

CHAPITRE

3

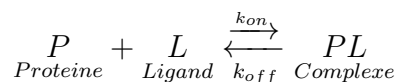
TD4 : MESURE DES INTERACTIONS PROTÉINES - LIGANDS

Les exercices 1 à 3 sont obligatoires. Vous devez les avoir préparé. Pour l'exercice 1, des vidéos sont disponibles en ligne afin de vous permettre de reprendre les démonstrations.

Exercice 1 : Équations liées aux interactions non coopératives protéines-ligand

Question 1

A partir de vos connaissances en chimie des solutions, démontrez l'équation de fixation *Ligand – lie* = $f(\text{ligand} - \text{libre})$ de la réaction suivante :



Question 2

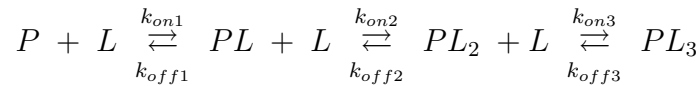
Exprimez de la même façon la fonction de saturation associée.

Question 3

Démontrez la linéarisation de l'équation pour la méthode de Scatchard

Question 4

Démontrez l'équation linéarisée par la méthode de scatchard pour la réaction suivante :



Exercice 2 : Étude de la liaison du tryptophane sur un enzyme

On étudie une enzyme du métabolisme du tryptophane. L'un des substrats de l'enzyme est le tryptophane lui-même dont on veut déterminer le nombre de site(s) de fixation. Après incubation de l'enzyme (à une concentration constante de $5 \cdot 10^{-5}$ M) avec des concentrations variables de tryptophane marqué au ^{14}C , on trouve :

$[^{14}C - Trp]_{lié} (M)$	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-6}$
$[^{14}C - Trp]_{libre} (M)$	$0,56 \cdot 10^{-6}$	$1,23 \cdot 10^{-6}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$	$11,7 \cdot 10^{-6}$	$43,7 \cdot 10^{-6}$

TABLE 3.1 – Fixation du tryptophane sur son enzyme

A partir de ces valeurs, calculez le nombre de site(s) de fixation du tryptophane par molécule d'enzyme, et la constante de dissociation K_d pour le complexe enzyme-tryptophane.

Exercice 3 : Etude par dialyse à l'équilibre de la fixation

L'adénylate kinase convertit l'AMP en ADP par transfert d'un groupement phosphoryle de l'ATP. On étudie la fixation de l'AMP par dialyse à l'équilibre. A $t = 0$:

- le compartiment A ($40 \mu L$) contient l'adénylate kinase ($80 \mu g$) ;
- le compartiment B ($40 \mu L$) contient l'AMP à différentes concentrations.

A l'équilibre, on prélève $25 \mu L$ de chaque compartiment et les concentrations en AMP sont mesurées. Le tableau suivant en donne les valeurs obtenues :

$[AMP]_A (\mu M)$	10,5	44	70	120	212	280
$[AMP]_B (\mu M)$	4	20	36	74	156	220

TABLE 3.2 – Fixation de l'AMP

A partir de ces valeurs, calculez le nombre de site(s) de fixation de l'AMP par molécule d'enzyme, et la constante de dissociation K_d . La masse molaire de l'adénylate kinase est de 27500 Da.

Exercice 4 : La fixation du calcium sur la désoxyribonucléase

La fixation du calcium sur la désoxyribonucléase est étudiée par filtration sur gel à pH 9. On peut ainsi déterminer le nombre d'ions Ca^{2+} fixés par molécule d'enzyme pour différentes concentrations initiales de calcium. Le tableau suivant en donne les valeurs :

$[Ca^{2+}]_{libre} (\mu M)$	2,5	5	10	20	50	100	200	500
Nombre d'ions fixés par molécule d'enzyme	0,25	0,4	0,75	1,25	2,20	3	3,4	4

TABLE 3.3 – Fixation du calcium

A partir de ces valeurs, calculez le nombre de site(s) de fixation du calcium par molécule d'enzyme, et la constante de dissociation K_d .

Exercice 5 : Fixation de la luciférine sur la luciférase

La fixation de la déshydroluciférine (DHL) sur la luciférase est étudiée par mesure de fluorescence. On peut ainsi déterminer le nombre de molécules de DHL fixées par molécule d'enzyme pour différentes concentrations initiales de DHL. Le tableau suivant en donne les valeurs obtenues :

$[DHL]_{libre} (\mu M)$	0,6	0,75	1,4	2,25	3	4,5	8	20
Nombre de DHL par enzyme	0,44	0,52	0,80	1,03	1,17	1,36	1,58	1,81

TABLE 3.4 – Fixation de la DHL

A partir de ces valeurs, calculez le nombre de site(s) de fixation de la DHL par molécule d'enzyme, et la constante de dissociation K_d .