

Interactions protéines – ligands

Pour mieux comprendre l'interaction entre l'enzyme et son substrat, il est nécessaire d'avoir une idée sur l'interaction entre n'importe quel ligand et son récepteur protéique. En fait, ce qui caractérise cette interaction, plus la cinétique, est le nombre de sites de fixation du ligand sur la protéine réceptrice qui peut être quantifié, en général, par la mesure de la concentration de ligand lié à la protéine à l'équilibre thermodynamique.

1. Définition :

1. 1. Ligand :

On appelle ligand une petite molécule reconnue et fixée spécifiquement par une molécule protéique. La fixation du ligand se fait de façon non covalente, par liaison électrostatique, forces de Van der Waals, liaison hydrogène, parfois liaisons hydrophobes. La liaison du ligand se fait sur un site spécifique, avec étroite complémentarité entre ligand et surface protéique.

Le ligand peut être : un ion (métallique ou autre), un coenzyme, une hormone, un facteur de croissance, une cytokine, un neurotransmetteur, un acide nucléique ou un effecteur allostérique (activateur ou inhibiteur). Alors que la protéine réceptrice peut être : une enzyme, un récepteur membranaire, des histones ou une enzyme allostérique.

1. 2. Site de fixation et site actif :

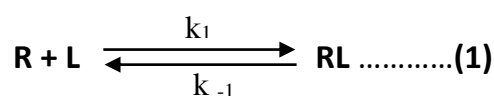
L'interaction entre la protéine et son ligand nécessite la fixation de ce dernier à une zone bien spécifique de la protéine appelée site de fixation (ou site de liaison).

Dans le cas des enzymes, les différents sites existant à la surface de l'apoenzyme sont :

- Site de reconnaissance du ou des substrats.
- Site de fixation du coenzyme.
- Site de fixation du ou des cofacteurs minéraux.
- Zone de transformation catalytique.
- Site de régulation.
- Site de fixation aux structures cellulaires.

2. Interaction protéine – ligand :

La fixation d'un ligand (L) à son récepteur protéique (R) est réversible et peut être représentée par :



La vitesse de combinaison du ligand à son récepteur dépend des concentrations en ligand (L) et en récepteur (R) :

$$v_1 = k_1 [R] [L]$$

La vitesse de dissociation est fonction de la concentration en complexe ligand-récepteur (RL):

$$v_2 = k_{-1} [RL]$$

Lorsque l'équilibre est atteint, $v_1 = v_2$ et on peut écrire :

$$k_1 [R] [L] = k_{-1} [RL]$$

$$[R] [L] / [RL] = k_{-1} / k_1 = K_D$$

$$[RL] / [R] [L] = k_1 / k_{-1} = K_A$$

où:

K_D est la constante d'équilibre de dissociation (mole.l⁻¹).

K_A est la constante d'équilibre d'association (l.mole⁻¹).

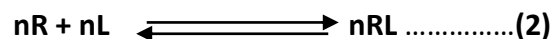
[R] la concentration de la protéine réceptrice.

[L] la concentration du ligand libre.

[RL] la concentration du ligand lié.

K_D est d'autant plus petite, ou K_A d'autant plus grand, que la liaison du ligand à la protéine est plus forte (complexe RL moins facilement dissociable).

Si la protéine (P) possède (n) sites de liaisons (R) pour le ligand (L), la réaction devient :



Notion d'affinité :

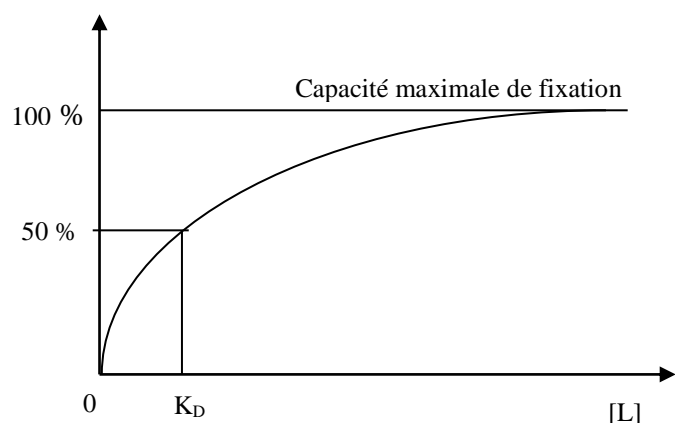
L'affinité d'un récepteur est exprimée par la constante de dissociation du complexe ligand-récepteur (K_D) dont la valeur, selon les cas, s'établit entre 10⁻¹² et 10⁻⁴ M. plus cette constante est faible plus l'affinité du récepteur pour son ligand est élevée.

3. Représentations graphiques de l'interaction protéine-ligand :

Soit respectivement $[P_t]$ et $[R_t]$ la concentration molaire de la protéine totale et de l'ensemble des sites de liaison :

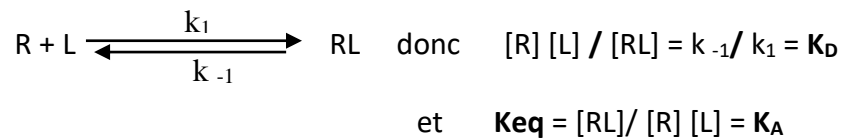
La concentration en ligand libre (K_D) nécessaire à la saturation de la moitié des sites récepteurs permet d'apprécier l'affinité du récepteur pour le ligand. Plus cette concentration est faible, plus l'affinité du récepteur pour le ligand est élevée.

Capacité de fixation (%)



3. 1. Protéines à un site de fixation :

La fixation d'un ligand sur une protéine qui possède un site de fixation (un récepteur, enzyme monomérique) est exprimée par :



Sachant que [R], [L] et [RL] sont définies lorsque l'équilibre thermodynamique est atteint.

On a : $[R_t] = [R] + [RL]$ d'où $[R] = [R_t] - [RL]$

Donc $[R] = [R_t] - [RL]$ (a)

NB : (a) est appelée *relation de conservation de la protéine*.

On sait que :

$$K_A = [RL] / [R][L] \quad \text{donc} \quad K_D = [R][L] / [RL] \text{(b)}$$

Combinons (a) et (b) :

$$K_D = ([R_t] - [RL])[L] / [RL]$$

$$K_D [RL] = [R_t][L] - [RL][L]$$

$$[RL](K_D + [L]) = [R_t][L]$$

$$\boxed{[RL] = [R_t][L] / (K_D + [L])}$$

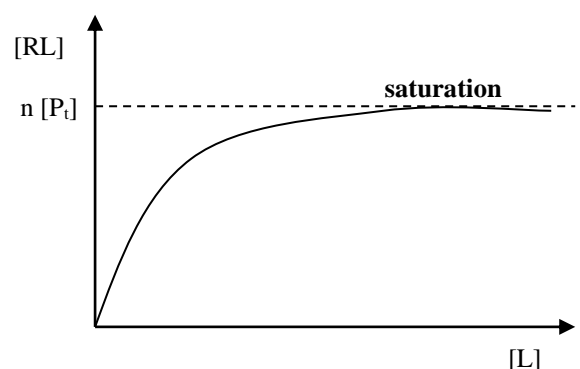
Donc [RL] dépend de K_D , [L] et de $[R_t]$ selon une loi hyperbolique. On parle alors d'une *saturation Michaélienne*.

Comme : $[R_t] = [P_t]$ donc $[RL] = [P_t][L] / (K_D + [L])$(1)

Ainsi : $[RL] / [P_t] = [L] / (K_D + [L])$ est appelée **fonction de saturation (Ÿ)** car elle renseigne sur le degré de saturation de la protéine. Elle varie entre 0 et 1.

La représentation Michaélienne

Elle consiste à porter [RL] en fonction de [L].
Le graphe obtenu est une hyperbole.



3. 2. Protéines à plusieurs sites de fixation :

Dans ce cas les sites peuvent être :

Sites dépendants : dont la fixation du ligand sur un site dépend de l'état de saturation des autres sites (cas des enzymes allostériques).

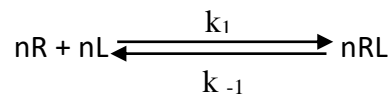
Sites indépendants : dont la fixation du ligand sur un site est indépendante de l'état de saturation des autres sites.

Sites indépendants et équivalents : chacun des sites possèdent la même constante de dissociation (K_D).

Sites indépendants et non équivalents : les sites possèdent des constantes de dissociation différentes ($K_{D1} \neq K_{D2} \neq K_{D3} \neq \dots$).

3. 2. 1. Cas des sites indépendants et équivalents :

La protéine possède (n) sites de fixation équivalents. Ce cas est fréquemment rencontré dans les enzymes oligomérique ayant un site de fixation pour le substrat sur chaque monomère. La réaction est représentée par :



Donc l'équation (1) devient :

$$[RL] = n [P_t] [L] / (K_D + [L]) = n [P_t] \check{Y} \dots \dots \dots (2)$$

$$[RL] / [P_t] = n [L] / (K_D + [L]) = n \check{Y}$$

où ($n \check{Y}$) est le nombre moyen des sites occupés par protéine.

Les méthodes de linéarisation (de la représentation Michaélienne) permettent de déterminer les paramètres qui caractérisent la fixation du ligand au récepteur (n).

En fait, il existe deux représentations les plus couramment utilisées :

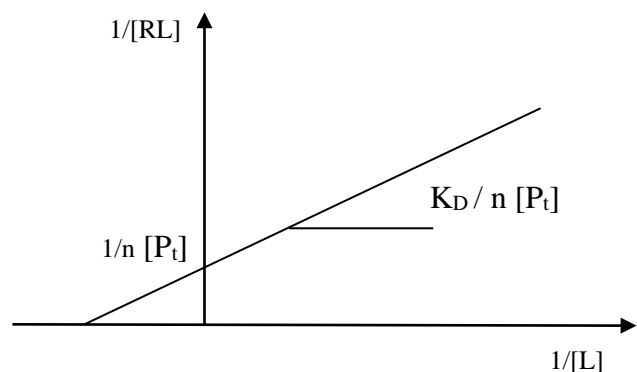
Représentation de KLÖTZ

On a l'équation (2) : $[RL] = n [P_t] [L] / (K_D + [L])$

$$1 / [RL] = K_D / n [P_t] [L] + 1 / n [P_t]$$

$$1/[RL] = 1/[L] (K_D / n [P_t]) + 1 / n [P_t]$$

Donc, la représentation de KLÖTZ consiste à porter ($1/[RL]$) en fonction de ($1/[L]$). Le graphe obtenu est une droite de pente ($1/K_A n [P_t]$) ou encore ($K_D/n [P_t]$) et d'ordonnée à l'origine ($1/n [P_t]$).



Représentation de SCATCHARD

On a :

$$K_D = (n [P_t] - [RL]) [L] / [RL]$$

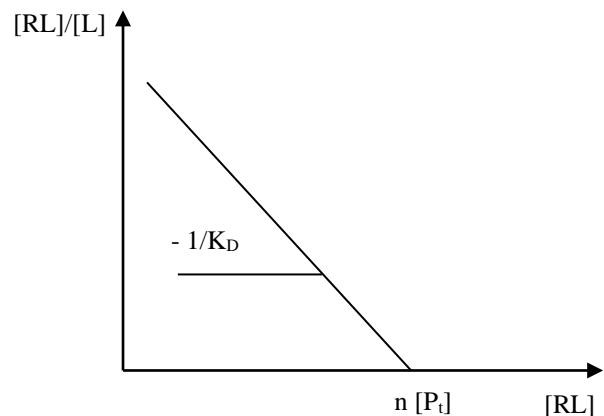
$$[L] / [RL] = K_D / (n [P_t] - [RL])$$

$$[RL] / [L] = (n [P_t] - [RL]) / K_D$$

$$[RL] / [L] = - [RL] / K_D + (n [P_t] / K_D)$$

Par conséquent, la représentation de SCATCHARD consiste à porter $[RL]/[L]$ en fonction de $[RL]$. Le graphe est une droite de pente $(-K_A)$ ou encore $(-1/K_D)$ qui coupe l'axe des abscisse en $(n [P_t])$.

$[P_t]$ étant connue, on peut en déduire (n) .

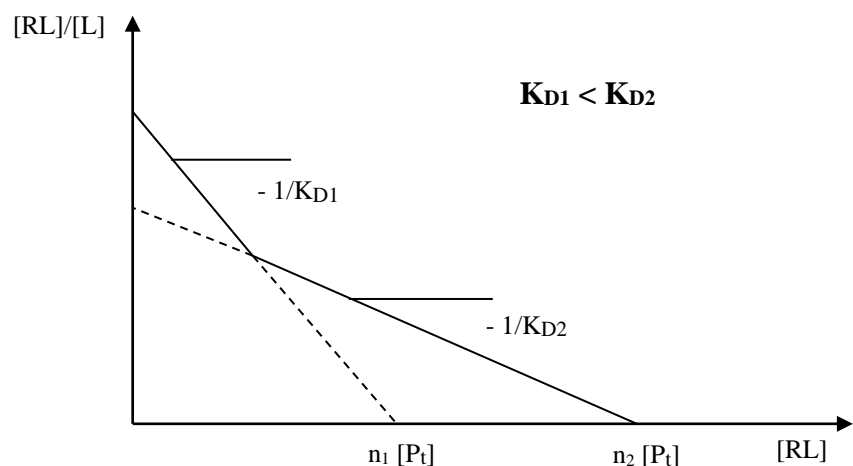


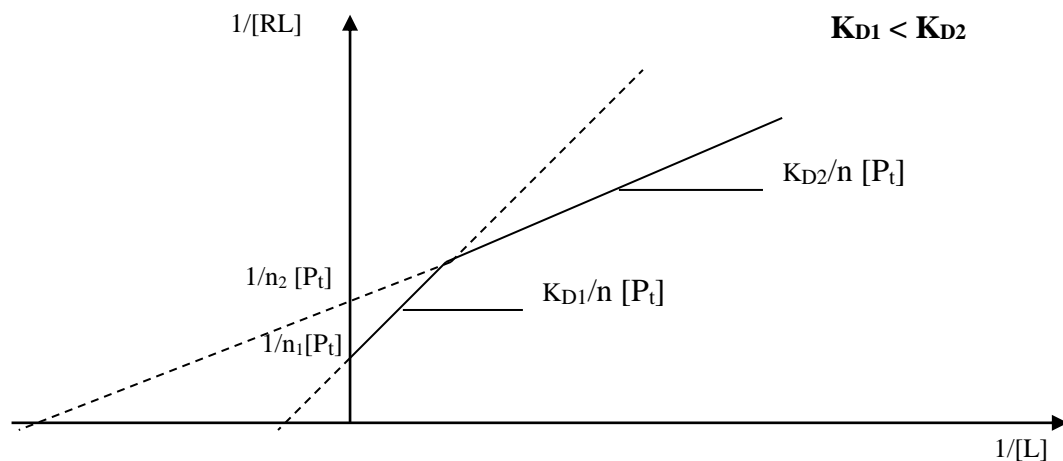
3. 2. 2. Sites indépendants et non équivalents :

Lorsque les sites ne sont pas équivalents (ayant des affinités différentes pour le ligand), on définit des classes de sites ; chaque classe regroupe des sites possédant la même constante de dissociation (K_D). Par conséquent, la représentation de SCATCHARD et celle de KLÖTZ ne sont plus linéaires.

Exemple :

Pour une protéine qui possède 2 classes de sites, donc 2 constantes de dissociation différentes ($K_{D1} \neq K_{D2}$), autrement dit ; 2 affinités différentes, on obtient 2 segments de droites avec 2 pentes différentes (plus la pente est grande, plus l'affinité est grande).





4. Approches expérimentales :

La détermination du nombre de sites de fixation (n) demande, en général, la détermination de la concentration du ligand lié $[RL]$ et celle du ligand libre $[L]$. La mesure de ces concentrations se fait par :

4.1. Séparation physique :

Ultrafiltration

- ✓ Elle utilise la propriété de certains filtres qui absorbent les protéines alors que le ligand libre n'est pas retenu.
- ✓ Le mélange protéine ligand est filtré à travers des supports tels que nitrocellulose ou membranes semi-perméables.
- ✓ Ensuite, on peut mesurer les proportions de ligand lié retenu sur le filtre et de ligand libre dans le filtrat.

Ultracentrifugation

- ✓ Cette méthode consiste à soumettre le mélange protéine ligand un champ gravitationnel.
- ✓ Au bout d'un temps convenable, le surnageant referme le ligand libre alors que le culot contient le ligand lié à la protéine.

Dialyse à l'équilibre

- ✓ Cette dialyse s'effectue au travers d'une membrane semi-perméable dont les pores sont relativement petits, de sorte que la membrane soit perméable aux petites molécules de ligands, mais demeure imperméable à la protéine.
- ✓ On utilise essentiellement des membranes en cellulose, cellophane ou collodion.
- ✓ Lorsque l'équilibre est atteint, la concentration de ligand libre à l'intérieur et à l'extérieur du sac est pratiquement la même.

Chromatographie d'exclusion moléculaire par taille.

- ✓ Dans cette technique, des tamis moléculaires tels les Séphadex sont utilisés pour séparer le ligand libre du ligand lié.
- ✓ Ces tamis retardent l'élution des petites molécules et laissent passer les molécules de plus grande taille.
- ✓ Le ligand doit présenter une caractéristique (radioactivité ou bande d'absorption) permettant de mesurer sa concentration totale dans l'éluat.

4.2. Mesure spectrophotométrique directe :**Fluorescence.**

- ✓ L'emploi des méthodes de fluorescence est possible lorsque le ligand présente une fluorescence qui est suffisamment modifiée lors de sa fixation à la protéine.
- ✓ Dans certains cas, il est possible d'utiliser la fluorescence de la protéine lorsque la fixation du ligand entraîne une atténuation significative de cette fluorescence.