

L3S5 Biochimie structurale et fonctionnelle
UE EN190

Analyse structurale et fonctionnelle des protéines

Pr. Sylvie Nessler

Equilibre d'interaction



Vitesse de formation du complexe: $v = \frac{d[PL]}{dt} = k_{\text{on}} [P].[L] - k_{\text{off}} [PL]$

A l'équilibre, $v = 0 \Rightarrow k_{\text{on}} [P]_{\text{eq}} . [L]_{\text{eq}} = k_{\text{off}} [PL]_{\text{eq}} \Leftrightarrow \frac{[P]_{\text{eq}} . [L]_{\text{eq}}}{[PL]_{\text{eq}}} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = K_D$ constante d'équilibre en $\text{mol}.L^{-1}$ (= M)

Linéarisation des doubles inverses

$$\Rightarrow [PL]_{\text{eq}} = \frac{[P]_{\text{eq}} . [L]_{\text{eq}}}{K_D} = \frac{([P]_0 - [PL]_{\text{eq}}) . [L]_{\text{eq}}}{K_D}$$

$$\Rightarrow [PL]_{\text{eq}} . K_D = ([P]_0 . [L]_{\text{eq}}) - ([PL]_{\text{eq}} . [L]_{\text{eq}})$$

$$\Rightarrow [PL]_{\text{eq}} (K_D + [L]_{\text{eq}}) = [P]_0 . [L]_{\text{eq}}$$

$$\Rightarrow [PL]_{\text{eq}} = \frac{[P]_0 . [L]_{\text{eq}}}{K_D + [L]_{\text{eq}}} = \frac{[P]_0 . [L]_0}{K_D + [L]_0}$$

$$\Rightarrow \frac{1}{[PL]_{\text{eq}}} = \frac{K_D}{[P]_0} \frac{1}{[L]_0} + \frac{1}{[P]_0}$$

Conservation de la matière:

$$[P]_0 = [P] + [PL]$$

Si $[L]_0 \gg [P]_0$
 $\rightarrow [L] \approx [L]_0$

Linéarisation de scatchard

$$\Leftrightarrow \frac{[L]_{\text{eq}}}{[PL]_{\text{eq}}} = \frac{K_D}{[P]_{\text{eq}}}$$

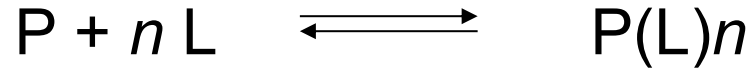
$$\Leftrightarrow \frac{[PL]_{\text{eq}}}{[L]_{\text{eq}}} = \frac{[P]_{\text{eq}}}{K_D}$$

$$\Leftrightarrow \frac{[PL]_{\text{eq}}}{[L]_{\text{eq}}} = \frac{[P]_0 - [PL]_{\text{eq}}}{K_D}$$

$$\Leftrightarrow \frac{[PL]_{\text{eq}}}{[L]_{\text{eq}}} = \frac{1}{K_D} [P]_0 - \frac{1}{K_D} [PL]_{\text{eq}}$$

$$\Leftrightarrow \frac{[L]_{\text{lié}}}{[L]_{\text{libre}}} = \frac{1}{K_D} [P]_{\text{tot}} - \frac{1}{K_D} [L]_{\text{lié}}$$

Pour n sites identiques et indépendants



$$[RL]_{eq} = [L]_{lié} \text{ par site}$$

Si on considère individuellement chacun des n sites de fixation, appelé R :

$$K_D = \frac{[R]_{eq} \cdot [L]_{eq}}{[RL]_{eq}}$$

avec

$$[R]_0 = n [P]_0$$

$$Y = \frac{[RL]_{eq}}{[R]_0} = \frac{[L]_{lié}}{n [P]_0}$$

$$[PL]_{eq} = \frac{[P]_0 \cdot [L]_0}{K_D + [L]_0} \text{ devient}$$

$$[RL]_{eq} = \frac{[R]_0 \cdot [L]_0}{K_D + [L]_0}$$

$$\frac{[PL]_{eq}}{[L]_{eq}} = \frac{1}{K_D} [P]_0 - \frac{1}{K_D} [PL]_{eq}$$

$$\frac{1}{[L]_{lié}} = \frac{K_D}{n[P]_0} \frac{1}{[L]_{libre}} + \frac{1}{[P]_0}$$

$$[L]_{lié} = \frac{n [P]_0 \cdot [L]_{libre}}{K_D + [L]_{libre}}$$

$$\text{devient } \frac{[RL]_{eq}}{[L]_{eq}} = \frac{1}{K_D} [R]_0 - \frac{1}{K_D} [RL]_{eq}$$

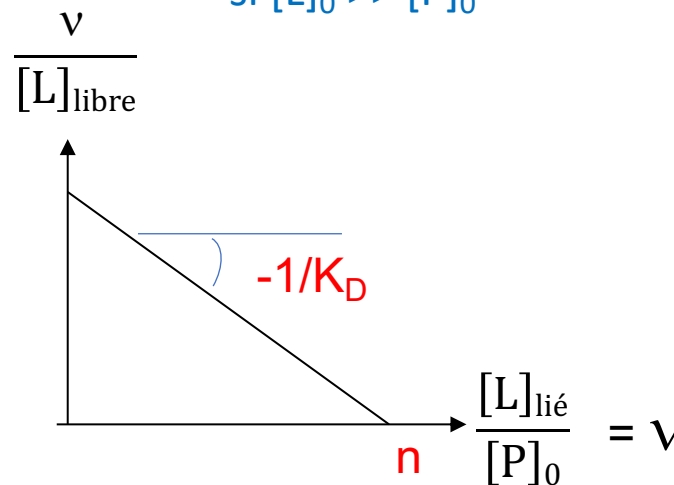
$$\frac{[L]_{lié}}{[L]_{libre}} = \frac{n}{K_D} [P]_0 - \frac{1}{K_D} [L]_{lié}$$

$$\frac{1}{[L]_{libre}} \frac{[L]_{lié}}{[P]_0} = \frac{n}{K_D} - \frac{1}{K_D} \frac{[L]_{lié}}{[P]_0}$$

$$\frac{v}{[L]_{libre}} = \frac{nY}{[L]_{libre}} = \frac{n}{K_D} - \frac{1}{K_D} v$$

La linéarisation des doubles inverses ne permet pas de calculer n et K_D mais seulement K_D/n

$[L]_{libre} = [L]_0$
si $[L]_0 \gg [P]_0$

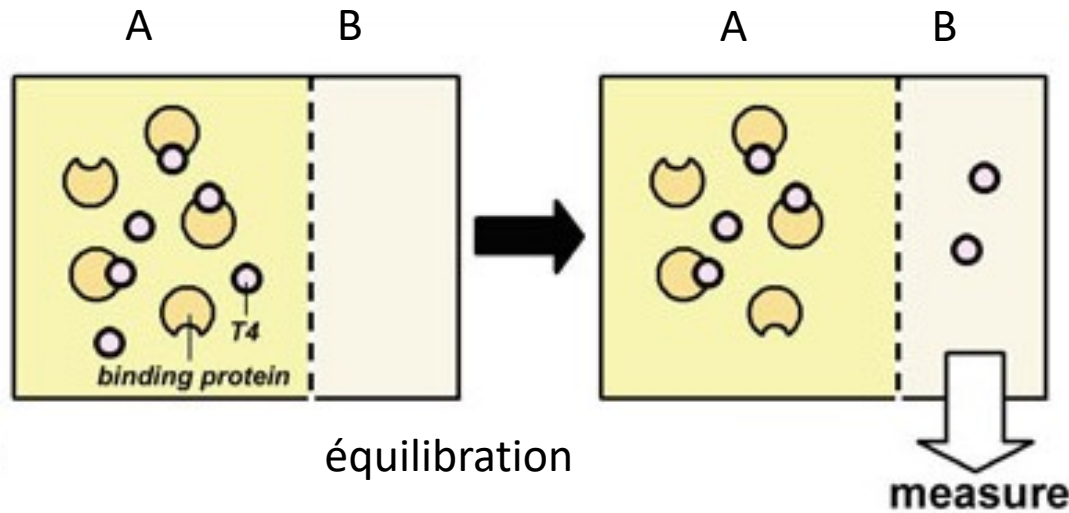


Linéarisation de Scatchard

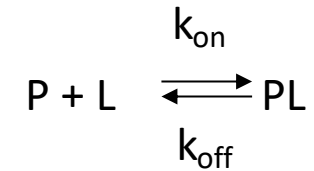
Méthodes de détermination de K_D

Comment suivre la disparition de ligand libre [L] ou l'apparition de complexe [PL] ?

La dialyse à l'équilibre



Dans le compartiment A:



à t_0 :

en A: $[L]_0, [P]_0$

en B: rien

à l'équilibre $[L]^A_{\text{libre}} = [L]^B_{\text{libre}}$

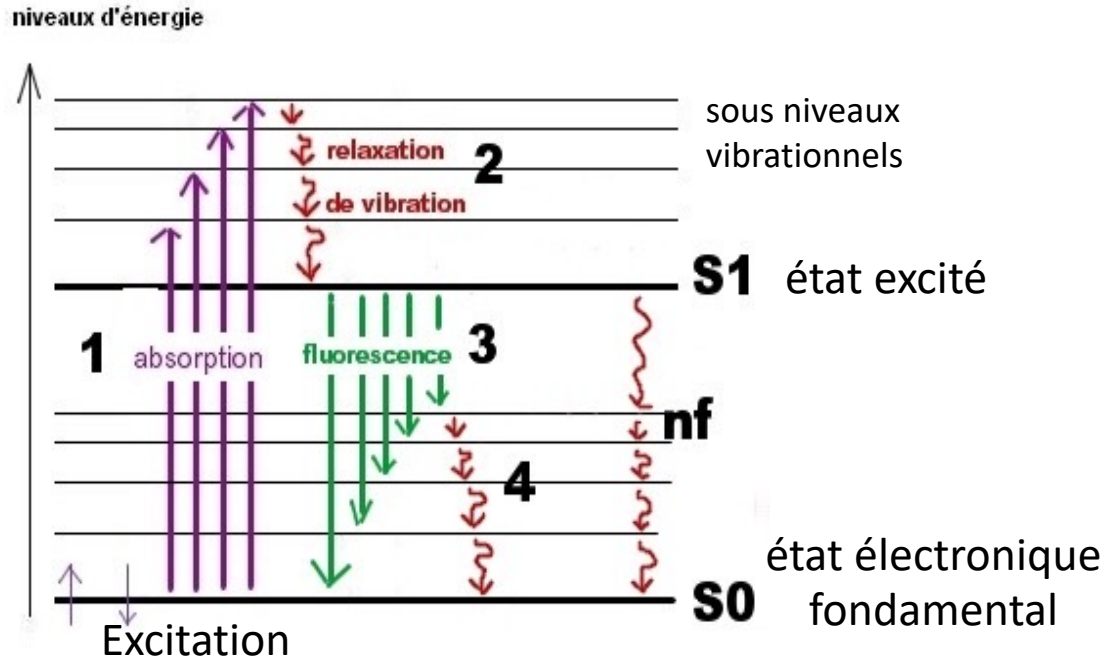
en A: $[L]^A_{\text{tot}} = [L]^A_{\text{lié}} + [L]^A_{\text{libre}}$

en B: $[L]^B_{\text{tot}} = [L]^B_{\text{libre}}$

$$\begin{aligned} \Rightarrow [L]^A_{\text{tot}} - [L]^B_{\text{tot}} &= [L]^A_{\text{tot}} - [L]^B_{\text{libre}} \\ &= [L]^A_{\text{tot}} - [L]^A_{\text{libre}} \\ &= [L]^A_{\text{lié}} \end{aligned}$$

Spectroscopie de fluorescence

Diagramme de Jablonski:



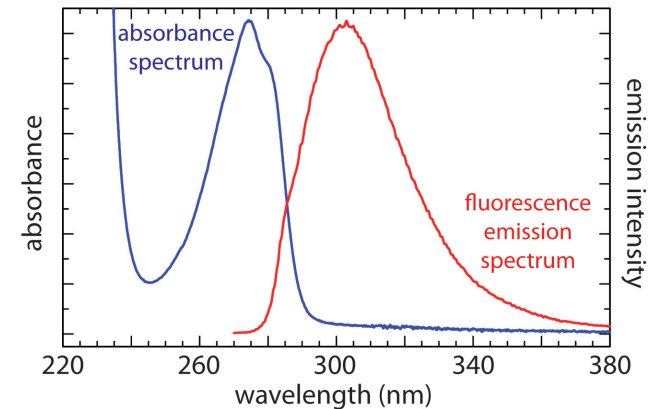
La perte d'énergie due au phénomène de relaxation se traduit par :

$$E_{\text{exc}} > E_{\text{em}} \rightarrow \lambda_{\text{exc}} < \lambda_{\text{em}}$$

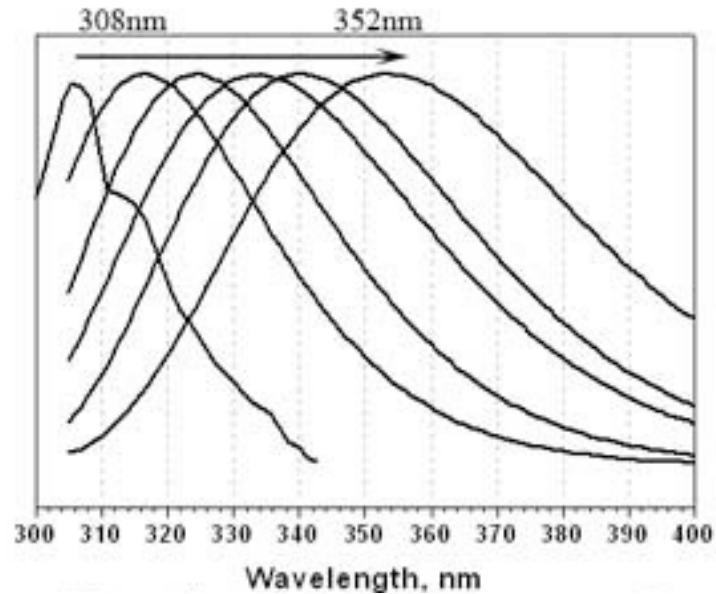
C'est ce qu'on appelle le **déplacement de Stokes**

Dans les protéines,
le groupement indole
du tryptophane fluoresce
quand il est excité à 280 nm

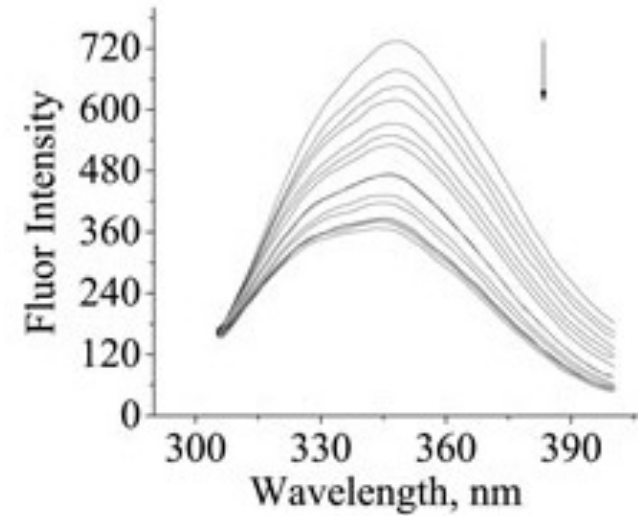
$$\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm} \quad \lambda_{\text{em}} = 310 \text{ nm}$$



Fixation de ligand et fluorescence



Quand la fixation d'un ligand augmente la polarité de l'environnement d'un Trp, le spectre d'émission est déplacé vers les grandes longueurs d'onde.



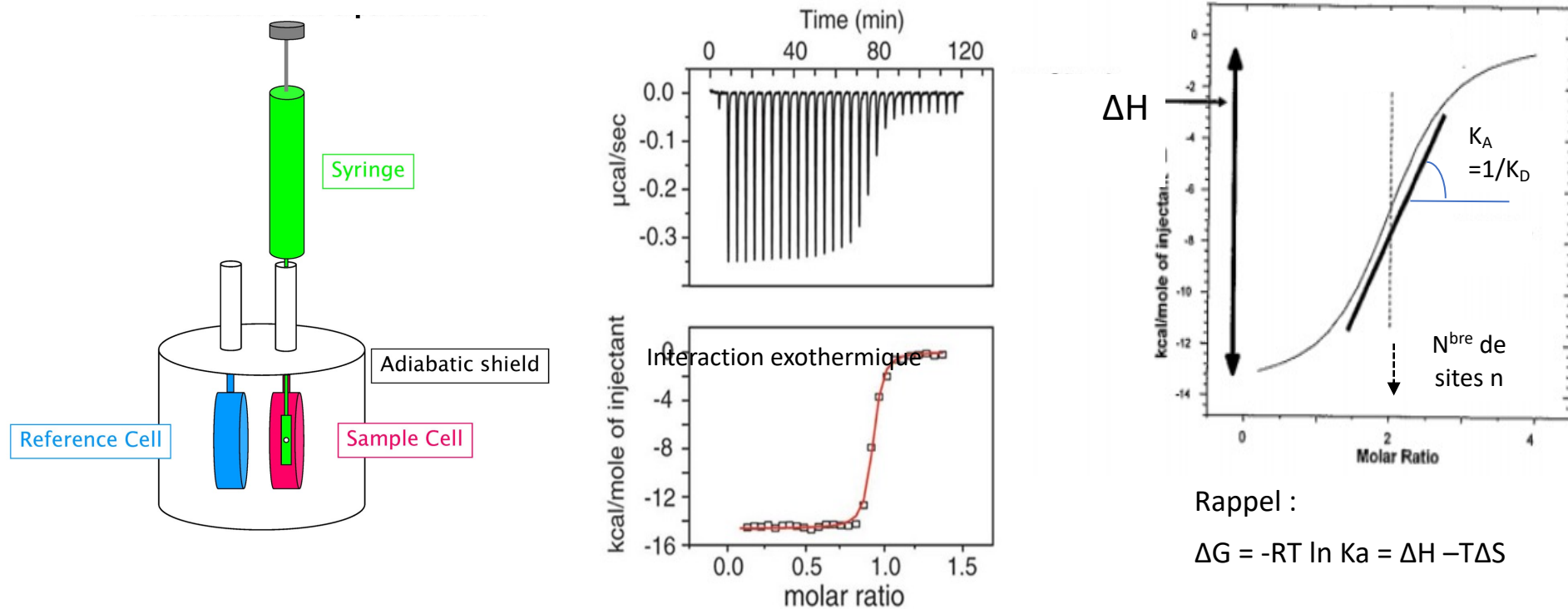
De plus, la fluorescence des Trp est diminuée (phénomène de **quenching**) par la proximité de groupements acides.

Lorsque la fluorescence intrinsèque de la protéine ne peut être utilisée pour la mesure d'interaction, on peut utiliser une sonde fluorescente greffée soit sur la protéine, soit sur le ligand.

Microcalorimétrie de Titration Isotherme

La plupart des interactions intra-moléculaires s'accompagnent d'un dégagement (réaction exothermique) ou d'une absorption de chaleur (réaction endothermique).

Une mesure précise de cette énergie permet une détermination de différents paramètres thermodynamiques de la réaction.

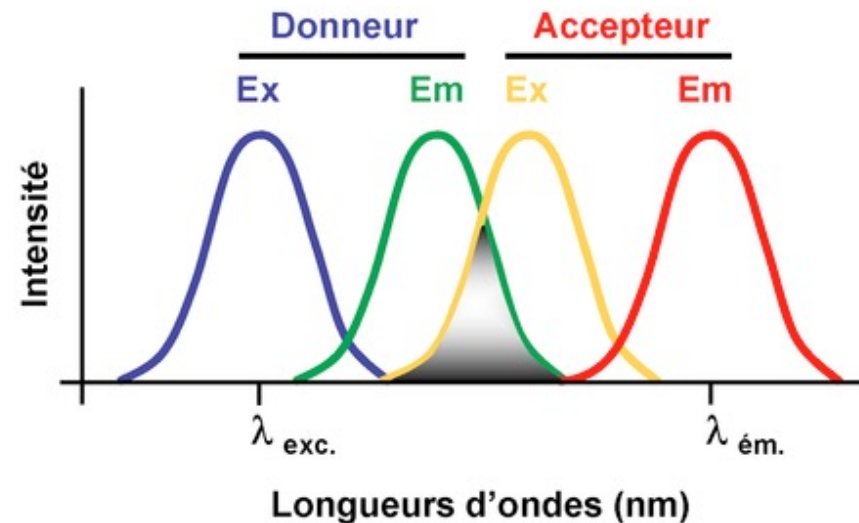
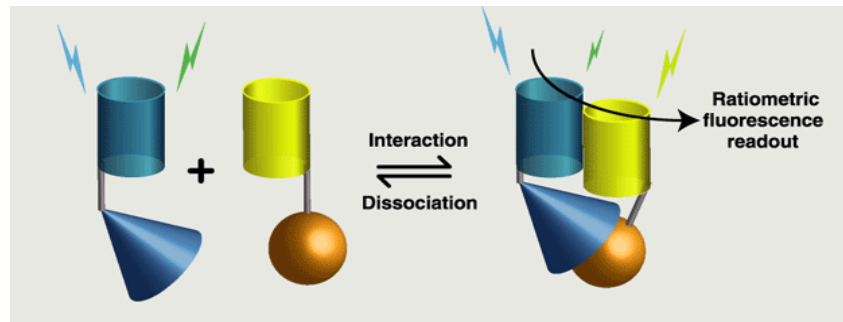


On réalise dans la cellule contenant la protéine des injections successives du ligand contenu dans la seringue et on mesure pour chaque injection l'énergie nécessaire au maintien d'un ΔT constant entre la cellule de mesure et la cellule de référence.

Fluorescence Resonance Energy Transfert (FRET)

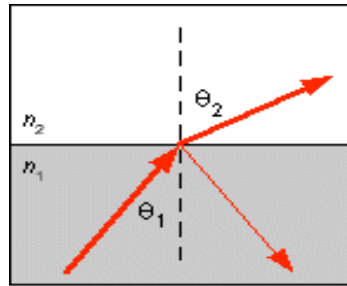
On peut fusionner une protéine X avec un fluorochrome donneur dont le spectre d'émission recouvre le spectre d'excitation d'un fluorochrome accepteur fusionné à une protéine Y.

Si en excitant le donneur on observe la fluorescence de l'accepteur, c'est que les protéines X et Y interagissent

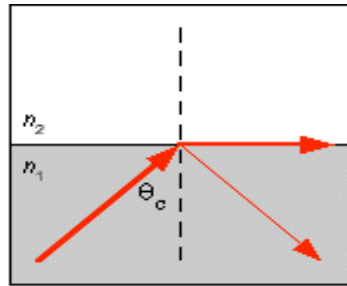


Cette technique fonctionne aussi bien *in vivo* que *in vitro*

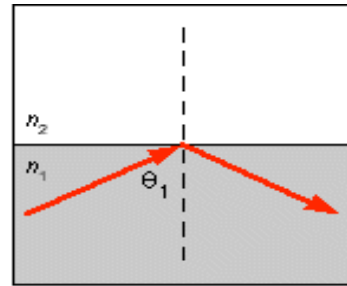
Principe de la SPR



$$\theta_1 < \theta_c$$



$$\theta_1 = \theta_c$$



$$\theta_1 > \theta_c$$

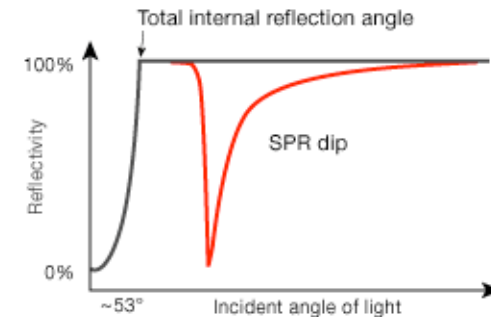
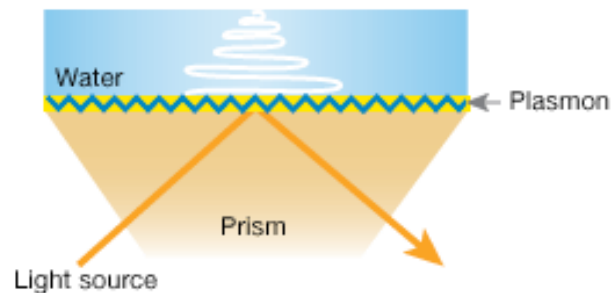
Interface entre deux milieux d'indice de réfraction n_1 et n_2 avec $n_1 > n_2$

Relation de Snell-Descartes: $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$

Quand l'angle θ_1 du faisceau incident est supérieur à l'angle critique θ_c , on observe le phénomène de réflexion totale interne

En condition de réflexion totale interne, une onde évanescente se propage à la surface et ses **propriétés sont affectées par les variations de masse** lors de l'association / dissociation du complexe entre la protéine et son ligand.

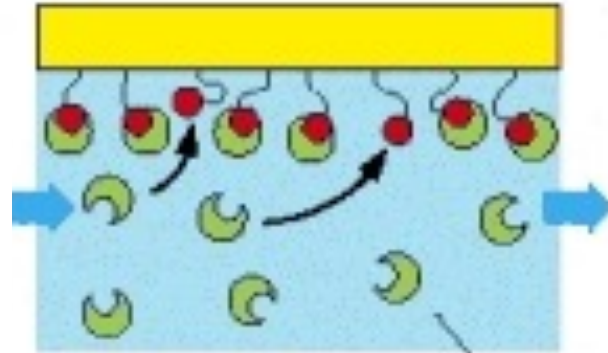
L'onde évanescente entre en résonance avec les e^- libres d'une fine couche d'or déposée à la surface, ce qui entraîne une chute d'intensité du faisceau réfléchi à un angle défini appelé angle de résonance.



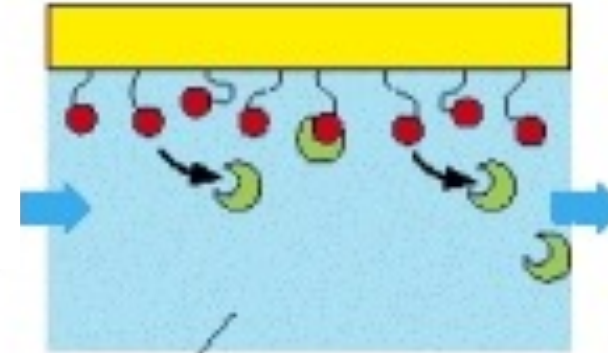
On suit les variations de l'angle de résonance en fonction de l'interaction

Résonance plasmonique de Surface (SPR)

Association:
Injection du
Ligand sur la
Protéine
immobilisée



Dissociation:
Retour en flux
de tampon



On appelle **sensorgramme** une cinétique d'interaction mesurée par SPR.

association

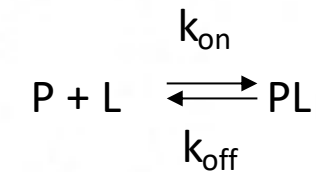
dissociation



Mesure proportionnelle à la quantité de matière présente à la surface d'immobilisation

Injection du ligand en solution

Retour en flux de tampon seul

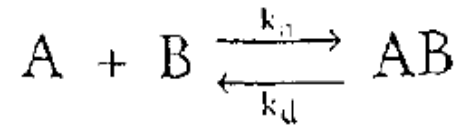


On détermine les constantes cinétiques d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) qui permettent de calculer la constante d'équilibre:

$$\frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = K_D = \frac{[P] \times [L]}{[PL]}$$

Analyse cinétique d'interaction par SPR

B immobilisé
A en solution



A l'équilibre:

$$k_a[A][B] = k_d[AB]$$



$$\frac{k_d}{k_a} = \frac{[A][B]}{[AB]} = K_D$$

Equation de vitesse:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] - k_d[AB]$$

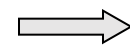
$$[B] = [B]_0 - [AB]$$

$$[A]_0 \gg [B]_0 \rightarrow [A] = [A]_0$$



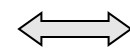
$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A]([B]_0 - [AB]) - k_d[AB]$$

$$\left. \begin{array}{l} C = [A] = [A]_0 \\ R = [AB] \\ R_{\max} = [B]_0 \end{array} \right\}$$



$$\frac{dR}{dt} = k_a C (R_{\max} - R) - k_d R$$

avec R le signal de
résonance

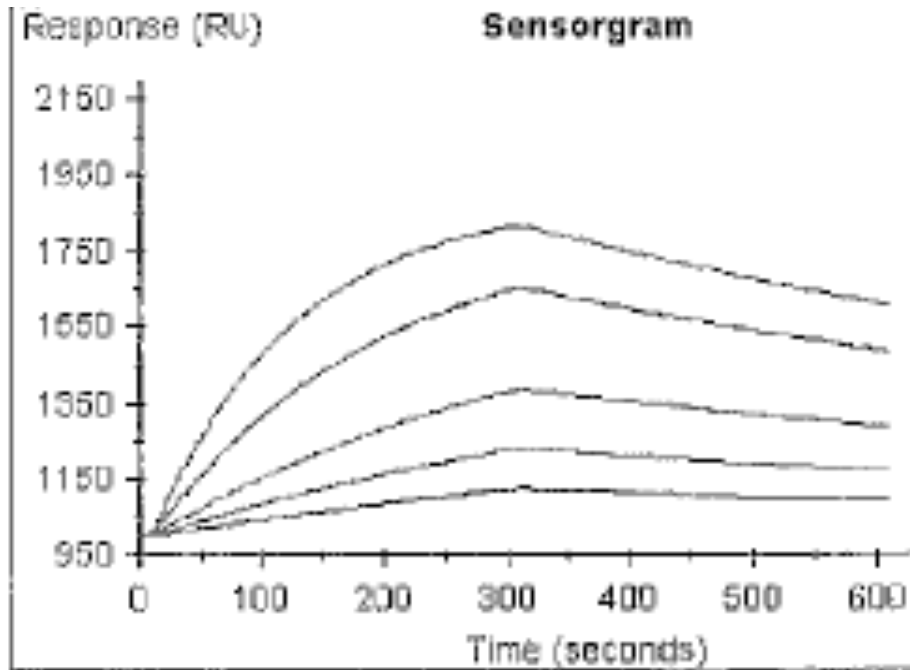


$$\frac{dR}{dt} = k_a C R_{\max} - (k_a C + k_d) R$$

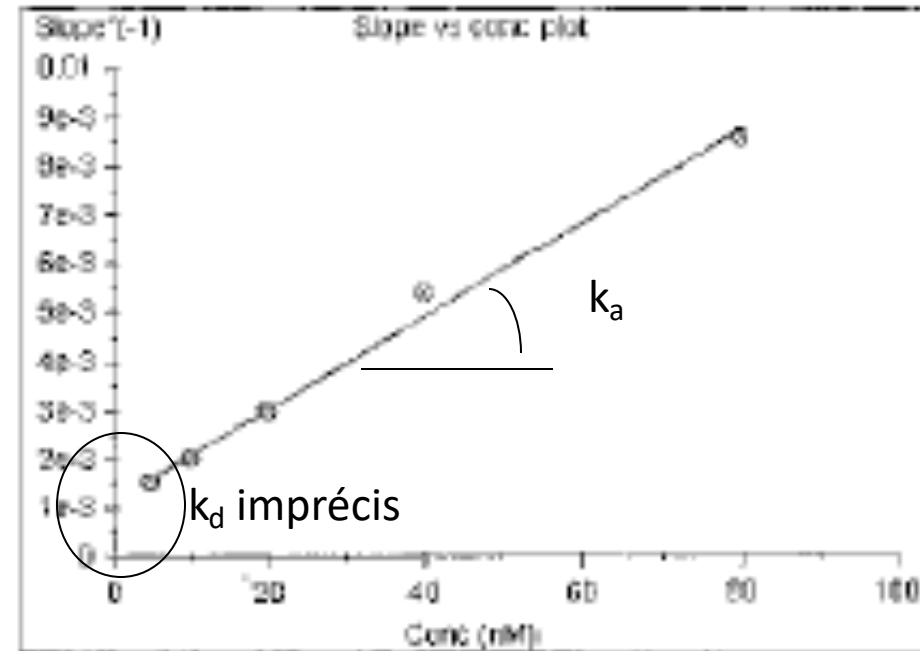
La courbe $dR/dt = f(R)$ est donc une droite de pente $k_{obs} = -(k_a C + k_d)$

Analyse graphique

On enregistre plusieurs sensorgrammes à des concentrations de ligand $[A]_0 = C$ variables



On détermine $k_{obs} = (k_a C + k_d)$ à partir de la courbe $dR/dt = f(R)$ pour chaque $[A]_0$ puis on trace $k_{obs} = f([A]_0) = f(C)$



Remarques:

Au début de l'injection $R = 0$ et $v_0 = k_a C R_{max}$

A l'équilibre, $dR/dt = 0$ et $R_{eq} = \frac{k_a C}{k_a C + k_d} \cdot R_{max}$

$$\frac{dR}{dt} = k_a C R_{max} - (k_a C + k_d) R$$

Cinétique de dissociation

$$\frac{dR}{dt} = -k_d R$$

En séparant les variables et en intégrant on obtient:

$$R_t = R_0 \cdot e^{-k_d(t-t_0)}$$

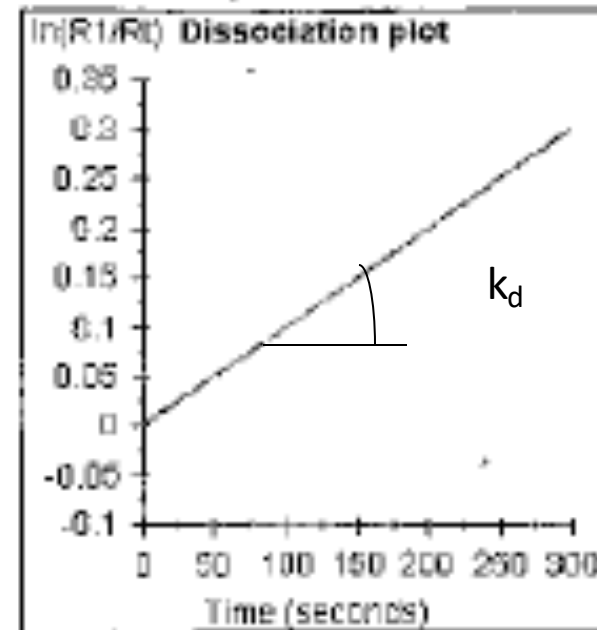
R_t = la réponse à un temps t

R_0 = la réponse en début de dissociation

Ce qui permet une analyse par régression non linéaire en dérivant:

$$\frac{dR}{dt} = -k_d R_0 \cdot e^{-k_d(t-t_0)}$$

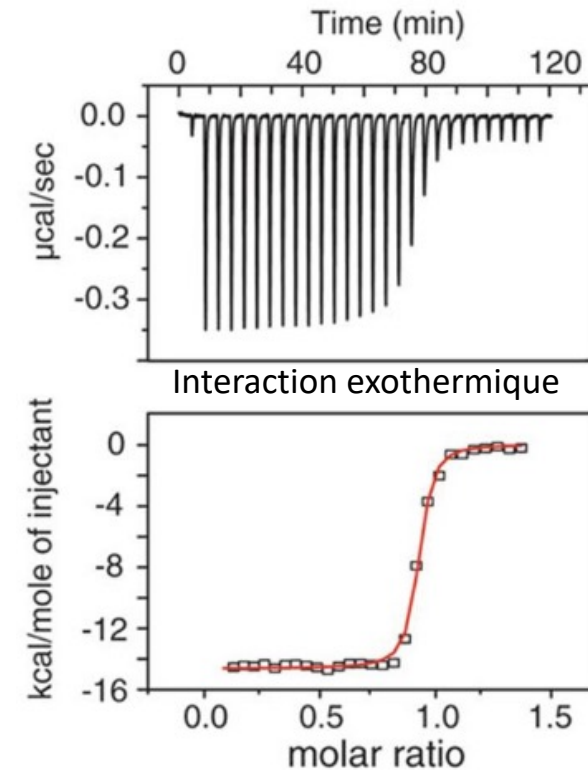
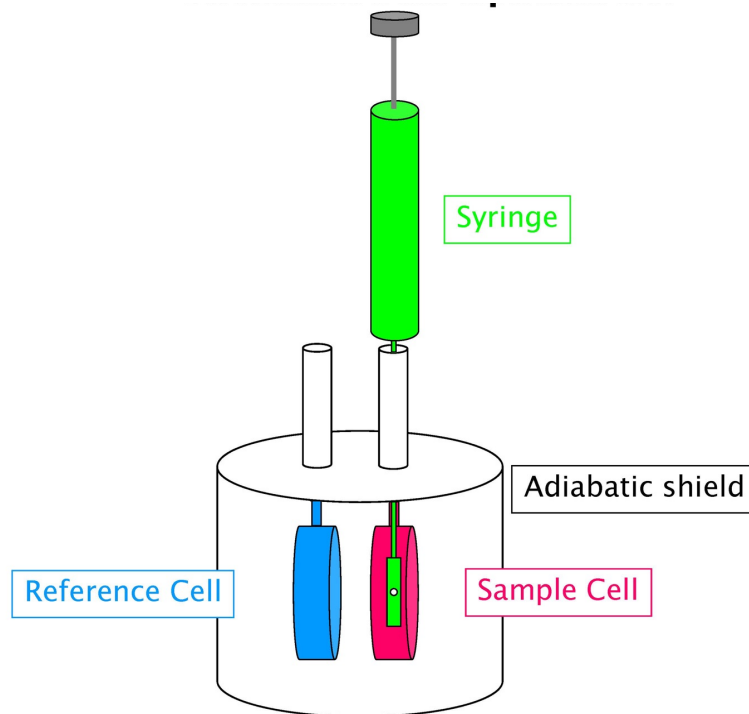
$$\Rightarrow \ln \frac{R_0}{R_t} = k_d(t-t_0)$$



Microcalorimétrie de Titration Isotherme

La plupart des interactions intra-moléculaires s'accompagnent d'un dégagement (exothermique) ou d'une absorption de chaleur (endothermique).

Une mesure précise de cette énergie permet une détermination de différents paramètres thermodynamique de la réaction.



La courbe de saturation obtenue par injections successives du ligand dans la cellule contenant la protéine. On mesure l'énergie nécessaire au maintien d'un ΔT constant entre la cellule de mesure et la cellule de référence pour chaque injection.

Calcul des constantes thermodynamiques



Sur la courbe de saturation on obtient:

- La stoechiométrie de l'interaction
- La constante d'association à l'équilibre K_a
- L'enthalpie ΔH qui reflète la force de l'interaction

Après détermination de K_a et ΔH , on peut calculer:

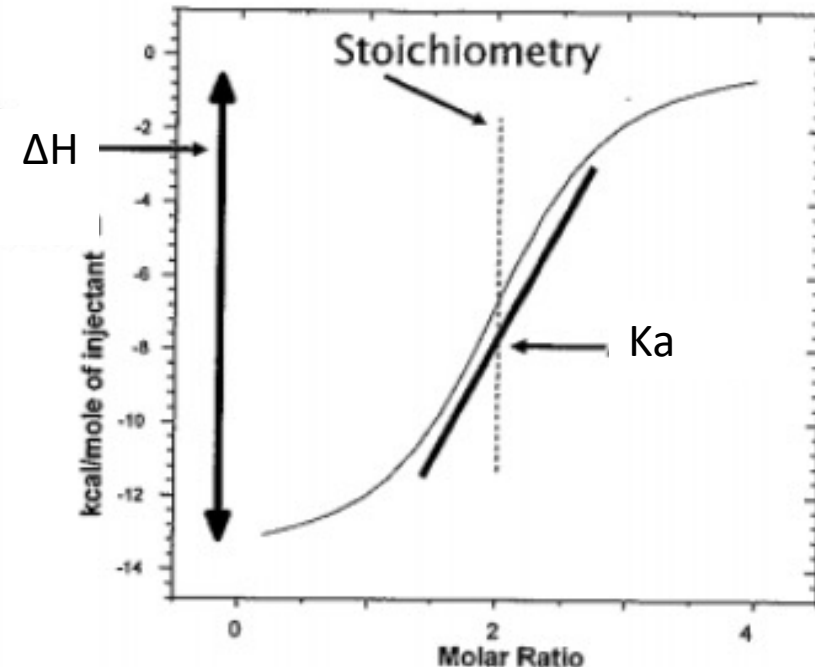
- L'énergie libre $\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S$

Avec $\Delta G < 0 \rightarrow$ réaction spontanée

- L'entropie $\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T$ qui reflète les changements de solvation et de conformation

$\Delta S > 0 \rightarrow$ interactions hydrophobes, desolvation

$\Delta S < 0 \rightarrow$ liaisons H



Rappels de thermodynamique



**La formation d'un complexe PL
est associée à une variation de l'énergie libre du système:**

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \times \ln\left(\frac{[PL]}{[P] \times [L]}\right)$$

R : constante des gaz parfaits (8.31 J. mol⁻¹. K⁻¹)

T : température absolue (en Kelvin)

ΔG^0 : variation d'énergie libre standard

A l'équilibre, $\Delta G = 0$ donc:

$$\Delta G^0 = -RT \times \ln K_{eq} = -RT \times \ln\left(\frac{[PL]}{[P] \times [L]}\right) = -RT \times \ln K_A = RT \times \ln K_D$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \times \Delta S^0$$

ΔG^0 exprimé en kJ.mol⁻¹ ou kcal.mol⁻¹ (1 kcal = 4.184 kJ)

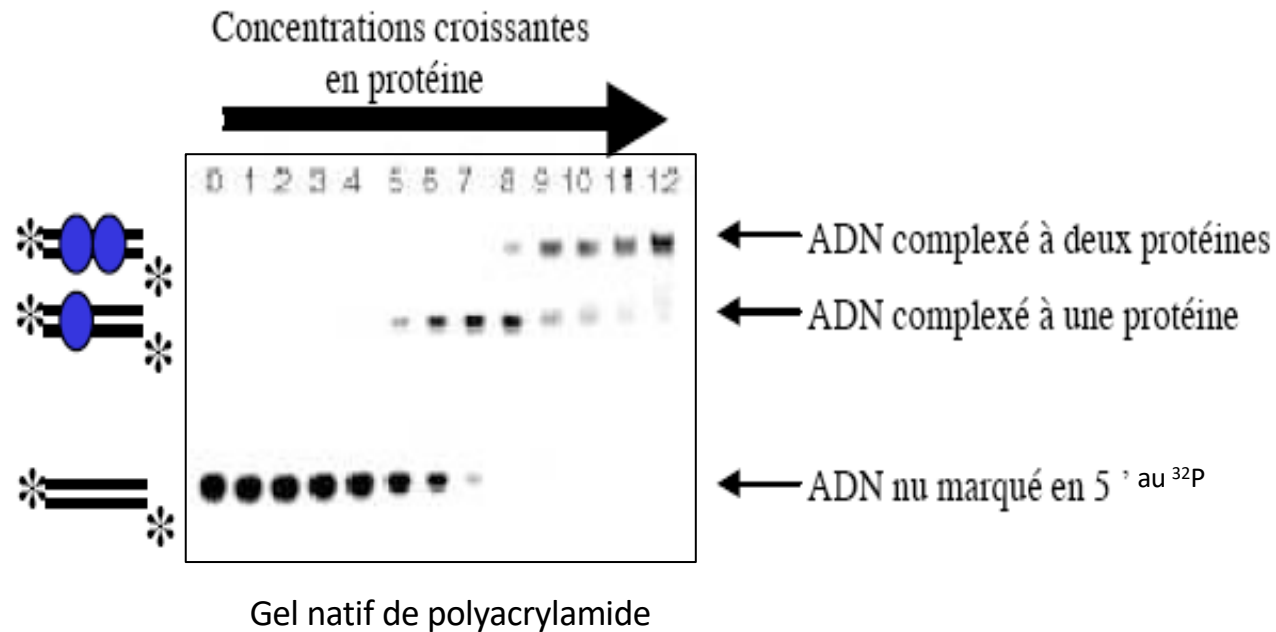
Énergie libre de Gibbs d'un système dans son état standard le plus stable (à l'équilibre)

Mesures d'interaction protéine / ADN

Mise en évidence d'une interaction protéine-ADN

Analyse par retard sur gel Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Marquage de l'ADN et séparation du complexe protéine-ADN de l'ADN seul sur gel de polyacrylamide en conditions non-dénaturantes

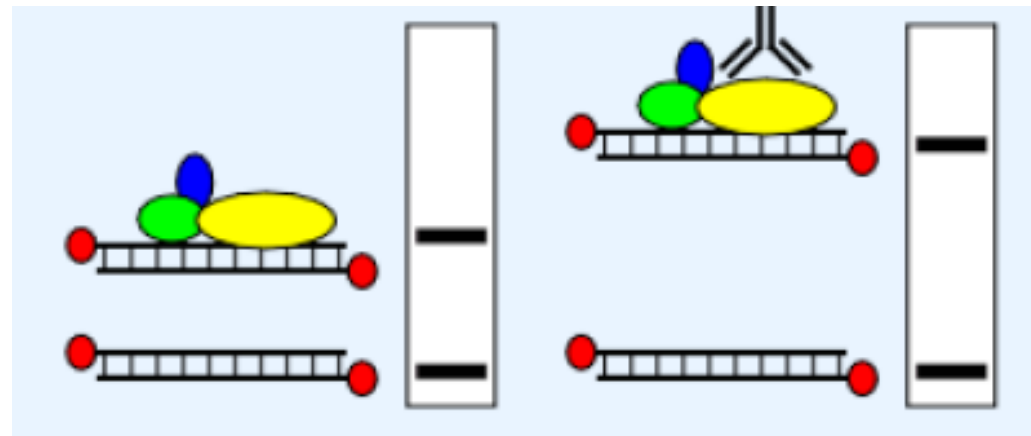


Le marquage le plus utilisé est la radioactivité du ^{32}P inséré en 5' des sondes nucléotidiques mais d'autres techniques de marquage comme la fluorescence peuvent être utilisées.

Identification de complexes spécifiques

Le gel retard peut être réalisé à partir d'un extrait protéique, sur des sondes nucléotidiques de séquences variées. Dans ce cas, la présence d'une protéine particulière dans le complexe retardé peut être mise en évidence par l'ajout d'anticorps spécifiques qui induisent un "supershift ».

→ On identifie ainsi la séquence ADN spécifiquement reconnue par la protéine d'intérêt.

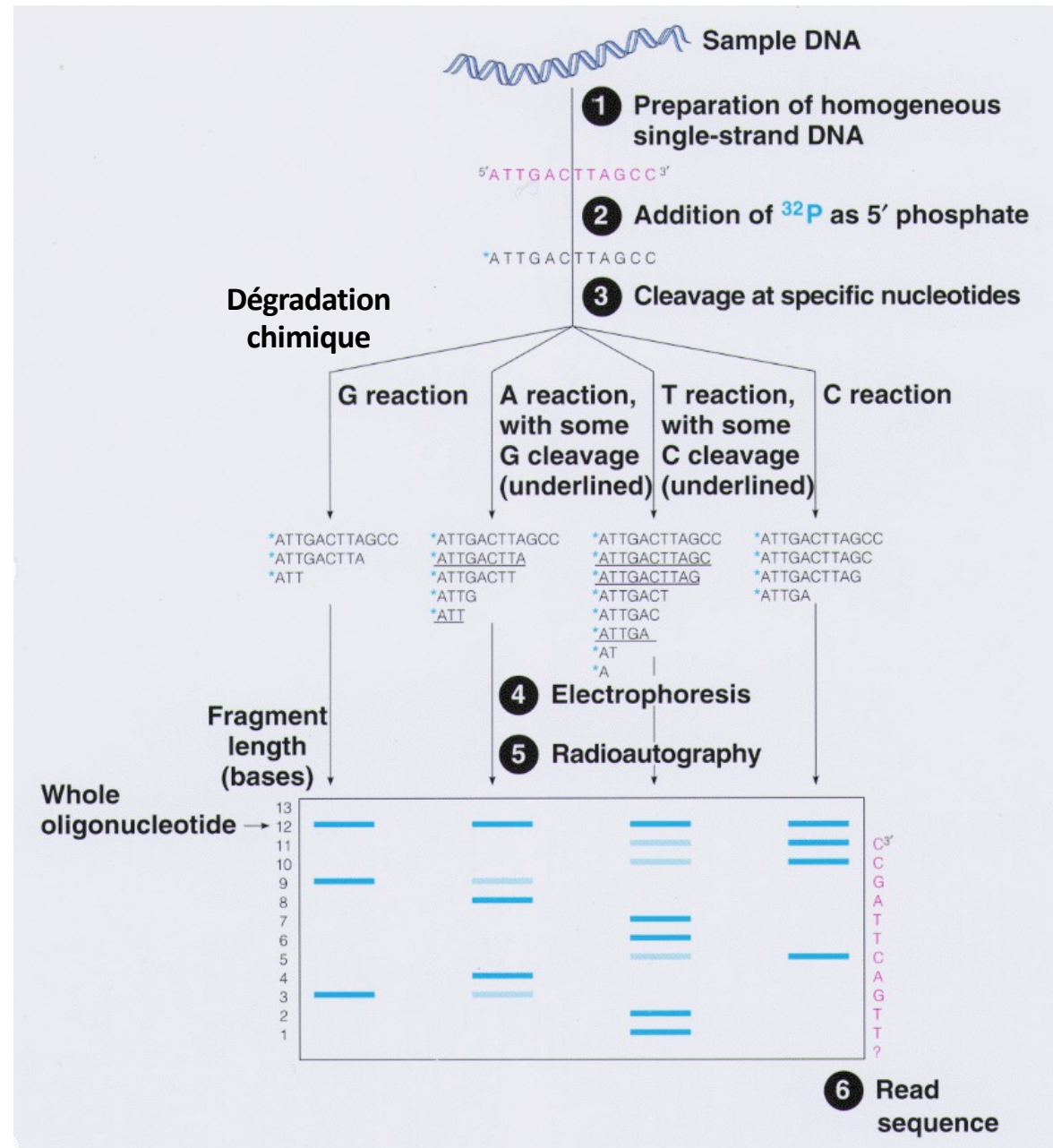


Cette technique fonctionne uniquement

- (i) si l'interaction de la protéine avec l'ADN ne masque pas son épitope,
- (ii) si le complexe antigène-anticorps ne se dissocie pas au cours de l'électrophorèse et
- (iii) si la fixation de l'anticorps ne dissocie pas le complexe protéine-ADN.

Identification de la séquence ADN cible (1)

Séquençage par la méthode de Maxam-Gilbert



On ne voit que les fragments 5'

Cette méthode nécessite des réactifs chimiques toxiques et ne permet d'analyser des fragments d'ADN > 250 nucléotides.

Difficile à robotiser, elle est aujourd'hui peu utilisée.

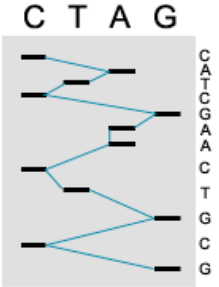
Identification de la séquence ADN cible (2)

Séquençage par la méthode de Sanger

Synthèse enzymatique

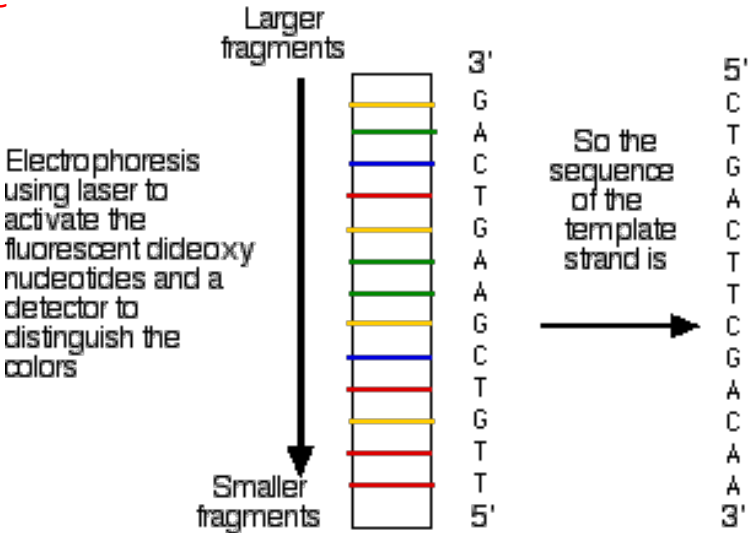
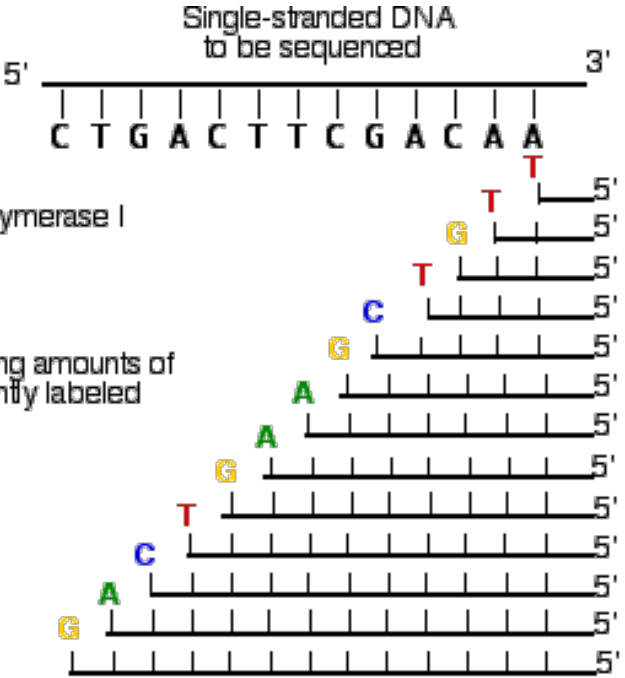
Blocage de la synthèse par didesoxy-nucléotides (ddNTP)

Les ddNTPs sont marqués radioactivement au ³²P ou avec une sonde fluorescente



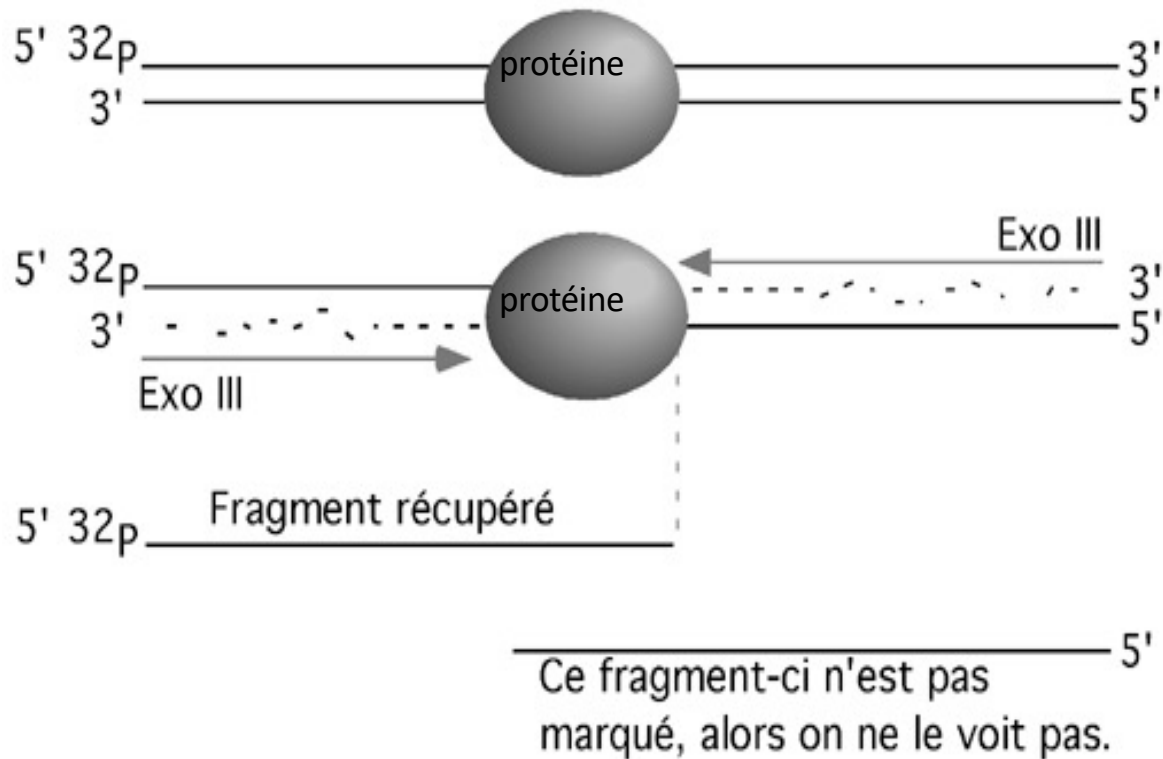
Si marquage radioactif

Electrophoresis using laser to activate the fluorescent dideoxy nucleotides and a detector to distinguish the colors



Identification du site de fixation de la protéine (1)

Empreinte à l'exonucléase (ExoIII)

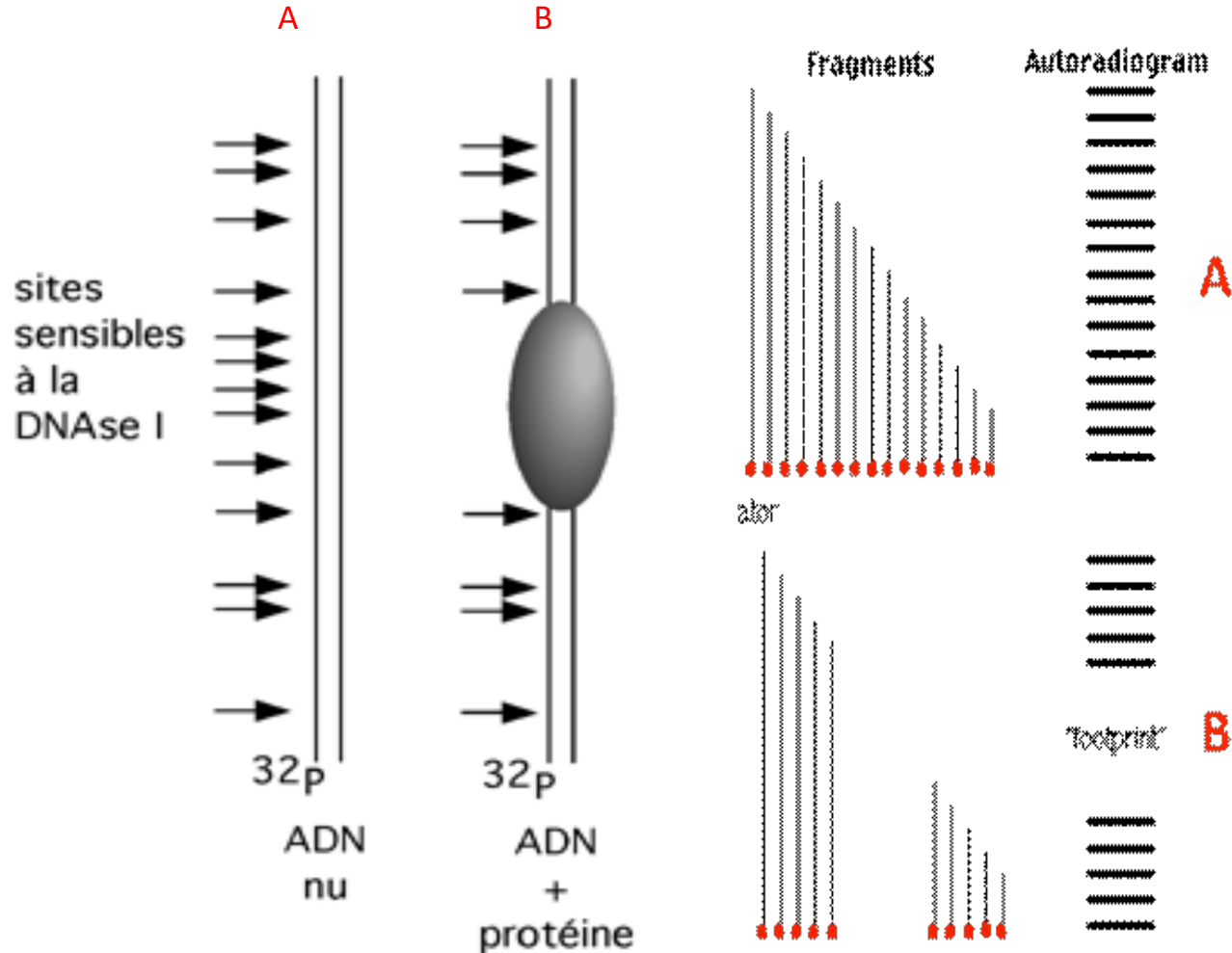


L'**exonucléase** dégrade l'ADN double brin de 3' en 5'. En marquant alternativement chacun des brins en 5', on pourra comparer par électrophorèse la taille des fragments récupérés et en déduire la position du site d'interaction protégé par la fixation de la protéine d'intérêt.

La même expérience sera ensuite réalisée avec le fragment d'ADN marqué sur l'autre brin.

Identification du site de fixation de la protéine (2)

Empreinte à la DNase I



La DNase I est une **endonucléase** qui coupe un des brin de l'ADN.

La digestion est réalisée en conditions contrôlées pour obtenir une seule coupure/molécule et éviter la dégradation totale.

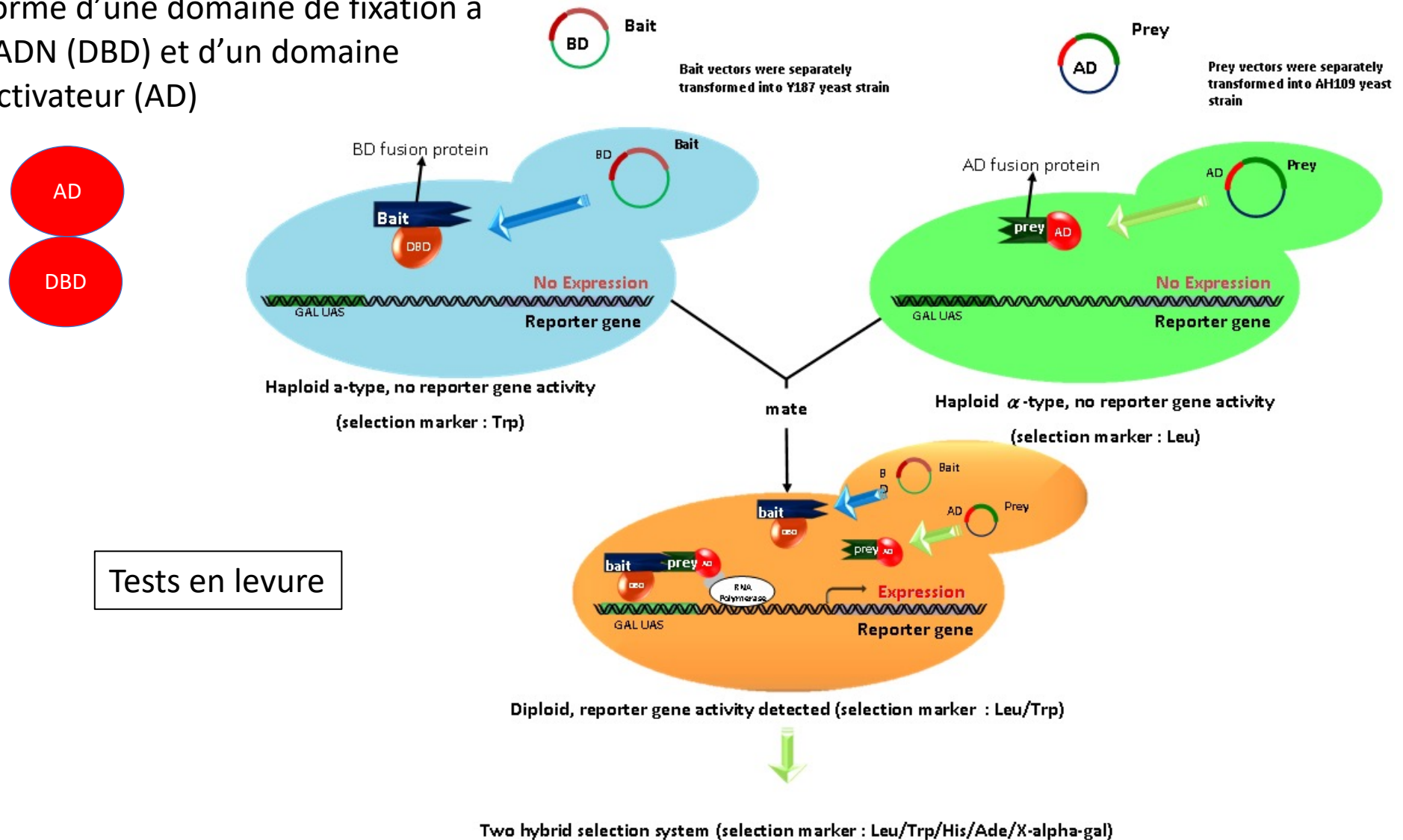
La comparaison sur gel ADN nu / ADN protégé, révèle une empreinte correspondant aux sites masqués à la DNase I par la présence de la protéine fixée.

Tests d'interactions protéine-protéine

Double-hybride

Gal4 = activateur transcriptionnel formé d'une domaine de fixation à l'ADN (DBD) et d'un domaine activateur (AD)

Interaction entre protéines appât et proie



Complémentation fonctionnelle

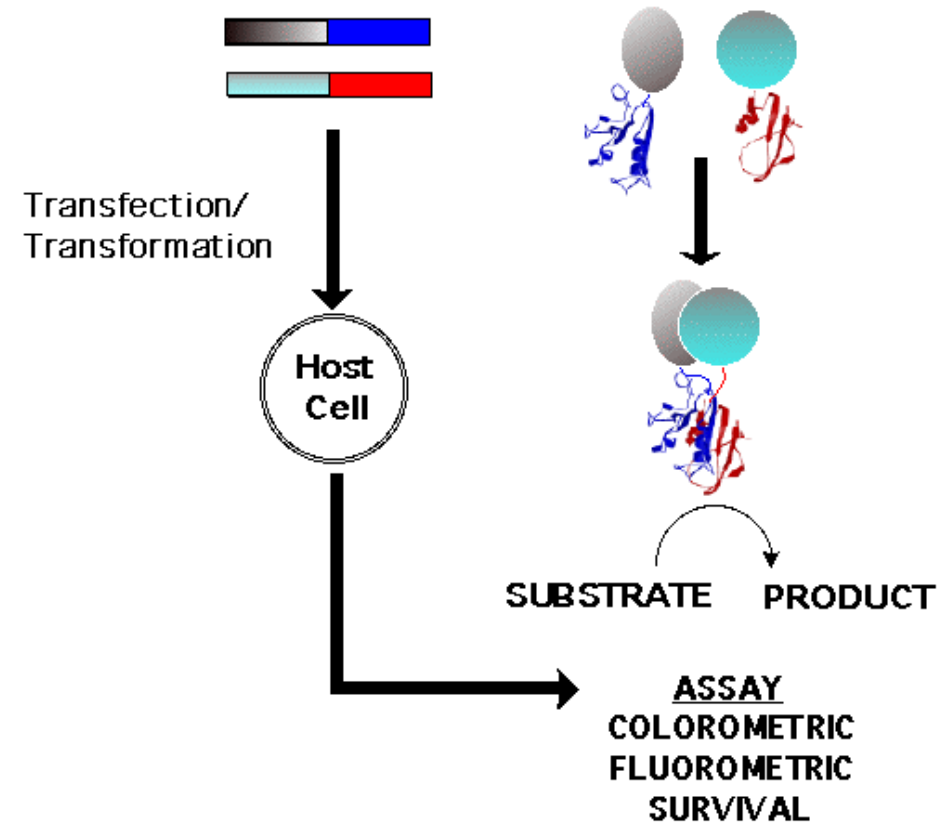
Principe:

- Le gène codant une protéine rapportrice (β -galactosidase, DHFR, Luciférase, GFP...) est séparé en 2 fragments.
- Les 2 fragments sont fusionnés avec les gènes codant les protéines X et Y dont on veut tester l'interaction.
- Lorsque X et Y interagissent, la protéine rapportrice est reconstituée et son activité est détectée.

Exemple: La **DHFR**, essentielle à la survie cellulaire, est impliquée dans la biosynthèse des purines.

On teste donc la survie cellulaire en milieu minimum dépourvu de nucléotides.

Dihydrofolate reductase



Avantages par rapport au double hybride:

- Expériences réalisables dans tous les types cellulaires
- La localisation cellulaire peut être choisie (même dans les membranes)