

II.3. Cinétique de Scatchard : Interactions Protéine-Ligand

II.3.1. Ligand

Ligand (latin *ligare*) : substance qui peut former un complexe non-covalent avec une biomolécule Liaison réversible en général (complexe non-covalent)

Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une enzyme. Toutes les molécules ayant une liaison spécifique avec une protéine sont appelées ligand. Pour chaque ligand, il existe au moins un site de fixation sur la protéine qui le reçoit. Les ligands (substrats, cofacteurs, activateurs, inhibiteurs, ions métalliques, autres biomolécules) varient à l'extrême en nature et en taille. Exemples (du plus petit au plus grand) :

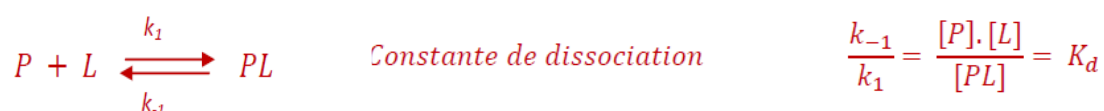
- Atome métallique ionisé (Ca^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , métaux de transition...)
- Acide aminé (Glutamate et Glycine : neurotransmetteurs qui ont leurs récepteurs protéiques dédiés)
- Dérivés d'AA (Gaba, Histamine, Adrénaline)
- Hormone peptidique (Glucagon, Insuline)
- Macromolécule (Acide nucléique, autres protéines ...)

Caractère fort ou faible de la liaison, ou "affinité" : peut-être caractérisée par une constante d'équilibre K_a et/ou une énergie libre standard.

II.3.2. Relation d'équilibre

Cas simple michaelien

L'équilibre de fixation d'un ligand sur une protéine correspond à la réaction :



La constante de dissociation se définit comme la concentration en ligand libre pour laquelle la protéine est saturée à 50% par son ligand.

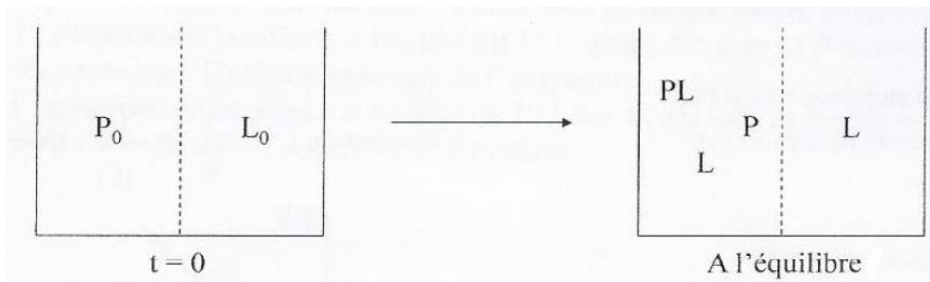
II.3.3. Mesure expérimentale de K_d

Dialyse à l'équilibre

Non applicable aux petits ions qui obéissent à l'équilibre de Donnan.

Dispositif : 2 compartiments séparés par une membrane « hémiperméable » (laisse passer L et pas P), de même volume.

- Au temps 0, une espèce par compartiment (P_0, L_0) de concentrations connues
- A l'équilibre, dans un compartiment, trois espèces : P, PL et L ; dans l'autre L, que l'on mesure



On aura à l'équilibre :

$$P_0 = P + PL$$

$$L_0 = PL + 2L$$

II.3.4. Méthode de Scatchard

Cette représentation permet :

- De déterminer le nombre de sites récepteurs présents sur une protéine P
- De déterminer K_d ou K_a
- De déterminer le nombre de sites occupés par le ligand L

Soit n le nombre de sites de fixation du ligand $n = P_0 \times n'$

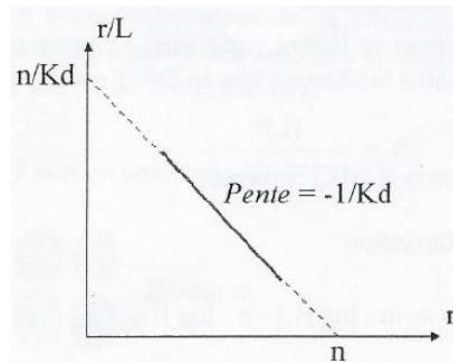
n' : nombre de sites de fixation de L sur 1 protéine

r le nombre de sites de fixation occupés par le ligand $r = L_0 - L$

$$K_d = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} = \frac{[L] \cdot (n - r)}{r}$$

Après linéarisation:

$$\frac{r}{[L]} = \frac{-1}{Kd} \cdot r + \frac{n}{Kd}$$



II.3.5. Cas particulier d'association Protéine-Ligand

P possède plusieurs sites indépendants

En théorie, n'est pas influencée par l'occupation des sites donc par Kd.

Kd ne varie pas donc il peut être défini.

L'affinité ne varie pas en fonction de la concentration en ligand.

On est dans le cas d'une protéine type michaelienne.

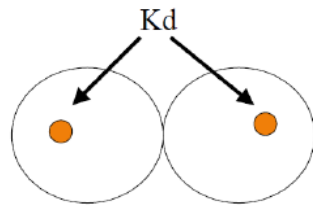
P peut être multimérique avec un site de fixation par monomère.

Si les monomères sont identiques, les sites sont identiques (même Kd).

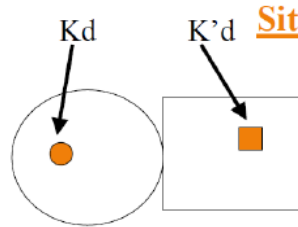
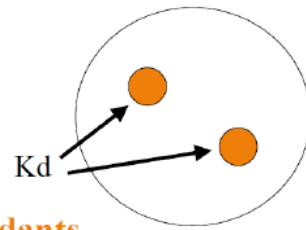
P peut être monomérique avec n sites identiques ou différents (dans ce dernier cas les Kd ne varient pas selon leur état d'occupation mais les Kd seront distincts, ils ne s'influencent pas mutuellement).

Exemples :

- La transferrine est une protéine monomérique à 2 sites de fixation pour le fer ferrique Fe⁺⁺⁺
- La calbindine monomérique fixant 2 Ca⁺⁺

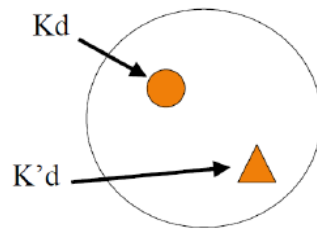


Monomère, 2 sites identiques



Sites indépendants

Oligomère: dimère



Monomère, 2 sites différents