

CHAPITRE

4

TD6 : MODÈLES SECONDAIRES DE CINÉTIQUE DES ENZYMES À UN SUBSTRAT - UN PRODUIT EN PRÉSENCE D'UN INHIBITEUR

CONSIGNES : Vous devez traiter puis analyser les résultats obtenus. Pour cela, méthode à suivre est toujours la même :

- Introduction (Écrire la réaction)
- A. Mécanisme :
 - Faire l'hypothèse que l'enzyme est Mickaëlienne et calculer les valeurs en double inverse
 - Tracer les régressions linéaires en double inverse sur un seul graphique primaire 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 primaire
 - Mécanisme 1 : l'enzyme est-elle bien Mickaëlienne ?
 - Mécanisme 2 : quel est le type d'inhibition
 - Faites un figure du mécanisme d'inhibition et donnez l'équation
- B. Constantes d'inhibition :
 - démontrez l'équation d'un graphique secondaire
 - tracez les graphiques secondaire en indiquant : l'échelle, le nom des axes, les unités, un titre qui a du sens, l'équation de la droite, le r^2 .
 - Calculez la (les) constante(s) d'inhibition : : 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

Démontrez l'équation de vitesse pour une réaction à un substrat, un produit en présence d'un inhibiteur compétitif

Exercice 2 : Inhibition réversible de C1s

A. Énoncé :

L'enzyme que nous avons étudiée précédemment doit être produite à grande échelle de façon à pouvoir la commercialiser. Or, nous avons observé une irrégularité dans l'activité des échantillons purifiés obtenus. Après analyse, nous avons remarqué que ces variations étaient corrélées à la présence relative de trois réactifs différents dont la présence semble diminuer la catalyse. Nous avons donc procédé à des études d'inhibition par ces trois réactifs.

	C4 nM				
Inhibiteur A nM	500	1000	2000	3000	4000
4000 nM	1,2	2,1	3,4	4,4	5
10000 nM	0,8	1,4	2,5	3,3	3,9
20000 nM	0,5	0,9	1,7	2,3	2,8
	C4 nM				
Inhibiteur B nM	500	1000	2000	3000	4000
4000 nM	1,6	2,4	3,1	3,5	3,8
10000 nM	1,2	1,7	2,1	2,2	2,3
20000 nM	0,9	1,2	1,3	1,4	1,4
	C4 nM				
Inhibiteur C nM	500	1000	2000	3000	4000
4000 nM	1	1,6	2,4	2,8	3,1
10000 nM	0,6	0,9	1,4	1,6	1,7
20000 nM	0,3	0,6	0,8	0,9	1

TABLE 4.1 – Résultats des expériences d'inhibition de C1s par les inhibiteurs A, B et C. Les vitesses initiales (en italiques) sont exprimées en nM de substrat transformé par seconde.

Question 1

Analysez les résultats obtenus pour les trois inhibiteurs

Question 2

L'échantillon est considéré de bonne qualité si les contaminations diminuent V_{max} et K_M de moins de 1 %. Quelle concentration maximale est acceptable pour chaque inhibiteur ?

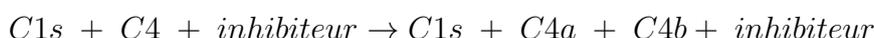
Question 3

Certains patients sur-expriment cet enzyme ce qui leur pose de gros problèmes métaboliques. Si vous deviez choisir un inhibiteur à donner au patient pour diminuer l'activité de l'enzyme, lequel choisiriez vous ?

B. Correction :

Question 1

La réaction d'hydrolyse de C4 par C1s est étudiée en présence de trois molécules inhibitrices A, B et C :

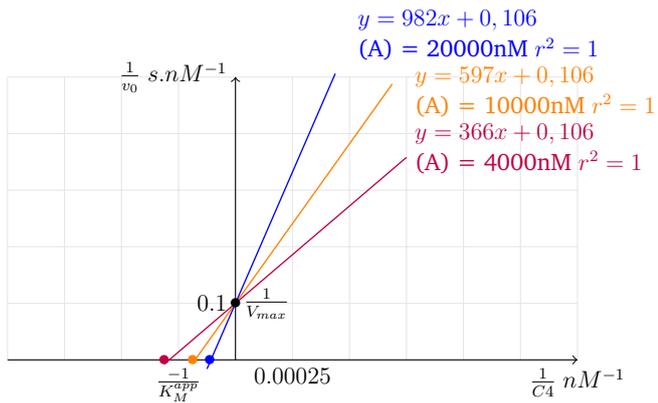


A. Mécanisme d'inhibition de l'enzyme

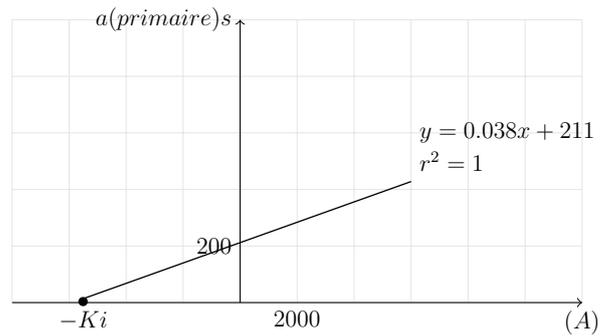
L'enzyme est supposée Micaëlienne en présence de des inhibiteurs. Les données sont traitées en double inverse. Le traitement des données par la méthode de Lineweaver et Burk est donné dans le tableau ci dessous.

TABLE 4.2 – Résultats des expériences d'inhibition de C1s par les inhibiteurs A, B et C. Les vitesses initiales (en italiques) sont exprimées en nM de substrat transformé par seconde.

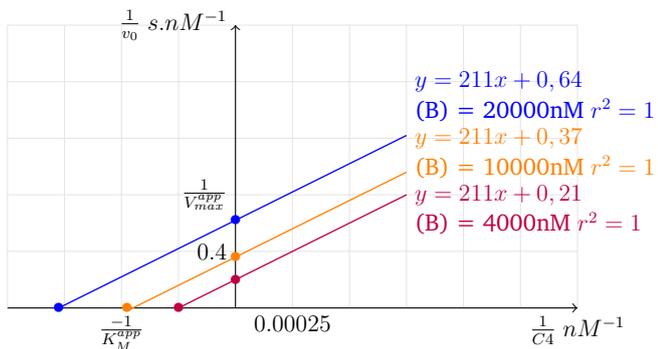
	1/C4 nM ⁻¹				
Inhibiteur A	<i>0,002</i>	<i>0,001</i>	<i>0,0005</i>	<i>0,00033333</i>	<i>0,00025</i>
4000	0,83845261	0,47241779	0,28940039	0,22839458	0,19789168
10000	1,30081238	0,70359768	0,40499033	0,30545455	0,25568665
20000	2,07141199	1,08889749	0,59764023	0,43388781	0,35201161
	1/C4 nM ⁻¹				
inhibiteur B	<i>0,002</i>	<i>0,001</i>	<i>0,0005</i>	<i>0,00033333</i>	<i>0,00025</i>
4000	0,63659574	0,42468085	0,3187234	0,28340426	0,26574468
10000	0,79617021	0,58425532	0,47829787	0,44297872	0,42531915
20000	1,06212766	0,85021277	0,74425532	0,70893617	0,6912766
	1/C4 nM ⁻¹				
Inhibiteur C	<i>0,002</i>	<i>0,001</i>	<i>0,0005</i>	<i>0,00033333</i>	<i>0,00025</i>
4000	0,99085714	0,60941033	0,41868693	0,35511246	0,32332523
10000	1,68182371	1,04607903	0,72820669	0,62224924	0,56927052
20000	2,83343465	1,77386018	1,24407295	1,0674772	0,97917933



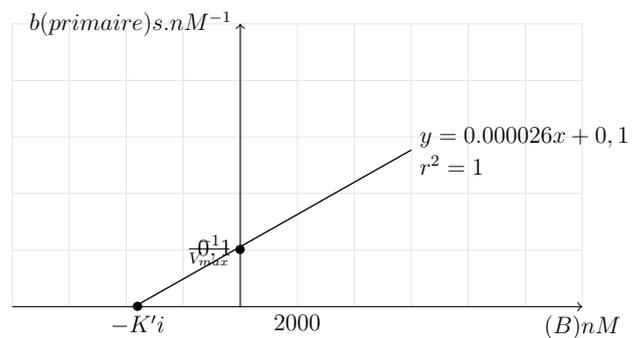
(a) Cinétique de C1s sur C4 (Double inverse) en présence de l'ihhibiteur A



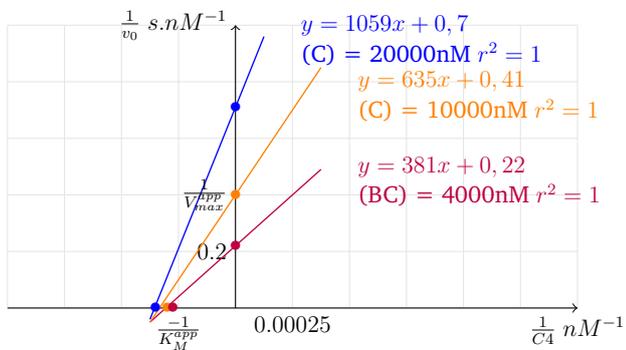
(b) Cinétique de C1s sur C4 (graphique secondaire) en présence de l'ihhibiteur A



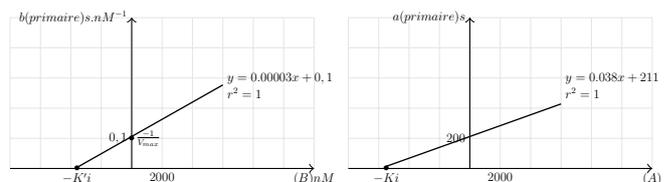
(c) Cinétique de C1s sur C4 (Double inverse) en présence de l'ihhibiteur B



(d) Cinétique de C1s sur C4 (graphique secondaire) en présence de l'ihhibiteur B



(e) Cinétique de C1s sur C4 (Double inverse) en présence de l'ihhibiteur C



(f) Cinétique de C1s sur C4 (graphique secondaire) en présence de l'ihhibiteur C

FIGURE 4.1 – Représentation en double inverse des cinétiques de C1s en présence d'ihhibiteurs

Les graphiques primaires montrent tous des droites ($r^2 > 0.95$) quelque soit l'inhibiteur : l'enzyme est bien restée Mickaëlienne en présence des trois inhibiteurs.

En présence de l'inhibiteur A, les trois droites se coupent sur l'axe des ordonnées : V_{max} ne change pas et K_M^{app} augmente. L'inhibiteur A est donc un inhibiteur compétitif.

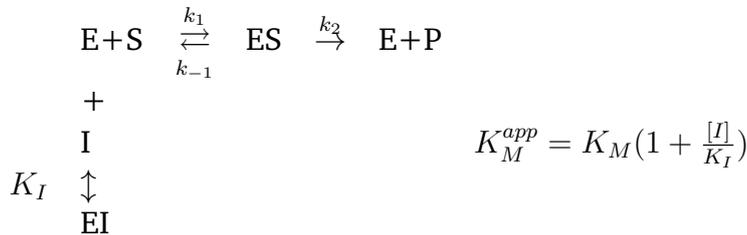


FIGURE 4.2 – Mécanisme et équations associés à l'inhibiteur A compétitif

En présence de l'inhibiteur B, les trois droites sont parallèles : V_{max}^{app} diminue et K_M^{app} diminue. L'inhibiteur A est donc un inhibiteur un compétitif.

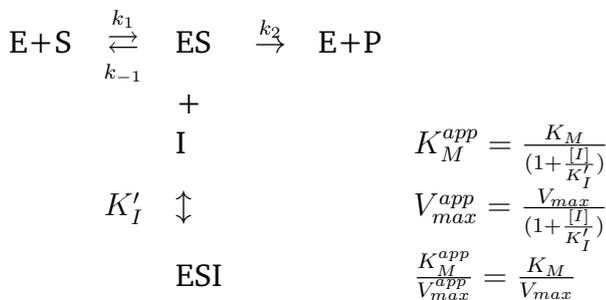


FIGURE 4.3 – Mécanisme et équations associés à l'inhibiteur B un compétitif

En présence de l'inhibiteur C, les trois droites se coupent autour de l'axe de abscisses : V_{max}^{app} diminue et K_M^{app} soit diminue soit reste fixe. L'inhibiteur C est donc un inhibiteur mixte voire non compétitif.

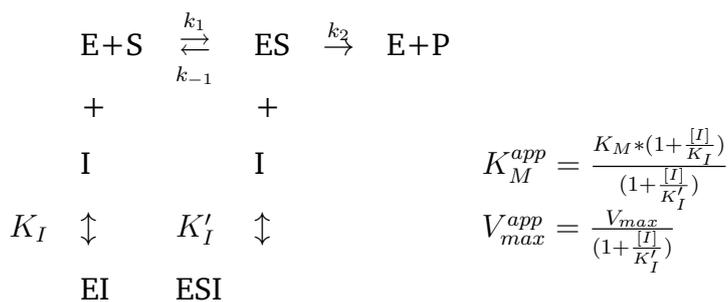


FIGURE 4.4 – Mécanisme et équations associés à l'inhibiteur C mixte

B.Constantes d'inhibition

Les constantes d'inhibitions sont obtenues en réalisant des graphiques secondaires à partir des trois types de graphiques primaires.

INHIBITEUR A, COMPÉTITIF

L'équation de chaque droite du graphique primaire est la suivante :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_{Mapp}}{V_{max}} * \frac{1}{S_0}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M(1 + \frac{I_0}{K_I})}{V_{max}} * \frac{1}{S_0}$$

La pente de chaque droite dépend donc de la constante d'inhibition et de la concentration en inhibiteur :

$$a(\text{primaire}) = \frac{K_M(1 + \frac{I_0}{K_I})}{V_{max}}$$

donc :

$$a(\text{primaire}) = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max} * K_I} * I_0$$

En traçant $a(\text{primaire}) = f(I_0)$, une droite est obtenue de pente $\frac{K_M}{V_{max} * K_I}$ et d'ordonnée à l'origine $\frac{K_M}{V_{max}}$. A l'intersection avec l'axe des abscisses, le point particulier $-K_I$ est trouvé :

$$y = 0 \text{ donc } \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max} * K_I} * I_0 = 0$$

$$\text{donc } 1 + \frac{1}{K_I} * I_0 = 0$$

$$\text{donc } I_0 = -K_I$$

Le graphique secondaire obtenu est bien une droite dont le point d'intersection avec l'axe des abscisse lu est -5500 nM donc $K_I = 5500 \text{ nM}$. L'équation de cette droite est : $y = 0,038x + 211$ donc pour $y = 0$, $x = \frac{-211}{0,038}$ donc $K_I = \frac{211}{0,038}$ donc $K_I = 5552 \text{ nM}$.

INHIBITEUR B, UNCOMPÉTITIF

L'équation de chaque droite du graphique primaire est la suivante :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}^{app}} + \frac{K_M}{V_{max}} * \frac{1}{S_0}$$

donc

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{\frac{V_{max}}{1 + \frac{I_0}{K'_I}}} + \frac{K_M}{V_{max}} * \frac{1}{S_0}$$

L'ordonnée à l'origine dépend donc de la concentration en inhibiteur et de la constante d'équilibre K'_I :

$$b(\text{primaire}) = \frac{1}{\frac{V_{max}}{1 + \frac{I_0}{K'_I}}}$$

$$\text{donc : } b(\text{primaire}) = \frac{1 + \frac{I_0}{K'_I}}{V_{max}}$$

$$\text{donc } b(\text{primaire}) = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{K'_I * V_{max}} * I_0$$

Le graphique $b(\text{primaire}) = f(I_0)$ est donc une droite de pente $\frac{1}{K'_I * V_{max}}$ et d'ordonnée à l'origine $\frac{1}{V_{max}}$. Au point d'intersection avec l'axe des abscisses, le point particulier $-K'_I$ est trouvé :

$$\text{Pour } y = 0, \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{K'_I * V_{max}} * I_0 = 0 \text{ donc } 1 + \frac{1}{K'_I} * I_0 = 0 \text{ donc } I_0 = -K'_I.$$

Le graphique secondaire obtenu est bien une droite dont le point d'intersection avec l'axe des abscisse lu est -3500 nM donc $K'_I = 3500 \text{ nM}$. L'équation de cette droite est : $y = 0,000026x + 0,106$ donc pour $y = 0$, $x = \frac{-0,106}{0,000026}$ donc $K'_I = \frac{0,106}{0,000026}$ donc $K'_I = 3846 \text{ nM}$.

INHIBITEUR C, MIXTE

L'équation de chaque droite du graphique primaire est la suivante :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}^{app}} + \frac{K_M^{app}}{V_{max}^{app}} * \frac{1}{S_0}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{\frac{V_{max}}{1 + \frac{I_0}{K_I}}} + \frac{K_M \frac{(1 + \frac{I_0}{K_I})}{1 + \frac{I_0}{K_I}}}{\frac{V_{max}}{1 + \frac{I_0}{K_I}}} * \frac{1}{S_0}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1 + \frac{I_0}{K_I}}{V_{max}} + \frac{K_M * (1 + \frac{I_0}{K_I})}{V_{max}} * \frac{1}{S_0}$$

Nous avons donc à la fois la pente et l'ordonnée à l'origine qui dépendent de la concentration en inhibiteur et respectivement de K_I et $K'I$. Les démonstrations et les points particuliers sont exactement identiques aux démonstrations précédentes. Je ne les remet donc pas.

Les graphiques obtenus pour l'inhibiteur C sont des droite et comme précédemment, les constantes d'inhibition sont déterminées : $K_I = 5500nM$ et $K'_I = 3500nM$

En conclusion, les trois inhibiteurs suivent un mécanisme différent (tableau ci-dessous) mais ont des constantes d'inhibition du même ordre de grandeur.

TABLE 4.3 – Modalités d'actions de trois inhibiteurs de C1s en présence de C4

Inhibiteur	Mécanisme	K_I nM	K'_I nM
A	Compétitif	5500	
B	Incompétitif		3500
C	Mixte	5500	3500

Question 2

Il faut déterminer pour quelles concentrations en inhibiteur, le comportement de l'enzyme n'est pas modifié de plus de 1 pour cent soit pour lesquelles on ne change pas la vitesse maximale ou la constante de Mickaelis de plus de 1* pour cent.

Inhibiteur Compétitif

Un inhibiteur compétitif ne change pas la vitesse maximale de l'enzyme mais il modifie la constante de Mickaëlis apparente en fonction de sa concentration. Cette constante augmente diminuant l'affinité. Si on veut que le comportement de l'enzyme ne varie pas de plus de 1 pour cent il faut alors que le K_M^{app} ne dépasse pas 101 pour cent du K_M donc :

$$K_M^{app} < 1,01K_M \text{ donc } K_M(1 + \frac{I_0}{K_I}) < 1,01K_M$$

On trouve alors $I_0 < 0,01 * K_I$ soit $I_0 < 55nM$.

Inhibiteur Incompétitif

Un inhibiteur incompétitif diminue la vitesse maximale apparente de l'enzyme ainsi que la constante de Mickaëlis apparente. Si on veut que le comportement de l'enzyme ne varie pas de plus de 1 pour cent il faut alors que le K_M^{app} ne dépasse pas 99 pour cent du K_M et que V_{max}^{app} ne dépasse pas 99 pour cent du V_{max} donc :

$$K_M^{app} > 0,99K_M \text{ et } V_{max}^{app} > 0,99V_{max} \text{ Dans les deux cas la résolution est exactement identique.}$$

On a donc :

$$\frac{V_{max}}{1 + \frac{I_0}{K_I'}} > 0,99V_{max}$$

$$\text{soit } 1 > 0,99\left(1 + \frac{I_0}{K_I'}\right) \text{ soit } 0,01 * K_I' > 0,99I_0$$

$$35nM > I_0$$

Inhibiteur mixte non compétitif

Un inhibiteur mixte non compétitif diminue la vitesse maximale apparente mais ne modifie pas le K_M . Si on veut que le comportement de l'enzyme ne varie pas de plus de 1 pour cent il faut alors que le V_{max}^{app} ne dépasse pas 99 pour cent du V_{max} donc :

$$V_{max}^{app} > 0,99V_{max}$$

On a donc :

$$\frac{V_{max}}{1 + \frac{I_0}{K_I'}} > 0,99V_{max}$$

$$\text{soit } 1 > 0,99\left(1 + \frac{I_0}{K_I'}\right) \text{ soit } 0,01 * K_I' > 0,99I_0$$

$$35nM > I_0$$

Question 3

Nous voulons utiliser un de ses inhibiteurs pour soigner un patient qui présente une surexpression de C1s. Tous nos inhibiteurs ont la même constante d'inhibition ou du moins les différences ne sont pas significatives (3500nM contre 5500nM). Pour choisir l'inhibiteur, il faut donc regarder le mécanisme :

- **L'inhibiteur compétitif** ne modifie pas la V_{max} mais par contre augmente le K_M apparent diminuant l'affinité. Il n'aura donc aucun effet à très fortes concentrations en substrat et il baissera l'efficacité à faible concentration en substrat. Il faudrait donc connaître la concentration en substrat dans l'organisme pour savoir si on peut utiliser cet inhibiteur.

- **L'inhibiteur incompétitif** diminue la V_{max} apparente. Il sera donc efficace à saturation en substrat. Par contre, à très faible concentration en substrat l'efficacité catalytique ne change pas car le K_M apparent aussi diminue, augmentant l'affinité :

$$Ec = \frac{k_{cat}^{app}}{K_M^{app}} \text{ donc}$$

$$Ec = \frac{\frac{k_{cat}}{1 + \frac{I_0}{K_I'}}}{\frac{K_M}{1 + \frac{I_0}{K_I'}}} \text{ donc}$$

$$Ec = \frac{k_{cat}}{K_M}$$

Cet inhibiteur n'aura donc aucun effet à faible concentration en substrat. Il faudrait donc connaître la concentration en substrat dans l'organisme pour savoir si on peut utiliser cet inhibiteur.

- **L'inhibiteur mixte non compétitif** diminue la vitesse maximale apparente mais ne modifie pas le K_M . Il sera donc efficace à saturation en substrat. A faible concentration en substrat, on trouve :

$$Ec = \frac{\frac{k_{cat}}{1 + \frac{I_0}{K_I'}}}{K_M}$$

On a donc bien une diminution de l'efficacité de l'enzyme à faible concentration en substrat. L'inhibiteur mixte agit donc à toutes les concentrations en substrat. Il semble donc le plus adapté.

Il serait possible en utilisant le principe de la question 3 de déterminer la concentration sanguine nécessaire en inhibiteur pour baisser de 50 pour cent la vitesse de réaction de l'enzyme.

Exercice 3 : Analyse de résultats expérimentaux

Pour cet exercice, vous viendrez en travaux dirigés avec vos résultats traités de travaux pratiques en présence d'inhibiteurs. 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.