

TABLE DES MATIÈRES

<i>PRÉFACE</i>	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. Mesure de l'activité enzymatique	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. Détection de l'inactivation d'un enzyme	127
4.3. Choix des conditions expérimentales	129
4.3.1. Choix des concentrations de substrat.....	129
4.3.2. Choix du <i>pH</i> , de la température et des autres conditions.....	131
4.3.3. Réplication des mesures	132
4.4. Traitement des équilibres ioniques	135
<i>Problèmes</i>	137
5 – INHIBITION ET ACTIVATION DES ENZYMES	139
5.1. Inhibition réversible et irréversible	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. Inhibitions linéaires	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. Présentations graphiques des résultats des inhibitions	148
5.4. Relation entre les constantes d'inhibition et la concentration de demi-inhibition	151
5.5. Inhibition par compétition avec un substrat	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. Activation des enzymes	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. Préparation des expériences d'inhibition	164
5.8. Effets inhibiteurs des substrats	166
5.8.1. Fixation non-productive	166
5.8.2. Inhibition par le substrat.....	169

5.9. <i>La modification d'un groupe de l'enzyme comme un moyen d'identifier les groupes essentiels</i>	171
<i>Problèmes</i>	174
6 – RÉACTIONS À PLUSIEURS SUBSTRATS	179
6.1. <i>Introduction</i>	179
6.2. <i>Classification des mécanismes</i>	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. <i>Dérivation des équations de vitesse à l'état stationnaire</i>	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. <i>Les équations de vitesse</i>	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. <i>Les mesures de vitesse initiale en absence de produit</i>	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. <i>Inhibition par le substrat</i>	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. <i>Inhibition par le produit</i>	221
6.8. <i>Préparation des expériences</i>	223
6.9. <i>Un exemple simple d'étude d'un enzyme à deux substrats et deux produits :</i> <i>la créatine kinase</i>	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
<i>Problèmes</i>	233

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

8.8. Effets isotopiques du solvant.....	289
Problèmes	291
9 – CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	293
9.1. Fonction des interactions coopératives et allostériques.....	293
9.1.1. Cycles futiles	293
9.1.2. Mécanismes de régulations de l'activité enzymatique.....	294
9.1.3. Inadéquation de l'équation de MICHAELIS et MENTEN pour décrire les mécanismes de régulation.....	296
9.1.4. La coopérativité	297
9.1.5. Interactions allostériques.....	298
9.2. Le développement de modèle expliquant la coopérativité	299
9.2.1. L'équation de HILL.....	299
9.2.2. Un autre index de coopérativité	301
9.2.3. Hypothèse d'un équilibre de fixation dans les cinétiques coopératives.....	301
9.2.4. L'équation d'ADAIR	303
9.2.5. Définitions mécaniques et opérationnelles de la coopérativité.....	307
9.3. Ajustement induit.....	309
9.4. Modèles modernes de coopérativité	311
9.4.1. Le modèle symétrique de MONOD, WYMAN et CHANGEUX	311
9.4.2. Le modèle séquentiel de KOSHLAND, NÉMETHY et FILMER.....	318
9.4.3. Modèles association-dissociation.....	324
9.5. Coopérativité cinétique.....	325
Problèmes	327
10 – CINÉTIQUES DES SYSTÈMES MULTI-ENZYMATIQUES	329
10.1. Les enzymes dans leur contexte biologique.....	329
10.2. Analyse du contrôle métabolique	330
10.3. Élasticités.....	332
10.3.1. Définition de l'élasticité.....	332
10.3.2. Propriétés communes des élasticités.....	335
10.3.3. Les cinétiques enzymatiques vues à travers l'analyse du contrôle	336
10.3.4. Considération des vitesses et des concentrations comme des effets et non comme des causes.....	337
10.4. Les coefficients de contrôle.....	340
10.5. Relations d'addition.....	342
10.6. Relations entre les élasticités et les coefficients de contrôle de flux	344
10.6.1. Propriétés de connectivité	344
10.6.2. Les coefficients de contrôle dans une voie à trois étapes.....	346
10.6.3. Expression des relations d'addition et de connectivité sous une forme matricielle	348
10.6.4. Relation de connectivité pour un métabolite non-impliqué dans une boucle de contrôle rétroactif.....	348

10.6.5. Le coefficient de contrôle de flux d'un enzyme pour le flux au travers de sa propre réaction	349
10.7. Les coefficients de réponse : la réponse partagée	350
10.8. Contrôle et régulation.....	351
10.9. Mécanismes de régulation	355
10.9.1. Canalisation de métabolites.....	355
10.9.2. Cascades d'enzymes convertibles	357
10.9.3. Le rôle métabolique de l'adénylate kinase.....	359
Problèmes	362
11 – LES RÉACTIONS RAPIDES	365
11.1. Les limitations des mesures à l'état stationnaire.....	365
11.1.1. Phases transitoires	365
11.1.2. Etapes «lentes» et «rapides» dans les mécanismes enzymatiques.....	366
11.1.3. Ambiguïtés dans l'analyse à l'état stationnaire de systèmes impliquant des isomérisations d'intermédiaires.....	367
11.1.4. Mauvais conditionnement	369
11.2. Libération du produit avant la fin de cycle catalytique.....	370
11.2.1. Les cinétiques avec burst	370
11.2.2. Titrage du site actif.....	372
11.3. Les techniques expérimentales.....	373
11.3.1. Les classes de méthodes.....	373
11.3.2. Les méthodes de flux continu	375
11.3.3. Les méthodes de stopped-flow.....	376
11.3.4. Le quenched flow	377
11.3.5. Les méthodes de relaxation.....	380
11.4. La cinétique des phases transitoires	382
11.4.1. Les systèmes hors d'équilibre.....	382
11.4.2. Simplification de mécanismes complexes.....	386
11.4.3. Les systèmes proches de l'équilibre.....	389
Problèmes	392
12 – ESTIMATION DES CONSTANTES CINÉTIQUES	393
12.1. L'effet des erreurs expérimentales dans l'analyse des données cinétiques	393
12.2. Ajustement sur une équation de MICHAELIS et MENTEN par la méthode des moindres carrés	396
12.2.1. Introduction d'erreurs dans l'équation de MICHAELIS et MENTEN	396
12.2.2. Estimations de V et de K_m	397
12.2.3. Résultats correspondants pour une déviation standard uniforme des vitesses.....	399
12.3. Aspects statistiques du graphique linéaire direct	400
12.3.1. Comparaison entre les statistiques classiques et les statistiques à distribution libre.....	400
12.3.2. Application au graphique linéaire direct.....	402
12.3.3. Absence de la nécessité d'utiliser des pondérations	403

12.3.4. Insensibilité vis-à-vis d'observations exceptionnelles.....	404
12.3.5. Traitement des estimations négatives des paramètres.....	405
12.4. <i>Précision des estimations des paramètres cinétiques</i>	407
12.5. <i>Graphiques des résidus et leurs utilisations</i>	411
<i>Problèmes</i>	416
<i>SOLUTIONS DES PROBLÈMES ET COMMENTAIRES</i>	419
<i>RÉFÉRENCES</i>	427
<i>INDEX</i>	443
<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	455