**Travaux Dirigés UE/EC « Outils analytiques » - E. Jaspard**

**Exercice N°1. Définitions diverses (fixation protéine - ligand)**

1. Définir les notions suivantes : ligand ; KD ; constante d’association ; site de fixation d’un ligand ; affinité ; IDP/IDR ; interactions protéine-protéine.

2. Quels sont les éléments clés structuraux qui régissent les interactions protéine-protéine ?

**Exercice N°1 bis. Remplir les « trous » du texte suivant**

Les ..... entre les biomolécules contrôlent tous les processus .....

Toutes les ..... ne sont pas repliées après leur synthèse. Des protéines ou régions ..... acquièrent leur structure 3D quand elles s’associent à leur partenaire moléculaire.

La technique ..... aboutit à la formation d’un facteur de ..... fonctionnel quand les protéines dites ....., attachées aux domaines de fixation et d’activation, interagissent.

La purification par ….. d'affinité couplée à la ..... ou AP-MS s’appuie sur le principe suivant : les ..... totales d'un échantillon sont extraites afin de purifier, par chromatographie ....., la protéine "appât" d'intérêt. Des ..... spécifiques de la protéine "appât" sont liés par covalence à des billes pour ..... des complexes protéiques.

La ..... correspond au retour d’un ..... excité à son état .....

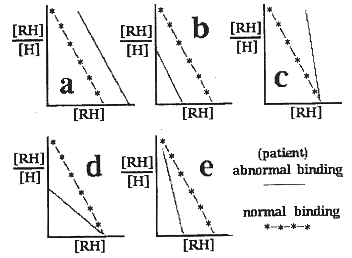
La technique du ..... permet d’analyser la proximité des biomolécules. Le ..... du FRET est l'élément clé de cette technique car le transfert ..... s'effectue si le spectre de fluorescence ….. du donneur et le spectre ..... de l'accepteur se .....

**Exercice N°2. Fixation protéine - ligand & représentation de Scatchard**

La fixation d'une hormone (H) est étudiée :

- Avec un récepteur (R) qui fixe l’hormone ("*normal binding"*).

- Avec un récepteur qui ne fixe pas normalement l’hormone ("*abnormal binding*").



**Exercice N° 3. Extinction de fluorescence**

1. Définir les phénomènes de fluorescence et d'extinction de fluorescence ou « *quenching*».

2. Le tableau suivant indique le rapport des rendements de fluorescence d’un fluorophore en absence (*f*0) ou en présence (*f*[Q]) d’un désactivateur à la concentration [Q].

Calculer la constante de vitesse de désactivation *k*q avec une durée de vie de l’état excité du fluorophore de 10-14 s.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| [Q] (mM) | 0 | 0,4 | 0,8 | 1,5 | 2,8 | 3,9 | 4,7 | 5,5 |
| *f*0/*f*[Q] | 1 | 1,06 | 1,12 | 1,22 | 1,42 | 1,59 | 1,71 | 1,83 |

**Exercice N°4. Fluorescence du DAPI et chevauchement des spectres**

1. Quel est le nom développé du DAPI ?

2. Sur quel type d’acide nucléique se fixe-t-il et où ?

3. Illustrer les propriétés spectrales du DAPI (émission, excitation, couples [accepteur-donneur], …). Donner des exemples d’utilisation du DAPI.

4. Aller au site Chroma : https://www.chroma.com/spectra-viewer

* + Avec l'application "*Spectra viewer*", sélectionner ("*Current selection (0 of 15)*") les fluorochromes DAPI (n°163) et FITC (n°644) et représenter le chevauchement des spectres [émission DAPI - excitation FITC] entre 350 nm et 600 nm (bouton bleu "*update*").
  + Idem pour le couple [émission DAPI - excitation GFP].
  + Interpréter les chevauchements de spectres obtenus.

**Exercice N°5. La GFP**

1. Définir GFP.

2. Ecrire la formule développée du tripeptide SYG. Quel est son rôle dans la GFP ?

3. Sous quelle forme est ce tripeptide pour être fonctionnel dans les protéines fluorescentes ?

4. Quelles sont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission maximales de la GFP non modifiée ?

5. Quels sont les avantages de la GFP et d’autres protéines fluorescentes (mutants) pour des études *in vivo*?

**Exercice N°6. Efficacité du FRET**

Combien de fois R0 le rayon R doit-il être pour une efficacité du FRET de 50 % ? De 1,53846 % ?

Qu’en conclure ?

**Exercice N°7. Sites de contacts entre organites et FRET**

1. Définir la notion d'organites.

2. Aller à PubMed (NCBI) et lire l’article : Poggio *et al*. (2022) « *Get Closer to the World of Contact Sites: A Beginner's Guide to Proximity-Driven Fluorescent Probes*» Contact (Thousand Oaks) 5, 25152564221135748 ( <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10243574/> ).

Interpréter la figure 1 et interpréter la figure 3.

3. Aller au site : <https://www.addgene.org/177434/>

Expliquer les constructions génétiques pour synthétiser les protéines de fusion spécifique de la membrane de tel ou tel organite.

**Exercice N°8.**

|  |
| --- |
| **Trouver la réponse aux questions suivantes.** |
| Q1. Comment s’appelle une molécule capable d’émettre une fluorescence ? |
| Q2. Comment s’appelle l’ensemble des interactions protéine-protéine ? |
| Q3. Quels sont les résidus d’acides aminés constitutifs du chromophore de la GFP ? |
| Q4. Citer un complexe caractérisé par l’une des interactions biologiques les plus fortes connues. |
| Q5. Citer un processus cellulaire qui n’implique aucune interaction entre biomolécules. |
| Q6. Quel est le nom complet de Cy3 et Cy 5 ? |
| **Répondre par vrai ou FAUX aux assertions suivantes.** |
| A1. KD = 10-5 M signifie une affinité plus élevée que KD = 1 nM. |
| A2. Il existe des dizaines de mutants de la GFP caractérisés par une longueur d’onde d’émission de fluorescence spécifique. |
| A3. L'efficacité du FRET dépend de la distance entre les deux fluorophores. |
| A4. Le BRET mesure le transfert d'énergie entre une molécule bioluminescente donneur et une molécule fluorescente accepteur. |
| A5. R0 est la distance de Förster pour une efficacité de transfert du FRET de 50%. |
| A6. Un diagramme de Jablonski représente les transitions entre les différents états électroniques d'une molécule à l'origine sa radioactivité. |
| A7. La technique FISH détecte et localise une séquence d'ADN spécifique sur les chromosomes. |

**=================================**

**Exercice facultatif - Fixation protéine - ligand / représentation de Scatchard**

Les équilibres de fixation 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 étudiés par dialyse à l'équilibre en utilisant du 32P-ADP ou du 32P-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 | 32P-ADP | 32P-ADP | 32P-GTP | 32P-GTP |

Au bout de 5 heures de dialyse, l'équilibre étant atteint, on prélève un volume identique dans chacun des compartiments et on mesure la radioactivité.

Le tableau suivant résume les valeurs obtenues pour chacune des 4 expériences :

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Rapport :  [32P-ADP]Lié  ----------------- [GDH]Totale | Expérience 1  [32P-ADP]Libre (µM) | Expérience 2  [32P-ADP]Libre (µM) | Rapport :  [32P-GTP]Lié  ----------------- [GDH]Totale | Expérience 3  [32P-GTP]Libre (µM) | Expérience 4  [32P-GTP]Libre (µM) |
| 1,2 | 0,65 | 2,5 | 0,3 | 4,3 | 15,6 |
| 2,4 | 1,75 | 6,6 | 0,6 | 10,0 | 35,7 |
| 3,6 | 3,92 | 16,7 | 1,2 | 26,0 | 95,2 |
| 4,2 | 6,08 | 23,3 | 1,8 | 60,0 | 214,0 |
| 4,8 | 10,38 | 40,0 | 2,4 | 166,0 | 571,0 |
| 5,4 | 42,20 | 90,0 |  |  |  |

a. 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 KD(E, GTP), KD(E, ADP), KD(E-ADP, GTP) et KD(E-GTP, ADP).

b. Quel est l'effet de la fixation préalable de l'ADP sur celle du GTP et réciproquement ?

c. Sachant que la GDH est un hexamère, quel schéma de fixation peut-on proposer ? Comment le vérifier ?

**Protéomique (bioinformatique) facultatif : Etude de la RuBisCO**

Les ressources pour effectuer cet exercice complètement en ligne sont à l’adresse :

<https://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/9ModulGenFoncVeg/6Proteomique/4ApplicationProteomiq.htm>

Le travail a pour point de départ la séquence FASTA "U91966".

On aborde les points suivants :

a. Gel bidimensionnel : analyse protéomique de la protéine identifiée (SWISS - 2D PAGE).

b. Spectromètrie de masse : diagramme de fragmentation virtuel (MS-MS) de la séquence en acides aminés (outil « *MS-Digest* »de « *Protein Prospector* »).

c. Confirmation de l'identité de la protéine et recherche de protéines homologues ou similaires (BLAST et PHI-BLAST).

d. Résultats de protéomique dans la base de données PPDB (« *The Plant Proteome DataBase* »).