

### T. D. n° 3 (interactions protéine –ligand)

#### Exercice n° 1 :

La fixation du  $\text{NAD}^+$  sur la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de levure entraîne la fluorescence des résidus tryptophane de la protéine enzymatique (ce qui correspond à une extinction de cette fluorescence). Connaissant le quenching de fluorescence qui accompagne la fixation d'une mole de  $\text{NAD}^+$ , on peut calculer pour chaque expérience la concentration de  $\text{NAD}^+$  fixé.

L'expérience a été effectuée à  $pH$  7 en présence d'enzyme ( $1\mu\text{M}$ ). Les résidus tryptophane étaient excités à 300 nm, et la fluorescence mesurée à 350 nm :

<b>[NAD<sup>+</sup>] total (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	20	15	10	8	6	5	4	3	2
<b>[NAD<sup>+</sup>] lié (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	3.70	3.50	3.30	3.05	2.70	2.50	2.15	1.80	1.30

Calculez le nombre de sites de fixation du  $\text{NAD}^+$  par molécule d'enzyme et les constantes d'équilibre (en utilisant la méthode de KLOTZ).

#### Exercice n°2 :

L'ATPase  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  dépendante peut fixer les ions rubidium ( $\text{Rb}^+$ ). On a utilisé  $60\mu\text{g}$  d'une suspension membranaire contenant de l'ATPase, dans 1ml de tampon contenant des ions rubidium radioactifs à différentes concentrations.

Quand l'équilibre de fixation a été atteint, chaque solution a été centrifugée, et on a mesuré la concentration d'ions rubidium dans le surnageant ainsi que la quantité d'ions rubidium fixés aux membranes :

<b>[Rb<sup>+</sup>] dans le surnageant (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	2	4	12	30	50
<b>Rb<sup>+</sup> lié aux membranes (nanomoles)</b>	0.15	0.26	0.455	0.59	0.64

1. Donnez un schéma qui montre la localisation des ions rubidium liés et libres, après centrifugation de la suspension membranaire contenant l'ATPase.
2. Déterminez la quantité maximale d'ions rubidium que l'on peut fixer aux membranes (*en nanomoles par mg de protéines*) et les constantes d'association et de dissociation correspondantes (en utilisant la méthode de KLOTZ).

#### Exercice n° 3 :

La fixation de la triiodothyronine (**T3**) sur la préalbumine a été étudiée par dialyse à l'équilibre, en utilisant de la (**T3**) marquée à l'iode  $\text{I}^{125}$ . La concentration de préalbumine dans le sac de dialyse était  $0.77\mu\text{M}$ . Lorsque l'équilibre était réalisé, les concentrations de (**T3**) ont été mesurées à l'intérieur et à l'extérieur du sac de dialyse :

<b>[T3] à l'extérieur du sac de dialyse (nM)</b>	33	76	110	120	190	265
<b>[T3] à l'intérieur du sac de dialyse (nM)</b>	265	460	560	600	750	880

Déterminez le nombre de sites de fixation de la (**T3**) sur la préalbumine et la constante d'équilibre d'association en utilisant la méthode de SCATCHARD.

#### **Exercice n° 4 :**

Le vérapamil est un composé qui se fixe sur des canaux calciques. On l'a utilisé pour étudier ces canaux dans des membranes préparées à partir de tissu cardiaque.

Les expériences ont été réalisées dans 200  $\mu$ l de tampon, dans lesquels on a mis 200  $\mu$ g de protéines membranaires et du vérapamil tritié à différentes concentrations. Après atteinte de l'équilibre, les solutions ont été filtrées. La radioactivité présente sur les filtres a permis de calculer la quantité de vérapamil liée aux protéines.

A partir de ces données et d'expériences contrôles, on a pu déterminer la quantité de vérapamil lié spécifiquement aux protéines :

<b>[vérapamil] (nM)</b>	210	100	50	30	10
<b>Vérapamil lié (pmol/essai)</b>	0,2	0,165	0,12	0,09	0,04

Calculer la quantité de sites de fixation du vérapamil par mg de protéines et leurs constantes de dissociation en utilisant la méthode de KLOTZ.

#### **Exercice n° 5 :**

L'équilibre de fixation du calcium sur la désoxyribonucléase, à *pH* 9, a été étudié par la méthode de filtration sur gel. On a pu ainsi déterminer la quantité de  $\text{Ca}^{++}$  fixé par mole d'enzyme, pour différentes concentrations de  $\text{Ca}^{++}$  libre. Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans le tableau suivant :

<b>[Ca<sup>++</sup> libre] (<math>\mu</math>M)</b>	500	200	100	50	20	10	5	2.5
<b>Nombre d'ions Ca<sup>++</sup> fixé par molécule d'enzyme</b>	4.00	3.40	3.00	2.20	1.25	0.75	0.40	0.25

Déterminez le nombre de sites de fixation des ions calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ) sur la désoxyribonucléase et leurs constantes d'équilibre (en utilisant la méthode de SCATCHARD).