

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

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

Inhibition réversible et irréversible

- Réversibles (compétitive, non compétitive, incompétitive)



- 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.

- **INHIBITION IRREVERSIBLE**

- L'inhibiteur irréversible se fixe par liaison covalente sur l'enzyme
- Cette réaction est « lente »
 - Il faut de quelques secondes à plusieurs heures pour atteindre l'état d'équilibre.
 - En général on étudie des inhibiteurs réagissant totalement en un temps variant de 30 min à 2 ou 3 heures. **On peut ainsi suivre la variation d'activité au cours du temps.**
 - Il peut arriver que l'on étudie un inhibiteur réagissant en quelques secondes. On ne dispose alors que des activités initiales et finales.

Inhibition irréversible



- **E-I** est moins actif que **E** parce que le substrat se fixe moins bien par liaison faible et ou parce qu'il est moins bien transformé :

$$K_{M,E-I} > K_{M,E} \quad \text{et/ou} \quad k_{cat,E-I} < k_{cat,E}$$

- A la limite (inhibition totale) : L'affinité de **E-I** pour **S** est nulle ou son activité est nulle :

$$K_{M,E-I} \rightarrow \infty \quad \text{et/ou} \quad k_{cat,E-I} = 0$$

Dans ce cas **E-I** n'est plus une enzyme.

L'activité d'une préparation contenant un mélange de **E** et **E-I** ne dépend que de la quantité de **E**

Inhibition irréversible

Variation de l'activité au cours du temps

Nous ne considérerons que le cas de l'inhibition irréversible totale



- On réalise un mélange de E_a et de I (I étant à concentration très supérieure à E) :

- Au temps 0, la préparation ne contient que E_a : $[E]_T = [E_a]_0$

- Au temps t , elle contient un mélange de E_a et $E-I$ $[E]_T = [E_a] + [E-I]$

- La vitesse de la réaction d'inhibition est proportionnelle à la concentration de E_a :

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = k_{app}[E_a] \quad [E_a] = [E_a]_0 e^{-k_{app}t} = [E]_T e^{-k_{app}t}$$

- L'activité « résiduelle » (a_r) au temps t est proportionnelle à la concentration de E_a :

$$a_r = k[E_a] = k[E_a]_0 e^{-k_{app}t} = a_0 e^{-k_{app}t}$$

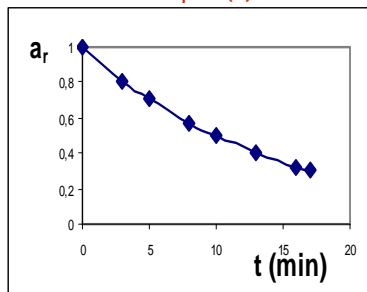
Inhibition irréversible

Equations (introduction à l'expérimentale)

Pour une concentration d'inhibiteur donnée $[I]$ on peut déterminer la constante d'inactivation k_{app} correspondante (spécifique à la $[I]$ utilisée) :

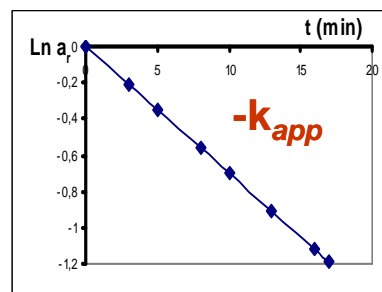
$$a_r = a_0 e^{-k_{app}t}$$

$$a_r = f(t)$$



$$\ln a_r = \ln a_0 - k_{app}t$$

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



Pour des concentrations d'inhibiteur différentes on obtient de k_{app} différentes

Inhibition irréversible

Etude expérimentale

Méthode de double incubation

La méthode de double incubation est utilisée pour l'étude de tout phénomène « lent » que l'on désire suivre au cours du temps.

Première incubation (souvent dite préincubation) :

- On incube l'enzyme (E) en présence de l'inhibiteur (I)



Deuxième incubation (analytique) :

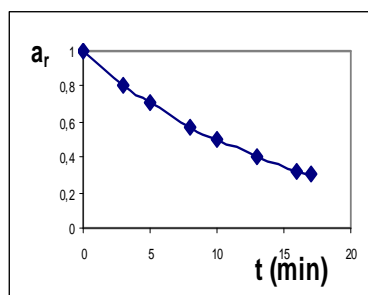
- A des temps fixés, on fait un prélèvement, on ajoute du substrat (en général à saturation), et on mesure l'activité.
- On peut ainsi tracer la courbe $a_r=f(t)$
- On trace ensuite la courbe $\text{Ln}(a_r)=f(t)$ qui permet de déterminer k_{app} .

Inhibition irréversible

Etude expérimentale

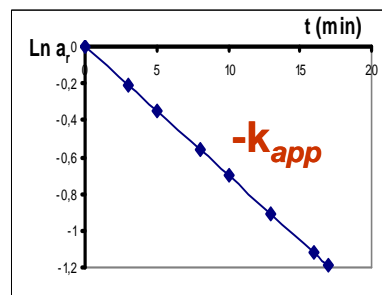
Pour une concentration d'inhibiteur donnée on peut déterminer la constante d'inactivation k_{app} correspondante (spécifique à la [I] utilisée) :

$$a_r=f(t)$$



$$a_r = a_0 e^{-k_{app}t}$$

$$\text{Ln}(a_r)=f(t)$$



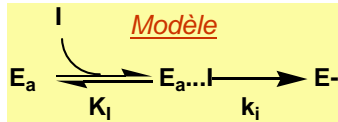
$$\text{Ln } a_r = \text{Ln } a_0 - k_{app}t$$

← *rappel* →

Pour des concentrations d'inhibiteur différentes on obtient de k_{app} différentes
(Rappel : A saturation du Substrat)

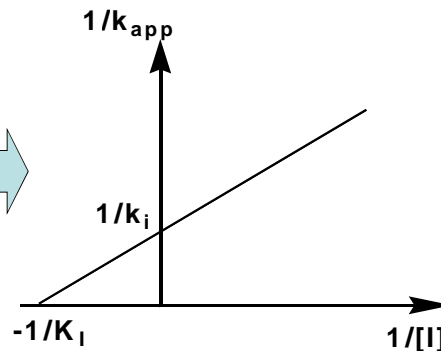
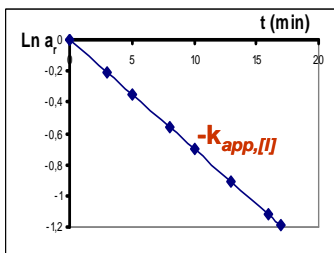
Inhibition irréversible

Etude expérimentale



Pour déterminer les constantes caractéristiques K_i et k_i du modèle de l'inhibition proposé il faut déterminer k_{app} à différentes $[I]$.

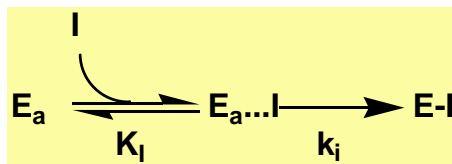
Rappel : k_{app} est déterminée expérimentalement pour chaque $[I]$: $\ln(a_r) = f(t)$



Inhibition irréversible

Validation du modèle

- En général, I se fixe d'abord par liaison faible sur l'enzyme en formant $E \dots I$. Il réagit alors sur un résidu d'acide aminé voisin pour former $E-I$



avec

$$[E_a]_T = [E_a] + [E_a \dots I]$$

$$a = k_i [E_a \dots I]$$

$$\frac{[E_a][I]}{[E_a \dots I]} = K_i$$

- Ce modèle étant analogue à celui de Michaélis, on peut prévoir sans calcul la loi de vitesse correspondante :

$$\frac{d[E_a]}{dt} = \frac{k_i [E_a]_T [I]}{K_i + [I]}$$

Cette loi correspond à l'activité résiduelle (a_r) de l'enzyme à des $[I]$ variables.

Inhibition irréversible

Modèle d'inhibition (suite)

Nous avons deux équations :

- Activité pour une $[I]$ fixée :

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = k_{app}[E_a]$$

- Activité à des $[I]$ variables :

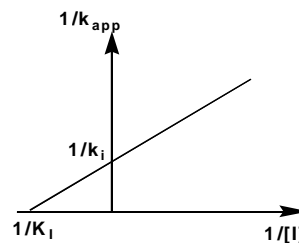
$$-\frac{d[E_a]}{dt} = \frac{k_i[E_a]_T[I]}{K_I + [I]}$$

A une concentration donnée d'inhibiteur on en déduit que :

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = k_{app}[E_a] = \frac{k_i[E_a]_T[I]}{K_I + [I]}$$

Rappel : K_I et k_i peuvent être déterminées par une linéarisation en double inverse de la courbe

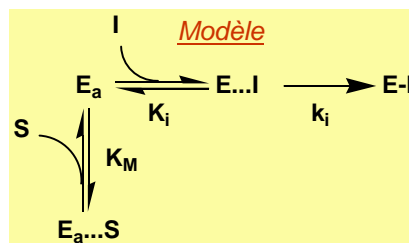
$$k_{app} = f([I])$$



Inhibition irréversible

Protection par le substrat

- L'inhibiteur I se fixant d'abord par liaison faible, se complexe sur un site de fixation d'un ligand intervenant dans le mécanisme catalytique de l'enzyme.
- Ce peut être le site actif ou un site de modulation.
- Si le site d'inhibition est le site actif, I et S sont en compétition pour se fixer :



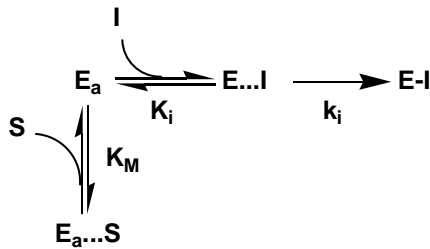
- S se comporte comme un inhibiteur compétitif réversible de constante K_M de la réaction d'inhibition.

Inhibition irréversible

Protection par le substrat

Étude expérimentale

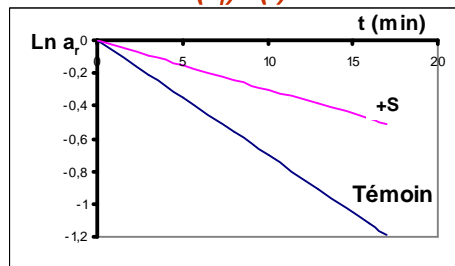
- On étudie l'inhibition par la *technique de double incubation*, en effectuant la première en présence du substrat ou d'un analogue de celui-ci.



$$K_i(S) = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right)$$

En présence de **S** la constante apparente d'inhibition $k_{app,[S]}$ est plus faible que celle de la réaction témoin :

$$\text{Ln}(a_t) = f(t)$$

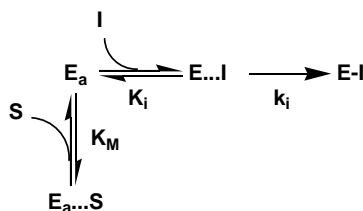


Inhibition irréversible

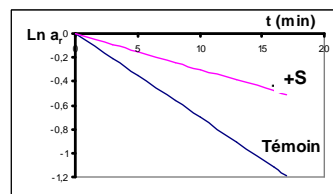
Protection par le substrat

Étude expérimentale

- L'étude de l'inhibition irréversible en présence du substrat est utilisée pour savoir si **I** se fixe au site actif.



$$\text{Ln}(a_t) = f(t)$$



NB : La même méthode peut être utilisée pour savoir si **I** se fixe sur un site de modulation différent du site actif. On incube alors **E** et **I** en présence du modulateur.

Inhibition irréversible

Intérêt des inhibiteurs irréversibles

1) Étude expérimentale d'un mécanisme enzymatique :

L'inhibiteur irréversible est utilisé pour identifier un groupe catalytique ou de fixation :

- Si l'inhibiteur réagit avec un groupe catalytique, le k_{cat} *apparent* diminue pendant l'incubation et devient nul en fin de celle-ci.
- Si l'inhibiteur réagit avec un groupe de fixation le K_M *apparent* augmente pendant l'incubation et devient infini en fin de celle-ci.

Inhibition irréversible

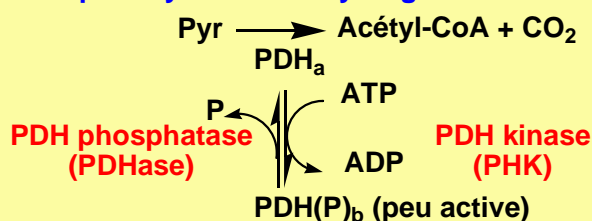
Intérêt des inhibiteurs irréversibles (suite)

2) Inhibition in vivo

Les enzymes-clés peuvent être soumises à un contrôle covalent, le plus souvent par phosphorylation.

- Une kinase catalyse la condensation d'un phosphate sur un résidu d'acide aminé (ex usuel, une sérine), ce qui inhibe E.
- Une phosphatase libère le phosphate et régénère l'enzyme.

Exemple : Pyruvate deshydrogénase du foie



NB : Le mécanisme peut être inverse : il y a activation par phosphorylation.

Activation

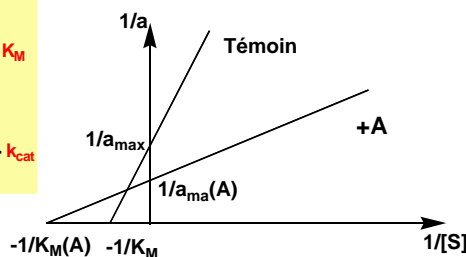
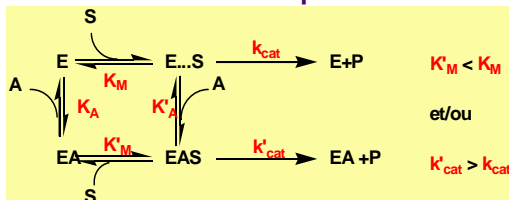
Activation

Les activateurs se fixent sur l'enzyme et/ou augmentent l'activité

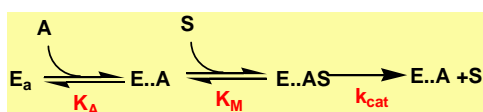
- Ils peuvent augmenter l'affinité ($K_M \searrow$) ou augmenter l'activité maximum ($k_{cat} \nearrow$)
- Ils peuvent être réversibles
 - A se fixe par liaison faible (phénomène instantané)
- Ils peuvent être irréversibles
 - A se fixe par liaison covalente (phénomène lent)

Activation réversible

L'activateur A se fixe par liaison faible (phénomène instantané).



Cas simple : S ne se fixe que sur E...A. (fréquent pour les métallo-enzymes).



Seule l'affinité augmente :

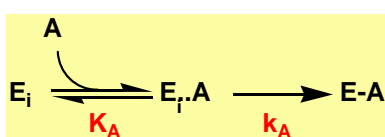
$$K_M(A) = K_M \left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)$$

(K_M est obtenu en excès de A)

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

Activation irréversible

L'activateur A se fixe par liaison covalente sur l'enzyme inactive (phénomène lent)



$$-\frac{d[E_i]}{dt} = k_{app}[E_i] = \frac{k_a[E_i]_T[A]}{K_A + [A]}$$

$$[E_i] = [E]_T e^{-k_{app}t}$$

$$[E - A] = [E]_T (1 - e^{-k_{app}t})$$

$$a = a_{infini} (1 - e^{-k_{app}t})$$

On étudie l'activation par double incubation.

NB : Pour déterminer k_{app} on trace la courbe $\text{Ln}(a_{infini} - a) = -k_{app}t$

Activation irréversible

Intérêt des activateurs irréversibles

Rôle in vivo

- De même que l'inhibition irréversible, l'activation par phosphorylation intervient pour contrôler des enzymes-clés du métabolisme.
- Très souvent, deux enzymes-clés contrôlent, par phosphorylation, des métabolismes « inverses » : **l'une active, l'autre inhibe**, ce qui permet de déterminer par action d'un modulateur (hormone) le sens du flux métabolique.

Par exemple, le glucagon provoque, par une cascade de réactions, la phosphorylation de la glycogène phosphorylase (GP) et de la glycogène synthase (GS).

- Cette phosphorylation active la GP (GP_a) et inhibe la GS (GS_b).
- La GP est l'enzyme –clé de la dégradation du glycogène.
- La GS est l'enzyme –clé de la synthèse du glycogène.
- Le glucagon provoque donc ainsi la dégradation du glycogène.