

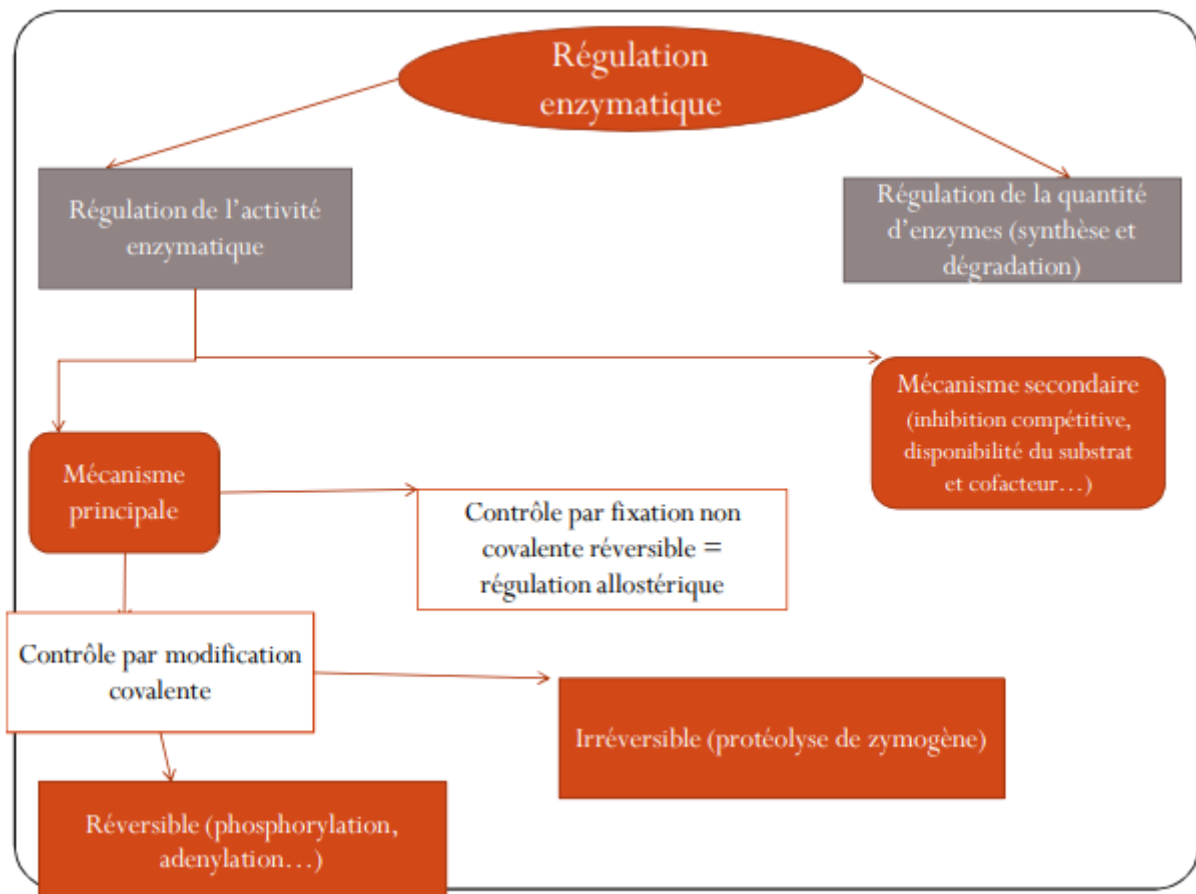
Les enzymes allostériques

Introduction

Pour éviter une carence ou une accumulation de biomolécules, certains mécanismes cellulaires reposent sur le contrôle de l'activité des enzymes impliquées dans les voies métaboliques.

Dans le cas de la cinétique michaélienne, l'activité enzymatique est régulée simplement par la concentration du substrat. Mais un tel contrôle est insuffisant dans un processus métabolique.

De ce fait, il existe d'autres moyens mis en œuvre *in vivo* pour effectuer la régulation de l'activité, notamment celle des enzymes « clés » des voies métaboliques. Il s'agit des enzymes à plusieurs sites de fixation dépendants.



1. Définition :

1.1. Allostérie :

Le terme allostérie, introduit par Monod et Jacob, vient de *allos* = autre et *stereos* = site ou espace. Allostérie signifie donc site différent.

1.2. Enzymes allostériques :

Les enzymes allostériques sont des enzymes oligomériques qui ont la propriété de changer leur structure spatiale. Cette propriété est appelée « transition allostérique » qui intervient suite à une interaction avec les ligands (substrat, activateur ou inhibiteur), qui se fixent chacun à son site spécifique. Cette liaison entraîne une modification de l'activité enzymatique.

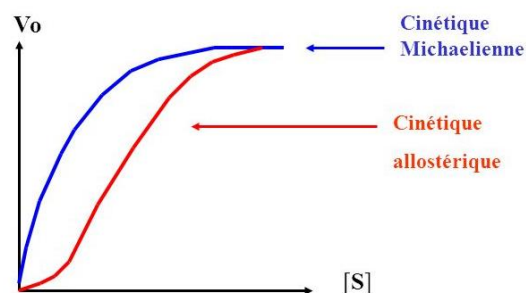
2. Classification :

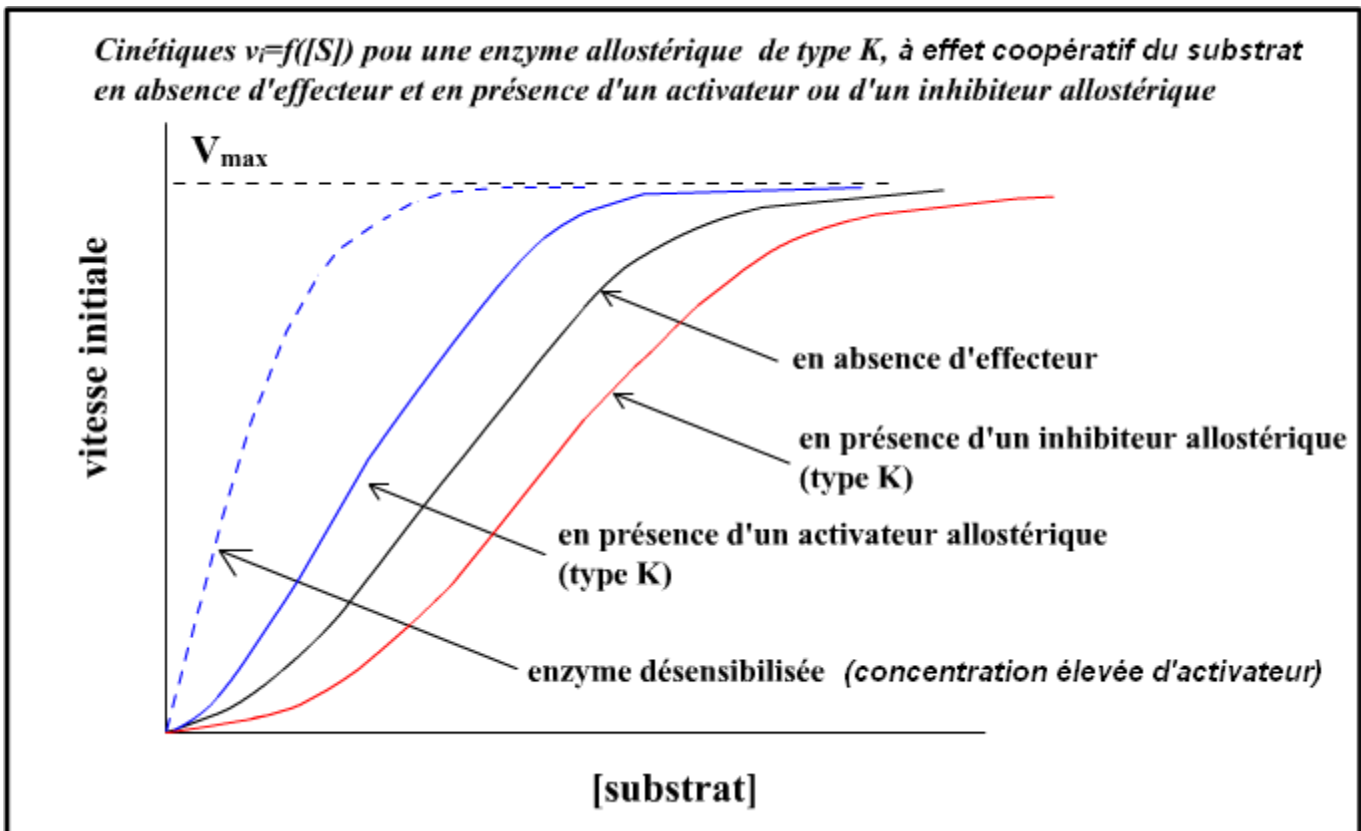
D'après Monod, Wyman et Changeux (1965), on distingue 3 groupes d'enzymes allostériques :

- **Enzymes homotropiques** : Le substrat dans ce groupe joue également le rôle de modulateur, il accélère l'activité enzymatique.
- **Enzymes hétérotropiques** : Ces enzymes sont stimulées ou inhibées par des substances de régulation différentes du substrat, il s'agit d'effecteurs.
- **Enzymes homo-hétérotropiques** : Dans ce groupe, les enzymes ont pour effecteurs le substrat et d'autres molécules.

3. Association coopérative :

- ✓ L'association coopérative est observée chez les enzymes oligomériques à plusieurs sites de fixation. En fait, la fixation d'une molécule de substrat à l'une des sites actifs augmente ou diminue l'affinité des autres sites pour accueillir une nouvelle molécule de substrat.
- ✓ La coopérativité positive correspond à une augmentation de l'affinité alors que la coopérativité négative concerne une diminution de l'affinité.
- ✓ La coopérativité exige que la molécule d'enzyme soit constituée de sous unités capables d'interagir entre elles.
- ✓ La fixation du substrat sur le site actif de l'une des sous unités provoque un changement de charges électriques, un changement structural ou de conformation qui se propagent aux sous unités proches et capable de modifier l'affinité de son site actif.
- ✓ L'interactivité des sous unités provoque un comportement cinétique qui ne suit plus le modèle michaelien.





La mesure de la vitesse initiale en fonction de la variation de la concentration du substrat permet d'obtenir une sigmoïde différente de l'hyperbole Michaelienne.

Ainsi :

- ✓ La présence d'un activateur allostérique diminue la valeur de K , donc l'affinité de l'enzyme pour son substrat augmente. L'activateur allostérique déplace l'équilibre vers la forme **R** (forme relâchée), c'est l'effet hétérotrope positif.
- ✓ Cependant lorsque la concentration de l'activateur est en excès, la courbe reprend la forme d'une hyperbole. L'effet coopératif est éliminé et la cinétique devient Michaelienne.
- ✓ La présence d'un inhibiteur allostérique augmente la valeur de K , l'affinité de l'enzyme pour son substrat diminue. L'inhibiteur allostérique déplace l'équilibre vers la forme **T** (forme tendue), c'est l'effet hétérotrope négatif. La présence d'un inhibiteur accentue la forme de la sigmoïde.

4. Transition allostérique :

L'enzyme régulatrice possède au moins deux sites fonctionnels :

- Le site actif adapté au substrat.
- Le site allostérique dont la conformation spatiale est adaptée à l'effecteur allostérique.

Lorsque l'effecteur allostérique se combine au site allostérique, il entraîne au niveau de la protéine enzymatique toute entière une très légère modification de structure qui est réversible : c'est la transition allostérique, qui a pour conséquence directe de modifier la cinétique de la réaction.

5. Les conformations tridimensionnelles des enzymes allostériques :

Les enzymes allostériques ont deux structures quaternaires possibles :

- **La conformation inactive est appelée T (Tendue)** car les liaisons interprotomériques y sont fortes. L'état T a une activité catalytique plus faible et une faible affinité pour le substrat. Il fixe le(s) inhibiteur(s). Lorsqu'il y a peu de substrat, l'enzyme reste sous forme T.
- **La conformation active est appelée R (Relâchée)** car les liaisons interprotomériques y sont faibles. L'état R a une activité plus forte et une forte affinité pour le substrat. Il fixe le(s) substrat(s) et le(s) activateur(s). Lorsqu'il y a beaucoup de substrat, l'enzyme passe à la forme R.

Le substrat se fixe rapidement sur la forme R et beaucoup plus lentement sur la forme T. Du fait des interactions entre les différentes sous-unités, l'enzyme entière peut permuter entre les conformations T et R. Le résultat de ce comportement allostérique est une courbe sigmoïde de la vitesse en fonction de la concentration en substrat.

6. Les systèmes allostériques :

Trois types d'enzymes allostériques peuvent être distingués selon les effets exercés sur elles par les effecteurs homotropes et hétérotropes qui les concernent. Ainsi, on distingue :

- Les enzymes du **système K** où l'effecteur ne modifie que l'affinité apparente (relative à K_m) de l'enzyme pour le substrat. Les formes R et T ont une même vitesse maximale. Le substrat et l'effecteur présentent, tous, des affinités différentes pour les formes R et T de l'enzyme. Il en résulte une fixation toujours sigmoïde. C'est le système le plus fréquent.
- Les enzymes du **système V** où l'effecteur ne modifie que la vitesse maximale (V_{max}) de la réaction. Dans ce système, le substrat présente la même affinité pour les deux formes d'enzyme R et T. Il en résulte une fixation hyperbolique du substrat. Les effecteurs A et I ont des affinités différentes pour chaque forme R et T qui résulte à une fixation sigmoïde. Les formes R et T sont différentes dans leurs activités catalytiques (V_{maxR} différente de V_{maxT})
- Les enzymes du **système mixte** où l'effecteur modifie les deux paramètres K_m et V_{max} .

7. L'équation de Hill :

A.V. Hill a caractérisé le comportement coopératif des enzymes oligomériques en 1910.

Soit une enzyme oligomérique possédant n sites actifs, le schéma réactionnel est le suivant :



La loi de conservation permet d'écrire que : $[E_t] = [E] + [ES_n]$

La vitesse de la réaction est : $v = k_2 [ES_n]$

A l'état stationnaire on a : $k_1 [E] [S]^n = k_{-1}[ES_n] + k_2 [ES_n]$

La constante de Michaelis-Menten est : $K_m = k_{-1} + k_2 / k_1$

Donc : $K_m = [E] [S]^n / [ES_n]$, soit $[E] = K_m [ES_n] / [S]^n$

En remplaçant $[E]$ par sa valeur dans l'équation de conservation :

$[E_t] = K_m [ES_n] / [S]^n + [ES_n] = [ES_n] (K_m/[S]^n + 1)$ d'où $[ES_n] = [E_t] / (K_m/[S]^n + 1)$

On a $v = k_2 [ES_n]$ donc $v = k_2 [E_t] / (K_m/[S]^n + 1) = V_{max} / (K_m/[S]^n + 1)$

La formule de la vitesse devient :

$$v / V_{max} = [S]^n / K_m + [S]^n \text{ c'est l'équation de Hill}$$

Soit aussi : $v (K_m + [S]^n) = V_{max} [S]^n$

Ou encore : $v K_m = [S]^n (V_{max} - v)$ et par réarrangement : $(v / V_{max} - v) = [S]^n / K_m$

La forme logarithmique est : $\log (v / V_{max} - v) = n \log [S] - \log K_m$

On sait qu'à la demi saturation : $v = V_{max} / 2$ donc $\log (v / V_{max} - v) = 0$

$\log K_m = n \log [S]_{0,5}$ d'où $\log (v / V_{max} - v) = n \log [S] - n \log [S]_{0,5}$

La représentation graphique de Hill :

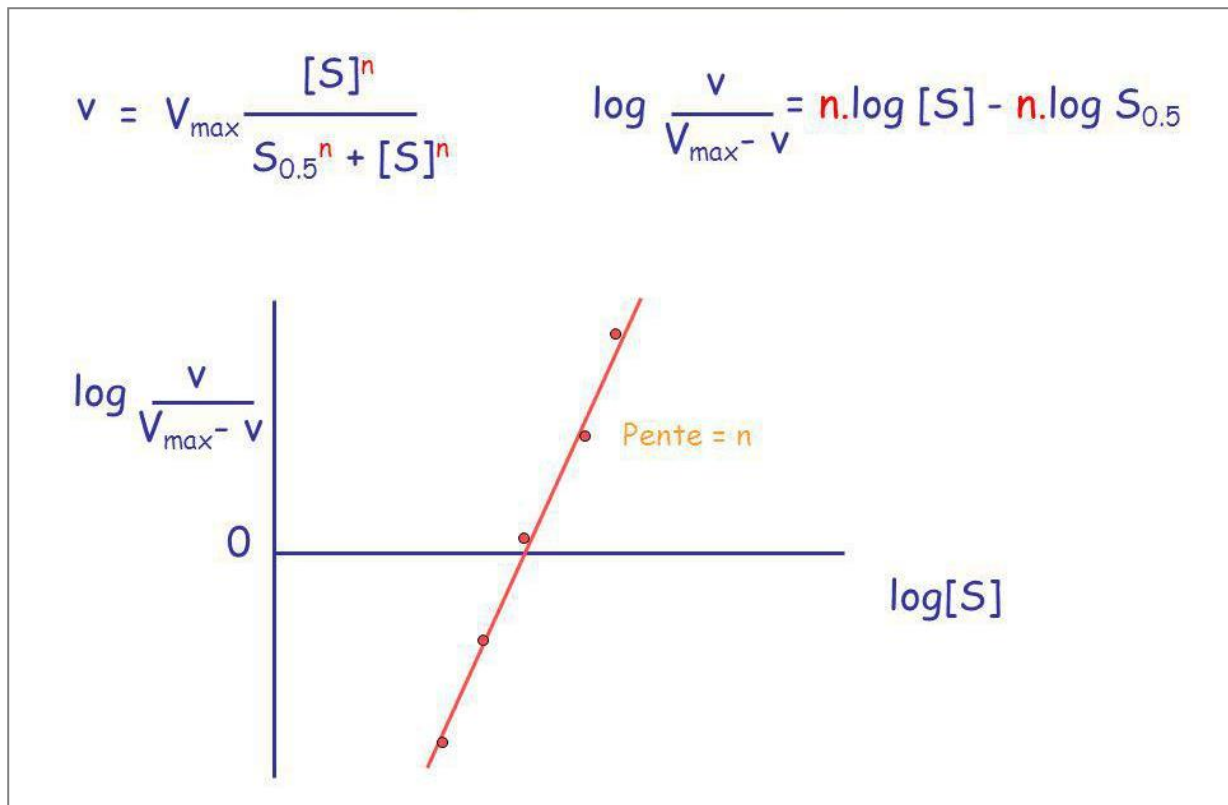
Le tracé de $\log (v / V_{max} - v) = f(\log [S])$ est une droite de pente **n** et d'ordonnée à l'origine **(- log K_m)** et d'abscisse à l'origine **(log K_m / n)**.

La représentation graphique de Hill est utilisée pour déterminer le degré de coopérativité. **n** est appelé nombre de Hill ou encore coefficient de Hill (n_H). Il tient compte du degré de coopérativité et plus sa valeur est élevée plus la coopérativité est grande.

L'absence de coopérativité correspond à $n = 1$, c'est -à-dire une cinétique michaelienne. Les enzymes allostériques donnent une valeur différente de 1 :

$n > 1$ coopérativité positive

$n < 1$ coopérativité négative



8. Modèles théoriques de l'allostérie :

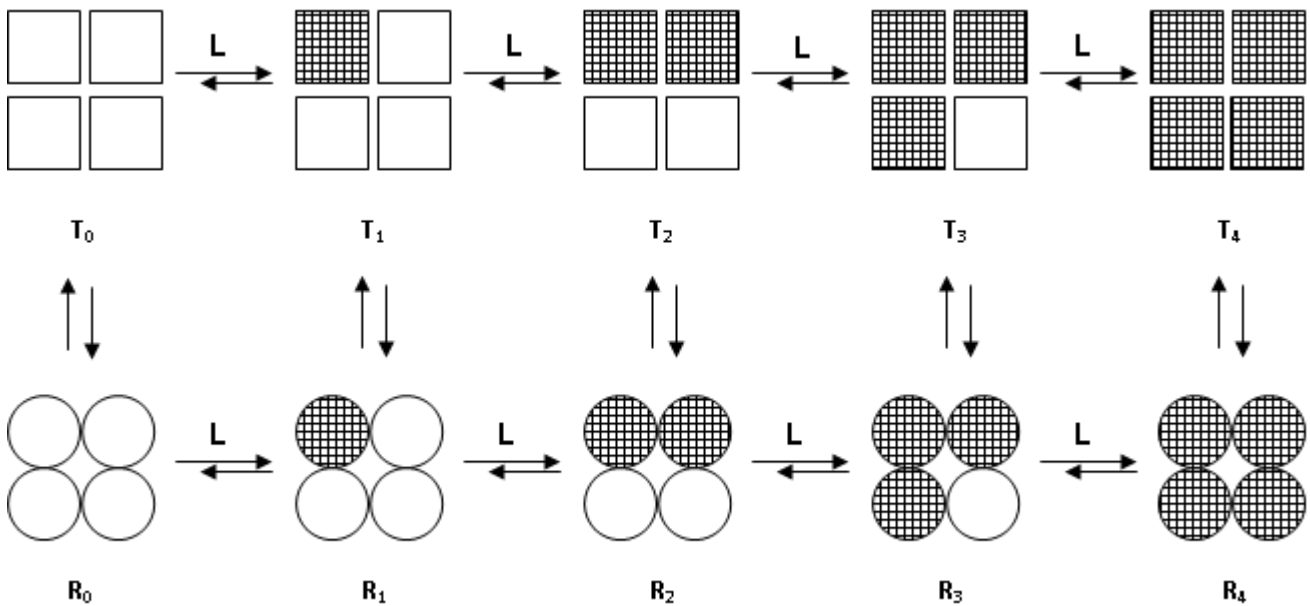
Plusieurs théories ont été proposées afin d'expliquer le fonctionnement des enzymes allostériques en particulier le changement conformationnel. Pour cela, les chercheurs ont adopté deux modèles :

1. Modèle concerté (modèle de symétrie) proposé par Monod, Wyman et Changeux.
2. Modèle séquentiel proposé par Koshland, Nemethy et Filmer.

8.1. Modèle de Monod (concerté, symétrique ou MWC) :

Proposé en 1965 par Monod, Wyman et Changeux, ce modèle nécessite les hypothèses suivantes :

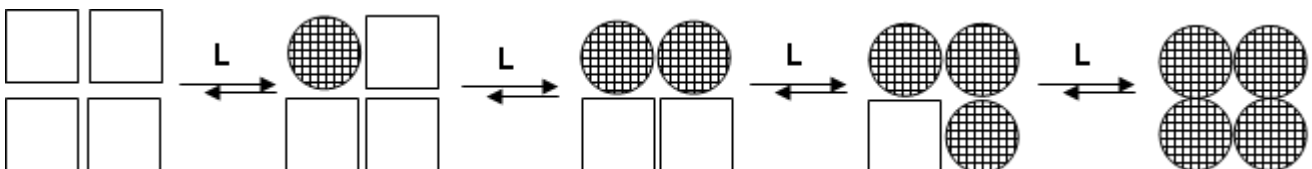
- L'enzyme présente 2 états conformationnels **R** (relâché) et **T** (tendu) différentes par leurs structure tertiaire et quaternaire.
- Les 2 formes, étant différentes par leur affinité au substrat et leur vitesse maximale, préexistent lors de la fixation de tout ligand.
- Lorsque se produit une transition de la forme **R** vers la forme **T**, les sous unités restent symétriques. Ceci veut dire que l'enzyme adopte une seule forme, il n'existe pas une forme hybride.



8. 2. Modèle de Koshland (séquentiel ou KNF) :

Proposé en 1966 par Koshland, Nemethy et Fischer, ce modèle dérive de l'hypothèse de l'adaptation induite d'une enzyme à son substrat :

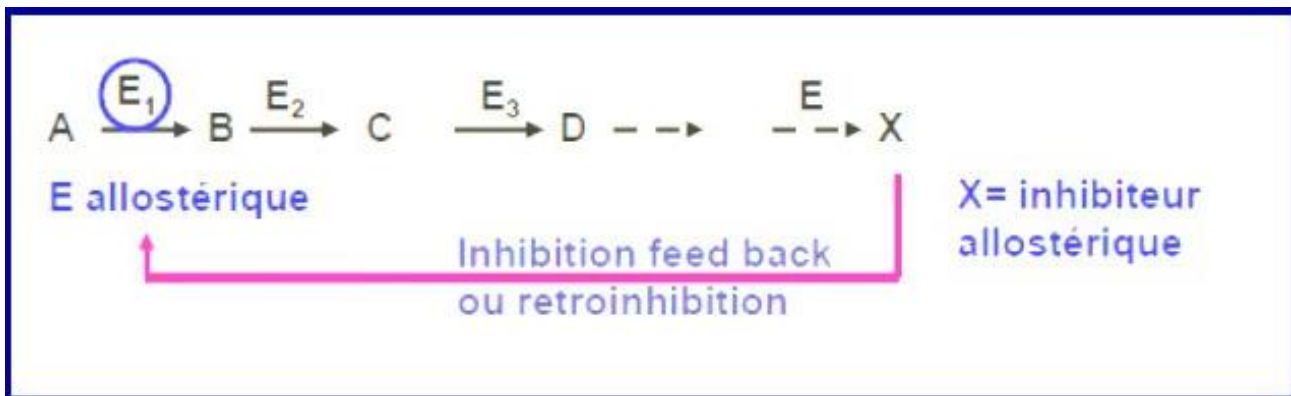
- En absence de ligand, la protéine enzymatique n'existe que sous une seule forme (R ou T).
- Sous l'effet de la fixation du substrat, le changement conformationnel est séquentiel avec apparition d'une forme hybride.



9. La régulation allostérique :

Dans les voies métaboliques comme la glycolyse, certaines enzymes sont de type allostérique :

- ✓ Elles sont faiblement actives quand il y a peu de substrat.
- ✓ Si la quantité de substrat augmente, leur activité augmente encore plus vite et empêche l'accumulation du substrat.
- ✓ L'effecteur allostérique est généralement le dernier ou l'un des derniers métabolites de la chaîne de réactions dans laquelle agit l'enzyme. Lorsque l'effecteur s'accumule, c'est que la cellule n'a plus besoin de ce métabolite qui va inhiber en retour une enzyme allostérique gouvernant l'un des premiers stades de la chaîne métabolique (rétroinhibition).



10. Désensibilisation des enzymes allostériques :

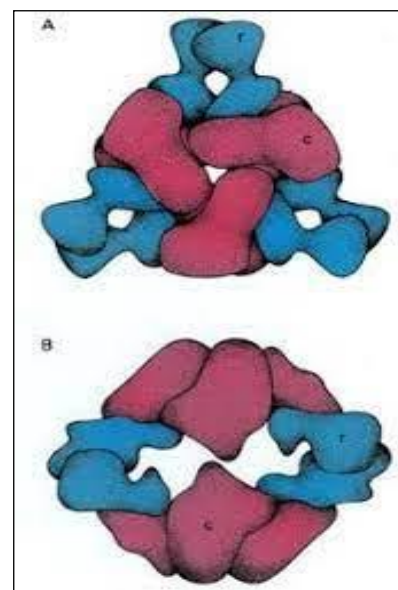
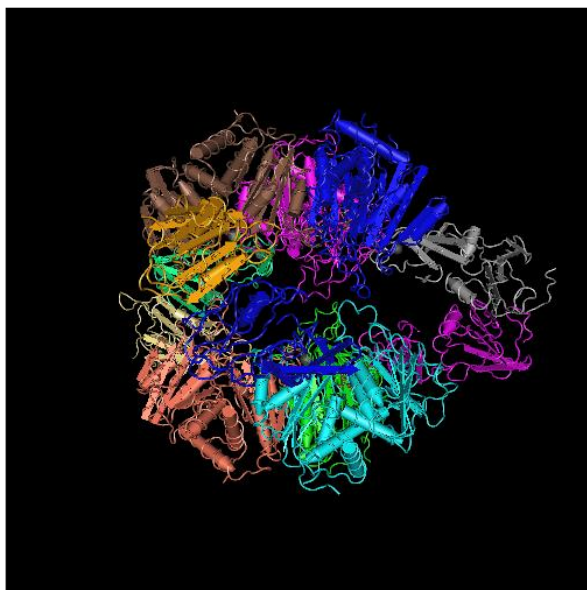
Le traitement d'une enzyme allostérique par des agents physiques (chauffage) ou chimiques (urée, dérivés mercuriques) s'accompagne d'une perte de la sensibilité de l'enzyme aux effecteurs allostériques.

Cependant, l'activité de l'enzyme persiste. Seul le site allostérique est détruit. Il en résulte perte du phénomène de coopérativité et la cinétique devient hyperbolique.

Exemple d'enzyme allostérique : l'aspartate transcarbamylase (ATCase)

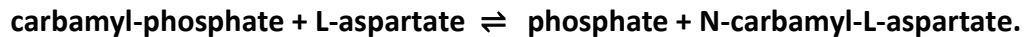
Structure :

Chez *Escherichia coli*, l'aspartate carbamyltransférase est constituée de 12 sous-unités ayant une masse totale de 300 kDa : six sous-unités catalytiques C de 34 kDa et six sous-unités régulatrices R de 17 kDa. Ce complexe C₆R₆ est organisé en deux trimères catalytiques C₃ et trois dimères régulateurs R₂. L'agencement de ces sous-unités permet à cette enzyme de présenter une très forte régulation allostérique par rapport à ses substrats.



Réaction :

L'aspartate transcarbamylase est une transférase qui catalyse la réaction :



Ainsi, cette enzyme possède deux substrats catalytiques (l'aspartate et le carbamoyl-Phosphate) et deux effecteurs (l'ATP comme activateur et le CTP comme inhibiteur).

Régulation allostérique :

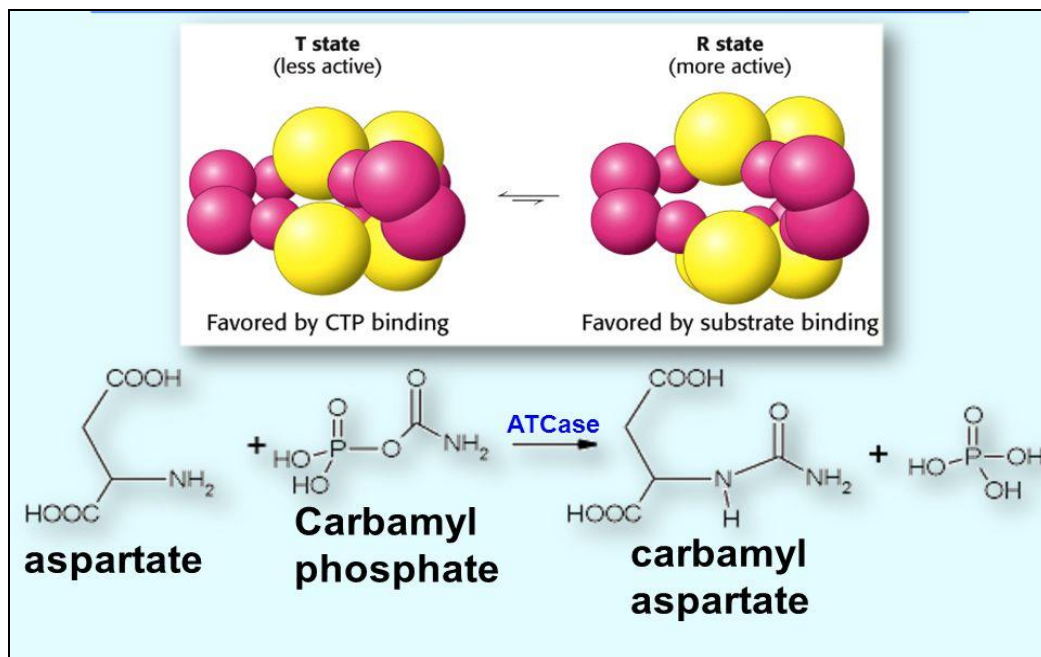
Cette enzyme intervient à la première étape de la biosynthèse des pyrimidines et ne suit pas la cinétique de Michaelis-Menten. C'est un exemple de régulation allostérique à l'étape initiale d'une voie métabolique.

Elle bascule entre un état tendu T à faible affinité pour les substrats et faible activité enzymatique et l'état relâché R à affinité et activité élevées :

La liaison des substrats aux sous-unités catalytiques déplace l'équilibre vers l'état R,

Tandis que la liaison du CTP aux sous-unités régulatrices déplace l'équilibre vers l'état T.

La liaison d'ATP aux sous-unités régulatrices déplace en revanche l'équilibre vers l'état R.

**Voie métabolique :**

La synthèse des bases pyrimidiques est une voie métabolique du cytoplasme.

La voie de synthèse des pyrimidines comprend un premier complexe multienzymatique qui catalyse la synthèse du dihydroorotate (complexe A).

Ce produit est oxydé par une déshydrogénase de la face externe de la membrane interne de la mitochondrie qui transfère les Hydrogènes vers la chaîne respiratoire mitochondriale.

Un multienzyme (complexe U) condense l'orotate avec le 5-PRPP pour en faire un nucléotide (orotidine monophosphate = OMP) qui est ensuite décarboxylé en UMP.

L'activation de l'UMP conduit à l'UTP, sur lequel une fonction amine est ajoutée, provenant de la glutamine, pour aboutir au CTP.

