

Influence du milieu d'étude sur l'activité (suite)

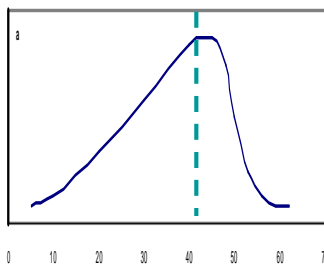
- Inhibition et activation
- Influence de la température
- Influence du pH

1

Influence de la température

- Si on chauffe une préparation enzymatique, l'activité augmente jusqu'à un maximum puis décroît rapidement.

L'augmentation d'activité (*réversible*) est liée à la variation exponentielle des constantes k_{cat} et K_M



La diminution d'activité (*irréversible*) est liée à la dénaturation de l'enzyme.

Température d'activité maximum :

- Dépend du milieu d'étude et de la nature de l'enzyme.
- Dans un milieu proche du milieu biologique, la majorité des enzymes se dénaturent à partir de 50°C.
- Cependant certaines, sont plus stables ou même moins stables.

2

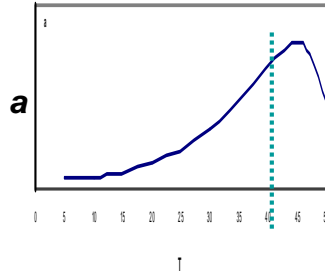
Activation thermique

Augmentation réversible d'activité avec la température qui se produit avant que l'enzyme se dénature.

Protocole expérimentale [S] à saturation

On mesure l'activité (a_{max}) d'une préparation d'enzyme à diverses températures et on trace la courbe $a = f(T)$:

Résultats :



Celle-ci est liée aux variations des constantes caractéristiques K_M et k_{cat}

3

Activation thermique (suite)

Interprétation des résultats

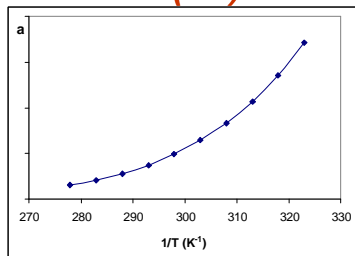
Interprétation : On démontre en chimie que les constantes cinétiques des réactions simples varient toute en vitesse $\exp(-E_a/RT)$.

Or k_{cat} est la constante cinétique de l'étape lente.

$$k_{cat} = k_{cat,infini} e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

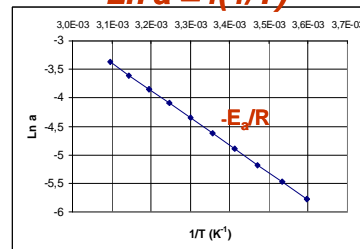
$$a = a_{infini} e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

$a = f(1/T)$



$$\ln a = \ln a_{infini} - \frac{E_a}{RT}$$

$\ln a = f(1/T)$



E_a est dit « énergie d'activation ». Elle est comprise entre 20 et 80 kJ

kelvin = Celsius + 273.15

Activation thermique (suite)

Interprétation des résultats

Etude du Q_{10}

L'énergie d'activation suffit pour caractériser l'effet de la température mais est « peu parlante ». On définit de façon plus simple d'utilisation le Q_{10} .

Q_{10} : Facteur par lequel est multiplié l'activité si la température augmente de 10°C.

$$Q_{10} = \frac{a_{T+10}}{a_T} = \frac{a_{\text{infini}} e^{-\frac{E_a}{R(T+10)}}}{a_{\text{infini}} e^{-\frac{E_a}{RT}}} = e^{\frac{10E_a}{RT(T+10)}}$$

Par approximation $Q_{10} = e^{-\frac{10E_a}{RT^2}}$

Le Q_{10} des enzymes varie entre 1,5 et 2,5.

- Remarque : Le Q_{10} d'une réaction catalysée est inférieur à celui de la réaction spontanée (l'énergie d'activation est plus faible)
- Exemple : Hydrolyse du saccharose

• Spontanée	$E_A = 400 \text{ kJ}$	$Q_{10} = 4,5$
• Saccharase	$E_A = 80 \text{ kJ}$	$Q_{10} = 2,5$

5

Activation thermique [S] hors saturation

Hors saturation l'activité varie de la même façon que à saturation :

$$a = a_{\text{infini}} e^{-\frac{E'_a}{RT}}$$

$$\ln a = \ln a_{\text{infini}} - \frac{E'_a}{RT}$$

L'énergie d'activation est plus faible.

Ceci est dû à la variation du K_M avec la température.

6

Dénaturation Thermique

La dénaturation est la **rupture** des **liaisons faibles** stabilisant les structures secondaires , tertiaires et quaternaires d'une protéine.

La protéine s'organise en pelote statistique de volume beaucoup plus grand que la protéine native.

Remarque : les ponts disulfures ne sont pas détruits.

7

Dénaturation

La dénaturation est obtenue si la protéine est dissoute dans un milieu dont la composition est éloignée de celle du milieu biologique :

- *Lors qu'on chauffe une protéine,*
- *pH très acide ou basiques,*
- *Concentration saline insuffisante,*
- *Présence d'agents dénaturants formant des liaisons hydrophobes ou hydrogène avec les restes d'acides aminés...*

La protéine dénaturée perd les propriétés d'intérêt biologique de la protéine native.

Sa réactivité chimique augmente car les restes d'acides aminés sont tous plus accessibles (en particulier, les petites molécules pénètrent à l'intérieur de la protéine dénaturée).

8

Dénaturation thermique

- La vitesse de dénaturation dépend de la protéine et du milieu d'étude.
- *Dans un milieu suffisamment proche du milieu biologique, la majorité des protéines sont stables jusqu'à 50°C et sont dénaturées en quelques secondes à température supérieure à 60°C.*
- Certaines sont beaucoup plus stables et quelques unes moins stables.
 - *Sous forme solide les protéines se dénaturent très lentement*

Applications

- 1) Une solution protéique doit être préparée et conservée à température proche de 0°C (**dans de la glace pilée**)
- Elle sera portée à température ambiante uniquement au moment d'effectuer des mesures.
- 2) Une fois purifiées, les protéines sont conservées sous forme **lyophilisées** à température **inférieure à 0°C** ou **précipitée** dans une solution de sulfate d'ammonium à température comprise entre **0 et 5°C**.

9

Cinétique de dénaturation

La dénaturation est une réaction du premier ordre :

$$-\frac{d[E]}{dt} = k_d[E] \quad [E] = [E]_0 e^{-k_d t} \quad \text{Ln}[E] = \text{Ln}[E]_0 - k_d t$$

$$k_d = k_{d,\text{infini}} e^{-\frac{E_{a,d}}{RT}}$$

$E_{a,d}$ est très élevée
(plusieurs centaines de kJ)

- Pour une enzyme, l'activité résiduelle s'exprime selon :

$$a_r = a_0 e^{-k_d t} \quad \text{Ln } a_r = \text{Ln } a_0 - k_d t$$

10

Dénaturation thermique

Protocole expérimental

La méthode de double incubation est utilisée (comme pour l'étude de tout phénomène « lent »)

Première incubation (dite pré-incubation) :

- On incube l'enzyme à une température dénaturante (choisie pour que celle-ci s'effectue en 10 à 20 min)

Il se fait la réaction : $E_a \rightarrow E_{\text{dénat}}$

Deuxième incubation (analytique) :

- A des temps fixés, on effectue des prélèvements dont on mesure l'activité résiduelle a_r à température ambiante ([S] en général à saturation).

Pour déterminer k_d à une température, on trace la droite :

$$\ln a_r = f(t) \text{ (pente } -k_d\text{)}.$$

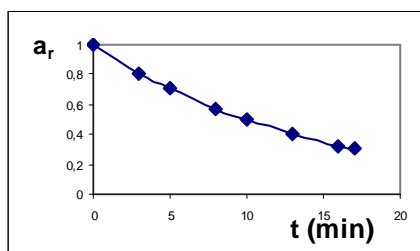
Pour déterminer $E_{a,d}$, on trace la courbe :

$$\ln k_d = f(1/T) \text{ (pente } -E_{a,d}/R\text{)}$$

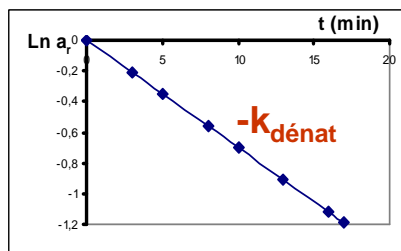
11

Traitement des données expérimentaux:

$$a_r = f(t)$$



$$\ln(a_r) = f(t)$$



Pour une température de pré-incubation donnée

12

Dénaturation thermique (suite)

Interprétation des résultats

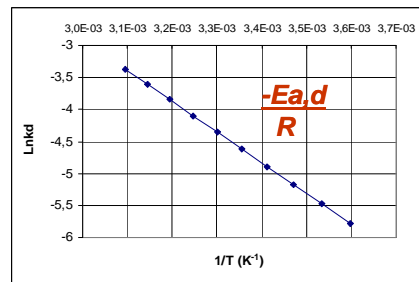
Interprétation : Comme pour l'activation, on démontre en chimie que les constantes cinétiques des réactions simples varient toutes en $\exp(-E_a/RT)$.

Or $k_{\text{dénat}}$ est une constante cinétique:

$$k_{\text{dénat}} = k_{\text{dénat, infini}} e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

$\ln k_d = f(1/T)$

$$\ln k_{\text{dénat}} = \ln k_{\text{dénat, infini}} - \frac{E_{a,d}}{RT}$$



On s'intéresse à déterminer E_a est dit « énergie de dénaturation ».

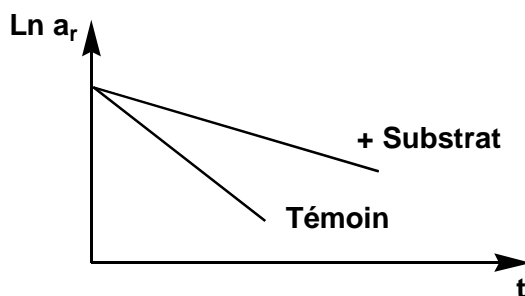
13

kelvin = Celsius + 273.15

Dénaturation thermique (suite)

Protection par le substrat ou un ligand

Si on incube l'enzyme en présence d'un substrat ou plus généralement, un ligand, la vitesse de dénaturation est plus faible



Les sites de fixation sont des points de fragilité de l'enzyme où commence la dénaturation. L'ajout d'un ligand crée des liaisons faibles supplémentaires qui stabilisent l'enzyme.

Application

- La dénaturation thermique en absence ou présence de ligands peut être utilisée pour savoir si un composé X se fixe sur l'enzyme : k_d est diminuée s'il se fixe

14

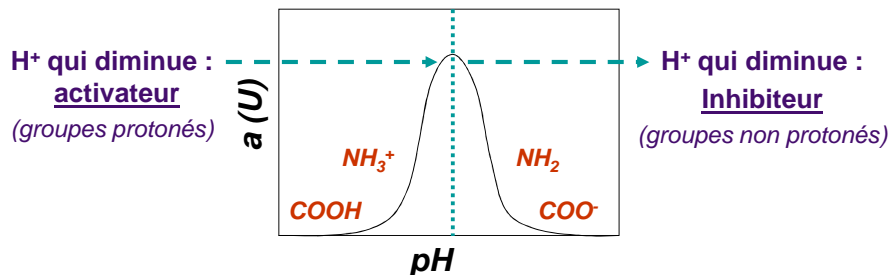
Effet du pH

Les enzymes ont un domaine d'activité limité à une zone de pH.

Elles s'inhibent de façon réversible en milieu trop acide ou trop basique.

INHIBITION REVERSIBLE PAR LE pH

L'activité est liée à l'état de ionisation des groupes de fixation et catalytiques



Cette activation et inhibition porte sur le K_M et/ou le a_{max} .

Remarque : Il n'y a pas de différence de nature entre la modulation par H⁺ et celle par un autre inhibiteur. Cependant, la méthode d'étude diffère car pour fixer [H⁺] on utilise un système tampon.

15

Interprétation de la modulation réversible liée au pH

Cet effet est en général lié aux propriétés acido-basiques de certains des groupes de fixation ou catalytiques.

1^{er} exemple :

Supposons une enzyme ayant un groupe de fixation aspartate ($-COO^-$) de pK_a 6. Il fixe le substrat par liaison ionique.

À $pH < 6$, l'aspartate se protonne ($-COOH$) et ne porte plus de charge.

L'enzyme lie moins bien le substrat : $K_M \nearrow$

De même si une lysine chargée ($-NH_3^+$) est un groupe de fixation, K_m augmente à pH élevée.

16

2ème exemple :

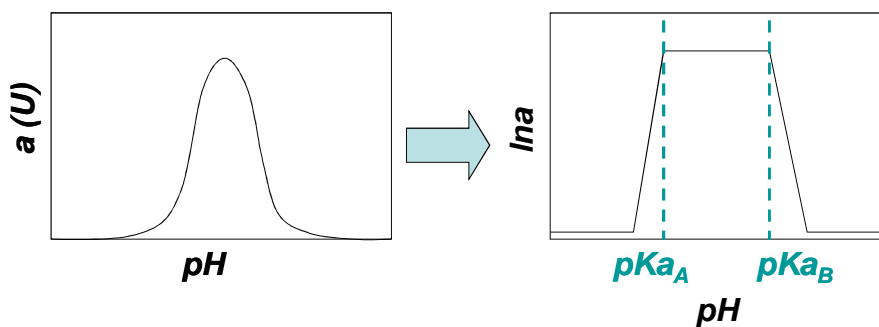
Supposons une enzyme ayant un groupe catalytique aspartate (-COO⁻) Celui-ci est nucléophile.

À pH < 6, l'aspartate se protonne (-COOH) devient électrophile : k_{cat} ↘

Remarque : L'effet inhibiteur ou activateur de H⁺ peut être lié à un changement de conformation de E : En effet le changement d'état de protonation d'un aminoacide stabilisant le structure tertiaire crée ou détruit une liaison ionique, ce qui peut déformer l'enzyme.

17

Il est possible de déterminer les acides aminés impliqués dans le mécanisme en déterminant les pKas.



NB : En milieu très acide ou basique, l'enzyme se dénature, ce qui correspond à une inhibition irréversible. Cependant, l'enzyme est en générale inactive avant d'être dénaturée.

18

Interprétation de l'inhibition liée au pH (suite)

- Ne pas oublier que le pK_a d'un reste d'acide aminé dans une protéine peut différer d'au maximum 2 unités de pK_a de même groupe dans l'enzyme libre.

Exemple :

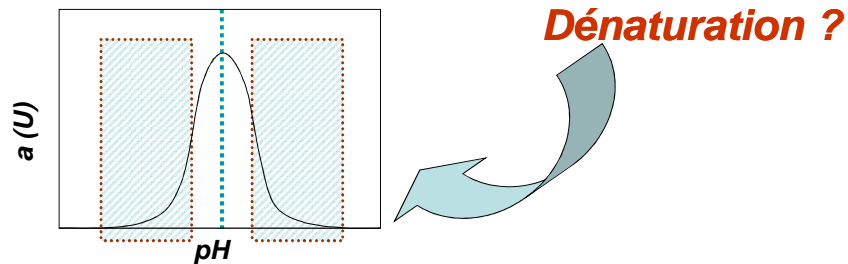
L'aspartate, le glutamate, l'histidine et la lysine ont des chaînes latérales de pK_a respectivement 3,9 4,2 6 et 9,1.

- En étudiant la variation de a_{max} et K_M avec le pH, on peut avoir une première idée de groupes catalytiques et de fixation intervenant.

Un augmentation du K_M à pH inférieur à 6 suggère qu'il existe un groupe de fixation Asp, Glu ou His (mais pas Lys).

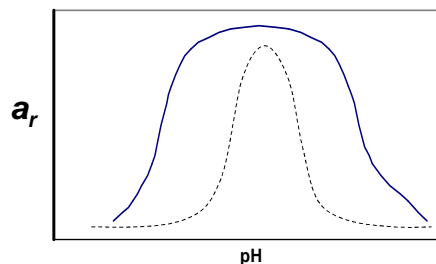
19

Il faut aussi considérer que la perte d'activité peut être aussi le résultat de la dénaturation de l'enzyme et pas uniquement de son état d'ionisation.



On utilise le protocole de double incubation pour étudier la dénaturation :

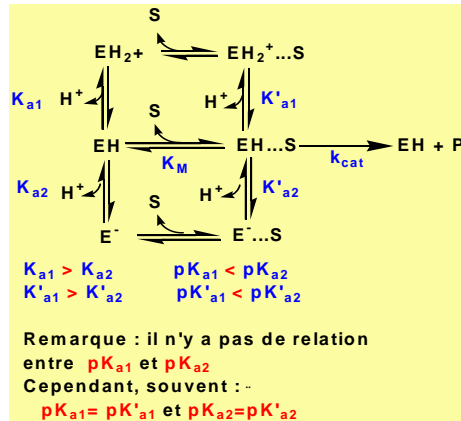
- Pre-incuber l'enzyme au pH d'étude
- Déterminer l'activité résiduelle (a_r) à chaque pH



Modèle d'inhibition par le pH

Il y a trop de possibilité pour donner un modèle général, nous prendrons un exemple illustrant les principales possibilités.

- Considérons une enzyme active sous forme EH mais existant sous forme EH₂⁺ en milieu plus acide et E⁻ en milieu plus basique.
- EH₂⁺ et E⁻ fixent S mais ont une affinité inférieure à EH



$$k_{cat}(H^+) = \frac{k_{cat}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_{a1}} + \frac{K'_{a2}}{[H^+]}}$$

$$K_M(H^+) = K_M \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{K_{a2}}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_{a1}} + \frac{K'_{a2}}{[H^+]}}$$

Attention : une enzyme n'est pas forcément active sous forme neutre : EH₂⁺ et E⁻ sont des charge relatives.

Variation de log k_{cat} avec le pH

$$k_{cat}(H^+) = \frac{k_{cat}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_{a1}} + \frac{K'_{a2}}{[H^+]}}$$

- $pH < pK'_{a1} < pK_{a2}$ $[H^+] > K'_{a1} > K'_{a2}$

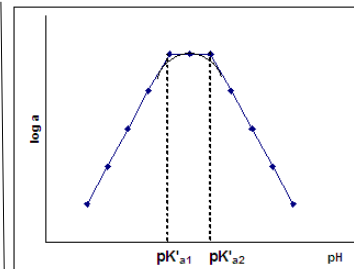
$$k_{cat}(H^+) = \frac{k_{cat} K'_{a1}}{[H^+]} \quad \log k_{cat}(H^+) = \log k_{cat} K'_{a1} + pH$$

- $pK'_{a1} < pH < pK_{a2}$ $K'_{a1} > [H^+] > K'_{a2}$

$$k_{cat}(H^+) = k_{cat} \quad \log k_{cat}(H^+) = \log k_{cat}$$

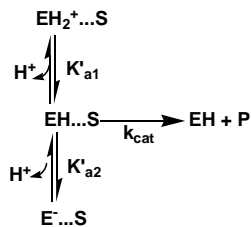
- $pK'_{a1} < pK_{a2} < pH$ $K'_{a1} > K'_{a2} [> H^+]$

$$k_{cat}(H^+) = \frac{k_{cat} [H^+]}{K'_{a2}} \quad \log k_{cat}(H^+) = \log \frac{k_{cat}}{K'_{a2}} + pH$$



Variation de $\log k_{cat}$ avec le pH : discussion

- A saturation, le modèle devient :



- Les constantes d'acidité des complexes enzyme substrat interviennent seules

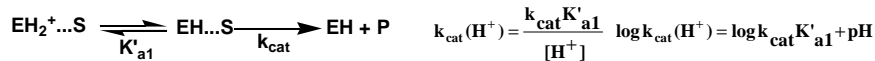
$$k_{cat}(\text{H}^+) = \frac{k_{cat}}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{\text{K}'_{a1}} + \frac{\text{K}'_{a2}}{[\text{H}^+]}}$$

- Simplifications du modèle

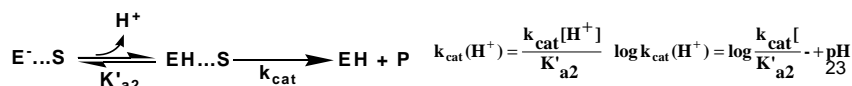
- Milieu d'activité maximum : $\text{pK}'_{a1} < \text{pK}'_{a2} < \text{pH}_2$ $\text{K}'_{a1} > \text{K}'_{a2} [> \text{H}^+]$: $[\text{ES}] = [\text{E}]_T$



- Milieu acide : $\text{pK}'_{a1} < \text{pH} < \text{pK}'_{a2}$ $\text{K}'_{a1} > [\text{H}^+] > \text{K}'_{a2}$: $[\text{EH}^+\text{S}] = [\text{E}]_T$



- Milieu basique : $\text{pH} < \text{pK}'_{a1} < \text{pK}'_{a2}$ $[\text{H}^+] > \text{K}'_{a1} > \text{K}'_{a2}$: $[\text{E}^-\text{S}] = [\text{E}]_T$



Variation de $\log K_M$ avec le pH

Il faut tenir compte de tous les domaines de pH correspondant aux diverses formes majoritaires de l'enzyme libre et du complexe enzyme substrat.

- Dans chacun d'eux, l'équation se simplifie :

la courbe $\log K_M = f(\text{pH})$ est un segment de droite.

Variation de $\log K_M$ et $\log a_{max}$ avec le pH : conclusion

- Le tracé des courbes $\log K_m = f(\text{pH})$ et $\log a_{max} = f(\text{pH})$ permet de déterminer les pK_a des groupes de fixation et catalytiques déterminant la zone d'activité maximum de l'enzyme.