

Table des matières

Chapitre 1. Chronologie de la découverte et de l'étude des enzymes	15
1. Les premiers pas	16
2. Le xx^e siècle	18
3. Années 1980 à nos jours	21
Résumé	24
Chapitre 2. La reconnaissance enzyme-substrat	25
1. Caractéristiques de l'association protéine-ligand. Classes d'enzymes	25
1.1. Facteurs de l'extrême spécificité de la reconnaissance protéine-ligand.....	25
1.2. Les classes d'enzymes.....	28
2. Le complexe enzyme-substrat	29
2.1. Faits expérimentaux	30
2.2. Nature des forces au sein du complexe [enzyme-substrat]	31
2.3. Aspects thermodynamiques	33
2.4. Aspects structuraux.....	34
3. État de transition, énergie libre d'activation et énergie libre de la réaction enzymatique	36
3.1. Généralités.....	36
3.2. État de transition et accélération de la réaction.....	37
4. Les effets de la surpopulation intracellulaire des macromolécules (<i>Macromolecular crowding</i>)	42
Résumé	44
Chapitre 3. Illustration d'une super-famille d'enzymes ubiquitaires : les protéases	45
1. Principales sources de protéases	48
1.1. Protéases animales	48
1.2. Protéases de plantes.....	48
1.3. Protéases microbiennes	48

1.4. Protéases fongiques.....	49
1.5. Protéases alcalines.....	49
2. Classification des protéases	49
2.1. Classification selon la commission des enzymes	49
2.2. Classification du point de vue du mécanisme catalytique.....	53
3. Le zymogène : précurseur d'une protéase	55
3.1. Activation du zymogène	55
3.2. Le domaine d'activation du zymogène	57
4. Mécanisme catalytique des protéases à sérine	57
4.1. Les acides aminés du site catalytique : la triade catalytique	57
4.2. Étapes de la catalyse par les protéases à sérine.....	58
4.3. Quelques protéases à sérine.....	61
5. Synthèse peptidique par les protéases	63
5.1. Le contrôle thermodynamique de la synthèse des peptides (<i>Thermodynamically Controlled Synthesis-TCS</i>).....	63
5.2. Le contrôle cinétique de la synthèse des peptides (<i>Kinetically Controlled Synthesis-KCS</i>).....	63
Résumé	65
Chapitre 4. Équations de Henri-Michaelis-Menten et de Briggs-Haldane	67
1. La réaction enzymatique	67
1.1. Cinétique de la réaction enzymatique	67
1.2. Vitesse initiale de la réaction enzymatique	69
2. Conditions de concentrations en substrat pour les mesures de cinétiques enzymatiques : $[S]_0 \gg [E]_0$.....	70
3. L'hypothèse du quasi équilibre : l'équation de Henri, Michaelis et Menten (1913).....	70
4. L'hypothèse de l'état stationnaire de la concentration du complexe ES : l'équation de Briggs et Haldane (1925)	72
5. La signification des paramètres cinétiques.....	74
5.1. La constante de vitesse k_2 ou constante catalytique k_{cat}	74
5.2. La constante de vitesse k_{-2}	74
5.3. La vitesse maximale de la réaction V_{max}	76
5.4. La constante de dissociation K_s et la constante de Michaelis-Menten K_M	77
5.5. Le rapport (k_{cat} / K_M) ou constante de spécificité	78
6. Les représentations graphiques et les méthodes modernes par calculs.....	78
6.1. Représentation de Hans Lineweaver & Dean Burk (1934) dite des doubles inverses	79
6.2. Représentation de George Eadie (1942) & Baren Hofstee (1952).....	80
6.3. Représentation de Charles Hanes & Barnett Woolf (1932)	80
6.4. Représentation de George Eadie & George Scatchard (1949).....	81

6.5. Représentation de Robert Eisinger & Athel Cornish-Bowden – graphe linéaire direct (1974)	81
6.6. Les méthodes modernes par calculs	82
Résumé	84
 Exercices	 85
 Chapitre 5. Les mécanismes d'inhibition des enzymes.....	 89
1. Définition et caractéristiques générales des inhibiteurs.....	90
2. Inhibition compétitive (fixation exclusive).....	91
2.1. Différents modèles du mécanisme de l'inhibition compétitive.....	92
2.2. Exemples d'inhibiteurs compétitifs.....	93
3. Inhibition non compétitive (fixation non exclusive).....	95
4. Inhibition incompétitive (fixation non exclusive).....	96
5. Résumé des facteurs liés aux 3 types d'inhibitions « classiques ».....	98
6. Inactivation	99
6.1. Inhibition irréversible.....	99
6.2. Inhibition temps-dépendante	100
7. Inhibition par excès de substrat	101
7.1. Site de fixation du substrat constitué de plusieurs sous-sites: exemple de l'acétylcholinestérase	102
7.2. Fixation du substrat sur le site catalytique et sur un site effecteur: exemple de la phosphofructokinase-1 (PFK1).....	104
Résumé	106
 Exercices	 107
 Chapitre 6. Les réactions enzymatiques à plusieurs substrats et produits	 109
1. Définitions.....	109
2. Système séquentiel appelé « au hasard »	111
2.1. Graphes primaires pour le substrat A et pour le substrat B.....	113
2.2. Graphe secondaire pour le substrat A et graphe secondaire pour le substrat B	114
3. Système séquentiel appelé « ordonné »	115

4. Système appelé « Ping Pong »	117
4.1. Mécanisme général.....	117
4.2. L'acyl-enzyme.....	119
4.3. Mécanisme Ping Pong à 2 sites (ou plus).....	122
5. Mécanismes d'inhibition des systèmes à 2 substrats	123
5.1. Inhibition par les analogues de substrats.....	123
5.2. Inhibition par les produits des réactions.....	123
6. Exemples de mécanismes plus complexes	125
6.1. Pas de complexe central ou isomérisation de l'enzyme.....	125
6.2. Plus de 2 substrats / plus de 2 produits.....	126
Résumé	127
 Exercices	 128
 Chapitre 7. Fixation d'un ligand sur des sites indépendants	 133
1. Équilibres de fixation multiple d'un ligand sur une protéine – Équation de Gilbert Adair	 133
2. Équilibre de fixation d'un ligand sur une protéine – Relation de George Scatchard	 135
2.1. Description d'une expérience pour déterminer le nombre de site de fixation d'un ligand.....	135
2.2. Relation et représentation de Scatchard.....	136
3. Généralisation à 2 sites identiques et indépendants	138
3.1. Fixation de la 1 ^{re} molécule de ligand	139
3.2. Fixation de la 2 ^e molécule de ligand.....	139
3.3. Expression de \bar{n}	140
4. Enzymes avec n sites catalytiques identiques et indépendants	140
5. Cas de 2 classes de sites non identiques et indépendants	142
5.1. Cas général.....	142
5.2. Autres cas de figure.....	143
Résumé	144
 Exercices	 145
 Chapitre 8. Allostérie, fixation coopérative, modèles allostériques	 147
1. Fixation d'un ligand sur n sites identiques et non indépendants	148
1.1. Fixation du dioxygène sur l'hémoglobine – représentation et coefficient de Hill	148
1.2. Application à une enzyme	150

2. Allostérie et fixation coopérative.....	151
2.1. Allostérie.....	151
2.2. La fixation coopérative	152
3. Le modèle MWC ou modèle concerté ou modèle « tout ou rien » (1965)	152
3.1. Introduction au modèle de Jacques Monod, Jeffries Wyman & Jean-Pierre Changeux (modèle MWC).....	152
3.2. Les bases du modèle MWC.....	154
3.3. Nomenclature du modèle MWC	155
3.4. Schéma général de la fixation successive de 4 molécules de substrat	156
3.5. Quelques exemples d'enzymes et de protéines à régulation allostérique	157
4. Les équations du modèle MWC	159
4.1. Équilibres macroscopiques : constantes L , K_T et K_R	159
4.2. Passage aux constantes microscopiques K_T^μ et K_R^μ	161
4.3. Fraction de protéine totale sous forme R et sous forme T (\bar{R} et \bar{T}) – Concentration réduite de substrat-Fonction quotient \bar{Q}	162
4.4. La fonction de saturation \bar{Y} pour $n = 4$ sites de fixation	164
4.5. Le polynôme de fixation $Z([S])$: généralisation de l'expression de la fonction de saturation.....	165
4.6. Allure des courbes	165
5. Effecteurs allostériques	168
5.1. Inhibiteur et activateur allostériques.....	168
5.2. Détermination des constantes K_R^S , K_T^I , K_R^A et L	169
5.3. Système V et système K	171
6. Le modèle KNF ou modèle séquentiel	173
6.1. Caractéristiques du modèle KNF et différences avec le modèle MWC.....	173
6.2. Formalisme du modèle KNF	174
6.3. Modèle KNF appliqué à un dimère	175
6.4. Modèle KNF appliqué à un tétramère.....	176
Résumé	179
 Exercice.....	 180
 Chapitre 9. Effets de quelques paramètres physico-chimiques	 183
1. Effets du pH	183
1.1. Incidence du pH sur la structure et la fonction des enzymes.....	183
1.2. Équilibres de fixation du proton et formes de l'enzyme	186
1.3. Formalisme des paramètres cinétiques en fonction du pH.....	188
1.4. Représentations de la vitesse de catalyse en fonction du pH.....	189
1.5. Cas d'un substrat qui s'ionise	191
2. Effets de la température.....	192
2.1. Effet de la température sur la constante d'équilibre.....	192
2.2. Énergie d'activation d'une réaction et constante de vitesse	193

2.3. Théorie de l'état de transition et constante de vitesse	194
2.3. Cinétique de l'inactivation thermique.....	196
3. Effets de la pression	199
3.1. Effet de la pression sur la constante d'équilibre et la constante catalytique : volume d'activation	200
3.2. Écart à la linéarité de la variation de la constante catalytique en fonction de la pression.....	200
3.3. Effet de la pression sur la fixation du substrat sur l'enzyme.....	202
3.4. Diagramme de phase de la dénaturation induite par la pression	203
4. Effets de la force ionique	204
4.1. Solubilité des enzymes.....	204
4.2. Effet sur l'activité des enzymes.....	205
5. Effet de la viscosité du milieu	206
Résumé	207
Exercices	208
Chapitre 10. Régulation de l'activité des enzymes : quelques mécanismes	211
1. Les protéines kinases et la phosphorylation des protéines.....	212
1.1. Rôle capital dans les voies de signalisation.....	212
1.2. Mécanisme catalytique des [Tyr ou Ser/Thr] protéines kinases.....	214
1.3. Illustration d'une cascade de phosphorylation.....	215
2. Régulation de l'activité des enzymes par le complexe Ca²⁺-calmoduline	216
2.1. L'ion calcium et la découverte de la calmoduline	216
2.2. Structure de la calmoduline et des sites de fixation du Ca ²⁺	217
2.3. Mécanisme d'activation des protéines cibles	219
2.4. Exemple du mécanisme d'activation de la CaM-kinase II.....	219
3. Régulation du métabolisme énergétique : la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK)	220
3.1. Rôle majeur de l'AMPK dans l'homéostasie énergétique	220
3.2. Rôles des différents domaines constitutifs des 3 sous-unités de l'AMPK.....	222
3.3. Rôle double de l'AMP dans l'activation de l'AMPK.....	223
4. HMG-CoA réductase : cholestérol et statines.....	224
4.1. Voie métabolique et réaction catalysée.....	224
4.2. Régulation du taux d'HMGR active	226
5. La RuBisCO et le cycle de Benson, Calvin & Bassham	227
5.1. La photosynthèse.....	227
5.2. Première étape du cycle RPP : la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase ou RuBisCO	227
Résumé	230

Chapitre 11. Intégration de la régulation des enzymes à une voie métabolique : exemple de la glycolyse	231
1. Les substrats de la glycolyse	232
1.1. Le glucose	232
1.2. Le saccharose ou α -D-glucopyranosyl-(1,2)- β -D-fructofuranoside ou sucrose.....	233
1.3. Le glycogène	233
1.4. L'amidon.....	234
1.5. Autres oses que le glucose métabolisés par la glycolyse.....	234
2. Les réactions de la glycolyse	237
2.1. Les réactions du tronçon hexoses.....	237
2.2. Les réactions du tronçon trioses	239
2.3 Bilan de la glycolyse	243
3. Contrôle de l'activité des enzymes clés de la glycolyse	244
3.1. L'hexokinase	245
3.2. La glucokinase	246
3.3. La phosphofructokinase 1 ou PFK-1	246
3.4. La pyruvate kinase.....	254
4. Contrôle de la glycolyse par des facteurs externes	255
4.1. Le glucagon	255
4.2. L'insuline	255
4.3. La charge énergétique adénylique.....	256
Résumé	258
Chapitre 12. Les techniques d'étude des réactions enzymatiques et des enzymes	259
1. Les techniques classiques d'analyse des cinétiques enzymatiques	260
1.1. Mesures par spectrophotométrie.....	260
1.2. Mesures par spectrofluorimétrie.....	262
1.3. La catalyse assistée par le substrat.....	263
2. Études des intermédiaires réactionnels : les techniques de mesures rapides	263
2.1. Le <i>stopped-flow</i> et le <i>quenched-flow</i>	263
2.2. Les méthodes de relaxation.....	264
2.3. L'échange isotopique et les effets des isotopes	265
3. Techniques permettant de déterminer la structure des enzymes	267
3.1. La cristallographie et la diffraction des rayons X	268
3.2. Les apports de la puissance du rayonnement synchrotron.....	269
3.3. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	271
4. Les techniques en plein essor	274
4.1. Détermination de la structure d'entités biologiques de très grandes tailles : la cryo-microscopie électronique.....	274
4.2. Obtention d'un grand ensemble d'informations par spectrométrie de masse.....	275
4.3. Caractéristiques thermodynamiques de la liaison entre molécules : la calorimétrie par titration isotherme.....	277

5. Les études théoriques de dynamique moléculaire.....	279
6. Les cinétiques dites « Michaeliennes à molécule d'enzyme unique »	282
7. Les données issues des domaines en « omique » et la bioinformatique.....	283
Résumé	285
Chapitre 13. Corrections des exercices.....	287
Chapitre 4: Équations de Henri-Michaelis-Menten et de Briggs-Haldane	287
Exercice N° 1	287
Exercice N° 2	289
Exercice N° 3	290
Chapitre 5: Mécanismes d'inhibition	290
Exercice N° 1	290
Exercice N° 2	293
Chapitre 6: Mécanismes à plusieurs substrats et produits	293
Exercice N° 1	293
Exercice N° 2	294
Exercice N° 3	296
Exercice N° 4	298
Exercice N° 5	299
Chapitre 7: Fixation d'un ligand sur des sites indépendants.....	301
Exercice N° 1	301
Exercice N° 2	303
Chapitre 8: Allostérie, fixation coopérative, modèles allostériques	305
1. Fonction de saturation de Hb	305
2. Effet du 2,3-BPG sur la saturation en oxygène de Hb	307
3. Différentes représentations et leur interprétation.....	309
Chapitre 9: Effets de quelques paramètres physico-chimiques.....	312
Exercice N° 1	312
Exercice N° 2	313
Exercice N° 3	314
Exercice N° 4	315
Exercice N° 5	316
Exercice N° 6	317
Bibliographie.....	319