

CHAPITRE

4

TD7 : MODÈLES PRIMAIRES DE CINÉTIQUE DES ENZYMES À DEUX SUBSTRATS - DEUX PRODUITS

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

- 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 deux graphiques primaires ($v_0 = f([A])$ et $v_0 = f([B])$) en indiquant : l'échelle, le nom des axes, les unités, un titre qui a du sens, les équations de droites, le r^2 .
 - Analysez vos graphiques primaires
 - Mécanisme 1 : l'enzyme est-elle bien Mickaëlienne ?
 - Mécanisme 2 : quel est le mécanisme réactionnel ? (ordre des substrats et produits)
 - Faites un figure du mécanisme et donnez l'équation
- B. Constantes cinétiques
 - 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) cinétiques : k_{cat} et/ou V_{max} , les 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

Démontrez l'équation de vitesse pour une réaction à deux substrats deux produits qui suit un mécanisme bi-bi ordonné

Exercice 2 : Étude de la peroxydase de Raifort

A. Énoncé :

Les peroxydases sont des enzymes impliquées dans l'élimination de certaines formes toxiques de l'oxygène. Leurs fonctions anti-oxydantes sont essentielles pour limiter le vieillissement cellulaire. La peroxydase de raifort est une enzyme également largement utilisée en biotechnologies pour la marquage des western-blot car elle est capable de transformer un substrat transparent : le gaiacol en un produit coloré : le gaiacol oxydé. Cette réaction nécessite en parallèle la réduction d'une molécule d'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène) en eau (x2). Le tableau 2 donne les résultats de l'étude cinétique de cet enzyme.

	(Gaiacol) mM				
(H ₂ O ₂) mM	2,5	3	5	10	20
1	32,8	38,5	58,6	97	143
0,22	29,4	33,8	48,5	72	95
0,15	27,7	31,6	44	62,5	79
0,07	22,8	25,4	33	42,3	49,3

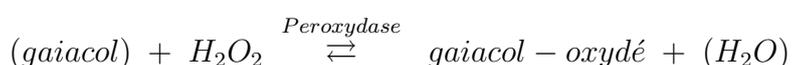
TABLE 4.1 – Vitesse initiale de réaction (en mole de S /mole enzyme/seconde) à différentes concentrations en H₂O₂ et en Gaiacol

Question 1

Déterminez le mécanisme d'action et les constantes cinétiques associées

B. Correction :

La réaction enzymatique de la peroxydase, impliquée dans l'élimination de formes réactives de l'oxygène, est étudiée par une méthode de cinétique dite à l'état stationnaire. Cela signifie que les vitesses de réactions sont mesurées pendant la phase stationnaire de la réaction enzymatique et ce dans différentes conditions. La réaction étudiée est la suivante :



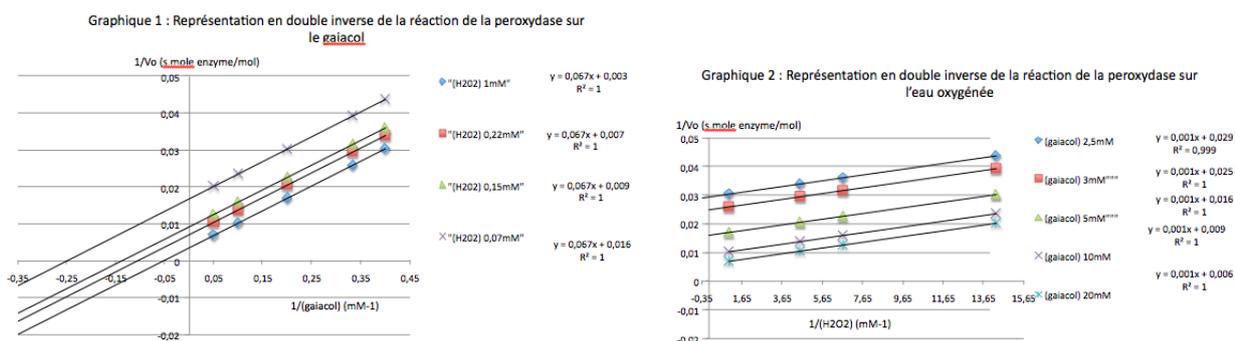
a. Obtention du mécanisme réactionnel

Les expériences effectuées ont permis d'obtenir les vitesses initiales de réaction pour différentes concentrations en *gaiacol* et en H_2O_2 . L'enzyme étant supposée Mickaélienne, il est plus précis d'étudier sa cinétique selon la méthode de Lineweaver et Burk qui nécessite de calculer les inverses des vitesses initiales et des concentrations en substrats.

$\frac{1}{V_0}$ en s.mole d'enzyme/mol ⁻¹		$\frac{1}{(gaiacol)}$ en mM ⁻¹				
		0,4	0,33	0,2	0,1	0,05
$4 * \frac{1}{(P_i)}$ en mM ⁻¹	1 0,0304	0,0259	0,01706	0,01030	0,0069	0,010526316
	4,545	0,03401	0,0295	0,0206	0,01388	
	6,666	0,0361	0,03164	0,02272	0,016	
	14,285	0,0438	0,0393	0,0303	0,023640	

TABLE 4.2 – Valeurs des inverses des vitesses initiales et des concentrations en substrats obtenus pour l'étude cinétique de l'enzyme Peroxydase

A partir de ces données, nous pouvons tracer **deux graphiques primaires**. Dans le premier, nous fixons les concentrations en H_2O_2 pour analyser les droites de regression $\frac{1}{v_o} = f(\frac{1}{(gaiacol)})$ (graphique 1) et dans le second nous fixons les concentrations en *gaiacol* pour analyser les droites de regression $\frac{1}{v_o} = f(\frac{1}{(H_2O_2)})$ (graphique 2).



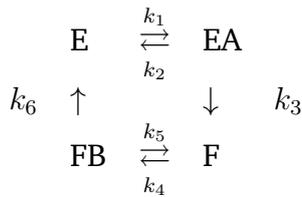
Les équations de chaque droite sont obtenues à partir de deux points A (x_1) B (x_2) grâce aux formules suivantes : $a = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$ et $b = y_1 - ax_1$. Par exemple, si on fixe $H_2O_2 = 1mM$, on peut calculer à partir des points A ($\frac{0,4}{0,03}$) B ($\frac{0,05}{0,006}$), on calcule :

$$a = \frac{0,006 - 0,03}{0,05 - 0,4} = 0,067 \text{ et } b = 0,006 - 0,05 * 0,067 = 0,0037$$

L'équation de la droite est donc : $y = 0,067x + 0,0037$

D'après les graphiques primaires, nous n'obtenons que des droites (les coefficients de corrélations sont tous supérieurs à 0,95), l'enzyme est donc Mickaélienne. Les graphiques primaires montrent que, pour chaque graphique, les droites sont parallèles. L'enzyme suit donc un mécanisme bibi ping pong.

MODÈLE



EQUATION : $K_M^A = \frac{k_6(k_2+k_3)}{k_2(k_3+k_6)}$; $K_M^B = \frac{k_3(k_5+k_6)}{k_4(k_3+k_6)}$; $V_{max} = \frac{k_6k_2}{(k_3+k_6)} * [E]_0$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M^A}{V_{max}[A]} + \frac{K_M^B}{V_{max}[B]} \quad (4.1)$$

FIGURE 4.1 – Mécanisme réactionnel et équation pour la peroxydase

b. Détermination des paramètres cinétiques de la réaction

A partir des graphiques 1 et 2, nous traçons les graphiques secondaires ordonnés à l'origine du graphique 1 en fonction de l'inverse de la concentration en H_2O_2 (graphique3) et ordonnés à l'origine du graphique 2 en fonction de l'inverse de la concentration en gaiacol (graphique 4)

$$o.ographique1 = \frac{K_s^{H_2O_2}}{V_{max}[(H_2O_2)]} + \frac{1}{V_{max1}}$$

$$o.ographique2 = \frac{K_s^{gaiacol}}{V_{max}[(gaiacol)]} + \frac{1}{V_{max1}}$$

On peut alors réaliser la régression linéaire $o.ographique1 = f(\frac{1}{(H_2O_2)})$ (graphique 3) et $o.ographique2 = f(\frac{1}{(gaiacol)})$.

Obtention de la V_{max}

On aura $\frac{1}{V_{max}^1}$ comme ordonnée à l'origine de ces deux graphiques secondaires.

A partir des deux graphiques, on lit :

- sur le graphique 3 : $y = -0,002$ quand $x = 0$ donc $V_{max} = 500$ mole de substrat/mole d'enzyme/s

- sur le graphique 4 : $y = -0,002$ quand $x = 0$ donc $V_{max} = 500$ mole de substrat/mole d'enzyme/s

L'équation du graphique 3 est : $0,001x + 0,0023$ donc $V_{max} = \frac{1}{0,0023} = 434$ mole de substrat/mole d'enzyme/s.

L'équation du graphique 4 est : $0,066x + 0,0026$ donc $V_{max} = \frac{1}{0,0026} = 384$ mole de substrat/mole d'enzyme/s.

Nous obtenons deux V_{max} du même ordre de grandeur, on garde comme valeur la moyenne des deux valeurs obtenues soit 409 mole de substrat/mole d'enzyme/s.

Obtention des K_M

L'intersection entre la droite et l'axe des abscisses dans les graphiques secondaires est $-\frac{1}{K_M}$.

Le graphique 3 permet de déterminer $-\frac{1}{K_M^{H_2O_2}}$. Pour $y = 0$, on a $x = -\frac{1}{K_M^{H_2O_2}}$:

- On lit pour $y = 0$, $x = -2$ donc $K_M^{H_2O_2} = 0,5$ mM.

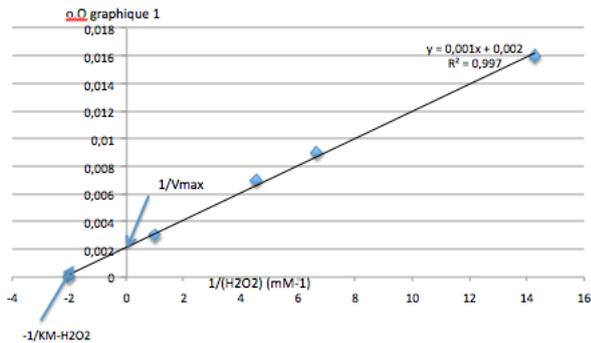
- On calcule : Pour $y=0$, on a $0,001x + 0,0023 = 0$ donc $x = \frac{-0,0023}{0,001}$ donc $x = -2,3$ donc $K_M^{H_2O_2} = 0,43$ mM.

Le graphique 4 permet de déterminer $-\frac{1}{K_M^{gaiacol}}$. Pour $y=0$, on a $x = -\frac{1}{K_M^{gaiacol}}$ soit

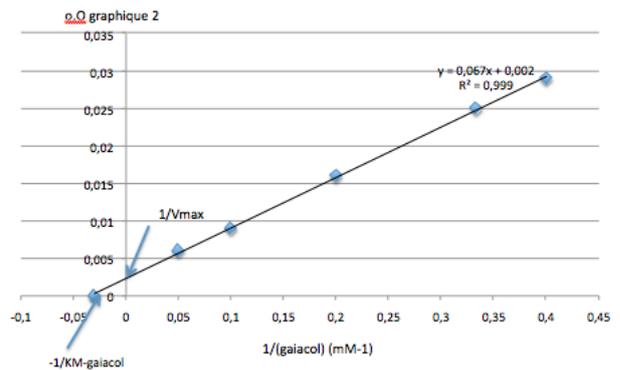
- On lit pour $y=0$, $x=-0,03$ donc $K_M^{H_2O_2} = 33$ mM.

- On calcule : $0,066x+0,0026 = 0$ donc $x = \frac{-0,0026}{0,066}$ donc $x = -0,039$ donc $K_M^{gaiacol} = 25,6$ mM.

Graphique 3 : Graphique secondaire : ordonné à l'origine du graphique 1 en fonction de l'inverse de la concentration en eau oxygénée



Graphique 4 : Graphique secondaire : ordonné à l'origine du graphique 2 en fonction de l'inverse de la concentration en gaiacol



Finalement, la peroxydase de raifort est une enzyme Mickaelienne qui suit un mécanisme bi-bi ping pong (figure 2) avec une V_{max} de 409 mole de substrat/mole d'enzyme/s et une affinité plus forte pour le H₂O₂, $K_M^{H_2O_2} = 0,43$ mM, qu'epour la gaiacol, $K_M^{gaiacol} = 25,6$ mM.

Exercice 3 : Etude de l'adénosine 5'-Phosphosulfate kinase - facultatif

A. Énoncé :

L'adénosine 5'-Phosphosulfate kinase est une enzyme qui participe à l'incorporation de sulfate dans les molécules organiques. La réaction est étudiée dans le sens de la phosphorylation de l'ADP à partir de l'adénosine 3'-phosphate-5' phosphosulfate (PAPS).

(ADP) mM	(PAPS) μM			
	3,2	5,12	10,24	192
0,33	0,017	0,025	0,042	0,117
0,5	0,021	0,03	0,049	0,119
1	0,027	0,038	0,059	0,122
5	0,034	0,047	0,07	0,124

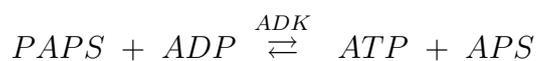
TABLE 4.3 – Vitesses initiales de réaction (en mM de substrat consommé par min) en fonction des concentrations en PAPS et en ADP.

Question 1

Donnez le mécanisme réactionnel ainsi que les constantes cinétiques associées.

B. Correction :

La réaction enzymatique de l'adénosine 5'-phosphosulfate kinase (ADK), impliquée dans l'incorporation de sulfates dans les molécules organiques, est étudiée par une méthode de cinétique dite à l'état stationnaire. Cela signifie que les vitesses de réactions sont mesurées pendant la phase stationnaire de la réaction enzymatique et ce dans différentes conditions. La réaction étudiée est la suivante :



a. Obtention du mécanisme réactionnel

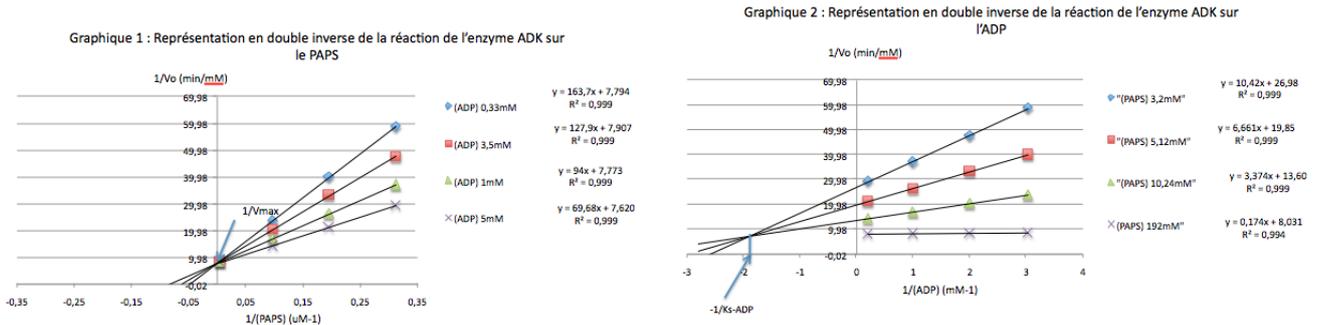
Les expériences effectuées ont permis d'obtenir les vitesses initiales de réaction pour différentes concentrations en *PAPS* et en *ADP*. L'enzyme étant supposée Mickaélienne, il est plus précis d'étudier sa cinétique selon la méthode de Lineweaver et Burk qui nécessite de calculer les inverses des vitesses initiales et des concentrations en substrats.

A partir de ces données, nous pouvons tracer **deux graphiques primaires**. Dans le premier, nous fixons les concentrations en *ADP* pour analyser les droites de regression $\frac{1}{v_o} = f\left(\frac{1}{(PAPS)}\right)$ (graphique 1) et dans le second nous fixons les concentrations en *PAPS* pour analyser les droites de regression $\frac{1}{v_o} = f\left(\frac{1}{(ADP)}\right)$ (graphique 2).

Les équations de chaque droite sont obtenues à partir de deux points A $\left(\begin{smallmatrix} x_1 \\ y_1 \end{smallmatrix}\right)$ B $\left(\begin{smallmatrix} x_2 \\ y_2 \end{smallmatrix}\right)$ grâce aux

$\frac{1}{v_0}$ en mn/mM		$\frac{1}{(PAPS)}$ en μM^{-1}			
		0,3125	0,1953	0,0976	0,0052
$4 * \frac{1}{(ADP)}$ en mM ⁻¹	3,0303	58,823	40	23,809	8,5470
	2	47,619	33,333	20,408	8,4033
	1	37,0370	26,3157	16,9491	8,19672
	0,2	29,411	21,27	14,285	8,06451

TABLE 4.4 – Valeurs des inverses des vitesses initiales et des concentrations en substrats obtenus pour l'étude cinétique de l'enzyme ADK



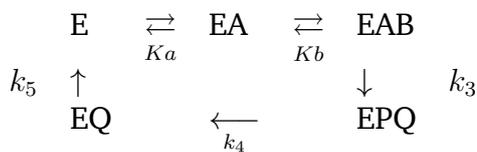
formules suivantes : $a = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$ et $b = y_1 - ax_1$. Par exemple, si on fixe $ADP = 0,33mM$, on peut calculer à partir des points A $(0,31)$ B $(0,005)$, on calcule :

$$a = \frac{8,54 - 58,8}{0,005 - 0,31} = 163 \text{ et } b = 8,54 - 0,005 * 163 = 27$$

L'équation de la droite est donc : $y = 163x + 27$

D'après les graphiques primaires, nous n'obtenons que des droites (les coefficients de corrélations sont tous supérieurs à 0,95), l'enzyme est donc Mickaëlienne. Sur le graphique 1 (en fonction de PAPS), les droites se croisent sur l'axe des ordonnées alors que sur le graphique 2 (en fonction d'ADP) les droites se croisent en dehors des axes. L'enzyme suit donc un mécanisme bi-bi ordonné au quasi équilibre avec l'ADP en premier substrat.

MODÈLE



$$K_s^A = \frac{k_{-1}}{K_2} ; K_M^A = \frac{k_3}{K_1} ; K_M^B = \frac{k_{-2} + K_3}{K_2} ; V_{max} = k_3 * [E]_0$$

EQUATION : Soit K_a et K_b les constantes d'équilibres des réactions de fixation de A et de B.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_b}{V_{max}[B]} + \frac{K_a K_b}{V_{max}[A][B]} \quad (4.2)$$

FIGURE 4.2 – Mécanisme réactionnel et équation pour l'enzyme ADK

b. Détermination des paramètres cinétiques de la réaction

Obtention de la V_{max}

A partir du graphique 1, la V_{max} peut être déterminée. On effectue, les droites se croisent sur l'ordonnée à l'origine en $\frac{1}{V_{max}}$.

- Sur le graphique 1, on lit pour $x=0$ $y=9,9$ donc $V_{max} = 0,101$ mM/mn

- On calcule à partir des équations. L'ordonnée à l'origine des droites de ce graphique est en moyenne de 7,8. La V_{max} est donc égale à $1/7,8$ soit $0,13$ mM/mn.

Obtention des K_s

Grace à l'équation des droites du graphique 2, on peut montrer que les droites se croisent à un point d'abscisse $-\frac{1}{K_{sADP}}$. En ce point, les ordonnées sont égales quelque soit la concentration en substrat.

-A partir du graphique 2, on lit : $x=-1,8$ pour l'abscisse du point d'intersection des droites, donc $K_{sADP} = 0,55$ mM.

-A partir des équations des deux droites extrêmes du graphique primaire, on calcule :

$$10,428x + 26,98 = 0,174x + 8$$

$$\text{donc } x = \frac{26,98-8}{0,174-10,428} = -1,85$$

$$\text{On a donc } K_{sADP} = -\frac{1}{-1,85} = 0,54 \text{ mM}$$

A partir du graphique 2, nous traçons le graphique secondaire ordonnées à l'origine du graphique 2 en fonction de l'inverse de la concentration en PAPS (graphique3).

$$o.\text{graphique2} = \frac{K_s^{PAPS}}{V_{max}[(PAPS)]} + \frac{1}{V_{max1}}$$

On peut alors réaliser la régression linéaire $o.\text{graphique2} = f(\frac{1}{(PAPS)})$.

L'intersection entre la droite et l'axe des abscisses dans les graphiques secondaires est $-\frac{1}{K_s^{PAPS}}$.

Le graphique 3 permet de déterminer $-\frac{1}{K_s^{PAPS}}$. Pour $y=0$, on a $x = -\frac{1}{K_M^{PAPS}}$ soit

- on lit : $x=-0,125$ pour $y=0$ donc $K_s^{PAPS} = 8$ mM.

- on calcule : $61,8x + 7,66 = 0$ donc $x = \frac{-7,66}{61,8}$ donc $x = -0,124$ donc $K_M^{PAPS} = 8$.

Finalement, l'ADK est une enzyme Mickaëlienne qui suit un mécanisme bibi ordonné au quasi équilibre avec comme premier substrat l'ADP (figure 3). Sa V_{max} est égale à $0,13$ mM/mn avec une meilleure affinité pour l'ADP, $K_{sADP} = 0,54 \text{ mM}$, que pour le PAPS, $K_M^{PAPS} = 8 \mu\text{M}$.

Graphique 3 : Graphique secondaire : ordonnée à l'origine du graphique 2 en fonction de l'inverse de la concentration en PAPS

