CHAPITRE

3

LES INTERACTIONS NON COOPÉRATIVES PROTÉINE-LIGANDS

Historiquement, les enzymes sont les premières protéines étudiées d'un point de vue chimique. Toutes les enzymes fixent leur substrat voire fixent des ligands qui régulent leur activité. Les interactions entre protéines ou entre des protéines et leur ligands sont donc les pré-requis à l'étude des fonctions protéiques. L'interaction entre deux molécules implique la formation de liaisons non covalentes dans les situations que nous allons étudier. En chimie des solutions, les réactions d'interaction classiquement étudiées sont des réactions de complexation ou de précipitations. Ces réactions sont des équilibres chimiques dans lesquels les partenaires se lient et se délient en permanence malgré une situation apparemment figée pour l'examinateur. A l'équilibre de la réaction et ce pendant un temps infini si le système n'est pas perturbé, la concentration en réactifs et en produit reste la même. Du point de vue microscopique, ce n'est pas toujours les mêmes molécules de ligand et de protéines qui sont liées.

L'étude des interactions protéines ligands implique la description à la fois de l'état d'équilibre entre les espèces mais aussi l'étude des vitesses d'association et de dissociation des complexes.

Nous allons aborder dans ce chapitre les particularités mathématiques et expérimentales des interactions protéines-ligands dites non coopératives.

I. Propriétés et caractérisation des interactions protéines ligands

A. Les valeurs mesurées

La réaction étudiée est la fixation du ligand sur la protéine dans un site spécifique. Un concentration connue en ligand et une concentration connue en protéine sont mise en contact. Comme le montre la réaction simple ci-dessous, si un ligand peut se fixer, nous aurons trois espèces en solution : la protéine dite libre, le ligand dit libre et le complexe protéine-ligand. Les concentrations obtenues en ligand libre, protéine libre et complexe protéine-ligand varient au cours de la réaction pour atteindre un équilibre.

$$P + L \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftarrows}} ; PL$$

Les réactions de fixation peuvent être plus complexes : une protéine peut fixer plusieurs ligands. Dans ce cas, la réaction engendre plusieurs formes de la protéine : une protéine avec un seul ligand fixé, avec deux ligands fixés, avec trois ligands fixés, avec quatre ligands fixés. Il devient donc très compliqué de mesurer la concentration de la forme protéine-ligand. C'est pourquoi les mesures effectuées sont macroscopiques : les concentrations mesurées sont les concentrations en ligand libre, protéine libre et ligand lié peu importe que celui-ci soit associé à une protéine qui porte déjà un ligand ou non.

$$P + L \underset{k_{off1}}{\overset{k_{on1}}{\rightleftarrows}} PL + L \underset{k_{off2}}{\overset{k_{on2}}{\rightleftarrows}} PL_2 + L \underset{k_{off3}}{\overset{k_{on3}}{\rightleftarrows}} PL_3$$

Ces réactions sont caractérisées par deux types de constantes :

— Les constantes de vitesse des réactions en sens de la formation (k_{on}) et dans le sens de la dissociation (k_{off}).

— La constante de dissociation (K_D) : c'est une constante d'équilibre qui décrit la répartition des espèces à l'équilibre de la réaction.
Soit P les Produits de la dissociation du complexe et R les réactifs :

$$K_D = \frac{\prod_{k=1}^{n} P_k^{\infty}}{\prod_{k=1}^{n} R_k^{\infty}} \tag{3.1}$$

Pour une protéine qui ne fixe qu'un ligand :

$$K_D = \frac{(P) * (L)}{(PL)} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \tag{3.2}$$

B. Les mesures effectuées

Comme nous l'avons abordé dans le premier chapitre la fixation d'un ligand est un équilibre et non une réaction totale.

C. Méthodes de mesure

1 Obtention de la constante de dissociation par mesure à l'équilibre de la réaction

a. Dialyse à l'équilibre : obtention de la concentration des différentes espèces à l'équilibre

Pour réaliser une dialyse à l'équilibre, deux compartiments sont séparés par une membrane hémiperméable qui ne laisse passer que le ligand libre (et le tampon). La protéine est ajoutée dans un compartiment (A) et le ligand dans l'autre (B). Le ligand libre du compartiment B passe dans le compartiment A jusqu'à équilibre des concentrations en ligand libre. A l'équilibre, la concentration en ligand dans le compartiment B sera égale à la concentration en ligand libre et celle dans le compartiment A à la somme de la concentration en ligand libre et ligand lié. La concentration en ligand lié est obtenu en soustrayant la concentration en ligand dans le compartiment B et celle dans le compartiment A (figure 2.1).

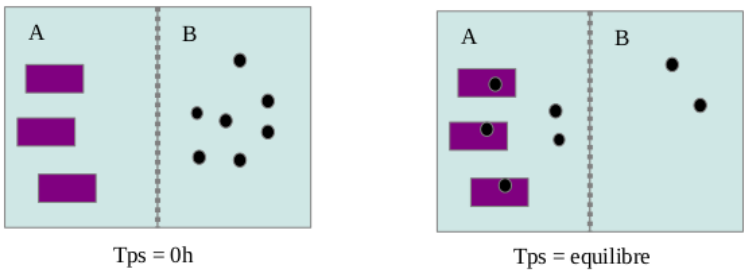


FIGURE 3.1 – Dialyse à l'équilibre

b. Filtration : obtention de la concentration des différentes espèces à l'équilibre

La réaction est réalisée en incubant le ligand radioactif avec la protéine. A la fin de la réaction, le mélange est filtré sur un filtre (acétate, nitrate de cellulose, fibre de verre) qui laisse passer le ligand libre mais retient les différentes formes de la protéine. La radioactivité sur le filtre est égale à la concentration en ligand lié et celle dans le filtrat à la concentration en ligand libre (figure 2.2).

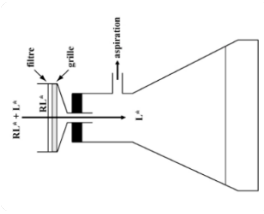


FIGURE 3.2 – Filtration

Attention : Le filtre ne doit pas adsorber ligand radioactif (ce qui nécessite parfois de tester plusieurs types de filtre).

2 Mesures hors équilibre

a. Le déplacement à l'équilibre

Principe : C'est la mesure de la liaison spécifique à l'équilibre, d'une concentration donnée (en général égale au K_D) en ligand radio-marqué en présence d'une concentration variable et croissante de ligand froid. Le ligand froid entre en compétition avec le ligand radioactif pour sa liaison à la protéine.

Cette technique permet :

- — démontrer qu'un ligand froid, se lie à une protéine.
- — d'étudier la liaison d'un ligand de faible affinité pour un récepteur (il est plus facile de disposer d'un ligand froid en grande quantité, que d'un ligand radio-marqué)

Représentation des résultats :

Ici, liaison totale n'est pas égale à la fixation maximale car la concentration en radio-ligand n'est pas saturante (souvent égale au K_D. La valeur 100 % correspond à la liaison spécifique en l'absence de

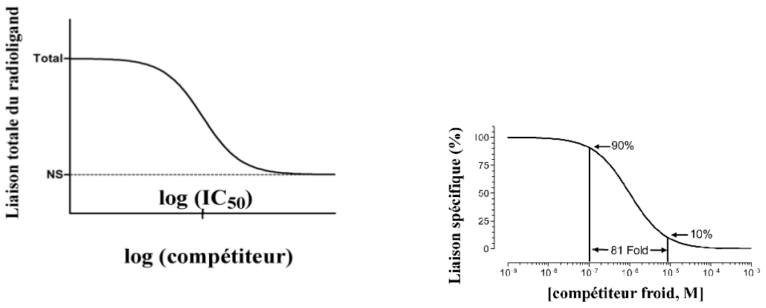


FIGURE 3.3 – Représentation de la liaison totale en fonction du log de la concentration en ligand compétiteur froid

compétiteur froid. La valeur 50 % correspond à la concentration en compétiteur froid qui déplace 50 % de la liaison spécifique en ligand radiomarqué (= IC50). La valeur 0 % est liaison spécifique en présence d'un excès de compétiteur froid.En théorie, le passage de 10 % à 90 % de liaison spécifique doit se faire en moins de 2 unités logarythmiques de concentration (figure 2.1).

Equation de Cheng et Prusoff :

Cheng et Prusoff ont déterminé en 1973 la relation qu'il existe entre le K_D, le K_i et l'IC_{50} [1].

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{(L)}{K_d}} \tag{3.3}$$

K_i = constante de dissociation à l'équilibre pour le compétiteur froid.

K_D = constante de dissociation à l'équilibre pour le ligand radiomarqué (affinité).

[L] = [L*] = concentration de radioligand libre.

Le K_D représente donc bien la concentration en compétiteur froid qui se lie à 50 % des sites de la protéine.

b. Utilisation d'un ligand froid et d'un ligand radioactif

Voici la représentation schématique d'une expérience d'association suivie d'une dissociation induite par l'ajout d'un excès de ligand froid. En reportant sur un graphique $\ln \Delta = f(tps)$ ou $\ln \Delta' = f(tps)$, les constantes de vitesse peuvent être calculées (figure 2.4).

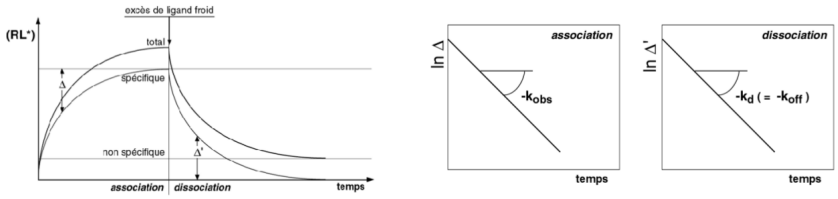


FIGURE 3.4 – Mesure des constantes de vitesse grâce à un ligand radioactif

c. Résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface est une méthode qui permet de mesurer la fixation d'une molécule sur une surface au cours du temps. La protéines est fixée sur une puce. L'appareillage mesure la masse de molécules présentes sur la puce grâce à un système optique. Dans un premier temps, un flux continu de tampon contenant une concentration constante en ligand est passé sur la puce. Le ligand se fixe alors sur la protéine jusqu'à atteindre l'équilibre de la réaction. Ensuite, un flux de tampon sans ligand est passé sur la puce entraînant la dissociation du ligand. La réaction est donc suivie en fonction du temps (figure 2.5).

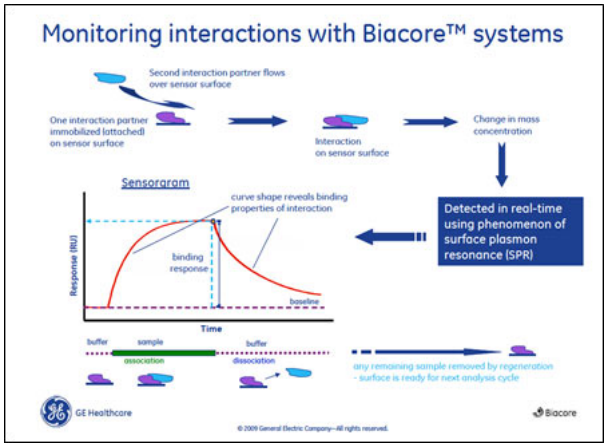


FIGURE 3.5 – La résonance plasmonique de surface (GE Healthcare)

II. Mathématique des interactions protéines-ligands

1 Constantes thermodynamiques et cinétique

$$\underset{Proteine}{P} + \underset{Ligand}{L} \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} \underset{Complexe}{PL} \tag{3.4}$$

k_{on} et k_{off} sont les constantes de vitesse respectives de la formation et de la dissociation du complexe protéine ligand. Elles sont écrites en minuscules. Lorsque la réaction est à l'équilibre les vitesses de formation et de dissociation du complexe protéine sont égales, la vitesse de la réaction suit la loi d'Arhénius (cf L2).

$$k_{on} * [P] * [L] = k_{off} * [PL] \Rightarrow \tag{3.5}$$

$$\frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[P] * [L]}{[PL]} = K_D = \frac{1}{K_a} \tag{3.6}$$

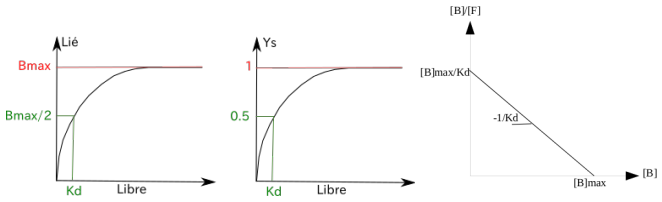
K_D est la constante thermodynamique de dissociation du complexe et K_a la constante thermodynamique d'association. Plus K_D est faible et donc K_a est élevée, plus l'affinité est forte.

A. Analyse de la fonction de saturation un seul de fixation : méthode à l'équilibre

A l'équilibre et suivant la loi de conservation de la matière :

$$K_d = \frac{[P] * [L]}{[PL]} \tag{3.7}$$

$$[P]_{tot} = [PL] + [P] \tag{3.8}$$



(a) Représentation de Mickaëlis (b) Représentation de Scatchard

FIGURE 3.6 – Représentation de la fixation d'un ligand sur une protéine à site unique

D'où

$$[P]_{tot} - [PL] = [P] \Rightarrow K_d = \frac{([P]_{tot} - [PL]) * [L]}{[PL]} \tag{3.9}$$

[L] est ajouté de chaque côté

$$K_d + [L] = \frac{([P]_{tot} - [PL]) * [L]}{[PL]} + [L] \tag{3.10}$$

$$K_d + [L] = \frac{[P]_{tot} * [L]}{[PL]} \tag{3.11}$$

$$[PL] = \frac{[P]_{tot} * [L]}{K_d + [L]} \tag{3.12}$$

Soit $PL = B = Bound$ le ligand lié,$L = free = F$ le ligand libre et $P_{tot} = B_{max}$, la capacité de fixation max.

$$B = \frac{B_{max} * F}{K_d + F} \tag{3.13}$$

C'est une forme de Mickaelis Menten avec $K_M = Kd$ et $V_{max} = B_{max}$

La fonction de saturation (figure 2.6) est le rapport entre le nombre moyen de sites occupés par le ligand ramené au nombre total de sites de fixation soit ici$\frac{B}{B_{max}}$.

$$\frac{B}{B_{max}} = \frac{F}{K_d + F} = \bar{Y_s} \tag{3.14}$$

Pour traiter les données, l'équation est linéarisée grâce à la représentation de Scatchard (figure 2.6) :$\frac{B}{F} = f(B)$.

$$[B] * K_d + [B] * [F] = B_{max} * [F] \rightarrow K_d * \frac{[B]}{[F]} + [B] = B_{max} \tag{3.15}$$

$$\frac{[B]}{[L]} = \frac{B_{max} - [B]}{K_d} \tag{3.16}$$

C'est une droite de pente $-\frac{1}{Kd}$, d'ordonnée à l'origine $\frac{B_{max}}{K_d}$ et pour y=0,$B = B_{max}$.

B. Les protéines à plusieurs sites de fixation indépendants

Le terme indépendants signifie que la fixation du premier ligand n'influence pas la fixation des suivants.

1 Plusieurs sites de fixation indépendants et équivalents

Une protéine, souvent avec une structure quaternaire, peut présenter plusieurs sites identiques pour un même ligand. Dans ce cas la démonstration des équations est plus complexe. Dans ce cas, il existe plusieurs formes de la protéine avec un nombre de sites variables contenant ou non le ligand. Techniquement, la quantité de ligands liés est mesurée. La fonction de saturation donne la concentration en ligand lié divisée sur la concentration en sites de fixation. Donc ici :

$$\bar{Y_s} = \frac{concentration - ligand - lie}{concentration - totale - en - site} = \frac{[bound]}{B_{max}} = \frac{\sum_{i=1}^{n}[PL_i]}{n * [P]_{tot}} \tag{3.17}$$

Le nombre moyen de sites occupés par molécules de protéines est noté $\bar{\nu}$

$$\bar{\nu} = \frac{concentration - ligand - lie}{concentration - protéine - tot} = \frac{[bound]}{P_{tot}} = \frac{\sum_{i=1}^{n}[PL_i]}{[P]_{tot}} = \bar{Y_s} * n \tag{3.18}$$

Pour n=1, comme nous l'avons vu précédemment, on trouve $\bar{Y_s} = \bar{\nu}$.

Pour n sites équivalents et indépendants, le même traitement des données est réalisé selon la régression linéaire de Scatchard sauf que $B_{max} = n * [P]_{tot}$.Si $[P]_{tot}$ est connu, n peut être déduit des résultats (figure 2.7).

$$\bar{Y_s} = \frac{concentration - ligand - lie}{concentration - totale - en - site} = \frac{[bound]}{B_{max}} = \frac{[L]}{K_d + [L]} \tag{3.19}$$

Donc :

$$\frac{[Bound]}{n * [P]_{tot}} = \frac{[L]}{K_d + [L]} \rightarrow [Bound] * K_d + [Bound] * [L] = n * [P]_{tot} * [L] \tag{3.20}$$

$$\frac{[bound]}{[L]} = \frac{1}{Kd} * (n * [P]_{tot} - [Bound]) \tag{3.21}$$

Plus directement, en exprimant $\bar{\nu}/(L)$, la valeur n peut être lue graphiquement (figure 2.7). En effet :

$$\frac{\bar{\nu}}{n} = \bar{Y_s} = \frac{[L]}{K_d - [L]} \tag{3.22}$$

$$\bar{\nu} * K_d + \bar{\nu} * [L] = n * [L] \longrightarrow \frac{\bar{\nu}}{[L]} * K_d = n \tag{3.23}$$

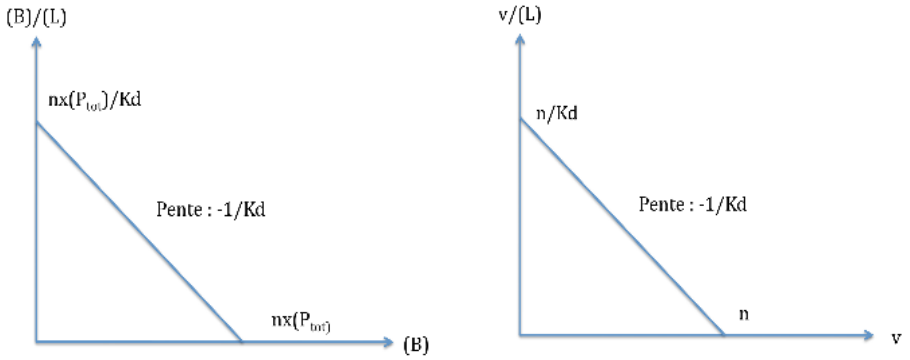


FIGURE 3.7 – Représentation de Scatchard n sites indépendants équivalents

$$\frac{\bar{\nu}}{[L]} = \frac{1}{K_d} * (n - \bar{\nu}) \tag{3.24}$$

Le graphique afin d'obtenir directement n et K_D peut être tracé (figure 2.7).

En réalité, il faudrait démontrer que quelque soit le nombre de sites indépendants et équivalents, la relation suivante est vérifiée :

$$\bar{Y_s} = \frac{concentration - ligand - lie}{concentration - totale - en - site} = \frac{[bound]}{B_{max}} = \frac{[L]}{K_d + [L]} \tag{3.25}$$

2 Plusieurs sites indépendants non équivalents

a. n sites spécifiques avec des affinités différentes

Ici, nous allons examiner le cas pour lequel une protéine possède n_1 sites indépendants associés à la constante K_{d1} et n_2 sites indépendants associés à la constante K_{d2}. La concentration en ligands liés va être égale à la concentration en ligands liés associés aux sites de type 1 et aux nombres de ligands liés associés aux sites de type 2.

$$[Bound]_{tot} = [Bound]_1 + [Bound]_2 \tag{3.26}$$

Or d'après ce qu'on a vu précédemment pour n sites indépendants et équivalent la concentration en ligand lié est égale à :

$$[Bound] = \frac{n * [P]_{tot} * [L]}{K_d + [L]} \tag{3.27}$$

donc

$$[Bound] = \frac{n_1 * [P]_{tot} * [L]}{K_{d1} + [L]} + \frac{n_2 * [P]_{tot} * [L]}{K_{d2} + [L]} \tag{3.28}$$

Si la représentation de Scatchard est réalisée, oune courbe en deux parties est obtenue : l'une associée aux sites d'affinité K_{d1} et l'autre aux sites d'affinité K_{d2}.

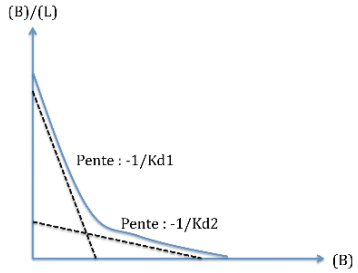


FIGURE 3.8 – Resprésentation de Scatchard pour une protéine avec deux types de sites spécifiques

b. Un site spécifique et un site de liaison non spécifique

Certains ligands possèdent un site spécifique mais se fixent aussi partiellement de façon non spécifique c'est-à-dire de façon non saturable. Dans le cas d'une liaison spécifique, la concentration en ligand lié est relié par une équation de type Mickaëlis et Menten à la concentration en ligand libre. Dans le cas d'une liaison non spécifique, la concentration en ligand lié et directement proportionnelle à la concentration en ligand libre. Pour n sites spécifiques indépendants et une fixation non spécifique, on obtient (figure 2.9) :

$$[Bound] = [Bound]_{spe} + [Bound]_{nonspe} \tag{3.29}$$

$$[Bound] = \frac{n * [P]_{tot} * [L]}{K_d + [L]} + K_{ns} * [L] \tag{3.30}$$

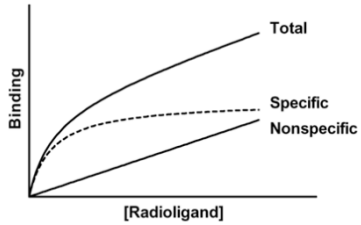


FIGURE 3.9 – Resprésentation de Scatchard pour une protéine avec une liaison spécifique et non spécifique

Le site non spécifique peut être sur la protéine, mais aussi dû à l'expérience comme la fixtion sur un filtre en cas de filtration sur Büchner.

CONCLUSION

La fixation de ligands sur un protéine est un processus majeur dans le fonctionnement du vivant qu'il est important de savoir caractériser et quantifier. Dans cette optique, la quantité de ligand lié (éventuellement pour différentes concentrations en ligand) peut être mesurée à l'équilibre ou hors équilibre. Cela permet respectivement d'obtenir la constante de dissociation K_D ou les constantes cinétiques. La méthode principale ici consiste à tracer la fonction de saturation (la quantité de ligand lié divisé par la concentration en sites) en fonction de la concentration en ligand. Si la fixation est spécifique et non coopérative, une hyperbole est obtenue alors que si la fixation est non spécifique une droite est obtenue. L'analyse de l'hyperbole étant complexe, cette hyperbole est

linéarisée grâce à la représentation de Scatchard. Cela permet d'obtenir des valeurs de constantes plus précises. A chaque résultats obtenu, vous devrez donc :

— traiter les données pour obtenir la représentation de scatchard

— calculer l'équation de la droite

— obtenir graphiquement et par le calcul le K_D et le nombre de sites spécifiques

Les fixations coopératives sont des cas particuliers dans lesquelles la protéines existe sous deux formes : une forme active et une forme inactive. Le traitement des données sera vu en troisième année.

WHOLE BIBLIOGRAPHY

[1] Cheng Y. et WH. PRUSOFF. “Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction.” In : *Biochem. Pharmacol* 22.23 (1973).