

Inhibiteurs d'enzymes

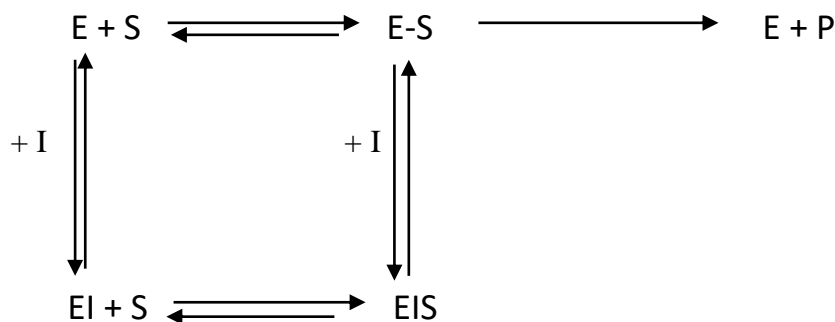
1. Introduction :

En plus de leurs substrats, des enzymes peuvent fixer des substances dont elles sont pourtant incapables de catalyser la conversion. Ces substances sont souvent des inhibiteurs. Donc un inhibiteur :

1. Réduit, affaiblit la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme sur un substrat ;
2. N'est pas transformé par l'enzyme.

Certaines inhibitions résultent de l'association réversible d'un inhibiteur à une enzyme. D'autres sont les conséquences de fixation irréversible de composés à l'enzyme.

Présentation générale :



2. Types d'inhibition réversible des réactions enzymatiques :

Les inhibiteurs sont classés selon leur site de fixation à l'enzyme et leur impact sur les constantes cinétiques. Ainsi, il existe quatre classes :

- Les inhibiteurs compétitifs.
- Les inhibiteurs non compétitifs.
- Les inhibiteurs incompétitifs (uncompétitifs).
- Les inhibiteurs mixtes.

2. 1. Inhibition compétitive :

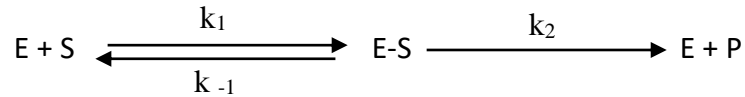
Un inhibiteur compétitif se fixe uniquement sur l'enzyme libre, au niveau du site de fixation du substrat (site catalytique), sa fixation et celle du substrat étant exclusive l'une de l'autre. Dans ce cas, l'inhibiteur entre en compétition avec le substrat pour le même site de liaison.

Les facteurs qui permettent à divers composés de fonctionner comme inhibiteurs compétitifs :

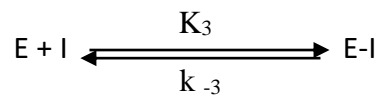
- ✓ L'inhibiteur présente une analogie avec le substrat par sa forme et la disposition de ses fonctions polaires dans l'espace ;
- ✓ L'inhibiteur présente un certain nombre de critères qui lui permettent de s'encaster dans le site actif en contractant une association de même type (liaison hydrogène, ponts ioniques, interactions hydrophobes,...) que celle du substrat ;

- ✓ L'inhibiteur montre une analogie avec le premier état de transition (un état de transition peut correspondre à un état fugitif, instable, qui peut être reproduit sous forme stable dans une autre molécule).

Deux réactions équilibrées se produisent en même temps :



$$[E][S] / [ES] = K_M \quad \text{d'où} \quad K_M [ES] = [E][S] \dots\dots\dots(1)$$



$$\text{D'après le 2}^{\text{e}} \text{ équilibre, on a :} \quad k_3 [E][I] = k_{-3} [EI]$$

$$\text{D'où :} \quad \boxed{[E][I] / [EI] = k_{-3} / k_3 = K_I} \quad \text{c'est la constante d'inhibition}$$

$$\text{On peut tirer :} \quad [EI] = [E][I] / K_I \dots\dots\dots(2)$$

Par conséquent, les équilibres peuvent être déplacés par un excès de substrat ou un excès d'inhibiteur. Donc, pour déplacer totalement l'inhibiteur de sa combinaison avec l'enzyme, il suffit d'ajouter un large excès de substrat.

On a, à tout instant, la concentration totale de l'enzyme :

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI] \quad (\text{relation de conservation de l'enzyme})$$

En remplaçant [EI] par sa valeur, on obtient :

$$[E_t] = [E] + [ES] + [E][I] / K_I$$

$$\text{Ce qui donne :} \quad [E_t] = [E] (1 + [I] / K_I) + [ES]$$

$$[E] = ([E_t] - [ES]) / (1 + [I] / K_I)$$

En remplaçant [E] par sa valeur dans l'équation (1) :

$$K_M [ES] = ([E_t] - [ES]) [S] / (1 + [I] / K_I)$$

$$K_M [ES] (1 + [I] / K_I) = [E_t] [S] - [ES] [S]$$

$$K_M [ES] (1 + [I] / K_I) + [ES] [S] = [E_t] [S]$$

$$[ES] (K_M (1 + [I]/K_i) + [S]) = [E_t] [S]$$

$$[ES] = [E_t] [S] / [K_M (1 + [I] / K_i) + [S]]..... (3)$$

En multipliant l'équation (3) par k_{cat} , on obtient :

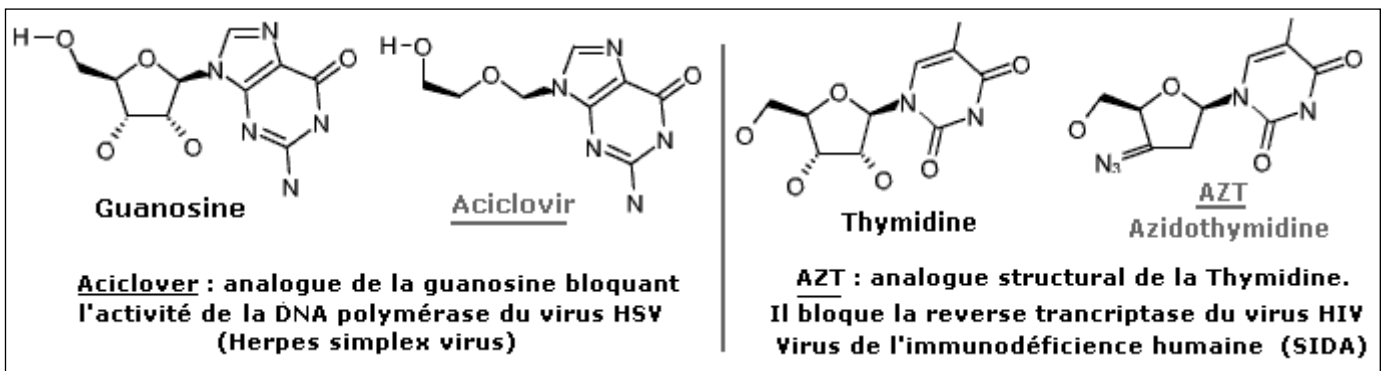
$$K_{cat} [ES] = k_{cat} [E_t] [S] / [K_M (1 + [I] / K_i) + [S]]$$

$$v = v_m [S] / [K_M (1 + [I] / K_i) + [S]]$$

On constate que la vitesse maximale ne change pas. Par contre, K_M augmente par un facteur égale à $(1 + [I] / K_i)$. Ce qui signifie qu'il faut plus de substrat pour obtenir $v_m / 2$.

Exemple d'inhibiteur compétitif :

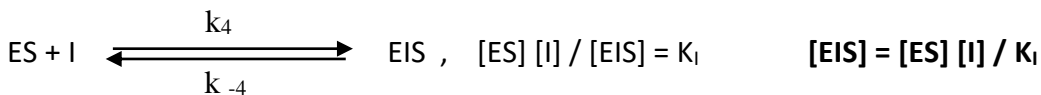
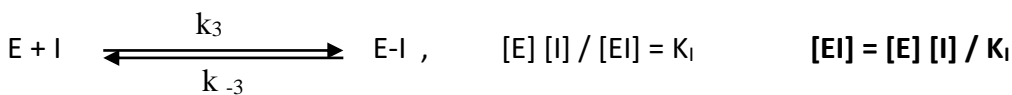
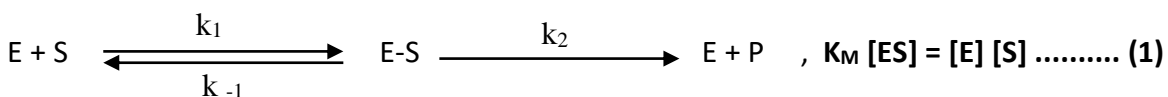
C'est le cas de certains antiviraux tels que :



2. 2. Inhibition non compétitive :

Dans ce cas, l'inhibiteur peut se fixer à la fois sur l'enzyme libre et sur le complexe E-S avec des constantes d'équilibres différentes. L'inhibiteur se fixe en un site différent du site de fixation du substrat (site catalytique). La modification de conformation qui en résulte diminue le pouvoir catalytique et rend plus difficiles les échanges électroniques dans le complexe E-S. En fait, le complexe ternaire EIS est inactif, ne pouvant en aucun cas donner un produit.

Par conséquent, on a les équilibres suivants :



La concentration totale de l'enzyme peut s'écrire :

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI] + [EIS] \dots \dots \dots (4)$$

En remplaçant [EI] et [EIS], chacune par sa valeur, dans l'équation (4) :

$$[E_t] = [E] + [ES] + [E] [I] / K_i + [ES] [I] / K_i$$

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

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

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

$$[E] = ([E_t] / (1 + [I] / K_i)) - [ES] \dots \dots \dots (5)$$

Combinons (1) et (5) :

$$K_M [ES] = ([E_t] [S] / (1 + [I] / K_i)) - [ES] [S]$$

$$K_M [ES] + [ES] [S] = [E_t] [S] / (1 + [I] / K_i)$$

$$[ES] (K_M + [S]) = [E_t] [S] / (1 + [I] / K_i)$$

$$[ES] = [E_t] [S] / (1 + [I] / K_i) (K_M + [S]) \dots \dots \dots (6)$$

En multipliant l'équation (6) par k_{cat} , on obtient :

$$k_{cat} [ES] = k_{cat} [E_t] [S] / (1 + [I] / K_i) (K_M + [S])$$

$$v = v_m [S] / (1 + [I] / K_i) (K_M + [S])$$

On constate que la constante de Michaelis n'est pas modifiée alors que la vitesse maximale diminue par un facteur $(1 + [I] / K_i)$.

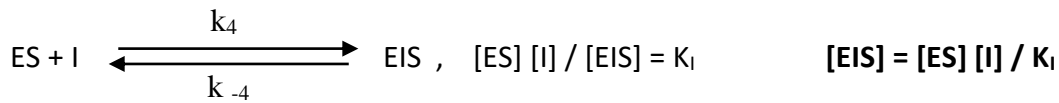
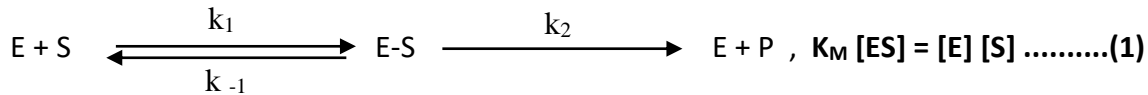
Exemple d'inhibiteur non compétitif :

Divers ligands de faible taille moléculaire comme les sulfonamides ou les benzodiazépines se comportent comme des inhibiteurs non compétitifs de la γ -sécrétase, impliquée dans la maladie d'Alzheimer, avec formation du complexe ternaire.

2. 3. Inhibition incompétitive (par blocage d'un complexe intermédiaire):

L'inhibiteur incompétitif ne se fixe que sur le complexe ES. Généralement, la liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de la conformation de l'enzyme, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme, et empêche la réaction.

Donc, il existe deux équilibres :



La concentration totale de l'enzyme est égale à :

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EIS] \dots\dots\dots (7)$$

En remplaçant [EIS], par sa valeur, dans l'équation (7) :

$$[E_t] = [E] + [ES] + [ES] [I] / K_i$$

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

$$[E] = [E_t] - [ES] (1 + [I] / K_i) \dots\dots\dots (8)$$

Combinons (1) et (8) :

$$K_M [ES] = [[E_t] - [ES] (1 + [I]/K_i)] [S]$$

$$K_M [ES] = [E_t] [S] - [ES] [S] (1 + [I]/K_i)$$

$$K_M [ES] + [S] [ES] (1 + [I]/K_i) = [E_t] [S]$$

$$[ES] (K_M + [S] (1 + [I]/K_i)) = [E_t] [S]$$

$$[ES] = [E_t] [S] / (K_M + [S] (1 + [I] / K_i))$$

$$[ES] = ([E_t] [S] / (1 + [I]/K_i)) / (K_M / (1 + [I]/K_i) + [S]) \dots\dots\dots (9)$$

En multipliant l'équation (9) par k_{cat} , on obtient :

$$k_{cat} [ES] = k_{cat} ([E_t] [S] / (1 + [I]/K_i)) / (K_M / (1 + [I]/K_i) + [S])$$

$$v = [v_m [S] / (1 + [I]/K_i)] / [K_M / (1 + [I]/K_i) + [S]]$$

On constate que les deux constantes cinétiques (K_M et v_m) diminuent par un facteur $(1 + [I] / K_i)$.

Exemple d'inhibiteur incompétitif :

Le lithium (Li^+) exerce sur IMPase (inositol monophosphatase) une inhibition de type incompétitif qui abaisse la concentration de l'inositol cytoplasmique.

2. 4. Inhibition mixte :

Dans certains cas, l'inhibition peut être à la fois compétitive et non compétitive. Elle résulte en une augmentation de K_M et une diminution de v_m . Ainsi, l'équation de Michaelis-Menten devient :

$$v = [v_m [S] / (1 + [I]/K_i)] / [K_M (1 + [I]/K_i) + [S]]$$

Exemple d'inhibiteur mixte :

C'est le cas du thio-oligosaccharide ; inhibiteur mixte de la cellulase.

Il existe d'autres types d'inhibition :

- *Inhibition par fixation de l'inhibiteur sur le substrat*
- *Inhibition par les fortes concentrations de substrat*
- *Inhibition par les produits de la réaction*

3. Représentations graphiques :

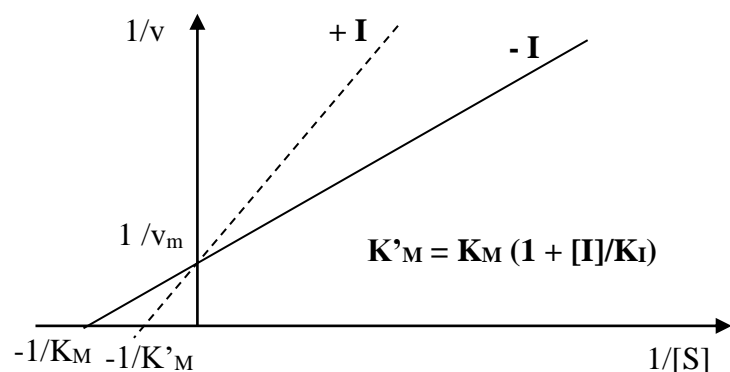
En général, les représentations graphiques permettent de déterminer le type d'inhibition, les constantes cinétiques de l'enzyme et la constante d'inhibition.

3. 1. Représentation de Lineweaver-Burk :

Si on trace la courbe de Lineweaver-Burk d'une activité enzymatique, en absence et en présence d'un inhibiteur, on obtient les graphes suivants :

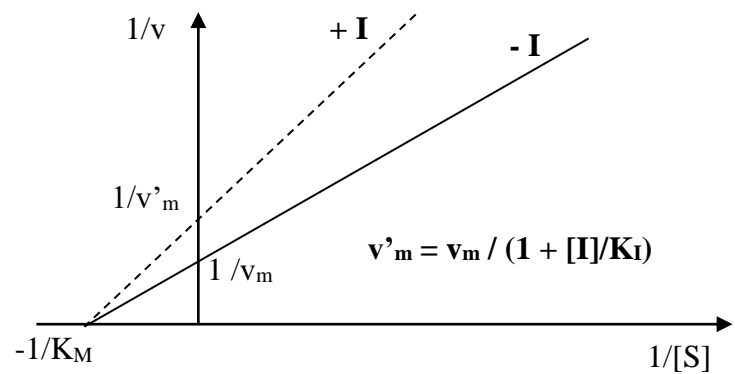
3. 1. 1. Inhibition compétitive :

La droite obtenue, en présence de l'inhibiteur, coupe l'axe des ordonnées au même point que la courbe en absence de l'inhibiteur. Par contre, elle coupe l'axe des abscisses en un point plus rapproché du 0 que le point $(-1/K_M)$.

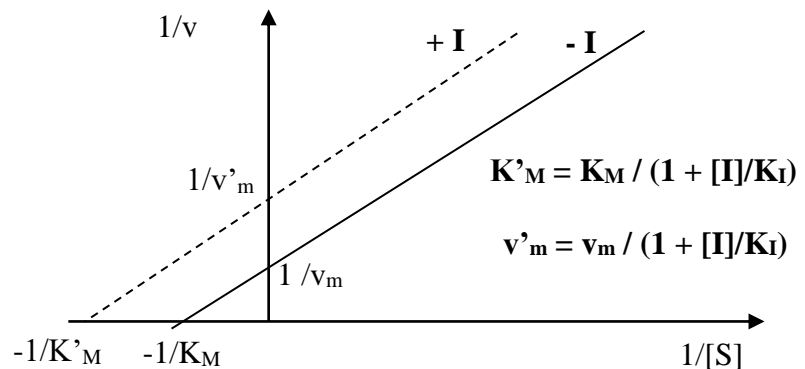


3. 1. 2. Inhibition non compétitive :

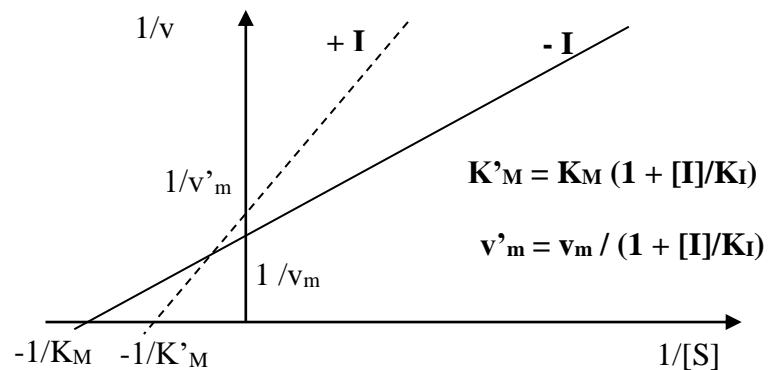
La courbe, en présence de l'inhibiteur, coupe l'axe des ordonnées plus haut qu'en l'absence de l'inhibiteur et celle des abscisses au même point ($-1/K_M$).

**3. 1. 3. Inhibition incompétitive :**

Dans ce cas, la courbe d'inhibition est parallèle à celle obtenue en l'absence de l'inhibiteur.

**3. 1. 4. Inhibition mixte :**

La droite de Lineweaver-Burk ne passe ni par le point ($-1/K_M$) ni par le point ($1/v_m$).

**3. 2. Représentation de Dixon :**

L'étude de l'effet de concentrations croissantes d'inhibiteur sur la vitesse de la réaction, mesurée à une seule concentration de substrat, permet d'obtenir une hyperbole.

Par conséquent, la méthode de linéarisation la plus utilisée est la représentation de Dixon, qui étudie ($1/v$) en fonction de $[I]$ pour différentes concentrations de substrat.

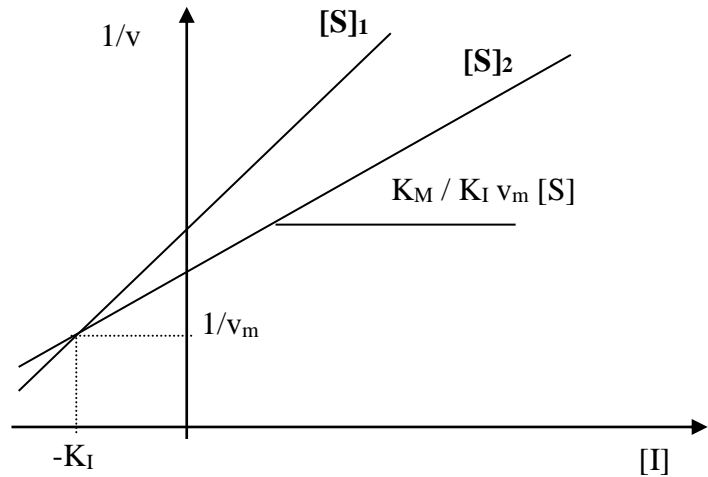
3. 2. 1. Inhibition compétitive :

On a :

$$v = v_m [S] / [K_M (1 + [I] / K_i) + [S]]$$

$$1/v = K_M (1 + [I]/K_i) / v_m [S] + 1/v_m$$

$$1/v = [I] (K_M / K_i v_m [S]) + (K_M + [S]) / v_m [S]$$



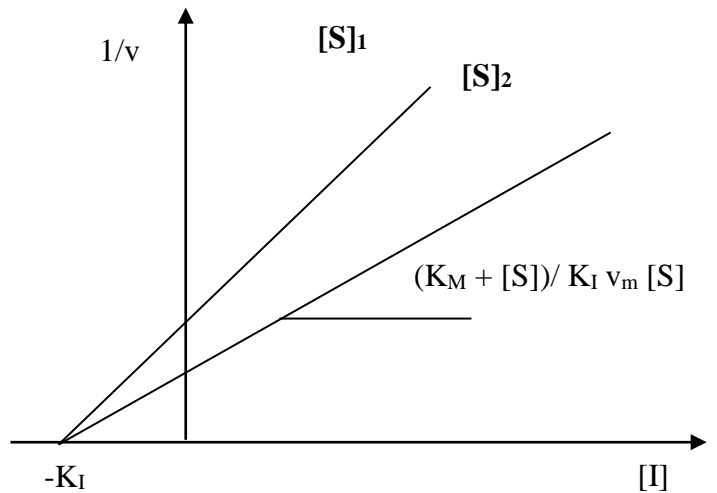
3. 2. 2. Inhibition non compétitive :

On a :

$$v = v_m [S] / (1 + [I] / K_i) (K_M + [S])$$

$$1/v = (1 + [I]/K_i) (K_M + [S]) / v_m [S]$$

$$1/v = [I] [(K_M + [S]) / K_i v_m [S]] + (K_M + [S]) / v_m [S]$$



3. 2. 3. Inhibition incompétitive :

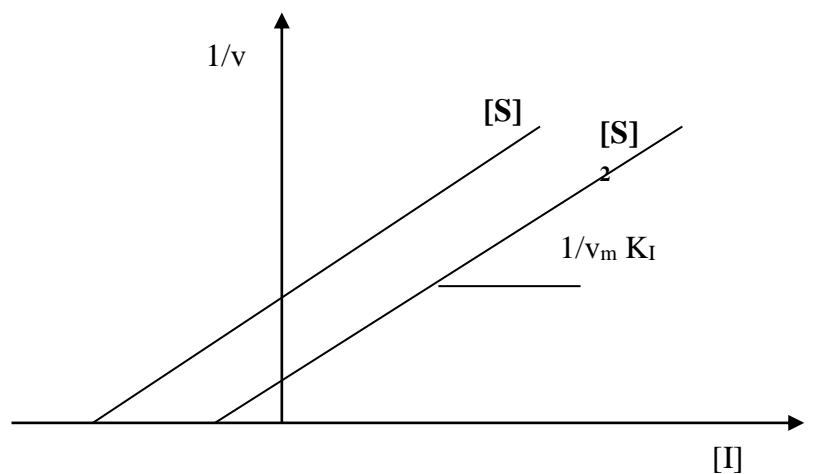
On a :

$$v = [v_m [S] / (1 + [I]/K_i)] / [K_M / (1 + [I]/K_i) + [S]]$$

$$v = v_m [S] / (K_M + [S] (1 + [I] / K_i))$$

$$1/v = (K_M + [S] (1 + [I] / K_i)) / v_m [S]$$

$$1/v = [I] (1 / K_i v_m) + (K_M + [S]) / v_m [S]$$



4. Inhibition irréversible :

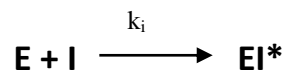
Les inhibiteurs irréversibles de type covalent sont nombreux et permettent souvent :

- De neutraliser une enzyme dont on veut éliminer définitivement les effets.
- De masquer le site actif ; ce qui permet d'identifier le groupement chimique qui a réagi avec l'inhibiteur après dénaturation et hydrolyse de l'enzyme.

Cette inhibition peut être simple ou avec un intermédiaire.

4.1. Inhibition simple :

La cinétique donne directement un complexe inactif irréversiblement (EI*) :



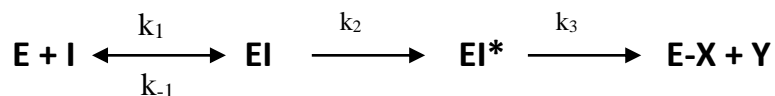
4.2. Inhibition avec un intermédiaire :

Certains mécanismes peuvent comprendre un complexe intermédiaire réversible (EI) :



Inhibiteur suicide :

On appelle souvent inhibiteur "suicide" un ligand qui s'installe dans le site actif d'une enzyme et y contracte une liaison covalente stable de telle sorte que la protéine est définitivement inactivée.



L'enzyme reconnaît l'inhibiteur comme son substrat et entame le processus de modification de ce dernier. Intervient alors une étape au cours de laquelle l'inhibiteur modifié devient très réactif et se lie de façon très stable à l'enzyme. L'enzyme contribue ainsi à sa propre inactivation irréversible d'où le nom d'inhibition « suicide ». L'inhibiteur peut se placer sur le site catalytique de l'enzyme ou ailleurs.

Ces inhibiteurs sont très recherchés dans les applications pharmacologiques et pour la conception des pesticides, herbicides,...

Exemple :

L'allopurinol est un puissant inhibiteur de la xanthine oxydase (XAO) utilisé dans le traitement de la goutte.