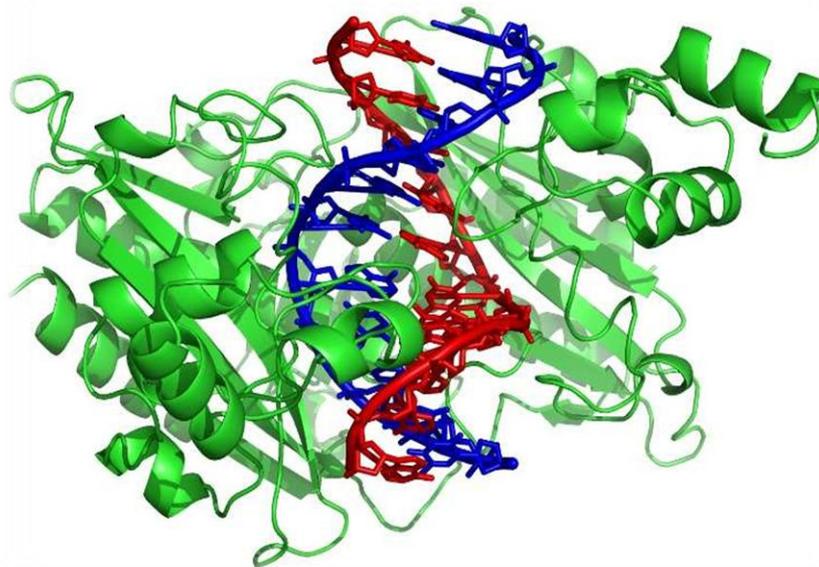


Interactions protéines-ligands



Dr Berzou

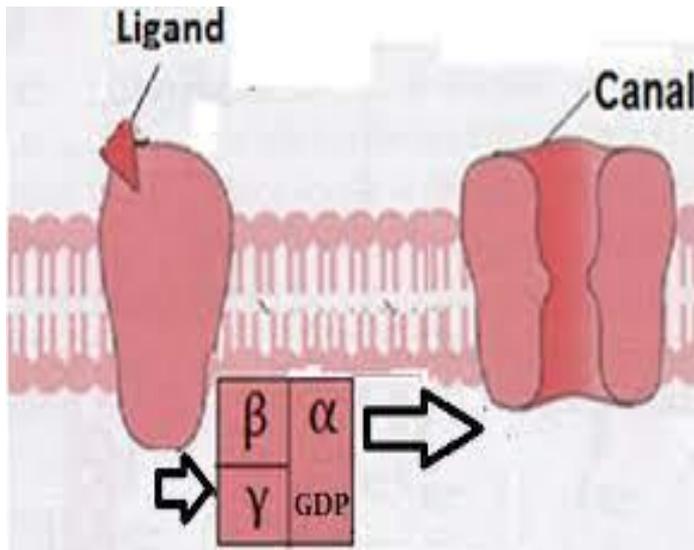
Année universitaire : 2022/2023

I. Interactions protéines-ligands

❖ Les protéines sont caractérisées par leur aptitude à former des complexes, C.a.d des associations réversibles par des **liaisons non covalentes** avec un nombre considérable de molécules organiques de petit ou de grand taille **exemple interaction enzymes substrat, antigène-anticorps, enzyme effecteur, hormone-récepteur.**

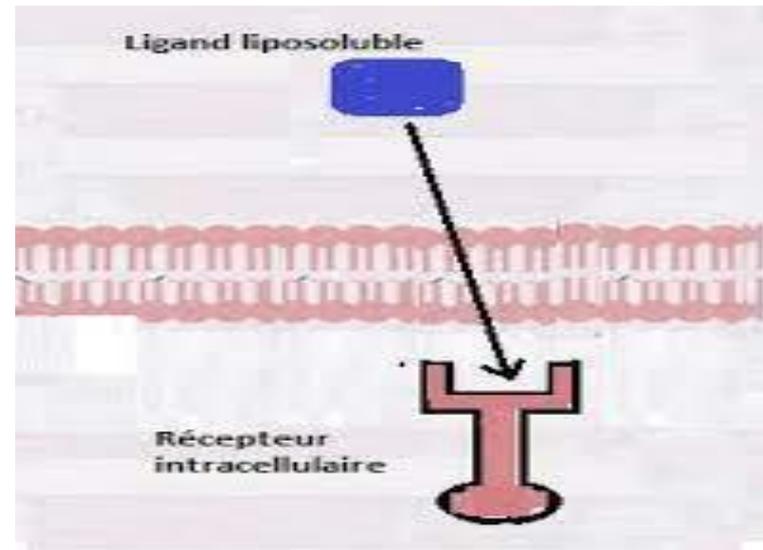
❖ La quantification des sites de fixation d'un ligand sur une protéine donnée nécessite en générale la détermination de la concentration de ligand liée à la protéine (**complexe-protéines-ligand**) à l'équilibre thermodynamique.

Ligand hydrosoluble



Récepteur de surface

Ligand liposoluble

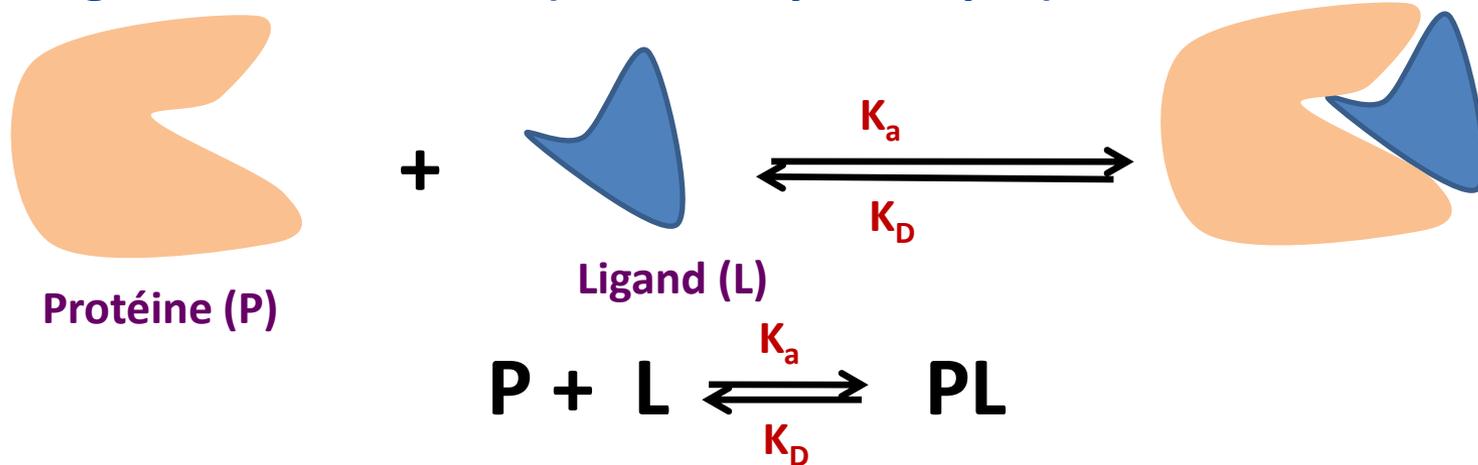


Récepteur intracellulaire

Interactions récepteur-ligands

1- Protéines à un seul site de fixation

❖ La fixation d'un ligand sur une protéine qui possède un seul site de fixation pour ce ligand est régit par une constante d'équilibre K_a et/ou une énergie libre standard (thermodynamique).



$[P]$ = concentration de la protéine libre,

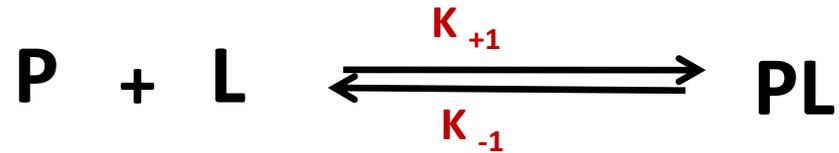
$[L]$ = concentration de ligand libre,

$[PL]$ = concentration de la protéine complexée

K_a (K_1): La constante d'équilibre d'association

K_D (K_{-1}): La constante d'équilibre de dissociation

❖ La constante d'association et de dissociation est la **constante de réaction** associée à la **dissociation ou l'association** d'un **composé chimique**.



- Vitesse d'association : $v_a = k_a \cdot [P] \cdot [L]$
- Vitesse de dissociation : $v_d = k_d \cdot [PL]$

□ Avec : $[L]$ = concentration du ligand libre et $[PL]$ = concentration du ligand lié.
 A l'équilibre, les vitesses sont égales :

$$k_a \cdot [P][L] = k_d \cdot [PL] \Rightarrow K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \text{ et } K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a}$$

$$K_d = K_{-1}/K_1 = [P][L]/[P-L] \text{ Donc } K_d = [P][L]/[P-L] \dots (1)$$

□ Avec : $K_a = K_d$ ce sont des constantes macroscopiques. Et :

$$K_a = \frac{1}{K_d}$$

$K_D (K_{-1})$ élevé : la dissociation rapide = faible affinité

$K_D (K_{-1})$ faible : la dissociation lente = forte affinité

2- Protéine à plusieurs site de fixation

❖ Si une protéine possède pour un ligand ces sites peuvent être :

➤ Indépendants

La fixation de ligand sur un site étant indépendante de l'état de saturation des autres sites de fixation ils peuvent être équivalents ou non équivalents.

➤ Site indépendant et équivalent

Chacun des sites possédant alors la même constante de dissociation K_d pour le ligand.

➤ Site dépendant

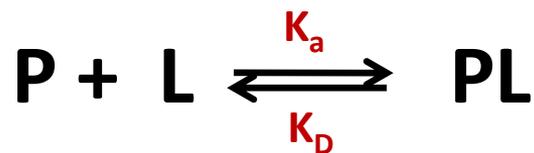
La fixation de ligand sur un site est dépend de l'état de saturation des autres sites.

3. Phénomène de saturation

3.1 Un seul site de fixation

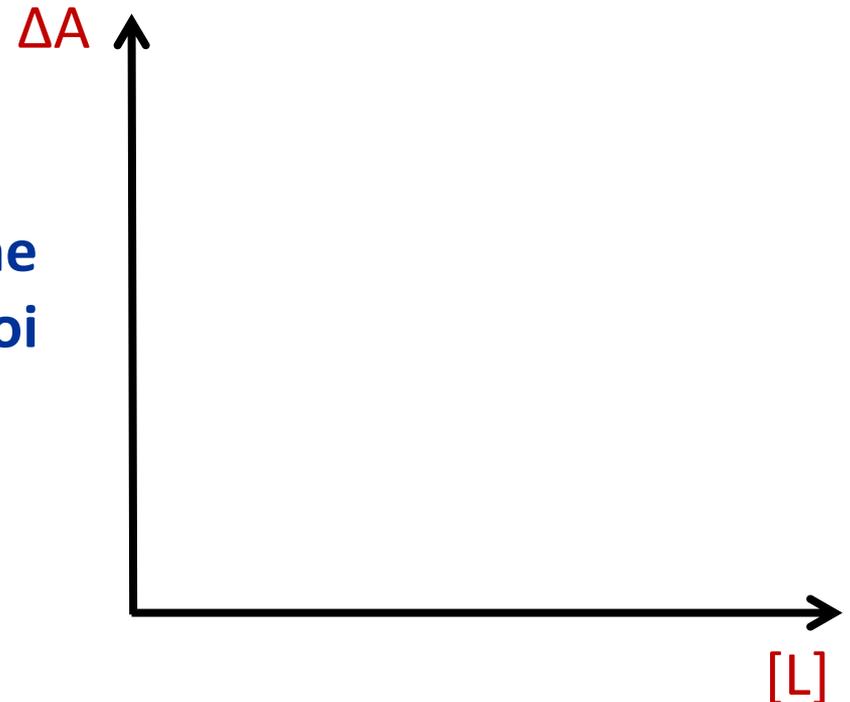
➤ Expérimentalement [PL] n'est pas connus, une détermination de la densité optique DO (densité optique) ou A du complexe PL par absorption à une longueur d'ondes λ caractéristique.

Soit deux réactions réversibles



➤ La fixation d'un ligand sur une protéine est définie par une loi d'équilibre :

$$K_A = \frac{1}{K_d} = \frac{[P \text{ libre}][L \text{ Libres}]}{[PL]}$$



- Expérimentalement on connaît le plus souvent non pas la **concentration de complexe formé PL** mais un paramètre **Y** qui lui est **proportionnel** et qui est **indépendant** de la présence **de protéine** et de ligand libre.
- Exemple : la vitesse **d'une réaction enzymatique « Y »**, en une **longueur d'onde λ** à laquelle seul le complexe (protéine-ligand) absorbe la lumière ce qui implique, on étudié **la variation d'absorbance (ΔA)** en présence de concentration **de produit constante** et **de concentration de ligand variable**.
- Pour une concentration **de protéine [P]** constante en mesure la valeur de signal en fonction de concentration croissante **de ligand** en observe alors **une augmentation de l'absorbance** jusqu'à ce que prendre des valeurs élevé de ligand.
- Tout les protéines est sous forme de **PL (protéine –ligand)** c-à-d que **ΔA** attente à une valeur maximale à partir de laquelle, on n'observe plus d'augmentation de signal, si on continue **d'augmenté la concentration [L]** cette effet **de saturation** est caractéristique la liaison non covalente entre une protéine (P) et un ligand (L) pour lequel elle possède un site de fixation spécifique.

3.1. Analyse de la fonction de saturation

➤ En utilisant la relation de conservation de la protéine :

$$[Pt] = [P] + [P-L] \dots \dots (2)$$

$$[P] = [Pt] - [PL] \dots \dots (3)$$

➤ On en déduit que $[P-L]$, dépend de $[Pt]$, de K_d et de la concentration de ligand libre selon une loi hyperbolique :

➤ On parle alors d'une saturation **Michaelienne** (par analogie avec l'équation de Michaelis donné pour la vitesse d'une réaction enzymatique).

➤ On définit une fonction de saturation Y tel que

❖ Relation de **Scatchard** pour un site de fixation : $n = 1$

$$K_d = \frac{[P][L]}{[P-L]} \longrightarrow \text{On va remplacer l'équation 3}$$

$$K_d = \frac{([Pt] - [PL]) \times [L]}{[PL]} \quad \text{ou} \quad K_d \times [PL] = ([Pt] - [PL]) \times [L]$$

$$K_d \times [PL] = [Pt] \times [L] - [PL] \times [L]$$

$$K_d \times [PL] - [PL] \times [L] = [Pt] \times [L]$$

$$\frac{[PL]}{[Pt]} = \frac{[L]}{K_d + [L]}$$

➤ $([L]/K_d + [L])$: Cette fonction renseigne sur la fonction de saturation \ddot{Y} , ne dépend que du rapport $[L]/K_d$ qui varie entre 0 et 1, et renseigne sur le degré de saturation de la protéine, on l'appelle la fonction de saturation \ddot{Y} (S).

➤ Sa valeur est égale à 0,5 (demi-saturation) quand la $[L]$ libre ($[L]_{0,5}$) est égale à K_d .

$$Y : \frac{\text{Concentration du ligand lié}}{\text{Concentration totale de sites de fixation}}$$

$$Y : \frac{[PL]}{[Pt]}$$

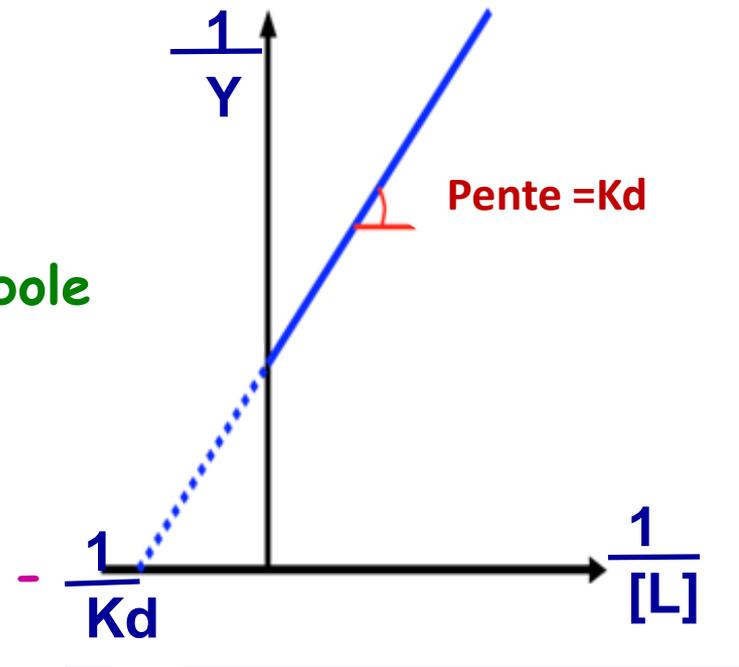
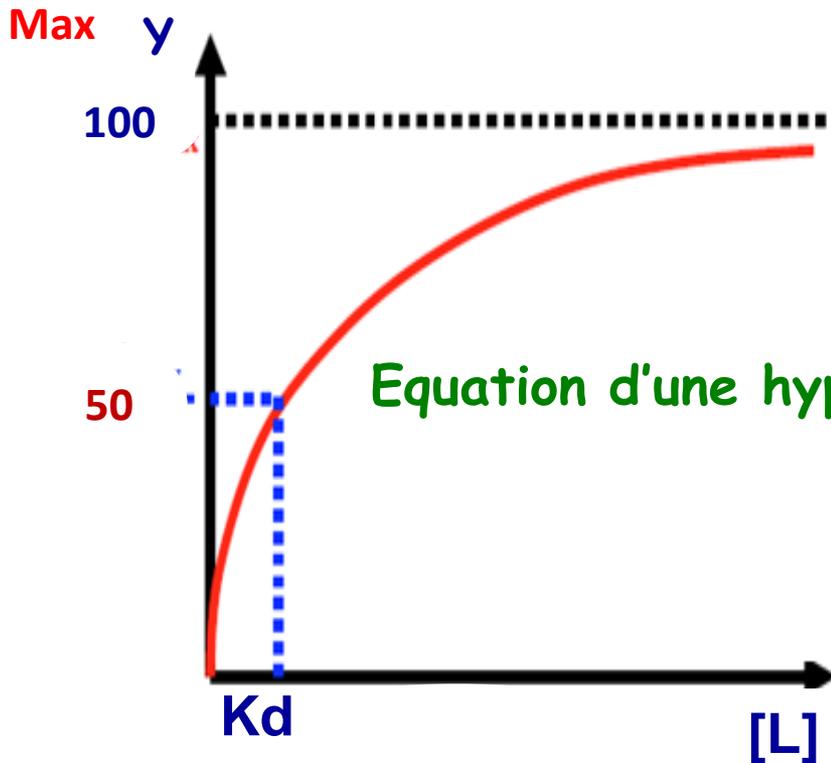
$$\ddot{Y} = \frac{[L]}{K_d + [L]}$$

❖ Fonction de saturation

$$Y = [L] / K_d \times [L]$$

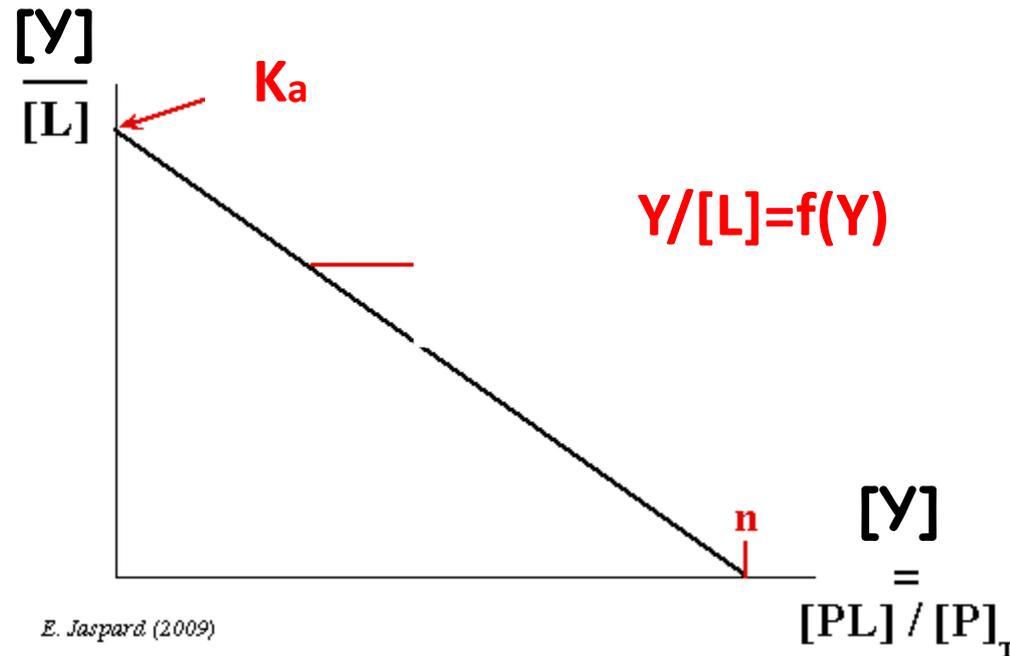
$$\frac{1}{Y} = 1 + K_d \times \frac{1}{[L]}$$

$$Y = b + ax$$



➤ L'équation de la fonction de saturation Y est celle d'une hyperbole équilatère possédant une asymptote pour la valeur.

➤ Cette expérience correspond à un titrage de nombre de site de fixation appartenant à la protéine qui est capable de former un complexe avec le ligand.



Représentation de SCATCHARD

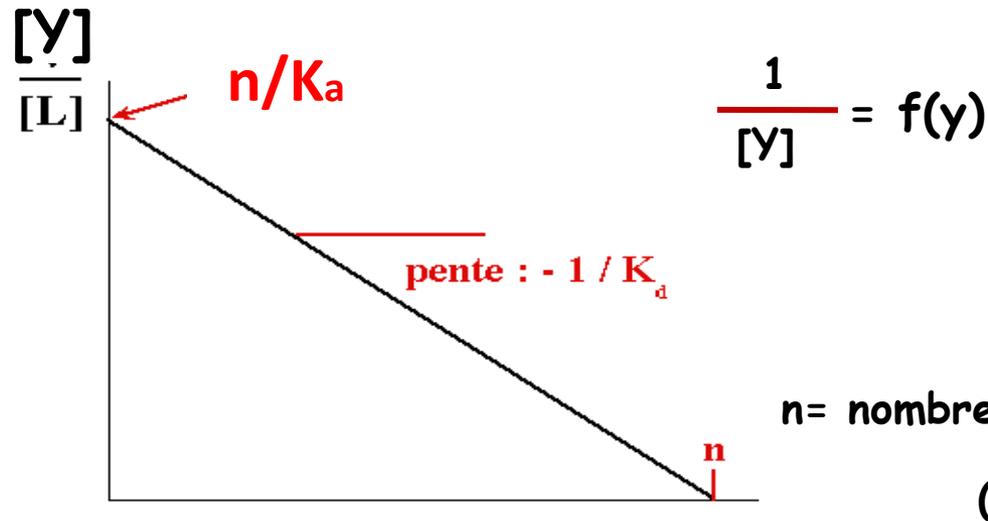
➤ n : le nombre de site de liaison par molécule d'enzyme ou bien le nombre de molécule de récepteurs par cellules (Bmax, bound).

➤ Remarque le cas représenté est celui dans lequel une molécule de ligand peut se lier à une molécule de protéine.

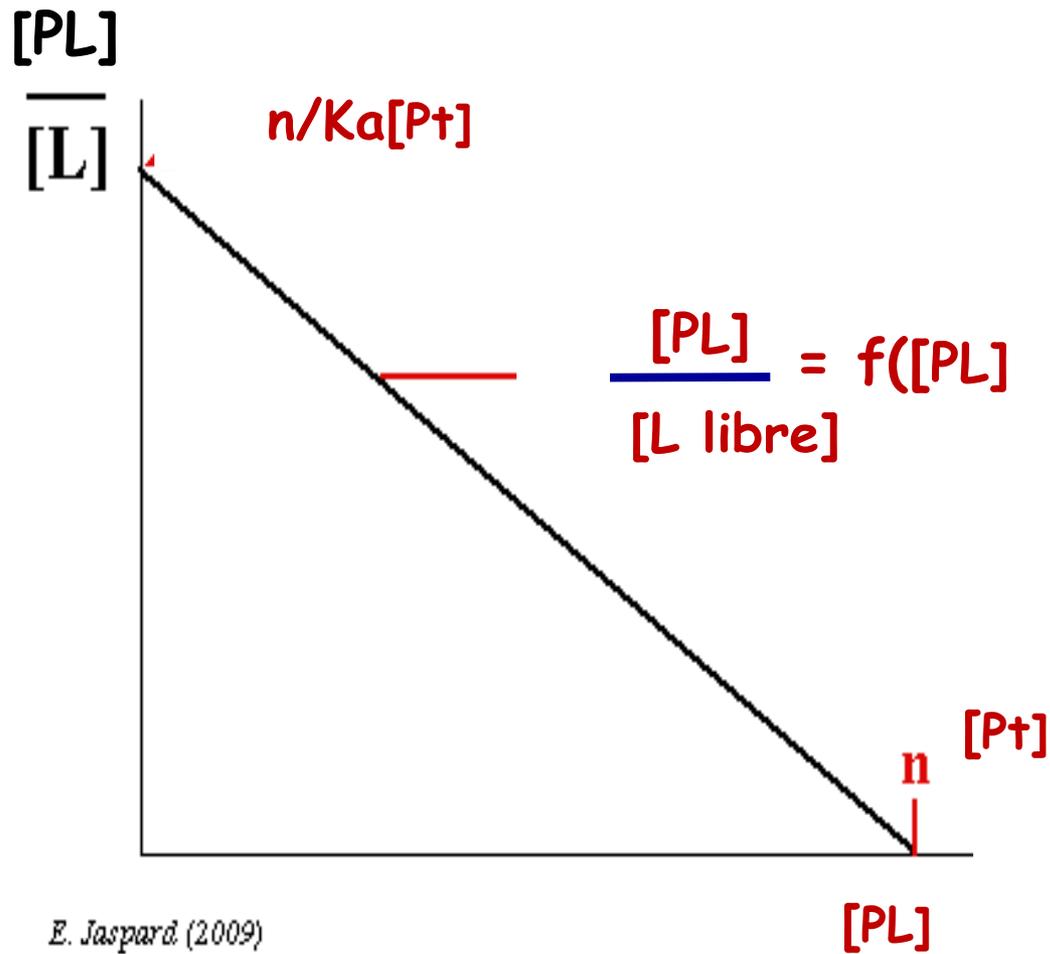
➤ Cas d'une protéine oligomérique ou on a plusieurs sites de fixations

➤ n : sous-unité identique capable de fixer chacune une molécule de ligand la fonction de saturation devient alors :

$$[Y] = n \frac{K_a [L \text{ libre}]}{K_a [L \text{ libre}] + 1} \quad \rightarrow \quad \frac{[Y]}{[L \text{ libre}]} = nK_a - YK_a$$



$n =$ nombre de site de fixation
(Bmax)



Représentation de SCATCHARD

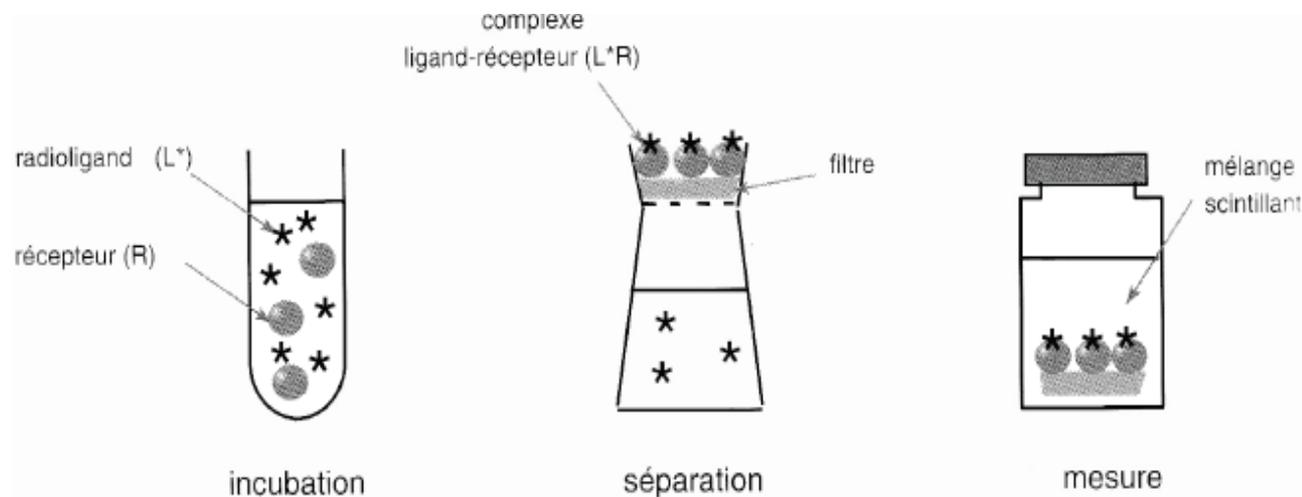
4. Mesure des concentrations de ligand libre

4.1 Approche expérimentale

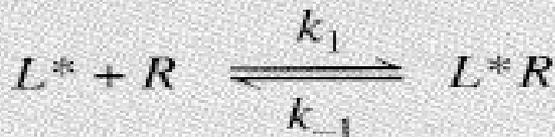
- La caractérisation de site de fabrication demande en générale la mesure des concentrations **de ligand liés** et **libres**.
- La caractéristique d'un récepteur est réalisée par la technique de liaison spécifique au récepteur (ou binding).
- Binding (anglais; site de liaison) est une technique qui permet de détecter dans un broyat tissulaire un **récepteur (R)** pour un ligand donnée et cela par l'utilisation d'un **ligand (L)** (agoniste ou antagoniste) a la capacité de se lié à un récepteur. Elle permet de définir l'affinité d'un nouveau ligand pour des sites de liaison spécifique.
- Ces mesures permet de caractériser l'affinité d'un site de liaison K_d (constante de dissociation) et nombre total de site de fixation maximale (B_{max}) d'une structure donnée.
- La K_d peut etre déterminer par deux méthodes d'études de liaison **L** sur son **R**; 1) méthodes de saturation, 2) méthodes de déplacement ou de compétition.

4.2 Mesure de l'affinité d'un ligand radiomarqué

- Marquer les récepteurs par **un ligand radioactif** et étudier la cinétique de la réaction **ligand - récepteur** en suivant la quantité de **ligand radioactif fixé**.
- Réalisé sur des préparations subcellulaires (par ex. les membranes).
- Incubation ligand radioactif (L^*) avec le récepteur R (par ex sur des membrane).
- Séparation : on élimine le marqueur libre par filtration
- Mesure radioactivité du marqueur lié



Les grandes étapes des études de liaison des ligands aux récepteurs.



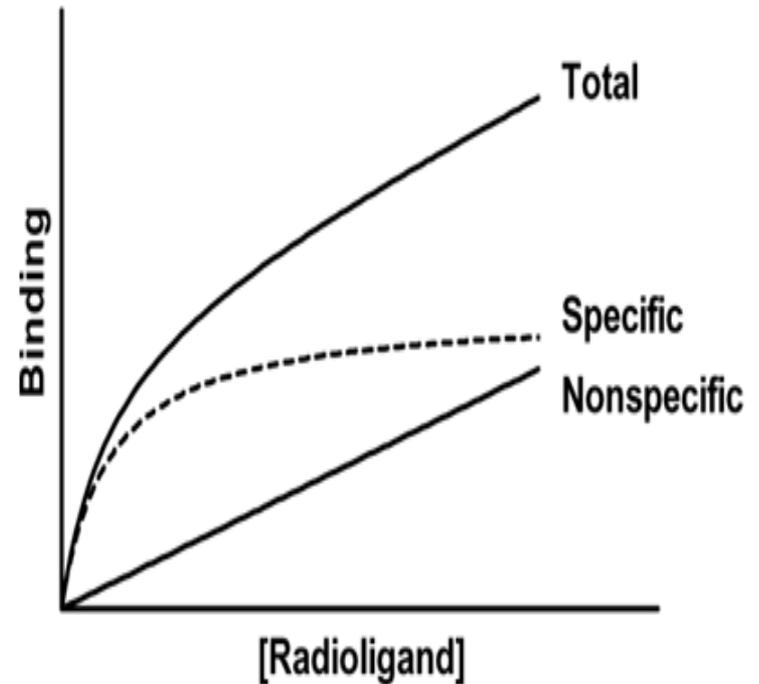
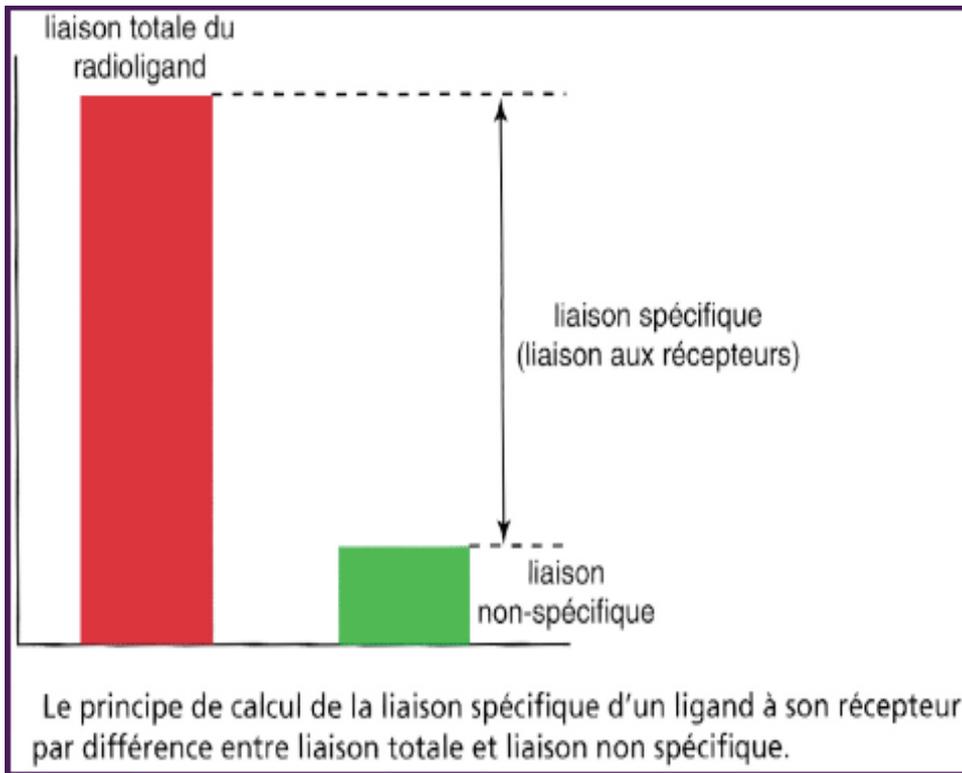
➤ on mesure la fixation totale :

spécifique = sur le récepteur

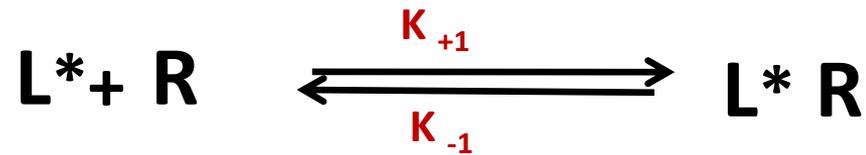
non spécifique = sur d'autres composants membranaires

On utilise un ligand froid en excès qui bloque l'accès aux sites

spécifiques - mais pas aux non spécifiques - pour le ligand marqué :



Représentation de la liaison fonction de concentration initiale du ligand



$[L^*]$ = concentration de radioligand libre,

$[R]$ = concentration de récepteur membranaire.

$[L^*R]$ = concentration de radioligand lié de manière spécifique.

$$K_d = k_{-1}/k_{+1} = [R][L^*]/[R-L]$$

➤ La valeur de L^* et R étant connues.

➤ L^*R ainsi qualifié, K_d est définie graphiquement comme la concentration de L^* nécessaire pour occupé 50% de récepteur. .

➤ Liaison totale = liaison spécifique à forte affinité + liaison non spécifique à faible affinité. .

$$K_d = [R][L^*]/[R-L^*] \dots\dots(1)$$

$$[R] = [K_d][RL^*] / L^* \dots\dots(2)$$

$$[Rt] = [RL^*] + [R]$$

$$\text{d'ou } [R] = [Rt] - [RL^*] \dots\dots(3)$$

On va remplacer 3 dans l'équation 1 d'ou

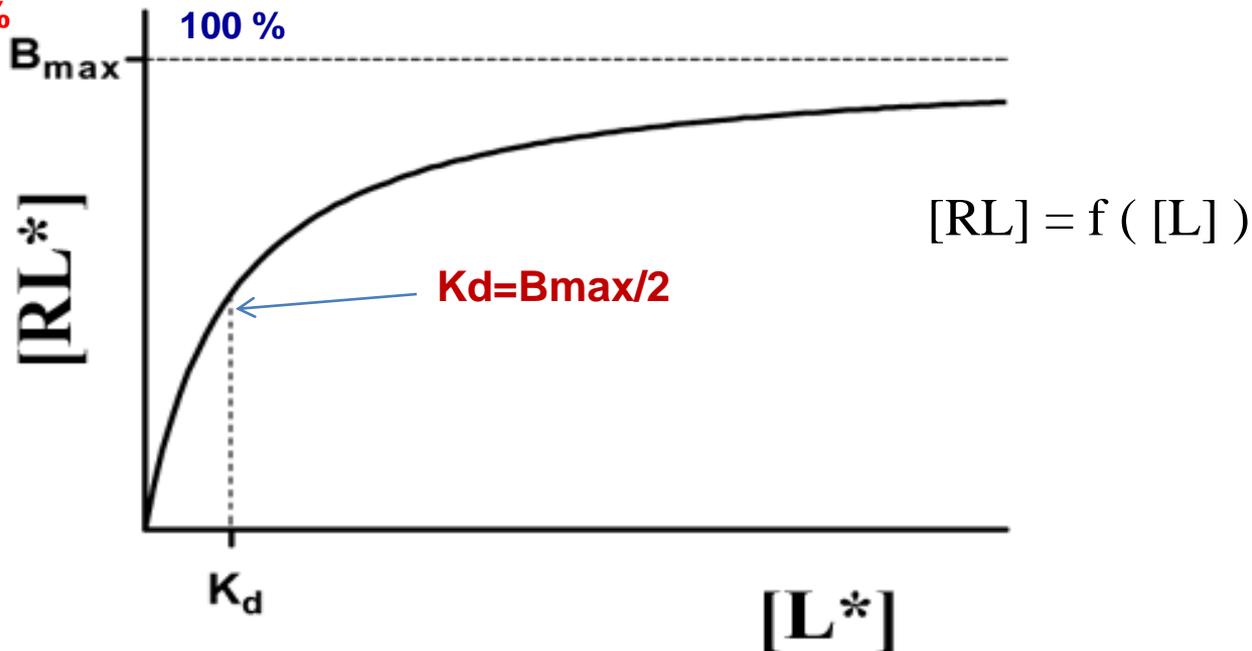
$$[Rt]-[PL^*] = K_d [x [RL^*]/[L^*] \quad [Rt]-[PL^*] = K_d [x [RL^*]/[L^*]$$

$$([Rt]-[PL^*]) [L] = K_d [x [RL^*] \quad [RL^*] = [Rt][L^*]/K_d + [L^*]$$

➤ **[Rt]** correspond à la **Bmax**

$$[RL^*] = \frac{B_{\max} \cdot (L)^*}{K_d + (L)^*}$$

Capacité de %
fixation RL^*



➤ **Bmax** correspond à l'occupation de 100% des récepteur par ligand radioactif (capacité maximale de liaison).

➤ **Bmax/2=Kd** est la concentration de ligand nécessaire à l'occupation de 50% des récepteur en l'équilibre.

➤ **Relation de Scatchard** : permet une détermination plus précise de K_D et B_{max} , elle exprimé selon l'équation $Y = ax + b$

$$L^*R / L^* = (-1 / K_D) \times L^*R + (B_{max} / K_D)$$

$$Y = ax + b$$

Y= soit lié / libre

a= (-1 / K_D) lié

b= B_{max} / K_D

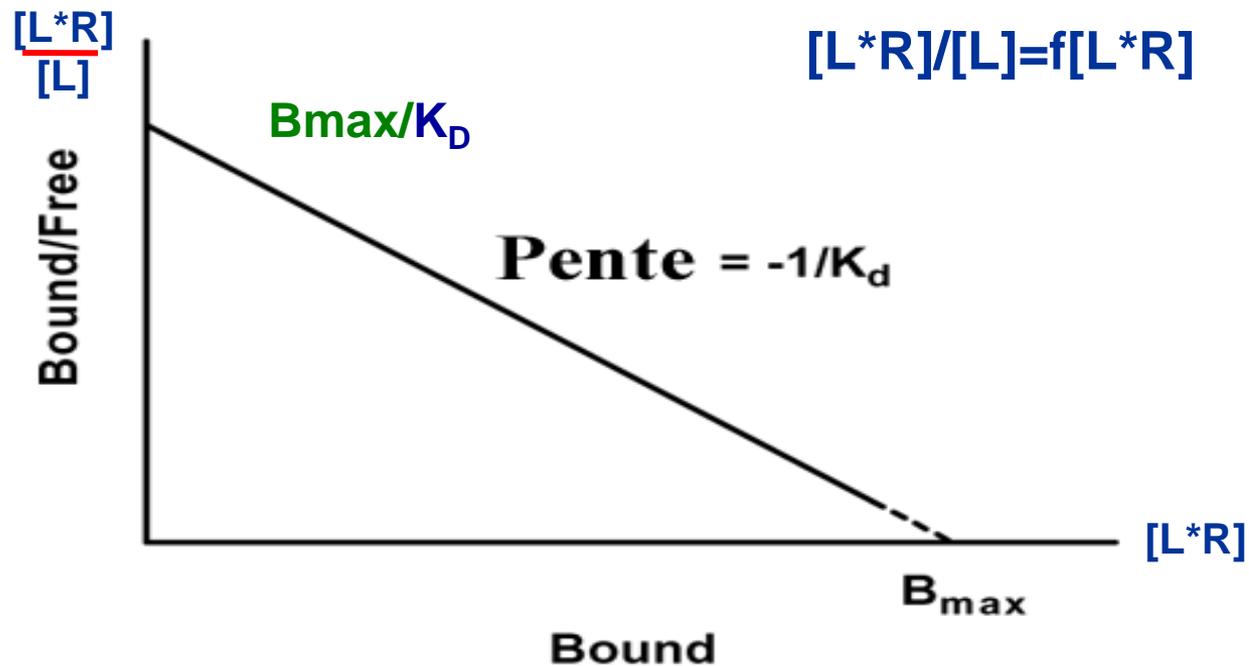


Fig. Représentation graphique selon Scatchard

II. Interactions protéines-ligands

1. Mécanisme d'action entre l'enzyme et le substrat

- La réaction enzymatique fait appel à la fixation du substrat au niveau du site actif.
- Le site actif doit être dans une conformation spatiale telle que le substrat puisse s'y fixer, il existe différents modèles .

1.1- Modèle de Fisher : Clé-serrure

- ❖ Dans ce modèle, la formation du complexe enzyme-substrat [ES] nécessite une interaction entre un ou plusieurs groupes fonctionnels ou domaines du substrat avec des motifs de la cavité enzymatique.
- ❖ Ce modèle explique la spécificité de l'enzyme pour son substrat, mais il n'explique pas l'effet des effecteurs.

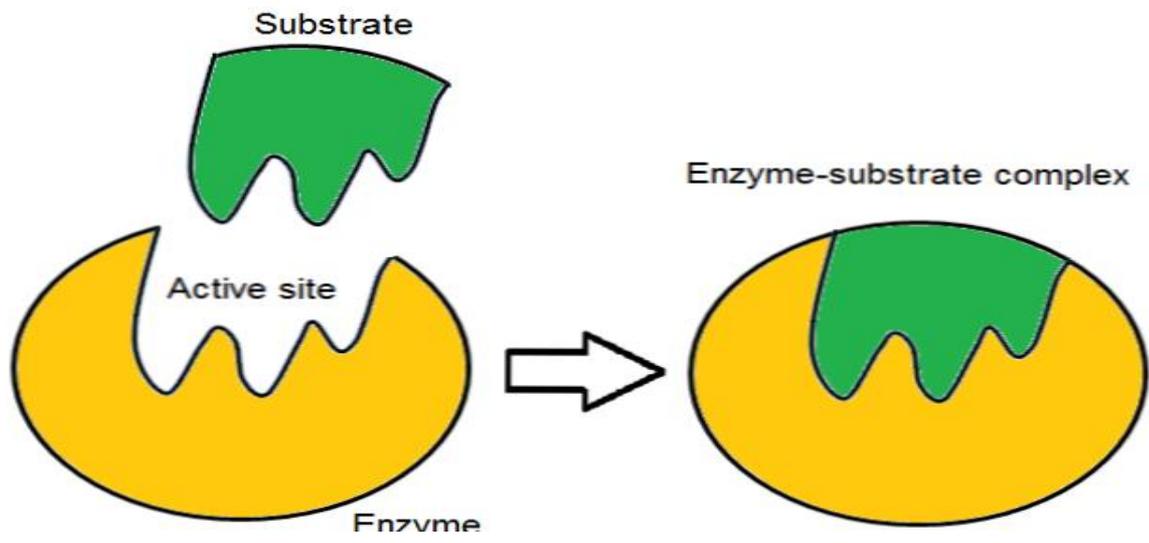
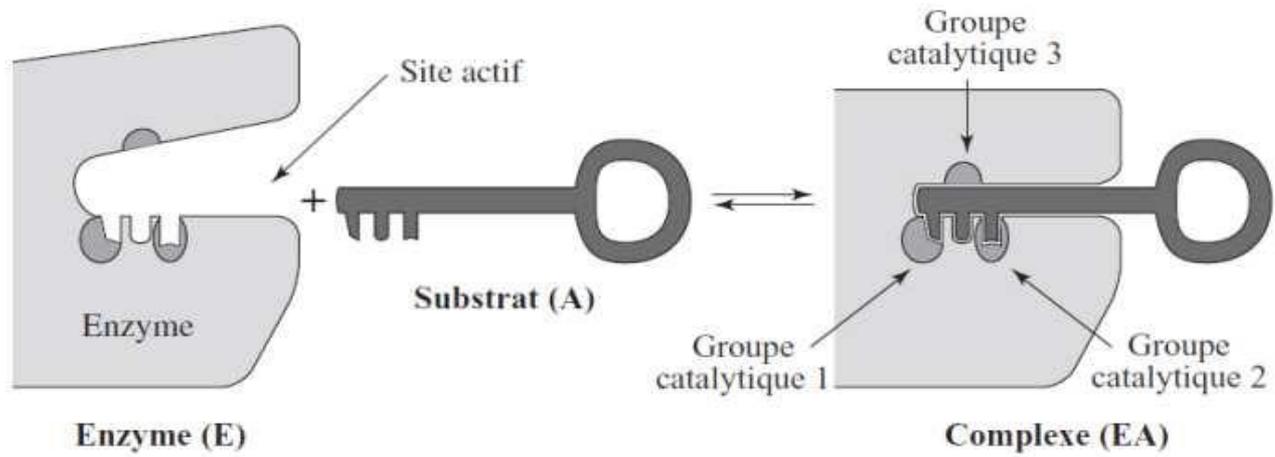


Fig 1. Modèle de Fisher : Clé-serrure

1.2- Modèle de Koshland : Ajustement induit

❖ L'association **enzyme-substrat** est permise après une modification de la conformation de l'enzyme induite par l'entrée partielle du substrat.

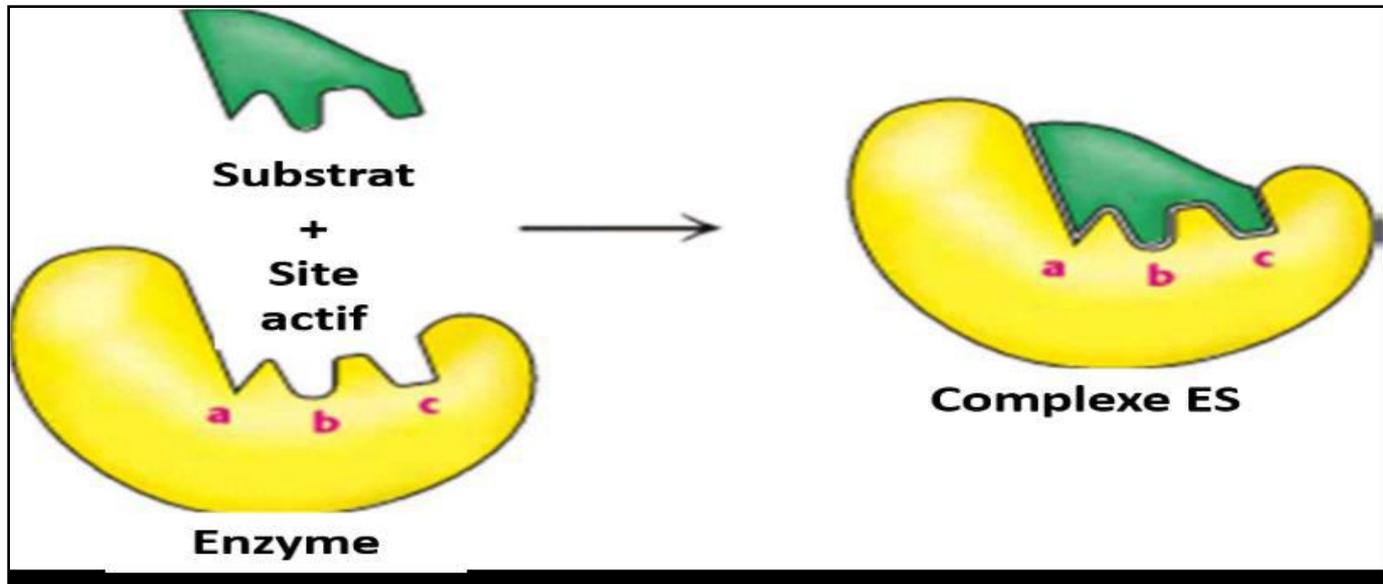


Fig. 2. Modèle de de Koshland

1.3- Modèle de Strain-Jenks :

❖ L'enzyme et le substrat lorsqu'ils ne sont pas dans le milieu présentent chacun une conformation particulière.

❖ La présence mutuelle de ces 2 molécules entraîne une déformation partagée de l'enzyme et du substrat, de manière à ce que le substrat se fixe sur les fonctions complémentaires des acides aminés de contacts.