CHAPITRE

4

TD5 : MODÈLES PRIMAIRES DE CINÉTIQUE DES ENZYMES À UN SUBSTRAT - UN PRODUIT

CONSIGNES : Vous devez traiter puis analyser les résultats obtenus. Pour cela, la méthode à suivre et le modèle de rédaction sont toujours les mêmes :

- Écrire la réaction
- A. Mécanisme :
 - Faire l'hypothèse que l'enzyme est Micaëlienne et calculer les valeurs en double inverse
 - Tracer la régression linéaire en double inverse en indiquant : l'échelle, le nom des axes, les unités, un titre qui a du sens, l'équation de la droite, le r^2 .
 - Analysez votre graphique puis conclure sur le mécanisme
- B. Détermination des constantes : Calculez les constantes (k_{cat} et/ou V_{max} , K_M) : par lecture graphique et par calcul à partir de l'équation de droite.
- Conclure

Exercice 1 : Équations de vitesse des réactions catalysées par des enzymes Mickaéliennes

Des vidéos sont disponibles sur moodle pour vous aider à réaliser ce travail.

Question 1

Démontrez en utilisant l'hypothèse de Victor Henry, l'équation de Mickaëlis et Menten pour une réaction à un substrat, un produit.

Question 2

Démontrez en utilisant l'état stationnaire l'équation générale de Mickaëlis et Menten pour une réaction à un substrat, un produit.

Exercice 2 : Spécificité de substrat d'enzymes impliquées dans une voie de destruction des pathogènes : le complément.

(Référence : Rossi, V. et al, 2001. JBC; Substrate Specificities of Recombinant Mannan-binding Lectin-associated Serine Proteases-1 and -2)

Le système du complément est un ensemble de protéines solubles et membranaires impliquées dans la destruction des pathogènes. Les protéines solubles sont produites par le foie et présentes dans le sérum. Lorsqu'un pathogène entre dans l'organisme, il est détecté par une protéine de reconnaissance qui déclenche une cascade protéolytique d'activation : des précurseurs d'enzymes appelés zymogènes sont activés par clivage. Nous nous intéresserons ici aux protéases impliquées dans le déclenchement de la cascade : MASP-2 et C1s qui sont susceptibles de cliver deux substrats C4 et C2 de façon à former C4b+C4a et C2a+C2b. Nous chercherons à connaître la spécificité de ces enzymes pour ces deux substrats.

MASP-2					
(C4) nM	50	100	250	400	500
$v_0 \text{ nM.s}^{-1}$	1,8	2,5	3,4	3,7	3,8
(C2) nM	1000	1500	2000	3000	4000
$v_0 \text{ nM.s}^{-1}$	1,3	1,8	2,3	3,1	3,7
C1s					
(C4) nM	500	1000	2000	3000	4000
$v_0 \text{ nM.s}^{-1}$	1,9	3,1	4,7	5,6	6,3
(C2) nM	1000	1500	2000	3000	4000
$v_0 \text{ nM.s}^{-1}$	0,8	1,1	1,5	2,1	2,6

TABLE 4.1 – Résultats des mesures de vitesse initiale des protéases à sérine MASP-2 et C1s sur deux substrats C4 et C2. La concentration en enzyme est la même dans tous es essais (2nM). Les concentrations en substrat sont données en nM et les vitesses en nM.s-1.

Question 1

Analysez les résultats obtenus pour les quatre couples enzyme-substrats

Question 2

Comparez les deux enzymes et leurs effets sur les deux substrats

Exercice 3 : Analyse de résultats expérimentaux

Pour cet exercice, vous viendrez en travaux dirigés avec vos résultats traités de travaux pratiques en absence d'inhibiteur. La méthode d'analyse des données est la même qu'en travaux dirigés à quelques différences près :

- Les équations de droites doivent être calculées en utilisant tous les points expérimentaux.
- Le traitement des données brutes (tableaux, calculs divers et variés) seront présentés dans les annexes de vos compte-rendus
- Les graphiques, les tableaux bilans de constantes et les mécanismes doivent apparaître dans les résultats