

L3 Biologie-Santé

UE Biochimie Structurale

TD Interactions protéines-ligands

Exercice 2: Etude d'une interaction récepteur-hormone

(Expérimentations et résultats tirés des travaux d'A. Mélançon, Université du Québec à Trois-Rivières)

- Une protéine P est constituée de plusieurs sites récepteurs R du ligand L ; n est le nombre de sites récepteurs par molécule de protéine ($[R]_0 = n \cdot [P]_0$). On admet que les sites récepteurs sont identiques et indépendants.
- **1.** *Ecrire l'expression de K_D et en déduire la relation de Scatchard pour le récepteur (protéine P) sur lequel se fixe le glucagon (ligand L) :*

$$\frac{[RL]}{[L]} = n \times \frac{[P]_0}{K_D} - \frac{[RL]}{K_D}$$

- Le glucagon est une hormone peptidique de 29 résidus sécrétée par le pancréas. Lorsque le taux de glucose dans le sang (glycémie) diminue significativement, la sécrétion de glucagon est stimulée. Le glucagon sécrété agit principalement sur les hépatocytes, par l'intermédiaire d'un récepteur situé à leur surface : après fixation de l'hormone sur le récepteur, les réserves de glycogène hépatique sont mobilisées et hydrolysées sous forme de glucose libéré dans le sang.
- Dans le but d'étudier les propriétés de liaison du récepteur au glucagon, et plus précisément après une période de jeûne ou d'exercice physique, des rats ont été assignés aléatoirement à des groupes contrôle (7 animaux), jeûne (7 animaux) et exercice physique (7 animaux). Les rats du groupe « jeûne » ont été privés de nourriture pendant 24 heures, tandis que les rats du groupe « exercice physique » ont été soumis à une session de nage de 180 minutes. Les rats du groupe « contrôle » n'ont rien subi de particulier.

Juste après la fin de l'expérimentation, les rats ont été sacrifiés. Leur sang a été prélevé au niveau de la veine cave abdominale et, après centrifugation, le plasma a été récupéré et conservé à -80°C . Les foies ont quant à eux été prélevés, pesés, coupés en plusieurs morceaux et conservés à 4°C dans une solution tampon de saccharose à 4%. Les concentrations respectives en glucose plasmatique et glycogène hépatique sont représentées pour chaque groupe d'animaux, à la figure 1.

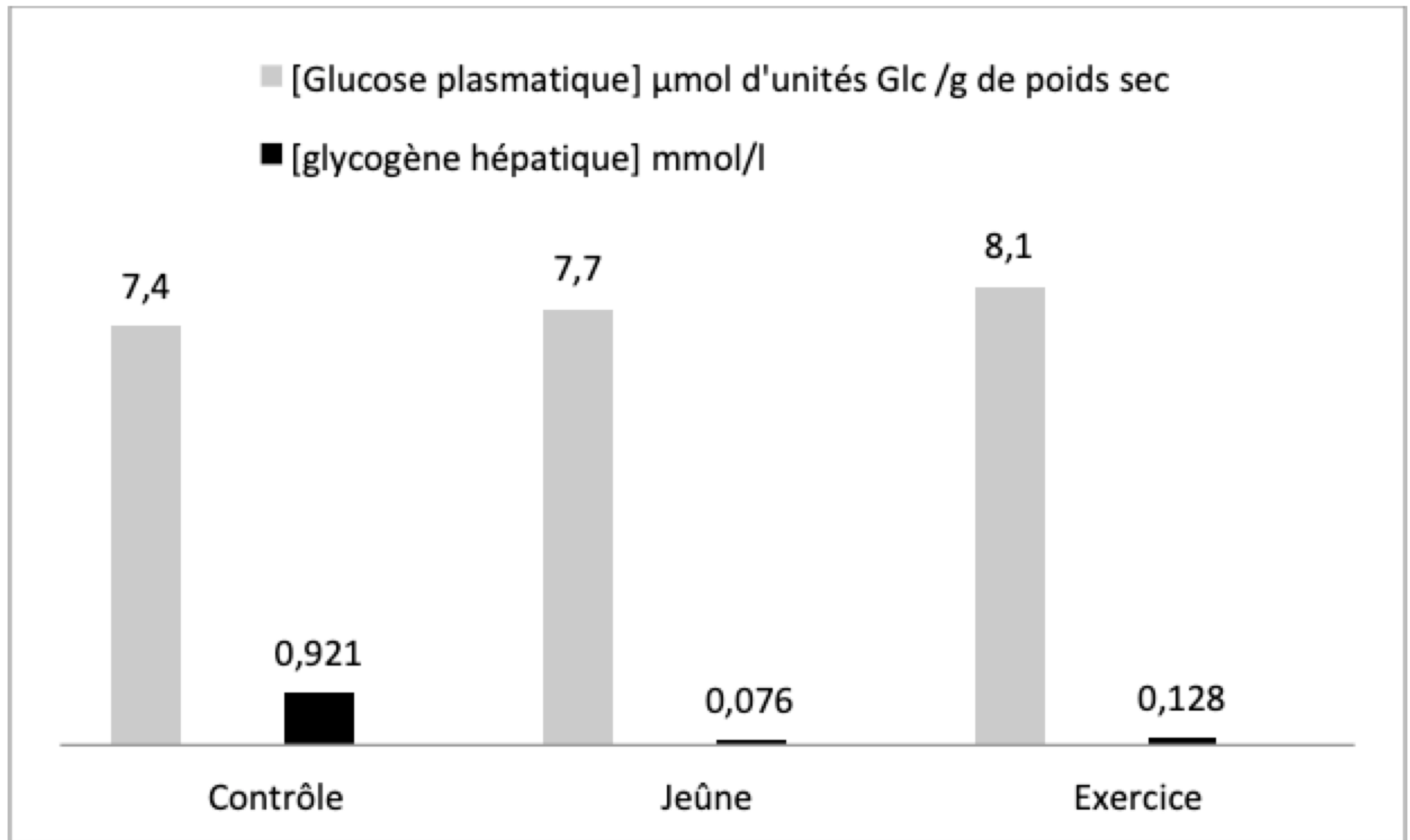


Figure 1 : Concentrations de glucose plasmatique et glycogène hépatique pour chaque groupe d'animaux.

La figure 1 montre que:

- la concentration du glucose plasmatique est globalement identique pour chaque groupe d'animaux;
 - en revanche, le taux de glycogène hépatique est significativement réduit pour les rats des groupes « jeûne » et « exercice » ;
- le fait de jeûner ou de nager provoque donc une mobilisation du stock de glycogène hépatique, c'est-à-dire une dégradation, une consommation du glycogène présent dans l'organisme des rats, afin de maintenir une concentration de glucose plasmatique constante.

Les membranes plasmiques des hépatocytes sont préparées par fractionnement subcellulaire à 4°C puis soumises à une expérience dite de radiolialison: une série de solutions contenant une quantité fixe de membranes sont incubées en présence de différentes concentrations en glucagon marqué à ^{125}I ; chaque solution est ensuite filtrée très rapidement à l'aide d'une pompe à vide sur une membrane dont la porosité permet le passage de molécules de moins de 10 kDa. La radioactivité présente dans la solution filtrée est mesurée ainsi que celle retenue sur le filtre.

3. Que permet de mesurer cette expérience?

- L'expérience de radioliation permet de caractériser un récepteur par une **technique de liaison spécifique du ligand au récepteur**.
- Cette technique utilise des ligands qui se définissent comme tout composé capable de se fixer sur un récepteur. Elle permet de définir l'**affinité** d'un ligand pour un site de liaison spécifique, c'est-à-dire la **capacité de fixation du ligand à son récepteur**.
- ATTENTION : cette technique n'étudie que la fixation du ligand et pas son effet biologique.

Une des méthodes les plus utilisées est la **méthode de saturation avec un ligand radiomarqué** (^{125}I est utilisé ici pour marquer le glucagon) Les résidus tyrosine du glucagon sont marqués avec ^{125}I .

Le ligand radioactif est ajouté à une concentration connue ($[L]_{\text{total}}$) sur une préparation membranaire

- La radioactivité mesurée dans la **solution filtrée** correspond au **ligand libre** $[L]_{\text{libre}}$
- La radioactivité **retenue sur le filtre** correspond au **ligand lié** $[L]_{\text{lié}}$.

3. Que permet de mesurer cette expérience?

- **On mesure la liaison dite totale** qui correspond à la somme de la liaison du ligand à son récepteur (liaison spécifique à forte affinité) et à d'autres sites de liaison à faible affinité (liaison non spécifique).

3. Que permet de mesurer cette expérience?

- L'expérience décrite ci-dessus a permis d'obtenir le graphique obtenu à la figure 2.

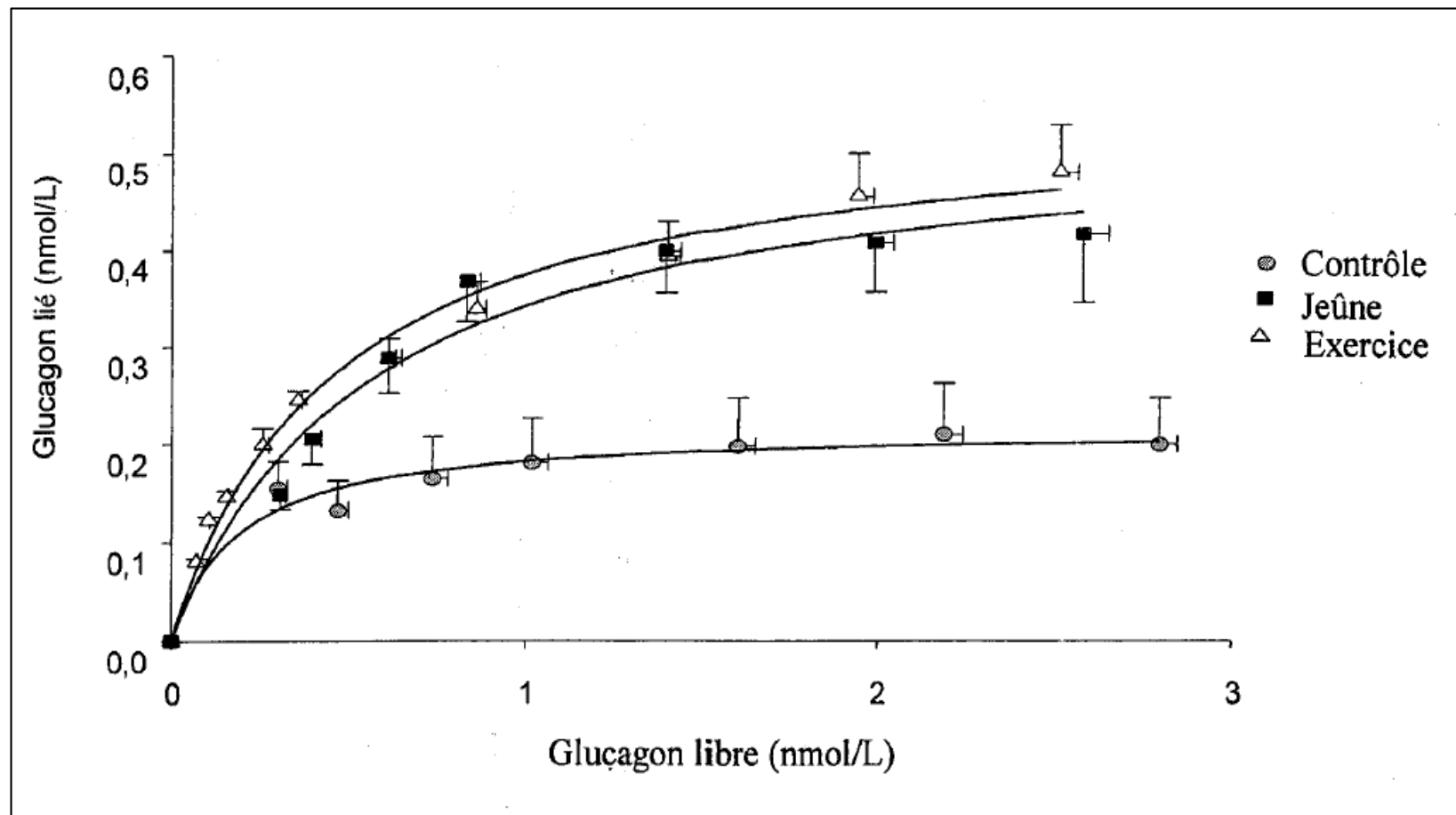


Figure 2 : Courbes de saturation des propriétés de liaison des récepteurs hépatiques au glucagon.

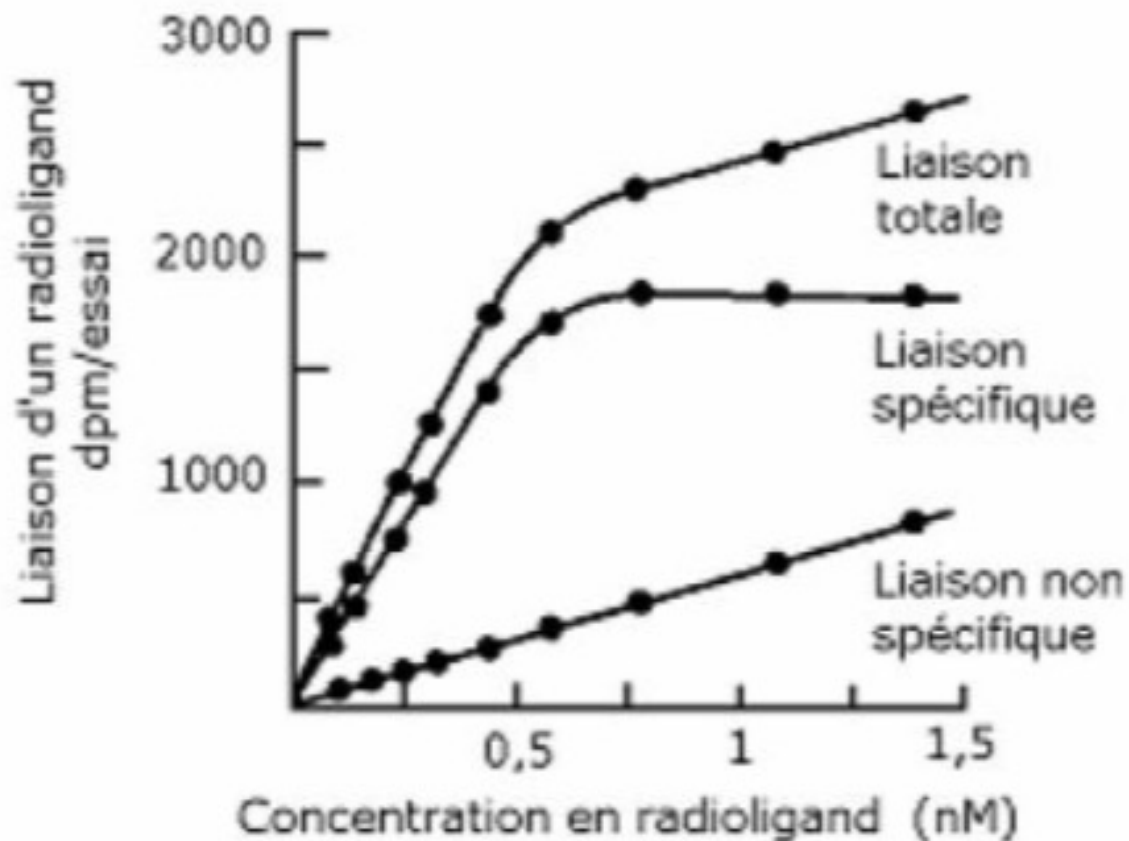
4. Interprétez les résultats obtenus et proposez une (des) hypothèse(s) pour expliquer les différences observées entre la courbe « Contrôle » et les courbes « Jeûne » et « Exercice ».

- Pour les 3 groupes d'animaux, la courbe $[Glucagon\ li\acute{e}] = f([Glucagon\ libre])$ obtenue est une hyperbole : chaque courbe de saturation permet d'atteindre un plateau.
- Cependant, ce plateau est atteint pour une concentration moindre pour le groupe « contrôle » ($\approx 0,2$ nmol/L) que pour les « jeûne » et « exercice » ($\approx 0,5$ nmol/L).
- Ces résultats permettent de proposer 2 hypothèses :
 - soit les rats des groupes « jeûne » et « exercice » possèdent un type de récepteurs au glucagon différent de celui présent chez les rats du groupe « contrôle » ;
 - soit il s'agit des mêmes récepteurs, mais présents en plus grande concentration chez les rats des groupes « jeûne » et « exercice » que chez les rats du groupe « contrôle ».

- L'expérience de radioliation permet donc de mesurer l'affinité du glucagon pour son récepteur et donc de déterminer la valeur de K_D .
- K_D est une constante de dissociation à l'équilibre, caractéristique d'un récepteur et d'un ligand. Plus concrètement, K_D représente la concentration en ligand nécessaire pour occuper 50% des récepteurs

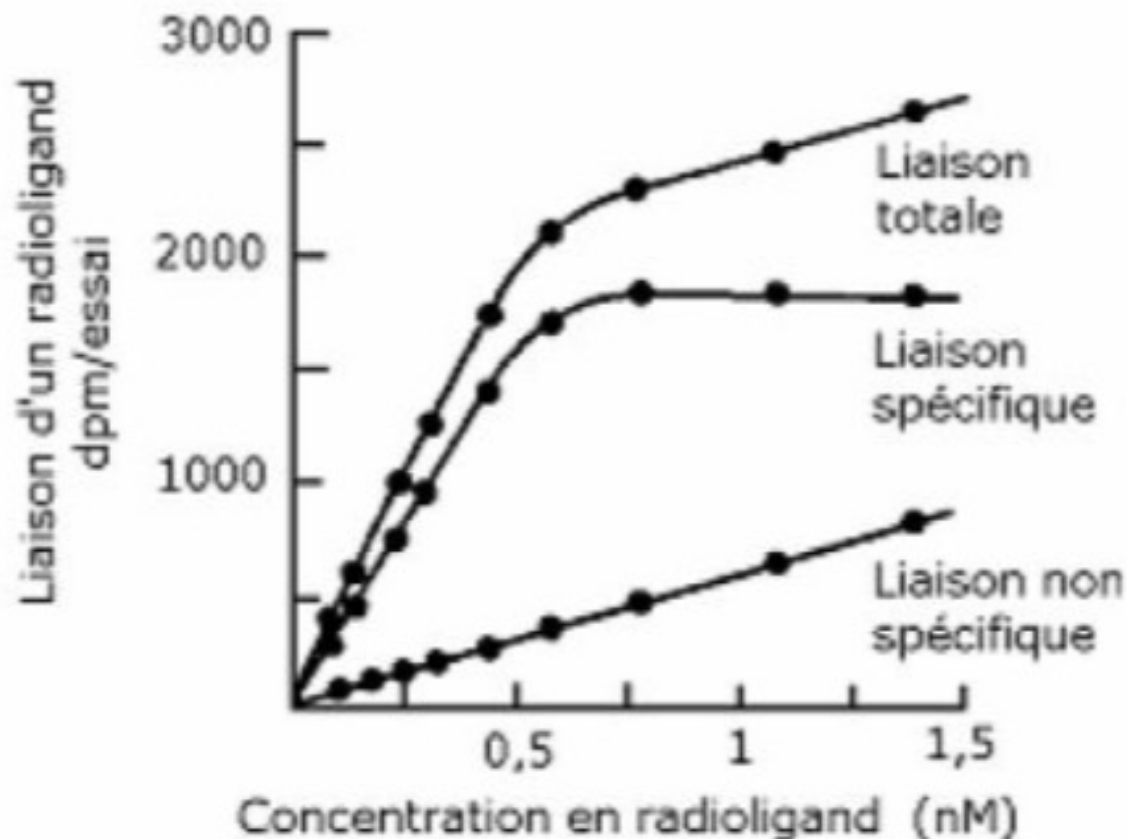
5. La liaison d'un ligand sur un récepteur reflète une liaison de type spécifique. Le nombre de sites de liaison spécifique est donc limité dans une préparation donnée : on parle de phénomène de saturation

Sachant que les liaisons non spécifiques correspondent à la fixation du ligand sur des sites non récepteurs, représentez, sur la figure 2, l'allure d'une courbe de liaison non spécifique.



5. La liaison d'un ligand sur un récepteur reflète une liaison de type spécifique. Le nombre de sites de liaison spécifique est donc limité dans une préparation donnée : on parle de phénomène de saturation

Sachant que les liaisons non spécifiques correspondent à la fixation du ligand sur des sites non récepteurs, représentez, sur la figure 2, l'allure d'une courbe de liaison non spécifique.



La liaison non spécifique peut être mesurée en présence d'une quantité de ligand non radioactif (ligand froid) suffisante pour empêcher la fixation du ligand radioactif sur ses sites spécifiques.

La liaison spécifique correspond à la différence entre liaison totale et liaison non spécifique et permet de définir l'affinité du ligand pour son récepteur.

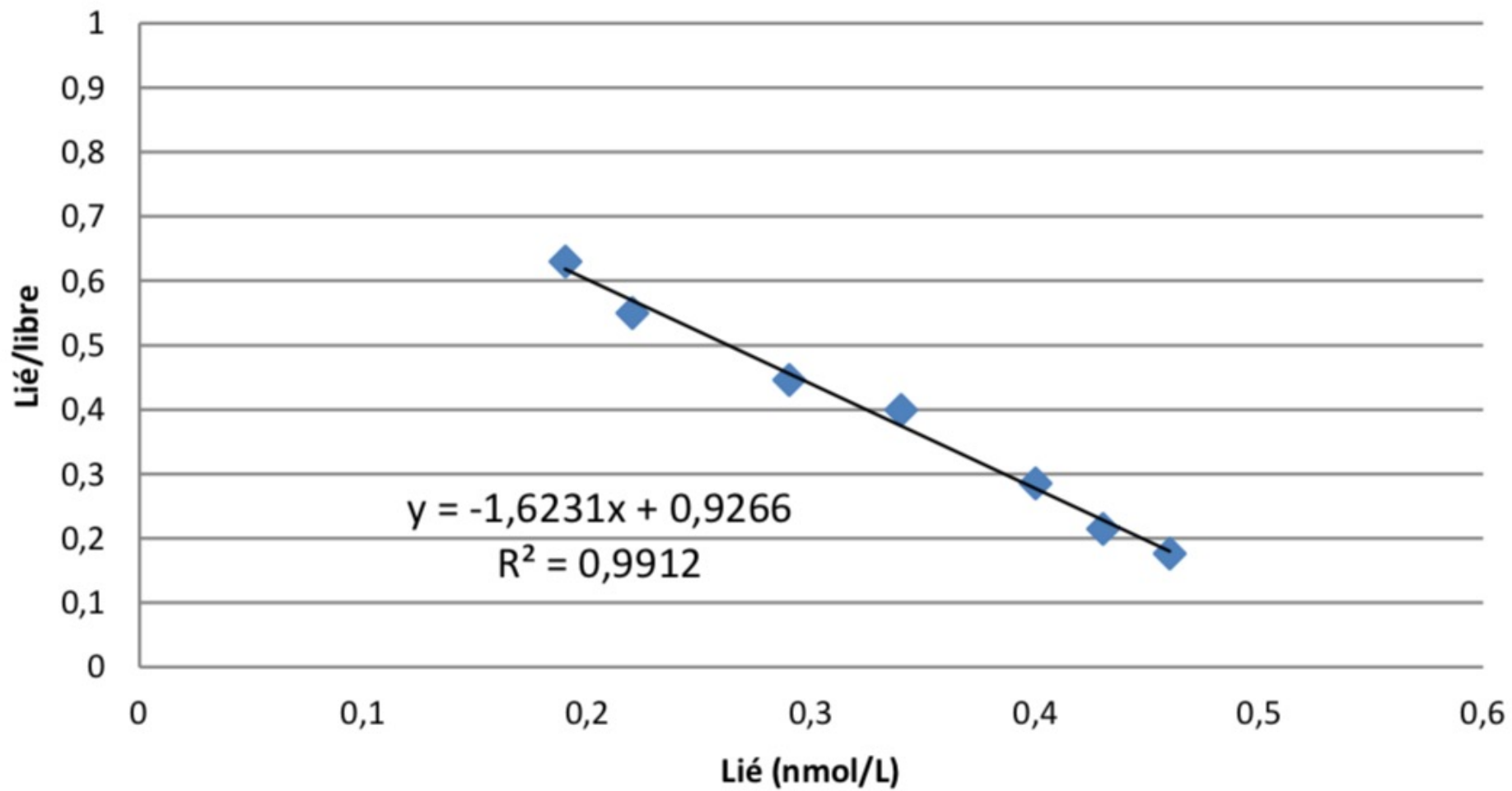
6. A partir des données issues des courbes précédentes et rassemblées dans le tableau ci-dessous, *tracer les courbes $[Glucagon\ lié]/[Glucagon\ libre] = f([Glucagon\ lié])$ et interpréter l'allure des courbes obtenues.*

Groupe « contrôle »	[Glucagon lié] (nmol/L)	0.125	0.16	0.175	0.19	0.2	0.21			
	[Glucagon libre] (nmol/L)	0.6	0.8	1	1.8	2.2	2.8			
Groupe « jeûne »	[Glucagon lié] (nmol/L)	0.19	0.22	0.29	0.34	0.4	0.43	0.46		
	[Glucagon libre] (nmol/L)	0.3	0.4	0.65	0.85	1.4	2	2.6		
Groupe « exercice »	[Glucagon lié] (nmol/L)	0.09	0.12	0.15	0.2	0.27	0.33	0.41	0.46	0.5
	[Glucagon libre] (nmol/L)	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5	0.85	1.4	1.9	2.5

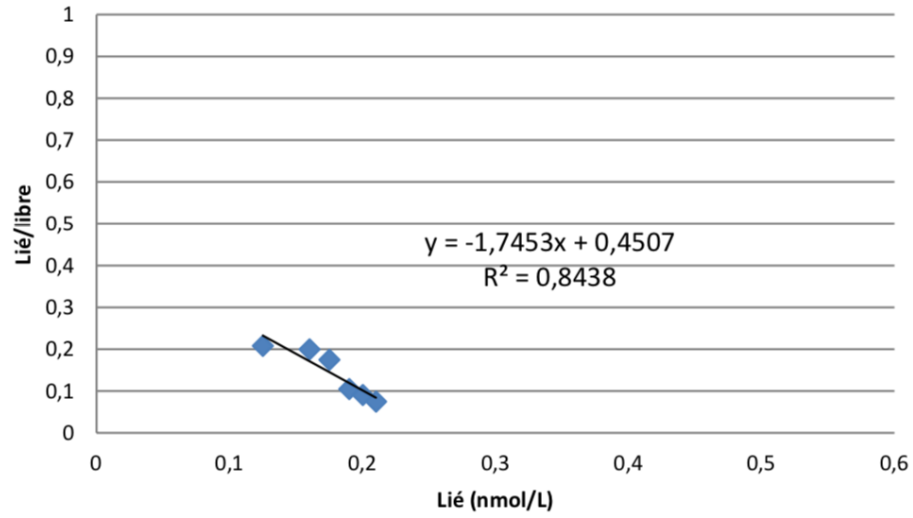
Groupe « contrôle »	[Glucagon lié] (nmol/L)	0.125	0.16	0.175	0.19	0.2	0.21			
	[Glucagon lié]/[Glucagon libre] (nmol/L)	0.208	0.2	0.175	0.105	0.091	0.075			
Groupe « jeûne »	[Glucagon lié] (nmol/L)	0.19	0.22	0.29	0.34	0.4	0.43	0.46		
	[Glucagon lié]/[Glucagon libre] (nmol/L)	0.63	0.55	0.446	0.4	0.286	0.215	0.177		
Groupe « exercice »	[Glucagon lié] (nmol/L)	0.09	0.12	0.15	0.2	0.27	0.33	0.41	0.46	0.5
	[Glucagon lié]/[Glucagon libre] (nmol/L)	0.9	0.8	0.75	0.667	0.54	0.388	0.293	0.242	0.2

On trace $[L]_{\text{lié}}/[L]_{\text{libre}}$ en fonction du $[L]_{\text{lié}}$

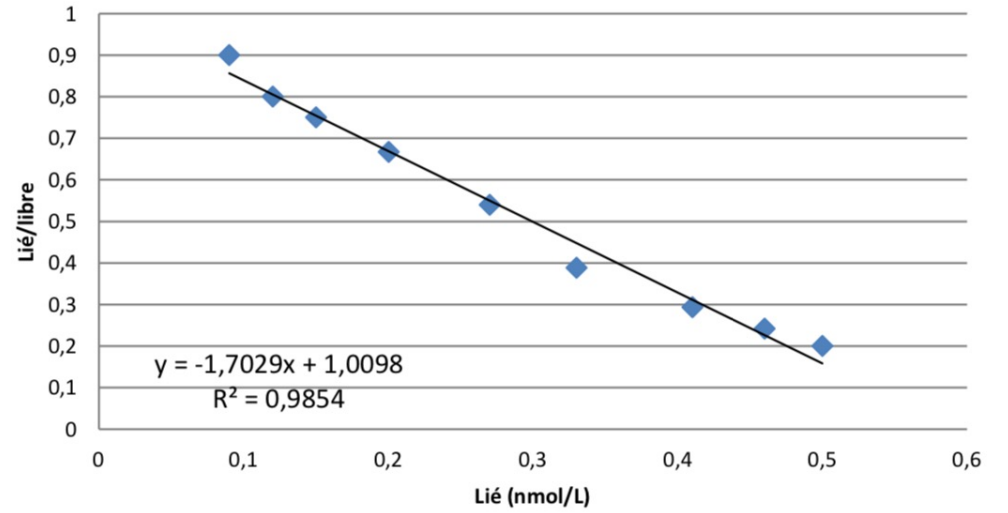
Groupe jeûne



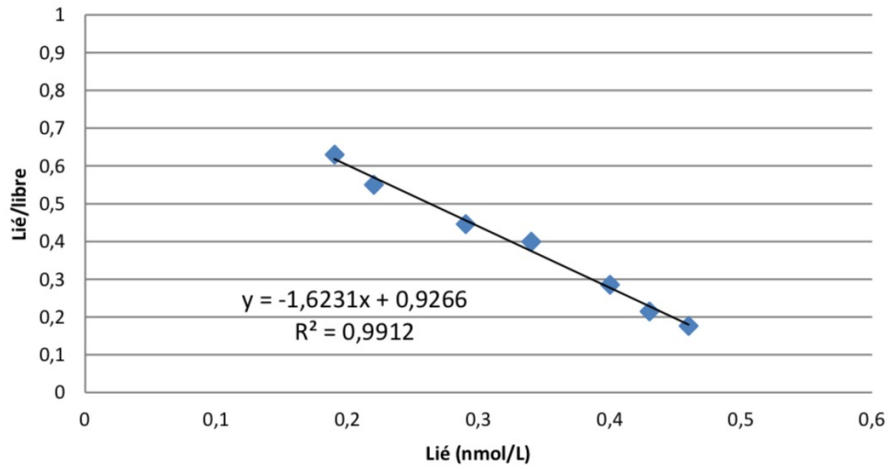
Groupe contrôle



Groupe Exercice



Groupe jeûne



Dans chaque cas, on obtient une droite de pente négative : c'est la représentation de Scatchard (représentation de la dérivée des courbes de saturation).

*7. A partir des représentations de Scatchard,,
calculer, pour chaque groupe d'animaux, la
constante de dissociation K_D .*

- Comment peut-on interpréter les résultats
obtenus ?*

7. *A partir des représentations de Scatchard,, calculer, pour chaque groupe d'animaux, la constante de dissociation K_D .*

- Dans les 3 cas on a des droites: l'équation de Scatchard décrit donc le système et donc les sites sont identiques et indépendants s'il y a plusieurs sites par récepteur

$K_D = -1/\text{pente}$, donc :

- pour le groupe « contrôle » : $K_D = -1/-1,7453 = \mathbf{0,57 \text{ nmol/L}}$
- pour le groupe « jeûne » : $K_D = -1/-1,6231 = \mathbf{0,63 \text{ nmol/L}}$
- pour le groupe « exercice » : $K_D = -1/-1,7029 = \mathbf{0,59 \text{ nmol/L}}$

Comment peut-on interpréter les résultats obtenus ?

- Les valeurs de K_D obtenues dans les 3 cas sont du même ordre de grandeur et non significativement différentes, autour de 0,6 nmol/L, ce qui traduit la même affinité du glucagon pour les récepteurs présents chez les 3 groupes d'animaux.
- Par rapport aux 2 hypothèses proposées plus tôt, on peut donc conclure à l'existence d'un **seul type de récepteurs au glucagon** ;
- il y a donc une plus forte concentration de récepteurs au glucagon chez les animaux des groupes « jeûne » et « exercice ».

8. Déterminer pour chaque groupe d'animaux, la concentration en sites de fixation maximale (B_{max}) du glucagon sur son récepteur :

- **en nmol/L,**
- puis **pmol/mg de protéines** sachant que les membranes plasmiques des hépatocytes incubées en présence de ^{125}I -glucagon contiennent $10\ \mu\text{g}$ de protéines dans un volume de $150\ \mu\text{l}$,
- et enfin en **nombre de récepteurs par cellule** sachant que chaque réaction a été effectuée dans un volume de $150\ \mu\text{l}$ et que la masse de foie utilisée pour chaque expérience ($2\ \text{g}$) équivaut à 10^9 cellules.

8. Déterminer pour chaque groupe d'animaux, la concentration en sites de fixation maximale (B_{max}) du glucagon sur son récepteur :

- **en nmol/L,**

• Valeurs de x pour $y=0$ soit :

- groupe « contrôle » : $-0,450/-1,745 = 0,26$ nmol/L

- groupe « jeûne » : $-0,926/-1,623 = 0,57$ nmol/L

- groupe « exercice » : $-1,01/-1,703 = 0,59$ nmol/L

- puis **pmol/mg de protéines** sachant que les membranes plasmiques des hépatocytes incubées en présence de ^{125}I -glucagon contiennent $10\ \mu\text{g}$ de protéines dans un volume de $150\ \mu\text{l}$,

- Exemple pour le groupe « contrôle » :
 $10\ \mu\text{g}$ de protéines dans $150\ \mu\text{L}$ soit une concentration de $0,067\ \text{mg/mL} = 0,067\ \text{g/L}$
 $0,26\ \text{nmol/L} = 0,26\ \text{nmol}/0,067\ \text{g}$ de protéines soit
 $3,88\ \text{nmol/g}$ de protéines = **$3,88\ \text{pmol/mg}$ de protéines**
- groupe « jeûne » : $0,57/0,067 = \mathbf{8,51\ \text{pmol/mg}}$ de protéines
- groupe « exercice » : $0,59/0,067 = \mathbf{8,81\ \text{pmol/mg}}$ de protéines

- et enfin en **nombre de récepteurs par cellule** sachant que chaque réaction a été effectuée dans un volume de 150 μl et que la masse de foie utilisée pour chaque expérience (2 g) équivaut à 10^9 cellules.

Exemple pour le groupe « contrôle » :

- 0,26 nmol/L donc pour $150 \cdot 10^{-6}$ L (=150 μL),
- on a $3,9 \cdot 10^{-5}$ nmol soit $3,9 \cdot 10^{-14}$ mol
- $3,9 \cdot 10^{-14} \times 6,02 \cdot 10^{23} = 2,35 \cdot 10^{10}$ molécules

$2,35 \cdot 10^{10}$ molécules pour 10^9 cellules, soit pour 1 cellule
 $2,35 \cdot 10^{10} / 10^9 = 23,5$

- soit **24 récepteurs au glucagon par hépatocyte chez les rats « contrôle »**

- **24 récepteurs au glucagon par hépatocyte chez les rats « contrôle »**
 - groupe « jeûne » : 51,5 soit **52 récepteurs au glucagon par hépatocyte chez les rats « jeûne »**
 -
 - groupe « exercice » : 53,3 soit **53 récepteurs au glucagon par hépatocyte chez les rats « exercice »**
- Ici, les différences sont significatives : il y a 2 fois plus de récepteurs au glucagon sur les hépatocytes des rats des groupes « jeûne » et « exercice » que sur ceux des rats du groupe « contrôle ».

9. Quelle(s) conclusion(s) pouvez-vous tirer de cette étude, concernant l'effet du jeûne et de l'exercice sur l'interaction du glucagon avec son récepteur ?

Le jeûne et l'exercice augmentent la densité des récepteurs au glucagon sur les hépatocytes, « forçant » ainsi les rats à puiser dans leurs réserves de glycogène ; celui-ci, sous le contrôle hormonal du glucagon, est dégradé en glucose pour maintenir la glycémie et fournir le glucose et l'énergie nécessaires aux organes.

En revanche, l'affinité du glucagon pour les récepteurs hépatiques n'est pas modifiée.