

# Coopérativité et allostérie

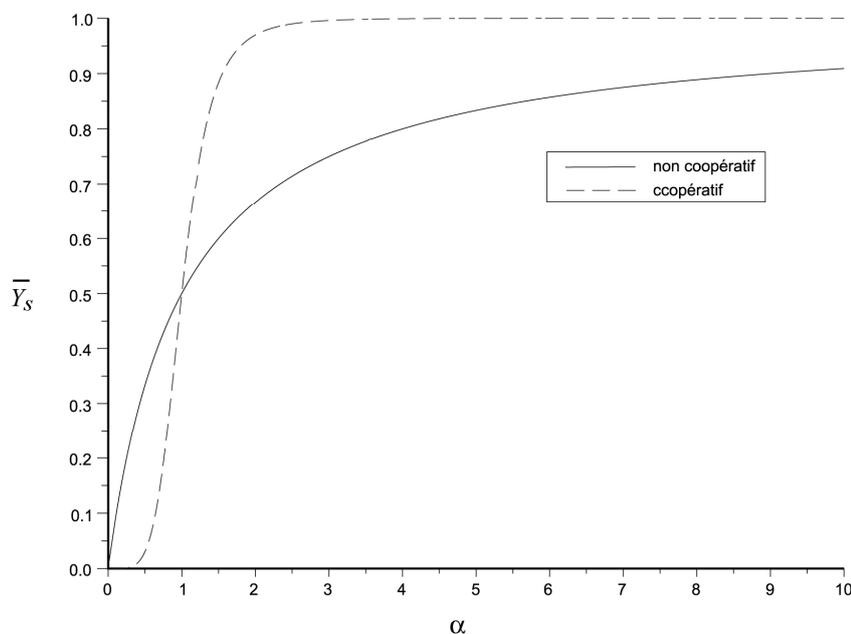
Ce chapitre présente les fondements de modèles à réponse non linéaire dans le domaine de la catalyse et du transport cellulaires, modèles qui, placés dans un contexte thermodynamique ouvert, sont à l'origine des phénomènes de multistabilité et d'oscillations étudiés plus avant dans cet ouvrage. L'accent est porté sur la nature formelle des éléments présentés, la maîtrise du formalisme permettant de comprendre en profondeur les principes et les propriétés d'un modèle.

L'environnement des êtres vivants est le siège de multiples et fréquentes perturbations. L'adaptation de l'activité des organismes aux conditions extérieures est assurée par des processus régulateurs qui s'exercent principalement au niveau de la catalyse des transformations biochimiques. Cette catalyse est assurée par une classe particulière de protéines appelées **enzymes**.

Les enzymes jouant un rôle clé dans le contrôle du métabolisme présentent un comportement cinétique caractérisé par le fait qu'ils sont capables de répondre avec une extrême sensibilité à de faibles variations de concentrations en ligands. Cette propriété est appelée **coopérativité** parce qu'elle résulte d'une coopération entre les sites actifs d'une protéine formée de plusieurs sous-unités et appelée protéine **oligomérique**.

## 1 Coopérativité et saturation sigmoïdale

Deux types de coopérativités doivent être distingués : la coopérativité positive et la coopérativité négative. Dans un processus à coopérativité positive, la fixation d'une première molécule de ligand sur une protéine favorise la fixation d'une deuxième molécule de ce même ligand, qui favorise elle-même la fixation de la troisième molécule, etc. Dans un phénomène de coopérativité négative, les fixations consécutives de molécules de ligand sont au contraire de plus en plus difficiles. La coopérativité positive constituera l'essentiel du propos de ce chapitre. Elle est de loin la plus fréquemment rencontrée et aussi celle à l'origine des phénomènes dynamiques étudiés dans cet ouvrage.



**Fig. 3.1 : fonctions de saturation hyperbolique (fixation non coopérative) et sigmoïdale (fixation coopérative).**

Nous allons voir plus loin qu'en absence de coopérativité, la fraction de sites occupés (ou **fonction de saturation**  $\bar{Y}_s$ ) d'une protéine augmente de manière hyperbolique (on parle aussi de **saturation michaélienne**) à mesure que croît la concentration du ligand  $S$ , l'équation de la fonction de saturation pouvant être écrite sous la forme :

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha}{1 + \alpha}$$

où

$\alpha = K[S]$  est la concentration normalisée (c'est-à-dire sans dimension) de  $S$ .

$K$  est la constante d'équilibre d'association entre le ligand  $S$  et la protéine.

Dans un modèle à coopérativité positive, la fonction de saturation  $\bar{Y}_s$  augmente de manière sigmoïdale avec la concentration de  $S$ , en accord avec l'équation empirique suivante (dite **équation de Hill**) :

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha^{n_h}}{1 + \alpha^{n_h}}$$

où  $n_h$  est l'indice de coopérativité (ou nombre de Hill).

Un simple calcul de dérivées<sup>1</sup> montre que la pente  $d\bar{Y}_s/d\alpha$  (ou son équivalent  $\Delta\bar{Y}_s/\Delta\alpha$  qui traduit l'intensité de la « réponse »  $\Delta\bar{Y}_s$  pour des différences  $\Delta\alpha$  finies) ne peut que diminuer à mesure que la protéine est saturée de manière hyperbolique par son ligand  $\alpha$ , alors que ce rapport augmente (à faible concentration en ligand) dans le cas d'une courbe de saturation sigmoïdale.

Le phénomène peut être visualisé (Fig. 3.2) en observant graphiquement les réponses  $\Delta Y$  à des variations successives d'amplitudes  $\Delta X$  égales de la variable  $\alpha$ , pour de petites valeurs de  $\alpha$ . Une protéine dont la courbe de saturation est sigmoïdale se distingue ainsi d'une protéine à saturation hyperbolique par le fait qu'à faible concentration de son ligand, l'amplitude de la « réponse » protéique augmente ( $\Delta Y_{i+2} > \Delta Y_{i+1} > \Delta Y_i$ ) avec son degré de saturation. En d'autres termes, tout se passe comme si la fixation des premières molécules de ligand rendait plus facile la fixation ultérieure d'autres molécules du même ligand (puisque pour un même  $\Delta X$ , le  $\Delta Y$  correspondant sera plus grand). En d'autres termes encore, les multiples sites semblent coopérer pour qu'une fois les premiers occupés, les autres lient plus facilement le ligand.

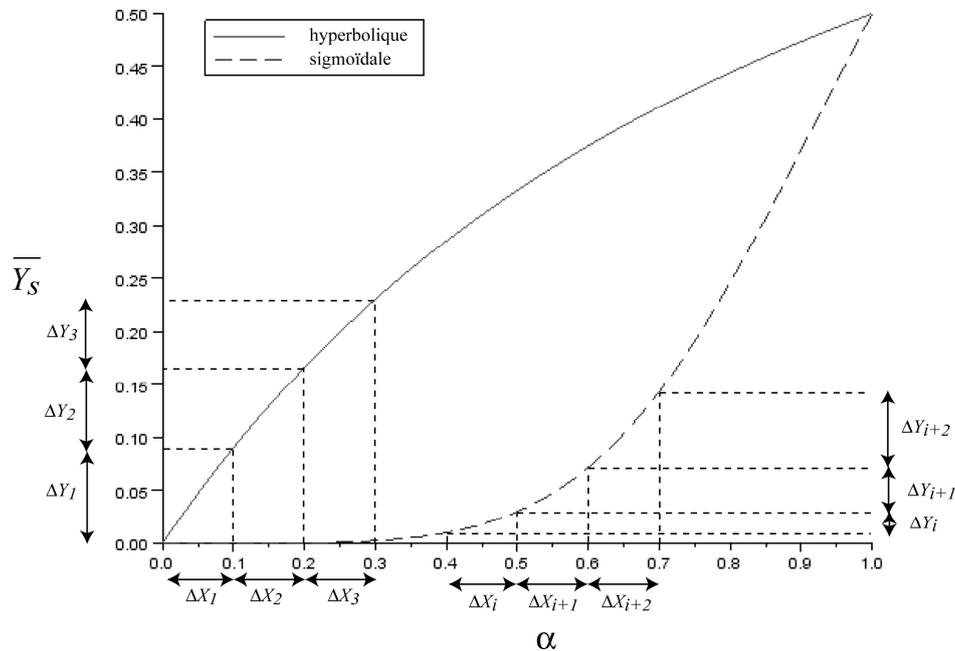
---

<sup>1</sup> Dans le cas de la courbe hyperbolique :  $\frac{d\bar{Y}_s}{d\alpha} = \frac{1}{(1+\alpha)^2} < 1$

ce qui montre que la pente de la fonction  $\bar{Y}_s$  décroît à mesure que  $\alpha$  augmente, c'est-à-dire que la protéine est saturée par son ligand  $\alpha$ .

Pour la courbe sigmoïdale :  $\frac{d\bar{Y}_s}{d\alpha} = \frac{n\alpha^{n-1}}{(1+\alpha^n)^2} \approx n\alpha^{n-1}$  quand  $\alpha \ll 1$

ce qui signifie que pour les faibles degrés de saturation, la pente de la courbe  $\bar{Y}_s = f(\alpha)$  augmente avec  $\alpha$ .



**Fig. 3.2 : amplification et amortissement des réponses coopératives et hyperboliques.** Les intervalles  $\Delta X$  de  $\alpha$  sont tous égaux. L'amplitude des réponses  $\Delta Y$  diminue ( $\Delta Y_1 > \Delta Y_2 > \Delta Y_3$ ) à mesure que la protéine non coopérative se sature alors que l'effet inverse est observé dans le cas de la réponse sigmoïdale ( $\Delta Y_i < \Delta Y_{i+1} < \Delta Y_{i+2}$ ), dans cette gamme de concentrations faibles de  $\alpha$  (de 0 à 1, à comparer aux variations de 0 à 10 sur la Fig. 3.1).

Deux équations différentes permettent de décrire les phénomènes coopératifs : l'équation de Hill (1910) et l'équation d'Adair (1925).

## 2 L'équation de Hill

L'équation de Hill est une équation **empirique**. Elle a été utilisée pour la première fois pour rendre compte de la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine. Son utilisation s'est ensuite étendue à l'étude des cinétiques enzymatiques coopératives. Elle peut être formulée de la manière suivante :

$$\bar{Y}_s = \frac{[S]^{n_h}}{K_{0.5}^{n_h} + [S]^{n_h}}$$

$K_{0.5}$  est la concentration en ligand  $S$  à demi-saturation (c'est-à-dire pour  $\bar{Y}_s = 0,5$ ).

$n_h$  est l'indice de coopérativité ou **nombre de Hill** (il peut avoir une valeur entière ou fractionnaire).

Dans cette équation,  $\bar{Y}_s$  représente la fonction de saturation de la protéine, c'est-à-dire la fraction de sites occupés par le ligand  $S$  (rapportée au nombre total de sites de fixation disponibles pour ce ligand sur la protéine) :

$$\bar{Y}_s = \frac{\text{nombre de sites de fixation de } S \text{ occupés}}{\text{nombre total de sites de fixation pour } S} \Rightarrow \bar{Y}_s \text{ est compris entre 0 et 1}$$

S'il s'agit d'une réaction enzymatique dont la vitesse  $v$  est proportionnelle à la fonction de saturation ( $\bar{Y}_s = v/V_M$ ), l'équation de Hill s'écrit :

$$v = \frac{V_M [S]^{n_h}}{K_{0.5}^{n_h} + [S]^{n_h}}$$

Si le nombre de Hill  $n_h$  est égal à l'unité (absence de coopérativité), l'équation de vitesse se réduit à celle d'un processus michaélien caractérisé par une fonction  $v = f([S])$  hyperbolique. Comme nous le verrons dans le prochain chapitre, l'équation de Hill peut être réarrangée sous la forme :

$$\log\left(\frac{\bar{Y}_s}{1-\bar{Y}_s}\right) = n_h \log([S]) - n_h \log(K_{0.5})$$

La représentation :

$$\log\left(\frac{\bar{Y}_s}{1-\bar{Y}_s}\right) = f(\log([S]))$$

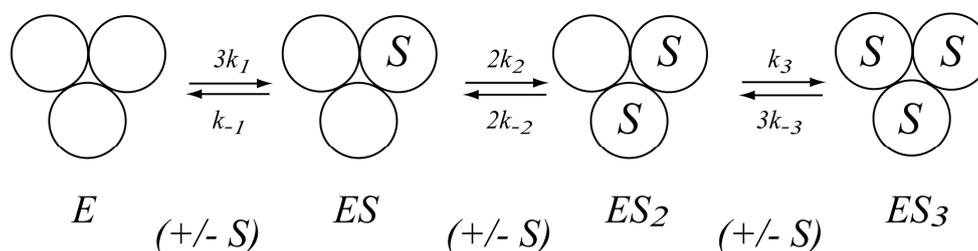
(ou son équivalent en termes de vitesses) permettra de déterminer graphiquement la valeur du nombre de Hill  $n_h$ . Lorsque celui-ci est supérieur à 1, on est en présence d'un phénomène de coopérativité positive. Lorsqu'il est inférieur à l'unité, le processus présente une coopérativité négative. Une valeur égale à l'unité témoigne de l'absence de coopérativité.

Le nombre de Hill peut être interprété (Cornish-Bowden, 2012) comme représentant le nombre statistique de molécules de ligand  $S$  se fixant simultanément sur une protéine. Aussi sa valeur ne peut-elle dépasser le nombre de sites de fixation disponibles pour ce ligand. Cette conjecture va être démontrée à partir de l'équation d'Adair.

### 3 Le schéma d'Adair

Le schéma d'Adair met en scène les équilibres de fixation successifs des molécules de ligand sur la protéine, chaque étape  $i$  étant caractérisée par des constantes de vitesse de fixation  $k_i$  et de désorption  $k_{-i}$  spécifiques. Le schéma d'Adair est purement descriptif et nullement interprétatif, en ce sens qu'il ne fait aucune hypothèse quant à l'origine des différences de valeurs de ces constantes de vitesse.

Considérons l'exemple d'un trimère :



Les facteurs statistiques figurant devant les constantes de vitesse  $k_i$  et  $k_{-i}$  expriment la multiplicité des liaisons possibles d'une molécule de ligand  $S$  aux différents sites disponibles. Dans ce schéma, les **sites de fixation** sont **équivalents** : cela signifie que la probabilité de fixer  $S$  sur l'un quelconque des 3 sites libres présents sur la forme  $E$  de la protéine est la même. Il existe donc 3 possibilités (ayant toute la même probabilité de réalisation) de fixer une molécule de  $S$  sur  $E$ . D'où le facteur statistique 3 affectant la constante de vitesse  $k_1$ .

Il existe deux manières de fixer une deuxième molécule de  $S$  une fois la première fixée, c'est-à-dire de passer de  $ES$  à  $ES_2$ . Ces deux possibilités correspondent aux 2 sites libres présents sur la forme  $ES$  de la protéine. Elles ont même probabilité de réalisation puisque les sites sont équivalents. D'où la constante de vitesse  $2k_2$ . Et le facteur statistique sera finalement de 1 pour saturer complètement la molécule de  $E$ , c'est-à-dire pour former  $ES_3$  à partir de  $ES_2$ .

Le raisonnement est le même pour ce qui concerne les transformations inverses (constantes de vitesses  $k_{-i}$ ) de désorptions successives d'une molécule de  $S$  à partir des formes ligandées de la protéine. Ainsi existe-t-il 3 possibilités différentes de libérer une molécule  $S$  de  $ES_3$  pour donner  $ES_2$ , d'où le facteur statistique 3 affectant la constante de vitesse  $k_{-3}$ . Puis  $2k_{-2}$  et finalement  $k_{-1}$ .

Nous pouvons définir une constante « d'équilibre » (plus précisément ici « d'équilibre d'association ») pour chacune des étapes permettant de passer réversiblement d'une forme à l'autre de la protéine :

$$K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad K_2 = \frac{k_{-2}}{k_2} \quad K_3 = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

Chaque constante  $K_i$  définit à la fois un rapport de constantes de vitesse, mais aussi un rapport de concentrations à l'équilibre des espèces moléculaires impliquées. En effet, une fois atteint le premier équilibre entre  $E$  et  $ES$ , les flux (ou encore les vitesses) dans l'un et l'autre sens seront égaux, ce qui se traduira par les relations :

$$3k_1 [E][S] = k_{-1} [ES] \quad \text{soit} \quad \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{3k_1} = \frac{1}{3} K_1$$

Aussi la valeur d'une constante d'équilibre traduit-elle la plus ou moins grande affinité du site de fixation considéré pour le ligand  $S$ . Dans l'exemple ci-dessus, **plus  $K_i$  est grand**, plus la proportion relative des formes dissociées  $E$  et  $S$  sera grande devant celle de la forme associée  $ES$ . Et plus l'équilibre est déplacé vers les formes dissociées, **moins grande est l'affinité** du site considéré pour  $S$ .

La fonction de saturation d'un trimère s'écrit :

$$\bar{Y}_s = \frac{[ES] + 2[ES_2] + 3[ES_3]}{3([E] + [ES] + [ES_2] + [ES_3])}$$

Appliquons la loi d'action de masses à chacun des 3 équilibres du schéma d'Adair correspondant :

$$3k_1 [E][S] = k_{-1} [ES] \quad \text{soit} \quad [ES] = 3 \underbrace{\frac{k_1}{k_{-1}}}_{K_1} [E][S] = 3K_1 [E][S]$$

$$2k_2 [ES][S] = 2k_{-2} [ES_2] \quad \text{soit} \quad [ES_2] = \frac{k_2}{\underbrace{k_{-2}}_{K_2}} [ES][S] = 3K_1 K_2 [E][S]^2$$

$$k_3 [ES_2][S] = 3k_{-3} [ES_3] \quad \text{soit} \quad [ES_3] = \frac{1}{3} \frac{k_3}{\underbrace{k_{-3}}_{K_3}} [ES_2][S] = K_1 K_2 K_3 [E][S]^3$$

D'où :

$$\begin{aligned} \bar{Y}_s &= \frac{[ES] + 2[ES_2] + 3[ES_3]}{3([E] + [ES] + [ES_2] + [ES_3])} \\ &= \frac{3K_1 [E][S] + 6K_1 K_2 [E][S]^2 + 3K_1 K_2 K_3 [E][S]^3}{3[E](1 + 3K_1 [S] + 3K_1 K_2 [S]^2 + K_1 K_2 K_3 [S]^3)} \end{aligned}$$

$$\bar{Y}_s = \frac{K_1[S] + 2K_1K_2[S]^2 + K_1K_2K_3[S]^3}{1 + 3K_1[S] + 3K_1K_2[S]^2 + K_1K_2K_3[S]^3}$$

Les constantes  $K_i$  ayant été définies comme des constantes d'association, la relation  $K_1 < K_2$  signifie que la fixation de la deuxième molécule est plus forte que celle de la première ; les sites étant initialement équivalents, il en résulte que la fixation de la première molécule a **facilité** celle de la deuxième. Aussi les inégalités  $K_1 < K_2 < K_3$  traduisent-elles l'occurrence d'un phénomène de **coopérativité positive**. Dans l'hypothèse où nous aurions  $K_1 = K_2 = K_3 = K$ , l'équation précédente se simplifierait ainsi :

$$\begin{aligned} \bar{Y}_s &= \frac{K[S] + 2K^2[S]^2 + K^3[S]^3}{1 + 3K[S] + 3K^2[S]^2 + K^3[S]^3} = \frac{K[S](1 + 2K[S] + K^2[S]^2)}{(1 + K[S])^3} \\ &= \frac{K[S](1 + K[S])^2}{(1 + K[S])^3} \end{aligned}$$

$$\text{d'où : } \bar{Y}_s = \frac{K[S]}{1 + K[S]}$$

soit l'équation correspondant à une saturation hyperbolique<sup>1</sup>. En accord avec cette observation, l'égalité des constantes  $K_1$ ,  $K_2$  et  $K_3$  signifie que la fixation de la  $i$ -ème molécule de  $S$  sur la protéine n'est ni plus ni moins facile que celle de la  $(i-1)$ -ème molécule. En d'autres termes, les fixations antérieures de molécules  $S$  ne favorisent, ni ne défavorisent les fixations à venir d'autres molécules  $S$ .

Une autre situation remarquable est celle où la constante  $K_3$  est beaucoup plus élevée que les constantes  $K_1$  et  $K_2$  : en ce cas, la fixation de la troisième molécule de ligand est facilitée de manière maximale par la fixation antérieure des deux premières molécules. L'équation d'Adair à 3 termes se simplifie alors ainsi :

$$\bar{Y}_s = \frac{K_1K_2K_3[S]^3}{1 + K_1K_2K_3[S]^3}$$

expression identique à l'équation de Hill avec  $n_h = 3$  et  $K_{0,5} = (K_1K_2K_3)^{-1/3}$ , ce qui montre que la valeur maximale du nombre de Hill est égale au nombre de sites de fixation pour le ligand  $S$ .

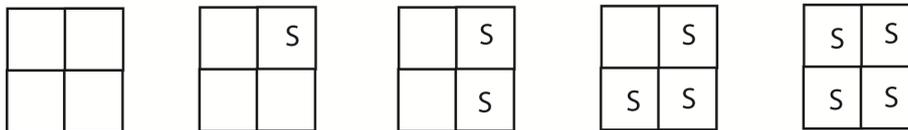
<sup>1</sup> L'équation de Michaélis peut en effet s'écrire :

$$\frac{v}{V_M} = \frac{[S]}{K_m + [S]} = \frac{K[S]}{1 + K[S]} \quad \text{avec } K = 1/K_m$$

## 4 Le modèle allostérique de Monod, Wyman et Changeux (MWC)

### III.4.1 Sites de fixation équivalents et indépendants

On considère une protéine-enzyme<sup>1</sup>  $E$  formée de l'association de 4 sous-unités, chacune d'entre-elles possédant un site de fixation pour le ligand (substrat ou autre)  $S$  :



Comme dans le schéma d'Adair, les sites sont équivalents (d'où les facteurs statistiques affectant les équilibres successifs). De plus, dans le modèle allostérique, les **sites** sont aussi **indépendants** : cela signifie que la fixation d'une molécule de  $S$  sur un site quelconque de  $E$  ne favorise, ni ne défavorise la fixation ultérieure d'une autre molécule de  $S$  sur un autre site de l'enzyme. En d'autres termes, **toutes les constantes d'équilibre  $K_1, K_2, K_3$  et  $K_4$  sont égales** ou, de manière équivalente, l'affinité des différents sites de fixation de  $S$  sur  $E$  sont et restent les mêmes.

### 4.2 Polynôme de fixation $X_S$ du ligand $S$ sur l'enzyme $E$

Ecrivons les relations décrivant les équilibres successifs, dans le cas de ce tétramère, en considérant cette fois les constantes d'équilibre de dissociation (c'est la convention dans le modèle allostérique) :

$$4k_1[E][S] = l_1[ES]$$

soit  $[ES] = \frac{4k_1}{l_1}[E][S] = 4 \frac{[E][S]}{K_1}$

<sup>1</sup> Un enzyme est une protéine douée d'activité catalytique. Même s'il décrit aussi le transport d'oxygène – et sa régulation – par l'hémoglobine, le modèle allostérique (Monod *et al.*, 1965) est le plus souvent mis en œuvre pour interpréter le comportement d'enzymes, tant dans leurs propriétés cinétiques que dans celles relatives à la liaison de leurs ligands. Aussi parlerons-nous davantage dans ce qui suit d'« enzymes » que de « protéines ».

$$3k_2[ES][S] = 2l_2[ES_2]$$

$$\text{soit } [ES_2] = \frac{3k_2}{2l_2}[ES][S] = \frac{3[ES][S]}{2K_2} = \frac{3[S]}{2K_2} \frac{4[E][S]}{K_1} = 6 \frac{[E][S]^2}{K_1K_2}$$

$$2k_3[ES_2][S] = 3l_3[ES_3]$$

$$\text{soit } [ES_3] = \frac{2k_3}{3l_3}[ES_2][S] = \frac{2[S]}{3K_3} \frac{6[E][S]^2}{K_1K_2} = 4 \frac{[E][S]^3}{K_1K_2K_3}$$

$$k_4[ES_3][S] = 4l_4[ES_4]$$

$$\text{soit } [ES_4] = \frac{k_4}{4l_4}[ES_3][S] = \frac{[S]}{4K_4} \frac{4[E][S]^3}{K_1K_2K_3} = \frac{[E][S]^4}{K_1K_2K_3K_4}$$

Puisque dans le modèle allostérique, toutes les constantes d'équilibre sont égales (à  $K$  par exemple), il vient :

$$\begin{aligned} [E_T] &= [E] + [ES] + [ES_2] + [ES_3] + [ES_4] \\ &= [E] + 4 \frac{[E][S]}{K} + 6 \frac{[E][S]^2}{K^2} + 4 \frac{[E][S]^3}{K^3} + \frac{[E][S]^4}{K^4} \\ &= [E](1 + 4\alpha + 6\alpha^2 + 4\alpha^3 + \alpha^4) \quad \text{avec } \alpha = \frac{[S]}{K} \\ &= [E] \underbrace{(1 + \alpha)^4}_{X_\alpha} \end{aligned}$$

$\alpha$  représente la concentration sans dimension (ou « normalisée ») en substrat  $S$ .

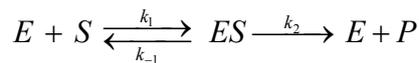
$X_\alpha$  est le polynôme de fixation du ligand  $\alpha$  sur la protéine. Il exprime la somme normalisée (par rapport à la forme libre  $E$ ) des concentrations de toutes les espèces moléculaires d'enzymes présentes dans le milieu. Dans le cas d'un enzyme possédant  $n$  sites de fixation équivalents et indépendants pour la liaison du ligand  $\alpha$ , le polynôme de fixation aurait été :

$$X_\alpha = (1 + \alpha)^n$$

Pour  $n = 1$  (1 seul site de fixation), nous avons :

$$X_\alpha = 1 + \alpha$$

Ce résultat peut être facilement retrouvé à partir du schéma de Michaélis :



$$[E_T] = [E] + [ES] = [E] + \frac{[E][S]}{K} \quad \text{avec } K = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

$$= [E](1 + \alpha) \quad \text{avec } \alpha = \frac{[S]}{K}, \text{ concentration normalisée de } S$$

### 4.3 Polynôme de fixation $X_s$ et fonction de saturation $\bar{Y}_s$

On peut montrer (Némethy, 1975) qu'une expression générale relie, en toutes circonstances, fonction de saturation  $\bar{Y}_s$  et polynôme de fixation  $X_s$  :

$$\bar{Y}_s = \frac{1}{n} \frac{\partial(\ln X_s)}{\partial(\ln[S])} = \frac{1}{n} \frac{[S]}{X_s} \frac{\partial X_s}{\partial[S]}$$

La formule fait intervenir des dérivées partielles car elle est applicable à des situations où plusieurs ligands différents sont présents. En ce cas, la concentration du ligand dont on étudie la saturation est la variable, les concentrations des autres ligands étant des constantes.

Appliquons cette formule à l'écriture de la fonction de saturation par  $S$  de l'enzyme formé de l'association de 4 sites équivalents et indépendants pour la fixation de ce ligand  $S$  (ici sous sa forme normalisée  $\alpha$ , avec  $\alpha = [S] / K_m$ ) :

$$\bar{Y}_\alpha = \frac{1}{n} \frac{\alpha}{X_\alpha} \frac{\partial X_\alpha}{\partial \alpha} = \frac{1}{4} \frac{\alpha}{(1 + \alpha)^4} 4(1 + \alpha)^3 = \frac{\alpha}{1 + \alpha}$$

On peut appliquer la même formule au calcul de la fonction de saturation d'un enzyme michaélien (pour lequel  $X_\alpha = 1 + \alpha$ ) :

$$\bar{Y}_\alpha = \frac{1}{n} \frac{\alpha}{X_\alpha} \frac{\partial X_\alpha}{\partial \alpha} = \frac{1}{1} \frac{\alpha}{1 + \alpha} = \frac{\alpha}{1 + \alpha}$$

soit la même expression que celle obtenue dans le cas de l'enzyme possédant  $n$  sites de fixation équivalents et indépendants. Dans les deux cas, la courbe de saturation  $\bar{Y}_s = f([S])$  ou ( $\bar{Y}_\alpha = f(\alpha)$ ) a donc une allure hyperbolique.

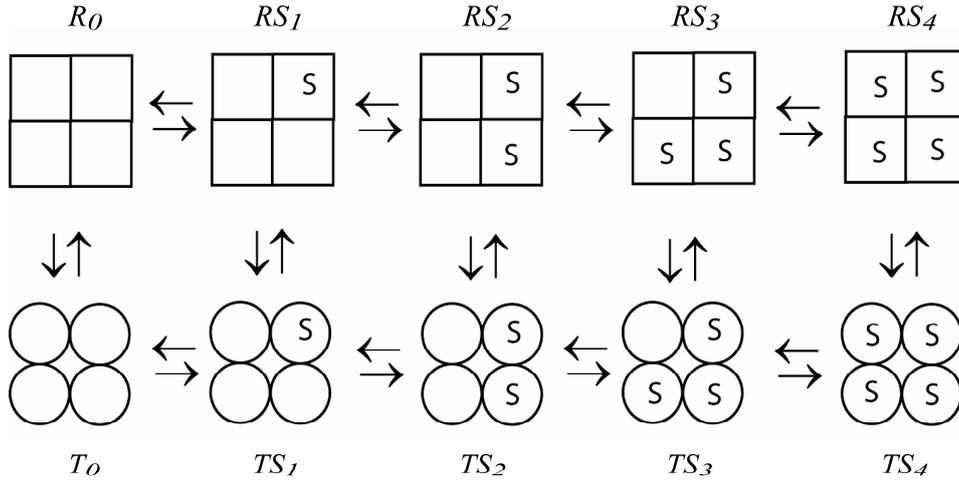
### 4.4 Fonction de saturation d'un enzyme allostérique

Hors les contraintes de symétrie (Monod *et al.*, 1965, Nadeau et Carlson, 2012), les hypothèses à la base de ce modèle sont les suivantes :

1. Les sites de fixation d'un ligand donné sont équivalents et indépendants au sein de chaque conformation ( $R$  ou  $T$ ) de la protéine.
2. Il existe entre les formes  $R_0$  et  $T_0$  un équilibre thermodynamique régi par la constante d'équilibre  $L_0 = [T_0] / [R_0]$ . Cela signifie que toutes les sous-unités appartenant à une même macromolécule protéique changent en

même temps de forme, les interactions s'exerçant au niveau de la structure quaternaire de la protéine l'emportant sur les interactions tertiaires<sup>1</sup>.

3. L'une des formes a plus d'affinité que l'autre pour le ligand  $S$ . Il s'agit par convention de la forme  $R$  si le ligand est le substrat.



Si l'enzyme formé ici de 4 sous-unités ( $n = 4$ ) existait sous la seule conformation  $R$ , nous aurions :

$$X_\alpha = (1 + \alpha)^n \quad \text{avec} \quad \alpha = [S]/K_R, \quad K_R = [R_0][S]/[RS_1]$$

Si l'enzyme existait sous la seule conformation  $T$ , le polynôme de fixation  $X_\alpha$  s'écrirait :

$$X_\alpha = (1 + c\alpha)^n \quad \text{avec} \quad c\alpha = [S]/K_T, \quad K_T = [T_0][S]/[TS_1] \quad \text{donc} \quad c = K_R/K_T$$

L'enzyme est en fait en équilibre entre les formes  $R$  et  $T$ , l'équilibre étant régi par la constante  $L_0$  :

$$\begin{aligned} [E_T]X_{\alpha,R,T} &= [R_0]X_{\alpha,R} + [T_0]X_{\alpha,T} = [R_0](1 + \alpha)^n + [T_0](1 + c\alpha)^n \\ &= [R_0] \left( (1 + \alpha)^n + L_0(1 + c\alpha)^n \right) \end{aligned}$$

D'où : 
$$X_{\alpha,R,T} = (1 + \alpha)^n + L_0(1 + c\alpha)^n$$

<sup>1</sup> Un modèle concurrent aurait voulu que le niveau de structuration pertinent fût le niveau tertiaire, chaque sous-unité changeant individuellement de forme à mesure qu'elle fixait le ligand et rendant plus facile les fixations ultérieures d'autres molécules de ligand par modification de l'intensité des interactions entre sous-unités, suite aux transconformations. Un tel modèle s'est révélé ne correspondre que marginalement aux observations expérimentales (Changeux, 2012).

$$\text{et : } \bar{Y}_\alpha = \frac{1}{n} \frac{\alpha}{X_{\alpha,R,T}} \frac{\partial X_{\alpha,R,T}}{\partial \alpha} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L_0 c \alpha (1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L_0 (1+c\alpha)^n}$$

L'expression ci-dessus est celle de la fonction de saturation de l'enzyme allostérique par son substrat  $\alpha$ . Dans le cas limite où  $\alpha$  se fixe non seulement « mieux » mais aussi exclusivement sur la conformation  $R$  de l'enzyme, nous avons  $c = 0$  et l'expression de la fonction de saturation se simplifie en :

$$\bar{Y}_\alpha = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L_0}$$

#### 4.5 Comprendre le modèle allostérique : examen des situations limites

##### Cas où $L_0 = [T_0] / [R_0]$ est proche de 0

Dans ce cas, l'équilibre allostérique est, en absence de tout ligand, très déplacé vers la forme  $R$ . Nous pouvons écrire :

$$\bar{Y}_\alpha = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L_0 c \alpha (1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L_0 (1+c\alpha)^n} \approx \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n} = \frac{\alpha}{1+\alpha}$$

L'équation de la fonction de saturation est donc celle d'une hyperbole. En accord avec cette expression, on observe dans ce cas la saturation michaélienne de la forme  $R$  de l'enzyme, au sein de laquelle les sites sont équivalents et indépendants.

##### Cas où $L_0$ est très grand et tend vers l'infini

Dans ce cas, l'équilibre allostérique est, en absence de tout ligand, très déplacé vers la forme  $T$  :

$$\bar{Y}_\alpha = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L_0 c \alpha (1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L_0 (1+c\alpha)^n} \approx \frac{L_0 c \alpha (1+c\alpha)^{n-1}}{L_0 (1+c\alpha)^n} = \frac{c\alpha}{1+c\alpha}$$

soit, là aussi, une saturation de type michaélienne de la seule forme  $T$  présente d'enzyme (car  $c\alpha = [S] / K_T$ ), forme au sein de laquelle les sites sont équivalents et indépendants.

##### Cas où $c=1$

Dans ce cas,  $K_R=K_T$ , le substrat  $S$  a la même affinité pour l'une et l'autre formes de l'enzyme (ce qui invalide l'une des hypothèses de base du modèle). Il ne déplacera donc pas, en se fixant, l'équilibre allostérique. Nous aurons alors :

$$\begin{aligned}\bar{Y}_\alpha &= \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L_0 c \alpha (1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L_0 (1+c\alpha)^n} \\ &= \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L_0 \alpha (1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L_0 (1+\alpha)^n} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} (1+L_0)}{(1+\alpha)^n (1+L_0)} = \frac{\alpha}{1+\alpha}\end{aligned}$$

soit là encore une fixation michaélienne sur les formes  $R$  et  $T$  ici indifférenciées pour leur liaison à  $S$ .

#### 4.6 Logique du modèle allostérique

Au sein de chacun des deux états quaternaires  $R$  et  $T$ , les sites de fixation pour un ligand donné sont équivalents et indépendants. En conséquence, comme l'examen des situations limites l'a montré, lorsque l'équilibre thermodynamique entre les deux conformations est entièrement déplacé vers l'une des deux formes, on observera une saturation de type michaélienne de la forme en question.

Considérons le substrat allostérique  $S$  qui a, par définition, plus d'affinité pour  $R$  que pour  $T$  et supposons qu'en absence de substrat, l'équilibre soit très déplacé vers la forme  $T$ . En se fixant sur la forme  $R_0$ , le substrat va diminuer la concentration de cette espèce moléculaire, ce qui va provoquer une transformation d'une certaine quantité de forme  $T_0$  en  $R_0$  afin que l'équilibre thermodynamique  $L_0 = [T_0] / [R_0]$  soit toujours respecté. Il y aura donc, au total, augmentation globale des formes  $R$  (ligandées et non ligandées) présentes en solution.

Considérons l'exemple d'un tétramère à fixation exclusive de  $S$  sur  $R$  tel que, en présence d'une concentration de  $S$  donnée :  $L_0 = 4$ ,  $[E_T] = 10$ ,  $[RS_1] = 1$ .

*Avant fixation de  $S$  :*

$$\left. \begin{array}{l} [T_0] + [R_0] = [E_T] \\ [T_0] = [R_0]L_0 \end{array} \right\} \rightarrow [R_0] = \frac{[E_T]}{1+L_0} = \frac{10}{1+4} = 2$$

soit un nombre de sites de fixation disponibles pour la première fixation de  $S$  de :  $4[R_0] = 4 \times 2 = \mathbf{8 \text{ sites}}$

*Après la première fixation de  $S$  :*

$$\left. \begin{array}{l} [T_0] + [R_0] + [RS_1] = [E_T] \\ [T_0] = [R_0]L_0 \end{array} \right\} \rightarrow [R_0] = \frac{[E_T] - [RS_1]}{1+L_0} = \frac{10-1}{1+4} = \frac{9}{5}$$

soit un nombre de sites disponibles pour les fixations ultérieures de  $S$  de :  $4[R_0] + 3[R_1] = (9/5) \times 4 + 3 = \mathbf{10,2 \text{ sites}}$ .

C'est précisément cette augmentation globale de la concentration en sites disponibles, dans la conformation qui lie le mieux le ligand, qui est responsable de la coopérativité de sa fixation : plus  $S$  se fixe préférentiellement sur  $R$ , plus l'équilibre entre  $R$  et  $T$  sera déplacé vers les formes  $R$ , c'est-à-dire vers les formes qui fixent le plus facilement  $S$ .

Comment agissent les effecteurs allostériques dans ce modèle ? Comme le substrat du même nom, les effecteurs allostériques, en se fixant préférentiellement sur l'une des deux conformations de l'enzyme, déplacent l'équilibre thermodynamique vers la conformation en question. Il existe deux types d'effecteurs allostériques :

- ceux qui déplacent l'équilibre vers la même conformation  $R$  que le fait le substrat. Ils sont appelés **activateurs allostériques** ;
- ceux qui déplacent cet équilibre vers la conformation qui a le moins d'affinité pour le substrat. Ce sont les **inhibiteurs allostériques**.

### Exercice 1

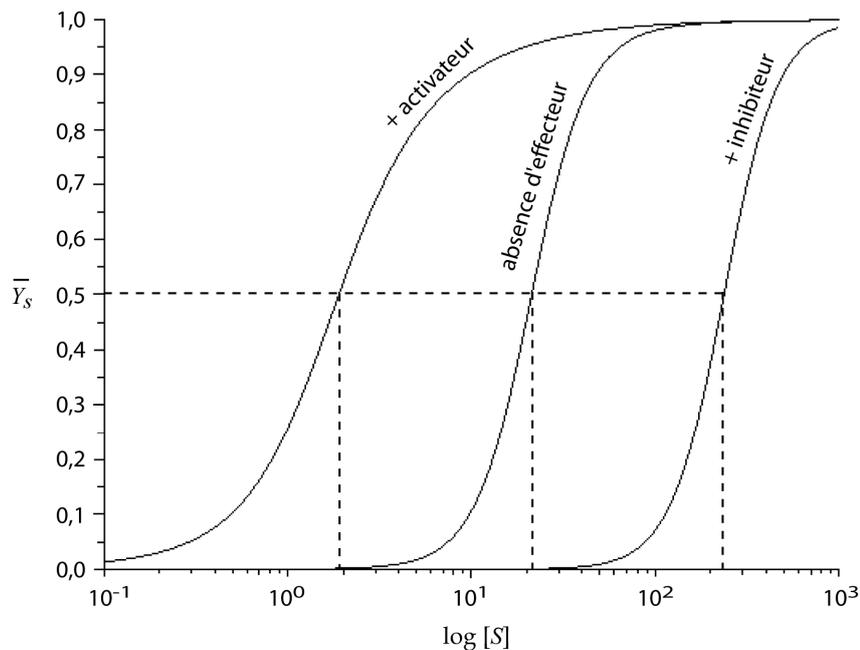
*Un expérimentateur a isolé un enzyme à comportement coopératif vis-à-vis de son substrat. Il montre que l'enzyme fixe au maximum 2 molécules d'un analogue de substrat (qui se fixe au même site que celui-ci). Il recommence l'expérience en présence d'un inhibiteur et trouve que l'enzyme fixe toujours deux molécules de l'analogue. Supposant que l'enzyme obéit au modèle MWC, l'expérimentateur en tire la conclusion que la forme  $T$  peut fixer l'analogue de substrat. Cette conclusion est-elle justifiée ?*

#### 4.7 Formalisation de l'action des effecteurs allostériques (activateurs ou inhibiteurs)

Le mot « allostérie » vient du grec *allos* (autre) et *stereos* (structure). Un effecteur allostérique se fixe toujours en un site autre que le site substrat. Son action sera inhibitrice si, en présence de l'effecteur, une plus grande concentration en substrat est nécessaire pour atteindre un degré de saturation donné. A l'inverse, l'effet sera activateur si la présence de l'effecteur a pour conséquence de réduire la concentration en substrat nécessaire pour atteindre ce degré de saturation (Fig. 3.3). L'activateur facilite la fixation du substrat, l'inhibiteur la rend plus difficile.

Un activateur possède une meilleure affinité pour  $R$  que pour  $T$ . En se fixant sur la protéine, il déplace ainsi l'équilibre vers la forme  $R$ . Tout se passe comme si la constante allostérique  $L_0 = [T_0] / [R_0]$  était remplacée, en présence d'activateur, par une constante apparente  $L'_0$  (qui inclut l'action de l'activateur) inférieure à  $L_0$ .

L'action d'un inhibiteur est symétrique : en se fixant préférentiellement sur  $T$ , il modifie la constante allostérique apparente  $L'_0$  telle que, cette fois,  $L'_0 > L_0$ .



**Fig. 3.3 : influence d'un effecteur allostérique sur la courbe de saturation de la protéine par son substrat  $S$ .** En présence d'activateur, la courbe  $\bar{Y}_s = f([S])$  est déplacée vers la gauche : une moins grande concentration de  $S$  est nécessaire pour saturer à moitié ( $\bar{Y}_s = 0,5$ , pointillés) la protéine. L'effet opposé est observé en présence d'inhibiteur.

### Exercice 2

*L'équilibre conformationnel d'un enzyme allostérique (modèle MWC) est presque entièrement déplacé vers la forme  $T$ . Quel sera le comportement de cet enzyme vis-à-vis de la fixation du substrat ? vis-à-vis de la fixation d'un inhibiteur allostérique ?*

On montre qu'en présence d'effecteur  $\beta$  et de substrat  $\alpha$ , le polynôme de fixation d'un enzyme allostérique formé de  $n$  sous-unités, s'écrit :

$$X_{\alpha,\beta,R,T} = (1 + \alpha)^n (1 + \beta)^n + L_0 (1 + c\alpha)^n (1 + d\beta)^n$$

Si  $d$  est inférieur à 1, l'effecteur  $\beta$  déplacera l'équilibre conformationnel vers la forme  $R$  (il se comportera donc de ce point de vue comme un substrat et sera appelé **activateur**) alors que si  $d$  est supérieur à l'unité, l'effecteur aura plus

d'affinité pour la forme  $T$ . Il s'agira en ce cas d'un **inhibiteur** (et son action sur l'équilibre allostérique sera antagoniste à celle du substrat).

Si  $\alpha$  est le ligand dont on étudie la fonction de saturation (donc celui dont on fait varier la concentration, l'effecteur ayant lui une concentration fixe), l'équation de la fonction de saturation de l'enzyme par  $\alpha$  en présence de  $\beta$  s'écrira :

$$\begin{aligned} \bar{Y}_{\alpha,\beta} &= \frac{1}{n} \frac{\alpha}{X_{\alpha,\beta,R,T}} \frac{\partial X_{\alpha,\beta,R,T}}{\partial \alpha} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1}(1+\beta)^n + L_0 c \alpha (1+d\beta)^n (1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n (1+\beta)^n + L_0 (1+d\beta)^n (1+c\alpha)^n} \\ &= \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L'_0 c \alpha (1+c\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L'_0 (1+c\alpha)^n} \end{aligned}$$

$$\text{avec } L'_0 = L_0 \frac{(1+d\beta)^n}{(1+\beta)^n}$$

L'action de l'effecteur se formalise ainsi par une modification de la valeur de la constante allostérique  $L_0$ , correspondant au déplacement de l'équilibre initial entre les formes  $R_0$  et  $T_0$ .

Supposons que l'on ajoute initialement, dans le milieu, un activateur qui déplace très largement l'équilibre allostérique vers la conformation  $R$ . Dans ces conditions, en se fixant sur la forme  $R$  déjà présente, le substrat  $S$  ne déplacera quasiment plus l'équilibre (car il n'y a plus rien à déplacer). On observera alors la saturation de la forme  $R$  de l'enzyme par  $S$ , soit une saturation michaélienne. Supposons au contraire que l'enzyme soit initialement préincubé en présence d'un excès d'inhibiteur, de sorte que l'équilibre soit largement déplacé vers  $T$ . Si l'affinité du substrat pour la conformation  $T$  n'est pas nulle et que l'excès d'inhibiteur est suffisant, on assistera dans ces conditions à la saturation michaélienne de la forme  $T$  par  $S$ .

### Exercice 3

*La constante  $L_0$  d'un enzyme allostérique obéissant au modèle MWC est égale à 1 à 25°C et à 0,01 à 15°C. La constante de dissociation de la forme  $R$  pour le substrat est égale à  $10^{-5}$  M, alors que celle de la forme  $T$  pour un inhibiteur est de  $10^{-6}$  M. Ces constantes de dissociation ne changent pas de valeur entre 15 et 25°C. Le substrat comme l'inhibiteur sont à « fixation exclusive », c'est-à-dire qu'ils ne se fixent chacun que sur l'une des deux conformations  $R$  ou  $T$  de l'enzyme. Celui-ci est un dimère.*

*Calculer la valeur de la constante allostérique apparente  $L'_0$  en présence d'une concentration de  $10^{-5}$  M en inhibiteur, à 15 et à 25°C.*

#### 4.8 Comparaison des fonctions de saturation du schéma d'Adair et du modèle MWC

Ecrivons l'expression, dans le modèle MWC, de la fonction de saturation par le substrat  $\alpha$ , quand  $n = 3$  :

$$\bar{Y}_\alpha = \frac{\alpha(1+\alpha)^2 + L_0 c \alpha(1+c\alpha)^2}{(1+\alpha)^3 + L_0(1+c\alpha)^3}$$

Rappelons l'expression correspondante dans un schéma d'Adair à 3 sites :

$$\bar{Y}_{adair} = \frac{K_1[S] + 2K_1K_2[S]^2 + K_1K_2K_3[S]^3}{1 + 3K_1[S] + 3K_1K_2[S]^2 + K_1K_2K_3[S]^3}$$

Afin de pouvoir comparer les expressions des fonctions de saturation des deux modèles, il est nécessaire d'ordonner numérateur et dénominateur de la fraction rationnelle  $\bar{Y}_\alpha$  en fonction des puissances de  $\alpha$  :

$$\bar{Y}_\alpha = \frac{\alpha(1+L_0c) + \alpha^2(2+2L_0c^2) + \alpha^3(1+L_0c^3)}{1+L_0+3\alpha(1+L_0c) + 3\alpha^2(1+L_0c^2) + \alpha^3(1+L_0c^3)}$$

Avant identification, le dénominateur doit être écrit sous la forme polynomiale  $1 + a\alpha + b\alpha^2 + c\alpha^3$ , ce qui nécessite de diviser numérateur et dénominateur par  $(1 + L_0)$  :

$$\bar{Y}_\alpha = \frac{\alpha \frac{1+L_0c}{1+L_0} + \alpha^2 \frac{2(1+L_0c^2)}{1+L_0} + \alpha^3 \frac{1+L_0c^3}{1+L_0}}{1 + \alpha \frac{3(1+L_0c)}{1+L_0} + \alpha^2 \frac{3(1+L_0c^2)}{1+L_0} + \alpha^3 \frac{1+L_0c^3}{1+L_0}}$$

Finalement, la comparaison de  $\bar{Y}_\alpha$  avec  $\bar{Y}_{adair}$  nécessite de développer la variable normalisée  $\alpha$  en faisant apparaître, comme dans le schéma d'Adair, les **constantes d'association** : par définition,  $\alpha = [S]/K_R$  où  $K_R$  est la constante de dissociation de  $S$  pour la forme  $R$  de la protéine. Si l'on appelle  $K_a = 1/K_R$  la constante d'association correspondante, il vient :

$$\alpha = [S]K_a$$

de sorte que l'expression de  $\bar{Y}_\alpha$  se réécrit :

$$\bar{Y}_\alpha = \frac{[S]K_a \frac{1+L_0c}{1+L_0} + [S]^2 K_a^2 \frac{2(1+L_0c^2)}{1+L_0} + [S]^3 K_a^3 \frac{1+L_0c^3}{1+L_0}}{1 + [S]K_a \frac{3(1+L_0c)}{1+L_0} + [S]^2 K_a^2 \frac{3(1+L_0c^2)}{1+L_0} + [S]^3 K_a^3 \frac{1+L_0c^3}{1+L_0}}$$

On peut maintenant identifier les coefficients des équations de  $\bar{Y}_\alpha$  et de  $\bar{Y}_{adair}$ . Pour ce faire, il est indifférent de procéder à partir des numérateurs ou des dénominateurs. On choisira ici les premiers :

	<i>Coeff. de [S]</i>	<i>Coeff. de [S]<sup>2</sup></i>	<i>Coeff. de [S]<sup>3</sup></i>
<b>Adair</b>	$K_1$	$2K_1K_2$	$K_1K_2K_3$
<b>MWC</b>	$K_a \frac{1+L_0c}{1+L_0}$	$K_a^2 \frac{2(1+L_0c^2)}{1+L_0}$	$K_a^3 \frac{1+L_0c^3}{1+L_0}$

L'expression de  $K_1$  est donnée par la première colonne (*coeff. de [S]*). Par substitution dans les colonnes 2 et 3, on en tire les expressions de  $K_2$  et  $K_3$  en termes de paramètres du modèle MWC :

$$K_2 = K_a \frac{(1+L_0c^2)}{1+L_0c} \quad \text{et} \quad K_3 = K_a \frac{(1+L_0c^3)}{1+L_0c^2}$$

Examinons les conséquences de l'hypothèse  $K_1 < K_2 < K_3$  dans le modèle MWC. La condition  $K_1 < K_2$  s'écrit :

$$K_a \frac{(1+L_0c)}{1+L_0} < K_a \frac{(1+L_0c^2)}{1+L_0c} \quad \text{soit} \quad 0 < (1-c)^2$$

Cette condition est vérifiée pour toute valeur de  $c$  différente de 1, une expression élevée au carré étant nécessairement positive.

La condition  $K_2 < K_3$  s'écrit :

$$K_a \frac{(1+L_0c^2)}{1+L_0c} < K_a \frac{(1+L_0c^3)}{1+L_0c^2} \quad \text{soit} \quad 0 < (1-c)^2$$

inégalité là aussi toujours vérifiée, quelle que soit la valeur de  $c$  différente de 1.

Ainsi, **dans le modèle MWC, la relation  $K_1 < K_2 < K_3$  est-elle toujours vérifiée**, quelle que soit la valeur des paramètres. Ce modèle permet donc d'interpréter les phénomènes de coopérativité positive (et eux seuls), pour toute valeur de  $c$  différente de 1 (quand  $c = 1$ , les deux formes de l'enzyme fixent  $S$  avec la même affinité, de sorte qu'il n'y a nul déplacement d'équilibre, donc pas de coopérativité).

On notera pour finir que les concepts de l'allostérie ont été transposés avec succès dans le domaine de la transduction des signaux (Changeux et Edelstein, 2005).

## 5 Solutions des exercices

### Exercice 1

Cet enzyme se comporte comme le ferait un enzyme répondant au modèle MWC. Il faut néanmoins prendre garde au fait que des enzymes à comportement coopératif pourraient ne pas répondre nécessairement à ce modèle (ce serait par exemple le cas d'un enzyme à coopérativité négative).

Les concentrations saturantes en substrat (ou en analogue de substrat) déplacent l'équilibre conformationnel vers la forme  $R$ . C'est donc la saturation de cette forme qui est étudiée par l'expérimentateur. Il ne peut rien conclure quant aux caractéristiques de la forme  $T$ .

### Exercice 2

L'équilibre conformationnel de cet enzyme est, en absence de tout ligand, très déplacé vers  $T$ , ce qui confère au système une constante allostérique  $L_0$  très grande. La fixation du substrat allostérique sera coopérative, traduisant le déplacement de l'équilibre vers  $R$  à mesure que le substrat se fixe sur cette forme pour laquelle il a une affinité préférentielle.

La fixation d'un inhibiteur allostérique présentera, elle, une saturation michaélienne, en l'occurrence celle de la forme  $T$  qui est en pratique la seule présente et celle envers laquelle l'inhibiteur a le plus d'affinité.

### Exercice 3

L'équation générale de la fonction de saturation d'un enzyme allostérique (modèle MWC) par son substrat  $\alpha$  en présence d'inhibiteur allostérique  $\beta$  s'écrit :

$$\bar{Y}_{\alpha,\beta} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1}(1+\beta)^n + L_0 c \alpha(1+c\alpha)^{n-1}(1+d\beta)^n}{(1+\alpha)^n(1+\beta)^n + L_0(1+c\alpha)^n(1+d\beta)^n}$$

Lorsque les fixations sont exclusives, nous avons :

- $c = 0$  si le ligand  $\alpha$  est un substrat ou un activateur allostérique
- $d\beta \gg \beta$  si le ligand  $\beta$  est un inhibiteur allostérique

D'où :

$$\bar{Y}_{\alpha,\beta} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L_0(1+d\beta)^n} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L'_0}$$

$$\text{avec } L'_0 = L_0(1+d\beta)^n$$

$$\text{et } d\beta = \frac{[I]}{K_{T,I}}$$

Nous avons ici :  $[I] = 10^{-5} \text{ M}$ ,  $K_{T,I} = 10^{-6} \text{ M}$ ,  $n = 2$

et  $L_0 = 1$  à  $25^\circ\text{C}$  et  $L_0 = 0.01$  à  $15^\circ\text{C}$ .

D'où :

$$L'_0 = 1 \times \left(1 + \frac{10^{-5}}{10^{-6}}\right)^2 = 11^2 = 121 \quad \text{à } 25^\circ\text{C}$$

$$L'_0 = 0.01 \times \left(1 + \frac{10^{-5}}{10^{-6}}\right)^2 = 0.01 \times 11^2 = 1.21 \quad \text{à } 15^\circ\text{C}$$

