

Méthodes thermodynamiques d'étude des équilibres d'association dans les systèmes biologiques *

par R. L. Biltonen

*(Département de biologie et de pharmacologie,
Université de Virginie, École de Médecine,
Charlottesville, Virginie, 22901, U.S.A.)*

Introduction

Beaucoup de phénomènes biologiques traduisent l'existence d'états d'équilibre thermodynamiquement définis : l'importance d'une réponse biologique est directement proportionnelle à la « position » thermodynamique d'une réaction atteignant rapidement son état d'équilibre. Un tel système peut être écrit, par exemple, par



M représente une macromolécule, X un certain ligand et MX le complexe macromoléculaire qui détermine la réponse biologique. Comme exemple simple, on peut citer la formation d'un complexe enzyme-substrat qui, par un chemin catalytique prédéterminé, conduit à un nouveau composé chimique ou métabolite du système.

C'est au niveau de l'étape de l'équilibre que le système complet exerce un contrôle le plus efficace du processus biologique. Tant que la concentration de la macromolécule ou du ligand commande la position de l'équilibre, un contrôle biologique de la quantité de ces espèces peut influencer le niveau de la réponse.

De même, la température, d'autres réactions couplées, comme celles qui interviennent dans un contrôle par rétroinhibition (inhibition par les produits, par exemple), la nature du solvant peuvent avoir une influence sur le taux de formation du « complexe intermédiaire réversible » et, donc, commander la réponse biologique.

Comme exemples évidents de tels phénomènes, on peut citer l'influence du pH sur le transport de l'oxygène par le sang, les processus de contrôle allostérique des enzymes et les interactions drogue-récepteur.

Il devient évident que la compréhension de l'ensemble des équilibres impliquant des macromolécules biologiques et des ligands constitués de petites molécules est essentielle pour la description complète de tout système biologique.

Dans cet article, nous examinerons quelques méthodes thermodynamiques permettant d'obtenir des

* Exposé présenté au cours de la « Conférence de thermodynamique biologique » organisée par la Division de chimie analytique (Assemblée annuelle), le 23 mai 1973, à Marseille.

informations sur les phénomènes d'association et l'analyse de ces informations en vue d'aboutir à une description détaillée du système en interaction.

Activité thermodynamique

Afin de décrire les méthodes thermodynamiques utilisées pour mesurer le degré d'association entre ligand et macromolécules, considérons d'abord le cas le plus simple, celui d'une macromolécule possédant un seul ensemble de sites d'association indépendants et équivalents. Dans un tel cas, le nombre moyen r de sites occupés par macromolécule est donné par la relation :

$$r = NK[L]/(1 + K[L]) \quad (I)$$

K représente la constante d'association intrinsèque par site, $[L]$ la concentration du ligand libre et N le nombre total de sites d'association par macromolécule.

L'analyse mathématique de tels systèmes est évidente et plusieurs représentations différentes peuvent être utilisées. Par exemple, la représentation de Scatchard :

$$r/[L] = NK - rK \quad (II)$$

De cette équation (II), on peut déduire que le graphe représentant la variation de $r/[L]$ en fonction de r est une droite dont l'intersection avec l'axe des abscisses donne N , nombre de sites par molécule et dont la pente est égale à $-K$ (K constante d'association intrinsèque).

Une méthode simple pour obtenir des données concernant l'association consiste à déterminer le potentiel chimique du ligand en présence de la macromolécule. Cette mesure peut être réalisée directement à l'aide d'électrodes spécifiques comme on l'a fait pour l'association cation divalent-acides nucléiques (2). Une méthode classique (3) consiste à mesurer la concentration totale du ligand sur chacune des deux faces d'une membrane de dialyse dans laquelle une solution de macromolécule est équilibrée avec une solution de ligand; la différence de concentration est une mesure directe de la quantité de ligand fixée.

Dans certains cas, il est possible de mettre à profit la modification des propriétés physiques du ligand et/ou de la macromolécule dans l'association pour étudier indirectement cette liaison. Comme exemples, on peut citer l'étude des variations du spectre du ligand, l'extinction de la fluorescence de la protéine par le ligand comme on l'a fait dans le cas des systèmes haptène-anticorps (4). Dans tous ces cas, on admet généralement que le changement de propriété est directement « proportionnel » au degré d'association.

Quelle que soit la méthode utilisée pour mesurer ce degré d'association l'analyse des données concernant un « isotherme » fournit seulement, au mieux, la stœchiométrie et la constante d'équilibre de la réaction. Si l'on souhaite obtenir d'autres renseignements thermodynamiques, il est nécessaire d'analyser l'influence de la température sur le degré d'association. Cela exige une expérimentation supplémentaire mais présente aussi un inconvénient : si le modèle d'association postulé est inexact, la chaleur de réaction déduite de l'application de la loi de Van't Hoff ne représente pas exactement une grandeur thermodynamique.

Par exemple, si les sites d'association de la macromolécule appartiennent à un ensemble de sites indépendants et identiques, il est très difficile de déduire de l'isotherme d'association les véritables constantes d'équilibre.

Dans de tels cas, les diagrammes de Scatchard ne sont pas linéaires : les différentes pentes et points d'intersection sont, en fait, les « moyennes pondérées » des diverses constantes d'équilibre intrinsèques (5).

Études calorimétriques de l'association d'un ligand

Si l'on mélange, dans un calorimètre, une solution contenant la macromolécule à une solution contenant le ligand, la quantité de chaleur libérée est proportionnelle au degré d'association entre le ligand et la macromolécule (après correction tenant compte des chaleurs de dilution). Si tous les sites sont identiques et équivalents, Q , quantité de chaleur rapportée à une mole de macromolécule, constitue une mesure du degré d'association et la relation :

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_{\max}} + \frac{1}{Q_{\max}K[L]} \quad (III)$$

s'applique au cas d'un ensemble unique de sites d'association (6). Dans cette relation, Q_{\max} représente la quantité de chaleur correspondant à l'association d'une mole de macromolécule à N ligands. Ainsi, un graphe représentant Q^{-1} en fonction de $[L]^{-1}$ permet d'estimer, à la fois, constante d'équilibre et accroissement d'enthalpie de la réaction : une description thermodynamique complète en terme d'enthalpie libre, d'enthalpie et d'entropie peut être réalisée.

En outre, si l'on effectue des études semblables à plusieurs températures, l'accroissement de capacité calorifique ΔC_p lié à la réaction peut être déduit de l'application de la relation :

$$\Delta C_p = \frac{d}{dt} (\Delta H)_p \quad (IV)$$

Sturtevant et ses collaborateurs (7) ont réalisé plusieurs études de ce type sur un grand nombre de systèmes macromoléculaires. Ils ont montré que l'association d'une petite molécule aux macromolécules est généralement accompagnée d'une décroissance de la capacité calorifique du système. Ce résultat peut avoir une importance déterminante pour l'interprétation de tels phénomènes. Il faut noter que les variations d'enthalpie et de capacité calorifique estimées calorimétriquement représentent des variations totales par mole de macromolécule.

$$Q_{\max} = N \langle \Delta H_s \rangle \quad (V)$$

Dans cette relation, $\langle \Delta H_s \rangle$ est égal à la variation d'enthalpie moyenne par site.

Par ailleurs, cette méthode d'estimation n'exige pas que le modèle exact du processus d'association soit connu. En fait, la comparaison entre ces quantités de chaleur exactes et celles déduites de l'application des méthodes de Van't Hoff doit être utile pour la description thermodynamique de la réaction.

Une combinaison de deux expériences calorimétriques peut aussi fournir une valeur approchée de la stœchiométrie de la réaction.

Supposons que tous les sites d'association soient identiques. Dans ce cas, la quantité totale de chaleur résultant du mélange du ligand en excès à la macromolécule correspond à Q_{\max} . Si l'on effectue une autre expérience au cours de laquelle un excès de macromolécule est mélangé au ligand, la quantité de chaleur mesurée est :

$$Q'_{\max} = \langle \Delta H_s \rangle$$

La comparaison des deux quantités Q_{\max} et Q'_{\max} fournit une valeur approchée de N , nombre de sites. Cette

technique a été appliquée par Bolen et ses collaborateurs au système de la ribonucléase A (6).

Dérivées des courbes d'association

Supposons qu'un système en équilibre, décrit par l'équation (I), soit soumis à une petite perturbation thermique, la concentration en ligand libre restant constante. Le déplacement de l'équilibre qui en résulte est décrit par l'équation (VI) dans laquelle ΔH représente l'enthalpie de la réaction, R la constante des gaz parfaits et T la température :

$$\Gamma = \frac{dr}{dt} = \frac{K[L]}{(1 + K[L])^2} \cdot \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (VI)$$

Si nous considérons l'expression mathématique de cette fonction de perturbation Γ en fonction du logarithme de la concentration en ligand libre (L), plusieurs propriétés importantes apparaissent :

$$\Gamma = \frac{Ke^y}{(1 + Ke)^2} \cdot \frac{\Delta H}{RT^2} \text{ avec } y = \text{Ln}[L]$$

On peut d'abord montrer que cette fonction est proportionnelle à la dérivée de la fonction d'association par rapport à y . Ensuite, comme cette fonction est toujours positive mais égale à 0 lorsque $\text{Ln}[L]$ tend vers $\pm \infty$, elle doit prendre une valeur maximale pour une certaine valeur de la concentration $[L]$. Cette valeur maximale est atteinte lorsque :

$$[L] = 1/K$$

En outre, cette fonction est symétrique par rapport à ce point. La démonstration expérimentale de ces propriétés est donnée par la figure 1 pour le système proflavine-chymotrypsine.

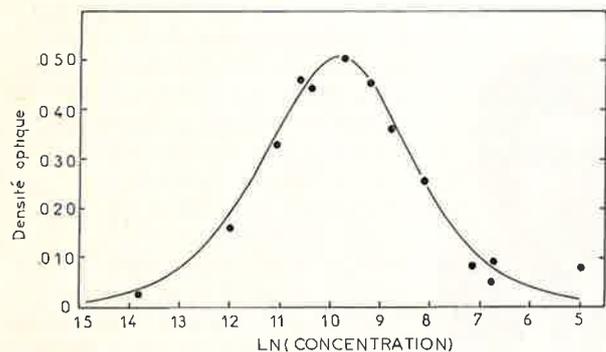


Figure 1. Courbe d'association liée à une « perturbation thermique » pour le système proflavine-chymotrypsine à pH 8.

La variation de densité optique est proportionnelle à la variation du degré d'association. Dans cette expérience, la concentration de la proflavine était maintenue constante alors que celle de la protéine variait. Le diagramme a été calculé en accord avec l'équation (VI) en supposant que $\text{Log } K = 9,7$.

Ainsi, si la dérivée de la fonction d'association est connue, on peut déduire de sa valeur maximale la constante d'association de la réaction. Dans ce cas particulier, on obtient des renseignements supplémentaires : en effet, lorsque le produit $K[L]$ est égal à 1, la fonction dérivée Γ est égale à $\frac{\Delta H}{4RT^2}$ ainsi, l'enthalpie de la réaction peut être estimée à partir de la valeur maximale relevée sur la courbe de perturbation thermique. Ce type d'analyse des informations liées à une perturbation thermique a déjà été illustré par Winkler (8) et Thusius (9).

Les dérivées des courbes d'association apportent des informations utiles par elles-mêmes sur des systèmes définis ; elles apportent également le moyen d'obtenir des renseignements plus détaillés sur les systèmes d'association sans faire intervenir d'hypothèse

a priori sur le modèle d'association.

D'abord, si la macromolécule possède un seul ensemble de sites indépendants, la dérivée de la courbe d'association doit être symétrique. Dans le cas où il existe une association de type coopératif, la courbe d'association peut également être symétrique.

Un exemple spécifique est fourni par un système dans lequel le degré d'association est donné par :

$$r = NK[L]^v / (1 + K[L]^v) \quad (VII)$$

expression dans laquelle v est représentatif du degré de coopérativité. Il est cependant facile de montrer que le moment centré d'ordre deux de la dérivée de la courbe d'association dans ce cas général est proportionnel à $\frac{1}{\sqrt{v}}$. Ainsi, le moment d'ordre deux de la courbe

apporte des renseignements sur le degré de coopérativité.

Comme nous l'avons indiqué précédemment (7), les dérivées des courbes d'association sont symétriques dans le cas de système décrit par les équations (I) et (VII). Cela signifie que leur moment centré d'ordre 3 doit être égal à 0. Au contraire, si le système considéré est constitué de plusieurs (plus de 2) ensembles de sites indépendants et équivalents, on doit attendre une courbe dérivée non symétrique. Ainsi, par l'analyse du moment d'ordre 3 de la dérivée de la courbe d'association, un critère de symétrie apporte des renseignements complémentaires sur le système considérée. Il apparaît également qu'une analyse plus précise de la forme des dérivées des courbes d'association peut donner des informations sur la distribution des différents sites d'association (10).

Un examen approfondi de l'utilité des dérivées des courbes d'association est actuellement réalisé dans notre laboratoire.

Bien que les techniques de perturbation thermique fournissent les informations nécessaires, une étude récente (11) des techniques calorimétriques à flux de réactif montre qu'elles permettent d'obtenir des renseignements de qualité suffisante pour en déduire des courbes dérivées exactes.

L'auteur pense actuellement que ces approches de l'équilibre d'association aideront de façon considérable à comprendre les systèmes d'association complexe.

Remerciements

La plus grande partie du travail décrit dans cet article a pu être réalisée grâce à des contrats du National Science Foundation et du National Institute of Health.

Bibliographie

- (1) G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1949, **51**, 660.
- (2) C. Sander et P. T'so, *J. mol. Biol.*, 1971, **55**, 1.
- (3) I. Klotz, dans « The Proteins », 1^{re} édition, 1953, p. 727.
- (4) S. Velick, C. Parker et H. Eisen, *Proc. natl. Acad. Sci., U.S.*, 1960, **46**, 1470.
- (5) I. Klotz et D. Hunston, *Biochemistry*, 1971, **10**, 3065.
- (6) D. Bolen, M. Fogel et R. Biltonen, *Biochemistry*, 1971, **10**, 4136.
- (7) H. Hinz, D. Shaio et J. Sturtevant, *Biochemistry*, 1971, **10**, 1347.
- (8) S. Velick, J. Baggot et J. Sturtevant, *Biochemistry*, 1971, **10**, 779.
- (9) R. Winkler, Thèse de doctorat, Göttingen, 1969.
- (10) D. Thusius, *Biochimie*, 1973, **55**, 277.
- (11) T. Sturgill, résultats non publiés de notre laboratoire.
- (12) D. Mountcastle, résultats non publiés de notre laboratoire.