

Cours d'Enzymologie



Destiné aux étudiants **L3 Génétique**

Année universitaire 2022-2023

Conçu par Dr. BECHKRI S.
Maitre de Conférences catégorie A
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Université Frères Mentouri Constantine 1

XII. Cinétique non Michaelienne

Jusqu'ici, nous nous sommes concentrés sur les plus simples des réactions enzymatiques, (les réactions avec un substrat et un produit). Ces réactions ne représentent qu'une petite partie des réactions enzymatiques connues, dont beaucoup mettent plusieurs substrats et plusieurs produits en jeu, procèdent en plusieurs étapes ou ne satisfont pas aux conditions du modèle cinétique de Michaelis-Menten.

XII.1. Les enzymes allostériques

XII.1.1. Définitions

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

Le terme allostérique désigne un site enzymatique différent du site actif, qui est non compétitif, et qui lie une molécule autre que le substrat et peut influencer l'activité enzymatique.

Les enzymes allostériques sont une classe d'enzymes de régulation par liaison non covalente réversible, de molécules régulatrices à l'enzyme. Les molécules régulatrices qui se lient aux sites allostériques sont appelées effecteurs allostériques ou modulateurs allostériques.

Remarque : substrats et effecteurs s'appellent ligands de l'enzyme allostérique.

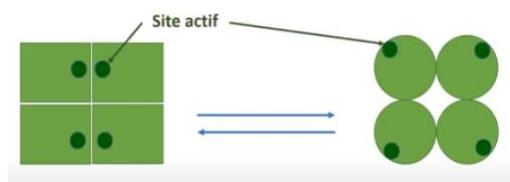
• Rappel : la structure oligomérique

Les enzymes oligomériques ont une structure quaternaire oligomérique, c'est-à-dire qu'elles sont constituées d'un petit nombre de protomères identiques ou différents (de 2 à 12).

XII.1.2. Propriétés générales

Les enzymes allostériques :

- Se distinguent des autres enzymes par le fait qu'elles n'obéissent pas à la loi de Michaelis-Menten.
- Ont une structure quaternaire oligomérique caractérisée par l'existence de sous-unités en nombre pair : chaque sous-unité a un site actif. Cela signifie qu'une enzyme à structure quaternaire peut lier plus d'une molécule de substrat. Il y a donc plusieurs sites actifs et allostériques dans la molécule d'enzyme : en général, un site actif et un site allostérique par protomère.



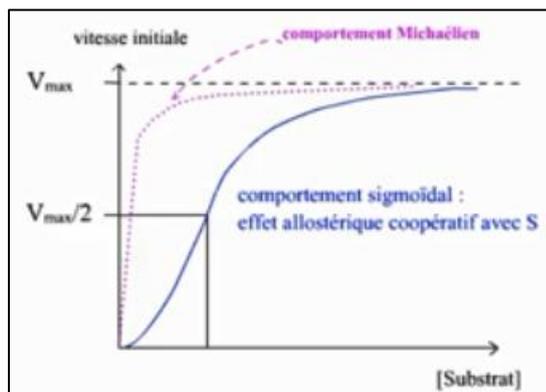
Comme dans tous les complexes protéiques, les protomères sont liés par des liaisons non covalentes. La dissociation d'une enzyme allostérique en protomères peut entraîner

une perte de l'activité catalytique, mais elle peut aussi se traduire par la disparition du comportement allostérique, le protomère isolé obéissant à la loi de Michaelis-Menten.

- Sont douées de coopérativité : la fixation d'une molécule va aider (accélérer) la fixation de la molécule suivante.
 - Coopération positive : la liaison d'un substrat avec un site actif facilite la réaction d'un autre substrat à un autre site actif.
 - Coopération négative : la réaction d'un substrat avec un site actif rend plus difficile la réaction d'un substrat à l'autre site actif.

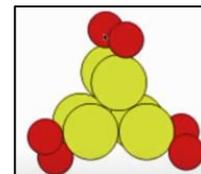
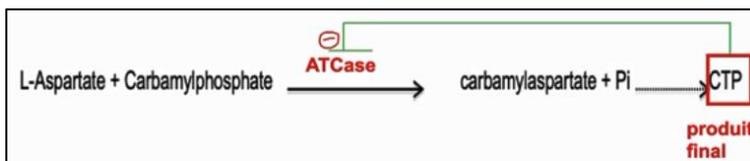
Dans le cas où il n'y a pas de coopérativité (enzymes Michaeliennes par exemple), la courbe a une allure de branche d'hyperbole.

- Possèdent une cinétique le plus souvent sigmoïde (en forme de S), ce qui indique une coopérativité positive (voir plus loin). Selon si la coopérativité est forte ou faible, la courbe en forme de sigmoïde est plus ou moins prononcée.



Remarque : dans le type classique de l'inhibition compétitive, l'inhibiteur (I) est un analogue structural du substrat (S) et tend à occuper le même site que ce dernier. Il s'agit d'un inhibiteur isostérique (isostérie). Par contre, si l'inhibiteur ne montre pas d'analogie structurale avec le substrat, il occupera un autre site sur l'enzyme, il est donc qualifié d'inhibiteur allostérique (allostérie).

Exemple : aspartate transcarbamylase (ATCase) d'*E. coli* qui est la première enzyme de la voie métabolique qui synthétise le CTP, selon la réaction ci-dessous :



Cette enzyme est composée de :

- Protomères catalytiques (2 trimères) fixant le substrat de manière non coopérative et pour lesquels la courbe $v_i=f[S]$ est une hyperbole

- Protomères régulateurs (3 dimères) dépourvus d'activité catalytique, mais capables de fixer les effecteurs (CTP comme inhibiteur et ATP comme activateur).

Cet exemple démontre la présence de sites allostériques distincts des sites actifs.

XII.1.3. 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

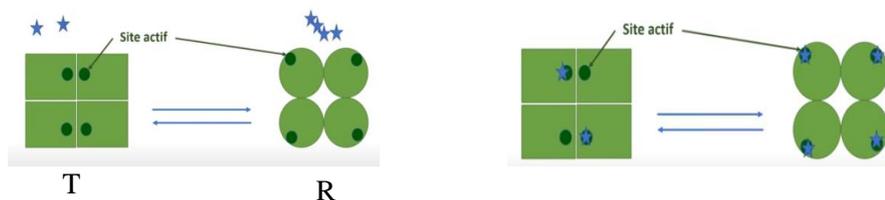
XII.1.4. Conformations tridimensionnelles

Les enzymes allostériques ont deux structures quaternaires possibles :

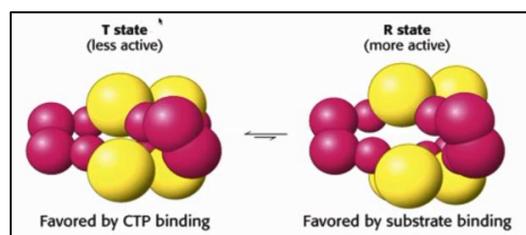
- La conformation inactive est appelée T (Tendue) car les liaisons interprotomériques y sont fortes. L'état T a une activité catalytique plus faible et une faible affinité pour le substrat. Il fixe le(s) inhibiteur(s). Lorsqu'il y a peu de substrat, l'enzyme reste sous forme T
- La conformation active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



Exemple de l'ATCase

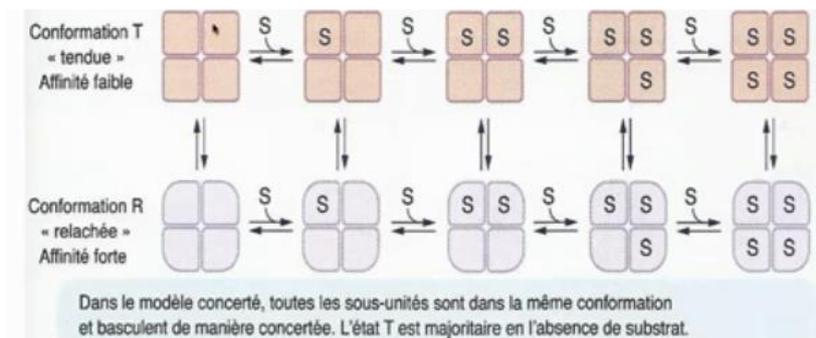


XII.1.5. Différents modèles moléculaires

Deux modèles différents ont été proposés pour expliquer la fixation coopérative des ligands. Ils reposent sur l'hypothèse de l'existence des deux conformations tridimensionnelles T et R.

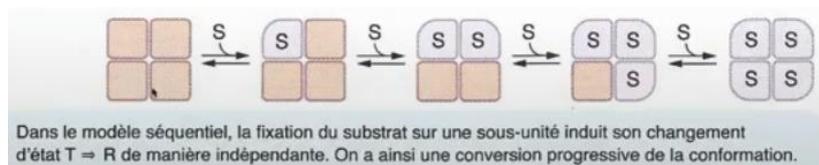
- **Le modèle concerté** : proposé en 1965 par Monod, Wyman et Changeux

Dans ce modèle, les molécules d'enzyme se répartissent entre les deux conformations T et R, qui sont en équilibre. Au sein d'une même molécule d'enzyme, tous les protomères sont identiques et adoptent la conformation R ou T.



- **Le modèle séquentiel** : proposé en 1966 par Koshland, Nemethy et Fischer (KNF)

La fixation d'un ligand sur l'un des protomères d'une molécule d'enzyme fait basculer ce protomère dans l'état R ou T selon que le ligand est substrat, activateur ou inhibiteur. Ce basculement ou transition allostérique se répercute d'un protomère au protomère voisin, d'où une coopérativité entre les différents protomères. Il existe donc dans ce modèle des formes intermédiaires dans lesquelles les protomères sont soit sous la forme R soit sous la forme T. Chaque sous unité change indépendamment à une conformation différente, différentes sous unités peuvent avoir des affinités différentes pour le substrat.

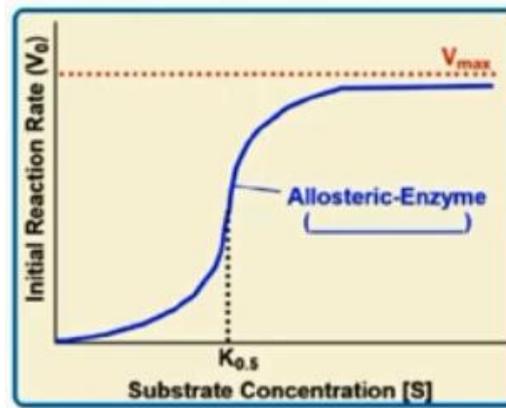


Les enzymes allostériques permutent entre les formes actives et inactives en raison de la liaison des substrats au site actif et des molécules régulatrices à d'autres sites.

XII.1.6. Cinétique d'une enzyme allostérique

La cinétique des enzymes allostériques n'est pas Michaëlienne. La liaison au site allostérique modifie l'activité de l'enzyme, ce qu'on appelle la liaison coopérative. Les enzymes allostériques affichent un tracé sigmoïdal $v_0=f[S]$.

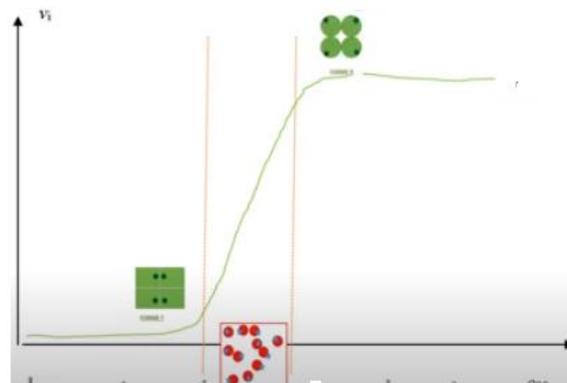
Bien que l'équation de référence de Michaelis-Menten ne s'applique pas ici, K_M et V_{max} peuvent être estimés et servir à caractériser l'activité enzymatique.



Dans cette courbe sigmoïde :

- A faibles [S], l'enzyme est inactive (conformation inactive) : la vitesse est faible, peu d'enzymes sont sollicitées.
- Le substrat se lie à l'enzyme et déclenche un changement de conformation de la forme active de l'enzyme
- Une fois le premier substrat lié, le second substrat et les substrats suivants se lient plus facilement (coopérativité)
- Le résultat du changement de la forme active est une forte augmentation de la liaison des substrats, et par conséquent de la vitesse de réaction sur une plage étroite de concentration du substrat
- Lorsque tous les sites actifs de l'enzyme allostérique sont occupés par un substrat, un plateau est atteint ($v_i = V_{max}$) : toutes les enzymes sont sollicitées.

Ainsi, lorsque la vitesse initiale est faible, cela correspond à peu d'enzymes sollicitées par le substrat, l'enzyme est sous la forme T (de faible affinité pour le substrat), alors que lorsque la concentration en substrat est très élevée, la forme T bascule vers la forme R (de forte affinité pour le substrat) et la vitesse initiale est maximale. Il existe donc un petit intervalle de concentration de substrat pour lequel l'enzyme passe rapidement de la forme T à la forme R :



Ce qui donne cette allure de courbe que l'on n'observe pas pour une enzyme Michaelienne dans laquelle il n'y a pas de basculement de la forme T vers la forme R.

Comme l'affinité de l'enzyme change avec la concentration du substrat, elle ne peut pas être décrite par une simple cinétique de Michaelis-Menten. Elle est plutôt caractérisée par :

- Une concentration du substrat donnant un taux demi-maximal, $[S]_{0,5}$
- La vitesse initiale ne répond pas à la formule de Michaelis-Menten, mais à celle de Hill (courbe sigmoïde)

Soit :



K_H (constante de Hill) : La constante d'équilibre ; elle correspond à la concentration en substrat pour laquelle la moitié de l'enzyme est saturée (on parle de $K_{0,5}$ ou $K_{1/2}$)

n (nombre de Hill ou indice de coopérativité) : fournit une mesure de la coopération du substrat se liant à l'enzyme. Plus n est grand, plus la coopérativité est forte.

Ce nombre est supérieur à 1 et inférieur ou égal au nombre des sites actifs par molécule d'enzyme.

$n > 1$: coopérativité positive

$n = 1$: coopérativité nulle (Michaelis-Menten)

$n < 1$: coopérativité négative

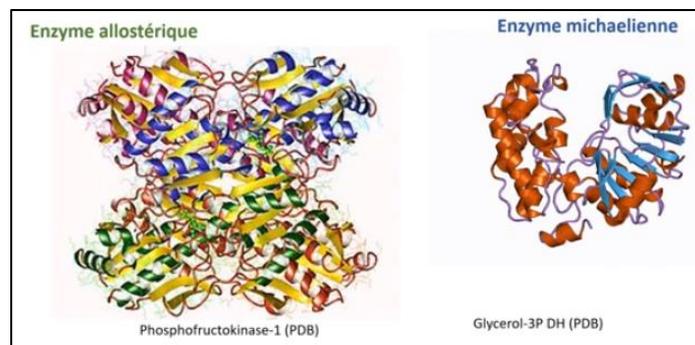
n entre 0 et 1 : anticoopérativité

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]^n}{(K_{0,5})^n + [S]^n}$$

Equation de Hill

XII.1.7. Comparaison entre les enzymes allostériques et les enzymes Michaeliennes

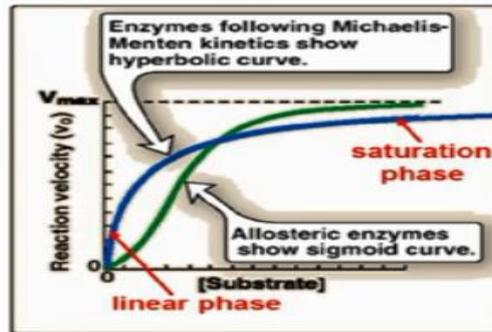
Ci-dessous un schéma de la structure d'une enzyme allostérique et d'une enzyme Michaelienne :



L'enzyme allostérique présente plusieurs sous unités identiques, tandis que l'enzyme Michaelienne, ici, n'a qu'une seule sous unité.

Attention : il y a des enzymes Michaeliennes qui ont plusieurs sous unités, mais l'enzyme allostérique a des sous unités qui coopèrent ; l'enzyme Michaelienne peut avoir plusieurs sous unités mais qui ne coopèrent pas entre elles.

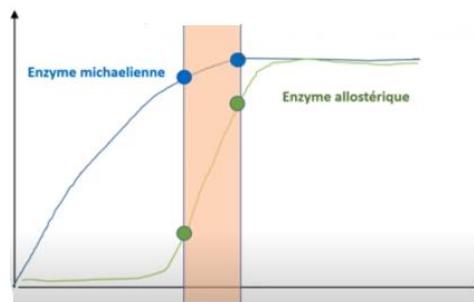
Pour une enzyme Michaelienne, la courbe a une forme hyperbolique, alors que pour une enzyme allostérique, la courbe a une forme sigmoïde.



Dans la courbe de l'enzyme allostérique, pour des concentrations de substrat suffisamment élevées, on atteint la valeur de $v_i = V_{max}$. Cela signifie que l'enzyme est saturée. Nous obtenons la même chose pour l'enzyme Michaelienne, l'enzyme sera saturée en substrat.

Lorsque la concentration en substrat est faible, l'enzyme est peu saturée en substrat. Donc, la vitesse initiale n'est pas égale et est loin de la V_{max} . On observait la même chose sur la courbe d'une enzyme Michaelienne.

Donc, c'est sur la partie intermédiaire de la courbe que l'on voit que le comportement d'une enzyme Michaelienne et celui d'une enzyme allostérique diffère : pour un petit intervalle de concentration en substrat pour l'enzyme allostérique, on voit que la vitesse initiale passe brutalement d'une valeur faible à une valeur élevée. Pour ce même intervalle de concentration en substrat, la vitesse initiale de l'enzyme Michaelienne n'augmente que très faiblement.



XII.3.8. Régulations de l'activité des enzymes allostériques : effecteurs allostériques

Certaines enzymes qui se trouvent au niveau de carrefours métaboliques sont allostériques, ce qui permet de réguler de manière efficace ces voies.

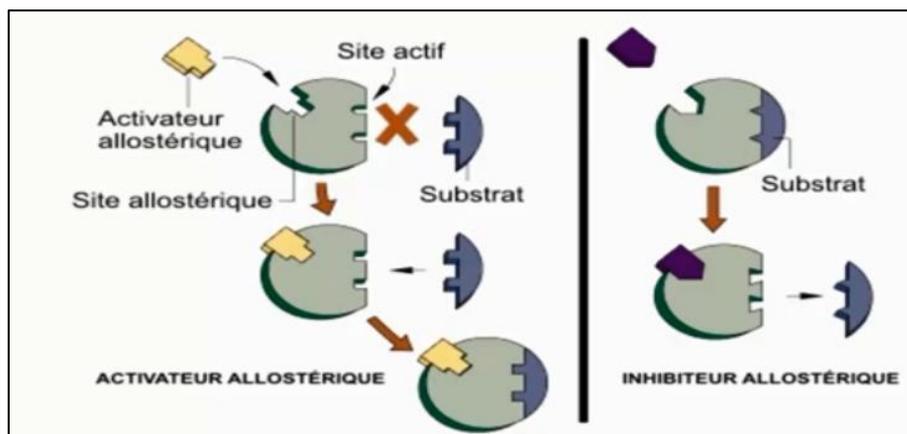
Les enzymes allostériques sont régulées par des effecteurs (ou modificateurs) allostériques de faible poids moléculaire, qui n'ont généralement que peu ou pas de ressemblance structurale

avec les substrats ou les coenzymes et se lie de façon non covalente sur un site allostérique autre que le site actif. La présence d'un effecteur allostérique peut modifier l'affinité de l'enzyme pour son substrat, ou modifier l'activité catalytique maximale de l'enzyme, ou les deux.

a. Effecteurs inhibiteurs et effecteurs activateurs

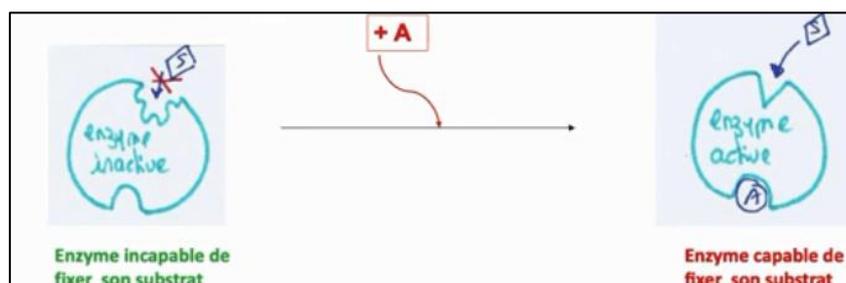
Rappelons que le terme allostérique provient du fait que ces enzymes sont inhibées ou activées par des effecteurs, inhibiteurs ou activateurs, stériquement différents du ou des substrats. Ces effecteurs se lient à des sites allostériques distincts du site actif, par des liaisons non covalentes et le complexe (enzyme-effecteur) est réversible (dissociable). Leur fixation se traduit par un abaissement ou un accroissement de la vitesse initiale.

Une enzyme allostérique peut généralement avoir deux formes différentes : une forme active et une forme inactive. L'effecteur, en se fixant sur son site allostérique, a pour effet de bloquer l'enzyme dans sa forme active ou dans sa forme inactive (cela dépend de l'enzyme). On parle alors d'effecteur inhibiteur et d'effecteur activateur.



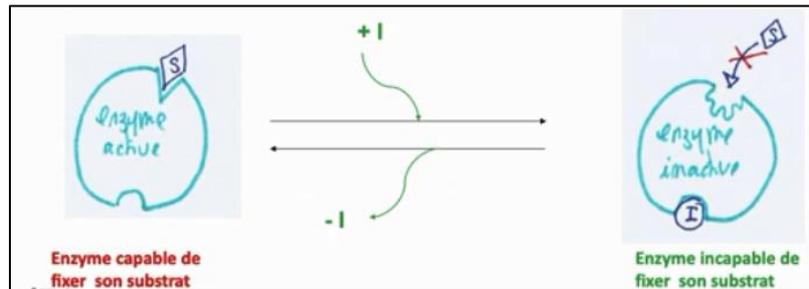
- **Effecteur activateur** : rend une enzyme, normalement inactive, active en se fixant à son site allostérique. Lorsque l'activateur se fixe au site allostérique, l'enzyme prend sa forme active. Si l'activateur se sépare de l'enzyme, celle-ci reprend sa forme inactive. Ce type d'enzyme n'est fonctionnel que si elle est liée à son effecteur. Sans effecteur, l'enzyme est biologiquement inactive.

Schéma correspondant :



- **Effecteur inhibiteur** : a pour effet de bloquer une enzyme dans sa forme inactive : en se liant au site allostérique, l'effecteur inhibiteur modifie la conformation du site actif et la forme de l'enzyme qui devient alors inactive. Ceci peut modifier soit l'affinité de l'enzyme pour le substrat, soit la vitesse de la réaction. Tant que l'inhibiteur est lié au site allostérique, l'enzyme garde sa forme inactive. Elle n'est pas fonctionnelle. Si l'inhibiteur se sépare du site allostérique, l'enzyme reprend sa forme active.

Schéma correspondant :



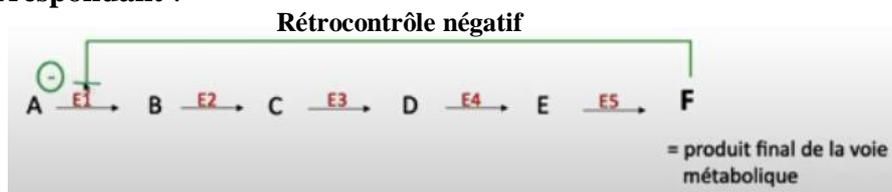
b. Rétroinhibition

Dans une chaîne métabolique dont la première étape est catalysée par une enzyme allostérique, le produit final de la chaîne de réaction peut inhiber cette enzyme bien qu'il n'ait aucune analogie avec le substrat. C'est le phénomène de rétroinhibition ; il joue un rôle très important dans la régulation du métabolisme cellulaire. La fixation de la molécule effectrice induit un changement de conformation spatiale de la protéine enzymatique. Dans le cadre de l'allostérie, cela a pour conséquence de modifier le site de liaison de l'un au moins des réactifs impliqués dans le processus de catalyse.

Illustration :

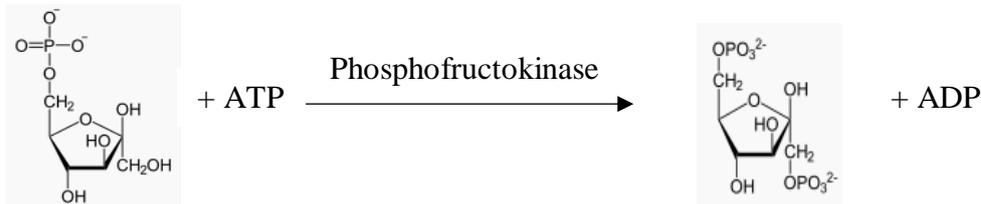
Pour la synthèse de F à partir de A, catalysée par les enzymes E1 à E5 : une concentration élevée de F inhibe de façon spécifique la conversion de A en B ; ceci reflète le pouvoir de F de se fixer à E1 et de l'inhiber. F agit donc comme un effecteur allostérique négatif ou inhibiteur rétroactif de E1. Cette rétro inhibition de E1 par F régule par conséquent la synthèse de F. Ce dernier se fixe sur un site allostérique éloigné du site catalytique sur l'enzyme inhibée. E1 est l'enzyme allostérique de cette voie de synthèse (car c'est la seule qui peut être régulée par le produit final).

Schéma correspondant :



Exemple :

Les effets allostériques participent à la régulation physiologique de la phosphofructokinase, qui catalyse la réaction :

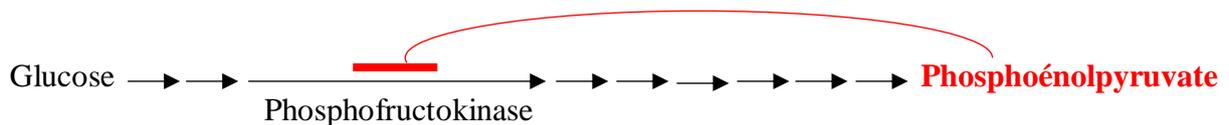


Fructose-6-phosphate

Fructose-1,6-bisphosphate

Cette réaction de phosphorylation constitue l'étape 3 de la glycolyse.

La réaction de la phosphofructokinase est inhibée par le phosphoénolpyruvate qui est le produit de la réaction 9 de la glycolyse. Le phosphoénolpyruvate est un exemple de rétro-inhibiteur ; lorsque sa concentration cellulaire est suffisamment élevée, il arrête sa propre synthèse en bloquant une étape plus précoce de sa voie biosynthétique :



La phosphofructokinase de la bactérie *Bacillus stearothermophilus* est un tétramère avec quatre sites actifs. Elle se fixe au fructose-6-phosphate selon une cinétique hyperbolique avec un K_M de 23 μM . En présence d'une concentration 300 μM de phosphoénolpyruvate comme inhibiteur, la fixation du fructose-6-phosphate devient sigmoïde et la K_M augmente jusqu'à environ 200 μM . L'inhibiteur n'affecte pas V_{max} mais la phosphofructokinase devient moins active car son affinité apparente pour le fructose-6-phosphate diminue.

Comment le phosphoénolpyruvate exerce-t-il son effet inhibiteur ? La courbe sigmoïde de la vitesse en fonction de la concentration en substrat indique que les sites actifs de la phosphofructokinase ont un comportement coopératif en présence de phosphoénolpyruvate.

Dans chaque sous-unité, l'inhibiteur se fixe dans une poche qui est séparée du site de fixation du fructose-6-phosphate du dimère voisin par une boucle de la protéine. Lorsque le phosphoénolpyruvate occupe son site de fixation, la protéine se referme sur lui. Cela entraîne un changement de conformation. Cette commutation de la conformation diminue la fixation du fructose-6-phosphate. L'effet du phosphoénolpyruvate se communique à toute la protéine (effet coopératif) car la fixation du phosphoénolpyruvate à une des sous-unités de la phosphofruktokinase affecte la fixation du fructose-6-phosphate à la sous-unité voisine de l'autre dimère. Autrement dit, la fixation du phosphoénolpyruvate fait basculer tout le tétramère dans la conformation T (de faible activité), estimé par la valeur de l'affinité de liaison du

fructose-6-phosphate. Le phosphoénolpyruvate est de ce fait appelé **effecteur négatif** de l'enzyme.

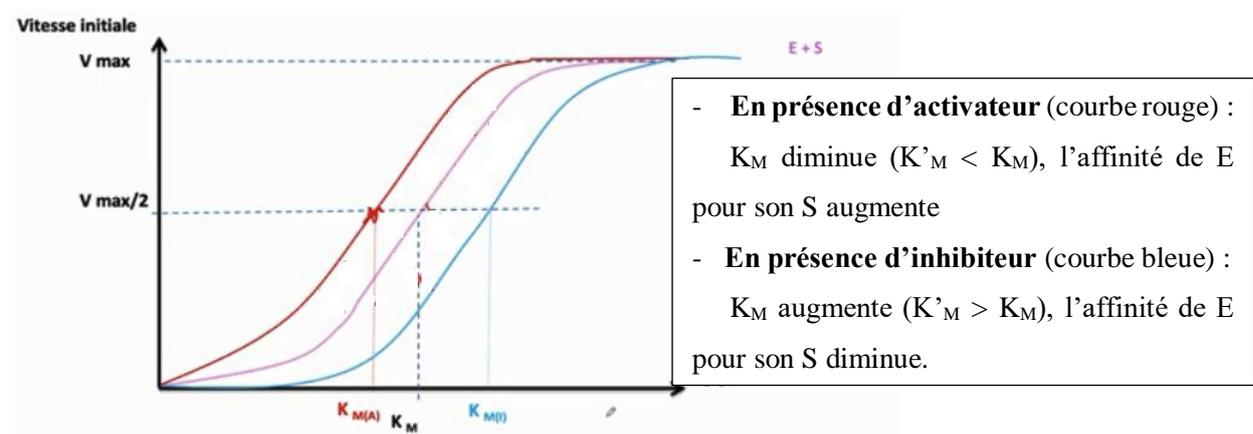
La phosphofructokinase peut aussi être activée de façon allostérique par l'ADP, un **effecteur positif** de l'enzyme. Bien que l'ADP soit un produit de la réaction catalysée par la phosphofructokinase, il est aussi un signal général des besoins accrus de la cellule en ATP, puisqu'en consommant l'ATP, le métabolisme produit de l'ADP : $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$. Comme la phosphofructokinase catalyse la réaction 3 de la voie glycolytique en 10 étapes, l'augmentation de l'activité de la phosphofructokinase peut augmenter la vitesse globale de production d'ATP par cette voie.

Il est à noter que l'ADP en tant qu'activateur ne se fixe pas au site actif (qui accepte l'ATP, son substrat et l'ADP comme produit de la réaction), mais au même site que celui où se fixe le phosphoénolpyruvate, l'inhibiteur. Par contre, comme l'ADP est beaucoup plus gros que le phosphoénolpyruvate, l'enzyme ne peut pas se refermer sur lui et le changement de conformation vers l'état T de faible activité est impossible. Au contraire, la fixation de l'ADP aide à maintenir l'enzyme à l'état R fortement actif. Le résultat global est que l'ADP contrecarre l'effet inhibiteur du phosphoénolpyruvate et stimule l'activité de la phosphofructokinase.

c. Effet de désensibilisation

L'effet allostérique peut disparaître sous l'action de la température ou par traitement chimique (urée). Dans ce cas, on observe que l'enzyme régulatrice n'est plus sensible à l'effecteur car 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 et il n'y a plus de coopérativité entre plusieurs sites actifs de l'enzyme. La cinétique devient alors de type Michaelien.

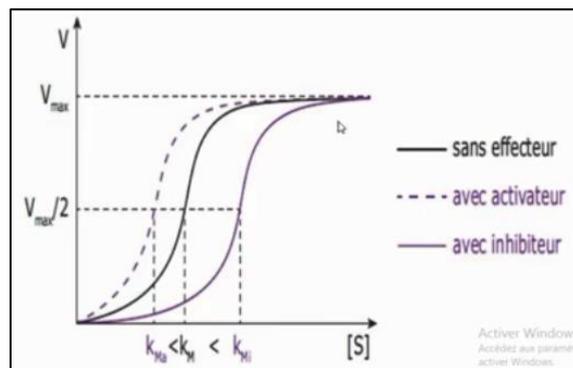
d. Activité enzymatique d'une enzyme allostérique en présence de son substrat et soit d'un activateur, soit d'un inhibiteur allostérique



e. Effecteurs de type K et de type V

• Effecteurs de type K (les plus fréquents)

Le substrat et les effecteurs ont des affinités différentes pour les formes R et T de l'enzyme. Ainsi, les inhibiteurs augmentent le K_M , les activateurs le diminuent, V_{max} est inchangée. Cela correspond au cas où substrat et activateur déplacent l'équilibre en faveur de l'état R, alors que l'inhibiteur le déplace en sens inverse vers l'état T (fixation sigmoïde). Cette situation rappelle l'inhibition compétitive à ceci près que la compétition entre S et I ne se fait pas au niveau d'un même site sur une même molécule d'enzyme, mais par déplacements opposés de l'équilibre entre les deux conformations R et T.

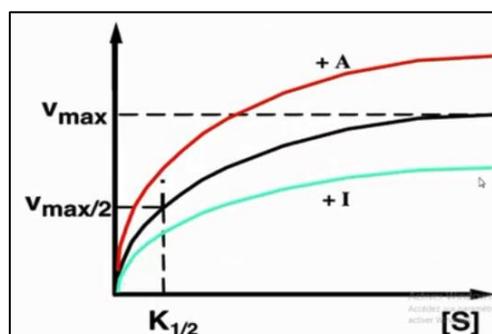


• Effecteurs de type V

Dans ce cas, le substrat a la même affinité pour les deux conformations R et T (K_M inchangé) et n'induit donc pas de transition allostérique.

La variation de vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat obéit à la loi de Michaelis-Menten (fixation hyperbolique du substrat).

- En présence de l'inhibiteur de type V, l'état T est privilégié et V_{max} est diminuée
- En présence de l'activateur de type V, c'est l'état R qui prédomine et V_{max} est augmentée. Ce deuxième cas rappelle donc l'inhibition non compétitive



Donc, selon que l'enzyme allostérique soit de type K ou V, la courbe $v_0 = f [S]$ est une sigmoïde ou une hyperbole mais dans tous les cas, les effecteurs induisent la transition allostérique en

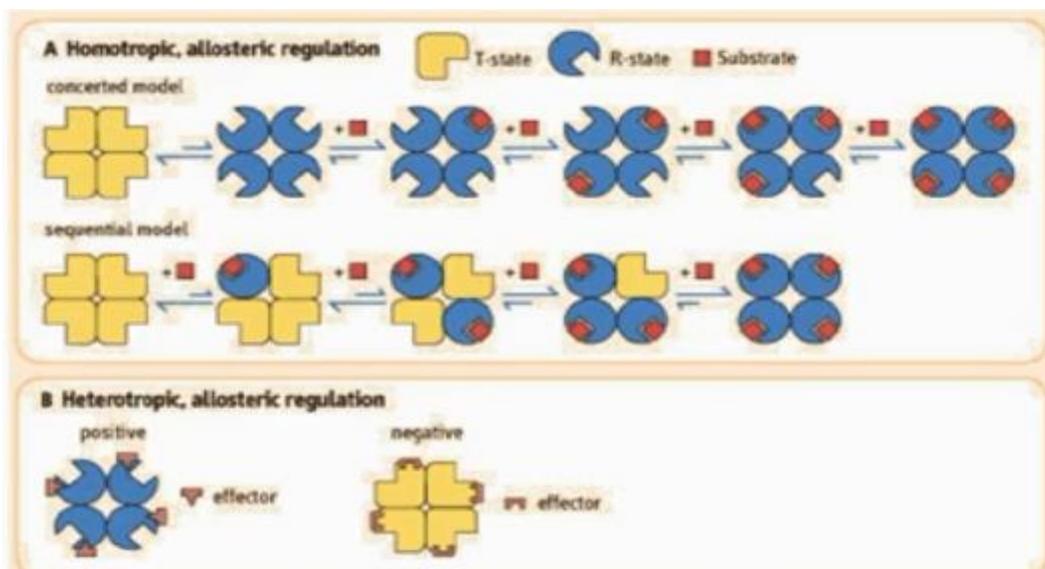
faveur de l'état capable de les fixer, ceci se traduisant par les courbes sigmoïdes $v_0 = f [A]$ ou $v_0 = f [I]$.

f. Effet homotropique et effet hétérotropique

Les effecteurs qui inhibent l'activité enzymatique sont appelés effecteurs négatifs. Les effecteurs qui augmentent l'activité enzymatique sont appelés effecteurs positifs.

Dans certains cas, le substrat exerce des effets allostériques, ce qu'on appelle un effet homotropique. Dans un tel cas, la présence d'une molécule de substrat à un site sur l'enzyme augmente la propriété catalytique de la liaison au substrat d'autres sites, c'est-à-dire leurs sites de liaison (coopérativité).

Si l'effecteur allostérique est différent du substrat, on parle alors d'effet hétérotropique.



XII.3.9. Importance des enzymes allostériques dans la régulation métabolique

enzymes	Effecteurs allostériques		Présence dans voie métaboliques
	Activateurs	Inhibiteurs	
Héxokinase	ATP	Glucose-6P	glycolyse
Phosphofructokinase	AMP	ATP, NADH, acide citrique	glycolyse
Pyruvate kinase	Fructose 1,6-diphosphate PEP	ATP, NADH, acide citrique	glycolyse
Pyruvate déshydrogénase	ADP	Acétyl-CoA, NADH	Entrée dans le cycle de Krebs
Isocitrate déshydrogénase	ADP	ATP, NADH	cycle de Krebs
Glycogène synthétase	Glucose-6P		Glycogénogénèse
Glycogène phosphorylase	AMP	ATP, Glucose-6P	Glycogénolyse
Fructose diphosphatase	ATP, citrate	AMP	Néoglucogénèse
Acétyl-coA carboxylase	Acide citrique	Palmityl-CoA	Synthèse des acides gras
Gluatmate déshydrogénase	ADP, GDP	ATP, GTP	Catabolisme des acides aminés