

Cours **ENZYMOLOGIE**  
pour Etudiants de Licence de Biochimie  
Département de Biologie Physico-Chimique,  
Faculté des sciences de la Nature et de la vie SNV,  
Université de Bejaia

## Cinétique d’Inhibition enzymatique

Pr. KHETTAL Bachra

Laboratoire de Biotechnologie Végétale et Ethnobotanique

Université de Bejaia

Email: [bachea.khettal@univ-bejaia.dz](mailto:bachea.khettal@univ-bejaia.dz)

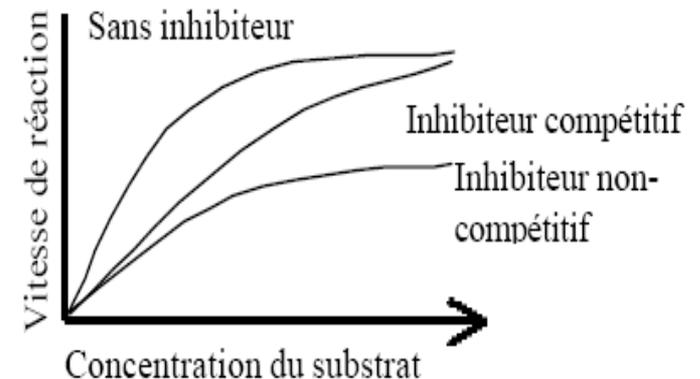




- L'activité catalytique d'un enzyme peut être modifiée par diverses molécules spécifiques et des ions désignés du terme générale d'effecteurs..
  - ❑ inhibition irréversible ou **inactivation**, le ligand se lie à l'enzyme de manière covalente ou si étroitement que le complexe EI ne se dissocie pas ou que la dissociation de l'enzyme est très lente.
  - ❑ inhibition réversible est caractérisée par l'établissement d'un équilibre rapide par suite de la formation d'un complexe enzyme inhibiteur dissociable.
  - ❑ L'inhibiteur, un ligand, non transformé par l'enzyme, se lie réversiblement à l'enzyme et son comportement cinétique

De nombreux types d'inhibitions ont été décrits :

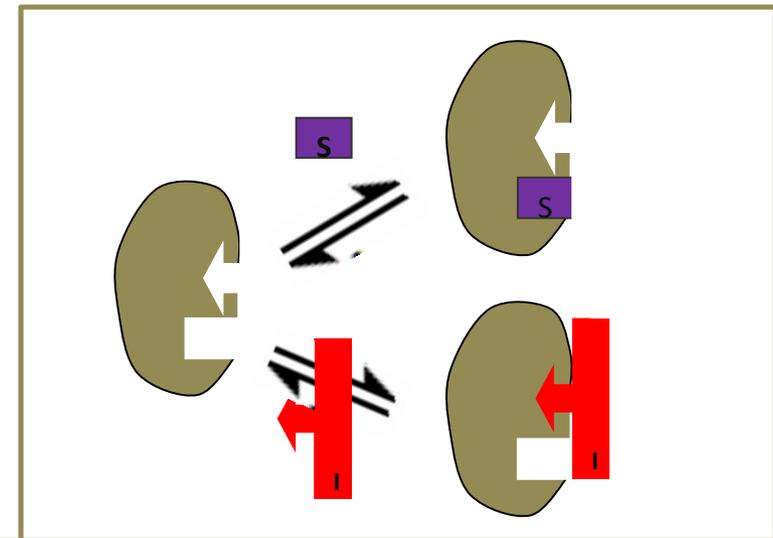
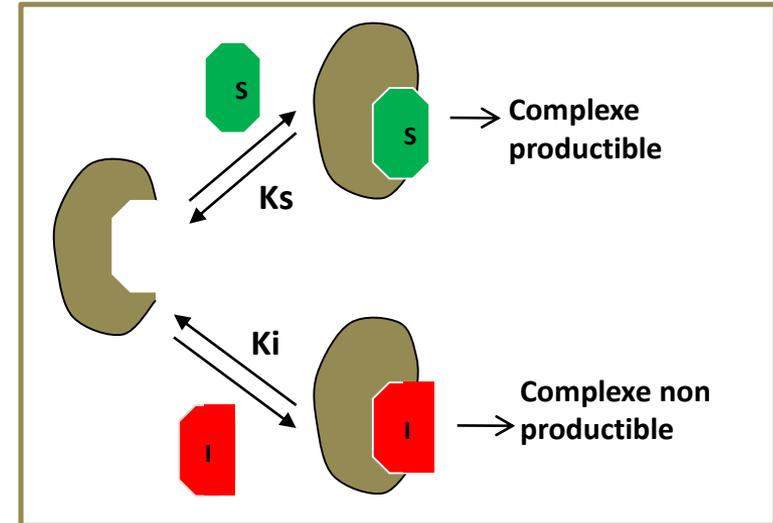
inhibition compétitive, inhibition non compétitive, inhibition incompétitive.





## 2. Modes d'action a-inhibition compétitive

- ✓ Compétition entre un inhibiteur et le substrat pour le site actif
- ✓ L'inhibiteur compétitif ressemble structuralement au substrat
- ✓ La liaison de l'inhibiteur sur le site actif de l'enzyme, empêchant la formation du complexe enzyme-substrat.
- ✓ Le S et l'IC ne peuvent se retrouver ensemble sur la même molécule d'enzyme que si cette molécule enzymatique est oligomérique.



### *A noter.*

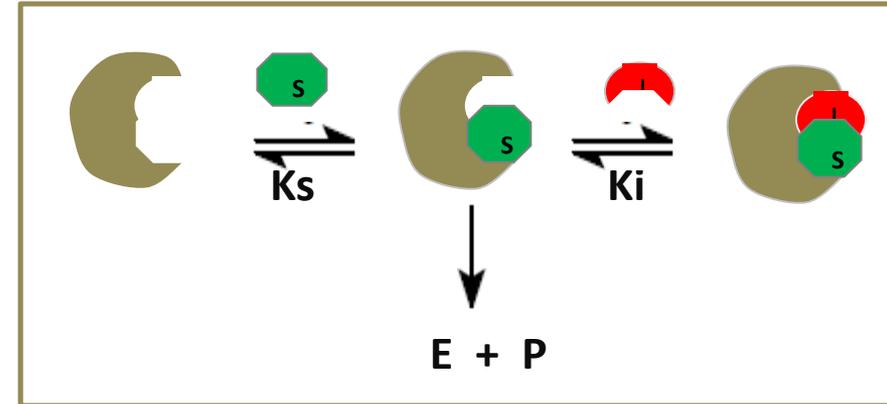
- ✓ que des molécules n'ayant aucune analogie structurale avec le substrat, peuvent agir cinétiquement comme inhibiteurs compétitifs. Dans ce cas, l'inhibiteur est volumineux, les sites sont proches et la fixation de l'inhibiteur sur son site empêche, par encombrement stérique l'accès du substrat vers son site.



## 2. Modes d'action Inhibitions incompétitive/ non compétitive

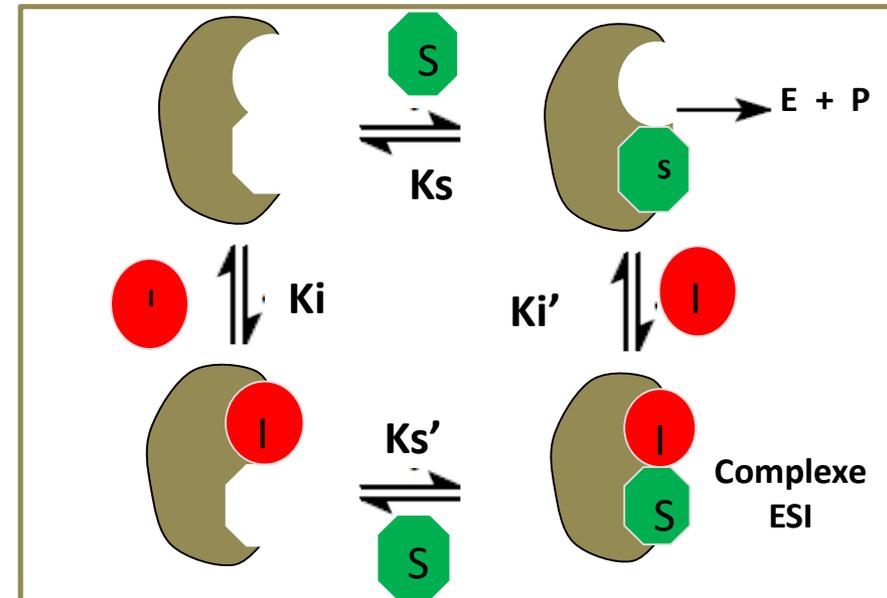
### *Inhibition incompétitive*

- Fixation d'un inhibiteur à l'enzyme complexé au substrat, mais pas à l'enzyme libre.
- Ce type d'inhibition commune pour les enzymes de plus d'un substrat où la liaison d'un inhibiteur dans le site de liaison d'un substrat donne lieu à l'inhibition incompétitive par rapport à l'autre substrat.



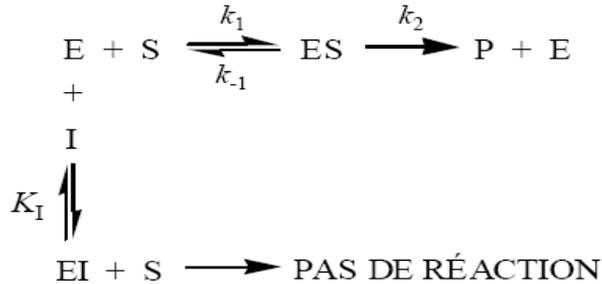
### *Inhibition non compétitive Mixte*

- Fixation d'un inhibiteur sur un autre site que le site actif de l'enzyme, provoquant une modification de la conformation de ce site actif.
- la fixation de l'inhibiteur à l'enzyme n'entraîne pas l'empêchement d'accès du substrat au site enzymatique mais provoque une altération des propriétés cinétiques de cette enzyme.





**Le schéma réactionnel:**



**Loi d'action de masse pour les équilibres:**

$$[E] = \frac{K_M [ES]}{[S]} \quad (1) \quad \text{et} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (2)$$

$$(1) \quad \text{et} \quad (2) \quad \longrightarrow \quad [EI] = \frac{[E][I]}{K_I} = \frac{K_M [ES][I]}{[S]K_I} \quad (3)$$

**Loi de conservation de masse de l'enzyme:**

$$[E]_T = [E] + [EI] + [ES] \quad (4)$$

$$(1), (3) \quad \text{et} \quad (4) \quad \longrightarrow \quad [E]_T = [ES] \left\{ \frac{K_M}{[S]} \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + 1 \right\} \quad (5)$$

## 3. Analyse cinétique a-inhibition compétitive

(5)



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



$$v_0 = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_T [S]}{K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}$$



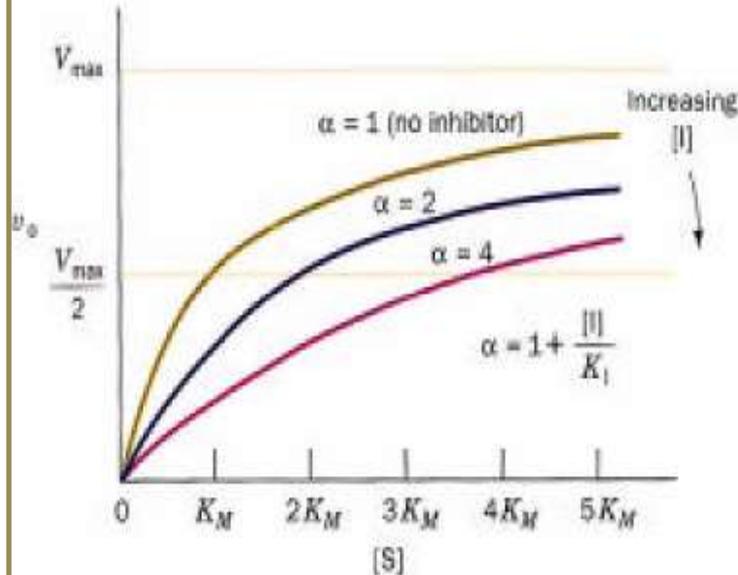
$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + [S]}$$

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

# VI-1. Cinétique d'inhibition réversible

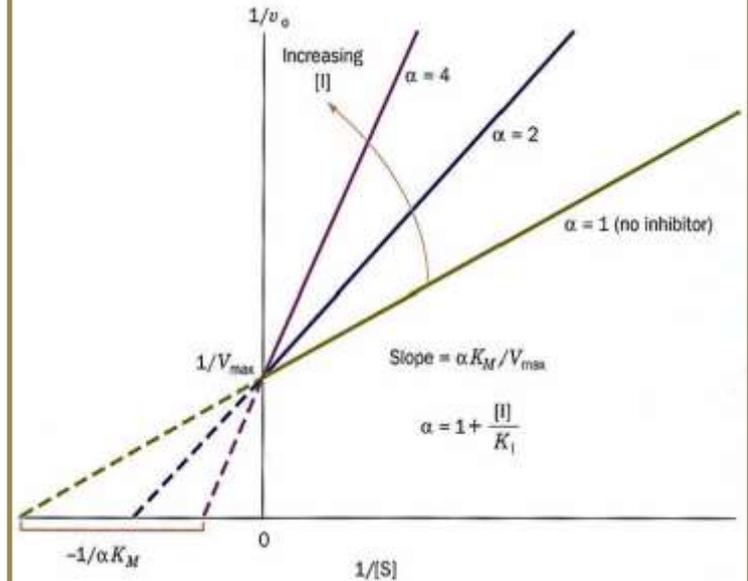
Représentation de  $v=fct [S]$

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + [S]}$$



Représentation de  $1/v=fct 1/[S]$

$$\frac{1}{v_0} = \left( \frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

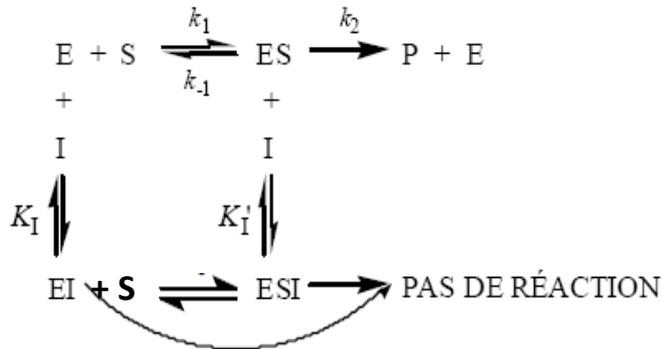






## 3. Analyse cinétique b-inhibition noncompétitive: Mixte

### Schéma réactionnel



$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]} \Rightarrow v_0 = \frac{V_{\max} / \alpha' [S]}{\frac{\alpha}{\alpha'} K_M + S}$$

Loi d'action de masse pour les équilibres:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{et} \quad K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \text{et} \quad K_S' = \frac{[EI][S]}{[ESI]}$$

Loi de conservation de masse de l'enzyme:

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

⇓

$$\frac{1}{v_0} = \left( \frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$



## Représentations de Lineweaver-Burk

$$1/v = fct 1/[S]$$

**Inhibition non compétitive pure  
(absolue)  
( $\alpha = \alpha'$ )**

**Inhibition non compétitive  
mixte  
( $\alpha \neq \alpha'$ )**

$$K_i = K_i' \Rightarrow K_s = K_s'$$

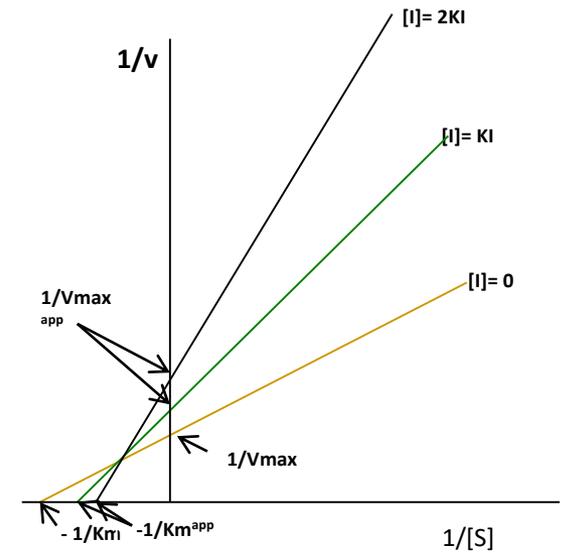
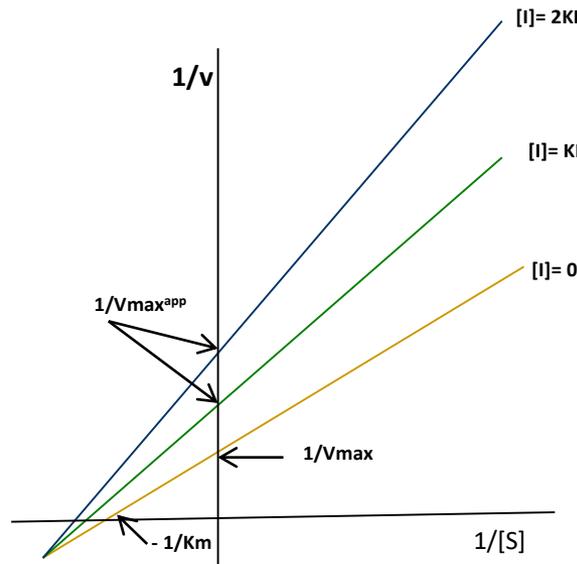
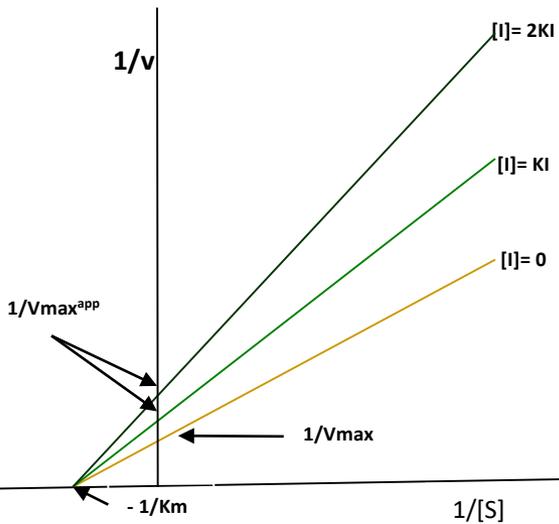
$$k_{m_{app}} = K_m$$

$$K_i < K_i' \Rightarrow K_s > K_s'$$

$$k_{m_{app}} > K_m$$

$$K_i > K_i' \Rightarrow K_s < K_s'$$

$$k_{m_{app}} < K_m$$





des inhibiteurs sur les paramètres de l'équation de Michaelis-Menten\*

	Type d'inhibition	$K_{Mapp}$	$Kcat_{app}$	$kcat_{app}/K_{m_{app}}$
$K_I fini, K_I' = \infty$	Compétitive	$\alpha K_M$	$kcat$	$kcat / \alpha K_M$
$K_I > K_I'$ ou $K_I < K_I'$	non compétitive mixte	$\alpha K_M / \alpha'$	$Kcat / \alpha'$	$kcat / \alpha K_M$
$K_I = K_I'$	Non compétitive simple	$K_M$	$kcat / \alpha$	$kcat / \alpha K_M$
$K_I = \infty, K_I' fini$	Incompétitive	$K_M / \alpha'$	$Kcat / \alpha'$	$kcat / K_M$

\*  $\alpha = 1 + [I]/K_I$  et  $\alpha' = 1 + [I]/K_I'$



## 4. Notion de l'IC50

La valeur de l'IC50 est la concentration de l'inhibiteur nécessaire pour diminuer de 50% de la valeur maximale de la vitesse la réaction non inhibée

L'IC50 est utilisée comme indice d'efficacité d'un inhibiteur par rapport à d'autres.

*Relation entre l'IC50 et la concentration du substrat*

Type d'inhibition	Expression de IC50	Obs.
Inhibition Compétitive	$IC50 = \frac{K_i}{K_m} [S] + K_i$	IC50 $\longrightarrow$ K <sub>i</sub> pour [S] faible
Inhibition In compétitive	$IC50 = \frac{K_i K_m}{[S]} + K_i$	IC50 $\longrightarrow$ K <sub>i</sub> pour [S] élevée
Inhibition Non compétitive pure	$IC50 = K_i$	

## 5. Cas particulier d'inhibition réversible

Inhibition par excès de substrat

Cas 1

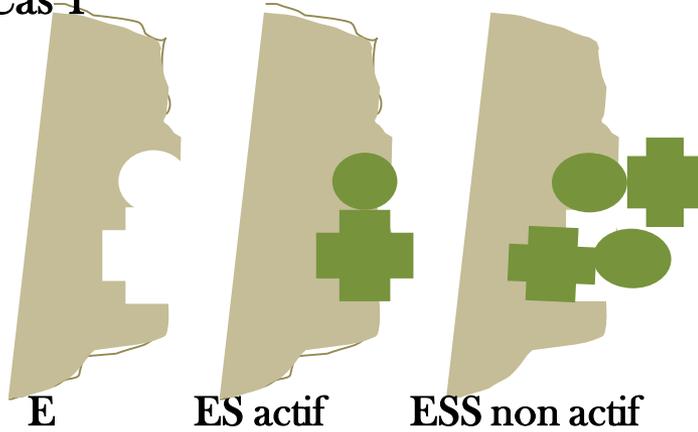
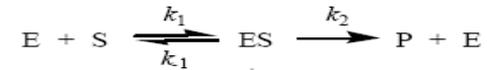


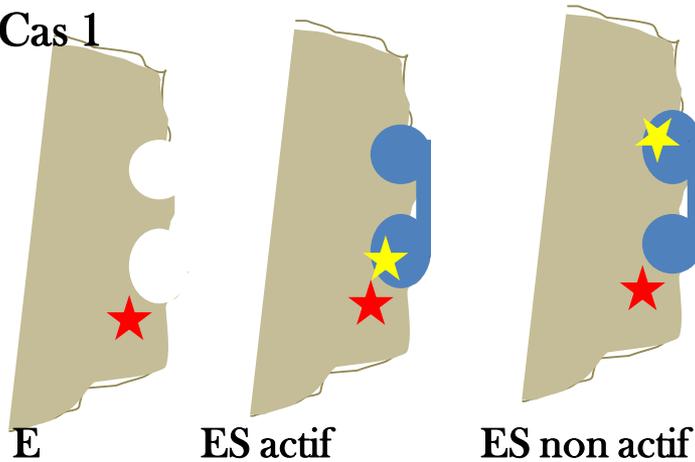
Schéma de la réaction:



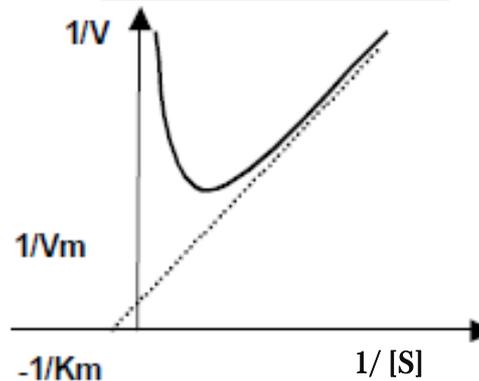
Equations de vitesse:

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i}} \Rightarrow \frac{1}{v_i} = \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i} \right)$$

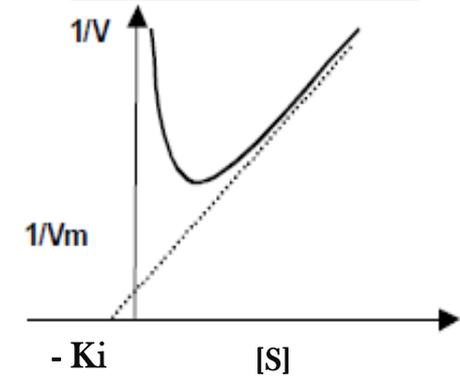
Cas 1



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



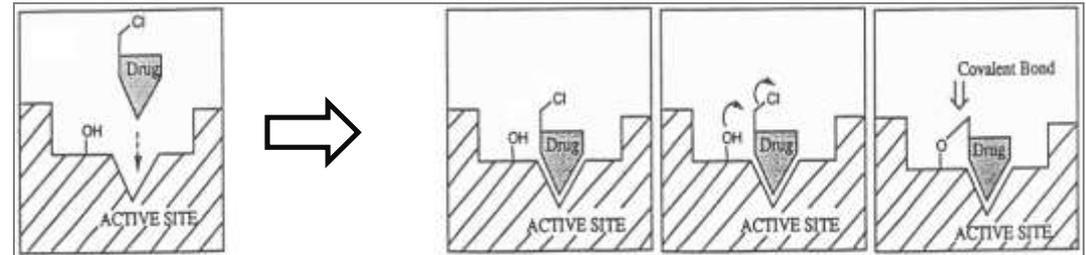
$$\frac{1}{v_i} = \frac{[S]}{K_i} + \frac{1}{V_{\max}}$$



- ❖ Les inhibiteurs irréversibles se lient à l'enzyme par liaison covalente
- ❖ Ils contiennent généralement des groupement fonctionnels réactifs à propriété électrophile (fonctions amines, sulfidryl, aldehydes, Phenyl sulfonates, Fluorophosphoryl, .....)
- ❖ Ils forment des liaisons covalentes avec les groupements fonctionnels à caractère nucléophile des chaines latérales des acides aminés principalement les groupements hydroxyl or sulfhydryl (serine , cysteine, threonine or tyrosine).
- ❖ Leurs efficacités sont évaluées par la constante de vitesse d'inactivation  $k_{\text{inact}}$  et la constante d'inhibition  $K_i$
- ❖ Ils sont de Deux types :
  - Réactifs du site actif (marquage par affinité)
  - Inhibiteurs mécanistiques (substrats suicides)

## Réactifs du site actif (Marqueurs par affinité)

### 1. Mode d'action



### 2. Schéma de la réaction



### 3. Caractéristiques

1. Modification covalente de l'enzyme; l'enzyme demeure inactive après la séparation de l'excès de l'inhibiteur; l'inhibiteur reste lié à la protéine après dialyse ou filtration sur gel (ou sur membrane) même après la dénaturation de l'enzyme.

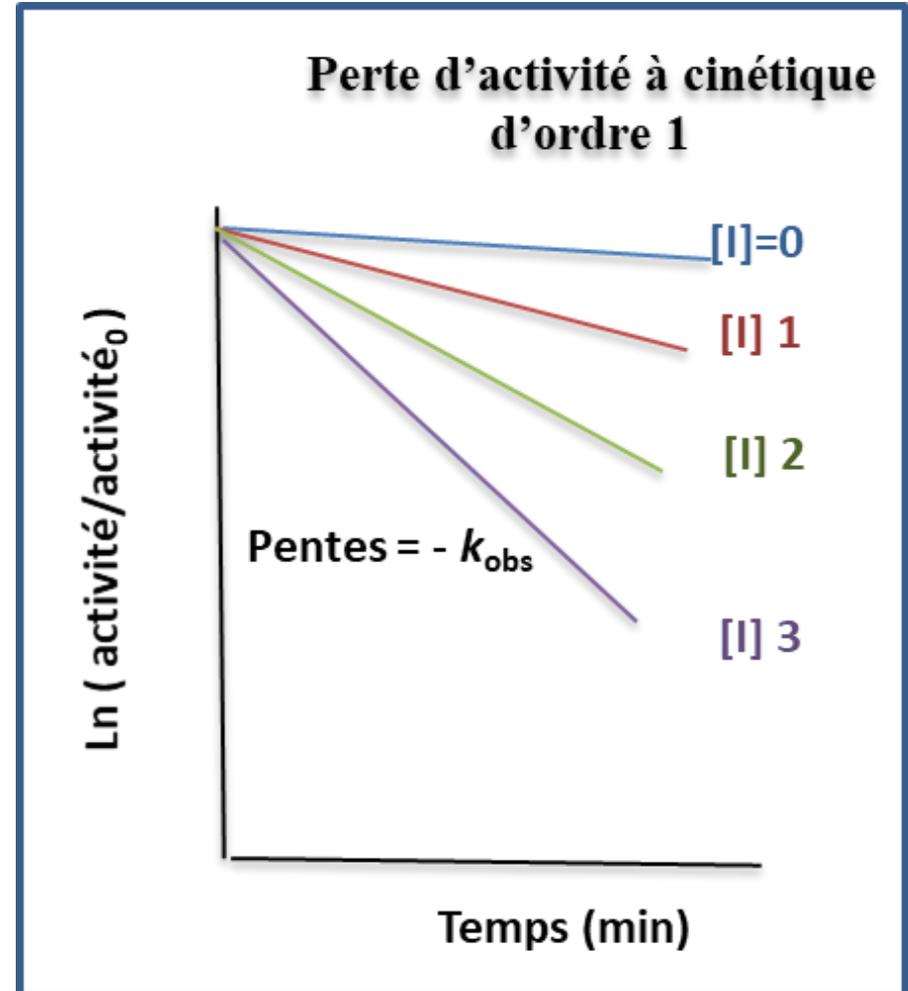
2. Spécificité envers un groupement fonctionnel des acides aminés du site actif. Ils comprennent aussi un groupement réactif (pharmacophore), typiquement un électrophile

3. Peuvent être analogues de substrat pour favoriser sa liaison dans les site actif.

Type d'inhibiteur	Inhibiteur	Groupements spécifiques	Enzymes cibles
Pas homologie structurale avec le substrat	<a href="#">Diisopropylfluorophosphate</a> (DFP)	-OH (serine)	Protéases à serine
	iodoacétamide	-SH (cysteine)	Protéase à cysteine
Analogues structuraux du Substrat	TPCK (tosyl L-phenylalanine chloromethyl ketone )	Groupelement imidazol (His)	chymotrypsine

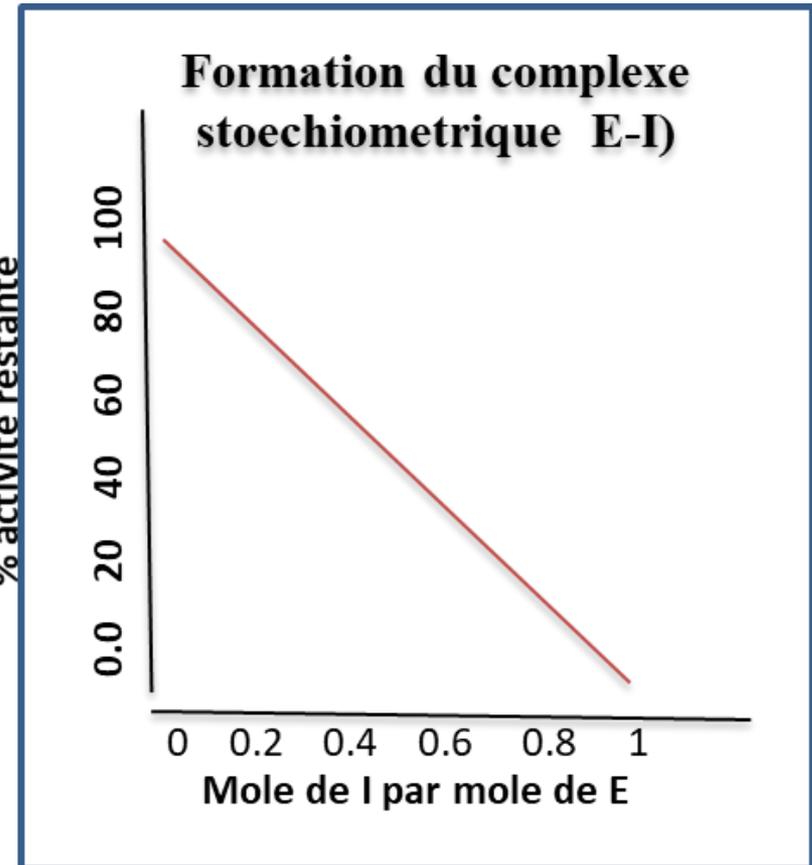
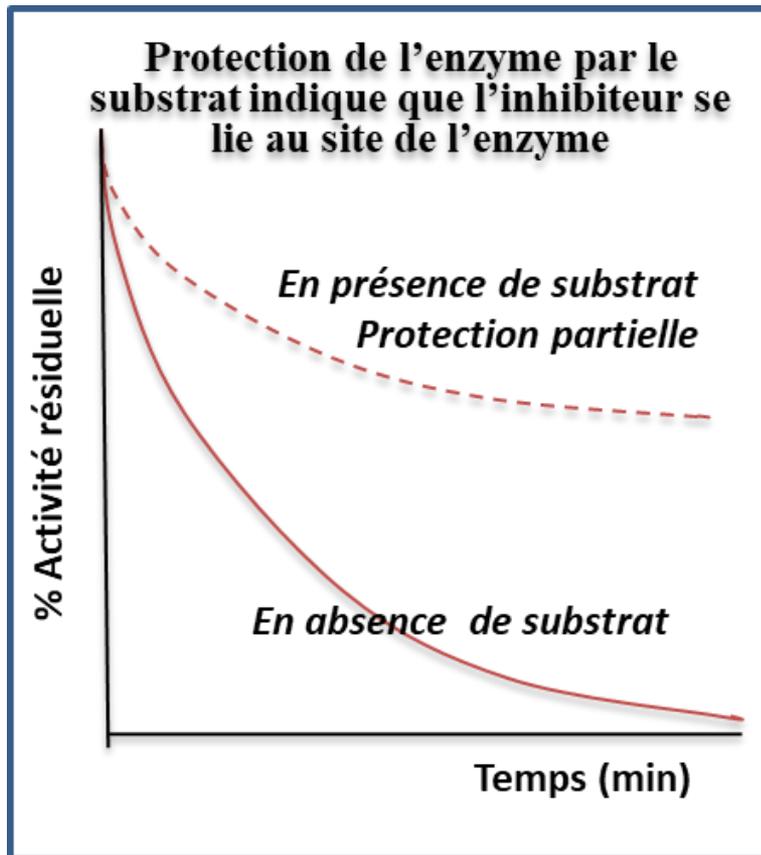


4. Cinétique de la perte d'activité de premier ordre. enzyme consommé comme réactif pendant la réaction



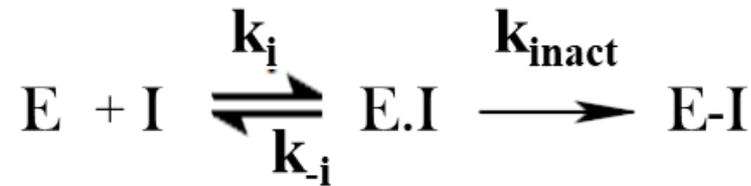


5. Un seul site saturable => action de manière stoechiométrique .
6. Protection de l'inhibition par le substrat ou le co-facteur





## 4. Analyse cinétiques



$$K_{obs} = \frac{k_{inact} [I]}{K_i + [I]} \quad \Rightarrow \quad \frac{1}{K_{obs}} = \frac{K_i}{k_{inact} [I]} + \frac{1}{k_{inact}}$$

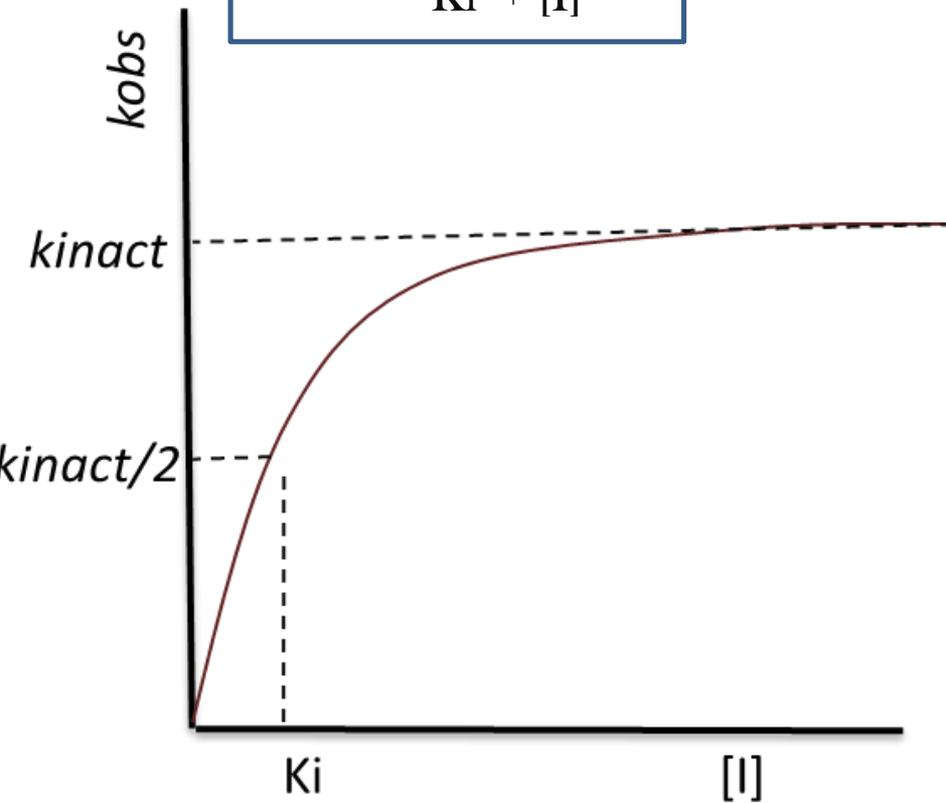
*k<sub>inact</sub>* est la constante de vitesse maximale d'inactivation (La totalité de l'enzyme est inactive)

**K<sub>i</sub>** est la concentration de l'inhibiteur qui donne une moitié de la vitesse maximale d'inactivation ( modifie 50% de l'enzyme)

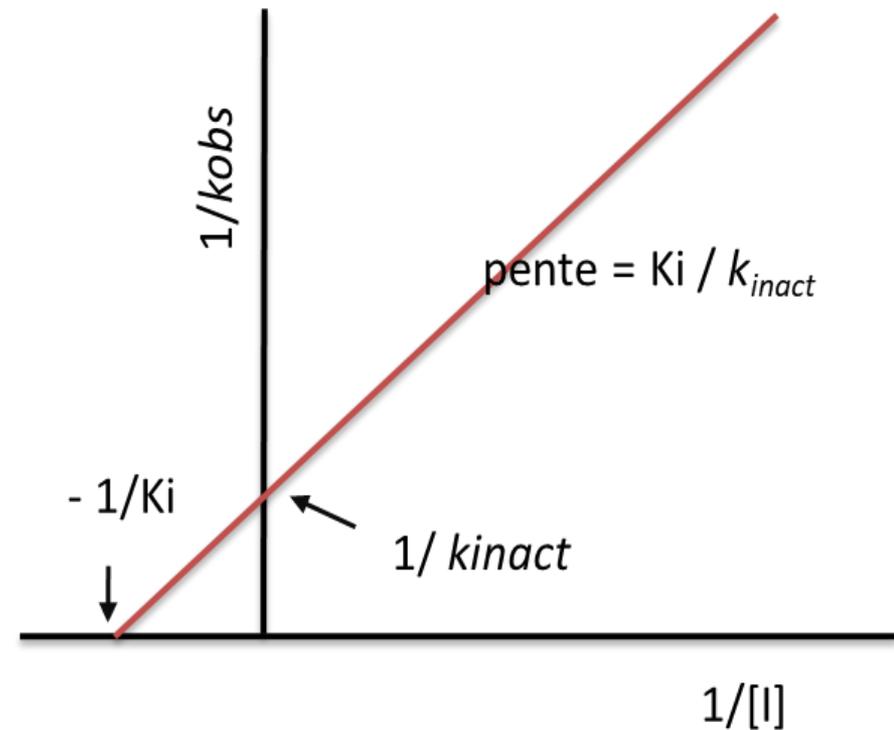


## 4. Analyse cinétiques

$$K_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}} [\text{I}]}{K_i + [\text{I}]}$$



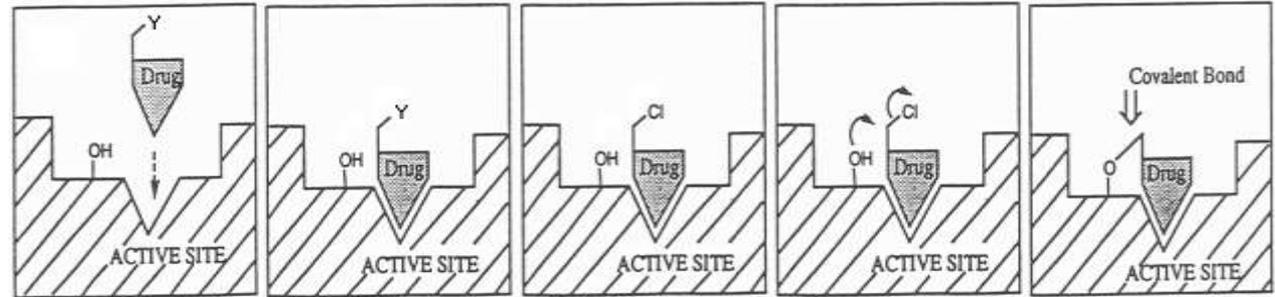
$$\frac{1}{K_{\text{obs}}} = \frac{K_i}{k_{\text{inact}} [\text{I}]} + \frac{1}{k_{\text{inact}}}$$





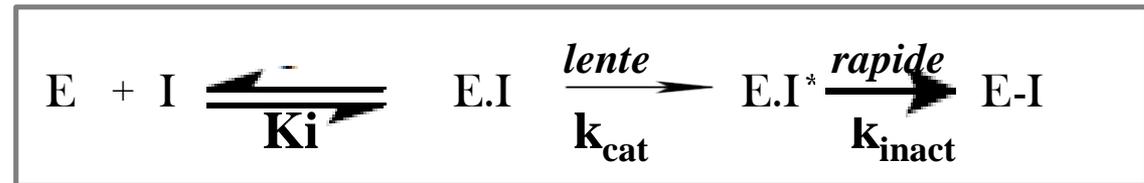
## Inhibition « suicide » ou mécanistique

### 1. Mode d'action



l'inhibiteur forme un complexe covalent stable avec l'enzyme . L'enzyme reconnaît l'inhibiteur comme substrat et entame le processus de catalyse; l'intermédiaire très réactif qui se forme inactive l'enzyme façon permanente par modification covalente.

### 2. Schéma de la réaction





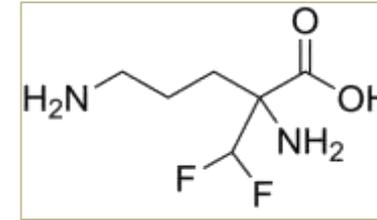
### Inhibition « suicide » ou mécanistique

#### 3. Quelques données

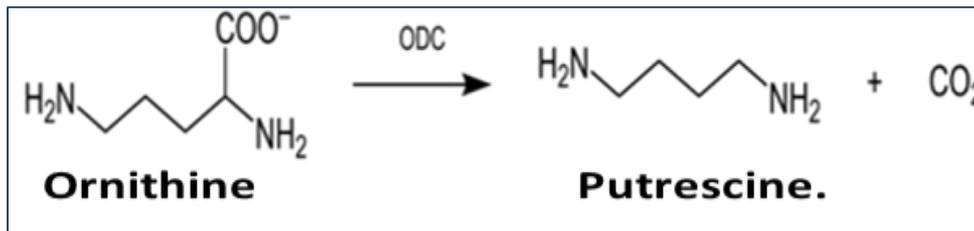
- La cinétique d'inactivation est de premier ordre que celles des réactifs du site actif (marqueurs par affinité).
- L'étape d'activation de l'inhibiteur est lente. La plupart ont des  $k_{cat}$  de cette étape sont de  $10^3$  à  $10^5$  fois plus faibles que pour substrat naturel.
- Les inhibiteurs suicides sont plus sélectifs que les marqueurs d'affinités.
- Des agents thérapeutiques de choix en raison de l'absence de leur réactivité chimique intrinsèque.



#### 4. Exemple : le DFMO ( Difluoromethylornithine)

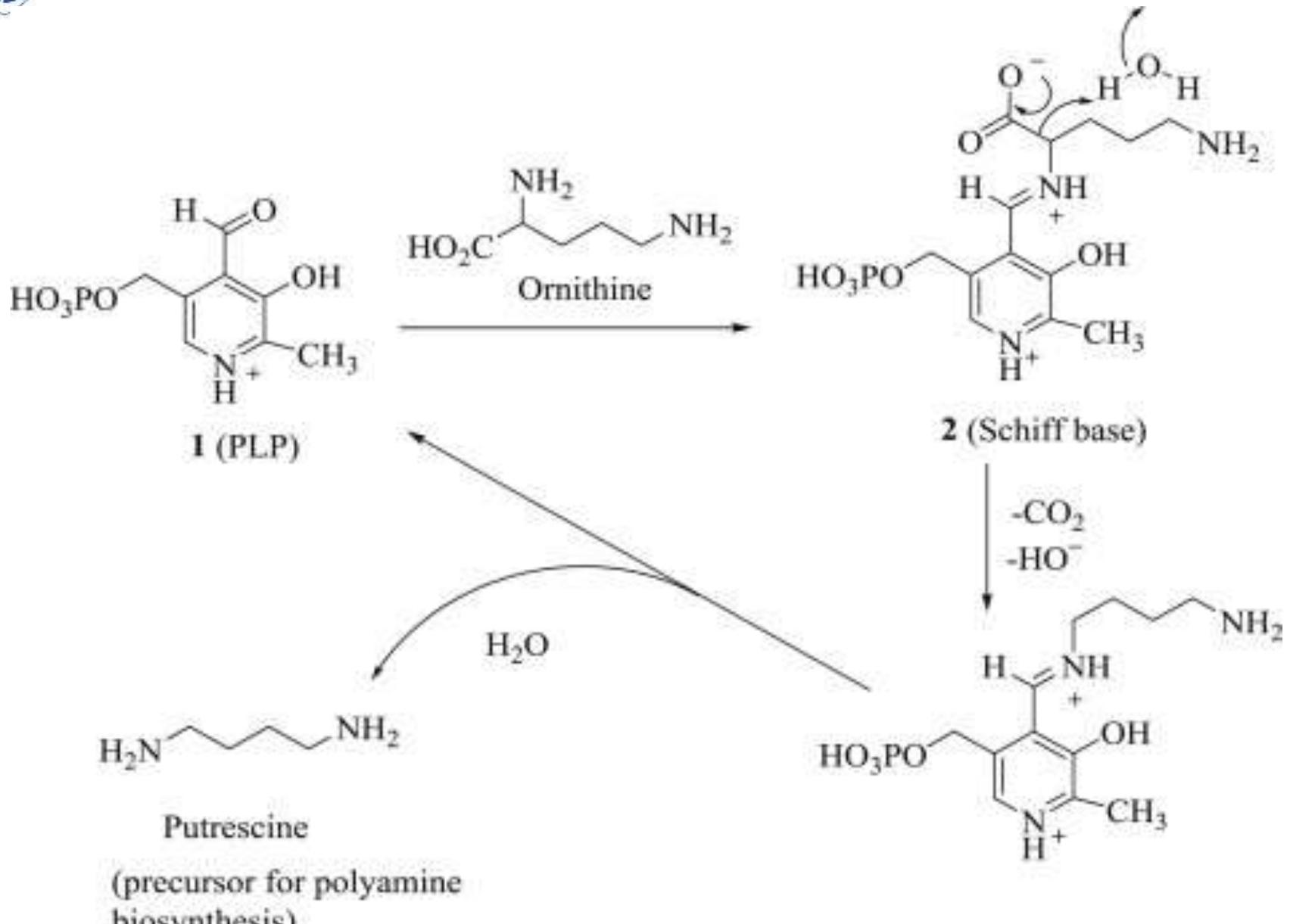


- ❖ Le DFMO est un inhibiteur suicide de l'ornithine décarboxylase (voie de synthèse des polyamine):

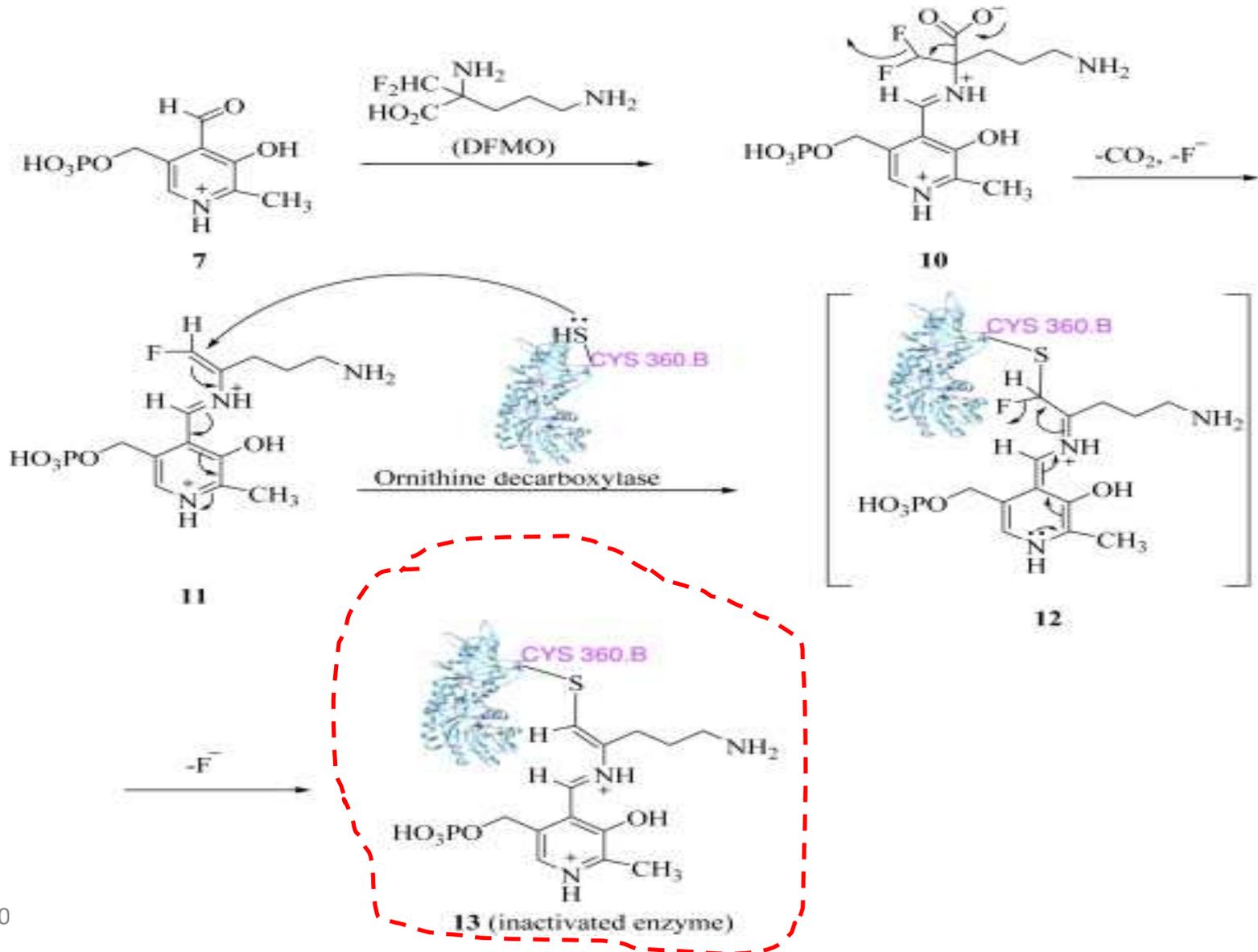


- ❖ Le temps de demi vie de l'ODC est très court  $\approx 10 - 20$  min
- ❖ le DFMO inactive l'enzyme avec un  $T_{1/2} \sim 3$  min (temps d'inactivation de 50% du taux d'activité enzymatique) et un  $K_i = 39 \mu\text{M}$ ,
- ❖ Le DFMO est un médicament utilisé comme **anticancéreux et antiparasitaire** pour la maladie du sommeil (action sur le trypanosoma)

## Mécanisme d'action de l'ornithine décarboxylase



## Mécanisme d'inactivation de l'ornithine décarboxylase par DFMO





## STRUCTURE DE L'ODC

