

**ENZYMOLOGIE  
MOLÉCULAIRE  
ET CELLULAIRE**

**TOME II**

**Jeannine YON-KAHN et Guy HERVÉ**



17, avenue du Hoggar  
Parc d'Activité de Courtabœuf, BP 112  
91944 Les Ulis Cedex A, France

## ***Grenoble Sciences***

Grenoble Sciences poursuit un triple objectif :

- réaliser des ouvrages correspondant à un projet clairement défini, sans contrainte de mode ou de programme,
- garantir les qualités scientifique et pédagogique des ouvrages retenus,
- proposer des ouvrages à un prix accessible au public le plus large possible.

Chaque projet est sélectionné au niveau de Grenoble Sciences avec le concours de referees anonymes. Puis les auteurs travaillent pendant une année (en moyenne) avec les membres d'un comité de lecture interactif, dont les noms apparaissent au début de l'ouvrage. Celui-ci est ensuite publié chez l'éditeur le plus adapté.

(Contact : Tél. : (33)4 76 51 46 95 - E-mail : Grenoble.Sciences@ujf-grenoble.fr)

Deux collections existent chez EDP Sciences :

- la ***Collection Grenoble Sciences***, connue pour son originalité de projets et sa qualité
- ***Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques***, collection présentant des thèmes de recherche d'actualité, traités par des scientifiques de premier plan issus de disciplines différentes.

### ***Directeur scientifique de Grenoble Sciences***

**Jean BORNAREL**, Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1

### ***Comité de lecture pour "Enzymologie moléculaire et cellulaire"***

- **Jean-Pierre MAZAT**, Professeur à l'Université Victor Ségalen, Bordeaux 2
- **Guy LAUQUIN**, Professeur à l'Université Victor Ségalen, Bordeaux 2
- **Jacques RICARD**, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris 7
- **Joël LUNARDI**, Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1
- **Jean PELMONT**, Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1
- **Michel VAN DER REST**, Professeur à l'École Normale Supérieure de Lyon
- **Bahram HOUCHMANDZADEH**, Directeur de recherche au CNRS, au laboratoire de Spectrométrie Physique de Grenoble

Cet ouvrage a bénéficié du soutien de l'Institut Servier (Neuilly-sur-Seine), de l'Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire (Paris-Sud), de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS (Gif-sur-Yvette), et du Département des Sciences Chimiques du CNRS

Grenoble Sciences bénéficie du soutien du **Ministère de l'Éducation nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche**, et de la **Région Rhône-Alpes**  
Grenoble Sciences est rattaché à l'**Université Joseph Fourier de Grenoble**

*Réalisation et mise en pages : Centre technique Grenoble Sciences*

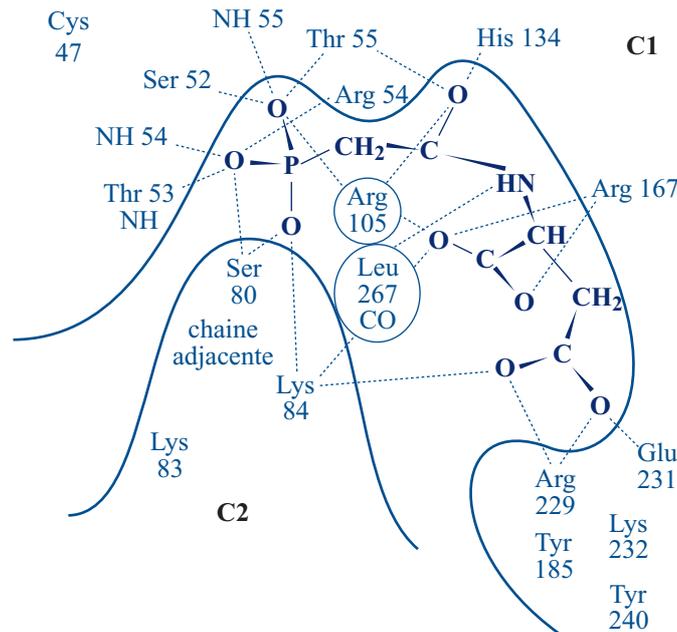
*Illustration de couverture : Alice GIRAUD*

**ISBN 2-86883-817-0**

© EDP Sciences, 2005

# **EXTRAITS**

sous-unités voisines est présentée sur la figure 10.5. Les atomes d'oxygène du groupe phosphate du substrat forment des liaisons hydrogène avec les groupes OH de Ser52 et de Thr55, le groupe amide de la chaîne principale des résidus 53, 54 et 55 de la sous-unité catalytique C1, mais aussi avec Ser80 et Lys84 de la sous-unité C2. De même, les oxygènes du groupe carboxylate sont en interaction avec des groupes de chacune des sous-unités, Lys84 de la sous-unité C2, Arg229 et Gln231 de la sous-unité C1. L'oxygène du carbonyle interagit avec His134 de la sous-unité C1. Ainsi le PALA contracte de nombreuses interactions faisant intervenir deux sous-unités catalytiques. D'autres exemples seront donnés dans les chapitres suivants à propos des mécanismes catalytiques.



### 10.5 - Chaînes latérales impliquées dans l'association

#### du phosphonacétyl-L-aspartate (PALA) avec l'aspartate transcarbamylase

Les pointillés représentent les liaisons hydrogène, ponts salins et autres contacts polaires à une distance de moins de 3,5 Å [d'après WOLZ et al., 1986].

## 10.2. ENERGÉTIQUE DES ASSOCIATIONS ENZYME-SUBSTRAT

Lorsque la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat,  $K_s$ , est connue, il est possible d'évaluer les constantes thermodynamiques qui correspondent à la formation de ce complexe. L'énergie libre de formation du complexe est reliée à la constante  $K_s$  par la relation :

$$\Delta G = -RT \ln 1/K_s = RT \ln K_s$$

### 11.3. PRINCIPAUX TYPES DE RÉACTIONS CATALYSÉES PAR LES ENZYMES

Les diverses réactions chimiques catalysées par les enzymes peuvent être regroupées en quatre grands types :

- ▶ les réactions de transfert de groupes,
- ▶ les réactions d'oxydoréduction,
- ▶ les isomérisations, éliminations et réarrangements,
- ▶ enfin les réactions impliquant la formation ou la rupture de liaisons carbone-carbone.

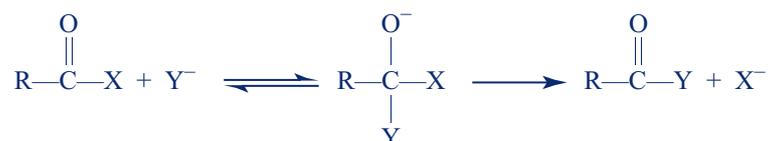
Il importe de décrire tout d'abord ces divers types de réaction avant d'aborder les caractéristiques de la catalyse enzymatique.

#### 11.3.1. RÉACTIONS DE TRANSFERT DE GROUPES

Dans ce type de réactions, une partie électrophile du substrat, par exemple un groupe acyle, phosphoryle ou glycosyle, est transférée à un accepteur nucléophile. Ce dernier peut être l'oxygène de la molécule d'eau ; il y a alors hydrolyse dégradative. Un tel mécanisme est impliqué dans les processus d'hydrolyse enzymatique de macromolécules (protéines, chaînes d'ADN et d'ARN, polysaccharides, lipides), et aussi dans l'hydrolyse de plus petites molécules comme l'acétylcholine. Par contre, dans la cellule, d'autres molécules portant un groupe nucléophile tel l'oxygène, l'azote ou le soufre servent d'accepteur dans les processus de synthèse.

##### 11.3.1.1. RÉACTIONS DE TRANSFERT D'ACYLE

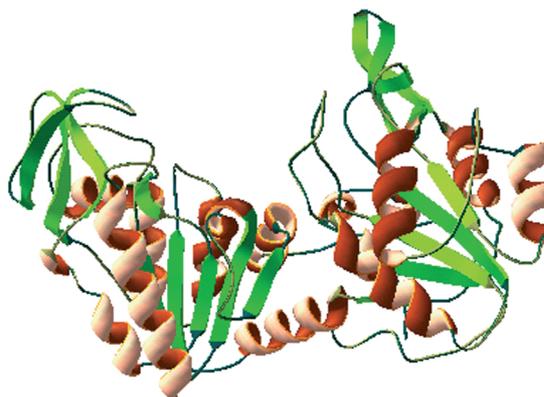
Les réactions de transfert d'acyle ont été prises comme exemple précédemment pour décrire les mécanismes impliqués dans la catalyse nucléophile. Ce sont des réactions du type suivant :



Ces réactions passent par un intermédiaire tétraédrique ainsi qu'il a été montré dans le paragraphe 11.1.2.1. Lorsque le nucléophile est l'oxygène de l'eau, un tel mécanisme rend compte de l'hydrolyse des protéines. Lorsque l'accepteur est un acide aminé ou un peptide, le nucléophile est l'azote aminé, il y a transpeptidation.

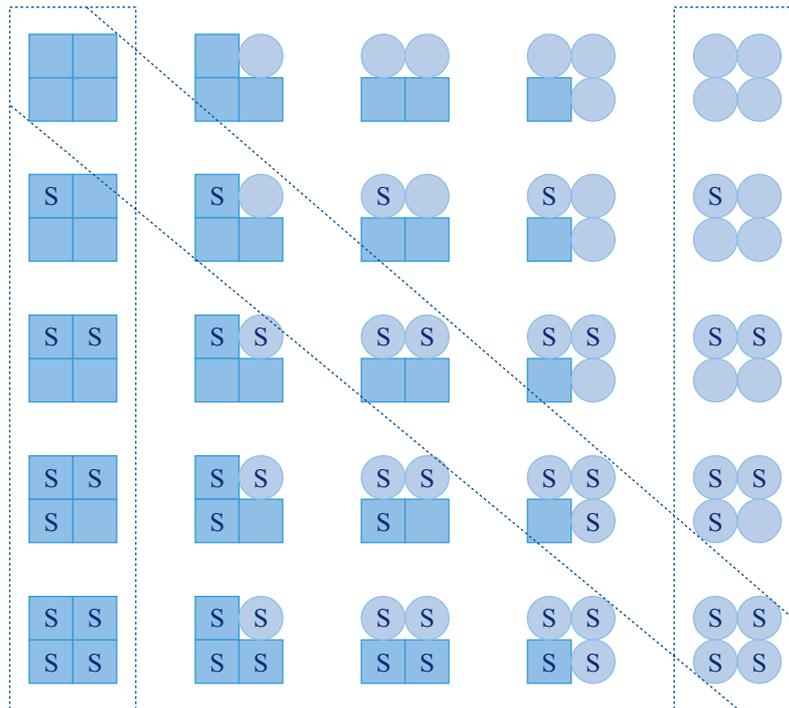
et  $\beta$ G dans l'enzyme de levure) forment le lien entre les deux domaines. Le domaine C-terminal a une structure du type pli ROSSMANN, caractéristique des domaines de fixation du  $\text{NAD}^+$  dans les déshydrogénases. Il n'existe aucune similitude de séquence entre les deux domaines qui diffèrent également dans le détail de leur structure tridimensionnelle. L'enzyme libre présente une large crevasse entre les deux domaines, structure ouverte en l'absence des substrats, comme cela a été décrit pour d'autres kinases, en particulier pour l'hexokinase.

12.22 - Représentation schématique de la structure de la phosphoglycérate kinase (PDB : 2PGK) montrant les deux domaines structuraux



#### 12.2.2.2. LE SITE DE FIXATION DES SUBSTRATS NUCLÉOTIDIQUES

Les études radiocristallographiques ont été réalisées sur les complexes formés par l'enzyme avec soit Mg-ADP, soit MgATP. Elles ne révèlent qu'un seul site de fixation pour les substrats nucléotidiques ; ce site, localisé dans le domaine C-terminal, est identique pour Mg-ATP et Mg-ADP. Les enzymes de cheval, de levure et de *Bacillus stearothermophilus* ont fourni des résultats analogues. La figure 12.23 ci-après illustre les interactions de l'enzyme de cheval avec Mg-ATP. Fixé à l'enzyme, Mg-ATP comme Mg-ADP a une configuration différente de celle qu'il présente dans les cristaux d'ATP. La base est dans une configuration *anti* par rapport au sucre, le ribose est *C'2 endo* et la liaison  $\text{C4}'\text{-C5}'$  exocyclique est *trans gauche* ; le groupe triphosphate est dirigé loin du noyau adénine. Ce dernier est complètement enfoui dans une région très hydrophobe du site, son groupement aminé formant vraisemblablement une liaison hydrogène avec l'oxygène du carbonyle de la chaîne polypeptidique de la Gly237. Le site de fixation de l'adénine est délimité par les parties de la chaîne principale consécutives aux segments  $\beta$ G (résidus Gly212, Gly213 et Ala214),  $\beta$ H (Gly236, Gly237 et Gly238) et  $\beta$ J (Val339, Gly340 et Val341). Les chaînes latérales de Leu313 et Leu256 sont en contact avec le noyau adénine. Le ribose est localisé dans une dépression au-dessus de la Pro338, les hydroxyles en 2' et 3' formant des liaisons hydrogène avec Gly343. Dans la chaîne des triphosphates, seul l' $\alpha$ -phosphate interagit avec le groupe  $\epsilon$ -aminé de Lys219 formant une paire d'ions. Dans l'enzyme natif, cette position est occupée par un ion sulfate ou tartrate selon la composition de la solution de cristallisation. Les  $\alpha$



13.11 - Modèle d'ADAIR-WEBER généralisé

### 13.7. COUPLAGE THERMODYNAMIQUE ENTRE ÉNERGIE DE FIXATION DES LIGANDS (SUBSTRATS) ET ÉNERGIE D'INTERACTION ENTRE SOUS-UNITÉS

- Cette notion est en fait implicite dans les modèles présentés dans les sections qui précèdent. Elle est également incluse dans les considérations thermodynamiques de WYMAN (1965) sur l'importance des potentiels de liaison.

Ce concept de couplage énoncé par NOBLE (1967) a été extensivement développé par WEBER qui a conçu une méthode d'analyse du comportement des protéines présentant des effets coopératifs, en termes de variations d'énergie libre associées d'une part à la fixation du ligand et d'autre part aux interactions entre les sous-unités de la protéine.

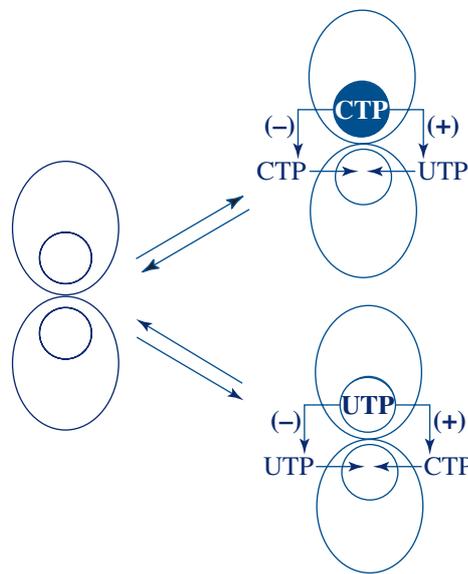
Considérons le cas extrême d'un équilibre monomère-dimère. Si le substrat S a une affinité plus grande pour la forme dimérique D que pour la forme monomérique M, il déplacera l'équilibre vers le dimère. Par contre, tout paramètre physico-chimique qui favorisera la dissociation sera en défaveur de la fixation de S.

### Action synergique du CTP et de l'UTP

- Il a été montré que les deux métabolites finaux, CTP et UTP, altèrent la fixation de l'aspartate aux sites catalytiques de manière synergique. L'UTP seul n'a pas d'effet, quoiqu'il se fixe aux sites régulateurs. Le CTP a un effet limité. En présence des deux nucléotides, l'ATCase est complètement inhibée [WILD *et al.*, 1989]. Ce phénomène de synergie se manifeste entièrement au niveau de la fixation des nucléotides aux deux sites régulateurs des dimères de chaînes régulatrices (figure 13.31). L'UTP et le CTP se fixent de manière compétitive aux mêmes sites régulateurs. La fixation du CTP au premier site diminue l'affinité du deuxième site pour ce nucléotide mais augmente son affinité pour l'UTP et inversement [ENGLAND & HERVÉ, 1992]. Ce phénomène est identique que les sous-unités régulatrices (dimères de chaînes régulatrices) soient associées ou non aux sous-unités catalytiques indiquant que dans ce processus il n'y a pas d'interaction entre sous-unités régulatrices dans l'holoenzyme.

#### 13.31 - Modèle des interactions entre sites à l'intérieur du dimère régulateur de l'ATCase

Les signes + et - correspondent respectivement à une augmentation (coopérativité) et à une diminution (anticoopérativité) d'affinité [d'après ENGLAND & HERVÉ, 1992].



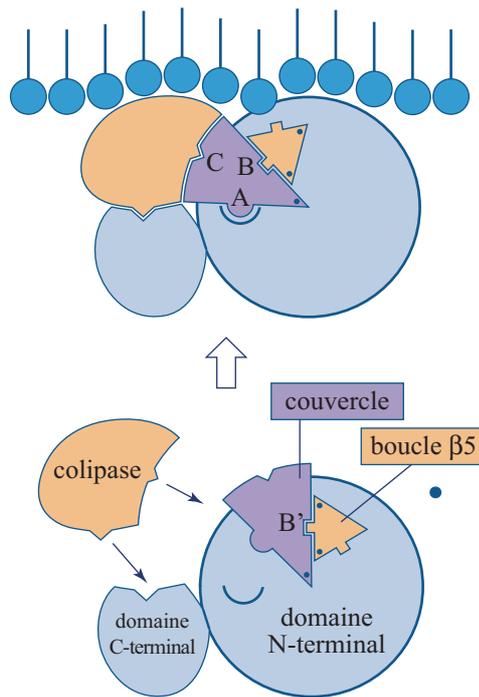
$$K_d(\text{UTP}) = 810 \mu\text{M} \rightarrow \text{réel } K_d(\text{UTP/CTP}) = 10 \mu\text{M}$$

$$K_{d1}(\text{CTP}) = 9 \mu\text{M} \rightarrow \text{réel } K_{d1}(\text{CTP/UTP}) = 1,7 \mu\text{M}$$

$$K_{d2}(\text{CTP}) = 260 \mu\text{M} \rightarrow \text{réel } K_{d2}(\text{CTP/UTP}) = 70 \mu\text{M}$$

### Les signaux régulateurs de l'ATP, de l'UTP et du CTP sont transmis par des voies différentes

L'utilisation extensive de la mutagenèse dirigée a permis de montrer que la transmission des signaux régulateurs des trois effecteurs implique des zones d'interface différentes entre chaînes catalytiques et chaînes régulatrices, mais également entre domaines d'une même chaîne [XI *et al.*, 1991 ; VAN VLIET *et al.*, 1991 ; DE STAERCKE *et al.*, 1993]. Au niveau de l'interface entre la région C-terminale d'une



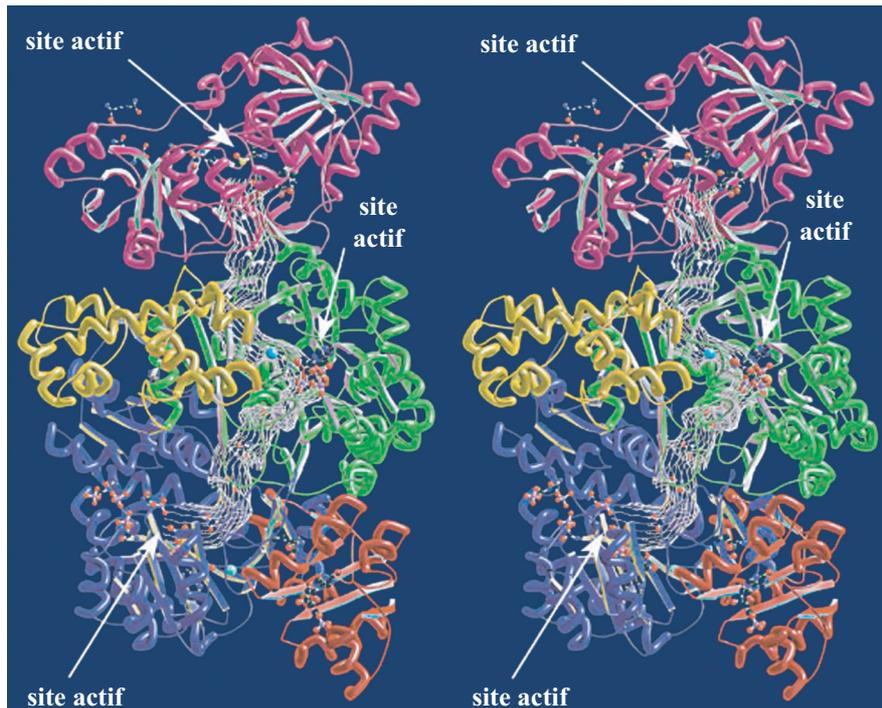
**13.53 - Mécanisme  
d'activation de la lipase**  
[d'après CARRIÈRE et al., 1994]

Cet exemple, aujourd'hui bien documenté, montre comment une interaction entre deux protéines assure la régulation d'une activité enzymatique *in vivo*.

### 13.13.2. RÉGULATION DE L'ORNITHINE TRANSCARBAMYLASE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PAR L'ARGINASE

L'ornithine transcarbamylyase catalyse la première réaction de la voie de biosynthèse de l'arginine. L'arginase catalyse la coupure de l'arginine en ornithine et urée. Ces activités sont donc à l'origine de deux voies métaboliques différentes (figure 13.54 ci-contre). Lorsque les concentrations intracellulaires d'arginine et d'ornithine sont élevées, ce système peut donc constituer un « cycle futile » conduisant à une dégradation incontrôlée d'ATP. Un tel danger est évité dans certaines espèces telles que *Saccharomyces cerevisiae* par l'association forte mais réversible de l'ornithine transcarbamylyase et de l'arginase.

Ce phénomène découvert par MESSENGUY et WYAME (1969) a été étudié par HENSLEY (1987) au niveau moléculaire. L'association de ces deux enzymes abolit complètement l'activité de l'ornithine transcarbamylyase, mais n'affecte pas l'activité de l'arginase. Ces deux enzymes sont des protéines trimériques de poids moléculaires respectifs 102 000 et 99 000.



15.13 - Structure de l'hétérodimère  $\alpha\beta$  de la CPSase montrant le tunnel entre les sites actifs (vue stéréoscopique) [d'après HOLDEN et al., 1998]

## 15.5. LE COMPLEXE DE LA PYRUVATE DÉSHYDROGÉNASE

A la jonction de la glycolyse et du cycle citrique, le complexe multienzymatique de la pyruvate déshydrogénase catalyse la transformation du pyruvate en acétyl-CoA selon la réaction globale :



Il est constitué par l'assemblage de multiples copies de trois sortes d'enzymes différents, le constituant E1 qui est une pyruvate décarboxylase, le constituant E2 qui est une dihydrolipoamide acétyl transférase et le constituant E3 qui est une dihydrolipoamide déshydrogénase.

### 15.5.1. PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES

Le constituant E1 à activité pyruvate décarboxylase fonctionne en présence d'un coenzyme, le pyrophosphate de thiamine (TPP) et catalyse la réaction :

