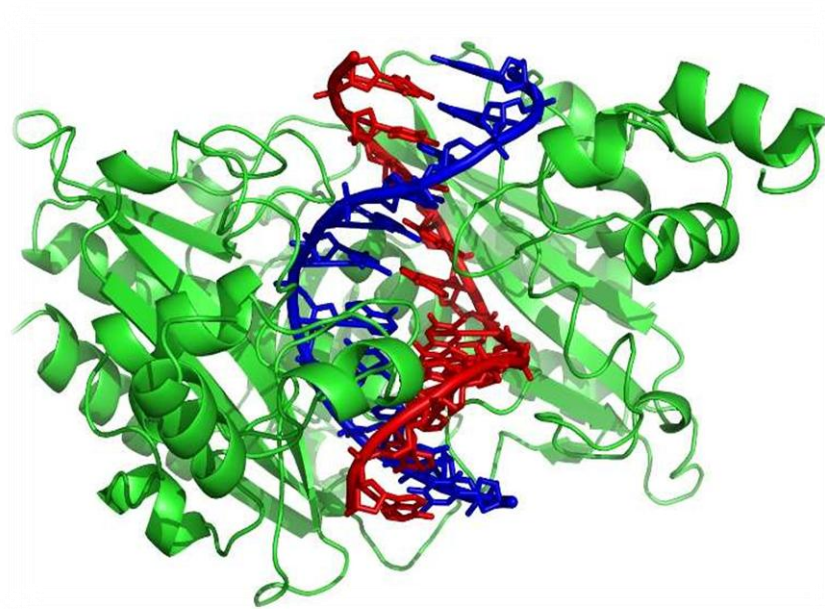


Interactions protéines-ligands



Dr Berzou

Année universitaire : 2021/2022

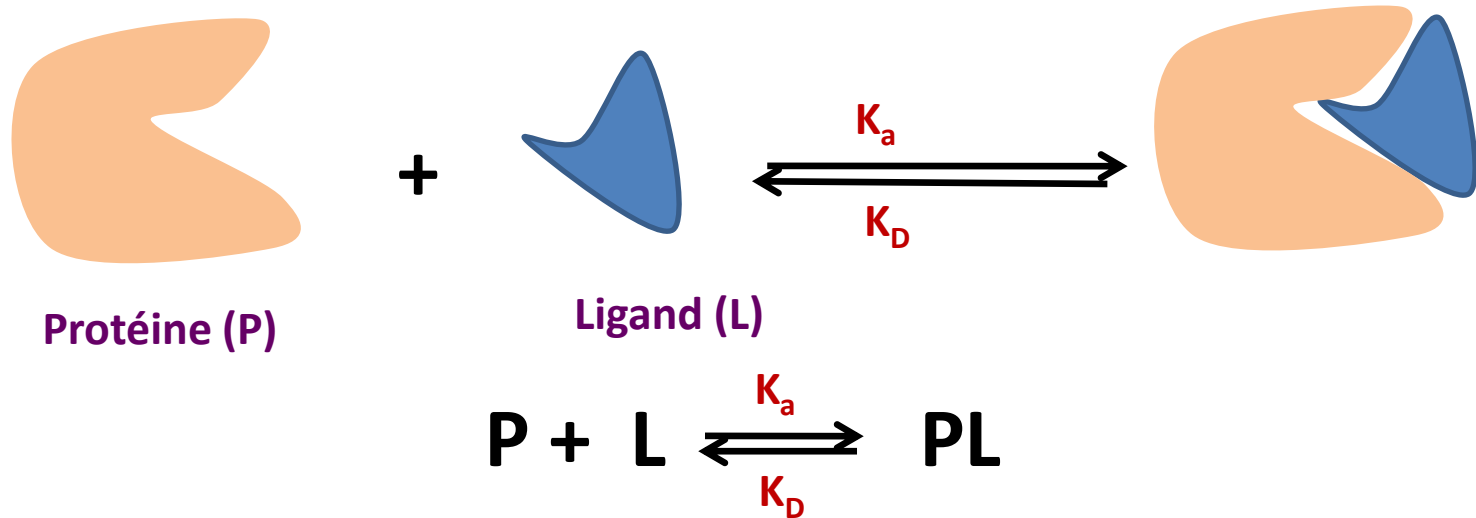
I. Interactions protéines-ligands

❖ 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-anticorp, 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-protéine-ligand) à l'équilibre thermodynamique.

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 : La constante d'équilibre d'association

K_D : 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**.

2- Protéine à plusieurs site de fixation

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

➤ Indépendants

La fixation de ligand sur un site étant Independent de l'état de saturation des autres sites de fixation ils peuvent êtres 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

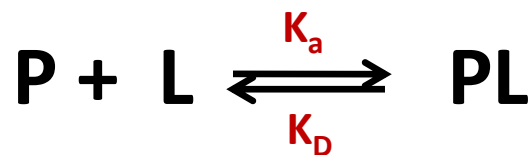
La fixation de ligand sur un site est dépend de l'état de saturation des autres sites.

3. Phénomène de saturation

3.1 Un seul site de fixation

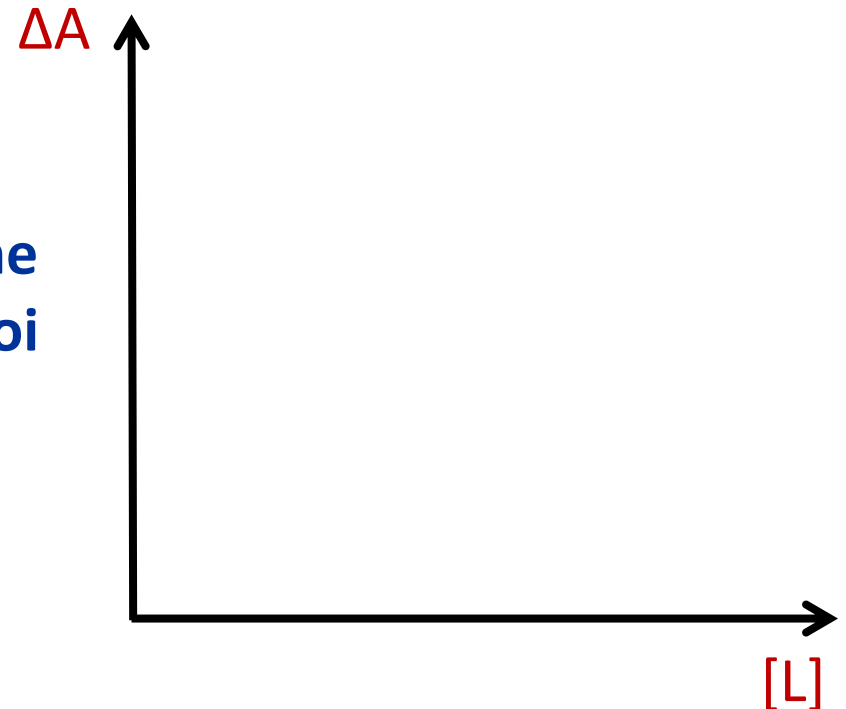
➤ Expérimentalement [PL] n'est pas connu, une détermination de la densité optique DO ou A du complexe PL par absorption à une longueur d'ondes λ caractéristique.

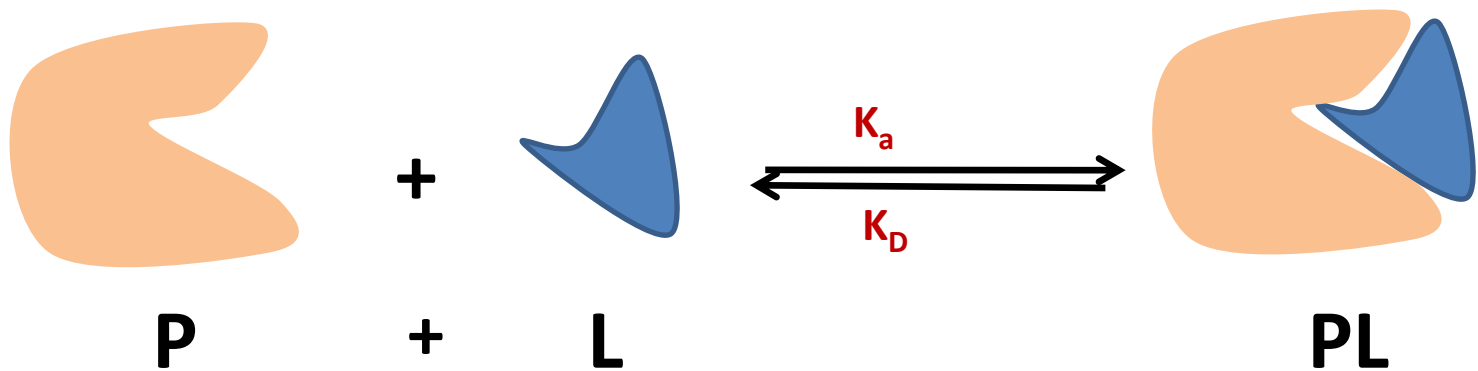
3.2 Soit deux réactions réversibles



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

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





➤ 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 :

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

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

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

❖ Analyse de la fonction de saturation

➤ On définit une fonction de saturation Y tel que

$$Y = \frac{[PL]}{[Pt]} = \frac{[\text{Complexe protéine + ligand}]}{[\text{Protéine total}]}$$

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

➤ On l'appelle la fonction de saturation $\bar{Y}$. Sa valeur est égale à 0,5 (demi-saturation) quand la $[L]$ libre ($[L]_{0,5}$) est égale à K_d .

Y_s : nombre moyen de sites de fixation occupés par le ligand ramené au nombre total de sites de fixation = $f([L])$

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

Y_s : $\frac{\text{Concentration des complexes } [PL_i]}{[\text{nombre } n \text{ de site(s) de fixation par molécule de protéine}] \times [\text{concentration totale de protéine}]}$

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

$$[Pt] = [P] + [PL]$$

➤ **Pt** : protéines total **P** : protéine libre **PL** : protéines liée

D'une part :

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \Rightarrow \frac{[P]}{[PL]} = \frac{K_d}{[L]}$$

D'autre part :

$$\bar{n} = \frac{[PL_i]}{[P]_{\text{totale}}} = \frac{[PL]}{[P] + [L]} = \frac{1}{1 + \frac{[P]}{[PL]}}$$

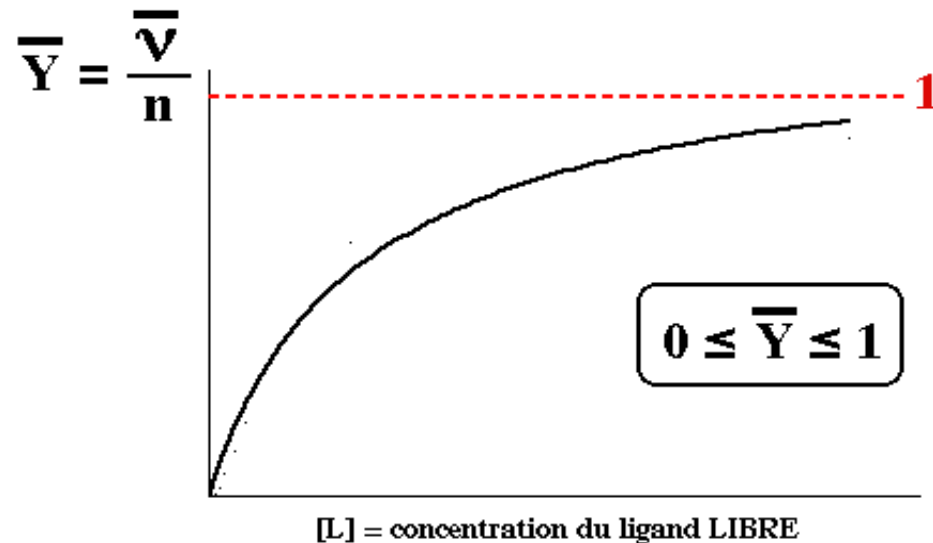
Donc :

$$\bar{n} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[L]}} = \frac{[L]}{K_d + [L]} = \frac{K_a \cdot [L]}{1 + K_a \cdot [L]}$$

On obtient la relation développée par George Scatchard (1892 - 1973), qui est généralisable à n sites identiques et indépendants :

$$Y_s = \frac{[L]}{K_d + [L]}$$

❖ Equation d'une hyperbole



E. Jaspard (2009)

- L'équation de la fonction de saturation $\bar{Y}$ 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.

N.B : la fonction de saturation $\bar{Y}$ représente la fraction des sites saturés ou occupés par le ligand

□ Représentation de SCATCHARD

La représentation de Scatchard permet de déterminer n et K_d :

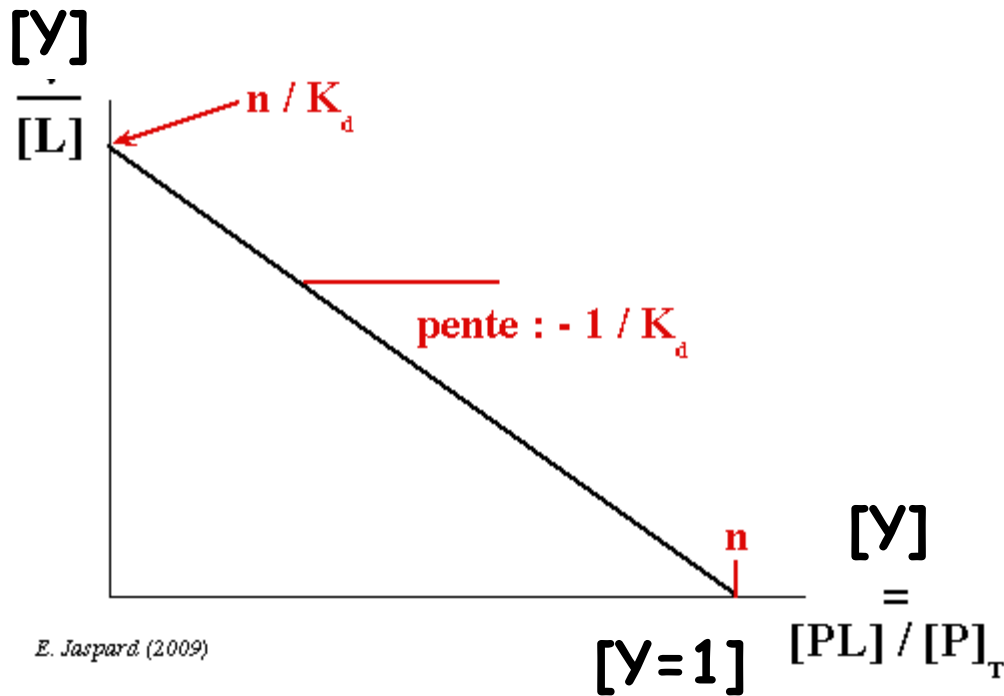
$$\begin{aligned}\bar{Y} = \frac{\bar{n}}{n} &= \frac{[L]}{K_d + [L]} \Rightarrow \frac{n}{\bar{n}} = 1 + \frac{K_d}{[L]} \Rightarrow \frac{n - \bar{n}}{\bar{n}} = \frac{K_d}{[L]} \Rightarrow \frac{n - \bar{n}}{K_d} = \frac{\bar{n}}{[L]} \\ &\Rightarrow \frac{\bar{n}}{[L]} = \frac{n}{K_d} - \left(\frac{1}{K_d} \cdot \bar{n}\right)\end{aligned}$$

Puisque :

$$\bar{n} = \frac{[PL_i]}{[P]_{\text{totale}}}$$

On représente :

$$\frac{\bar{n}}{[L]} = f\left(\frac{[PL_i]}{[P]_{\text{totale}}}\right) \text{ dont la pente} = -\frac{1}{K_d}$$

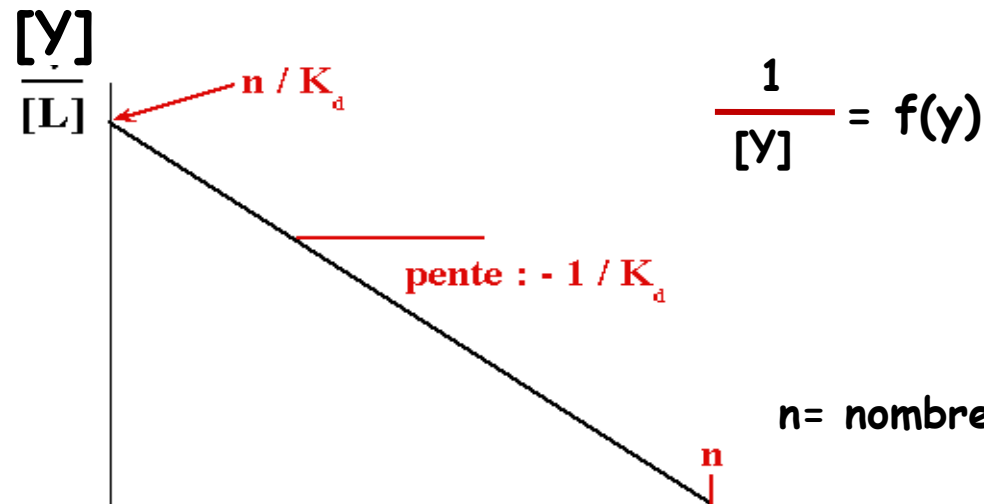


- n : le nombre de site de liaison par molécule d'enzyme ou bien le nombre de molécule de récepteurs par cellules.
- Remarque le cas représenté est celui dans lequel une molécule de ligand peut se lier à une molécule de protéine.

➤ Cas d'une protéines oligomérique ou on a plusieurs site de fixations

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

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



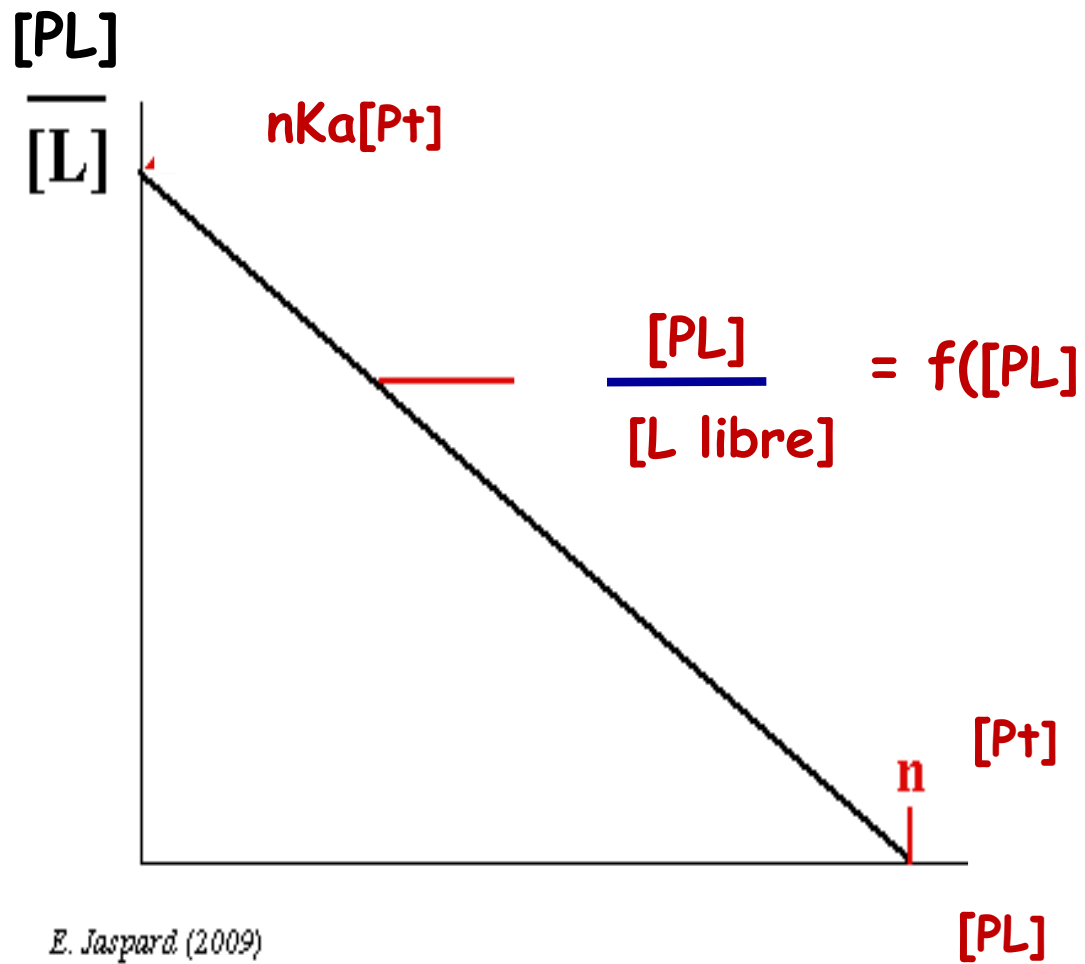
n = nombre de site de fixation

A partir de l'équation (1) $y = \frac{[PL]}{[P^+]}$

Équation (2) $\frac{[Y]}{[L \text{ libre}]} = nK_a - yK_a$

Remplaçant 1 en 2 $\frac{[PL]/[P^+]}{[L \text{ libre}]} = nK_a - \frac{[PL]}{[P^+]} K_a$

Donc $\frac{[PL]}{[L \text{ libre}]} = nK_a[P^+] - [PL]K_a$



E. Jaspard (2009)

❑ 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.

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.

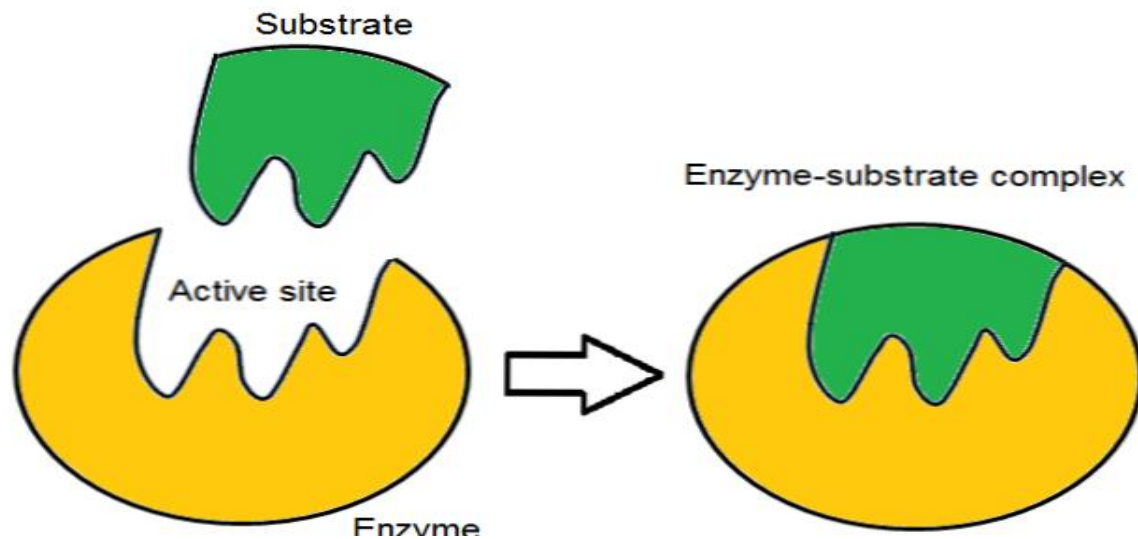
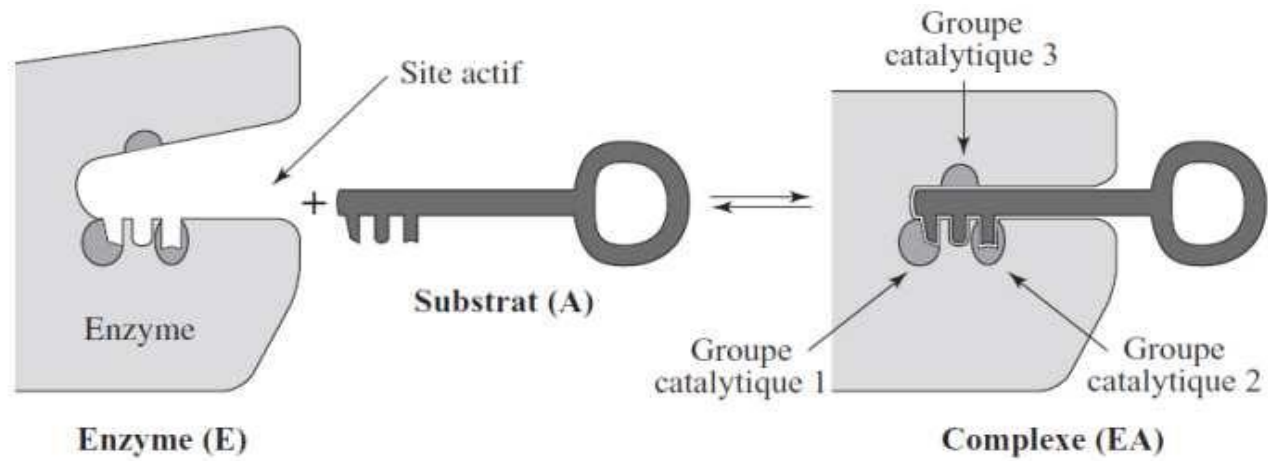


Fig 1. Modèle de Fisher : Clé-serrure

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.

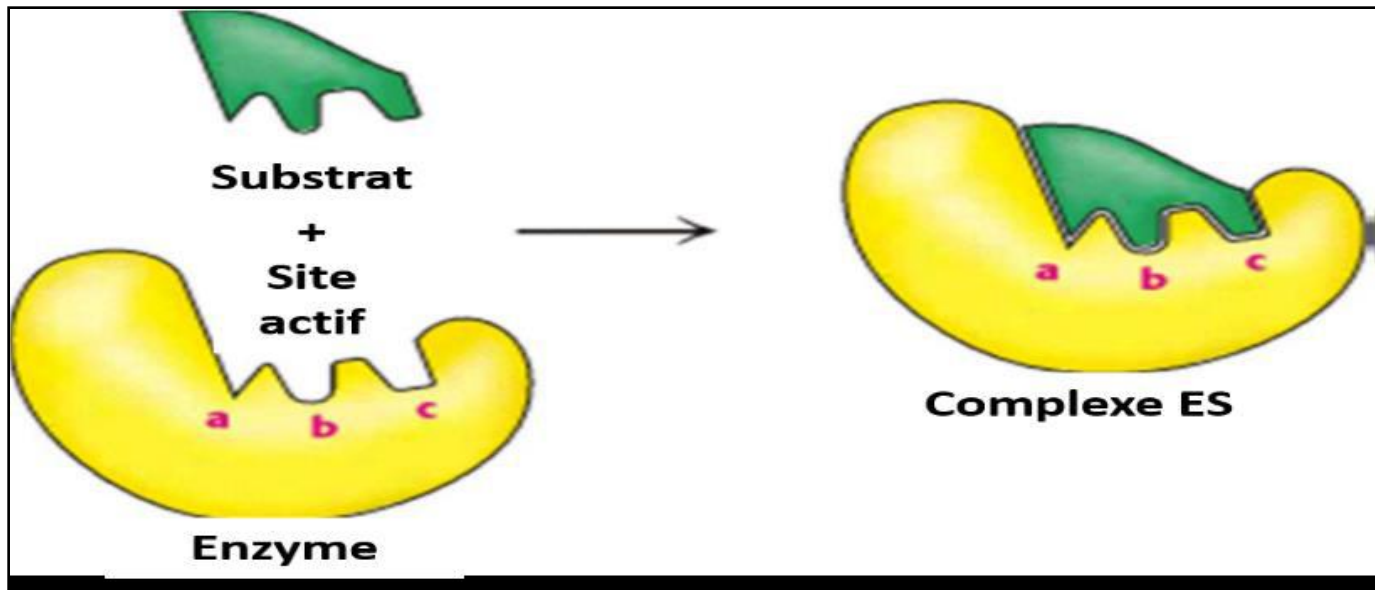


Fig. 2. Modèle de de Koshland

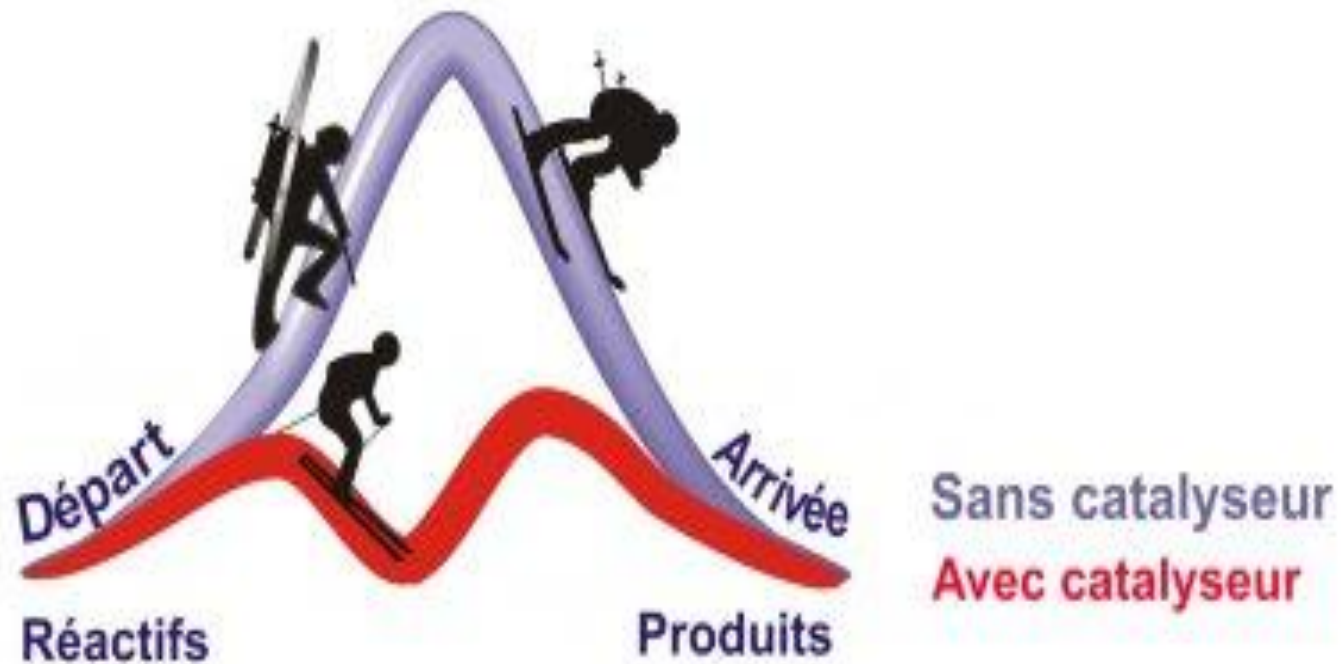
1.3- Modèle de Strain-Jenks :

❖ 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.

2-Propriétés particulières des catalyseurs

❖ Le mécanisme par lequel, les enzymes accélèrent les réactions peut être illustrée par une analogie mécanique (Figure ci-dessous).

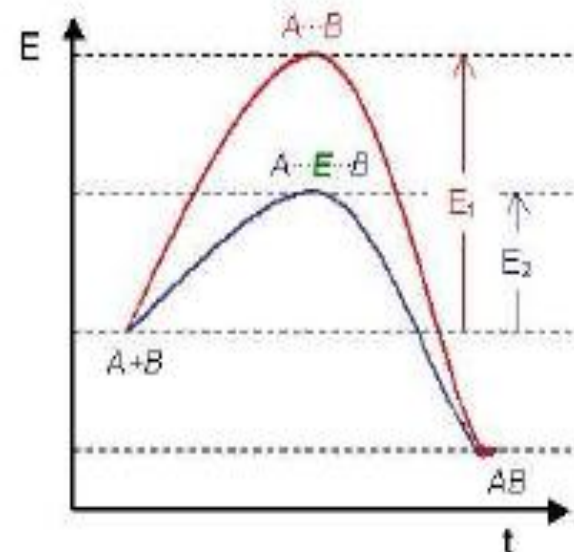
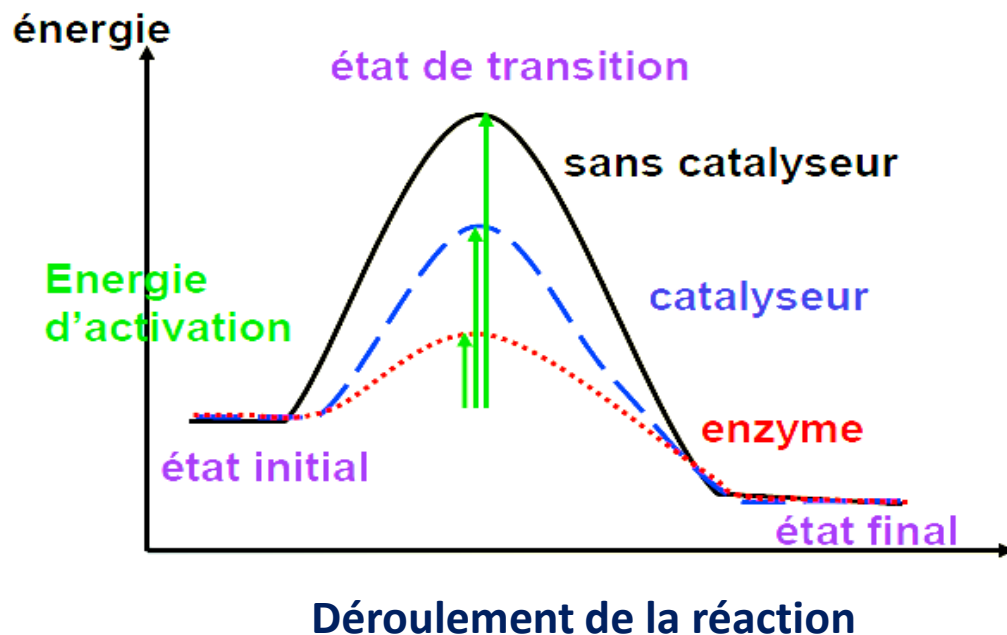


❖ Catalyseurs biologiques très puissants , différent des catalyseurs chimiques par leurs propriétés: Leur taux de réaction est plus élevé.

❖ Les enzymes ont un pouvoir catalytique de 10^6 à 10^{12} fois supérieur aux réactions non catalysées, et de plusieurs ordres de grandeur supérieur aux réactions catalysées par des réactifs chimiques .

❖ Une molécule de catalase peut hydrolyser 5 millions de molécules d' H_2O_2 en une min dans des conditions de pH et de température physiologiques.

❖ Elles augmentent la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier l'équilibre Les réactions enzymatiques se déroulent dans des conditions physiologiques (pH:7,4 et température :37°C).



Les enzymes abaissent l'énergie d'activation

3-Facteurs affectant l'activité enzymatique

❖ Les enzymes, le fait qu'ion sont de nature protéique ont leurs confères les propriétés physico-chimie des macromolécules (solubilité ,échange ionique ,dénaturation , ect ...).

❖ La dénaturation est obtenue si la protéine est dissoute dans un milieu dont la composition est éloignée de celle du milieu biologique : -

- Température élevée, Lors qu'on chauffe une protéine, (albumine)
- pH très acide ou basiques,
- Concentration saline insuffisante,
- Présence d'agents dénaturants formant des liaisons hydrophobes ou hydrogène avec les restes d'acides aminés....

❖ La protéine dénaturée perd **les propriétés d'intérêt biologique** de **la protéine native**. Sa réactivité chimique augmente car les restes d'acides aminés sont tous plus accessibles (en particulier, les petites molécules pénètrent à l'intérieur de la protéine dénaturée).

❖ Les enzymes dénaturées perdent leur propriétés biologiques; l'activité enzymatique.

3-1 Effet de la température

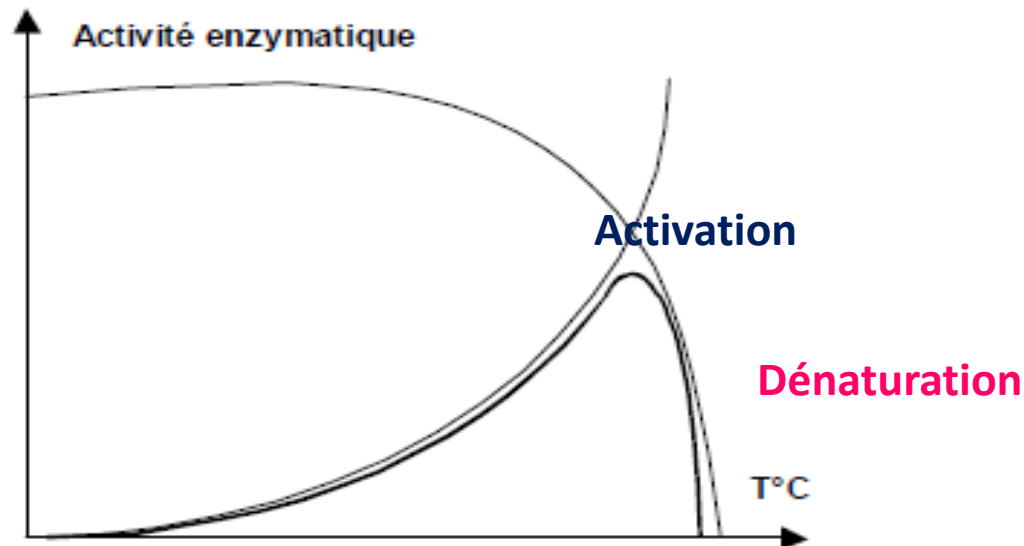
❑ Une augmentation de la température:

➤ Augmente la vitesse de la réaction chimique

➤ Augmente la vitesse de dénaturation de l'enzyme (une protéine), diminuant ainsi son activité catalytique

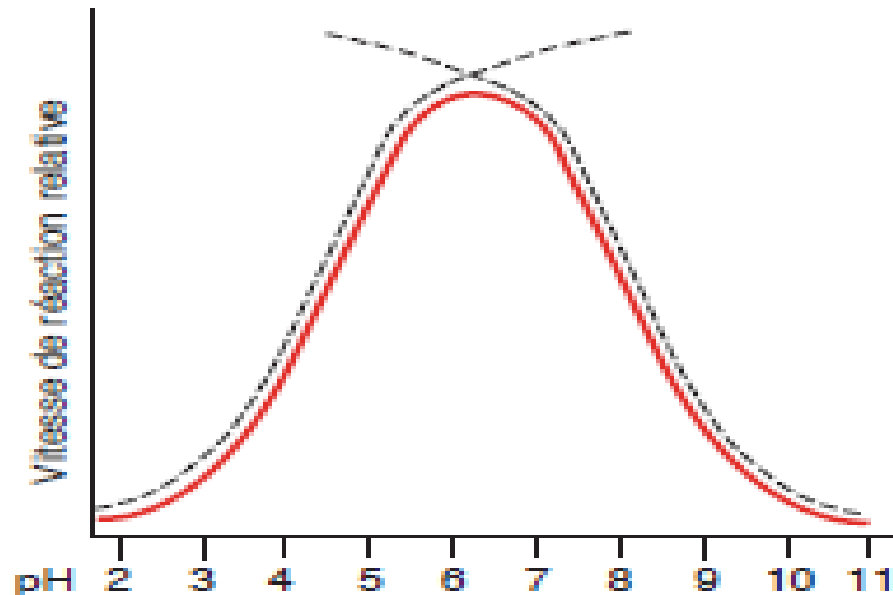
➤ A températures élevées, fluctuations importantes de la structure 3D de la protéine avec perte de structure tertiaire : dénaturation thermique, souvent irréversible.

➤ La somme de ces deux effets donne une courbe caractéristique de l'activité enzymatique température qui passe par un maximum, montrant ainsi l'existence d'une température optimale.



3.2- Effet du pH

- ❖ Les enzymes sont des protéines constituées d'acides aminés pouvant porter des fonctions chimiques sensibles aux variations de pH.
- ❖ Ces fonctions chimiques peuvent se protonner ou se déprotonner selon le pH du milieu dans lequel se trouve l'enzyme.
- ❖ Les enzymes auront par conséquent des pH optimaux différents, selon leur structure et la nature de leur site actif. La pepsine a un pH optimal de 1,5, appropriée pour un enzyme gastrique; la trypsine intestinale a plutôt un pH optimal de 7,7.



3.3- Effet de la concentration du substrat pour une quantité fixe d'enzyme

- ❖ À faible concentration du substrat, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du substrat.
- ❖ À des concentrations de substrat élevées, la vitesse de réaction est indépendante de la concentration du substrat et tend vers une valeur constante (vitesse maximale).
- ❖ Le choix de la concentration du substrat est une considération importante dans le développement des essais enzymatiques.

3.3- Les effecteurs

❖ Les effecteurs sont des molécules chimiques qui ont deux propriétés.

- Elles se fixent spécifiquement sur l'enzyme,
- Elles ont un effet sur la cinétique de la réaction.

❖ Ils modifient la réaction enzymatique se sont **des inhibiteurs** ou des activateurs

3.3.1- Des activateurs

- Toute molécule ayant pour une action positive sur la vitesse de la réaction.

3.3.2- Des inhibiteurs

- Ils sont plutôt des agents dénaturant de l'enzyme.

Les effecteurs

Des activateurs

Des inhibiteurs

Réversibles

Irréversibles

Inhibition compétitive

Inhibition non-compétitive

Inhibition anti-compétitive (ou in-compétitive)

4-Définition des unités enzymatiques

2.1- Unité internationale:

❖ Quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation d'une micromole (μmole) de substrat par min, dans des conditions optimales de mesure ou de dosage.

$$\text{UI} = \mu\text{mol/min}$$
$$\text{Activité enzymatique} = \frac{V_{\text{max}}}{\text{UI / unité de volume}}$$

2.2- Katal :

❖ En pratique médicale, l'activité enzymatique est exprimée en mole de substrat transformé par seconde. L'unité usuelle est le nanokatal (une nanomole de substrat transformé par seconde (1 UI = 16,6 nanokatal)).

2.3- Activité spécifique (AS) :

❖ **Nombre d'unités d'activité par unité de masse (UI/mg de protéine).** L'activité spécifique caractérise une préparation d'enzyme partiellement purifiée

$$\mu \text{ mol/min/mg de protéine} = \text{UI /mg de protéine}$$

2.4- Activité spécifique moléculaire (ASM) :

❖ **Nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme et par seconde.** C'est une caractéristique de l'enzyme et ne peut se calculer que si la préparation enzymatique est pure. L'ASM correspond à la constante catalytique (kcat) *ou turn-over de la réaction et s'exprime en seconde⁻¹*

$$\mu \text{ mol/min} / \mu \text{ mol de protéine} = \text{UI} \mu \text{ mol de protéine}$$