

## Travaux Dirigés : série n° 2

### (Inhibitions des réactions enzymatiques)

#### Exercice N°1

On suit la cinétique d'hydrolyse de l'orthonitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) par la  $\beta$ -galactosidase, respectivement en absence d'inhibiteur et en présence d'orthonitrophényl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (ONPTG), de maltose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1,4)- $\beta$ -D-glucopyranose) ou de mélibiose ( $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1,6)- $\alpha$ -D-glucopyranose).

Voir un [cours sur les oses](#).

Les valeurs des vitesses initiales ( $\Delta A$  = variation d'absorbance) obtenues en suivant la variation de l'absorbance à  $\lambda = 410$  nm sont les suivantes :

[S <sub>0</sub> ] (M)	v <sub>i</sub> ( $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ )			
	Sans I	[ONPTG] $3 \cdot 10^{-4}$ M	[maltose] 0,26 M	[mélibiose] 0,17 M
0	0	0	0	0
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,033	0,018	0,016	0,027
$5 \cdot 10^{-5}$	0,055	0,033	0,027	0,041
$1 \cdot 10^{-4}$	0,082	0,055	0,041	0,055
$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,118	0,091	0,059	0,069
$5 \cdot 10^{-4}$	0,138	0,118	0,069	0,075
$1 \cdot 10^{-3}$	0,150	0,138	0,075	0,079

1. Déterminez  $V_{\max}$ ,  $K_M$  et  $k_{\text{cat}}$  (en  $\text{s}^{-1}$ ) à l'aide de la représentation de votre choix.
2. Déterminez les paramètres cinétiques  $V_{\max}^{\text{app}}$  et  $K_M^{\text{app}}$  en présence des inhibiteurs. Calculez les constantes  $K_I$ .
3. Que suit-on à  $\lambda = 410$  nm ?
4. Expliquez le type d'inhibition observé pour chacun des inhibiteurs de cet exercice.

Données:  $[E_0] = 1,19 \cdot 10^{-9}$  M -  $\epsilon_M^{\text{ONP}} = 3300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  -  $l = 1$  cm

## Exercice N°2

L'étude préliminaire de l'activité d'une enzyme en absence et en présence d'un inhibiteur donne les résultats suivants :

$[S_0]$ (mM)	1	2	4	7	10
$v_i$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) sans I	31	33	34,5	36	37
$v_i$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) avec I	19	21	22,5	24	25

1. Tracez les courbes de saturation. Quelles conclusions pouvez-vous en tirer ?
2. Dans le cas d'un inhibiteur incompétitif, dans quelle partie de la courbe de saturation (en d'autres termes, pour quelle gamme de concentrations de substrat), cet inhibiteur est-il le plus efficace ?

## Exercice N°3

On dispose d'une molécule M dont on veut préciser le rôle dans une réaction catalysée par une enzyme :  $\text{Substrat} + \text{M} \text{-----} \rightarrow \text{produit(s)}$

On mesure la vitesse initiale de cette réaction (exprimée en  $\text{nM}\cdot\text{min}^{-1}$ ) pour différentes concentrations de S, en présence ou non de la molécule M (à la concentration indiquée dans le tableau suivant).

$[S_0]$ ( $\mu\text{M}$ )	$[\text{molécule M}]$ (mM)		
	0	1	2,84
1	3,8	2,7	1,7
2	6	4,2	2,6
5	9	6,2	4,1
10	10,5	7,7	4,8

- D'après les résultats de ce tableau, déterminez si la molécule M est :
- un second substrat : dans ce cas, tracez les graphes primaires, déterminez les paramètres cinétiques auxquels vous avez accès et précisez le type de mécanisme réactionnel.
  - un inhibiteur : dans ce cas, déterminez le type d'inhibition et calculez la valeur de la constante  $K_I$ .

## Exercice N°4

On suit la cinétique d'hydrolyse d'un substrat, respectivement en absence d'inhibiteur et en présence d'un inhibiteur I. Les valeurs des vitesses initiales, en UA.min<sup>-1</sup>, sont les suivantes :

[S <sub>0</sub> ] (mM)	Sans I	[I <sub>0</sub> ] (3 μM)
25 10 <sup>-2</sup>	6,6	3,6
50 10 <sup>-2</sup>	11	6,6
100 10 <sup>-2</sup>	16,4	11
25 10 <sup>-1</sup>	23,6	18,2
50 10 <sup>-1</sup>	27,6	23,6
100 10 <sup>-1</sup>	30	27,6

1. Déterminez les paramètres cinétiques  $V_{\max}$ ,  $K_M$  et  $k_{\text{cat}}$  par une méthode graphique de votre choix. Les concentrations doivent être exprimées en molarité.

2. Déterminez les paramètres cinétiques  $V_{\max}^{\text{app}}$  et  $K_M^{\text{app}}$  en présence de l'inhibiteur. Précisez le type d'inhibition et calculez la constante d'inhibition  $K_I$ .

Données :  $[E]_0 = 1,1 \mu\text{M}$  /  $\epsilon_M^{\text{produit}} = 2300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  /  $l = 1 \text{ cm}$  / UA = unité d'absorbance

## Exercice N°5

Une enzyme catalyse l'isomérisation d'une double liaison d'un **acide gras insaturé** en C16.

On étudie la réaction catalysée par cette enzyme, en absence et en présence d'un inhibiteur I.

On suit la réaction enzymatique en mesurant la variation d'absorbance due à l'apparition du produit. Pour différentes concentrations en substrat, on obtient les vitesses initiales suivantes :

$[C16]_0$ (mM)	$v_i$ (U.A.h <sup>-1</sup> ) $[I_0] = 55 \mu\text{M}$	$v_i$ (U.A.h <sup>-1</sup> )
0,8	0,5	0,8
1,2	0,7	1,1
1,9	1,1	1,5
2,4	1,2	1,7
3,4	1,5	2,0
5,8	2,0	2,6
8,7	2,4	2,9

1. Déterminez les paramètres cinétiques ( $V_{\max}$ ,  $K_M$  et  $k_{\text{cat}}$ ) et les paramètres cinétiques en présence de l'inhibiteur, par une méthode graphique de votre choix.

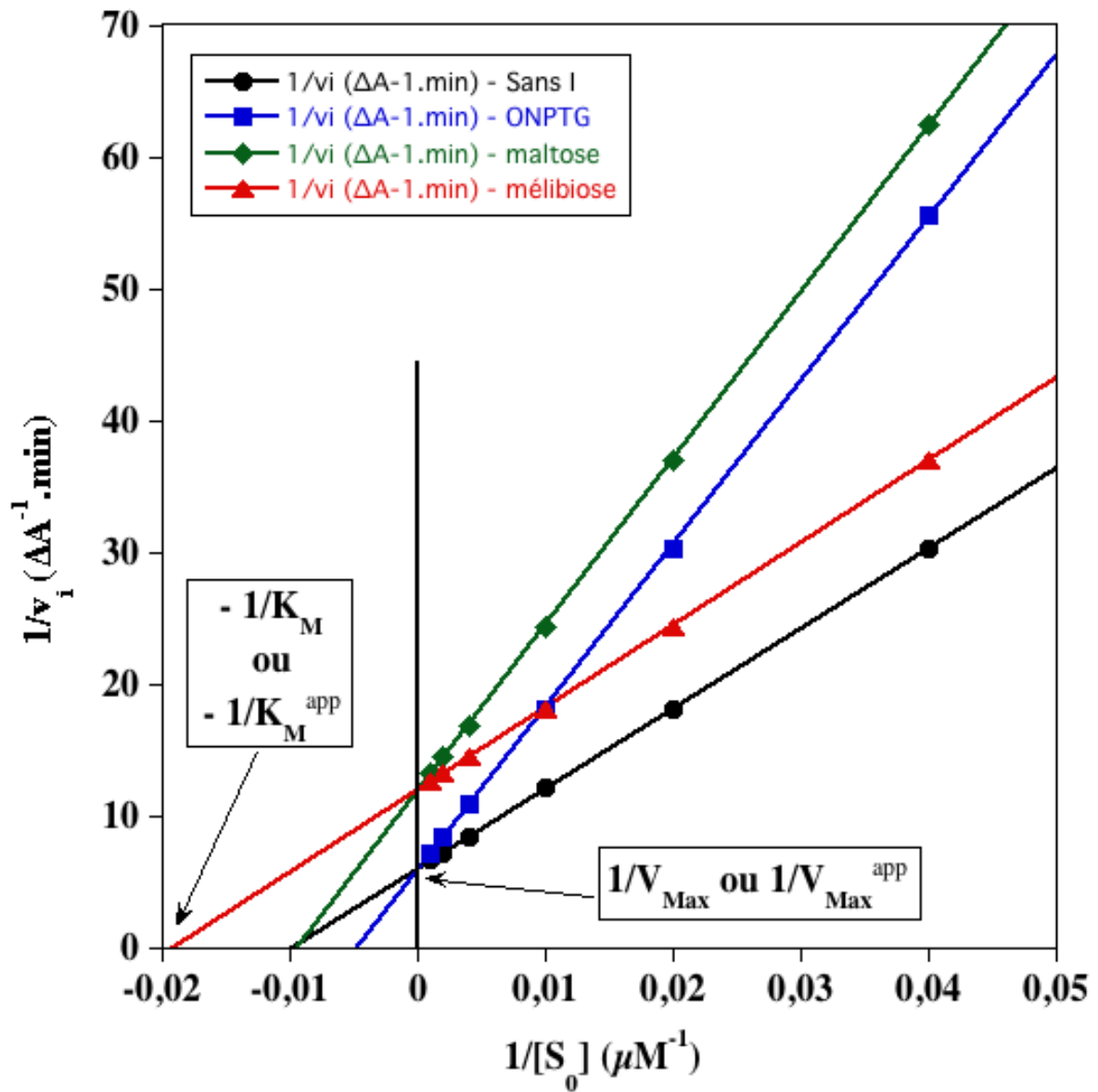
Les concentrations doivent être exprimées en molarité.

2. Précisez le type d'inhibition et calculez la constante d'inhibition  $K_I$ .

Données :  $[E]_0 = 9 \mu\text{M}$  -  $\epsilon_M^{\text{produit}} = 17000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  -  $l = 1 \text{ cm}$

## Correction TD N° 2

### Exercice N°1



## Expression de $V_{Max}$

On passe de  $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$  à  $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$  avec la [relation de Beer-Lambert](#) :

$$V_{Max} (\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}) = V_{Max} (\Delta A \cdot \text{min}^{-1}) / \epsilon_M \cdot l$$

Inhibiteur	$1/V_{Max}$ ou $1/V_{Max}^{app}$ ( $\Delta A^{-1} \cdot \text{min}$ )	$V_{Max}$ ou $V_{Max}^{app}$ ( $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ )	$V_{Max}$ ou $V_{Max}^{app}$ ( $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$-1/K_M$ ou $-1/K_M^{app}$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$K_M$ ou $K_M^{app}$ (mM)	Type d'inhibition	$K_I$ (M)
SANS	6,1	0,16	50	-10	0,1	-----	-----
ONPTG	6,1	0,16	50	-5	0,2	compétitive	$3 \cdot 10^{-4}$
Maltose	12,1	0,08	25	-10	0,1	non compétitive	0,26
Mélibiose	12,1	0,08	25	-20	0,05	incompétitive	0,17

Formules pour  $K_I$  :

Inhibition compétitive :  $(K_M \cdot [I_0]) / (K_M^{app} - K_M)$

Inhibition non compétitive :  $(V_{Max}^{app} \cdot [I_0]) / (V_{Max} - V_{Max}^{app})$

Inhibition incompétitive :  $(V_{Max}^{app} \cdot [I_0]) / (V_{Max} - V_{Max}^{app})$  ou  $(K_M \cdot [I_0]) / (K_M^{app} - K_M)$

## Calcul de $k_{cat}$

$$k_{cat} = V_{max} / [E_0] \implies k_{cat} = 4,2 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1} = 700 \text{ s}^{-1}$$

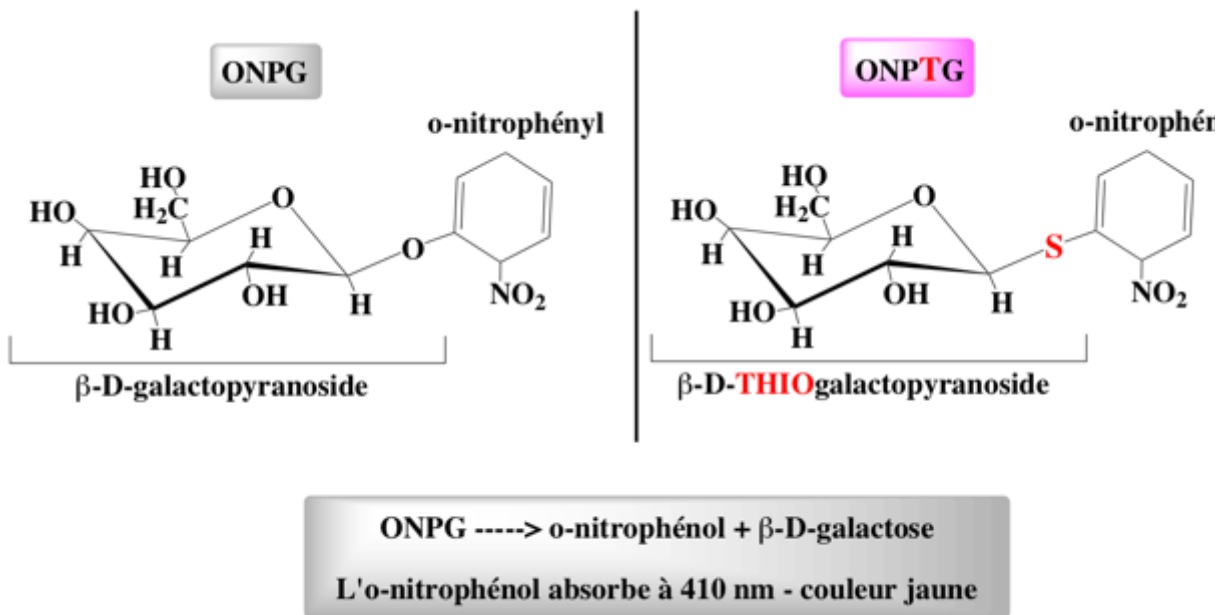
Il faut **diviser par 60** pour passer des  $\text{min}^{-1}$  en  $\text{s}^{-1}$  : l'acte catalytique a lieu 60 fois moins souvent en 1 seconde que en 1 minute.

$V_{max}^{app} < V_{max}$  en présence d'un inhibiteur non compétitif ou incompétitif car  $[E_0]^{app} < [E_0]$  (une partie de l'enzyme est complexée à l'inhibiteur - formes EI ou ESI). Malgré tout  $k_{cat}$  est une caractéristique de l'enzyme et sa valeur est **indépendante de la présence de l'inhibiteur** : la valeur de  $k_{cat}$  en présence d'inhibiteur est donc inchangée ( $k_{cat} = V_{max}^{app} / [E_0]^{app}$ ).

## Explications des types d'inhibitions observées

Le **substrat synthétique** de la  $\beta$ -galactosidase est l'orthonitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG). C'est un substrat très souvent employé en travaux pratiques pour la mesure de l'activité de cette enzyme. En effet, la cinétique de formation du produit (o-nitrophénol) est très facile à suivre avec un spectrophotomètre puisqu'il absorbe à 410 nm.

Dans la structure de l'ONPTG, un atome de **soufre** (plus encombrant stériquement) remplace l'oxygène de la **liaison osidique** hydrolysée.



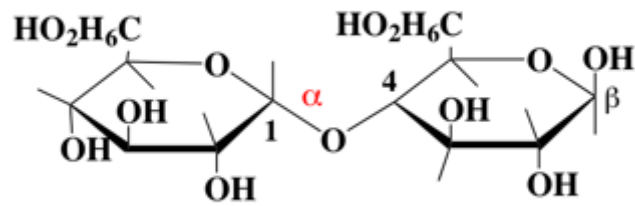
*E. Jaspard (2)*

- rayon de van der Waals du soufre = 1,04 Å
- rayon de van der Waals de l'oxygène = 0,74 Å

L'ONPTG est donc un **analogue structural** de l'ONPG mais l'atome de soufre empêche l'acte catalytique.

Le **maltose** : ce diholoside est libéré par hydrolyse de l'amylose qui est un polymère de résidus glucose : il s'agit de l' $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1,4)- $\beta$ -D-glucopyranose. Les résidus de glucose sont libérés par hydrolyse chimique ou par une enzyme : l' **$\alpha$ -D-glucosidase**.

## maltose



*E. Jaspard (2013)*

Le maltose peut se fixer sur l'enzyme libre E et sur le complexe intermédiaire ES (inhibition non compétitive).

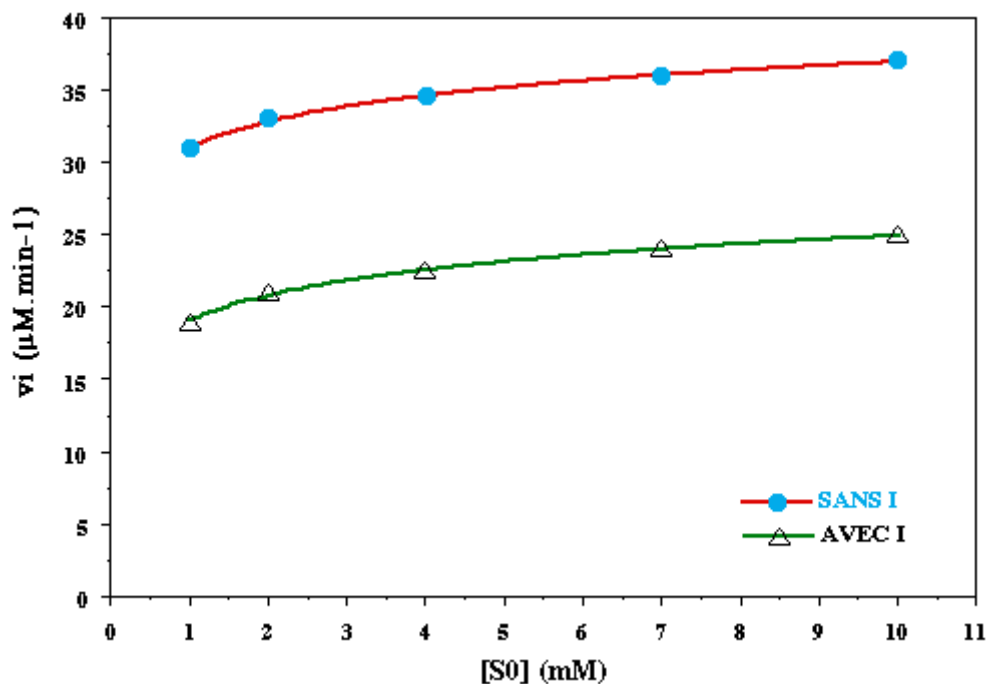
Le **mélibiose** : ce diholoside est l' $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1,6)- $\alpha$ -D-glucopyranose.

### Exercice N°2

Cet exercice est à comparer avec l'exercice N°2 - TD 1.

#### - Question a

Malgré leur apparence, les 2 courbes ci-dessous sont **courbes de saturation** (hyperboles) :  $v_i = f([S]_0)$ .





Cependant on n'observe que la **fin** de la courbe de saturation.

- donc, la gamme étudiée de concentrations de substrat n'est pas appropriée pour déterminer les paramètres cinétiques.
- il faudrait l'étendre à des concentrations plus faibles (tout en conservant ces valeurs).

On remarque que :  $V_{\text{Max}}^{\text{SANS I}} > V_{\text{Max}}^{\text{AVEC I}}$  .

Donc l'inhibiteur est soit **non** compétitif, soit **in**compétitif.

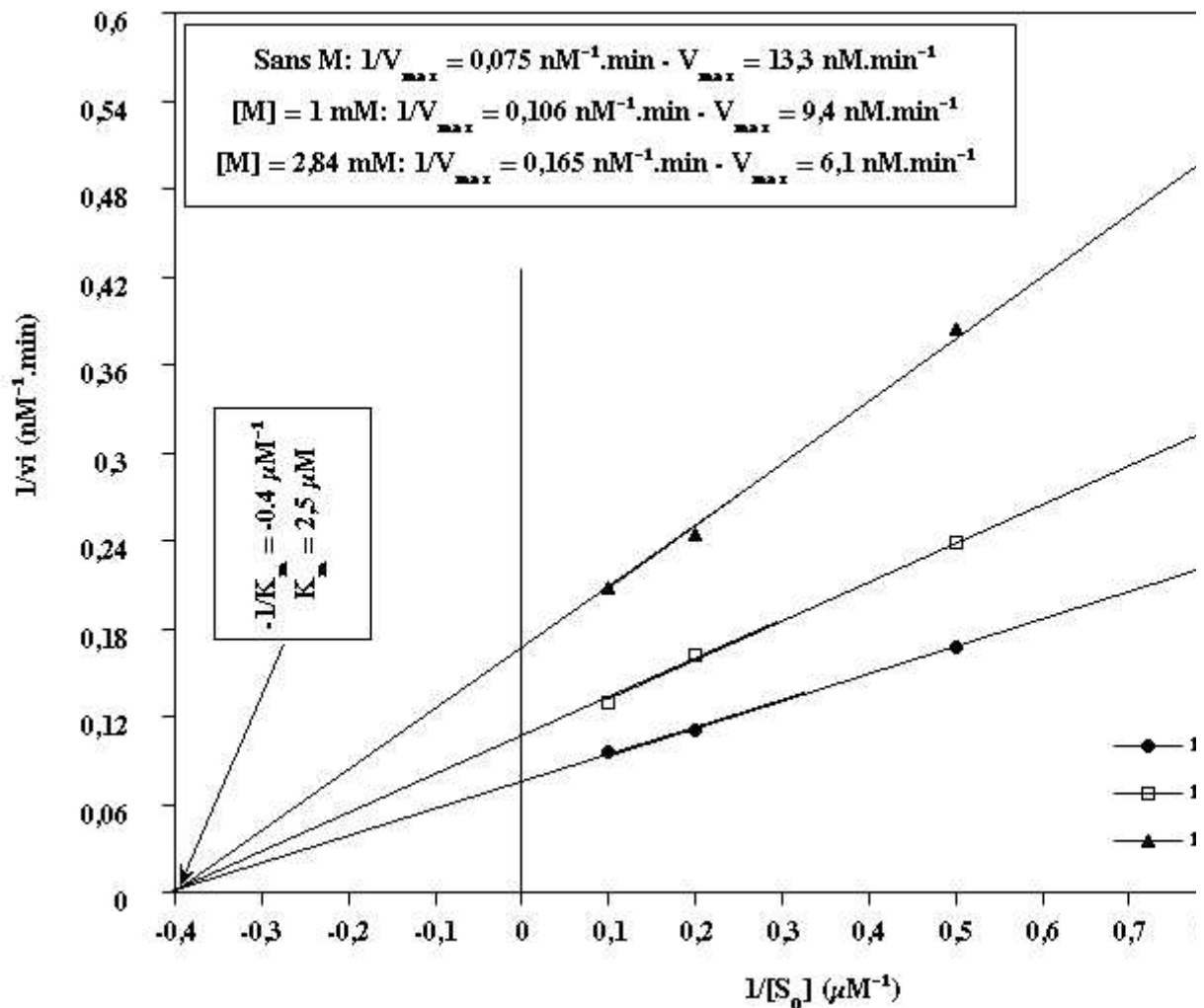
#### - Question b

Un inhibiteur **incompétitif** se fixe sur le complexe intermédiaire ES. Cet inhibiteur est d'autant plus efficace que la concentration du complexe [ES] est forte, c'est-à-dire pour des concentrations :  $[ES] \gg [E]_{\text{libre}}$ .

Il faut que donc de **fortes** concentrations de substrat. On dit alors que l'enzyme est **saturée** par le substrat. Pour des concentrations moindres l'enzyme est en **excès**.

Remarque : un inhibiteur agit **quelle que soit la concentration** en substrat. Mais son effet est plus marqué dans certaines gammes de concentrations.

### Exercice N°3



Pour [M] = 0 mM (c'est-à-dire en absence de M), l'enzyme est **active** : M **ne peut pas être un second substrat**.

Il s'agit d'un inhibiteur **non** compétitif.

A partir des valeurs du graphique :  $K_I = (V_{\max}^{\text{app}} \times [I_0]) / (V_{\max} - V_{\max}^{\text{app}})$   
 $\Rightarrow K_I = 2,4 \text{ mM}$

## Remarques complémentaires sur les inhibiteurs

Un inhibiteur incompétitif se fixe sur le complexe intermédiaire ES. Cet inhibiteur est d'autant plus efficace que l'espèce moléculaire ES est en forte concentration, c'est-à-dire:  $[ES] \gg [E]_{\text{libre}}$ .

Pour cela, il faut que l'enzyme soit **saturée** par le substrat, donc il faut de **fortes** concentrations de substrat.

Un inhibiteur agit quelles que soient la concentration en substrat. Mais son effet est plus marqué dans certaines gammes de concentrations.

## Qu'est-ce qui distingue fondamentalement un substrat d'un inhibiteur ?

### Un substrat

- Il se fixe au site de fixation du site actif, il y a formation du complexe de Michaelis-Menten ( $E + S \rightleftharpoons E-S$ , réversible).
- Du fait de la structure du substrat et de la nature des chaînes latérales des acides aminés constitutifs du site de fixation, le substrat passe dans l'**état de transition**. Cet état est caractérisé par une énergie interne bien supérieure à celle du substrat, donc une instabilité structurale bien plus élevée. La cause en est la distortion de la molécule (c'est-à-dire les modifications des longueurs et des angles de liaison et les modifications de l'énergie de vibration : la molécule est "gelée") qu'induisent les acides aminés du site de fixation.
- La stéréospécificité (c'est-à-dire la complémentarité spatiale et chimique) de cette "nouvelle" molécule (l'état de transition) avec les chaînes latérales des acides aminés du site catalytique aboutit à l'acte catalytique proprement dit, c'est-à-dire la réaction chimique ( $E-S \rightarrow P$ ).

### Un inhibiteur

Seule la première étape "ressemble" à ce qui se passe avec un substrat (à fortiori si l'inhibiteur est compétitif) = formation d'un complexe réversible. La réaction chimique ne peut avoir lieu.

### a. Différence entre un inhibiteur et un substrat qui diminue la vitesse de la réaction (qui agit comme un inhibiteur)

- Dans tous les cas, les équations de vitesse sont très différentes.
- La plupart du temps cela implique une structure oligomérique de l'enzyme.
- Une inhibition liée au substrat est fonction de sa concentration, alors qu'un inhibiteur agit quelle que soit la concentration du substrat (même si selon le type d'inhibiteur, l'efficacité est modulée en fonction de la concentration du substrat).

### b. différence avec un inhibiteur non compétitif ou incompétitif

Le substrat est alors un **effecteur allostérique** qui peut se fixer sur deux sites distincts de fixation : celui du site actif et un site régulateur.

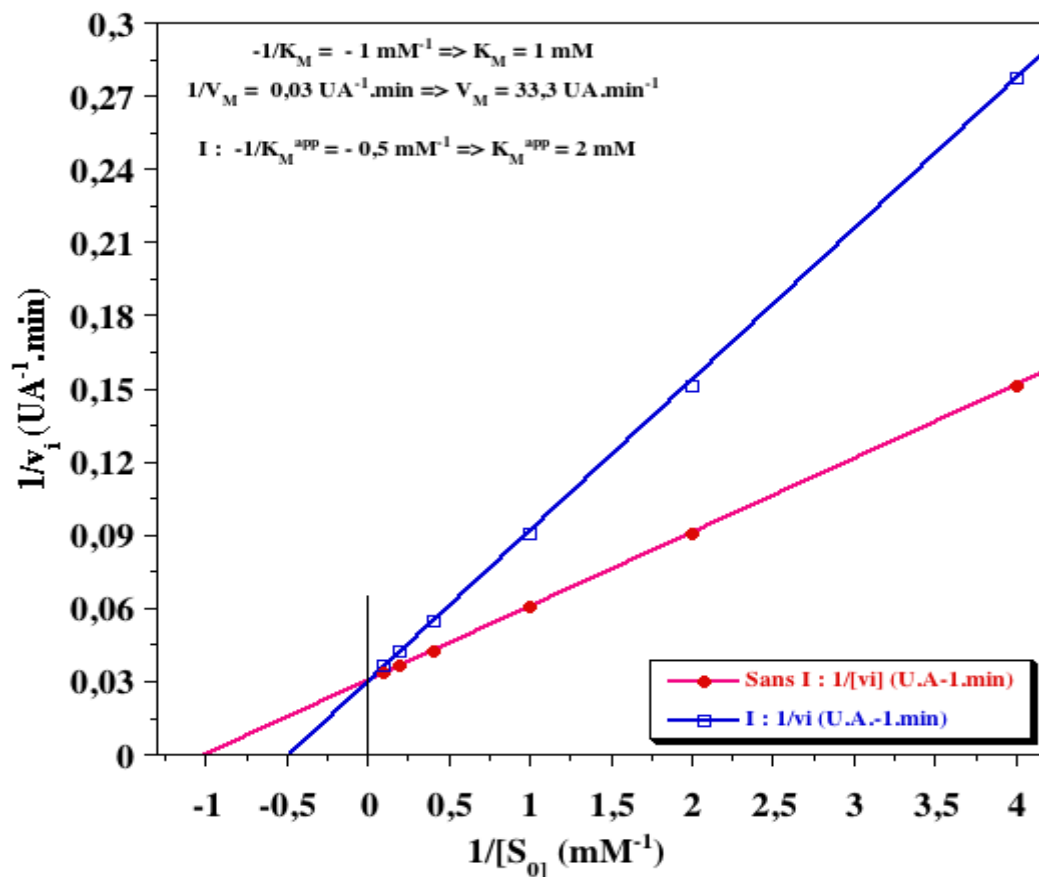
Exemple : en deçà d'une certaine concentration, l'un des deux substrats de la **phosphofructokinase 1**, l'ATP, se fixe au site actif et la vitesse de la réaction augmente. A fortes concentrations, l'ATP se fixe aussi sur un autre site que le site actif et empêche les changements de conformation des sous-unités qui stabilisent la conformation active (effet homotrope négatif).

### c. différence avec un inhibiteur compétitif

C'est l'inhibition par **excès de substrat** où deux molécules de substrat se fixent au site actif :  $E + 2S \rightleftharpoons ES_2$ .

Il en résulte que l'espèce moléculaire  $[ES_2]$  est improductive car aucune des deux molécules de substrat n'est fixée de manière optimale, et donc aucune ne peut passer dans l'état de transition.

## Exercice N°4

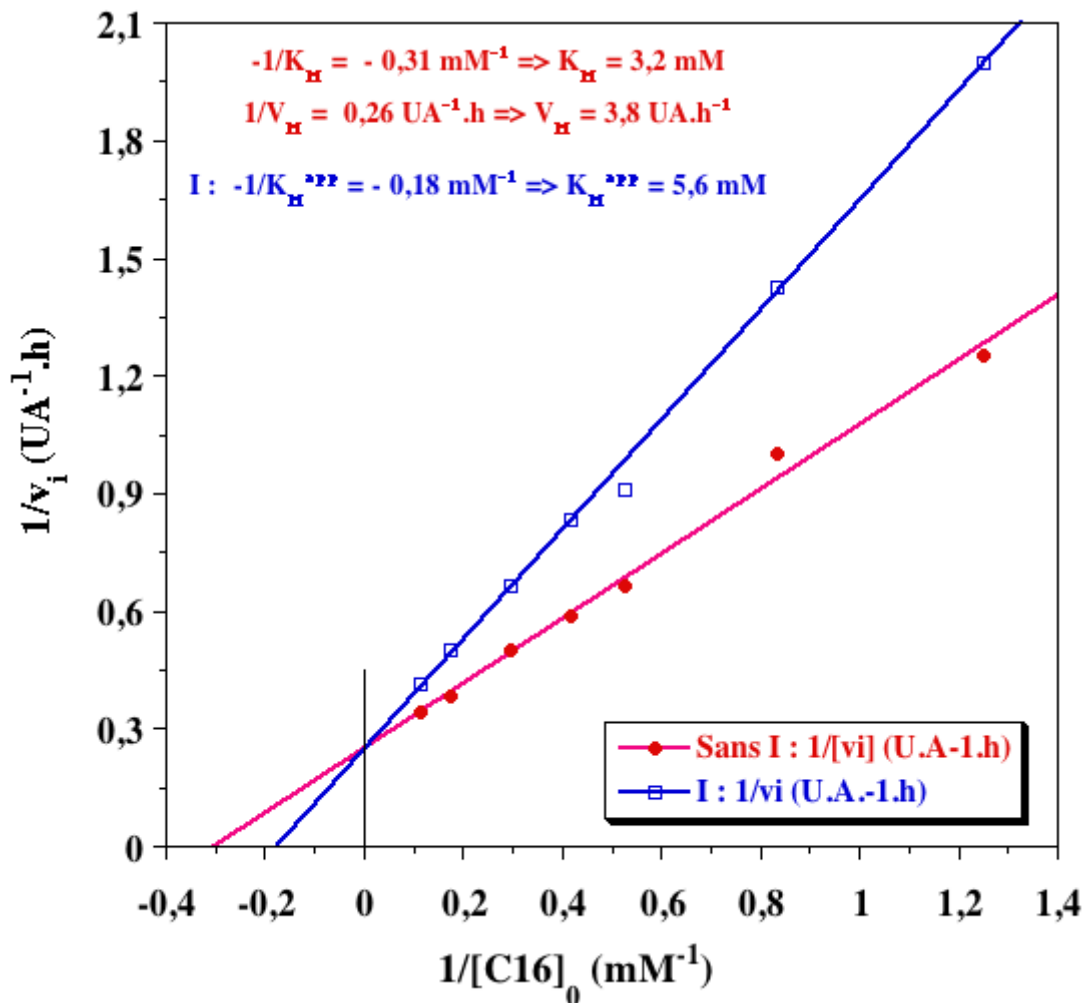


Il s'agit d'un inhibiteur **compétitif**.

A partir des valeurs déterminées graphiquement, on calcule :  $K_I = (K_M \times [I_0]) / (K_M^{\text{app}} - K_M) = 3 \mu\text{M}$

Paramètres	Sans I	Avec I
$1/V_M$ ou $1/V_M^{\text{app}}$ ( $\text{UA}^{-1}.\text{min}$ ) ou ( $\text{mM}^{-1}.\text{min}$ )	0,03 ou 0,069	
$V_M$ ou $V_M^{\text{app}}$ ( $\text{UA}.\text{min}^{-1}$ ) ou ( $\text{mM}.\text{min}^{-1}$ )	33,3 ou 14,5	
$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	220	-----
$-1/K_M$ ou $-1/K_M^{\text{app}}$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	- 1	- 0,5
$K_M$ ou $K_M^{\text{app}}$ (mM)	1	2
Type inhibition	-----	Compétitive
$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	-----	3

## Exercice N°5



Il s'agit d'un inhibiteur **compétitif**.

A partir des valeurs déterminées graphiquement, on calcule :  $K_I = (K_M \times [I]) / (K_M^{\text{app}} - K_M) = 73,3 \mu\text{M}$

Paramètres	Sans I	$[I_0] = 55 \mu\text{M}$
$1/V_M$ ou $1/V_M^{\text{app}}$ (UA <sup>-1</sup> .h)		0,26
$V_M$ ou $V_M^{\text{app}}$ (mM.h <sup>-1</sup> )		0,22
$k_{\text{cat}}$ (h <sup>-1</sup> )	24	-----
$-1/K_M$ ou $-1/K_M^{\text{app}}$ (mM <sup>-1</sup> )	- 0,31	- 0,18
$K_M$ ou $K_M^{\text{app}}$ (mM)	3,2	5,6
Type inhibition	-----	Compétitive
$K_I$ (μM)	-----	73,3

