



C O L L E C T I O N
DIRIGÉE PAR JEAN BORNAREL

G R E N O B L E S C I E N C E S

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

■ Athel CORNISH-BOWDEN
Marc JAMIN
Valdur SAKS



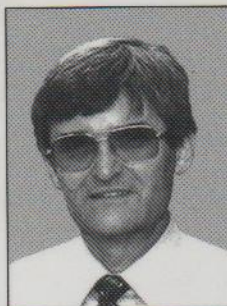
■ CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biologiques en étudiant leur vitesse et les flux métaboliques. En partant des enzymes isolés et en allant vers les systèmes métaboliques organisés et intégrés, la cinétique enzymatique permet de décrire quantitativement les propriétés catalytiques des enzymes et les mécanismes de leur régulation. La cinétique enzymatique est un élément indispensable des études biochimiques et des biotechnologies. L'ouvrage est une adaptation complétée du célèbre *Fundamentals of Enzyme Kinetics* d'Athel Cornish-Bowden. Il donne une description des principes de base (cinétique, thermodynamique des enzymes), des phénomènes d'inhibition et d'activation, de la régulation allostérique et de la coopérativité ; il aborde les systèmes enzymatiques, le contrôle métabolique et analyse en détail les applications pratiques que permettent ces méthodes.

L'ouvrage a été adapté au public français. Il comble un vide qui existait dans la littérature en langue française pour les étudiants des licences et masters de biologie. Il concerne aussi tous les universitaires, chercheurs, biologistes des entreprises quelle que soit leur spécialité.

■ LES AUTEURS

Athel Cornish-Bowden (à gauche) a obtenu son doctorat à l'université d'Oxford. Il poursuit ensuite une carrière de chercheur et d'enseignant à Berkeley (USA) puis à Birmingham (UK). Il est actuellement directeur de recherche au



CNRS (Marseille). **Marc Jamin** (à droite) obtint son doctorat à l'université de Liège (Belgique) et effectua sa recherche à Stanford puis à La Jolla (USA) avant de devenir, comme V. Saks, professeur à l'université de Grenoble. Marc Jamin est titulaire du Prix Marcel Florin.



Valdur Saks (en bas) a étudié la chimie physique et l'enzymologie à Moscou où il fut directeur du laboratoire de Bioénergétique. Il est titulaire du prix d'Etat de l'ex-URSS et membre de l'Académie des sciences d'Estonie. Les expériences diversifiées des trois auteurs ont permis de réaliser un ouvrage unique dans l'édition française.

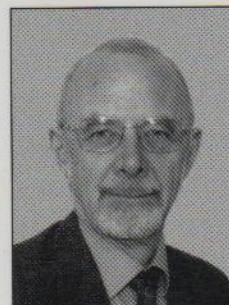


TABLE DES MATIÈRES

PRÉFACE.....	5
1 - PRINCIPES DE BASE DE LA CINÉTIQUE CHIMIQUE.....	7
1.1. Introduction.....	7
Les conventions d'écriture des réactions chimiques.....	7
1.2. Les principes de base de la cinétique chimique.....	10
1.2.1. Vitesse de réaction et équation de vitesse.....	10
1.2.2. Mécanisme de réaction et réactions élémentaires.....	11
1.2.3. Ordre et molécularité d'une réaction.....	11
1.2.4. Détermination de l'ordre d'une réaction.....	15
1.2.5. Dimensions des constantes de vitesse.....	16
1.2.6. Les réactions réversibles.....	19
1.2.7. Détermination des constantes de vitesse du premier ordre.....	20
Problèmes.....	23
2 - LA THERMODYNAMIQUE ET LA THÉORIE DES VITESSES.....	25
2.1. La thermodynamique et ses limites.....	25
2.2. Concepts généraux de la thermodynamique.....	26
2.2.1. États du système.....	26
2.2.2. Un «processus» est un événement au cours duquel une propriété du système change.....	27
2.3. Les lois de la thermodynamique.....	28
2.3.1. Loi de conservation de l'énergie.....	28
2.3.2. La définition de l'entropie et du critère de spontanéité.....	30
2.3.3. La définition statistique de l'entropie.....	31
2.3.4. L'entropie dans les systèmes vivants et les réactions couplées.....	32
2.3.5. L'énergie de GIBBS.....	32
2.3.6. Le potentiel chimique : L'énergie de GIBBS d'un soluté dépend de sa concentration.....	33
2.3.7. Relation entre la constante d'équilibre et la variation d'énergie de GIBBS.....	34
2.4. Relations entre la thermodynamique et la cinétique : les notions d'équilibre et d'état stationnaire.....	37
2.4.1. Distinction entre vitesse initiale et vitesse nette.....	37
2.4.2. L'état d'équilibre.....	38
2.4.3. L'état stationnaire.....	41

2.5. L'influence de la température sur les constantes de vitesse.....	45
2.5.1. Le profil réactionnel.....	45
2.5.2. L'équation d'ARRHENIUS.....	46
2.5.3. Théorie de collision élémentaire.....	47
2.5.4. Théorie de l'état de transition - Théorie de la vitesse absolue.....	49
2.5.5. Les enzymes stabilisent l'état de transition de la réaction.....	53
Problèmes.....	54

3- INTRODUCTION À LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

RÉACTIONS À UN SUBSTRAT ET UN PRODUIT.....	55
3.1. Historique.....	55
3.1.1. La découverte des enzymes.....	55
3.1.2. Les premières études de la cinétique enzymatique et le développement du concept du complexe enzyme-substrat.....	57
3.1.3. Les travaux de Victor HENRI.....	59
3.1.4. Les problèmes rencontrés par HENRI.....	63
3.1.5. La notion de site actif et le mécanisme d'action des enzymes.....	66
3.2. Description cinétique des réactions enzymatiques dans des conditions d'équilibre.....	67
3.2.1. La première équation cinétique : l'équation de HENRI.....	67
3.2.2. Le traitement de MICHAELIS et MENTEN.....	70
3.3. Description cinétique des réactions enzymatiques dans des conditions d'état stationnaire.....	72
3.3.1. Les premières utilisations de la notion d'état stationnaire.....	72
3.3.2. Le traitement de BRIGGS et HALDANE.....	73
3.3.3. L'équation de MICHAELIS et MENTEN.....	75
3.3.4. Analyse de la courbe définie par l'équation de MICHAELIS et MENTEN.....	76
3.3.5. Autres formes de l'équation de MICHAELIS et MENTEN.....	78
3.3.6. L'équilibre comme un cas particulier de l'état stationnaire.....	79
3.3.7. Validité et limites de l'hypothèse de l'état stationnaire.....	79
3.4. Unités de l'activité enzymatique.....	81
3.5. Méthodes d'analyse des données cinétiques.....	82
3.5.1. Le graphique de v en fonction de $[A]$	82
3.5.2. Différentes méthodes de transformation linéaire.....	84
3.6. Les réactions réversibles.....	96
3.6.1. L'équation de vitesse du mécanisme réversible simple.....	96
3.6.2. L'équation de vitesse du mécanisme en trois étapes : traitement à l'équilibre.....	98
3.6.3. La relation de HALDANE.....	100
3.6.4. L'équation de vitesse du mécanisme en trois étapes : cas à l'état stationnaire.....	102
3.6.5. Utilisation du profil d'énergie de GIBBS.....	104
3.6.6. Les enzymes unidirectionnels.....	104
3.7. Inhibition par le produit.....	107
3.8. Intégration des équations de vitesse pour les réactions enzymatiques.....	108
3.8.1. Équation de MICHAELIS et MENTEN sans inhibition par le produit.....	108
3.8.2. Inhibition par le produit.....	109

3.8.3. Mesures précises des vitesses initiales.....	110
3.8.4. Les décours complets dans d'autres cas	114
<i>Problèmes</i>	115
4 - ASPECTS PRATIQUES DES ÉTUDES CINÉTIQUES	119
4.1. <i>Mesure de l'activité enzymatique</i>	119
4.1.1. Méthodes continues et discontinues de mesure.....	119
4.1.2. Estimation de la vitesse initiale.....	120
4.1.3. Amélioration de la linéarité d'un décours de réaction	121
4.1.4. Les systèmes couplés.....	123
4.2. <i>Détection de l'inactivation d'un enzyme</i>	127
4.3. <i>Choix des conditions expérimentales</i>	129
4.3.1. Choix des concentrations de substrat.....	129
4.3.2. Choix du pH , de la température et des autres conditions.....	131
4.3.3. Réplication des mesures	132
4.4. <i>Traitement des équilibres ioniques</i>	135
<i>Problèmes</i>	137
5 - INHIBITION ET ACTIVATION DES ENZYMES	139
5.1. <i>Inhibition réversible et irréversible</i>	139
5.1.1. Les poisons de la réaction catalytique	139
5.1.2. Analyse de la vitesse d'inactivation.....	139
5.1.3. Types d'inhibition réversible	140
5.2. <i>Inhibitions linéaires</i>	141
5.2.1. Inhibition compétitive (ou inhibition spécifique).....	141
5.2.2. Inhibition mixte	143
5.2.3. L'inhibition anti-compétitive (inhibition catalytique)	146
5.2.4. Résumé des types d'inhibition linéaire.....	147
5.3. <i>Présentations graphiques des résultats des inhibitions</i>	148
5.4. <i>Relation entre les constantes d'inhibition et la concentration de demi-inhibition</i>	151
5.5. <i>Inhibition par compétition avec un substrat</i>	154
5.5.1. Spécificité de l'enzyme	154
5.5.2. Test du déroulement simultané de deux réactions.....	156
5.5.3. Protection par le substrat	158
5.6. <i>Activation des enzymes</i>	159
5.6.1. Diverses utilisations du terme «activation».....	159
5.6.2. Activation spécifique.....	160
5.6.3. Activation et inhibition hyperboliques	163
5.7. <i>Préparation des expériences d'inhibition</i>	164
5.8. <i>Effets inhibiteurs des substrats</i>	166
5.8.1. Fixation non-productive	166
5.8.2. Inhibition par le substrat.....	169

5.9. La modification d'un groupe de l'enzyme comme un moyen d'identifier les groupes essentiels	171
Problèmes	174

6 – RÉACTIONS À PLUSIEURS SUBSTRATS	179
6.1. Introduction	179
6.2. Classification des mécanismes	180
6.2.1. Les mécanismes à complexe ternaire	180
6.2.2. Mécanismes à enzyme modifié	183
6.2.3. Comparaison entre la classification chimique et la classification cinétique	184
6.2.4. Représentation schématique des mécanismes	187
6.3. Dérivation des équations de vitesse à l'état stationnaire	189
6.3.1. Introduction	189
6.3.2. La méthode de KING et ALTMAN	189
6.3.3. La méthode de WONG et HANES	193
6.3.4. Modifications de la méthode de KING et ALTMAN	194
6.3.5. Réactions renfermant des étapes à l'équilibre	197
6.3.6. Analyse des mécanismes par inspection	199
6.3.7. Dérivation des équations de vitesse par ordinateur	202
6.4. Les équations de vitesse	205
6.4.1. Mécanisme de type ordonné à complexe ternaire	205
6.4.2. Mécanisme de type aléatoire à complexe ternaire	206
6.4.3. Mécanisme à enzyme modifié	208
6.4.4. Calcul des constantes de vitesse à partir des paramètres cinétiques	208
6.5. Les mesures de vitesse initiale en absence de produit	210
6.5.1. Signification des paramètres	210
6.5.2. Paramètres apparents de MICHAELIS et MENTEN	212
6.5.3. Les graphiques primaires pour les mécanismes à complexe ternaire	213
6.5.4. Les graphiques secondaires	214
6.5.5. Graphiques pour les mécanismes à enzyme modifié	216
6.6. Inhibition par le substrat	217
6.6.1. Pourquoi y a-t-il une inhibition par le substrat ?	217
6.6.2. Mécanisme de type ordonné à complexe ternaire	218
6.6.3. Mécanisme de type aléatoire à complexe ternaire	219
6.6.4. Mécanisme à enzyme modifié	219
6.6.5. Valeur diagnostique de l'inhibition par le substrat	220
6.7. Inhibition par le produit	221
6.8. Préparation des expériences	223
6.9. Un exemple simple d'étude d'un enzyme à deux substrats et deux produits : la créatine kinase	224
6.9.1. Application pratique de la mesure des paramètres pour la créatine kinase	228
6.10. Réactions à trois substrats et plus	229
Problèmes	233

7 – UTILISATION D'ISOTOPES POUR L'ÉTUDE DES MÉCANISMES ENZYMATIQUES	237
7.1. Echange isotopique et effets isotopiques	237
7.2. Principes de l'échange d'isotope	238
7.3. Echange d'isotopes à l'équilibre	241
7.4. Echange d'isotopes dans des mécanismes à enzyme modifié	242
7.5. Echange d'isotopes hors équilibre	243
7.5.1. Rapports de flux chimiques	243
7.5.2. Cinétiques d'isomérisation	247
7.5.3. Perturbation par un traceur	249
7.6. La théorie des effets isotopiques cinétiques	251
7.6.1. Effets isotopiques primaires	251
7.6.2. Effets isotopiques secondaires	253
7.6.3. Effets isotopiques sur les équilibres	253
7.7. Effets isotopiques primaires sur les cinétiques enzymatiques	254
Problèmes	256
8 – EFFETS DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES ENZYMES	257
8.1. Effet du pH sur les cinétiques enzymatiques	257
8.2. Les propriétés acide-base	259
8.2.1. Les équilibres d'ionisation	259
8.2.2. Les tampons	263
8.2.3. Les propriétés acide-base des protéines	265
8.2.4. Analyse sur la base des constantes de dissociation des groupes	267
8.2.5. Analyse sur la base des constantes de dissociation moléculaires	269
8.2.6. Les fonctions pH de MICHAELIS	270
8.2.7. Les courbes en cloche	271
8.3. L'effet du pH sur les constantes cinétiques enzymatiques	273
8.3.1. Hypothèses sous-jacentes	273
8.3.2. La dépendance au pH des paramètres V et V/K_m	274
8.3.3. Les paramètres indépendants du pH et leur relation avec les paramètres «apparents»	276
8.3.4. La dépendance au pH de K_m	277
8.3.5. Préparation des expériences	279
8.4. Ionisation du substrat	280
8.5. Effets complexes du pH	280
8.6. Effets de la température sur les réactions catalysées par des enzymes	281
8.6.1. Dénaturation thermique	281
8.6.2. L'«optimum» de température	283
8.6.3. Application de l'équation d'EYRING aux enzymes	284
8.7. Effets de la pression sur les réactions catalysées par des enzymes	285
8.7.1. Effets de la pression sur les équilibres et les vitesses de réaction	285
8.7.2. Effet de la pression sur les interactions non-covalentes	287
8.7.3. Effets de la pression sur les réactions enzymatiques	287