

## VI Enzymes Allostériques (Enzymes régulatrices)

### Introduction

Toutes les enzymes possèdent diverses particularités qui pourraient correspondre à des éléments de régulation de leur activité dans la cellule vivante, elles ont toutes :

- Un pH optimum caractéristique qui rend possible l'altération de leur vitesse de catalyse par des changements de pH intracellulaires.

-La vitesse est également dépendante de la concentration du substrat.

-De nombreuses enzymes exigent la présence des métaux pour leur activation ou encore de coenzymes.

En outre à ces propriétés que l'on trouve chez toutes les enzymes, certaines en possédant d'autres qui leur permettent spécifiquement de jouer un rôle de régulation du métabolisme. De telles enzymes hautement spécialisées, sont appelées : **enzymes régulatrices**, il existe deux(02) types principaux d'enzymes régulatrices :

**1**-Enzymes allostériques dont l'activité est modulée grâce à l'attachement non covalent d'un métabolite spécifique sur un autre site protéique que le site catalytique.

**2**- Les enzymes modulées de façon covalente dont les formes active et inactive sont interconverties par l'action d'autres enzymes.

### 6.1. Généralités sur le fonctionnement et la régulation allostérique :

**1**-Les enzymes allostériques sont des enzymes de régulation des chaînes métaboliques.

**2**-Elles ont en générale un poids moléculaire élevé et sont plus complexes et difficiles à purifier que les autres enzymes.

**3**-Certaines enzymes n'ont pas une cinétique Michaelienne dont la courbe  $v_i = f(s)$  est une courbe sigmoïde qui indique que l'enzyme est allostérique. Les enzymes allostériques ne suivent pas la cinétique classique de Michaélis, la courbe  $v = f(S)$  n'est pas hyperbolique mais sigmoïde (**Figure1**). Ces enzymes jouent un rôle important dans la régulation métabolique.

**4**-Les enzymes allostériques ont une structure protéique quaternaire avec plusieurs sous unités dont chacune fixe un substrat.

**5**-La disposition des sous unités est faite de façon à avoir un axe symétrique dans la molécule.

**6**-La fixation du substrat augmente l'affinité de l'enzyme pour le substrat, d'où l'aspect sigmoïde de la courbe, c'est l'effet coopératif.

**7**-L'enzyme allostérique, en plus au site catalytique possède un site effecteur permettant la fixation d'effecteur autre que le substrat. : C'est l'effet hétérotrope

\* Effet négatif : inhibiteur allostérique.

\* Effecteur positif : activateur.

Lorsque l'effecteur allostérique est le substrat lui-même, on parle de phénomène homotrope.

**8**-Une enzyme allostérique existe sous deux(02) formes conformationnelles :

\* T tendue faible affinité pour le substrat.

\*R relâchée possède une forte affinité pour le substrat.

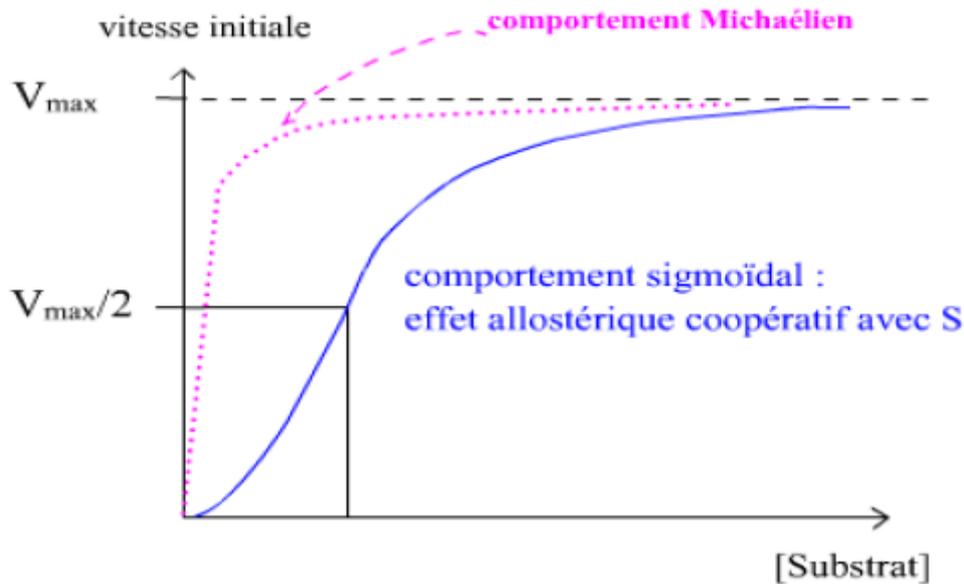
Deux(02) modèles ont été proposés pour montrer l'effet coopératif homotrope des enzymes allostériques.

\* Modèles symétrique ou concerté : Monod Wyman et Changeux(1965)

Toutes les sous unités adoptent la même conformation, T en absence du substrat, R en présence de ce dernier, les deux formes sont en équilibre qui sera déplacé vers R en présence du substrat.

\* Modèle Séquentiel : Koshland(1966) :

La transition TR se fait en bloc, la fixation d'un substrat à une sous unité induit sa transition, et facilitera la transition des autres sous unités voisines.



**Figure1. Courbe avec un comportement Michaelien pour l'un et allostérique pour l'autre.**

### **6.2. Définition de l'enzyme allostérique :**

Les enzymes allostériques sont des enzymes polymériques ayant des sous unités en nombre paire, le plus souvent quatre(04) et dont l'activité enzymatique varia en fonction de la conformation de leurs monomères.

### **6.3. Classification**

D'après Monod ; Wyman et Changeux (1965), on distingue 3 groupes d'enzymes de régulation

1. Enzyme homotropiques : Le substrat dans ce groupe joue également le rôle de modulateur, il accélère l'activité enzymatique
2. Enzyme hétérotropiques : Ces enzymes sont stimulés ou inhibés par des substances de régulation inhabituelles et différentes du substrat, il s'agit d'effecteurs
3. Enzyme homo-hétérotropique : Dans ce groupe, les enzymes ont pour effecteurs le substrat et d'autres molécules

### **6.4 Régulation de l'activité enzymatique par la transition allostérique :**

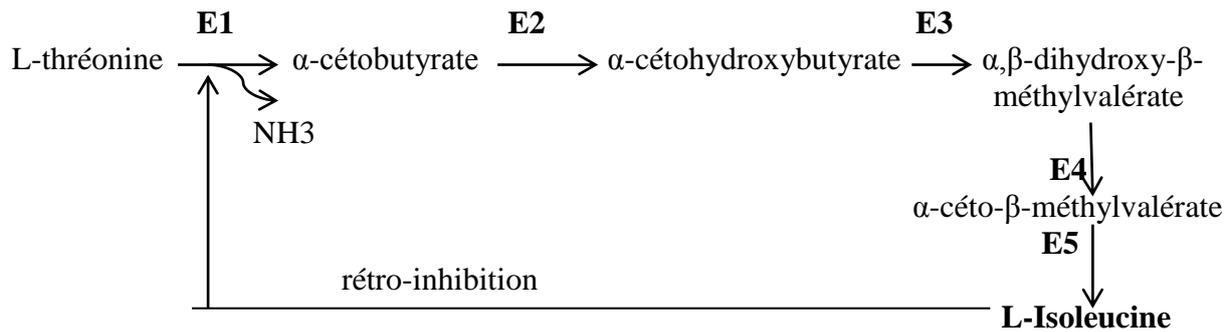
#### **6.4.1 Notion de rétro-inhibition :**

En1954 Novick et Szilard observent que le tryptophane est un inhibiteur des enzymes qui concoure à sa propre synthèse.

Le produit terminal ou final d'une chaîne enzymatique de la biosynthèse peut assurer la régulation de l'activité de toute la chaîne. C'est à ce mécanisme que l'on donne le nom de rétro-inhibition ( ou feed back control)

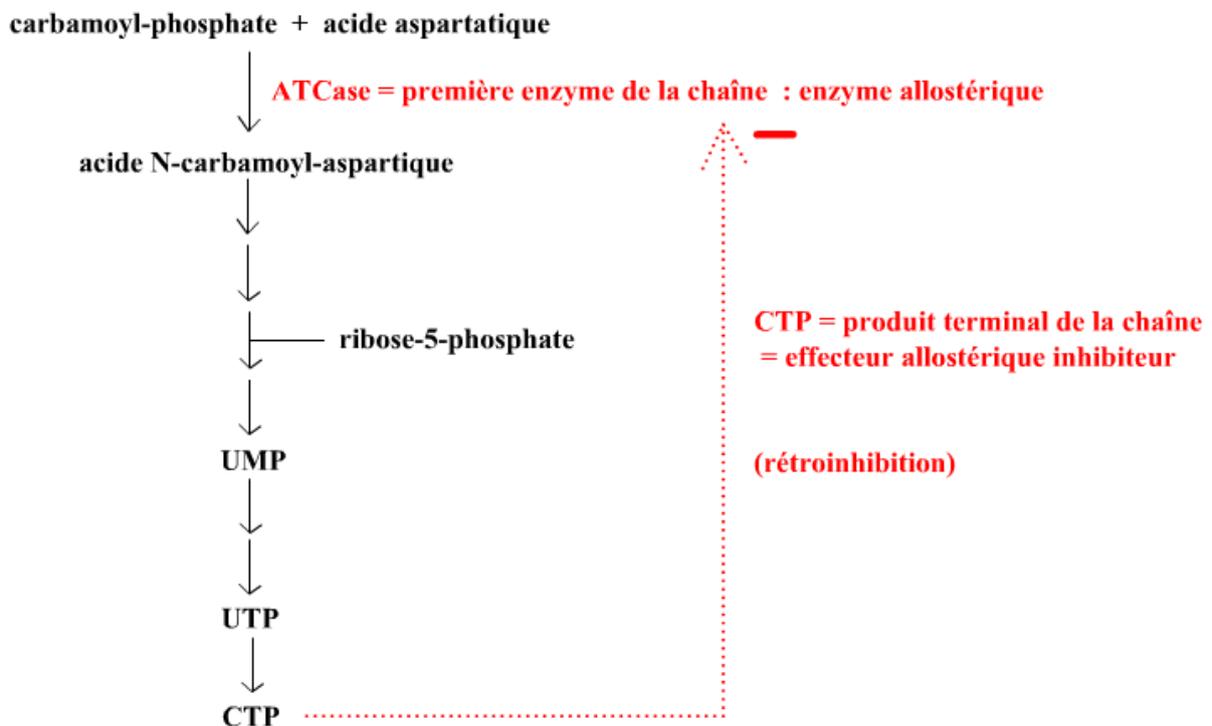
D'autres exemple comme :

La thréonine-désaminase enzyme situe au début de la chaîne de synthèse de l'isoleucine est inhibée par isoleucine(**Figure 2**)



**Figure2. Rétro-inhibition ( feed back control) de l'enzyme thréonine-désaminase**

- La carbamyle transférase située au début de la chaîne de synthèse du cytidine-tiphosphate(CTP) en partant de l'acide aspartique , est inhibé par CTP (Figure3 ci-dessous)



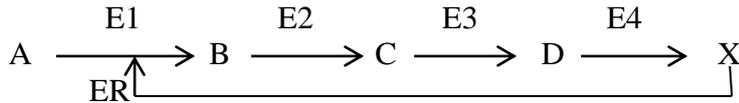
**Figure 3. Régulation allostérique (rétro-inhibition) par le nucléotide CTP.**

-Homosérine déshydrogénase enzyme située au début de la chaîne de synthèse de thréonine est inhibée par la thréonine.

#### 6.4.2 Notion d'effet allostérique :

L'étude des processus de rétro-inhibition par le produit final aboutit aux résultats suivants :  
**1-**Dans toute séquence métabolique, il existe une enzyme douée d'une réactivité particulière, cette enzyme est en générale, la première de la séquence métabolique, on lui donne le nom de l'enzyme régulatrice.

Exemple :



L'enzyme **E1** est l'enzyme régulatrice(**ER**) de la séquence.

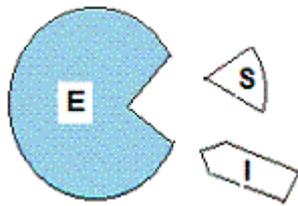
2- Cette enzyme régulatrice(**ER**) est inhibée seulement par le produit final(**X**), mais n'est pas inhibé par **B**, **C** ou **D**.

3- Cette **ER** est la seule enzyme de la séquence a été inhibée par le produit final.

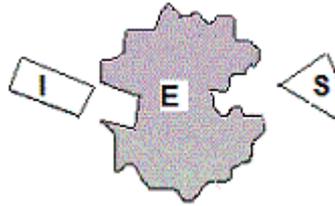
4- En générale, le produit final de la réaction à une structure différente de celle du (S). Si bien que ce produit final n'agit jamais sur l'enzyme régulatrice par un processus d'inhibition compétitive avec le substrat normal.

Cette action du produit final de la réaction n'est donc pas due à un **effet iso stérique** sur l'enzyme régulatrice.

C'est pour cette raison que **Monod** et ses collaborateurs ont proposé le nom d'effet **allostérique**. Le produit final doué des propriétés régulatrices est : l'**effecteur allostérique**. (figure 4 ci-dessous)



**Inhibition isostérique**



**Inhibition allostérique**

**Figure 4. Représentation de l'effet allostérique**

#### 6.4.3 Notion de transition allostérique :

Les enzymes régulatrices possèdent au moins deux(02) sites actifs

\* Le site actif

\* Le site allostérique.

Lorsque l'effecteur allostérique (s'adapte spécifique et réversible) se combine au site allostérique, il entraîne au niveau de la protéine **entière** une très légère modification de structure. Cette modification est réversible : c'est une transition allostérique.

Une des conséquences les plus importantes d'une telle transition allostérique est la **modification du site actif** qui retenti immédiatement sur la cinétique de la réaction catalysée.

En outre à la régulation par inhibition , il existe des activateurs par exemple : l'aspartate – transcarbamylyase( **ATCase**) est inhibée par CTP mais elle est activée par ATP.

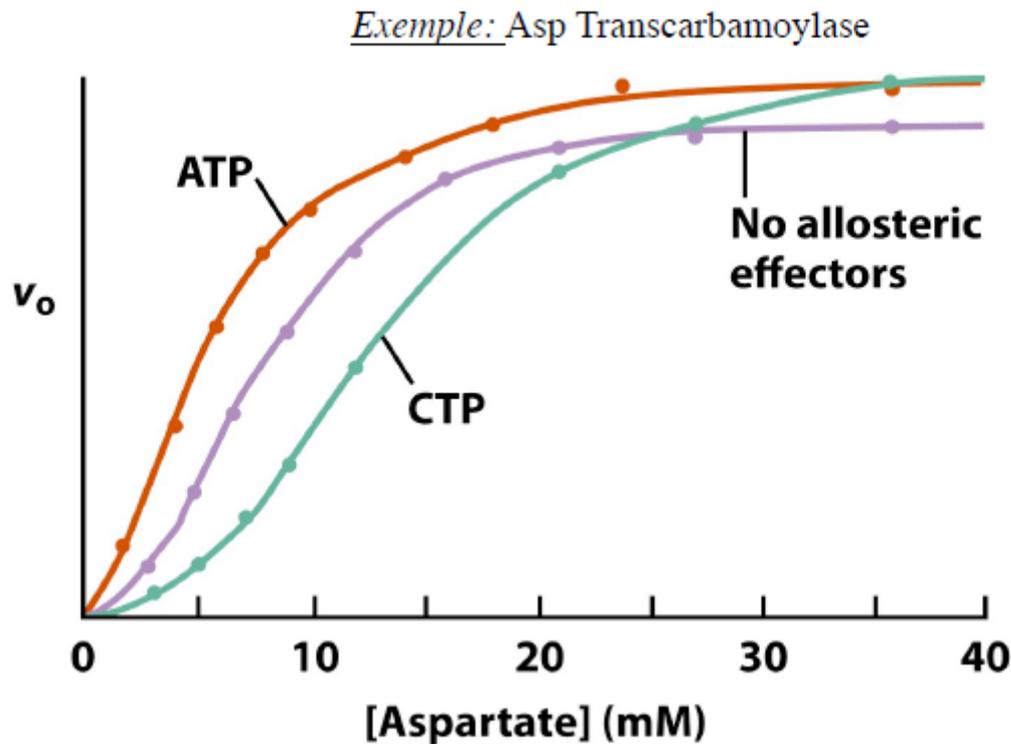


Figure. 4 Régulation allostérique de l'enzyme : l'aspartate –transcarbamylyase( ATCase)

#### 6.4.4 L'effet de désensibilisation

L'enzyme régulatrice est sensible à l'effecteur allostérique au niveau de son site allostérique, mais cette sensibilité peut disparaître sous l'effet de traitement physique (chaleur) ou chimique (urée) c'est l'effet de désensibilisation.

La désensibilisation est dans certains cas provoquée par une mutation génétique ; celle-ci entraîne alors la synthèse d'un enzyme ayant perdu la sensibilité à l'effecteur.

Dans ce cas on constate :

\* Qu'une certaine activité enzymatique persiste, donc le site actif n'est pas détruit.

\* L'enzyme n'est plus sensible à l'effecteur allostérique, cet effet de désensibilisation peut être interprété par deux(02) manières différentes :

-La première consiste à admettre que le site allostérique a subi une légère modification au cours de la désensibilisation. L'effecteur ne pourrait plus s'y fixer, et la transition allostérique ne serait pas possible. L'enzyme régulatrice(**ER**) perd sa fonction régulatrice.

-La seconde consiste à admettre que le bon fonctionnement de l'**ER** dépend non seulement de l'intégrité du site allostérique, mais encore du maintien de la structure spatiale de la protéine enzymatique qui conditionne la possibilité d'une interaction entre le site actif et allostérique.

**Exemple :** L'ATCase possède deux substrats catalytiques (l'aspartate ou S1 et le carbamoyl-P ou S2) et deux effecteurs (l'ATP ou F1 comme activateur et le CTP ou F2 comme inhibiteur).

La réaction catalysée par l'ATCase appartient à la voie de synthèse des pyrimidines, c'est la première étape dans la cascade de synthèse du nucléotide CTP (**Figure 3 ci-dessus**).

#### 6.5. Notion de la coopérativité des sites

L'étude cinétique d'action enzymatique (d'une ER) par exemple thréonine désaminase a montré qu'une seule molécule protéique enzymatique peut se combiner  
La coopérativité traduit le fait que la fixation sur l'enzyme d'une molécule d'un effecteur allostérique (exemples: activateur allostérique (A) et inhibiteur allostérique (I)) influe sur la fixation des molécules suivantes.

à plusieurs molécules de substrats et plusieurs molécules d'effecteur allostérique, il y a donc au niveau de cette enzyme plusieurs sites actifs identiques et plusieurs sites allostériques identiques : il paraît que les sites actifs multiplient par l'interaction réciproque et leur potentialité réactionnelle, ils coopèrent entre eux, c'est-à-dire il y a une **interaction coopérative des sites actifs**.

La coopérativité n'est pas toujours conservée, elle peut être supprimée sous l'action d'agents de désensibilisation qui est donc :

\* La suppression des interactions entre le site actif et sites allostériques : la transition allostérique n'a pas lieu.

\* La suppression de la coopération entre plusieurs sites actifs dans un même ensemble protéique (d'une même enzyme).

\* La suppression de la coopération entre plusieurs sites allostériques d'une même enzyme.

### **6.6. Cinétique des enzymes allostériques.**

La coopérativité traduit le fait que la fixation sur l'enzyme d'une molécule d'un effecteur allostérique (exemples: activateur allostérique (A) et inhibiteur allostérique (I)) influe sur la fixation des molécules suivantes.

Dans le cas de coopérativité en présence du substrat (sigmoïde de  $v = f(S)$ ), Si l'effecteur allostérique est le substrat lui-même (il existe alors 2 sites différents de fixation on emploie alors le terme **modulation homotrope**.

Si l'effecteur est différent du substrat on parle de **modulation hétérotrope**. Dans une **coopérativité positive**, une molécule d'un effecteur entraîne l'augmentation de l'affinité pour les mêmes molécules et vice versa pour une **coopérativité négative**.

-Les enzymes allostériques ne répondent pas à la cinétique Michaelienne mais à une sigmoïde qui traduit le phénomène de coopérativité qui peut être positive (augmentation de l'activité enzymatique) ou négative (diminution de l'activité enzymatique).

Cette coopérativité est décrite par l'équation de **Hill** :

$$\log \frac{V_i}{V_{\max} - V_i} = n \log[S] - \log K'$$

Où  $K'$  : constante  $K_m$

$n$  : Coefficient de Hill représente le nombre de site récepteurs, il décrit la coopérativité.

La valeur du coefficient de Hill décrit la coopérativité de la liaison du ligand de la manière suivant :

**Si  $n = 1$**

**Liaison non coopérative (complètement indépendante)** : L'affinité de l'enzyme pour une molécule de ligand ne dépend pas du fait que d'autres molécules de ligand sont déjà liées ou non. Lorsque  $n = 1$ , nous obtenons un modèle qui peut être modélisé par la cinétique de Michaelis – Menten

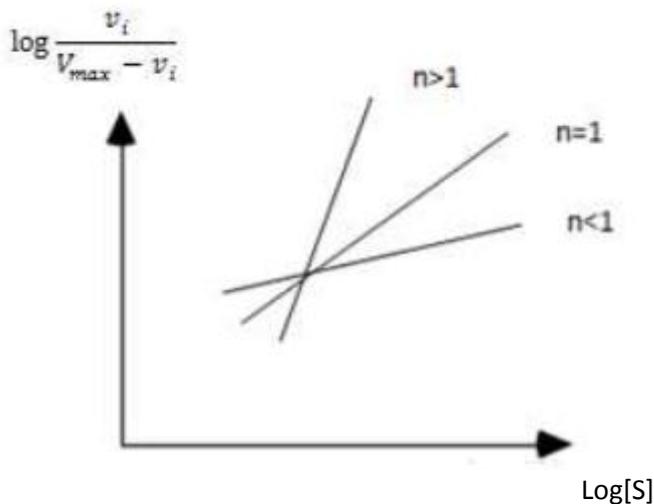
**Si  $n > 1$**

**Liaison à coopération positive** : une fois qu'une molécule de ligand est liée à l'enzyme, son affinité pour les autres molécules de ligand augmente. Par exemple, le coefficient de Hill de liaison de l'oxygène à l'hémoglobine (un exemple de coopérativité positive).

**Si  $n < 1$**

**Liaison coopérative négative** : une fois qu'une molécule de ligand est liée à l'enzyme, son affinité pour les autres molécules de ligand diminue.

La représentation graphique de  $\log \frac{v_i}{V_{max} - v_i}$  en fonction de  $\log[S]$  donne une droite (**figure 5**) qui nous permet de calculer le  $n$  et  $K_m$  et de déterminer le **type de coopérativité** grâce à la pente  $n$



**Figure 5. Représentation graphique de  $\log v_i / v_{max} - v_i$  en fonction de  $\log [s]$**

### **6.7.Mécanisme de régulation**

La question que l'on peut se poser est « comment la fixation d'un modulateur sur le site spécifique régule l'activité catalytique lorsque le site de fixation du modulateur est éloigné du site catalytique et peut être situé sur une autre chaîne polypeptidique ? ».

Plusieurs théories ont été développées, toutes ont aboutis à la conclusion suivante :

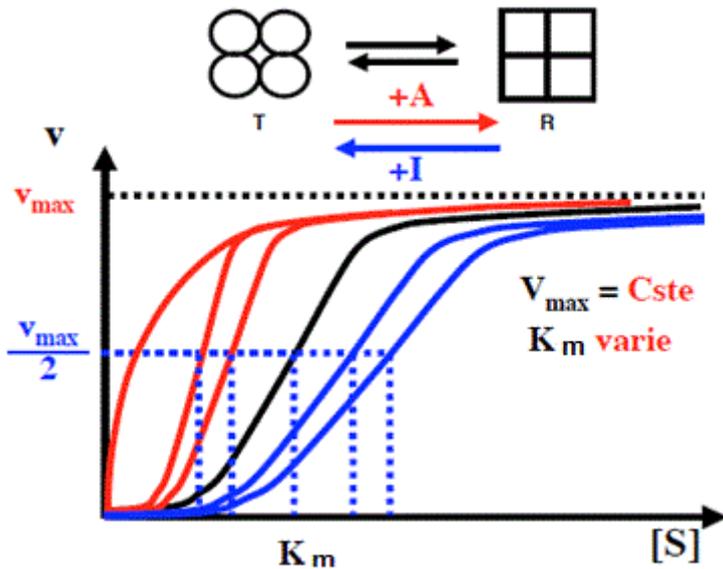
La fixation d'un modulateur (effecteur) sur son site de fixation entraîne un changement conformationnel de la structure tridimensionnelle de la molécule enzymatique.

#### **6.7.1.Modulation allostérique de types K et V**

La cinétique allostérique impossible de donner aux  $K_m$  et  $V_{max}$  le sens exact de la même manière pour l'inhibition compétitive non compétitive et incompétitive sont impropres à usage précis.

##### **6.7.1.1 Enzyme du système K**

Dans les systèmes K, la protéine passe d'une forme à l'autre sous l'influence de la liaison d'un ligand qui peut être le substrat, ou un effecteur. Les différentes formes ne présentent pas la même affinité pour le substrat. **Ce sont des enzymes pour lesquelles l'effecteur ne modifie que l'affinité apparente  $K_m$  de l'enzyme pour le substrat ( Figure. 6)**



**Figure 6. Enzyme allostérique de type K**

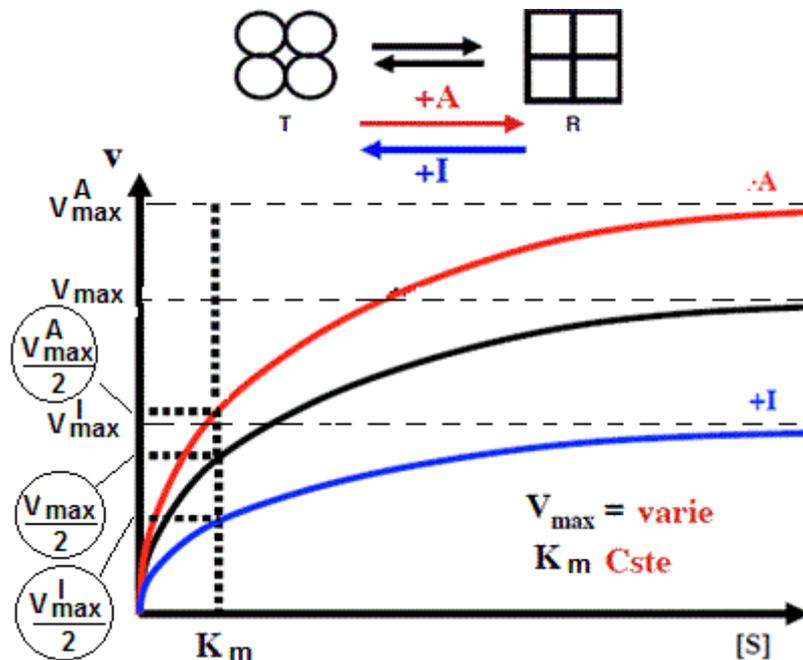
**A** : activateur allostérique entraîne une modulation hétérotrope positive de la saturation de l'enzyme par le substrat.

**I** : Inhibiteur allostérique entraîne une modulation hétérotrope négative de la saturation de l'enzyme par le substrat.

L'exemple des enzymes du système K : Thréonine désaminase et aspartate transcarbamylase

### 6.7.1.2 Enzyme du système V (plus rare)

Ce sont les enzymes pour lesquelles l'effecteur allostérique ne modifie que  $V_{max}$ . (figure 6)



**A** : activateur

**I** : Inhibiteur

**Figure 7. Enzyme allostérique de type V**

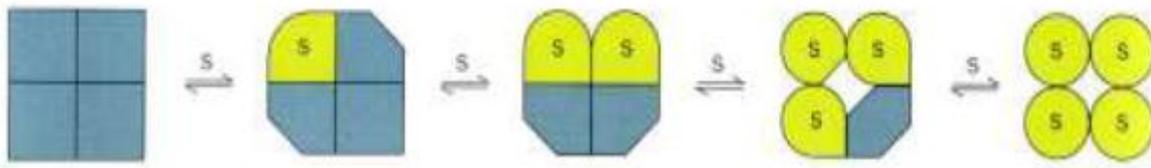
## 6.8. Interprétation Moléculaire de Modulation allostérique

De nombreux modèles ont été proposés, les plus importants sont : Modèle séquentiel de KOSCHLAND et ATKINSON et Modèle concerté de MONOD ; WYMAN et CHANGEUX (MWC). Ces deux modèles impliquent que l'enzyme existe sous plusieurs conformations dont deux extrêmes : T (tense) et R (relaxed). Ce dernier a pour le substrat une affinité plus marquée que T. Les deux formes existent en équilibre.

### 6.8.1. Modèle de Koshland et d'Atkinson

Ce modèle dit de coopérativité séquentielle ou de transition séquentielle, postule que la fixation du premier ligand à une sous-unité entraîne en cascade la déformation des autres. Chaque S/unité a la possibilité d'être sous forme R ou T indépendamment des autres s/unités. L'enzyme comprend à la fois les deux(02) formes T et R.

La liaison du ligand induit donc progressivement des changements conformationnels dans les sous-unités, les changements les plus importants se produisant au niveau des sous-unités qui ont lié le ligand. Le couplage entre les sous-unités n'est pas nécessairement assez fort pour préserver la symétrie de l'oligomère comme c'est le cas dans le modèle symétrique.



**Figure 8. Evolution du modèle séquentiel de Koshland par fixation successive des molécules du ligand [S] (modulation homotrope).**

### 6.8.2. Modèle de Monod, Wyman et Changeux (modèle concerté).

Les règles applicables à ce modèle sont les suivantes :

- Les **sous unités** ne peuvent pas se distinguer les unes des autres sur le plan fonctionnel.
- L'édifice tétramérique (pris pour exemple) doit conserver sa symétrie en permanence.
- Les changements de conformation (type transition  $R \longleftrightarrow T$ ) intéressent toutes les sous-unités en même temps.
- Le ligand peut se fixer aux formes R ou T mais avec des affinités différentes pour ces conformations R ou T.
- C'est la fixation du ligand qui modifie l'équilibre entre les formes R et T, et oriente les protomères vers les formes à haute affinité (en modulation positive).
- Le fait que les enzymes soumis à la régulation allostérique soient constitués d'un nombre pair généralement de protomères, s'adapte bien à cette conception.

**La figure 9** schématise ce modèle comme suit :

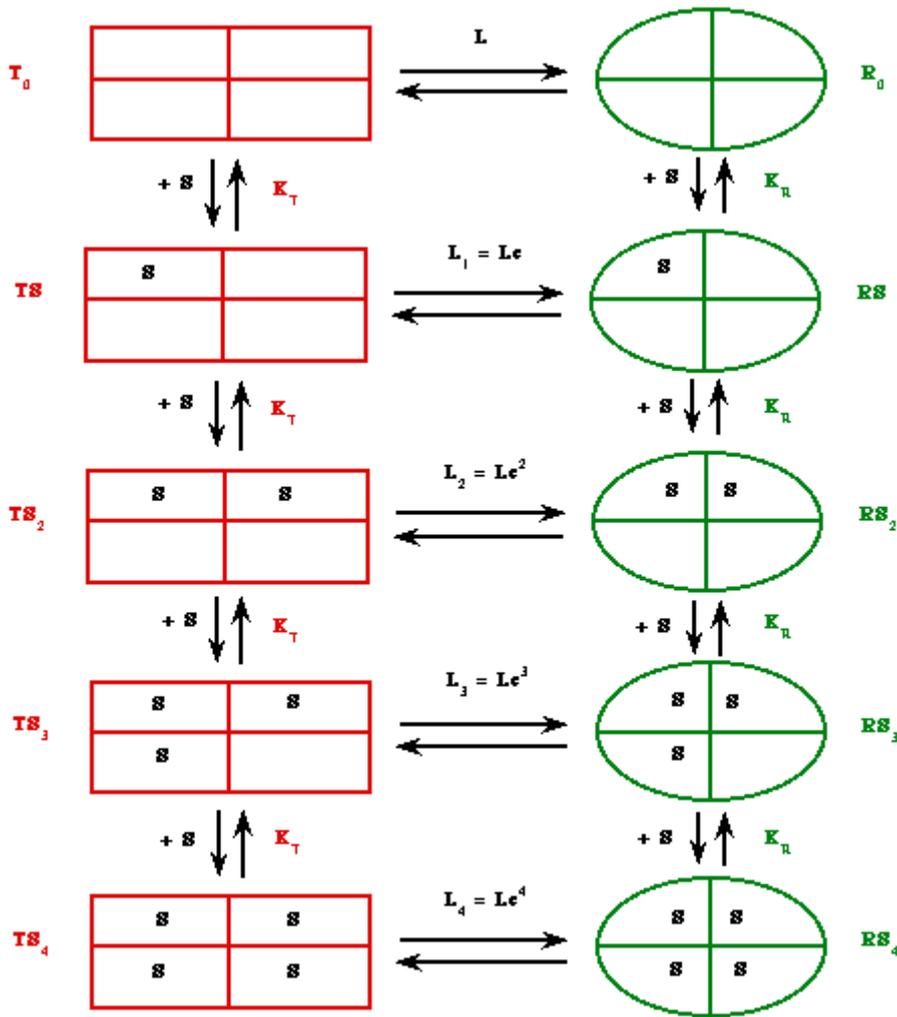


Figure 9. Evolution du modèle concerté de Monod( homotrope).