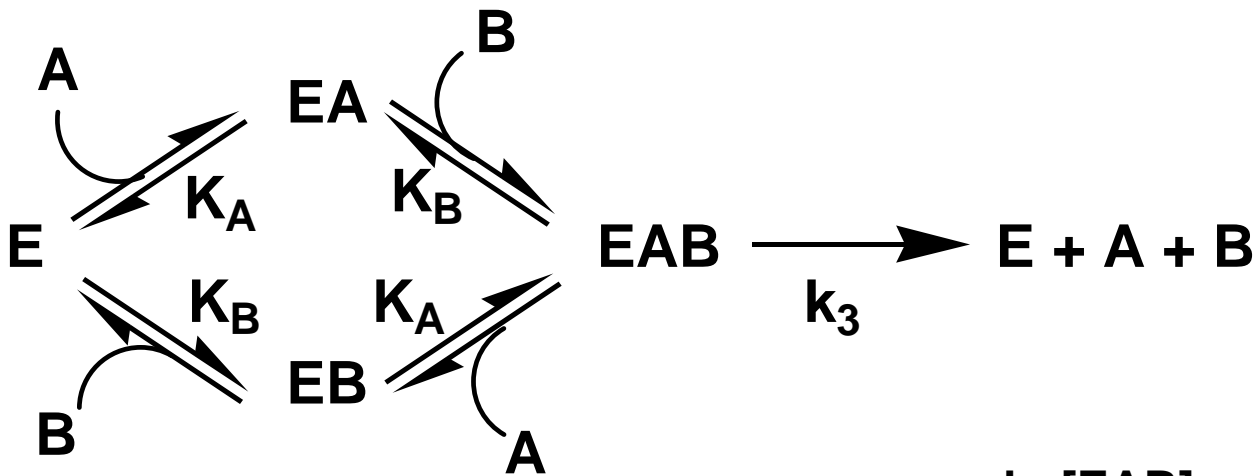
**NB : F = E(P)**

NB : dans les déshydrogénase à E-FAD, E et F correspondent à E-FAD et E-FADH<sub>2</sub>



# Établissement de la loi de vitesse

## Exemple d'un mécanisme aléatoire



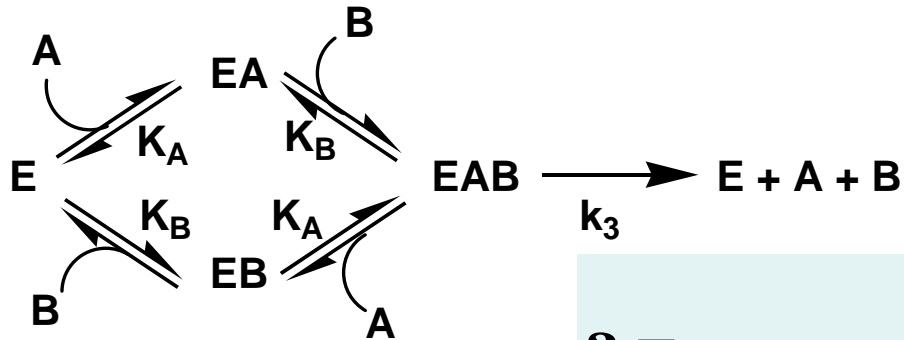
$$a = k_3 [EAB]$$

$$[E]_T = [E] + [EA] + [EB] + [EAB]$$

$$a = \frac{k_3 [E]_T [A][B]}{K_A K_B + K_A [B] + K_B [A] + [A][B]}$$

# Détermination des constantes vraies

## Exemple d'un mécanisme aléatoire



$$a = \frac{k_3 [E]_T [A] [B]}{K_A K_B + K_A [B] + K_B [A] + [A] [B]}$$

Si A est en excès, donc infiniment grand, les termes du dénominateur ne contenant pas A sont négligeables

$$a = \frac{k_3 [E]_T [A] [B]}{K_B [A] + [A] [B]} = \frac{k_3 [E]_T [B]}{K_B + [B]}$$

$$k_{\text{cat}} = k_3$$

$$K_{\text{MB}} = K_B$$

De même, si B est en excès,

$$k_{\text{cat}} = k_3$$

$$K_{\text{MA}} = K_A$$

# Constantes apparentes

## Exemple d'un mécanisme aléatoire

Pour déterminer  $k_{\text{cat}}(\text{B})$  et  $K_{\text{MA}}(\text{B})$ , on regroupe les termes en A et les termes constants

$$a = \frac{k_3[\text{E}]_{\text{T}}[\text{B}][\text{A}]}{(\mathbf{K}_{\text{A}}\mathbf{K}_{\text{B}} + \mathbf{K}_{\text{A}}[\text{B}]) + (\mathbf{K}_{\text{B}} + [\text{B}])[\text{A}]}$$

$$k_{\text{cat}}(\text{B}) = \frac{k_3[\text{B}]}{\mathbf{K}_{\text{B}} + [\text{B}]} = \frac{k_{\text{cat}}[\text{B}]}{\mathbf{K}_{\text{MB}} + [\text{B}]}$$

$$\mathbf{K}_{\text{MA}}(\text{B}) = \frac{\mathbf{K}_{\text{A}}\mathbf{K}_{\text{B}} + \mathbf{K}_{\text{A}}[\text{B}]}{\mathbf{K}_{\text{B}} + [\text{B}]} = \mathbf{K}_{\text{A}} = \mathbf{K}_{\text{MA}}$$

De même

$$k_{\text{cat}}(\text{A}) = \frac{k_3[\text{A}]}{\mathbf{K}_{\text{A}} + [\text{A}]} = \frac{k_{\text{cat}}[\text{A}]}{\mathbf{K}_{\text{MA}} + [\text{A}]}$$

$$\mathbf{K}_{\text{MB}}(\text{A}) = \frac{\mathbf{K}_{\text{A}}\mathbf{K}_{\text{B}} + \mathbf{K}_{\text{B}}[\text{A}]}{\mathbf{K}_{\text{A}} + [\text{A}]} = \mathbf{K}_{\text{B}} = \mathbf{K}_{\text{MB}}$$

# Modulation réversible

- Pour faire une étude complète de l'activité en présence d'un modulateur réversible, on fait des préparations correspondant à :
  - 5 concentrations de A encadrant  $K_{MA} + 1$  contenant A en excès
  - 5 concentrations de B encadrant  $K_{MB} + 1$  contenant B en excès
  - 5 concentrations de modulateurs encadrant  $K_I$  ou  $K_A$

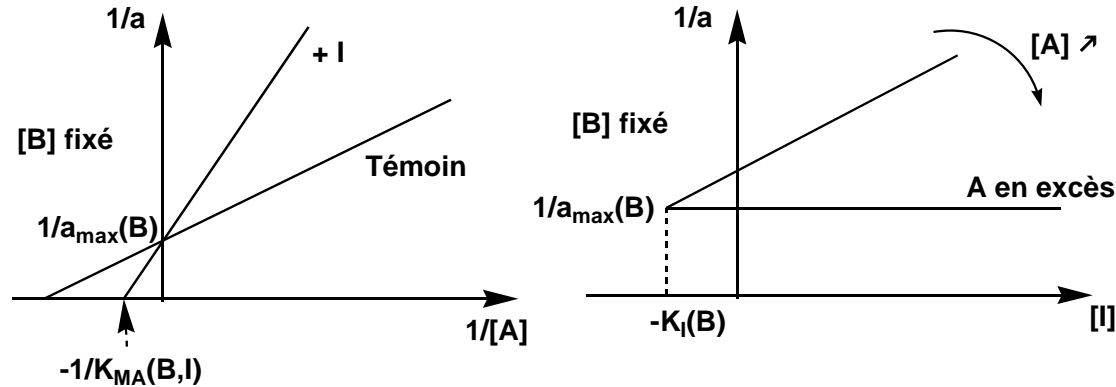
On obtient des résultats analogues à ceux obtenus pour la réaction  $S \rightleftharpoons P$

**En particulier, un inhibiteur peut être compétitif, non compétitif, ou incompétitif**

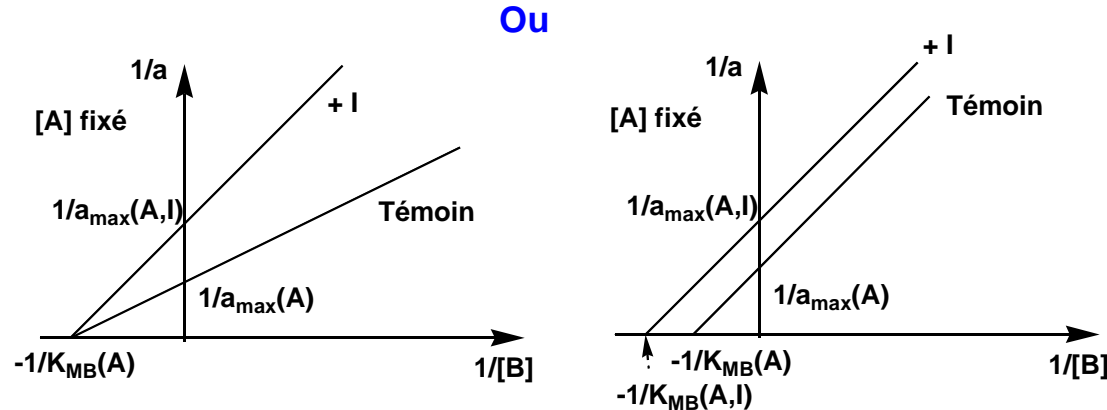
# Inhibition par un analogue de l'un des substrats (par exemple le produit analogue)

- Un analogue de A ( $I_A$ ) se comporte comme un inhibiteur **compétitif** si on fait l'étude par rapport à A à **B fixé** saturant ou non et **non compétitif ou incompétitif** si on fait l'étude par rapport à B à **A fixé**.

## Étude à B fixé



## Étude à A fixé

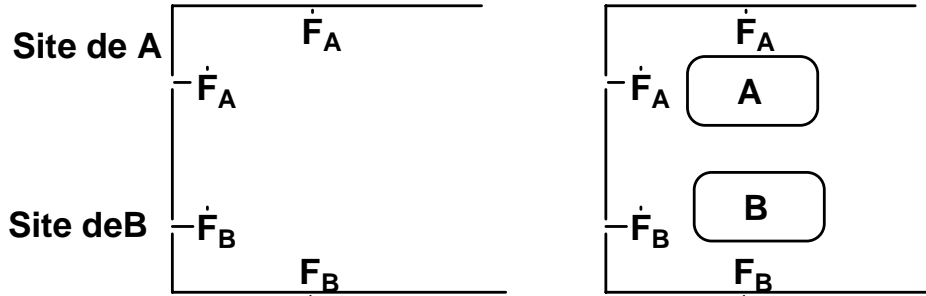


On trace également les courbes  $1/a=f([I])$  à B à A fixé

Le type d'inhibition i.n.c. ou i. inc dépend du modèle de fixation des substrats. À saturation de A, il peut ne pas y avoir d'inhibition.

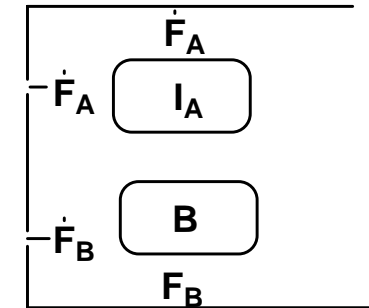
# Interprétation (exemple)

- **Considérons un modèle de fixation aléatoire**  
 Enzyme libre (site actif)    Complexe ternaire actif



- $I_A$  se fixe à la place de A, par les mêmes groupes de fixation, sans gêner la fixation de B

Complexe ternaire inactif



Il se forme aussi les complexes EA et EB

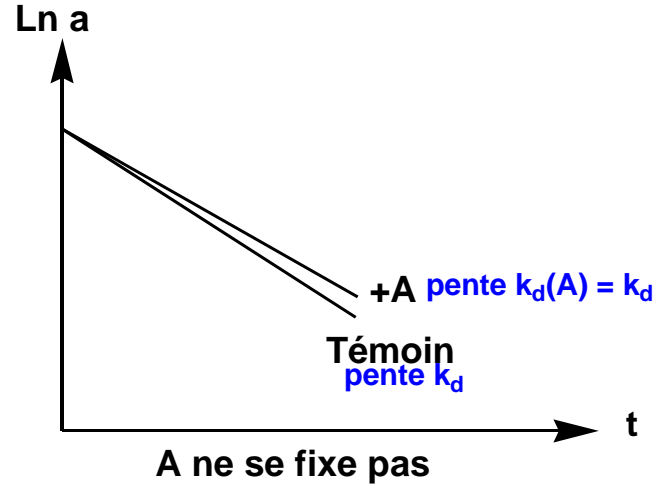
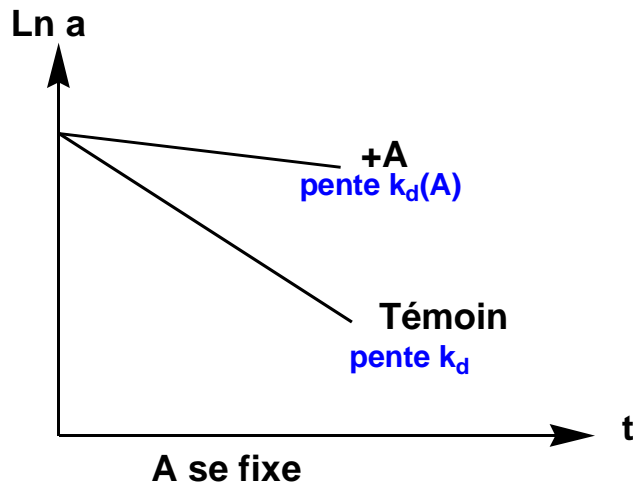
- à B fixé, A et  $I_A$  sont en compétition pour se fixer. L'affinité pour A est apparemment diminuée par B  $\Rightarrow$  **Inhibition compétitive.**
- à A fixé, l'enzyme se répartit, en absence de B entre E (libre) EA et  $EI_A$ .
- $I_A$  ne gêne pas la fixation de B : **l'affinité pour B est inchangée.**
- Il se forme un mélange de EAB (actif) et  $EI_A B$  (inactif).
- Il y a donc moins de EAB présent,  $a_{\max}$  est diminué  $\Rightarrow$  **Inhibition non compétitive.**

# Méthodes non cinétiques de détermination du mécanisme de fixation

- En raison de la complexité des mécanismes enzymatiques, les seules méthodes cinétiques étudiées ci-dessus sont insuffisantes pour être certain du type de mécanisme intervenant.
- Des études complémentaires doivent être menées

# Dénaturation thermique

- On étudie la dénaturation thermique de l'enzyme seule (témoin) et de l'enzyme en présence de A puis de B
- Si A (ou B) se fixe sur E, la vitesse de dénaturation est diminuée  $k_d(A) < k_d$



## Résultats

	Protection par A	Protection par B	Par A et B
Aléatoire	$k_d(A) < k_d$	$k_d(B) < k_d$	$k_d(A,B) \ll k_d$
Ordonné (A puis B)	$k_d(A) < k_d$	$k_d(B) = k_d$	$k_d(A,B) \ll k_d$
Ping Pong (état E)	$k_d(A) < k_d$	$k_d(B) = k_d$	
Ping Pong (état F)	$k_d(A) = k_d$	$k_d(B) < k_d$	



# Mesure des constantes de dissociation des complexes EA(en absence de B) et EB

- On mesure, par exemple par dialyse à l'équilibre les constante  $K_A$  et  $K_B$  de dissociation des complexes EA et EB formés en absence de l'autre produit.
  - Si A se fixe sur E,  $K_A$  est de l'ordre de  $K_{MA}$   $K_A = K_{MA}$
  - Sinon  $K_A$  est très supérieur à  $K_{MA}$   $K_A \gg K_{MA}$

## Résultats

	Complexe EA	Complexe EB
Aléatoire	$K_A = K_{MA}$	$K_B = K_{MB}$
Ordonné (A puis B)	$K_A = K_{MA}$	$K_B \gg K_{MB}$
Ping Pong (état E)	$K_A = K_{MA}$	$K_B \gg K_{MB}$
Ping Pong (état F)	$K_A \gg K_{MA}$	$K_B = K_{MB}$

Pour le mécanisme ping pong, on utilise des analogues de A et B pour que l'enzyme reste sous forme E ou F

# Échange isotopique à l'état initial

- On incube l'enzyme en présence de A marqué (A\*) et de A' et on regarde si A' se marque.
- L'expérience est faite en absence de B et B' (état initial).
- Dans un mécanisme **ping pong**, il se fait les réactions :
  - $A + E \rightleftharpoons EA \rightleftharpoons EA' \rightleftharpoons E + A'$
- **A' se marque (A'\*).**
- Dans un mécanisme **aléatoire ou ordonné**, pour transformer A en A', il faudrait passer par l'intermédiaire de EAB.
- **A' se marque (A'\*).**
- Cette expérience ne permet pas de distinguer les mécanismes ordonnés et aléatoires.