

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 :

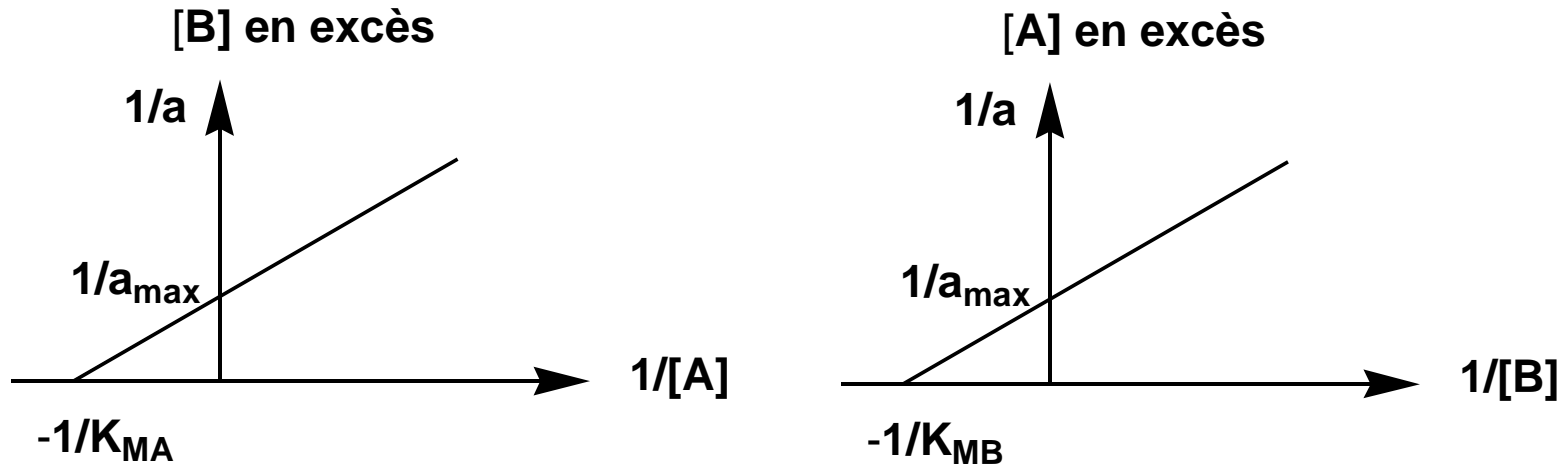
- 5 concentrations de A encadrant K_{MA} + 1 contenant A en excès
- 5 concentrations de B encadrant K_{MB} + 1 contenant B en excès

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 :

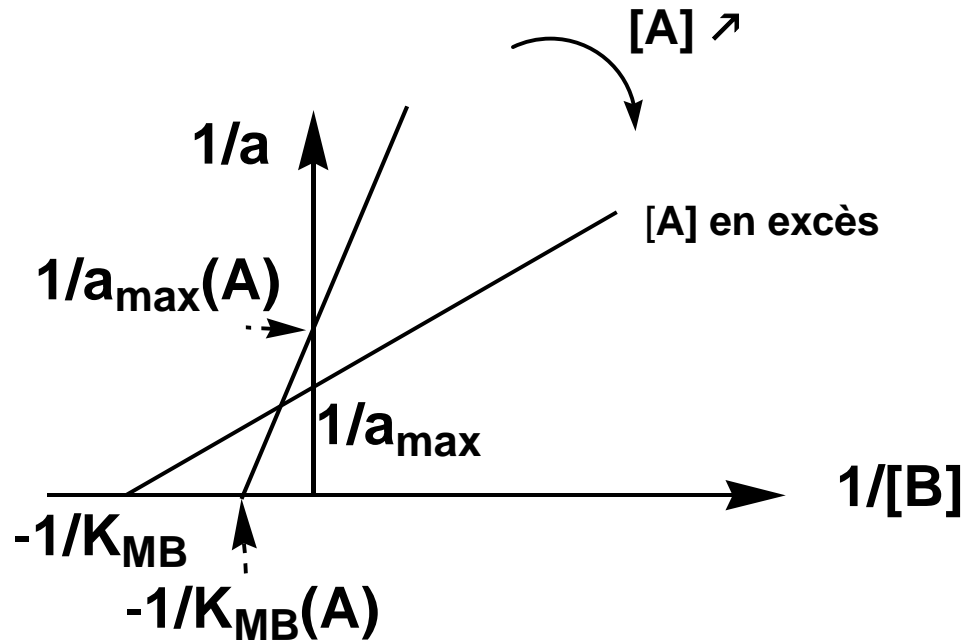
K_{MA} , K_{MB} , k_{cat}

- 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 $K_{MB}(A)$, $a_{\max}(A)$.

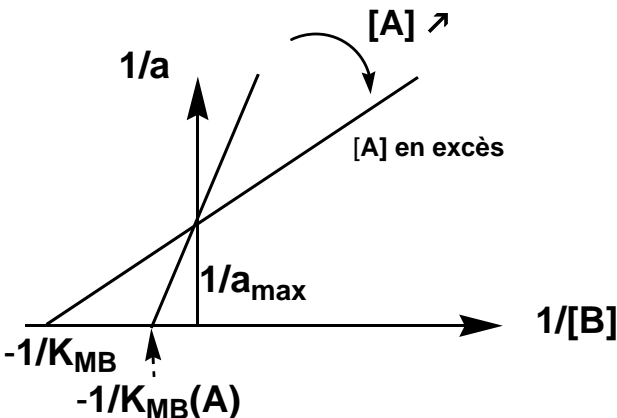
De même, à B fixé non saturant, le système est caractérisé par les constantes apparentes $K_{MA}(B)$, $a_{\max}(B)$.

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

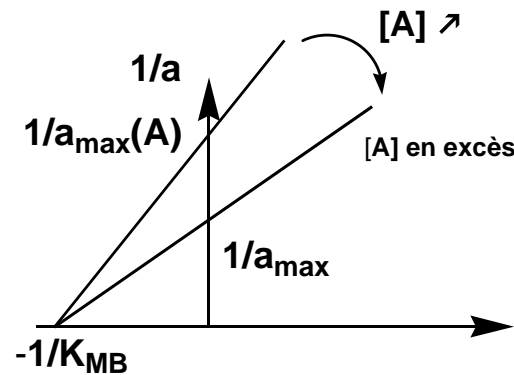
Cas limites

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

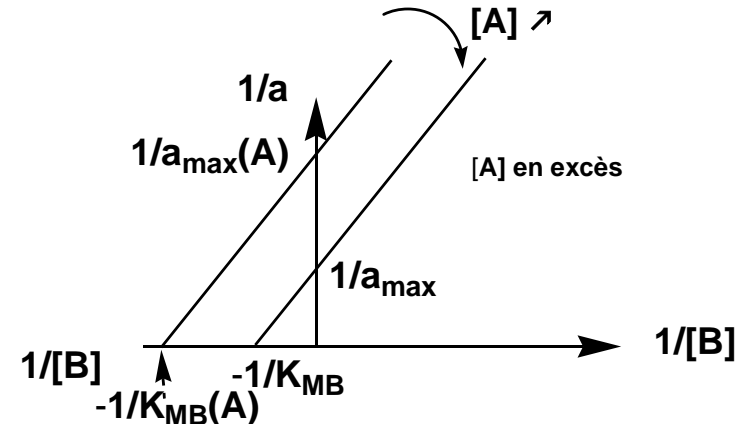
$a_{\max}(A)$ constant



$K_{MB}(A)$ 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.

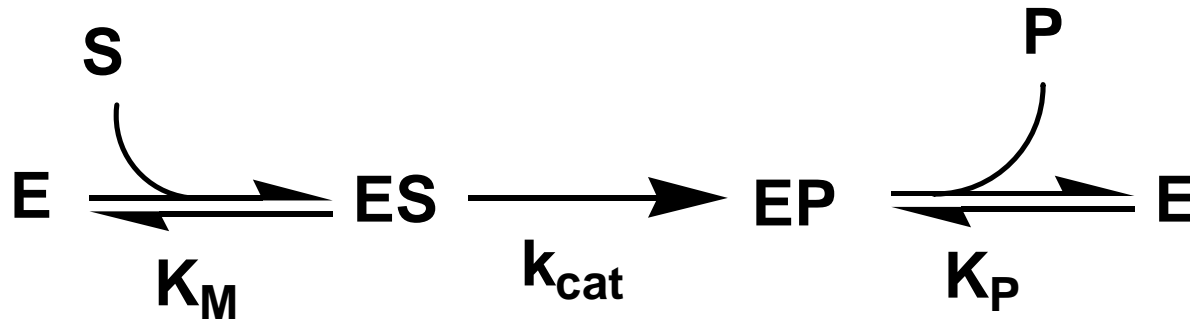
Il y a donc plusieurs mécanismes de fixation de A et B selon les enzymes.

Mécanismes de fixation

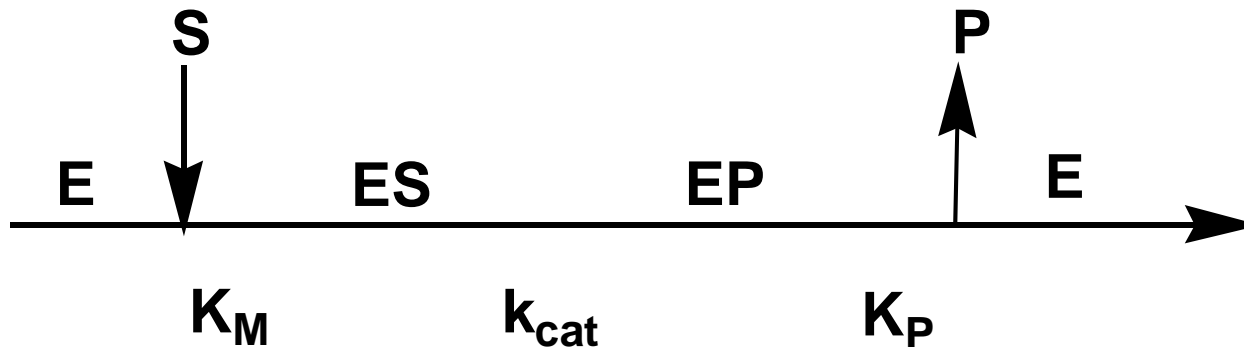
Représentation de Cleland

Réaction : $S \rightleftharpoons P$

- Représentation classique :



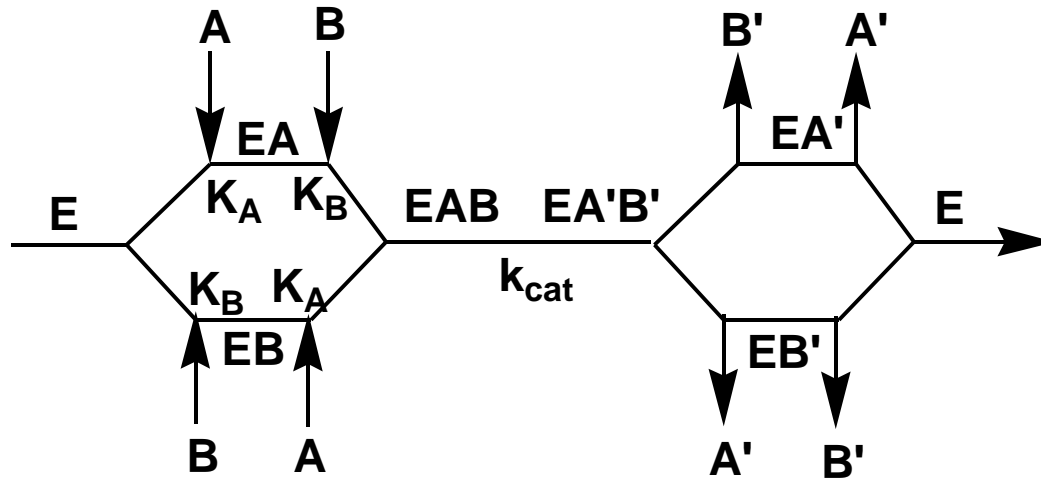
- Représentation de Cleland



Mécanismes de fixation

- **Mécanisme aléatoire indépendant**

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



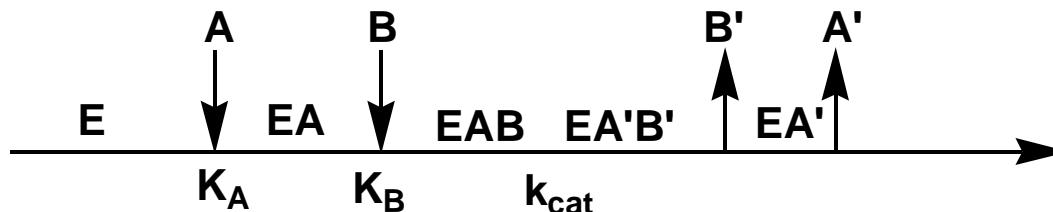
Observation :

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

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

- **Mécanisme ordonné**

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



Observation

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

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

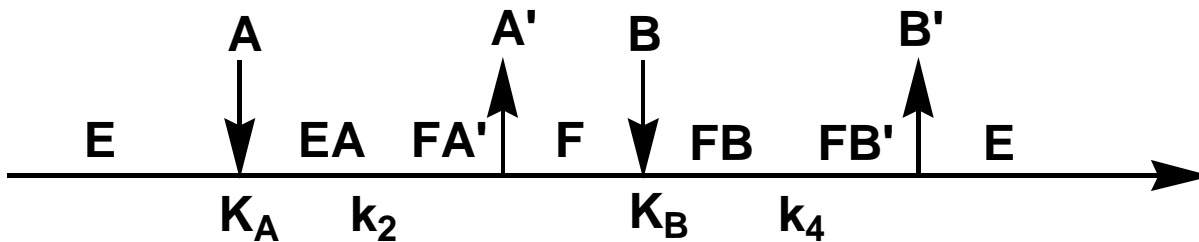
Il y a deux mécanismes ordonnés possibles selon que A ou B se fixe en premier

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



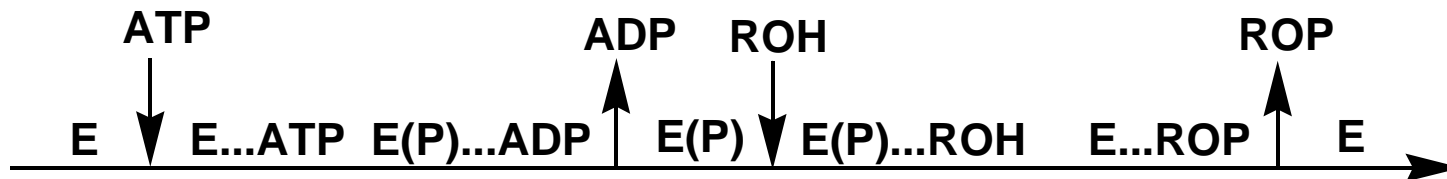
Observation

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

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

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 : $\text{ROH} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{ROP} + \text{ADP}$

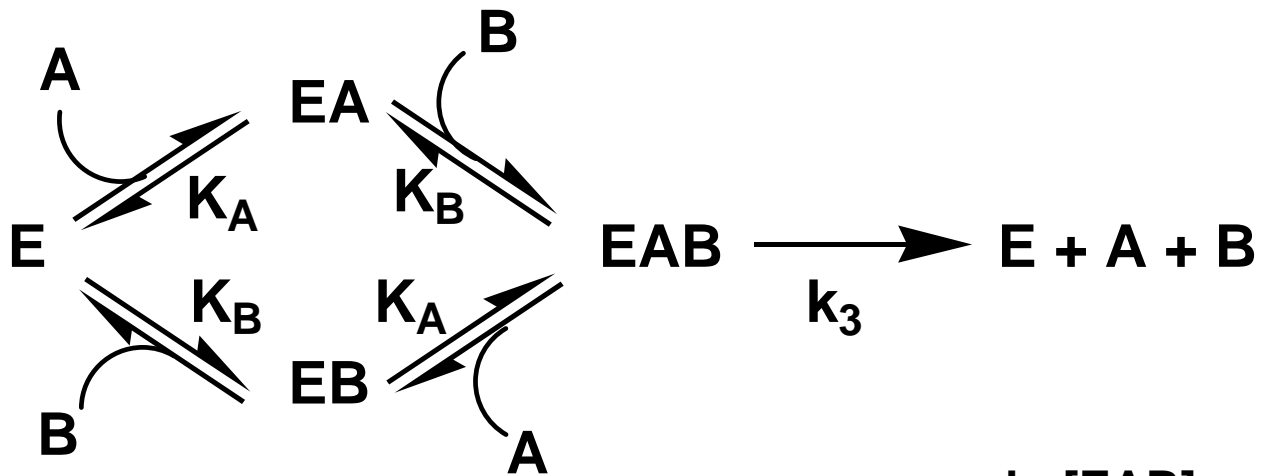


NB : F = E(P)

NB : dans les déshydrogénase à E-FAD, E et F correspondent à E-FAD et E-FADH₂

Établissement de la loi de vitesse

Exemple d'un mécanisme aléatoire



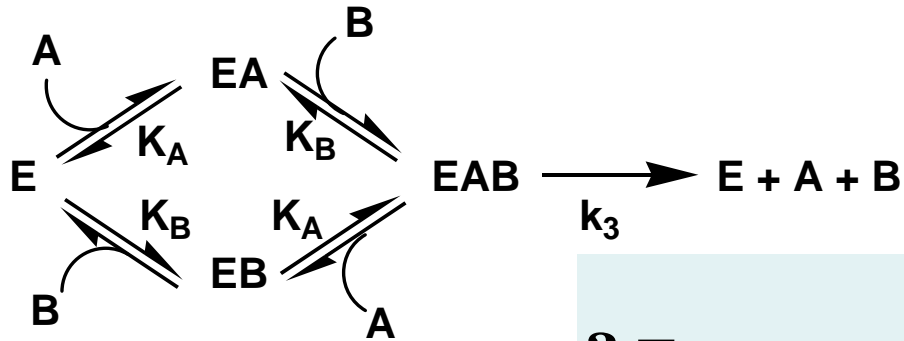
$$a = k_3 [EAB]$$

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

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

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

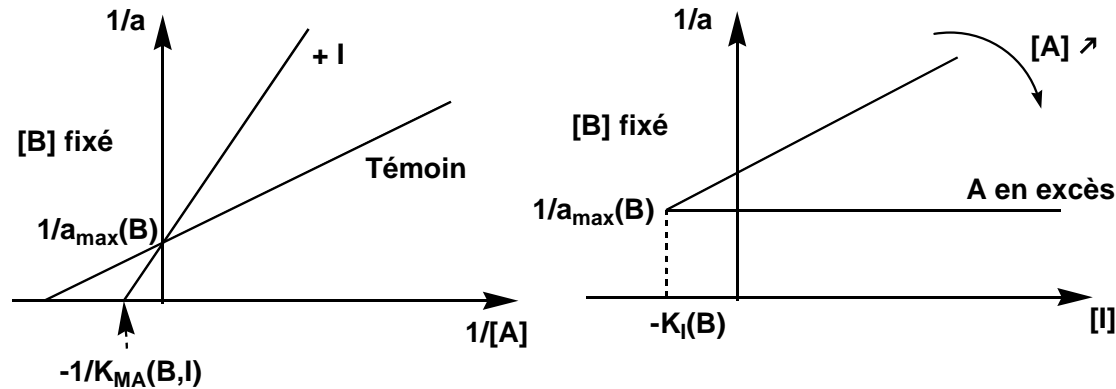
On obtient des résultats analogues à ceux obtenus pour la réaction $S \rightleftharpoons P$

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

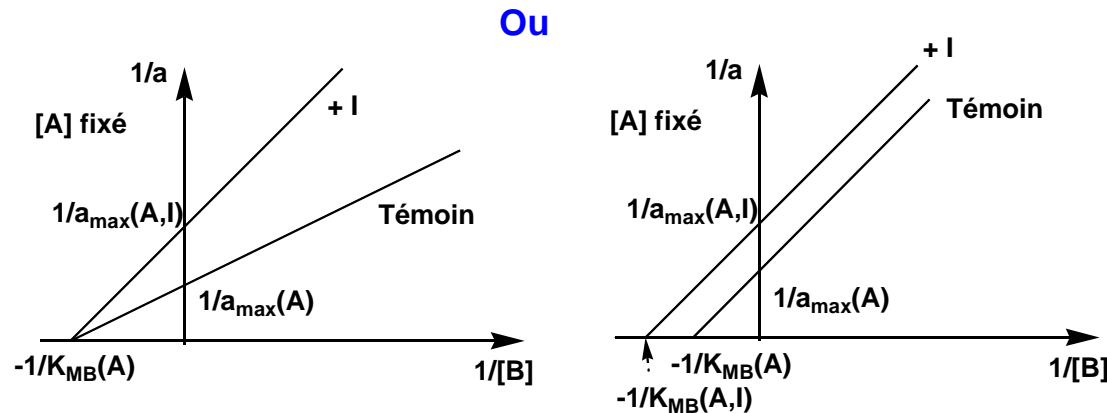
Inhibition par un analogue de l'un des substrats (par exemple le produit analogue)

- 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

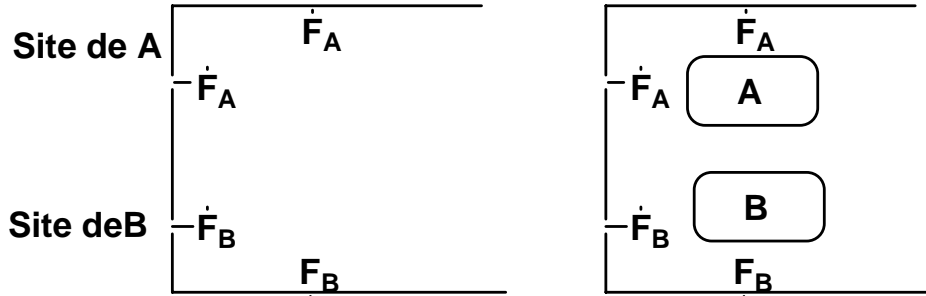


On trace également les courbes $1/a=f([I])$ à B à A fixé

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.

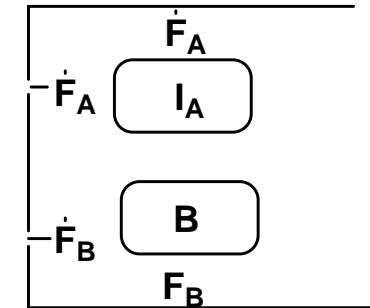
Interprétation (exemple)

- **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

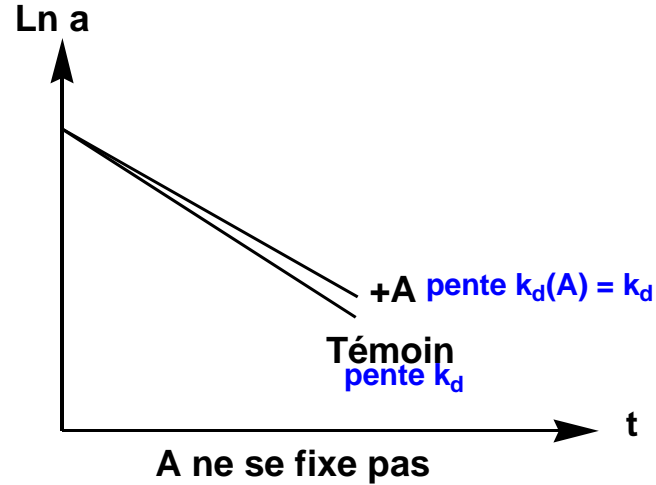
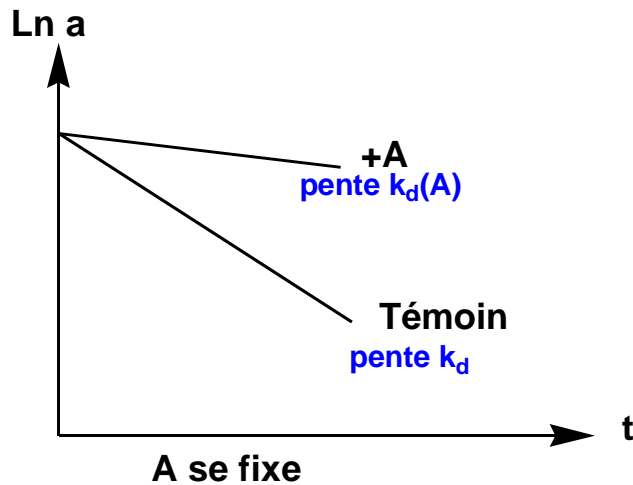
- à B fixé, A et I_A sont en compétition pour se fixer. L'affinité pour A est apparemment diminuée par B \Rightarrow **Inhibition compétitive.**
- à A fixé, l'enzyme se répartit, en absence de B entre E (libre) EA et EI_A .
- I_A ne gêne pas la fixation de B : **l'affinité pour B est inchangée.**
- Il 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.