

ENZYMOLOGIE

***Étude du Site actif : détermination du nombre de site
fixation***

By

SANANG AMAYA Suarès Le Prince, Msc

PhD Student in Biochemistry

University of Yaounde I – Cameroon

+237657539349

sanangsuares@gmail.com

Artemisia Yogurt

Généralité

- ❖ **Le site actif** : c'est une portion de l'enzyme constituée à la fois du **site de fixation** et du **site catalytique**.
- ❖ Ce site est formé des **acides aminés** qui sont situés le long de la chaîne polypeptidique, qui à la suite du repliement de la protéine se retrouvent dans un sens unique qui a des caractéristiques bien précises.
- ❖ Ces résidus d'acides aminés ont des groupements qui sont complémentaires à ceux du substrat et permettant la fixation de ce dernier à l'aide des interactions variées : liaisons hydrogènes, hydrophobes, électrostatiques et Van der Waals.
- ❖ Et lorsque cette fixation a lieu, d'autres résidus d'acides aminés du site catalytique vont à leur tour interagir avec certains groupements du substrat afin d'induire la catalyse.

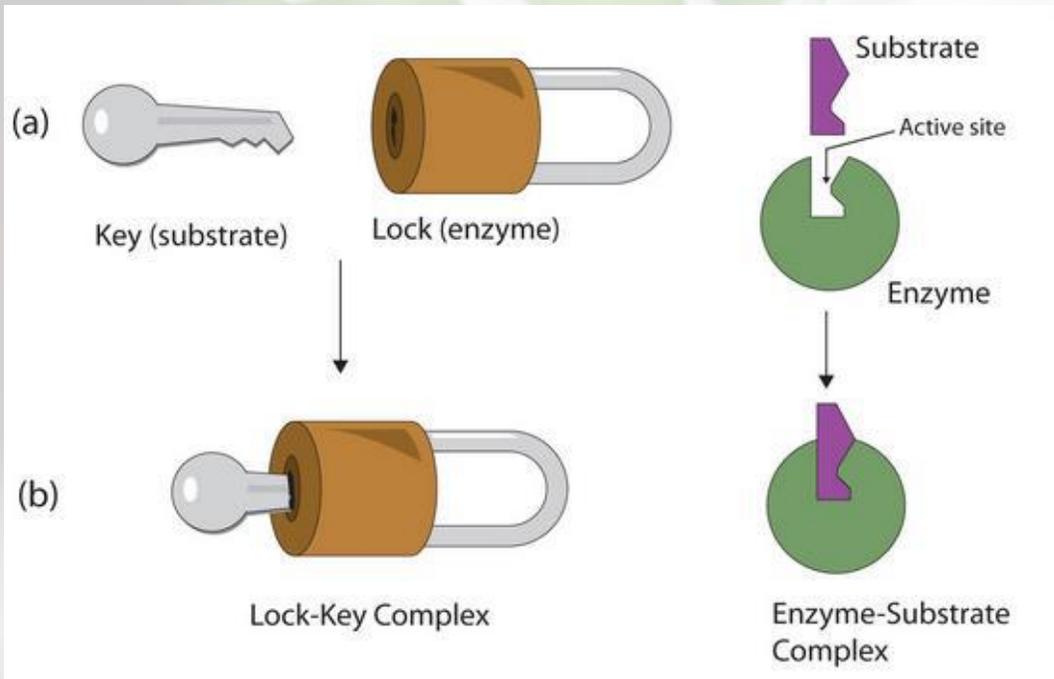
Interaction protéine-ligand à faits quantitatifs (1/3)

- ❖ Il existe plusieurs interactions entre les protéines et leurs ligands.
- ❖ Ce type s'observe lorsqu'un ***ligand se fixe sur son récepteur*** ou lorsque ***l'hormone se fixe sur son récepteur afin d'induire une réponse physiologique.***
- ❖ Elle s'observe au niveau des protéines de transport qui fixe des molécules afin de les acheminées d'un endroit à un autres de la cellule (***intérieure-extérieure ou extérieure-intérieure***) ou un autre endroit de l'organisme.
- ❖ On observe enfin ce type lorsque l'enzyme a une spécificité à fixer son substrat afin de le transformer en produit
- ❖ Ainsi, Deux modèles ont été proposés pour élucider cette spécificité

Interaction protéine-ligand à faits quantitatifs (2/3)

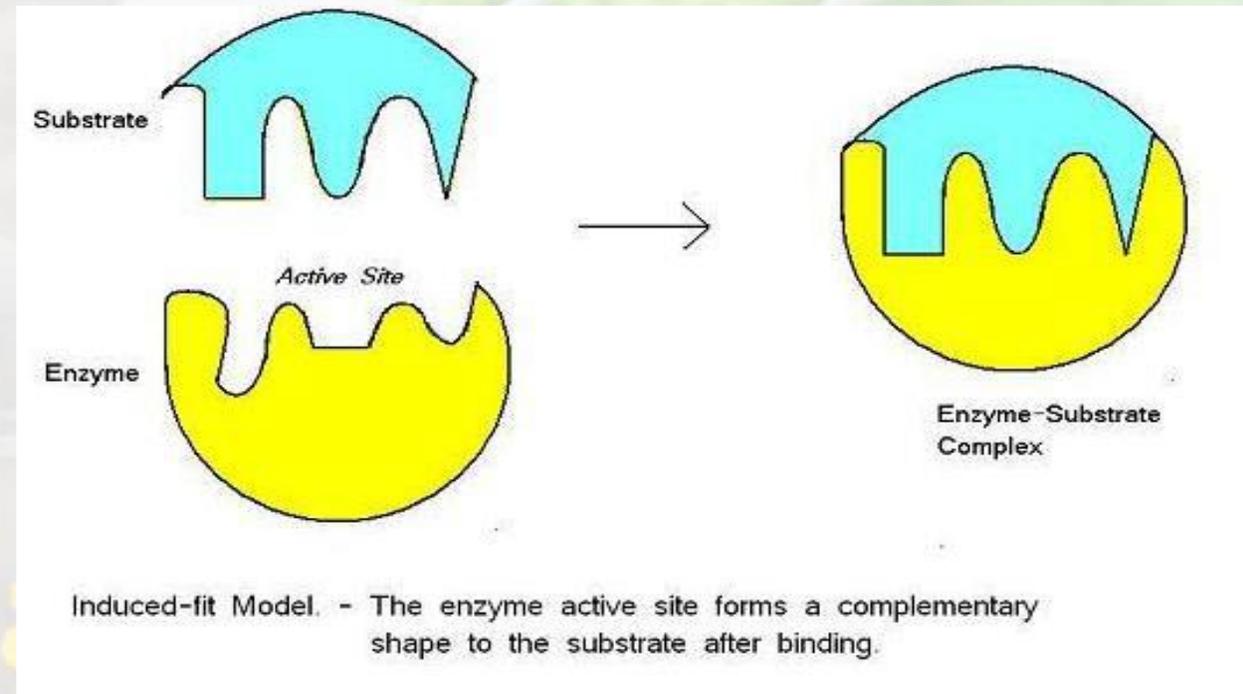
❖ **Modèle de fisher (1890) : modèle de la clé et de la serrure**

La forme du substrat (clé) est complémentaire de celle de site actif de l'enzyme (la serrure)



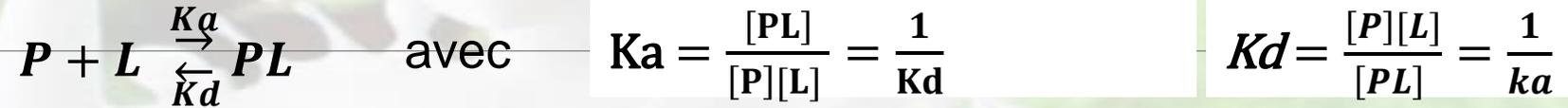
❖ **Modèle de Koshland (1985) : modèle de l'ajustement induit**

L'enzyme n'est pas **rigide**, mais **flexible**, l'enzyme et le substrat adaptent mutuellement leurs formes respectives, qui ne sont complémentaires qu'au sein du complexe enzyme substrat.



Interaction protéine-ligand à faits quantitatifs (3/3)

- ❖ A travers le Modèle de fisher et Koshland , considérons la fixation d'un ligand **L** à une protéine **P** pour former le complexe **PL**



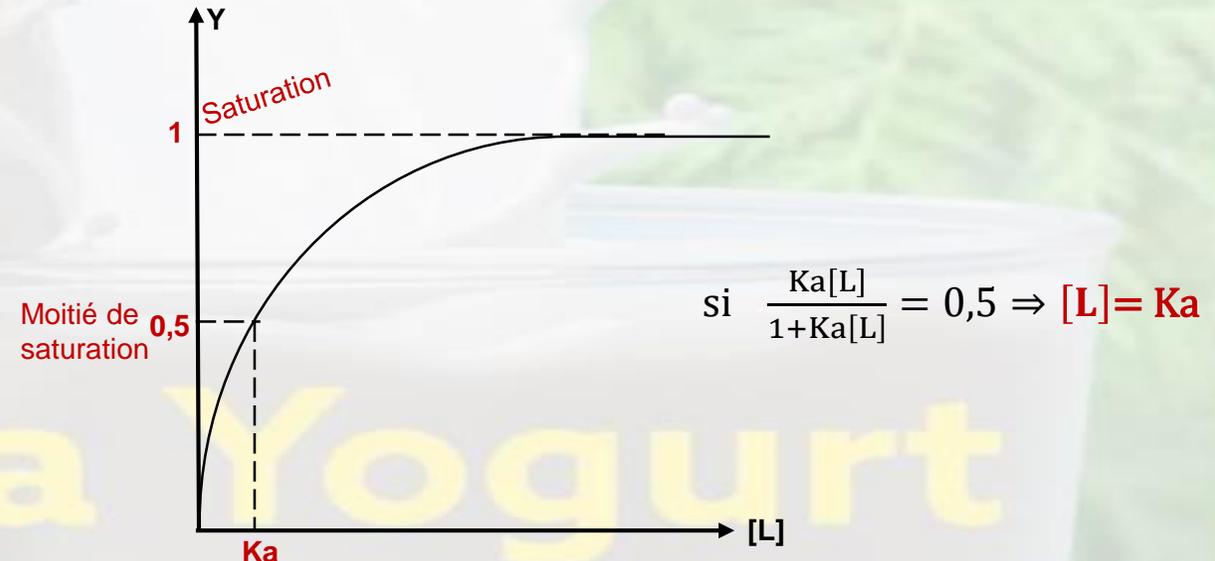
$$[P_o] = \text{quantité totale de protéines} = [P] + [PL]$$

- ❖ Étant donné que cette interaction est **spécifique**, il existe une certaine saturation ; et cette saturation partielle représente **l'occupation de la protéines par le ligand** noté **Y**.

$$Y = \frac{[PL]}{[P_o]} = \frac{[PL]}{[P] + [PL]} \quad \text{or} \quad [PL] = k_a[P][L]$$

$$\Rightarrow Y = \frac{K_a[P][L]}{[P] + K_a[P][L]} = \frac{K_a[L]}{1 + K_a[L]}$$

$$\text{d'où} \quad Y = \frac{[PL]}{[P_o]} = \frac{K_a[L]}{1 + K_a[L]}$$



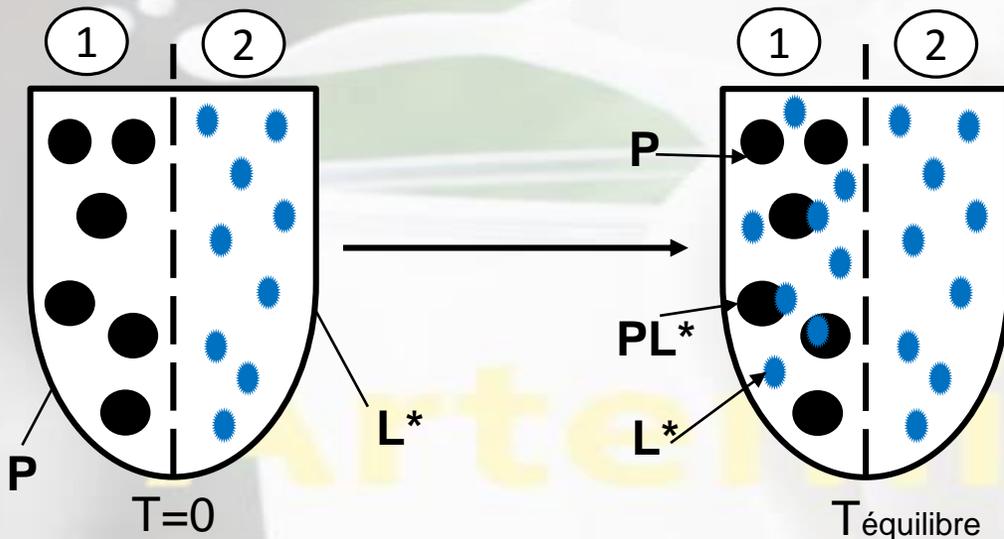
Méthode expérimentale pour la fixation de P au L (1/3)

- ❖ L'étude expérimentale de cette liaison permet de définir l'affinité du ligand pour les site de liaisons (**capacité de fixation du ligand au récepteur**).
- ❖ Cette méthode n'étudie que la fixation de L et pas la réponse biologique.

Méthode de saturation et celle de déplacement

Méthode de saturation

- ❖ C'est aussi celle de la **dialyse à l'équilibre**
- ❖ On suppose un ligand radioactif L^* dont-on peut mesurer la concentration par simple mesure de la radioactivité.



Concentration totale en ligand
 $[PL^*] + [L^*]$

Concentration de ligand libre
 $[L^*]_{\text{①}} = [PL^*] + [L^*]$

La proportion de site occupée par L par rapport au totale varie avec $[L]$ (plus L augmente plus on a des sites occupés)

Méthode expérimentale pour la fixation de P au L (2/3)

Méthode de saturation

- ❖ Ainsi on recherche le nombre de site occupée par la molécule L en fonction de la [PL]. Pour ça, considérons une protéine qui a '**n**' **site de fixation /molécule**



$$\text{ou aura } Y = \frac{nK_a[L]}{1 + K_a[L]} = \frac{[PL]}{[Po]}$$

$$\Rightarrow n[L]k_a[Po] = [PL]k_a[L] + [PL]$$

$$\Rightarrow n[L]k_a[Po] - [PL]k_a[L] = [PL]$$

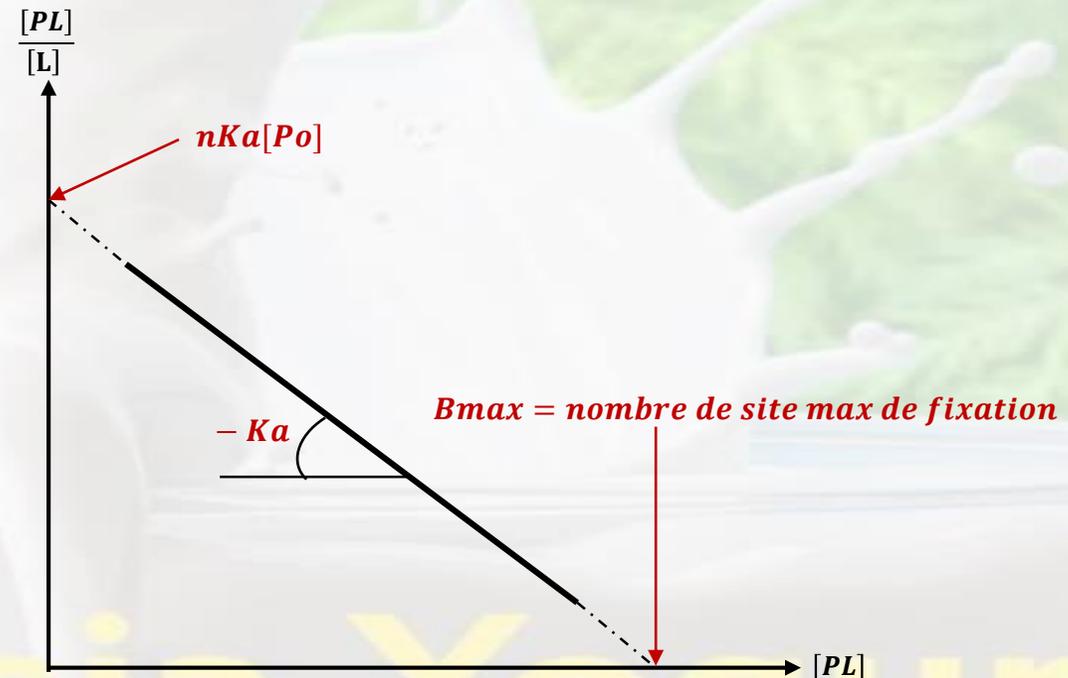
$$\Rightarrow [L](nka[Po] - [PL]ka) = [PL]$$

$$\Rightarrow nka[Po] - [PL]ka = \frac{[PL]}{[L]}$$

Relation de Scatchard

$$\frac{\text{Lié}}{\text{Libre}} = \frac{[PL]}{[L]}$$

Représentation de de Scatchard



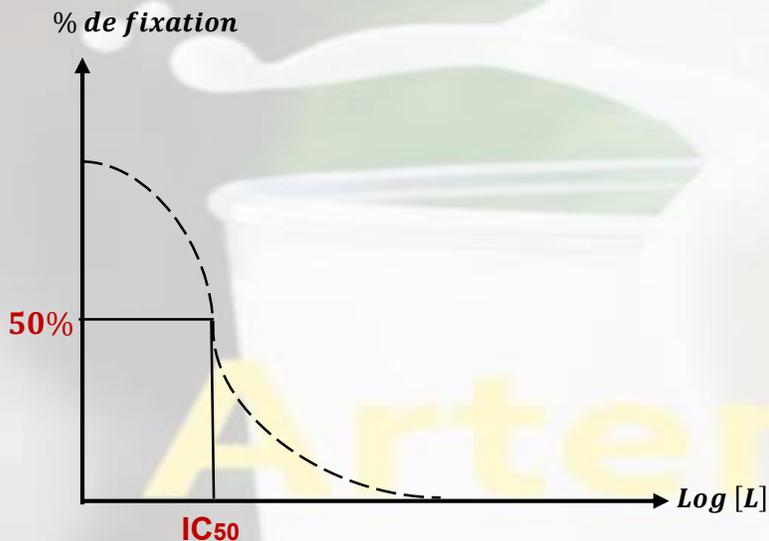
$$-ka = \frac{Y1 - Y2}{X1 - X2}$$

$$n = \frac{Bmax}{[Po]} = \text{nombre sites réellement occupées}$$

Méthode expérimentale pour la fixation de P au L (3/3)

Méthode de déplacement

- ❖ Elle permet de définir l'affinité du ligand non radioactif.
- ❖ Ces expériences sont réalisées en présence d'une concentration fixe de ligand radioactifs et de concentration croissante de ligand non radioactifs à étudier
- ❖ Permet de déterminer la **constance d'inhibition (Ki)** et **IC₅₀** (concentration de ligand non radioactif pour déplacer 50% de la fixation totale de ligand radioactif)



$$K_i = \frac{IC_{50}}{[L^{\circ}]K_d} = \frac{IC_{50}}{[L^{\circ}]}K_a$$

Plus IC₅₀ est faible plus l'affinité du ligand non radioactif est élevée

ligand non radioactif = ligand non transformé

Exercice d'application

Le dopenezil (D) est un inhibiteur de l'acétylcholine estérase (P) ayant pour substrat l'acétylcholine, sa fixation se fait avec une concentration en l'acétylcholine estérase totale de $45\mu M$. On mesure la concentration en Dopenzil lié (DP) et libre (D) et nous obtenons les valeurs suivantes :

| | | | | | | |
|------|----|-----|----|-----|----|------|
| DP/D | 3 | 2,5 | 2 | 1,5 | 1 | 0,75 |
| DP | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |

1. Déterminer le nombre de site maximale que peut avoir l'acétylcholine estérase.
2. Déterminer le nombre site réellement occupé par la dopenezil sur l'acétylcholine estérase.
3. Déterminer K_a et K_d

Artemisia Yogurt

