

CHAPITRE

3

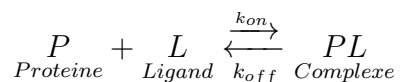
TD4 : MESURE DES INTERACTIONS PROTÉINES - LIGANDS

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 :

$$P + L \overset{k_{on1}}{\underset{k_{off1}}{\rightleftharpoons}} PL + L \overset{k_{on2}}{\underset{k_{off2}}{\rightleftharpoons}} PL_2 + L \overset{k_{on3}}{\underset{k_{off3}}{\rightleftharpoons}} PL_3$$

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

A. Énoncé :

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 $5 \cdot 10^{-6}$ M) avec des concentrations variables de tryptophane marqué au ^{14}C , on trouve :

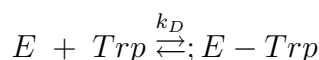
$[^{14}\text{C} - \text{Trp}]_{\text{lié}} \text{ (M)}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-6}$
$[^{14}\text{C} - \text{Trp}]_{\text{libre}} \text{ (M)}$	$0,56 \cdot 10^{-6}$	$1,23 \cdot 10^{-6}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$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

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.

B. Correction :

La réaction de fixation du tryptophane sur une enzyme est étudiée à l'équilibre :



A. Mécanisme de fixation

La fixation du tryptophane sur l'enzyme est supposée non coopérative. Les résultats sont analysés par la méthode de Scatchard.

TABLE 3.2 – Fixation du tryptophane sur son enzyme. $\bar{\nu} = \frac{\text{Trp-lie}}{P_{\text{tot}}}$

$[^{14}\text{C} - \text{Trp}]_{\text{lié}} \text{ (M)}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-6}$
$[^{14}\text{C} - \text{Trp}]_{\text{libre}} \text{ (M)}$	$0,56 \cdot 10^{-6}$	$1,23 \cdot 10^{-6}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$	$11,7 \cdot 10^{-6}$	$43,7 \cdot 10^{-6}$
$\bar{\nu}$	0,2	0,4	0,8	1,1	1,4	1,8
$\text{frac} \nu \text{Trp} - \text{libre}$	357140	325200	235290	183330	119650	41200

L'équation de la droite $\frac{\bar{\nu}}{\text{Trp-libre}} = f(\bar{\nu})$ est calculée de la façon suivante :

$$a = \frac{y_B - y_A}{x_B - x_A} = \frac{357140 - 41200}{0,2 - 1,8} = -199267$$

$$b = y_B - a * x_B = 357140 + 199267 * 0,2 = 399600$$

La régression de Scatchard est une droite d'équation $y = -199267x + 399600$ ($r^2 > 0,95$). La fixation du tryptophane est donc non coopérative.

B. Les constantes

A l'intersection de la droite de régression avec l'axe des abscisses, x est égale au nombre de sites. A cette intersection, la valeur lue est 2. Afin de confirmer ce résultat, le calcul de cette intersection est calculée à partir de l'équation de la droite :

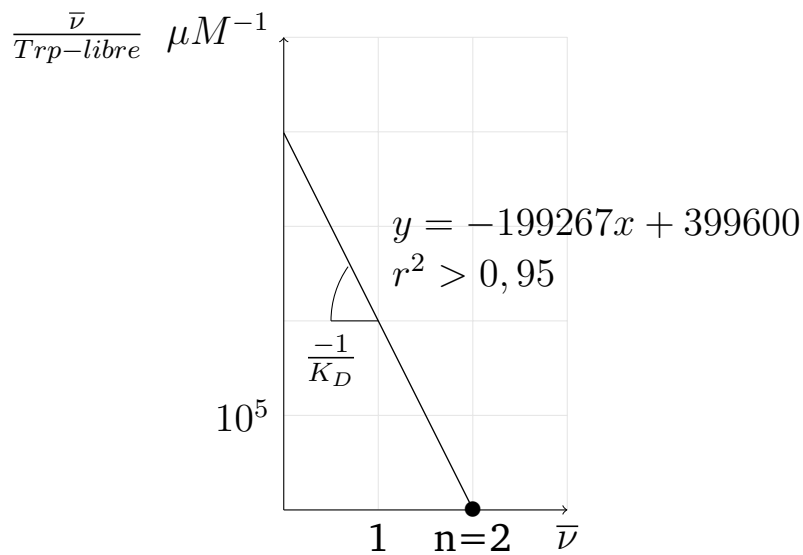


FIGURE 3.1 – Représentation de Scatchard de la fixation du tryptophane sur un enzyme

Pour $y=0$, $-199267x + 399600 = 0$ donc $x = \frac{-399600}{-199267} = 2$

La pente de la droite vaut $\frac{-1}{K_D}$ d'après la régression de Scatchard donc $K_D = \frac{1}{199267} = 5 \cdot 10^{-6} M$.

L'enzyme possède donc deux sites de fixation du tryptophane équivalents indépendant avec un K_D de $5 \mu M$.

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

A. Énoncé :

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

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

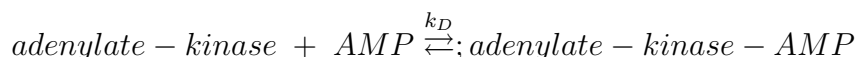
$[AMP]_A$ (μ M)	10,5	44	70	120	212	280
$[AMP]_B$ (μ M)	4	20	36	74	156	220

TABLE 3.3 – 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.

B. Correction :

La réaction étudiée à l'équilibre est la suivante :



La fixation de l'AMP sur l'enzyme est supposée non coopérative. Les résultats sont analysés par la méthode de Scatchard.

A. Mécanisme de fixation

Les résultats de dialyse à l'équilibre donne les concentrations en AMP dans les compartiments A et B à l'équilibre de la réaction : soit à l'équilibre de la fixation de l'AMP sur l'enzyme et à l'équilibre de la diffusion de l'AMP du compartiment B vers le compartiment A. A l'équilibre de diffusion, la concentration en AMP libre dans le compartiment A et dans le compartiment sont donc identiques. Dans le compartiment A, l'AMP existe sous deux formes : libre et liée.

$$AMP_A = AMP_{libre} + AMP_{lie} \text{ et } AMP_B = AMP_{libre}$$

donc :

$$AMP_{libre} = AMP_B \text{ et } AMP_{lie} = AMP_A - AMP_B$$

Afin de faciliter la lecture graphique et les calculs, les données seront traitées en utilisant $\bar{\nu} = \frac{AMP_{lie}}{P_{tot}}$. Pour cela la concentration en protéines totale est calculée :

$$P_{tot} = \frac{\text{masse}_{prot}}{V_A * MM_{prot}} = \frac{80 * 10^{-6}}{40 * 10^{-6} * 27500} = 70 \mu M$$

Les résultats des calculs sont consignés dans le tableur ci-dessous.

TABLE 3.4 – Fixation de l'AMP sur l'adénylate kinase

$[AMP]_{libre} (\mu M)$	4	20	36	74	156	220
$[AMP]_{lie} (\mu M)$	6,5	24	34	46	56	60
$\bar{\nu}$	0,093	0,342	0,48	0,66	0,8	0,86
$\frac{\bar{\nu}}{[AMP]_{libre}} (\mu M^{-1})$	0,023	0,017	0,013	0,009	0,005	0,0038

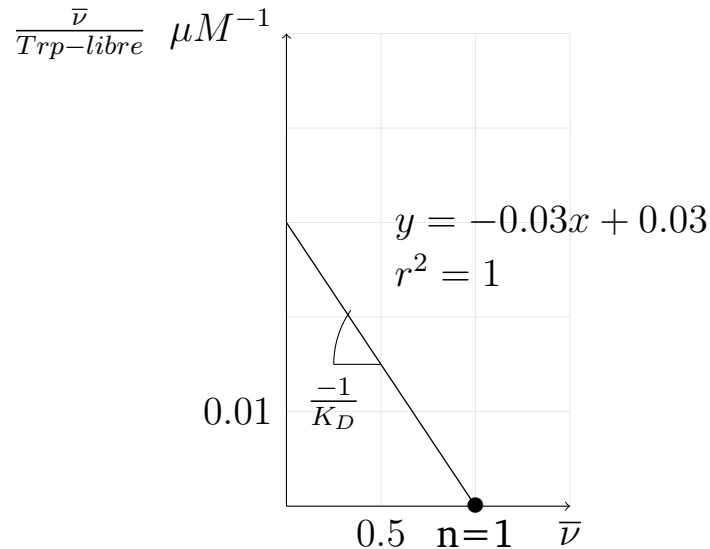


FIGURE 3.2 – Représentation de Scatchard de la fixation de l'AMP sur l'adénylate kinase

L'équation de la droite $\frac{\bar{\nu}}{[AMP]_{libre}} = f(\bar{\nu})$ est calculée de la façon suivante :

$$a = \frac{y_B - y_A}{x_B - x_A} = \frac{0.023 - 0.0038}{0.093 - 0.86} = -0.03$$

$$b = y_B - a * x_B = 0.023 + 0.03 * 0,093 = 0.03$$

La régression de Scatchard est une droite d'équation $y = -0.03x + 0.03$ ($r^2 > 0,95$). La fixation de l'AMP est donc non coopérative.

B. Calcul des constantes

A l'intersection de la droite de régression avec l'axe des abscisses, x est égale au nombre de sites. A cette intersection, la valeur lue est 1. Afin de confirmer ce résultat, le calcul de cette intersection est calculée à partir de l'équation de la droite :

$$\text{Pour } y=0, -0.03x + 0.03 = 0 \text{ donc } x = \frac{0.03}{0.03} = 1$$

La pente de la droite vaut $\frac{-1}{K_D}$ d'après la régression de Scatchard donc $K_D = \frac{1}{0.03} = 40 * 10^{-6} M$.

L'enzyme possède donc un site de fixation de l'AMP avec un K_D de 40 μM .

Exercice 4 : La fixation du calcium sur la désoxyribonucléase

A. Énoncé :

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 :

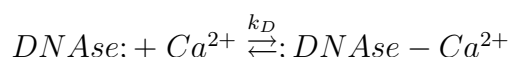
$[Ca^{2+}]_{libre} (\mu M)$	2,5	5	10	20	50	100	200	500
Nombre d'ions fixés par molécule d'enzyme	0,25	0,4	0,75	1,25	2,20	3	3,4	4

TABLE 3.5 – 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 Kd.

B. Correction :

La réaction de fixation du calcium sur la desoxyribonucléase est étudiée à l'équilibre :



La fixation du calcium sur l'enzyme est supposée non coopérative. Les résultats sont analysés par la méthode de Scatchard.

A.Mécanisme de fixation

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

TABLE 3.6 – Fixation du calcium sur un enzyme

$[Ca^{2+}]_{libre} (\mu M)$	2,5	5	10	20	50	100	200	500
Nombre d'ions fixés par molécule d'enzyme $\bar{\nu}$	0,25	0,4	0,75	1,25	2,20	3	3,4	4
$\frac{\bar{\nu}}{[AMP]_{libre}} (\mu M^{-1})$	0,1	0,08	0,075	0,0625	0,044	0,03	0,017	0,008

L'équation de la droite $\frac{\bar{\nu}}{[AMP]_{libre}} = f(\bar{\nu})$ est calculée de la façon suivante :

$$a = \frac{y_B - y_A}{x_B - x_A} = \frac{0,1 - 0,008}{0,25 - 4} = -0,02$$

$$b = y_B - a * x_B = 0,1 + 0,02 * 0,25 = 0,09$$

La régression de Scatchard est une droite d'équation $y = -0,02x + 0,09$ ($r^2 > 0,95$). La fixation du calcium est donc non coopérative.

B. Calcul des constantes

A l'intersection de la droite de régression avec l'axe des abscisses, x est égale au nombre de sites. A cette intersection, la valeur lue est 4.5. Afin de confirmer ce résultat, le calcul de cette intersection est calculée à partir de l'équation de la droite :

$$\text{Pour } y=0, -0,02x + 0,09 = 0 \text{ donc } x = \frac{0,09}{0,02} = 4,5$$

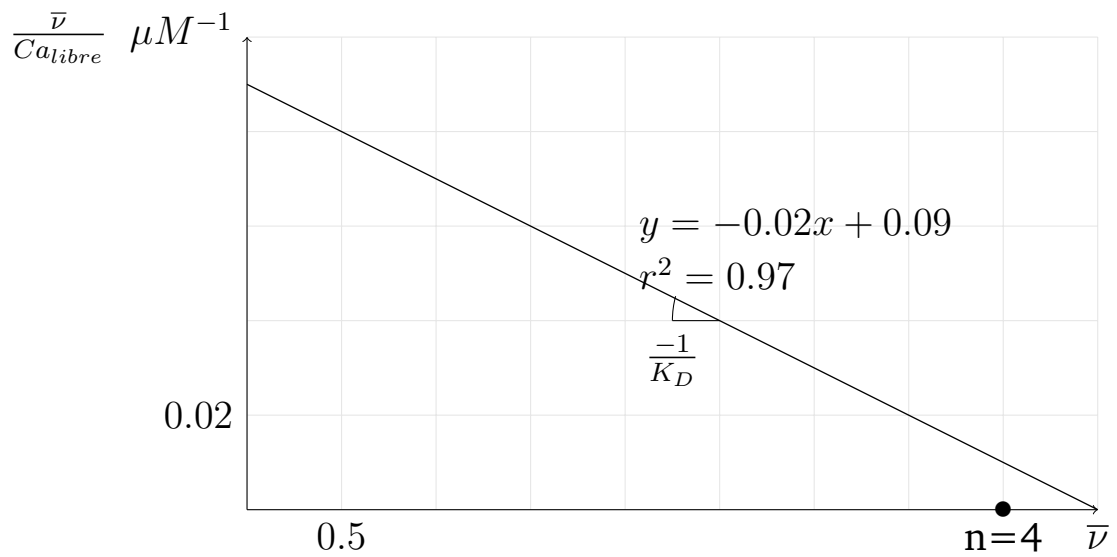


FIGURE 3.3 – Représentation de Scatchard de la fixation du calcium sur une DNase

La pente de la droite vaut $\frac{-1}{K_D}$ d'après la régression de Scatchard donc $K_D = \frac{1}{0.02} = 45.5 * 10^{-6} M$.

L'enzyme possède donc entre 4 et 5 site de fixation du Calcium indépendents équivalents avec un K_D de $45.5 \mu M$.

Exercice 5 : Fixation de la luciférine sur la luciférase

A. Énoncé :

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 :

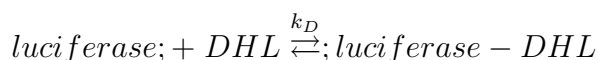
$[DHL]_{libre} (\mu M)$	0,6	0,75	1,4	2,25	3	4,5	8	20
Nombre de DHL par enzyme	0,44	0,52	0,80	1,03	1,17	1,36	1,58	,1,81

TABLE 3.7 – 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 .

B. Correction :

La réaction de fixation de la DHL sur la luciférase est étudiée à l'équilibre :



La fixation de la DHL sur la luciférase est supposée non coopérative. Les résultats sont analysés par la méthode de Scatchard.

A. Mécanisme de fixation

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

TABLE 3.8 – Fixation de la DHL sur la luciférase

$[DHL]_{libre} (\mu M)$	0,6	0,75	1,4	2,25	3	4,5	8	20
Nombre de DHL par enzyme $\bar{\nu}$	0,44	0,52	0,80	1,03	1,17	1,36	1,58	,1,81
$\frac{\bar{\nu}}{[DHL]_{libre}} (\mu M^{-1})$	0,733	0,693	0,571	0,45	0,39	0,30	0,1975	0,0905

L'équation de la droite $\frac{\bar{\nu}}{[DHL]_{libre}} = f(\bar{\nu})$ est calculée de la façon suivante :

$$a = \frac{y_B - y_A}{x_B - x_A} = \frac{0.733 - 0.0905}{0.44 - 1.81} = -0.47$$

$$b = y_B - a * x_B = 0.733 + 0.47 * 0,44 = 0.94$$

La régression de Scatchard est une droite d'équation $y = -0.47x + 0.94$ ($r^2 > 0,95$). La fixation du calcium est donc non coopérative.

B. Calcul des constantes

A l'intersection de la droite de régression avec l'axe des abscisses, x est égale au nombre de sites. A cette intersection, la valeur lue est 1.9. Afin de confirmer ce résultat, le calcul de cette intersection est calculée à partir de l'équation de la droite :

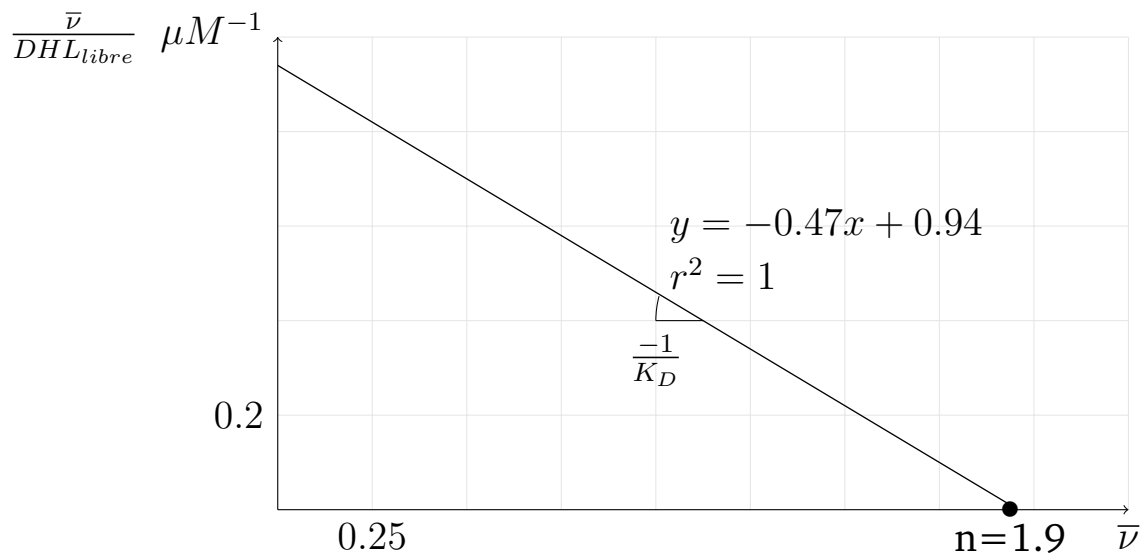


FIGURE 3.4 – Représentation de Scatchard de la fixation de la DHL sur la luciférase

Pour $y=0$, $-0.47x + 0.94 = 0$ donc $x = \frac{0.94}{0.47} = 1.9$

La pente de la droite vaut $-\frac{1}{K_D}$ d'après la régression de Scatchard donc $K_D = \frac{1}{0.47} = 2,1 \times 10^{-6} M$.

L'enzyme possède donc 2 sites de fixation de la DHL indépendants équivalents avec un K_D de $2.1 \mu M$.