

Exercice 1 :

Fixation de la luciférine sur la luciférase - Représentation de Scatchard

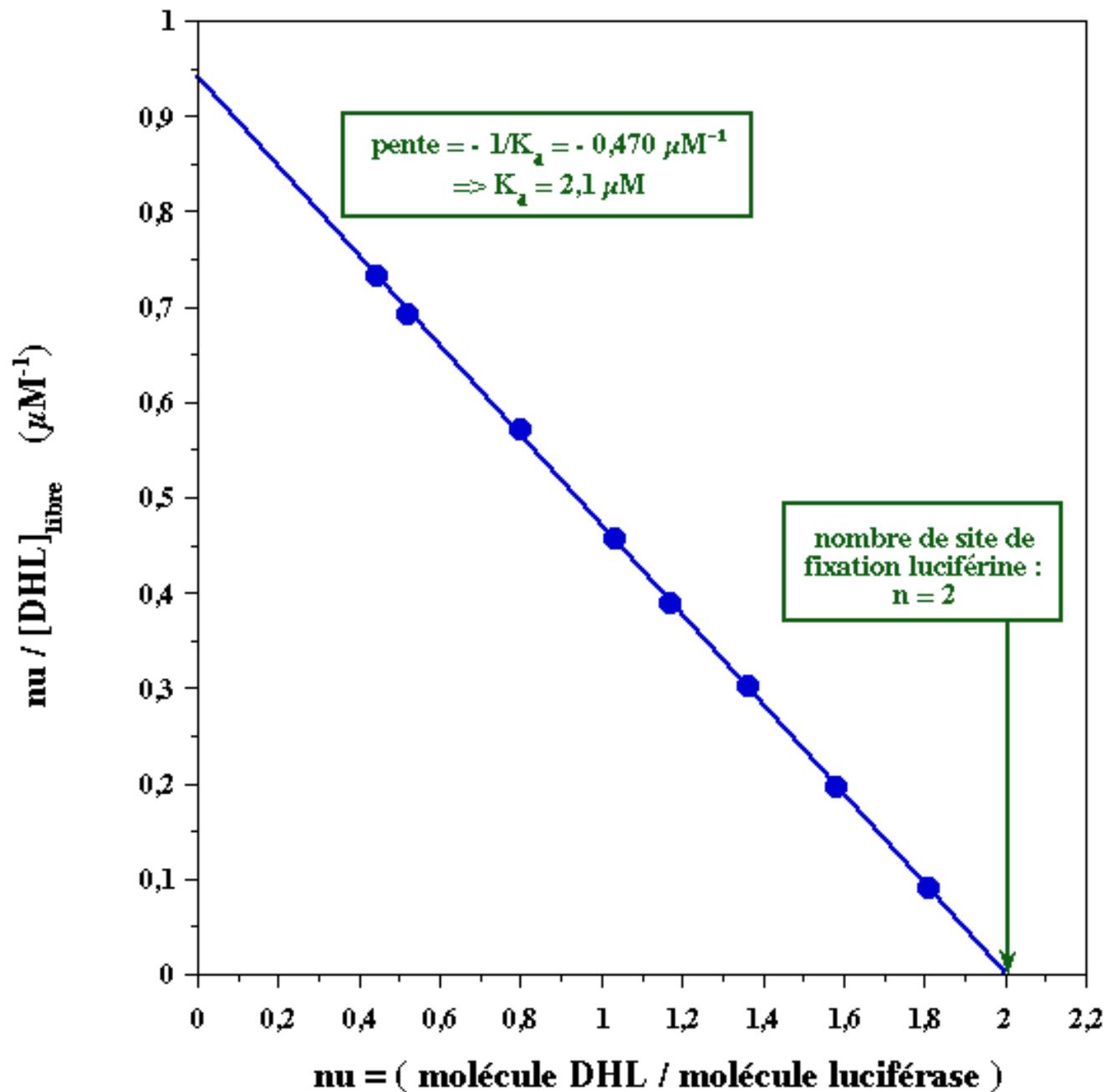
La fixation de la déshydroLuciférine (DHL) sur la luciférase est étudiée par mesure de fluorescence. On peut ainsi déterminer le nombre de molécules de DHL fixées par molécule d'enzyme pour différentes concentrations initiales de DHL. Le tableau suivant en donne les valeurs :

DHL Libre (μM)	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 .

$[DHL]_{\text{libre}} (\mu\text{M})$	$nu = (\text{DHL fixée} / \text{molécule d'enzyme})$	$y = (nu/[DHL]_{\text{libre}}) (\mu\text{M}^{-1})$
0.6	0.44	0.733
0.75	0.52	0.693
1.4	0.8	0.571
2.25	1.03	0.458
3	1.17	0.39
4.5	1.36	0.302
8	1.58	0.198
20	1.81	0.0905

Fixation luciférine sur la luciférase



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-emet 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 μM . 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 :

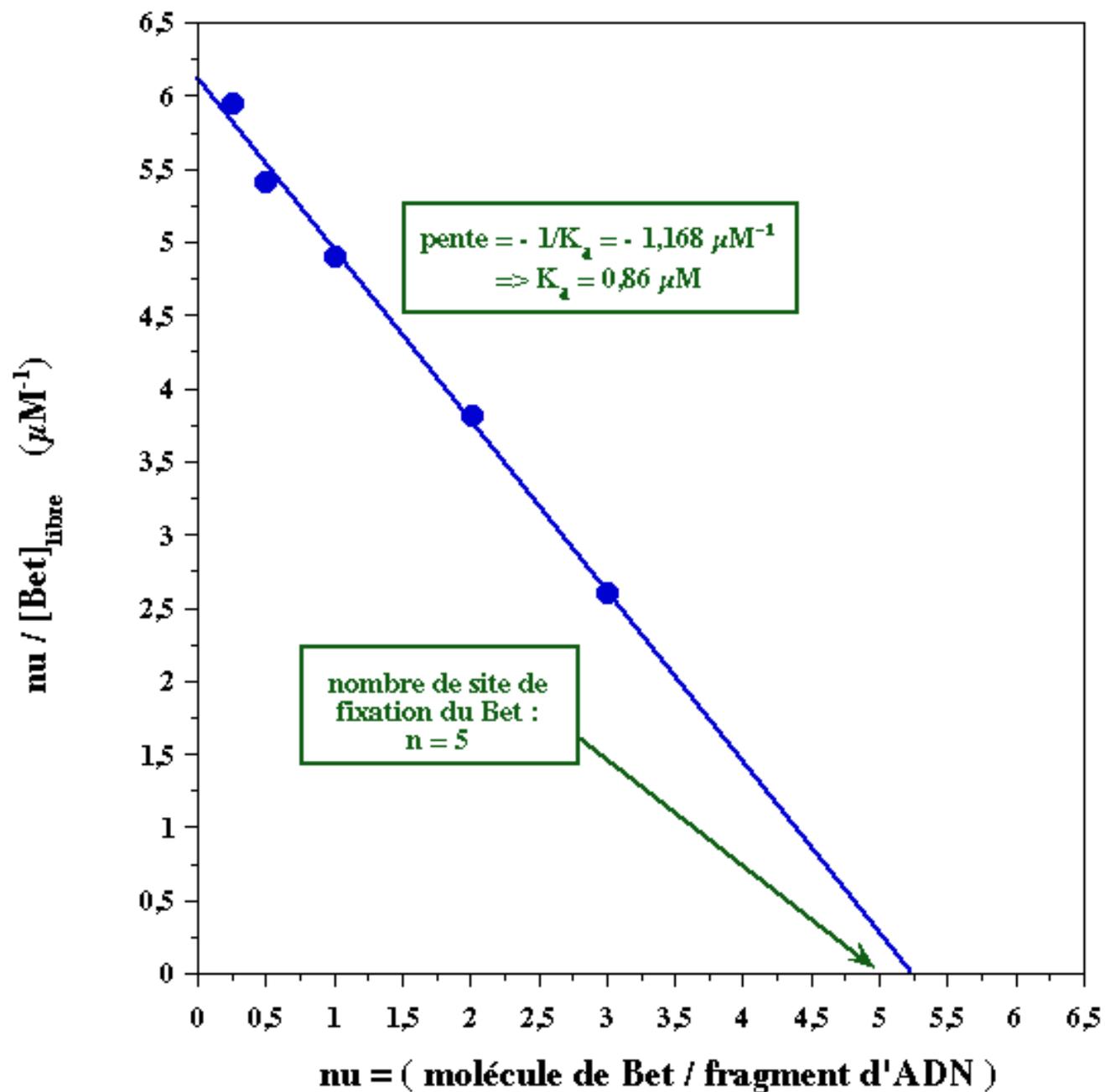
[Bet] libre (μM)	0,042	0,092	0,204	0,526	1,150
[Bet] (lié + libre) (μM)	0,292	0,590	1,204	2,531	4,150

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

$[\text{Bet}]_{\text{libre}} (\mu\text{M})$	$[\text{Bet}] (\text{libre} + \text{lié} = \text{côté ADN}) (\mu\text{M})$	$[\text{Bet}]_{\text{lié}} (\mu\text{M})$
0.042	0.292	0.25
0.092	0.59	0.498
0.204	1.204	1
0.526	2.531	2.005
1.15	4.15	3

$[\text{ADN}] (\mu\text{M})$	$nu = [\text{Bet}]_{\text{lié}} / [\text{ADN}]$	$y = (nu / [\text{Bet}]_{\text{libre}}) (\mu\text{M}^{-1})$
1	0.25	5.95
1	0.498	5.41
1	1	4.9
1	2	3.81
1	3	2.61

Fixation du bromure d'éthidium sur des fragments d'ADN



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 Ca^{2+} fixés par molécule d'enzyme pour différentes concentrations initiales de calcium.

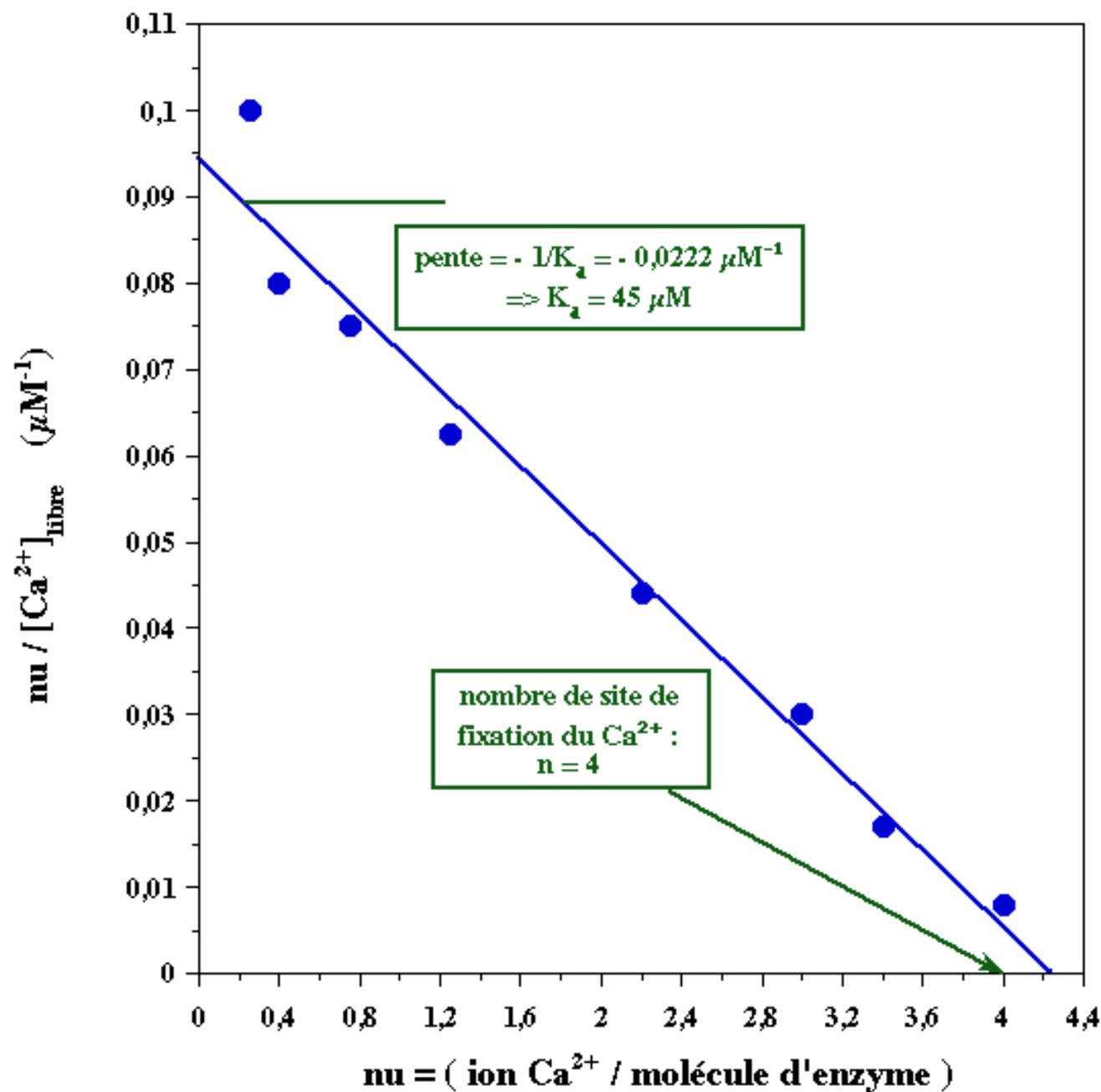
Le tableau suivant en donne les valeurs :

[Ca^{2+}] libre (μM)	2.5	5.00	10	20	50	100	200	500
nombre d'ions 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 .

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}} (\mu\text{M})$	$\text{nu} = (\text{ion Ca}^{2+} / \text{molécule d'enzyme})$	$\gamma = (\text{nu}/[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}) (\mu\text{M}^{-1})$
2.5	0.250	0.100
5	0.400	0.0800
10	0.750	0.0750
20	1.25	0.0625
50	2.20	0.0440
100	3.00	0.0300
200	3.40	0.0170
500	4.00	0.00800

Fixation Ca^{2+} sur la désoxyribonucléase



Exercice 5:

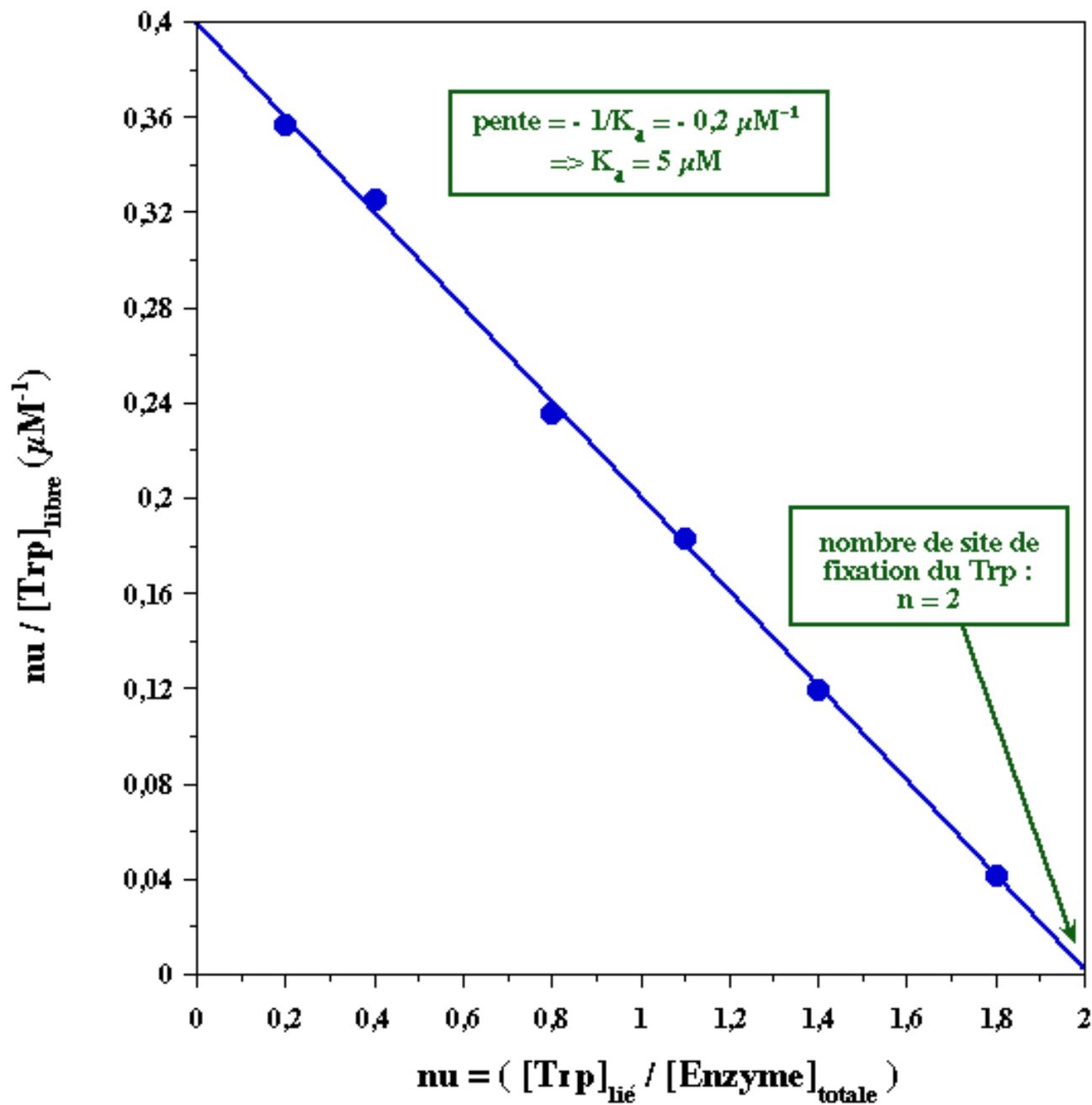
On étudié une enzyme de métabolisme de tryptophane, l'une des substrats (ligand) de cet enzyme est le tryptophane lui-même. On veut déterminer le nombre de site de fixation, après l'incubation de l'enzyme dont la concentration est constant $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ avec des concentrations variables de tryptophane marqué au C_{14} en trouve les résultats présentés dans le (tableau) :

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

[Tryptophane]_{lie} $\cdot 10^{-6} \text{M}$	[Tryptophane] $\cdot 10^{-9} \text{M}$ libre
1	0,56
2	1,23
4	3,40
5,5	6
7	11,70
9	43,7

[Trp] _{lié} (μM)	[Trp] _{libre} (μM)	[E] _{totale} (μM)	$\nu = ([\text{Trp}]_{\text{lié}} / [\text{E}]_{\text{totale}})$	$\gamma = (\nu / [\text{Trp}]_{\text{libre}}) (\mu\text{M}^{-1})$
1	0.560	5.00	0.200	0.357
2	1.23	5.00	0.400	0.325
4	3.40	5.00	0.800	0.235
5.5	6.00	5.00	1.10	0.183
7	11.7	5.00	1.40	0.120
9	43.7	5.00	1.80	0.0412

Fixation du tryptophane



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

[Voir une description de l'expérience de la dialyse à l'équilibre](#)

A $t = 0$:

- le compartiment A (40 μL) contient l'adénylate kinase (80 μg)
- le compartiment B (40 μL) contient l'AMP à différentes concentrations

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

[AMP] Compartiment A (μM)	10,5	44	70	120	212	280
[AMP] Compartiment B (μM)	4	20	36	74	156	220

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.

compartiment A : [AMP] (lié + libre) (μM)	compartiment B : [AMP] _{libre} (μM)	différence A - B : [AMP] _{lié} (μM)
10.5	4	6.5
44	20	24
70	36	34
120	74	46
212	156	56
280	220	60

[E] _{totale} (μM)	$nu = \frac{[\text{AMP}]_{\text{lié}}}{[\text{E}]_{\text{totale}}}$	$nu/[\text{AMP}]_{\text{libre}} (\mu\text{M}^{-1})$
72.7	0.0894	0.0224
72.7	0.33	0.0165
72.7	0.468	0.013
72.7	0.633	0.00855
72.7	0.77	0.00494
72.7	0.825	0.00375

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⁺] sur la fixation de

ce coenzyme sur l'alcool déshydrogénase avec une concentration d'enzyme 3. 10⁻⁵M.

On obtient les résultats présentés dans le (tableau 01)

- Calculez le nombre de site de fixation de NADH, H⁺ par molécules d'enzyme ?
- Le KD du complexe enzyme-coenzyme ?

[NADH, H⁺]_{lié} .10⁻⁶ M	[NADH, H⁺]_{libre} .10⁻⁹ M
9	5,67
8,40	4,12
7,65	2,83
5,52	1, 35
2,91	0,49

Exercice 01: (tableau 01)

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 peut pour différentes concentrations de coenzyme lié.

Application : on étudie l'effet de la concentration de coenzyme $[\text{NADH}, \text{H}^+]$ sur la fixation de ce coenzyme sur l'alcool déshydrogénase avec une concentration d'enzyme $3 \cdot 10^{-5} \text{M}$.

On obtient les résultats présentés dans le (tableau 01)

- Calculez le nombre de site de fixation de NADH, H^+ par molécules d'enzyme ?
- Le K_D du complexe enzyme-coenzyme ?

Tableau 01

$[\text{NADH}, \text{H}^+]_{\text{lie}} \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$[\text{NADH}, \text{H}^+]_{\text{libre}} \cdot 10^{-9} \text{ M}$	
9	5,67	
8,40	4,12	
7,65	2,83	
5,52	1,35	
2,91	0,49	

Exercice 03 : (tableau 03)

La fixation de NADP sur la glutathion réductase a été suivie à 500nm, le NADPH n'absorbe pas à cette longueur d'onde et la variation d'absorbance correspond a une attraction entre la flavine de glutathion réductase et NADPH ON travaille avec 2,5 mM d'enzyme et on a mesuré l'absorbance en présences de différent concentration de NADPH

- Calculez e nombre de site de fixation et le Kd du complexe.

[NADP] μM	Do			
0	0,2625			
1,25	0,325			
2,5	0,38			
3,75	0,43			
5	0,47			
7,5	0,53			
10	0,56			
15	0,605			
20	0,625			