

## Interaction Protéine-Ligand

De nombreux mécanismes biologiques existent grâce à des interactions entre une protéine et un ligand (toute molécule capable de se lier à une protéine) : hormones-récepteurs (cytokines-récepteurs / facteurs solubles-cellules), liaisons cellules-cellules, Ig-Ag, récepteurs lymphocytes T-Ag, molécules de transport (transferrine lie le fer), facteurs de transcription, enzyme-substrat... On parle d'**interactome**.  
La spécificité est liée à la structure 3D.  
Les ligands peuvent être des protéines, des ions....

Caractéristiques principales :

- spécifique
- pas uniquement due à une complémentarité géométrique
- nécessite généralement une adaptation dynamique de la protéine
- ces interactions mettent en jeu des liaisons faibles et des liaisons réversibles.

### I. Ordre d'une réaction

L'ordre d'une réaction est une notion expérimentale qui permet d'étudier la cinétique d'une réaction chimique ainsi que l'implication des différents réactifs.

#### 11. Réaction d'ordre 0



Si la vitesse est constante et indépendante de la conc. de A, l'ordre de la réaction est égale à 0

$$V = - \frac{d[A]}{dt} = k \quad k = \text{cste de vitesse de réaction}$$

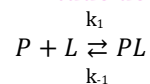
#### 12. Réaction d'ordre 1



Si la vitesse est proportionnelle à la conc. de A, elle est d'ordre 1

$$V = - \frac{d[A]}{dt} = k[A] \quad k = \text{constante de vitesse.}$$

### II. Etude de la fixation.



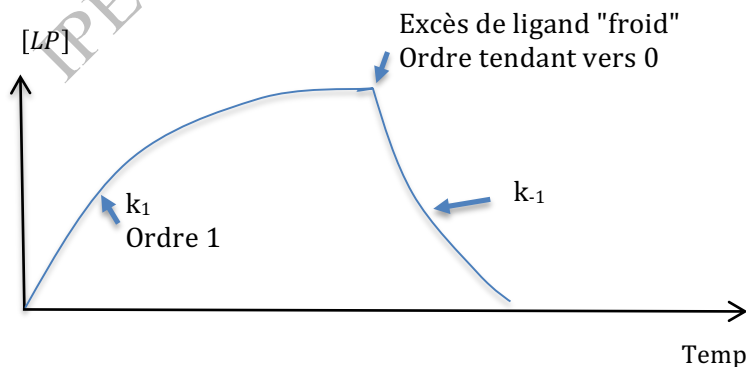
**$k_1$  = cste de vitesse d'association en  $M^{-1}.s^{-1}$**

**$k_{-1}$  = cste de vitesse de dissociation en  $s^{-1}$**

Suivi de la formation du complexe LP :

Expérience de marquage avec un isotope radioactif du ligand.

Pour mesurer la constante de vitesse de dissociation, on ajoute un excès de ligand froid (non marqué radioactivement). Il y a une compétition et on mesure le ligand marqué libéré.



A l'équilibre, la vitesse d'association de PL = vitesse de dissociation de PL

[L] = conc. en ligand libre à l'équilibre (Free) = [F]

[P] = conc. en P libre à l'équilibre

[PL] = conc. en complexe PL à l'éq = conc. en ligand lié à l'éq. (bound) = conc en prot. lié à l'éq = [B]

Cste de dissociation (en M):  $Kd = \frac{([L][P])}{[PL]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$

Cste d'association (en M<sup>-1</sup>):  $Ka = \frac{[PL]}{([L][P])} = \frac{k_1}{k_{-1}}$

Ka est un indicateur de l'affinité voire de la spécificité de la protéine pour le ligand.

Plus Ka est élevé, plus la prot. a une grande spécificité pour le ligand et plus l'équilibre est déplacé vers la formation du complexe PL.

Plus Kd est faible, plus l'affinité est grande.

Liaison non spécifique si  $K_D > 10^{-6}$  M

Exemple de très forte affinité utilisé lors du test ELISA :

Kd (avidine / biotine) =  $10^{-15}$  M → Outil biologique très important

Autres exemples :

- IgG / Ag →  $K_D$  va de  $10^{-6}$  à  $10^{-13}$  M (varie en fonction de la réponse immunitaire)

- IL2 / Récepteur (formé de 3 sous unités  $\alpha, \beta, \gamma$  = hétérotrimérique →  $K_D = 10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-12}$  M

- Albumine / Tyrosine →  $K_D = 10^{-6}$  M → Affinité très très faible

### III. Etude cinétique en fonction de la conc. en ligand :

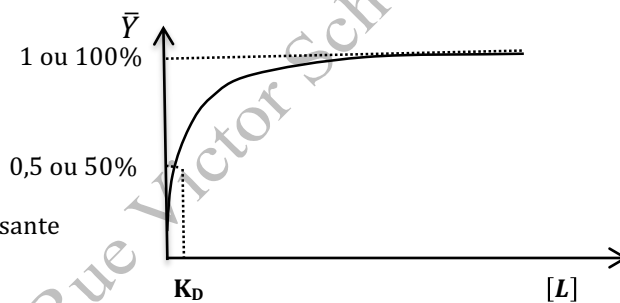
$[P_{totale}] = [P] + [PL]$

Fonction de saturation :  $\bar{Y} = [PL] / [P_{totale}]$

Après plusieurs étapes...

$\bar{Y} = [L] / (K_D + [L])$

Hyperbole équilatère croissante



**$K_D$  = conc. en ligand pour avoir 50% de saturation.**

Si  $K_D$  augmente, l'affinité diminue.

### IV. Cas où la protéine présente n sites équivalents et indépendants.

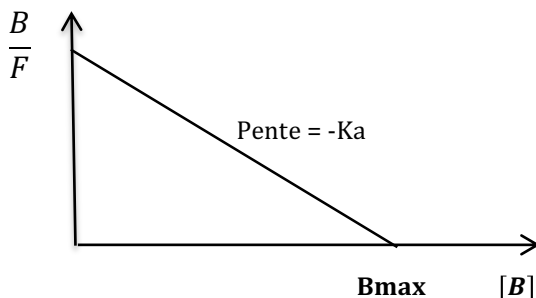
Fonction de saturation en fonction de la concentration en L → hyperbole équilatère.

Détermination de  $K_D$  et du nombre de sites de la protéine en utilisant la linéarisation de Scatchard.

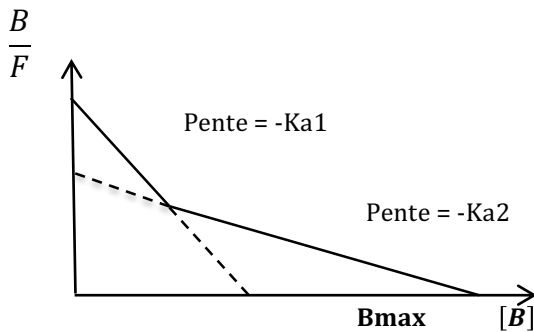
$[B]/[F] = K_A \times n [P_{totale}] - K_A [B]$

Conc. totale en sites =  $B_{max} = n \times [P_{totale}]$

Représentation de Scatchard  $[B]/[F]$  en fonction de  $[B]$  (applicable aux cellules)



**V. Cas ou la protéine présente n sites non équivalents et indépendants.**



Deux types de sites liant le même ligand :  $K_{A1} > K_{A2}$ .  
Le ligand est plus affiné pour le site n°1.

**VI. Méthodes d'étude**

**61. Expérience de dialyse**

To : mélange de P et L\*(radioactif)

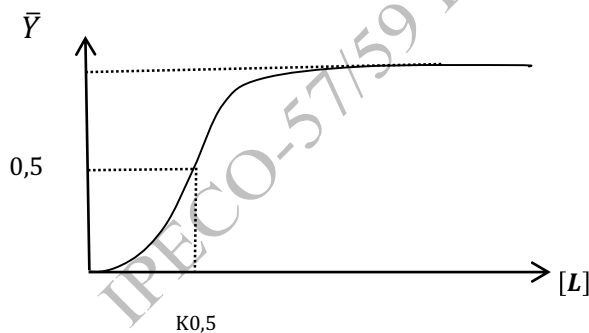
T1 : Temps nécessaire pour avoir équilibre  $P + L^* \rightleftharpoons PL^*$

Le mélange est placée dans un sac de dialyse à porosité variable mais calculée pour ne laisser passer que le ligand L\* libre (appelée F ou Free).  
On détermine la concentration en L\* libre (ou Free) qui est la même à l'intérieur du sac et à l'extérieur du sac de dialyse  
Et on trace Scatchard.

**62. Système Biacore = SPR ou surface plasma membrane**

Un flux de ligand (Ag) qui vient interagir avec des Ac (fixé au sensor). On mesure la réflexion de la lumière via la résonance magnétique de la surface.  
Ce système mesure directement la  $k_d$ .

**VI. Cas ou la protéine présente n sites équivalents et dépendants : Allostérie**



L'allure de la courbe est une sigmoïde → cela illustre une fixation allostérique  
Ce type de fixation s'observe dans le cas de protéine multimérique (plusieurs monomères ou sous-unités/ structure IVaire) avec des sites de fixation équivalents et dépendants.

$K_{0,5}$  = concentration en ligand pour avoir 50% de saturation.

Tout se passe comme si la fixation d'une molécule de ligand facilite la fixation d'une deuxième et que celle-ci facilite encore plus la fixation d'une 3ème et etc...

La fixation d'une première molec. de ligand modifie l'affinité d'une deuxième, etc... → phénomène de coopérativité.

Il y a une modification de la protéine dès lors qu'un premier ligand se fixe.

On parle d'effet homotrope.

Il existe deux modèles pour expliquer le phénomène de coopérativité.

Utilisation de deux représentations pour les monomères :

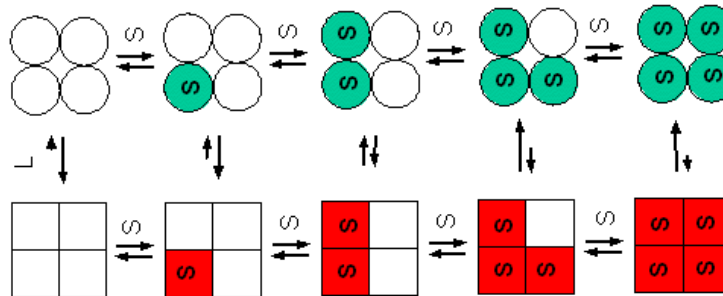
- Tendue /Tense : moins affine pour le ligand



- Relachée / relax : plus affine pour le ligand



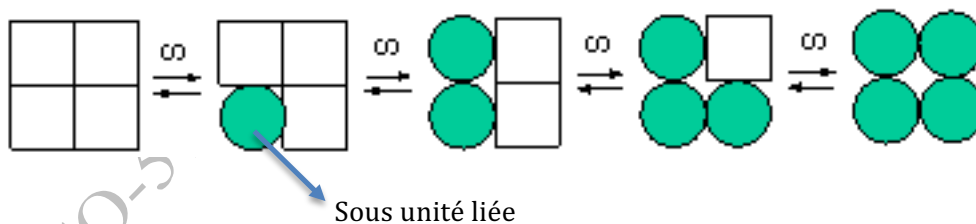
- Premier modèle MWC (Monod, Wyman, Changeux) : modèle concerté



La protéine existe soit tout sous forme R soit tout sous forme T

Le passage de l'une à l'autre s'accompagne d'un changement de la conformation de la protéine. La fixation d'un premier ligand déplace l'équilibre vers la forme R, etc...et de plus en plus facilement

- Deuxième modèle = modèle séquentiel de Koshland



Le changement de conformation se fait de proche en proche et de plus en plus rapidement.

Les protéines peuvent être soumises à des régulations par d'autres ligands : effet hétérotrope. Il y a deux types d'effets hétérotropes :

- positif :
  - $K_{0,5}$  diminue
  - La proportion de la forme R augmente
  - L'affinité augmente
  - activateur allostérique.

- négatif :
    - $K_{0,5}$  augmente
    - La proportion de forme T augmente
    - L'affinité diminue
- inhibiteur allostérique

#### IV. Les Chromoprotéines : la myoglobine et l'hémoglobine.

##### 41. Structure de Hb et Mb

Mb : une seule unité (un monomère)

Hb : tétramère (4 sous-unités)

Chaque monomère de Hb ressemble fortement au monomère de la Mb.

Chaque monomère est constitué :

- une partie protéique : globine
- une partie groupement prosthétique : l'hème

##### 411. Structure de l'hème

constitué de protoporphyrine = cad d'un noyau tétrapyrrole (constitué de 4 molécules de pyrrole) sur lequel se fixe différents constituants.

L'hème est constitué d'une partie protoporphyrine et d'un atome de fer au centre.

Le fer est sous forme ionisée ?

Il peut exister sous deux formes :

Soit l'état ferreux ( $Fe^{2+}$ )

Soit l'état ferrique ( $Fe^{3+}$ )

Cet ion fer est relié à la protoporphyrine par l'intermédiaire de liaisons datives via les atomes d'azotes (4).

##### 412. Etude comparative Mb/Hb

La globine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique globulaire.

Elle est extrêmement compacte avec les  $\frac{3}{4}$  de la chaîne repliée en 8 hélices alpha.

Pour la myoglobine : PM = 17800 et compte 155 résidus d'aa.

Le fer établit 5 liaisons datives : 4 avec la protoporphyrine et 1 avec l'atome d'azote de la chaîne latérale d'une histidine.

4 sous unités identiques deux à deux

HbA = Hb Adulte avec structure  $\alpha_2\beta_2$

Chaque sous unité possède un hème et donc une hémoglobine possède 4 hèmes.

Il existe aussi une hémoglobine fœtale = HbF

Structure  $\alpha_2\gamma_2$

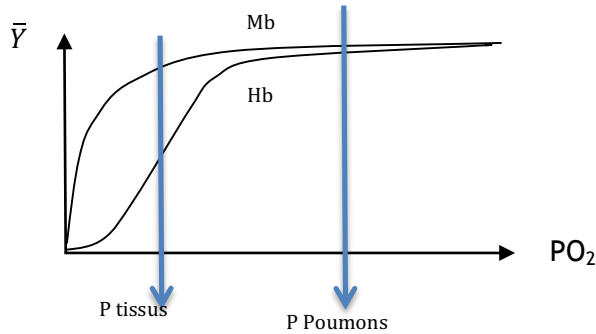
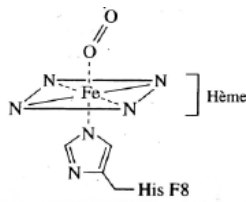
Le ligand de la Mb et de l'Hb =  $O_2$  qui va établir une 6ème liaison de covalence dative avec  $Fe^{2+}$ .

Il n'y a pas de possibilité de liaison avec  $Fe^{3+}$  (fixation d'une molécule d' $H_2O$ ).

La liaison  $Fe^{2+} / O_2$  est dans le même plan que la liaison  $Fe^{2+} / His$  et perpendiculaire au plan formé par les 4 liaisons datives ( $Fe^{2+} /$  noyau tétrapyrrole)

##### 42. Aspect dynamique de la fixation d' $O_2$ .

Avant la fixation de l' $O_2$ ,  $Fe^{2+}$  est légèrement au dessous du plan formé par le noyau tétrapyrrole. A l'approche d' $O_2$ , His (F8) pousse  $Fe^{2+}$  dans le plan formé par le noyau tétrapyrrole et l' $O_2$  peut se fixer.



Mb → hyperbole équilatère  
 Hb → sigmoïde

$K_{0,5} \text{ Hb}$  ou  $P_{50} \text{ Hb} > K_d \text{ Mb}$  ou  $P_{50} \text{ Mb}$  → Mb a plus d'affinité pour l'O<sub>2</sub>

L'Hb se sature en O<sub>2</sub> dans les poumons et relargue l'O<sub>2</sub> dans les tissus → elle joue le rôle de transporteur d'O<sub>2</sub>.

La Mb stocke l'O<sub>2</sub> dans les muscles.

#### 421. Analyse cinétique à 2 points caractéristiques.

Y	0,1	0,9
P <sub>O<sub>2</sub></sub> ou conc en O <sub>2</sub> pour Mb	0,2	16,2
Pour Hb	14	54

Index de coopérativité =  $\frac{[S]_{0,9}}{[S]_{0,1}}$

Mb →  $16,2/0,2 = 81$  → pas de coopérativité  
 Cinétique hyperbole équilatère

Hb →  $54/14$  (quasi = 4)  $\ll 81$  → coopérativité positive  
 Cinétique : sigmoïde → allostérie

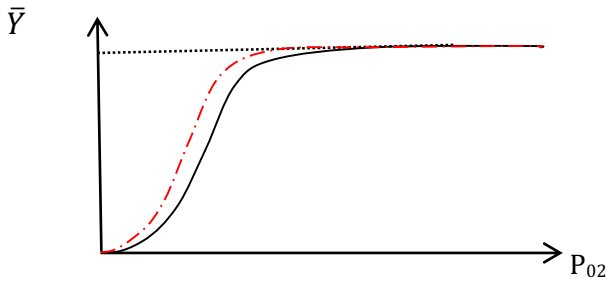
Rem : Ceci est applicable à toutes fixations protéine - ligand mais aussi aux cinétiques enzymatiques.

Il existe une coopérativité négative pour certaines protéines → index de coopérativité > 81.

On peut appliquer les modèles MWC et Koshland à toutes les enzymes possédant une cinétique allostérique.

En principe, l'ordre de coopérativité doit donner une idée du nombre de sous-unités (4 pour Hb)

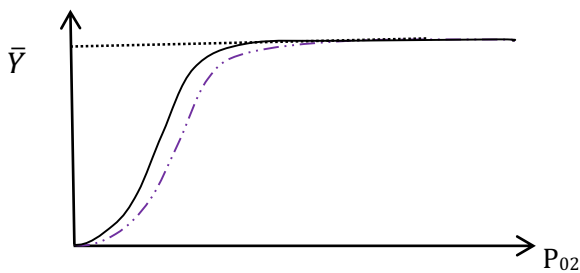
#### 422. Transfert de l'O<sub>2</sub> de HbA à HbF



HbF (courbe rouge en pointillés) est plus affine que HbA / d'où un transfert placentaire de l'O<sub>2</sub> de HbA vers HbF qui a une plus forte proportion de forme relâchée.

#### 423. Régulation de la fixation d'O<sub>2</sub>.

##### a. l'effet Bohr



Une diminution du pH (courbe violette en pointillée) augmente la P<sub>50</sub> ce qui permet une libération facilitée de l'O<sub>2</sub> (transition de R en T).

Ceci se déroule au cours du métabolisme : quand celui-ci augmente, il y a augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub>, donc en protons → d'où une diminution du pH et donc une libération d'O<sub>2</sub> dans les tissus.

C'est un effet hétérotrope : la concentration en CO<sub>2</sub>/ H<sup>+</sup> influe la fixation ou la libération d'O<sub>2</sub>. On observe une augmentation de la proportion de forme T : effet hétérotrope négatif.

La variation de pH influe sur la structure 3D de la globine en modifiant l'état d'ionisation de certains résidus d'aa qui étaient mises en jeu dans l'établissement de certaines liaisons ioniques mais aussi de l'ensemble des 4 sous unités de l'Hémoglobine (existence de liaison H, interactions...)

##### b. le 2,3-BPG

Son site de fixation est dans la cavité centrale formée par les 4 sous unités.

Il stabilise la forme T et se situe dans les tissus de notre organisme : il facilite donc la libération d'O<sub>2</sub>. La fixation est exclusive.

Le 2, 3-BPG interagit préférentiellement avec les sous unités bêta.

Ce qui permet à HbF d'être moins sensible au 2,3-BPG.

Ce qui explique la plus grande proportion de forme R pour HbF comparé à HbA.

#### 424. Physiopathologie.

##### a. Intoxication au CO

le site de fixation de CO est de celui de l'O<sub>2</sub>.

L'Hb est 200 fois plus affine pour le CO que pour l'O<sub>2</sub> d'où une intoxication possible.

Utilisation de caisson hyperbare pour déplacer le CO de l'Hb et le remplacer par O<sub>2</sub>.

**b. La méthémoglobine**

= Hb qui possède un ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) incapable de fixer l' $O_2$

Taux normal faible de méthémoglobine

Augmentation si maladie génétique ou prise de certains médicaments

**c. Drépanocytose**

HbS

Due à une mutation = substitution d'1 glu par une val

Donc par un aa apolaire qui va aboutir à la précipitation des sous unités  $\beta$  → globules rouges en forme de faucille → obstruction des capillaires.