

## Interaction protéine ligands

### 1. Introduction : Page facebook ; Domaine SNV : Biologie, Agronomie, Science Alimentaire, Ecologie

Les protéines sont caractérisées par leur aptitude à former des complexes c'est-à-dire des associations réversibles par des liaisons non covalentes avec un nombre considérable de molécules organiques de petite ou de grande taille exemple d'interaction enzyme substrat, antigène-anticorps, enzyme-effecteur, hormone-récepteur, la quantification des sites de fixation d'un ligand sur une protéine donne nécessairement en générale la détermination de la concentration de ligand liée à la protéine (complexe protéine-ligand) à l'équilibre thermodynamique.

Protéine a un seul site de fixation :

La fixation d'un ligand sur une protéine qui possède un seul site de fixation pour ce ligand est régie par un équilibre thermodynamique



$K_D$  : constante de dissociation

### 2. Protéine à plusieurs sites de fixation

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

Indépendants : c'est-à-dire 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 ;

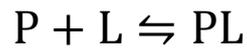
Site dépendant : la fixation de ligand sur un site est dépendante de l'état de saturation des autres sites.

### 3. Phénomène de saturation

- Un seul site de fixation

Expérimentalement  $[PL]$  n'est pas connue, une détermination de la densité optique  $DO$  ou  $A$  du complexe  $PL$  par absorption à une longueur d'onde  $\lambda$  caractéristique.

Soit deux réactions réversibles



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

$$KD = \frac{1}{KA} = \frac{[P_{libre}][L_{libre}]}{[PL]}$$

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  $\lambda$  à laquelle seul le complexe (protéine-ligand) absorbe la lumière ce qui implique, on étudie la variation d'absorbance ( $\Delta A$ ) 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 on observe alors une augmentation de l'absorbance jusqu'à ce que prendre des valeurs élevées de ligand, toutes les protéines sont sous forme de PL (protéine – ligand) c-à-d que  $\Delta A$  atteint à une valeur maximale à partir de laquelle, on n'observe plus d'augmentation de signal, si on continue d'augmenter la concentration [L] cet effet de saturation est caractéristique de la liaison non covalente entre une protéine (P) et un ligand (L) pour lequel elle possède un site de fixation spécifique

Analyse de la fonction de saturation :

On définit une fonction de saturation Y tel que

$$Y = \frac{[PL]}{[Pt]} = \frac{\Delta A}{\Delta A_{\max}}$$

Cette fonction renseigne sur le degré de saturation de la protéine, d'après la loi de conservation de la protéine

$$[Pt] = [P_{\text{libre}}] + [P_{\text{liée}}]$$

$$Y = \frac{[PL]}{[Pt]} = \frac{\Delta A}{\Delta A_{\max}} \Rightarrow Y([P_{\text{libre}}] + [P_{\text{liée}}]) = [PL]$$

$$Y = \frac{1}{1 + \frac{[P_{\text{libre}}]}{[P_{\text{liée}}]}}$$

$$Y = \frac{1}{1 + \frac{[P_{\text{libre}}]}{KA [P_{\text{libre}}][L_{\text{libre}}]}}$$

$$Y = \frac{1}{1 + \frac{1}{KA[L_{\text{libre}}]}}$$

$$KD = \frac{[P_{\text{libre}}][L_{\text{libre}}]}{[PL]} = \frac{1}{KA}$$

$$Y = \frac{1}{\frac{KA[L_{\text{libre}}] + 1}{KA[L_{\text{libre}}]}} = \frac{KA[L_{\text{libre}}]}{KA[L_{\text{libre}}] + 1}$$

Equation d'une hyperbole

$$Y = \frac{KA [L libre]}{KA [L libre] + 1}$$

$$Y = \frac{[L libre]}{KD + [L libre]}$$

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

$$\frac{[P libre]}{[P totale]} = 1$$

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

N.B : la fonction de saturation Y représente la fraction des sites saturés ou occupés par le ligand

$$Y = \frac{KA[L libre]}{KA[L libre] + 1} \Rightarrow Y(KA [L libre] + 1) = KA [L libre]$$

$$Y = \frac{KA [L libre]}{KA[L libre] + 1} \Rightarrow Y KA[L libre] + Y = KA[L libre]$$

$$Y = \frac{KA[L libre]}{KA[L libre] + 1} \Rightarrow Y = (KA - Y KA)[L libre]$$

Equation de Scatshard

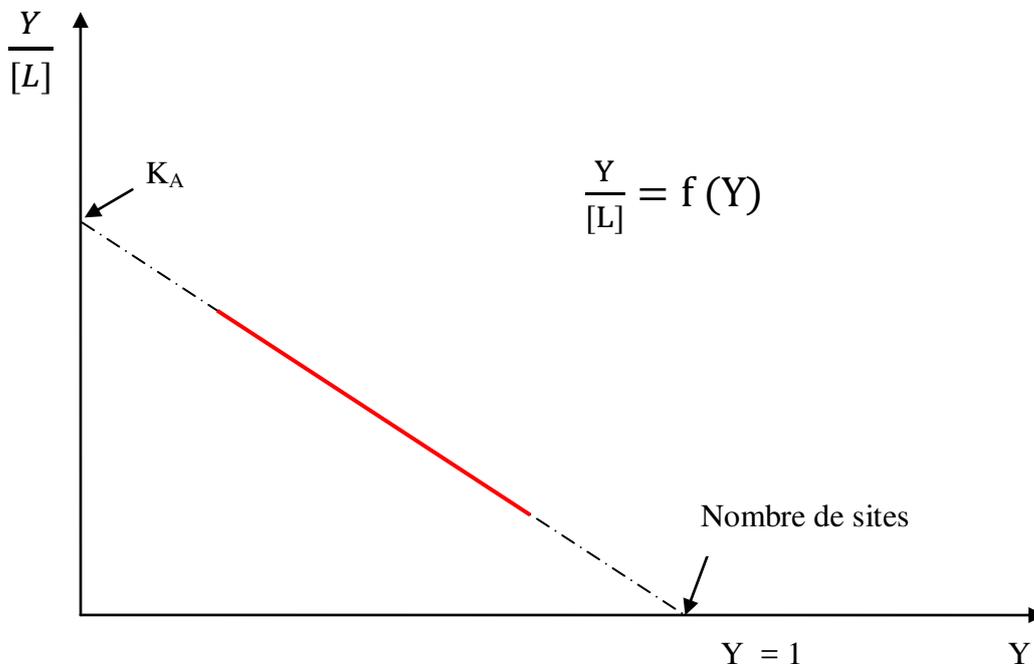
$$\frac{Y}{[L libre]} = KA - Y KA$$

On obtient une droite dont la pente est KA et qui coupe l'axe des abscisses pour la valeur de

$$Y = A$$

$n$  : le nombre de site de liaison par molécule d'enzyme ou bien le nombre de molécule de récepteurs par cellules

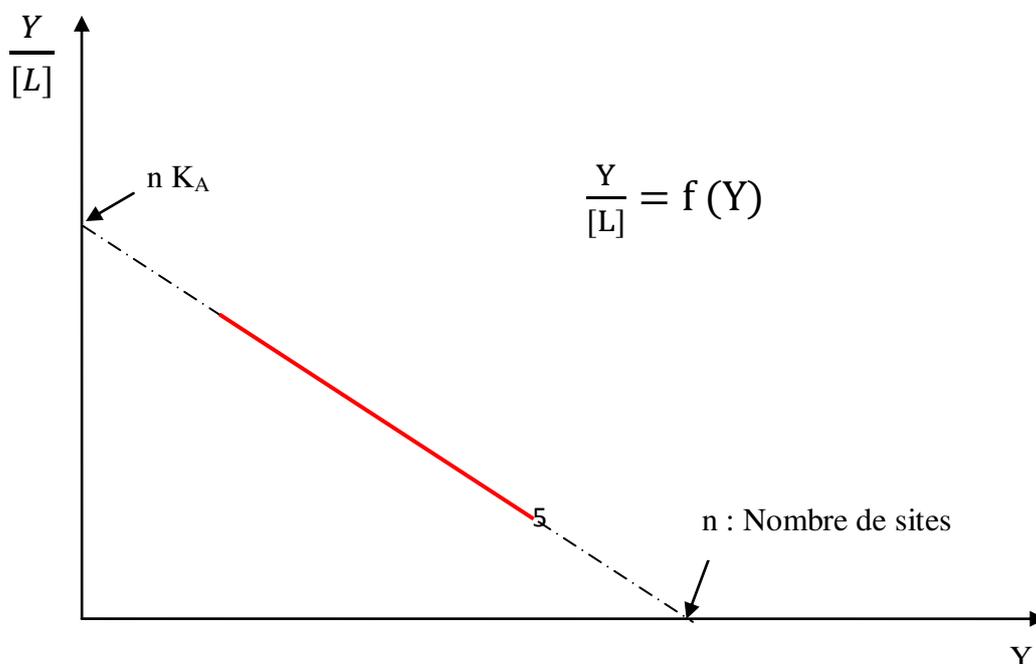
Remarque le cas représenté est celui dans lequel une molécule de ligand peut se lier à une molécule de protéine



**Cas d'une protéine oligomérique ou on a plusieurs site de fixation**

$n$  sous-unité identique capable de fixé chacune une molécule de ligand la fonction de saturation devient alors

$$Y = n \frac{KA[L \text{ libre}]}{KA[L \text{ libre}] + 1} \Rightarrow \frac{Y}{[L \text{ libre}]} = nKA - Y KA$$



$$Y = \frac{[PL]}{[Pt]} \dots\dots\dots ①$$

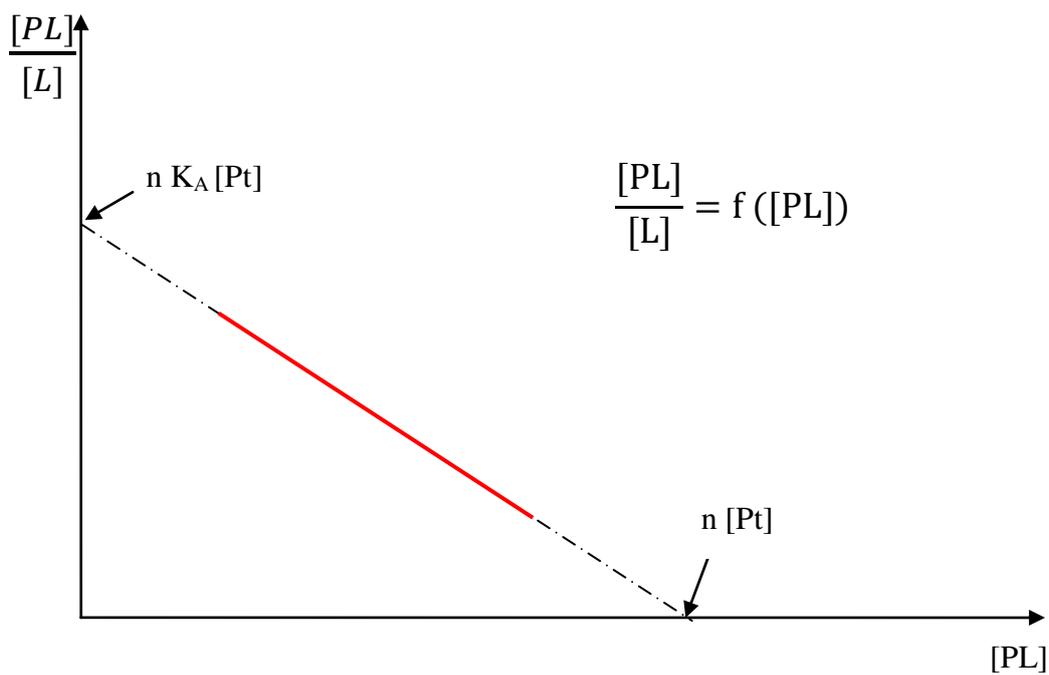
$$\frac{Y}{[L \text{ libre}]} = nKA - Y KA \dots\dots\dots ②$$

Remplaçons ① en ②

$$\frac{[PL]/[Pt]}{[L \text{ libre}]} = nKA - \frac{[PL]}{[Pt]} KA$$

Donc

$$\frac{[PL]}{[L \text{ libre}]} = n KA [Pt] - [PL]KA$$

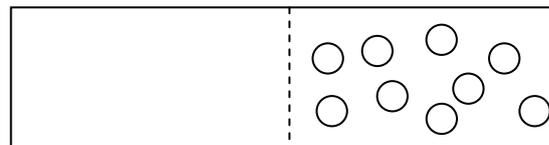


**Mesure des concentrations de ligand libre :**

Approche expérimentale : la caractérisation de site de fabrication demande en générale la mesure des concentrations de ligand liés et libres.

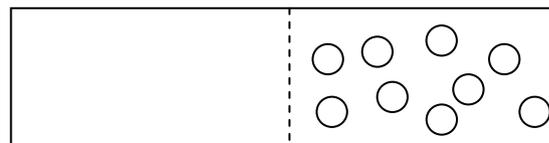
Exemple1 : lorsque on étudie la fixation d'un ligand libre se trouve alors dans le surnageant ou dans le filtrat. Le ligand lié va se trouver dans le culot sur le filtre.

Exemple2 : Si on est en présence de protéine soluble et que l'on étudie la fixation sur tamis moléculaire ou la dialyse à l'équilibre dans le cas dans le cas de la dialyse, le ligand libre est capable de diffuser librement à travers la membrane de dialyse alors que ligand lié à la protéine ne diffuse pas, lorsque l'équilibre est atteint la concentration de ligand libre de part et d'autre de la membrane, et la même si la protéine qui fixe le ligand et mis d'un seul coup la membrane de dialyse on retrouve en plus dans ce comportement le ligand lié à cette protéine.

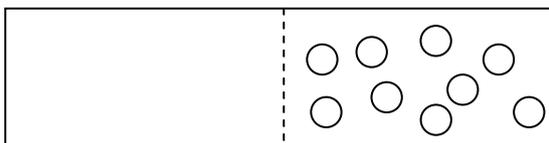


**Pas de ligand liée**

**Ligand libre**

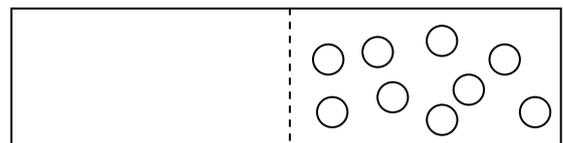


**Ligand libre et liée**



**Milieu contre dialyse non renouvelé**

$$[L \text{ lié}] = [L \text{ total}] - 2 [L \text{ libre}]$$



**Milieu contre dialyse renouvelé**

$$[L \text{ lié}] = [L \text{ total}] - [L \text{ libre}]$$

## TD interaction protéine-ligand

### Exercice 01: (tableau 01)

La détermination de la concentration de ligand lié et ligand libre peut se faire indirectement en étudiant un paramètre expérimental. Exemple : la fluorescence d'une enzyme lorsqu'il est en présence de concentration saturante de apoenzyme. Connaissant ces deux paramètres on peu pour différents concentration de coenzyme lié.

Application : on étudie l'effet de la concentration de coenzyme [NADH, H<sup>+</sup>] sur la fixation de ce coenzyme sur l'alcool déshydrogénase avec une concentration d'enzyme  $3 \cdot 10^{-5}M$ .

On obtient les résultats présentés dans le (tableau 01)

- Calculez le nombre de site de fixation de NADH, H<sup>+</sup> par molécules d'enzyme ?
- Le  $K_D$  du complexe enzyme-coenzyme ?

### Exercice 02 : (tableau 02)

On étudié une enzyme de métabolisme de tryptophane, l'une des substrats (ligand) de cet enzyme est le tryptophane lui-même. On veut déterminer le nombre de site de fixation, après l'incubation de l'enzyme dont la concentration est constant  $5 \cdot 10^{-6}M$  avec des concentrations variables de tryptophane marqué au C<sup>14</sup> en trouve les résultats présentés dans le (tableau 02) :

A partir de ces valeurs, calculer le nombre de site de fixation de tryptophane par molécule d'enzyme et le  $K_D$  pour le complexe enzyme-tryptophane.

### Exercice 03 : (tableau 03)

La fixation de NADP sur la glutathion réductase a été suivie à 500nm, le NADPH n'absorbe pas à cette longueur d'onde et la variation d'absorbance correspond a une attraction entre la flavine de glutathion réductase et NADPH ON travaille avec 2,5 mM d'enzyme et on a mesuré l'absorbance en présences de différent concentration de NADPH

- Calculez e nombre de site de fixation et le  $K_d$  du complexe.

**Tableau 01**

<b>[NADH, H<sup>+</sup>]<sub>lie</sub> .10<sup>-6</sup> M</b>	<b>[NADH, H<sup>+</sup>]<sub>libre</sub> .10<sup>-9</sup> M</b>	
<b>9</b>	<b>5,67</b>	
<b>8,40</b>	<b>4,12</b>	
<b>7,65</b>	<b>2,83</b>	
<b>5,52</b>	<b>1, 35</b>	
<b>2,91</b>	<b>0,49</b>	

**Tableau 02**

<b>[Tryptophane]<sub>lie</sub> .10<sup>-6</sup> M</b>	<b>[Tryptophane] .10<sup>-9</sup> M libre</b>	
<b>1</b>	<b>0,56</b>	
<b>2</b>	<b>1,23</b>	
<b>4</b>	<b>3,40</b>	
<b>5,5</b>	<b>6</b>	
<b>7</b>	<b>11,70</b>	
<b>9</b>	<b>43,7</b>	

**Tableau 03**

<b>[NADP] μM</b>	<b>Do</b>			
<b>0</b>	<b>0,2625</b>			
<b>1,25</b>	<b>0,325</b>			
<b>2,5</b>	<b>0,38</b>			
<b>3,75</b>	<b>0,43</b>			
<b>5</b>	<b>0,47</b>			
<b>7,5</b>	<b>0,53</b>			
<b>10</b>	<b>0,56</b>			
<b>15</b>	<b>0,605</b>			
<b>20</b>	<b>0,625</b>			

Interaction protéine ligands

---

<b>saturent</b>	<b>0,675</b>			
-----------------	--------------	--	--	--