



L3S5 Biochimie structurale
UE EN190

Analyse structurale et fonctionnelle des protéines

Pr. Sylvie Nessler

Inhibiteurs enzymatiques

Classe importante de molécules thérapeutiques (antibiotiques, antiviraux, antitumoraux etc)

Un inhibiteur est une molécule qui diminue la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme, sans détruire l'enzyme.

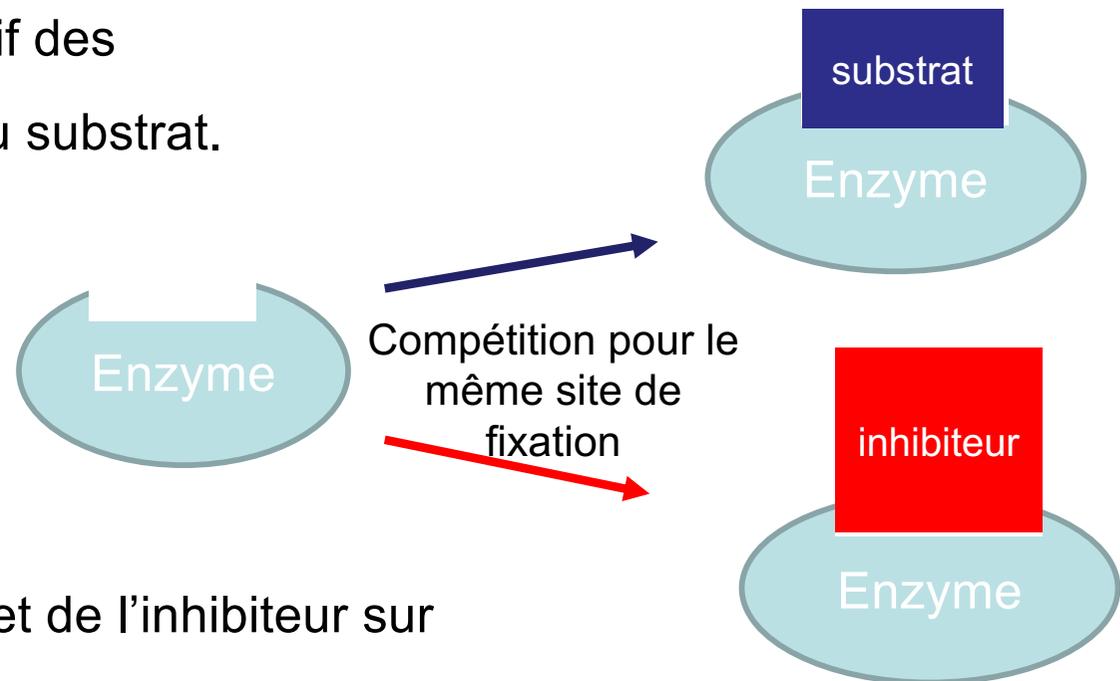
Ne pas confondre **inhibition** : spécifique et **inactivation** non spécifique

Exemple : l'acide sulfurique concentré n'est pas un inhibiteur bien qu'il diminue la vitesse de réaction de beaucoup d'enzymes...

Inhibition compétitive

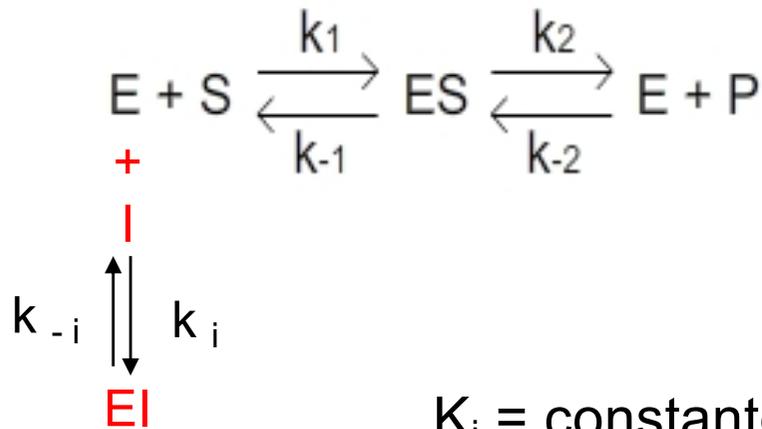
Un inhibiteur compétitif est:

- un analogue structural du substrat
- capable d'établir avec le site actif des interactions qui miment celles du substrat.



→ Fixation du substrat et de l'inhibiteur sur l'enzyme mutuellement exclusives

Effet d'un inhibiteur compétitif sur un enzyme de type michaelien



à l'équilibre, $k_i [E] [I] = k_{-i} [EI]$

$$K_i = \frac{[E] [I]}{[EI]} = \frac{k_{-i}}{k_i} \quad (\text{en mole} \cdot \text{L}^{-1})$$

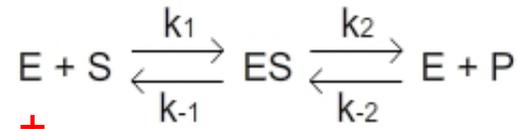
K_i = constante de dissociation du complexe abortif EI
 = concentration $[I]_0$ nécessaire pour inhiber la moitié de $[E]_0$

Et comme dans le cas simple sans inhibiteur, on cherche à exprimer V_i en fonction de ce que l'on connaît:

$[E]_0$, $[S]_0$, $[I]_0$ et les constantes cinétiques

$$\begin{aligned}
 \text{Conservation de la matière} \quad \rightarrow \quad [E]_0 &= [E] + [ES] + [EI] \\
 &= [E] + [ES] + \left(\frac{[E] [I]}{K_i} \right) \\
 &= [ES] + [E] \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad \Leftrightarrow \quad [E] = \frac{[E]_0 - [ES]}{1 + [I]/K_i}
 \end{aligned}$$

Effet d'un inhibiteur compétitif sur K_M et V_{max}



avec l'état stationnaire rapidement atteint :

$$V_i = k_2 [ES]$$

On cherche à remplacer $[ES]$, inconnu, par ce que l'on connaît, c.à.d $[E]_0$, $[S]_0$ et $[I]_0$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$

$$\Leftrightarrow k_1 [E][S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

$$\Leftrightarrow \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \text{ (en mole} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}$$

Conservation de la matière :

$$[E] = \frac{[E]_0 - [ES]}{1 + [I]/K_i}$$

$$\Leftrightarrow [E] = \frac{K_M \cdot [ES]}{[S]_0} = \frac{[E]_0 - [ES]}{(1 + [I]_0/K_i)}$$

$$\Leftrightarrow (1 + [I]_0/K_i) K_M [ES] = ([E]_0 - [ES]) [S]_0$$

si $[S]_0 \gg [E]_0 \rightarrow [S] \approx [S]_0$

$$\Leftrightarrow K'_M [ES] = [E]_0 [S]_0 - [ES] [S]_0 \quad \text{avec } K'_M = K_M (1 + [I]_0 / K_i)$$

si $[I]_0 \gg [E]_0 \rightarrow [I] \approx [I]_0$

$$\Leftrightarrow [ES] (K'_M + [S]_0) = [E]_0 [S]_0$$

$$\Rightarrow V_i = k_2 \frac{[E]_0 [S]_0}{K'_M + [S]_0} = \frac{V_{max} [S]_0}{K'_M + [S]_0}$$

Le K_M augmente et le V_{max} reste inchangé

Un inhibiteur n'est efficace

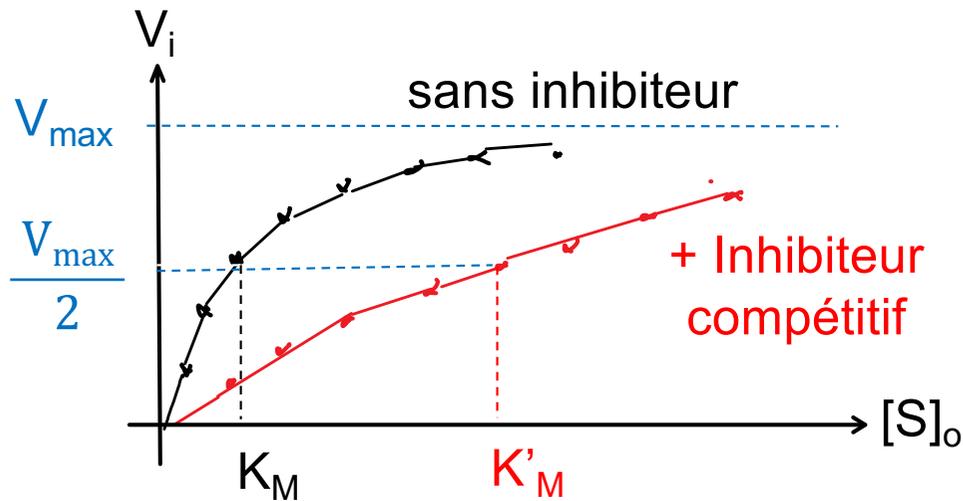
que si $[I]_0 \gg K_i \rightarrow K'_M \gg K_M$

c.à.d. que l'affinité de E pour S diminue

Effet d'un inhibiteur compétitif sur la courbe de Michaelis

Représentation directe

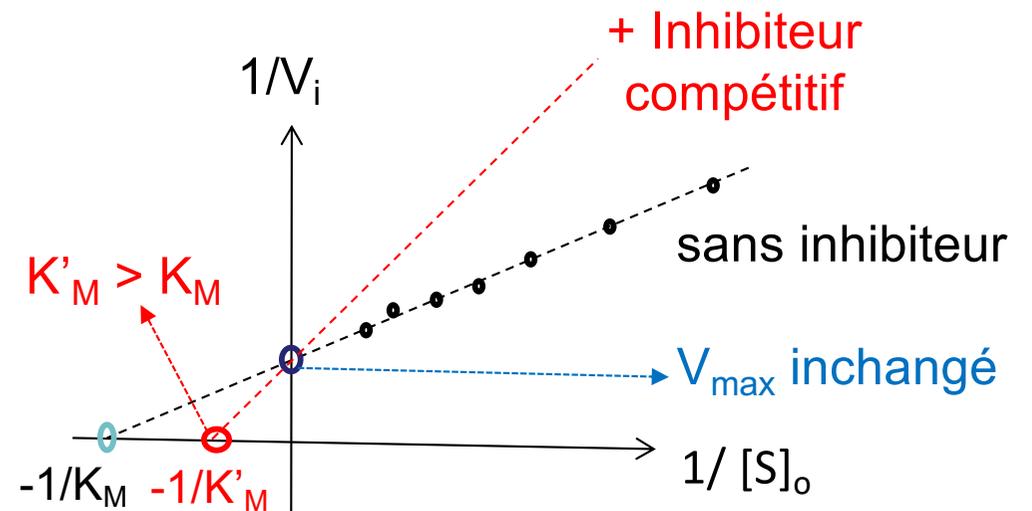
$$V_i = \frac{V_{\max} [S_0]}{K'_M + [S_0]}$$



Le K_M augmente
et le V_{\max} reste inchangé

Représentation des doubles inverses

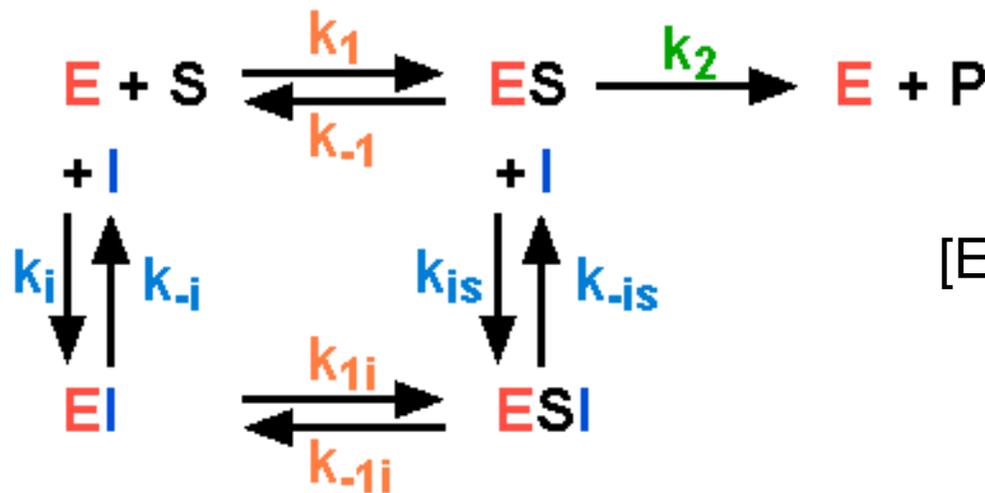
$$\frac{1}{V_i} = \frac{K'_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{\max}}$$



K_M augmente $\rightarrow 1/K_M$ diminue
 $\rightarrow -1/K_M$ augmente

Inhibition non compétitive

- L'inhibiteur se fixe sur un autre site que le substrat
- Il n'est pas, a priori, analogue structural du substrat
- Il n'empêche pas le substrat de se fixer, et réciproquement
S n'empêche pas I de se fixer
- Lorsque I est fixé, l'enzyme ne peut pas catalyser la réaction



$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{-i}}{k_i} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} = \frac{k_{-is}}{k_{is}}$$

Conservation de la matière :

$$[E]_0 = [E] + [EI] + [ES] + [ESI]$$

$$\text{avec } [EI] = \frac{[E][I]}{K_i} \text{ et } [ESI] = \frac{[ES][I]}{K_i}$$

$$[E]_0 = [E] (1 + [I]_0 / K_i) + [ES] (1 + [I]_0 / K_i)$$

$$\Leftrightarrow [E]_0 = (1 + [I]_0 / K_i) ([ES] + [E])$$

$$\text{avec } [E] = \frac{K_M \cdot [ES]}{[S]_0}$$

$$\Leftrightarrow [E]_0 / (1 + [I]_0 / K_i) = [ES] + \frac{K_M \cdot [ES]}{[S]_0}$$

$$\Leftrightarrow [E]'_0 = [ES] (1 + K_M / [S]_0)$$

Effet d'un inhibiteur non compétitif sur l'équation et la courbe de Michaelis

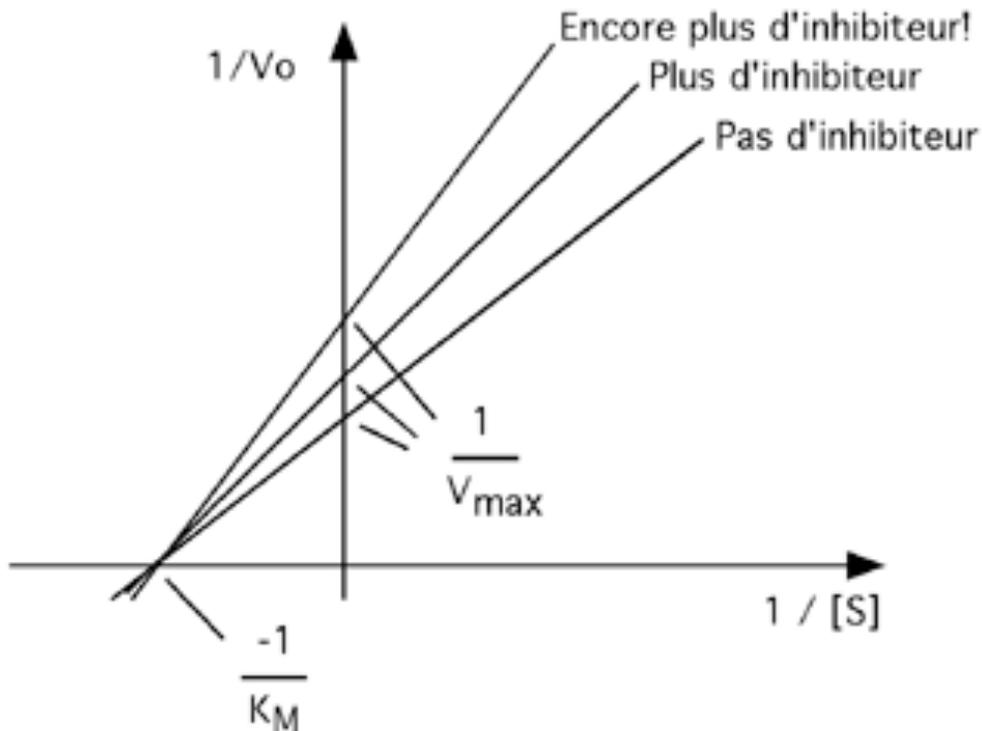
$$V_i = k_2 [ES] \quad \text{avec} \quad [ES] = [E]_0' / (1 + K_M / [S]_0)$$

$$V_i = k_2 \frac{[E]_0'}{1 + K_M / [S]_0}$$

$$V_i = k_2 \frac{[E]_0' [S]_0}{[S]_0 + K_M} = \frac{V'_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0}$$

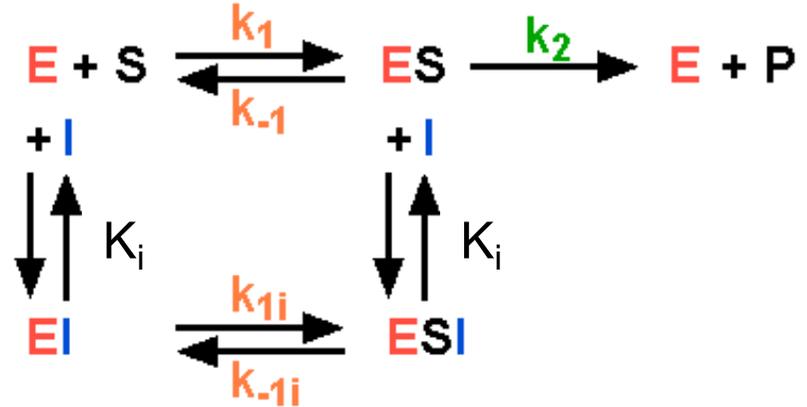
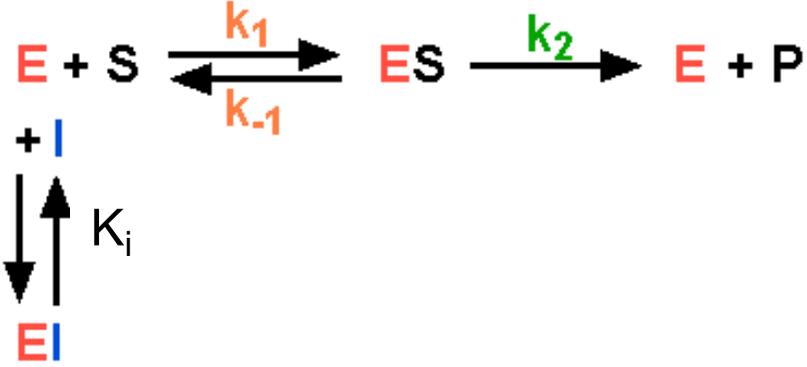
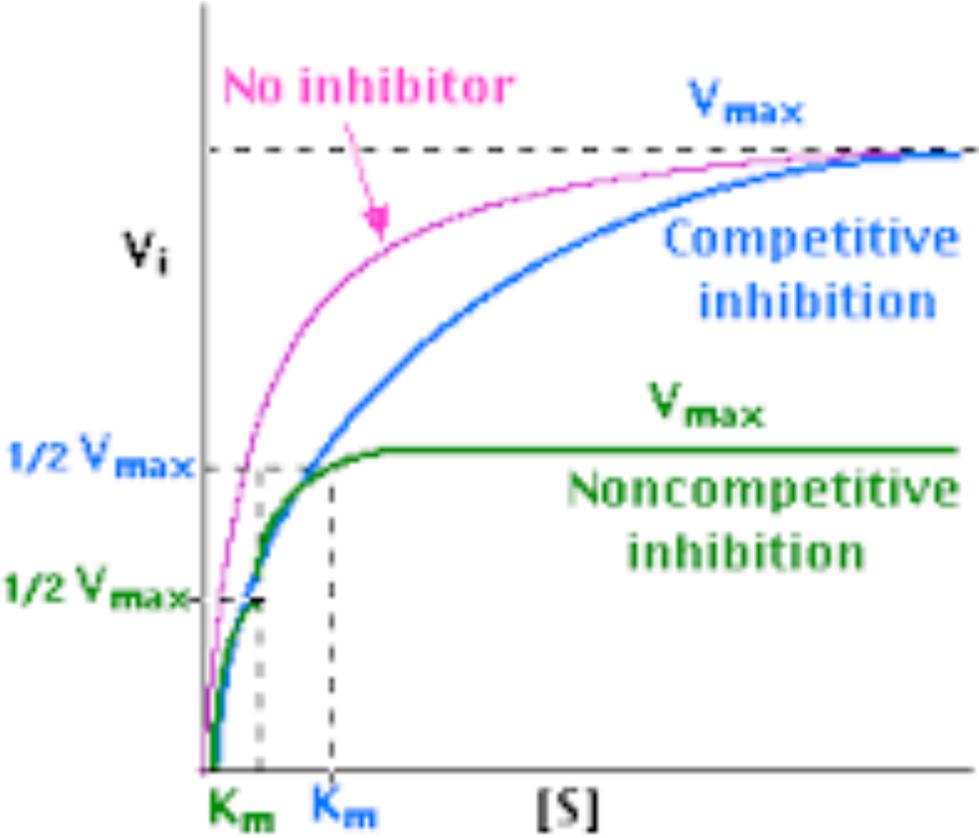
$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0$ diminue
 puisque $[E]_0' = [E]_0 / (1 + [I]_0 / K_i)$ diminue

Inhibition non-compétitive



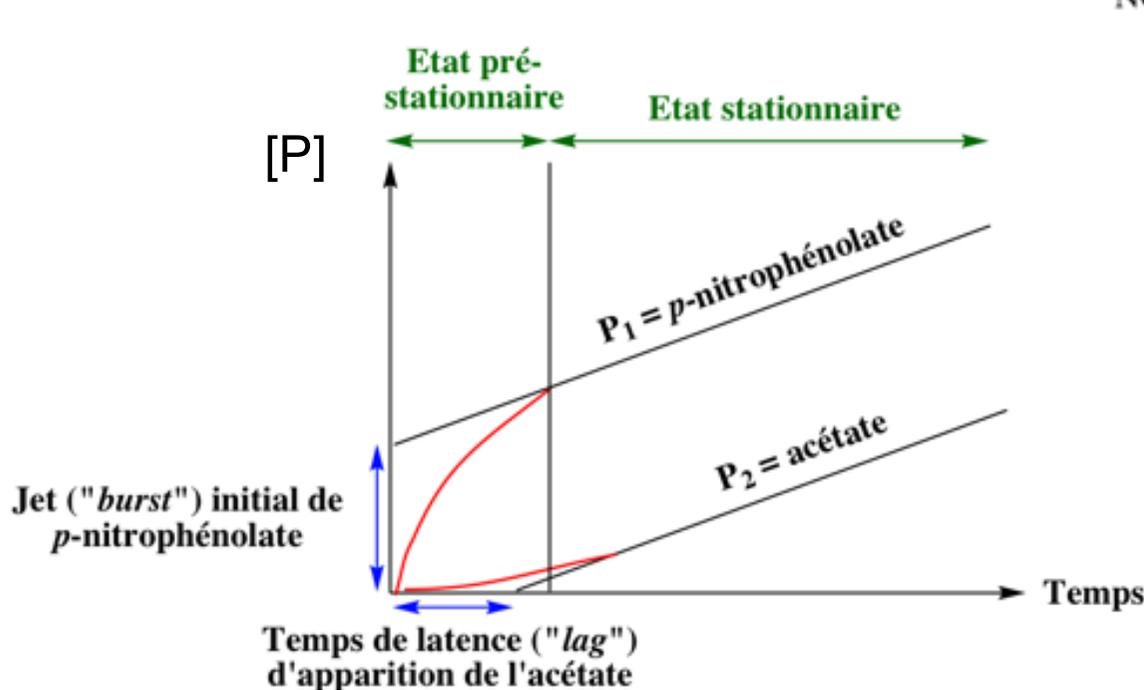
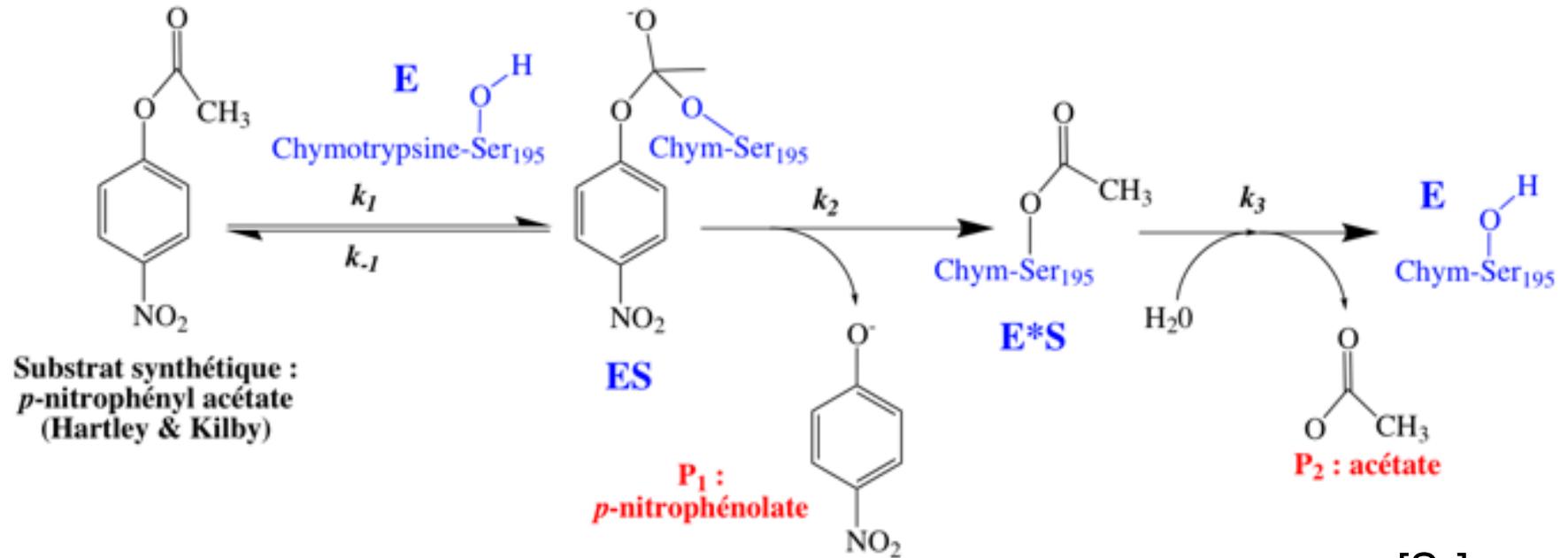
V_{\max} diminue de $(1 + [I]_0/K_i)$
 K_M ne change pas

Bilan de différents types d'inhibition



Inhibiteur non-compétitif:
 K_m inchangé
 $V_{max(app)} = V_{max} / (1 + [I]_0 / K_i)$

Exemple de cinétique enzymatique à 2 produits

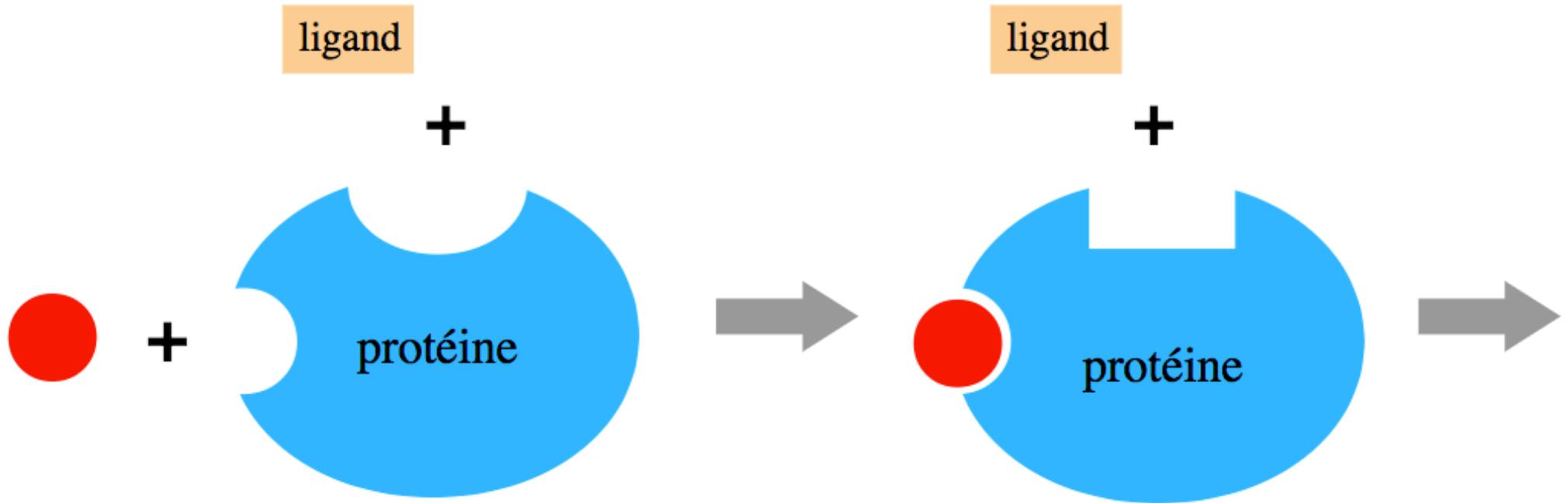


$$v_i = k_{\text{cat}} [E_0] \frac{[S_0]}{K_{M_{\text{app}}} + [S_0]}$$

$$\text{avec } k_{\text{cat}} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3}$$

$$\text{et } K_{M_{\text{app}}} = \left[\frac{k_3}{k_2 + k_3} \right] K_M$$

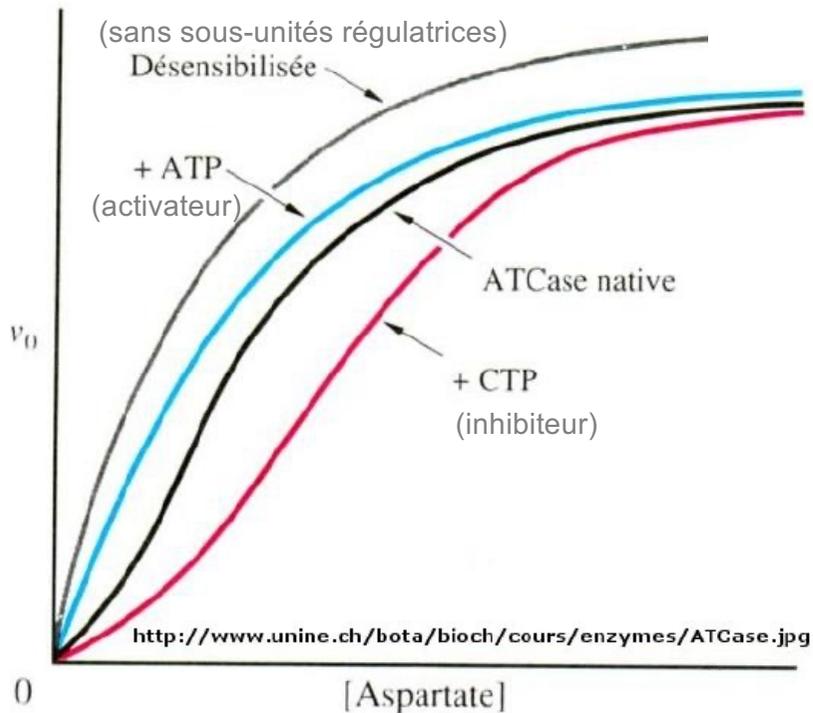
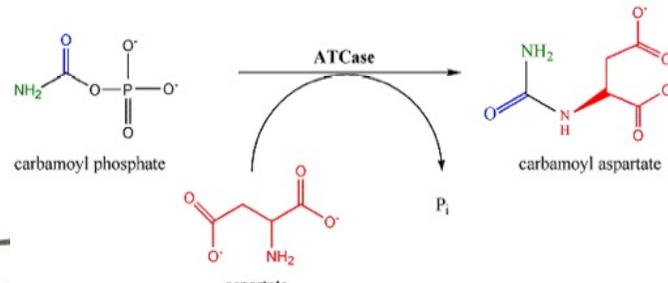
Effecteurs allostériques



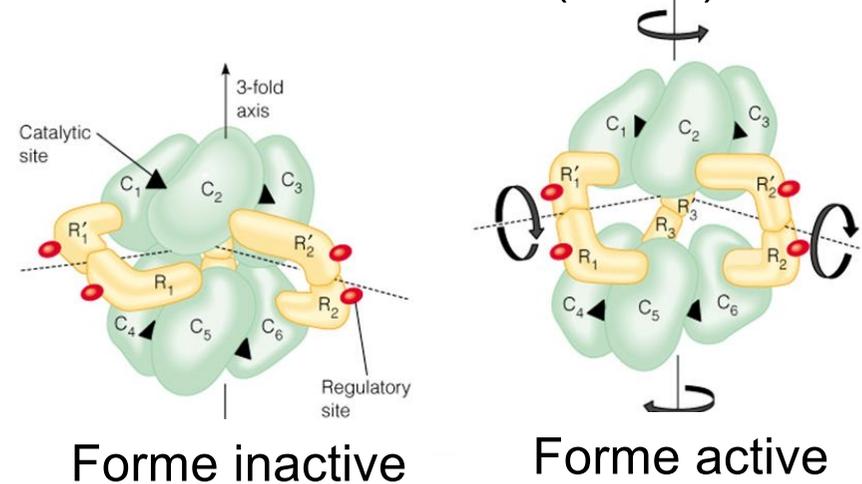
La fixation d'un effecteur allostérique modifie le site de fixation du ligand

Effet des effecteurs allostériques

Ex: L'Aspartate TransCarbamylase (ATCase)



L'ATCase (hétérohexamère C3R3)
 est régulée par 2 effecteurs
 qui se fixent sur les sous-unités régulatrices R
 et stabilisent
 soit la forme active de la protéine (+ ATP)
 soit une forme inactive (+CTP)



Courbe $V_i = f([S]_0)$ sigmoïde
 → Fixation coopérative du substrat

Notion de ligand

Ligand (du latin ligare):

Petite molécule qui forme un complexe non-covalent avec une protéine

Liaison réversible à caractère fort ou faible → notion d'affinité
caractérisée par une constante d'équilibre

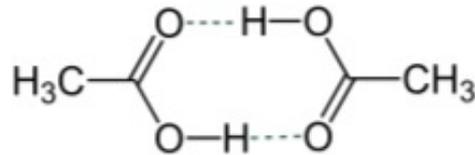
Nature des ligands des protéines:

substrats, cofacteurs, activateurs, inhibiteurs, ions métalliques...

Interactions non covalentes

Interactions polaires:

Liaisons hydrogènes:



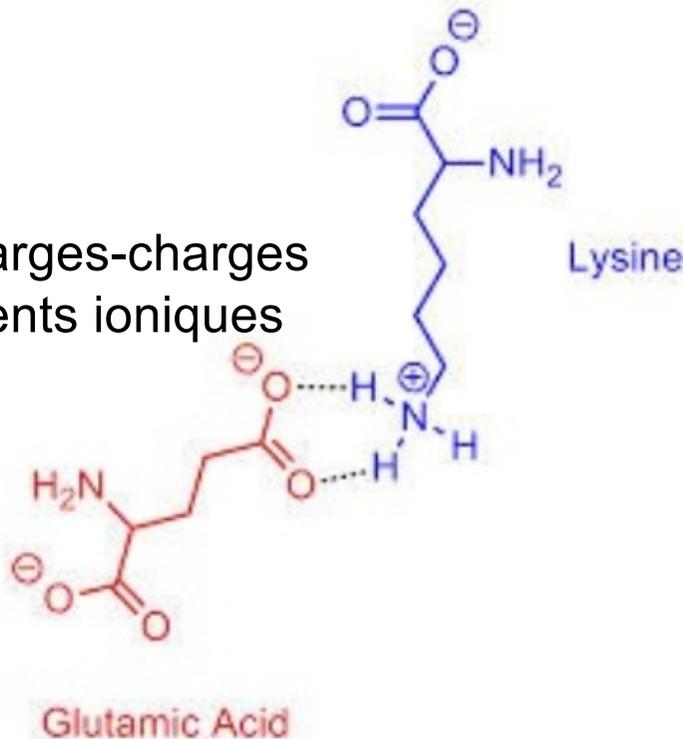
D-H A

distance D...A \approx 2.5 à 3.2 Å

angle DHA \approx 180° (>130°)

Ponts salins:

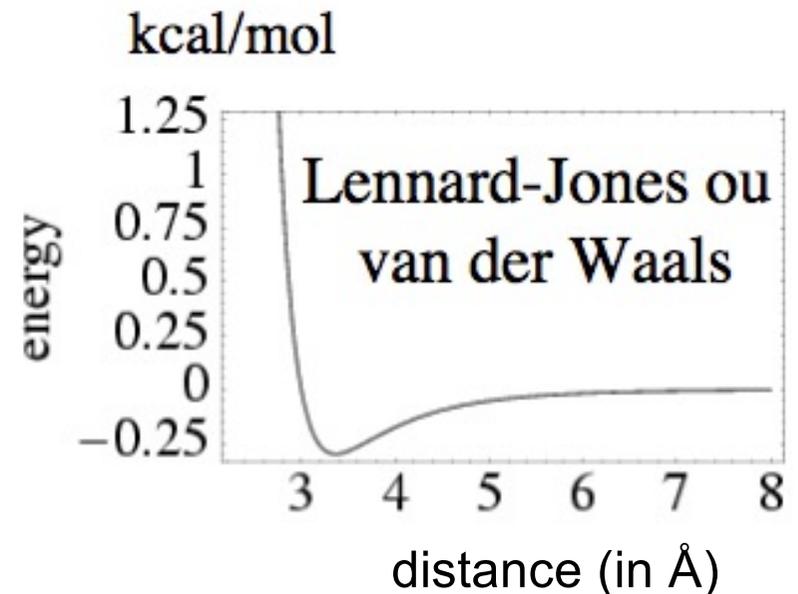
Interactions charges-charges
entre groupements ioniques



Interactions apolaires:

Interactions de type van der Waals ou
Lennard-Jones:

- Peu directionnelles
- Faiblement attractif (polarisation mutuelle des nuages électroniques)
- Répulsion stérique à courte distance



Equilibre d'interaction



avec les constantes cinétiques:

$$k_{\text{on}} \text{ en } M^{-1} \cdot s^{-1}$$

$$k_{\text{off}} \text{ en } s^{-1}$$

Vitesse de formation du complexe:
$$v = \frac{d[PL]}{dt} = k_{\text{on}} \cdot [P] \cdot [L] - k_{\text{off}} \cdot [PL]$$

A l'équilibre, $v = 0$ $\Rightarrow \frac{[P] \times [L]}{[PL]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = K_D = \frac{1}{K_A}$ avec les constantes d'équilibre:

$$K_D \text{ en } \text{mol} \cdot L^{-1} (= M)$$

$$K_A \text{ en } \text{mol}^{-1} \cdot L (= M^{-1})$$

$$\Rightarrow [PL] = \frac{[P] \times [L]}{K_D} = \frac{([P_0] - [PL]) \times [L]}{K_D}$$

$$\Rightarrow [PL] \cdot K_D = ([P_0] \cdot [L]) - ([PL] \cdot [L])$$

$$\Rightarrow ([PL] \cdot K_D) + ([PL] \cdot [L]) = [P_0] \cdot [L]$$

$$\Rightarrow [PL] (K_D + [L]) = [P_0] \cdot [L]$$

$$\Rightarrow [PL] = \frac{[P_0] \times [L]}{K_D + [L]}$$

Conservation
de la matière:

$$[L]_0 = [L] + [PL]$$

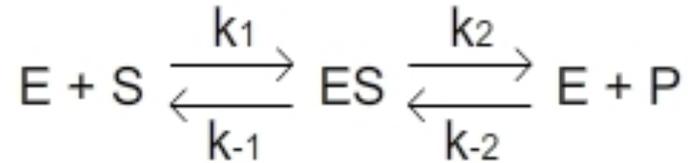
$$[P]_0 = [P] + [PL]$$

$$\text{Si } [L]_0 \gg [P]_0$$

$$\rightarrow [L] \approx [L]_0$$

Comparaison avec les enzymes

Dans le cas d'un enzyme Michaelien:



On a vu que : $V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P]$

et en début de réaction,
[P] négligeable
→ $V_i = k_2 [ES]$

avec, à l'état stationnaire :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$
$$\Leftrightarrow \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \text{ (en mol.L}^{-1}\text{)}$$

On voit donc que si l'enzyme fixe un mauvais substrat,

alors $k_2 \ll k_{-1} \Rightarrow K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \approx \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = K_D$

et le complexe ES se dissocie sans transformer le substrat en produit

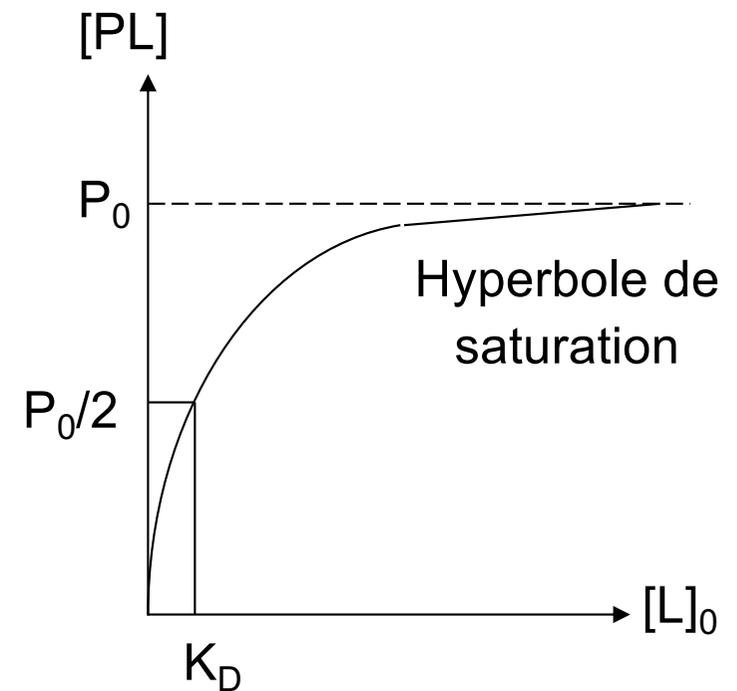
Détermination de K_D

On a vu que pour l'équilibre $P + L \xrightleftharpoons[k_{\text{off}}]{k_{\text{on}}} PL$ on a la relation $[PL] = \frac{[P]_0 \times [L]_0}{K_D + [L]_0}$

et la courbe $[PL] = f([L])$ correspond à l'hyperbole de saturation de l'enzyme par le ligand.

Si $[L]_0 \gg [P]_0 \rightarrow [L] \approx [L]_0$

En mesurant $[PL]$ à différentes concentrations en ligand $[L]_0$ (en excès) et à concentration constante de protéine $[P]_0$, on peut donc déterminer K_D , qui correspond à la concentration en ligand libre $[L]_0$ pour laquelle la protéine est à demi-saturation:



$$\Leftrightarrow \text{Si } [L]_0 = K_D \Rightarrow [PL] = \frac{[P]_0}{2}$$

$$\text{si } [L]_0 = 10 \times K_D \Rightarrow [PL] = \frac{[P]_0 \times [L]_0}{\frac{[L]_0}{10} + [L]_0} = \frac{[P]_0 \times [L]_0}{0.1 [L]_0 + [L]_0} = \frac{[P]_0 \times [L]_0}{1.1 [L]_0} = \frac{[P]_0}{1.1} = 0.91 [P]_0$$

$$\text{si } [L]_0 = 100 \times K_D \Rightarrow [PL] = 0.99 [P]_0 \quad \text{On atteint la saturation}$$

Linéarisation de Lineweaver & Burk

Linéarisation de l'équation $[PL] = \frac{[P]_0 \times [L]_0}{K_D + [L]_0}$ pour déterminer précisément K_D

Comme dans le traitement de la courbe de Michaelis en enzymologie, on peut utiliser la représentation des doubles inverses :

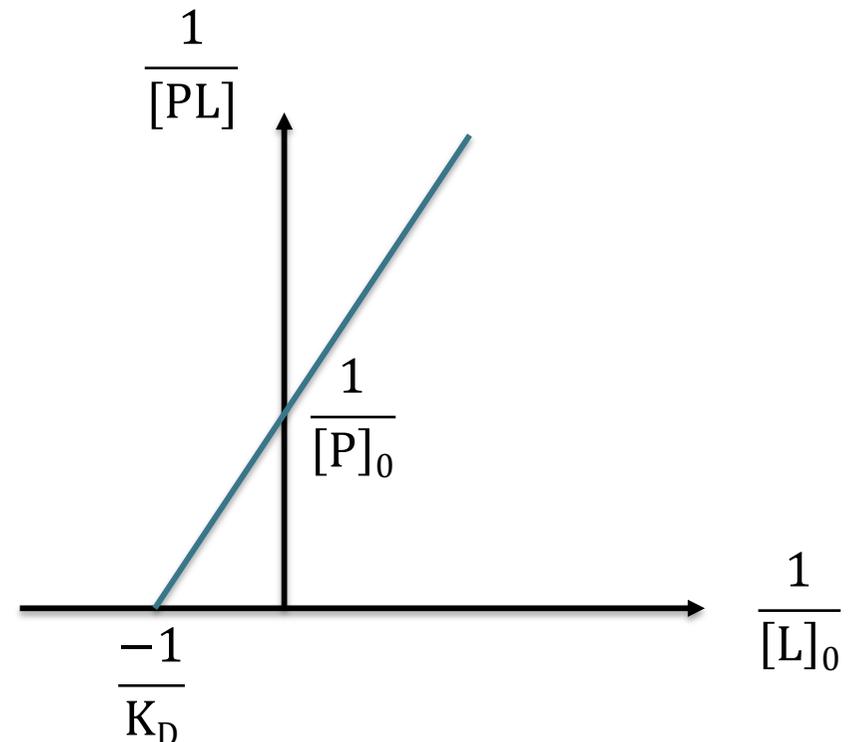
$$\frac{1}{[PL]} = \frac{K_D}{[P]_0 \times [L]_0} + \frac{[L]_0}{[P]_0 \times [L]_0}$$

$$= \frac{K_D}{[P]_0} \frac{1}{[L]_0} + \frac{1}{[P]_0} \quad \text{De la forme } y = a x + b$$

$$\text{Si } \frac{1}{[PL]} = 0 \rightarrow \frac{K_D}{[P]_0} \frac{1}{[L]_0} = - \frac{1}{[P]_0}$$

$$\rightarrow \frac{K_D}{[L]_0} = -1$$

$$\rightarrow \frac{1}{[L]_0} = - \frac{1}{K_D}$$



Linéarisation de Scatchard

On peut aussi partir de l'écriture de la constante d'équilibre K_D :

$$K_D = \frac{[P] \times [L]}{[PL]} \Leftrightarrow \frac{[L]}{[PL]} = \frac{K_D}{[P]} \Leftrightarrow \frac{[PL]}{[L]} = \frac{[P]}{K_D}$$

et avec la conservation de la matière on remplace $[P]$ par $[P]_0 - [PL]$

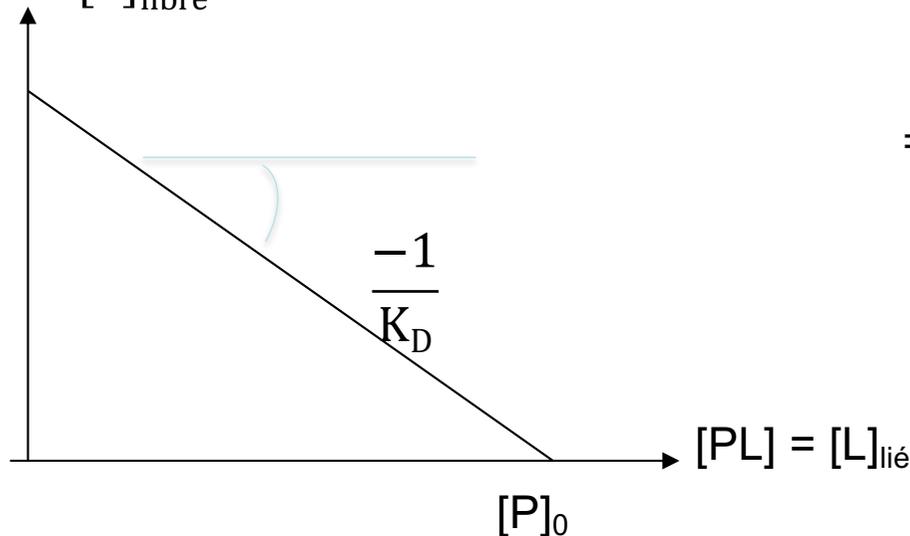
$$\frac{[PL]}{[L]} = \frac{[L]_{\text{lié}}}{[L]_{\text{libre}}}$$

\Leftrightarrow

$$\frac{[PL]}{[L]} = \frac{[P]_0 - [PL]}{K_D}$$

\Rightarrow

$$\frac{[PL]}{[L]} = -\frac{1}{K_D} [PL] + \frac{1}{K_D} [P]_0$$



$$\frac{[L]_{\text{lié}}}{[L]_{\text{libre}}} = -\frac{1}{K_D} [L]_{\text{lié}} + \frac{1}{K_D} [P]_{\text{tot}}$$

Relation de Scatchard

Représentation de Scatchard

Cas d'une protéine avec n sites identiques et indépendants



Si on considère individuellement chaque site de fixation, appelé R, qui peut fixer un ligand, avec une affinité régie par la constante d'équilibre K_D :

$$K_D = \frac{[R] \times [L]}{[RL]}$$

L'équation de l'hyperbole $[PL] = \frac{[P]_0 \times [L]}{K_D + [L]}$ devient $[RL] = \frac{[R]_0 \times [L]}{K_D + [L]}$

avec n sites R par protéine : $[R]_0 = n \times [P]_0 \Rightarrow [RL] = \frac{n [P]_0 \times [L]}{K_D + [L]}$

Donc pour chaque site indépendant on a $\Leftrightarrow [L]_{lié} = \frac{n \times [P]_0 \times [L]_{libre}}{K_D + [L]_{libre}}$

et $[L]_{libre} = [L]_0$ si $[L]_0 \gg [P]_0$

On définit la fraction de saturation: $Y = [L]_{lié} / n[P]_0$
 et la fraction de ligand lié $v = [L]_{lié} / [P]_0$

$$\rightarrow v = nY$$

Scatchard pour n sites identiques et indépendants

$$K_D = \frac{[R] \times [L]}{[RL]} \Rightarrow \frac{[R]}{K_D} = \frac{[RL]}{[L]} = \frac{[R]_0 - [RL]}{K_D} = \frac{n[P]_0 - [RL]}{K_D}$$

L'équation de Scatchard devient:

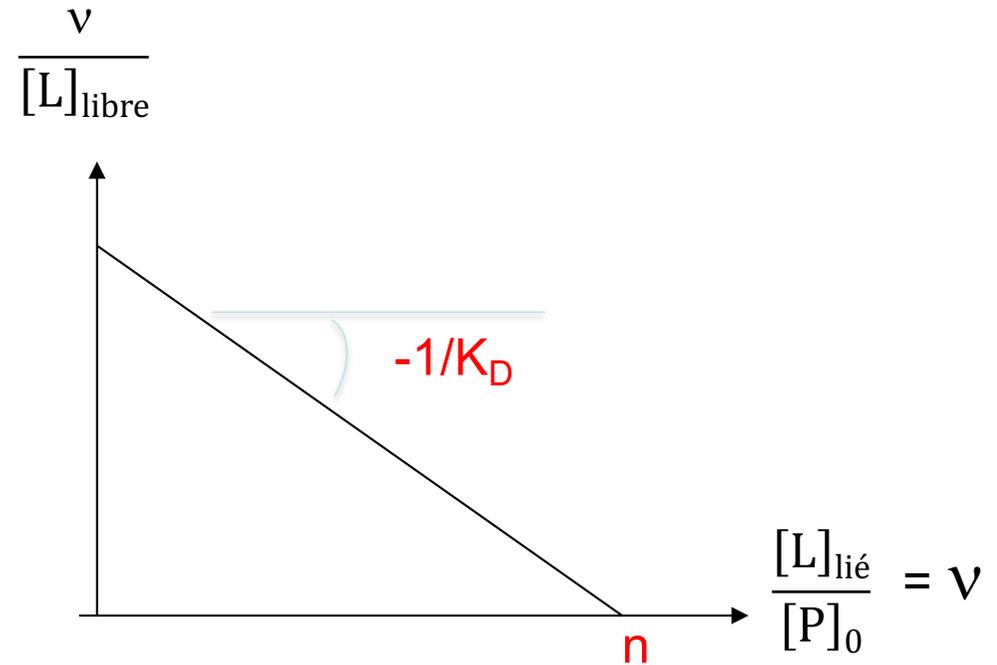
$$\frac{[RL]}{[L]} = -\frac{1}{K_D} [RL] + \frac{n}{K_D} [P]_0$$

$$\frac{[RL]}{[L] \times [P]_0} = \frac{-1}{K_D} \frac{[RL]}{[P]_0} + \frac{n}{K_D}$$

$$\frac{[L]_{\text{lié}}}{[L]_{\text{libre}} \times [P]_0} = \frac{-1}{K_D} \frac{[L]_{\text{lié}}}{[P]_0} + \frac{n}{K_D}$$

$$\frac{v}{[L]_{\text{libre}}} = \frac{-1}{K_D} v + \frac{n}{K_D}$$

avec $v = \frac{[L]_{\text{lié}}}{[P]_0}$



K_D et notion d'affinité

On considère que l'affinité d'une protéine pour un ligand est:

- Forte si $K_D \ll 10^{-9}$ M (nM)
- Modérée si $K_D \approx 10^{-6}$ M (μ M)
- Faible si $K_D > 10^{-3}$ M (mM)