

## Régulation de l'activité enzymatique.

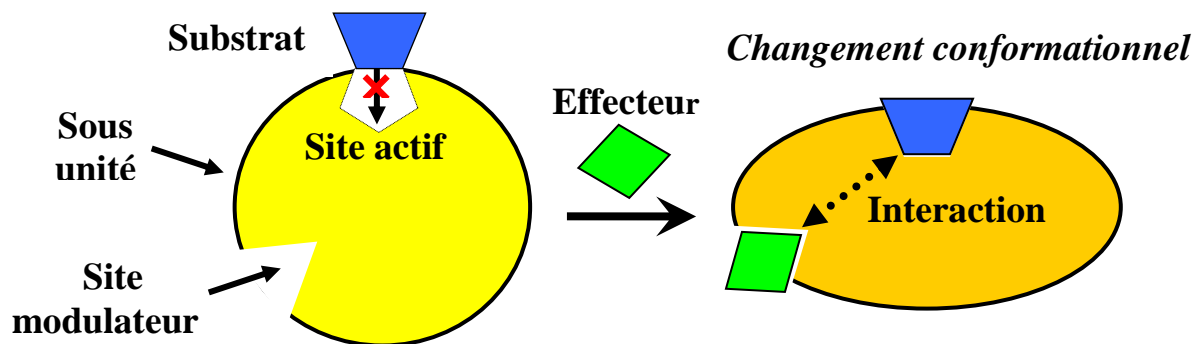
Les organismes doivent être capables de moduler l'activité enzymatique cellulaire de façon à s'adapter aux changements métaboliques. De cette façon, les enzymes peuvent coordonner les voies métaboliques, en fonction de l'environnement. Les deux moyens principaux sont :

1- Le contrôle de la quantité d'enzyme. La quantité d'enzyme dans une cellule est dépendante du taux de synthèse de l'enzyme et de son taux de dégradation. Des systèmes complexes de régulation de la transcription et/ou de la traduction des gènes codant pour des enzymes ont été développés durant l'évolution et modulent la quantité d'enzyme en réponse à des conditions physiologiques changeantes. Par exemple, l'enzyme qui permet l'hydrolyse du lactose n'est synthétisée que lorsque le milieu de culture contient du lactose.

2- Le contrôle de l'activité enzymatique. L'activité catalytique des enzymes peut être directement modifiée par des altérations structurales et conformationnelles. Ainsi, la modulation de l'affinité de l'enzyme pour son substrat permettra de changer le taux de catalyse. L'affinité d'association peut être changée par la présence de protéines ou de sous-unités régulatrices, par une modification covalente (en général une phosphorylation), une activation protéolytique et/ou une régulation allostérique.

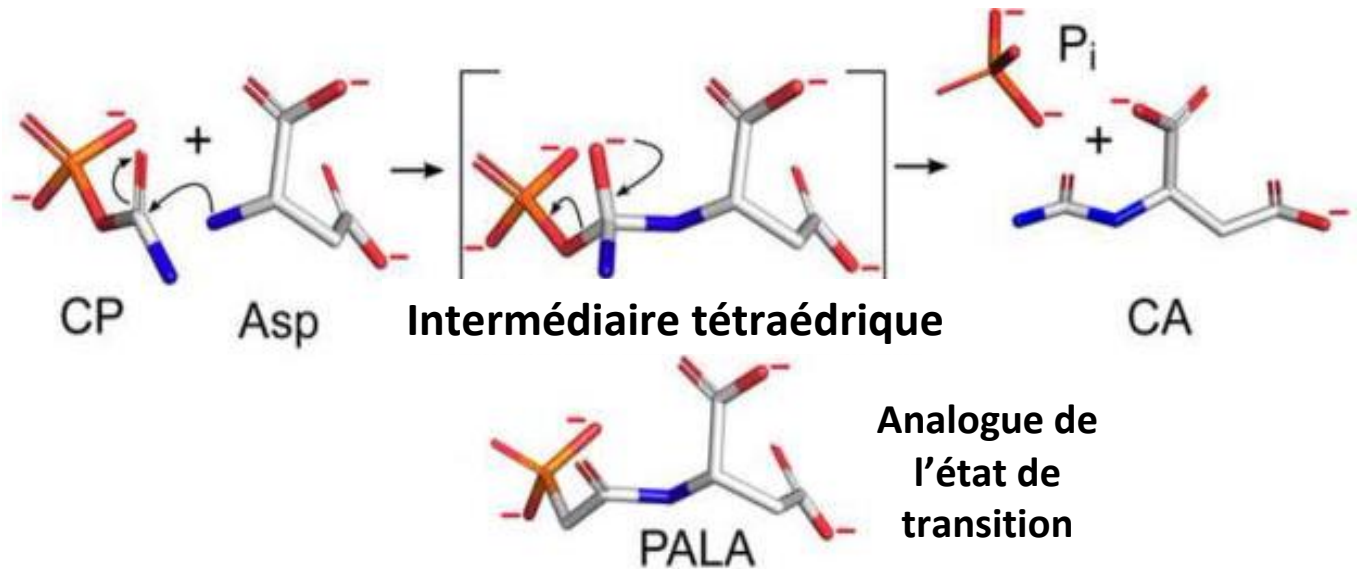
Dans la régulation allostérique, un métabolite de la voie réactionnelle peut se fixer de façon non-covalente à l'enzyme et ainsi moduler son activité catalytique. Ainsi, dans ces systèmes multi-enzymatiques, le produit final de la chaîne de réactions sert d'inhibiteur spécifique à une enzyme du début de la chaîne.

Le taux de catalyse dans la cascade est déterminé par la concentration du produit final, dans un phénomène appelé rétro-inhibition. L'enzyme ainsi modulée est appelée enzyme allostérique. L'enzyme allostérique possède un site actif et un site modulateur sur lequel vient se fixer l'effecteur. Les enzymes allostériques sont en général complexes, formées de plusieurs sous-unités, régulatrices et catalytiques.



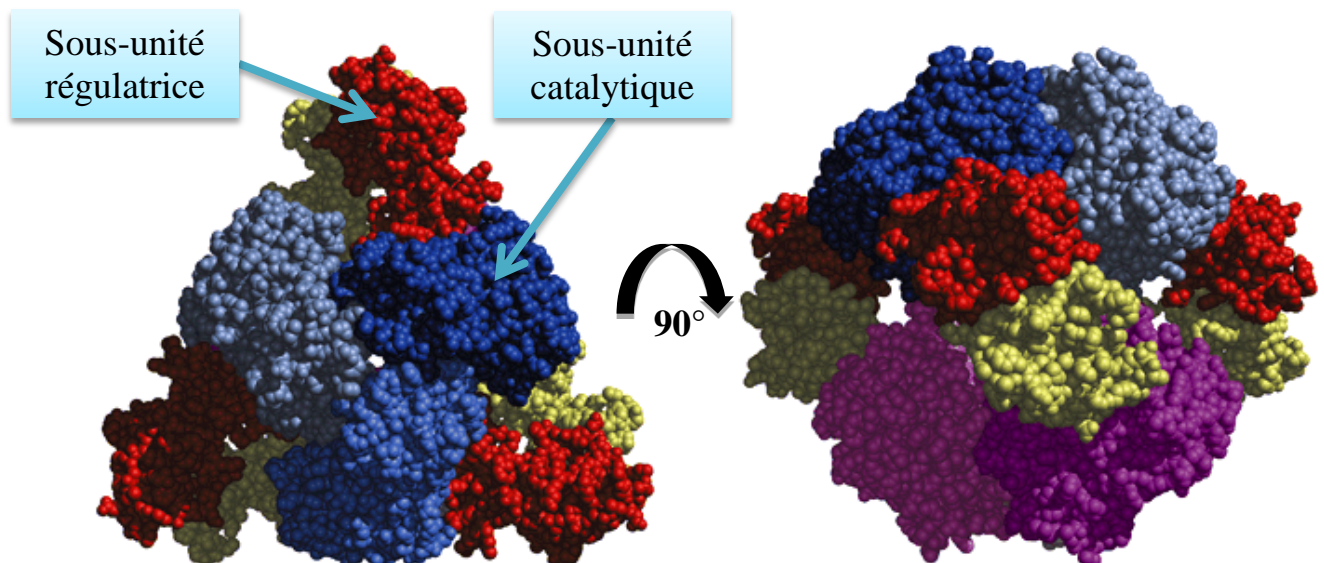
### Exemple, l'aspartate transcarbamoylase (ATCase)

L'ATCase catalyse la réaction entre le phosphate de carbamoyle (CP) et le L-aspartate (Asp) afin de former la N-carbamoyl-L-aspartate (CA) et du phosphate inorganique (Pi). C'est la première étape dans la cascade de synthèse du nucléotide cytidine triphosphate (CTP).

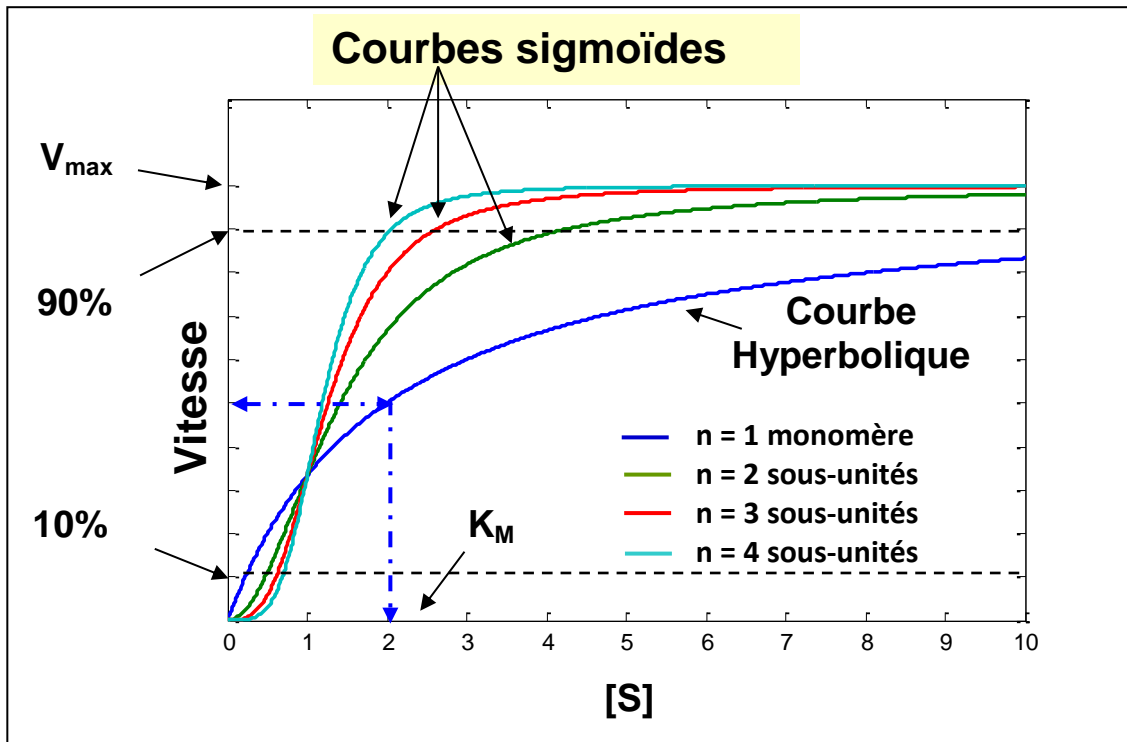


Vraisemblablement, la réaction se déroule *via* un intermédiaire tétraédrique. L'analogue à deux substrats N-phosphonacetyl-L-aspartate (PALA), possédant un grand nombre de loci de liaison de l'intermédiaire tétraédrique, est un puissant inhibiteur de l'enzyme.

La structure de l'ATCase (2 vues) montrant 6 sous-unités catalytiques et 6 sous-unités régulatrices, regroupées en 2 trimères catalytiques "empilés", et colorées en bleu (1 trimère catalytique) et en violet (l'autre trimère catalytique); et les 3 dimères régulateurs, en rouge et jaune.



L'analyse cinétique de l'activité enzymatique a montré 3 caractéristiques :



1) La coopérativité positive du substrat, c'est-à-dire que la fixation d'un premier substrat dans un des 6 sites actifs de l'enzyme facilite la fixation du substrat dans les 5 autres sites actifs. Ceci génère une courbe sigmoïde. Ainsi, une

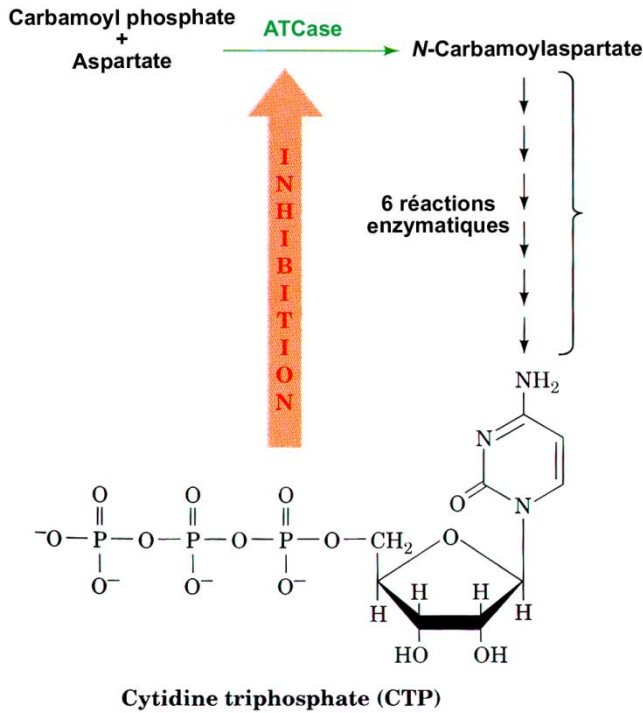
faible augmentation dans la concentration du substrat provoque une forte augmentation du taux de catalyse. Plus la coopérativité est importante ( $n > 1$ ), plus restreinte en gamme de concentration S sera la réponse cinétique (10% → 90% en  $V_{max}$ )

Degré de coopérativité				
$V_{max}$	M-M Michaelis	n=2	n=3	n=4
10%	0.22	0.47	0.61	0.69
90%	18.0	4.25	2.62	2.06
		[S]		

La courbe hyperbolique correspond à celle de la cinétique michaelienne ( $n=1$ ) tandis que les courbes sigmoïdes montrent la cinétique correspondante à l'enzyme sous forme de dimère

( $n=2$ ), trimère ( $n=3$ ), et tétramère ( $n=4$ ).

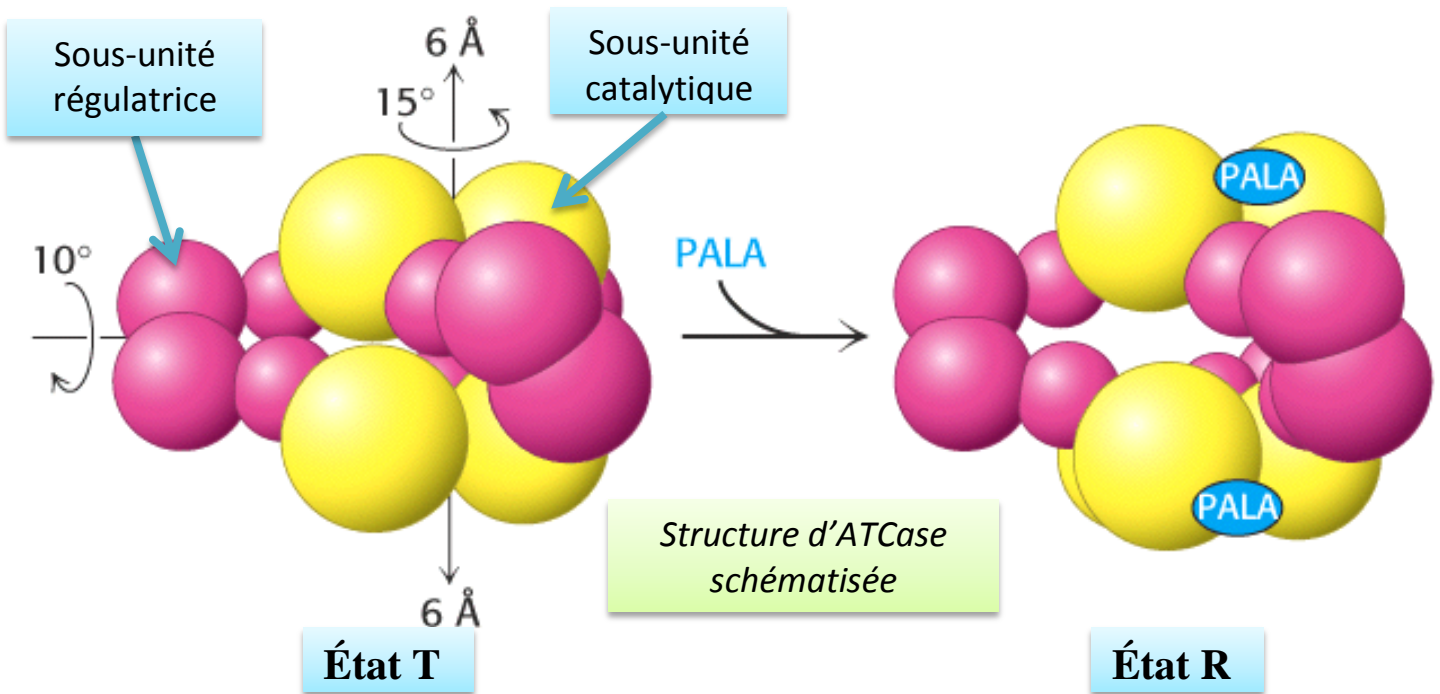
2) Une régulation allostérique (rétro-inhibition) par le nucléotide CTP. CTP réduit le taux de catalyse.



3) Une régulation positive par le nucléotide ATP, qui augmente le taux de catalyse. Il semble que l'ATP compétitionne avec le CTP pour se fixer au site modulateur.

L'interaction allostérique change la conformation des sites de liaison du substrat. Selon la théorie de l'allostérie, chaque sous-unité catalytique peut exister sous une forme T (basse affinité pour le substrat) ou sous forme R (haute affinité pour les substrats ou des analogues comme le phosphonoacetamide (PAM) et le malonate (MAL)).

La transition conformationnelle T  $\rightarrow$  R dans ATCase. Lors de la transition T  $\rightarrow$  R, la séparation entre les trimères catalytiques et les sous-unités régulatrices est de 12Å et 4Å respectivement le long de l'axe 3 et elle est couplée à une légère réorientation des trimères et des sous unités régulatrices.



- NB : la transition T  $\rightarrow$  R conserve la symétrie D<sub>3</sub> du complexe



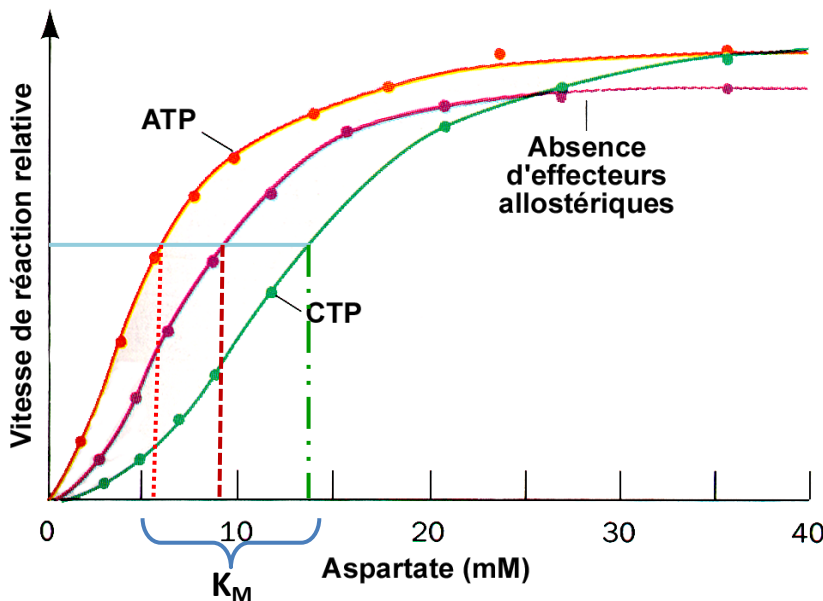
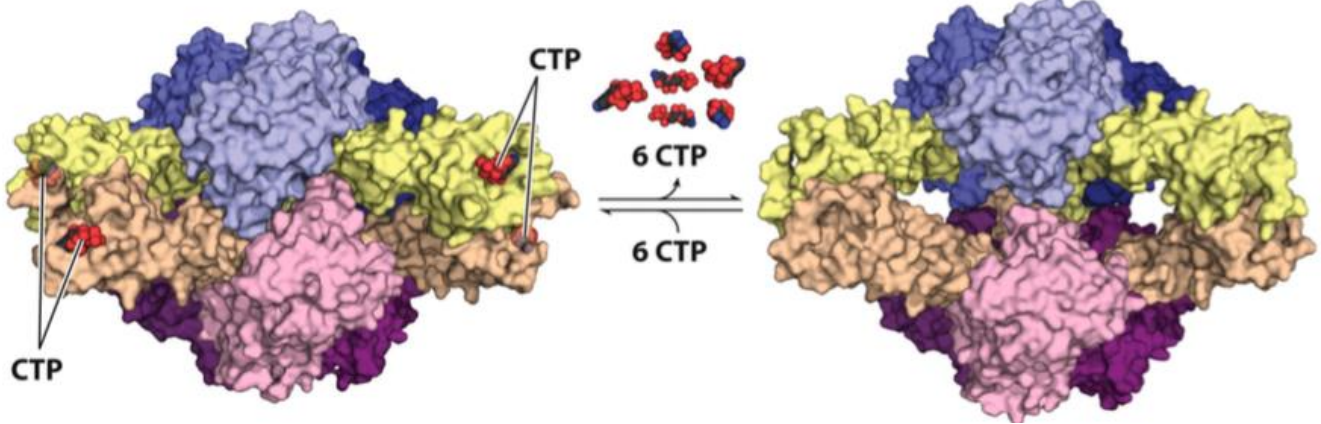
Même en l'absence de tout substrat ou effecteur, ATCase existe en équilibre entre les états R et T, et l'état T favorisée par un facteur d'environ 200, à savoir que  $[T]_{eq} / [R]_{eq} \approx 200$ .

La liaison par PALA (analogue de l'état de transition), ou la liaison par substrat, stabilise l'état R, la forme plus active.

Le CTP maintiendrait les sous-unités à l'état T (inhibition), alors que l'ATP les maintiendrait à l'état R (stimulation).

**État T - moins actif**

**État R - plus actif**



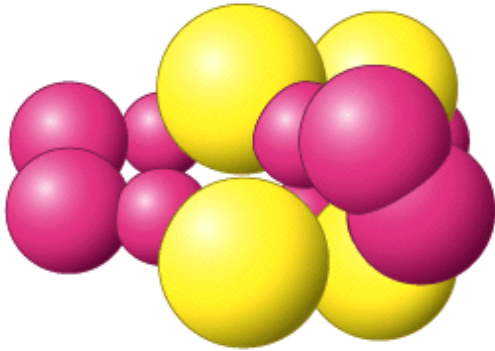
Cinétique résultante de l'ATCase en présence de l'ATP, du CTP, et sans effecteur allostérique. À noter : le changement important en  $K_M$

➤ l'ATP et la CTP compétitionnent pour le même site de liaison sur l'ATCase. Ils déplacent l'équilibre de l'ATCase soit vers l'état R dans le cas d'ATP ou vers

l'état T pour CTP. Ceci est dû à *des liaisons différentielles* faites par le groupement adénine de l'ATP et la cytosine du CTP qui engendrent des interactions différentes.

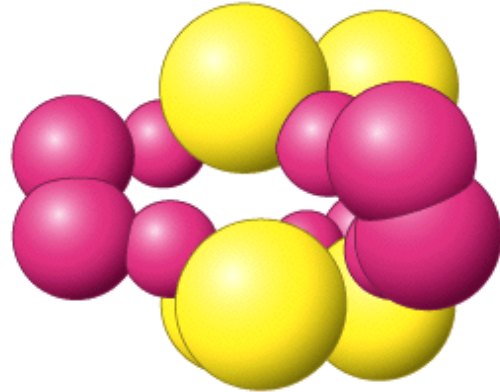
## Récapitulation de l'activité de l'ATCase

**État T**  
*moins actif*



Favorisé par la liaison du CTP

**État R**  
*plus actif*

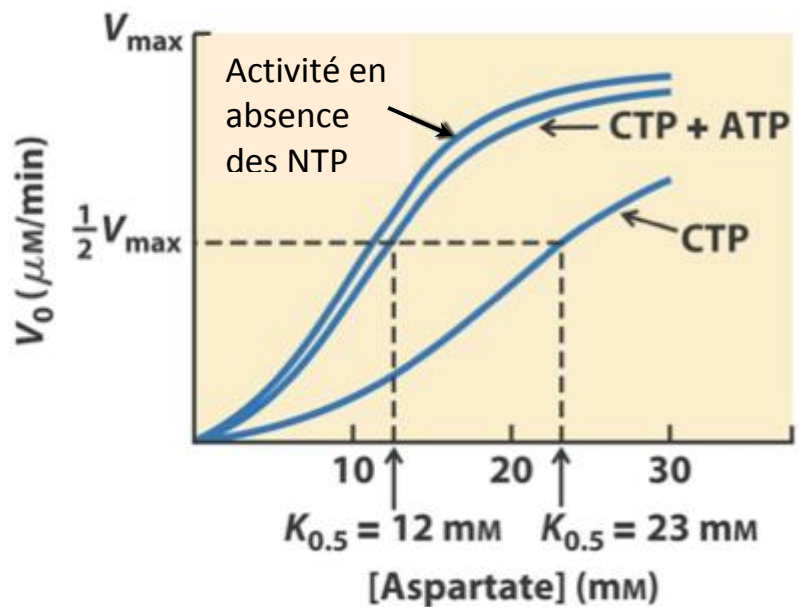


Favorisé par la liaison des substrats et de l'ATP

Les deux états sont dus à une transition de la structure quaternaire de l'enzyme qui modifie la structure du site actif et ainsi change la capacité de liaison du substrat et sa catalyse.

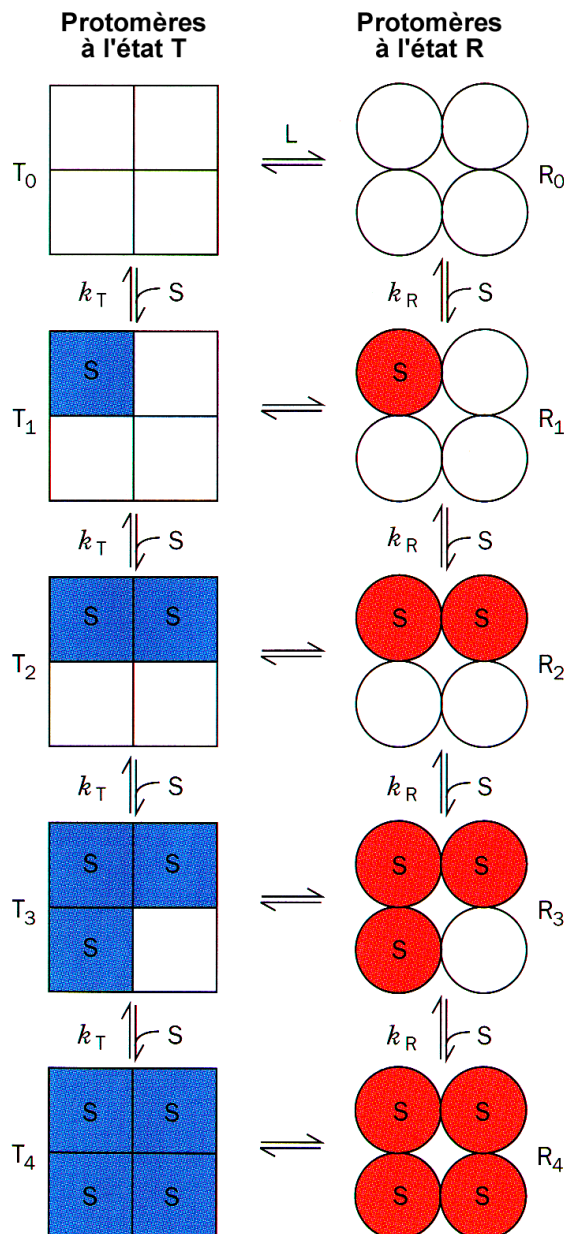
Les changements tertiaires (dans une sous-unité) et quaternaires (entre les sous-unités) manifestés ne sont pas indépendants; ils sont fortement couplés dû à des contacts étroits entre sous-unités.

L'état T et R représentent un équilibre contrôlé par la force de la liaison de chacun des ligands. Dépendamment des concentrations des ligands (substrats et nucléotide) et leur force de liaison feront pencher l'équilibre conformationnel vers un de deux états – les substrats et l'ATP de préférence vers l'état R, et l'inhibiteur CTP de préférence vers l'état T.



Deux modèles expliquent cette transition : le modèle concerté (ou symétrique) et le modèle séquentiel.

Dans le **modèle concerté**, toutes les sous-unités d'une enzyme doivent conserver la symétrie moléculaire, et, par conséquent, elles sont toutes en même temps au même état T ou R, à un moment précis. L'enzyme globale existe donc sous forme T ou R, puisque c'est seulement dans cette configuration qu'il y a la conservation de symétrie par toutes les sous-unités. Ainsi, la fixation du substrat dans un premier site actif provoque une transition telle que toutes les sous-unités de l'enzyme deviennent sous forme R, et ceci représente l'état de compétence catalytique. L'effecteur se lie à l'état T ou R de préférence et ainsi exerçant son rôle d'inhibiteur ou d'activateur.



Dans le **modèle séquentiel**, chaque sous-unité a la possibilité d'être sous forme R ou T, indépendamment des autres sous-unités. L'enzyme est constituée d'un mélange de sous-unités sous forme T et R. La liaison d'un premier substrat change la structure de la sous-unité à laquelle il s'est fixé (R), alors que les autres sous-unités acquièrent une affinité intermédiaire entre celle observée à l'état T et celles à l'état R.

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

