

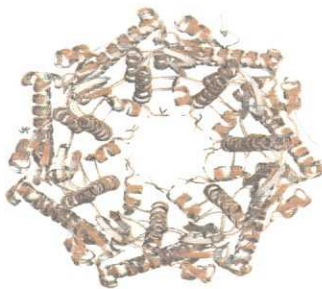
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université ABBES Laghrou. Khenchela
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



Polycopié Pédagogique
Matière

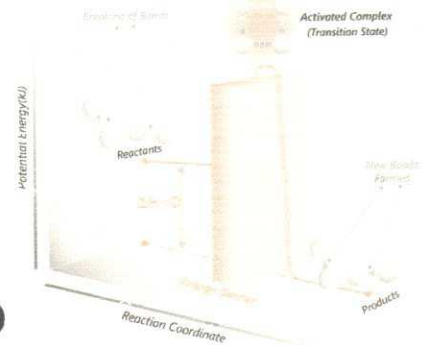


Cours d'Enzymologie approfondie



Niveau

3^{ème} année Biochimie (LMD)



Realisé par

Dr HABIBATNI. Sofiane

Maître de Conférence B

Université Khenchela

Année Universitaire 2023-2024

Le syllabus du cours de la matière, Enzymologie approfondie tel que présenté dans le canevas de Licence en Biochimie:

Intitulé de Licence: Biochimie. Semester 5

Unité d'Enseignement	VHS	V.H hebdomadaire				Coeff	Crédits	Mode d'évaluation	
	15 sem	C	TD	TP	Autres			Continu (40%)	Examen (60%)
UE fondamentales									
UEF1 (O/P) : Biochimie cellulaire et Enzymologie	202h30	6h00	3h00	-	247h30	9	18		
Enzymologie approfondie	67h30	3h00	1h30	-	82h30	3	6	X	X
Biochimie cellulaire et fonctionnelle	67h30	3h00	1h30	-	82h30	3	6	X	X
UEF2 (O/P) :		3h00	1h30	-					
Régulation métabolique	67h30	3h00	1h30	-	82h30	3	6	X	X
UE méthodologie									
UEM (O/P)	105h00	3h00	3h00	1h00	120h00	9			
Structure & fonction des macromolécules	60h00	1h30	1h30	1h00	65h00	3	5	X	X
Bio-statistique	45h00	1h30	1h30	-	55h00	2	4	X	X
UE découverte									
UED (O/P)	45h00	1h30	1h30	-	5h00	2	2		
Toxicologie	45h00	1h30	1h30	-	5h00	2	2	X	X
UE Transversale									
UET (O/P)	22h30	1h30	-	-	2h30	1	1		
Anglais scientifique	22h30	1h30	-	-	2h30	1	1	X	X
Total Semestre 5	375h00	15h00	9h00	1h00	375h00	17	30		

Objectifs de l'enseignement

Comprendre au niveau structural et cinétique les interactions moléculaires protéine/protéine et protéine/Ligand, connaître le fonctionnement des différents types d'enzymes Michaéliennes, à plusieurs substrats et allostériques, connaître les applications du génie enzymatique en industrie).

Connaissances préalables recommandées

Les pré-requis pour ce module consistent à avoir des connaissances suffisantes acquises dans la matière de Biochimie enseigné en L2.

Contenu de la matière :

I. Généralités

II. Structure et propriétés des enzymes

- Enzymes monomériques (chymotrypsine)
- Enzymes oligomériques
- Isoenzymes (LDH)
- Complexes multienzymatiques (FAS)

III. Interactions protéines-ligands

- Association sur un site.
- Association sur n sites équivalents et indépendants.
- Association d'un ligand sur deux sites différents.

IV. Cinétique Enzymatique

- Cinétique michaélienne à un substrat (rappel)
- Cinétique à deux substrats
- Cinétique à plusieurs substrats

V. Fonctionnement et régulation des enzymes allostériques

- Propriétés structurales
- Propriétés fonctionnelles
- Détermination des constantes cinétiques à partir de représentation graphique (Hill...)

VI. Mécanisme de la catalyse.

- Topologie et identification des centres actifs.
- Fonctionnement des coenzymes.
- Activation des zymogènes.
- Marqueurs spécifiques des centres catalytiques.
- Mécanismes d'action des sérines protéases.
- Mécanisme d'action des pyridoxal transférases.

VII. Isolement et purification des enzymes

- Origine
- Méthodes d'études

VIII. Génie enzymatique

- Nature et origine des enzymes

VIII.1 - Méthodes d'immobilisation des enzymes

- Méthode physique : immobilisation par adsorption



- Méthode chimique : immobilisation par fixation covalente sur un support.
- Immobilisation des enzymes et utilisation en bioréacteurs

VIII.2 - APPLICATIONS DES ENZYMES EN BIOTECHNOLOGIE

- Préparations industrielles des enzymes
- Production à l'échelle industrielle
- Applications dans les domaines industriels (pharmaceutiques, cosmétiques, agronomiques)
- Biocapteurs enzymatiques
- Les enzymes artificielles

IX. Travaux dirigés

SOMMAIRE

Historique.....	01
-----------------	----

Enzymologie approfondie

I. Généralités

I-1 Introduction.....	02
I-2 Nomenclature.....	03

II. Structure et propriétés des enzymes

II-1 Introduction.....	5
II-2 Enzymes monomériques (chymotrypsine).....	6
II-3 Mécanisme d'action.....	7
II-4 Enzyme oligomérique.....	8
II-5 Isoenzymes (LDH).....	9
II-6 Complexes multienzymatiques (FAS).....	10

III. Interactions protéines-ligands

1- Introduction.....	12
2- Les protéines se lient à des molécules données.....	12
3- Spécificité des protéines.....	13
4- Affinité.....	13
5- Protéine à un seul site de fixation.....	14
5-1 Site de fixation et site actif.....	14
6- Association d'un ligand sur deux sites différents.....	17
6-1 Cas des sites indépendants et équivalents.....	17
6-2 Cas des Sites indépendants et non équivalents.....	19

IV. Cinétique Enzymatique

1- Introduction.....	20
----------------------	----

2- Définition.....	20
3- Cinétique Michaélienne à un substrat.....	21
3-1 Introduction à la cinétique chimique.....	21
3-2 Rôle de à la cinétique chimique.....	22
3-3 Réactions d'ordre simple.....	22
3-3-1 Réactions d'ordre 1.....	22
3-3-2 Réactions d'ordre 2.....	23
3-4 Cinétique Michaélienne à un substrat.....	25
3-4-1 Détermination de l'équation de Michaelis-Menten.....	25
2- Cinétique à deux substrats.....	30
2- 1 Introduction.....	30
2- 2 Mécanisme à complexe ternaire.....	31
2 2-1 Premières étapes.....	31
2 2-2 Deuxièmes étapes.....	31
2-3 Mécanisme au hasard ou non ordonné (aléatoire).....	34
2-3-1 Association dépendante.....	34
2.3.2. Association indépendante.....	36
2.3.2. Association indépendante.....	36
3- Réactions à double déplacements.....	37
3-1 Mécanisme Pin-Pong.....	37
4- Cinétique à plusieurs substrats.....	39

V. Fonctionnement et régulation des enzymes

1- Introduction.....	40
2- Propriétés structurales.....	40
3- Propriétés fonctionnelles.....	41
3-1 Le contrôle de la quantité d'enzyme.....	41
3-2 Le contrôle de l'activité enzymatique.....	42
3-2-1 Régulation par modification covalente.....	42
3-2-2 Régulation par changement conformationnel.....	43
3- Détermination des constantes cinétiques.....	45

VI. Mécanisme de la catalyse

I- Introduction.....	47
2- Topologie et identification des centres actifs.....	47
2-1 Analyse cristallographique par diffraction des rayons X.....	50
2-2 Les modifications chimiques des enzymes.....	51
2-2-1 Généralité.....	51
2-2-2 Les réactifs spécifiques des groupements fonctionnels de la chaîne latérale des acides aminés.....	51
2-2-3 Aspect cinétique de la modification chimique d'enzyme.....	52
2-2-4 Marqueur d'affinité.....	52
2-2-5 Les méthodes spectroscopiques.....	52
3- Fonctionnement du Coenzyme.....	53
4- Activation des zymogènes.....	54
5- Mécanismes d'action des sérines protéases.....	55
6- Mécanisme d'action des pyridoxal transférases.....	56

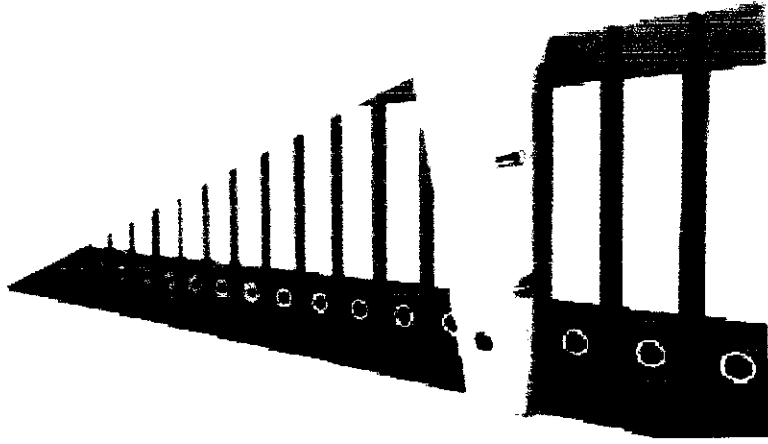
VII. Isolement et purification des enzymes

1- Origine des enzymes.....	58
1-1 Origine animale.....	58
1-2 Origines microbiennes.....	58
1-3 Protéases d'origine végétale.....	59
2- Isolement et purification des enzymes.....	59
2-1 Méthodes d'extractions (solubilisation) de l'enzyme.....	60
2-1-1- méthode mécanique et physique.....	60
2-1-2 Méthode chimique et enzymatique.....	60
2-2 Méthodes de fractionnement.....	61

VIII. Génie enzymatique

1- Nature.....	63
2- Méthodes d'immobilisation des enzymes.....	63
2-1 Introduction.....	63
2-2 Enzymes immobilisées.....	65

2-3 Principales méthodes d'immobilisation.....	67
2-3-1 Méthode physique, immobilisation par adsorption.....	67
2-3-2 Méthode chimique d'immobilisation.....	69
3- Intérêt de l'immobilisation des enzymes.....	70
4- Immobilisation des enzymes et utilisation en bioréacteurs.....	71
4-1 Facteurs influençant l'activité enzymatique.....	72
4-2 Les réacteurs enzymatiques.....	73
4-2-1 Réacteurs agités à fonctionnement discontinu.....	74
4-2-2 Les réacteurs continus.....	75
4-2-3 Taux de conversion, productivité, temps de résidence et fréquence de renouvellement et relation avec le taux de conversion.....	77
4-2-3-1 Taux de conversion.....	77
4-2-3-2 PRODUCTIVITE EN PRODUIT.....	77
4-2-3-3 TEMPS DE RESIDENCE T POUR LA CATALYSE.....	78
4-2-3-4 FREQUENCE DE RENOUVELLEMENT.....	78
5- Applications des enzymes en biotechnologie.....	79
5-1 Production d'enzymes industrielles.....	79
5-2 L'industrie alimentaire.....	80
5-3 Biocapteurs enzymatiques.....	81
5-3 -1 Définition.....	81
5-3-2 Fonctionnement.....	81
5-3-3 Les enzymes artificielles.....	82
5-3-3-1 Les abzymes.....	82
5-3-3-2 Cyclodextrines.....	83



Généralités

Généralités

I- Histoire :

L'histoire de l'enzymologie, l'étude des enzymes, débute avec celle de la biochimie elle-même ; ces disciplines se sont développées ensemble depuis les recherches sur les fermentations et la digestion au dix-neuvième siècle. Les recherches sur les fermentations ont commencé en 1810 lorsque **Joseph Gay-Lussac** a montré que l'éthanol et le CO_2 sont les produits principaux de la dégradation du sucre par les levures. 1835, **Jacob Berzélius** dans la première étude théorique générale sur la catalyse chimique, remarqua qu'un extrait de malt appelé diastase catalyse l'hydrolyse de l'amidon avec plus d'efficacité que l'acide sulfurique. **Pasteur** supposa que les êtres vivants étaient dotés d'une force vitale qui leur permettait d'échapper aux lois de la nature qui régissent la matière inanimée. D'autres cependant, en particulier **Justus von Liebig**, estimèrent que les processus biologiques sont sous la dépendance de substances chimiques appelées *ferments*. Le terme enzyme a été introduit en 1878 par **Wilhelm Friedrich Kühne** afin de souligner qu'il existe quelque chose dans les levures, par opposition à la levure elle-même, qui catalyse les réactions de la fermentation. Toutefois, ce n'est qu'en 1897 qu'**Eduard Buchner** obtint un extrait acellulaire de levures capable d'assurer la synthèse de l'éthanol à partir de glucose « **fermentation alcoolique** ». **Emil Fischer** découvrit, en 1894, que les enzymes de la glycolyse peuvent distinguer des sucres stéréoisomères, ce qui le conduisit à formuler l'hypothèse de la *clef et de la serrure* : la spécificité d'une *enzyme* « enzyme » pour son substrat « le clef » est due à leurs formes géométriques complémentaires. En 1926, **James Sumner** cristallisa la première enzyme, l'uréase du haricot sabre (jack bean), qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en NH_3 et CO_2 , et démontra que ces cristaux étaient de nature protéique. Au milieu des années 1930, lorsque **John Northrop** et **Moses Kunitz** mirent en évidence une corrélation directe entre les activités enzymatiques de pepsine, trypsine et chymotrypsine cristallisées, et les quantités de protéines présentes.

Bien que l'enzymologie ait une longue histoire, notre compréhension de la nature et des fonctions des enzymes est, en grande partie, le résultat de travaux des soixante dernières années. Ce n'est que grâce à la mise en point de techniques modernes de séparation et d'analyse que l'isolement et la caractérisation d'une enzyme ont cessé d'être un travail gigantesque. Il a fallu attendre 1963 pour que la première séquence en acides aminés d'une enzyme, celle de **ribonucléase A de pancréas de bovin** soit publiée dans son intégralité, et

1965 pour qu'on élucide la première structure d'une enzyme par rayon X celle du lysozyme. Depuis ce temps des dizaines de milliers d'enzymes ont été purifiées et caractérisées, au moins jusqu'à certain point, et la vitesse de ces investigations ne fait que s'accroître.

1- Généralités

1-1 Introduction

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques diverses. Chez tous les organismes vivants, les réactions chimiques du métabolisme sont catalysées par des molécules de nature protéique que l'on appelle enzymes. Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes corps chimiques initiaux.

En biochimie, certaines protéines possèdent une activité catalytique. Il s'agit des enzymes. Le catalyseur augmente la vitesse de réaction en introduisant de nouveaux chemins de réaction (mécanisme), et en abaissant son énergie d'activation, ou énergie libre de Gibbs d'activation. Ce faisant il permet d'augmenter la vitesse, ou d'abaisser la température de la réaction. Il est important de noter que le catalyseur ne modifie pas l'énergie libre de Gibbs totale de la réaction qui est une fonction d'état du système et n'a donc aucun effet sur la constante d'équilibre.

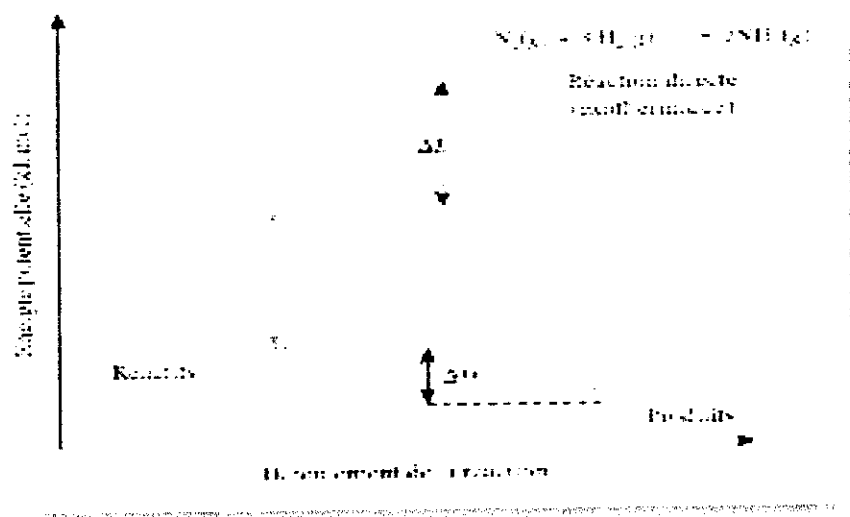


Figure 1. Schéma énergétique d'une réaction chimique de la transformation d'un substrat (S) en un produit (P), en absence (courbe bleu) et en présence (courbe rouge) d'un catalyseur (C)

Les catalyseurs sont des molécules qui accélèrent la vitesse d'une réaction. Ils possèdent des propriétés caractéristiques. En plus d'augmenter la vitesse de réaction, ils ne modifient pas l'équilibre de la réaction ni l'énergie de la réaction. En plus, ils ne subissent pas la réaction.

(Ils n'apparaissent pas dans l'équation globale). Le choix d'un catalyseur peut reposer sur d'autres paramètres :

- * **La sélectivité**, un catalyseur sélectif va favoriser la production du produit désiré par rapport aux produits secondaires. Par exemple, quand on utilise l'argent métallique pour catalyser la réaction de formation de l'oxyde d'éthylène, à partir d'oxygène et d'éthylène, cette réaction est accompagnée par la formation plus favorable thermodynamiquement de CO_2 et H_2O . C'est pour cette raison qu'il est important de trouver un catalyseur favorisant le produit désiré.
- * **La durée de vie**, une faible quantité de catalyseur doit pouvoir survivre à plusieurs cycles de réaction. Exemple simple d'un catalyseur : La cendre sur le sucre est un bon catalyseur : Essayez d'allumer un sucre avec un briquet. Cela fait au mieux du caramel. Maintenant, mettez un peu de cendre sur le sucre, et essayez d'allumer à l'endroit où vous avez mis la cendre. le sucre brûle alors avec une flamme bleue, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus que de la cendre.
- * **La répétitivité**, l'enzyme peut effectuer un grand nombre (infini) de cycles sans être modifiée.

1-2 Nomenclature

À part quelques enzymes qui ont gardé des noms particuliers (trypsine, lysozyme, ...), le reste sont désignées par le nom du substrat que lequel elles agissent spécifiquement, suivi du nom évoquant le type de réaction catalysée auquel on ajoute le suffixe « ase » ; β -D-glucoside hydrolase, provoquant l'hydrolyse des β -D-glucosides.

Ainsi, les enzymes sont classifiés selon la réaction qu'ils catalysent. Pour mieux utiliser ces molécules et les choisir de la meilleure façon possible, une classification a été établie : elle identifie **6 catégories d'enzymes** différentes :

1 : les oxydoréduct.

L'oxydoréductase **catalyse l'oxydoréduction**. Une oxydation est réalisée sur le réducteur, qui perd des électrons, tandis que l'oxydant en reçoit davantage. Plusieurs de ces enzymes sont connues en tant que :

- * **oxydases** ;
- * **oxygénases** ;
- * **Peroxydases** ;
- * **Monooxygénases** ;
- * **oxydases** ;
- * **Hydrogénases** ;
- * **Déshydrogénases**.

Certaines de ces enzymes produisent des radicaux libres, d'autres (catalases superoxy de dismutases, glutathion peroxydases, sont impliquées dans la réponse au stress oxydatif, formant la première ligne de défense contre les dérivés réactifs de l'oxygène.

Exercice. Soit l'enzyme succinate déshydrogénase. Ecrire la réaction catalysée.

Le 2 : les transf.

Il existe **différentes sortes de transférases**, mais toutes ces enzymes ont la même spécificité : elles **transfèrent des groupements fonctionnels**.

Puisqu'elles n'agissent pas toujours sur les mêmes molécules, les transférases entrent dans différentes catégories (celle des **méthyltransférases**, des **glycosyltransférases** ou encore des **phosphotransférases**).

Le nom de chaque type de transférase est créé à partir de celui du donneur, de l'accepteur, mais aussi du groupe transféré. Dans une transférase, on trouve un groupement de molécules donneuses et un autre groupement de molécules réceptrices.

Exercice. Soit une enzyme bien connue : hexokinase. Ecrire la réaction catalysée ?

Le 3 : les hydr.

Utilisée pour ses propriétés permettant de **briser les liaisons covalentes**, l'hydrolase est une enzyme qui se distingue en plusieurs catégories, selon le type de liaison qu'elle catalyse :

- Les **estérases** agissent sur les liaisons ester, formées par un groupe alcool et un groupe acide carboxylique.
- Les **protéases** suppriment les liaisons peptidiques, entre le groupe amine et le groupe acide carboxylique de deux acides aminés.
- Il existe aussi des **glycosidases** qui agissent sur les oligo- et polysaccharides, et des phosphatases hydrolysant les produits contenant du phosphore.

L'une des particularités de l'hydrolase réside dans son acidité, avec son pH proche de 5.

Exercice. Soit une enzyme fort célèbre : la trypsine. Ecrire la réaction catalysée.

Le 4 : les ly.

La **lyase** est une enzyme que l'on peut aussi utiliser afin de **supprimer des liaisons covalentes**. Suite à ce processus, une nouvelle liaison est généralement créée, et elle est parfois double. La particularité de cette enzyme est son besoin en réactifs : il n'en faut qu'un dans le sens direct, mais deux dans le sens inverse.

Selon la nature de la liaison et en fonction de ce que l'on recherche au niveau du substrat, on peut mobiliser différents types de lyases. **L'adénylate cyclase est souvent sollicitée pour obtenir l'AMP à partir d'adénosine triphosphate, un nucléotide servant à transporter de l'énergie.**

Exercice. Soit une enzyme fort célèbre en microbiologie . Ecrire la réaction catalysée.

Leçon 5 : les ligases

La ligase est une enzyme que l'on mobilise afin de **catalyser une liaison covalente entre deux molécules**. On différencie les ligases entre elles selon la liaison qu'elles créent : carbone-carbone, carbone-azote, etc. On parle parfois également de « synthétase » pour désigner cette **protéine**, parce qu'elle agit sur la **synthèse des nouvelles molécules**. Toutes les enzymes ont une structure similaire : **elles se basent sur un site actif ou site catalytique** sur lequel la réaction a lieu.

Exercice. Soit la glutamine synthétase catalysant la réaction de fixation de l'azote . Ecrire la réaction catalysée.

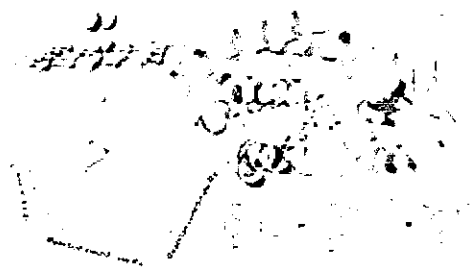
Leçon 6 : les isomérases

Pour obtenir l'isomère d'une molécule, on **réalise une isomérase**. Ces molécules isomères sont des enzymes basées sur la même formule que l'originale, mais se caractérisent par une structure différente. On distingue les isomères de constitution des isomères de configuration. Les premières ont des enchaînements d'atomes variables, les secondes ont des organisations spatiales différentes.

Exercice. Soit une enzyme fort célèbre dans l'industrie sucrière : la glucose isomérase. Ecrire la réaction catalysée.

CHAPITRE I

Structure et propriétés des enzymes



Structure et propriétés des enzymes

1 Introduction :

Les enzymes sont des protéines et leur structure peut être décrite en quatre étapes :

- ✓ **Structure primaire:** Si l'on comparait l'enzyme à un collier de perles de couleurs et d'aspects différents, chaque perle correspondant à l'un des vingt acides aminés, on obtiendrait la structure primaire en étalant le collier de perles dans un plan et en décrivant une à une les perles dans un ordre précis, par exemple de la gauche vers la droite. Ces acides aminés sont liés entre eux par une liaison de type amide, la liaison peptidique. Ce premier niveau de structure est responsable au moins indirectement des niveaux supérieurs d'organisation et ainsi de toutes les propriétés des protéines, en particulier des propriétés catalytiques des enzymes, mais aussi de la formation d'autres liaisons covalentes (modifications post-traductionnelles).

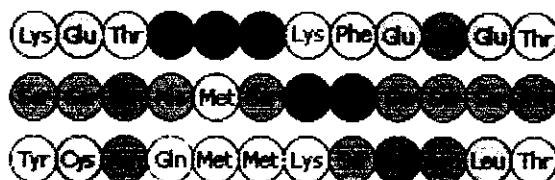


Figure 2. Structure primaire.

- ✓ **Structure secondaire:** elle résulte de l'établissement de liaisons hydrogène entre les groupements amide (-NH) et carbonyle (-CO) du squelette peptidique. L'existence de structures secondaires vient du fait que les repliements énergétiquement favorables de la chaîne peptidique sont limités et que seules certaines conformations sont possibles. Il existe trois principales catégories de structures secondaires selon le repliement des liaisons peptidiques : les hélices (de type alpha), les feuilletts (de type bêta) et les coudes ;
- ✓ **Structure tertiaire:** la chaîne polypeptidique déjà ordonnée en structure secondaire peut se replier sur elle-même pour former une molécule de configuration spatiale bien déterminée (en général, de forme globulaire dans le cas des enzymes). Les liaisons intramoléculaires (pont disulfure, liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, liaisons hydrophobes) responsables de la stabilité de la structure tertiaire se forment à partir des chaînes latérales des acides aminés ;
- ✓ **Structure quaternaire:** les protéines sont souvent constituées de plusieurs sous-unités qui correspondent chacune à une chaîne polypeptidique de structure tertiaire définie. L'association de ces sous-unités entre elles par le même type de liaisons que celles

rencontrées au niveau de la structure tertiaire constitue la structure quaternaire de la protéine. C'est de cette association dont dépend l'activité de la protéine.

Par rapport à leur structure on distingue des enzymes à structure monomérique (une seule sous-unité) et des enzymes à structure oligomérique (plusieurs sous-unités).

Les enzymes monomériques sont des enzymes constituées d'une seule chaîne polypeptidique. C'est à dire une seule unité fonctionnelle arrangée en structure tertiaire (il n'a pas de structure quaternaire).

2 Enzymes monomériques (chymotrypsine) :

La **Chymotrypsine** (EC.3.4.4.5) c'est une protéase à sérine dont la structure est connue depuis 1969. Elle est synthétisée par le pancréas sous une forme inactive appelée le *Chymotrypsinogène*. L'activation est provoquée par la trypsine qui coupe cette molécule en deux chaînes, puis par la chymotrypsine elle-même lors d'une *trans*-protéolyse, donnant à la fin une structure globulaire compacte de trois chaînes reliées par deux ponts disulfures et repliées en 2 domaines de 120 acides aminés. La chymotrypsine est produite par le pancréas sous une forme inactive appelée le chymotrypsinogène. Ces domaines adoptent la conformation d'un tonneau β formé de 6 brins β . Le site actif est situé dans une crevasse bordée par les 2 domaines. Il fixe le substrat au niveau de 2 régions (la région 214-216, liaison non spécifique, et la région 189-216 et 226, liaison spécifique).

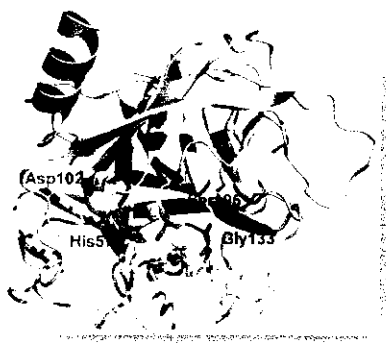


Figure 3. Structure de la chymotrypsine.

3 Mécanisme d'action

La **Chymotrypsine** intervient dans la protéolyse des protéines du système digestif des mammifères et autres êtres vivants. Elle catalyse le clivage des chaînes polypeptidiques par hydrolyse, mécanisme au départ extrêmement lent sans un activateur.

La chymotrypsine attaque les groupes carbonyles potentiellement nucléophiles impliqués dans une liaison peptidique grâce à la sérine 195, laquelle se lie à son substrat pour former un

intermédiaire substrat-enzyme covalent. Le site actif de l'enzyme fait également intervenir les acides aminés His57, Asp102 et Gly193.

Il a été montré que la réaction de la Chymotrypsine avec son substrat se produit en deux phases : une phase initiale d'éclatement au tout début de la réaction, puis une phase d'état stationnaire qui suit la loi de **Michaelis-Mentes**.

La Chymotrypsine doit absolument être conservée au froid pour garder l'activité enzymatique. Le site actif de la Chymotrypsine comporte une poche hydrophobe dans laquelle se loge l'acide aminé du substrat. Ceci permet le positionnement de la liaison à cliver en regard de la sérine catalytique.

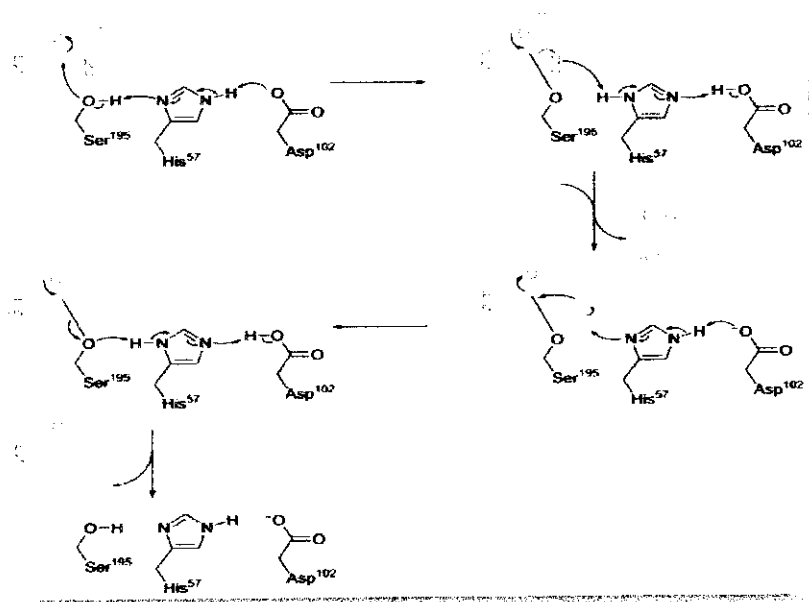


Figure 4. Mécanisme d'action de la chymotrypsine.

4 Enzyme oligomérique

Une enzyme oligomérique est une protéine formée par l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques (unités fonctionnelles). Chaque sous-unité correspond à un seul polypeptide et forme un protomère. L'enzyme oligomérique adopte une conformation quaternaire, elle est constituée de deux à plusieurs sous-unités qui sont liées entre elles par des liaisons non covalentes, les sous-unités liées acquièrent des propriétés qu'elles ne peuvent pas avoir à l'état libre (une meilleure efficacité catalytique et capacité de régulation) ;

- ✓ Elle a un PM élevé.
- ✓ Le nombre d'unités est pair
- ✓ Les sous-unités sont reliées entre elles par des liaisons ioniques ou hydrogènes.
- ✓ Elle présente une cinétique allostérique.

Exemple: la β -galactosidase d'*E. Coli* (EC 3.2.1.23) hydrolyse le lactose, est une enzyme de diagnostic médical utilisée dans la détection des bactéries coliformes capables d'hydrolyser le lactose. La β -galactosidase d'*E. coli* comprend 4 sous-unités identiques dont le PM est de l'ordre 105 KDa (plus de 900 acides aminés). Les sous-unités chez d'autres espèces sont comprises entre 80 – 100 KDa, lorsque les sous-unités sont séparées elles deviennent inactives.

La β -galactosidase catalyse différentes réaction d'intérêt industriel, cette enzyme est essentielle dans la fabrication de produits laitiers sans lactose, car de plus en plus de personnes ne peuvent pas digérer les glucides, (parfois abrégée en **béta-gal** ou **β -gal**), c'est une hydrolase dont le rôle est d'hydrolyser des β -galactosides en monosaccharides. Ses substrats de prédilection peuvent être le ganglioside GM1, les lactosylcéramides, le lactose, ainsi que plusieurs glycoprotéines. Elle intervient dans le métabolisme du galactose et des sphingolipides, et dans la biosynthèse de glycosphingolipides.

Son absence (ou faible présence) dans l'intestin est la principale cause de l'incapacité à digérer le lactose chez l'homme, on parle d'intolérance au lactose. Génétiquement, une déficience au niveau du gène GLB1 provoque la mucopolysaccharidose de type IV (MPS4), la galactosialidose ou la gangliosidose GM1.

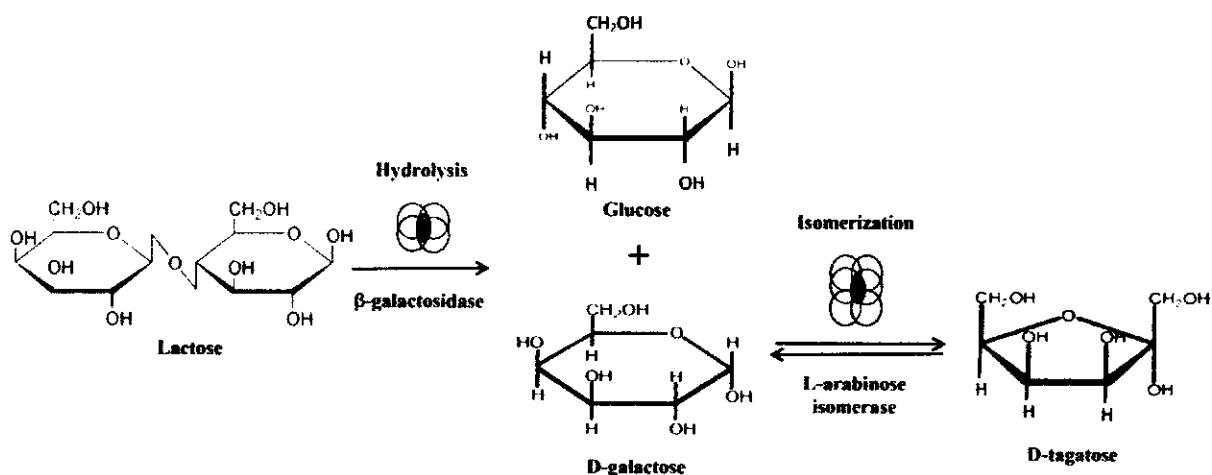


Figure 5. Utilisation de la β -galactosidase dans le processus de production du D-Tagatose

5 Isoenzymes (LDH)

Les **Isoenzymes** sont des enzymes oligomériques qui présentent plusieurs formes de structures quaternaires selon les proportions relatives des sous unités, elles ont la même spécificité de substrat et la même spécificité de réaction mais d'activités distinctes. Des tissus

différents expriment des isoenzymes différents, ce qui permet une meilleure adaptation aux besoins métaboliques. **Ex: Lactate déshydrogénase (LDH)** des mammifères Structure de la LDH : la LDH est un tétramère formé de 4 sous unités (poids moléculaire 144 KDa) chaque sous unité contient 334 résidus et porte un site actif, il existe deux sous unités qui diffèrent par quelques acides aminés, la sous unité H contient plus de résidus acides et moins de résidus basiques que la forme M donc elle est plus riche en charge négative. Cette propriété est exploitée pour la séparation des isoenzymes par électrophorèse (la sous unité H migre plus vite, par contre la sous unité M est plus lente) La LDH est présente sous forme de 5 isoenzymes selon l'association tetramérique des sous unités M et H : M4, M3H1, M2H2, M1H3, H4 La forme H4 : (heart) prédomine dans le cœur, elle est plus active dans le sens de formation de pyruvate parce que en présence d'oxygène le pyruvate entre dans le cycle de creps pour produire l'énergie (l'activité de muscle cardiaque est régulière ; tissus aérobie) La forme M4 : (muscle) prédomine dans les tissus anaérobies (muscle squelettique), les cellules musculaire lors d'une forte activité oxydent rapidement le glucose et deviennent anaérobies, au cours de la glycolyse elles produisent le pyruvate et le NADH. Elles ont besoin de LDH afin que la glycolyse puisse continuer (la forme M est plus active dans le sens de formation de lactate ce qui permet la régénération du NAD^+ nécessaire pour la glycolyse).

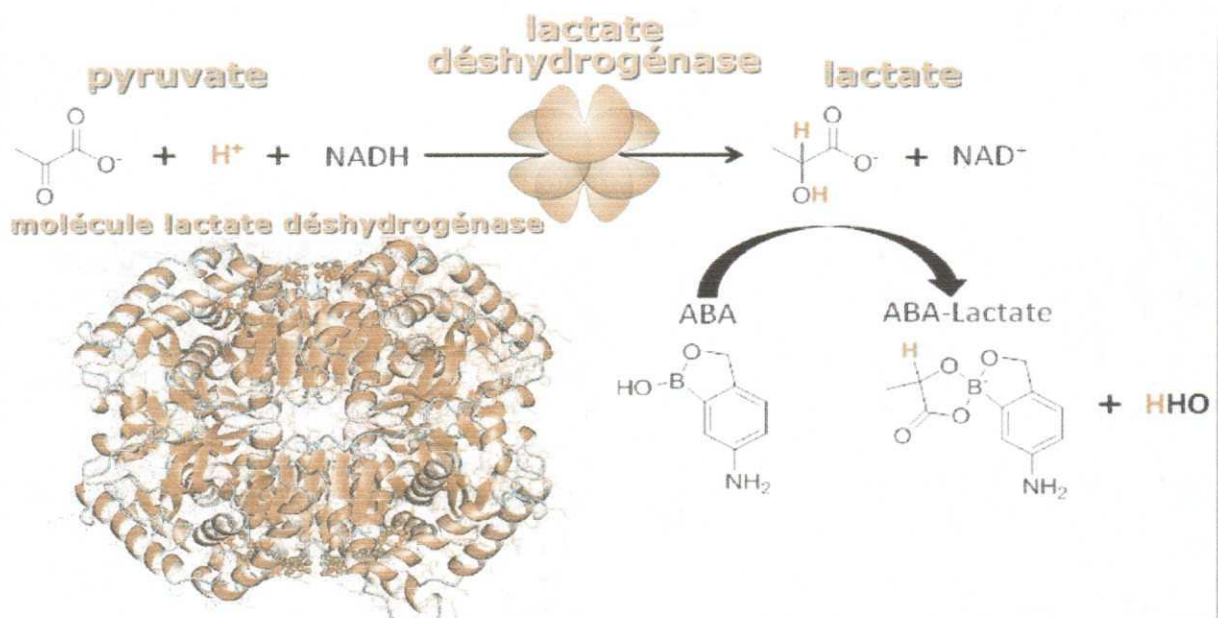


Figure 6 . Réaction de la Lactate déshydrogénase.

6 Complexes multienzymatiques (FAS)

Les complexes multienzymatiques (**enzyme multifonctionnelle**) sont formés par l'assemblage physique de plusieurs enzymes associées entre elles par des liaisons non

covalente et qui catalyse des réactions successives d'une voie métabolique (le produit de la 1^{ère} enzyme est le substrat de la 2^{ème} enzyme, le produit de la 2^{ème} enzyme est le substrat de 3^{ème} enzymes etc). le Complexe Pyruvate Déshydrogénase (PDC)

Ex: Le **Complexe Pyruvate Déshydrogénase (PDC)** est l'association de trois enzymes intervenant séquentiellement pour catalyser la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA. Le pyruvate est notamment issu de la glycolyse, tandis que l'acétyl-CoA est, par exemple, le point d'entrée du cycle de Krebs, qui fonctionne dans la foulée de la chaîne respiratoire pour parachever l'oxydation du groupement acétyle de l'acétyl-CoA.

Ces 3 enzymes sont :

E1 : Pyruvate déshydrogénase.

E2 : Dihydrolipoamide transacétylase.

E3 : Dihydrolipoamide déshydrogénase.

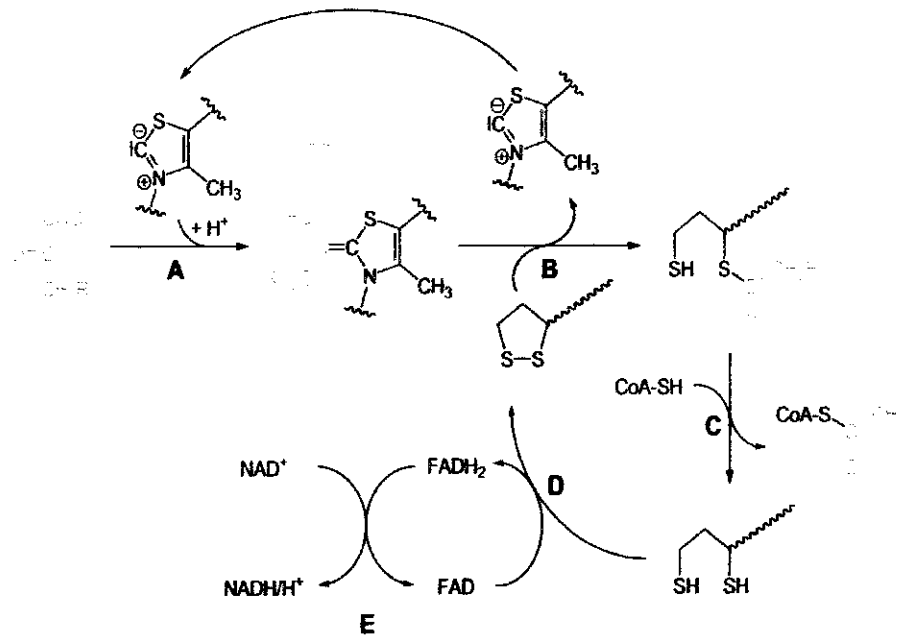
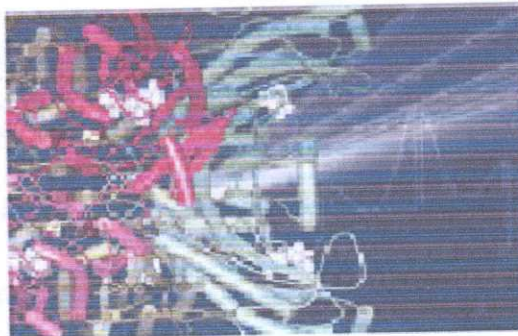


Figure 7. Mécanisme d'action du complexe multienzymatique.

CHAPITRE III

Cinétique

Enzymatique



Interactions protéines-ligands

1- Introduction :

Les protéines sont les « bêtes à tout faire » de l'organisme. Celles qui ne sont pas solubles dans l'eau sont des composants de structure. Celles qui sont solubles se répartissent pour la plupart dans l'une de ces sept grandes catégories :

1. Enzymes : elles agissent alors en accélérant les réactions chimiques et jouent un rôle important dans le métabolisme.
2. Transporteurs membranaires : ces protéines agissent en faisant passer des substances de part et d'autre de la membrane cellulaire. Elles peuvent former des canaux dans la membrane ou se lier aux molécules à transporter et les faire passer au travers de la membrane.
3. Molécules signal : des protéines et des peptides plus petits agissent comme des hormones ou comme d'autres molécules signal.
4. Récepteurs : ces protéines se lient aux molécules signal et déclenchent des réponses dans la cellule.
5. Protéines de transport : présentes pour la plupart dans le liquide extracellulaire, elles se lient à des molécules qu'elles transportent dans l'ensemble du corps, comme l'hémoglobine qui transporte l'oxygène et comme les protéines LDL ou HDL qui transportent le cholestérol.
6. Protéines régulatrices : elles peuvent déclencher ou arrêter certains mécanismes, ou les moduler. C'est le cas des facteurs de transcription de l'ADN qui peuvent modifier l'expression des gènes et la synthèse des protéines.
7. Immunoglobulines : ces protéines immunes extracellulaires, appelées aussi anticorps, participent à la protection de l'organisme.

Malgré leur diversité, toutes ces protéines solubles présentent des points communs. Toutes se lient à d'autres molécules par des liaisons non covalentes. La liaison se fait en une région précise de la protéine, dite site de liaison : ce site est spécifique.

2- Les protéines se lient à des molécules données

Toute molécule se liant à une autre s'appelle un ligand. Pour les ligands qui se fixent à des enzymes ou à des transporteurs membranaires, on parle aussi de substrat. Les protéines signal et les facteurs de transcription sont des ligands. Quant aux immunoglobulines, elles fixent des ligands mais le complexe immunoglobuline-ligand peut devenir à son tour un ligand.

La liaison d'un ligand exige une complémentarité moléculaire : ligand et site de liaison doivent être compatibles. À partir d'études sur les enzymes et autres protéines, on a pu montrer que la forme du site de liaison de la protéine et celle du ligand n'ont pas besoin d'être

exactement complémentaires : quand ils se rapprochent, des interactions non covalentes (liaison hydrogène et forces de Van der Waals) s'établissent entre eux et un changement est induit dans la conformation du site pour s'ajuster plus précisément au ligand.

3- Spécificité des protéines

La spécificité est la capacité d'une protéine à se lier à un ligand donné ou à un certain type de ligands. Certaines ont une spécificité très étroite tandis que d'autres peuvent se lier à des groupes entiers de molécules. Par exemple, les *peptidases* se lient à des polypeptides et en coupent les liaisons peptidiques, quels que soient les acides aminés liés par cette liaison : elles sont peu spécifiques. Au contraire, les *aminopeptidases*, qui coupent aussi des liaisons peptidiques, ne peuvent le faire qu'à l'extrémité de la chaîne protéique (du côté de la terminaison amine) : leur spécificité est plus étroite.

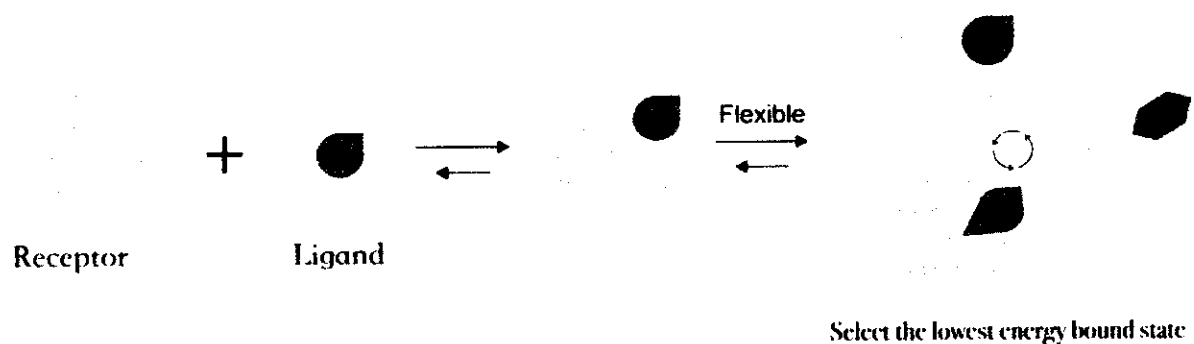


Figure 8. Changement de conformation d'une protéine induite par fixation d'un ligand.

4- Affinité

L'affinité d'une protéine pour un ligand est le degré d'attraction de la protéine pour le ligand. Si l'affinité est élevée, le ligand a plus de chance de se fixer sur la protéine. On peut utiliser la même notation que celle utilisée pour représenter les réactions chimiques:



Dans laquelle **P** est la **protéine**, **L** le **ligand**, **PL** le complexe **protéine-ligand**.

La double flèche indique que la liaison est réversible. Ces liaisons réversibles conduisent à un état d'équilibre quand la vitesse de formation de la liaison (réaction de gauche à droite) est égale à la vitesse de dissociation (droite à gauche). À l'équilibre, le rapport de la somme des concentrations du ligand et de la protéine à la concentration du complexe protéine-ligand est toujours le même, K_{eq} , appelé **constante d'équilibre** et s'applique à toutes les réactions chimiques réversibles. Dans le cas des liaisons protéine-ligand, l'équation donne une

représentation quantitative de l'affinité de la protéine pour le ligand ; on appelle aussi la constante d'équilibre, **constante de dissociation, K_d** :

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

Équation qui peut aussi s'écrire

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d}$$

Avec cette écriture, on voit bien que si K_d est grand, la valeur de $[PL]$ sera petite. Un K_d élevé traduit donc une faible affinité de la protéine pour le ligand. Si une protéine peut se lier à plusieurs ligands, la comparaison de leurs K_d respectifs permet de savoir quel est le ligand qui a la plus grande chance de se lier à la protéine. Les ligands qui sont en compétition pour un même site sont dits compétitifs. Cette compétition entre ligands est une caractéristique générale des protéines. Certains ligands en miment d'autres, ce sont des agonistes. Certains sont naturels comme la nicotine du tabac qui se fixe sur le même récepteur que l'acétylcholine. D'autres sont synthétisés par les scientifiques pour étudier les sites de liaison protéine-ligand. Du fait de leur capacité de mimer certains ligands naturels, les agonistes entrent dans la composition de nombreux médicaments.

5- Protéine à un seul site de fixation :

5-1 Site de fixation et site actif :

L'interaction entre la protéine et son ligand nécessite la fixation de ce dernier à une zone bien spécifique de la protéine appelée site de fixation (ou site de liaison).

Dans le cas des enzymes, les différents sites existant à la surface de l'apoenzyme sont :

- ✓ Site de reconnaissance du ou des substrats.
- ✓ Site de fixation du coenzyme.
- ✓ Site de fixation du ou des cofacteurs minéraux.
- ✓ Zone de transformation catalytique.
- ✓ Site de régulation.
- ✓ Site de fixation aux structures cellulaires.

La fixation d'un ligand (L) à son récepteur protéique (R) est réversible et peut être représentée par :

L'acétylcholine, dont le récepteur est un canal sodium/potassium, est un exemple d'un **ligand** de faible affinité (nM) permettant des contractions musculaires transitoires et rapides.

La **vitesse de combinaison** du ligand à son récepteur dépend des concentrations en ligand (L) et en récepteur (R) :

$$v_1 = k_1 [R] [L]$$

La **vitesse de dissociation** est fonction de la concentration en complexe ligand-récepteur (RL):

$$v_2 = k_{-1} [RL]$$

Lorsque l'équilibre est atteint, $v_1 = v_2$ et on peut écrire :

$$\begin{aligned} k_1 [R] [L] &= k_{-1} [RL] \\ [R] [L] / [RL] &= k_{-1} / k_1 = K_D \\ [RL] / [R] [L] &= k_1 / k_{-1} = K_A \end{aligned}$$

Où:

K_D est la constante d'équilibre de dissociation (**mole.L⁻¹**).

K_A est la constante d'équilibre d'association (**L.mole⁻¹**).

[R] la concentration de la protéine réceptrice.

[L] la concentration du ligand libre.

[RL] la concentration du ligand lié.

K_D est d'autant plus petite, ou K_A d'autant plus grand, que la liaison du ligand à la protéine est plus forte (complexe RL moins facilement dissociable).

Si la protéine (P) possède (n) sites de liaisons (R) pour le ligand (L), la réaction devient :



L'affinité d'un récepteur est exprimée par la constante de dissociation du complexe ligand-récepteur (K_D) dont la valeur, selon les cas, s'établit entre 10^{-12} et 10^{-4} M. plus cette constante est faible plus l'affinité du récepteur pour son ligand est élevée.

5-2 Représentations graphiques de l'interaction protéine-ligand :

Soit respectivement $[P_t]$ et $[R_t]$ la concentration molaire de la protéine totale et de l'ensemble des sites de liaison :

La concentration en ligand libre (K_D) nécessaire à la saturation de la moitié des sites récepteurs permet d'apprécier l'affinité du récepteur pour le ligand. Plus cette concentration est faible, plus l'affinité du récepteur pour le ligand est élevée.

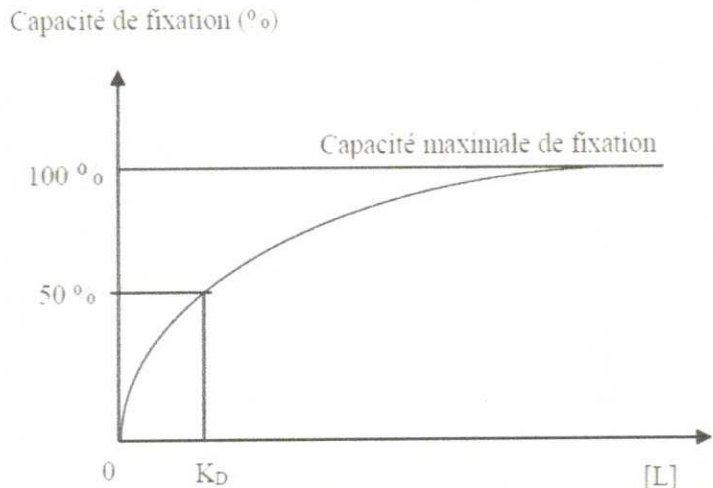
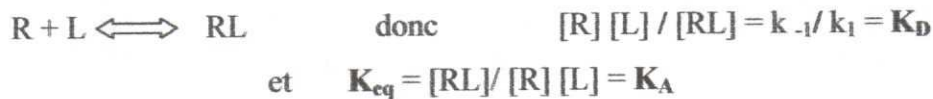


Figure 9 . Représentations graphiques de l'interaction protéine-ligand

La fixation d'un ligand sur une protéine qui possède UN site de fixation (un récepteur, enzyme monomérique) est exprimée par :



Sachant que [R], [L] et [RL] sont définies lorsque l'équilibre thermodynamique est atteint.

On a : $[Rt] = [R] + [RL]$ d'où $[R] = [Rt] - [RL]$

Donc $[R] = [Rt] - [RL]$ relation de conservation de la protéine (a).

On sait que :

$$K_A = \frac{[RL]}{[R] [L]} \quad \text{donc} \quad K_D = \frac{[R] [L]}{[RL]} \dots\dots (b)$$

Combinons (a) et (b) :

$$K_D = \frac{([Rt] - [RL]) [L]}{[RL]}$$

$$K_D [RL] = [Rt] [L] - [RL] [L]$$

$$[RL] (K_D + [L]) = [Rt] [L]$$

Donc [RL] dépend de K_D , [L] et de [Rt] selon une loi hyperbolique. On parle alors d'une *saturation Michaélienne*.

Comme : $[Rt] = [Pt]$ donc $[RL] = \frac{[Pt] [L]}{(K_D + [L])} \dots\dots\dots(1)$

Ainsi : $\frac{[RL]}{[Pt]} = \frac{[L]}{(K_D + [L])}$ est appelée *fonction de saturation (Ÿ)* car elle renseigne sur le degré de saturation de la protéine. Elle varie entre 0 et 1.

Elle consiste à porter [RL] en fonction de [L]. Le graphe obtenu est une hyperbole.

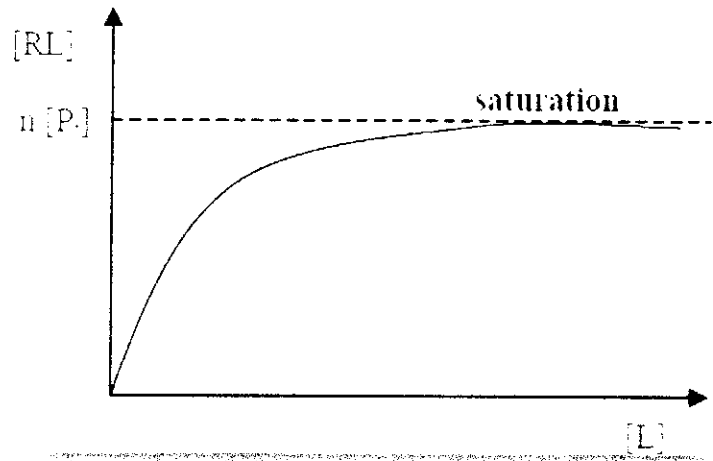


Figure 10. La représentation Michaélienne

6- Association d'un ligand sur deux sites différents :

Si une protéine établit une liaison avec un ligand, les sites peuvent être :

Sites dépendants : dont la fixation du ligand sur un site dépend de l'état de saturation des autres sites (cas des enzymes allostériques).

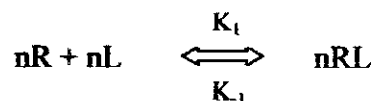
Sites indépendants : dont la fixation du ligand sur un site est indépendante de l'état de saturation des autres sites.

Sites indépendants et équivalents : chacun des sites possède la même constante de dissociation (K_D).

Sites indépendants et non équivalents : les sites possèdent des constantes de dissociation différentes ($K_{D1} \neq K_{D2} \neq K_{D3} \neq \dots$).

6-1 Cas des sites indépendants et équivalents :

La protéine possède (n) sites de fixation équivalents. Ce cas est fréquemment rencontré dans les enzymes oligomériques ayant un site de fixation pour le substrat sur chaque monomère. La réaction est représentée par :



Donc l'équation (1) devient :

$$[RL] = n [Pt] [L] / (K_D + [L]) = n [Pt] \check{Y} \dots \dots \dots (2)$$

$$[RL] / [Pt] = n [L] / (K_D + [L]) = n \check{Y}$$

où ($n \check{Y}$) est le nombre moyen des sites occupés par protéine.

Les méthodes de linéarisation (de la représentation Michaélienne) permettent de déterminer les paramètres qui caractérisent la fixation du ligand au récepteur (n).

En fait, il existe **DEUX** représentations les plus couramment utilisées :

On a l'équation (2) :

$$[RL] = n [Pt] [L] / (K_D + [L])$$

$$1 / [RL] = K_D / n [Pt] [L] + 1 / n [Pt]$$

$$1/[RL] = 1/[L] (K_D / n [Pt]) + 1 / n [Pt]$$

Donc, la **représentation de KLÖTZ** consiste à porter $(1/[RL])$ en fonction de $(1/[L])$. Le graphe obtenu est une droite de pente $(1/K_A n [Pt])$ ou encore $(K_D/n [Pt])$ et d'ordonnée à l'origine $(1/n [Pt])$.

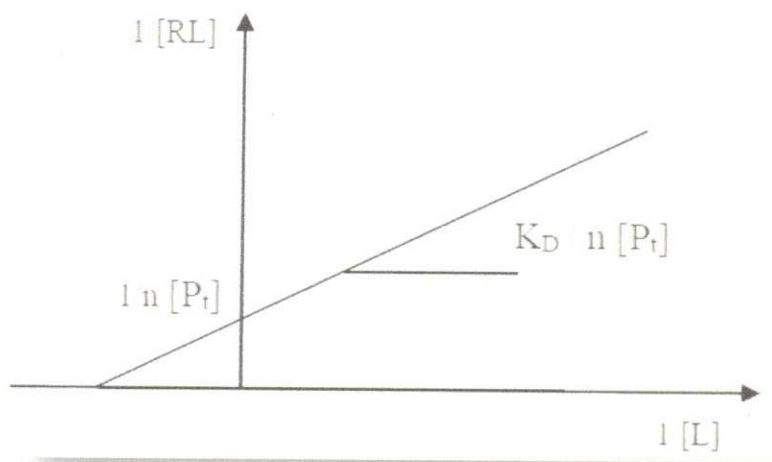


Figure 11. Représentation de KLÖTZ

Représentation de SCATCHARD

On a :

$$K_D = (n [Pt] - [RL]) [L] / [RL]$$

$$[L] / [RL] = K_D / (n [Pt] - [RL])$$

$$[RL] / [L] = (n [Pt] - [RL]) / K_D$$

$$[RL] / [L] = - [RL] / K_D + (n [Pt] / K_D)$$

Par conséquent, la représentation de SCATCHARD consiste à porter $[RL]/[L]$ en fonction de $[RL]$. Le graphe est une droite de pente $(-K_A)$ ou encore $(-1/K_D)$ qui coupe l'axe des abscisses en $(n [Pt])$. $[P_t]$ étant connue, on peut en déduire (n) .

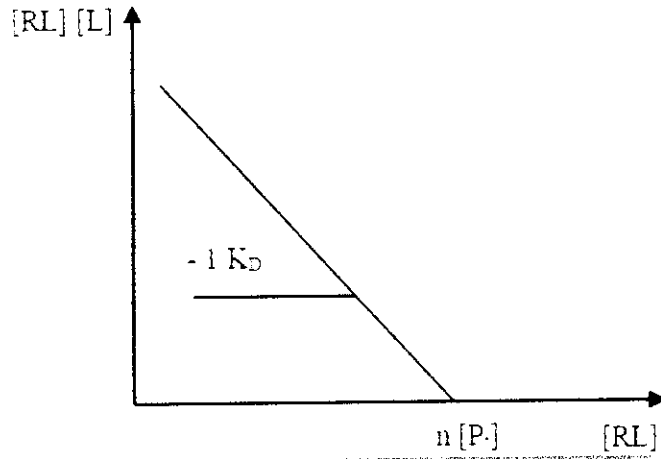


Figure 12. Représentation de SCATCHARD

6-2 Cas des Sites indépendants et non équivalents :

Lorsque les sites ne sont pas équivalents (ayant des affinités différentes pour le ligand), on définit des classes de sites ; chaque classe regroupe des sites possédant la même constante de dissociation (K_D). Par conséquent, la représentation de SCATCHARD et celle de KLÖTZ ne sont plus linéaires.

Exemple :

Pour une protéine qui possède 2 classes de sites, donc 2 constantes de dissociation différentes ($K_{D1} \neq K_{D2}$), autrement dit ; **DEUX** affinités différentes, on obtient **DEUX** segments de droites avec **DEUX** pentes différentes (plus la pente est grande, plus l'affinité est grande).

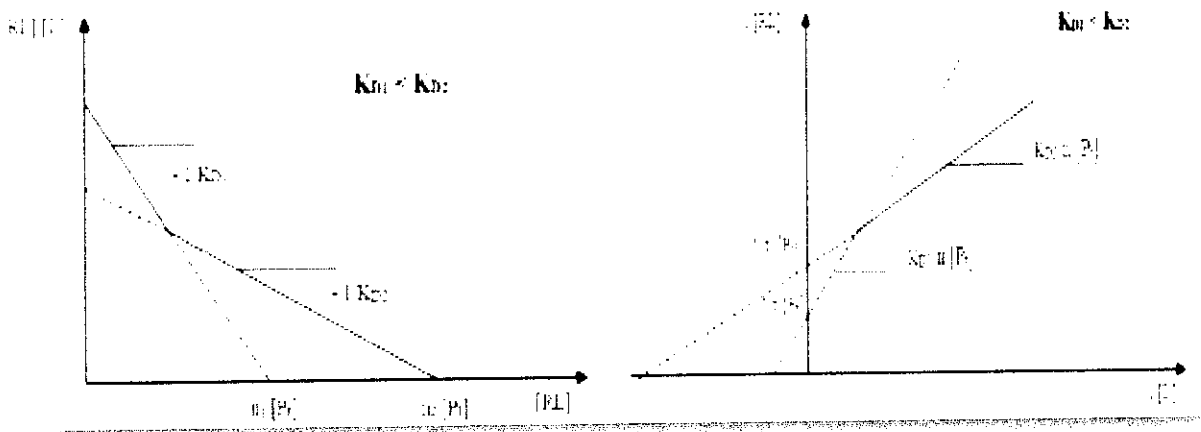


Figure 13. Sites indépendants et non équivalents.

Cinétique Enzymatique

1- Introduction

La cinétique enzymatique est la discipline scientifique, à l'interface de la chimie et de la biochimie, qui applique les concepts de la cinétique chimique à l'étude des réactions catalysées par des enzymes : il s'agit, par cette approche, de chercher à comprendre comment fonctionnent les enzymes par l'examen de la manière dont les vitesses de ces réactions varient en fonction des conditions expérimentales.

Presque toutes les réactions chimiques qui ont lieu dans les systèmes biologiques sont catalysées par des enzymes. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques hautement spécifiques, de nature protéiques. Pour quantifier une enzyme dans un milieu biologique, il faudrait connaître son poids et sa masse molaire à l'état pur, or cela n'est possible qu'avec un nombre restreint d'enzymes. Pour palier à ce problème pratique, on peut caractériser une enzyme en étudiant la vitesse de la réaction qu'elle catalyse.

2- Définition

La cinétique est l'étude des vitesses des réactions chimiques. La cinétique enzymatique a pour but de déterminer les vitesses des réactions que l'enzyme catalyse, et à mesurer son affinité pour les substrats. Elle permet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biologiques et les mutations des enzymes en étudiant leur vitesse réactionnelle. On peut comprendre alors comment les modifications de l'environnement de l'enzyme peuvent affecter son fonctionnement.

Les enzymes sont des protéines globulaires solubles dans l'eau. Elles peuvent être différenciées d'après leurs structures, origines, poids moléculaires et autres propriétés. Par rapport à leur structure on distingue des enzymes à structure monomérique (une seule sous-unité) et des enzymes à structure oligomérique (plusieurs sous-unités).

Du point de vue cinétique les enzymes monomériques possèdent une cinétique Michaelienne (courbe hyperbolique) alors que les enzymes oligomériques ont une cinétique allostérique (courbe sigmoïde).

Les valeurs de la constante de Michaelis K_m et de la V_{max} d'une enzyme pouvant fournir des informations sur son activité, bien qu'il faille avant tout tenir compte du nombre de molécules d'une enzyme disponibles dans une cellule pour savoir quelle sera l'efficacité de son action.

La constante de Michaelis permet de savoir quel est le degré d'adaptation de l'activité de l'enzyme, K_m est approximativement égale à la constante de dissociation du complexe Enzyme-Substrat. Quand elle est basse, cela veut dire que l'affinité du substrat pour l'enzyme

est forte. Pour les concentrations en substrat inférieures ou égales à K_m , la vitesse de la réaction dépend de la vitesse d'association entre enzyme et substrat.

3- Cinétique Michaélienne à un substrat

3-1 Introduction à la cinétique chimique :

Certaines réactions chimiques (neutralisation d'un acide par une base) semblent être rapides (instantanées), la plupart d'entre elles atteignent l'équilibre dans un intervalle de temps variant de la fraction de seconde (explosions) à plusieurs journées (réactions d'estérification) ou même des mois (photodécomposition de la cellulose). L'étude de la vitesse d'une réaction chimique se fait par la cinétique chimique.

La notion de cinétique chimique fut introduite pour la première fois par les travaux de WENZEL au XVIII^e siècle, après avoir étudié la corrosion des métaux par les acides. Par la suite WILHELMY (1850) met en évidence la proportionnalité entre les vitesses de réaction et les concentrations des réactifs dans l'inversion du saccharose par les acides.

3-2 Rôle de la cinétique chimique

La thermodynamique ne s'intéresse qu'à des états d'équilibre (initiaux et finaux) et à la possibilité et au sens probable d'une réaction chimique. Le temps n'est pas un facteur thermodynamique. Par contre, la cinétique se base sur l'évolution chronologique d'une réaction chimique (variation dans le temps de composition du mélange réactionnel et du degré d'avancement) et au chemin suivi par son mécanisme. Si la thermodynamique fait appel à des notions de température et de fonctions d'état (énergie interne, entropie, enthalpie, etc.), la cinétique est liée à la notion du facteur temps, tout en étant partiellement dépendante de certains aspects énergétiques (constante de vitesse et énergie d'activation).

Au cours d'une réaction enzymatique, des échanges d'énergie avec le milieu environnant ont lieu : certaines liaisons du substrat sont rompues en absorbant de l'énergie et les liaisons du produit sont formées en libérant de l'énergie. La stabilité d'un complexe peut-être mesurée en déterminant la constante d'association K_a (en $M^{-1}.s^{-1}$) et la constante de dissociation K_d (en s^{-1}) de la réaction. La constante de dissociation à l'équilibre K_d est directement reliée à l'énergie libre de Gibbs :

$$K_a = [PL] / [P] \times [L] = 1/K_d$$

$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \ln K_a$$

le sens de la réaction $\Delta G < 0$: évolution dans le sens [PL]

$\Delta G > 0$ évolution dans le sens de [P] et [L]

$\Delta G = 0$ (équilibre)

$$\Delta G_{\text{liaison}} = - RT \log K_a = RT \log K_d$$

$$K_a = \exp\left(\frac{-\Delta G_0}{RT}\right) K_2$$

ΔG° très négative \leftrightarrow association très favorable

R = constante des gaz parfaits ($8,32 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) ; et T = température absolue en degrés Kelvin ($^\circ\text{K}$).

La cinétique chimique est le domaine de la chimie qui étudie la vitesse des réactions chimiques et les paramètres l'influençant; une étude cinétique conduit à la détermination de la vitesse d'une réaction et des facteurs qui la modifient.

3-3 Réactions d'ordre simple

3-3-1 Réactions d'ordre 1 :

Une réaction en phase gazeuse : $\text{CH}_3\text{OCH}_3 \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{HCHO}$.

On peut également déterminer la loi de vitesse en suivant la variation des concentrations en fonction du temps et ce, au cours d'une même expérience. Dans cette section, on ne considérera que les réactions comportant un seul réactif ($A \rightarrow$ produits). Dans les réactions d'ordre 1, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du réactif.

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]$$

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = \int_0^t -k dt = -k \int_0^t dt$$

$$[\ln[A]]_{[A]_0}^{[A]} = -k[t]_0^t$$

$$\ln[A] - \ln[A]_0 = -kt \quad \text{ou} \quad \ln \frac{[A]}{[A]_0} = -kt$$

$$\text{Ou encore :} \quad \mathbf{Ln(A) = Ln(A_0) - kt}$$

Cette expression prend la forme d'une droite ($y = b + mx$) où $-k$ est la pente, t est le temps en secondes, et $\ln(A)_0$ est l'ordonnée à l'origine, comme illustré ici :

On peut également transformer cette expression sous sa forme exponentielle :

$$\mathbf{(A) = (A_0) e^{-kt}}$$

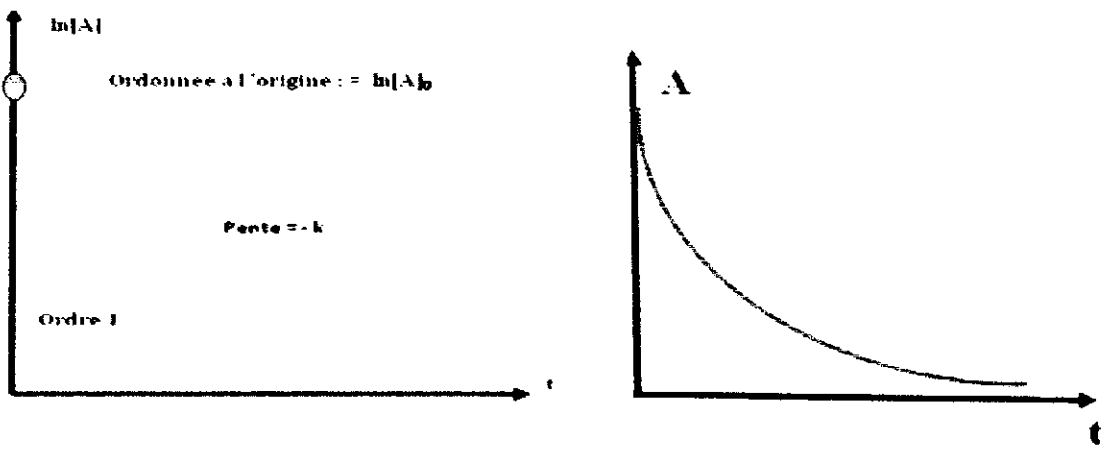


Figure 14. Cinétique d'ordre UN Variation de [A] en fonction du temps

Comment savoir si une réaction est d'ordre 1 ?

Pour savoir si une réaction est d'ordre 1

- Trace le logarithme naturel de la concentration d'un réactif en fonction du temps et vérifie si le graphe est linéaire ;
- Si le graphe est linéaire et présente une pente négative, la réaction doit être une réaction d'ordre 1.

3-3-2 Réactions d'ordre 2 :

La réaction d'ordre 2 est une **réaction chimique** dans laquelle la somme des exposants de la loi de vitesse correspondante de la réaction chimique est égale à deux. La vitesse d'une telle réaction peut être écrite soit comme $V = k(A)^2$, soit comme $V = k(A)(B)$.

ordre	Loi de vitesse	Loi de vitesse intégrée	Méthode graphique	k	Unités de k	Demi-vie
0	$v(t) = k = -\frac{d[A]}{adt}$	$[A]_t = -ak t + [A]_0$	$[A]_t = f(t)$	- pente	mol/L.s ⁻¹	$t_{1/2} = \frac{[A]_0}{2ak}$
1	$v(t) = k[A] = -\frac{d[A]}{adt}$	$Ln[A]_t = -ak t - Ln[A]_0$	$Ln[A]_t = f(t)$	- pente	s ⁻¹	$t_{1/2} = \frac{Ln2}{ak}$
2	$v(t) = k[A]^2 = -\frac{d[A]}{adt}$	$\frac{1}{[A]_t} = ak t + \frac{1}{[A]_0}$	$1/[A]_t = f(t)$	+ pente	L/mol.s ⁻¹	$t_{1/2} = \frac{1}{ak[A]_0}$

Cette équation décrit une **décroissance exponentielle** de la concentration en fonction du temps. Toutefois, l'équation sous forme de droite est la plus souvent utilisée.

Par définition, la vitesse d'une réaction chimique est la vitesse à laquelle la concentration en réactifs ou produits de la réaction change au cours du temps. Pour une réaction qui transforme un réactif A en un produit B, cette vitesse est :

$$v = -d[A]/dt = d[B]/dt.$$

Elle s'exprime en mol/L/s et dépend en général du temps. En cinétique enzymatique, le ou les réactifs qui se fixe(nt) sur le site de l'enzyme où s'opère la réaction (le site actif), porte(nt) le nom de substrat(s).

D'un point de vue expérimental, pour déterminer la vitesse d'une réaction, il faut donc pouvoir mesurer la concentration de l'un des réactifs ou produits en fonction du temps. La méthode utilisée dépend évidemment de la nature de ces molécules. Dans les cas favorables, l'une d'elles absorbe la lumière spécifiquement à une certaine longueur d'onde, et on peut déterminer simplement la vitesse à laquelle sa concentration change en mesurant la variation d'absorbance du milieu réactionnel au cours du temps. Si l'on ne peut pas mesurer instantanément la concentration d'un réactif ou produit, il peut être possible de faire avancer la réaction enzymatique pendant un certain temps, de la stopper en dénaturant l'enzyme (par exemple, en provoquant une variation brutale de température ou de pH), puis d'effectuer un dosage des réactifs restants ou des produits formés.

$$\text{Soit : } V_A = -k [A]^2/dt$$

Pour simplifier, on considère une **réaction de type** : $A + B \rightarrow \text{Produits}$

On écrit que la vitesse est proportionnelle aux concentrations de A et B.

on obtient l'équation : $V_A = V_B = -k [A]^1 [B]^1$ (le signe moins indique que A et B disparaissent)

On dit que la vitesse est d'**ordre partiel 1** vis à vis de A ou de B (l'écriture $v = -k [A]^1 [B]^1$ exprime ce fait) et la vitesse est d'**ordre total** $1 + 1 = 2$.

A partir de l'équation : $V_A = -k [A] [B]$ à $t = 0$ si l'on a $[A_0] = [B_0]$ alors $[A] = [B]$.

L'équation s'écrit :

$$V_A = - \frac{k [A]^1 [B]^1}{dt} = -k [A]^2$$

Si l'on intègre

$$\frac{d[A]}{[A]} = -k [A] [B] = -k dt$$

On obtient

$$\frac{-1}{[A]} + \frac{1}{[A_0]} = -k t$$

Equation attachée à l'ordre 2

Application :

On a effectué trois expériences avec des concentrations initiales différentes et on a mesuré le temps de demi-vie pour chacune d'elles. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant ;

Expérience	1	2	3
$C_{A,0}$ (mol.L ⁻¹)	0,080	0,120	0,200
$t_{1/2}$ (s)	34	22	13
$t_{1/2} \times CA,0$	2,72	2,64	2,8

- 1- Que constate-vous ?
- 2- Vérifier si elle est du second ordre ?

3-4 Cinétique Michaélienne à un substrat

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques, c'est-à-dire des molécules capables d'accélérer des réactions chimiques spécifiques et qui sont retrouvées dans leur état initial à l'issue de la réaction catalysée.

Il existe différents mécanismes enzymatiques selon l'enzyme considérée. Les enzymes dites Michaeliennes fonctionnent selon le mode suivant : un substrat S se lie avec une enzyme E pour donner un intermédiaire ES, appelé complexe enzyme-substrat, puis cet intermédiaire se dissocie pour donner un produit P avec régénération de l'enzyme E. Pour faire une étude cinétique, il faut mesurer la vitesse instantanée de la réaction à différents moments en ayant choisi avec soin les conditions initiales. À partir des mesures on peut tracer des courbes représentant la cinétique de la réaction, ce qui permet de déterminer certaines valeurs caractéristiques.

L'équation de Michaelis-Menten est une expression mathématique décrivant les paramètres cinétiques d'une réaction chimique catalysée par une enzyme michaelienne.

3-4-1 Détermination de l'équation de Michaelis-Menten

Au début du XX^e siècle, Michaelis et Menten ont proposé un mécanisme réactionnel pour la transformation d'un substrat S en un produit P par une enzyme E. Ce mécanisme comporte deux étapes et fait intervenir un intermédiaire réactionnel : le complexe enzyme-substrat, noté ES.



Avec k_1 , k_{-1} , k_2 et k_{-2} sont les constantes de vitesse des différents actes élémentaires.

Rappel de cinétique chimique : les concentrations des espèces à l'instant t sont notées $[E]$, $[ES]$, $[S]$ et $[P]$. Les concentrations initiales de ces espèces sont notées $[E]_0$, $[ES]_0$, $[S]_0$ et $[P]_0$.

La vitesse de réaction (caractérisée par la vitesse d'apparition du produit, soit $v = d[P]/dt$)

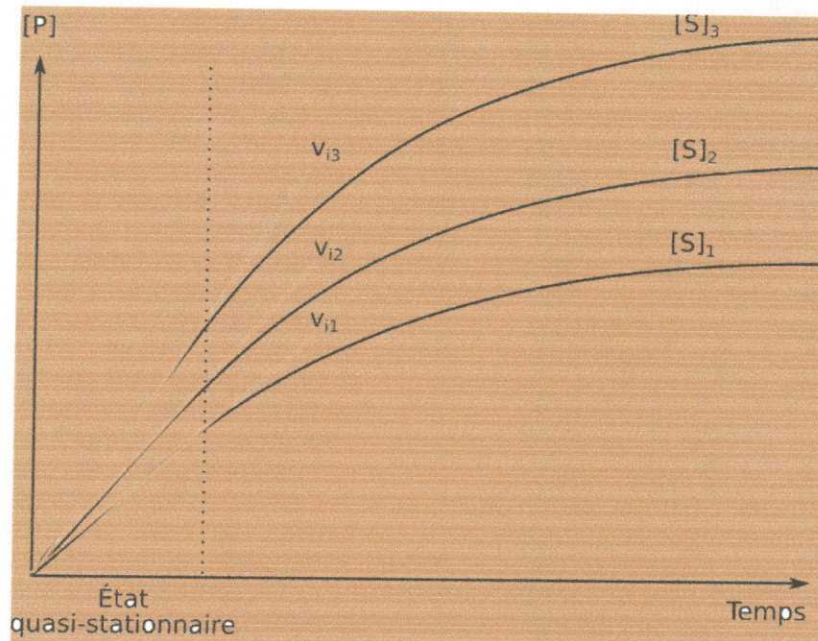


Figure 15. Concentration en produit au cours du temps pour une réaction catalysée par une enzyme Michaelienne

La vitesse de la réaction à un instant t s'obtient en mesurant la pente de la tangente à la courbe à cet instant t . En début de réaction, la vitesse de réaction est constante, on parle d'état quasi-stationnaire. Durant cette période la quantité de produit P reste négligeable donc les conditions de **Michaelis** sont respectées. La vitesse de réaction déterminée sur cette période correspond donc à la vitesse initiale v_i . Puis, on constate un infléchissement de la courbe, qui traduit une diminution progressive de la vitesse de la réaction. En effet, le produit continuant à s'accumuler, la réaction inverse (disparition du produit) devient non négligeable. À plus long terme, la concentration en produit atteint un plateau, la quantité maximale de produit pouvant apparaître dépendant de la quantité de substrat introduite au début de l'expérience et des constantes cinétiques de la réaction. On constate que pour des concentrations de substrat croissantes, la concentration finale de produit ainsi que la vitesse initiale de réaction sont également croissantes.

En début de réaction, la vitesse de réaction est quasi-constante et égale à la vitesse initiale, notée v_i ou v_0 . En fin de réaction, la vitesse tend vers zéro. En effet, soit la réaction est totale et une fois le substrat épuisé il n'y a plus de réaction possible (donc $v=0$), soit un équilibre s'instaure entre la formation de produit ($ES \rightarrow E+P$) et sa destruction ($E+P \rightarrow ES$) ce qui, là encore, se traduit par une vitesse de réaction nulle.

L'équation de Michaelis-Menten donne une expression de la vitesse initiale de réaction v_i en fonction de grandeurs connues (fixées par l'expérimentateur ou mesurées).

Pour cela il faut se placer dans des conditions expérimentales particulières, à savoir : concentration en substrat $[S]$ très largement supérieure à la concentration totale en enzyme $[E]_0$ et absence ou quasi-absence de produit P. La première condition est obtenue en choisissant des quantités adaptées d'enzyme et de substrat à introduire dans le milieu réactionnel, la seconde en réalisant les mesures suffisamment rapidement pour que la quantité de substrat transformé en produit soit faible. On parle de conditions de **Michaelis**. À partir du moment où ces conditions sont réunies, on peut effectuer les approximations suivantes :

- La concentration en produit $[P]$ étant nulle ou faible, la vitesse d'apparition du complexe ES par réaction entre E et P ($v_{-2}=k_{-2}[E][P]$) est négligeable devant $v_1=k_1[E][S]$.
- On se place dans le cadre de l'approximation des états quasi-stationnaires, ce qui revient à considérer que la concentration $[ES]$ reste constante. Mathématiquement, cela se traduit par $d[ES] / dt=0$.
- $[S]_0$ étant très grand par rapport à $[E]_0$, la concentration maximale en complexe $[ES]$ est limitée par $[E]_0$ et sera donc toujours négligeable comparée à $[S]_0$, même à saturation de tous les sites actifs. Or $[S]=[S]_0-[ES]$, donc si $[ES]$ est négligeable face à $[S]_0$, il en découle l'approximation suivante : $[S]=[S]_0$.

Ces préalables étant posés, on peut commencer à faire un traitement mathématique simple de la cinétique de la réaction.

Etape 1

À tout instant, la vitesse de réaction v est donnée par $V=d[P]/dt = k_2[ES]-k_{-2}[E][P]$.

Si l'on considère maintenant la vitesse initiale de réaction V_i , d'après l'approximation 1 on peut négliger le terme $k_{-2}[E][P]$, ce qui donne $V_i=k_2[ES]$.

$[ES]$ est une valeur qui n'est pas fixée par l'expérimentateur, et qui ne peut pas être mesurée (pas plus que $[E]$ et $[S]$, contrairement à $[E]_0$ et $[S]_0$). Pour avoir une expression utilisable, il faut donc trouver une expression de $[ES]$ qui utilise des valeurs qui peuvent être connues (qu'elles correspondent aux conditions expérimentales fixées par l'expérimentateur ou qu'elles puissent être mesurées).

Il est également nécessaire de faire la distinction en V_i et V_{max} . Quelles que soient les conditions, $V_i=k_2[ES]$. Par contre, il existe une valeur particulière de V_i , la vitesse maximale V_{max} . Celle-ci est atteinte lorsque $[ES]=[E]_0$, c'est-à-dire lorsque tous les sites actifs sont saturés. La V_{max} est donc la vitesse maximale de catalyse pour une concentration donnée

d'enzyme. Elle est obtenue à saturation de l'enzyme, autrement dit lorsque tous les sites actifs de toutes les molécules d'enzyme sont occupés. Sa valeur dépend évidemment d'autres conditions expérimentales (température, pH, etc.) .



La variation de la concentration en complexe enzyme-substrat ES est liée aux vitesses des différents actes élémentaires du mécanisme proposé par **Michaelis** et **Menten**. Certains contribuent à sa formation, tandis que d'autres contribuent à sa disparition . Ainsi :

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] + k_2[ES] + k_{-2}[E][P] = 0$$

Puisqu'on néglige $k_{-2}[E][P]$ et qu'on considère que $d[ES]/dt=0$, on obtient :

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - (k_{-1}[ES] + k_2[ES]) = 0 \Leftrightarrow k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \Leftrightarrow \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$$

Pour simplifier on pose $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$ est appelée constante de **Michaelis** ; sa dimension est celle d'une concentration.

L'équation précédente devient donc

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = K_M \Leftrightarrow [ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$



À tout instant, la concentration totale d'enzyme $[E]_0$ se répartit entre les molécules libres E et les molécules complexées avec le substrat, ES :

$$[E]_0 = [E] + [ES] \Leftrightarrow [E] = [E]_0 - [ES]$$

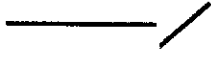
En remplaçant ce terme dans l'équation trouvée en fin d'étape 2 on obtient :

$$[ES] = \frac{([E]_0 - [ES])[S]}{K_M} \Leftrightarrow [ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_M} - \frac{[ES][S]}{K_M} \Leftrightarrow [ES] + \frac{[ES][S]}{K_M} = \frac{[E]_0[S]}{K_M} \Leftrightarrow [ES](1 + \frac{[S]}{K_M}) = \frac{[E]_0[S]}{K_M}$$

$$[ES] = \frac{\frac{[E]_0[S]}{K_M}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

$$[ES] = \frac{\frac{[E]_0[S]}{K_M}}{\frac{K_M + [S]}{K_M}}$$

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_M + [S]}$$



D'après l'étape 1, $V_i = k_2[ES]$ et d'après l'étape 3,

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_M + [S]}$$

$$V_i = k_2 \frac{[E]_0[S]}{K_M + [S]}$$

Or, d'après le raisonnement développé à la fin de l'étape 1, $k_2[E]_0 = V_{\max}$

On en déduit donc l'équation de Michaelis et Menten :

$$V_i = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

À partir de cette équation, on peut déterminer la V_i pour toutes les conditions initiales connues puisque V_{\max} et K_M sont des constantes qui peuvent être déterminées expérimentalement (voir paragraphe suivant). V_i ne dépend donc que de la concentration en substrat $[S]$, valeur connue puisqu'il s'agit de la concentration en substrat introduite par l'expérimentateur (rappelons que selon l'approximation 3, $[S] = [S]_0$)

La détermination graphique de la constante de Michaelis et de V_{\max}

Pour déterminer les constantes K_M et V_{\max} , il faut faire une étude cinétique.

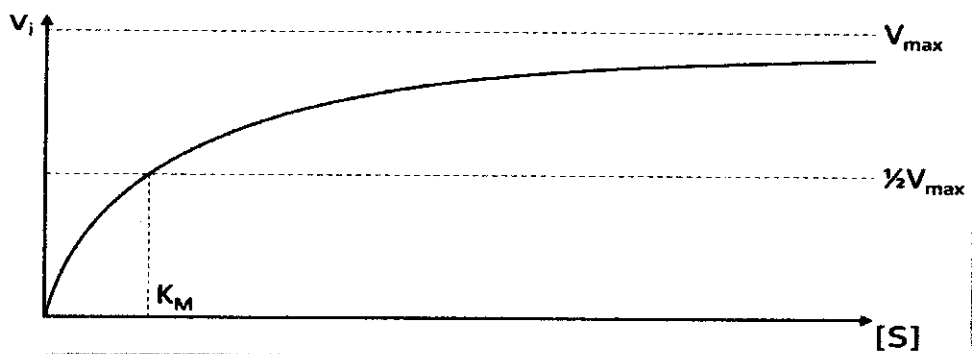


Figure 16. Vitesses initiales en fonction de la concentration en substrat

La détermination graphique de l'asymptote, et donc de K_M et V_{max} , est peu précise.

Une première méthode consiste à tracer le graphique représentant les V_i en fonction de la concentration en substrat $[S]$ utilisé. D'après l'équation de Michaelis, on peut en effet déduire que V_i se rapproche asymptotiquement de V_{max} lorsque $[S]$ augmente. Par ailleurs, lorsque $[S]=K_M$, $V_i=V_{max}/2$.

On peut donc déterminer graphiquement V_{max} , puis K_M (voir graphique 2). La difficulté vient du fait que la détermination graphique d'une asymptote est une nécessairement imprécise, entachant d'erreur la détermination de K_M et V_{max} .

Pour améliorer la précision de la détermination graphique de ces deux constantes, il existe des représentations graphiques qui linéarisent les résultats, permettant des extrapolations plus précises.

2- Cinétique à deux substrats

2- 1 Introduction

Hormis quelques exemples de cinétique enzymatique à un seul substrat: réaction d'isomérisation, la majorité des cinétiques enzymatiques in vivo répondent à un mécanisme impliquant deux ou plusieurs substrats. La loi de vitesse dépend de la séquence d'événements dans le cycle catalytique et en particulier de l'ordre dans lequel les substrats se lient à l'enzyme et les produits sont relargués. Dans la plupart des cas, dans des expériences où l'on fait varier la concentration d'un seul des substrats, la vitesse initiale suit une loi de Michaelis-Menten en fonction de la concentration de ce substrat, avec des paramètres V_{max} et K_M dont les valeurs dépendent de la concentration de l'autre substrat. Examiner cette dépendance permet de déterminer quel mécanisme est opérationnel.

L'étude cinétique des réactions enzymatiques à deux substrats a pour but de déterminer l'ordre de fixation des substrats, les constantes cinétiques caractérisant la fixation de chacun d'eux en présence et en absence de l'autre ainsi que la vitesse maximale de la réaction qui est mesurée quand les deux substrats sont à concentration saturante.

A et B se retrouvent-ils ensemble sur l'enzyme (Complexe EAB) ?

Si on admet que le complexe EAB existe, on peut se poser d'autres questions :

Y'a-t-il un ordre de fixation ?

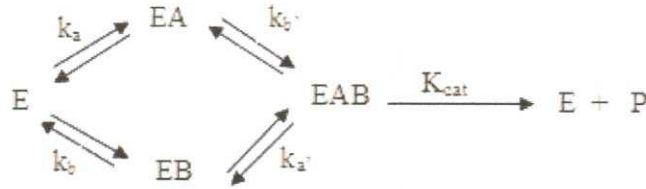
Est-ce que la fixation de A modifie celle de B (et inversement) ?

Ou au contraire, est ce qu'il n'y a pas d'influence entre la fixation de A et de B ?

En 1963, Cleland a proposé différents mécanismes La cinétique à deux et plusieurs substrats :

- ▶ Mécanisme à complexe ternaire (enzyme et deux substrats), à déplacement simple
- ▶ Mécanisme à complexe binaire, à déplacement double

Pour simplifier, on va se replacer dans les conditions de vitesses initiales « état stationnaire » c'est-à-dire, P et Q ne sont pas encore formés.



Constantes de dissociation :

$$K_a = (A).(E) / (EA)$$

$$K'_b = (EA).(B) / (EAB)$$

$$K_b = (E).(B) / (EB)$$

$$K'_a = (EB).(A) / (EAB)$$

$$K_A K'_B = K'_A K_B$$

$$v = k (EAB) \quad \text{et} \quad V_{\max} = k.(E_T)$$

Équation de conservation :

$$(E)_{\text{total}} = (E) + (EA) + (EB) + (EAB)$$

$$(E)_{\text{tot}} = [K_a \cdot (EA) / A] + [K_b \cdot (EB) / (B)] + [K'_a \cdot (EAB) / (A)] + (EAB)$$

Quand on fixe A et on fait varier B, on obtient l'équation de vitesse :

Résolution :

$$(EA) = [K'_B / (B)] (EAB)$$

$$(EB) = [K'_A / (A)] (EAB)$$

$$(E) = [(K'_B K_A) / ((A) (B))] (EAB)$$

$$(E)_T = \{ 1 + [K'_B / (B)] + [K'_A / (A)] + [(K'_B K_A) / ((A) (B))] \} (EAB)$$

$$v = (k (E)_T) / \{ 1 + [K'_B / (B)] + [K'_A / (A)] + [(K'_B K_A) / ((A) (B))] \}$$

$$v = V_M / \{ 1 + [K'_B / (B)] + [K'_A / (A)] + [(K'_B K_A) / ((A) (B))] \}$$

$$v = \frac{V_M}{1 + \frac{K'_A}{(A)} + \frac{K'_B}{(B)} + \frac{K_A K'_B}{(A)(B)}}$$

Représentations graphiques ; $1/v_i$ en fonction de l'inverse de (A) et (B)

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_M} \left[1 + \frac{K'_A}{(A)} + \frac{K'_B}{(B)} + \frac{K_A K'_B}{(A)(B)} \right]$$

A variable et B paramétrique, la représentation de Lineweaver-Burk devient ;

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_M} \left[K'_A + \frac{K_A K'_B}{(B)} \right] \frac{1}{(A)} + \frac{1}{V_M} \left[1 + \frac{K'_B}{(B)} \right]$$

En traçant, pour une concentration en B donnée, $1/v = f(1/A)$, on obtient une droite dont les caractéristiques sont :

$$p = \frac{1}{V_M} \left[K'_A + \frac{K_A K'_B}{(B)} \right] \quad I_p = \frac{1}{V_M} \left[1 + \frac{K'_B}{(B)} \right]$$

$$a.o. = \frac{- \left[1 + \frac{K'_B}{(B)} \right]}{\left[K'_A + \frac{K_A K'_B}{(B)} \right]}$$

Les droites $1/v = f(1/A)$ convergent à gauche de l'axe des ordonnées, au point de coordonnées ;

$$\left(\frac{1}{v} \right)_{conv} = \frac{K'_A - K'_A}{V_M K'_A} \quad \text{et} \quad \left(\frac{1}{S} \right)_{conv} = \frac{-1}{K'_A}$$

Graphes secondaires:

Si on trace les valeurs de I_p du graphe primaire [$1/v = f(1/(A))$] en fonction de l'inverse de (B) : Cette équation est celle d'une droite de la forme ;

$$I_p = \frac{K'_B}{V_M} \frac{1}{(B)} + \frac{1}{V_M}$$

$$p_s = \frac{K'_B}{V_M} \quad I_{p_s} = \frac{1}{V_M} \quad a.o._s = \frac{-K'_A}{K'_A K'_B}$$

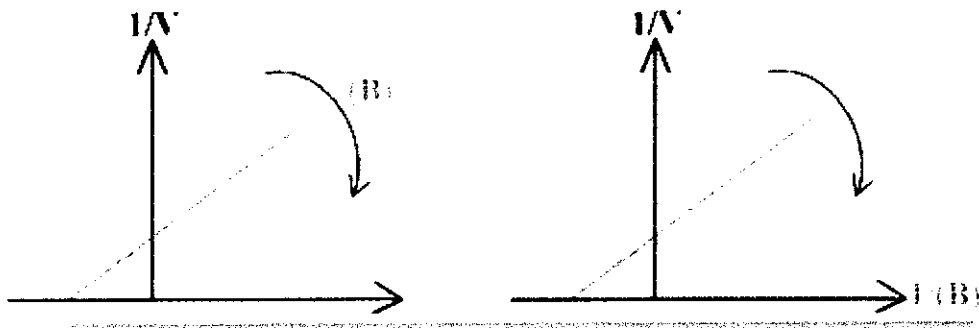
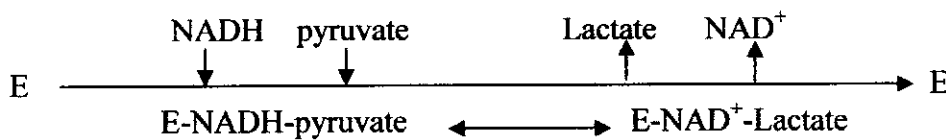


Figure 18. Mécanisme aléatoire avec interaction ; les graphes primaires.

Exemple de mécanisme ordonné ou séquentiel (Les déshydrogénases à NAD⁺)

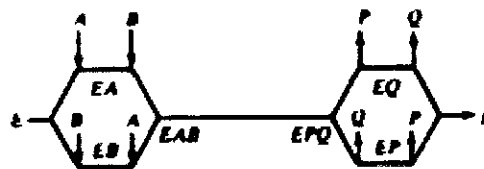
Cas de **lactate déshydrogénase (Mécanisme à simple déplacement)**: Certains enzymes nécessitent la présence d'un coenzyme dissociable, pour l'analyse le coenzyme peut être considéré comme un second substrat.



2-3 Mécanisme au hasard ou non ordonné (aléatoire)

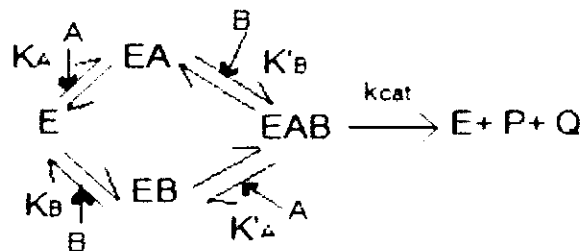
Les deux substrats, A et B, se fixent de manière aléatoire sur l'enzyme libre E (c'est-à-dire qu'il n'y a pas de fixation privilégiée de l'un ou l'autre des deux substrats). La réaction implique l'existence de quatre constantes d'équilibre K_A , K_B , K'_A et K'_B . Dans ce mécanisme, la fixation des deux substrats peut être soit dépendante ou indépendante. Dans le premier cas, le plus fréquent, l'association de A et B à l'enzyme dépend l'une de l'autre alors que dans le second cas, l'association de A et B à l'enzyme est indépendante.

Représentation de Cleland :



2-3-1 Association dépendante :

Avec : K_A différent de K'_A et K_B différent de K'_B . Cela signifie que la fixation d'un substrat « A » sur son site enzymatique modifie la fixation ultérieure de l'autre substrat « B » sur son site et réciproquement. Le substrat n'a pas la même affinité pour l'enzyme libre et l'enzyme complexé. Les droites se coupent au dessus de l'axe des abscisses dans le cas d'une fixation dépendante.



$$K_A = \frac{[E][A]}{[EA]}$$

$$K'_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

K_A : constante de dissociation de EA

K'_B : constante de dissociation de EAB

$$K_B = \frac{[E][B]}{[EB]}$$

$$K'_A = \frac{[EB][A]}{[EAB]}$$

K_B : constante de dissociation de EB

K'_A : constante de dissociation de EAB

Pour chaque concentration de A ou de B, la vitesse en fonction de A ou de B suit la loi de Michaelis et la vitesse maximale est obtenue lorsque l'enzyme est saturé en A et en B:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K'_A}{[A]} + \frac{K'_B}{[B]} + \frac{K_A K'_B}{[A][B]} \right)$$

Représentations graphiques :

(A) constante,

$$\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{[B]}\right) \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{[B]} \left(\frac{K'_B}{V_{max}} + \frac{K_A K'_B}{[A] V_{max}} \right) + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K'_A}{[A]} \right)$$

$$\frac{1}{v_E} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K'_A}{[A]} \right)$$

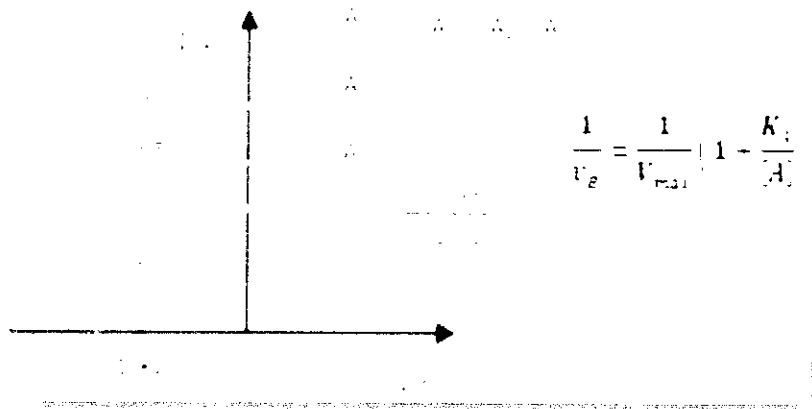


Figure 19. Représentation Primaire : $1/V = f(1/B)$

Quand on prend $[B] = \text{constante}$, on trace la représentation primaire $1/v = f(1/A)$

- Les graphes primaires permettent de déterminer de nouvelles valeurs : voir les équations des droites.
- Ces valeurs sont reportées dans le graphe secondaire pour le substrat A et le graphe secondaire pour le substrat B.
- Elles permettent de déterminer les paramètres cinétiques

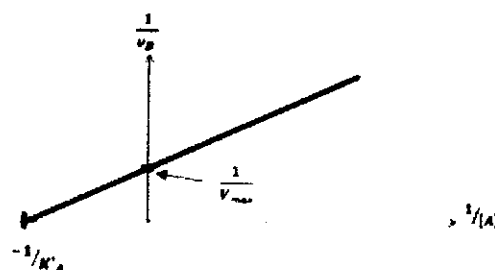


Figure 20. Représentation secondaire $1/v_B = f(1/A)$

Deux cas se présentent :

- Premier cas : Lorsque l'ordonnée est positif par rapport au point d'intersection :

- Si $K'_A < K_A$, la fixation de B augmente l'affinité de EB pour A
- Si $K'_B < K_B$, la fixation de A augmente l'affinité de EA pour B

Et donc on obtient une fixation **dépendante positive** car la fixation du premier substrat facilite la fixation du second substrat.

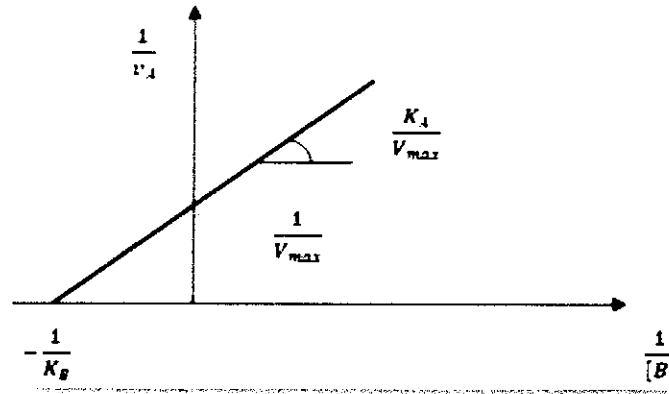


Figure 22. Représentation secondaire $1/v_A$ f ($1/B$)

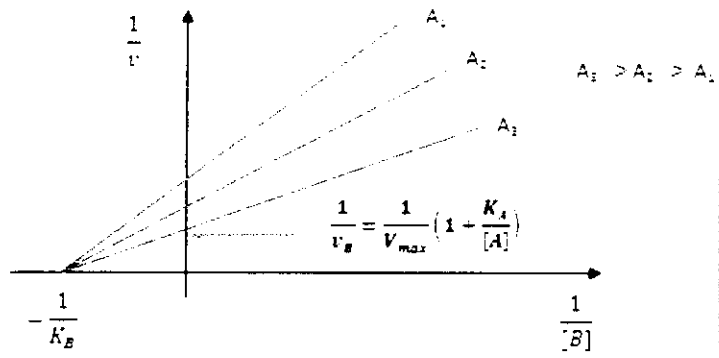
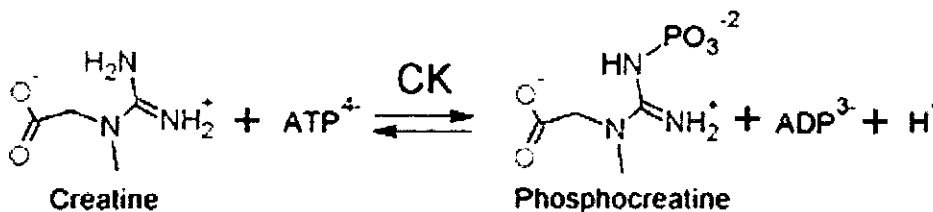


Figure 23. Représentation primaire $1/v = f(1/B)$

Exemple d'enzymes :

- la créatine kinase (E.C. 2.7.3.2). Il s'agit d'un mécanisme Bi Bi au hasard.



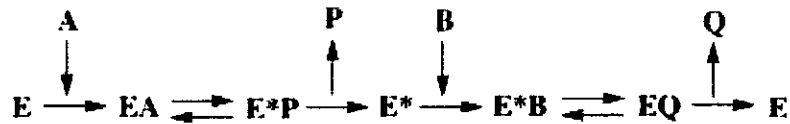
3- Réactions à double déplacements impliquant la formation d'un complexe binaire

3-1 Mécanisme Pin-Pong (appartient aux réactions ordonnées)

Certaines réactions du métabolisme impliquant deux substrats se produisent sans que la réaction nécessite la formation d'un complexe ternaire. C'est le cas de beaucoup de réaction de transfert de groupes qui mettent en jeu que la formation de complexes binaires.

Si la réaction enzymatique ne nécessite pas la formation d'un complexe ternaire, l'enzyme, après avoir fixé un des substrats, le transforme et libère le produit correspondant. L'enzyme ensuite fixe l'autre substrat, le transforme et libère le second produit. C'est le mécanisme ping-pong « mécanisme séquencé » qui se distingue des précédents par le fait qu'il intervient, entre

les étapes de fixation des deux substrats, une étape irréversible en absence des produits de la réaction.



Si on considère uniquement la réaction dans le sens de gauche à droite et on se place dans les conditions initiales qui permettent de négliger la réaction inverse, on aboutit à l'équation suivante :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]}} \qquad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} \right)$$

$\frac{1}{v}$ en fonction de $\left(\frac{1}{A}\right)$

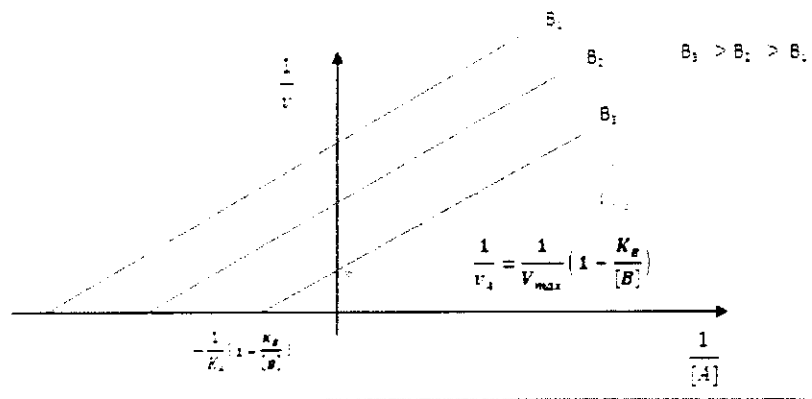


Figure 24. Représentation primaire $1/v$ f ($1/A$)

$\frac{1}{v}$ en fonction de $\left(\frac{1}{B}\right)$

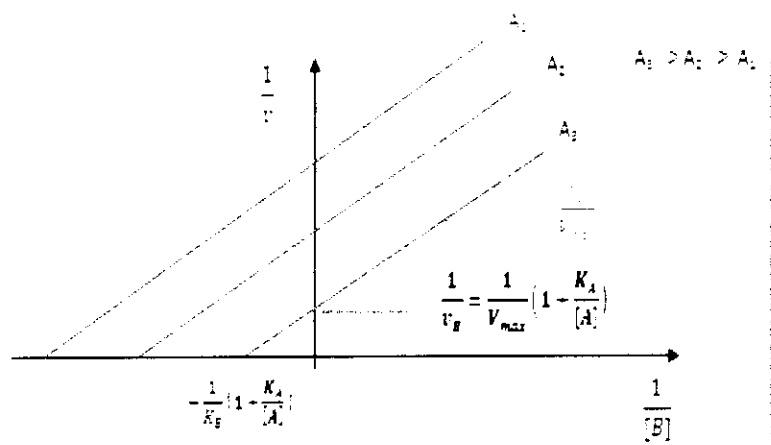
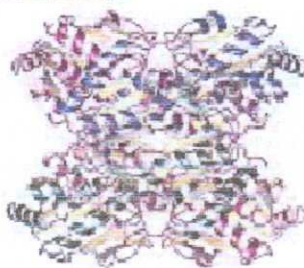


Figure 25. Représentation primaire $1/v$ f ($1/A$)

CHAPITRE IV

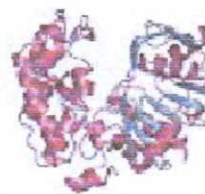
Fonctionnement et régulation des enzymes

Enzyme allostérique



Phosphofruktokinase (1F19)

Enzyme michaelisienne



Alcohol 3P DeH (7D3)

Fonctionnement et régulation des enzymes allostériques

1- Introduction

Les enzymes allostériques sont largement répandues dans la nature et elles tendent à occuper des positions clefs dans la régulation des voies métaboliques. Lorsqu'une protéine possède plusieurs sites de fixation pour un ligand, la saturation par ce ligand peut être Michaelienne ou non. Un comportement Michaelien est obtenu lorsque les sites sont équivalents et indépendants ; les enzymes allostériques se distinguent des autres enzymes « dits Michaeliens » par leur courbe $v_i=f(S)$ qui n'est pas une branche d'hyperbole équilatérale correspondant à l'équation de Michaelis–Menten, mais une courbe sigmoïde « en S » (Figure1).

En cinétique Michaelienne, quand (S) augmente, V augmente de moins en moins vite et plafonne à V_{max} . Tandis que, en cinétique allostérique, quand S augmente, V_i augmente d'abord de plus en plus vite jusqu'au point d'inflexion « correspondant à la K_M , appelé aussi $K_{0,5}$ puis de moins en moins vite et plafonne à V_{max} .

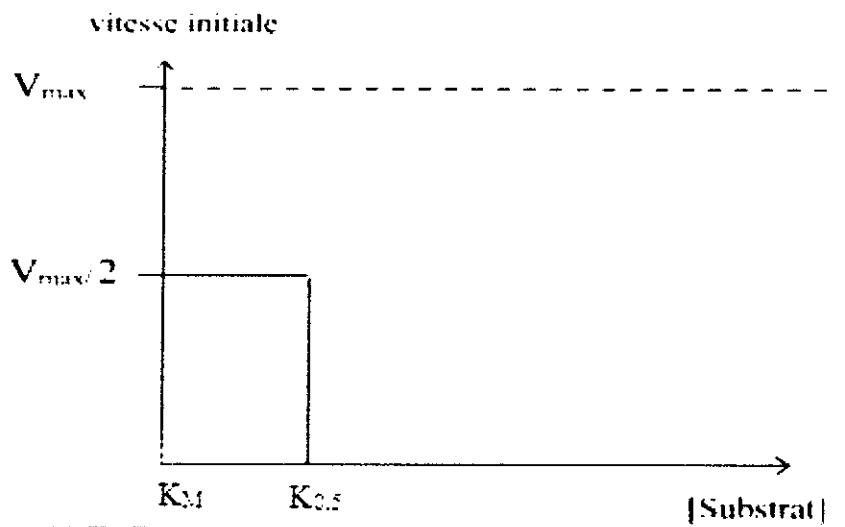


Figure 27. Comparaison d'une courbe hyperbolique et sigmoïde

2- Propriétés structurales

Les enzymes allostériques ont une structure quaternaire. Composées d'oligomères qui résultent de l'assemblage d'un nombre limité de protomères, associés de façon telle que la molécule présente au moins un centre de symétrie (nombre de S/U est toujours pair). Chaque sous-unité peut fixer une molécule de substrat. Les sous-unités sont reliées entre elles par des liaisons ioniques ou hydrogènes, et chaque sous-unité ou protomère d'une molécule

allostérique, porte un seul récepteur stéréospécifique complémentaire de chaque catégorie de ligand avec lequel l'enzyme établit des complexes réversibles.

L'enzyme allostérique peut prendre réversiblement plusieurs états conformationnels distincts, ces états diffèrent entre eux par:

Le nombre, la distribution, ou l'Energie des liaisons entre protomères.

Leur affinité à l'égard du ou des ligands stéréospécifique.

Les sous-unités sont reliées entre elles par des liaisons ioniques ou hydrogènes.

L'enzyme allostérique possède deux conformations extrêmes, qui diffèrent par leur structure tertiaire et quaternaire :

La conformation T « tense, tendue », à faible affinité pour le substrat.

La conformation R « relaxed, relâchée », à forte affinité pour le substrat.

3- Propriétés fonctionnelles

Les enzymes allostériques assurent la régulation des chaînes métaboliques. Cette faculté est due à la présence d'un site régulateur « en plus du site actif » qui réagit avec des modulateurs. Elles sont caractérisées par des comportements cinétiques différents de ceux des enzymes Michaeliennes.

Au départ, le terme d'allostérie a été utilisé pour expliquer une inhibition compétitive de certains enzymes par des molécules ne présentant pas ou peu de ressemblance au substrat initial. Dans l'inhibition compétitive classique, l'inhibiteur est un analogue structural du substrat et tend à occuper le même site que ce dernier. Il s'agit d'un inhibiteur isostérique (isostérie). Par contre un inhibiteur ne montrant pas une analogie structurale avec le substrat occupera un autre site sur l'enzyme. Il est qualifié d'inhibiteur allostérique « allostérie » ces différentes interactions permettent de concevoir l'existence de plusieurs forme d'enzyme et la présence de site allostérique et de site actif.

Pour pouvoir s'adapter aux changements métaboliques, l'organisme doit être capable de moduler l'activité enzymatique cellulaire. De cette manière, les enzymes peuvent coordonner les voies métaboliques, en réponse à l'environnement. Les deux moyens principaux sont :

3-1 Le contrôle de la quantité d'enzyme ; dans la cellule, la quantité de l'enzyme dépend à la fois du taux de sa synthèse et de sa dégradation. Chacune de ces taux est génétiquement contrôlée en réponse des conditions physiologiques changeantes.

Ex : La réponse au contrôle génétique de la concentration en enzyme n'est pas immédiate. Elle survient de quelques minutes chez les bactéries qui se développent rapidement, ou de quelques heures chez les eucaryotes supérieurs. Exp : chez E.coli induction de la biosynthèse de la β galactosidase en présence de lactose et répression en absence de lactose

3-2 Le contrôle de l'activité enzymatique

3-2-1 Régulation par modification covalente : l'activité enzymatique peut être réglé par la liaison covalente d'un groupement phosphate ou l'élimination de ce groupement, donc ces enzymes existe sous deux formes interconvertibles : forme phosphorylée et forme déphosphorylée certaines enzymes sont active sous forme phosphorylée d'autre sont actives sous forme déphosphorylées. **La phosphorylation** (sur un residu ser, thr,tyr) est catalysée par des **protéines kinases**. **La déphosphorylation** est catalysé par **des protéines phosphatases**.

Les phosphatases et les kinases sont soumises indirectement à un contrôle hormonal. Ex : Glycogène synthétase est activée par phosphorylation et inactivée par déphosphorylation La glycogène phosphorylase est activée par déphosphorylation et inhibée par phosphorylation. Les changements de concentration en AMP et ATP sont les principaux régulateurs de l'activité l'AMPK. Cette enzyme est régulée de façon allostérique par l'AMP et inhibée par l'ATP par compétition pour un même site de fixation sur la sous-unité régulatrice γ de l'AMPK (point 1). La liaison de l'AMP favorise la phosphorylation de la sous-unité catalytique α par les AMPK kinases (LKB1 et CaMKK β) (point 2), essentielle pour assurer l'activation de l'AMPK, et empêche également sa déphosphorylation par les protéines phosphatases (point 3). C'est l'augmentation du rapport AMP/ATP qui détermine l'activation de l'AMPK en réponse aux épisodes de stress énergétique comme l'absence de glucose, l'exercice physique, l'ischémie ou l'hypoxie. Lorsque la balance énergétique cellulaire est perturbée, les rapports ATP/ADP et ATP/AMP sont alors automatiquement modifiés par l'intervention de l'adénylate kinase (point 4). Une fois activée, l'AMPK favorise les réactions métaboliques génératrices d'ATP et réduit les voies anaboliques consommatrices d'ATP.

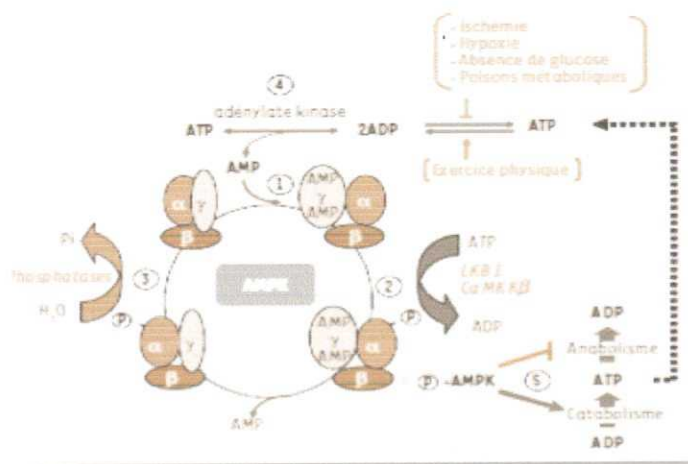


Figure 28. Régulation et activation de l'AMPK

3-2-2 Régulation par changement conformationnel : L'enzyme peut être inhibée ou activée par des interactions non covalentes avec de petites molécules régulatrices dites effecteurs allostériques (activateur ou inhibiteur), cette régulation est dite **allostérique** car l'activateur ou l'inhibiteur se lie à l'enzyme sur un autre site différent du site actif (du grec allos=autre). La fixation de ces effecteurs sur le site allostérique provoque une légère modification de la conformation de l'enzyme au niveau du site actif ce qui entraîne une augmentation ou diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

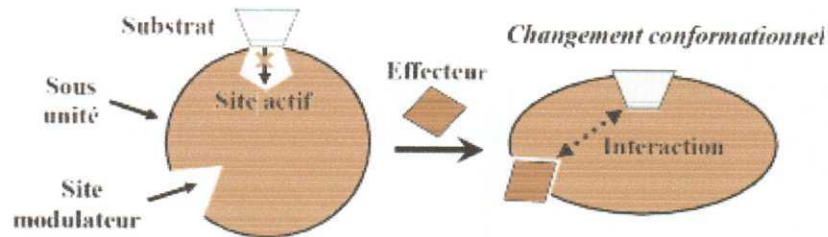


Figure 29. Changement conformationnel de l'enzyme allostérique

Dans la régulation allostérique l'activateur est généralement un métabolite en amont de la réaction ou le substrat lui-même, l'inhibiteur est généralement un métabolite en aval de la réaction ou le produit lui-même, l'inhibition par le produit final d'une voie métabolique est appelé *retroinhibition* (feed back). Les enzymes allostériques possèdent généralement deux à plusieurs sous unités, il existe au moins un site de fixation de substrat et un site de fixation d'effecteur allostérique.

Ex : Régulation allostérique de l'ATCase d'E.coli L'Aspartate carbamoyle transferase (aspartate transcarbamoylase) catalyse le transfert d'un résidu carbamoyle du carbamoyle phosphate sur le groupement aminé de L-aspartate pour donner le N carbamoyle –L-aspartate qui est le précurseur des bases pyrimidiques. L'ATCase est inhibée par le produit final de la voie métabolique le CTP (inhibiteur allostérique), elle est activée par l'ATP (activateur allostérique) . *Lorsque la vitesse de synthèse de CTP dépasse sa vitesse d'utilisation par les cellules, l'excès de CTP qui en résulte inhibe l'ATCase qui à son tour réduit la vitesse de synthèse de CTP (Retroinhibition).

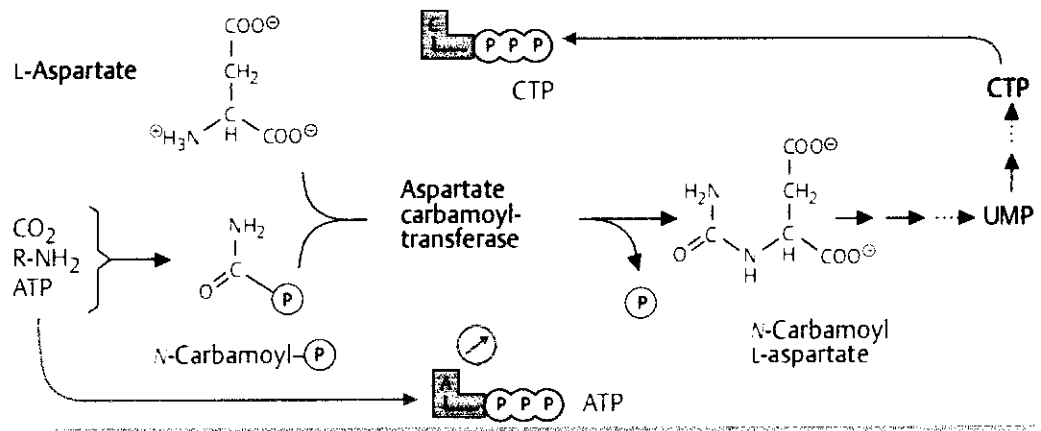


Figure 30. Réaction catalysée par l'aspartate transcarbamoylase

Inversement, si la concentration intracellulaire de CTP est abaissée, le CTP se dissocie de l'ATC^{asc} et lève l'inhibition de l'enzyme.

L'activation de l'ATC^{asc} par l'ATP permet de coordonner la vitesse de synthèse de nucléotides puriques et pyrimidiques pour la biosynthèse des acides nucléiques (si la concentration en CTP et en ATP sont déséquilibrée en faveur d'ATP. l'ATC^{asc} est activée par l'ATP pour la synthèse des pyrimidines jusqu'à ce que l'équilibre soit rétabli). Par contre si la concentration de CTP est supérieure à celle de l'ATP, l'inhibition de l'ATC^{asc} par le CTP permet à la biosynthèse des purines de rétablir l'équilibre entre les bases puriques et pyrimidiques.

L'ATCase d'E.coli est formée de 12 sous unités ; 6 sous unités catalytiques organisées en 2 série de trimères et 6 sous unités régulatrices organisées en 3 série de dimères (2C3 + 3R2).

Les trimères catalytiques sont attachés par les dimères de régulation, Chaque sous unité catalytique contient deux domaines celui de l'aspartate et de carbamoyl phosphate. Les effecteurs allostériques CTP et ATP se fixent sur le même site allostérique au niveau des sous unités régulatrices.

La fixation de ces effecteurs sur le site allostérique entraîne des modifications conformationnelles dans les sous unités régulatrices et en conséquence dans les sous unités catalytiques et leurs sites actifs.

La fixation de l'ATP sur les sous unités régulatrices provoque une séparation des trimères catalytiques (0,4 Å°) et le rapprochement des deux domaines des sous unités catalytique ce qui permet la fixation des substrats et la formation de produit .par contre ,La fixation de CTP sur les sous unités régulatrice cause un rapprochement des trimères catalytiques ce qui empêche la catalyse.

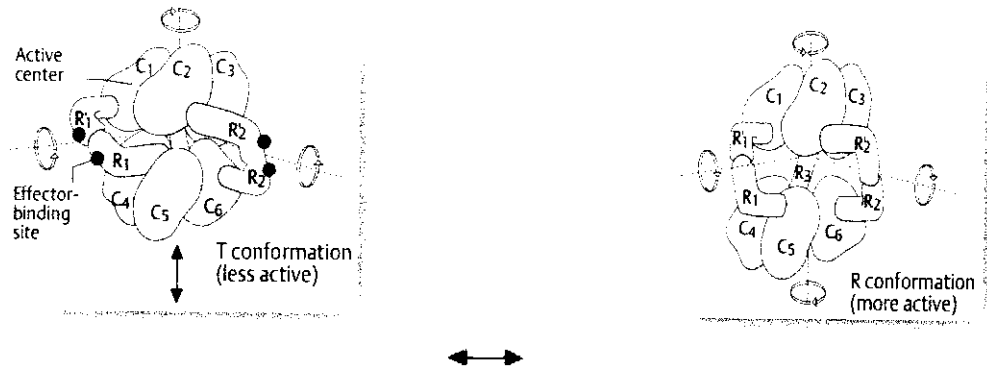


Figure 31. Le changement conformationnel de l'ATCase

3- Détermination des constantes cinétiques

La cinétique des enzymes allostériques n'est pas Michaëlienne. La liaison au site allostérique modifie l'activité de l'enzyme, ce qu'on appelle la liaison coopérative. Les enzymes allostériques affichent un tracé sigmoïdal $V_i=f[S]$. Bien que l'équation de référence de Michaelis-Menten ne s'applique pas ici, K_M et V_{max} peuvent être estimés et servir à caractériser l'activité enzymatique.

Les enzymes allostériques présentent la propriété de répondre aux changements de concentration des métabolites, ils déterminent ainsi la vitesse globale d'une voie métabolique en fonction des besoins des cellules en énergie (ATP) et en métabolites.

L'augmentation de la concentration du substrat entraîne une augmentation de la proportion des molécules d'enzyme en configuration R.

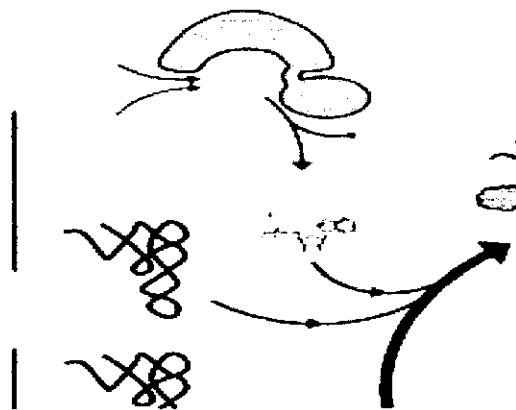
Les enzymes allostériques ont deux structures quaternaires possibles :

- La conformation inactive est appelée T (Tendue) car les liaisons interprotomériques y sont fortes. L'état T a une activité catalytique plus faible et une faible affinité pour le substrat. Il fixe le(s) inhibiteur(s). Lorsqu'il y a peu de substrat, l'enzyme reste sous forme T
- La conformation active est appelée R (Relâchée) car les liaisons interprotomériques y sont faibles. L'état R a une activité plus forte et une forte affinité pour le substrat. Il fixe le(s) substrat(s) et le(s) activateur(s). Lorsqu'il y a beaucoup de substrat, l'enzyme passe à la forme R.

L'occupation d'un seul des sites actifs par un substrat suffit à modifier légèrement la conformation spatiale de l'enzyme, les protomères vont alors prendre la forme R, ce qui conduit à une augmentation globale de l'activité enzymatique. Cette propriété est appelée coopérativité, parce que les sous-unités coopèrent les unes avec les autres, c'est-à-dire le fait que la fixation de la première molécule de substrat facilite la fixation du second substrat, qui elle-même facilite la troisième, etc...

CHAPITRE V

Mécanisme de la catalyse



Mécanisme de la catalyse

I- Introduction

Les progrès réalisés au début du XXe siècle dans la connaissance de la nature et de la structure des protéines, ont progressivement conduit au développement de la notion de **site actif**.

En 1904, **E.F. ARMSTRONG** a proposé la première représentation d'un substrat se fixant à la surface d'un enzyme. Aujourd'hui, on définit un **site actif**, ou site catalytique, la zone de l'enzyme dans laquelle le substrat est lié à être catalysé. De manière générale, le site actif a une taille restreinte par rapport à la taille globale de la protéine, il est défini dans les trois dimensions et est souvent localisé dans une crevasse caractérisée par un micro-environnement spécifique. C'est l'arrangement des atomes constituant le site actif qui va déterminer la spécificité d'action de l'enzyme et la sélection précise du substrat, la molécule de substrat devant s'adapter à la forme et aux propriétés de fixation de ce site actif.

La structure tridimensionnelle de ceci détermine la spécificité des enzymes. Au sein du centre actif, certains acides aminés interviennent dans la liaison du substrat à l'enzyme et sont appelés résidus de liaison, tandis que ceux qui participent activement à la transformation chimique du substrat sont appelés résidus catalytiques.

Toutefois, le concept de centre actif est resté longtemps assez mal défini. Pour **KOSHLAND**, le centre actif est constitué par tous les atomes de l'enzyme qui sont en contact délimité par le rayon de **VAN DER WAALS** avec les atomes du substrat, c'est-à-dire ceux qui restent à une distance minimale telle que les couches électroniques ne soient pas perturbées. **KOSHLAND** distingue ainsi les résidus de contact et les résidus auxiliaires, ces derniers pouvant jouer un rôle dans l'activité enzymatique.

Fisher (1894) a déclaré : "le substrat s'adapte au centre actif ou catalytique d'une enzyme comme une clé d'une serrure". Cependant, des études ultérieures ont confirmé que le site actif est beaucoup plus polyvalent et dynamique que le "trou" d'une serrure.

2- Topologie et identification des centres actifs.

Pour la plupart des enzymes, il existe une disproportion entre la taille de la molécule enzymatique et la taille du substrat. Une telle constatation a conduit très tôt à la notion de centre actif, du fait qu'une proportion très faible de la surface de l'enzyme entre en contact avec le substrat.

Une telle conception reste cependant insuffisante. Elle est purement spatiale et ne tient pas compte de l'aspect fonctionnel. En effet, les résidus de l'enzyme qui entrent en contact avec le

substrat peuvent avoir des rôles très divers, soit qu'ils interviennent dans la fixation du substrat, soit qu'ils participent directement à la catalyse.

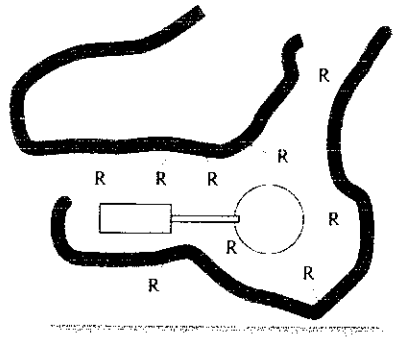


Figure 32. Représentation schématique du centre actif d'un enzyme avec les différents résidus R qui interagissent avec le substrat

Certains enfin ne jouent aucun rôle, présents au centre actif par suite de l'enchaînement séquentiel ils n'ont d'influence directe ni sur l'association enzyme-substrat, ni sur la catalyse. Leur modification ou leur remplacement par d'autres acides aminés lorsque l'on passe d'une espèce à une autre par exemple ou lorsqu'on les remplace par mutagenèse dirigée, ne change pas l'activité.

Un **site actif**, ou site catalytique, est la zone de l'enzyme dans laquelle le substrat est lié à être catalysé. La réaction spécifique qu'une enzyme contrôle dépend d'une zone de sa structure tertiaire. Le site actif ne peut contenir que certaines molécules du substrat où la catalyse a lieu. La structure tridimensionnelle de ceci détermine la spécificité des enzymes. Au sein du centre actif, certains acides aminés interviennent dans la liaison du substrat à l'enzyme et sont appelés résidus de liaison, tandis que ceux qui participent activement à la transformation chimique du substrat sont appelés résidus catalytiques.

Pour décrire avec précision le mécanisme d'action des enzymes il est nécessaire de connaître sa structure tridimensionnelle, c'est le cas de tous les protéines mais il est de plus lié la structure à l'activité enzymatique. Comme il est difficile d'obtenir la structure des protéines par cristallographie et diffraction des rayons X, l'étude des sites actifs des enzymes est réalisée par des méthodes indirectes, soit en modifiant par voie chimique ou génétique certains acides aminés, soit on utilise pour substrat des analogues variés.

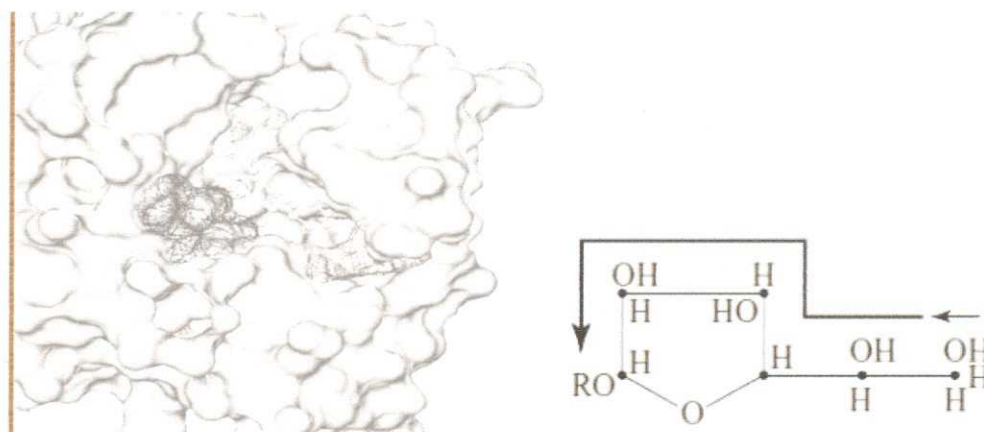


Figure 32. Représentation du site actif des enzymes

Le second modèle, proposé ultérieurement par **KOSHLAND**, implique un changement de conformation du site actif de l'enzyme lors de la fixation du substrat.

Ce modèle est connu sous le nom d'ajustement induit (induced-fit) et est illustré dans la figure 3.5. Ce modèle implique que l'enzyme sélectionne spécifiquement son substrat, non sur la base d'une complémentarité statique entre l'enzyme et le substrat, mais en agissant comme des « pinces » qui se renferment pour piéger le substrat. L'enzyme devient actif uniquement dans sa forme fermée impliquant une régulation de l'activité par la fixation du substrat.

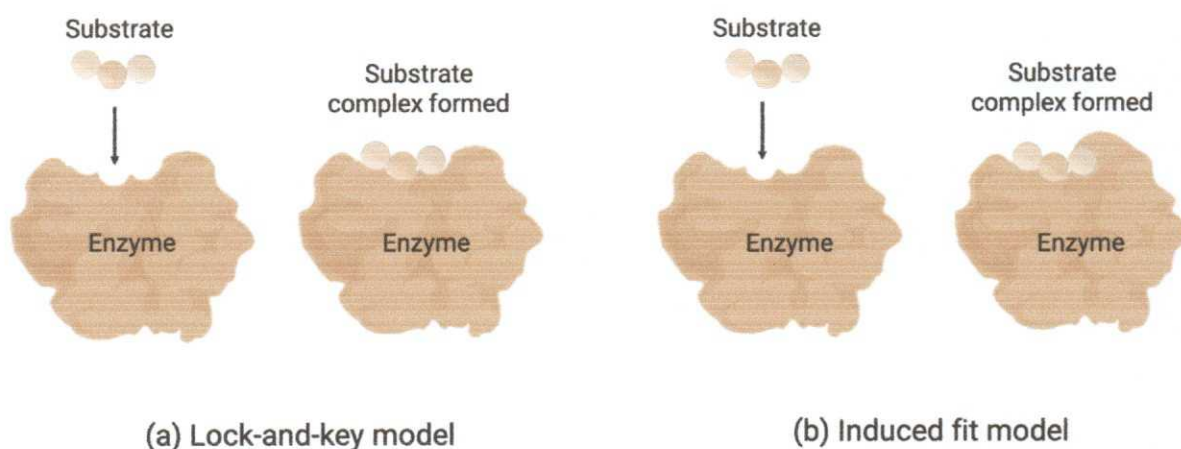


Figure 33. (a) Selon le modèle clé-serrure, la forme du site actif d'une enzyme est parfaitement ajustée au substrat. (b) Selon le modèle d'ajustement induit, le site actif est quelque peu flexible et peut changer de forme afin de se lier au substrat.

Le « meilleur ajustement » résulte de la forme et de l'attrait du groupe fonctionnel des acides aminés pour le substrat. Il existe une enzyme spécifiquement adaptée à chaque substrat et donc à chaque réaction chimique ; cependant, il y a également de la flexibilité.

Le fait que les sites actifs soient parfaitement adaptés à des conditions environnementales spécifiques signifie également qu'ils sont soumis aux influences de l'environnement local. Il est vrai que l'augmentation de la **température** ambiante augmente généralement les vitesses

de réaction, catalysées par des enzymes ou non. Cependant, l'augmentation ou la diminution de la température en dehors d'une *plage optimale* peut affecter les liaisons chimiques au sein du site actif de telle sorte qu'elles sont moins bien adaptées pour lier les substrats. Les températures élevées finiront par provoquer la dénaturation des enzymes, comme les autres molécules biologiques. De même, le **pH** de l'environnement local peut également affecter la fonction enzymatique. Les résidus d'acides aminés du site actif possèdent leurs propres propriétés *acides* ou *basiques* qui sont optimales pour la catalyse. Ces résidus sont sensibles aux variations du **pH** qui peuvent altérer la façon dont les molécules du substrat se lient. Les enzymes sont adaptées pour fonctionner au mieux dans une certaine plage de pH et, comme pour la température, les valeurs extrêmes du pH (acide ou basique) de l'environnement peuvent provoquer la dénaturation des enzymes.

Le site actif « représentant environ 5% de la surface totale de l'enzyme » apparaît alors sous la forme d'une petite cavité de la protéine enzyme. Cette cavité est définie par des replis de la chaîne polypeptidique de l'enzyme qui rapprochent des acides aminés souvent éloignés le long de la séquence d'acides aminés. Ce repli présente sur la face interne de la cavité (souvent à dominante hydrophobe) des radicaux latéraux d'acides aminés (OH, NH ou NH₂, protons échangeables) dans une disposition caractéristique. Deux à dix aminoacides seulement, regroupés dans une zone hydrophobe interne de la molécule, participent à l'activité catalytique. Les plus rencontrés sont His, Ser, Cys, Lys, Tyr. Ce sont des acides aminés polaires dotés de doublets électroniques libres, possédant ainsi une activité nucléophile (N, O, S ...). Les atomes ou radicaux du substrat interagissent avec les atomes et radicaux du site actif par le biais de liaisons faibles en énergie, liaisons hydrogène, de Van der Waals, interactions électrostatiques, interactions hydrophobes, etc., dont l'ensemble va définir une constante d'association. Le plus souvent, un groupement réactif de l'enzyme, ou bien exogène, est orienté vers le point précis du substrat où va être opérée la modification chimique catalysée. C'est à travers cette interaction complexe entre radicaux réactifs du site actif de l'enzyme et positionnement dans l'espace de la liaison à modifier du substrat qu'est stabilisé le complexe ES, que l'état de transition devient manifeste, que l'énergie d'activation est suffisamment abaissée pour que la réaction ait lieu et qu'enfin le produit (P), le substrat modifié et l'enzyme inchangée soient libérés.

1-1 Analyse cristallographique par diffraction des rayons X

Le principe et d'analysé de diffraction obtenu au moyen du bombardement par un faisceau de rayon X, de cristaux d'enzyme. Une des difficultés de la technique est d'obtenir la formation de cristaux a partir d'une solution concentré d'enzyme il existe de méthode générale de

crystallisation toute fois on cherche de part d'une solution protéine on provoque lentement la cristallisation :

La diffusion en phase gazeuse, La dialyse en solution

Le réseau cristallin est bombardé des rayons X monochromatique, le motif cristallin agit comme un réseau de diffraction tridimensionnelle chaque fois que les rayons X rencontre les électrons des atomes.

La structure de cristal, enzyme, ou le plus exactement la distribution de sa densité électronique peut être calculé à partir du diagramme de diffraction.

Cette méthode souffre de deux limitations principales :

Technique délicate nécessite une grande patience et le soutien d'une importante logistique pour l'analyse des spectres. La cristallographie des enzymes n'est pas à ce jour très simple à réaliser il est parfois difficile voire impossible d'obtenir des cristaux stable.

2-2 Les modifications chimiques des enzymes

2-2-1 Généralité :

Le principe de cette approche est de faire agir un réactif avec l'enzyme de façon à conduire à une modification covalente au niveau de la chaîne latérale d'un ou plusieurs acides aminés.

L'idéal est d'utiliser un réactif suffisamment spécifique pour un acide aminé donné, si ce dernier appartient au site actif on peut s'attendre alors à ce que l'activité enzymatique diminue à mesure de la modification et l'analyse cinétique de la variation d'activité peut alors apporter des éléments d'information.

Pour compenser le manque de spécificité des réactifs, des marqueurs d'affinité ont été conçus, ce sont des analogues de ligand spécifique qui peuvent se fixer par des liaisons covalentes. L'inconvénient de cette méthode est qu'il faut pratiquement concevoir un réactif pour chaque enzyme ou classe d'enzyme.

2-2-2 Les réactifs spécifiques des groupements fonctionnels de la chaîne latérale des acides aminés

La réactivité des chaînes latérales dépend de leur caractère nucléophile, celui-ci est influencé par les conditions expérimentales et spécialement le pH.

Liste des réactifs couramment employés pour la modification des résidus

Acide aminé	réactifs
Asp, Glu	Cardodimides, réactifs de Woodward (N-éthyle-5-phényloxagluim-3-sulfonate)
Agr	Butanedione, phénylglyoxale
Lys	Trinitrobenzènesulfonate, carbamylation, paracyanate
His	Diéthylpynocarbonate

Cys	Iodoacetate
Tyr	tetranitromethan
Ser	Diisopylfluorophosphate
Trp	N-bromosuccinide

2-2-3 Aspect cinétique de la modification chimique d'enzyme

Le principe est de suivre en fonction du temps la modification de l'enzyme à l'aide d'un paramètre physicochimique ou à l'aide d'une mesure d'activité

2-2-4 Marqueur d'affinité :

Ce sont des molécules qui associe la spécificité lie à la reconnaissance enzyme-ligand et la modification chimique due à la formation ultérieure d'une liaison covalente généralement par alkylation, arylation. C'est cette liaison qui les différencie des inhibiteurs réversibles.

Exemple : le Tosyl-L-phenylalanine chromethylcétone (**TPCK**) réagit avec la chymotrypsine au niveau d'une histidine du site actif entraînant une inhibition irréversible de l'enzyme, l'analyse de l'inactivation montre que le **TPCK** agit comme un marqueur d'affinité.

Pour connaître l'importance d'un acide aminé au niveau de la structure et/ou de la fonction de l'enzyme on peut envisager de le remplacer par un autre acide aminé et ensuite d'évaluer l'effet de mutation.

Le concept semble a priori simple mais la réalisation est plus complexe, puisque il faut effectuer un changement très localisé dans la séquence peptidique, une telle approche a été réalisée grâce au développement en 1984 par **M. J. Zoller** et **M. Smith** de la mutagenèse dirigée, en provoquant un changement au niveau du gène non pas au niveau de protéines. Il suffit alors d'évaluer l'effet de la mutation sur les propriétés structurales et/ou biologiques pour savoir si l'acide aminé initial joue un rôle important dans la structure non mutée.

Exemple : pour la tyrosyl-ARNt-synthase de nombreuses mutations ont été réalisées et l'activité enzymatique correspondante mesurée.

enzyme	Efficacité K_{cat}/K_m (mole/sec)
Enzyme non muté	8400
His 45→Gly45	1140
His45→Asn45	3
Thr51→Ala51	15900
Thr51→Pro51	208000

2-2-5 Les méthodes spectroscopiques

Ces techniques permettent d'obtenir des renseignements sur le changement conformationnel qui se sont induits globalement soit sur un site spécifique, les informations sur la conformation globale, ainsi que sur leur modification, peuvent être obtenus par des mesures de fluorescence par dichroïsme circulaire ou par spectrophotométrie RMN.

3- Fonctionnement du Coenzyme.

Molécule biologique intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction, il est soit synthétisé par l'organisme (molécule organique) ou apporté par l'alimentation (vitamine), il peut être:

✓ *Libre* : se dissocie de l'enzyme à la fin de chaque réaction.

- il est lié à l'enzyme par des liaisons faibles (type électrostatique).

- la concentration du coenzyme est du même ordre de grandeur que celle du substrat : *stoechiométrie*.

✓ *Lié* : ne se dissocie pas de l'enzyme.

- il est lié à l'enzyme par des liaisons fortes (type covalent).

- sa concentration est la même que celle de l'enzyme (faible).

- il est dit groupement prosthétique.

Les coenzymes sont des molécules organiques particulières, pouvant inclure des ions métalliques (Fe^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+}), ayant pour spécificité de servir de cofacteurs à certaines enzymes, en participant obligatoirement à la réaction catalytique en formant un complexe de coordination avec le substrat.

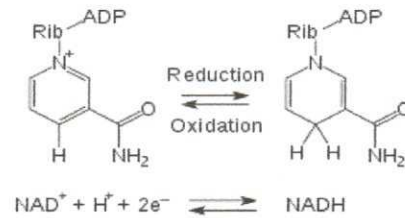
Un cofacteur est un composant non protéique, thermostable et de faible masse moléculaire, nécessaire à l'action d'une enzyme. Le cofacteur se lie à une structure protéique, appelée apoenzyme, et le complexe apoenzyme-cofacteur est appelé holoenzyme.

Les cofacteurs sont fondamentalement de deux types, les ions métalliques et les molécules organiques, appelées coenzymes. Les enzymes qui nécessitent des ions métalliques sont parfois appelées

Les coenzymes, sont généralement des vitamines (vitamines B, vitamine C, vitamine D, par exemple), une carence en vitamines dans un organisme, provoque une carence en enzymes et donc un manque de réactions essentielles.

Exemple ; NAD^+ est un transporteur d'électrons dans les réactions redox. NAD^+ est capable d'accepter un proton (H^+) et deux électrons d'un substrat, pour former le NADH. Le NADH est capable de faire don de ces électrons à un second substrat, en se régénérant lui-même en

NAD^+ . Par conséquent, NAD^+ est capable de transférer des électrons du premier substrat (qui devient oxydé) au second (qui devient réduit).



Un autre exemple est la coenzyme A (CoA), qui, sous forme libre ou acétylée, participe à plusieurs étapes du cycle de l'acide citrique et du métabolisme des acides gras. De même, dans le cycle de l'acide citrique, mais aussi dans la glycolyse, les coenzymes flavine adénine dinucléotide (FAD) et nicotine-ammide-adénine-dinucléotide (NAD), jouent un rôle d'abord comme accepteurs d'électrons puis comme accepteurs de protons ou donneurs de protons. D'autres coenzymes, telles que l'adénosine triphosphate (ATP), transportent des groupes entiers, par exemple des résidus de phosphate.

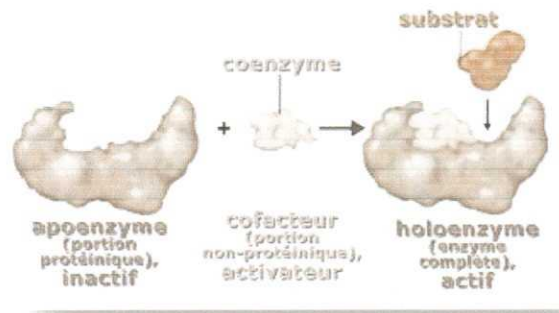


Figure 34. Coenzyme A (CoA)

4- Activation des zymogènes.

On appelle zymogène le précurseur inactif d'une enzyme activée par protéolyse. La plupart des protéases sont synthétisées sous forme de zymogènes. L'élimination post sécrétoire, de certains Acides Aminés, transforme les zymogènes inactifs en enzymes actives.

Le facteur VII est une glycoprotéine synthétisée par le foie, zymogène d'une sérine protéase. C'est un facteur de coagulation, Vitamine K-dépendant.

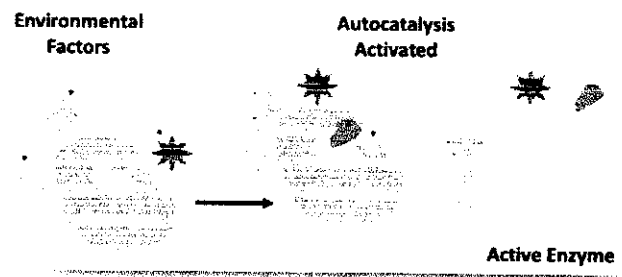


Figure 35. Activation du Zymogène

5- Mécanismes d'action des sérines protéases.

Les protéases ont un rôle dans de nombreux processus physiologiques (coagulation, immunité, cicatrisation) mais aussi pathologique (MICI, pancréatite, cancer...). Les protéases hydrolysent des liaisons peptidiques à l'intérieur de la protéine (endopeptidase) ou clivent les liaisons présentes aux extrémités de la protéine (exopeptidase). Les protéases présentent un site actif permettant un clivage protéique spécifique de liaisons peptidiques. Cette spécificité de substrat ainsi que l'ensemble des liaisons se formant entre la protéase et son substrat définissent la spécificité de la protéase. Chez les mammifères, il existe 4 grandes classes de protéases : les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases à aspartate et les métalloprotéines.

Les protéases à sérine se caractérisent par la présence de 3 acides aminés conservés dans leur site catalytique : une sérine, une histidine et un acide aspartique qui forment la triade catalytique. La nature des résidus présents dans la poche catalytique ainsi que leur taille va permettre de classer ces protéases à sérine. Les protéases sont produites par de nombreux types cellulaires et sont impliquées dans la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires comme les MICI ou encore dans le SCI.

Ces enzymes sont caractérisées par la présence d'une triade catalytique composée des chaînes latérales de trois acides aminés : His 57, Asp 102 et Ser 195. Ces résidus sont en interaction et forment un relai de charge qui rend nucléophile la sérine du site actif et permet l'attaque du groupe carbonyle de la liaison peptidique à hydrolyser. L'une des protéases à sérine les plus étudiées est la trypsine, dont le mécanisme a été particulièrement bien analysé.

Les protéases à sérine sont des enzymes qui utilisent les deux types de catalyse : la sérine 195 sert de catalyseur par covalence avec un carbone de la liaison peptidique qui va être clivée et l'histidine 57 sert de catalyseur acide-base. On estime que les acides aminés mis en jeu dans la catalyse acide - base accélèrent de 10 à 100 fois les réactions enzymatiques par rapport à la vitesse de la même réaction non catalysée par une enzyme. L'accélération par la catalyse

covalente est du même ordre de grandeur. Bien qu'importants, ces deux facteurs sont loin de rendre compte des facteurs d'accélération couramment observés avec les enzymes (10^7 à 10^{17}).

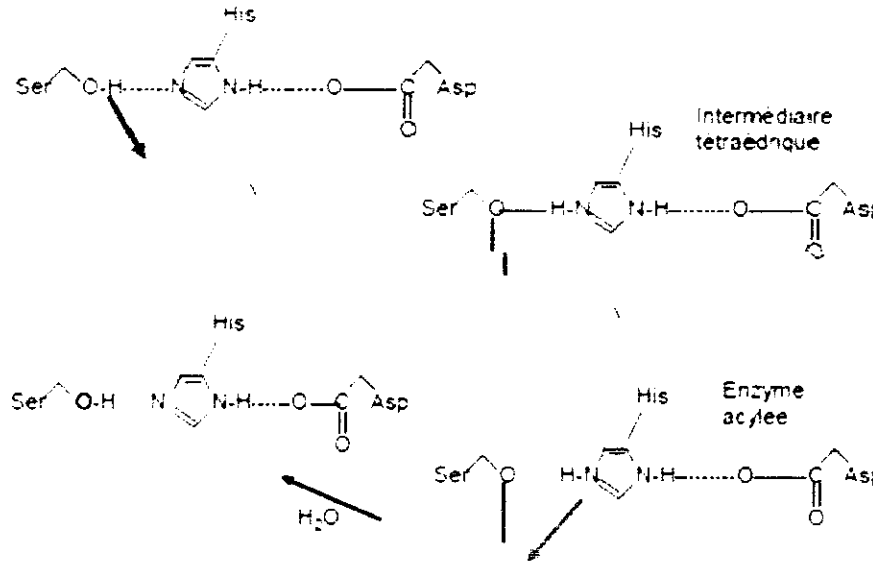


Figure 36. Mécanisme catalytique de la protéase à Sérine

6- Mécanisme d'action des pyridoxal transférases.

Le pyridoxal phosphate est la coenzyme de nombreuses enzymes intervenant dans le métabolisme des acides aminés : transaminases, décarboxylases, racémases, désulfhydrases des acides aminés soufrés. Les différentes transformations impliquent une combinaison préalable, sous forme de base de Schiff, de l'acide aminé avec le groupe carbonyle du pyridoxal phosphate.

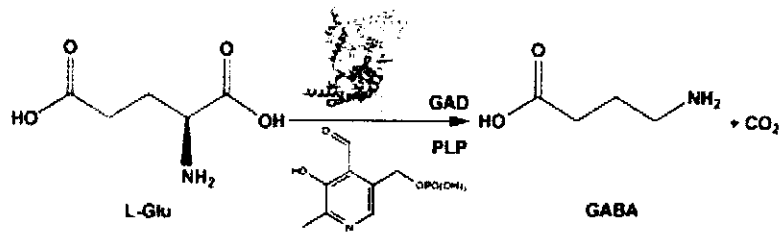
La carence en vitamine B₆ provoque chez l'animal, après ingestion de tryptophane, une excrétion d'acide xanthurénique, de cynurénine et de ses dérivés. En effet, le phosphate de pyridoxal intervient dans la transformation du tryptophane en dérivés nicotiniques ; il est la coenzyme de la cynuréninase qui catalyse la réaction :

3-hydroxycynurénine \rightarrow acide 3-hydroxyanthranilique, précurseur de l'acide nicotinique dont l'amide est la vitamine PP.

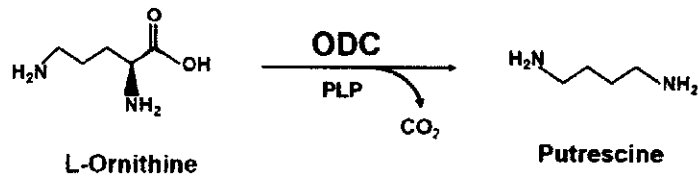
Les réactions catalysées par la vitamine B₆ sont nombreuses :

Décarboxylations ;

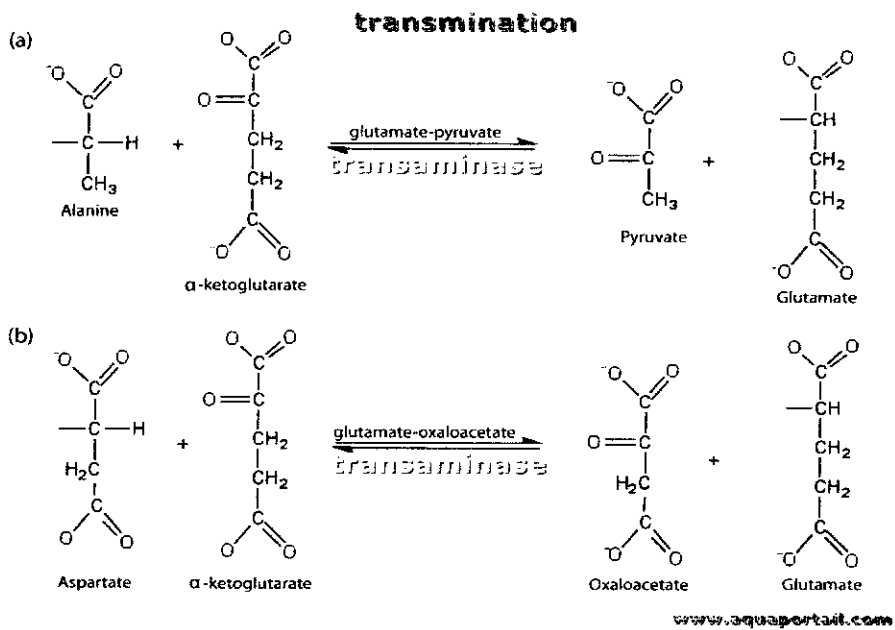
Décarboxylation de l'acide glutamique en GABA :



Décarboxylation de l'ornithine en putrescine :



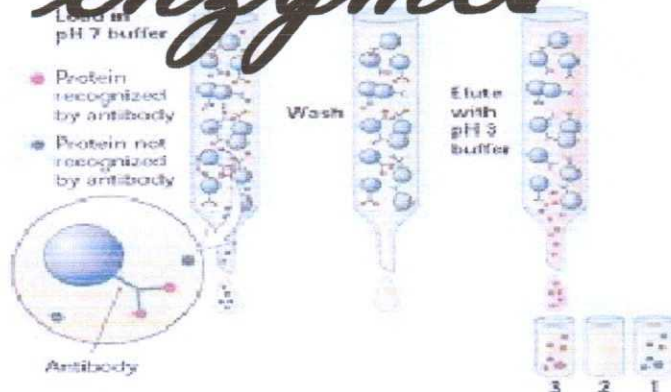
Transaminations



CHAPITRE VI

Isolément et purification des

enzymes



Isolement et purification des enzymes

1- Origine des enzymes

Les enzymes peuvent être extraites de n'importe quel organisme vivant : des bactéries aux champignons, des plantes aux animaux. Parmi toutes les enzymes utilisées industriellement, plus de la moitié proviennent de champignons ou de levures, environ un tiers sont d'origine bactérienne et ce qui reste se divise entre les sources animales (8 %) ou végétales (4 %).

La très grande majorité des enzymes utilisées dans l'industrie provient donc de la culture de micro-organismes pour diverses raisons : faible coût de production, teneur en enzyme mieux contrôlable, composition des extraits connue et constante....

1-1 Origine animale

Les protéases aspartiques gastriques sont des enzymes protéolytiques retrouvées chez pratiquement tous les organismes vivants. Au niveau du tube digestif, elles sont responsables de la digestion des protéines alimentaires par hydrolyse des liaisons peptidiques. Elles sont sécrétées sous formes inactives appelées «proenzymes » ou «zymogènes ». Une fois dans la lumière du tube digestif, elles deviennent actives sous l'action de l'acide gastrique ; l'enzyme active agit ainsi directement sur les liaisons peptidiques des protéines.

La prochymosine bovine est aussi extraite à partir de caillette de veau et est convertie en chymosine active en milieu acide. La chymosine est employée comme agent de coagulation du lait dans la fabrication de fromage (présure). En effet, cette enzyme possède des capacités coagulantes très élevées envers les caséines du lait (surtout sur la kappa (k)-caséine). La prédisposition des caséines du lait à la coagulation est fonction de leur composition en phosphate. Les caséines Alpha S1, Alpha S2 et Beta sont fortement phosphorylées, elles se lient facilement aux ions calcium facilitant ainsi leur coagulation spontanée.

1-2 origines microbiennes

Certaines enzymes alimentaires peuvent être produites dans un fermenteur où sont cultivées des bactéries, des levures ou de moisissures productrices d'enzymes, ensuite un processus de filtration permet de séparer les enzymes alimentaires des microorganismes.

De multiples espèces de bactéries ont été étudiées notamment dans les genres **Bacillus** et **Pseudomonas** tels que *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans*. Les résultats ont été en général décevants en raison de l'activité protéolytique généralement très élevée de ces protéases par rapport à celle de la présure. La protéase de *Bacillus cereus* dégradait rapidement la caséine entière. Du cheddar préparé par la protéase de

Bacillus subtilis présentait une saveur acceptable, cependant, le rendement était très faible suite à une protéolyse excessive.

Protéases d'origine fongique, trois genres de moisissures; *Cryphonectria parasitica*, *Rhizomucor pusillus* et *Rhizomucor Miehei*.

1-3 Protéases d'origine végétale

Il existe plusieurs préparations coagulantes (coagulation du lait) provenant du règne végétal. Elles sont extraites par macération de divers organes de plantes supérieures. Parmi les espèces connues on peut citer le gaillet, l'artichaut, le chardon qui ont été utilisés jadis dans des fabrications de fromages fermiers au Portugal et en Espagne.

D'autres extraits coagulants ont été obtenus à partir de plantes tropicales ; les plus connus sont la ficine extraite du latex de figuiers : *ficus genius*, *ficus glabatra*, ou *ficus carica*. Cette enzyme est utilisée dans l'industrie alimentaire, dans l'industrie textile, en pharmacologie, en cosmétologie et en immuno-hématologie pour la recherche d'anticorps irréguliers. Lorsqu'on utilise des figues fraîches avec des produits laitiers, il faut les consommer rapidement car la ficine peut rendre amers les plats à base de produits laitiers; extraite du latex de figuier, la papaïne ; extraite des feuilles de papayer, la bromélaïne ; extraite de l'ananas. Ces protéases contrairement aux autres enzymes coagulants appartiennent au groupe de protéases sulphydryls. D'une manière générale, ces diverses préparations végétales ont donné des résultats assez décevants en fromagerie car elles possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée qui induit des pertes dans le rendement fromager et le développement de goût amer au cours de l'affinage. Ces difficultés résultent de la composition particulière de ces extraits, qui renferment des enzymes à site actif peu spécifique et /ou des systèmes enzymatiques dont il est difficile de maîtriser l'activité.

2- Isolement et purification des enzymes

La purification des enzymes est l'isolement d'une enzyme de son milieu naturel et l'élimination des protéines contaminantes dans l'objectif d'étudier ces propriétés (sa structure, sa cinétique), ou pour son utilisation en médecine (traitement, diagnostic) ou en industrie.

Selon la facilité d'obtention de quantité suffisante d'enzyme on distingue :

- Des sources classiques : tissus d'animaux domestiques tel que le poulet, bœuf, lapin, rat (l'acétyl coA carboxylase est purifiée à partir des glandes mammaires. phosphatase alcaline est purifiée à partir des reins)
- Des sources alternatives: par génie génétique on peut isoler le gène codant pour l'enzyme de son organisme d'origine et l'exprimer en grande quantité dans un microorganisme approprié mis en culture tel que *E. coli* ou la levure. Après plusieurs

multiplications l'enzyme recherché peut représenter jusqu'à 30% des protéines totales de la cellule productrice ce qui facilite son isolement et sa purification

2-1 Méthodes d'extractions (solubilisation) de l'enzyme :

l'enzyme peut être mise en solution par rupture de tissus ou de cellules sources, la technique d'extraction choisie dépend des caractéristiques mécaniques de tissus de départ (tissus musculaire, cerveau) et la localisation intracellulaire de la protéine (cytosolique, mitochondriale, nucléaire...).

2-1-1- Méthode mécanique et physique :

- ⌚ **Broyeur** : instrument qui broie les tissus avec un piston de diamètre très ajusté qui va et vient à l'intérieure d'un tube cylindrique.
- ⌚ **Presse de french** : appareil qui provoque l'ouverture des cellules en les forçant à passer sous haute pression à travers un petit trou.
- ⌚ **Sonicateur** : appareil qui génère des vibrations (ultrasons) qui provoquent la rupture des membranes cellulaires

2-1-2 Méthode chimique et enzymatique :

- ⌚ **lyse osmotique** : cette méthode consiste à mettre les cellules dans un milieu hypotonique, ce qui conduit au passage de l'eau vers le milieu intracellulaire par osmose et l'éclatement des cellules, cette technique est efficace avec les cellules animales et sans effet avec les cellules qui ont une paroi cellulaire (bactérie, cellule végétale)
- ⌚ **Lyse enzymatique**: utilisé pour les cellules qui possède une paroi cellulaire, dans le cas des cellules végétales on utilise des cellulases qui dégradent la cellulose, dans le cas de la cellule bactérienne on utilise le lysozyme qui dégrade le peptidoglycane.
- ⌚ **Lyse par des solvants organiques** : l'acétone et le toluène sont aussi utilisés pour lyser la cellule mais ils peuvent dénaturer l'enzyme recherchée.

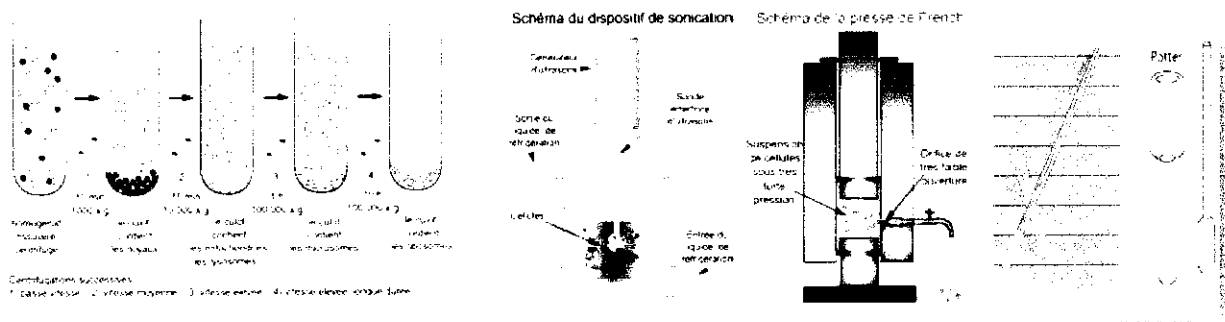


Figure 37. Fractionnement des cellules et des tissus

Après solubilisation, le lysat obtenu peut être filtré ou centrifugé afin d'éliminer les débris membranaire et récupérer le surnageant contenant l'enzyme recherché, mais lorsque l'enzyme est contenue dans des organites intracellulaires on doit récupérer ces organites par centrifugation différentielle (les organites cellulaires possèdent des densités différentes donc se sédimentent à des vitesses de centrifugation différentes, certains organites de la cellule sont plus denses que les autres donc se sédimentent à basse vitesse de centrifugation). Ensuite, on traite ces organites de la même manière que les cellules.

Après ces étapes on obtient l'extrait brut total contenant l'enzyme recherchée (probablement très minoritaire) et d'autres protéines contaminantes.

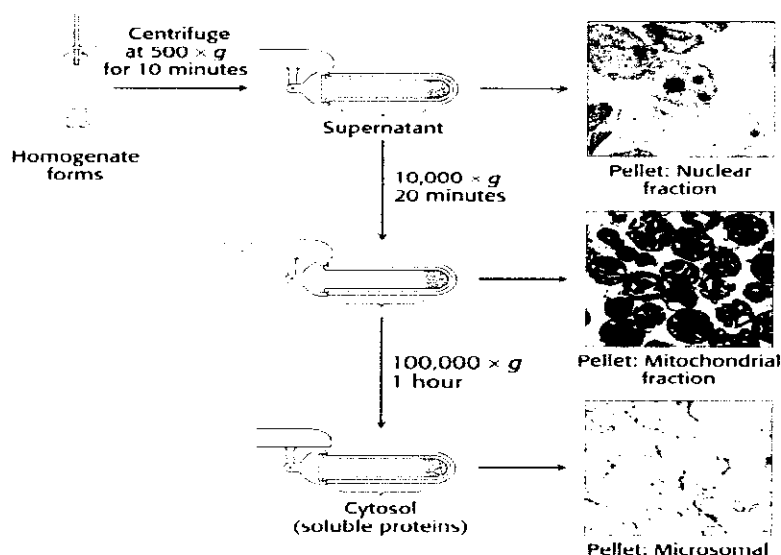


Figure 38. Séparation des organites cellulaires par centrifugation différentielle

2-2 Méthodes de fractionnement (purification proprement dite)

L'enzyme recherchée est en mélange avec d'autres protéines contaminantes, elle est purifiée en se basant sur ces propriétés (solubilité, charge ionique, taille moléculaire et spécificité d'interaction avec d'autres molécules)

- ❏ **Précipitation différentielle :** cette technique est basée sur la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition en acide aminé (hydrophobe ou hydrophile) on peut en séparer plusieurs en fonction de leurs tendances à se précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique (la concentration de sel) certaines protéines vont se précipiter pour de faible concentration de sel d'autres nécessitent une concentration importante. Le sel le plus utilisé pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$...
- ❏ **Chromatographie par filtration sur gel (chromatographie d'exclusion stérique):** La CES sépare les protéines en fonction de leurs tailles, on utilise pour cela une colonne de chromatographie remplie de billes poreuses (séphadex, sépharose). Le mélange de

protéines est déposés sur l'extrémité supérieure de la colonne, l'éluion se fait en faisant passer à travers la colonne un flux de tampon, les grosses protéines ne peuvent pas pénétrer dans les billes et vont passer rapidement à travers la colonne, les molécules de taille moyenne et les petite protéines seront plus ou moins ralentie selon leurs taille (le volume d'éluion est inversement proportionnel avec la taille moléculaire).

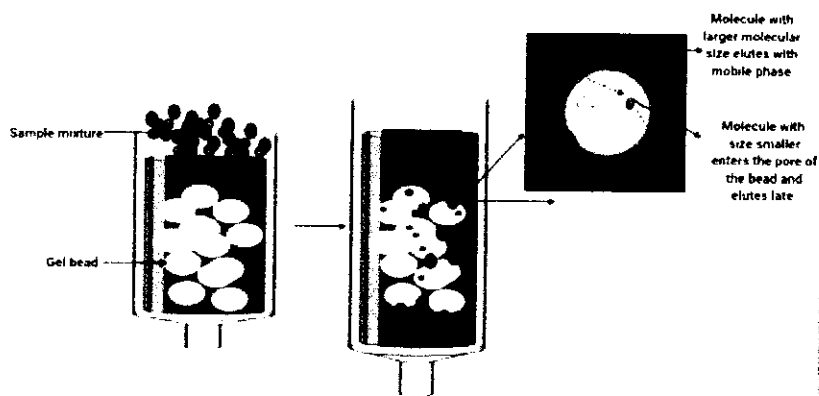


Figure 38. Chromatographie par filtration sur gel

- Chromatographie d'affinité : Elle est basée sur l'affinité ou la spécificité d'interaction de l'enzyme avec une molécule appelé ligand (substrat, inhibiteur, coenzyme.....) qui est fixé par covalence à la phase stationnaire. Quand l'extrait brut traverse la phase stationnaire, l'enzyme recherché se lie au ligand immobilisé tandis que les autres substances sortent de la colonne en même temps que le tampon de lavage. L'éluion (récupération de l'enzyme) se fait par déstabilisation du complexe (enzyme-ligand) en changeant le pH, la force ionique.

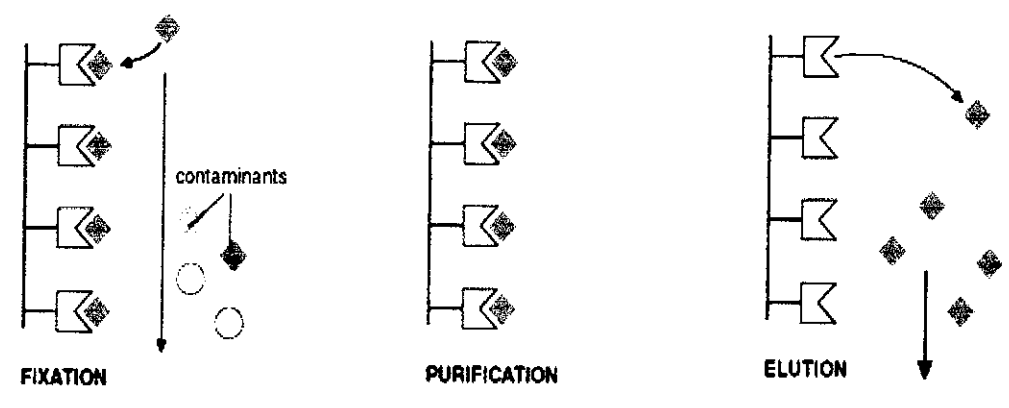


Figure 39. Chromatographie d'affinité

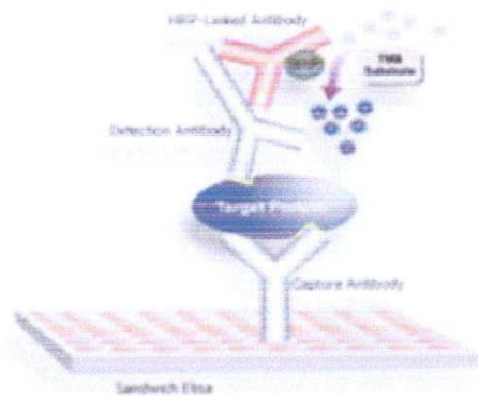
L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu SDS est le procédé le plus employé pour contrôler la pureté des protéines

- ✓ Dans l'électrophorèse native sur gel de polyacrylamide (PAGE) les molécules se déplacent dans un champ électrique, leurs vitesses de migration dépendent de leurs tailles et leurs charges
- ✓ Dans l'électrophorèse SDS-PAGE le mélange des protéines est traité de telle façon que leur migration ne dépend que de leurs taille, on utilise pour cela le SDS (sodium dodecyle sulfate) la forte charge négative apporté par le SDS masque la charge intrinsèque de la protéine et leurs donne une charge négative constante par unité de masse, toute les protéines possèdent donc la même densité de charge et leur mobilité électrophorétique dépend seulement de la taille (PM)

L'apparition d'une seule bande sur le profil de migration electrophoretique indique que l'échantillon est pur donc dépourvue de protéines contaminantes

CHAPITRE VII

Génie enzymatique



Génie enzymatique

1- Nature

Les enzymes sont des protéines globulaires pouvant avoir des tailles très variables, allant de 62 acides aminés à 2500 « Ex : **Ac gras Synthase** » et, à ce titre, leur structure peut être :

- ♦ structure primaire : c'est l'ordre d'enchaînement des acides aminés de série L, liés entre eux par une liaison de type amide, la **liaison peptidique**. Ce premier niveau de structure est responsable au moins indirectement des niveaux supérieurs d'organisation et ainsi de toutes les propriétés des protéines, en particulier des propriétés catalytiques des enzymes, mais aussi de la formation d'autres liaisons covalentes (modifications post-traductionnelles) ;
- ♦ structure secondaire : elle résulte de l'établissement de liaisons hydrogène entre les groupements amide (-NH) et carbonyle (-CO) du squelette peptidique. L'existence de structures secondaires vient du fait que les repliements énergétiquement favorables de la chaîne peptidique sont limités et que seules certaines conformations sont possibles. Il existe trois principales catégories de structures secondaires selon le repliement des liaisons peptidiques : les hélices (de type alpha), les feuilletts (de type bêta) et les coudes.
- ♦ structure tertiaire : la chaîne polypeptidique déjà ordonnée en structure secondaire peut se replier sur elle-même pour former une molécule de configuration spatiale bien déterminée (en général, de forme globulaire dans le cas des enzymes). Les liaisons intramoléculaires (pont disulfure, liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, liaisons hydrophobes) responsables de la stabilité de la structure tertiaire se forment à partir des chaînes latérales des acides aminés.
- ♦ structure quaternaire : les protéines sont souvent constituées de plusieurs sous-unités qui correspondent chacune à une chaîne polypeptidique de structure tertiaire définie. L'association de ces sous-unités entre elles par le même type de liaisons que celles rencontrées au niveau de la structure tertiaire constitue la structure quaternaire de la protéine. C'est de cette association dont dépend l'activité de la protéine.

2- Méthodes d'immobilisation des enzymes

2-1 Introduction :

Les enzymes immobilisées ont une longue histoire et ont été largement étudiées dans le domaine de la biotechnologie : Au début du XXe siècle, les scientifiques ont commencé à explorer l'immobilisation des enzymes. En 1916, **Kastle et Loevenhart** ont expérimenté avec l'immobilisation de la pepsine, une enzyme digestive, en utilisant de l'oxyde de fer. Ils ont constaté que l'activité enzymatique était supérieure à celle de la pepsine non immobilisée.

À partir des années 1970, l'utilisation industrielle des enzymes immobilisées s'est répandue, notamment, dans l'industrie alimentaire. Cette technique a été largement employée pour la fabrication d'édulcorants artificiels tels que l'aspartame.

Récemment, de nouvelles applications ont été découvertes pour les enzymes immobilisées, notamment dans la production de biocarburants, la dépollution des eaux usées, la synthèse de médicaments, et la fabrication de biopolymères. Les scientifiques se sont intéressés à l'utilisation de nanomatériaux, tels que les nanoparticules métalliques, les nanotubes de carbone et les graphènes, pour l'immobilisation des enzymes. Ces nouveaux matériaux présentent des avantages tels qu'une plus grande surface de contact et une plus grande stabilité de l'enzyme.

L'application de la catalyse enzymatique aux processus chimiques diminue l'utilisation de produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement. Les enzymes offrent un avantage distinct dû à leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. Les enzymes sont des catalyseurs. A ce titre, ils ne sont pas principalement des produits, mais des parties de procédés. Or, il est plus facile de modifier, d'améliorer un procédé que de créer un nouveau produit.

Quelques critères doivent être réunis pour qu'une enzyme soit un catalyseur industriel viable. L'enzyme doit être compatible et stable. Au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicaux et biotechnologiques. Une approche possible pour stabiliser des enzymes est leur immobilisation sur une matrice appropriée. Du point de vue industriel, les biocatalyseurs immobilisés présentent une stabilité augmentée.

Initialement, les enzymes ont été utilisées en phase homogène, donc leurs applications restaient limitées, compte tenu de leur prix de revient. Le développement des travaux sur la fixation antigènes-anticorps a débouché tout naturellement sur le greffage des enzymes sur des supports insolubles. Cette technique permet d'utiliser de façon répétée ces protéines douées d'activité catalytique et donc d'apporter une solution naturelle au développement de la production industrielle de composés indispensables à la vie moderne.

L'immobilisation des enzymes permet une approche plus adaptée des phénomènes biologiques, car les enzymes agissent *in-vivo*, non à l'état libre, mais à l'état fixé dans les membranes des organismes intracellulaires. Cependant, le comportement cinétique enzymatique est modifié lorsqu'elle passe de la phase soluble à l'état immobilisé, et l'étude des enzymes doit être conduite sous des conditions proches de leur existence *in-vivo*.

Les empoisonnements graves sont souvent provoqués par des produits polluants ou pharmaceutiques à des concentrations très faibles. En conséquence, un système enzymatique peut perdre énormément de son efficacité lorsque de tels composés même à l'état de traces, se trouvent à son contact. Il a été judicieux de copier la nature en utilisant des enzymes immobilisées sur support, afin de doser ces composés toxiques.

Immobiliser des enzymes dans une matrice synthétique permet souvent d'augmenter leur stabilité mécanique vis-à-vis des membranes naturelles, rendant ainsi la manipulation plus facile. D'autre part, l'étude de la réversibilité des enzymes vis-à-vis des inhibiteurs est nettement plus simple avec des enzymes fixées sur des supports que l'on peut à tout moment changer de milieu.

2-2 Enzymes immobilisées

Les enzymes sont également utilisées pour l'analyse des aliments et des fluides biologiques, notamment sous la forme de capteur biologique (mesure de glucose). De plus en plus, les enzymes sont impliquées dans la synthèse de molécules bio-organiques et, dans la digestion (ex. décomposition) de biopolymères tels que l'ADN et les protéines pour faciliter leur analyse structurale.

L'immobilisation des enzymes a trouvé plusieurs applications industrielles, en chimie analytique, clinique, en environnement et surtout dans les industries chimiques (digestion protéolytique). L'immobilisation des enzymes a été utilisée en électrochimie, dans le bioréacteur à deux phases liquides, en chromatographie d'affinité et dans les biocapteurs.

L'enzyme conserve t'elle ses caractéristiques enzymatiques (activité et stabilité) après immobilisation ?

Les enzymes étant solubles dans l'eau et très fragiles, leur purification après usage ne peut généralement être envisagée favorablement, surtout à l'échelle industrielle. Pour différentes raisons, y compris la valeur commerciale élevée des enzymes, on s'est efforcé de mettre au point des méthodes permettant leur réutilisation, une fois la réaction enzymatique achevée. L'une de ces méthodes est l'**ultrafiltration**, mais il semble que celle qui a donné naissance aux plus grands développements consiste à **rendre l'enzyme insoluble** par un traitement physique ou chimique convenable, suffisamment doux et sélectif pour éviter une perte trop importante d'activité biologique. L'enzyme ainsi insolubilisé (ou *immobilisé*) peut catalyser, en milieu hétérogène cette fois, les réactions susceptibles de l'être en phase homogène par

l'enzyme soluble initial. Le dérivé insoluble est ensuite récupéré par filtration, sédimentation ou centrifugation et peut servir à nouveau.

2-3 Principales méthodes d'immobilisation

Les enzymes peuvent être immobilisées par des méthodes chimiques et/ou physiques. Cinq méthodes générales d'immobilisation des enzymes. Ce sont l'adsorption, la microencapsulation, l'inclusion, la réticulation et la fixation chimique sur un support insoluble. Toutes ces méthodes opèrent en milieu aqueux tamponné.

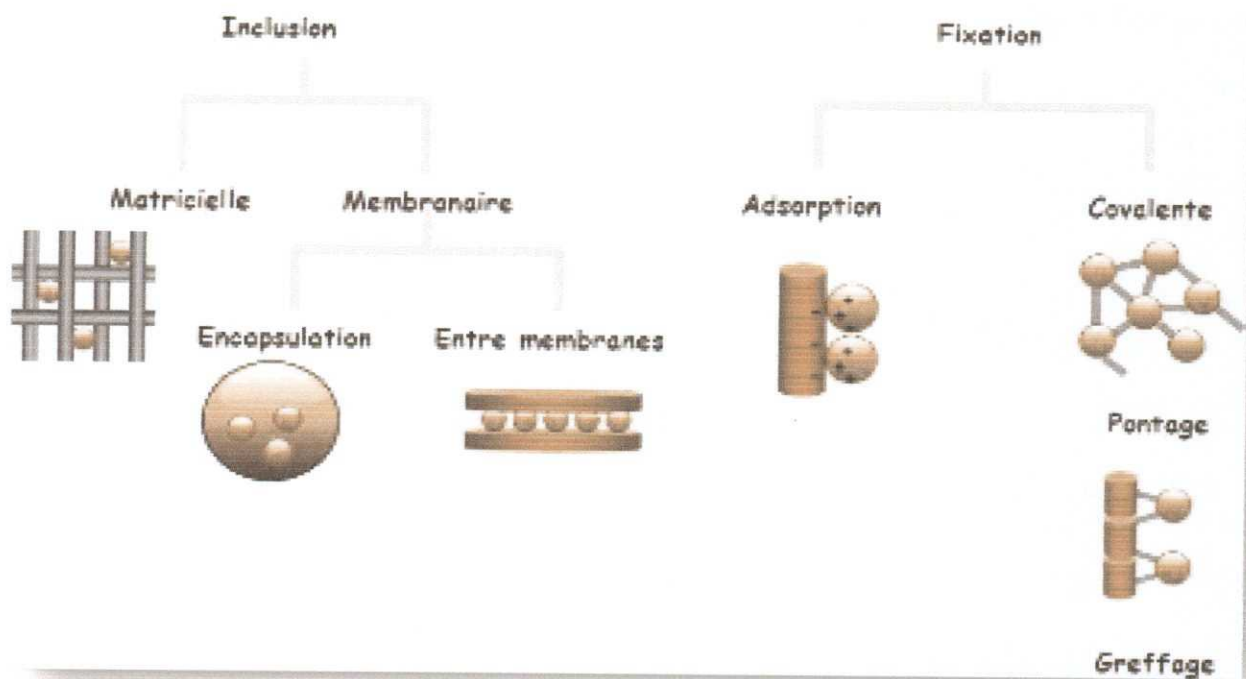


Figure 40. Différents modes d'immobilisation des enzymes (○) enzyme; (□) autre protéine.

2-3-1 Méthode physique, immobilisation par adsorption

L'immobilisation des enzymes se réalise soit par voie physique (adsorption), soit par voie chimique. L'immobilisation par voie physique est due à l'attachement de l'enzyme sur la surface du support par plusieurs types d'interactions : électrostatique, hydrophobe/hydrophile, et par les forces de Van der Waals. L'inconvénient de l'adsorption physique est généralement de créer un changement dans l'environnement de l'enzyme.

De plus, elle nécessite un contrôle précis du pH et de la force ionique durant l'application industrielle de l'enzyme adsorbée. Les interactions ioniques avec les composants du tampon peuvent entraîner un changement de la protéine. Un deuxième facteur influence l'immobilisation par adsorption: la température. La température joue un rôle très important dans l'adsorption, celle-ci s'accomplit facilement à une température élevée, cependant l'augmentation de la température dénature l'enzyme.

Choix du support solide : La sélection du support solide est une étape cruciale lors de l'immobilisation enzymatique par adsorption, car le support doit répondre à des critères spécifiques, tels que la porosité, l'inertie, la stabilité, la non-toxicité et la disponibilité en grandes quantités. Les résines échangeuses d'ions, les polymères, les nanoparticules, les membranes, les fibres et les billes magnétiques sont les supports les plus couramment utilisés. Pour faciliter l'adsorption des enzymes, la plupart de ces supports sont fonctionnalisés avec des groupes chimiques, tels que les groupes amine, carboxyle, hydroxyle ou sulfonate.

Adsorption de l'enzyme sur le support solide : Lorsqu'on souhaite fixer une enzyme sur un support solide, il est possible de procéder de deux manières : soit en plongeant le support dans une solution contenant l'enzyme, soit en versant la solution contenant l'enzyme sur le support. Pour faciliter l'adsorption de l'enzyme sur le support, il est recommandé de l'agiter, de maintenir un pH optimal et une température optimale. Une fois que l'enzyme est adsorbée sur le support, il est nécessaire de laver ce dernier afin d'éliminer toute enzyme qui n'a pas été fixée. Une fois que l'enzyme est immobilisée, il est important de caractériser le biocatalyseur afin d'évaluer son activité enzymatique, sa stabilité, sa réutilisabilité et sa cinétique. Les méthodes de caractérisation les plus courantes incluent la spectrophotométrie, la chromatographie, l'électrophorèse, la microscopie et la mesure de l'activité enzymatique.

Les enzymes immobilisées par absorption « tels que des billes, des membranes ou des fibres » ont souvent une activité enzymatique élevée car leur structure et leur fonction ne subissent pas de modifications chimiques ou physiques qui pourraient les altérer.

La méthode d'absorption présente l'avantage d'être souvent réversible, si nécessaire, ce qui implique que les enzymes peuvent être facilement retirées du support. Cette caractéristique peut s'avérer bénéfique pour les applications qui nécessitent le recyclage ou la récupération des enzymes.

La méthode d'absorption physique peut entraîner une stabilité relativement faible pour les enzymes immobilisées en raison des forces de liaison peu fortes. Cette faible stabilité peut entraîner la libération de l'enzyme dans le milieu réactionnel, ce qui peut réduire son efficacité catalytique. De plus, il existe un risque que l'enzyme se détache complètement de la matrice, limitant ainsi sa capacité à être réutilisée. De plus l'immobilisation par absorption peut causer une diminution d'activité de l'enzyme immobilisée due aux changements conformationnels subis par l'enzyme pendant l'immobilisation ou aux interactions défavorables entre l'enzyme et la matrice d'immobilisation. Un autre inconvénient s'ajoute, lors l'immobilisation, il est difficile de contrôler précisément la densité d'enzyme immobilisé. Cette densité peut varier considérablement d'un lot à l'autre, ce qui peut avoir un impact sur les performances de

l'enzyme immobilisée. De même, les enzymes immobilisées par adsorption peuvent être influencées par la température, le pH et la force ionique. Ces facteurs peuvent impacter la stabilité et l'activité de l'enzyme immobilisée.

De même, Certains facteurs peuvent affecter la stabilité et l'activité de l'enzyme immobilisée, notamment, la température, le pH et la force ionique.

2-3-2 Méthode chimique d'immobilisation

L'attachement de l'enzyme par voie chimique nécessite un lien covalent ou de coordination entre l'enzyme et le support. L'immobilisation chimique diffère de l'attachement par adsorption, on remarque généralement qu'il y a diminution de l'activité de l'enzyme. De plus, le lien covalent ou coordonnant formé entre l'enzyme et le support crée un changement structural de l'enzyme immobilisée, qui peut aussi affecter son site actif et ainsi diminuer l'activité de l'enzyme.

Généralement, certains acides aminés possédant des groupements thiols (SH), alcools (OH), et amines (NH₂) sont impliqués dans la réaction d'immobilisation. Plusieurs supports pouvant réagir sélectivement avec un site particulier d'un acide aminé ont été décrits dans la littérature; la Lysine est l'acide aminé le plus impliqué dans l'immobilisation, parce qu'elle possède un bon groupement nucléophile. L'attachement de l'enzyme sur le support entraîne une diminution de sa flexibilité. Le changement tridimensionnel de l'enzyme devient plus alors difficile, ce qui pouvait entraîner une diminution de l'activité enzymatique.

L'immobilisation par liaison covalente conduit à des systèmes plus stables, évitant des pertes d'enzymes pendant leur utilisation. Mais le système enzymatique, obtenu par cette dernière méthode, présente généralement une activité plus fiable que l'enzyme libre.

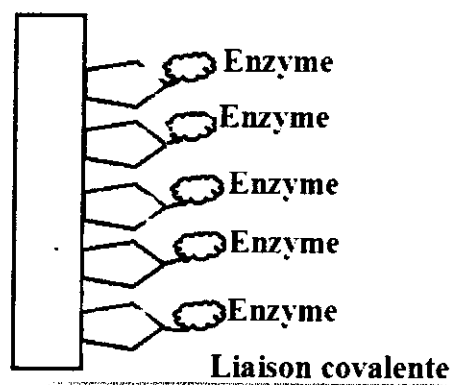


Figure 41. Immobilisation par liaison covalente

On sait que la ribonucléase immobilisée sur agarose subit une baisse d'activité de l'ordre de 10 à 75 % par rapport à l'enzyme libre, selon la nature du substrat traité. Pour remédier à ce

défaut on préfère utiliser la deuxième technique qui est la plus courante et la plus utilisée dans le domaine industriel actuellement ; la technique du bras de support « bras espaceur ».

Cette technique permet d'utiliser un réactif intermédiaire (agent d'activation), combiné d'une part au support et de l'autre à l'enzyme. Cet agent est capable de former une liaison covalente avec les fonctions portées par les enzymes, il permet de fixer l'enzyme à certaine distance du support et d'avoir une meilleure accessibilité de l'enzyme à son substrat.

L'agent d'activation peut être le bromure de cyanogène, le glutaraldéhyde...

Les matrices couramment utilisées dans cette méthode d'immobilisation sont soit ;

Naturelles ; Séphadex, Agarose, Sépharose, Cellulose..

Synthétiques ; Acrylamide, Acide Méthacrylique, Styrène...

Substances inorganiques ; Verre, Alumino-silicates..

Groupement fonctionnel		Composé bi- fonctionnel « Bras espaceur »
Enzyme	Support	
-NH ₂	-OH	Bromure de cyanogène
-NH ₂	-NH ₂	Glutaraldéhyde
-COOH	-NH ₂	Carbodiimide
-NH ₂	-COOH	Azoture d'acyle Carbodiimide
-SH	-SH	4,4'-Dithiodipyridine

3- Intérêt de l'immobilisation des enzymes

L'immobilisation est utilisée à des fins fondamentales ou appliquées parce qu'il procure certains avantages ;

a- Stabilisation des activités ;

En réduisant la mobilité de la chaîne polypeptidique, on stabilise l'activité vis-à-vis de la chaleur, on la protège des enzymes protéolytiques. Associée à un milieu contenant peu d'eau, l'immobilisation donne en général de bons résultats.

b- L'immobilisation d'un enzyme permet son chargement dans un réacteur quelqu'en soit le type: lit fixe, lit fluidisé... Ceci autorise le passage d'une production discontinue 'à une production continue, permet le contrôle par des moyens automatiques.

c- Les enzymes immobilisés ne se retrouvent plus dans le produit final, ce qui est important pour les industries pharmaceutique et agro-alimentaire où le contrôle de la qualité des produits est important.

d- À l'inverse de la solution où le transport du(es) substrat(s) et du(es) produit(s) est assuré essentiellement par l'agitation, le milieu qui entoure l'enzyme immobilisé régit le transport des solutés uniquement par diffusion. Ceci entraîne la formation de gradients de concentration entre le cœur du support et la solution. Le microenvironnement qui baigne l'enzyme peut être notablement différent de la solution (pH, concentration ' en inhibiteur, etc...) et moduler en conséquence l'activité enzymatique.

e- En rapprochant les sites actifs enzymatiques, en augmentant la concentration locale du produit d'un enzyme, substrat de l'enzyme suivant, l'immobilisation augmente considérablement l'efficacité des systèmes multienzymatiques.

f- Immobilisés à la surface d'électrodes, les enzymes confèrent à celles-ci la spécificité qui leur manque. Sur ce principe, a été conçu dans notre laboratoire un appareil pouvant mesurer une douzaine de paramètres (glucose, saccharose, éthanol, cholestérol, etc...) dans différents milieux (sang total, milieux de culture). Il est ainsi possible de suivre en continu la concentration d'un produit intéressant dans un fermenteur par exemple.

g- Conditions asymétriques - Quand il est immobilisé en membrane, l'enzyme peut être soumis, à des conditions asymétriques. On peut ainsi voir apparaître des phénomènes nouveaux. Une différence de potentiel se forme aux bornes d'une membrane contenant de l'acétylcholinestérase dont une seule face est au contact d'une solution d'acétylcholine. On a alors transformation d'une information chimique en une information électrique. Un gradient de pK de part et d'autre d'une membrane peut s'amplifier quand certaines activités sont immobilisées. Une membrane asymétrique peut effectuer un transport actif même si les conditions sur chacune de ses faces sont identiques.

h- Propriétés qualitativement nouvelles Dans des conditions convenables, on peut faire apparaître des boucles d'hystérésis, des oscillations, ou provoquer une structuration.

4- Immobilisation des enzymes et utilisation en bioréacteurs

Les procédés de préparation de plusieurs produits alimentaires de grande consommation comportent au moins une étape mettant en jeu des micro-organismes ou des enzymes :

- lorsque cette étape fait appel à des micro-organismes qui se développent en consommant une partie d'un réactif appelé substrat et en transformant l'autre en divers produits, le réacteur employé est un **fermenteur** ;

- si cette étape est une réaction biochimique catalysée par des enzymes transformant un substrat en produit, elle est réalisée dans un **réacteur enzymatique**.

4-1 Facteurs influençant l'activité enzymatique

Il est connu que la **température**, le **pH** et la **concentration du substrat** sont les principaux facteurs qui influencent l'activité enzymatique en milieu aqueux tout comme en milieu non aqueux. Le pH et la température agissent en synergie sur la conformation de l'enzyme et sa structure tridimensionnelle modifiant ainsi son activité autour de sa température et son pH optimaux. Le pH et la température ont un effet non monotone sur l'activité enzymatique avec la présence d'un optimum comme le montre la Figure

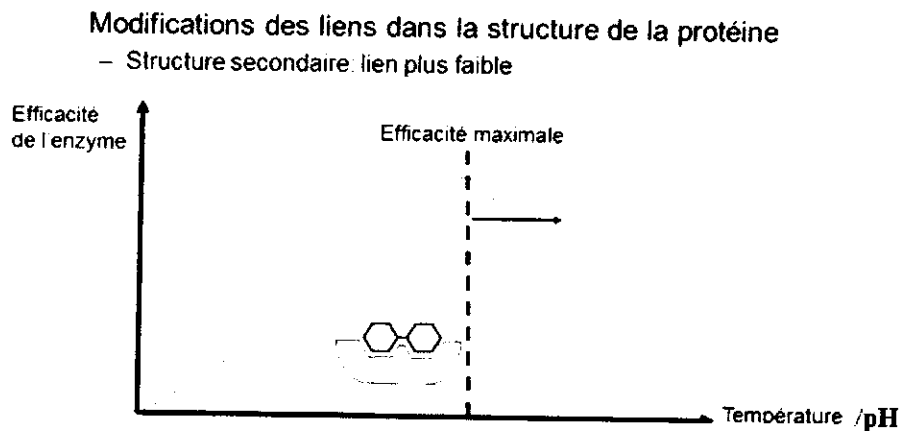


Figure 42. Effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique

La concentration du substrat est également un paramètre très important car elle influence la vitesse de la réaction. D'une part, l'augmentation de cette concentration peut entraîner l'augmentation de la vitesse de la réaction compte tenu de la loi de vitesse. D'autre part, un substrat en excès peut dans certains cas inhiber l'enzyme et la vitesse de la réaction s'en trouve alors diminuée. De la même façon, l'enzyme peut être également inhibée par le produit de la réaction. Les mécanismes d'inhibition sont multiples : l'inhibition compétitive, incompétitive, mixte ou non compétitive.

Pour maintenir son action catalytique, notamment en milieu non aqueux, l'enzyme nécessite la présence d'une certaine activité d'eau. Cette dernière peut agir de plusieurs façons sur l'activité enzymatique : en modifiant sa structure par organisation et/ou désorganisation des liaisons non covalentes et des liaisons hydrogène au sein de la protéine, en influençant de

façon plus ou moins favorable la diffusion des réactifs et en modifiant l'équilibre de la réaction.

Par ailleurs, la pression agit essentiellement par le changement de l'état d'hydratation des enzymes principalement en modifiant l'organisation des molécules d'eau au sein de ces enzymes. En effet, la pression peut modifier par rupture ou par formation des liaisons non covalentes notamment les liaisons hydrogène qui lient la protéine aux molécules d'eau. Ainsi, la réorganisation des molécules d'eau au sein de l'enzyme peut entraîner la modification de sa conformation et changer par conséquent son comportement en termes d'activité, de sélectivité et de stabilité

4-2 Les réacteurs enzymatiques

Les réactions enzymatiques sont conduites généralement dans des réacteurs fermés, où l'enzyme utilisée (libre ou immobilisée) est mis en contact avec les substrats dans une cuve agitée pendant un temps donné durant lequel le pH et la température sont contrôlés. Ainsi, il existe des réacteurs industriels pour la catalyse homogène (enzymes libres) quand le coût du catalyseur est suffisamment faible pour permettre son utilisation unique et pour la catalyse hétérogène (enzymes immobilisées) qui permet la récupération et la réutilisation du catalyseur quand celui-ci est au contraire coûteux.

Un réacteur à enzymes est un "bocal" où une enzyme va catalyser la transformation d'un substrat en un produit d'intérêt. Il faudra ensuite récupérer le produit.

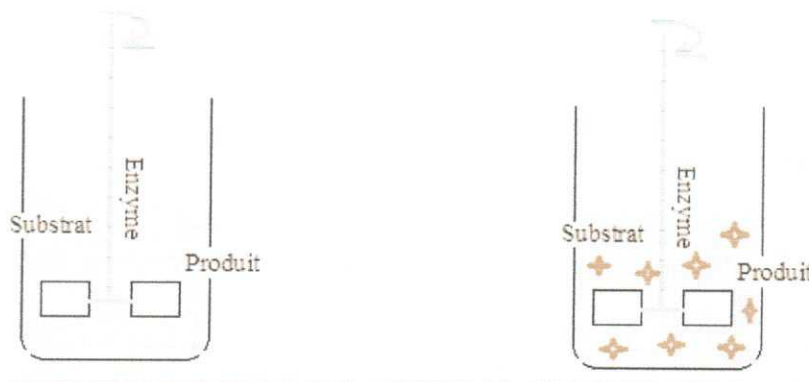
Il existe deux grands types de procédés : ceux où on travaille par lots (procédés en batch, procédés par lots, procédés discontinus) et ceux où la production est réalisée en débit continu (procédés continus).

Dans la quasi totalité des process, il faut récupérer le produit sans le catalyseur enzymatique, c'est pourquoi la plupart des process utilisent désormais des enzymes immobilisées :

- ◆ Grande facilité de récupération de l'enzyme en fin de cycle dans le cas des procédés discontinus (pour certaines catalyses, des industriels annoncent des utilisations d'enzymes immobilisées sur plusieurs centaines de cycles).
- ◆ Souplesse d'utilisation pour les procédés en continu grâce à la facilité de rétention dans le réacteur.
- ◆ Le fait que de nombreuses techniques d'immobilisation améliorent la stabilité thermique des enzymes.

4-2-1 Réacteurs agités à fonctionnement discontinu (BSTR, Batch Stirred Tank Reactor)

Dans les bioprocédés, les réactions sont généralement conduites dans des réacteurs fermés où le catalyseur (sous forme libre ou immobilisée) est mis en contact avec les substrats dans une cuve agitée pendant un temps donné durant lequel le pH et la température sont contrôlés. La récupération des produits qui suit chaque cycle de biotransformation se fait, généralement, par filtration, par centrifugation ou par précipitation. La séparation des produits constitue donc une étape à part entière dans le procédé. Malgré sa simplicité, ce type de réacteur comporte plusieurs inconvénients inhérents aux réacteurs fermés tels que la variabilité de la qualité des produits, le coût de main d'œuvre lié à la fréquence des démarrages et des arrêts, l'utilisation de grands volumes, la perte des enzymes souvent actives en fin de cycle (pour les enzymes solubles) et la nécessité d'une étape supplémentaire de séparation des enzymes du milieu réactionnel.



BSTR à enzymes libres

BSTR à enzymes immobilisées

Figure 43. Réacteurs agités à fonctionnement discontinu

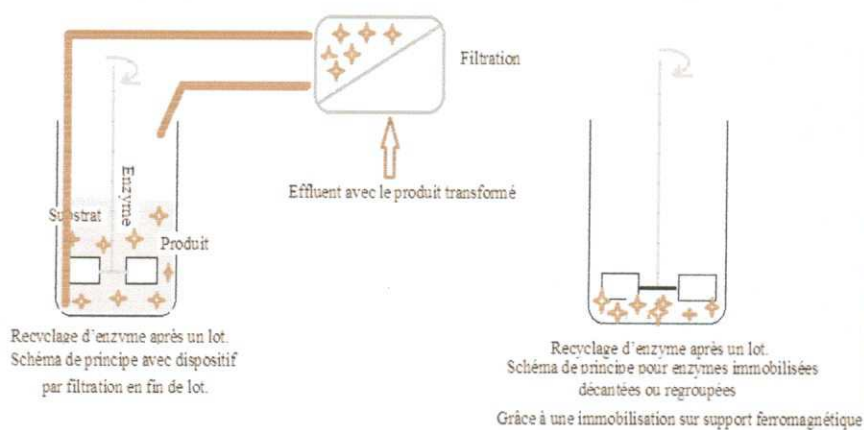


Figure 44. Réacteurs à fonctionnement discontinus

4-2-2 Les réacteurs continus

Il existe, par ailleurs, plusieurs types de réacteurs enzymatiques qui fonctionnent en continu. Parmi les différents réacteurs continus on distingue :

- Les réacteurs à lit fixe
- Les réacteurs à lit fixe fluidisé
- Les réacteurs membranaires (REM)

Un bioréacteur à lit fixe est constitué d'un tube de section circulaire rempli de particules solides rendues actives par fixation de micro-organismes ou d'enzymes et dont les extrémités sont fermées par des grilles ou des plaques perforées et permettant la percolation d'une phase liquide, mais empêchant tout mouvement de la phase solide dispersée. Si les particules sont de forme sphérique, la fraction de réacteur occupée par la phase solide est de l'ordre de 0,6, celle occupée par la phase liquide étant alors 0,4.

Dans ce réacteur, les enzymes sont immobilisées sur des supports (particules ou billes) qui sont chargés dans un lit fixe. L'alimentation peut se faire de bas en haut ou de haut en bas selon le type de construction. Le réacteur à lit fixe permet à la fois d'avoir une importante productivité et un produit final exempt d'enzymes étant donné que celles-ci sont confinées dans le réacteur, évitant ainsi une étape finale de séparation du biocatalyseur et du produit. L'intérêt d'utiliser cette configuration plutôt que celle du réacteur fermé a été prouvé avec différentes enzymes et dans différentes conditions.

Le bioréacteur à lit fluidisé. Le réacteur à lit fluidisé s'apparente à un lit fixe au sein duquel les particules sur lesquelles les enzymes sont immobilisées, sont mises en suspension grâce à une alimentation ascendante à un débit suffisamment élevé. Les risques de colmatage et de perte de charge inéluctables en lit fixe peuvent être ainsi limités. Cependant, le problème de limitation du transfert de masse à la surface ou à l'intérieur des particules n'est pas à écarter. De plus, la nécessité d'utilisation de pompes de taille et de puissance relativement importantes constitue un frein au recours à ce type de réacteur.

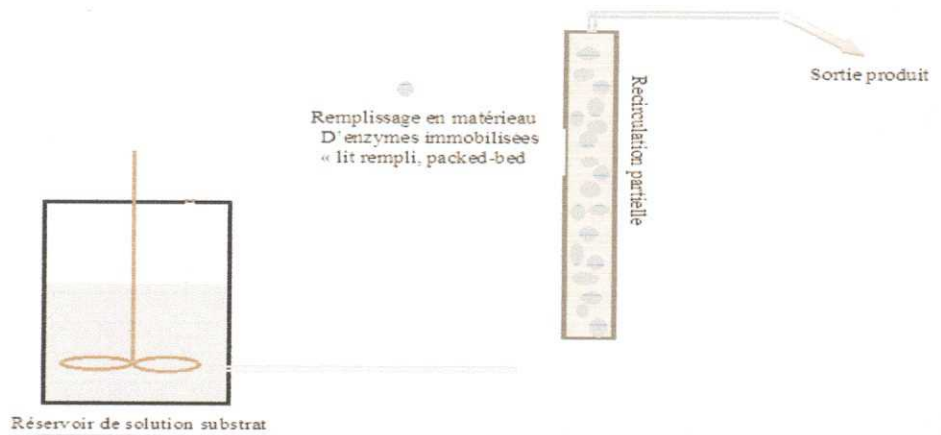


Figure 45. Réacteur de type lit fixé « packed-bed » en mode de fonctionnement continu.

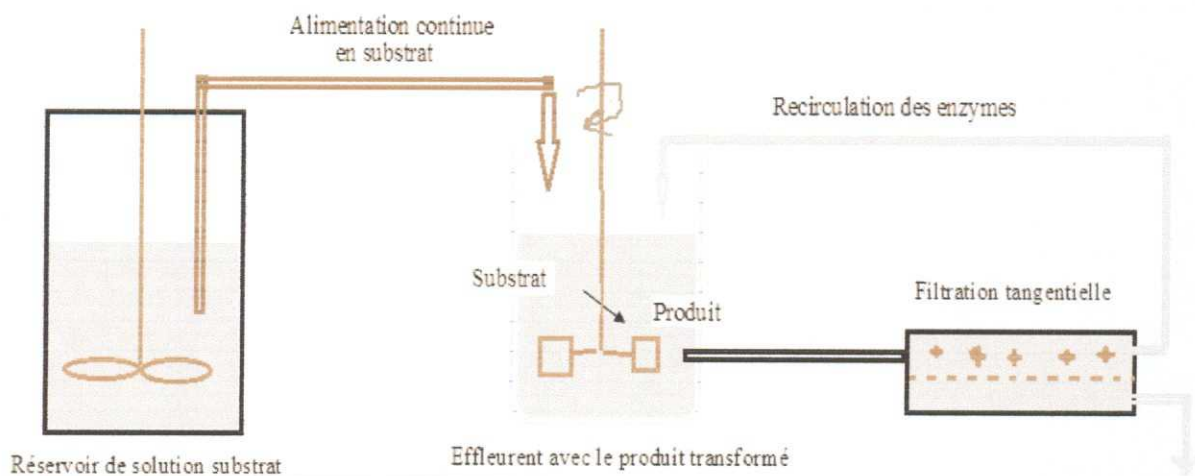


Figure 46. Réacteurs agités mis en fonctionnement continu

Les réacteurs membranaires (REM). Le concept de réacteur enzymatique membranaire (REM) associe à la fois un réacteur enzymatique classique et une membrane. Ce réacteur permet de conduire un procédé en continu où, grâce à la membrane, l'enzyme peut être séparée des produits de la réaction. Le REM offre donc la possibilité de réduire les étapes du procédé en assurant en une seule fois la conversion catalytique et la récupération du biocatalyseur et donc la possibilité de passer plus facilement à une échelle de production plus grande. Dans ce type de réacteur, les enzymes peuvent être sous forme libre et circuler dans le retentât: on parle alors de réacteur enzymatique membranaire à enzymes libres (REMEL). Dans ce cas, la membrane a pour rôle la rétention des enzymes. Une autre configuration est possible en immobilisant les enzymes à la surface ou à l'intérieur des pores de la membrane conférant à cette dernière des propriétés catalytiques, il s'agit alors dans ce

4-2-3 Taux de conversion, productivité, temps de résidence et fréquence de renouvellement et relation avec le taux de conversion

4-2-3-1 Taux de conversion

Soit S_0 la concentration initiale en substrat (dans le lot pour un procédé discontinu ou en entrée de nourrissage pour un procédé continu). Soit S_t la concentration à l'instant t où le taux de conversion est défini (dans le lot pour un procédé discontinu ou en sortie pour un procédé continu). Soit T_x ou X le taux de conversion du substrat :

$$T_x = X = \frac{S_0 - S_t}{S_0}$$

Ex1 : Soit un réacteur à lit fixé à bêta-fructosidase immobilisée en fonctionnement continu. Soit le réacteur alimenté avec une solution de saccharose à 150,0 g/L. Soit en sortie une concentration mesurée en glucose de 78,0 g/L. Quel est le taux de conversion ?

La réaction catalysée est :



$MM_{\text{saccharose}} = 342,3 \text{ g/mol.}$

$MM_{\text{glucose}} = 180,2.$

78,0 g/L de glucose en sortie correspondent à $(78,0/180,2) \text{ mol/L}$ de glucose, soit $(78,0/180,2) = 0,433 \text{ mol/L}$ de saccharose hydrolysés ("disparus") puisque la réaction est à 1:1 de stoechiométrie. Cette valeur représente ici $(S_0 - S_t)$. La concentration en entrée est de $150,0/342,3 \text{ mol/L} = 0,438 \text{ mol/L}$. Le taux de conversion est donc

$$T_x = 0,433/0,438 = 0,988 = 98,8\%.$$

Note. Le taux de conversion varie évidemment entre 0 et 1 (0 à 100%). 1 ne pouvant être obtenu que pour une réaction irréversible qui a pu être conduite à complétude !

4-2-3-2 Productivité en produit

On peut calculer différentes productivités. C'est les unités qui guident :

La productivité en produit comme la quantité de produit formé par unité de temps : « masse ou quantité mol] / [temps] »

La productivité volumique comme la quantité de produit formé par unité de temps et par unité de volume de bioréaction : « masse ou quantité mol].[temps]⁻¹[volume]⁻¹ »

Ex2 : Soit un réacteur à lit fixé à bêta-fructosidase immobilisée en fonctionnement continu. Soit le réacteur alimenté avec une solution de saccharose à 150,0 g/L sous un débit de 20 L/min. Soit évidemment débit d'entrée = débit de sortie. Soit en sortie une concentration mesurée en glucose de 78,0 g/L. Quel est la productivité (hors maintenance, démarrage, arrêt) ?

La réaction catalysée est :



78,0 g/L de glucose en sortie. Donc aussi 78 g/L de fructose en sortie. En définissant le produit de sortie intéressant comme la teneur totale en fructose et saccharose (l'inverti) soit 156 g/L, la productivité est de $156 \cdot 20 = 3120$ g/min soit $3120 \cdot 60 / 1000 = 187$ kg/h.

On pourrait calculer aussi une productivité volumique horaire à :

$$187/10^3 = 0,187 \text{ kg.h}^{-1}\text{L}^{-1} \text{ d'installation. Soit } 187 \text{ kg.h}^{-1}.\text{m}^{-3} \text{ d'installation.}$$

4-2-3-3 Temps de résidence τ pour la catalyse :

- Pour le réacteur en cuve agitée mis en fonctionnement continu. $\tau = V/F$.
- Pour le réacteur colonne en fonctionnement continu, τ est défini comme la durée nécessaire à la traversée du réacteur depuis l'entrée à la sortie. Si on connaît le volume V de phase liquide dans la colonne de réacteur (donc en dehors du volume support pour l'enzyme immobilisée) on peut poser $\tau = V/F$.

Ex 3 : Soit un réacteur en cuve agitée de 1000 L de contenu alimenté en continu à 8,33 L par minute (8,33 L par minute c'est $8,33 \cdot 60 = 500$ L). Quel est le temps de résidence ?

$\tau = 1000/8,33 = 120$ minutes. Ou $\tau = 1000/500 = 2$ h. On le comprenait très bien intuitivement.

4-2-3-4 Fréquence de renouvellement

Au lieu de donner le temps de résidence τ pour la catalyse dans un réacteur réservoir agité alimenté et soutiré en continu, on peut préférer donner la fréquence de renouvellement :

$$f = F/V = 1/\tau.$$

Ex 4: Soit un réacteur en cuve agitée de 1000 L de contenu alimenté en continu à 8,33 L par minute (8,33 L par minute c'est $8,33 \cdot 60 = 500$ L). Quel est le temps de résidence?

$$\tau = 1000/8,33 = 120 \text{ minutes.} \quad \text{Ou } \tau = 1000/500 = 2\text{h.}$$

Et $f=8,33/10^3=8,33*10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (pas très parlant) mais aussi $f=500/10^3=0,5 \text{ h}^{-1}$. Le bioréacteur est renouvelé à 1/2 chaque heure (assez parlant).

5- Applications des enzymes en biotechnologie

5-1 Production d'enzymes industrielles

L'utilisation des biocatalyseurs est en forte croissance notamment en industrie. Grâce à l'activité catalytique des enzymes que des milliers de réactions biochimiques sont réalisées par les cellules vivantes pour leur métabolisme. La spécificité chirale des enzymes constitue un deuxième avantage. Dans le domaine pharmaceutique en particulier, les résolutions énantiomériques enzymatiques et les synthèses enzymatiques de produits sont de plus en plus requises. Les produits biologiquement actifs étant de plus en plus complexes et présentant des centres chiraux de plus en plus nombreux, l'utilisation des voies enzymatiques présente des avantages économiques et techniques significatifs par rapport à la chimie traditionnelle.

L'enzyme est produite dans des fermenteurs de très grands volumes (plusieurs m³) à partir d'organisme génétiquement modifié du champignon *Aspergillus niger* avec un procédé économique en ressources. Le produit est vendu après extraction, et séchage sans purification sous forme de préparation enzymatique. Puis purification

Natuphos est mélangée à l'alimentation de porc et de volaille. Une fois consommée par l'animal, elle aide à mieux assimiler le phosphate contenu dans l'aliment d'origine végétale. Ceci diminue significativement la quantité de phosphate inorganique ajouté à l'aliment. Les excréments de l'animal contiennent ainsi moins de phosphates et la contamination du sol et de l'eau est réduite de 1/3.

Le même procédé permet à l'entreprise de produire d'autres enzymes qui facilitent la digestion de certains polysaccharides comme Natugrain : xylanase.

Le procédé industriel typique pour la production d'enzymes est la culture en profondeur en milieu aérobie utilisant un microorganisme produisant en grande quantité une enzyme extracellulaire. Les principaux avantages des enzymes de fermentation par rapport aux enzymes d'extraction :

- ◆ Production en grande quantité en fermenteur,
- ◆ Production indépendante des contraintes géographiques et saisonnières,
- ◆ Matière première bon marché
- ◆ Manipulation génétique facile
- ◆ mutants hyperproducteurs,
- ◆ Purification plus facile en cas d'enzymes extracellulaires.

5-2 L'industrie alimentaire

Le brunissement enzymatique est une réaction très néfaste pour les fruits, les légumes vendus frais etc. Les conséquences de ce brunissement sont la perte de la valeur nutritive, la décoloration et la détérioration de la qualité organoleptique de l'aliment. L'utilisation des enzymes dans l'alimentaire ne se restreint pas à l'exploitation des propriétés catalytiques de ces dernières, elle regroupe également les opérations visant à les contrôler voir les inhiber.

Les lourdes pertes engendrées par le brunissement enzymatique ont suscité un intérêt considérable pour la compréhension et le contrôle de l'activité polyphénoloxydasique dans les aliments. Ainsi plusieurs stratégies ont été développées pour prévenir ce phénomène physiologique. Elles concernent l'utilisation d'agents réducteurs tels que l'acide ascorbique, les composés thiolés, les sulfites et des traitements physiques.

Exemple des brunissements enzymatiques observés dans certains aliments (exemple de la pomme de terre ou de la banane tranchée) dus à la formation des quinones issus de l'oxydation des polyphénols.

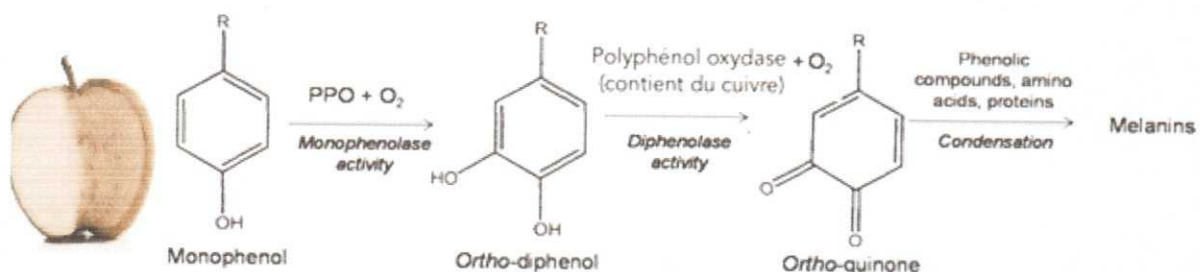


Figure 47. Réaction d'oxydation qui entraîne le brunissement enzymatique.

Cette réaction est catalysée par la polyphénoloxydase (PPO). Cette dernière est désactivée avec des traitements thermiques appropriés ou par modification des conditions catalytiques de la PPO (acidification du milieu).

Un autre exemple, celui du rancissement (odeur et goût de rance dans les aliments riches en matière grasse) est dû essentiellement à l'action de la lipoxygénase. Cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation des acides gras polyinsaturés et conduit à l'apparition de molécules responsables du phénomène de rancissement. Les procédés appliqués dans les IAA font souvent appel au « vide », absence d'oxygène ou aux procédés de dénaturations d'enzymes indésirables.

5-3 Biocapteurs enzymatiques

L'histoire des biocapteurs a débuté dans les années 1950 grâce à l'élaboration par **L. Clark** de la première électrode capable de mesurer la concentration en oxygène dissous dans le sang. Le

couplage de cette électrode à oxygène à une membrane enzymatique renfermant la glucose oxydase a par la suite permis la détermination de la teneur en glucose dans le sang et dans différentes autres solutions biologiques. A la fin des années 70, **Guilbault** a créé un dispositif pour doser l'urée dans le sang et l'urine. Depuis ces premières ébauches, les biocapteurs ne cessent de susciter l'intérêt des chercheurs et le progrès accomplis dans ce domaine a permis le développement de dispositifs implantables chez des animaux de laboratoire et même chez des patients

5-3 -1 Définition.

Un capteur ou biocapteur enzymatique peut considéré comme la combinaison de tout type de transducteur avec une fine couche enzymatique destinée, en générale, à mesurer la concentration d'un substrat. La réaction enzymatique assure la transformation du substrat en produit de réaction détectable par le transducteur. Les biocapteurs enzymatiques utilisent une variété de transducteurs. Le premier biocapteur, décrit dans la littérature par Clark et Lyons, se basait sur l'utilisation d'oxydase de glucose par détection électrochimique. Ce principe a été depuis largement étendu pour le développement de nouveaux biocapteurs en particulier basés sur les oxydoréductases (comme la tyrosinase, la peroxydase et la lactase) et les hydrolases (cholinestérases). Généralement ces biocapteurs ont été classés en deux catégories:

- Ceux qui mesurent l'inhibition d'une enzyme spécifique due à la présence d'analytes cibles;
- Ceux qui mesurent la transformation catalytique d'analytes cibles par une enzyme spécifique.

5-3-2 Fonctionnement

La représentation schématique d'un capteur enzymatique est donnée par la figure 2.1 la surface sensible du transducteur est mise en contact avec la couche enzymatique. On suppose qu'il n'existe pas de transfert de masse à travers cette interface. La face externe de la couche enzymatique est trempée dans une solution contenant le substrat à doser. Ce substrat va migrer vers l'intérieur de cette couche et sera décomposé en produit de réaction dès qu'il entrera en contact avec l'enzyme immobilisée. Pour assurer une mise en équilibre rapide des concentrations, la membrane enzymatique doit être aussi fine que possible et la solution bien agitée pour assurer un apport constant en substrat. En résumé, les différentes étapes mises en jeu au cours du fonctionnement du capteur enzymatique sont :

- 1- Transport du substrat de la masse de la solution vers la couche enzymatique.
- 2- Diffusion du substrat dans cette couche, accompagnée de la transformation enzymatique du substrat en produit de réaction.
- 3- Migration du produit vers le transducteur.

4- Conversion de la concentration du produit à cette interface, par le transducteur, en signal électrique [

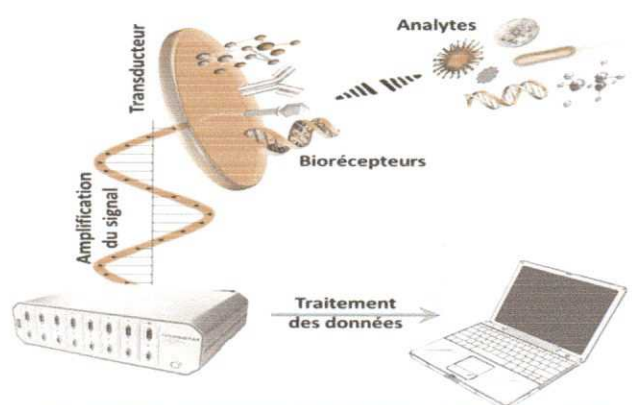


Figure 48. Représentation schématique d'un capteur enzymatique

5-3-3 Les enzymes artificielles

Une enzyme artificielle est une molécule synthétique relativement petite créée pour imiter le site actif d'une enzyme naturelle. Elle est bâtie à partir d'une molécule hôte, responsable de la liaison sélective avec le substrat, et à laquelle on ajoute des groupes fonctionnels pour obtenir une activité catalytique. Initialement, les molécules hôtes utilisées étaient essentiellement des cyclodextrines, des éthers couronnes ou des calixarènes. Même si les systèmes artificiels sont capables d'accélérer une réaction par un facteur 1000, leurs performances restent encore très en dessous des performances réalisées par les enzymes naturelles ($\times 10^6$). Depuis, d'autres approches ont suivi telles que l'utilisation de peptides ou d'anticorps (abzymes).

5-3-3-1 Les abzymes

Les anticorps catalytiques (aussi appelés abzymes) sont des anticorps capables de catalyser une réaction chimique. Ils sont normalement produits artificiellement. Par rapport à une enzyme normale, ils possèdent une meilleure spécificité par rapport au substrat. Un autre avantage est qu'ils peuvent être produits pour catalyser toute sorte de réactions, comme la réaction de **Diels-Alder**. Leur nom a été construit à partir des mots antibody (anticorps en anglais) et enzyme. Comme toutes les enzymes, ils fonctionnent en stabilisant l'état de transition de la réaction. En pratique, ils sont développés et sélectionnés à l'aide d'une molécule ressemblant à cet état. Les premières abzymes obtenues en utilisant des analogues d'états de transition furent décrites simultanément, en **1986**, par les équipes américaines de **Richard Lerner** et de **Peter Schultz**. Ces abzymes catalysaient l'hydrolyse de liaisons chimiques simples, esters et carbonates. Depuis lors, de très nombreuses abzymes ont été

produites, catalysant des réactions très diverses d'hydrolyse (de liaisons esters, carbonates, amides ou glycosidiques), de formation de liaisons (amides ou imines), d'isomérisation ou encore des réactions pour lesquelles aucun catalyseur biologique n'était connu, comme la réaction chimique de **Diels- Alder**. Actuellement, des recherches sont menées dans l'espoir de pouvoir utiliser des abzymes à des fins thérapeutiques.

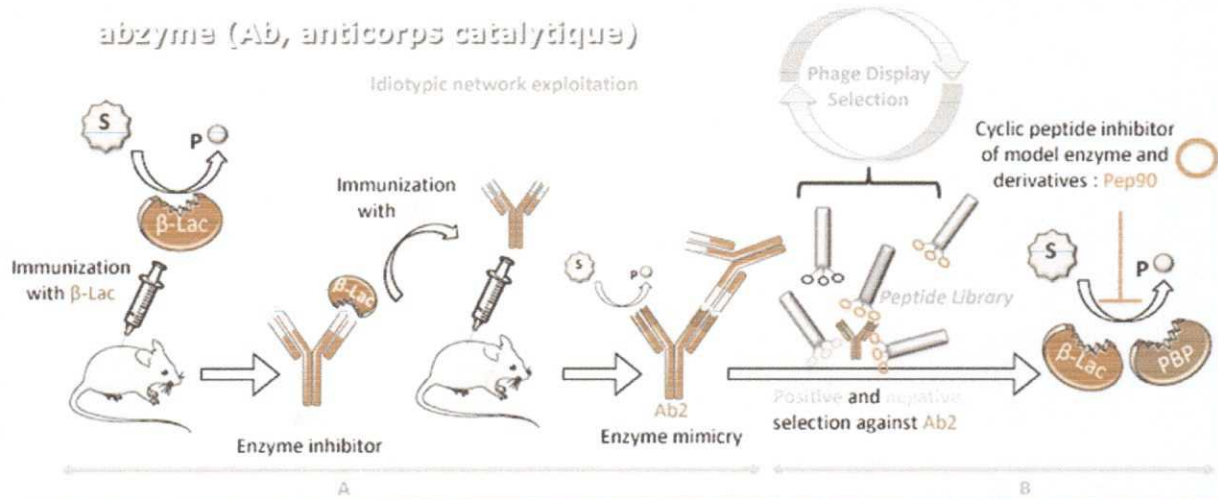


Figure 49. Anticorps catalytiques

5-3-3-2 Cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des molécules cycliques naturelles constituées de sous-unités glucopyranose liées en α -(1,4) (des oligosaccharides cycliques). Ces produits naturels provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*, ont été découverts en 1891 par **Villiers**. Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes se composent de 6,7 ou 8 unités α D-glucopyranose en configuration chaise reliées entre elles par des liaisons α -(1,4). Elles sont dénommées respectivement α -, β - et γ -cyclodextrine. Des familles de plusieurs dizaines de sous-unités ont été synthétisées dans des buts de recherche. La cavité des cyclodextrines est tapissée de fonctions hydroxyles qui, selon le pH de la solution, peuvent être sous forme acide (OH) ou sous forme basique (O⁻). Il en résulte une potentialité de catalyse acido-basique assimilable à celle d'enzymes comme la ribonuléase et La conversion des cyclodextrines en molécules catalytiques ou enzymes artificielles a été également envisagée en utilisant la β -cyclodextrine à la quelle a été fixé un groupement: O-[4(5)-mercaptométhyl-4(5)-méthyl imidazol-2-yl] benzoate, on obtient une molécule dont le groupe hydroxyle, un noyau imidazole et un groupe carboxylate miment le site actif de la chymotrypsine (chymotrypsine de R. Breslow). Ces molécules sont capables de reconnaître et

fixer un substrat parmi un ensemble de molécules et de catalyser une réaction. La spécificité de cette catalyse pouvant être modifiée par variation de leur architecture interne.

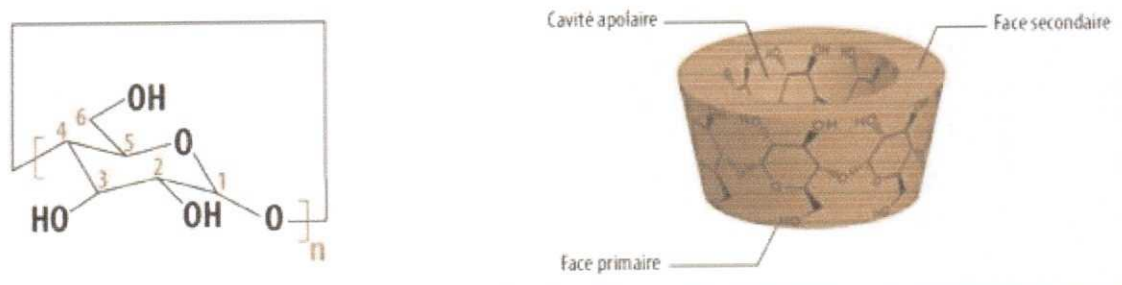


Figure 50. Représentation schématiques des dextrines

Références

Fig	Références
1	Peter H Raven, Kenneth A Mason, Georges B Johnson · Biologie - Page 125 2017
2	Gregory A. Petsko, Dagmar Ringe · Structure et fonction des protéines. 2008
3-4	Harry Mark Greenblatt · The Structure of the Complex of Polypeptide Chymotrypsin. 1988
5	Donald Voet, Judith G. Voet · Biochimie. 2016
6	J.H. Wilkinson · Isoenzymes. 2012
7	Salima Daou · Étude fonctionnelle d'un nouveau complexe multi-enzymatique 2015
8- 9.32	Gregory A. Petsko, Dagmar Ringe · Structure et fonction des protéines - Page 47 2008
10	Donald Voet, Judith G. Voet · Biochimie - Page xviii. 2016
11- 27.32	Jeannine Yon-Kahn, G. Hervé · Molecular and Cellular Enzymology - Page 60 2011
28	Marie Daval · Rôle de l'AMP-activated protein kinase dans la régulation du ... 2007 ·
29	Luc Fetler · CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS LIES A LA TRANSITION . 1995
30-31	Gregory A. Petsko, Dagmar Ringe · Structure et fonction des protéines - Page 66. 2008
33	Jean-Pierre Abita · La structuration des centres actifs des protéines . 1972
34-35	Donald Voet, Judith G. Voet · Biochimie - Page 531. 2016
36-37	Eduardo D. P. De Robertis, E. M. F. De Robertis · Biologie cellulaire et moléculaire - Page 61. 1983
38.39	Helmut Determann · Gel Chromatography: Gel Filtration · Gel Permeation · 2013
40-42	Mohamed Ghoul · Mise en oeuvre des procédés enzymatiques et des bactéries lactiques dans les industries agro-alimentaires. 2023
43	J. Pelmont, Enzymes Catalyseurs du monde vivant Grenoble Sciences, (2000) 1040
44	http://www.perrin33.com/enzym/tech/bioreacteur-ez_4.php
45	Référence ; http://www.perrin33.com/enzym/tech/bioreacteur-ez_4.php
46	http://www.perrin33.com/enzym/tech/bioreacteur-ez_4.php
47	Francesca Taranto, et al. Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. Int J Mol Sci. 2017 Feb; 18(2): 377
48	Laurence de Viguerie · Propriétés physico-chimiques et caractérisation. 2019 ·
49	Elsa Nedonchelle · Les anticorps catalytiques: des outils pour la production et l'étude des anticorps catalytiques semi-synthétiques et auto-immuns... 2000
50	Nadia Morin-Crini, Grégorio Crini . Cyclodextrines réticulées pour traiter des eaux contaminées. 2017

Références

- 1- Athel CORNISH-BOWDEN. Cinétique enzymatique. 2005.**
- 2- Jean-Pierre Sine. Enzymologie et applications. 2010.**
- 3- Geneviève Durand, Jean-Louis Beaudeau. Biochimie médicale. Marqueurs actuels et perspectives. 2011.**
- 4- Emmanuel Jaspard · Enzymologie fondamentale. 2019.**
- 5- Denis Riendeau, Robert Ménard. Enzymologie. 1995.**
- 6- Pierre Monsan. Catalyse et génie enzymatique. 2004.**
- 7- Mohamed Ghoul. Mise en oeuvre des procédés enzymatiques et des bactéries. 2023.**
- 8- Satish Kumaran. Immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs. 1991.**
- 9- Jeffrey W. Kelly, Thomas O. Baldwin. Applications of Enzyme Biotechnology. 2013.**
- 10- Wolfgang Aehle. Enzymes in Industry: Production and Applications. 2008.**
- 11- Julio Polaina, Andrew P. MacCabe. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. 2007.**