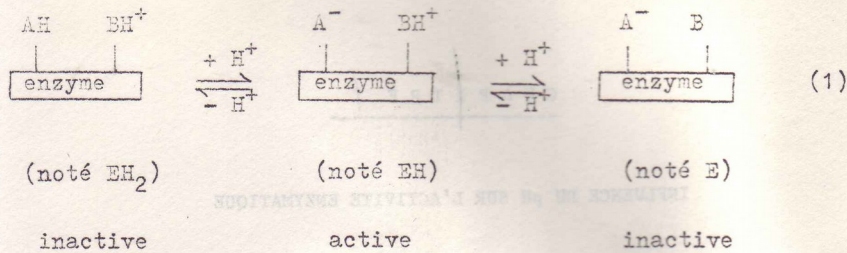


Influence du pH sur les paramètres cinétiques des enzymes

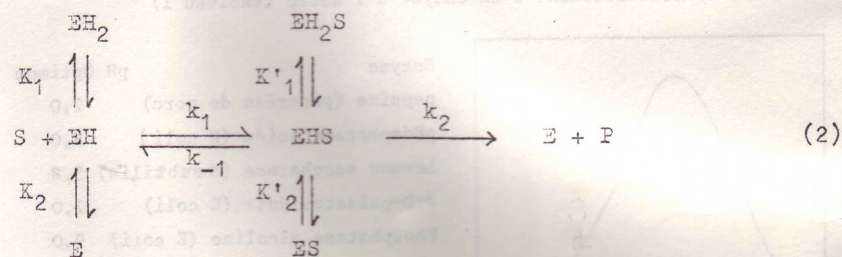
Détermination des pKa de résidus aminoacyls déterminants pour k0 et Km à l'aide de l'étude expérimentale des paramètres cinétiques en fonction du pH

Huits pages extraites du polycopié de l'Université Paris VII, "Enzymologie, Cinétique", Licence de Biochimie ; Burstein, Chambert, Gonzy-Treboul, Guion-Rain, Orsini et Reboud ; édition année universitaire 1980-1981. Publié pour le public étudiant de licence de Biochimie de l'époque.



On comprend alors que par addition d'acide ou de base, on fasse diminuer la concentration de la forme active et qu'une courbe en cloche puisse être observée.

En fait cette interprétation est trop simpliste pour rendre compte de l'ensemble des résultats expérimentaux : on doit tenir compte en fait de l'ionisation de l'enzyme et du complexe enzyme-substrat. Lorsque deux groupes ionisables de pKa différents sont impliqués, les réactions mises en jeu sont représentées par le schéma 2.



Dans un but de généralité, les charges portées par E, EH, EH₂ et par leurs formes combinées au substrat ont été omises. En admettant que les réactions de protonation et de déprotonation soient rapides par rapport à la réaction enzymatique et qu'un équilibre soit établi entre les différentes formes enzymatiques l'expression de la vitesse initiale dérivée du schéma ci-dessus est (calcul détaillé dans l'addendum) :

$$v_i = \frac{v_M \cdot s}{1 + \frac{K'_1}{K_1} + \frac{K'_2}{K_2} + \frac{K_2}{K_1} \frac{K'_2}{K_2}} = \frac{v_{M \text{ pH}} \cdot (S)}{(S) + K_M \text{ pH}} \quad (3)$$

$V_{M^{pH}}$ est la vitesse maximum au pH considéré défini par :

$$V_{M^{pH}} = V_M \frac{1}{1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)}} \quad (4) \text{ avec } V_M = k_2 (E_T)$$

$K_{M^{pH}}$ est la constante de Michaelis défini par

$$K_{M^{pH}} = K_M \frac{1 + \frac{(H^+)}{K_1} + \frac{K_2}{(H^+)}}{1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)}} \quad (5) \text{ avec } K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

L'effet du pH peut donc se faire sentir aussi bien dans la fixation du substrat que dans l'acte catalytique.

ADDENDUM

Calcul de v_t en fonction du pH. Nous avons :

$$(1') \quad K_1 = \frac{(EH) (H^+)}{(EH_2)} \quad K'_1 = \frac{(EHS) (H^+)}{(EH_2S)} \quad (3')$$

$$(2') \quad K_2 = \frac{(E) (H^+)}{(EH)} = \frac{(E) (H^+)^2}{(EH_2) K_1}$$

$$K'_2 = \frac{(ES) (H^+)}{(EHS)} = \frac{(ES) (H^+)}{(EH_2S) K'_1} \quad (4')$$

Le complexe actif est EHS^- . D'où

$$(5') \quad \frac{V_M}{v_t} = \frac{(E_t)}{(EHS)}$$

$$(E_t) = (E) + (EH) + (EH_2) + (ES) + (EHS) + (EH_2S) \quad (6')$$

d'autre part,

$$\frac{d(EHS)}{dt} = 0 = (EH) \cdot (S) k_1 - (EHS) (k_2 + k_{-1})$$

$$\frac{(EH) (S)}{(EHS^-)} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_M \quad (7')$$

Exprimons les concentrations des différentes formes de l'enzyme en fonction de (EHS^-)

De (7') nous tirons directement:

$$(EH) = (EHS) \frac{K_M}{(S)}$$

de (2') nous tirons :

$$(EH) = \frac{(E)(H^+)}{K_2}$$

Portant dans (7') nous avons :

$$\frac{(E)(H^+) / K_2 (S)}{(EHS^-)} = K_M$$

$$(E) = (EHS) \frac{K_M}{(S)} \frac{K_2}{(H^+)}$$

de (1') nous tirons :

$$(EH) = (EH_2) \frac{K_1}{(H^+)}$$

Portant dans (7')

$$\frac{(EH_2) K_1 / (H^+) (S)}{(EHS)} = K_M \quad (EH_2) = (EHS) \frac{K_M}{(S)} \frac{(H^+)}{K_1}$$

De (3) nous tirons :

$$(EH_2S) = (EHS) \frac{(H^+)}{(K'_1)}$$

De (4) nous tirons :

$$(ES) = (EHS) \frac{K'_2}{(H^+)}$$

$$\text{d'où } (E_t) = (EHS) \left[1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{K_M}{(S)} \left(1 + \frac{(H^+)}{K_1} + \frac{K_2}{(H^+)} \right) \right]$$

$$\frac{V_M}{V_t} = 1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{K_M}{(S)} \left(1 + \frac{(H^+)}{K_1} + \frac{K_2}{(H^+)} \right)$$

$$v_i = \frac{V_M}{1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)} + \frac{K_m}{(S)} \left(1 + \frac{(H^+)}{K_1} + \frac{K_2}{(H^+)} \right)}$$

Divisant par $1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)}$ et multipliant par (S)

numérateur et dénominateur nous obtenons :

$$v_i = \frac{V_M (S)}{1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)}} \cdot \left((S) + K_M \left(\frac{1 + \frac{(H^+)}{K_1} + \frac{K_2}{(H^+)}}{1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)}} \right) \right)$$

ANALYSE DES RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les valeurs des constantes d'ionisation des résidus amino-acides impliqués dans l'activité de l'enzyme sont obtenues à partir de graphes de variation du logarithme des paramètres cinétiques en fonction du pH.

1°) Variation de la vitesse maximum en fonction du pH. Elle reflète la protonation ou la déprotonation d'un groupement fonctionnel du complexe enzyme-substrat dont la transformation constitue l'étape lente de la réaction étudiée. Bien que l'état d'ionisation du substrat (ou d'un des substrats) puisse affecter la vitesse maximum, les effets observés en fonction du pH viennent habituellement de l'ionisation de groupements fonctionnels de résidus amino-acides de l'enzyme réellement impliqués dans la catalyse = groupe imidazole de l'histidine, groupe carboxylique de l'aspartate et du glutamate, groupes thiols de la cystéine, hydroxylique de la tyrosine, α -aminé de l'acide aminé N-terminal de la chaîne protéique ou ϵ -aminé de la lysine.

La figure 2 représente la variation de V_M en fonction du pH (équation 4) Les pKa des groupements fonctionnels du complexe enzyme-substrat impliqués sont donnés par l'abscisse des points d'inflexion présentés par la courbe (ici à titre d'exemple $pK'_1 = 4$ et $pK'_2 = 8$). La représentation logarithme (équation 6) permet

une détermination plus commode de ces pKa (figure 3).

$$(4) \text{ donne } \lg V_M^{\text{pH}} = \lg V_M - \lg \left(1 + \frac{K'_2}{K'_1 + (H^+)} \right) \quad (6)$$

en effet =

- en milieu suffisamment acide, le terme $\frac{(H^+)}{K'_1}$ peut devenir beaucoup plus grand que $1 + \frac{K'_2}{(H^+)}$. Alors :

$$\lg V_M^{\text{pH}} = \lg V_M - \lg \frac{(H^+)}{K'_1} = \lg V_M + \text{pH} - \text{pK}'_1$$

A pH peu élevé, $\lg V_M^{\text{pH}}$ variera linéairement avec le pH (pente + 1)

- au contraire, en milieu basique, $1 + \frac{(H^+)}{K'_1}$ deviendra négligeable devant

$\frac{K'_2}{(H^+)}$ et

$$\lg V_M^{\text{pH}} = \lg V_M - \lg \frac{K'_2}{(H^+)} = \lg V_M - \text{pH} + \text{pK}'_2$$

$\lg V_M^{\text{pH}}$ varie linéairement avec le pH mais la pente de la droite est -1

- dans la série intermédiaire de pH, $\frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)}$ peut devenir négligeable devant 1 d'où

$$\lg V_M^{\text{pH}} = \lg V_M$$

La droite représentative de $\lg V_M^{\text{pH}} = f(\text{pH})$ à une pente nulle.

Les intésections des droites de pentes + 1 et 0 d'une part et de celles de pentes -1 et 0 se produisent respectivement à

$$\text{pH} = \text{pK}'_1 \quad (\lg V_M + \text{pH} - \text{pK}'_1 = \lg V_M)$$

et

$$\text{pH} = \text{pK}'_2 \quad (\lg V_M - \text{pH} + \text{pK}'_2 = \lg V_M)$$

Cet analyse des variations de $\lg V_M$ en fonction du pH permet donc de déterminer la valeur des pKa de la forme Enzyme - substrat.

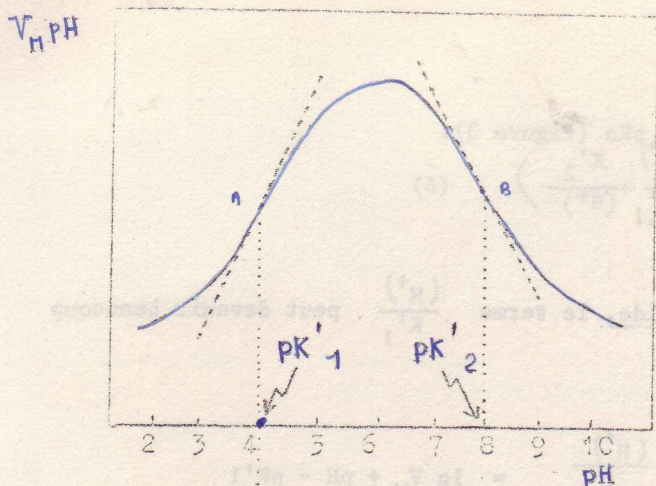


Figure 2

$$V_{MPH} = \frac{V_M}{1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)}} \quad (4)$$

a, b = tgtes au pt d'inflexion -

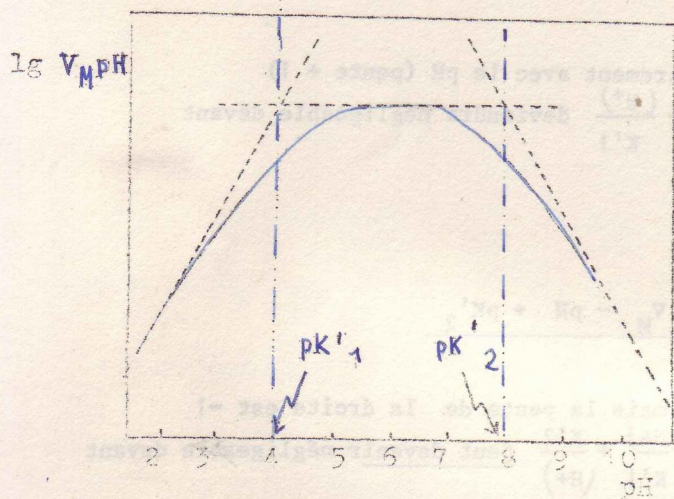


Figure 3

$$\lg V_{MPH} = \lg V_M - \lg \left(1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)} \right) \quad (6)$$

2°) Variation de K_{MPH} en fonction du pH

Elle est plus complexe puisqu'elle dépend des constantes de dissociation de l'enzyme libre et du complexe enzyme-substrat (équation 5 ci-dessus). Les pKa impliqués peuvent être déterminés graphiquement en appliquant le même mode de raisonnement que précédemment à l'équation (7) :

$$pK_{MPH} = -\lg K_{MPH} = pK_M + \lg \left(1 + \frac{(H^+)}{K'_1} + \frac{K'_2}{(H^+)} \right) - \lg \left(1 + \frac{(H^+)}{K_1} + \frac{K_2}{(H^+)} \right) \quad (7)$$

Mais la plus grande complexité des courbes rend souvent leur interprétation difficile. Aussi préfère-t-on généralement analyser les variations du rapport $\lg \frac{V_{MPH}}{K_{MPH}}$ en fonction du pH

3°) Variation du rapport $\lg \frac{V_{M^{pH}}}{K_{M^{pH}}}$

D'après les expressions de $V_{M^{pH}}$ et $K_{M^{pH}}$ établies plus haut (équations 4 et 5), on peut écrire :

$$\frac{V_{M^{pH}}}{K_{M^{pH}}} = \frac{V_M}{K_M} \times \frac{1}{1 + \frac{(H^+)}{K_1} + \frac{K_2}{(H^+)}} \quad (8)$$

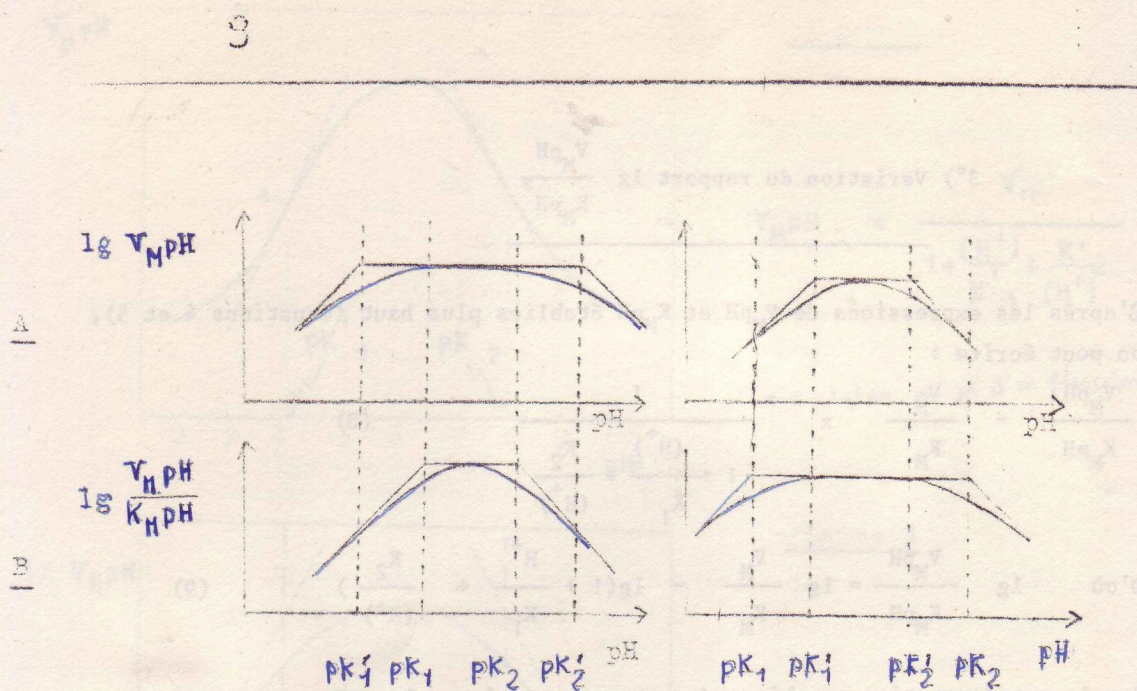
$$\text{D'où} \quad \lg \frac{V_{M^{pH}}}{K_{M^{pH}}} = \lg \frac{V_M}{K_M} - \lg \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{(H^+)} \right) \quad (9)$$

Sur la représentation graphique de cette expression, les pKa correspondant aux constantes de dissociation K_1 et K_2 de groupes présents sur l'enzyme libre sont déterminés à partir des abscisses des points d'intersection des droites $+1$ et 0 d'une part, -1 et 0 d'autre part (figure 4B), comme le montre un raisonnement similaire à celui conduit pour la variation de $\lg V_{M^{pH}}$ en fonction du pH et appliqué à l'équation (9) ci-dessus.

Ce rapport $V_{M^{pH}}/K_{M^{pH}}$ est une constante apparente de premier ordre pour la réaction de l'enzyme avec le substrat à faible concentration (si la réaction enzymatique fait intervenir plusieurs substrats, les autres substrats sont saturants). Elle reflète la faculté de l'enzyme et du substrat à former un complexe productif. Donc toute ionisation se produisant soit sur le substrat soit sur la forme enzymatique se combinant avec le substrat affectera la variation de $\lg(V_{M^{pH}}/K_{M^{pH}})$ en fonction du pH. Comme les pKa des substrats sont normalement connus, tout autre pKa observé doit appartenir à un résidu amino acide de l'enzyme. L'avantage de cette analyse est de fournir les valeurs des pK de la forme enzymatique libre E et de refléter seulement une étape : la combinaison de l'enzyme et de son substrat.

On choisit plus souvent encore l'analyse des variations du rapport $\frac{k_{cat}}{K_M}$ (ou $\lg \frac{k_{cat}}{K_M}$) en fonction du pH, qui est équivalent aux expressions précédentes (8) et (9) au facteur (E_T) près. On voit ici que ce rapport en effet ne tient compte que des complexes enzyme-substrat capables de libérer du produit, éliminant toute forme enzymatique donnant naissance à des complexes improductifs, dits abortifs, ainsi qu'on l'a vu dans un chapitre précédent.

ou plutôt dans un essai de T. D.



Courbes de pH et identification des résidus amino-acides présents dans le centre actif des enzymes

L'analyse des courbes ci-dessus a montré que la variation des paramètres cinétiques en fonction du pH suit la courbe de neutralisation des groupements en cause. Il est donc tentant d'identifier les groupements fonctionnels des acides aminés mis en cause en comparant les pKa déterminés par l'analyse des courbes de pH aux pKa habituellement présentés par ces groupes fonctionnels dans les protéines (tableau II). Ce tableau montre que les pKa des résidus acides aminés varient fortement selon leur environnement dans la protéine (des écarts de 4 unités de pH par rapport à la structure modèle - peuvent être observés). Cette méthode ne peut donc être employée seule pour caractériser la nature des acides aminés du centre actif et ses résultats doivent être comparés à ceux obtenus par d'autres techniques (tableau III).

On peut citer le cas du Lysozyme, dans lequel le groupe γ -carboxy d'un résidu acide glutamique jouant un rôle dans le centre actif voit son pKa s'élever à $\text{pH} \approx 6$, du fait de son environnement non polaire dans la protéine native.