

**Exercice 1 :****Fixation de la luciférine sur la luciférase - Représentation de Scatchard**

La fixation de la déshydroxyluciférine (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 :

DHL Libre ( $\mu\text{M}$ )	0.60	0.75	1.40	2.25	3.00	4.50	8.00	2.20
Nbre Molécules DHL Fixées /molécules d'enzyme	0.44	0.52	0.80	1.03	1.17	1.36	1.58	1.81

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  $K_D$ .

**Exercice 2:****FIXATION DU BROMURE D'ÉTHIDIUM SUR L'ADN - Représentation de Scatchard**

Bromure d'éthidium (Bet) interagit par interactions hydrophobes avec les cycles des bases des acides nucléiques (phénomène de "stacking"). Le Bet s'intercale donc entre 2 bases contigües sur chaque brin. Sous l'action de photons UV, il ré-émet de la fluorescence qui permet de visualiser les acides nucléiques sur un gel d'agarose par exemple. La fixation du Bet est étudiée par dialyse à l'équilibre avec de courts fragments d'ADN à une concentration de  $1 \mu\text{M}$ . Voir une description de l'expérience de la dialyse à l'équilibre. On peut ainsi déterminer le nombre de molécules de Bet fixées par fragment d'ADN pour différentes concentrations initiales de Bet. Le tableau suivant en donne les valeurs :

[Bet] libre ( $\mu\text{M}$ )	0,042	0,092	0,204	0,526	1,150
[Bet] (lié + libre) ( $\mu\text{M}$ )	0,292	0,590	1,204	2,531	4,150

A partir de ces valeurs, calculez le nombre de site(s) de fixation du Bet par fragment d'ADN, et la constante de dissociation.

**Exercice 3 :****Fixation du calcium sur la désoxyribonucléase - Représentation de Scatchard**

La fixation du calcium sur la désoxyribonucléase est étudiée par filtration sur gel à pH 9. On peut ainsi déterminer le nombre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  fixés par molécule d'enzyme pour différentes concentrations initiales de calcium.

Le tableau suivant en donne les valeurs :

[ $\text{Ca}^{2+}$ ] libre ( $\mu\text{M}$ )	2.5	5.00	10	20	50	100	200	500
nombre d'ions $\text{Ca}^{2+}$ fixés par molécule d'enzyme	0.25	0.40	0.75	1.25	2.20	3.00	3.40	4.00

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 4:**

La détermination de la concentration de ligand lié et ligand libre peut se faire indirectement en étudiant un paramètre expérimental. Exemple : la fluorescence d'une enzyme lorsqu'il est en présence de concentration saturante de apoenzyme. Connaissant ces deux paramètres on peu pour différents concentration de coenzyme lié.

Application : on étudie l'effet de la concentration de coenzyme [NADH, H<sup>+</sup>] sur la fixation de

ce coenzyme sur l'alcool déshydrogénase avec une concentration d'enzyme 3. 10<sup>-5</sup>M.

On obtient les résultats présentés dans le (tableau 01)

- Calculez le nombre de site de fixation de NADH, H<sup>+</sup> par molécules d'enzyme ?

- Le KD du complexe enzyme-coenzyme ?

[NADH, H <sup>+</sup> ] lié .10 <sup>-6</sup> M	[NADH, H <sup>+</sup> ] libre .10 <sup>-9</sup> M
9	5,67
8,40	4,12
7,65	2,83
5,52	1, 35
2,91	0,49

**Exercice 5:**

On étudié une enzyme de métabolisme de tryptophane, l'une des substrats (ligand) de cet enzyme est le tryptophane lui-même. On veut déterminer le nombre de site de fixation, après l'incubation de l'enzyme dont la concentration est constant 5.10<sup>-6</sup>M avec des concentrations variables de tryptophane marqué au C<sub>14</sub> en trouve les résultats présentés dans le (tableau) :

A partir de ces valeurs, calculer le nombre de site de fixation de tryptophane par moléculed'enzyme et le KD pour le complexe enzyme-tryptophane.

[Tryptophane] lié .10 <sup>-6</sup> M	[Tryptophane] .10 <sup>-9</sup> M libre
1	0,56
2	1,23
4	3,40
5,5	6
7	11,70
9	43,7