

Exercice 6 : Les fixations de l'ADP et du GTP sur la glutamate déshydrogénase (GDH) (expériences 1 & 3) et sur les complexes binaires préformés GDH-ADP et GDH-GTP (expériences 2 & 4), sont étudiées par dialyse à l'équilibre en utilisant soit du ^{32}P -ADP, soit du ^{32}P -GTP.

Les cellules de dialyse contiennent initialement :

- compartiment A : la protéine complexée ou non à l'un des ligands
- compartiment B : un volume identique de tampon.

Pour chaque expérience, on ajoute à $t = 0$, des quantités croissantes de ligand radioactif dans le compartiment B

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Expérience 4
Compartiment A	[GDH] 30 μM	[GDH] 30 μM [GTP] 2 mM	[GDH] 30 μM	[GDH] 30 μM [ADP] 35 mM
Compartiment B	^{32}P -ADP	^{32}P -ADP	^{32}P -GTP	^{32}P -GTP

Au bout de 5 heures de dialyse, l'équilibre étant atteint, on prélève un volume identique dans chacun des compartiments et on compte la radioactivité. Le tableau suivant résume les valeurs obtenues pour chacune des 4 expériences réalisées :

Rapport :	Expérience 1 :	Expérience 2 :	Rapport :	Expérience 3 :	Expérience 4 :
$\frac{[^{32}\text{P-ADP}]_{\text{Lié}}}{[\text{GDH}]_{\text{Totale}}}$	$\frac{[^{32}\text{P-ADP}]_{\text{Libre}} (\mu\text{M})}{[\text{GDH}]_{\text{Totale}}}$	$\frac{[^{32}\text{P-ADP}]_{\text{Libre}} (\mu\text{M})}{[\text{GDH}]_{\text{Totale}}}$	$\frac{[^{32}\text{P-GTP}]_{\text{Lié}}}{[\text{GDH}]_{\text{Totale}}}$	$\frac{[^{32}\text{P-GTP}]_{\text{Libre}} (\mu\text{M})}{[\text{GDH}]_{\text{Totale}}}$	$\frac{[^{32}\text{P-GTP}]_{\text{Libre}} (\mu\text{M})}{[\text{GDH}]_{\text{Totale}}}$
1,2	0,65	2,5	0,3	4,3	15,6
2,4	1,75	6,6	0,6	10	35,7
3,6	3,92	16,7	1,2	26	95,2
4,2	6,08	23,3	1,8	60	214
4,8	10,38	40	2,4	166	571
5.40	42,20	90			

1. Déterminer le nombre de sites de fixation de l'ADP et du GTP sur l'enzyme libre et sur chacun des complexes préformés et les constantes de dissociation correspondantes $K_D(\text{E}, \text{GTP})$, $K_D(\text{E}, \text{ADP})$, $K_D(\text{E-ADP}, \text{GTP})$ et $K_D(\text{E-GTP}, \text{ADP})$. 2. Quel est l'effet de la fixation préalable de l'ADP sur celle du GTP et réciproquement ?