

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 Mickaëlienne 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 Mickaëliennes

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

Question 1

Démontrez en utilisation 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.

A. Énoncé :

(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 les 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

B. Correction :

Question 1

Les réactions d'hydrolyse de MASP-2 et C1s sur leurs substrats C4 et C2 sont étudiées :



$MASP_2; + C2 MASP_2; + C2a + C2b$

$C1s; + C4 C1s; + C4a + C4b$

$C1s; + C2 C1s; + C2a + C2b$

Les deux enzymes sont supposées Mickaéliennes. Les données sont traitées en double inverse.

A.Mécanisme de l'enzyme

Le traitement des données par la méthode de Lineweaver et Burk est donné dans le tableau ci dessous.

TABLE 4.2 – 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 les essais (2nM). Les concentrations en substrat sont données en nM et les vitesses en nM.s-1.

MASP-2					
$\frac{1}{(C4)} nM^{-1}$	0,02	0,01	0,004	0,0025	0,002
$\frac{1}{v_0} s.nM^{-1}$	0,56	0,39	0,29	0,27	0,26
$\frac{1}{(C2)} nM^{-1}$	0,001	0,00067	0,0005	0,00033	0,00025
$\frac{1}{v_0} s.nM^{-1}$	0,76	0,54	0,43	0,3231292517	0,26
C1s					
$\frac{1}{(C4)} nM^{-1}$	0,002	0,001	0,0005	0,00033	0,00025
$\frac{1}{v_0} s.nM^{-1}$	0,53	0,32	0,21	0,18	0,16
$\frac{1}{(C2)} nM^{-1}$	0,001	0,00067	0,0005	0,00033	0,00025
$\frac{1}{v_0} s.nM^{-1}$	1,25	0,87	0,67	0,4811320754	0,38

Les équations de droite $\frac{1}{v_0} = f(\frac{1}{S_0})$ sont calculées de la façon suivante (exemple de MASP-2 avec C4) :

$$a = \frac{y_B - y_A}{x_B - x_A} = \frac{0.56 - 0.26}{0.02 - 0.002} = 16,8$$

$$b = y_B - a * x_B = 0.56 + 16,8 * 0,02 = 0,227$$

Les graphiques obtenus à partir des résultats sont présentés dans la figure ci-dessous

Les régressions en double inverse sont des droites ($r^2 > 0,95$). Les enzymes sont donc Mickaéliennes.

B. Calcul des constantes

Les calculs sont détaillés pour le couple MASP-2-C4. Les calculs sont exactement les mêmes pour les autres couples.

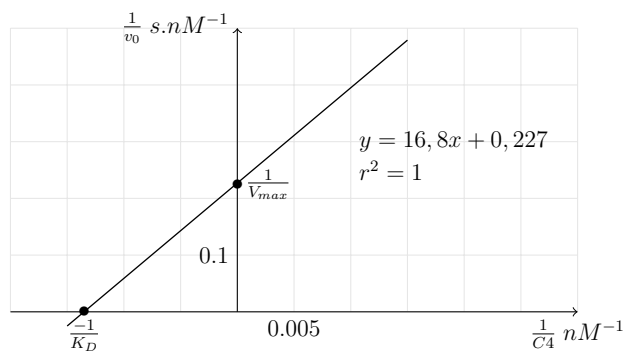
Obtention de V_{max}

A l'intersection de la droite de régression avec l'axe des ordonnées, y est égal à $\frac{1}{V_{max}}$. A cette intersection, la valeur lue est 0,22. $V_{max} = \frac{1}{0,22} = 4,54 nM.s^{-1}$

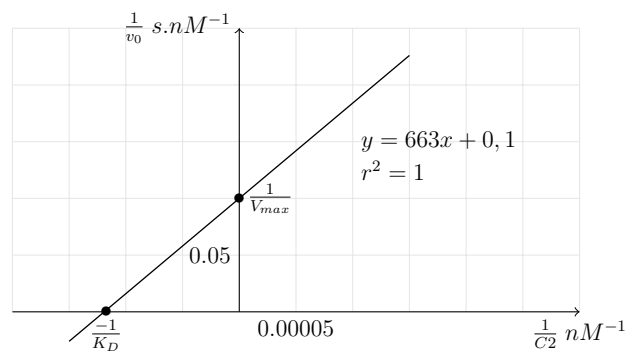
Afin de confirmer ce résultat, le calcul de cette intersection est calculée à partir de l'équation de la droite. A l'intersection avec la droite des ordonnées, x=0 donc :

$$y = 16,8 * 0 + 0,227 \text{ donc } y = 0,227 \text{ et } V_{max} = \frac{1}{0,227} = 4,4 nM.s^{-1}$$

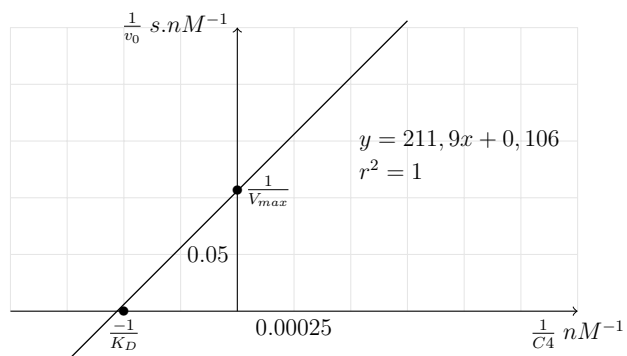
La **constante catalytique** est égale à : $k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_0} = \frac{4,4}{2} = 2,2 s^{-1}$



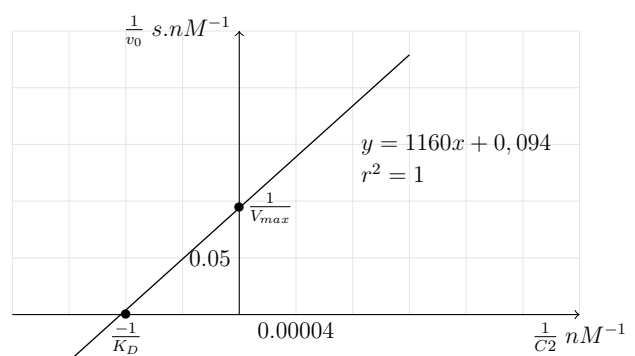
(a) Cinétique de Masp-2 sur C4 (Double inverse)



(b) Cinétique de Masp-2 sur C2 (Double inverse)



(c) Cinétique de C1s sur C4 (Double inverse)



(d) Cinétique de C1s sur C2 (Double inverse)

FIGURE 4.1 – Représentation en double inverse des cinétiques des enzymes MASP-2 et C1s en présence des substrats C2 et C4

Obtention de K_M

A l'intersection de la droite de régression avec l'axe des abscisses, x est égal à $-\frac{1}{7}K_M$. A cette intersection, la valeur lue est -0,014. $K_M = \frac{1}{0,014} = 71,4 \text{ nM}$

Afin de confirmer ce résultat, le calcul de cette intersection est calculée à partir de l'équation de la droite. A l'intersection avec la droite des abscisses, $y=0$ donc :

$$\text{Pour } y=0, 16,8x + 0,227 = 0 \text{ donc } x = \frac{-0,227}{16,8} = -0,0135$$

$$\text{donc } K_M = \frac{1}{0,0135} = 74 \text{ nM}$$

L'efficacité catalytique E_c est égale à : $E_c = \frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{2,2}{74} = 0,03 \text{ s}^{-1} \cdot \text{nM}^{-1}$

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau bilan ci-dessous.

TABLE 4.3 – Constantes cinétiques de MASP-2 et C1s en présence de différents substrats.

enzyme		MASP-2		C1s	
substrat		C4	C2	C4	C2
2^*K_M nM	graphique	71			
	calcul	74	6501	1999	12340
2^*V_{max} nM/s	graphique	4,54			
	calcul	4,4	9,8	9,43	10,63
$2^*k_{cat} \text{ s}^{-1}$	graphique	2,27			
	calcul	2,2	4,9	4,72	5,315
$2^*E_c \text{ s}^{-1} \cdot \text{nM}^{-1}$	graphique	0,032			
	calcul	0,029	0,00075	0,0023	0,00043

MASP-2 et C1s sont donc deux enzymes Mickaéliennes dont les constantes cinétiques sont présentées dans le tableau ci-dessus.

Question 2

Question 3

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

Temporary page!

$\LaTeX$ was unable to guess the total number of pages correctly. As there was some unprocessed data that should have been added to the final page this extra page has been added to receive it.

If you rerun the document (without altering it) this surplus page will go away, because $\LaTeX$ now knows how many pages to expect for this document.