



# COURS: ENZYMOLOGIE

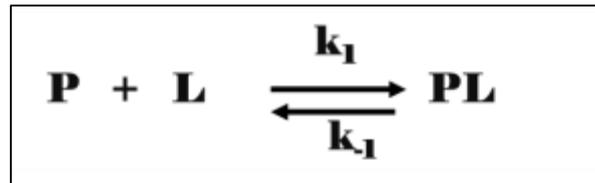
## **III: Notions d'interaction protéine/ligand** **Cas du complexe enzyme substrat**

# A. ASSOCIATION PROTÉINE-LIGAND

## I. Caractéristiques de l'Interaction Protéine – Ligand

- En général liaisons non covalente
- Met en jeu des interactions de type secondaire à faible énergie
- Interaction réversible
- Régit par la thermodynamique  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$
- Force de la liaison évaluée par la constante d'affinité ( $K_a$  ou  $K_d$ )...

## II. Schema de la reaction :



$k_1$  : Constante de vitesse du second ordre de la réaction bimoléculaire :  $P + L \rightarrow PL$   
✓ Unités :  $\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$  ou  $\text{M}.\text{s}^{-1}$

$k_{-1}$  : Constante de vitesse du premier ordre de la réaction mono moléculaire :  $PL \rightarrow P + L$   
✓ Unités :  $\text{s}^{-1}$

### III. Evaluation de l'affinité de liaison ( $K_a$ ou $K_d$ ) et du nombre de site (n)de liaison

#### 1. Relation de $K_d$ à l'équilibre



A l'équilibre:

$$K_d = \frac{[P] \times [L]}{[PL]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{1}{K_a}$$

**$K_a$  et  $K_d$**  : constantes macroscopiques qui lient la concentration à l'équilibre des composés impliqués dans la réaction.

**$K_d$** : constante d'équilibre de dissociation  $K_d = k_1/k_{-1}$

**$K_a$** : constante d'association  $K_a = k_{-1}/k_1$

**$K_d = 1/K_a$**

## 2. SIGNIFICATION DU $K_d$

- Constante de dissociation
- Constante expérimentale qui dépend de Température, force ionique et pH mais reste constante dans une fourchette de ces variables).
- Exprimée en unité de concentration.
- Correspond à la concentration en ligand libre l'instant où la protéine est à moitié saturée :  $K_d = [L]_{50\%}$ .
- $K_d = 1 / K_a$  (association)
- **Permet d'évaluer l'affinité de liaison**
  - ✓  **$K_d$  élevé = > affinité faible**
  - ✓  **$K_d$  faible = > affinité forte**

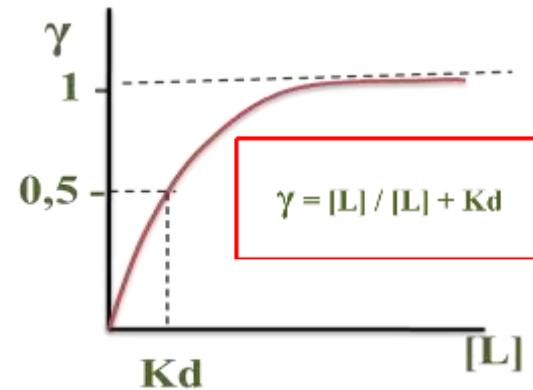
### 3. COURBES DE SATURATION:

Fraction ( $\gamma$ ) ou Taux de saturation en fonction de la concentration du ligand

$$\gamma = [PL] / [P] + [PL] \quad \text{et } \gamma \text{ varie de } 0 \text{ à } 1, \text{ pas d'unité}$$

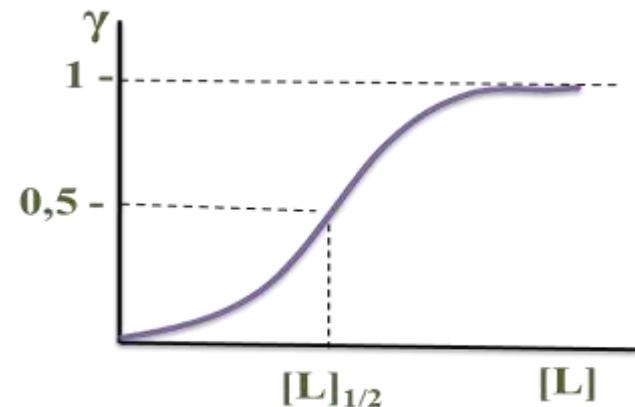
#### A. Cas d'un seul site de liaison ou de plusieurs sites équivalents indépendants

$\gamma$  est une fonction de type **hyperbole** typique d'un phénomène saturable et réversible



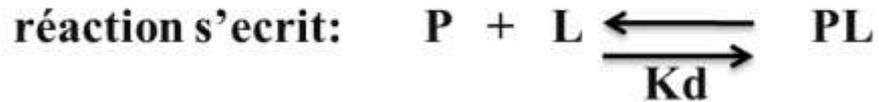
#### B. Cas plusieurs sites de liaison non équivalents ou équivalents dépendants

$\gamma$  est une fonction de type **sigmoide** d'un phénomène saturable et réversible



## 4. EQUATION DE SCATCHARD

Relation valable pour un seul site ou plusieurs sites de liaison indépendants équivalents:



A l'équilibre la relation entre la concentration du complexe formé PL et la concentration du ligand L est :

$$\frac{[PL]}{[L]} = -\frac{1}{K_d} [PL] + \frac{1}{K_d} n [P]_t$$

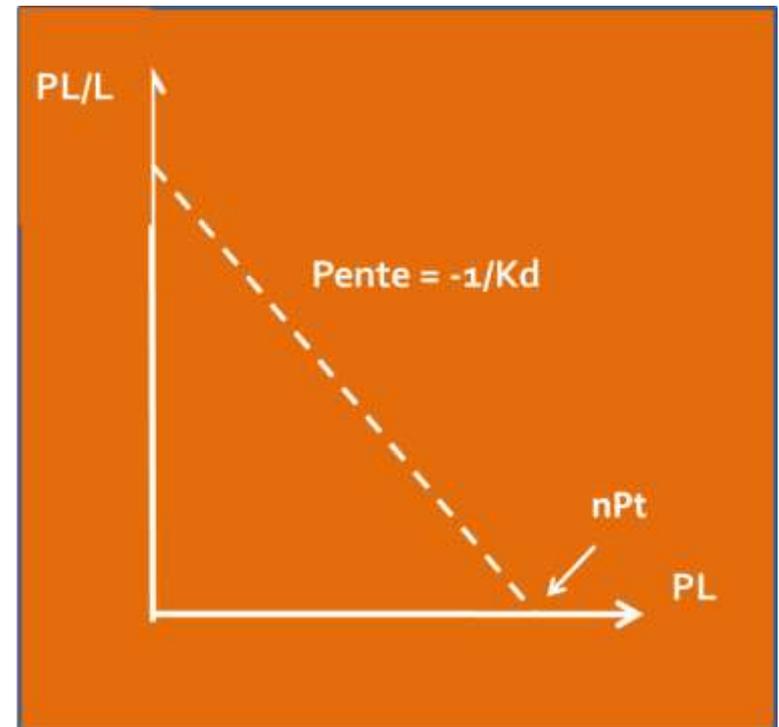
Où

[PL] : ligand lié,

[L] : ligand libre,

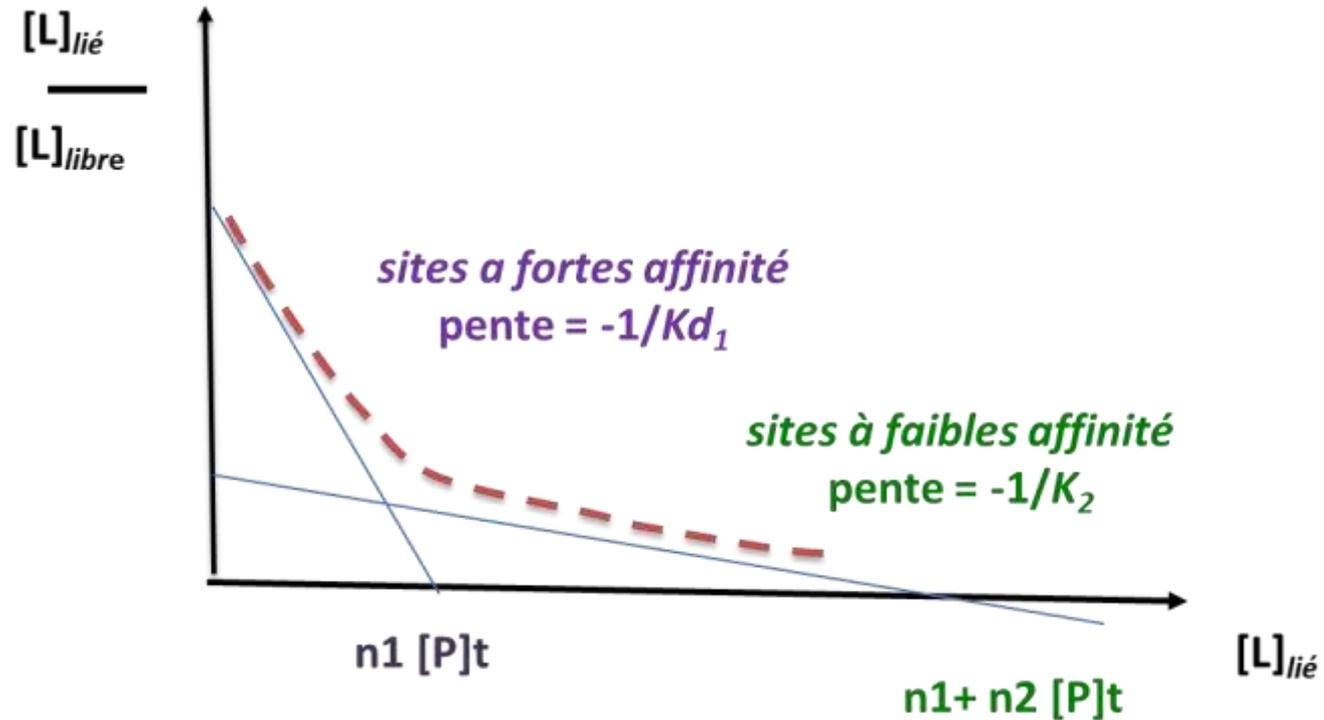
[P]<sub>t</sub> : protéine totale,

n : nombre de site / molécule de protéine



La représentation de PL/L en fonction PL est linéaire seulement si la protéine possède un seul site ou plusieurs sites identiques indépendants

# Représentation graphique Scatchard dans le Cas où les sites ne sont pas équivalents : Cas de deux sites



# B. LE COMPLEXE ENZYME SUBSTRAT

## I. ARGUMENTS

➤ **Le haut degré de spécificité de la reconnaissance d'un substrat par le site actif d'une enzyme.**

très forte complémentarité des structures (mais aussi de la nature chimique des groupements réactionnels) du substrat et de l'enzyme qui le fixe,  
model de la **clé et la serrure** (Emil Fisher 1894)

➤ **La forme de la courbe dite de saturation**

vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat  
( $v_i = f([S])$ )

➤ **Le fait que les substrats protègent souvent les enzymes de l'inactivation**

## II. Notion du Site actif

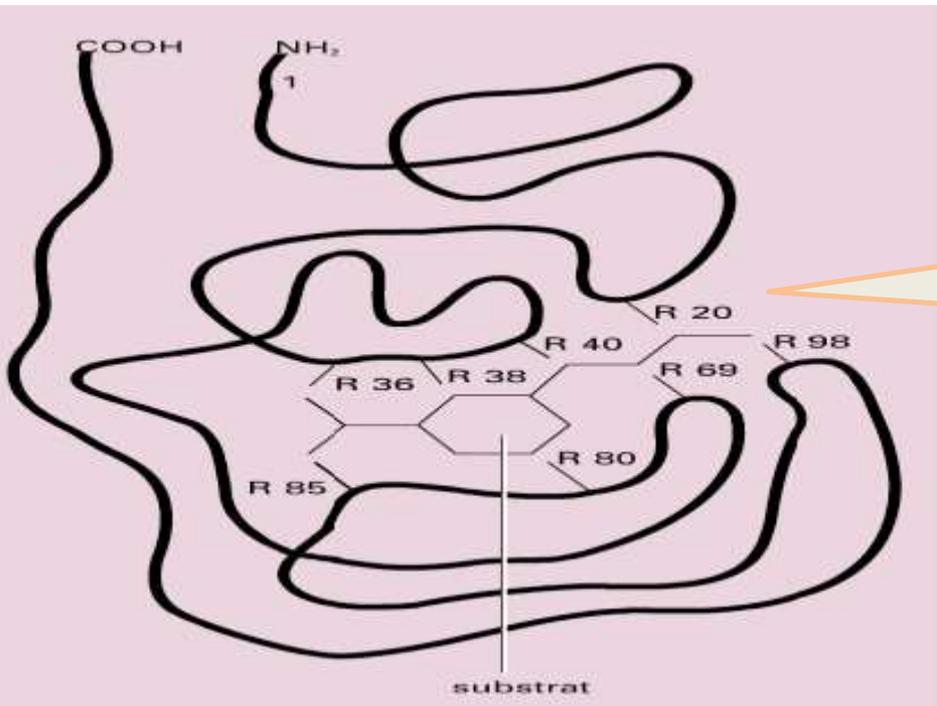
- ✓ Région particulière de la macromolécule enzymatique,
- ✓ Constitué d'un petit nombre d'acides aminés, une douzaine au plus, le plus souvent ne sont pas contigus dans l'enchaînement de la chaîne polypeptidique
- ✓ Souvent enfoui au sein de la protéine,
- ✓ Structure spatiale complémentaire en taille, forme et nature chimique du substrat,
- ✓ Caractérisé par une grande diversité: petits, crevasses, hydrophobe, aa. polaires

**Le site enzymatique est constitué de:**

**Site de Reconnaissance** : les acides aminés qui constituent le site de fixation et maintient du substrat

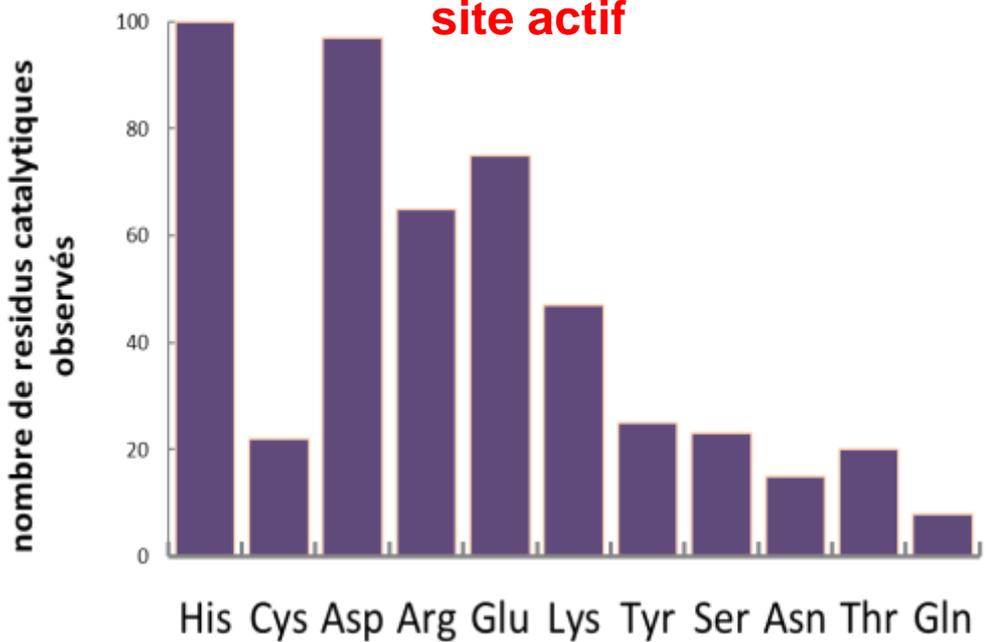
**Site catalytique (actif)** (2 ou 3 seulement) : les acides aminés qui possèdent des potentialités **réactives** => **interviennent dans le mécanisme catalyse.**

Les acides aminés catalytiques sont polaires: His, Ser, Cys, Tyr, Lys, Asp, ....

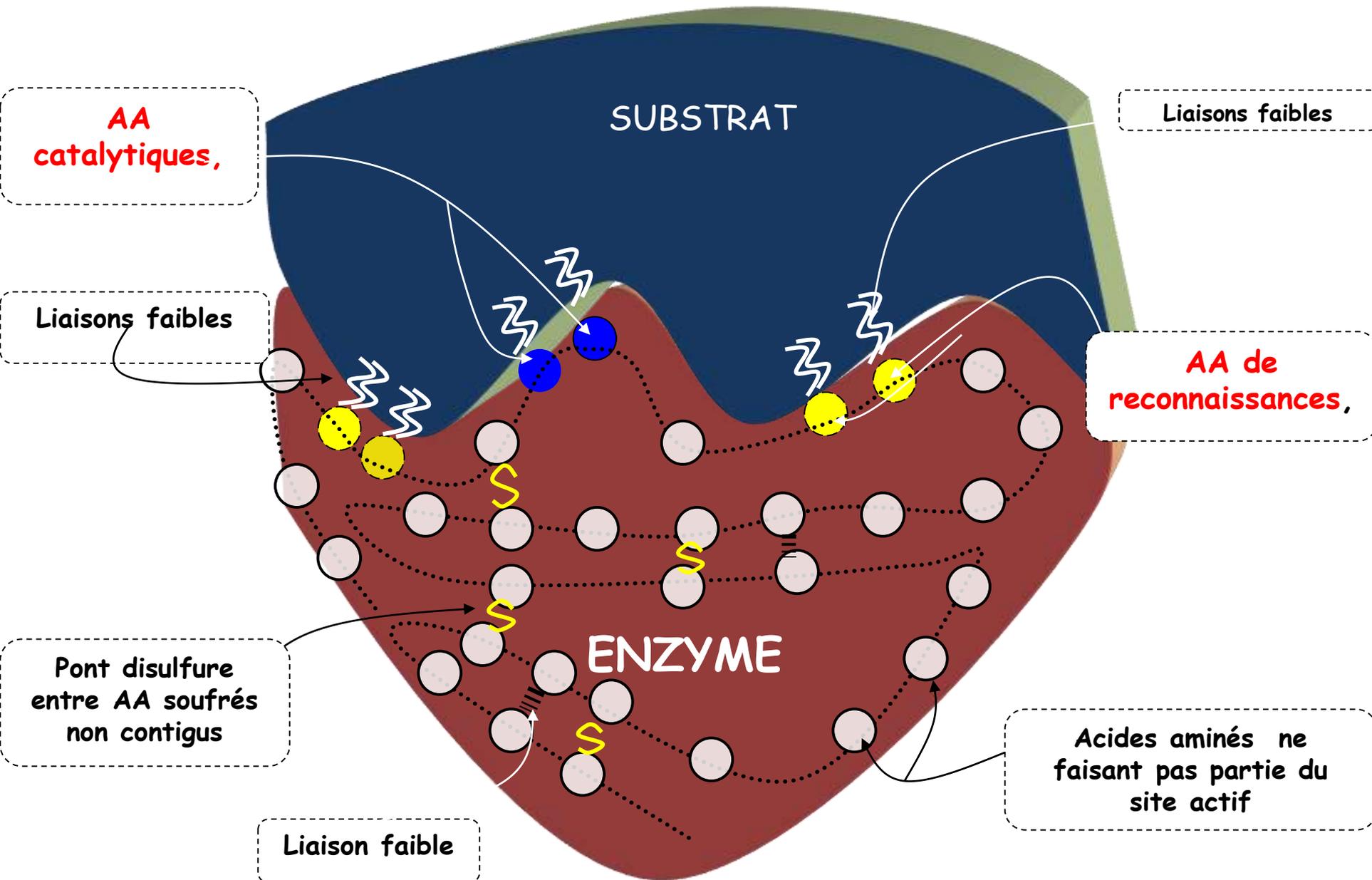


Fixation du substrat par des interactions à faible énergies (hydrogènes, électrostatiques, ..)

**Fréquences des acides amines du site actif**

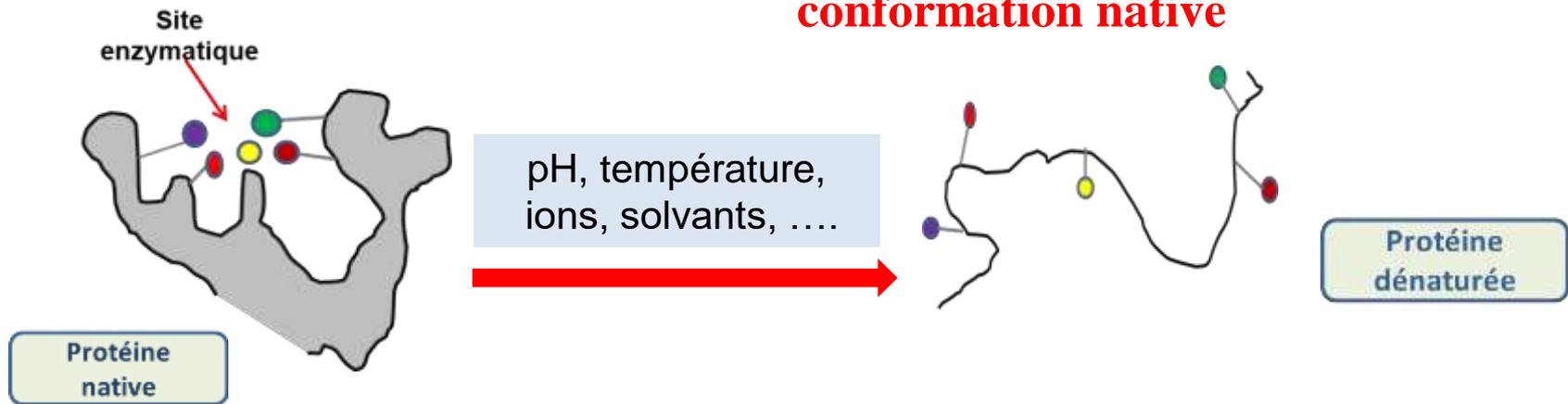


# le complexe enzyme substrat



### III. DENATURATION

**L'activité catalytique dépend de l'intégrité de la conformation native**



**Dénaturation => perte d'activité enzymatique**

#### Facteurs de dénaturation: agents physico-chimiques

- ❑ **pH** : modification de l'état d'ionisation de certains acides aminés → rupture des liaisons hydrogènes
- ❑ **Température** : Energie de vibration ou de rotation → déséquilibre des liaisons faibles
- ❑ **Agents chaotiques**: Urée  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$   
Mercaptoethanol : rupture des liaisons S-S
- ❑ **Détergents** : SDS (dodecyl sulfate de sodium) → rupture des interactions hydrophobes

**Le chauffage important, acide fort ou base forte → dénaturation irréversible**  
**→ Rupture des liaisons covalentes**