



## Partir du bon pied avec l'enzymo

### Partie I

I - <u>Intro</u>	(pages 1 - 2)
II - <u>Définitions</u>	(pages 3 - 4)
III - <u>Dialyse</u>	(page 4)
IV - <u>Dans les formules</u>	(page 5)

#### I - Intro

In vivo les **associations entre les molécules doivent être transitoires** (sinon une enzyme ne pourrait servir qu'une seule fois par exemple), elles se font donc via des **liaisons faibles**

- Attention, il est quand même précisé dans le cours **qu'il peut y avoir de la covalence transitoire**

Ces interactions se font sur de **petits sites** (ayant une conformation précise) présents sur les molécules : ils sont appelés « **sites actifs** »

- Il faut imaginer un système de clé et de serrure, devant correspondre parfaitement
- C'est pour ça qu'**une enzyme est spécifique** : elle ne correspond qu'à une seule clé !
  - Rq : parfois une enzyme proche structurellement d'une autre pourra adopter le même substrat
- Pour aller un peu plus loin on peut en déduire que si on a une mutation sur le site actif, notre enzyme ne pourra plus effectuer son travail car ne correspondra plus à sa clé (en suivant le raisonnement, une mutation hors du site actif n'a pas d'effet)

Rq : le site actif est constitué d'un site de reconnaissance et d'un site catalytique

En plus de devoir parfaitement correspondre, il faut que la serrure et sa clé **s'emboîtent parfaitement** lors de leur rencontre

- Cela se fait grâce à l'**agitation moléculaire** et prend du temps : *qui n'a jamais galéré à insérer sa clé dans une serrure ?*

Après être passé sur le double sens précédent, on peut suivre notre logique : pourquoi ne pas avoir **plusieurs sites sur une même molécule** ?

- Avec des sites identiques cela permettrait de **réaliser plus de réactions en même temps** donc d'être plus rapide / efficace
- Avec des sites différents cela permettrait à l'enzyme de **réaliser plusieurs tâches différentes**

Souvent, plusieurs sites peuvent correspondre à la même clé (un même substrat peut être pris en charge par deux enzymes différentes), ce qui introduit la notion d'**affinité** : les sites étant légèrement différents, le substrat préférera l'un ou l'autre

Pour réguler les réactions (afin d'éviter d'avoir trop ou pas assez de produits) l'**affinité évolue** selon la quantité de substrat présent

- « Quand on a peu on désire beaucoup, quand on a beaucoup on utilise peu »
  - Si il y a beaucoup de substrats l'affinité diminue
  - Si il y a peu de substrats l'affinité augmente

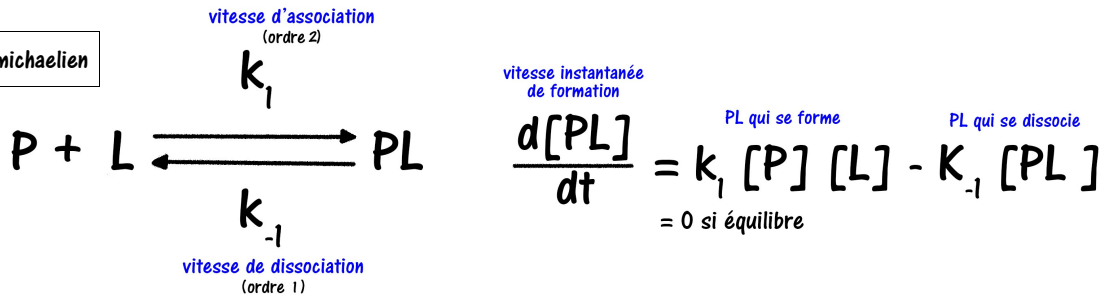
Attention, dans un cas michaelien l'affinité ne varie pas, ici nous sommes en situation d'allostérie

Les différents sites d'une molécule peuvent **entrer en interaction et s'influencer** : c'est l'**allostérie**

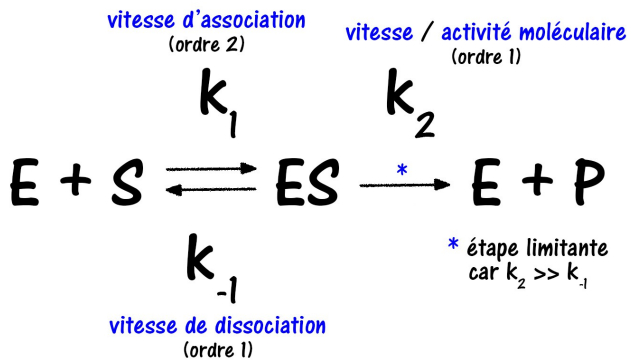
Pour encore mieux comprendre les phénomènes décrits dans le cours il faut se pencher sur la **différence qu'il y a entre une association protéine / ligand et une association enzyme / substrat**

- Protéine / ligand : simple association, il n'y a pas de transformation du ligand
  - C'est le type d'interaction que l'on retrouve entre l'hémoglobine et l'O<sub>2</sub> : il y a une simple association transitoire afin d'assurer un rôle de transport (ça marche aussi pour un stockage : le ligand complexé ne peut pas aller se fixer sur les récepteurs)
  - Comme dit précédemment cette association prend du temps (représenté par k<sub>1</sub>, la dissociation étant illustrée par k<sub>-1</sub>)

Rq : ici on est dans un cas michaelien



- Enzyme / substrat : les deux vont s'associer comme précédemment mais cette fois **l'enzyme va transformer le substrat en produit**, il y a une étape supplémentaire, qui prend du temps aussi (représenté par k<sub>2</sub>)



Équation simplifiée de Michaelis-Menten

Rq : k<sub>2</sub> >> k<sub>-1</sub> **IN VITRO**

Rq : ces interactions se font au hasard selon l'agitation moléculaire

- On prend deux équipes (enzymes et substrats) que l'on place dans une pièce avec les yeux bandés. Une interaction se fait lorsque deux joueurs d'équipes différentes se rentrent dedans.
- Après tout n'est qu'affaire de proba : si on rajoute des gens il y a plus de chances d'interaction, et si on en rajoute dans une seule équipe il y a possibilité qu'ils se gênent entre eux
- Si on rajoute une 3e équipe il y a aussi une gêne possible : c'est l'inhibition

## II - Définitions

**Nombre de Hills (nH)** : nombre de sites ouverts sur la molécule

- $nH = n_{\text{tot}}$  : coop. totale (théorique) → il y a autant de sites ouverts sur la molécule que de sites existants
- $nH = 1$  : sites indépendants (cas michaëlien)
- $nH > 1$  : **coop. positive** (affinité augmente ; facilite)
- $nH < 1$  : **coop. négative** (affinité diminue ; gêne)

Peut évoluer au cours du temps !

$nH = 1$

**Cas michaëlien** : la fixation du ligand n'a pas d'influence sur la fixation des autres ligands

- $K_d$  pas influencé par l'occupation des sites donc l'affinité ne varie pas

**Allostérie** : la fixation du ligand influe sur la fixation des autres ligands

- Besoin d'une prot. ayant plusieurs sites car se fait sur un site différent de celui du ligand principal
- Rq : allostérie = changement conformationnel de la molécule

$nH > 1$

- **Coopération positive** : elle favorise la fixation des autres ligands sur la MEME molécule

- Par exemple le changement de conformation va permettre au ligand d'accéder plus facilement au site actif

Affinité APPARENTE augmente

$0 < nH < 1$

- **Coopération négative** : elle gêne la fixation des autres ligands

Affinité APPARENTE diminue

**Ligand principal** : tout est dans le nom

Attention ici nous ne sommes que dans des situations d'allostérie

**Effecteur** : ligand dont le site de fixation est différent de celui du ligand principal

- **Homotrope** : ligand principal qui, en se fixant sur son site A, exerce un effet sur ses autres sites A (coopération positive ou négative)
- **Hétérotrope** : ligand autre que le ligand principal qui, en se fixant sur son site B, va influencer la fixation du ligand principal sur son site A
  - **Positif** : activateur allostérique
  - **Négatif** : inhibiteur allostérique

Ces influences se font par changement de conformation de l'enzyme

- Soit sa nouvelle forme va gêner l'arrivée du ligand, sa reconnaissance, etc
- Soit au contraire elle va favoriser les interactions

**Forme T (tendue)** : configuration spatiale d'un site de la protéine sans ligand → faible affinité pour le ligand

- « Personne ne vient le voir (= sans ligand) donc il boude (= faible affinité) »

Rq : pour que T existe il faut (en théorie) au moins la présence d'effecteur hétérotrope négatif

Attention ce n'est pas logique : sans ligand la forme T est la forme favorisée, mais c'est aussi la forme la moins affine pour le ligand

**Forme R (relâchée)** : configuration spatiale d'un site de la protéine avec le ligand → grande affinité pour le ligand

- « A partir du moment où quelqu'un est venu le voir (= avec ligand) il s'ouvre et cherche encore plus de monde (= grande affinité) »

Pour une enzyme allostérique c'est la forme active qui transforme le substrat

**Modèles de transitions allostériques**

- **Concerté** : avec un seul ligand tous les sites de la molécule passent de T à R en même temps
  - Quel que soit T et R, la symétrie de la molécule est conservée
  - Cf. effecteur homotrope : explique bien la coopération positive
- **Séquentiel** : les sous-unités passent de T à R les unes après les autres
  - Perte partielle de symétrie de la molécule en fonction de la proportion T/R

Sans ligand, l'équilibre entre T et R est en faveur de la forme T

Ne pas confondre la coopération négative avec l'inhibition !

- Différence entre coop. négative d'un effecteur hétérotrope et inhibiteur non compétitif

Effecteur hétérotrope : l'enzyme reste active et continue à libérer le produit, mais son affinité pour le substrat (et/ou  $V_{max}$ ) est modifiée

- Plusieurs sites sont en interaction

INC : empêche la réaction d'avoir lieu, le produit ne pourra être libéré que lorsque l'INC ne sera plus fixé à l'enzyme

- Un seul site

→ les inhibitions (compétitives, non compétitives et incompétitives) ne concernent QUE la cinétique enzymatique michaelienne, jamais l'allostérie

Mais pourquoi dans le cours les inhibitions font varier l'affinité et le  $V_{max}$  (au lieu de complètement empêcher la réaction comme dit précédemment) ? Et surtout pourquoi l'affinité peut évoluer (inhibiteurs compétitifs et incompétitifs) alors que nous sommes dans un cas michaelien ?

ATTENTION, il s'agit ici d'une seule enzyme. Dans les exercices (et le cours) on prend en compte plein d'enzymes en même temps : certaines sont inhibées (totalement) et d'autres sont libres → globalement on se rend compte d'une influence sur l'affinité et la  $V_{max}$ .

Unités		
Katal	$\text{mol.s}^{-1}$	
UI	$\mu\text{mol.min}^{-1}$	[substrat] saturante $T^\circ = 25 / 37^\circ\text{C}$ pH optimal
Activité spécifique	qté de substrat transformé / poids de prot. / tps	

### III - La dialyse

Membrane semi-perméable : ne laisse passer QUE les ligands

Elle sépare deux compartiments (souvent de même volume dans les exercices)

- Compartiment 1, dans lequel on met une certaine quantité  $P_0$  de protéines
- Compartiment 2, dans lequel on met une certaine quantité  $L_0$  de ligands

Les ligands vont donc pouvoir passer la membrane et la concentration initiale  $L_0$  va se diluer dans le volume total

(compartiment 1 + compartiment 2)

- Si ils sont de même volume la concentration est divisée par 2 car au final, pour les ligands, on double le volume du compartiment

Mais une partie des ligands va se lier aux protéines et former des complexes protéines-ligands (ce qui diminue la quantité de ligands dits « libres » qui vont s'équilibrer entre les deux compartiments)

Dans le compartiment 1, ligands et protéines vont aussi se lier, on se retrouve avec

- Une certaine quantité de protéines libres (P)
- Une certaine quantité de ligands libres (L)
- Une certaine quantité de complexes protéines-ligands (PL)

Dans le compartiment 2 on a uniquement du ligand libre (L), et autant que dans le compartiment 1 (toujours si les compartiments sont de même volume)

Notre quantité initiale  $P_0$  de protéines s'est donc partagée en

- Une certaine quantité de protéines dans les complexes PL
- Une certaine quantité de protéines libres (P) dans le compartiment 1
- Il n'y a pas de protéine dans le compartiment 2

$$\text{D'où } P_0 = PL + P$$

Notre quantité initiale  $L_0$  de ligands va elle être partagée en

- Une certaine quantité de ligands dans les complexes PL
- Une certaine quantité de ligands libres (L) dans le compartiment 1
- Une certaine quantité de ligands libres (L) dans le compartiment 2 (identique à celle du compartiment 1 si les deux sont de même volume)

$$\text{D'où } L_0 = PL + L + L = PL + 2L$$

IV - Dans les formules

- **Kd (mol.L<sup>-1</sup>)** : cte de dissociation intrinsèque d'une protéine michaëlienne (**augmente = affinité diminuée**)
  - Représente K lorsqu'on est dans un cas michaëlien
  - Rapport des ctes de vitesses ( $Kd = k_{-1} / k_1$ )
  - [ligands libres] pour laquelle la prot. est saturée à 50% par son ligand ( $Kd = L_{0,5}$ )
- **Ka (L.mol<sup>-1</sup>)** : cte d'association
  - Inverse de Kd
- **Km** = « Kd des enzymes » : cte de michaëlis (**augmente = affinité diminuée**)

**ATTENTION pour Km vs Kd**

Dans l'idée c'est la même chose (**rapport des constantes de vitesses**)  
 MAIS, comme pour les réactions enzymatiques il y a une constante en plus  
 ( $k_2$  : vitesse, donc temps, de transformation du substrat),  
 au final ce n'est pas la même chose.

$Kd = k_{-1} / k_1$   
 $Km = [k_{-1} + k_2] / k_1$

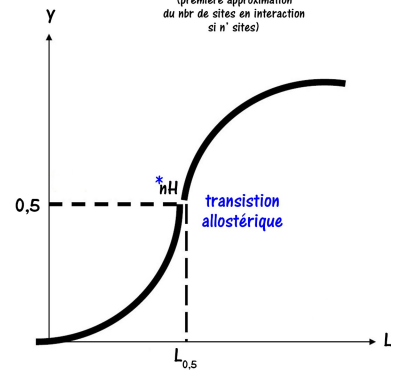
Sauf que Mr Sieso considère qu'on peut négliger  $k_2$  **IN VITRO**  
 (et tout le monde en fait, parce qu'en effet :  $k_2 \ll k_{-1}$ ),  
 ce qui fait bien de Km le "Kd des enzymes".

*(Mais on ne peut faire ce raccourci  
 qu'une fois que l'on a bien compris d'où ça venait)*

**IN VIVO**  $k_2$  n'est pas négligeable,  
 c'est même  $k_{-1}$  que l'on néglige devant  $k_2$

**Allostérie**  
 (pls sites dépendants)

\* nbr de Hill  
 ou  
 coef. d'interaction  
 > 0  
 (première approximation  
 du nbr de sites en interaction  
 si n' sites)



$$\log \frac{Y}{1-Y} = n \log L - n \log L_{0,5}$$

- **Y (%)** → **sans dimension** : fraction de saturation →
  - La formule de la courbe permet notamment de trouver le nombre de Hills (n)

$$v = Vm S / [Km + S]$$

- **v** : vitesse
- **Vm** : vitesse limite maximum (cte)
- **Vitesse d'ordre 0** : vitesse constante → mol.L<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>
- **Vitesse d'ordre 1** (monomoléculaire) : dépend de la [prot.] → s<sup>-1</sup>
- **Vitesse d'ordre 2** (bimoléculaire) : dépend de la [prot.] et de la [ligand] → L.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>

Rq : les s<sup>-1</sup> ne sont qu'une possibilité de t<sup>-1</sup>

- $k_{-1}$  : vitesse de dissociation → **ordre 1**
- $k_1$  : vitesse d'association → **ordre 2**
- $k_2$  : vitesse / activité moléculaire → **ordre 1**

- **Critère d'efficacité globale** : augmente = enzyme efficace et rapide
  - $k_2$  → caractérise la catalyse
  - Km → caractérise la fixation

catalyse  $\frac{k_2}{Km}$   
 fixation

= critère  
 d'efficacité globale  
 (augmente =  
 enzyme efficace et rapide)