**TD spécial enzymologie B32**

**2012**

**Etude des protéases à sérine C1s et MASP-2**

***CONSIGNES :***

*Vous devez respecter les méthodes données en travaux dirigés. Vos graphiques doivent comporter toutes les données qui ont été exigées en TD.*

*Equations de droites : Les données ici sont « parfaites », une vraie droite moyenne n’est pas exigée. Calculez vos équations de droite en n’utilisant que deux points pour la pente et un seul pour l’ordonnée à l’origine. Le r2 de chacune de ces droites est 0,9999999.*

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.

**Première partie : Comparaison de l’efficacité des deux enzymes**

Le tableau ci-dessous donne les valeurs de vitesse initiale obtenue pour l’enzyme MASP-2 en présence de C4.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **MASP-2** | | | | | |
| (C4) nM | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 |
| v0 nM.s-1 | 4,16666667 | 5,88235294 | 7,40740741 | 8,10810811 | 8,5106383 |

Tableau 1 : Vitesses initiales de réaction en nM.s-1 de MASP-2 sur C4. La concentration en enzyme est de 2nM.

Les mêmes expériences ont été réalisées pour C1s ainsi que pour le substrat C2. Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **C1s** | | **MASP-2** | |
|  | **C4** | **C2** | **C4** | **C2** |
| **Vmax (nM.s-1)** | 9,4 | 10,6 |  | 9,8 |
| **Km (nM)** | 1999 | 12340 |  | 6501 |
| **kcat s-1** | 4,7 | 5,3 |  | 4,9 |
| **Ec** | 0,0023 | 0,0004 |  | 0,00075 |

Tableau 2 : Constantes cinétiques pour chacune des enzyme MASP-2 et C1s sur leurs deux substrats C4 et C2.

1. Analysez les résultats sur le tableau 1.
2. Compléter le tableau 2.
3. Comparez les deux enzymes et les deux substrats. (ne me faites pas un roman !!)

**Deuxième partie : A la recherche d’un inhibiteur**

La trop forte activation de ces enzymes peut mener à des inflammations chroniques à la destruction des tissus. L’utilisation d’un inhibiteur serait un moyen efficace de soigner ces pathologies inflammatoires.

Le tableau ci-dessous donne les résultats obtenus pour un inhibiteur de MASP-2 prometteur.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1/Vi | 1/C4 nM-1 | | | | |
| Inhibiteur nM | 0,02 | 0,01 | 0,005 | 0,00333333 | 0,0025 |
| 0 |  |  |  |  |  |
| 4000 | 0,99 | 0,61 | 0,42 | 0,35 | 0,32 |
| 10000 | 1,68 | 1,05 | 0,73 | 0,62 | 0,57 |

Tableau 3 : On donne l’inverse de la Vi (s.nM-1) en fonction de l’inverse de la concentration en C4 pour trois concentrations en inhibiteur.

1. Complétez le tableau et analysez les données. (Vous ajouterez les droites primaires sur le graphique de la question 1).
2. Quelle concentration en inhibiteur doit-on utiliser pour n’avoir que 1% d’activité résiduelle (1% de Vmax) de l’enzyme ?



