

LES ENZYMES ALLOSTERIQUES

Partie III

Dr. H. BENSAFI-GHERAÏBIA
Faculté de Médecine
Université Badji Mokhtar-Annaba
2020-2021

Protomère:

Monomère protéique associé à d'autres monomères par des liaisons non covalentes, pour former un oligomère ou polymère.

Protomère:

- Chaque protomère d'une protéine oligomérique peut être formé de plusieurs sous-unités.
(Association de sous-unités se répétant n fois (n nombre paire)).

Exemple:

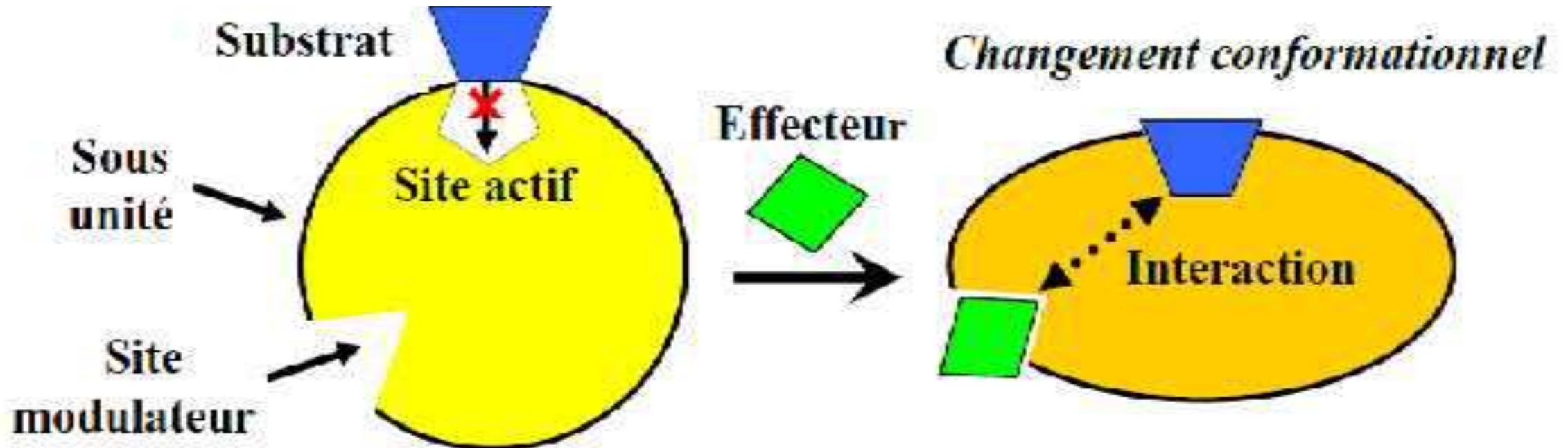
1- Enzyme renfermant 4 sous unités identiques « a », l'enzyme est dit **a₄** et le protomère est **a** (le protomère est aussi le monomère).

2- Enzyme renfermant 4 sous unités dont 2 de type a et 2 de type b, enzyme est dit **a₂b₂** et le protomère **ab**.

L'hémoglobine est un tétramère composé de 2 protomères, chaque protomère est constitué de 2 sous unités a et β.

Allostérie:

Propriété de certaines protéines actives qui peuvent **changer de structure spatiale** lorsqu'elles se lient à un **effecteur** en un site **différent du site actif**, cette liaison se traduisant par une **modification de l'activité**.



Ligand:

Substance qui peut se lier et former un complexe avec une biomolécule (Enzyme).

- Types de ligands: substrat, cofacteurs, ions métalliques, activateurs, inhibiteurs, neurotransmetteurs ...
- L'effecteur se fixe sur le **site allostérique** et joue un rôle important dans le contrôle de l'activité des enzymes dans la cellule.

Symétrie:

Des enzymes de structure plus complexe ont une affinité vis à vis du substrat avec une vitesse maximum changer en fonction de la concentration des effecteurs: ce sont les enzymes à **cinétique allostérique**.

La protéine est donc un oligomère de 2 ou 4 sous-unités par exemple. Les protomères sont arrangés dans l'espace de façon que chacun d'entre eux ait les **mêmes liaisons avec les autres**. Un tel arrangement est dit **symétrique**.



Sites de liaison:

Les sites de liaison existent de façon **identique** sur chaque protomère.



2- Chaque ligand d'une enzyme allostérique (effecteur, cofacteur ou substrat) a un site sur chaque protomère.

Conformations:

Chaque protomère a des liaisons avec les autres protomères du système, le plus souvent de type électrostatique, Sa structure secondaire et tertiaire et son énergie interne sont modifiées par ces liaisons.



3- La conformation de chaque protomère est contrainte par la conformation des autres.

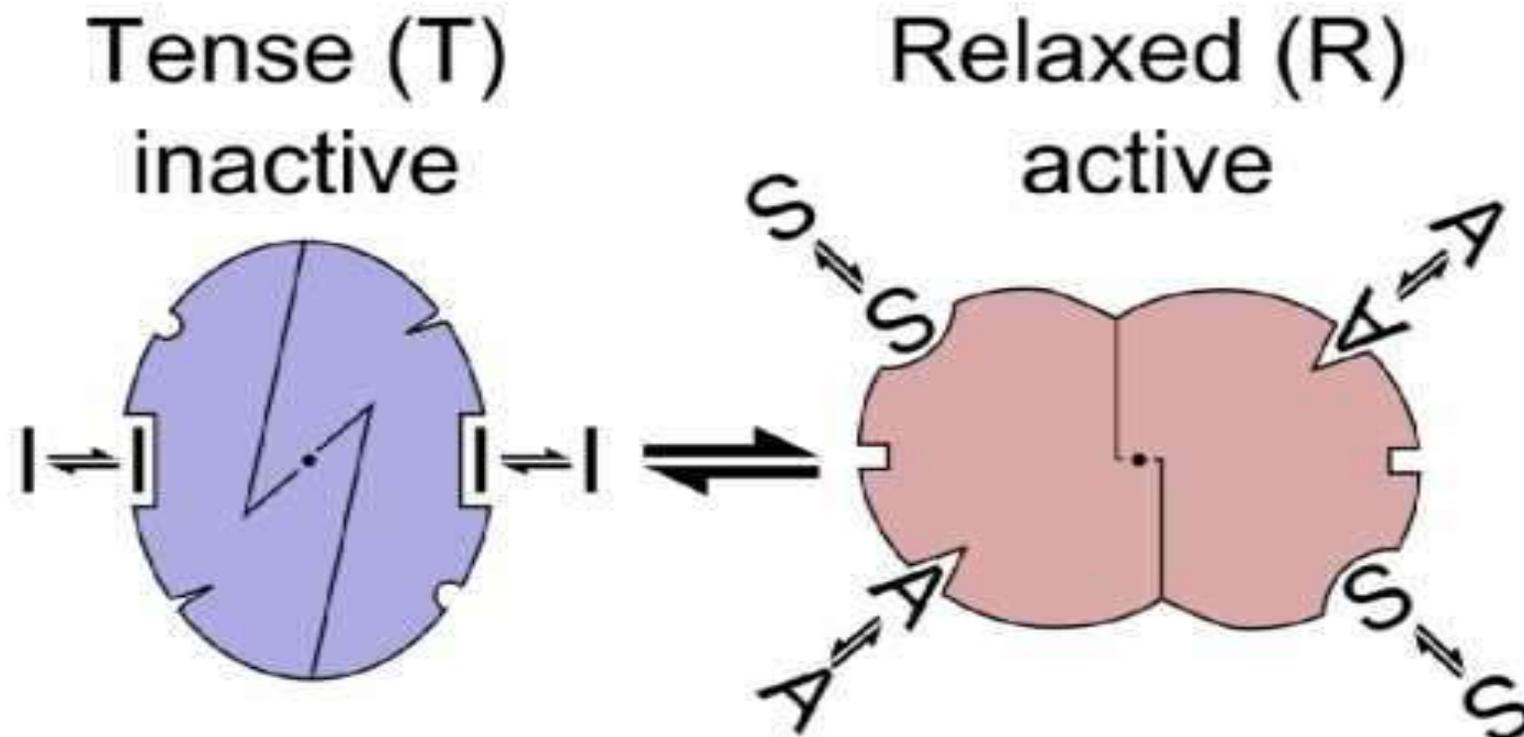
2- Transition allostérique

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**.



La **transition allostérique** modifie les forces de liaisons qui associent les sous unités entre elles, mais sans aller jusqu'à leur dissociation.

La molécule apparait soit dans un état **tendu** ou **relâché** (selon son affinité au substrat).



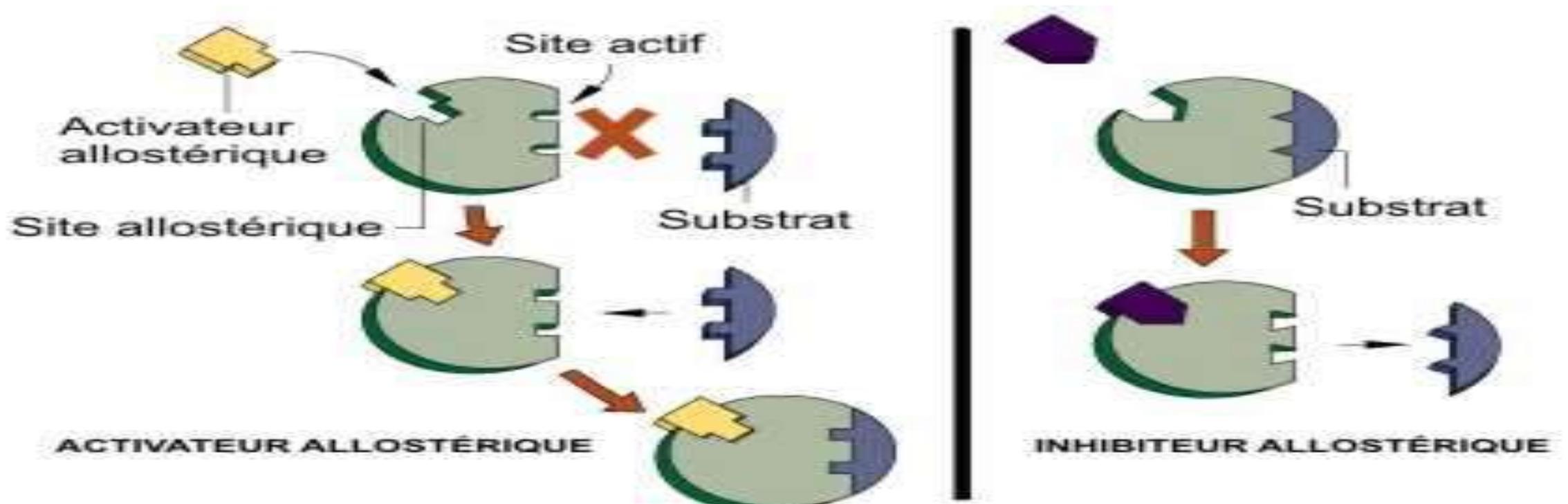
T: Faible affinité pour S

R: Forte affinité pour S

En se liant au site allostérique:

L'effecteur inhibiteur modifie la forme de l'enzyme qui devient alors **inactive**. Si l'inhibiteur se sépare du site allostérique, l'enzyme reprend sa forme active.

Un effecteur activateur rend une enzyme normalement inactive, **active**. Si l'activateur se sépare de l'enzyme, celle-ci reprend sa forme inactive.



3- Effet allostérique

Enzyme homotrope = L'effecteur est le substrat lui-même (le substrat activateur de l'enzyme, aura un effet homotrope positif. Il agit sur sa propre transformation)

Enzyme hétérotrope = L'effecteur est une molécule qui diffère du substrat.

- Un activateur allostérique aura un effet hétérotrope positif
- Un inhibiteur allostérique aura un effet hétérotrope négatif

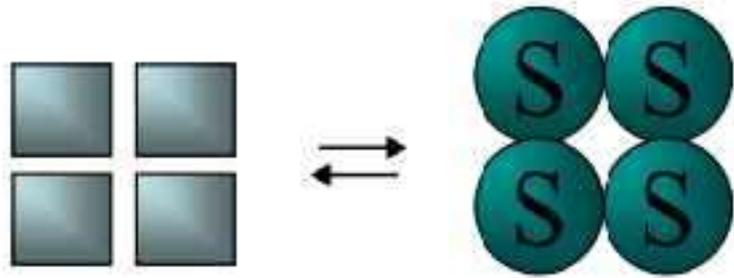
4- La coopérativité

L'enzyme allostérique contient:

- Plusieurs sites actifs identiques
- Plusieurs sites allostériques identiques

Ces sites montrent une coopérativité: la fixation sur l'enzyme d'un effecteur allostérique, influe sur la fixation du substrat.

Modèle symétrique



Modèle concerté

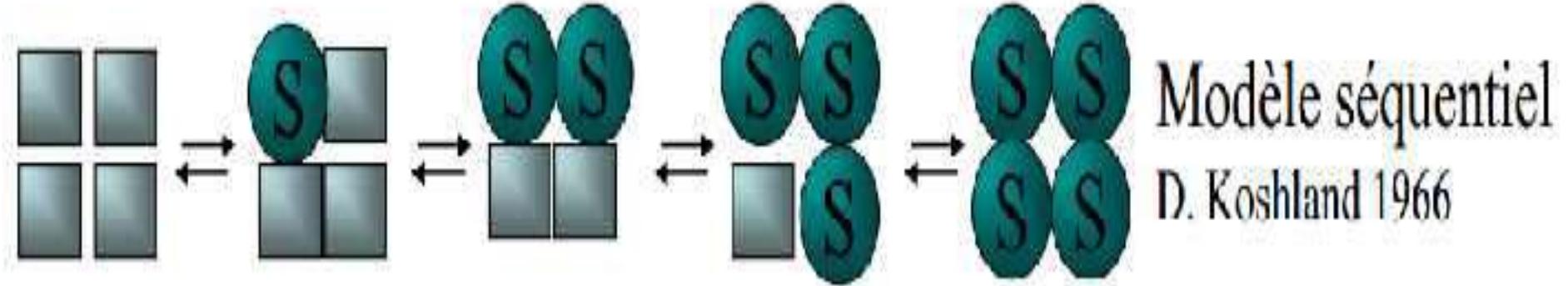
J. Monod JP Changeux 1965

Le passage d'un protomère de l'état relâché à l'état tendu implique en général la **transformation de la structure des autres protomères dans le même sens** pour maintenir la **symétrie** de la structure d'ensemble.

Il s'établit une **coopération** entre les protomères pour que le substrat soit plus efficacement transformé.

Tous les protomères sont soit en conformation **T** (absence du substrat),
soit en conformation **R** (en présence du substrat).

Modèle non symétrique (séquentiel)



Les sous unités passent de la forme **inactive** à la forme **active individuellement**.
(La fixation de la molécule de substrat, induit la transition de la première s/u, ce qui facilite la transition de la s/u voisine et ainsi de suite).

Diagramme de Hill

- Les constantes de vitesse et d'affinité des enzymes allostériques varient en fonction des ligands, de telle sorte que la courbe prend une forme **sigmoïde**, caractéristique de la **coopération** qui se fait entre les protomères.
- Ce qui donne un avantage aux systèmes allostériques par rapport aux enzymes à cinétique michaelienne pour la **régulation de la vitesse des réactions enzymatiques**.
- Par comparaison, la courbe en tirets représente la même réaction en cinétique michaelienne (sans effet allostérique):
La cinétique allostérique est plus lente que la cinétique michaelienne pour les petites concentrations du substrat et devient plus rapide au-delà. ce qui signifie que pour une même différence entre deux concentrations du substrat, l'accélération de la réaction sera plus grande dans le cas de l'enzyme allostérique.

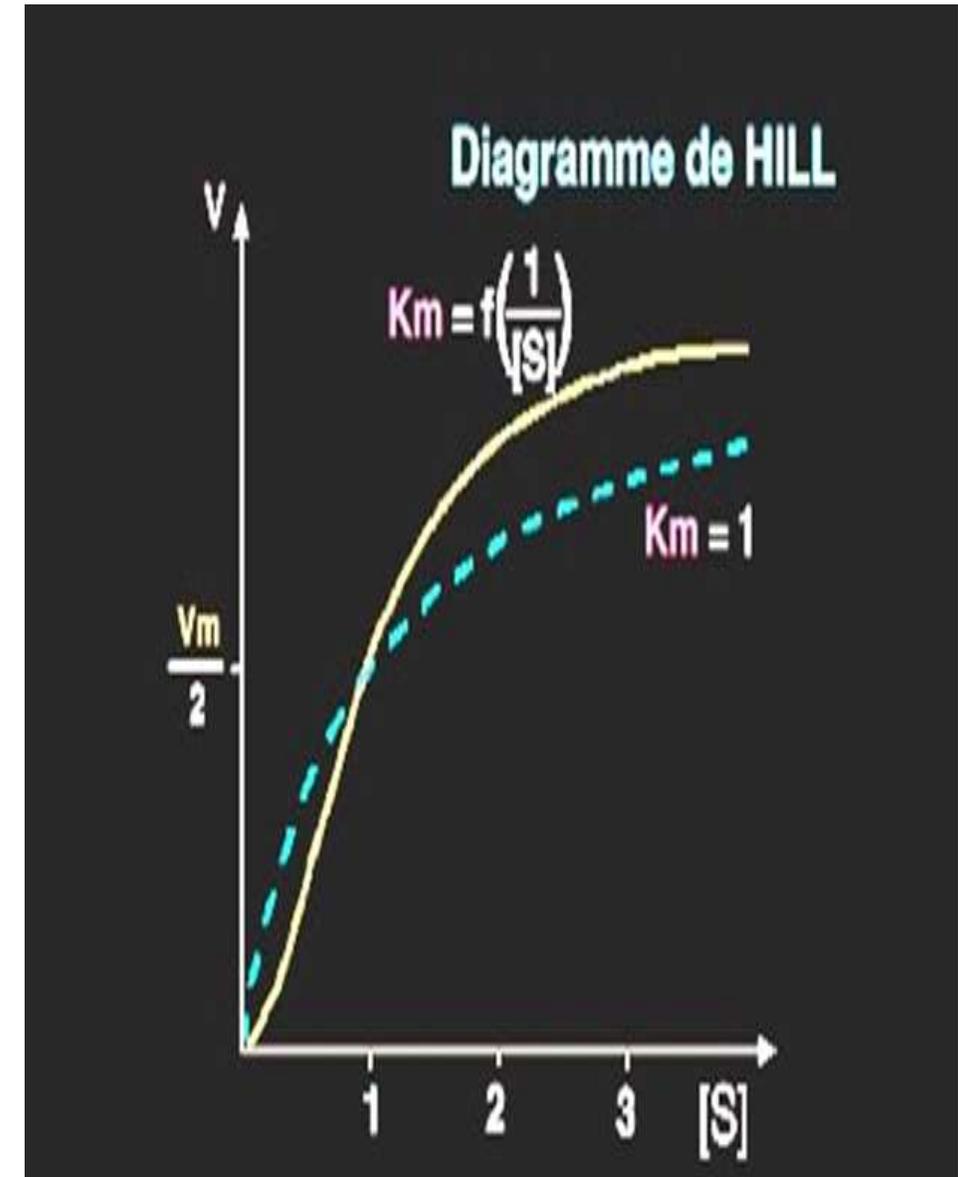
Courbe sigmoïde

$$V = \frac{V_m \cdot [S]^n}{K_{1/2} + [S]^n}$$

$$V = V_{max}/2$$

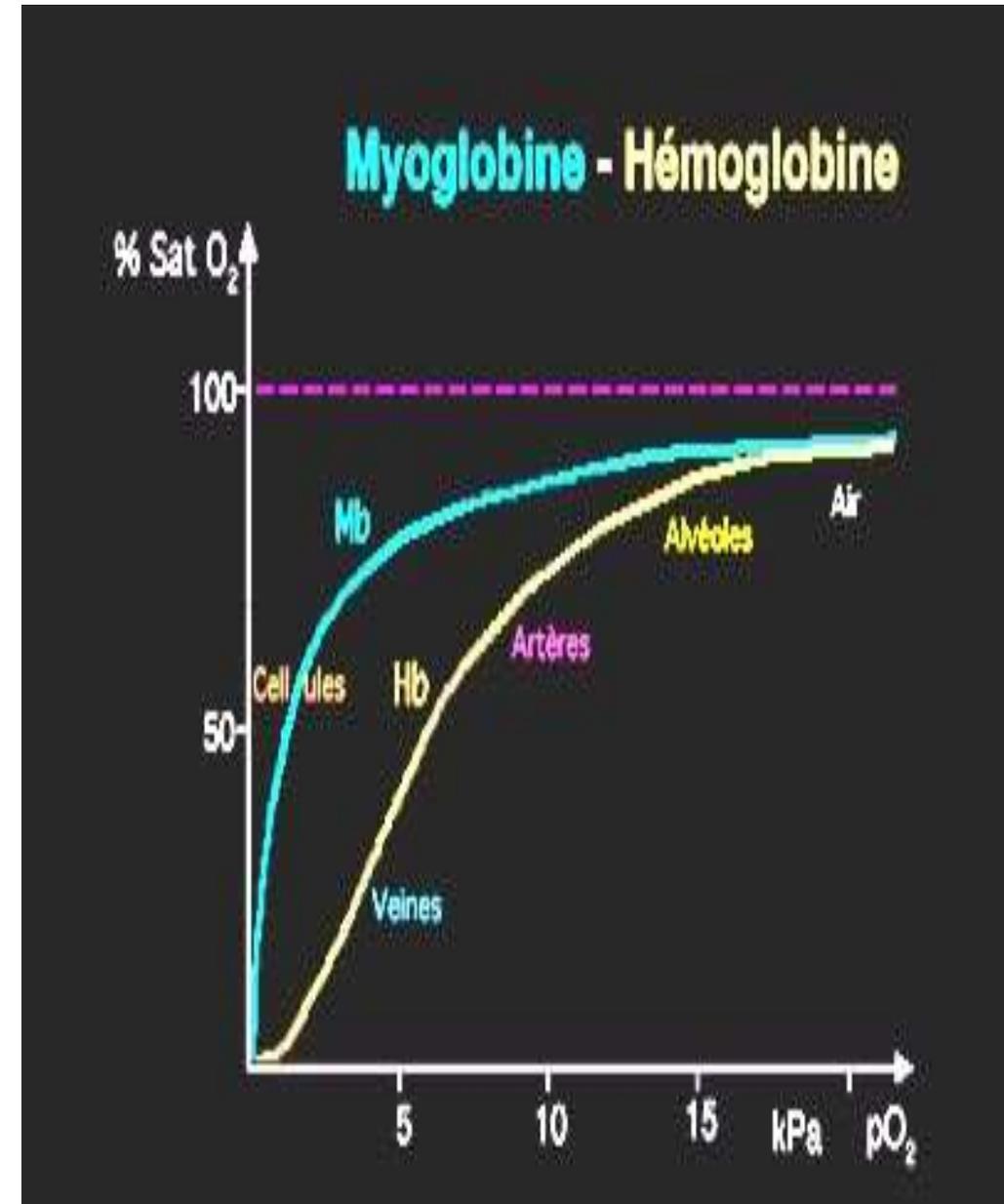
$$K_{1/2} = [S]$$

n: nombre de site de liaison de substrat



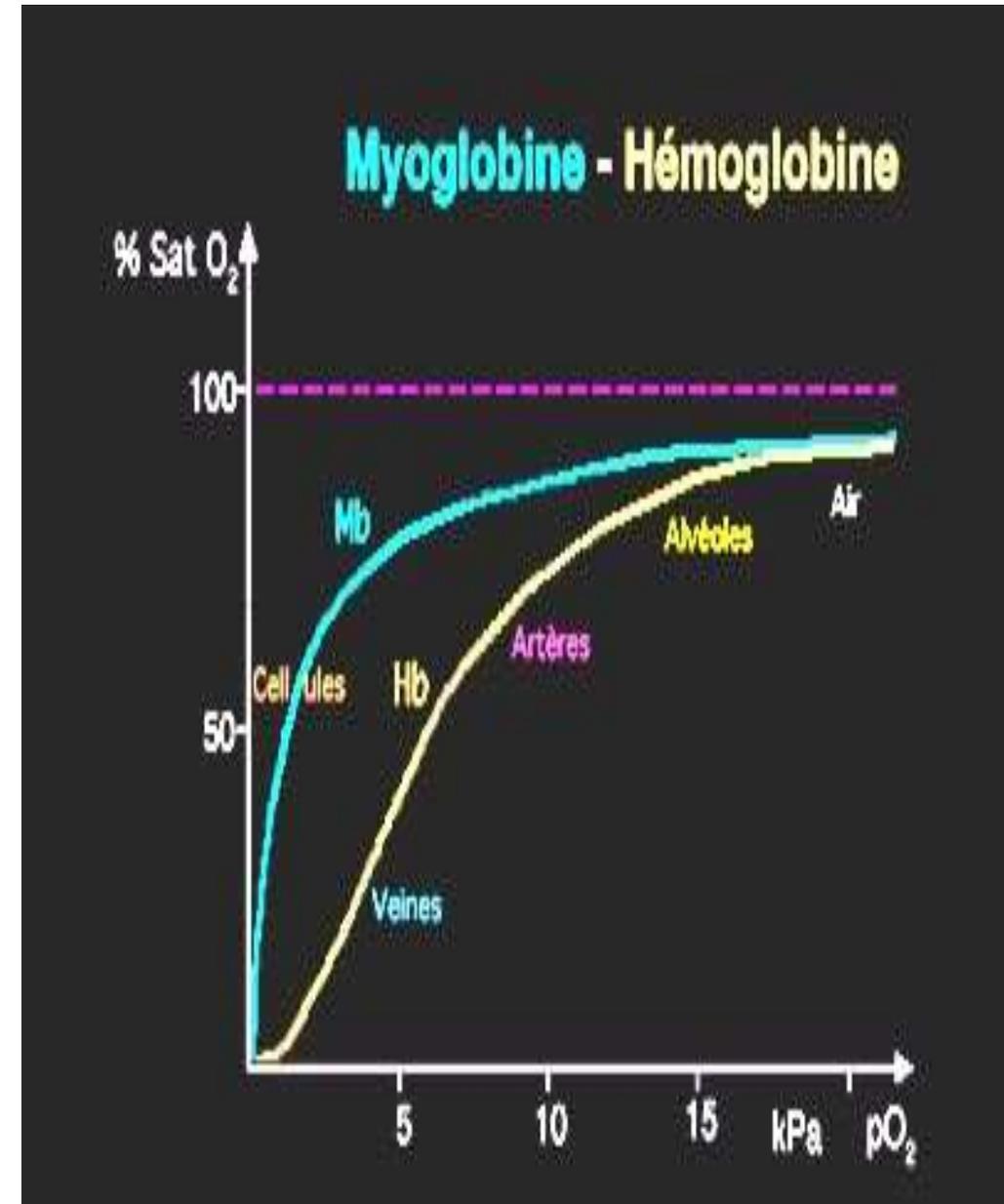
- Exemple d'allostérie: myoglobine; hémoglobine

- La **Mb** est une protéine qui transporte l'oxygène dans le cytoplasme des cellules. Elle est constituée d'une seule chaîne d'acides aminés. Sa vitesse de transport de l'oxygène en fonction de la pression de ce gaz, est de **type michaélien** (courbe: hyperbole).
- L'**Hb** est une protéine qui transporte l'oxygène dans les globules rouges. Elle est constituée de quatre chaînes d'acides aminés. Sa vitesse de transport de l'oxygène en fonction de la pression de ce gaz, est de **type allostérique** (courbe: sigmoïde).



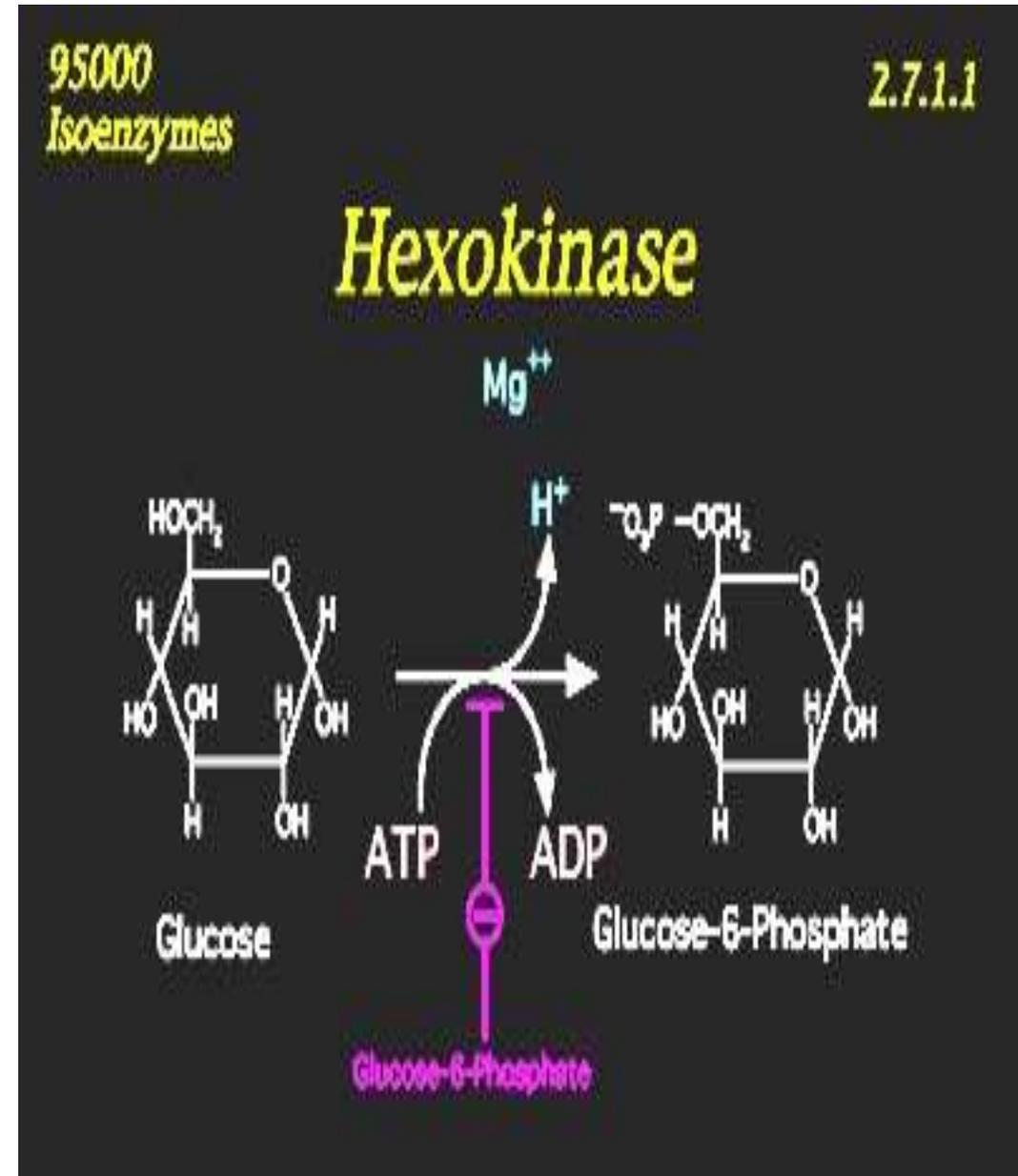
- Exemple d'allostérie: myoglobine; hémoglobine

- La coopération entre les protomères confère à l'hémoglobine une grande affinité pour l'oxygène dans les poumons où il est abondant et une faible affinité dans les tissus où il est transmis aux cellules.
- L'Hb a donc un comportement différent d'un organe à l'autre lorsque les pressions d'oxygène sont différentes. Cette protéine s'adapte mieux aux conditions du milieu grâce à l'allostérie.



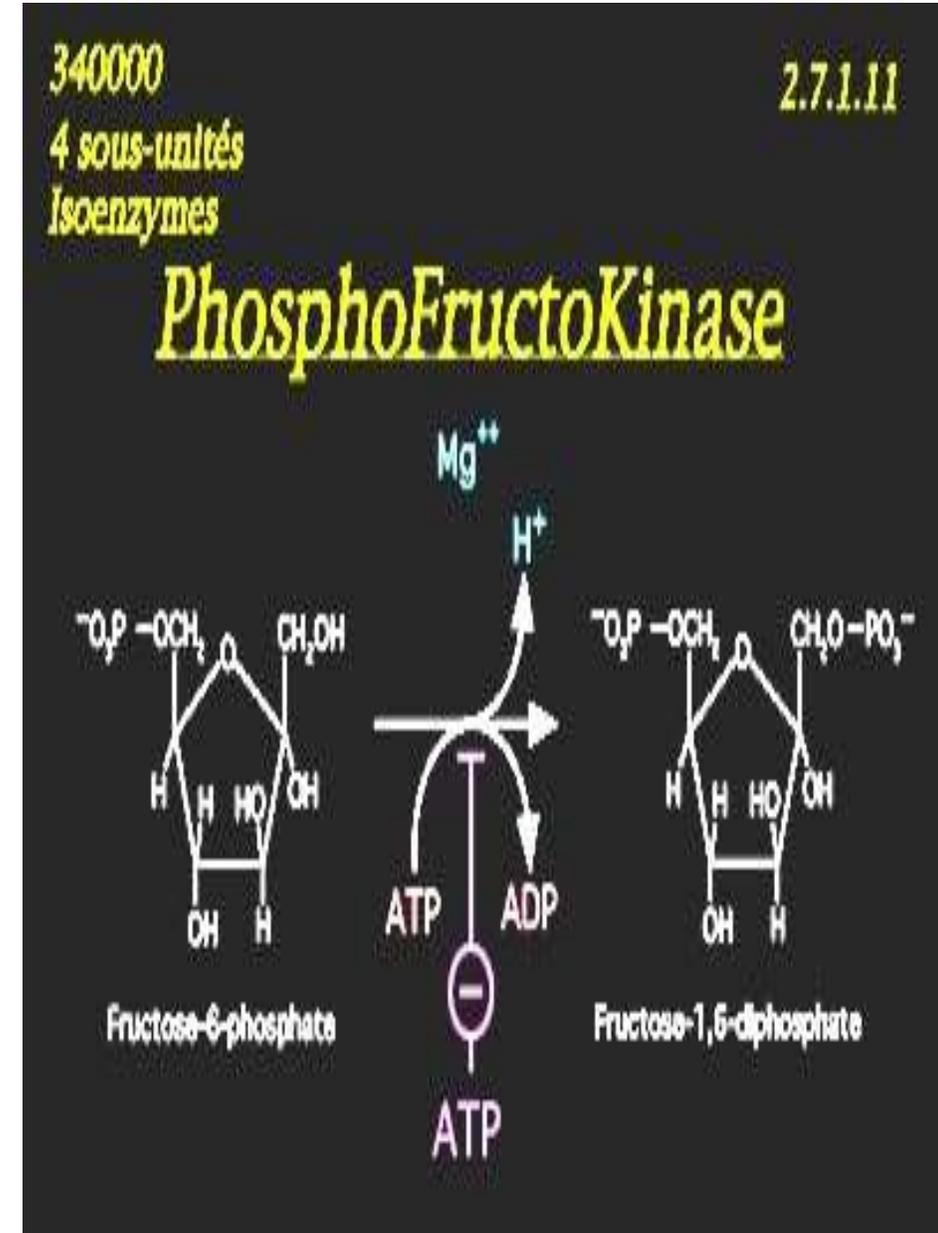
- Exemple d'allostérie: hexokinase

- L'**hexokinase** est une enzyme de la membrane plasmique de toutes nos cellules.
- Elle catalyse une réaction de transfert de phosphate et d'énergie du coenzyme ATP vers le **glucose** qu'elle active en **glucose-6-phosphate**. Un proton est libéré.
- La réaction couplée est exergonique et irréversible.
- Le **glucose-6-phosphate**, produit de la réaction catalysée, est **un régulateur allostérique de l'hexokinase**. Il se fixe sur un site de liaison différent du site actif et cette fixation diminue l'affinité du site actif pour le glucose. Il en résulte un **ralentissement de la vitesse de réaction**.



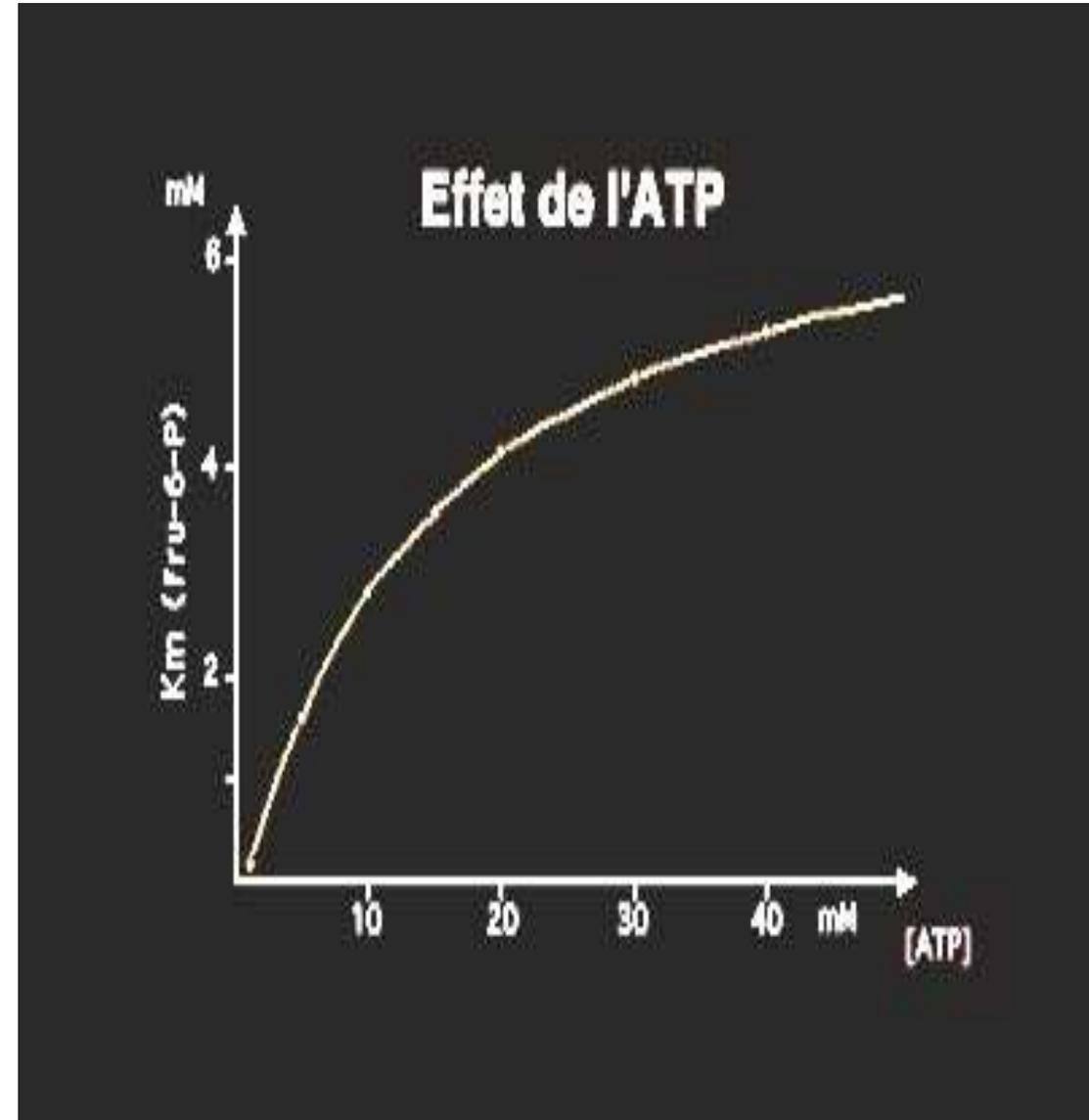
- Exemple d'allostérie: phosphofructokinase

- La PFK, enzyme présente dans toutes nos cellules. Comporte 4 sous-unités presque identiques, avec 4 sites actifs.
- Elle catalyse une réaction de transfert de phosphate et d'énergie du coenzyme ATP vers le fructose 6-phosphate qu'elle active en fructose 1,6-diphosphate. Un proton est libéré.
- La réaction couplée est exergonique et irréversible.
- La PFK est **l'enzyme la plus lente** de la glycolyse cytoplasmique, voie métabolique du métabolisme énergétique. Elle catalyse l'étape d'engagement des glucides dans la production d'énergie. Elle est donc **l'enzyme-clé** de cette voie métabolique.
- La cinétique de la PFK est **allostérique**; elle est **rétro-inhibée** par le produit final de la glycolyse, l'ATP. Une molécule d'ATP (effecteur allostérique), différente de celle qui apporte le phosphate et l'énergie (coenzyme), se fixe sur un site de liaison de chaque protomère et cette fixation **diminue l'affinité du site actif pour le fructose 6-phosphate**. Il en résulte un **ralentissement de la vitesse de réaction**.



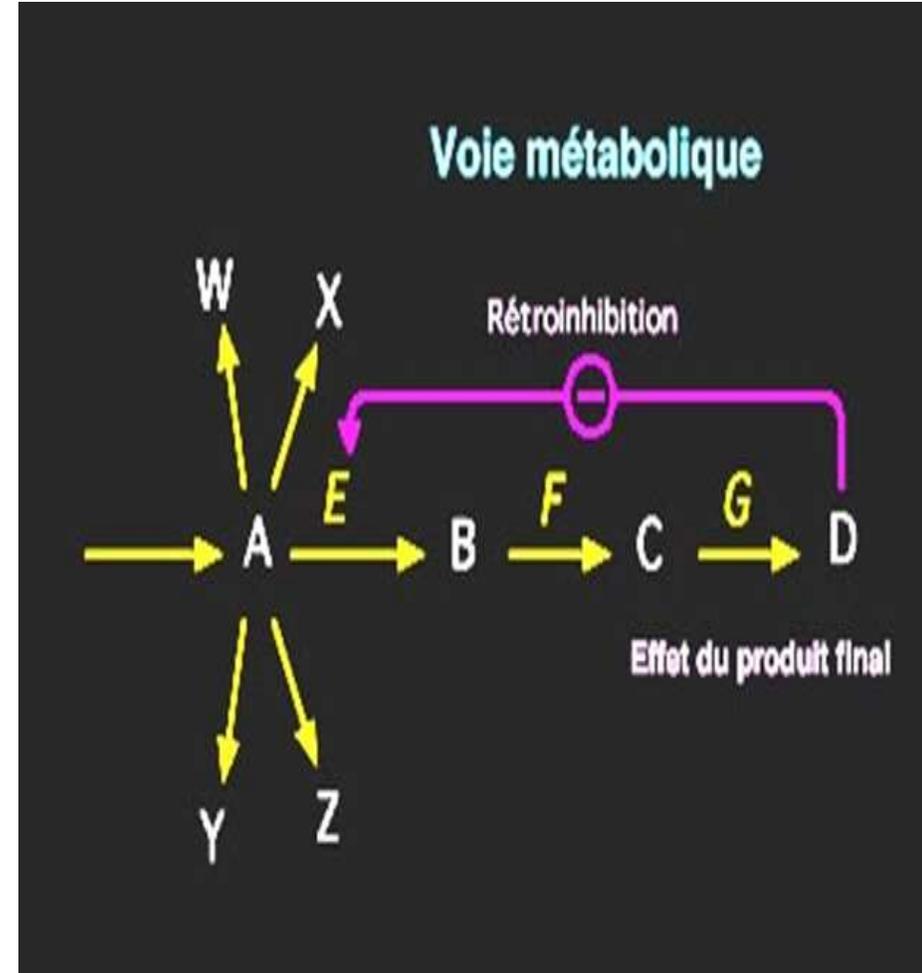
- Exemple d'allostérie: phosphofructokinase
- Effet de l'ATP sur la PFK:

- Graphe représentant la constante K_m de la PFK pour son substrat le Fructose-6-phosphate, en fonction de la concentration de l'ATP, produit final du métabolisme énergétique
- Cette constante K_m est d'autant plus élevée que cette concentration augmente.
- L'affinité de la PFK pour le Fructose-6-phosphate diminue avec l'augmentation de la concentration du produit final: il y a donc rétro-inhibition de l'enzyme par l'ATP.



Voie métabolique

- Un composé A peut être le substrat de réactions enzymatiques. Chacune de ces synthèses va se faire en plusieurs étapes (A, B, C, D,...) chacune catalysée par une enzyme spécifique (E, F, G,...).
- La vitesse de synthèse du dernier produit dépend de la vitesse de la **plus lente de ces enzymes**. Si ce produit final est en quantité insuffisante (enzyme activée). Si la concentration élevée du produit D est élevée (l'enzyme est inhibée).
- L'enzyme la plus lente va être régulée pour que les composés intermédiaires ne s'accumulent pas
- L'enzyme E, catalysant la transformation de A en B, 1^{ère} étape de la synthèse, doit être régulée par des effecteurs qui permettront de contrôler la vitesse de l'ensemble. Par exemple, un excès de produit final peut aboutir à l'inhibition de cette première étape : c'est la **rétro-inhibition**.



Voie métabolique

Ensemble de réactions métaboliques successives aboutissant à la production d'un composé biologique ayant une fonction indispensable pour l'organisme

Carrefour métabolique

Corps chimique pouvant être le substrat de plusieurs enzymes appartenant à des voies métaboliques différentes

Enzyme clé

- Dans une voie métabolique, celle des enzymes qui a la vitesse la plus lente et qui par conséquent contrôle la vitesse de la synthèse est appelée **l'enzyme-clé**.
- C'est habituellement la première des enzymes de la voie. Cette enzyme-clé est inhibée pour diminuer la synthèse du produit final ou activée pour l'augmenter.
- Les enzymes-clés sont toutes des enzymes allostériques contrôlées par de multiples effecteurs.

Effet de désensibilisation

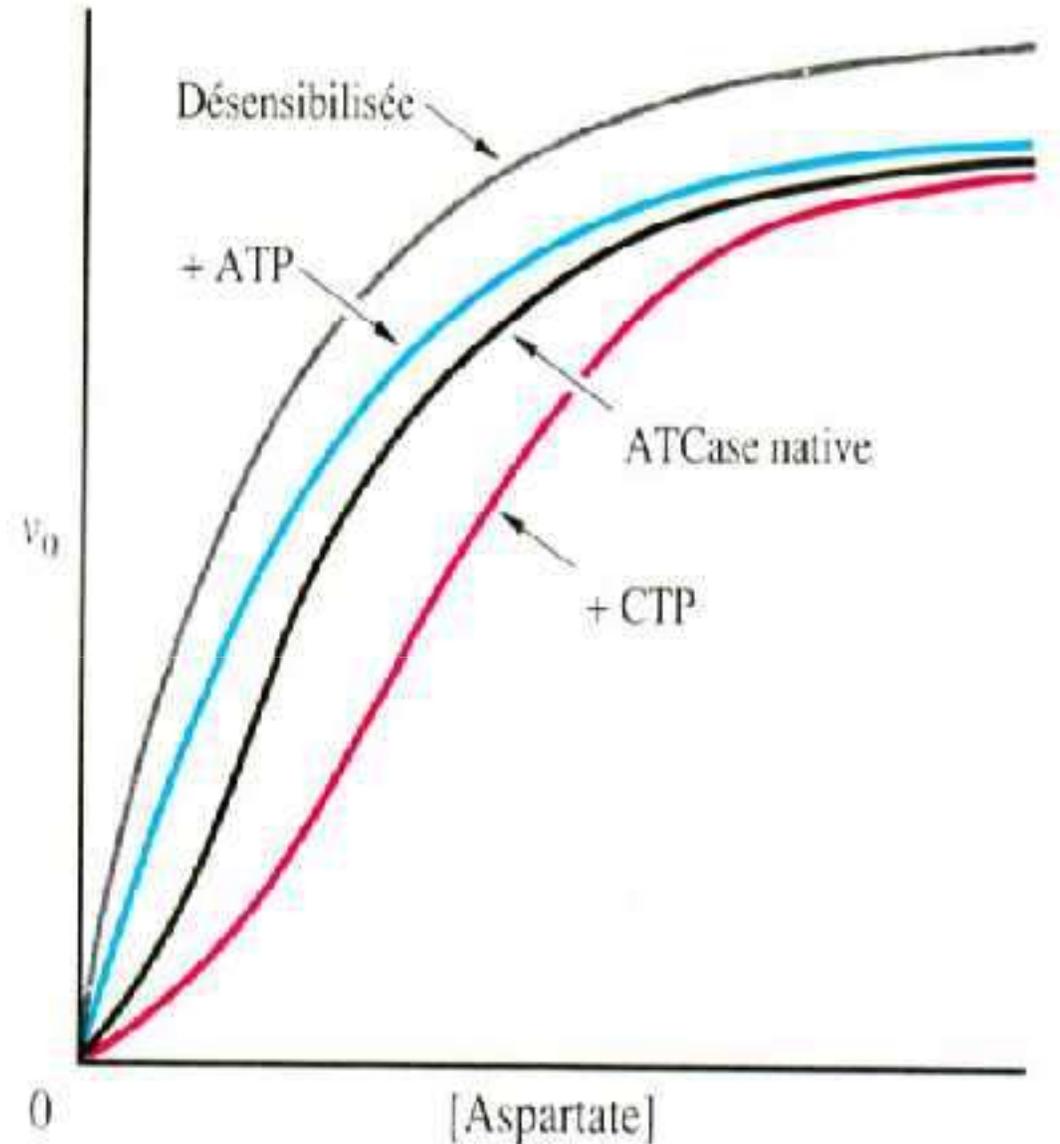
L'effet allostérique peut disparaître sous l'action de la température ou par traitement chimique (urée).

-le site allostérique a été détruit au cours du traitement de désensibilisation de telle façon que l'effecteur allostérique ne pourrait plus s'y fixer. La transition allostérique ne peut plus avoir lieu. La cinétique devient alors de type michaelien.

L'effet d'un agent de désensibilisation est donc :

-la suppression des interactions entre sites actifs et sites allostériques ; la transition allostérique n'a pas lieu.

-la suppression de la coopérativité entre plusieurs sites actifs de l'enzyme



Exercice 1:

Voici les valeurs de K_m pour la réaction catalysée par la chymotrypsine avec 2 substrats différents.

Substrats	K_m (M)
N-Acétylestérol	$8,8 \times 10^{-2}$
N-Acétylestérol	$6,6 \times 10^{-4}$

Quel est le substrat ayant la plus forte affinité apparente pour l'enzyme ?

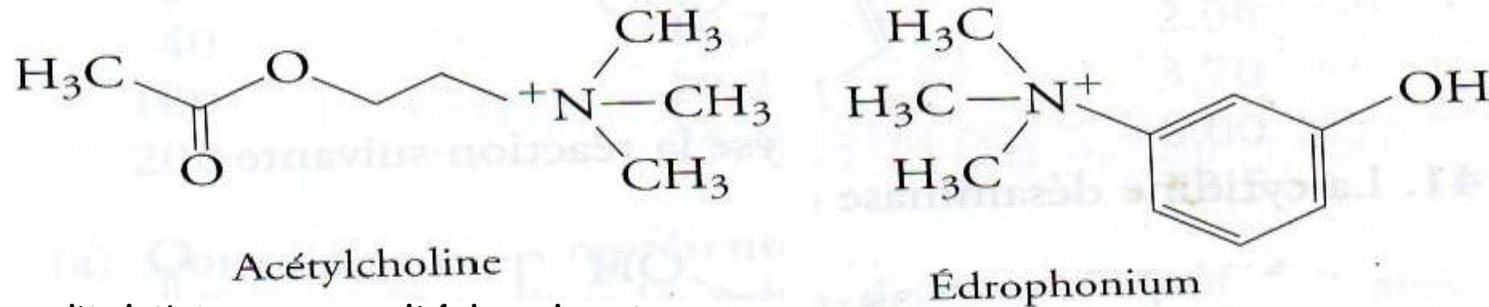
Solution:

Le N-Acétylestérol avec sa valeur la plus basse de K_m , a la plus haute affinité pour la chymotrypsine.

(le résidu aromatique de tyrosine s'insère mieux dans la « poche » non polaire de l'enzyme que le résidu aliphatique plus petit de valine).

Exercice 2 :

Des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase comme l'édrophonium sont utilisés dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. L'acétylcholine est le substrat de l'acétylcholinestérase.



A- Quelle sorte d'inhibiteur est l'édrophonium ?

B- L'inhibition par l'édrophonium peut-elle être vaincue par une augmentation de la concentration en substrat ?

C- Cet inhibiteur se fixe-t-il à l'enzyme de façon réversible ou irréversible ?

Solution:

A- Puisque les 2 structures sont similaires (les 2 ont des groupes de choline), l'inhibiteur est compétitif. (les inhibiteurs compétitifs sont en compétition avec le substrat pour la fixation au site actif, les structures doivent donc être similaires).

B- Oui, l'inhibition peut être surmontée si l'on ajoute de grandes quantités de substrat, il sera capable d'une compétition efficace avec l'inhibiteur de sorte que très peu d'inhibiteur se fixera au site actif. (le substrat « gagne » la compétition lorsqu'il est en excès).

C- Comme tous les inhibiteurs compétitifs, l'inhibiteur se fixe de façon réversible.

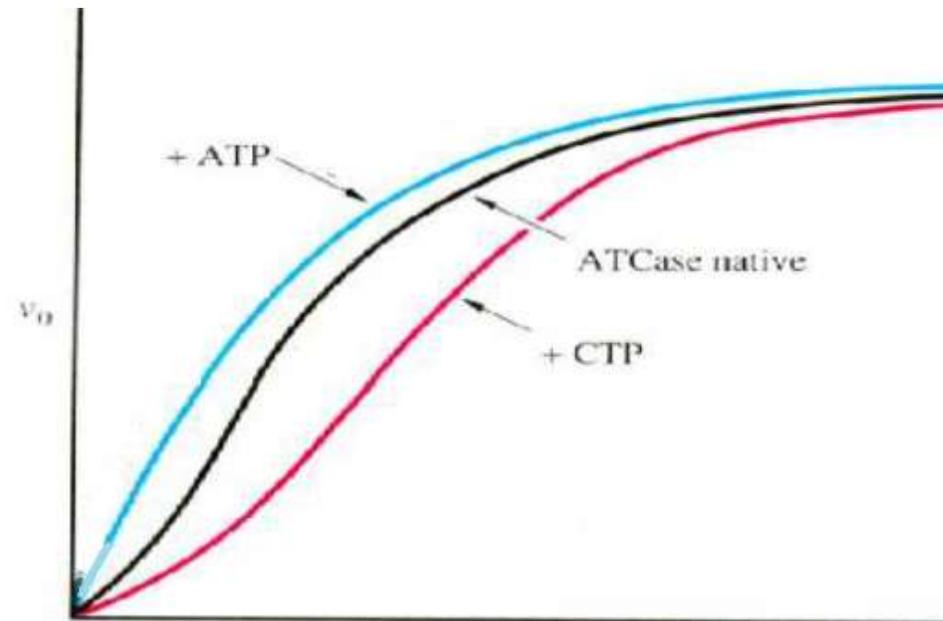
Exercice 3:

L'aspartate transcarbamylase (ATCase) catalyse la formation de N-carbamyl aspartate à partir de carbamyl phosphate et d'aspartate, c'est une des étapes du processus multienzymatique de la synthèse de la cytidine triphosphate (CTP).

ATCase

carbamyl phosphate + aspartate \rightarrow N-carbamyl aspartate \rightarrow \rightarrow \rightarrow UMP \rightarrow \rightarrow UTP \rightarrow CTP

Les études cinétiques de l'activité de l'ATCase en fonction de la concentration en aspartate produisent les résultats montrés dans ce graphe :



A- L'ATCase est-elle une enzyme allostérique ?

- L'ATCase est une enzyme allostérique. Puisque la courbe de son activité en fonction de [S] est de forme sigmoïde

B- Quelle sorte d'effecteur est le CTP ? Quelle est la signification biologique de l'action du CTP sur l'ATCase ?

- Le CTP est un effecteur négatif ou inhibiteur.

Puisque lors de l'addition de CTP, le K_m augmente et donc l'affinité de l'enzyme pour le substrat diminue. Le CTP est le produit final de la voie de biosynthèse des pyrimidines. Lorsque la concentration en CTP est suffisante pour les besoins de la cellule, le CTP inhibe une enzyme du début de la voie de biosynthèse « l'ATCase » par rétroinhibition.

C- Quelle sorte d'effecteur est l'ATP ? Quelle est la signification biologique de l'action d'ATP sur l'ATCase ?

- L'ATP est un effecteur positif ou activateur.

Puisque lors de l'addition d'ATP, le K_m diminue et donc l'affinité de l'enzyme pour le substrat augmente. L'ATP est un réactif dans la séquence de réactions, il sert donc d'activateur.

L'ATP est aussi un nucléotide purique tandis que le CTP est un nucléotide pyrimidique.

La stimulation de l'ATCase par l'ATP favorise la synthèse de CTP quand il y a beaucoup d'ATP équilibrant ainsi les pools cellulaires de nucléotides puriques et pyrimidiques.

VITAMINES ET COENZYMES

Les vitamines:

- Sont des nutriments essentiels, dont l'organisme est incapable de faire la synthèse et qui doivent donc être apportés par l'alimentation où elles se trouvent généralement en petites quantités.
- Les exigences en vitamines varient avec l'organisme considéré (tous les organismes n'ont pas les mêmes besoins)
- Ces substances sont subdivisées en vitamines hydrosolubles et liposolubles
- A l'exception de la vitamine C (acide ascorbique) toutes les vitamines hydrosolubles sont soit directement soit après transformation métabolique d'importants constituants des systèmes enzymatiques appelés: coenzymes.
- les vitamines liposolubles ne sont pas directement apparentées aux coenzymes mais elles ont néanmoins un rôle essentiel dans plusieurs processus physiologiques fondamentaux comme la vision, la formation et le maintien liposolubles de la structure osseuse, la coagulation sanguine

Les coenzymes :

- Les coenzymes sont des molécules de faible masse moléculaire qui donnent une spécificité chimique à certaines réactions enzymatiques.
- Ils peuvent aussi avoir un rôle transporteur d'un groupe fonctionnel spécifique, par exemple de groupe méthyle ou acétyle.
- Les coenzymes agissant de concert avec les enzymes appropriés, accroissent la variété des réactions métaboliques.
- Les coenzymes sont généralement modifiés par ces réactions puis retrouvent leur état original sous l'action d'autres enzymes (parfois du même enzyme).
- Constamment recyclés, ils ne sont présents qu'en très petite quantité.

La liste des coenzymes dérivés des vitamines hydrosolubles :

Vitamine Hydrosolubles	Coenzyme dérivé	Rôle	Maladie
Acide ascorbique (C)	Ascorbate	Cofacteur de l'hydroxylation du collagène	Scorbut
Thiamine (B1)	Thiamine pyrophosphate	Cofacteur des réactions de transfert d'aldéhyde	Béribéri
Nicotinamide (niacine, B3)	Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD+) Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP+)	Cofacteur des réactions d'oxydoréduction	Pellagre
Riboflavine (B2)	Flavine adénine dinucléotide (FAD) Flavine mononucléotide (FMN)	Cofacteur des réactions d'oxydoréduction	
Acide pantothénique(B5)	Coenzyme A	Cofacteur des réactions de transfert d'acyle	
Pyridoxal, pyridoxine, pyridoxamine (B6)	Pyridoxal phosphate	Cofacteur des réactions de transfert d'acide aminé	
Cobalamine (B12)	5'-désoxyadénosylcobalamine Méthylcobalamine (cobalaminiques)	Cofacteur des réactions d'alkylation	Anémie
Biotine(B7)	Complexes biotine-lysine (biocytine)	Cofacteur des réactions de carboxylation	
Acide lipoïque	Complexes lipoyl-lysine (lipoamide)	Cofacteur des réactions de transfert d'acyle	
Acide folique	Tétrahydrofolate	Cofacteur des réactions de transferts monocarbonés	Anémie

Les vitamines liposolubles :

Vitamine liposolubles	Rôle	Maladie
Vitamine A (rétinol)	Pigment absorbant la lumière	Cécité
Vitamine D	Hormone promotrice de l'absorption de Ca^{2+}	Rachitisme
Vitamine E (tocophérol)	Antioxydant	
Vitamine K (phylloquinone)	Cofacteur de la carboxylation des protéines de la coagulation sanguine	Saignements

Exemples de maladies:

Vitamine B12 et anémie pernicieuse

- La vitamine la plus active connue, celle dont les besoins pour l'organisme sont les plus faibles, fut la dernière vitamine découverte.
- Elle prévient l'anémie pernicieuse (anémie de Biermer).
- En 1926, Minot et Murphy ont montré que l'ingestion de grandes quantités de foies permettait de traiter avec succès cette maladie. L'agent actif présent dans le foie fut identifié en 1948.
- 2 formes de vitamines B12 ont été cristallisées, la 1^{ère} la cyanocobalamine semblait être la vraie vitamine. La seconde, l'hydroxycobalamine avait la même activité biologique mais son spectre était différent (vitamine B12b).
- Les exigences nutritionnelles en B12 sont très faibles, un adulte humain n'a besoin que de 3 μ g par jour, une quantité facilement obtenue par une alimentation normale. Mais comme les plantes ne synthétisent pas de vitamine B12, des symptômes d'anémie pernicieuse sont parfois observés chez les végétariens les plus stricts.

Acide ascorbique et scorbut

- L'acide ascorbique est efficace dans la prévention et le traitement du scorbut.
- Cette maladie qui peut être mortelle se caractérise par une anémie, une fragilisation de la structure du collagène des os, des dents, des tissus conjonctifs et une altération du métabolisme protéique.
- C'est une vitamine qui a souvent modifié le cours de l'histoire, mettant fin aux grands voyages à travers les océans et aux campagnes militaires: quand les aliments avaient perdu leur vitamine C.
- Albert Szent-Györgyi a isolé l'acide ascorbique en 1928 et l'a dénommé acide hexuronique.
- Sa structure a été déterminée par Hirst et Haworth en 1933 et simultanément Reichstein en a publié la synthèse.
- Haworth et György ont proposé de changer son appellation en celle d'acide L-ascorbique pour rappeler son activité antiscorbutique (anti scorbut). Tous 2 ont eu le prix Nobel en 1937 pour leurs recherches sur la vitamine C.

Thiamine et béribéri

- La thiamine ou vitamine B1 est essentielle pour la prévention du béribéri, une affection du système nerveux qui fut pendant des siècles très fréquente en Extrême-Orient. La carence en vitamine B1 conduit à une asthénie générale accompagnée de nombreux troubles et à la mort.
- En 1882, le directeur général du département de la marine japonaise montra qu'il était possible de prévenir la carence par une modification des habitudes alimentaires.
- 10 ans plus tard, un Hollandais a montré qu'il y avait une substance « anti-béribéri » dans les polissures (le son) de riz.
- Des poulets nourris par du riz poli présentaient des symptômes de paralysie et rétraction du cou qui s'estompaient si la nourriture des volatiles était enrichie avec les couches externes et l'embryon du riz éliminés lors du polissage du riz.
- En 1911, Casimir Funk a isolé du son de riz puis cristallisé, la substance qui guérissait les oiseaux du béribéri. Il a appelé ce produit vitamine du béribéri « amine vitale ».
- En 1935, la structure de la vitamine B1 a été déterminée et on a mis au point d'une méthode de synthèse.

Vitamine D et rachitisme

- La vitamine D est une famille de molécules très voisines qui sont actives dans la prévention du rachitisme, une maladie observée au cours de la croissance.
- Cette maladie se caractérise par une mauvaise absorption intestinale du calcium et une mauvaise réabsorption du calcium et du phosphate par les reins. La persistance de ce trouble aboutit à une déminéralisation des os
- Les symptômes du rachitisme sont la courbure des jambes, les genoux cagneux, la déformation de la colonne vertébrale, de la ceinture pelvienne et de la cage thoracique.
- Tous ces symptômes sont la conséquence de la pression mécanique normale exercée sur des os déminéralisés.
- La carence en vitamines D chez les adultes conduit à un ramollissement des os et du cartilage, une affection connue sous le nom d'ostéomalacie.