

# Utilisation de la Calorimétrie à Titrage Isotherme pour l'étude des interactions entre (bio)molécules

Gilles BRUYLANTS, Kristin BARTIK\*

Université Libre de Bruxelles, Faculté des Sciences Appliquées, Ingénierie Moléculaire et Biomoléculaire, CP165/64, 50 av F.D. Roosevelt, B-1050 Bruxelles, Tel: +32-2-650.35.86, Fax: +32-2-650.36.06, [kbartik@ulb.ac.be](mailto:kbartik@ulb.ac.be)

## Use of Isothermal Titration Calorimetry for the study of the interaction between (bio)molecules

*La calorimétrie à titrage isotherme est une méthode particulièrement bien adaptée pour l'étude des interactions entre (bio)molécules. En effet, il s'agit de la seule technique expérimentale permettant la mesure directe et simultanée de la constante d'affinité et de l'enthalpie caractérisant la formation d'un complexe réversible. La connaissance de la contribution enthalpique à l'énergie libre, et donc également de la contribution entropique, apporte un niveau d'information supplémentaire quant aux facteurs énergétiques à la base de la stabilisation du complexe. L'ITC permet également de mettre en évidence des équilibres liés à l'interaction étudiée, notamment des équilibres de protonation/déprotonation, et d'isoler la part intrinsèque de l'interaction des paramètres thermodynamiques observés.*

*Isothermal Titration calorimetry, Ligand-receptor interaction, Linked equilibria*

## Introduction

La mise en évidence et la quantification des facteurs énergétiques à la base de la stabilisation d'un complexe réversible entre deux - ou plusieurs - molécules est fondamentale pour améliorer notre compréhension des processus biologiques. La plupart de ces processus nécessitent en effet l'interaction d'un récepteur, généralement une macromolécule biologique, avec un ligand pouvant être une macromolécule ou une petite molécule telle qu'une hormone. Pour bien comprendre l'interaction entre (bio)molécules, il est non seulement nécessaire de s'intéresser à la structure du complexe d'association mais également indispensable d'évaluer les différentes interactions non-covalentes qui mènent à sa stabilisation. Toutes les questions liées à la détermination des règles qui dictent la stabilité de l'association de (bio)molécules sont d'une importance primordiale tant au niveau fondamental qu'au niveau appliqué, par exemple dans le cadre de la conception rationnelle de nouvelles molécules thérapeutiques.

Le paramètre généralement utilisé pour caractériser la stabilité d'un complexe d'association est la constante d'équilibre  $K_{\text{eq}}$ . Celle-ci est reliée à la variation d'énergie libre standard de l'interaction ( $\Delta G^\circ$ ) par la relation :

$$K_{\text{eq}} = e^{-\frac{\Delta G^\circ}{RT}}$$

Équation 1

où R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue.  $K_{\text{eq}}$  est fonction de l'activité ( $a_i$ ) des différentes espèces en solution (forme libre des partenaires et complexes) et des coefficients stoechiométriques ( $\nu_i$ ) :

$$K_{\text{eq}} = \prod_i a_i^{\nu_i}$$

Les activités étant difficiles à déterminer, la constante d'équilibre est usuellement exprimée en termes de concentrations. Ainsi formulée, il s'agit d'une constante empirique, appelée constante d'association ou d'affinité,  $K_a$ , obtenue par application de la loi d'action des masses de Guldberg et Waage. Néanmoins on considère généralement que le  $\Delta G^\circ$  qui peut en être extrait est une grandeur thermodynamique (ce qui n'est rigoureusement exact que si la solution est idéale).

Dans le cas "simple" d'une interaction bimoléculaire, la constante d'affinité est le rapport de la concentration molaire en complexe (ML) et du produit des concentrations molaires en partenaires isolés (M et L):



$$K_a = \frac{[ML]}{[L] \cdot [M]}$$

Équation 2

Cette constante peut être mesurée par de nombreuses techniques expérimentales, soit en déterminant les concentrations à l'équilibre des différentes espèces présentes, soit en effectuant un titrage en mesurant la variation d'une observable physique lors de la formation du complexe (modification des propriétés d'absorption ou d'émission, du pouvoir rotatoire, du déplacement chimique RMN, ...).

La connaissance de la constante d'affinité, quoi qu'indispensable pour l'appréciation de la stabilité d'un complexe, ne nous renseigne en aucune manière sur les facteurs énergétiques à l'origine de cette stabilité. Une meilleure caractérisation de l'interaction peut être obtenue en séparant le terme d'énergie libre en ses contributions enthalpique ( $\Delta H^\circ$ ) et

entropique ( $\Delta S^\circ$ ):

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^\circ$$

Équation 3

La variation d'enthalpie est égale à la différence des énergies des liens non covalents créés et rompus entre le ligand, le récepteur et le solvant lors de l'interaction. Le terme entropique lui, est caractéristique du nombre de microétats accessibles au système et est généralement dominé, dans les systèmes biologiques, par le réarrangement des molécules d'eau.<sup>[1]</sup> Le  $\Delta G^\circ$  étant la somme de ces deux contributions, celles-ci peuvent se renforcer ou, au contraire, se compenser. Différentes combinaisons de  $\Delta H^\circ$  et  $\Delta S^\circ$  peuvent donc mener à la même valeur de  $\Delta G^\circ$ . Il est fréquent qu'une modification structurale d'une drogue en vue d'améliorer son efficacité n'ait pas d'influence sur l'affinité pour la cible thérapeutique de par le fait qu'elle conduise à des effets antagoniques sur  $\Delta H^\circ$  et  $\Delta S^\circ$ . Par exemple, les deux inhibiteurs de la trypsine présentés à la Figure 1 exhibent sensiblement la même affinité pour la protéine mais des profils thermodynamiques totalement différents (voir table associée).<sup>[2]</sup> Sans la connaissance de la répartition de  $\Delta G^\circ$  entre  $\Delta H^\circ$  et  $\Delta S^\circ$ , le remplacement de l'hydrogène de l'acide carboxylique de la drogue par un groupement méthyle aurait pu paraître ne pas avoir d'influence sur l'interaction avec l'enzyme. La connaissance des contributions enthalpiques et entropiques de l'énergie libre apporte un niveau d'information supplémentaire quant aux facteurs énergétiques à la base de la stabilisation du complexe.

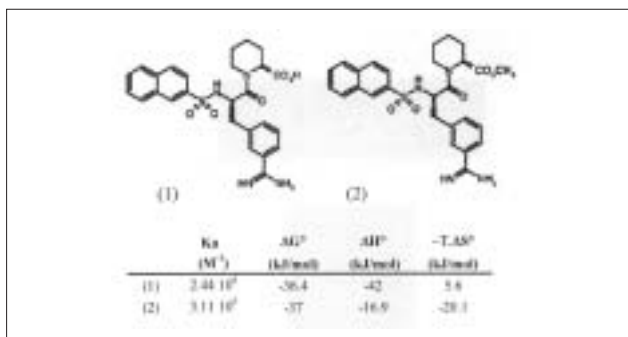


Figure 1. (1) Acide Na-(2-naphthylsulphonyl-3-amidino-L-phénylalanine-D-pipécolinique) et (2) méthylester correspondant de l'acide ainsi que le profil thermodynamique de leur interaction avec la trypsine<sup>[2]</sup>

L'enthalpie d'interaction peut être déterminée selon la méthode de van't Hoff en étudiant la dépendance de la constante d'affinité en fonction de la température. En combinant les équations 2 et 3 :

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

Équation 4

et en dérivant par rapport à la température en sachant que :

$$\frac{\delta(\Delta H^\circ)}{\delta T} = \Delta C_p$$

Équation 5

$$\frac{\delta(\Delta S^\circ)}{\delta T} = -\frac{\Delta C_p}{T}$$

Équation 6

on obtient :

$$\frac{\delta(\ln K_a)}{\delta(1/T)} = -\Delta H^\circ$$

Équation 7

A une température donnée l'enthalpie d'interaction est la tangente à la courbe donnant  $\ln K_a$  en fonction de  $1/T$ . L'hypothèse fréquemment utilisée est que l'enthalpie est indépendante de la température ( $\Delta C_p=0$ ) ce qui, par intégration de l'équation 7, mène à une linéarisation de la dépendance de  $\ln K_a$  en fonction de  $1/T$ . Ce type d'approche conduit à une estimation erronée de l'enthalpie d'interaction car  $\Delta C_p$  est rarement nul. Cependant les constantes d'affinités déterminées expérimentalement sont généralement largement entachées d'erreurs et il est de ce fait souvent difficile de procéder autrement. Il faut atteindre des valeurs de  $|\Delta C_p|$  supérieures à  $1 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ deg}^{-1}$  pour que la non-linéarité introduite dans la dépendance de  $\ln K_a$  en fonction de  $1/T$  soit suffisante pour être prise en compte dans le traitement des données.<sup>[3]</sup> Il est alors possible d'utiliser la forme intégrale de l'équation de van't Hoff :

$$\ln \frac{K_a}{K_a(T_0)} = \frac{\Delta H^\circ(T_0) - T_0 \cdot \Delta C_p}{R} \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \ln \frac{T}{T_0}$$

Équation 8

pour laquelle on considère  $\Delta C_p$  constant. Bien que ceci ne soit pas rigoureusement exact, espérer pouvoir utiliser un modèle plus complexe est illusoire.

## Calorimétrie à Titrage Isotherme

La calorimétrie à titrage isotherme (ITC) est un outil particulièrement puissant pour étudier les interactions entre (bio)molécules car elle permet une mesure directe de l'enthalpie d'interaction et de la constante d'affinité (donc de l'énergie libre). Cette technique consiste à titrer une solution contenant une molécule (que nous appellerons récepteur, généralement une macromolécule - M) à l'aide d'une solution contenant une autre molécule (que nous appellerons ligand - L). Après chaque injection, l'appareil mesure le flux de chaleur au travers de la paroi de la cellule de travail (Figure 2a). En intégrant ce signal par rapport au temps, on obtient la chaleur dégagée (ou absorbée) à chaque injection. Celle-ci est égale à la somme de la chaleur dégagée (ou absorbée) suite à la formation du complexe et des chaleurs de dilution du ligand et du récepteur (Figure 2b). La chaleurs de dilution peuvent être

déterminées grâce à deux expériences supplémentaires : en injectant le ligand dans le tampon et en titrant le récepteur à l'aide du tampon. Ces chaleurs de dilution sont soustraites de la chaleur totale mesurée pour donner la chaleur dégagée (ou absorbée) par la formation de complexe. En utilisant un modèle pour représenter l'interaction, le plus simple étant évidemment celui d'une interaction 1:1 (équation 2), et en l'ajustant aux données expérimentales, il est possible d'extraire les paramètres thermodynamiques caractérisant l'interaction : l'enthalpie d'interaction et la constante d'affinité. En effet, la chaleur dégagée (ou absorbée) par la formation de complexe à chaque injection ( $q_i$ ) est égale au produit de l'enthalpie d'interaction et du nombre de moles de complexe formé. Cette dernière quantité est fonction des concentrations totales en M et L en solution et de la constante d'affinité  $K_a$ . Il est intéressant de faire remarquer que même pour une interaction bimoléculaire, on utilise généralement un modèle faisant intervenir la stoechiométrie de l'interaction et ce, dans le but de corriger d'éventuelles erreurs sur les concentrations, plus que fréquentes lorsque l'on travaille avec des macromolécules biologiques.

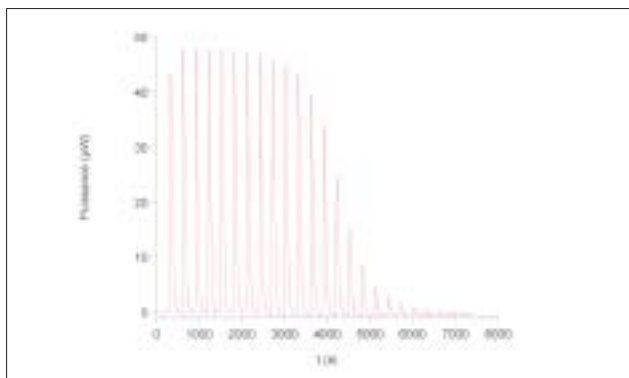


Figure 2a. Puissance que l'appareil doit dissiper lors d'injections de 10 µl d'une solution de 2°CMP (cytidine 2-monophosphate) de concentration 6mM dans 1,3ml d'une solution de RNase 0,6 mM afin de maintenir la température de la cellule de travail égale à la température de la cellule de référence

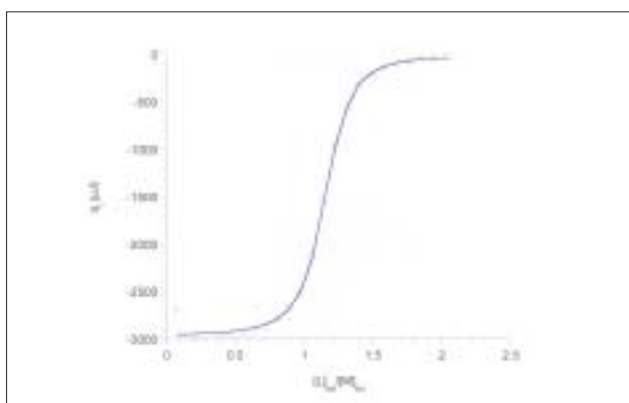


Figure 2b. Chaleur dégagée par l'interaction de la 2°CMP et de la RNase en fonction du nombre d'équivalents d'inhibiteurs ajoutés (mêmes conditions que la Figure 2a). La courbe bleue représente le meilleur ajustement d'un modèle d'interaction 1:1 aux données expérimentales

Différentes contraintes doivent être respectées lors du choix des conditions expérimentales afin d'assurer l'exactitude des résultats : les concentrations en récepteur et en ligand

doivent être adaptées afin que (i) en début de titrage l'excès de récepteur soit suffisant pour que tout le ligand injecté soit complexé, (ii) en fin de titrage le récepteur soit saturé par le ligand, (iii) la quantité de complexe formé soit suffisante pour que le signal soit détectable par l'appareil, (iv) le nombre de points expérimentaux soit suffisant pour permettre un ajustement du modèle aux données expérimentales. Tenant compte du fait que le récepteur est généralement une macromolécule biologique dont la quantité disponible et /ou la solubilité peuvent être limitées, seule une certaine gamme de valeurs de constantes d'affinité peut être déterminée par ITC. Le produit de la constante d'affinité et de la concentration initiale en molécule réceptrice ( $c = K_a * [M]_0$ ) dans le cellule doit être compris entre 10 et 1000 pour permettre une détermination correcte des paramètres (voir Figure 3). Les constantes d'affinité accessibles sont dès lors comprises entre  $10^4$  et  $10^8 \text{ M}^{-1}$  en mode d'utilisation classique de l'ITC. Des valeurs plus grandes peuvent cependant être atteintes grâce à des expériences de compétition<sup>[4]</sup> (jusqu'à approximativement  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ ) et il est possible, à condition que les concentrations puissent être déterminées avec une très grande précision, d'obtenir des valeurs de constantes de l'ordre de  $10^2 \text{ M}^{-1}$ .<sup>[5]</sup> La détermination de l'enthalpie d'interaction reste toutefois possible dans tous les cas en injectant une faible quantité de ligand dans un large excès de récepteur. Dans ce cas, la chaleur dégagée lors de chaque injection est, après correction des chaleurs de dilution, égale au produit de l'enthalpie d'interaction et du nombre de moles de ligand injectées (si l'on considère que celui-ci est entièrement complexé).<sup>[6]</sup> L'erreur expérimentale sur les paramètres obtenus par calorimétrie est généralement majoritairement due à l'erreur liée à la détermination des concentrations initiales en les différents partenaires. Il est cependant important de faire remarquer que ceci est vrai pour toute technique expérimentale permettant la détermination de la constante d'affinité, ce qui explique la faible précision généralement obtenue sur ce paramètre.

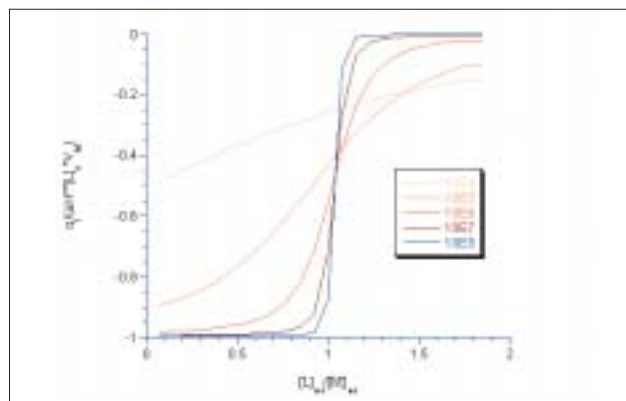


Figure 3. Simulation de courbes de titrage pour une solution  $10^{-4} \text{ M}$  dans la cellule de travail en fonction de la valeur de la constante d'affinité. La valeur portée en abscisse est la chaleur dégagée normée, c-à-d la chaleur dégagée divisée par la chaleur qui serait dégagée si tout le ligand injecté interagissait. La situation optimale pour l'exploitation des résultats expérimentaux est rencontrée lorsque la constante d'affinité vaut  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , c-à-d lorsque  $c (= K_a * [M]_0)$  vaut 100

La calorimétrie à titrage isotherme permet d'étudier directement la dépendance de  $\Delta H^\circ$  en fonction de la température et ainsi la variation de capacité calorifique  $\Delta C_p$  (cf Equation 5).

Ce paramètre semble particulièrement intéressant pour relier les données thermodynamiques à d'éventuelles données structurales du complexe d'interaction, le signe et la grandeur de ce paramètre semblant pouvoir être corrélé aux variations de surfaces polaires et apolaires accessibles au solvant lors de la formation du complexe.<sup>[7]</sup>

Etant la seule technique expérimentale permettant la mesure directe des paramètres thermodynamiques de l'interaction, l'ITC est un outil indispensable pour la caractérisation de systèmes en équilibre.

## Utilisation de l'ITC

Le développement de microcalorimètres à titrage isotherme de sensibilité suffisante pour pouvoir travailler avec des solutions faiblement concentrées a permis d'étendre leur utilisation aux systèmes biologiques et d'en faire un outil communément utilisé dans des domaines extrêmement variés et tout particulièrement dans celui de la conception rationnelle de nouvelles molécules thérapeutiques. Tout système dont les concentrations peuvent être adaptées aux exigences de la technique (voir paragraphe précédent) peut être étudié par ITC. Cela englobe aussi bien les interactions drogue-ADN, oligonucléotide-ADN, que les interactions protéine-protéine, oligonucléotide-protéine, antigène-anticorps, enzyme-substrat, enzyme-cofacteur, hormone-récepteur, ... .

L'étude des interactions entre des protéines et divers ligands (aussi bien des petites molécules que d'autres protéines ou macromolécules) constitue une part importante des études calorimétriques rapportées dans la littérature. Par exemple les profils thermodynamiques caractérisant l'interaction de différents inhibiteurs avec leur enzyme cible sont fréquemment corrélés à des données structurales (obtenues expérimentalement par modélisation) dans le but d'essayer de rationaliser l'effet des différents groupements fonctionnels sur la stabilité du complexe et d'en tirer des enseignements pour l'élaboration d'une nouvelle génération d'inhibiteurs plus efficaces. De même, l'utilisation de la mutagenèse dirigée permet d'obtenir une meilleure compréhension des contributions propres de différents acides aminés sur la stabilisation d'un complexe.<sup>[2, 8]</sup>

Des études systématiques de l'interaction de différentes drogues avec des poly- et oligonucléotides sont également entreprises par ITC et ce dans l'espoir de pouvoir corrélérer le profil thermodynamique avec le mode d'interaction de la drogue (intercalation – adsorption – interaction électrostatique).<sup>[9,10]</sup> L'ITC est également avantageusement utilisée en combinaison avec des études de dénaturation thermique (sui- vie par exemple par spectroscopie UV ou par Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC)) pour caractériser la stabilité de doubles-brins d'oligonucléotides (d'ADN ou d'ADN modifiés) car elle permet la mesure des paramètres thermodynamiques de formation du duplexe à toute température.<sup>[11]</sup>

L'ITC est également utilisée pour réaliser des études de cinétiques enzymatiques. Il est en effet possible de suivre

l'hydrolyse d'un substrat par une enzyme en mesurant la chaleur libérée par cette réaction. Ceci permet d'obtenir non seulement les constantes cinétiques habituellement déterminées dans ce type d'études mais également l'enthalpie d'hydrolyse du substrat.<sup>[12]</sup>

## Constantes d'affinité observées et équilibres thermodynamiquement liés

Théoriquement, une constante d'équilibre thermodynamique caractérisant un système dans un solvant donné ne dépend que de la pression et de la température. Cependant, il est fréquent de voir rapporté dans la littérature des constantes d'affinité qui présentent une dépendance en fonction des concentrations, du pH ou de la force ionique du milieu. Ceci résulte du fait que les modèles utilisés pour représenter l'interaction et analyser les données expérimentales ne considèrent pas toutes les espèces présentes en solution. Dans le cas du modèle 1:1 précité on ne considère que les partenaires isolés et le complexe. Or il est possible que les partenaires puissent former des dimères ou agrégats, interagir avec différents ions en solution ou se présenter sous différents états de protonation. Les paramètres thermodynamiques déterminés expérimentalement peuvent donc contenir des contributions dues à d'autres équilibres thermodynamiquement liés à l'équilibre d'association.

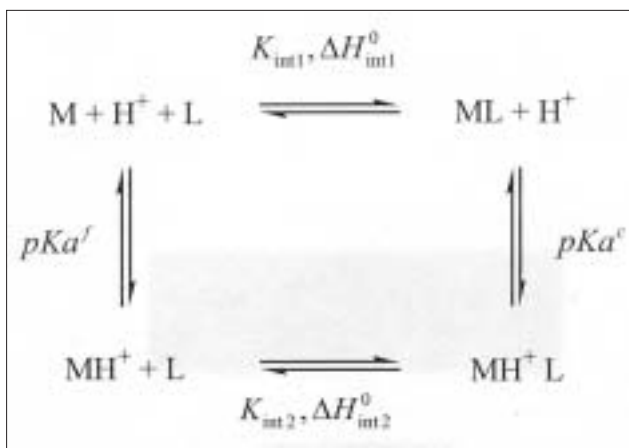
Lorsque le récepteur ou le ligand peut former des dimères ou agrégats, on observera une dépendance de la constante d'association en fonction de la concentration. Il suffit, lorsque les constantes de dimérisation ou d'agrégation sont connues, de corriger les concentrations pour s'affranchir de cette dépendance.

Le cas de la dépendance en fonction de la concentration en sel dans la solution est caractéristique d'un échange d'ions avec le cœur de la solution lors de l'interaction. Cet effet est principalement rencontré pour des interactions impliquant l'ADN : étant chargé négativement, il séquestre dans son environnement des cations, condensés autour de son squelette phosphaté. L'interaction avec des drogues généralement chargées positivement va avoir pour effet d'éjecter certains de ces cations hors de l'atmosphère ionique de l'ADN et ainsi mener à une redistribution des contre-ions en solution autour du complexe afin de minimiser l'énergie libre du système. Il est possible, en faisant varier la concentration en sel, de partager l'énergie libre de l'interaction en un terme électrostatique et un terme non-électrostatique.<sup>[13]</sup>

La dépendance de  $K_a$  en fonction du pH, quant à elle, est signature d'un échange de protons avec la solution lors de la formation du complexe. Les protéines possèdent de nombreux acides aminés dont la chaîne latérale présente un groupement ionisable. Si un tel type d'acide aminé se situe dans le site d'interaction du ligand, son état de protonation peut fortement influencer les interactions non covalentes entre les partenaires. L'interaction préférentielle du ligand avec un état de protonation de l'enzyme va déplacer l'équilibre de protonation et conduire à l'éjection ou l'absorption de protons. Il est bien

entendu que le ligand peut aussi exister sous différents états de protonation.

Prenons l'exemple d'une protéine possédant dans le site d'interaction un résidu ionisable, cas fréquemment rencontré pour des interactions avec de petits ligands. Différents équilibres doivent être envisagés :



M et MH<sup>+</sup> représentent respectivement la protéine libre dont le résidu est déprotoné et protoné (que nous nommerons dorénavant protéine déprotonée ou protonée), ML et MH<sup>+</sup>L le complexe formé entre le ligand et la protéine déprotonée ou protonée, K<sub>int1</sub> et K<sub>int2</sub> les constantes d'affinité intrinsèques de l'interaction entre le ligand et la protéine déprotonée et protonée, pK<sub>a</sub><sup>f</sup> et pK<sub>a</sub><sup>c</sup> la constante d'acidité du résidu ionisable dans la protéine libre et dans le complexe.

Les techniques expérimentales utilisées pour mesurer les constantes d'association ne permettent généralement pas de distinguer les différents états de protonation de l'enzyme. Les constantes d'affinité sont donc exprimées en termes de concentrations totales en enzyme libre et complexée. Dans l'exemple précité K<sub>obs</sub> est donc :

$$K_{obs} = \frac{([ML] + [MH^+L])}{([M] + [MH^+]) \cdot [L]}$$

Équation 9

Cette constante peut être reliée aux constantes intrinsèques de la manière suivante :

$$K_{obs} = K_{int1} + \frac{(K_{int2} - K_{int1})}{(1 + 10^{pH - pKa^f})}$$

Équation 10

Ceci met clairement en évidence la dépendance de la constante d'affinité en fonction du pH.

La connaissance de la dépendance de la constante observée en fonction du pH devrait permettre de déterminer K<sub>int1</sub> et K<sub>int2</sub>. Malheureusement, les erreurs associées aux constantes expérimentales sont importantes ce qui peut rendre l'ajustement paramétrique difficile. Cependant, il est fréquent qu'il existe plu-

sieurs ordres de grandeur entre les constantes K<sub>int1</sub> et K<sub>int2</sub> et qu'une des deux formes du complexe puisse être négligée (que nous choisirons arbitrairement comme celle avec la forme protonée de l'enzyme). L'expression se simplifie alors en :

$$K_{obs} = \frac{K_{int1}}{(1 + 10^{pKa^f - pH})}$$

Équation 11

Lorsqu'un équilibre de protonation est lié à l'interaction, le ΔH° global mesuré par ITC (ΔH°<sub>obs</sub>) sera non seulement différent à chaque pH mais dépendra également de la nature du tampon. Grâce à cette dépendance, il est possible d'obtenir les paramètres thermodynamiques intrinsèques des différents équilibres.

La dépendance de l'enthalpie calorimétrique observée en fonction de la nature du tampon résulte du fait que l'enthalpie globale observée comprend un terme relatif à l'échange de protons avec le tampon et que chaque tampon possède une enthalpie d'ionisation propre (ΔH°<sub>ion-tamp</sub>) : [14, 15]

$$\Delta H_{obs}^0 = \Delta H_0^0 + n_{H^+} \cdot \Delta H_{ion-tamp}^0$$

Équation 12

ΔH°<sub>0</sub> représente l'enthalpie qui serait mesurée dans un tampon d'enthalpie d'ionisation nulle et n<sub>H<sup>+</sup></sub> le nombre de protons échangés par mole de complexe formé. Il est possible de déterminer n<sub>H<sup>+</sup></sub> et ΔH°<sub>0</sub> à chaque pH en travaillant dans différents tampons. A titre d'exemple, la Figure 4 représente l'enthalpie observée pour l'interaction entre la chymotrypsine et la proflavine à pH7 dans différents tampons. A ce pH, 0.56 moles de protons sont larguées par mole de complexe formée.

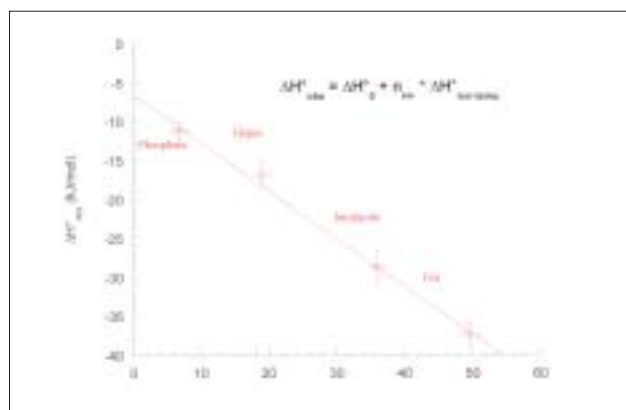


Figure 4: Enthalpies d'interaction mesurées pour l'interaction entre l'α-chymotrypsine et la proflavine à pH7 en fonction de l'enthalpie d'ionisation du tampon.

ΔH°<sub>0</sub> contient un terme relatif au changement d'état de protonation du résidu de l'enzyme. Dans le cas où l'état de protonation d'un seul acide aminé est influencé par l'interaction, l'expression complète est:

$$\Delta H_0^{\circ} = \frac{K_{\text{int}1}}{K_{\text{int}1} + K_{\text{int}2} \cdot 10^{pK_a' - \text{pH}}} \cdot \Delta H_{\text{int}1}^{\circ} + \frac{K_{\text{int}2}}{K_{\text{int}1} \cdot 10^{\text{pH} - pK_a'} + K_{\text{int}2}} \cdot \Delta H_{\text{int}2}^{\circ} - n_{\text{H}^+} \cdot \Delta H_{\text{ion-aa}}^{\circ}$$

Équation 13

Cette expression se simplifie, lorsque l'affinité du ligand est beaucoup plus grande pour une des deux formes de l'enzyme ( $K_{\text{int}1} \gg K_{\text{int}2}$ ) :

$$\Delta H_0^{\circ} = \Delta H_{\text{int}1}^{\circ} - n_{\text{H}^+} \cdot \Delta H_{\text{ion-aa}}^{\circ}$$

Équation 14

En portant, pour chaque pH,  $\Delta H_0^{\circ}$  en fonction du nombre de protons échangés, il est possible de déterminer l'enthalpie d'interaction intrinsèque ainsi que l'enthalpie d'ionisation de l'acide aminé, qui varie avec la nature et l'environnement de celui-ci. Dans le cas de la chymotrypsine par exemple, l'ajustement linéaire de  $\Delta H_0^{\circ}$  en fonction de  $n_{\text{H}^+}$  donne pour  $\Delta H_{\text{ion-aa}}^{\circ}$  une valeur de  $33 \pm 2$  kJ/mol, en bon accord avec la valeur de 29.5 kJ/mol rapportée dans la littérature pour l'enthalpie d'ionisation d'une histidine seule [16] (et en tenant compte du fait que le résidu est dans un environnement protéique). Seule l'étude complète de ce système et la détermination des contributions intrinsèque des différents équilibres aux paramètres globaux observés permet de déterminer la contribution dominante de l'interaction, en l'occurrence le terme enthalpique dans le cas qui nous préoccupe :

$\Delta H_{\text{int}1}^{\circ} = -27 \pm 1$  kJ/mol,  $\Delta G_{\text{int}1}^{\circ} = -25 \pm 2$  kJ/mol et donc  $T \cdot \Delta S_{\text{int}1}^{\circ} = -2 \pm 0.3$  kJ/mol.

## Conclusion

Il est indispensable, pour améliorer notre compréhension des facteurs à l'origine de la sélectivité des interactions protéine/ligand et des interactions entre (bio)molécules en général, d'obtenir des informations quantitatives sur les énergies liées à la formation du complexe. En ce sens, l'unique connaissance de la constante d'affinité ( $K_a$ ), et donc de l'énergie libre ( $\Delta G^{\circ}$ ), est peu instructive. La détermination des contributions enthalpiques ( $\Delta H^{\circ}$ ) et entropiques ( $\Delta S^{\circ}$ ) de l'énergie libre permet de mieux cerner les facteurs énergétiques à la base de la stabilisation du complexe. La Calorimétrie à Titrage Isotherme (ITC) est la seule technique expérimentale permettant la détermination simultanée des ces trois paramètres ( $\Delta G^{\circ}$ ,  $\Delta H^{\circ}$ ,  $\Delta S^{\circ}$ ), ce qui en fait un outil particulièrement bien adapté pour l'étude des interactions entre (bio)molécules.

Il est important de garder à l'esprit lors de l'étude de tels systèmes, que le récepteur et/ou le ligand peuvent être impliqués dans des équilibres thermodynamiquement liés à l'interaction, notamment des équilibres de protonation. Ici aussi, l'utilisation de l'ITC peut contribuer à la détermination des paramètres intrinsèques de l'interaction. La connaissance de ces derniers est extrêmement précieuse dans l'établissement de corrélations avec des données structurales et la mise en évidence des interactions non-covalentes essentielles à la stabilisation du complexe.

## Références

1. E. Locci, K. Bartik, J. Reisse, *Chimie Nouvelle*, 2002, 78, 58.
2. F. Dullweber, M. T. Stubbs, D. Musil, J. Sturzebecher, G. Klebe, *J. Mol. Biol.*, 2001, 313, 593.
3. J. B. Chaires, *Biophys. Chem.*, 1997, 64, 15.
4. G. Bains, E. Freire, *Anal. Biochem.*, 1991, 192, 203.
5. W. B. Turnbull, A. H. Daranas, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 14859.
6. J. Ren, T. C. Jenkins, J. B. Chaires, *Biochemistry*, 2000, 39, 8439.
7. R. S. Spolar, J. H. Ha, M. T. Record, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1989, 86, 8382.
8. H. Ohtaka, S. Muzammil, A. Schon, A. Velazquez-Campoy, S. Vega, E. Freire, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2004, 36, 1787.
9. I. Haq, P. Lincoln, D. C. Suh, B. Norden, B. Z. Chowdhry, J. B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 4788.
10. I. Haq, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, 403, 1.
11. J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry in *Biocalorimetry. Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, Wiley, Chichester, 1998.
12. M. J. Todd, J. Gomez, *Anal. Biochem.*, 2001, 296, 179.
13. M. T. Record, Jr., C. F. Anderson, T. M. Lohman, *Q. Rev. Biophys.*, 1978, 11, 103.
14. J. M. Sturtevant, L. Beres, *Biochemistry*, 1971, 10, 2120.
15. B. M. Baker, K. P. Murphy, *Biophys. J.*, 1996, 71, 2049.
16. R. N. Goldberg, N. Kishore, R. M. Lennen, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2002, 31, 231.

## Remerciements

Les auteurs remercient le Prof. Jacques Reisse pour les nombreuses discussions scientifiques et Juliana Vandercammen pour son aide précieuse. G.B. remercie le FRIA pour son support financier.