

Influence du milieu d'étude sur l'activité

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

La conformation de l'enzyme dépend du milieu où elle se trouve.

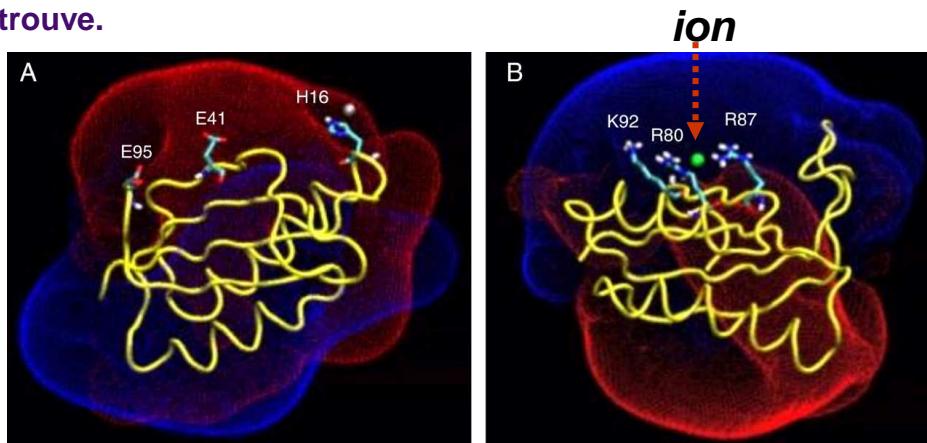
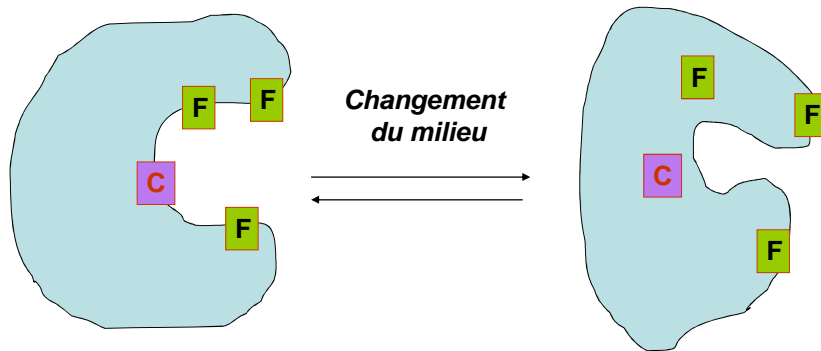


FIGURE The electrostatic potential surface around the protein. (A) Residue His-16 (which is transiently located in the vicinity of the ion) and the two attractor sites Glu-41 and Glu-95 are presented under the positive Coulomb cage umbrella. (B) Residues Arg-80 and Arg-87, which are the strongest ion attractors, and Lys-92, which is located in their vicinity and forms a weak ion attractor, are presented as the ion is detained by Arg-80 and Arg-87. The Coulomb cages for the positive (blue) and negative (red) domains are drawn at the distance where the electrostatic potential equals 1 kBT/e.

Friedman et coll., *Biophysical Journal* 89:768-781 (2005)

Les groupes catalytiques ou de fixation ont une efficacité dépendant de la composition du milieu.



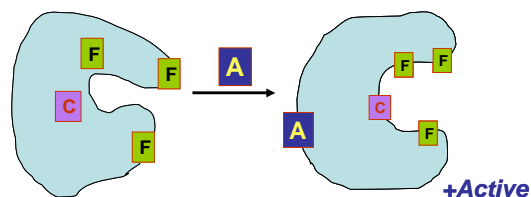
Il en résulte que :

- Toute modification du milieu provoque une variation de l'activité de quelques % au moins.
- NB : Certains composés réagissent en créant des liaisons covalentes avec un aminoacide.

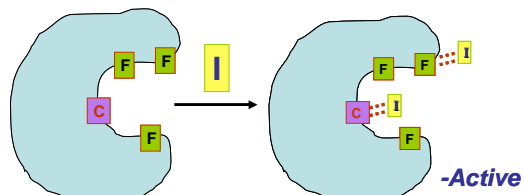
Activateurs ou inhibiteurs enzymatiques

Ions ou molécules organiques présents à faible concentration dans un milieu et capables de provoquer une variation importante de l'activité de l'enzyme /

– En raison d'un changement global de conformation.



– Et/ou en interagissant fortement avec les groupes catalytiques ou de fixation.

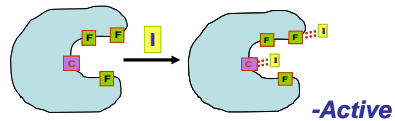


Modulation

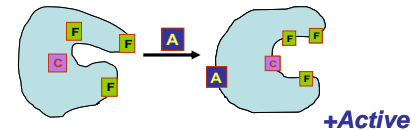
- Les modulateurs modifient le K_M et/ou le a_{max}

On appelle **modulateurs** les composés qui, ajoutés au milieu provoquent une forte modification de l'activité d'une enzyme.

- Les **inhibiteurs** diminuent l'activité de celle-ci.



- Les **activateurs** augmentent l'activité de celle-ci.



Modulation réversible et irréversible

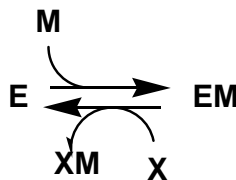
- On distingue 2 types de modulateurs :
 - Réversibles
 - irréversibles.

Les modulateurs réversibles :

- Ils se fixent par liaison faible sur l'enzyme.
- Ce phénomène est « instantané » ($t < 1\text{ms}$).
- Si on élimine le modulateur par dialyse ou chromatographie d'exclusion de gel, l'enzyme retrouve son activité initiale.

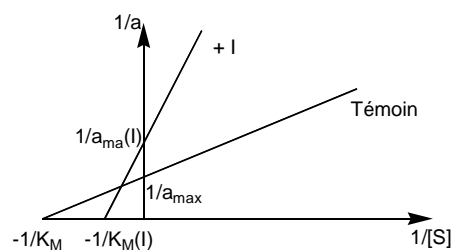
Les modulateurs irréversibles :

- Les modulateurs irréversibles se fixent par liaison **covalente** sur l'enzyme.
- Ce phénomène est « lent » (Il fait de quelques secondes à plusieurs heures pour atteindre l'état d'équilibre).
- Si on élimine le modulateur par dialyse ou chromatographie d'exclusion de gel, l'enzyme ne retrouve pas son activité initiale.
- On peut néanmoins régénérer l'enzyme par une réaction chimique éliminant le modulateur :



Inhibition réversible

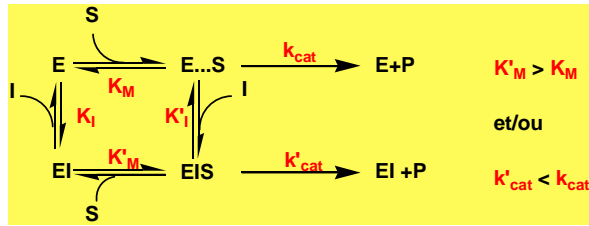
- Un inhibiteur réversible provoque instantanément une augmentation du K_M et/ou une diminution du k_{cat} .



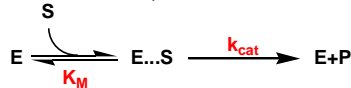
- Dans le milieu de référence, l'enzyme est caractérisé par les constantes vraies K_M et k_{cat} .
- Dans un milieu où l'inhibiteur est à concentration I , l'enzyme est caractérisé par les constantes apparentes $K_M(I)$ et $k_{cat}(I)$.

NB : Une **constante vraie** caractérise une enzyme dans un **milieu de référence**. Une **constante apparente** caractérise une enzyme dans un milieu où on a ajouté un modulateur à concentration fixée. Elle dépend *a priori* de la **concentration du modulateur**.

Modèle général d'inhibition réversible

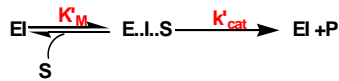


- En absence de I, le modèle devient :



L'enzyme est caractérisé par les constantes vraies K_M et k_{cat}

- En excès de I, le modèle devient :



L'enzyme est caractérisé par les constantes vraies K'_M et k'_{cat}

Selon la concentration de I, on mesure les constantes apparentes $K_M(I)$ et $k_{cat}(I)$

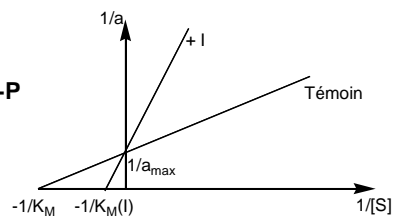
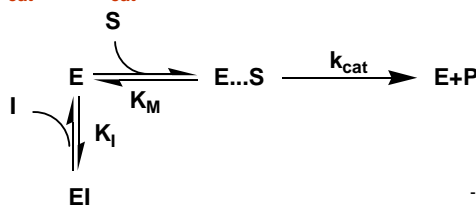
$$K_M < K_M(I) < K'_M \quad k_{cat} > k_{cat}(I) > k'_{cat}$$

- L'inhibition correspondante est dite mixte.

1^{er} cas limite : Inhibition compétitive (i.c.)

- L'activité maximum ne dépend pas de la concentration de I :

$$k_{cat}(I) = k_{cat}$$

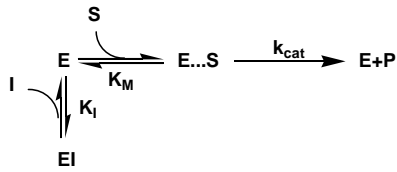


$$K_M < K_M(I)$$

$$k_{cat}(I) = k_{cat} \text{ (constant)}$$

- Inhibition compétitive totale
- Le complexe EI ne fixe pas S.
- L'inhibiteur ne se fixe que sur E (site actif)

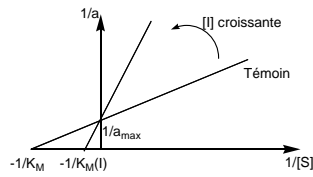
Inhibition compétitive : étude expérimentale



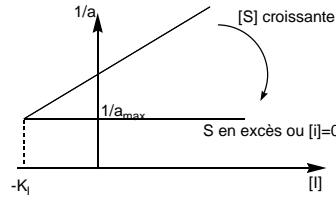
$$k_{cat}(\mathbf{I}) = k_{cat}$$

$$K_M(\mathbf{I}) = K_M \left(1 + \frac{[\mathbf{I}]}{K_I}\right)$$

- On réalise une série de préparation correspondant à 5 valeurs de [S] encadrant K_M et 5 valeurs de [I] encadrant K_I .
- On trace les réseaux courbes $1/a = f(1/[S])$ à [I] constant et $1/a = f([I])$ à [S] constant.



Les courbes $1/a = f(1/[S])$ montre que I est inhibiteur compétitif.

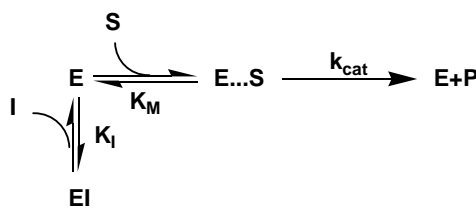


Les courbes $1/a = f([I])$ sont des droites convergeant au point de coordonnées $-K_I, 1/a_{max}$.

Elles permettent de déterminer K_I .

NB : Si l'inhibition est partielle, les courbes $1/a = f([I])$ ne sont pas des droites.

Inhibition compétitive totale : Loi cinétique



$$a = k_{cat} [\text{E...S}]$$

$$[\text{E}]_T = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}]$$

$$\frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} = K_M$$

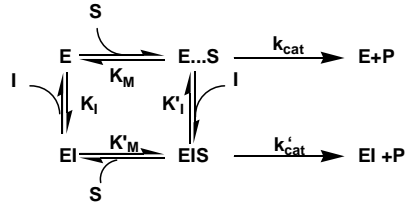
$$\frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]} = K_I$$

$$a = \frac{k_{cat} [\text{E}]_T [\text{S}]}{K_M \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I}\right) + [\text{S}]}$$

$$k_{cat}(\mathbf{I}) = k_{cat}$$

$$K_M(\mathbf{I}) = K_M \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_I}\right)$$

Note : Inhibition compétitive partielle

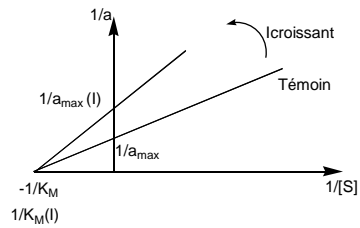
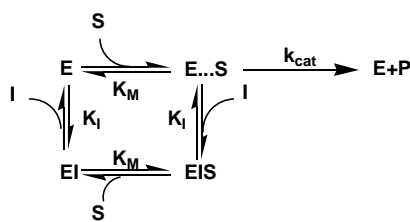


$K_M < K_M(I) < K'_M$ $k_{cat}(I) = k'_{cat}$ (constant)

- Le complexe EI fixe S avec une moindre affinité
- EIS catalysé en produit avec la même efficacité que ES (k_{cat} inchangé)
- Sites distincts

2ème cas limite : Inhibition non compétitive (i.n.c.)

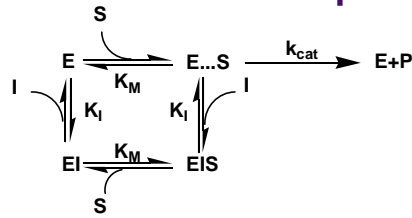
- L'affinité ne dépend pas de la concentration de I : $K_M(I) = K_M$



$K_M(I) = K_M$ (constant) $k_{cat} > k_{cat}(I)$

- Inhibition non compétitive totale
- Le complexe EIS ne produit pas de P : $k'_{cat} = 0$.

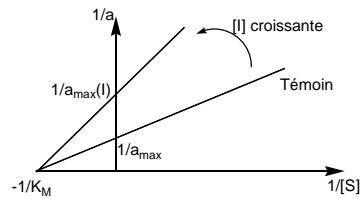
Inhibition non compétitive : étude expérimentale



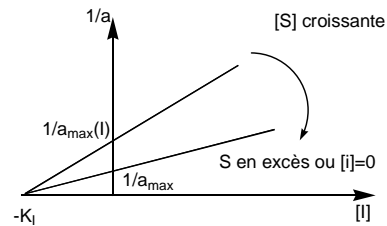
$$k_{\text{cat}}(\text{I}) = \frac{k_{\text{cat}}}{1 + \frac{[\text{I}]}{K_I}}$$

$$K_M(\text{I}) = K_M$$

- On réalise une série de préparation correspondant à 5 valeurs de [S] encadrant K_M et 5 valeurs de [I] encadrant K_I .
- On trace les réseaux courbes $1/a = f(1/[S])$ à [I] constant et $1/a = f([I])$ à [S] constant.



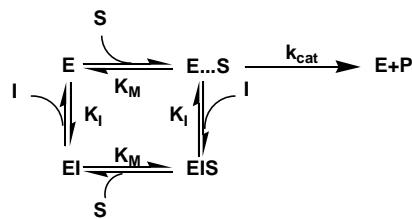
Les courbes $1/a = f(1/[S])$ montre que I est inhibiteur non compétitif



Les courbes $1/a = f([I])$ sont des droites convergeant au point de coordonnées $-K_I$.

Elles permettent de déterminer K_I .

Inhibition non compétitive totale : Loi cinétique



$$a = k_{\text{cat}}[\text{E...S}]$$

$$[\text{E}]_T = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EI}] + [\text{EIS}]$$

$$\frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} = K_M$$

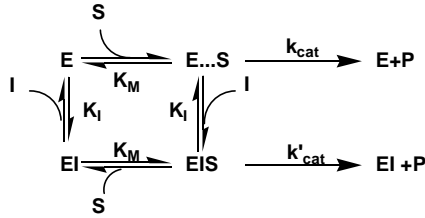
$$\frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]} = K_I$$

$$a = \frac{k_{\text{cat}}[\text{E}]_T [\text{S}]}{1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{[\text{S}]}{K_M}}$$

$$k_{\text{cat}}(\text{I}) = \frac{k_{\text{cat}}}{1 + \frac{[\text{I}]}{K_I}}$$

$$K_M(\text{I}) = K_M$$

Note : Inhibition non compétitive partielle

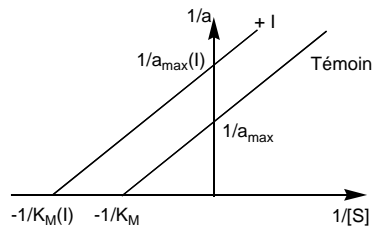
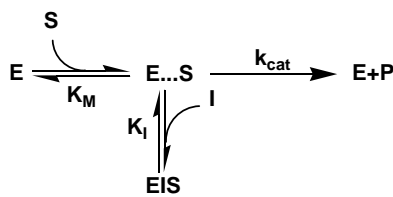


$K_M(I) = K_M$ (constant) $k_{cat} > k_{cat}(I) > k'_{cat}$

- EIS catalysé en produit avec une efficacité moindre que ES ($k'_{cat} < k_{cat}$)

3ème cas limite : Inhibition incompétitive

- L'inhibiteur ne se fixe que sur E...S



Résultats

$$K_M(I) = \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad k_{cat}(I) = \frac{k_{cat}}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

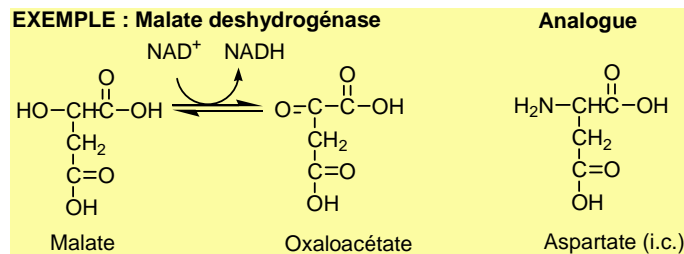
- L'inhibiteur diminue l'activité max mais augmente proportionnellement l'affinité
- En effet la formation de EI déplace l'équilibre E,ES vers la droite
- Ce cas d'inhibition est très rare mais se retrouve dans des modèles plus complexes (Voir mécanismes bibi)

Remarque :
Expression des constantes
vraies et apparentes

- Une **constante vraie** caractérise un couple enzyme ligand dans un milieu **fixé** (k_{cat} , K_M , K_i ...).
- Son expression est une combinaison des constantes cinétiques et d'équilibres intervenant dans le modèle.
- **Aucun terme de concentration ne peut intervenir.**
- Une constante apparente donne les caractéristiques d'un couple enzyme ligand dans un milieu donné en fonction de la concentration d'un ou plusieurs modulateurs ajoutés ($k_{cat,app}$, $K_{M,app}$, $K_{i,app}$ ou $k_{cat}(X)$, $K_M(X,Y)$...).
- **Son expression comporte en général la ou les concentration(s) de ce ou ces modulateurs.**
- Il peut arriver que le modulateur X ne provoque pas de variation d'un paramètre caractéristique (**ex : un i.c. ne modifie pas k_{cat} .**)
- **La constante apparente s'assimile alors à une constante vraie et ne contient pas de terme de concentration.**

Mécanisme d'inhibition
Fixation de l'inhibiteur au site actif

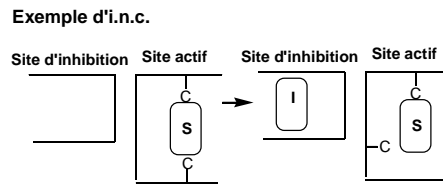
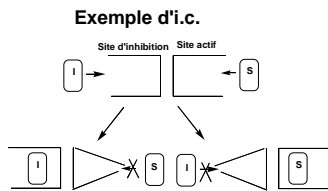
- Un inhibiteur se fixant au site actif est un analogue du substrat :
 - Sa taille est comparable à celle de celui-ci
 - Il possède les fonctions lui permettant de se lier sur plusieurs des groupes de fixation.



- Les analogues du substrat empêchent généralement celui-ci de se fixer : ils sont **inhibiteurs compétitifs**.
- Exceptionnellement, ils n'empêchent pas le substrat de se fixer mais bloquent l'action des groupes catalytiques : ils sont **i.n.c.**

Mécanisme d'inhibition Fixation sur un autre site

- Un inhibiteur peut se fixer sur un autre site : **Il provoque alors un changement de conformation de l'enzyme qui déforme le site actif.**
- Ils peuvent être inhibiteurs compétitifs ou non compétitifs.



La fixation de l'inhibiteur a provoqué le déplacement d'un groupe catalytique qui n'attaque plus le substrat

- Ce mécanisme permet aussi une activation.

Cas particuliers d'inhibition

1° Le produit est un analogue du substrat qui se fixe au site actif : **c'est un inhibiteur compétitif.**

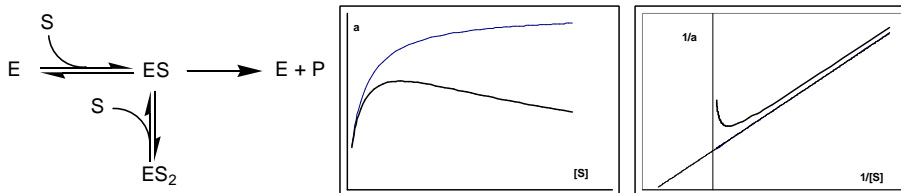
2° On met l'enzyme en présence de deux substrats de celle-ci :

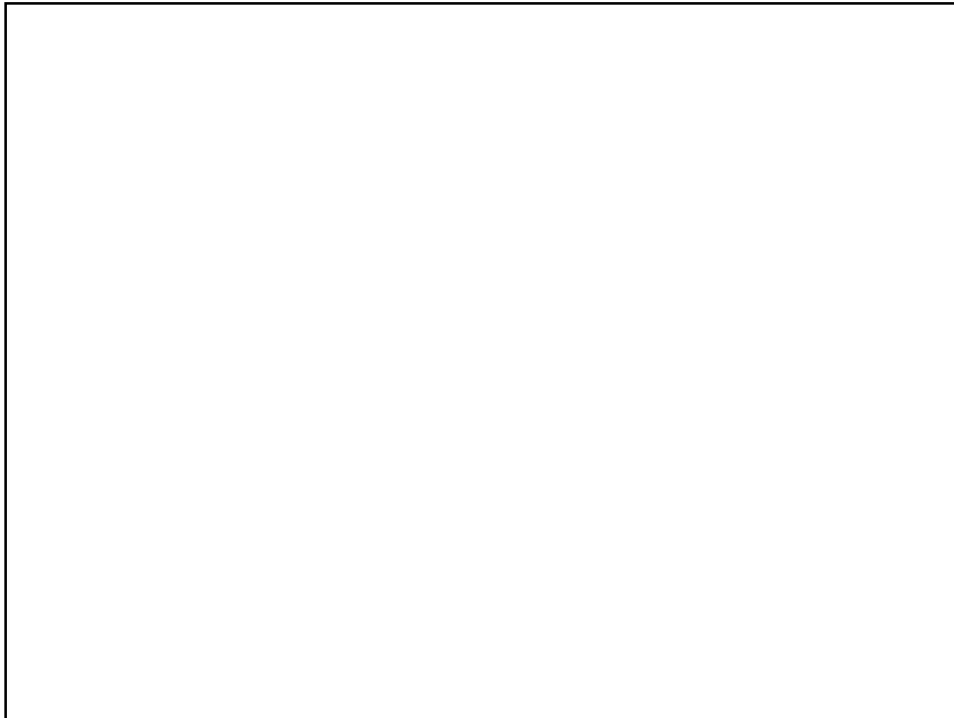


- Chacun d'eux gêne la fixation de l'autre. **S' est inhibiteur compétitif de la transformation de S en P et réciproquement.**

$$K_{M,S}(S') = K_{M,S} \left(1 + \frac{[S']}{K'_M}\right) \quad K_{M,S'}(S) = K_{M,S'} \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)$$

3° Dans quelques cas, à forte concentration de substrat, deux molécules se fixent au site actif. Elles s'orientent alors incorrectement et ne sont pas transformées. **L'excès de S provoque une inhibition incompétitive**





Influence du milieu d'étude

Les enzymes se dénaturent rapidement dans de l'eau pure.

Les ions et molécules interagissent par liaison faible avec des aminoacides présents en surface de la protéine.

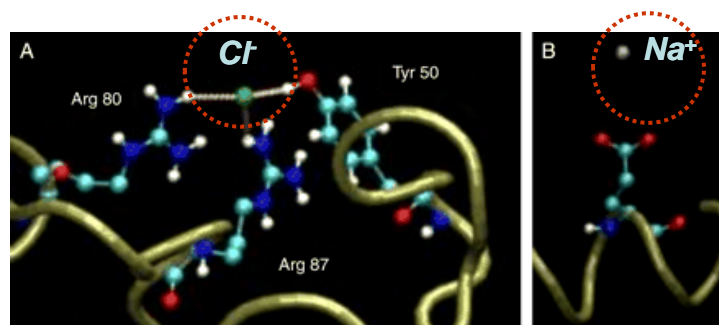


FIGURE : The bound ions and their immediate vicinity. (A) A chloride ion bound to residues Arg-80, Arg-87, and Tyr-50. The minimal distances between the ion and the residues were 2.24, 2.86, and 2.02 Å for Arg-80, Arg-87, and Tyr-50, respectively. (B) A sodium ion bound to Glu-31. The minimal distance between the ion and the protein is 4.34 Å.

Friedman et coll., *Biophysical Journal* 89:768-781 (2005)