



Institut Villebon
Georges Charpak

L1 Sciences et technologies
Sciences Fondamentales et Appliquées 2
UE Sciences et Energie

Cours d'introduction à l'enzymologie

Valérie PERIS DELACROIX
valerie.peris-delacroix@ens-paris-saclay.fr

école —
normale —
supérieure —
paris — saclay —

OBJECTIFS D'APPRENTISSAGE

- ✓ Définir les caractéristiques structurales et fonctionnelles (classification) d'une enzyme
- ✓ Utiliser le modèle de Michaelis-Menten pour déterminer les paramètres cinétiques $V_{\max}$ et K_M d'une enzyme michaelienne (méthode graphique)
- ✓ Analyser les effets de la température et du pH sur l'activité d'une enzyme (méthode graphique)
- ✓ Identifier (méthode graphique) la nature des principaux inhibiteurs enzymatiques sur la base de leur action sur les paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne

Enzymologie

Introduction : Définitions

1. La cinétique enzymatique et le modèle de Michaelis Menten
2. Détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne
3. Dosages enzymatiques
4. L'inhibition enzymatique

Enzymologie

Introduction : Définitions

1. La cinétique enzymatique et le modèle de Michaelis Menten
2. Détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne
3. Dosages enzymatiques
4. L'inhibition enzymatique

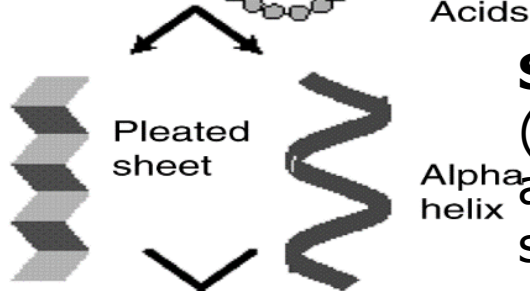
ENZYME

- protéine
- ayant une activité catalytique
- régulée
- et douée de spécificité

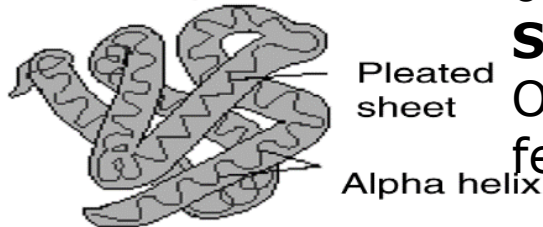
ENZYME : protéine ayant une activité catalytique régulée et douée de spécificité



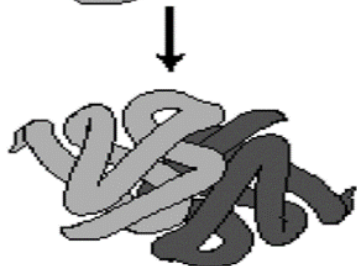
Structure primaire (= séquence des acides aminés)



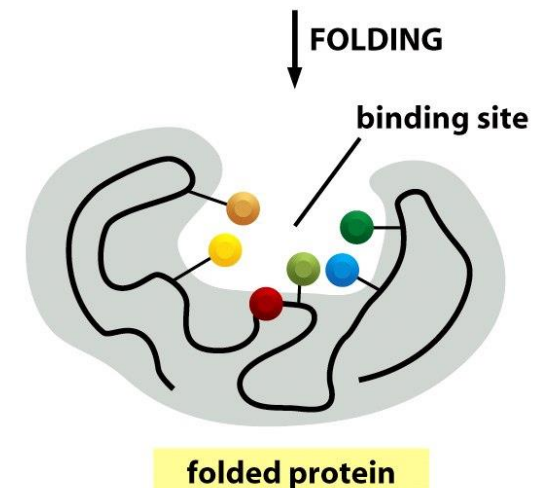
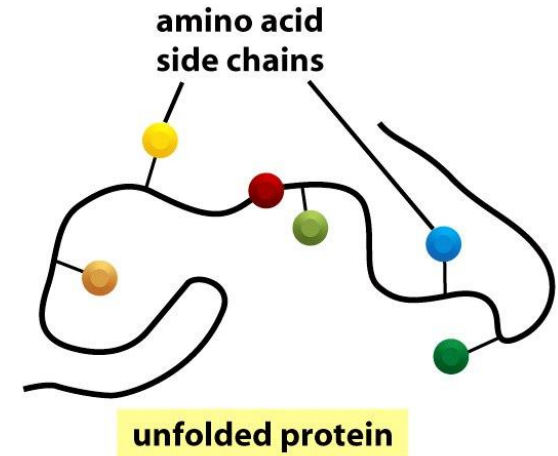
Structure secondaire (= interaction des acides aminés qui s'organisent en hélice ou en feuillet)



Structure tertiaire
Organisation en 3D des feuillets et hélices

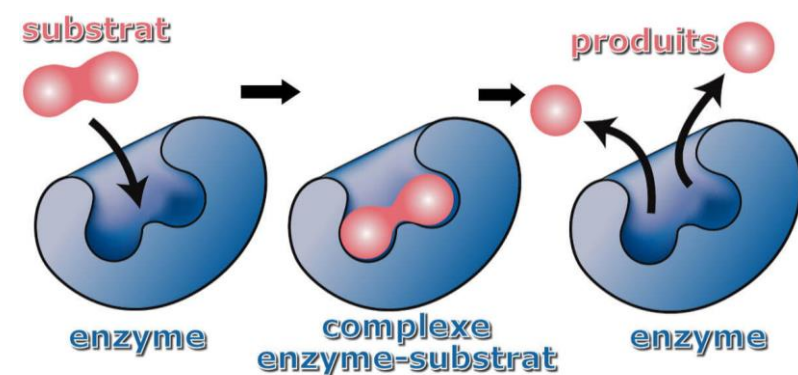
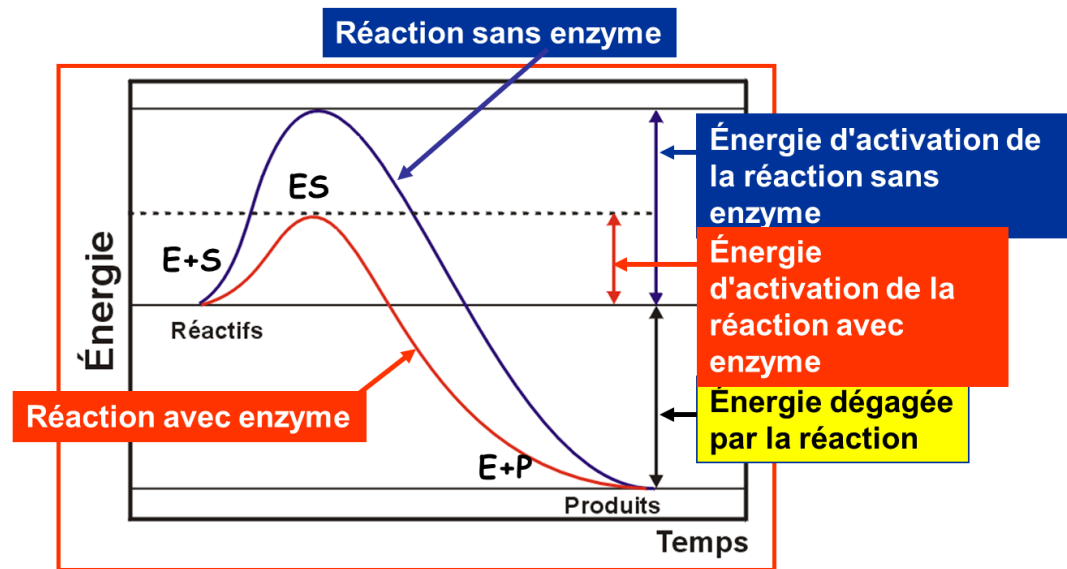
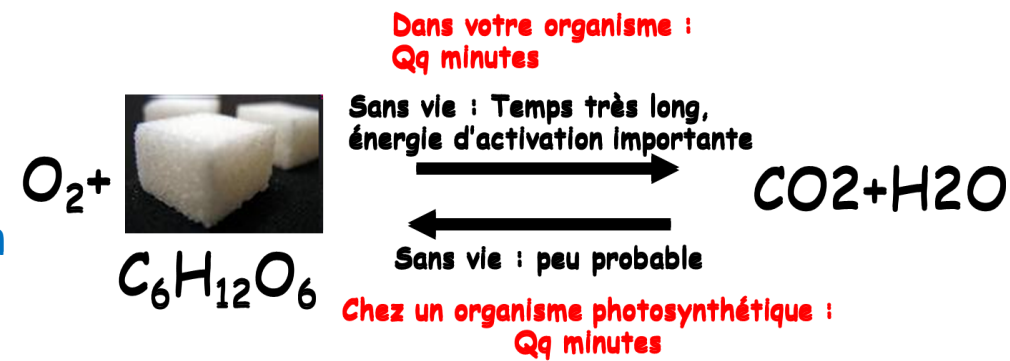


Structure quaternaires :
Interaction de plusieurs molécules



ENZYME : protéine ayant une activité catalytique régulée et douée de spécificité

- **Catalyseur**
- **Augmente la vitesse des réactions en diminuant l'énergie d'activation**
- **Ne modifie pas l'équilibre de la réaction**
- **Intacte à la fin de la réaction**

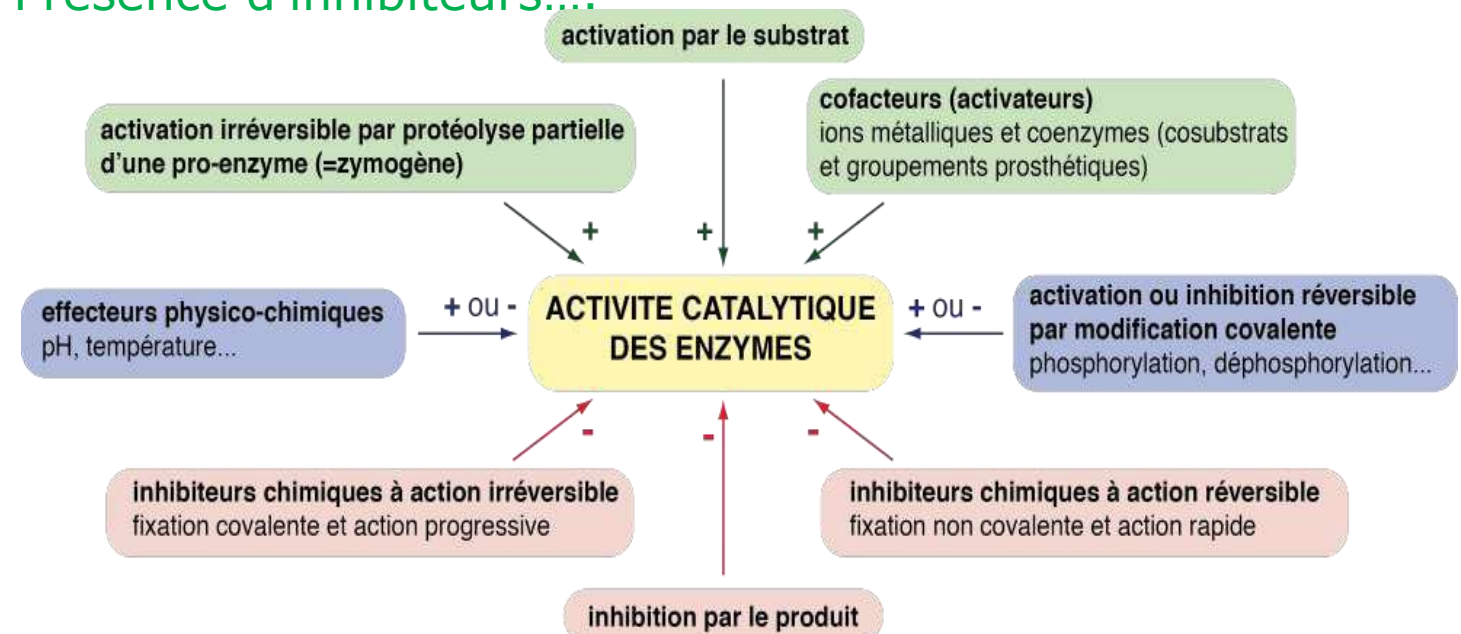


Enzyme = catalyseur

abaisse l'énergie d'activation requise pour la réaction

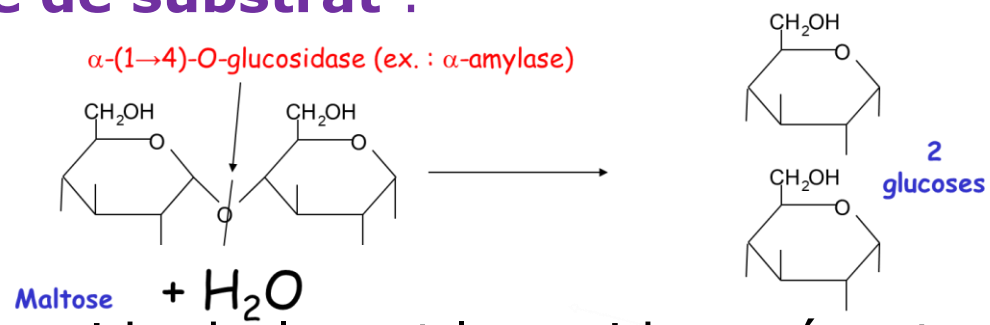
Enzyme : protéine ayant une activité catalytique régulée et douée de spécificité

- **Divers signaux** (Ex : des hormones)
- **Ajustement de l'offre métabolique à la demande cellulaire**
- **Différents mécanismes** de régulation :
 - ✕ [Substrat] et [Produits]
 - ✕ Quantité d'enzymes
 - ✕ Modifications post-traductionnelles des enzymes (ex : phosphorylation)
 - ✕ activation par protéolyse à partir d'une pro-enzyme
 - ✕ nécessité de co-facteurs
 - ✕ Présence d'inhibiteurs....



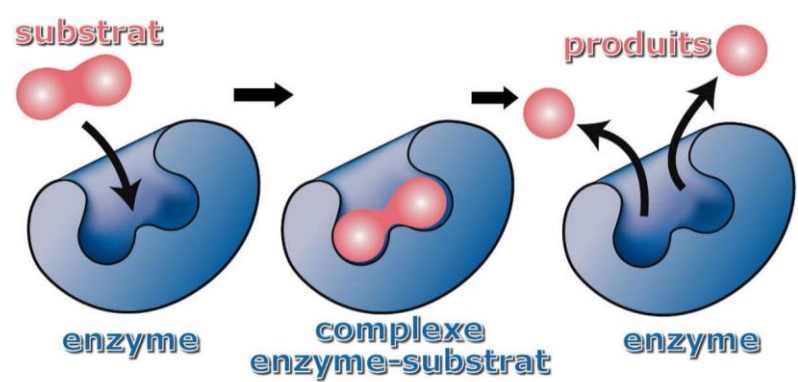
ENZYME : protéine ayant une activité catalytique régulée et douée de spécificité

- **Spécificité de substrat :**



Les enzymes qui hydrolysent les osides présentent une spécificité qui peut être liée :

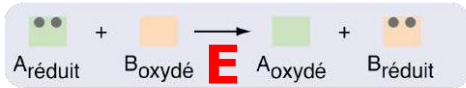
- au **type de liaisons hydrolysées** (dans l'ex, liaison osidique)
- aux **résidus osidiques** (dans l'exemple glucose)
- à l'**anomérie** (α ou β)



ENZYME : protéine ayant une activité catalytique régulée et douée de spécificité

- Spécificité de réactions : Les 7 classes d'enzymes

Classe 1. Oxydoréductases



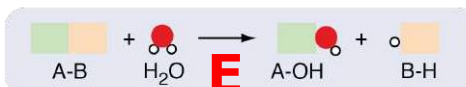
Oxydo-reductase

Classe 2. Transférases



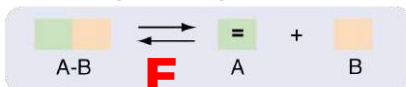
Transférase

Classe 3. Hydrolases



Hydrolase

Classe 4. Lyases et synthases



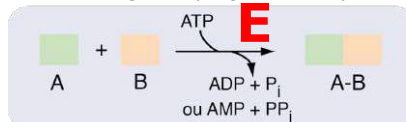
Lyase et synthase

Classe 5. Isomérases



Isomérase

Classe 6. Ligases (= synthétases)



Ligase

Classe 7. Translocases



Translocase

nom usuel : règle

- suffixe « **-ase** »
- reste du nom : dérivé de la **réaction** et/ou des **composés** impliqués dans la réaction

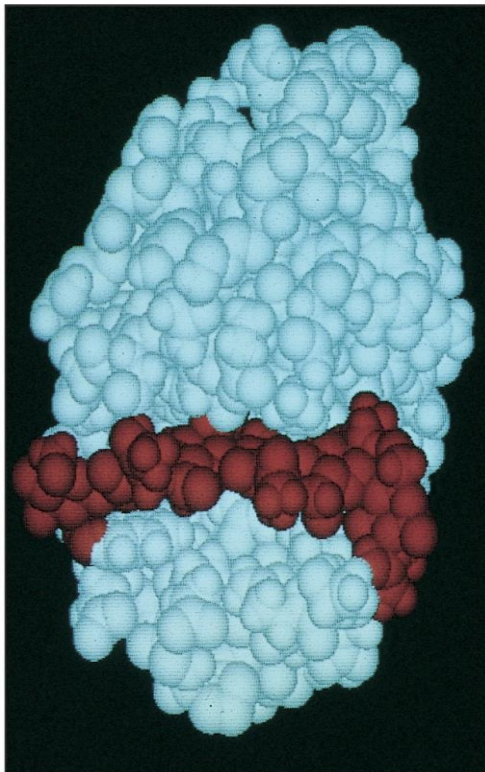
SITE ACTIF

- **Zone spécifique** de l'enzyme
- **où se fixe(nt) le(s) substrat(s)**
- **où se déroule la réaction**

= Liaison stéréospécifique

Interactions faibles (non covalentes- avec le substrat)

SITE ACTIF : Zone spécifique de l'enzyme, où se fixe(nt) le(s) substrat(s), où se déroule la réaction



entité tridimensionnelle

SITE ACTIF : Zone spécifique de l'enzyme, où se fixe(nt) le(s) substrat(s), où se déroule la réaction

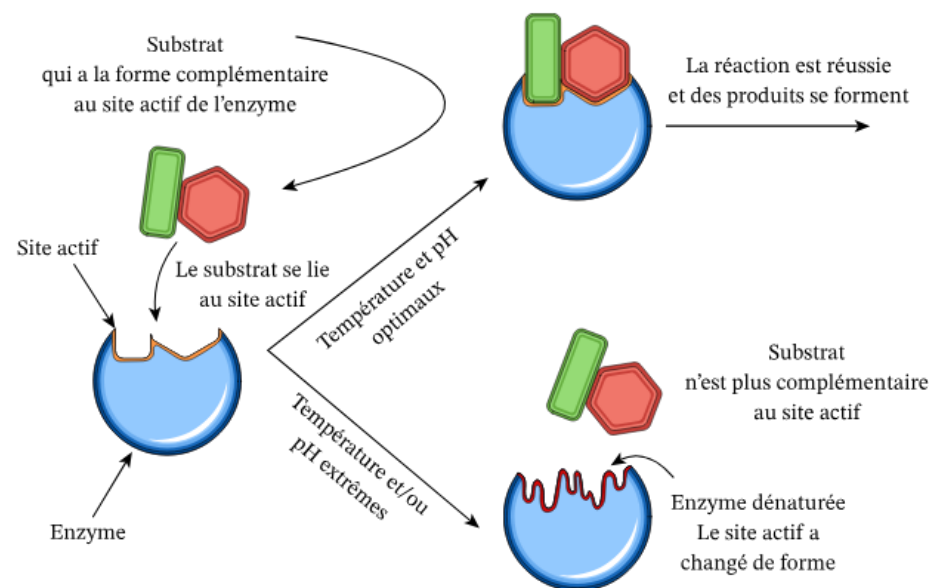
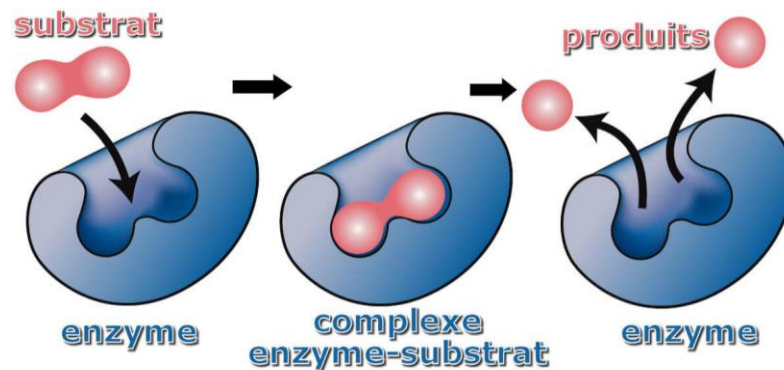
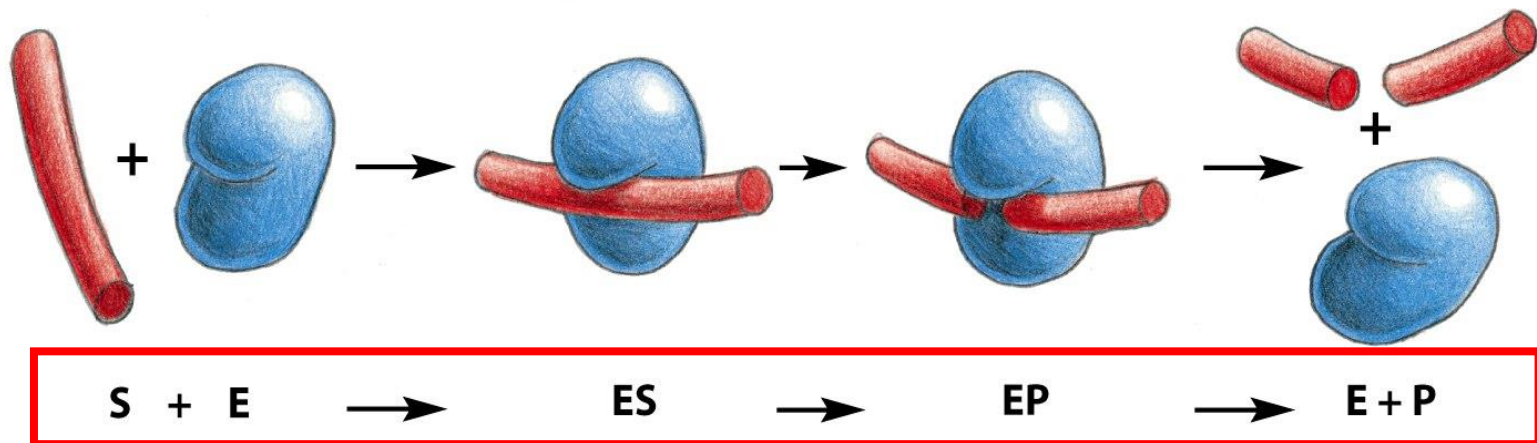


Figure 2: Schéma illustrant la différence entre une enzyme normale ou dénaturée.

SITE ACTIF : Zone spécifique de l'enzyme, où se fixe(nt) le(s) substrat(s), où se déroule la réaction

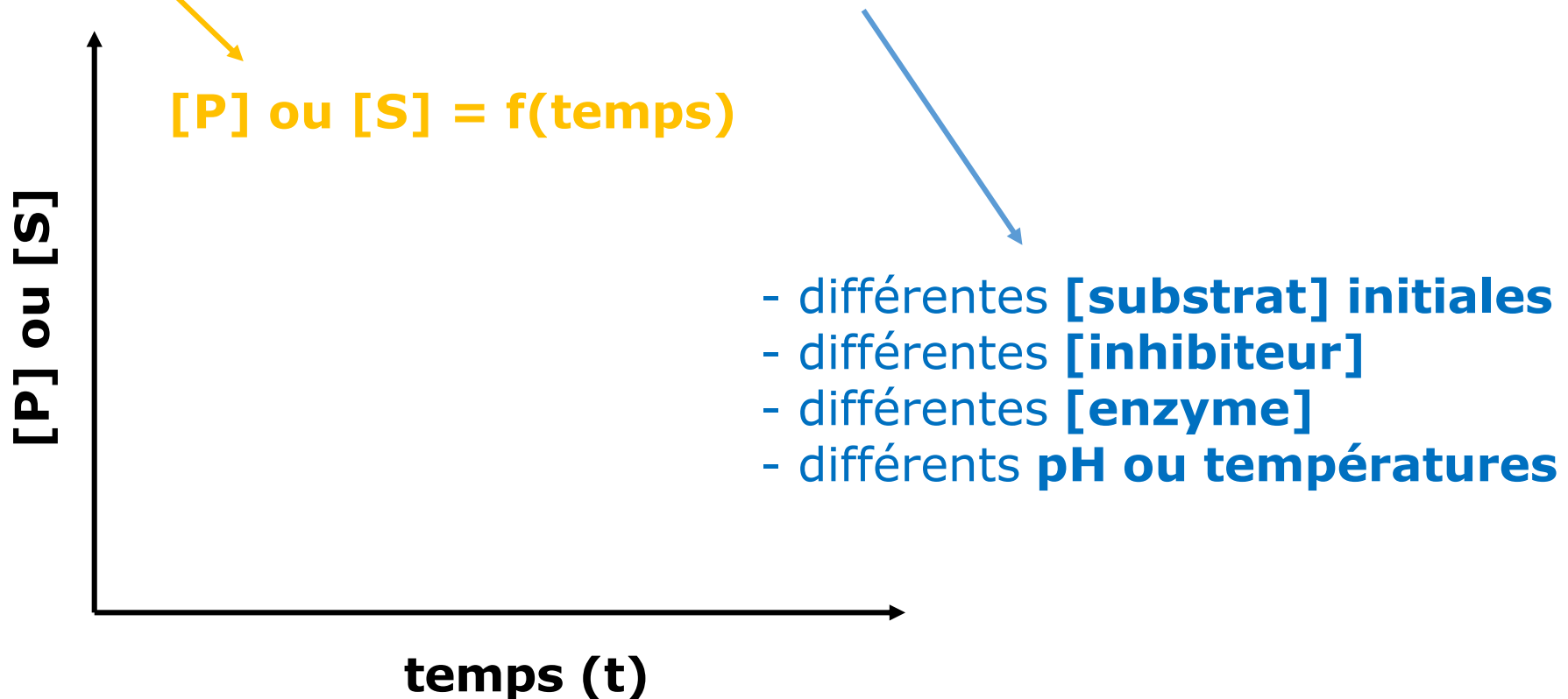


Enzymologie

Introduction : Définitions

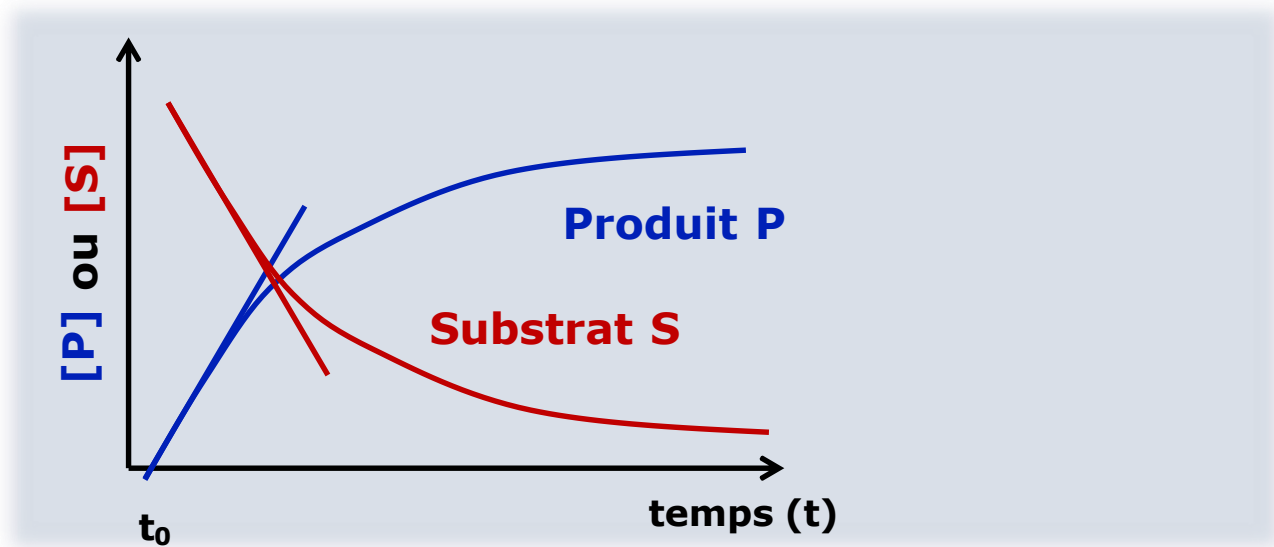
1. La cinétique enzymatique et le modèle de Michaelis Menten
2. Détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne
3. Dosages enzymatiques
4. L'inhibition enzymatique

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE : repose sur l'étude de la **vitesse des réactions catalysées par une enzyme** en fonction de **différents paramètres**.



Question : Quelle allure de courbe peut-on obtenir selon que l'on suive l'apparition d'un produit ou la disparition d'un substrat ?

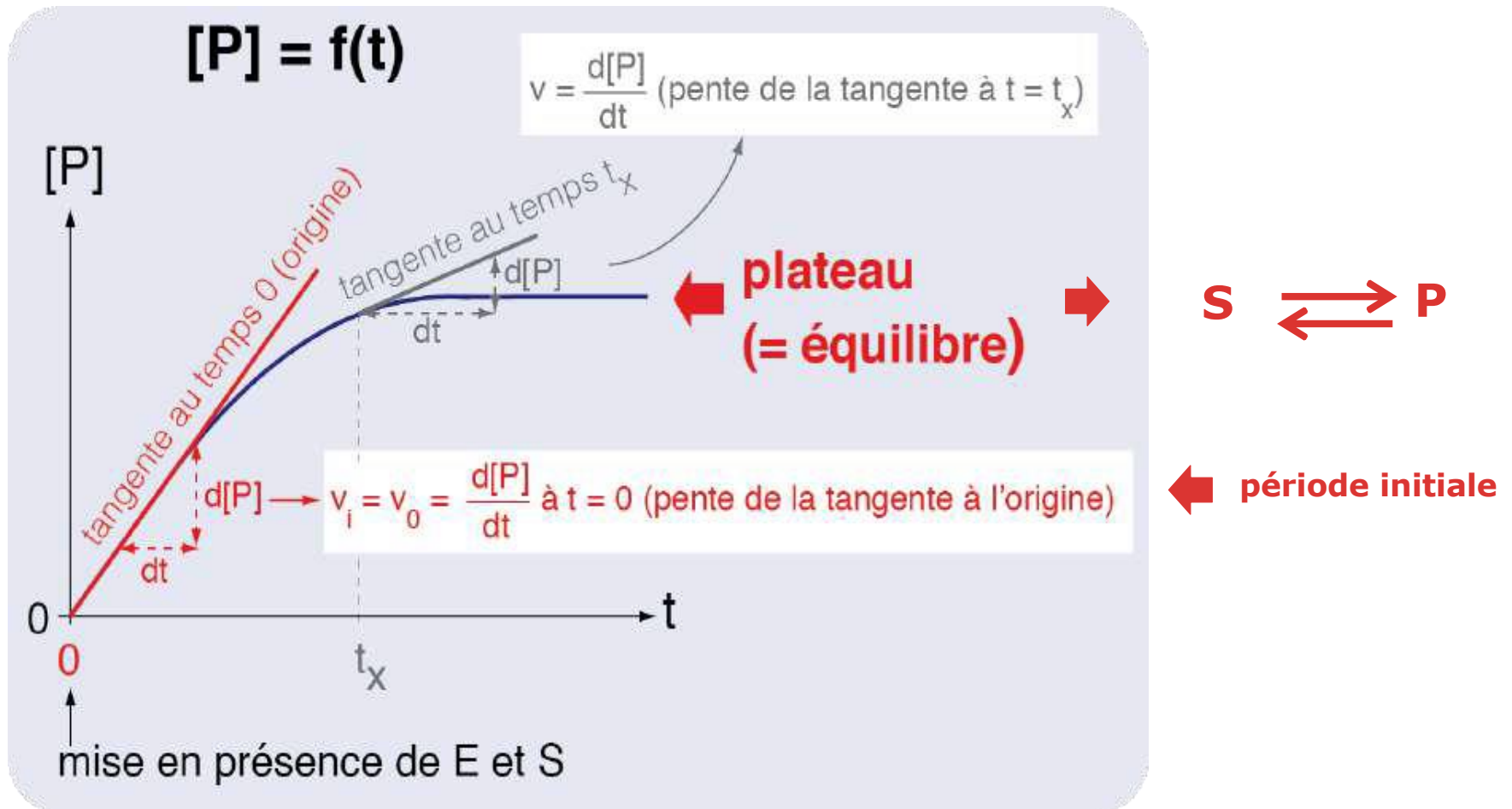
Question : Quelle allure de courbe peut-on obtenir selon que l'on suive l'apparition d'un produit ou la disparition d'un substrat ?



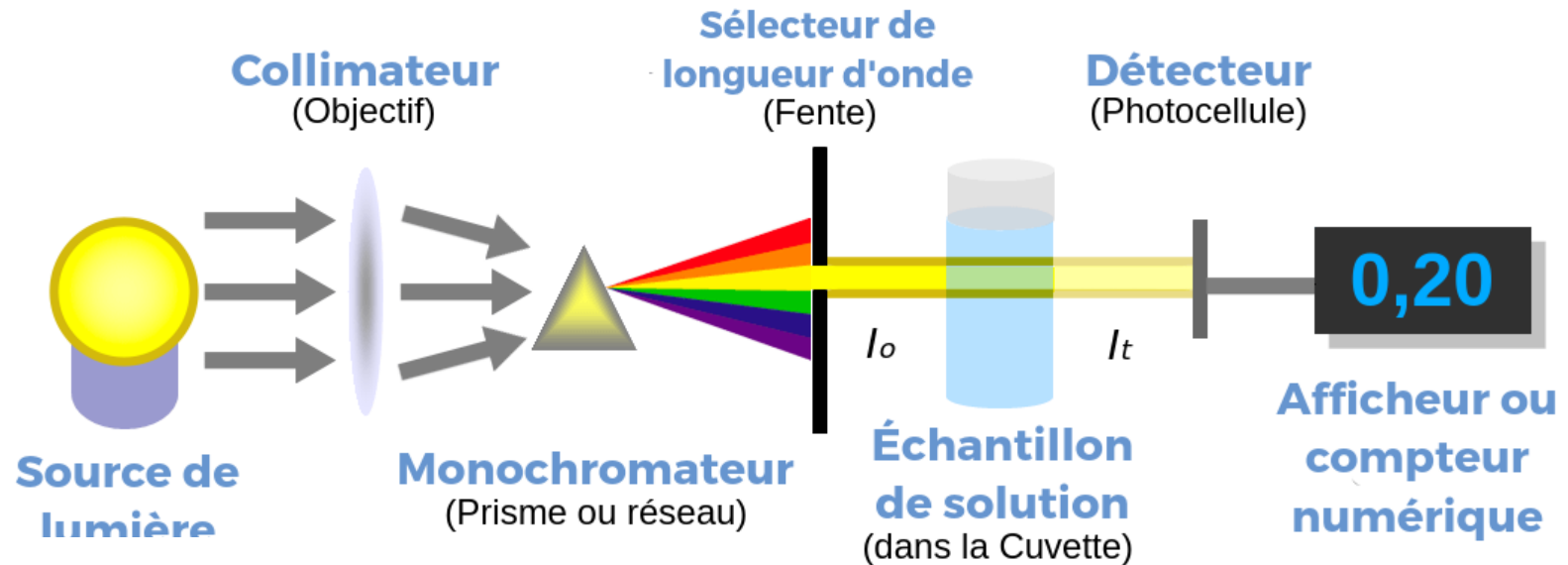
La vitesse instantanée de réaction (v) et la vitesse initiale (v_i ou v_0)

$$v_i = v_0 = \frac{d[P]}{dt} = - \frac{d[S]}{dt}$$

La vitesse de réaction (v) et la vitesse initiale (v_i ou v₀)



Méthode de mesure de la vitesse de réaction par spectrophotométrie



$$I = I_0 e^{-k l c}$$

La **loi de Beer-lambert** : $A_\lambda = \epsilon_\lambda \times l \times c$ ($= \text{Log} (I_0/I)$)

Avec : A_λ Absorbance à la longueur d'onde λ (sans unité)

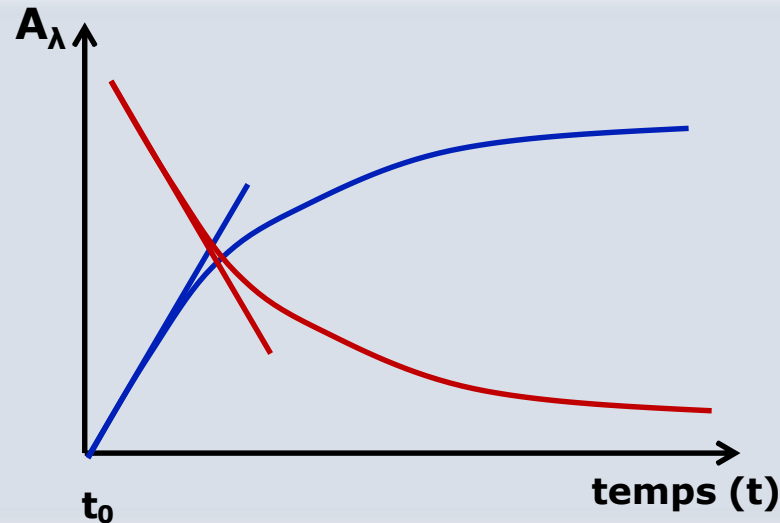
ϵ_λ Le coefficient d'extinction molaire ou moléculaire de la molécule absorbante (en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

l : la longueur du trajet optique (= largeur de cuve) (en cm)

C : concentration de l'espèce absorbante (en mol.L^{-1})

Méthode de mesure de la vitesse de réaction par spectrophotométrie

Absorbance de **P** ou **S**
à la longueur d'onde λ



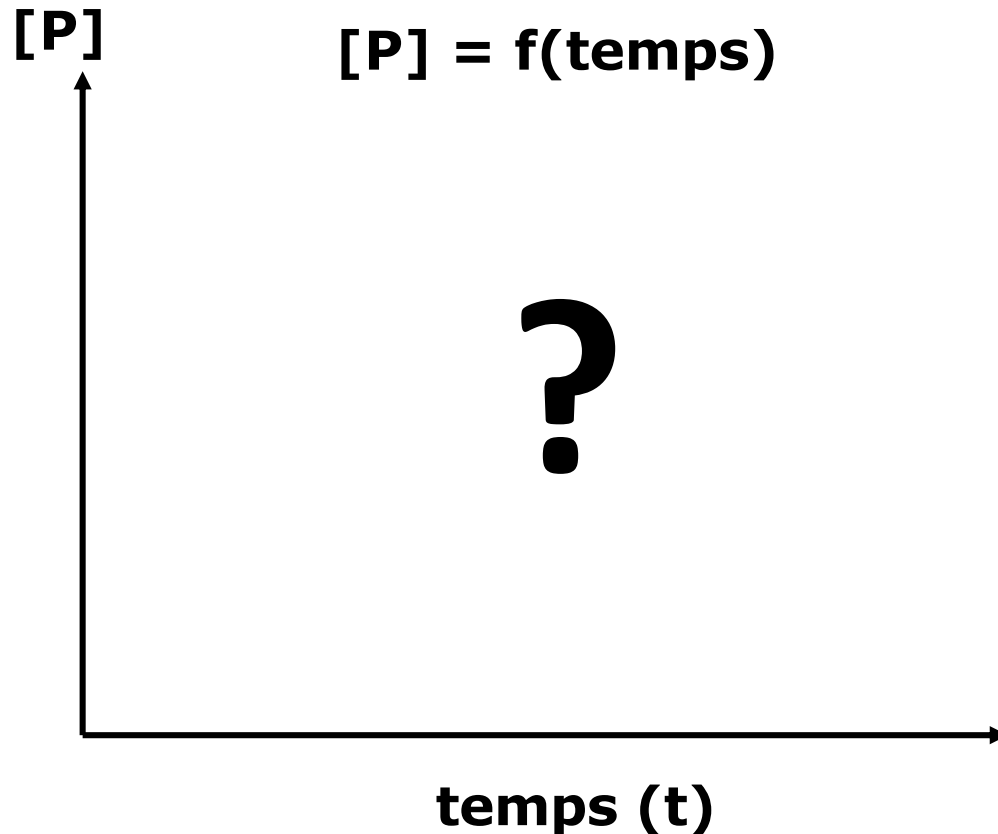
La mesure de la pente
initiale dA/dt est
proportionnelle $d[P]/dt$ ou
 $d[S]/dt$

→ Voir TP

$$v_i = v_0 = \frac{d[P]}{dt} = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{dA_\lambda}{dt}$$

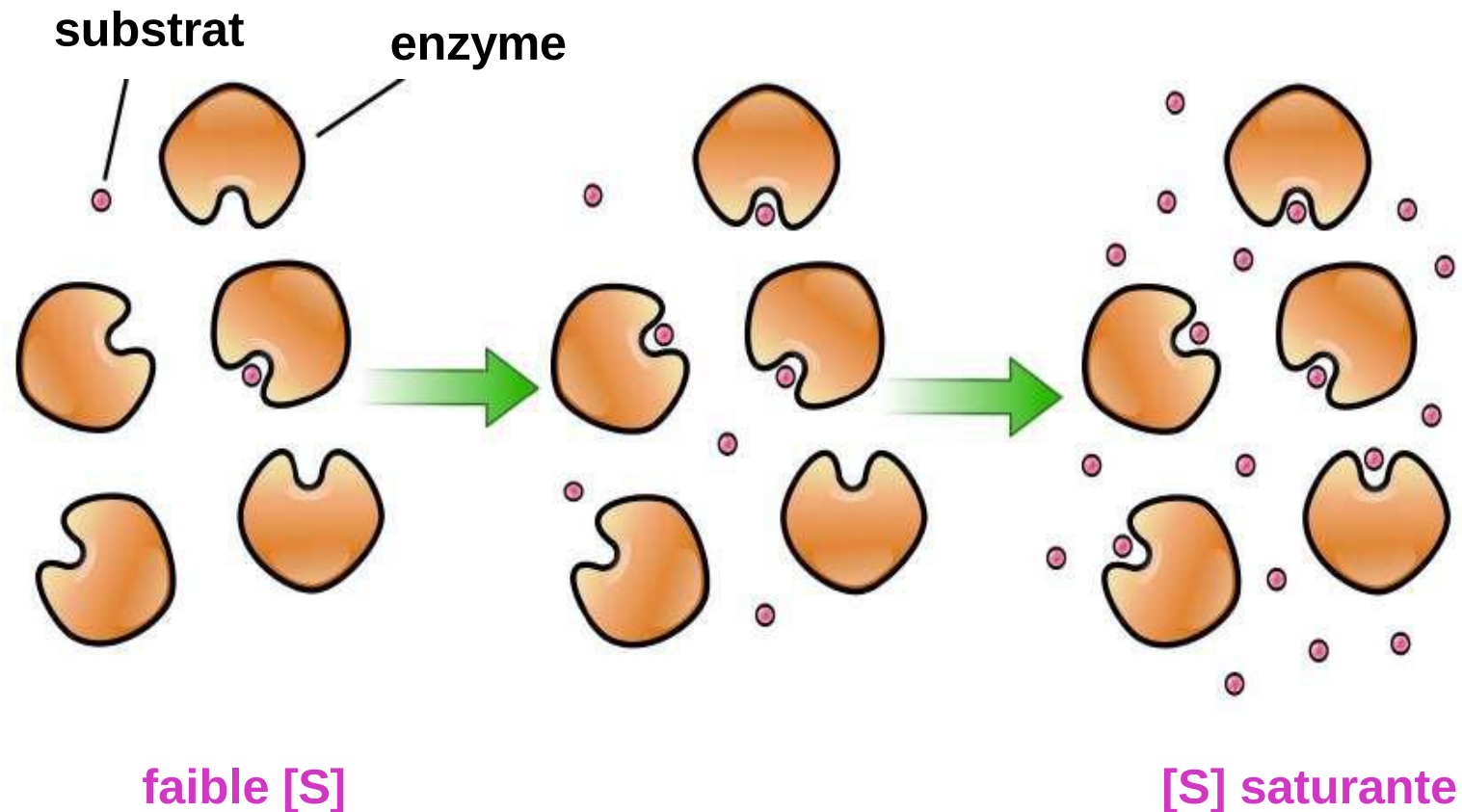
Influence de la $[S]$ sur la vitesse initiale v_i

D'après vous, comment varie la courbe $[P] = f(t)$ lorsqu'on fait varier la $[S]$? → dessiner plusieurs courbes avec des $[S]$ croissantes.

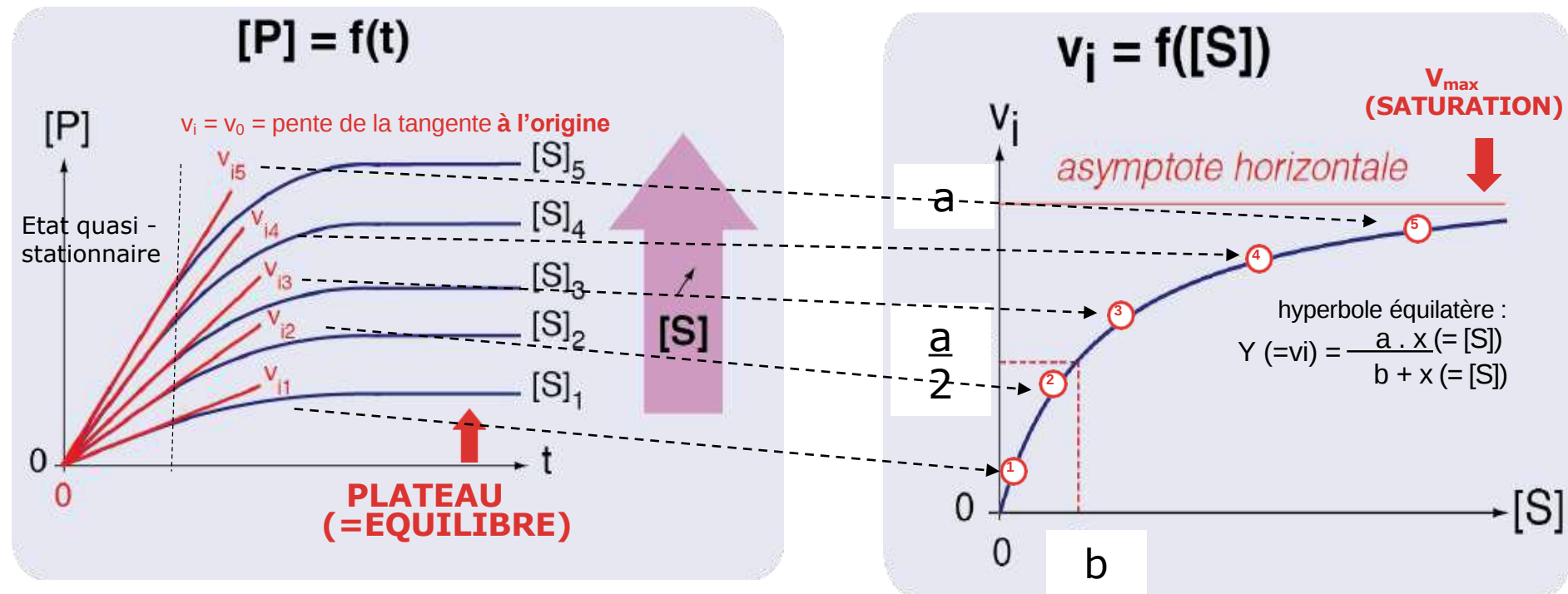


Influence de la $[S]$ sur la vitesse initiale v_i

INDICE



Influence de la $[S]$ sur la vitesse initiale v_i



$$[S]_1 < [S]_2 < [S]_3 < [S]_4 < [S]_5$$

La vitesse initiale augmente avec l'augmentation de la [substrat], jusqu'à atteindre un maximum appelé $V_{\max}$. Cela n'est possible que dans des **conditions saturantes en substrat**

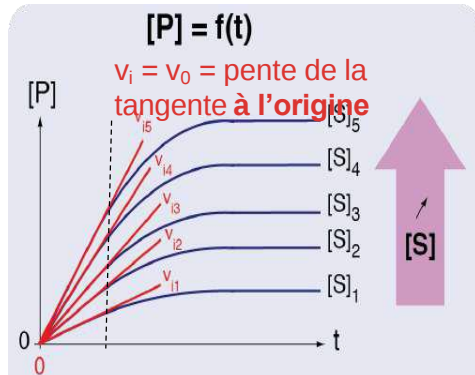
Démonstration de l'équation $v_i = f([S])$ L'équation de Michaelis Menten (1913)



Equation de base de la cinétique enzymatique



Avec k :
constante de
vitesse



A tout instant, la vitesse d'apparition du produit v est égale à

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P]$$

Etat quasi -
stationnaire

- **L'équation de Michaelis-Menten**, donne une expression de la vitesse initiale de réaction v_i
- **En début de réaction**, la vitesse de réaction est quasi-constante et égale à la vitesse initiale, notée v_i .
- **En fin de réaction**, la vitesse tend vers zéro (soit la réaction est totale et une fois le substrat épuisé il n'y a plus de réaction possible (donc $v=0$), soit un équilibre s'instaure entre la formation de produit ($ES \rightarrow E+P$) et sa destruction ($E+P \rightarrow ES$) ce qui, là encore, se traduit par une vitesse de réaction nulle ($= 0$)

Démonstration de l'équation $v_i = f([S])$ L'équation de Michaelis Menten (1913)

Les conditions nécessaires à l'équation de Michaelis Menten et leurs conséquences

1. La concentration en substrat est largement supérieure à la concentration initiale en enzyme

→ $[S] \gg [E]_0 \rightarrow [ES]$ est négligeable donc $[S] = [S]_0$

2. Absence ou quasi-absence de P

→ Besoin de faire les mesures rapidement en début de réaction

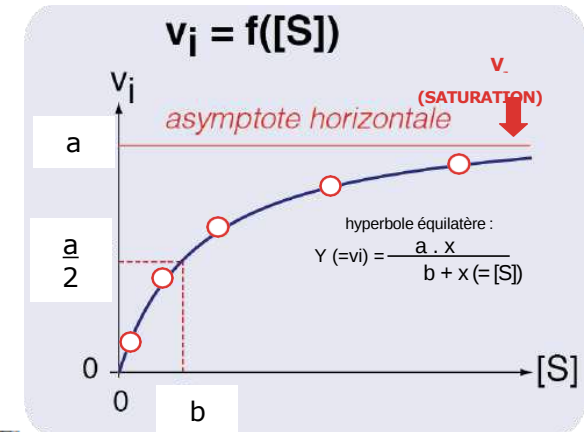
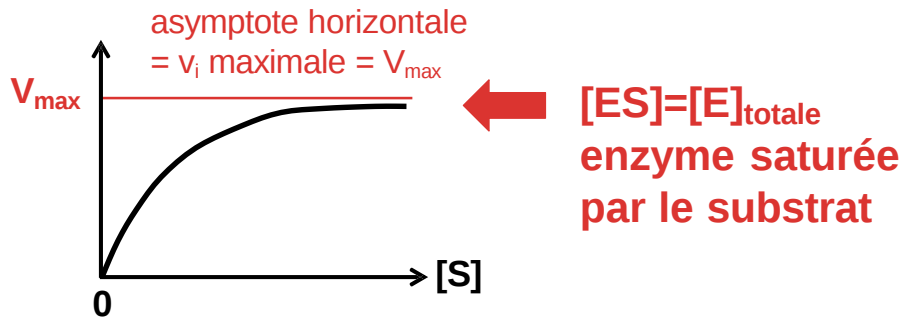
→ la réaction $P + E \rightarrow ES$ est négligeable.

→ $v_1 \gg v_{-2}$

3. On se place à l'état quasi-stationnaire, $[ES]$ reste constante

→ $d[ES]/dt = 0$

Démonstration de l'équation $v_i = f([S])$ L'équation de Michaelis Menten (1913)



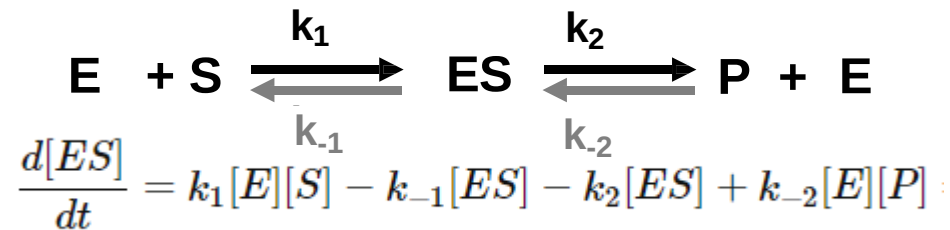
- la réaction $P + E \rightarrow ES$ est négligeable donc $v_i = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$.
- Quand $v_i = V_{\text{imax}}$ ou V_{max} , $[ES] = [E]_{\text{totale}} = [E]_0$ Constante = enzyme saturée par le substrat
- Donc $V_{\text{max}} = k_2 [E]_0$, avec $k_2 = k_{\text{cat}}$ **constante catalytique**
- V_{max}** caractérise le **pouvoir catalytique de l'enzyme**. Elle est obtenue en concentration saturante en substrat. Elle s'exprime en $\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$

$$\rightarrow v_i = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{b + [S]}$$

Démonstration de l'équation $v_i = f([S])$ L'équation de Michaelis Menten (1913)

Détermination de K_M La constante de Michaelis Menten

Equation de base de la cinétique enzymatique



- Comme $d[ES]/dt = 0$ et que v_{-2} est négligeable on obtient :

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

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

- $K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$ **K_M est la constante de Michaelis**
- Elle est caractéristique de l'enzyme dans des conditions (de $T^\circ C$ et de $pH, \dots$) données. Elle représente le rapport entre la disparition du complexe ES ($(k_{-1} + k_2)$) et l'apparition du complexe $[ES]$ (k_1)

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

Démonstration de l'équation $v_i = f([S])$ L'équation de Michaelis Menten (1913)

- Si on remplace $[E]$ par $[E]_0 - [ES]$ dans l'équation $[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$
- Alors on obtient $[ES] = \frac{([E]_0 - [ES])[S]}{K_M}$

$$\Leftrightarrow [ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_M} - \frac{[ES][S]}{K_M}$$

$$\Leftrightarrow [ES] + \frac{[ES][S]}{K_M} = \frac{[E]_0[S]}{K_M}$$

$$\Leftrightarrow [ES] \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) = \frac{[E]_0[S]}{K_M}$$

$$\Leftrightarrow [ES] = \frac{\frac{[E]_0[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

$$\Leftrightarrow [ES] = \frac{\frac{[E]_0[S]}{K_M}}{\frac{K_M + [S]}{K_M}}$$

$$\Leftrightarrow [ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_M + [S]} \times \frac{K_M}{K_M}$$

$$\Leftrightarrow [ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_M + [S]}$$

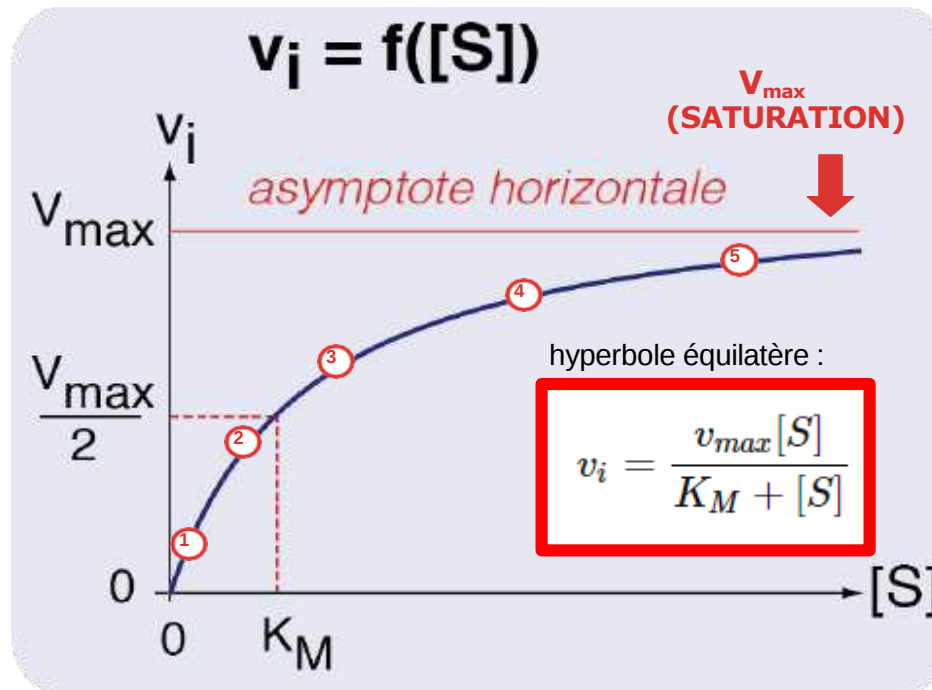
$$\Leftrightarrow v_i = k_2 [ES]$$

$$v_i = k_2 \frac{[E]_0[S]}{K_M + [S]}$$

$$V_{\max} = k_2 [E]_0$$

$$v_i = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Démonstration de l'équation $v_i = f([S])$ L'équation de Michaelis Menten (1913)



- K_M s'exprime en unité de concentration (mol.L^{-1})
- K_M est généralement compris entre 10^{-6} et 10^{-2}

Démonstration de l'équation $v_i = f([S])$ L'équation de Michaelis Menten (1913)

Cas particuliers du quasi-équilibre

Equation de base de la cinétique enzymatique



RAPIDE

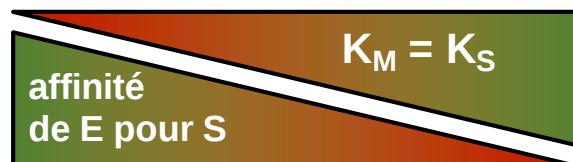
LENT

$$K_M = \frac{k_{-1} + \cancel{k_2}}{k_1} \longrightarrow K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_S = K_{\text{dissociation}}$$

$$K_{\text{dissociation}} = \frac{1}{K_{\text{association}}} \quad K_{\text{affinité}}$$

FAIBLE valeur de K_M
valeur **ELEVÉE** de K_M

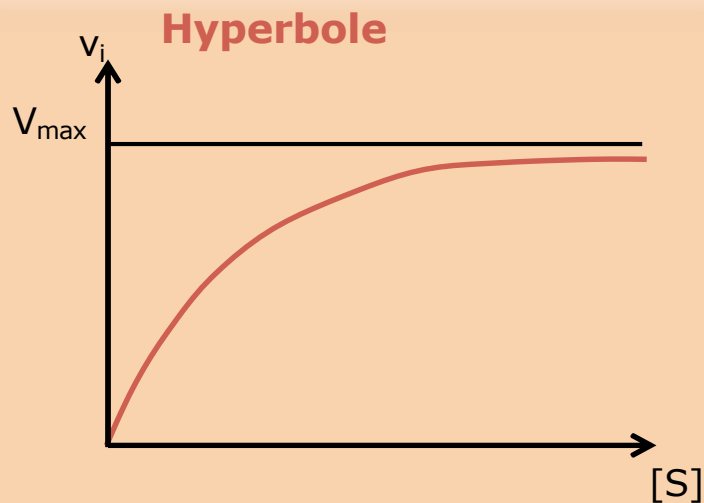
FORTE AFFINITE
FAIBLE AFFINITE



Quelques exemples d'enzymes michaeliennes

Enzyme	Substrat	K_M (M)	k_{cat} (s ⁻¹)
Acétylcholinestérase	Acétylcholine	9.5×10^{-5}	1.4×10^4
Anhydrase carbonique	CO ₂	1.2×10^{-2}	1.0×10^6
	HCO ₃ ⁻	2.6×10^{-2}	4.0×10^5
Catalase	H ₂ O ₂	2.5×10^{-2}	1.0×10^7
Chymotrypsine	Ester éthylique de N-Acétyleglycine	4.4×10^{-1}	5.1×10^{-2}
	Ester éthylique de N-Acétylevaline	8.8×10^{-2}	1.7×10^{-1}
	Ester éthylique de N-Acétyletyrosine	6.6×10^{-4}	1.9×10^2
Fumarase	Fumarate	5.0×10^{-6}	8.0×10^2
	Malate	2.5×10^{-5}	9.0×10^2
Uréase	Urée	2.5×10^{-2}	1.0×10^4

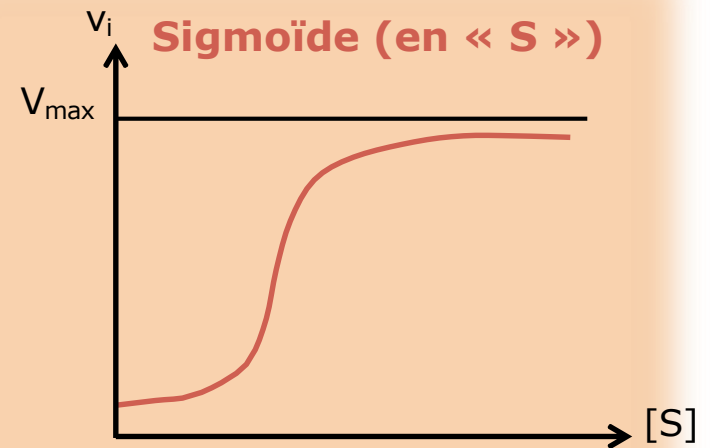
Il existe 2 catégories d'enzymes Selon l'allure du graphe $v_i = f([S])$



Enzymes michaeliennes



Structure tertiaire ou quaternaire de l'enzyme



Enzymes allostériques

- rôle majeur dans les régulations métaboliques
- structure quaternaire obligatoire



Structure
quaternaire
(ex : tétramérique)

Enzymologie

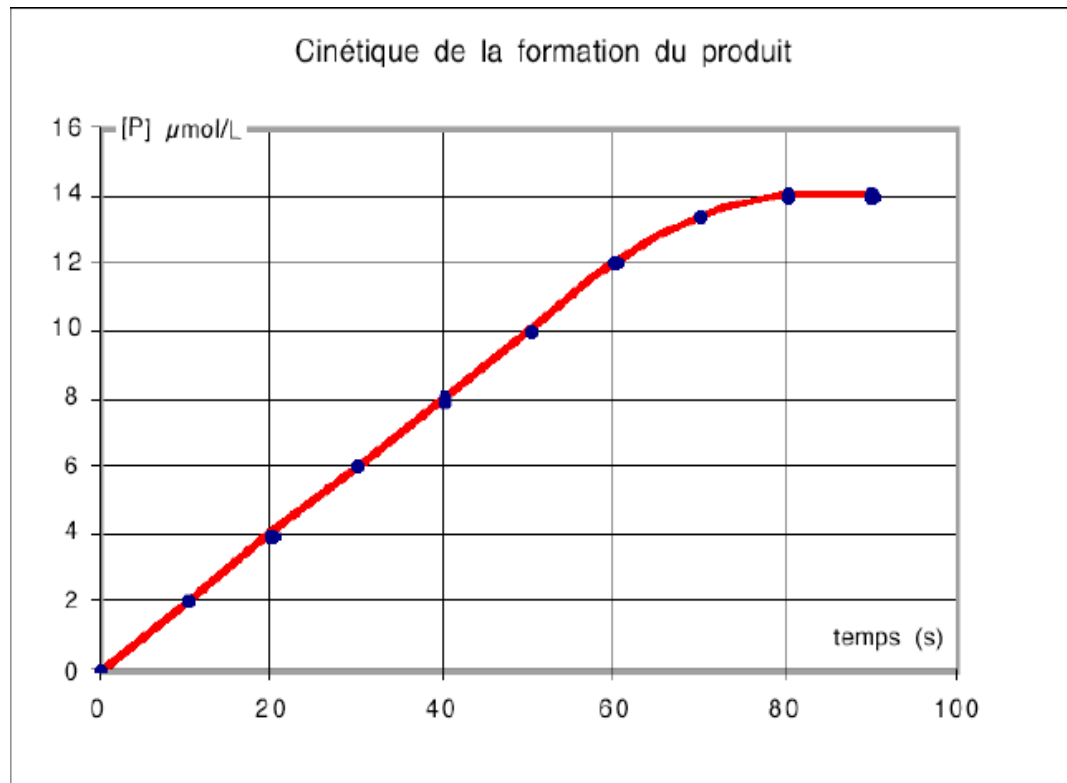
Introduction : Définitions

1. La cinétique enzymatique et le modèle de Michaelis Menten
2. Détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne
3. Dosages enzymatiques
4. L'inhibition enzymatique

EXERCICES RELATIFS AU COURS ET AUX TP D'ENZYMOLOGIE

1. Détermination de V_i **Enzymologie**

La courbe ci-dessous donne la quantité de produit formé en $\mu\text{mol.L}^{-1}$ en fonction du temps en secondes.
Définir et déterminer graphiquement la vitesse initiale de la réaction.



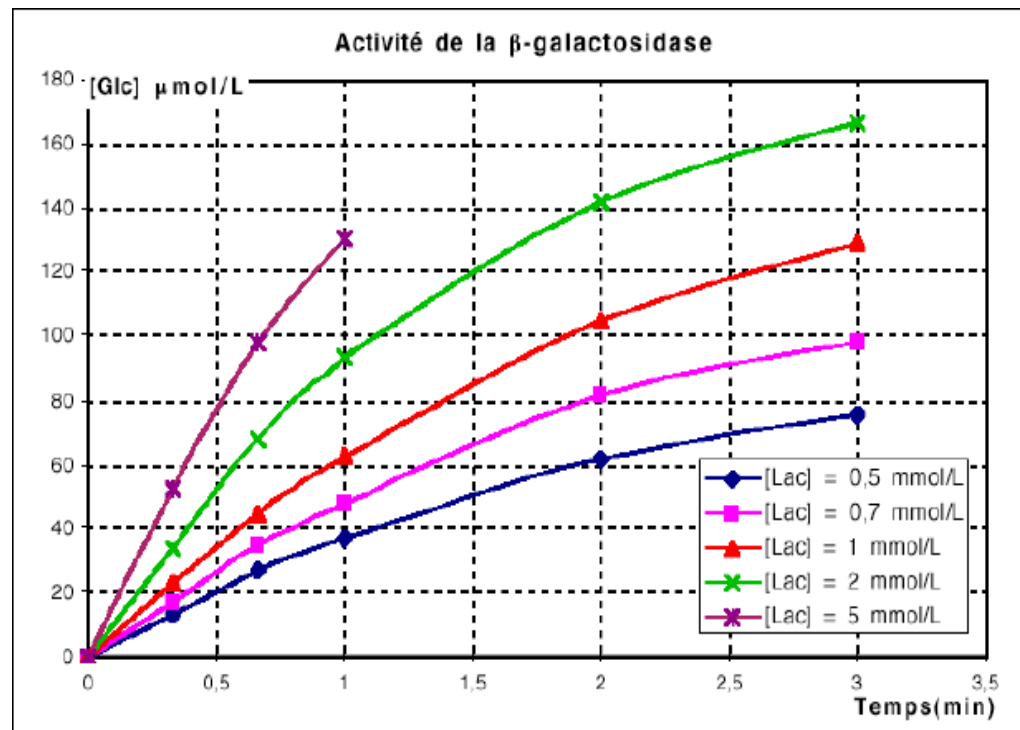
2. β -Galactosidase

On étudie l'hydrolyse du lactose par la β -galactosidase en mesurant l'apparition du glucose en fonction du temps.

Réaction d'hydrolyse du lactose catalysée par la β -galactosidase :
Lactose + H₂O $\rightarrow$ galactose + glucose

Afin d'étudier le rôle de la concentration en substrat sur les vitesses initiales de la réaction, on effectue une série d'essais avec des concentrations différentes en lactose. Les résultats ont permis de tracer les courbes de la figure ci-dessous.

a) Déterminer graphiquement les différentes vitesses initiales (V_i) correspondant à chaque concentration en substrat $[S]$.

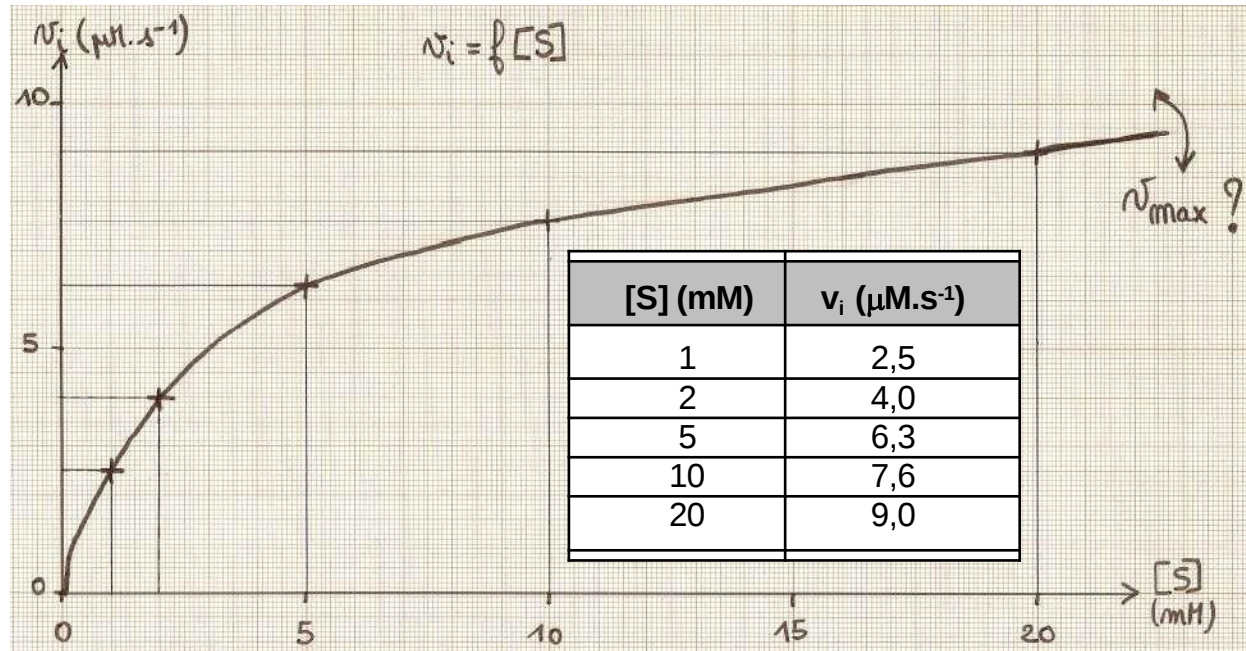


Enzymologie

Introduction : Définitions

1. La cinétique enzymatique et le modèle de Michaelis Menten
2. Détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne
3. Dosages enzymatiques
4. L'inhibition enzymatique

Détermination graphique de K_M et V_{max} **Limites de la représentation $v_i = f([S])$**



La détermination de V_{max} peut être imprécise → La détermination de K_M sera également imprécise

→ Besoin d'une **autre méthode graphique**

Détermination graphique de K_M et V_{max} La représentation de **Lineweaver-Burk**

La représentation de Lineweaver-Burk repose sur la **linéarisation de la représentation hyperbolique** obtenue avec $v_i = f([S])$.

C'est une **représentation en double inverse**

équation de
Michaelis-Menten

$$v_i = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$



$$\frac{V_{max}}{v_i} = \frac{K_M + [S]}{[S]} = \frac{K_M}{[S]} + 1$$



équation de
Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

La représentation de Lineweaver-Burk (représentation en double inverse)

équation de Lineweaver-Burk

équation d'une droite

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = a \cdot x + b$$

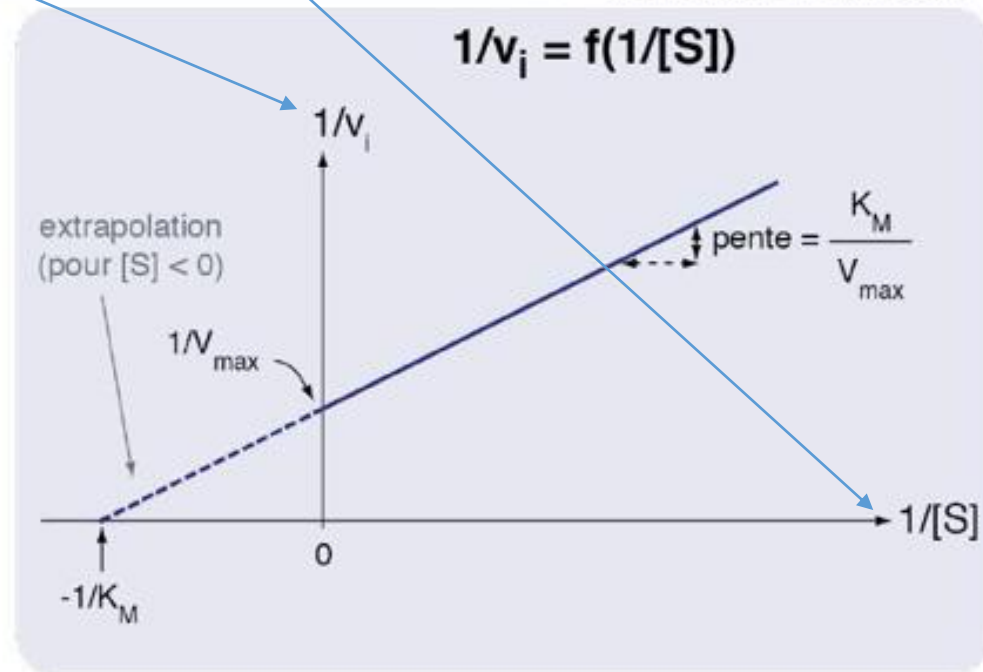
a : pente

b : ordonnée à l'origine

représentation de Lineweaver-Burk (en double inverse)

$$\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$$

- ordonnée à l'origine (b) = $1/V_{\max}$
- pente (a) = $K_M/V_{\max}$
- coupe l'axe des abscisses en $-1/K_M$



La représentation de Lineweaver-Burk (représentation en double inverse)

UTILISATION PRATIQUE :

1/ déterminer graphiquement les v_i pour différentes $[S]$ initiale
(avec $[E]$, température, pH, pression constants....) avec la représentation **$[P] = f(t)$**

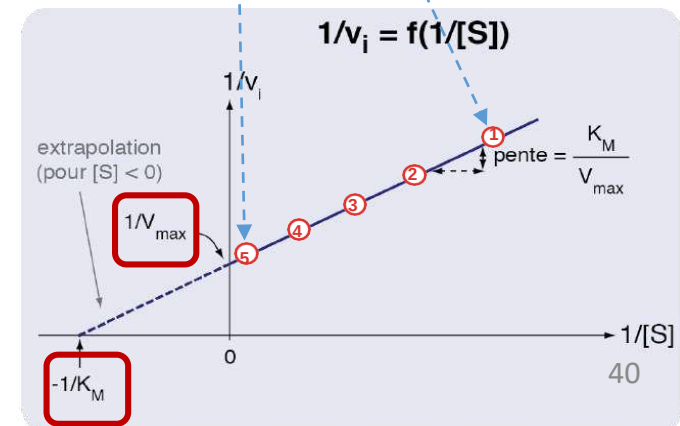
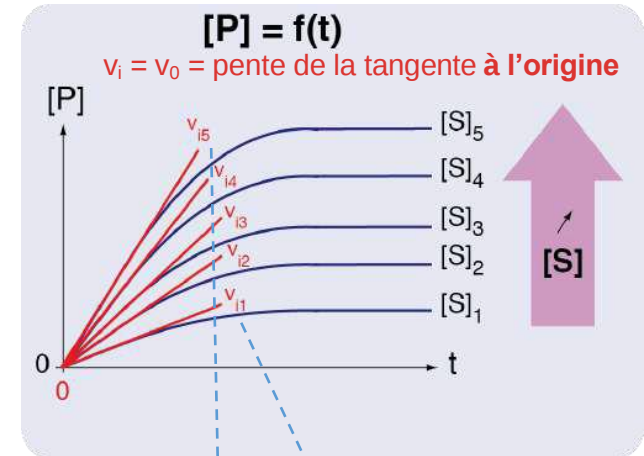


2/ calculer les inverses $1/[S]$ et $1/v_i$

3/ tracer le graphique

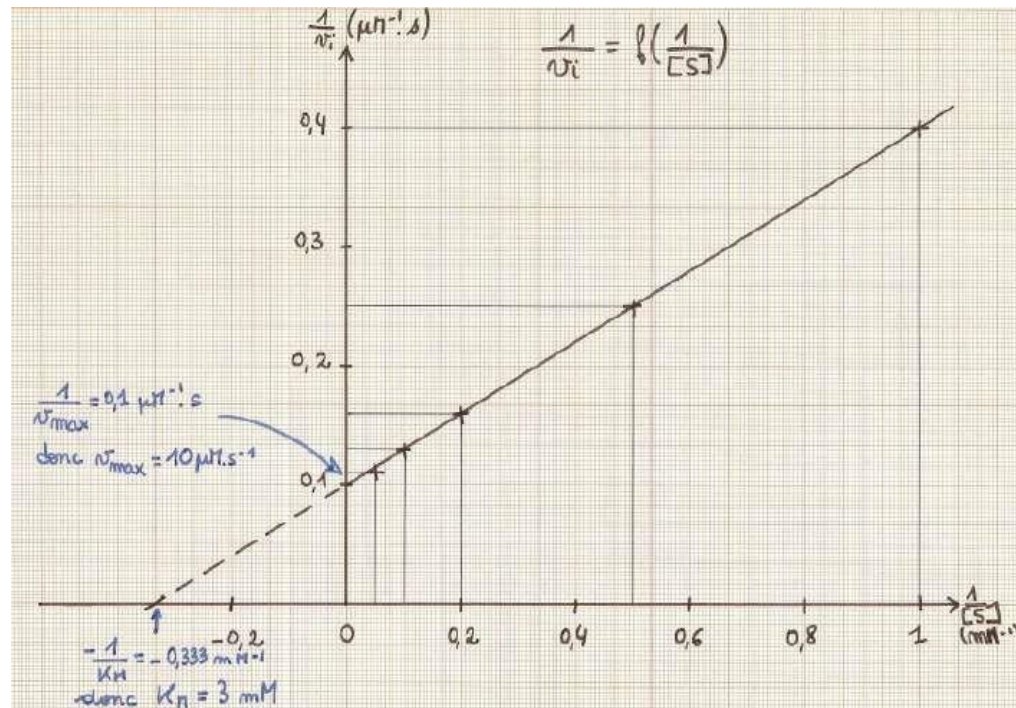
$$\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$$

et déterminer graphiquement K_M et V_{max}



La représentation de Lineweaver-Burk (représentation en double inverse)

[S] (mM)	v_i ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)		$1/[S]$ (mM^{-1})	$1/v_i$ ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}$)
1	2,5	→	1	0,4
2	4,0		0,5	0,25
5	6,3		0,2	0,16
10	7,6		0,1	0,13
20	9,0		0,05	0,11



Calcul de la constante catalytique d'une enzyme À partir de $V_{\max}$

On a vu précédemment que dans les conditions de Michaelis-Menten (Concentration saturante en substrat, $[ES]$ négligeable, $[P]$ négligeable, $[E] \approx [E]_{\text{totale}} (= [E]_0)$)

$$v_i = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES]$$

- Quand $v_i = V_{\max}$, $[ES] = [E]_{\text{totale}} = [E]_0$ Constante = enzyme saturée par le substrat
- Donc $V_{\max} = k_2 [E]_t$ avec $k_2 = \mathbf{k_{cat}}$ **constante catalytique**

$$\text{min}^{-1} \rightarrow \mathbf{k_{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E]_t}$$

mol. L⁻¹.min⁻¹ (for $V_{\max}$)
mol.L⁻¹ (for $[E]_t$)

Suppose de connaître la concentration molaire d'enzyme $[E]_t$ donc sa masse moléculaire

valeurs de k_{cat} : généralement entre 10^3 et 10^6 min⁻¹

Enzymologie

Introduction : Définitions

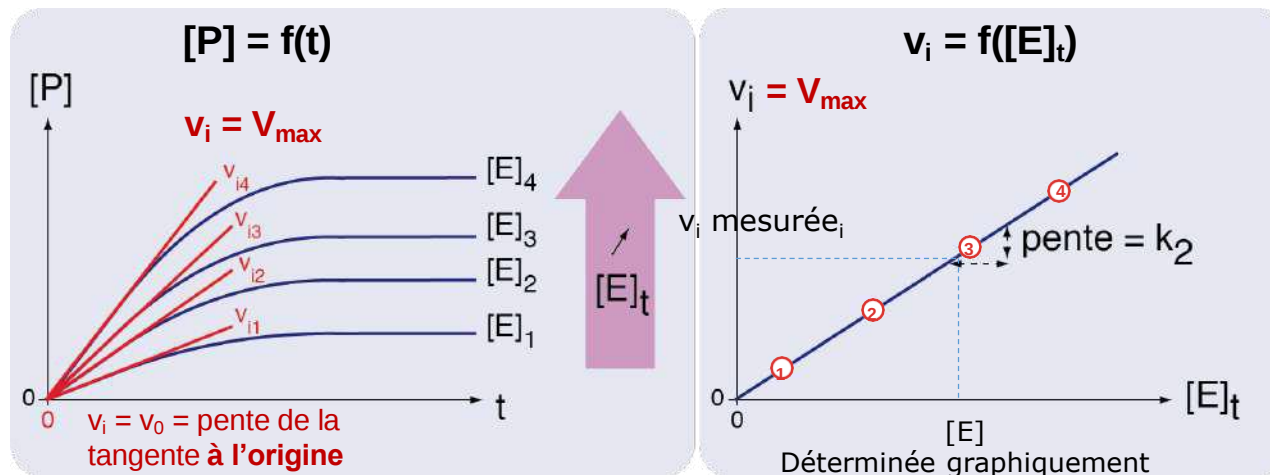
1. La cinétique enzymatique et le modèle de Michaelis Menten
2. Détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne
3. Dosages enzymatiques
4. L'inhibition enzymatique

Dosage d'enzymes

Objectifs : Déterminer la [enzyme] d'après la mesure de sa vitesse initiale v_i

Principe : La détermination de la [E] s'appuie sur une courbe étalon $v_i = f([E])$ avec une solution d'enzyme étalon de concentration connue. Seule la [] varie – les autres paramètres sont constants. Possibilité de déterminer [E] d'après la détermination de k_2

Conditions expérimentales : $[E]_{\text{totale}}$ ($[E]_t$) variable et faible et [S] constante et saturante ($[S] \gg K_M$, en pratique $[S] > 10 K_M$)

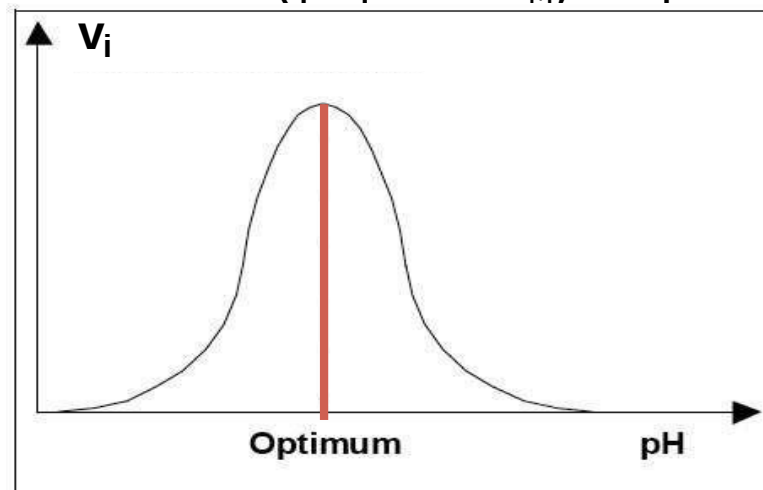


Influence du pH sur l'activité enzymatique

Objectifs : Déterminer l'influence du pH d'après la mesure de la vitesse initiale v_i de l'enzyme considérée (les autres paramètres sont constants)

Principe : La détermination de la $[E]$ s'appuie sur une courbe étalon $v_i = f([E])$ avec une solution d'enzyme étalon de concentration connue.

Conditions expérimentales : $[E]_{\text{totale}}$ ($[E]_t$) variable et faible et $[S]$ constante et saturante ($[S] \gg K_M$, en pratique $[S] > 10 K_M$)



Obtention d'une **courbe en cloche**
(à ± 2 unités du pH optimum : activité négligeable)

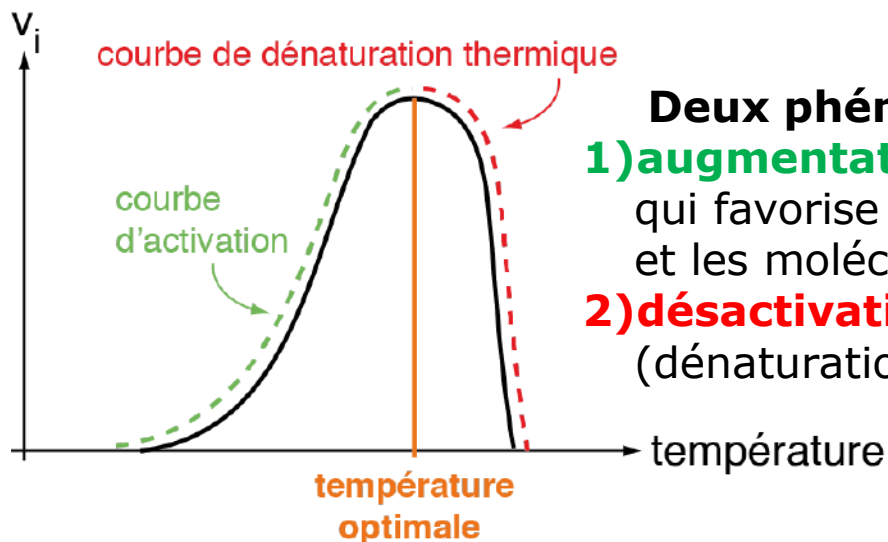
Influence de la **température** sur l'activité enzymatique

Objectifs : Déterminer l'influence du pH d'après la mesure de la vitesse initiale v_i de l'enzyme considérée (les autres paramètres sont constants)

Principe : La détermination de la $[E]$ s'appuie sur une courbe étalon $v_i = f([E])$ avec une solution d'enzyme étalon de concentration connue.

Conditions expérimentales : $[E]_{\text{totale}}$ ($[E]_t$) variable et faible et $[S]$ constante et saturante ($[S] \gg K_M$, en pratique $[S] > 10 K_M$)

$$v_i = f(\text{température})$$



Deux phénomènes opposés :

- 1) augmentation de la vitesse** (agitation moléculaire qui favorise la rencontre entre les molécules d'enzymes et les molécules de substrats)
- 2) désactivation progressive de l'enzyme** (dénaturation thermique de l'enzyme)

Obtention d'une **courbe asymétrique**

Enzymologie

Introduction : Définitions

1. La cinétique enzymatique et le modèle de Michaelis Menten
2. Détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne
3. Dosages enzymatiques
4. L'inhibition enzymatique

Inhibiteurs chimiques à action réversible = inhibiteurs réversibles

On considèrera uniquement que les **inhibiteurs réversibles** qui peuvent donc avoir un impact sur la cinétique enzymatique

Ces inhibiteurs doivent conduire à une **inhibition spécifique** de l'enzyme car ils sont capables **d'interagir spécifiquement** avec elle.

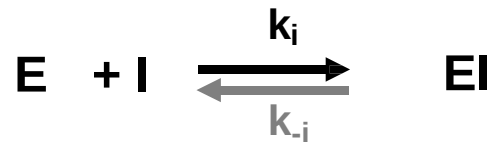
Ils sont généralement de **petites tailles** par rapport à la molécule d'enzyme (ce sont des ions ou des petites molécules).

Ils interagissent par des **liaisons non covalentes**

Détermination de la constante d'inhibition

En se basant sur les équations pour déterminer le K_M on peut déterminer que :

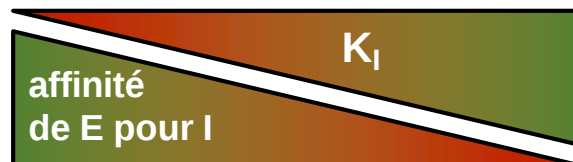
Equation de base de l'inhibition enzymatique



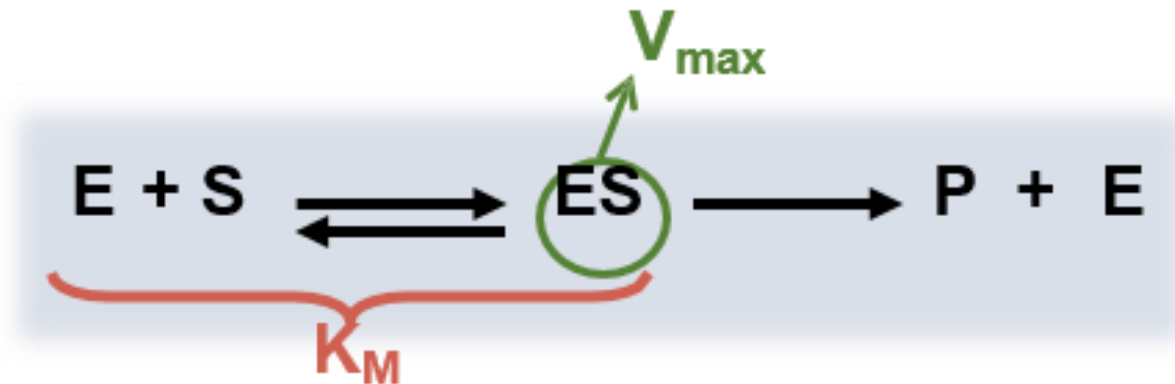
$$K_{\text{inhibition}} \quad K_i = \frac{[E][I]}{EI} = \frac{k_{-i}}{k_i} = \frac{1}{K_{\text{association EI}}} = \frac{1}{K_{\text{affinité EI}}}$$

FAIBLE valeur de K_i
valeur ELEVEE de K_i

FORTE AFFINITE
FAIBLE AFFINITE



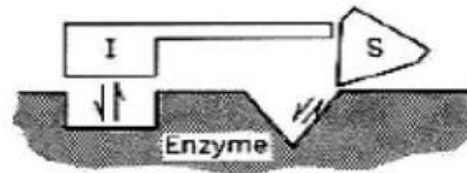
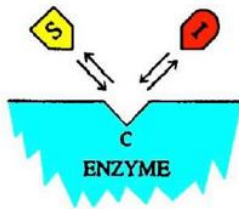
Paramètres caractérisant l'action des inhibiteurs



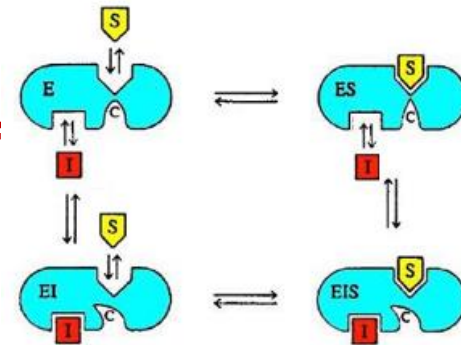
- K_M dépend de l'équilibre association/dissociation de ES :
→ tout inhibiteur qui modifie cet équilibre modifie la K_M
- V_{max} dépend de la concentration stationnaire maximale de ES :
→ tout inhibiteur qui modifie cette concentration modifie la V_{max}

Les 3 types d'inhibiteurs

- 1. Les inhibiteurs compétitifs** : compétition pour le site actif - EI

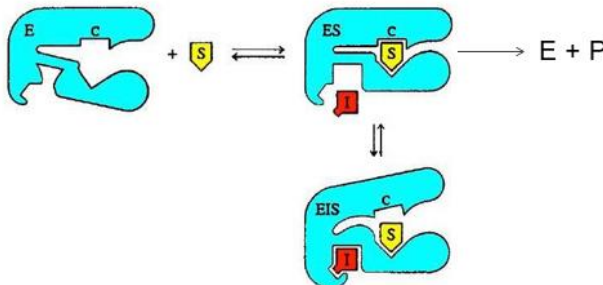


- 2. Les inhibiteurs non compétitif**
EIS et EI bloquent la réaction

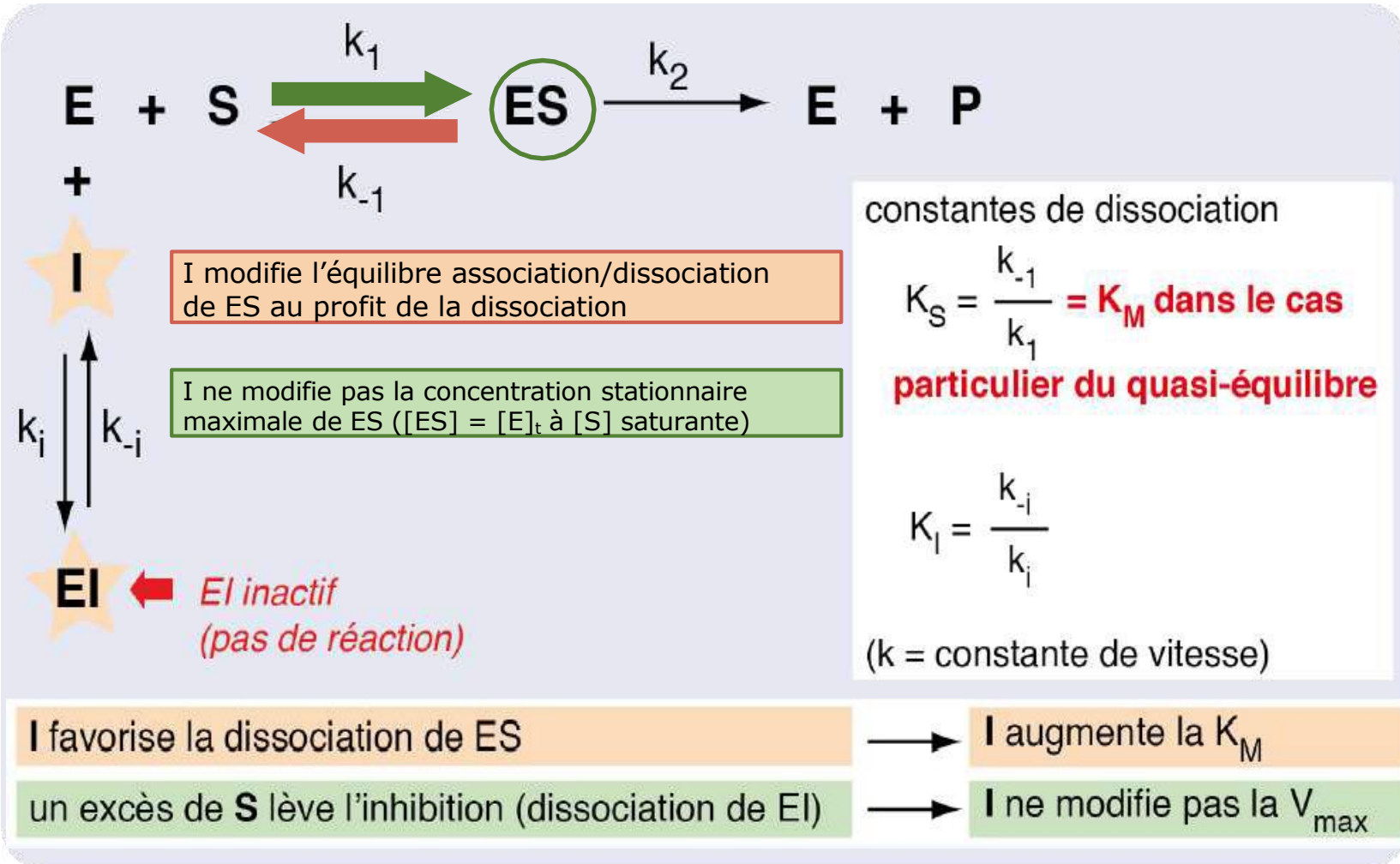


- 3. Les inhibiteurs incompétitifs** :

Blocage du mécanisme catalytique dans un complexe ESI



L'inhibition compétitive



L'inhibition compétitive

EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN

en l'absence d'inhibiteur

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

en présence d'inhibiteur compétitif

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + [S]}$$

$K_{M_{app}}$ (K_M apparente) ou K_M

Inhibiteur compétitif :

- ne modifie pas $V_{\max}$
- augmente K_M d'un facteur α ($\alpha > 1$) :

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

donc $K_{M_{app}} (K'_M) = \alpha K_M = K_M \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$

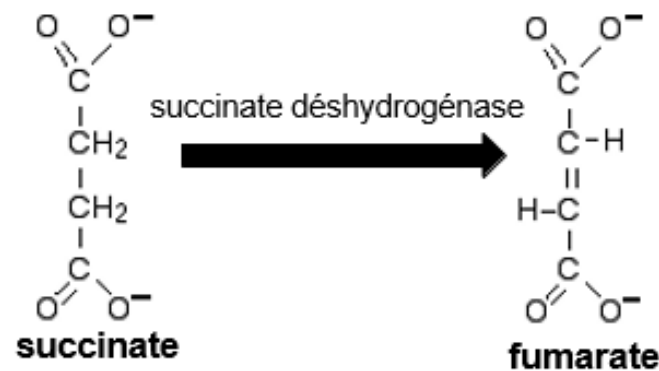
$$v_i = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M \times \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right] + [S]}$$

→ Si $[I]$ augmente, αK_M augmente, l'affinité pour S diminue, l'affinité pour $[ES]$ diminue mais $V_{\max}$ reste inchangée donc k_{cat} reste constante

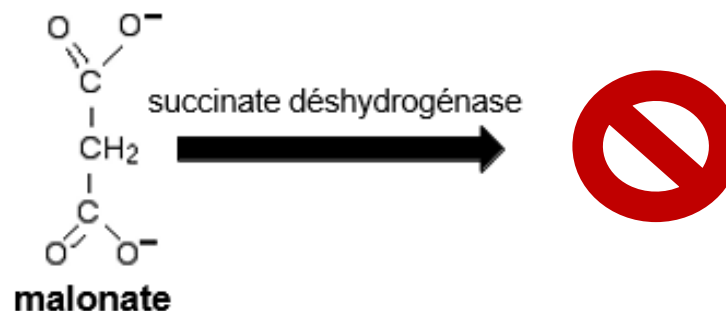
→ Si $[S]$ augmente, l'effet de l'inhibiteur disparaît

L'inhibition compétitive

Exemple de l'inhibition de la succinate déshydrogénase par le malonate

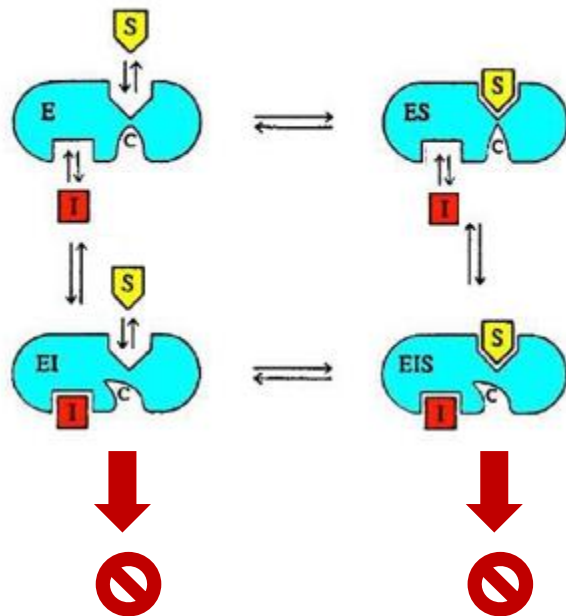


Le malonate est une analogue structural



Remarque : L'inhibition par le produit a lieu quand le produit d'une réaction occupe le site actif d'une enzyme, empêchant ainsi la fixation de nouvelles molécules de substrat. C'est une des raisons pour lesquelles les mesures d'activité enzymatique sont faites en début de réaction, avant une accumulation significative de produit.

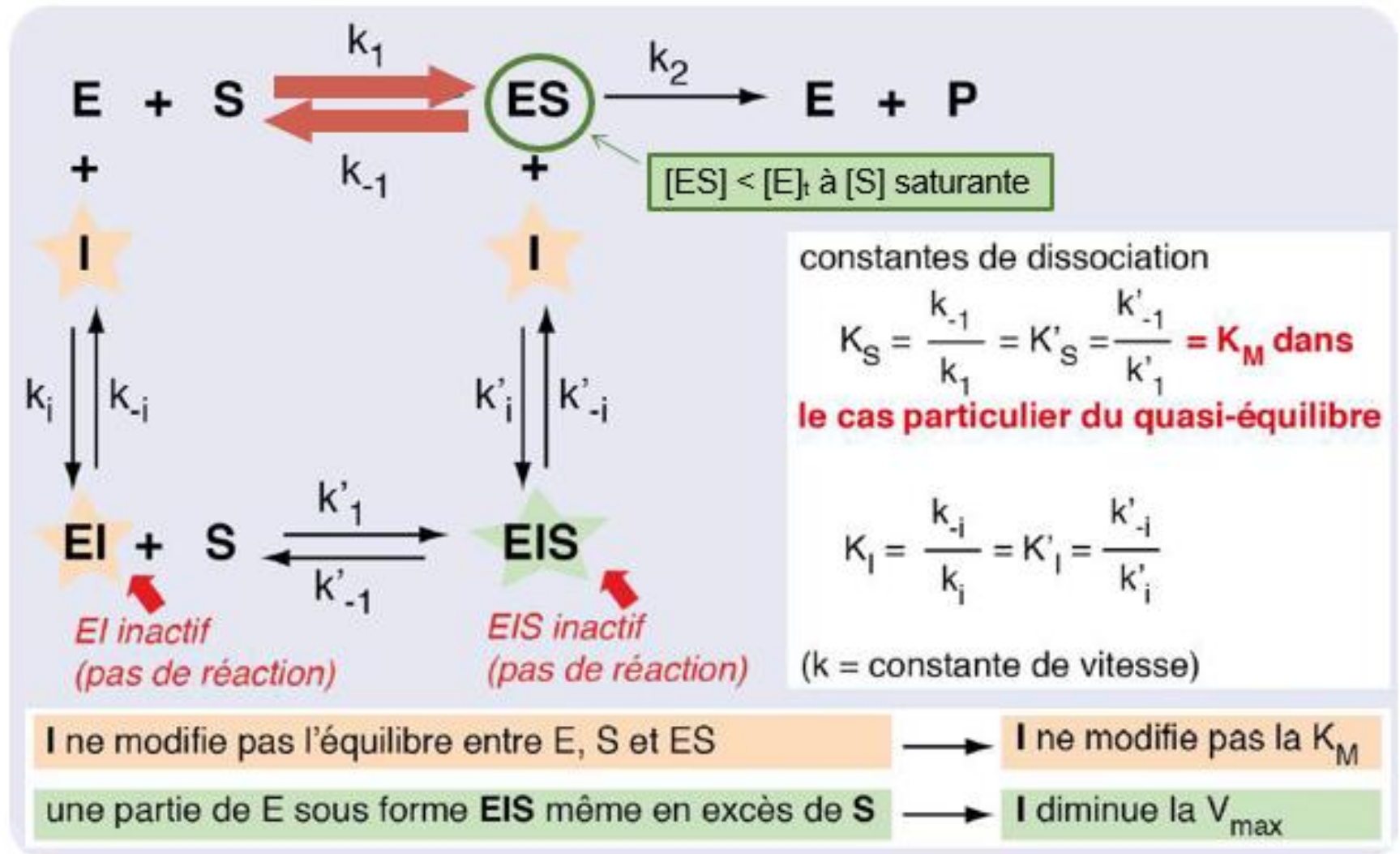
L'inhibition non compétitive



- Un inhibiteur non compétitif présente une **structure différente de celle du substrat** → pas de compétition avec le site de fixation du substrat
- **L'affinité n'est pas affectée** car le site de l'inhibiteur est différent du site du substrat.
- **L'inhibiteur peut se fixer à la fois sur l'enzyme et sur le complexe ES.**

- **Modification de la conformation du site catalytique (c)** mais pas de celle du site de fixation du substrat
- Inhibition non compétitive **pure** : **E et ES ont la même affinité pour I**

L'inhibition non compétitive



L'inhibition non compétitive

EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN

en l'absence d'inhibiteur

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

en présence d'inhibiteur non compétitif pur

$$v_i = \frac{V_{\max}}{\alpha} \frac{[S]}{(K_M + [S])}$$

$V_{\max}^{\text{app}}$ ($V_{\max}$ apparente) ou $V_{\max}$

Inhibiteur non compétitif :

- ne modifie pas K_M
- diminue $V_{\max}$ d'un facteur α ($\alpha > 1$) :

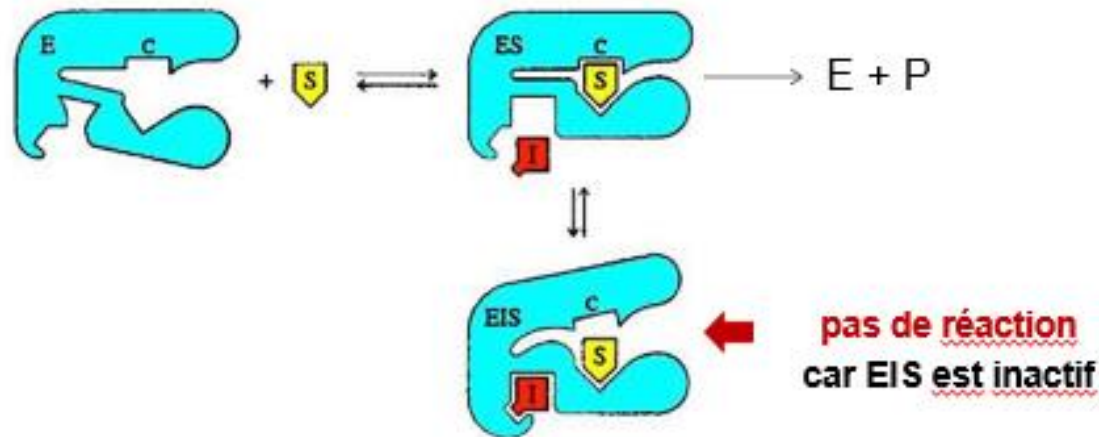
$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$\text{donc } V_{\max}^{\text{app}} (V'_{\max}) = \frac{V_{\max}}{\alpha} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

$$v_i = \frac{V_{\max} \times [S]}{\left[1 + \frac{[I]}{K_I}\right] \times K_M + [S]}$$

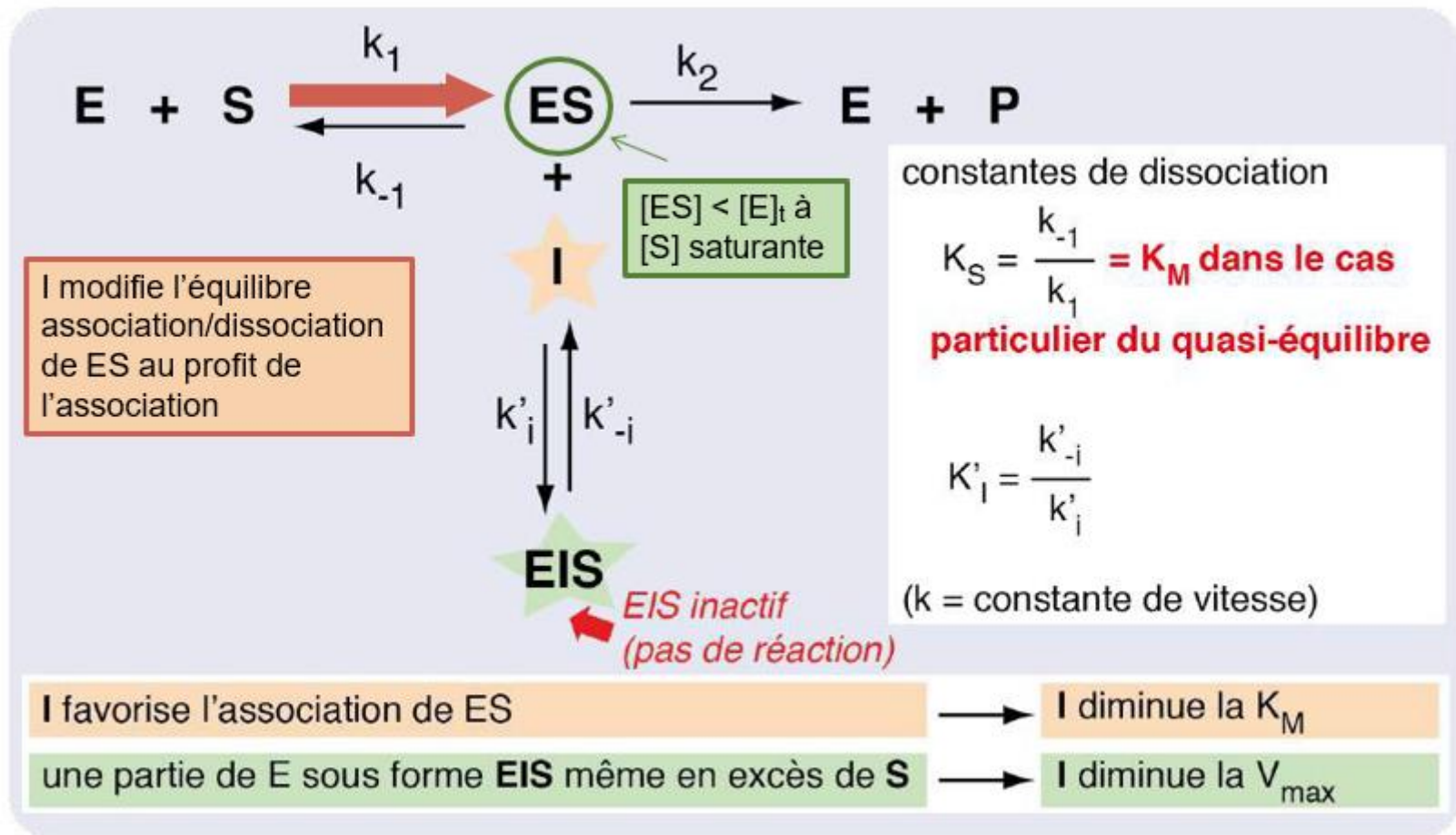
- Si $[I]$ augmente, $V_{\max}$ diminue, l'affinité pour S et pour $[ES]$ reste inchangée donc K_M reste constante
- Si $[S]$ augmente, l'effet de l'inhibiteur ne disparaît pas.

L'inhibition incompétitive



- L'inhibiteur **ne se fixe que sur le complexe ES** et forme un complexe inactif EIS
- L'inhibiteur **se fixe sur un site différent du substrat**

L'inhibition incompétitive



L'inhibition incompétitive

EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN

en l'absence d'inhibiteur

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

en présence d'inhibiteur incompétitif

$$v_i = \frac{V_{\max}}{\alpha'} \frac{[S]}{(K_M/\alpha' + [S])}$$

$V_{\max}^{\text{app}}$ ($V_{\max}$ apparente) ou $V'_{\max}$ K_M^{app} (K_M apparente) ou K'_M

Inhibiteur incompétitif :

- diminue K_M d'un facteur α' ($\alpha' > 1$)
- diminue $V_{\max}$ d'un facteur α' ($\alpha' > 1$)

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}$$

donc $K_M^{\text{app}} (K'_M) = \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K'_I}}$ et $V_{\max}^{\text{app}} (V'_{\max}) = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K'_I}}$

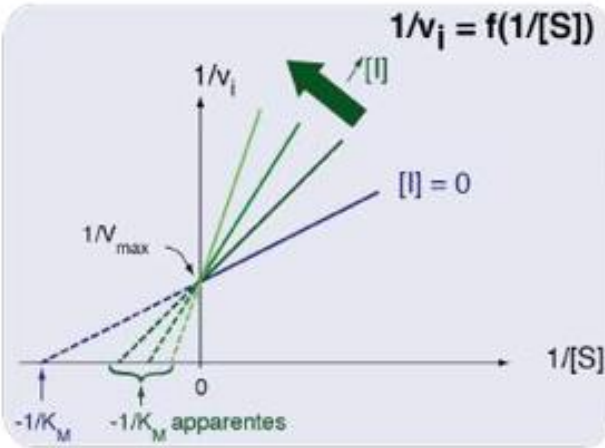
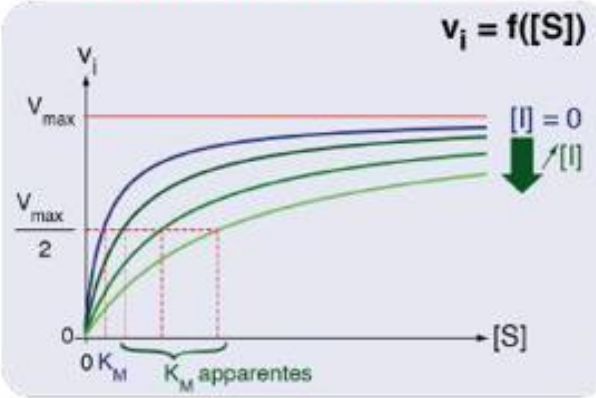
$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{\left[1 + \frac{[I]}{K'_I}\right] \times K_M \left[1 + \frac{[I]}{K'_I}\right] + [S]}$$

K_M et $V_{\max}$ sont changés d'un même facteur

Récapitulatif et conséquence sur les représentations graphiques

Inhibition compétitive

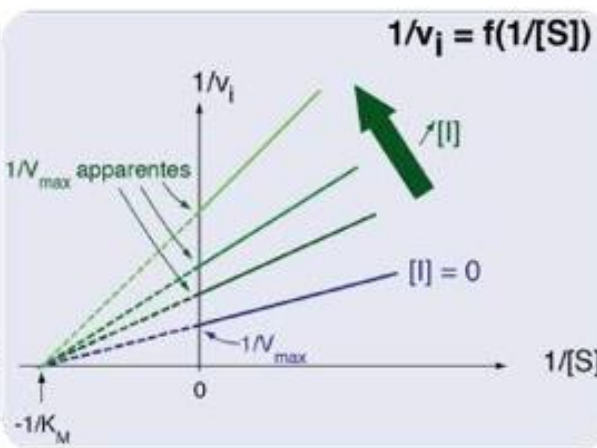
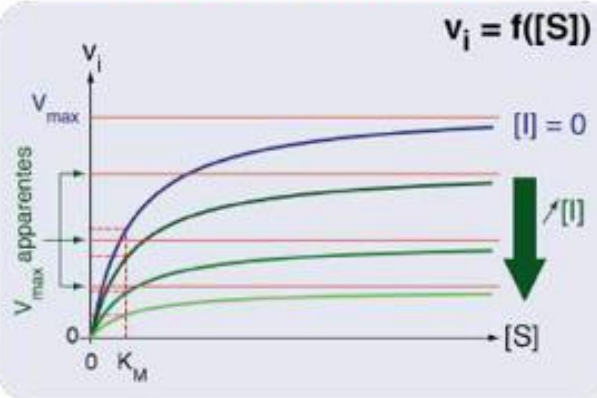
V_{max} inchangée, $K_M \uparrow$



Effet annulé si $S \nearrow$

Inhibition non compétitive

$V_{max} \downarrow$, K_M inchangée



Pas d'effet de la variation de $[S]$

Inhibition incompétitive

$V_{max} \downarrow$, $K_M \downarrow$

