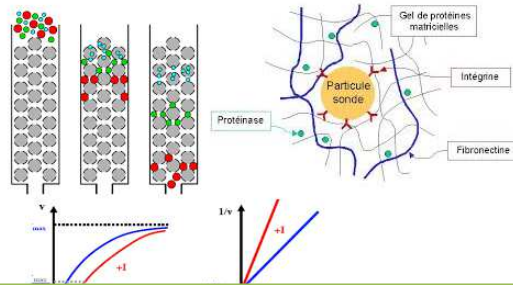


République Algérienne Démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة احمد بوقرة_ بومرداس
Université M'Hamed Bougara de Boumerdes
Faculté des Sciences
Département de Biologie



POLYCOPIE PEDAGOGIQUE



Cours et travaux dirigés de génie enzymatique

Cours destiné aux étudiants Master 1
Nutrition et Sciences Alimentaires, Biochimie Appliquée et
Biotechnologie Microbienne

Présenté par le Docteur : LAGHA-BENAMROUCHE SAMIRA

Année universitaire 2021/2022

SOMMAIRE

PARTIE I : PARTIE COURS

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : NOTIONS GENERALES	3
I.1. Définition	3
I.2. Cofacteur et coenzyme	3
I.3. Structure de l'enzyme	4
I.4. Spécificité enzymatique	5
I.5. Classification et nomenclature des enzymes	8
I.6. Catalyse enzymatique (Energie d'activation et état de transition)	8
CHAPITRE II : CINETIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE	12
II.1. Notion de la vitesse initiale	12
II.2. Equation de Michaelis Menten et représentation graphique (Lineweaver-Burk et Eadie-Hoftsee)	14
II.3. Signification de Vitesse maximale et constance Michaelis	16
II.4. Unités enzymatiques et activité spécifique	17
CHAPITRE III: LES EFFECTEURS DE LA REACTION ENZYMATIQUE.....	18
III.1. Influence des paramètres physicochimiques	18
III.1.1. Effet de la température	18
III.1.2. Effet de pH	19
III.1.3. Effet de la force ionique	21
III.1.4. Métaux et cations divalents	22
III.2. Protéolyse	22
III.3. Inhibiteurs	22
III.3.1. Inhibition compétitive	23
III.3.2. Inhibition non compétitive	25
III.3.3. Inhibition incompétitive	28
CHAPITRE IV : LES ENZYMES INDUSTRIELLES	30
IV.1. Préparation des enzymes	30

IV.1.1. Sources	30
IV.1.1.1. Cellules végétales	30
IV.1.1.2. Cellules animales	30
IV.1.1.3. Cellules microbiennes	30
IV.2. Procédé d'obtention	32
IV.2.1. Extraction	32
IV.2.1.1. Procédés utilisés pour les tissus végétaux et animaux (procédé mécanique)	33
IV.2.1.2. Procédés appliqués aux cellules microbiennes	33
IV.2.1.2.1. Fermentation en milieu solide	34
IV.2.1.2.2. Fermentation en milieu liquide	38
IV.2.2. Fractionnement	41
IV.2.2.1. Fractionnement par les sels ou relargage (procédé le plus utilisé)	41
IV.2.2.2. Précipitation isoélectrique	42
IV.2.2.3. Coagulation par la température	42
IV.2.2.4. Précipitation par les solvants organiques (surtout les alcools)	43
IV.2.3. Purification	43
IV.2.3.1. Chromatographie d'exclusion (filtration sur gel, perméation ou diffusion)	43
IV.2.3.2. Chromatographie d'échange d'ions	43
IV.2.3.3. Chromatographie d'affinité	44
IV.3. Enzymes immobilisées et leurs intérêts.....	45
IV.3.1. Méthodes d'immobilisation des enzymes	45
IV.3.1.1. Adsorption physique	45
IV.3.1.2. Encapsulation (inclusion dans un gel)	46
IV.3.1.3. Greffage covalent	47
IV.3.2. Propriétés des enzymes immobilisées	49
IV.4. Domaines d'applications des enzymes	49
IV.4.1. Application dans l'agro-alimentaire	49
IV.4.1.1. Usage dans la panification	49
IV.4.1.2. Usage dans la préparation des boissons	50
IV.4.1.2.1. Clarification enzymatique des jus de fruits	51

IV.4.1.2.2. Brasserie	51
IV.4.1.3. Usage dans la transformation des matières grasses et raffinage des huiles végétales	53
IV.4.1.4. Usage dans les produits laitiers	54
IV.4.1.5. Usage dans les produits carnés	55
IV.4.1.6. Enzymes et qualité hygiénique des aliments	55
IV.4.2. Application dans le domaine de la biologie moléculaire	56
IV.4.3. Applications industrielles	56
IV.4.3.1. Industrie de papier	56
IV.4.3.2. Industrie des détergents	57
IV.4.3.3. Desencollage de textile	58
IV.4.3.4. Industrie de cuir	58
PARTIE II : PARTIE TRAVAUX DIRIGES	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	78

AVANT PROPOS

Le contenu de cette matière est destiné aux étudiants de niveau Master de spécialités Biochimie Appliquée, Biotechnologie Microbienne, Nutrition et Sciences Alimentaires. Ce cours permet aux étudiants d'acquérir des connaissances élémentaires concernant l'outil de base du génie enzymatique qui est l'enzyme (la structure, le fonctionnement, les propriétés des réactions enzymatiques et la détermination des paramètres cinétiques en présence ou en absence des effecteurs de la réaction enzymatique), et d'améliorer leurs connaissances sur les différentes techniques d'extraction, de purification et d'utilisation des enzymes à des fins industrielles.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structures des protéines	04
Figure2 : Représentation schématique d'une enzyme	05
Figure 3 : Diagramme énergétique de l'état de transition	09
Figure 4 : Heurtement des réactants, dégagement de chaleur et production d'énergie d'activation	09
Figure 5 : Effet d'un catalyseur enzymatique sur le diagramme énergétique d'une réaction	10
Figure 6 : Le diagramme énergétique d'une réaction de décomposition de l'eau oxygénée en présence et en absence de catalyseurs	10
Figure 7 : Diagramme énergétique des réactions intermédiaires	11
Figure 8 : Les phases de la cinétique enzymatique	12
Figure 9 : Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse de la réaction	13
Figure 10 : Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de la réaction	13
Figure 11 : Hyperbole de Michaelis-Menten	15
Figure 12 : Courbe des doubles inverses (Lineweaver-Burk)	15
Figure 13 : Courbe des doubles inverses (Eadie Hofstee)	16
Figure14 : Courbe caractéristique de l'activité enzymatique en fonction de la température	18
Figure15 : Effet de la température sur la vitesse de l'activité enzymatique	19
Figure 16 : Effet du pH sur la vitesse de la réaction enzymatique	20
Figure 17 : pH optimal de quelques enzymes (acide, neutre et basique)	21
Figure 18 : Effet de la force ionique sur la peroxydase (POD)	22
Figure 19 : Inhibition compétitive (hyperbole)	24
Figure 20 : Inhibition compétitive (double inverse)	25
Figure 21 : Inhibition non compétitive (hyperbole)	26
Figure 22 : Inhibition non compétitive (double inverse)	27
Figure 23 : Inhibition incompétitive (hyperbole)	28
Figure 24 : Inhibition incompétitive (double inverse)	29
Figure 25 : Représentation schématique d'un processus d'isolement et de purification d'une enzyme	33
Figure 26 : Schéma général d'un fermenteur	34
Figure 27 : Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS	35
Figure 28 : Cinétique de croissance microbienne en milieu non renouvelé (batch)	39

Figure 29 : Exemple d'un fractionnement par le sulfate d'ammonium d'un extrait musculaire de lapin	42
Figure 30 : Chromatographie d'exclusion	43
Figure 31 : Schéma de l'interaction entre la résine et l'ion retenu dans le cas d'une résine anionique	44
Figure 32 : Chromatographie d'affinité	45
Figure 33 : Adsorption des enzymes sur un support	46
Figure 34 : Encapsulation des enzymes	47
Figure 35 : Greffage covalent des enzymes	48
Figure 36 : Exemple d'immobilisation au bromure de cyanogène BrCN étape1: activation du support, étape 2: fixation de l'enzyme	48

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Vitamines hydrosolubles et coenzymes	3
Tableau II : pH optimal de quelques enzymes	20
Tableau III : Exemple de matières premières utilisées comme milieu de production	31
Tableau IV : Avantages et inconvénients de l'inclusion dans un gel	46
Tableau V : Méthodes d'activation des supports	47
Tableau VI : Avantages et inconvénients du greffage covalent	48
Tableaux VII: Principales pectinases	51

INTRODUCTION

Les organismes vivants sont le siège d'innombrables réactions biochimiques. Ces réactions s'effectuent dans des conditions « douces » grâce à la présence de biocatalyseurs, appelés enzymes. Ce sont des acteurs omniprésents dans la vie de la cellule. Ces macromolécules biologiques sont indispensables à la vie cellulaire, ils ont un rôle vital, aucune des réactions métaboliques ne serait possible sans elles.

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique. L'enzyme présente des propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique du métabolisme de l'être vivant qui la produit. Comme tous les catalyseurs, les enzymes agissent à des concentrations très petites. Elles augmentent la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat ou l'équilibre thermodynamique. A la fin de la réaction, la structure de l'enzyme se retrouve inchangée.

Historiquement, les premières biotransformations sont utilisées empiriquement depuis des millénaires, il s'agit des procédés de fermentation du sucre en éthanol dans la préparation des boissons alcooliques, la production du vinaigre par oxydation de l'éthanol, le caillage du lait par fermentation du lactose où les activités catalytiques des enzymes sont responsables de transformations chimiques. Probablement la première application de l'enzyme acellulaire a été dans la fabrication du fromage où la présure obtenue à partir d'estomac de veau a été utilisé pour coaguler les protéines du lait.

De nos jours, les enzymes ont de plus en plus d'applications : agroalimentaires (alimentation humaine et animale), industrielles (cuir, papier, textile et détergents), médicales et pharmaceutiques. L'utilisation des enzymes pour catalyser des réactions d'intérêt industriel présente certains avantages par rapport aux procédés relevant de la chimie organique et de la microbiologie appliquée :

- ✚ Simplicité de l'équipement et des opérations qui peuvent éventuellement être faites en milieu stérile, après filtration des solutions enzymatiques ;
- ✚ Spécificité de la catalyse ;
- ✚ La rapidité et la possibilité des réactions continues, en plusieurs étapes si nécessaires.

Les désavantages principaux des enzymes sont liés à leur instabilité et à leur prix. L'amélioration des techniques de production économique de diverses enzymes microbiennes

par fermentation, la découverte des méthodes de purification par chromatographie d'affinité, la possibilité de fixer des enzymes par différents procédés et de les réutiliser ou de les stabiliser marquent la naissance du génie enzymatique.

La génie enzymatique est une branche de l'ingénierie des bioprocédés qui relève de l'exploitation des enzymes en passant par l'identification de leurs spécificités, les conditions de leur purification, leur modification dans le but d'améliorer leurs propriétés et les conditions optimales de la catalyse enzymatique et enfin la production à grande échelle à des fins appliquées. L'utilisation des enzymes dans divers domaines industriels présente un fort intérêt et explique les efforts faits ces dernières années par la communauté scientifique dans ce sens. Cependant, les enzymes restent des entités faisant partie du domaine du vivant et leur emploi nécessite de prendre certaines précautions notamment afin de conserver leur propriétés catalytiques. De plus chaque enzyme présente des particularités, il n'existe pas de solution universelle applicable à l'ensemble de cette classe de protéines.

Le cours est divisé en 4 chapitres. Le premier chapitre donne des notions générales sur les enzymes (structure, spécificité enzymatique, catalyse enzymatique classification et nomenclature). Le deuxième chapitre traite la cinétique enzymatique Michaélienne à un substrat. Le troisième chapitre est consacré aux modulateurs de la réaction enzymatique et l'effet des inhibiteurs réversible sur la réaction enzymatique. Les deux derniers chapitres sont consacrés aux enzymes industriels (sources, extraction, purification et immobilisation) et leurs applications dans différents domaines (agroalimentaires, industriels (cuir, papier, textile) et en biologie moléculaire.

PARTIE I : PARTIE COURS

Chapitre I : Notions générales

I.1. Définition

L'enzyme est une protéine présentant des propriétés de catalyse spécifique d'une réaction chimique du métabolisme de l'être qui la produit. L'enzyme agit à des concentrations faibles, elle augmente la vitesse de la réaction chimique sans en modifier le résultat. A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée. L'enzyme agit à des conditions relativement douces (Température basse, pH neutre). En enzymologie, on désigne par substrat enzymatique toute molécule subissant une réaction chimique catalysée par une enzyme (Exp. L'amidon est hydrolysé par l'amylase en glucose). Il peut s'agir de molécules complexes, de polymères, de molécules simples (Exp. La catalase dismutant du peroxyde d'hydrogène). On désigne par produit, toute molécule qui résulte de la transformation du substrat au cours d'une réaction catalysée par une enzyme.

I.2. Cofacteur et de coenzyme

Le cofacteur est un corps chimique (ion ou petite molécule minérale) intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique. Exp. Fe^{+2} pour la catalase, Zn^{+2} pour la carboxypeptidase, Mg^{+2} pour la phosphotransférase.

Le coenzyme est une molécule organique, souvent des vitamines, qui servent de transporteurs de groupes fonctionnels ou d'électrons intervenant comme élément indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction, la plupart étant des dérivés de vitamine B. (Tableau I)

Tableau I : Vitamines hydrosolubles et coenzymes

Coenzyme	Vitamine	Principaux types de réactions catalysées
Pyridoxal phosphate (PLP)	Vitamine B6 (pyridoxine)	Transamination des acides aminés Décarboxylation des acides aminés Déamination des acides aminés
Thiamine pyrophosphate (TPP)	Vitamine B1 (thiamine)	Décarboxylation des α -cétoacide Transcétolisation
Coenzyme A (CoASH)	Vitamine B5 (acide panthothénique)	Transfert de groupe acétyle, acyle
Tétrahydrofolate (THF)	Vitamine B9 (acide folique)	Transfert de groupe méthyle
Biotine	Vitamine B8 (vit.H)	Carboxylation

I.3. Structure de l'enzyme

L'enzyme est une protéine globulaire, elle adopte plusieurs degrés d'organisation (Figure1):

- 1- Structure primaire : se définit par la séquence en acides aminés,
- 2- Structure secondaire : La séquence en acides aminés subit des repliements pour former des motifs. On parle de structure en hélice, en feuillet ou en coude. Ces structures sont majoritairement dictées par les liaisons hydrogène.
- 3- Structure tertiaire : la structure tertiaire d'une protéine correspond au repliement de la chaîne polypeptidique en trois dimensions donnant une forme spatiale à la protéine. Ces repliements nécessitent les interactions covalentes comme les ponts disulfures entre les atomes de soufre des résidus cystéines, les interactions électrostatiques comme les liaisons ioniques (par exemple entre la chaîne latérale de l'arginine et de l'aspartate) ou les interactions de type "liaison hydrogène", les interactions de van der Waals et les interactions avec l'environnement de la protéine (solvant, ions, lipides, ...). Cette organisation entraîne une localisation: des acides aminés polaires en surface externe et des acides aminés non polaires vers l'intérieur de la molécule (zone hydrophobe interne) ; C'est au niveau de cette zone que se situe le site actif d'une enzyme. Pour qu'une enzyme soit fonctionnelle, il faut qu'elle adopte une structure tertiaire.
- 4- Structure quaternaire : Représente l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques possédant chacune sa propre structure tertiaire. Chaque monomère est appelé sous-unité et l'agencement tridimensionnel des sous-unités est stabilisé le plus souvent par le biais d'interactions non covalentes.

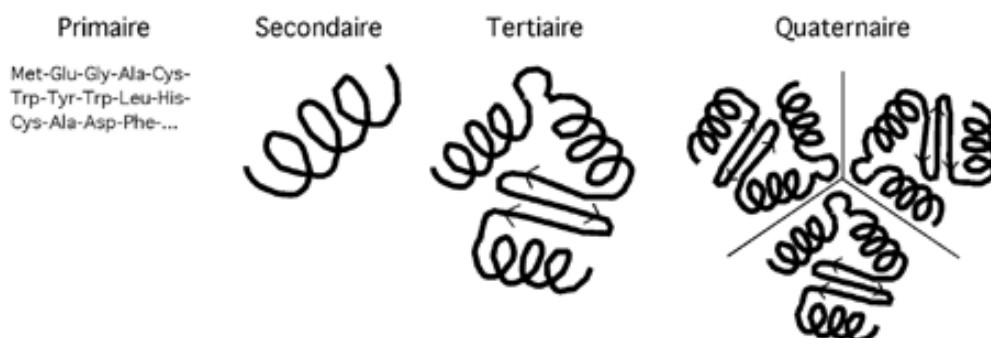


Figure 1 : Structures des protéines

On peut trouver :

- Des enzymes entièrement protéiques (protéine enzymatique) Exp. chymotrypsine, lysozyme,...etc.
- Hétéro-enzymes ou halo-enzymes ou holo-enzyme : enzymes avec deux parties :
Partie protéique (Apoenzyme non active) + **partie non protéique** (coenzymes et ou cofacteur). **Exp.** catalase, phosphotransférase,...etc.

Les cofacteurs et ou coenzymes peuvent être liés de façon covalente ou non covalente à l'enzyme. Ceux qui sont liés fortement (incapables d'être dissociés par dialyse) s'appellent des **groupements prosthétiques**. Lorsque la liaison est faible on parle d'un co-substrat ou co-enzyme. Une enzyme contenant un cofacteur ou un groupement prosthétique s'appelle holoenzyme. Le terme apoenzyme est réservé à l'enzyme sans cofacteur.

Les enzymes sont en général des protéines globulaires. Le site actif est formé d'un site de fixation et d'un site catalytique (Figure2) :

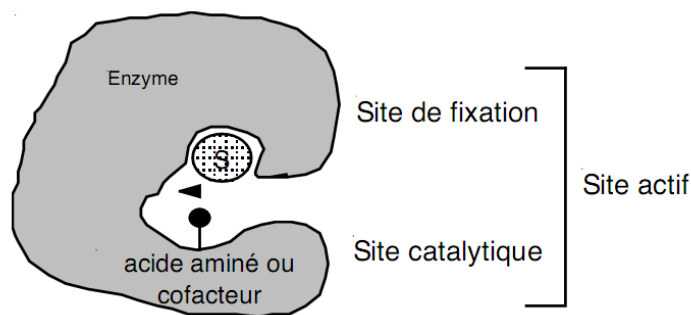


Figure2 : Représentation schématique d'une enzyme.

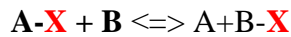
- le **site de fixation** reconnaît la structure du substrat et détermine l'affinité;
- le **site catalytique** permet la transformation du substrat en produit, et détermine la vitesse de la réaction.

I.4. Spécificité enzymatique

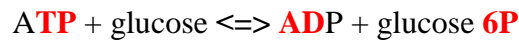
Les enzymes présentent une spécificité pour leur substrat et pour la réaction qu'ils catalysent. Une classe d'enzyme ne reconnaît qu'un type de substrat et la réaction enzymatique est unique.

I.4.1. Spécificité de réaction : Une enzyme ne catalyse qu'un seul type de réaction parmi l'ensemble des réactions qui sont possibles, par exemple le glucose peut être phosphorylé en glucose 6 phosphate (par la glucokinase) ou isomérisé en mannose (par la glucose épimérase), la glucokinase et la glucose isomérase possèdent la même spécificité de substrat mais possèdent des spécificités de réaction différentes.

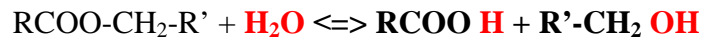
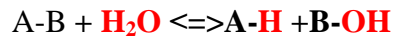
E



Phosphokinases



- **EC 3 : hydrolases** qui catalysent la rupture d'une liaison avec la fixation des éléments d'une molécule d'eau :



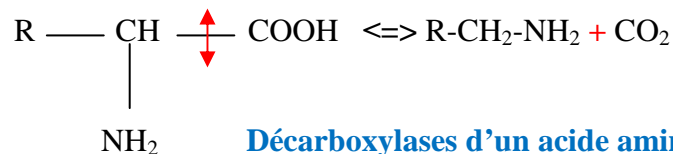
Esterases

- **EC 4 : lyases (ou synthases)** qui rompent diverses liaisons par d'autres procédés que l'hydrolyse et l'oxydation ;



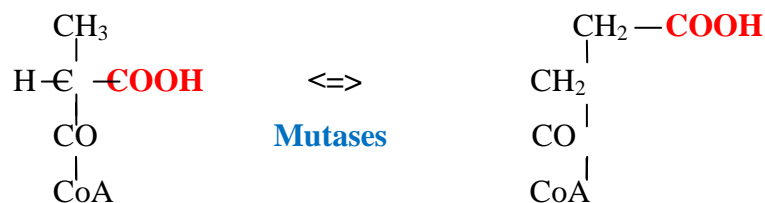
Décarboxylases

(d'acide cétonique)



Décarboxylases d'un acide aminé

- **EC 5 : isomérases** qui catalysent le déplacement d'un groupe à l'intérieur de la molécule sans que la formule brute ne varie.



Mutases

- **EC 6 : ligases (ou synthétases)** qui lient deux molécules avec la rupture d'une liaison à haut potentiel énergétique.

Acetyl CoA synthétase



Avec : ATP : Adénosine triphosphate

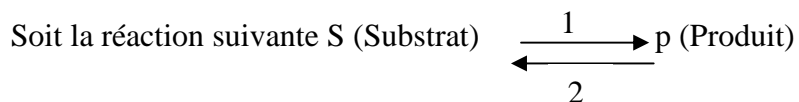
AMP : Adénosine mono-phosphate

PP : pyrophosphate

La nomenclature EC est une classification numérique des enzymes, basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. Chaque code d'enzyme consiste en des lettres majuscules «EC» suivies de quatre nombres séparés par des points. Ces nombres représentent chacun une étape dans la précision de la classification de l'enzyme. Le premier nombre de la nomenclature EC indique le type de réaction catalysée, le second le substrat général impliqué lors de la réaction, le troisième le substrat spécifique impliqué et le quatrième le numéro de série de l'enzyme.

Exemple : l'enzyme **tripeptide aminopeptidase** a le code **EC 3.4.11.4** qui est construit comme suit : **3** signifie une hydrolase, **3.4** signifie hydrolases agissant sur des liens peptidiques, **3.4.11** implique celles qui détachent un acide aminé amino-terminal d'un polypeptide et **3.4.11.4** implique celles qui détachent cet acide aminé amino-terminal d'un tripeptide.

I.6. Catalyse enzymatique (Energie d'activation et état de transition)



L'énergie est la capacité d'un système à effectuer un travail. L'énergie libre de Gibbs (G) exprime l'énergie potentielle d'une molécule et ΔG° est la variation de l'énergie libre d'une réaction. Le sens de déroulement de la réaction dépend de ΔG° qui elle-même dépend de l'état initial de (S) et l'état final (P).

- si S possède plus d'énergie que P, la réaction se fait spontanément dans le sens 1 la réaction est dite exergonique ($\Delta G^\circ < 0$).

- Si P possède plus d'énergie que S, la réaction ne se fait spontanément dans le sens 1 La réaction est dite endergonique ($\Delta G^\circ > 0$).

Les lois de la thermodynamique expliquent qu'une réaction puisse se faire spontanément mais prend beaucoup de temps à se faire et les enzymes accélèrent le taux de réaction. L'enzyme augmente la vitesse d'une réaction thermodynamiquement possible sans en modifier l'équilibre et sans qu'elle ne soit modifiée. La plupart des réactions chimiques, non catalysées, bien que thermodynamiquement possible ($\Delta G^\circ < 0$), n'aboutissent qu'accidentellement à la transformation des molécules en produits et ceci avec de très faibles vitesses.

En effet, les molécules participantes à une réaction chimique passent par un état dont la structure est intermédiaire entre celles des réactifs et celles des produits. Cette structure intermédiaire est appelée « **Etat de transition** » qui implique des liaisons extrêmement faibles lui conférant une grande instabilité (c'est l'état le plus instable de la réaction). Pour atteindre l'état de transition, les nuages électroniques des deux réactants doivent entrer en contact, ceci nécessite un apport d'énergie qualifié de « **Energie d'activation : ΔG^*** » (Figure3).

$$\Delta G^{\ddagger} = -RT \ln K_{eq}^{\ddagger}$$

où ΔG^* : est l'énergie d'activation, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue en Kelvin, La constante d'équilibre K_{eq}^{\ddagger}

$$K_{eq}^{\ddagger} = \frac{[X^{\ddagger}]}{[S]}$$

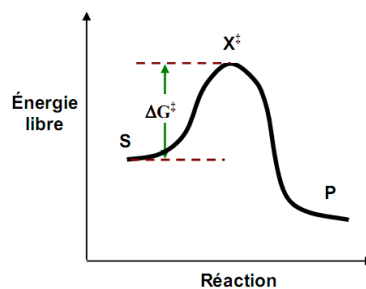


Figure 3 : Diagramme énergétique de l'état de transition

La réaction ne se fera que si les réactants se heurtent avec suffisamment de force pour libérer de l'énergie capable de rompre les liaisons (Figure4).

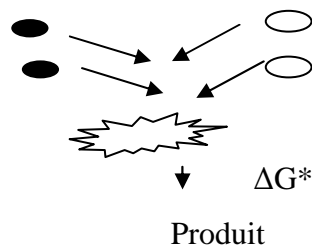


Figure 4 : Heurtement des réactants, dégagement de chaleur et production d'énergie d'activation

Les enzymes sont capables d'abaisser l'énergie d'activation des réactions, de ce fait augmentent les vitesses des réactions.

L'enzyme accélère (catalyse) une réaction en stabilisant l'état de transition, par conséquent diminue l'énergie d'activation (ΔG^*) (Figure 5). L'enzyme est capable de lier les réactants au sein de son site actif et former ainsi un complexe ES.

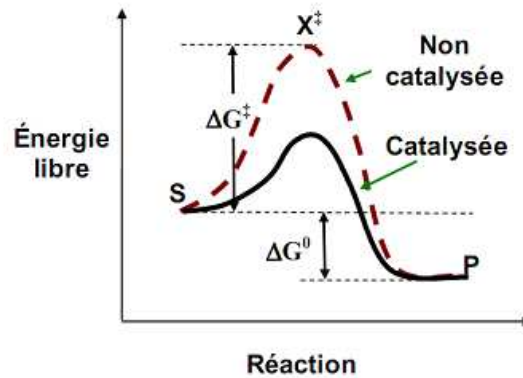


Figure 5 : Effet d'un catalyseur enzymatique sur le diagramme énergétique d'une réaction

Exemple : Soit la décomposition de l'eau oxygénée.

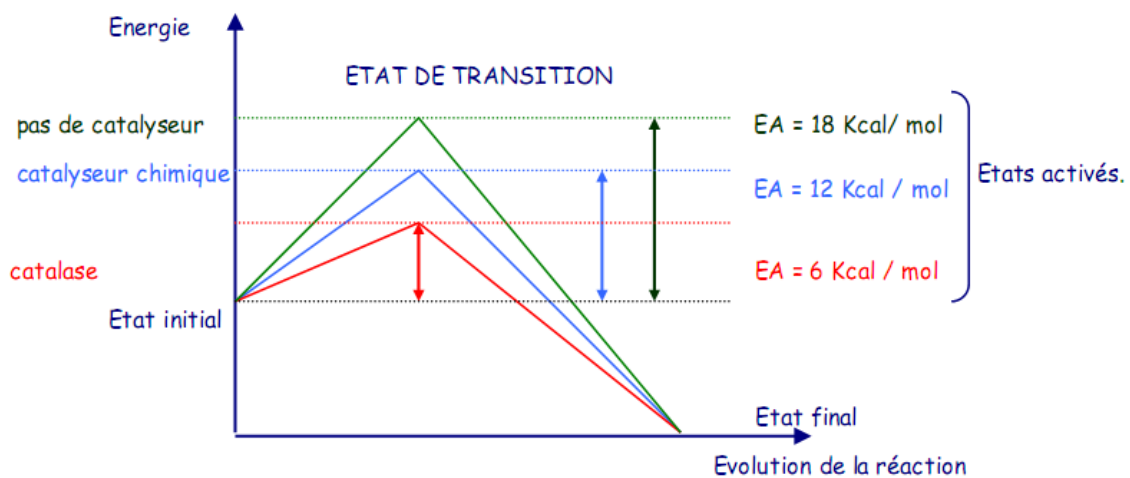
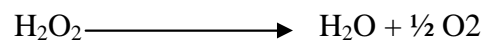


Figure 6 : Le diagramme énergétique d'une réaction de décomposition de l'eau oxygénée en présence et en absence de catalyseurs

La formation du complexe ES permet de :

- orienter les substrats dans une position propice à leur interaction ;
- Diminuer l'hydratation des molécules ;
- Stabiliser l'état de transition ;
- Augmenter la réactivité du substrat.

La catalyse enzymatique se caractérise parfois par plus d'un état de transition séparant des intermédiaires réactionnels plus au moins stables (Figure 7)

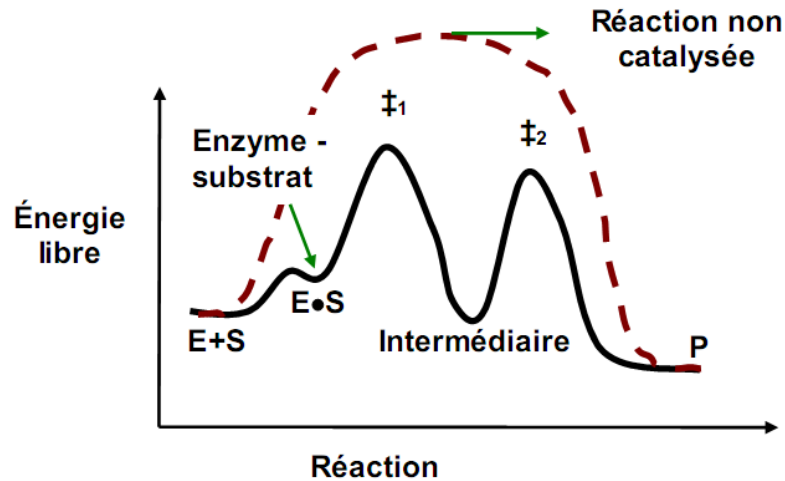


Figure 7 : Diagramme énergétique des réactions intermédiaires

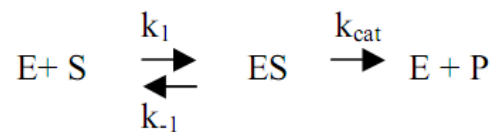
- ΔG^* d'une réaction enzymatique = $\Delta G^*(ES^*1) + \Delta G^*(ES^*2) + \Delta G^*(ES^*3) \dots \dots$
- $\Delta G^*(enzyme) < \Delta G^*(catalyseur\ chimique) < \Delta G^*(réaction\ non\ catalysée)$
- $\Delta G(enzyme) = \Delta G(catalyseur\ chimique) = \Delta G(réaction\ non\ catalysée)$: ΔG ne change pas en présence et en absence de catalyseur ($\Delta G = G_p - G_S$)

CHAPITRE II : CINÉTIQUE ENZYMATIQUE MICHAELIENNE

La cinétique enzymatique est l'étude des variations des vitesses de la réaction en fonction de la concentration en substrat. La vitesse de la réaction est le nombre de mole de substrat transformé ou en produit formé dans un volume et dans un temps donné.

II.1. Notion de la vitesse initiale

On considère la réaction enzymatique suivante :



Avec K_i : constante de vitesse de réaction élémentaire

La vitesse initiale mesure l'apparition du produit au cours du temps dans les conditions expérimentales : T° , pH, salinité,...etc. optimaux.

$$v = -\frac{ds}{dt} = +\frac{dp}{dt}$$

$[S] \gg \gg \gg [E]$ et le temps court : on cherche à rester dans les conditions où $[S] \gg \gg \gg [P]$, dans ces conditions $[S]$ et $[ES]$ sont considérés comme des constantes : c'est la phase stationnaire (Figure 8).

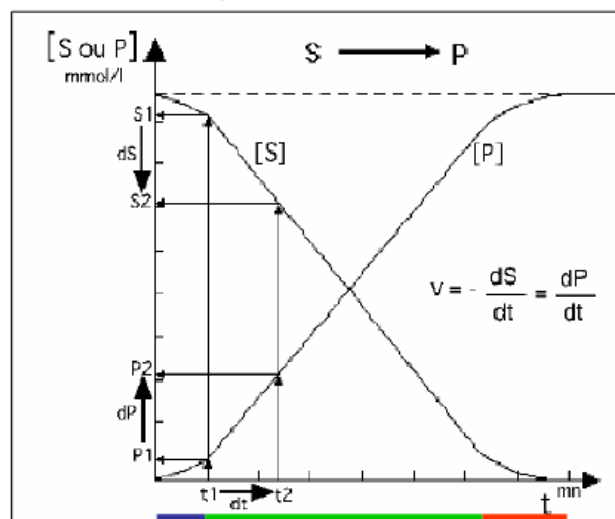


Figure 8 : Les phases de la cinétique enzymatique

- phase pré-stationnaire
- phase stationnaire
- phase post-stationnaire

II.1.1. Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse

On augmente progressivement la concentration en enzyme et on maintient la concentration en substrat constante. Lorsque la concentration de l'enzyme augmente la vitesse initiale augmente aussi.

A t_1 , en condition de vitesse initiale, il y a proportionnalité entre la $[E]$ et la quantité de produit formé. La courbe $V = f([E])$ est une droite ($V = d[P] / dt$)

A t_2 , les conditions initiales ne sont plus vérifiées, il n'y a plus proportionnalité (Figure 9).

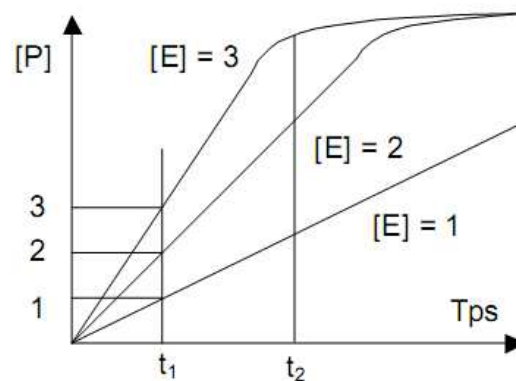


Figure 9 : Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse de la réaction

II.1.2. Influence de la concentration en substrat sur la vitesse

On augmente progressivement la concentration en substrat et on maintient la concentration en enzyme constante. La vitesse initiale augmente avec l'augmentation de la concentration de substrat (Figure 10)

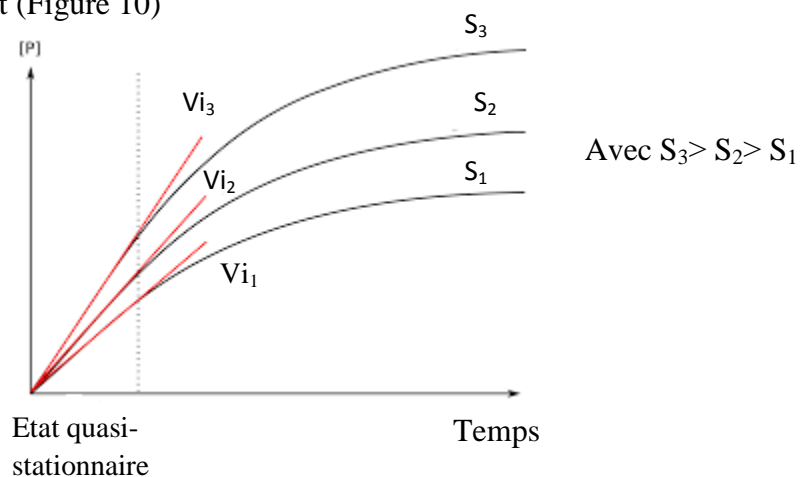
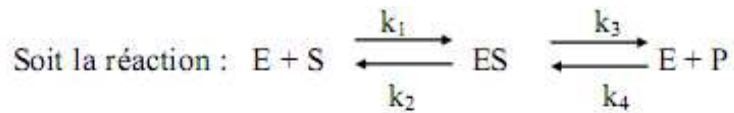


Figure 10 : Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de la réaction

II. 2. Equation de MICHAELIS MENTEN et représentation graphique (LINEWEAVER-BURK ET EADIE-HOFTSEE)



$$\begin{aligned} V_1 &= k_1 [E].[S] & V_3 &= k_3 [ES] \\ V_2 &= k_2 [ES] & V_4 &= k_4 [E].[P] = 0 \end{aligned}$$

La vitesse de disparition du substrat est : $-dS / dt = V_1 - V_2$

La vitesse de l'apparition du produit est : $+dP / dt = V_3$

Donc : $V_1 - V_2 = V_3$

D'où: $k_1 [E].[S] = [ES] (k_2 + k_3)$

Alors :
$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

K_m : constante de Michaëlis est la constante de dissociation du complexe enzyme substrat

Soit $[E_T]$ la concentration totale de l'enzyme dans le milieu.

La $[E]$ libre s'écrira : $[E] = [E_T] - [ES]$

$$\begin{aligned} K_m \text{ devient alors } : K_m &= ([E_T] - [ES]). [S] / [ES] \\ K_m &= [E_T].[S] / [ES] - [ES].[S] / [ES] \\ K_m &= [E_T].[S] / [ES] - [S] \\ K_m + [S] &= [E_T].[S] / [ES] \\ [ES] &= [E_T].[S] / K_m + [S] \end{aligned}$$

Sachant que la vitesse de la réaction : $V = K_3.[ES]$

On peut donc écrire en remplaçant $[ES]$: $V = k_3.[E_T].[S] / K_m + [S]$

La vitesse est maximale lorsque tout E est combiné à S $[E_T] = [ES]$

$$\begin{aligned} V &= k_3.[E_T] \\ V_{\max} &= k_3.[E_T] \end{aligned}$$

$$v = \frac{V_{\max} . [S]}{K_m + [S]} \quad y = a.x \quad \text{avec } a = V_{\max}/k_m + [S] \quad (\text{Figure 11})$$

La détermination des paramètres cinétiques est difficile et peu précise à partir de l'hyperbole. Expérimentalement, il n'est pas possible de déterminer V_{max} on ne connaît qu'une valeur approchée.

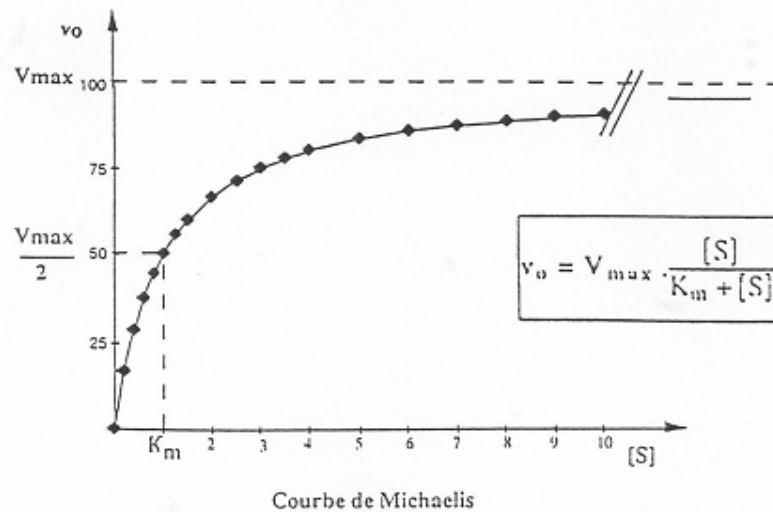


Figure 11 : Hyperbole de Michaelis-Menten

On peut retrouver les deux valeurs importantes V_{max} et K_m grâce à différents traitements mathématiques, parmi lesquels la représentation en double inverse. Représentation Lineweaver-Burk (type : $Y=ax+b$) (Figure 12) et Représentation d'Eadie Hoftsee (Type $Y= - ax+b$) (Figure 13).

A

Représentations linéaires

- Lineweaver-Burk : $\frac{1}{V_i} = f\left(\frac{1}{[S]_0}\right)$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m[S]_0} + \frac{1}{V_m}$$

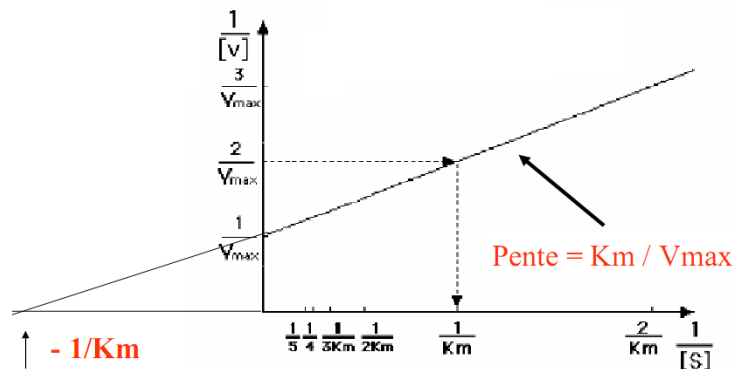


Figure 12 : Courbe des doubles inverses (Lineweaver-Burk)

B Eadie-Hofstee : $V = f\left(\frac{V}{[S]_0}\right)$

$$V_m = \frac{V[[S] + K_m]}{[S]_0} = V + \frac{V}{[S]} K_m$$

$$V = V_m - K_m \frac{V}{[S]_0}$$

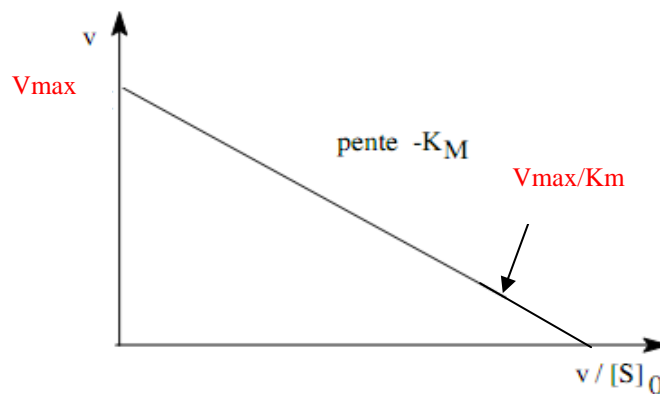


Figure 13 : Courbe des doubles inverses (Eadie Hofstee)

II.3. Signification de la vitesse maximale V_{\max} et la constante de Michaelis K_m

La vitesse maximale (V_{\max})

- ✓ Correspond à la vitesse initiale quand l'enzyme est saturée par son substrat ;
- ✓ Renseigne sur l'efficacité catalytique de l'enzyme $V_{\max} = k_2 [Et] \Rightarrow V_{\max} = k_{\text{cat}}[Et]$;
- ✓ k_{cat} : Turn Over Number « TNO », nombre de molécules de substrat transformé en produit par unité de temps, c'est l'efficacité catalytique de l'enzyme : la fréquence de l'acte catalytique (s^{-1}).

La constante de Michaelis K_m

- ✓ K_m a la grandeur d'une concentration et représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat, K_m est d'autant plus élevée que l'affinité de l'enzyme pour le substrat est plus faible (inversement proportionnelle à l'affinité) ;
- ✓ Concentration initiale de substrat pour laquelle $V_i = 1/2 V_{\max}$, donc la moitié des sites actifs de l'enzyme est occupée par le substrat.

Quand :

$$[S] \gg K_m \Rightarrow V_i = V_{\max} = k_{\text{cat}}[Et]$$

Quand :

$$[S] \lll K_m \Rightarrow V_i = (k_{cat} / K_m) [E] [S]$$

- ✓ Le rapport K_{cat}/K_m : constante de spécificité liée au substrat, permet de déterminer le meilleur substrat pour une enzyme. Le rapport est souvent donné comme mesure de l'efficacité catalytique, car il correspond à une constante de vitesse pour de basses concentrations de substrat $[S] \ll K_m$, donc $(E) = (ET)$

II.3. Unités enzymatiques et activité spécifique

La vitesse est exprimée en unités :

- ✓ **Unité internationale (UI)** est la quantité d'enzyme transformant une μ mole de substrat par minute dans les conditions optimales de dosage.
- ✓ **Katal** est l'activité enzymatique exprimée en mole de substrat transformé par seconde. L'unité usuelle est le nanokatal (1 UI = 16,6 nanokatal).
- ✓ **Activité spécifique (AS)** est l'activité enzymatique exprimée par UI ou Katal par mg de protéine partiellement purifiée (UI/mg de protéine) ou (Katal/mg protéine).
- ✓ **Activité spécifique molaire (ASM)** est le nombre de moles de substrat transformé par mole d'enzyme et par seconde. C'est une caractéristique de l'enzyme et ne peut se calculer que si la préparation enzymatique est pure. L'ASM correspond à la constante catalytique (k_{cat}) ou turn over de la réaction et s'exprime en seconde⁻¹

CHAPITRE III : LES EFFECTEURS DE LA REACTION ENZYMATIQUE

Toute molécule qui modifie la vitesse d'une réaction enzymatique est appelée un effecteur. Les effecteurs qui augmentent l'activité enzymatique sont des activateurs, à l'inverse, ceux qui la diminuent sont des inhibiteurs.

III.1. Influence des paramètres physicochimiques

III.1.1. Effet de la température

La plupart des réactions chimiques s'accélèrent avec la chaleur. En effet, l'augmentation de la température augmente l'énergie thermique (la chaleur) fournie aux particules impliquées. Cette énergie thermique est convertie en énergie cinétique, et plus d'énergie cinétique signifie que les particules se déplacent plus vite et se heurtent plus fréquemment. Dans le cas de réactions contrôlées par une enzyme, l'augmentation de l'énergie cinétique signifie que les substrats vont percuter plus fréquemment le site actif de l'enzyme et former plus de complexes enzyme-substrat et donc plus de produits. Si pour une même durée, plus de produits sont formés à des températures plus élevées qu'à des températures plus basses, la vitesse de réaction aura donc augmenté.

L'activité de l'enzyme augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à un certain seuil qui provoque la dénaturation de l'enzyme (une protéine), diminuant ainsi son activité. La somme de ces deux effets donne une courbe caractéristique de l'activité enzymatique (Figure14)

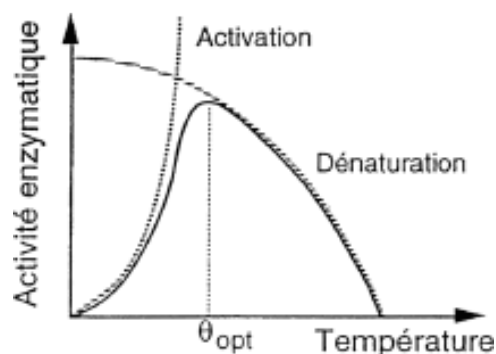


Figure14 : Courbe caractéristique de l'activité enzymatique en fonction de la température

On peut le voir sur le graphique de la figure 15, où au point 1, allant de 0°C à 60°C, la vitesse de réaction augmente à mesure que la température augmente. Le point 2 à 55°-60°C correspond à la température optimale de l'enzyme. C'est la température à laquelle la vitesse de réaction est la plus élevée, où il y a donc le plus de produits formés par unité de temps. Cependant, une fois que la température dépasse 60°C au point 3, les enzymes

commencent à se dénaturer car la température est trop élevée. Au-delà d'une certaine température (à partir de 60°C) on observe une perte souvent irréversible de l'activité : c'est la thermolabilité. Ceci est valable pour la majorité des enzymes sauf pour les organismes thermophiles. Exp. ADN polymérase de *Thermus aquaticus* fonctionne à haute température (72°C)

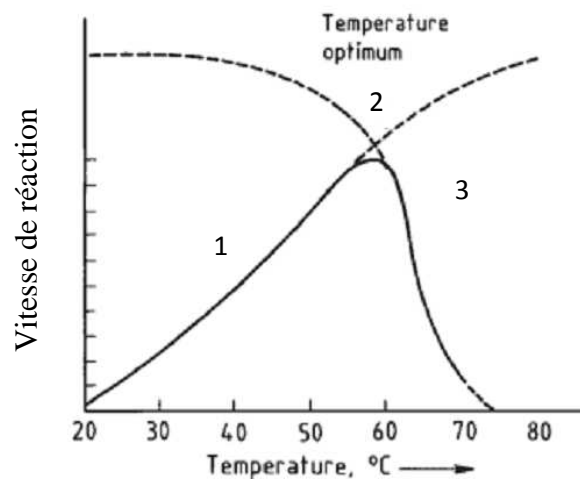


Figure15 : Effet de la température sur la vitesse de l'activité enzymatique

III.1.2. Effet de pH

Le pH, également connu sous le nom de puissance ou potentiel hydrogène, correspond à la concentration d'ions hydrogène dans une solution. Une concentration plus élevée en ions hydrogène indique une solution plus acide et un pH plus bas. Une concentration plus faible d'ions hydrogène indique que la solution est plus basique, ou alcaline, et a donc un pH plus élevé.

Chaque enzyme a un pH optimal ; C'est le pH auquel son site actif est le plus susceptible de percuter avec succès un substrat et donc de catalyser une réaction le plus rapidement possible. Lorsque le pH est significativement modifié au-dessus ou en dessous de ce pH optimal, les enzymes commencent à se dénaturer. Cela modifie la forme du site actif de l'enzyme, de sorte qu'il n'est plus complémentaire à la molécule de substrat et que la réaction contrôlée par l'enzyme ne se produira plus. Le pH modifie l'état d'ionisation des protéines et affecte l'activité enzymatique (modifie la structure tertiaire de l'enzyme ou la charge des acides aminés du site actif).

Le graphique suivant (Figure16) montre les changements de l'activité enzymatique en fonction des variations de pH. Lorsque le pH augmente de 2 à 7, la vitesse de réaction

augmente. D'un pH 7 à un pH 12, la vitesse de réaction diminue. Dans des conditions très acides ou alcalines, la vitesse des réactions enzymatiques est faible.

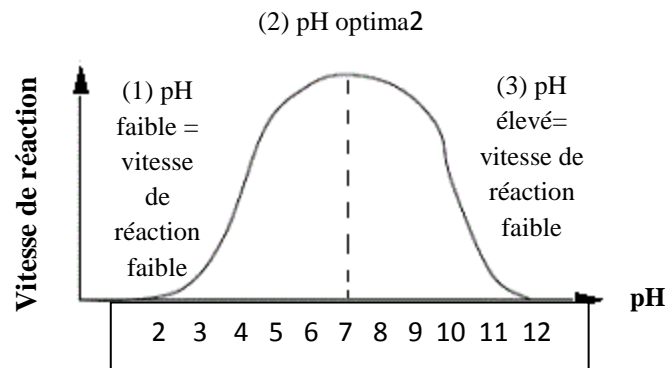


Figure 16 : Effet du pH sur la vitesse de la réaction enzymatique

La plupart des enzymes présentent un maximum d'activité entre des pH allant de 6 et 8. Certaines cependant requièrent des conditions sensiblement plus acides ou plus alcalines (Tableau II, Figure 17)

Tableau II : pH optimal de quelques enzymes

Enzyme	pH optimal
Pepsine	2
Lysozyme	5
Phosphatase acide	5
Chymotrypsine	8
Phosphatase alcaline	9
Lipase pancréatique	7-7,5

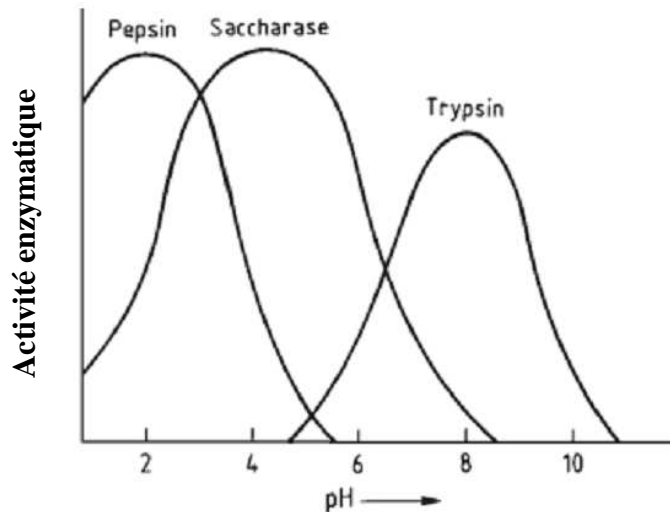


Figure 17 : pH optimal de quelques enzymes (acide, neutre et basique)

III.1.3. Effet de la force ionique

La force ionique influence sur la conformation (ionisation de site actif, structure tertiaire, ...etc.) et la solubilité de l'enzyme et du substrat (diminue ou en augmente leur affinité envers la phase aqueuse).

Une enzyme n'est active que si elle est solubilisée dans le milieu où elle agit. En solution, chaque molécule d'enzyme est hydratée, c'est-à-dire en interaction avec des molécules d'eau. Si on introduit un sel dans cette solution, il est aussi hydraté. Cependant, si ce sel est à une concentration beaucoup plus grande que l'enzyme, il monopolise toutes les molécules d'eau et l'enzyme n'a plus d'enveloppe d'hydratation : elle est séparée du solvant aqueux. C'est le processus de relargage ou "*salting-out*". Outre le pH, la charge de la chaîne latérale des acides aminés dépend de la force ionique : la fixation des substrats chargés dans le site catalytique et leur mouvement sont influencés par la composition en ions du milieu.

L'expression la plus simple de la force ionique I est :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i (C_i \cdot z_i^2)$$

Où C_i est la concentration molaire de l'ion i et z_i sa charge.

La figure suivante (Figure18) montre un exemple de l'effet de la force ionique sur l'activité enzymatique de la peroxydase (POD).

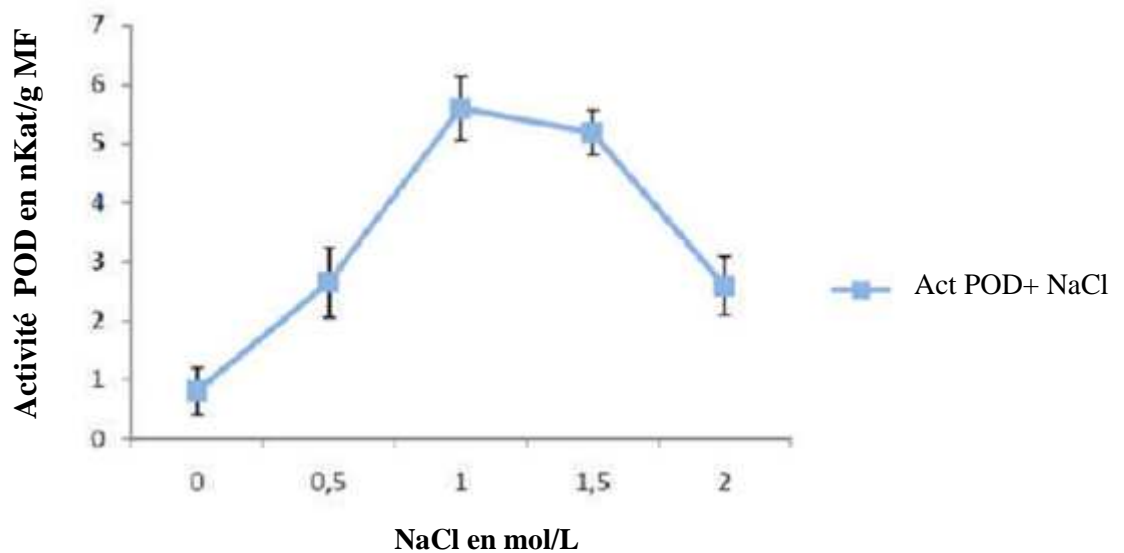


Figure 18 : Effet de la force ionique sur la peroxydase (POD)

III.1.4. Métaux et cations divalents

Les ions métalliques (Fe^{+2} , Ca^{+2} ,...etc.) sont parfois nécessaires à l'activité enzymatique. Ils interviennent :

- Comme éléments dans la catalyse (cofacteurs) ;
- Comme stabilisant de la structure tridimensionnelle de l'enzyme

Quelques exemples :

Cu^{2+} : cofacteur pour le cytochrome c oxydase (enzyme de la chaîne respiratoire) ;

Fe^{2+} ou Fe^{3+} : stabilisant pour les cytochromes et cofacteur pour la catalase ;

Ca^{2+} : stabilisant pour les protéases de la coagulation ;

Mg^{2+} : stabilise la structure de la phosphatase tyrosine et joue également le rôle d'un cofacteur.

Zn^{2+} est un inhibiteur pour la phosphatase tyrosine et un cofacteur pour la carboxypeptidase.

III.2. Protéolyse

Les enzymes sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, leur coupure par les protéases va conduire à leur activation. Exp. La trypsine (enzyme pancréatique) est synthétisée sous forme de trypsinogène (inactive) subit un clivage par l'entérokinase (enzyme intestinale) pour devenir active (trypsine).

III.3. Inhibiteurs

Un inhibiteur est une substance qui a pour effet de diminuer la vitesse d'une réaction enzymatique. Il existe des inhibiteurs réversibles et des inhibiteurs irréversibles.

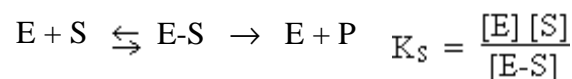
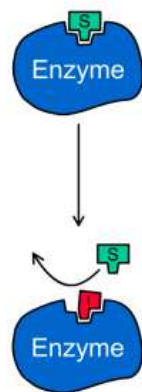
Inhibiteur irréversible : Agent qui se lie de façon covalente avec l'enzyme pour l'inactiver totalement. Exp. L'acide cyanhydrique (HCN) (poison respiratoire). Il forme un complexe stable avec le fer des cytochromes et provoque leur inhibition.

Inhibiteur réversible : Agent qui se lie à l'enzyme avec des liaisons faibles : liaison vanderwals, électrostatique,...l'inhibition n'est pas définitive. On distingue trois types d'inhibition : inhibition compétitive, non compétitive et incompétitive.

III.3.1. Inhibition compétitive

On parle d'inhibiteur compétitif lorsque l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme en compétition avec le substrat. Le complexe EI (enzyme-inhibiteur) n'a pas d'activité.

Un inhibiteur compétitif possède généralement une ressemblance structurale avec le substrat et tous deux entrent en compétition pour se fixer sur le même site enzymatique (effet isostérique). On parle également d'une inhibition compétitive lorsque l'inhibiteur est volumineux et empêche ainsi l'accès du substrat.



K_S et K_I sont les constantes des équilibres de dissociation des complexes intermédiaires E-S et E-I. Dans le cas de cette inhibition, la concentration totale de l'enzyme s'exprime par :

$$[E]_0 = [E] + [E-S] + [E-I]$$

$$[E]_0 = [E] + [E-S] + \frac{[E][I]}{K_I}$$

ou encore :

$$[E] = \frac{[E]_0 - [E-S]}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

Dans le cas de l'inhibition compétitive, l'équation devient :

$$[E-S] = \frac{[E]_0 [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}$$

La vitesse de la réaction enzymatique ainsi inhibée s'exprime alors par :

$$[E] \quad V_o = \frac{V_{max}}{1 + \left(\frac{K_M}{[S]}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad \text{avec} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[E-I]}$$

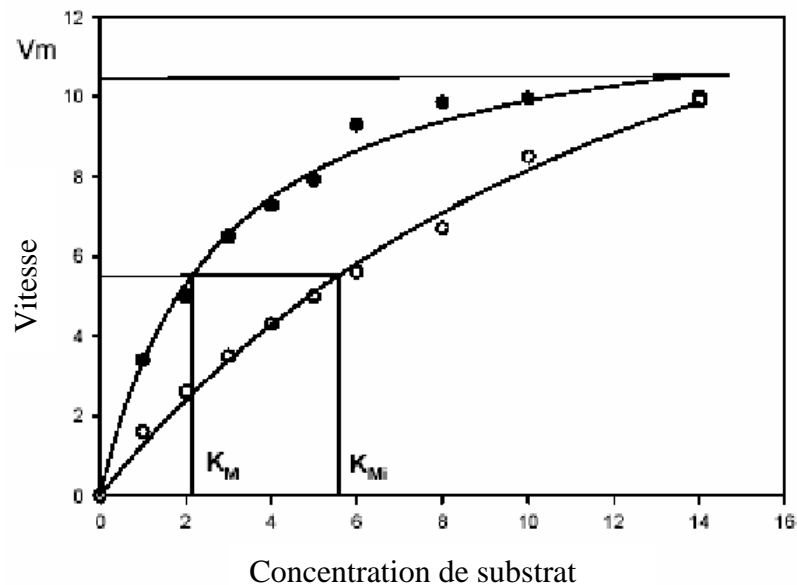


Figure 19 : Inhibition compétitive (hyperbole)

L'équation de LINEWEAVER-BURK devient :

$$[F] \quad \frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

L'intercepte demeure $1/V_{max}$ et la pente est accrue par le facteur $(1 + [I]/K_I)$. La valeur de $1/[S]$ lorsque $1/V_o = 0$ est telle que :

$$\frac{1}{V_{max}} = - \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \frac{1}{[S]}$$

$$\frac{1}{[S]} = - \frac{1}{K_M} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

Une caractéristique importante de l'inhibition compétitive réside dans le fait que les droites tracées pour différentes concentrations de l'inhibiteur convergent toutes en un même point sur l'ordonnée à une valeur égale à $1/V_{max}$. On reconnaît ainsi facilement l'inhibition compétitive (Figure 20).

Parmi les caractéristiques de l'inhibition compétitive :

1. En présence d'une concentration fixe d'inhibiteur, on observe une augmentation du K_m ($K_{mi} > K_m$) => une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat
2. Pas de modification de la V_{max} quand $[S] \gg \gg K_{mi}$

3. Il est possible de lever l'inhibition en augmentant la concentration du substrat.

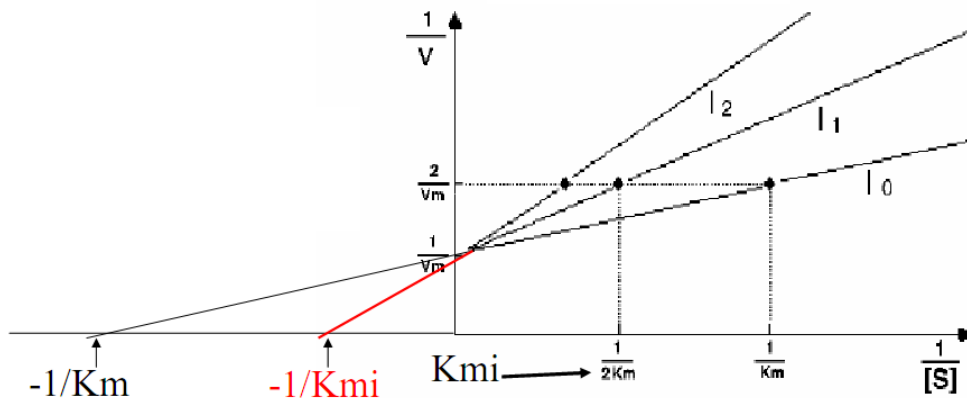
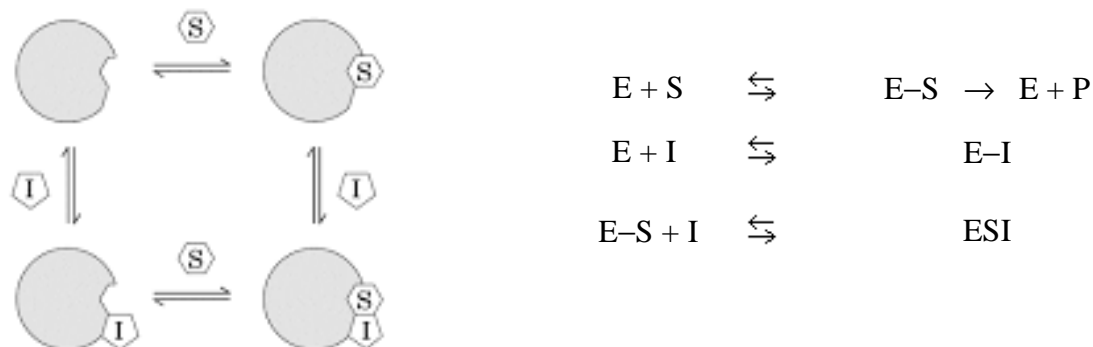


Figure 20 : Inhibition compétitive (double inverse)

III.3.2. Inhibition non compétitive

Un inhibiteur non compétitif peut se lier à la fois, et avec une même affinité, sur l'enzyme libre et sur l'enzyme liée au substrat. Cependant, l'inhibiteur et le substrat n'entrent pas en compétition pour se fixer sur un même site : le substrat se lie au site actif, et l'inhibiteur à un autre site de fixation. L'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la transformation du substrat en produit mais n'influe pas sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat. Le complexe EI (enzyme-inhibiteur) et ESI (enzyme-substrat-inhibiteur) n'ont pas d'activité.



Dans le cas de cette inhibition, la concentration totale de l'enzyme s'exprime par :

[G] $[E]_0 = [E] + [E-S] + [E-I] + [ESI]$

où $[E-I] = \frac{[E][I]}{K_I}$ et $[ESI] = \frac{[E-S][I]}{K_{SI}}$

L'équation [G] se réécrit ainsi :

$$[E]_0 = [E] + [E-S] + \frac{[E][I]}{K_I} + \frac{[E-S][I]}{K_{SI}}$$

Il faut remarquer que les réactions de formation des complexes E-S et ESI sont de même nature, les constantes K_I et K_{SI} seront vraisemblablement identiques.

ou encore :
$$[E] = \frac{([E]_0 - [E-S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

Dans le cas de l'inhibition compétitive, l'équation devient :

$$[E-S] = \frac{[E]_0 [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S] \frac{[I]}{K_I}}$$

La vitesse initiale de la réaction enzymatique affectée par une inhibition non compétitive s'exprime alors par :

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{(K_M + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

avec $K_I = \frac{[E][I]}{[E-I]} = \frac{[E-S][I]}{[ESI]}$

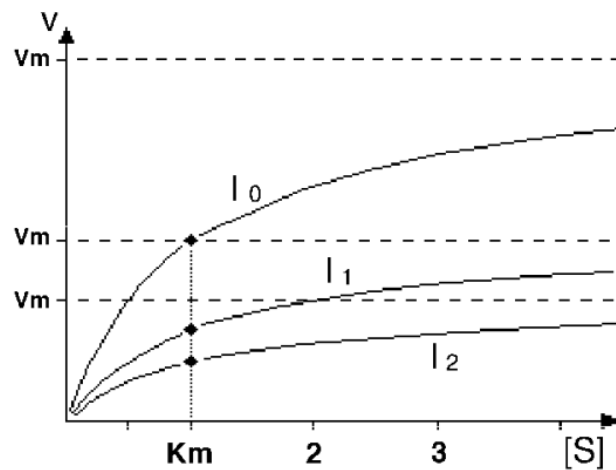


Figure 21 : Inhibition non compétitive (hyperbole)

L'équation de LINEWEAVER-BURK devient :

$$[H] \quad \frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

Si on trace $1/V_0$ versus $1/[S]$, l'intercepte, b , devient :

$$b = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

et la pente, a , à la droite s'écrit :

$$a = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

La valeur de $1/[S]$ lorsque $1/V_o = 0$ peut se recalculer :

$$\frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \frac{1}{[S]} = - \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

$$\frac{1}{[S]} = - \frac{1}{K_M}$$

Une caractéristique importante de l'inhibition non compétitive réside dans le fait que les droites tracées pour différentes concentrations de l'inhibiteur ne convergent pas en un même point de l'ordonnée mais plutôt en un point commun de l'abscisse correspondant à la valeur $-1/K_M$. On la distingue ainsi de l'inhibition compétitive (Figure 22).

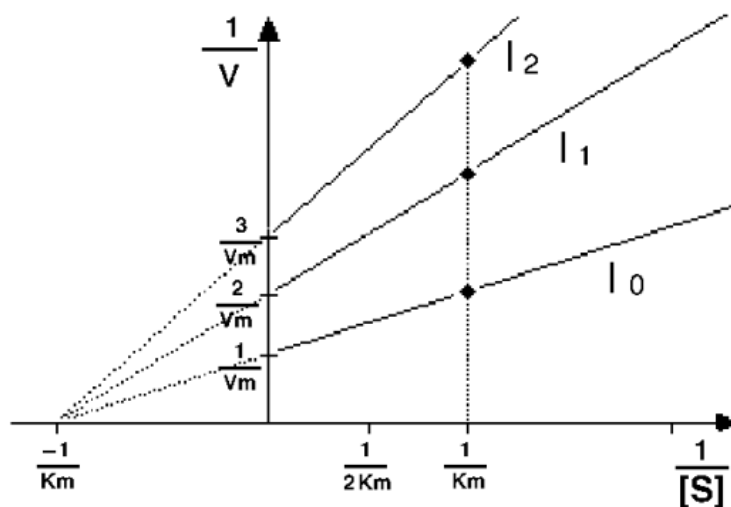


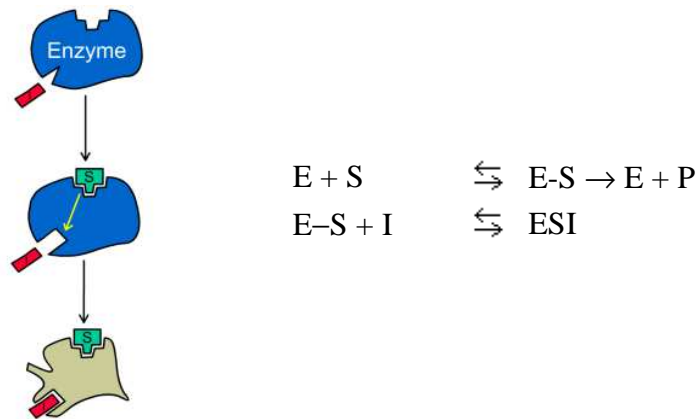
Figure 22 : Inhibition non compétitive (double inverse)

Parmi les caractéristiques de l'inhibition compétitive :

- ✓ Ce type d'inhibition n'est pas levé par un excès de substrat
- ✓ Il se produit une diminution de la vitesse maximale sans aucune modification du K_M car il n'y a pas de compétition entre le substrat et l'inhibiteur pour le site actif

III.3.3. Inhibition incompétitive

Un inhibiteur incompétitif ne se fixe jamais à l'enzyme libre mais seulement à l'enzyme complexée avec le substrat ES et empêche la formation des produits. Généralement, la liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de la conformation de l'enzyme par ajustement induit, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme, et empêche la réaction.



L'analyse du mécanisme réactionnel donne :

$$V_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S] \left(1 + \frac{1}{[S]} \right)}$$

avec $K_I = \frac{[E-S][I]}{[ESI]}$

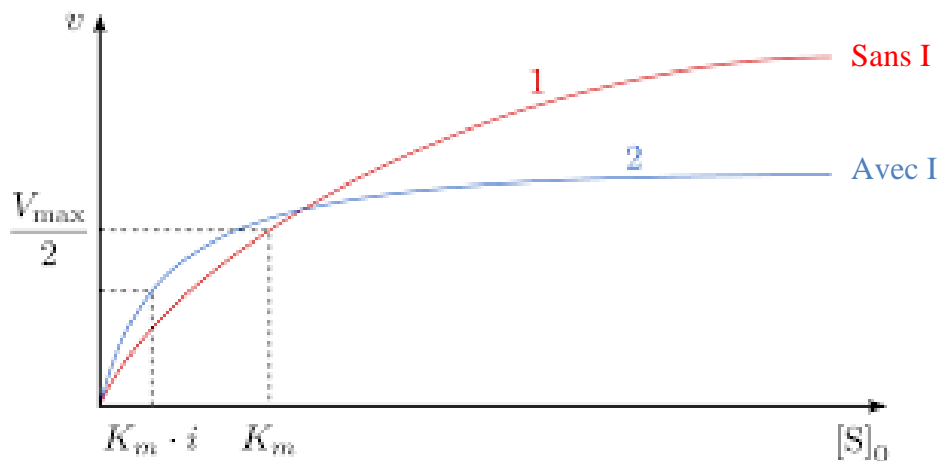


Figure 23 : Inhibition incompétitive (hyperbole)

Le graphique de LINEWEAVER-BURK se réécrit de la manière suivante :

$$[I] \quad \frac{1}{V_o} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

Si on trace $1/V_o$ versus $1/[S]$, l'intercepte, b , devient :

$$\text{et la pente, } a, \text{ à la droite} \quad b = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

s'écrit :

$$a = \frac{K_M}{V_{\max}}$$

La valeur de $1/[S]$ lorsque $1/V_o = 0$ peut se recalculer :

$$\frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} = - \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

$$\frac{1}{[S]} = - \frac{1}{K_M} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

Dans ce cas, V_{\max} et K_M diminuent du même facteur $(1 + [I]/K_I)$, alors que K_M / v_{\max} reste inchangé. L'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat augmente et une partie de $[ES]$ reste bloquée sous forme de $[ESI]$ (V_{\max} diminue). Dans ce type d'inhibition le substrat a une affinité supérieure pour l'enzyme (Figure 24). L'inhibition incompétitive se retrouve rarement pour les enzymes spécifiques à un substrat. Par contre, les enzymes pouvant réagir avec plusieurs substrats donnent ce type de cinétique en présence d'unhibiteurs

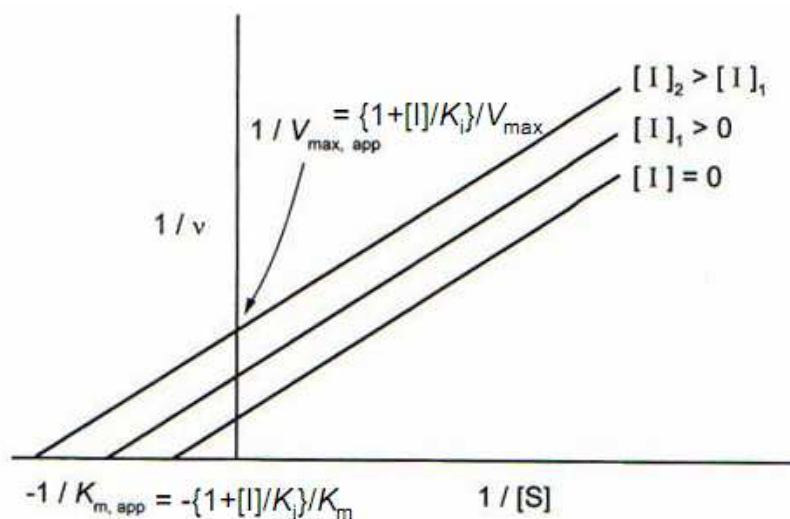


Figure 24 : Inhibition incompétitive (double inverse)

CHAPITRE IV : LES ENZYMES INDUSTRIELLES

IV.1. Préparation des enzymes

Les enzymes industrielles sont obtenues par extraction à partir des cellules animales, végétales et microbiennes. Les cellules microbiennes sont les plus largement utilisées ; elles présentent de nombreux avantages comme source d'enzymes : croissance exponentielle (bonne production d'enzymes en un minimum de temps), induction et rétro inhibition facile.

IV.1.1. Sources

IV.1.1.1. Cellules végétales

L'induction se fait souvent en changeant quelques paramètres d'environnement par exemple, on induit les cellulases par l'éthylène ou de l'acide indolylacétique, l'amylase par l'acide gibberellique,...etc. La différence majeure par rapport aux enzymes microbiennes réside dans la présence chez les plantes d'un mécanisme contrôlé de dégradation des enzymes en tant que méthode de régulation. La fabrication des enzymes d'origine végétales est soumise aux contraintes d'approvisionnement de la matière première (caractère saisonnier des récoltes).

IV.1.1.2. Cellules animales

Divers organes, glandes et liquides biologiques sont des sources d'enzymes. Les facteurs déterminants sont : l'âge, l'espèce, la manière de tuer les animaux (guillotine, exsanguination,...etc.) et la rapidité d'exécution du fait de la présence d'une grande quantité d'enzymes protéolytiques. La fabrication des enzymes d'origine animale est soumise également aux contraintes d'approvisionnement de la matière première. Les organes sont également collectés dans les centres d'abattage, les soins apportés aux conditions de collecte et de stockage sont déterminants pour la qualité de la matière première et le coût final de l'enzyme. Il faut éviter les contaminations microbiennes qui provoquent une perte d'activité enzymatique.

IV.1.1.3. Cellules microbiennes

Pour obtenir une bonne sécrétion d'enzymes, il faut choisir une bonne souche, un bon milieu de culture, des inducteurs, bien déterminer les conditions de fermentation (pH, température, lumière, O₂,...), rechercher les mutants ne produisant pas de répresseurs et augmenter le nombre de gènes pour synthétiser l'enzyme désirée.

Milieux de production

Les matières premières qui vont apporter aux microorganismes leurs éléments nutritifs (énergie et sources de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre, de sels minéraux, de vitamines,...). Elles sont choisies en fonction des critères suivants :

- Compatibilité avec les réglementations en vigueur des pays pour ce qui concerne les normes des produits destinés à l'alimentation : absence d'antiseptiques, d'antibiotiques, de pesticides, de métaux lourds,... etc.) ;
- Approvisionnement stable en quantité et en qualité tout au long de l'année ;
- Coût aussi peu élevé que possible, y compris stockage et transport.

Pratiquement tous les produits réglementaires utilisés proviennent des industries agricoles et alimentaires (Tableau III).

Tableau III : Exemple de matières premières utilisées comme milieu de production

Substrats	Exemples
Source de carbone et d'énergie	Farine de céréales, farine de soja, amidon de maïs et de pomme de terre, son de blé ou de riz, Ainsi que les sous produits tels que le lactosérum et les mélasses.
Source d'azote (organique)	Farine de poisson, gélatine, caséine, farine de soja, son de coton, maïs et d'arachide, corn-steep (obtenu à partir des eaux du trempage de maïs).
Sels minéraux et substances de croissance exigées	Extrait de levure, corn-steep, huiles végétales, farines de graines oléagineuses.

Préparation et stérilisation du milieu

La pureté de la culture doit être maintenue jusqu'au moment de la récolte. Ceci implique un traitement thermique suffisant des matières premières. Cette stérilisation peut se faire par des échangeurs de chaleur à plaques ou par injection de vapeur. Le traitement thermique ne doit pas provoquer l'apparition de produits défavorables à la croissance et à la synthèse (produits de la réaction de Maillard).

Conduite de la fermentation

Elle se fait dans un milieu riche, fortement aéré et agité où les paramètres physicochimiques sont régulés en continu (O_2 , pH, Température). Dans les milieux riches en protéines l'agitation et l'aération provoquent l'apparition de mousses qui sont réduites par l'addition d'anti-mousses (composés à base d'huiles animales ou végétales,...).

Dans certaines synthèses il faut un inducteur, dans d'autres il faut éviter la présence de métabolites répresseurs au début ou leur apparition en cours de la fermentation. Les

inducteurs doivent être présents dans les milieux de production (exemple: l'amidon pour l'amylase, l'urée pour l'uréase, le xylose pour la xylose isomérase ...). Certaines molécules agissent comme inducteurs à faible concentration et comme répresseur à fortes doses (exemple: cellobiose pour les cellulases). Un effet inducteur est très souvent démontré par des analogues de substrats (exemple: isopropyl-béta-D-thiogalactoside qui est l'analogue du lactose pour la β -galactosidase). Les co-enzymes peuvent aussi avoir un effet inducteur (exemple: la thiamine augmente la production de la pyruvate carboxylase). Les produits de la réaction enzymatique peuvent agir comme inducteurs (exemple: maltodextrine pour l' α -amylase, maltose pour la pullulanase).

La répression catabolique: De fortes concentrations en sucres rapidement assimilables peuvent entraîner la répression de la synthèse de l'enzyme. Le glucose, le cellobiose, le glycérol, l'amidon répriment la cellulase de *Trichoderma viridae*. Le glucose inhibe la synthèse de l'invertase par *Aspergillus nidulans*. La synthèse de polygalacturonases par *Aspergillus niger* est inhibée par le glucose et l'acide galacturonique.

IV.2. Procédé d'obtention

Le processus d'obtention des enzymes pures suit les étapes suivantes (Figure 25):

1^{ère} étape : l'extraction donnant un mélange de molécules sous forme solubles ;

2^{ème} étape : Fractionnement du mélange en jouant sur les différences de solubilité pour obtenir une famille moléculaire ;

3^{ème} étape : la purification par des méthodes physicochimiques ou bio-spécifiques conduisant à une molécule pure.

IV.2.1. Extraction

Les enzymes peuvent être divisées en deux catégories selon leur localisation : les enzymes extracellulaires (exo-enzymes) sont synthétisées à l'intérieur de la cellule, puis secrétées dans l'espace extracellulaire ; les enzymes intracellulaires sont synthétisées et utilisées entièrement à l'intérieur de la cellule. Celles-ci sont généralement présentes en agrégats ou liées ou emprisonnées dans des particules subcellulaires ou membranes intracellulaires, rendant leur isolement plus difficile.

L'extraction consiste en la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires nécessitant donc un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire, par des procédés mécaniques, physiques ou chimiques.

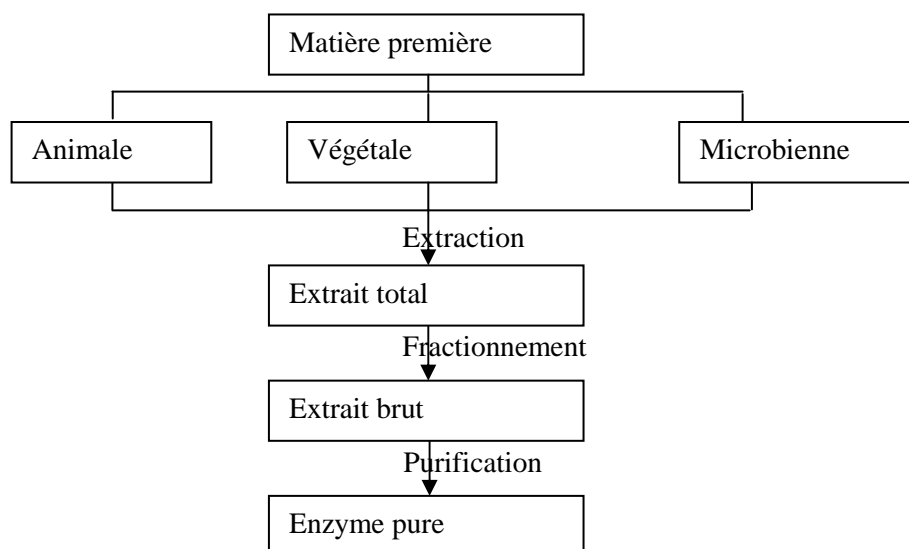


Figure 25 : Représentation schématique d'un processus d'isolement et de purification d'une enzyme.

IV.2.1.1. Procédés utilisés pour les tissus végétaux et animaux (procédé mécanique)

La plupart des enzymes d'origine animale sont localisées dans des organes particuliers ou dans les muscles. Les organes sont émincés à l'aide d'un hachoir et ensuite agités dans le milieu d'extraction. On peut également obtenir une purée à l'aide d'un homogénéisateur (mixeur). Il est important de respecter le rapport fluide/poids organes, qui peut varier dans les ordres de 2 :1 à 4 :1. Cette étape se résume en deux opérations : broyage et homogénéisation tissulaire et cellulaire.

IV.2.1.2. Procédés appliqués aux cellules microbiennes

Un bioréacteur, appelé aussi fermenteur (Figure 26), est un appareil ou une cuve qui permet la croissance d'un micro-organisme pour la production de la biomasse, de métabolites primaires ou secondaires ou encore la bioconversion d'une molécule d'intérêt.

C'est une enceinte permettant la culture de tout type de microorganisme et répondant à des critères de conception permettant d'influer efficacement sur la culture et de contrôler et de piloter les paramètres physicochimiques. Le bioréacteur doit permettre une stérilisation facile et un maintien de l'asepsie pendant toute la durée de culture et être caractérisé par une résistance mécanique et chimique aux contraintes liées à la culture du micro-organisme.

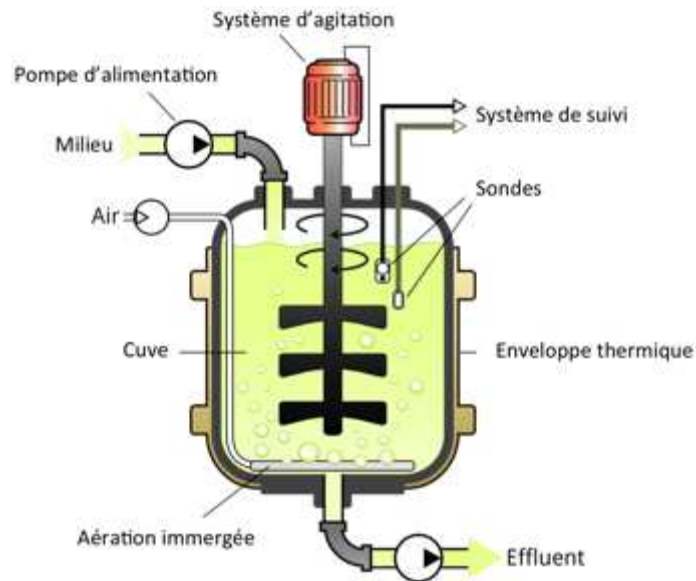


Figure 26: Schéma général d'un fermenteur

IV.2.1.2.1. Fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique. D'un point de vue fondamental, la FMS est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou très faible présence d'eau libre. Elle diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide. La principale différence entre ces procédés réside dans la variation des proportions des phases solide, liquide et gazeuse. La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice ou un support solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci.

Les champignons filamenteux sont particulièrement bien adaptés à ces cultures du fait de leur résistance à une faible A_w et à une pression osmotique élevée. Le développement des champignons filamenteux en FMS (figure 27) se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide) ou dans les espaces interparticulaires (par croissance) à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide. A des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments

aériens sont remplis de gaz (aérobie), tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau (anaérobie). Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon.

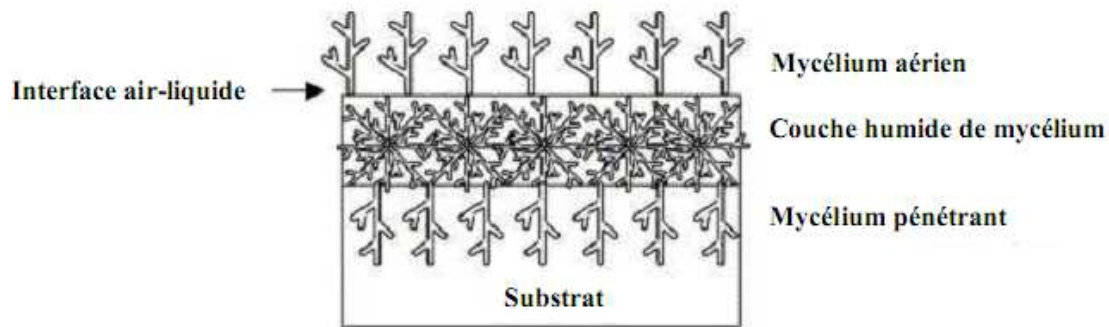


Figure 27 : Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS.

○ Les paramètres influençant la FMS

1. Le support

Le support est l'un des paramètres les plus importants en FMS. Il doit être choisi avec attention en fonction de plusieurs facteurs comme la taille des particules, la porosité, la composition biochimique, sa capacité de rétention d'eau et/ou sa capacité à contenir les éléments nutritifs (source de carbone, d'azote et de sels minéraux), sa disponibilité et son coût. Ils sont classés en deux catégories, les supports inertes et organiques, et se présentent sous trois formes :

- 1) Sous la forme de matériaux organiques naturels (amylacés ou lignocellulosiques) : ce sont généralement des sources de polymères insolubles, complexes et hétérogènes (bagasse, pulpes de betterave, paille, bois, son de blé, manioc,...). Ils servent à la fois de substrat (source de carbone) et de support ;
- 2) Sous la forme de matériaux synthétiques (mousse de polyuréthane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif ;
- 3) Sous la forme de matériaux minéraux (granulés d'argile, perlite, pouzzolane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif

2. La température

La température est l'un des facteurs les plus difficiles à réguler en FMS. La faible conductivité thermique de l'air (en comparaison de celle de l'eau), des

supports et l'absence d'eau libre limite le transfert de chaleur et son élimination favorisant ainsi une élévation de la température pouvant aller jusqu'à 20°C au dessus de la température d'incubation. Cette élévation de la température dépend du type de microorganisme, de la porosité, de la taille des particules et de la profondeur du support. Ce phénomène se produit surtout lors de la croissance de la souche et est directement proportionnel à son activité métabolique génératrice de chaleur, de l'ordre de 100 à 300 kJ par kg de masse cellulaire. Une mauvaise dissipation de la chaleur peut entraîner des gradients de température au sein du milieu de culture durant la fermentation et peut provoquer des déviations métaboliques, l'assèchement du milieu, la dégradation des produits sécrétés, une diminution de la disponibilité des nutriments ou encore l'arrêt de la phase végétative au profit de la phase reproductive du champignon filamenteux (production de conidies).

Plusieurs possibilités existent pour limiter ou éliminer cette chaleur avec :

- de manière passive : le phénomène d'évaporation d'eau (mais avec une diminution de la disponibilité de l'eau) ou l'utilisation d'une fine couche de support (favorisant l'évacuation de la chaleur, contrairement aux couches profondes) ;
- de manière active : l'agitation mécanique du milieu de culture (de manière modérée et intermittente), la circulation d'eau froide à l'intérieur des plateaux (dans le cas d'un réacteur à plateaux), l'aération forcée du milieu de culture avec de l'air humidifiée et refroidie (le plus efficace, avec une dissipation de plus de 80% de la chaleur).

3. L'humidité relative et l'activité de l'eau

En FMS, l'eau est présente sous deux formes : sous la forme d'eau complexée à l'intérieur de la matrice solide, et sous la forme d'une couche mince qui peut être absorbée à la surface des particules ou contenue dans les régions capillaires. La teneur en eau nécessaire pour les cultures est avant tout dépendante des souches utilisées, mais sa limite basse serait fixée à 12%, seuil en delà duquel les activités métaboliques cessent, et sa limite haute dépendrait principalement du support et de sa capacité de rétention (mais elle serait de 90% pour les substrats ligno-cellulosiques). Le contenu en eau, ou plutôt la quantité d'eau disponible, est vraiment très important puisqu'une faible humidité limiterait l'hydrolyse du substrat, la solubilisation et la diffusion des nutriments et/ou l'accumulation de composés inhibiteurs dans les particules solides, tandis qu'une forte humidité réduirait la porosité (espace interparticulaire), le volume des gaz et les échanges gazeux, tout en favorisant la contamination bactérienne.

4. L'aération

L'aération est un facteur important en FMS puisqu'elle va permettre : l'oxygénation (surtout pour les organismes aérobies comme les champignons filamenteux), la dissipation de la chaleur métabolique (régulation de la température du milieu) et l'élimination des produits du métabolisme (CO₂, vapeur d'eau, composés volatils). Elle peut être passive (de surface) ou active (forcée par l'injection d'air humidifiée afin de ne pas assécher le milieu). Le choix d'un support poreux et la calibration de la taille des particules par broyage (de 1 mm à 1 cm) permettra d'optimiser l'aération du milieu de culture en facilitant la circulation de l'air. Il faut cependant noter qu'un changement dans la porosité du support (pour les supports organiques) se produit lors de la dégradation du substrat avec le risque d'un tassement ou d'une compaction des particules, provoquant la formation de chemins préférentiels et une réduction de l'apport d'oxygène.

5. Le pH

Le pH est très difficile à homogénéiser et à contrôler en FMS. En effet, au cours de la culture, l'activité métabolique des souches va modifier le pH du milieu soit en l'acidifiant, par la production d'acides ou par l'absorption d'ions ammonium, soit en l'alcalinisant, par la libération d'ammoniac provenant de la dégradation de protéines, d'urée ou d'autres amines. Une régulation partielle de ce facteur au cours de la fermentation peut cependant être réalisée par l'ajout d'acide ou de base à l'eau utilisée pour ajuster le taux d'humidité du milieu. Un autre système de régulation (passif) consiste à utiliser des systèmes tampon, comme l'emploi de résidus agro-industriels présentant naturellement un excellent pouvoir tampon ou l'utilisation d'un mélange de sels d'ammonium et d'urée.

○ Les différents types de réacteurs industriels

Lors de la conception d'un réacteur, deux facteurs sont principalement pris en compte : la hauteur de couche (mince ou profonde, c'est-à-dire jusqu'à un mètre) et l'aération. L'optimisation de ces paramètres permettra notamment d'éviter ou de limiter l'hétérogénéité du milieu et l'accumulation de chaleur. Le nombre de réacteurs conçus pour la FMS reste cependant encore limité et ceux-ci ne sont pas optimisés. Les quatre principaux types de réacteurs communément utilisés sont :

1. Les bioréacteurs à plateaux (*Tray bioreactor*)

Ce type de bioréacteur est constitué de plateaux étagés (en bois, en métal ou en plastique), contenant une couche mince de support (5 à 15 cm), et placés dans une chambre à atmosphère contrôlée (température, humidité). La culture se déroule en principe de manière statique et l'aération de celle-ci se fait généralement de manière passive (sans aération

forcée), bien qu'une aération puisse être réalisée en faisant circuler de l'air du bas vers le haut de la chambre. La température peut éventuellement être contrôlée par circulation d'air ou aspersion d'eau. Enfin, le principal désavantage de ce type de bioréacteur est le nombre de plateaux et le volume nécessaire, rendant compliqué le changement d'échelle.

2. Les bioréacteurs à lit fixe (*Packed bed bioreactor*)

Ce type de bioréacteur est généralement composé d'une colonne (en verre ou en plastique) contenant le support solide. L'enceinte peut éventuellement être équipée d'une double enveloppe permettant une circulation d'eau et par conséquent une meilleure régulation de la température. La culture est généralement statique et une aération peut être appliquée par le bas de la colonne. Les principaux inconvénients de ce type de bioréacteur résident dans l'obtention d'une culture non homogène, dans la difficulté à récupérer le produit (support) et dans le changement d'échelle (compliqué)

3. Les bioréacteurs à tambour rotatif (*Rotating drum bioreactor*)

Ce type de bioréacteur est composé d'une cuve, avec ou sans baffles, tournant autour d'un axe (comme une bétonnière). Ce système permet une aération adéquate (forcée ou non) et une homogénéisation du milieu par une rotation périodique (afin de limiter le cisaillement) ou continue. Le principal désavantage de ce type de bioréacteur est son remplissage qui ne doit pas excéder 30% afin de garantir une agitation efficace.

4. Les bioréacteurs à lit fluidisé (*Fluidized bed bioreactor*)

Ce type de bioréacteur consiste à mettre des particules en suspension dans l'air à l'intérieur d'une colonne. Ce système permet une agitation et une aération continue, évitant ainsi l'agrégation des particules et favorisant l'élimination de la chaleur métabolique. Cependant, le principal désavantage de ce type de bioréacteur réside dans son coût (trop) élevé.

IV.2.1.2.2. Fermentation en milieu liquide

La fermentation en milieu liquide est particulièrement bien adaptée aux cultures des micro-organismes unicellulaires, comme les bactéries et les levures, alors que la FMS est, elle, bien adaptée aux organismes mycéliens. En effet, l'agitation nécessaire pour homogénéiser les milieux liquides (et les oxygéner pour les cultures aérobies) entraîne des contraintes de cisaillement que peu de souches mycéliennes sont capables de supporter (même si des souches fongiques ont pu être adaptées avec succès à ce type de culture). En outre, il n'y a pas de contraintes d'oxygénation en FMS, le mycélium étant directement en contact avec l'oxygène de l'air.

○ Types de fermentations

On distingue 3 types de fermentation en phase liquide : culture discontinue (batch ou non renouvelé), culture discontinue alimentée (Fed-batch) et culture continue.

1. Culture discontinue (batch)

Consiste à mettre en contact la biomasse et le substrat une fois pour toute. La fermentation est arrêtée lorsqu'il ya épuisement du substrat et / ou accumulation de produit. L'entièreté du substrat est apportée dès la mise en route de la fermentation. Le volume reste constant et la biomasse augmente selon la courbe de croissance à 5 phases (Figure 28). Le procédé présente les avantages de la simplicité et le faible cout. L'inconvénient majeur de cette technologie réside dans le risque de répression catabolique, productibilité faible due à la taille de l'inoculum qui est souvent faible et conduit à des phases de latence longues et le démarrage de la culture associé au temps nécessaire à la remise en service du réacteur (lavage, stérilisation).

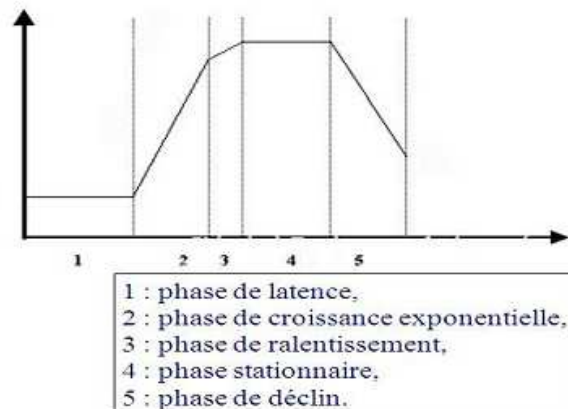


Figure 28 : Cinétique de croissance microbienne en milieu non renouvelé (batch)

2. Culture discontinue alimentée (Fed batch)

La fermentation est initiée dans un plus faible volume (pied de cuve). Pour une même taille d'inoculum la fermentation va démarrer plus vite. Lorsque la culture est en phase exponentielle de croissance, le substrat stérile est ajouté progressivement dans la cuve. Le débit est réglé de sorte que la concentration en substrat et en biomasse soit constante dans la cuve. Lorsque la cuve est remplie, on coupe l'alimentation la culture évolue alors conformément à la courbe de croissance discontinue. C'est une technique très utilisée en pratique pour les avantages suivant : gain de temps et de productibilité, possibilité de modifier la composition du milieu durant l'opération et possibilité d'orienter si nécessaire le

métabolisme de la souche et de stimuler la production de métabolites après avoir favorisé la croissance.

3. Culture continue

Dans un réacteur fonctionnant en continu, il y a un apport permanent du substrat en contrepartie, une partie équivalente du contenu du réacteur doit être soutirée. Deux cas peuvent se présenter : soit les cellules sont fixées dans le réacteur par différents moyens (cellules immobilisées) (réacteur hétérogène) ; soit elles sont libres et le réacteur est homogénéisé (réacteur homogène). La productibilité est plus élevée qu'en discontinu ou semi continu (volume utile de la cuve mieux utilisé, cuve n'est pas vidée, nettoyée et stérilisée). Le procédé présente l'inconvénient de contamination et de mutation.

○ Types de réacteurs

1. Bioréacteur à biomasse en suspension (réacteur homogène)

Dans un réacteur à biomasse en suspension, des "unités biologiques" sont perpétuellement agitées de façon à optimiser leur interaction avec le substrat et à éviter toute accumulation locale. Les "unités biologiques" en question peuvent être constituées soit de cellules indépendantes, soit de cellules agglomérées entre elles en vue de former un floc, soit de cellules fixées sur un support mobile ou encore des cellules enfermées dans des capsules poreuses.

2. Bioréacteur à biomasse immobilisée (réacteur hétérogènes)

L'utilisation de bioréacteurs à particules en suspension implique un processus de séparation en aval de la fermentation pour récupérer soit les cellules, soit les molécules intéressantes. Pour éviter cette opération, consommatrice de temps et d'énergie, les technologues ont pensé à immobiliser les cellules soit en les emprisonnant dans des matrices de plus ou moins grandes tailles, soit en les fixant sur un support inerte. On parle alors de biofilm pour désigner l'ensemble de la biomasse fixée sur le support ou la membrane de confinement. Dans cette configuration, le mouvement relatif entre substrat et biomasse indispensable pour éviter les carences et/ou les accumulations - est obtenu en faisant s'écouler le substrat sur la biomasse qui est, quant à elle, immobile dans le réacteur. La fixation cellulaire n'est cependant pas toujours applicable car des difficultés de transfert de nutriments et particulièrement d'oxygène peuvent apparaître. Elles sont causées par l'épaisseur du "film" cellulaire, qui empêche une bonne diffusion des éléments nécessaires aux cellules, ce qui se traduit par un ralentissement du métabolisme des couches sous-jacentes. De même lorsque la biomasse est enfermée dans une membrane ou intégrée dans un gel, la translation des nutriments et des produits aux travers de ceux-ci peut être ralentie. Enfin, on peut assister à

des phénomènes de "relargage" (détachement de la biomasse [ex : autocurage d'un lit bactérien]) qui imposent malgré tout souvent des processus de séparation en aval de la fermentation.

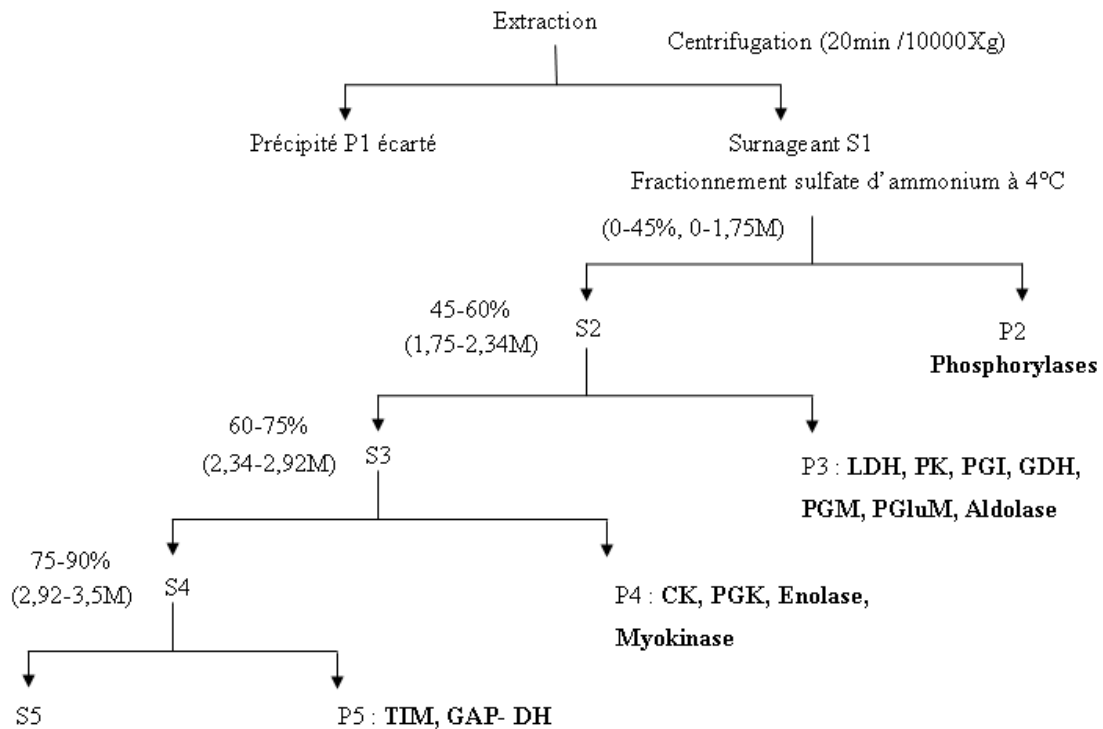
Dès que la fermentation est terminée, la culture est refroidie entre 3 à 5°C. Les enzymes doivent alors être séparées des cellules et du milieu au moyen d'une centrifugation et d'une filtration. Dans le cas des enzymes endocellulaires, la récupération est plus difficile et suppose une étape supplémentaire de broyage ou de lyse des cellules microbiennes [sonication (ultrasons), congélation/décongélation, broyage ou agitation avec des abrasifs (agitation violente en présence des microbilles de verre appelées « ballotinis », désintégration à haute pression, lyse enzymatique (lysosyme pour les Gram positifs), lyse chimique par des traitements alcalins (ce traitement dépend de la stabilité de l'enzyme recherché à ces pH) Exp. La L-asparaginase extraite à pH 12 pendant 20 min permet d'hydrolyser la membrane].

IV.2.2. Fractionnement

Après éclatement des cellules et des organisations subcellulaires, les composants non protéiques sont séparés des enzymes en jouant sur leur solubilité. La précipitation est le procédé le plus utilisé. Cette méthode repose sur la différence de solubilité des protéines. L'addition d'un réactif ou un changement de condition provoque le passage d'une protéine de l'état soluble à l'état insoluble. Diverses techniques sont utilisées : addition de sels neutres ou d'alcools, variation de pH,...etc.

IV.2.2. 1. Fractionnement par les sels ou relargage (procédé le plus utilisé)

Les protéines sont solubles dans les solutions salines à des pH éloignés de leur point isoélectrique. La solubilité décroît rapidement avec la concentration en sels et les protéines précipitent. Tout se passe comme s'il y avait compétition entre les protéines et les ions vis-à-vis des molécules d'eau. Ce phénomène de relargage correspond à une déshydratation des macromolécules. Pour chaque protéine, on détermine une zone de concentration en sel pour laquelle il y a précipitation totale (dénaturation réversible). Cette technique permet ainsi de fractionner, en partie, les constituants d'un mélange (Figure 29). On utilise préférentiellement le sulfate d'ammonium en raison de son faible coût, de son pouvoir précipitant élevé, de sa grande solubilité et de son faible effet dénaturant vis-à-vis des protéines.



Abréviations : LDH : Lactate deshydrogenase, PK : Pyruvate kinase, PGluM : Phosphoglucomutase, PGI : Phosphoglucose isomerase, GDH : Glycerol-3-phosphate deshydrogenase, PGM : Phosphoglycérate mutase, CK : Créatine Kinase, PGK : 3-Phosphoglycerate kinase, TIM : triosephosphate isomérase, GAP-DH : Glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogenase.

Figure 29 : Exemple d'un fractionnement par le sulfate d'ammonium d'un extrait musculaire de lapin

IV.2.2. 2. Précipitation isoélectrique

Comme toutes les protéines, les enzymes ont un minimum de solubilité au voisinage de leur point isoélectrique (pH pour lequel la molécule n'a pas de charge électrique nette, empêchant par là toute répulsion électrostatique entre les molécules protéiques voisines. A ce pH, les protéines ont tendance à précipiter. Chaque protéine a un pH_i différent selon leur contenu en acides aminés possédant des chaînes latérales ionisables. La principale difficulté d'utilisation de cette technique réside dans la stabilité des enzymes à certains pH pouvant conduire à leur dénaturation.

IV.2.2. 3. Coagulation par la température

La solubilité des protéines globulaires augmente avec la température jusqu'à un seuil limite (40 à 50°C) où ces protéines deviennent instables et se dénaturent. On peut alors jouer sur leur différence de stabilité à haute température pour dénaturer sélectivement certaines enzymes contaminantes. Cette technique est peu coûteuse mais exige un contrôle rigoureux pour éviter toute perte du produit recherché.

IV.2.2. 4. Précipitation par les solvants organiques (surtout les alcools)

L'addition de solvants organiques neutres miscibles à l'eau à une solution protéique aqueuse, entraîne une diminution de leur solubilité. En effet, les molécules protéiques tendent à réagir entre elles plutôt qu'avec l'eau, les protéines s'agrègent jusqu'à précipitation, lorsque on ajoute des quantités croissantes de solvant. La précipitation doit être effectuée à très basses températures (à la limite du point de congélation du milieu, car les solvants sont dénaturants). A cet inconvénient il faut rajouter que la plupart des solvants organiques sont inflammables et très coûteux.

IV.2.3. Purification

IV.2.3.1. Chromatographie d'exclusion (filtration sur gel, perméation ou diffusion)

Cette méthode permet la séparation des protéines par leur poids et leur taille. Le milieu utilisé est généralement le Sephadex ; milieu réticulé présentant des macromolécules exemptes de groupements ionisables se différenciant par leur degré de réticulation, donc par leurs propriétés de gonflement. Les molécules de dimensions supérieures aux plus gros pores de gel gonflé, ne pouvant pénétrer dans les billes sont exclues et traversent la colonne dans la phase liquide circulant autour des perles et sortent les premières. Les solutés de petite masse moléculaire diffusent dans le gel et sont d'autant plus retardés que leur masse est plus faible. On élue donc les solutés dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes (Figure 30).

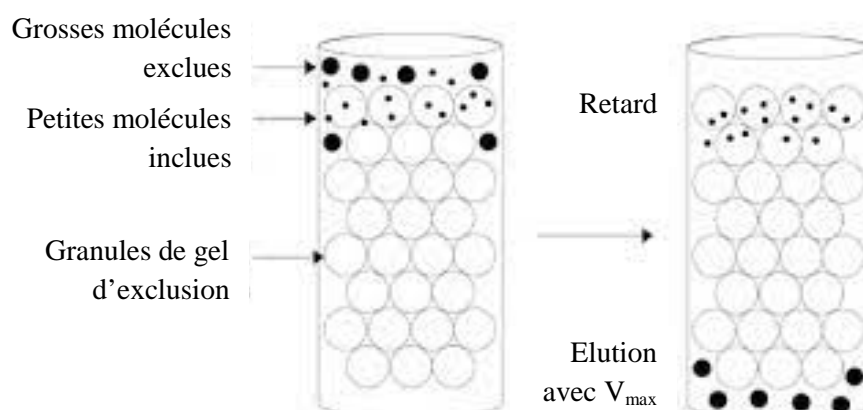


Figure 30 : Chromatographie d'exclusion

IV.2.3.2. Chromatographie d'échange d'ions

Cette méthode utilise le comportement acido-basique des protéines pour leur séparation. En effet, les enzymes sont des macromolécules possédant de nombreux groupements fonctionnels chargés électriquement et qui se comportent comme des poly électrolytes. L'état d'ionisation de ces amphotères varie en fonction du milieu ambiant. Si on utilise un matériel

portant une charge opposée à celle de la protéine à isoler, celle-ci sera retenue. Dans le cas contraire, on retiendra les protéines contaminantes. Il s'agit d'une colonne en verre contenant de la résine synthétique (polymère insoluble) sur laquelle sont fixés des groupements sulfuriques (SO_3^-) (résine échangeuse de cation) ou d'ammonium quaternaire (NH_3^+) (résine échangeuse d'anion). Dans le cas des échangeuses de cation, le pH de la solution tampon de départ est acide, à ce moment tous les acides aminés seront chargés positivement ; plus ils sont basiques plus ils sont fortement liés à la résine sulfurée. Par l'augmentation du pH de la solution tampon la charge positive des acides aminés est très progressivement neutralisée lorsque le pH de la solution tampon atteint le pH_i de la protéine, celle-ci est détachée de la résine. Dans le cas des échangeuses d'anion, le pH de la solution tampon de départ est basique, à ce moment tous les acides aminés seront chargés négativement ; plus ils sont acides plus ils sont fortement liés à la résine échangeuse d'anion. Par la diminution du pH de la solution tampon la charge négative des acides aminés est très progressivement neutralisée lorsque le pH de la solution tampon atteint le pH_i de la protéine, celle-ci est détachée de la résine (Figure 31).

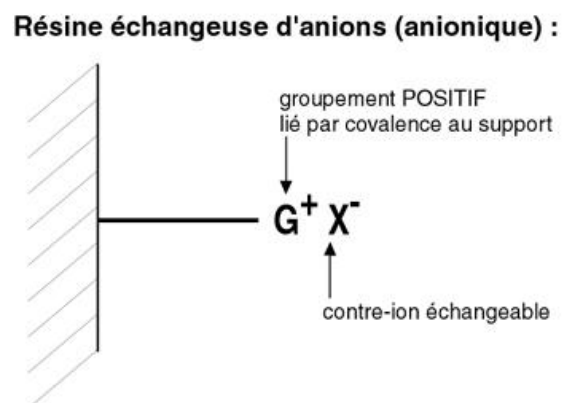


Figure 31 : Schéma de l'interaction entre la résine et l'ion retenu dans le cas d'une résine anionique.

IV.2.3.3. Chromatographie d'affinité

Cette méthode ne fait pas appel aux propriétés physicochimiques mais à une interaction moléculaire du constituant à étudier, c'est à dire la capacité de fixer de façon réversible et spécifique une autre molécule appelée ligand. Ce ligand attaché covalentiellement sur un support insoluble placé dans une colonne, permet à partir d'un mélange de protéines contenant l'enzyme à isoler, de retenir spécifiquement celle-ci, tandis que toutes les autres protéines n'interagissant pas avec le ligand, passent à travers la colonne. On élue ensuite l'enzyme par différents moyens. Plusieurs facteurs sont importants : choix de la matrice, du ligand, de la méthode de fixation du ligand, et des conditions de l'élution de la molécule

recherchée pure. Pour l'éluion, on utilise en général un compétiteur qui dissocie le complexe ligand-molécule à purifier. Il devra être en concentration suffisante (supérieur à son K_m) (Figure 32).

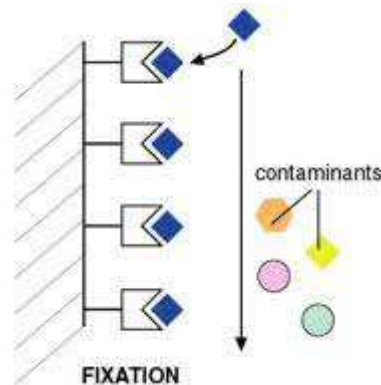


Figure 32 : Chromatographie d'affinité

IV.3. Enzymes immobilisées et leurs intérêts

Les enzymes présentent un fort intérêt dans le domaine de la biocatalyse. Cependant, leur coût et leur stabilité limitée dans le temps sont des facteurs limitant leur utilisation industrielle. Afin de palier ces inconvénients, une stratégie fut proposée : l'immobilisation des enzymes qui permet de stabiliser celles-ci au cours de leur utilisation, de pouvoir les réutiliser et de séparer l'enzyme des produits de la réaction enzymatique.

IV.3.1. Méthodes d'immobilisation des enzymes

Les méthodes d'immobilisation des enzymes sont au nombre de trois:

IV.3.1.1. Adsorption physique

Elle se réalise sur des supports inertes (verre, cellulose, charbon actif). La fixation se fait par interaction des groupes fonctionnels de l'enzyme et du support (liaison hydrogène, force de Van der Waals, interaction ionique,...etc.) (Figure 33). Cette adsorption exige des conditions de pH et de force ionique très précise. La moindre variation d'un de ces paramètres provoque une desorption, inconvénient majeur de cette technique.

Cette technique d'immobilisation présente plusieurs avantages. C'est une méthode très simple à mettre en œuvre nécessitant seulement de mettre en contact l'enzyme et le support dans des conditions de pH, température et de force ionique données. De plus elle est facilement réversible, économique et ne requiert aucun réactif chimique pouvant dénaturer l'enzyme. Cependant, elle présente un inconvénient majeur puisque, du fait des interactions faibles liant l'enzyme au support, ces systèmes sont peu stables, l'enzyme se désorbant au cours du temps.

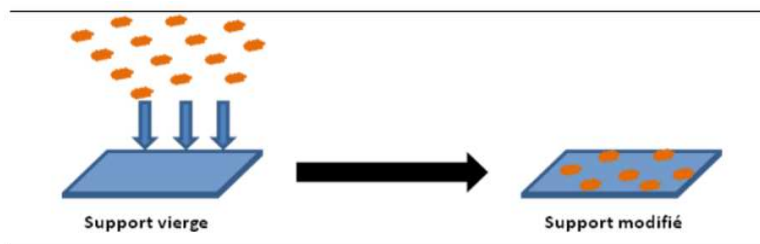
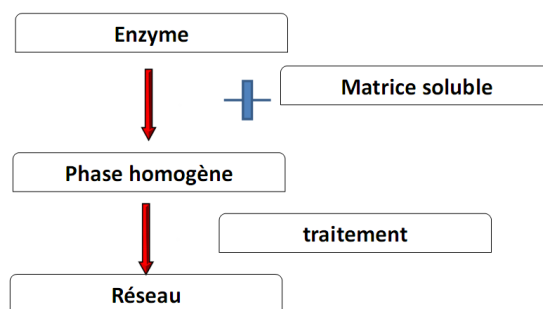


Figure 33 : Adsorption des enzymes sur un support.

IV.3.1.2. Encapsulation (inclusion dans un gel)

L'enzyme est emprisonnée à l'intérieur d'une matrice schématisé comme suite :



L'immobilisation se fait de manière physique et pas de manière chimique contrairement au greffage covalent (Figure 34). Les mailles de la matrice assurent de manière purement physique la rétention de l'enzyme et permet la diffusion du substrat (la matrice doit permettre la diffusion des petite molécules seulement afin que les enzymes ne puissent pas s'en échapper. Les matières les plus utilisées sont les gels: de polyacrylamide, d'alginate, d'amidon, les fibres de polyacétate de cellulose et les microcapsules de nylon. Cette méthode présente un certain nombre d'avantages et d'inconvénients présentés dans le tableau IV:

Tableau IV : Avantages et inconvénients de l'inclusion dans un gel

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Elle permet en une seule étape d'immobiliser la totalité de l'enzyme - Elle ne présente aucun caractère de spécificité et est applicable à n'importe quelle enzyme. - Elle ne met pas en jeu les groupements actifs de l'enzyme. - Economique et facile. 	<ul style="list-style-type: none"> - La localisation de l'enzyme à l'intérieur du polymère pose des problèmes stériques (efficacité limitée par accès délicat du substrat vers l'enzyme et du produit en dehors du polymère). - Les conditions de polymérisation (Exp. pH élevé) peuvent s'avérer dénaturantes pour l'enzyme. - Méthode applicable que pour des substrats de petites tailles.

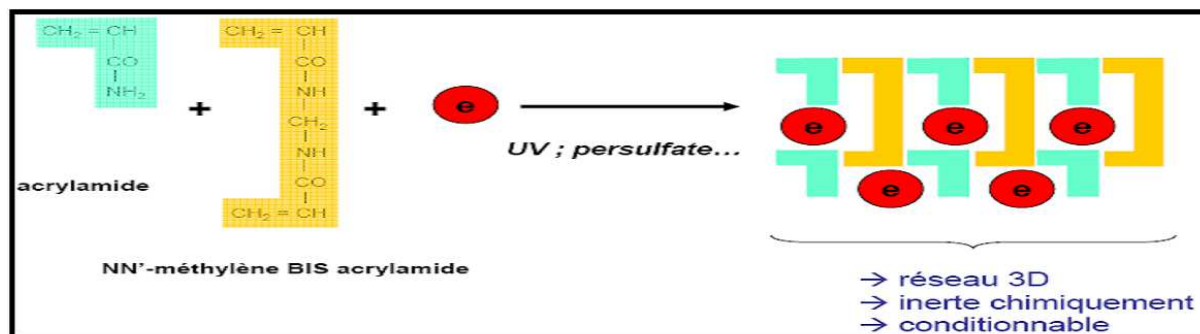
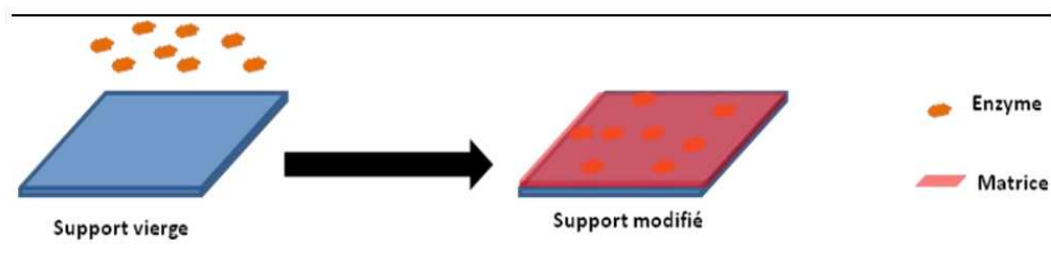


Figure 34 : Encapsulation des enzymes.

IV.3.1.3. Greffage covalent

Il s'agit d'établir des liaisons covalentes entre l'enzyme et le support utilisé, tout en préservant l'activité catalytique de l'enzyme (Figure 35). Les principaux supports utilisés sont les suivants:

- Polyosides (dextrane, agarose, cellulose).
- Protéine (collagène).
- Polymères synthétiques (polyacrylamide).
- Silice et verre poreux.

En général, les groupements fonctionnels de ces supports sont des fonctions carboxyliques, thiols, hydroxyles ou encore amines. Ces groupements sont très peu réactifs et doivent de ce fait être activés afin de pouvoir réagir avec les groupements de l'enzyme, n'intervenant pas dans la catalyse enzymatique, dans des conditions dites douces afin de ne pas dénaturer la biomolécule (Figure 36). Les tableaux suivants représentent respectivement les méthodes d'activation selon les supports utilisés et les avantages ainsi que les inconvénients de cette méthode.

Tableau V : Méthodes d'activation des supports

Groupe fonctionnel		Méthode d'activation
Enzyme	Support	
NH ₂	NH ₂	Glutaraldéhyde
NH ₂	COOH	Azoture carbodiimide
NH ₂	OH	Bromure de cyanogène
SH	SH	Pont dissulfure

Tableau VI : Avantages et inconvénients du greffage covalent

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - solidité de la liaison enzyme-substrat (fixer l'enzyme de façon permanente). - L'établissement de pontage entre les molécules d'enzymes leur confère une résistance aux facteurs dénaturants (stabilité). 	<ul style="list-style-type: none"> - L'immobilisation est plus complexe à réaliser (choix des groupements à activer...). - Les quantités d'enzymes immobilisées sont inférieures par rapport aux deux précédentes méthodes. - les réactifs indispensables au greffage risquent de dénaturer l'enzyme et donc de provoquer une perte d'activité.

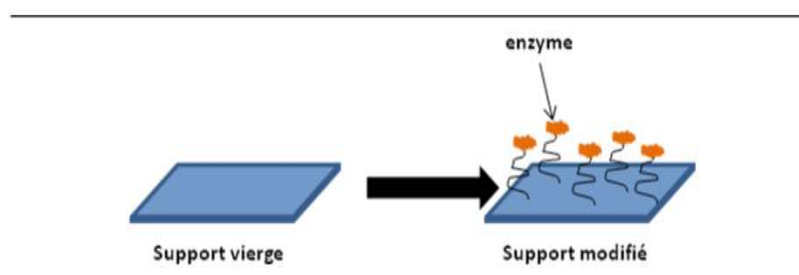


Figure 35 : Greffage covalent des enzymes.

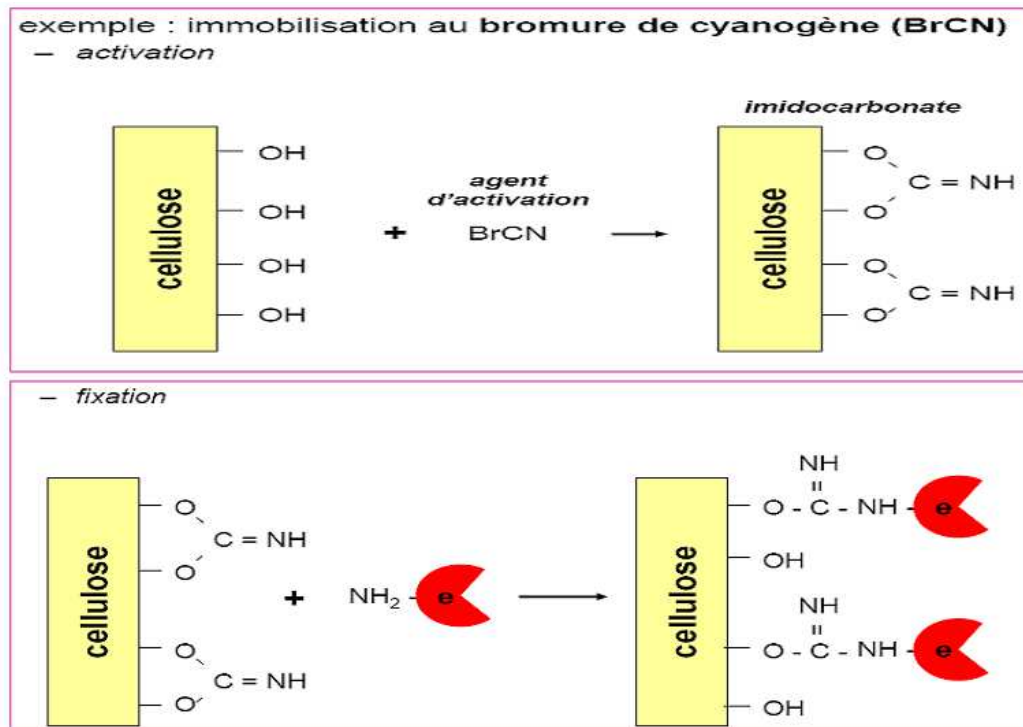


Figure 36 : Exemple d'immobilisation au bromure de cyanogène BrCN

étape 1: activation du support, étape 2: fixation de l'enzyme

IV.3.2. Propriétés des enzymes immobilisées

Propriétés physico-chimiques : Une des propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation est :

6. L'amélioration de la stabilité dans le temps.
7. La résistance vis-à-vis de la dénaturation.

Propriétés cinétiques : Les propriétés cinétiques d'une enzyme immobilisée ne sont pas parfaitement corrélées à celles de l'enzyme libre. La diminution du transfert de masse du substrat dans le support résultant de l'immobilisation, augmente la valeur du K_M de l'enzyme. De plus, l'orientation stérique de l'enzyme fait que le site actif ne peut être que partiellement accessible, voire inaccessible au substrat: en d'autres termes, l'enzyme est maintenue dans une conformation telle que la fonction catalytique est partiellement ou totalement bloquée.

IV.4. Domaines d'application des enzymes

IV.4.1. Application dans l'agroalimentaire

L'utilisation des enzymes sous leurs principales formes (préparation enzymatique ou purifiée) connaît son essor essentiellement au XXe siècle. Le développement et la maîtrise des procédés d'extraction des enzymes des cellules (microbienne, végétales et animale) ont permis les diverses utilisations largement connues aujourd'hui.

IV.4.1.1. Usage dans la panification

Étant donné la prépondérance et la diversité des macromolécules végétales dans le monde vivant, les possibilités d'applications des enzymes pour transformer et modeler les matières premières végétales sont innombrables.

L'utilisation de différentes enzymes permet d'améliorer la qualité des produits de **boulangerie** et de **pâtisserie** :

_ L'apport d' α - et β -amylase à la farine de blé permet d'accroître un peu la teneur en oses libres fermentescibles (en moyenne de 1 à 2 % dans la plupart des farines). Cet apport permet une **meilleure fermentation** avec production de gaz et un bon gonflement de la pâte boulangère : on obtient des pains bien lacunaires, non collants. De plus, on peut déterminer la proportion de dextrans produite en réglant le rapport α / β des amylases de la farine. On limite ainsi la réaction de Maillard à la cuisson et on obtient des croûtes ni trop épaisses, ni trop colorées.

_ L'hydrolyse partielle des constituants du gluten par un apport de protéases bactériennes avant la formation de la pâte coupe certaines liaisons endopeptidiques, ce qui **réduit**

l'élasticité et améliore l'extensibilité de la pâte ; en conséquence, le pétrissage mécanique devient plus efficace car la déchirure de la pâte ne se produit plus.

_ De même, avec certaines exopeptidases fongiques, on accroît la libération d'acides aminés, modulant ainsi la réaction de Maillard, donc ses conséquences sur la flaveur du pain, la consistance et la couleur de la croûte.

_ Les hémicellulases jouant un rôle en panification ont essentiellement comme substrat les pentosanes des farines. Les farines de blé contiennent en effet entre 2 et 3 % de pentosanes constitués principalement de D-xylose et de Larabinose. En conséquence, les enzymes efficaces sont principalement des endoxylanases. Ajoutées à une dose optimale aux farines (entre 50 et 100 ppm), ces biocatalyseurs convertissent en partie les pentosanes insolubles, à caractère défavorable pour la qualité boulangère, en pentosanes solubles qui sont eux bénéfiques. Cela se traduit par une amélioration des caractéristiques de pâte (extensibilité, élasticité, collant) et de pain (volume, aspect, mie). En cas d'addition excessive, une trop forte proportion de pentosanes est dégradée ce qui rend les pâtes molles et collantes.

_ La farine contient également une acide ascorbique oxydase. Elle catalyse l'oxydation par l'oxygène moléculaire de l'acide L-ascorbique - additif couramment utilisé en panification - en acide L-déshydroascorbique. Ce dernier oxyde le glutathion en présence de glutathion déshydrogénase. Le glutathion oxydé devient alors indisponible pour participer aux réactions d'échange de ponts disulfures avec les protéines ; il en résulte un raffermissement de la pâte.

_ L'utilisation de différentes enzymes permet d'exprimer le pouvoir sucrant (Invertase : saccharose \longrightarrow glucose + fructose) et d'améliorer la qualité des produits de boulangerie et de pâtisserie.

Parmi les autres oxydoréductases présentes dans la pâte, il convient de mentionner :

— les polyphénoloxydases qui oxydent les composés phénoliques pour former des quinones, lesquelles, après une série de réactions, conduisent à des polymères colorés en brun ;

— la glucose oxydase qui catalyse l'oxydation du glucose en D-gluconolactone et eau oxygénée. Cette enzyme n'existe pas dans la farine mais l'utilisation de préparations fongiques de glucose oxydase a été préconisée dans le but de raffermir les pâtes.

IV.4.1.2. Usage dans la préparation des boissons

Les enzymes de **macération** sont caractérisées par leur forte activité polygalacturonase. L'action de ces biocatalyseurs se limite à une hydrolyse partielle des pectines de la lamelle moyenne, suffisante pour dissocier les cellules tout en les conservant intactes en suspension dans un jus rendu visqueux par la présence des pectines solubilisées. Du reste, la charge des

pectines solubilisées et dégradées est importante pour la stabilité et la qualité des produits obtenus.

Dans le cas de la **liquéfaction** de tissus végétaux l'hydrolyse de la paroi cellulaire doit être plus importante que lors de la macération. Il s'agit non seulement de désorganiser les tissus, mais également de favoriser l'écoulement du cytoplasme et du contenu vacuolaire. Par conséquent, la liquéfaction la plus performante est obtenue par l'action simultanée des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques.

IV.4.1.2.1. Clarification enzymatique des jus de fruits

Dans le cas du jus de pomme, la baisse de viscosité est obtenue par une activité combinée de la pectine estérase et de l'endo-polygalacturonase sur des pectines hautement estérifiées en solution ; la clarification du jus de pomme est possible avec la pectine lyase mais cette enzyme est moins efficace dans la clarification du jus de raisin qui contient entre 45 et 60 % de pectines estérifiées. Il faut une concentration préalable (à 45-50 °C) pour arriver à une clarification et dépectinisation complètes. L'enzymage avant pressurage entraîne une baisse de viscosité qui améliore la filtrabilité des jus. Il permet de réduire le temps de filtration lors de la clarification des moûts, ainsi que le temps et l'énergie nécessaires à l'évaporation des jus limpides pour la fabrication des concentrés.

Tableaux VII: Principales pectinases

Nom	N°	Type	Substrat	Produits
Pectine méthylestérase	EC 3.1.1.11	Hydrolase	Haut DM	Méthanol + GalA
Polygalacturonase				
endo	EC 3.2.1.15	Hydrolase	Pectate	Chaînes plus courtes, oligosaccharides
exo	EC 3.2.1.67	Hydrolase	Pectate	Mono OU dimère
Pectine-lyase	EC 4.2.2.10	Lyase; endo	Haut DM	Chaînes plus courtes
Pectate-lyase				
endo	EC 4.2.2.2	Lyase	DM bas	
exo	EC 4.2.2.9	Lyase		Dimères

DM : Degré de méthylation

IV.4.1.2.2. En brasserie

En brasserie les principales sources d'enzyme sont le malt, les enzymes ajoutées au brassin et enfin la levure. Depuis le début du XXe siècle, il est possible d'améliorer la conservation, de remplacer ou suppléer les enzymes du malt, de régulariser la qualité et de

produire de nouvelles bières grâce à la mise en œuvre d'enzymes exogènes (figure 9). En malterie, l'usage d'enzymes exogènes est peu fréquent. Néanmoins, des cellulases et hémicellulases peuvent accélérer la trempe des grains et la germination. Des pentosanases et -glucanases peuvent éventuellement être ajoutées, atomisées sur le malt. Elles ne vont agir qu'au moment du brassage mais dans ce cas, c'est plutôt un remède à des malts défectueux. En brasserie au contraire, ce sont des outils extrêmement efficaces pour hydrolyser l'amidon des grains utilisés crus dans la cuve de trempe (maïs, blé, riz). À la gélification, l' α -amylase évite à l'amidon d'être trop collant. L'usage d'enzymes très thermostables à un pH compris entre 6 et 7, souvent d'origine bactérienne, comme celles de *Bacillus amyloliquefasciens* ou de *B. licheniformis* qui supportent des températures de 70 à 90°C et même jusqu'à 100°C pour la seconde sont indispensables pour permettre l'hydrolyse de grains crus comme ceux de riz ou de sorgho qui nécessitent un empesage à 68-78°C. Elles sont utilisées à 1/1000 avec les grains crus. Elles sont calcium dépendantes (200 ppm). L'usage de l' α -amylase évite la rétrogradation de l'amidon lors de la chute de température. Cet amidon rétrogradé gêne la filtration et diminue le rendement de conversion de l'amidon en sucres fermentescibles. Dans la cuve matière, les β -glucanes, les xylanes et autres pentosanes, certaines protéines riches en cystéines sont des freins à l'hydrolyse de la maïsche et finalement à sa filtration. Les -glucanases bactériennes (*B. subtilis*) et fongiques (*A. niger*, *T. reesei*, *P. emersonii*...) sont efficaces. Leurs optima de température sont croissants et s'étalent de 50°C pour *B. subtilis* à 80°C pour *Penicillium emersonii*. Les activités pentosanases, souvent contaminantes des préparations de β -glucanases, sont très importantes car les pentosanes ont un très fort pouvoir de rétention d'eau et vont donc particulièrement gêner la filtration. Elles ont pour effet une accélération très significative de la filtration, donneront des drêches moins humides mais leur effet sur le rendement est moins net. Les surdosages de ces enzymes ne sont pas favorables car cela conduit à une altération du lit filtrant. L'ensemble de ces enzymes sont dénaturées lors de l'ébullition de la maïsche. Les dextrines résiduelles (20 à 60 g/L dans une bière de type Pilsen) sont à l'origine de 30% du pouvoir calorique de la bière. L'utilisation d'amyloglucosidases (5 à 10 unités/L) permet de réduire ce niveau de dextrine mais retarde la fin de la fermentation. L'ajout de -amylases ou de pullulanases peut permettre de gagner jusqu'à deux jours de fermentation et diminue significativement la teneur en oligosaccharides de la bière. Certaines enzymes sont mises en œuvre pour accélérer le processus de maturation de la bière. C'est le cas de l' α -acétolactate décarboxylase (ALDC) qui transforme rapidement l' α -acétolactate présent dans le moût en acétoïne plutôt qu'en

diacétyle. En présence d' α -acétolactate et d'oxygène, une accumulation de diacétyle se fait spontanément, ce qui oblige à une garde de la bière pour éviter les notes aromatiques beurrées liées à sa présence au-dessus de 0,1 mg/L. Au cours de la garde, le diacétyle est réduit en acétoïne, cela fait disparaître la note aromatique de beurre. L'utilisation de l'ALDC. (Produite par *Bacillus subtilis*) permet de réduire de cinq à six jours le temps de fabrication de la bière. Elle est détruite lors de flash pasteurisation qui permet de conserver la bière. Les polyphénols présents dans la bière peuvent être à l'origine de troubles. Un traitement avec des protéases permet d'éviter ce problème (ancien remède). Aujourd'hui la papaine (1 à 3g/hL) est largement utilisée à cette fin.

IV.4.1.3. Usage dans la transformation des matières grasses et raffinage des huiles alimentaires

IV.4.1.3.1. La lipolyse

La lipolyse permet grâce à la libération d'acides gras :

1—d'améliorer les propriétés émulsifiantes des ingrédients lipidiques : libération des mono et diacylglycérols tensioactifs.

La digestibilité des lipides peut être améliorée soit en réalisant des hydrolyses partielles, soit en accroissant l'interface entre la phase lipidique et la phase aqueuse pour augmenter la surface réactionnelle. La mise en œuvre de lipases associée à des traitements d'homogénéisation permet d'y parvenir ; l'hydrolyse doit être partielle, d'une part, pour éviter l'apparition de saveurs indésirables et, d'autre part, pour accroître le taux de mono- et de diacylglycérols qui, par leur caractère amphiphile, réduisent la tension interfaciale et permettent d'accroître la surface interphasique.

2— Libération des AG volatils et amélioration de la saveur des aliments : L'hydrolyse des acylglycérols conduit en effet à des acides gras qui ont une action importante sur les caractéristiques olfactives de certains fromages et notamment les pâtes persillées (roquefort, bleu des Causses, bleu d'Auvergne...) par suite de leur transformation en cétoacides, méthylcétones, lactones. Ainsi, Certains acides gras, comme les acides caproïque (C6 :0), caprylique (C8 : 0) et caprique (C10 : 0) donnent un goût piquant, poivré au fromage.

IV.4.1.3.2. Raffinage des huiles alimentaires

Le dégomme enzymatique est la méthode la plus récente pour dégommer les huiles végétales, y compris l'huile de soja. Elle constitue une technique adéquate pour le raffinage physique qui requiert de faibles teneurs en phosphore et qui ne peuvent être atteintes grâce

aux méthodes conventionnelles de démulcination (traitement à l'acide, dégomme à l'eau, super-dégomme, etc.). Le but de ce procédé est de convertir grâce à une phospholipase, les phospholipides non hydratables en une forme hydratable avec pour avantages un accroissement du rendement en huile, des coûts de fabrication réduits ainsi que la diminution des effluents. Les huiles obtenues à la suite de ce procédé de dégomme poursuivent un raffinage physique. Elles sont ainsi envoyées directement à la section de décoloration sans passer par l'étape de neutralisation. En effet, l'élimination des acides gras libres dans ce cas se fera par distillation sous vide au cours de la désodorisation.

IV.4.1.4. Usage dans les produits laitiers

La première étape de la transformation du lait en fromage est la coagulation. Quand elle s'effectue par la voie enzymatique, elle résulte d'une déstabilisation de la fraction caséinique par hydrolyse spécifique de la caséine capa (liaison Phe105Met 106) sous l'action de chymosine. Dans la présure extraite de la caillette de veau nourri au lait, cette enzyme se trouve en compagnie d'une autre protéase coagulante : la pepsine.

Il existe quatre sources principales de présure: la présure animale (extraite de l'estomac des veaux ou de porc), la présure microbienne, la chymosine recombinante obtenue grâce aux OGM (organismes génétiquement modifiés) et la présure végétale, issue des plantes.

La plupart des fromagers utilisent aujourd'hui de la présure animale, mais plus récemment, divers facteurs ont conduit à un regain d'intérêt pour l'utilisation de sources d'origine végétale dans la fabrication du fromage. Parmi ces facteurs, on trouve le prix élevé et la disponibilité des ressources en quantités limitées d'estomacs de ruminants, les régimes alimentaires tels que le lacto-végétarisme, les restrictions religieuses (cashier et halal par exemple) ou l'interdiction de la présure de veau recombinante dans de nombreux pays européens (France, Allemagne et Pays-Bas).

Remplacer la présure animale par des enzymes extraites de plantes pour fabriquer du fromage n'est toutefois pas la solution la plus simple. En effet, ces enzymes péjorent la saveur et la qualité de la texture du fromage. Elles ont également un rendement inférieur à celui d'autres sources de présure.

Parmi les plantes habituellement employées comme source de présure végétale on trouve : le Gaillet jaune (*Galium verum*), le chardon, l'artichaut et d'autres espèces du genre *Cynar*, l'ortie piquante (*Urtica dioica*) et le pommier Sodome (*Calotropis procera*) et le figuier (*Ficus carica*).

IV.4.1.5. Usage dans les produits carnés

Les enzymes protéolytiques musculaires jouent un rôle très important dans le processus d'attendrissage des viandes. Elles sont en effet responsables des altérations structurales et biochimiques des muscles conduisant à une fragilisation de ce tissu et, par voie de conséquence, à l'amélioration de sa tendreté, qualité la plus recherchée par le consommateur. La variabilité importante de cette qualité, qui a pour origine une grande diversité des matières premières, a conduit les industriels à s'intéresser aux technologies d'attendrissage « artificiel » des viandes et, plus particulièrement, à celles qui font appel à des enzymes exogènes comme la papaïne, la ficine ou les collagénases.

L'attendrissage artificiel n'offre d'intérêt que pour la viande bovine car les viandes de porc, d'agneau ou de volaille sont généralement suffisamment tendres du fait de l'âge d'abattage de ces animaux qui est physiologiquement très bas. L'attendrissage enzymatique de la viande grâce à l'action de protéases exogènes d'origines diverses est interdit en France au niveau industriel. Seule l'utilisation de sels attendrisseurs est autorisée et cette autorisation ne concerne que la papaïne, enzyme extraite de la papaye. Le sel attendrisseur à base de papaïne est exclusivement réservé à la consommation domestique avec une proportion de papaïne comprise entre 20 et 30g/kg de sel de cuisine. Par contre, l'utilisation d'extraits de fruits (papaye, ananas) est autorisée. Compte tenu que la viande est généralement stockée à basse température, ces protéases ne seront pleinement actives que lors de la cuisson. Pour la papaïne, l'optimum d'efficacité est atteint aux environs de 40-50 °C et son activité ne cessera qu'après dénaturation de l'enzyme elle-même par la chaleur, dénaturation qui intervient aux environs de 75-80 °C. Pour cette raison, les sels attendrisseurs sont ajoutés à la viande juste avant cuisson.

IV.4.1.6. Enzyme et qualité hygiénique des aliments

Des produits agricoles, en particulier, ceux d'origine animale comme l'œuf et le lait contiennent des protéines qui ont un pouvoir bactéricide ou bactériostatique. Ces biomolécules sont soit lytiques (lysozyme E.C.3.2.1.17), soit inhibitrices de micro-organismes (peroxydase E.C.1.11.1.7). Ces propriétés sont exploitées pour maîtriser la qualité hygiénique des aliments. Par ailleurs, certaines enzymes comme la catalase (E.C.1.11.1.6) ou la β -lactamase (E.C.3.5.2.6) peuvent détruire des molécules qui ont été introduites dans le milieu (peroxyde d'hydrogène, antibiotique); d'autres biocatalyseurs (par exemple, la glucose oxydase E.C.1.1.3.4) génèrent dans le milieu des produits inhibiteurs. Le lysozyme est utilisé

pour améliorer la conservation des produits marins congelés comme les huîtres ou les crevettes.

IV.4.2. Applications dans le domaine de la biologie moléculaire

L'utilisation des enzymes dans les méthodes de biologies moléculaire est bien ancrée dans les principes méthodes analytique de la biologie moléculaire. Les propriétés extraordinaires que possèdent certaines enzymes, en l'occurrence leur action sur les acides nucléique (synthèse, restriction, ligation, transcription...) font d'elles des outils incontournables dans le génie génétique. Ici, nous développerons quelques exemples d'utilisation d'enzymes dans les techniques de clonage et d'amplification de l'ADN.

- **Enzymes de restriction:** Les enzymes de restriction agissent au niveau de site bien précis au niveau de l'ADN. Elles sont dites endonucléase car elles coupent à l'intérieur de l'AND et non pas au niveau de ces extrémités. Les coupures donnent des « bouts francs » ou extrémité cohésives.

- **ADN Polymérase:** L'utilisation la plus connue est la réplication de l'ADN. Ainsi, en présence des bases ACTG+enzyme+ADN, le fragment d'ADN peut être dupliqué. En *in vivo*, cette enzyme est responsable de la synthèse de l'ADN à partir des monomères deoxynucléotides. Cette enzyme est utilisée dans toutes les étapes *in vitro* de techniques de biologie moléculaire faisant appel à la réplication du brin d'ADN.

- **Transcriptase inverse:** Enzyme servant à synthétiser de l'ADN complémentaire ADNc à partir de l'ARN. Etape cruciale dans la RT-PCR (revers transcription-PCR). Le principe de son fonctionnement est lié à sa composition. En effet, elle comprend en général une polymérase de l'ADN ARN-dépendante et une polymérase de l'ADN ADN-dépendante, lesquelles travaillent en synergie pour réaliser la transcription en sens inverse de la direction standard. Cette transcription inverse ou rétrotranscription permet comme son nom l'indique de transcrire à l'envers c'est-à-dire d'obtenir de l'ADN à partir d'ARN.

IV.4.3. Applications industrielle

IV.4.3.1. Industrie du papier

Le blanchiment est l'élimination de la lignine des pulpes chimiques du papier. Cette étape de la fabrication du papier est nécessaire pour des raisons esthétiques ainsi que pour améliorer les qualités du produit final. Le blanchiment est constitué de diverses étapes et varie en fonction du type de substances utilisées. On utilise traditionnellement pour le blanchiment de la pâte kraft des composés chlorés. Cette méthode produisant des déchets toxiques (mutagènes, cancérigènes, bioaccumulables) qui entraînent de nombreuses altérations des

systèmes biologiques, l'utilisation de ces agents blanchissants est interdite dans divers États développés. Les enzymes sont une bonne alternative aux agents blanchissants chlorés. L'utilisation de xylanases dans l'étape de blanchiment de la pâte kraft permet d'éviter le chlore et de réduire les déchets toxiques, d'éliminer l'étape du goulot de bouteille (en raison de la capacité limitée des cuves de dioxyde de chlore), d'augmenter le degré de blanc de la pâte et de diminuer les coûts de l'opération, notamment dans les usines qui utilisent de grandes quantités de dioxyde de chlore. Enfin, le prétraitement aux enzymes permet également d'augmenter le degré de blanc final de la pâte et de réduire la présence des agents chimiques dans l'étape du blanchiment. Le désencrage est une étape nécessaire si l'on souhaite utiliser comme matières premières des fibres récupérées dans la fabrication de papier et de carton ; la réutilisation de ces fibres dépend de l'élimination des encres et des autres polluants. Le désencrage présente néanmoins des inconvénients, notamment dans le cas du papier recyclé et produit de nouveaux déchets solides et liquides. Voici les enzymes utilisées dans les étapes du désencrage : les lipases, les estérases, les pectinases, les hemicellulases, les cellulases et les enzymes lignitiques. Les deux premières, les lipases et les estérases, dégradent les encres à base d'huiles végétales. Les autres (les pectinases, les hemicellulases, les cellulases et les enzymes lignitiques), modifient la surface de la fibre de cellulose ou les unions proches des particules d'encre, ce qui libère la teinture de la fibre et permet de la séparer par flottation ou lavage.

IV.4.3.2. Industrie des détergents

L'industrie des détergents utilise le plus gros volume d'enzymes, c'est-à-dire 45 % du total du marché. Les enzymes utilisées dans ce secteur sont les protéases, bactériennes et fongiques, les amylases, les cellulases et les lipases. Les enzymes les plus présentes sur le marché sont les protéases bactériennes, dont il existe actuellement une grande variété. Ces enzymes possèdent des propriétés nettoyantes croissantes et une grande stabilité face aux oxydants. Les alpha-amylases sont très efficaces en ce qui concerne la dégradation des chaînes d'amidon, ce qui est la raison pour laquelle elles améliorent l'élimination des particules de poussière et de terre qui restent présentes dans les tissus à cause de la trame des polymères de l'amidon. Utiliser les protéases et les amylases conjointement permet d'obtenir un meilleur lavage des tissus ; en effet, il y a diminution de la charge des produits chimiques dans le détergent et de la température de lavage. Les cellulases sont quant à elles utilisées à la place des tensioactifs ioniques pour améliorer la douceur des tissus en coton. Elles sont également actives dans l'élimination des particules de poussière et de terre car elles éliminent les microfibrilles des fibres de coton, ce qui produit de plus un effet de brillantage de la

couleur. Les lipases catalysent l'hydrolyse des triglycérides présentes dans les taches de graisse, ce qui les rend hydrophiles et permet une élimination facile au lavage. Il faut signaler que les enzymes utilisées dans les détergents ont un impact sur l'environnement positif. Elles entraînent en effet des économies énergétiques dues à la réduction des températures du lavage, permettent la réduction de la teneur en produits chimiques des détergents, sont biodégradables, n'ont pas d'impact négatif dans les processus d'épuration des eaux et ne présentent pas de risques pour la vie aquatique.

IV.4.3.3. Désencollage de textile

L'amidon est la substance naturelle dont on recouvre le fil à coudre pour augmenter sa résistance avant le tissage. Cet amidon doit être éliminé avant de procéder aux traitements finaux du tissu: blanchiment, teinture, traitements spéciaux, etc. L'élimination traditionnelle s'effectuait auparavant en milieu acide. Aujourd'hui, le désencollage enzymatique utilise des amylases en remplacement de l'acide. L'industrie textile utilise ce procédé biotechnologique depuis le début du XXe siècle. Les amylases sont très efficaces dans le désencollage et ne génèrent pas de problèmes de déchets dangereux pour l'environnement comme c'est le cas des acides minéraux, des bases ou des oxydants.

IV.4.3.4. Industrie de cuir

Le tannage des peaux est l'un des processus industriels aux enzymes les plus anciens. En voici les étapes traditionnelles : séchage, trempage, élimination des poils et de la laine, raclage et tannage. Le tannage utilise de nombreux produits chimiques pour éliminer les poils, les graisses et les protéines non-désirées (élastine, kératine, albumine et globuline), laissant intact le collagène dans l'étape précédant le tannage de la peau. Les produits chimiques utilisés nuisant considérablement à l'environnement, on utilise aujourd'hui des protéases telles que la trypsine et les lipases. Ces substances, qui réduisent l'utilisation des sulfites, des solvants organiques et des tensioactifs synthétiques, permettent d'obtenir un produit doté de meilleures propriétés finales.

PARTIE II : TRAVAUX DIRIGES

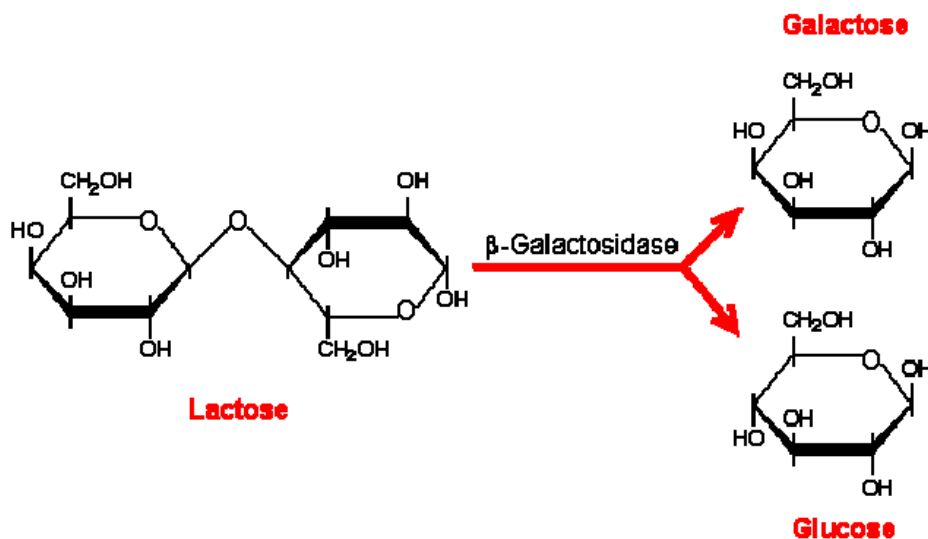
Exercice 1

La lactase hydrolyse le lactose en glucose et galactose. On détermine la vitesse d'hydrolyse du lactose par la lactase (β -galactosidase) (E.C. 3.2.1.23) dans les conditions initiales. Il apparaît $0,672 \times 10^{-2}$ moles de glucose en 10 minutes. On a introduit dans le milieu 1 mL de solution enzymatique dont la teneur en protéines est de $2,85 \text{ g.L}^{-1}$

- Ecrire l'équation de la réaction
- Que signifie le terme « conditions initiales », Préciser les conditions de concentrations en substrat.
- Calculer la concentration d'activité catalytique de la préparation en enzymatique en U.L^{-1} et en Kat.mL^{-1}
- Calculer l'activité spécifique de l'enzyme en U.mg^{-1} et en Kat.mg^{-1}
- Calculer l'activité molaire spécifique en considérant que l'on est en présence d'une enzyme pure. ($\text{PM} = 135000 \text{ Da}$)

Solution de l'exercice 1

a) Réaction



- Conditions initiales : ce sont les conditions qui permettent de mesurer la vitesse initiale de la réaction, en particulier le substrat doit être en large excès par rapport à l'enzyme pour que $v = v_i$ le plus longtemps possible.
- Calcul de la concentration d'activité enzymatique

– En UI.mL^{-1} : l'unité internationale est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 μmole de substrat par minute.

Il apparaît $0,672 \times 10^{-2}$ moles soit 6720 μmole de glucose en 10 minutes, ainsi, d'après la stœchiométrie de la réaction, 6720 μmole de lactose ont été hydrolysées en 10 minutes soit 672 μmole par minute pour un volume de 1 mL. Donc la concentration d'activité enzymatique est de 672 UI.mL^{-1}

– En Kat.mL^{-1} : le katal est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de 1 mole de substrat par seconde. donc la concentration d'activité enzymatique est égale à $0,672 \times 10^{-2} / 60 \times 10 \times 1 = 1,12 \times 10^{-5} \text{ kat.mL}^{-1}$

d) Activité spécifique de l'enzyme S'exprime en UI.mg^{-1} .ou en Kat.mg^{-1}

La concentration en protéines de la solution est de $2,85 \text{ g.L}^{-1}$, dans 1 mL de solution il y a donc 2,85 mg de protéine D'où activité spécifique de l'enzyme = $(672/2,85) \times 1 = 236 \text{ UI.mg}^{-1}$ ou $(1,12 \times 10^{-5}/2,85) \times 1 = 3,92 \text{ Kat.mg}^{-1}$

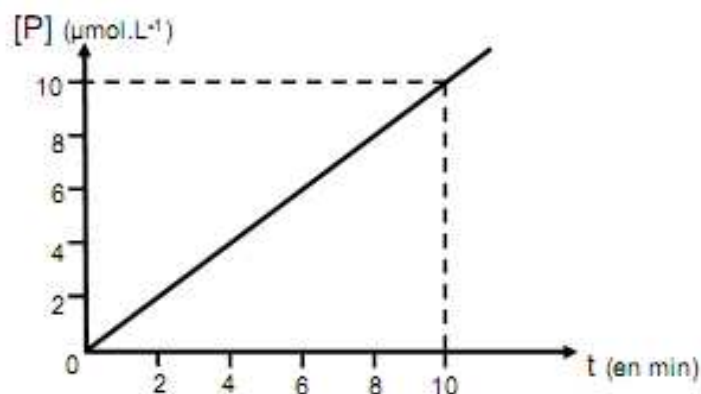
e) Activité molaire spécifique de l'enzyme

Le poids moléculaire de l'enzyme est 135 000 Da, 2,85 mg représentent donc $2,85 \times 10^{-3} / 135000 = 2,1 \times 10^{-8}$ mole.

D'où activité molaire spécifique de l'enzyme = $(672/2,1 \times 10^{-8}) \times 1 = 3,18 \times 10^{10} \text{ UI.mol}^{-1} = (1,12 \times 10^{-5}/2,1 \times 10^{-8}) \times 1 = 530 \text{ Kat.mol}^{-1}$

Exercice 2

Pour l'étude d'une poudre A possédant une activité enzymatique, on en dissout 0,1 g dans une solution tampon convenable et on complète à 10 ml, on obtient ainsi la solution B. Les mesures d'activités enzymatiques sont effectuées après dilution de 1 ml de solution B dans 9 ml de solution de substrat (S). La concentration en substrat dans le milieu réactionnel est de 10 Km ($K_m = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$)



Question 1

- A partir des résultats reproduits sur le graphique, calculer la vitesse initiale (à exprimer en $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$).
- En déduire la concentration d'activité catalytique de la poudre A exprimée en unité internationale par g de poudre (UI/g).

Question 2

- On prépare une solution C en dissolvant 0,3 g de poudre A dans 10 mL de tampon. Puis le reste du protocole est identique à celui utilisé précédemment. Calculer la vitesse initiale v_0 (à exprimer en $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

Question 3

- Calculer le % de substrat consommé après 10 minutes d'incubation selon le protocole évoqué dans la question 1
- Calculer le % de substrat consommé après 10 minutes d'incubation selon le protocole évoqué dans la question 2

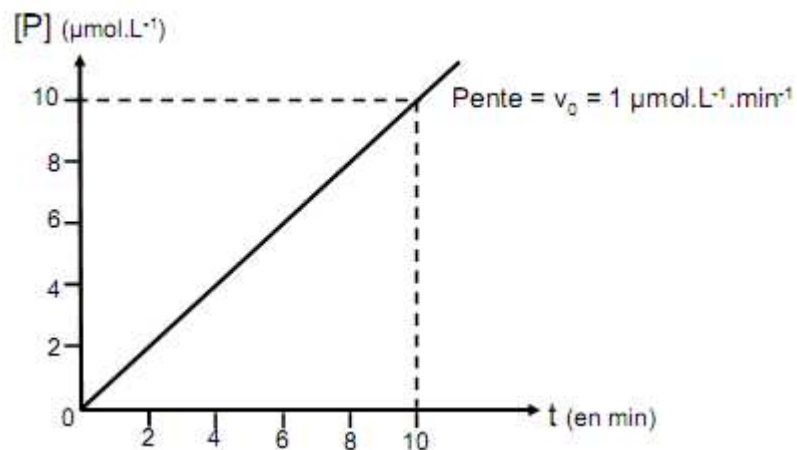
Question 4

- Si on admet que pour être en condition de vitesse initiale pendant les 10 minutes d'incubation il faut que la consommation de substrat pendant ce laps de temps soit inférieure ou égale à 5 %, quelle est la concentration d'activité enzymatique maximale mesurable avec cette technique (concentration d'activité enzymatique du milieu d'incubation en UI/L) ?

Solution de l'exercice 2

Question 1

- En déduire la concentration d'activité catalytique de la poudre A exprimée en unité internationale par g de poudre (UI/g).



Les mesures de vitesse initiale ont été effectuées après dilution de la solution B au 1/10 (1 ml de solution B + 9 ml de solution de substrat).

La concentration d'activité de la solution B est donc 10 fois plus élevée que celle du milieu réactionnel ayant permis les mesures de vitesse initiale :

Concentration d'activité de la solution B = $10 \times 1 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1} = 10 \text{ UI/L}$

La solution B a été obtenue par dissolution de 0,1g de poudre dans 10 ml de tampon : Quelle est l'activité enzymatique de 0,1 g de poudre? C'est égal à l'activité de 10 ml de solution B

Dans 1 L de solution B : 10 UI, donc dans 10 mL : 0,1 UI

Concentration d'activité de la poudre A : 0,1 UI dans 0,1 g donc 1UI/g

– En déduire la concentration d'activité catalytique de la poudre A exprimée en unité internationale par g de poudre (UI/g).

Définitions :

– 1 UI = activité enzymatique permettant la transformation d'une micromole de substrat par minute ($\mu\text{mol. min}^{-1}$)

– Concentration d'activité catalytique = activité par unité de volume (L) ou par unité de masse (g) (UI.L^{-1} ou $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{L}^{-1}$ ou UI.g^{-1} ou $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$)

Remarque :

Concentration d'activité catalytique est exprimée en : $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{L}^{-1} = \mu\text{mol. L}^{-1} .\text{min}^{-1} =$ unité de vitesse initiale. Donc mesurer la concentration d'activité catalytique = mesurer la vitesse initiale

Question 2

– On prépare une solution C en dissolvant 0,3 g de poudre A dans 10 mL de tampon. Puis le reste du protocole est identique à celui utilisé précédemment. Calculer la vitesse initiale v_0 (à exprimer en $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

On sait que $v = k_{\text{cat}} [\text{Et}] [\text{S}] / (K_m + [\text{S}])$

La solution C est faite en mettant 3 fois plus de poudre que pour la solution B, il y aura donc une concentration d'enzyme trois fois plus grande donc une vitesse initiale trois fois plus grande.

$V_0 = 3 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$

Question 3

– Calculer le % de substrat consommé après 10 minutes d'incubation selon le protocole évoqué dans la question 1.

La concentration de substrat dans le milieu réactionnel au temps 0 est de 10 mmol/L. Après 10 minutes d'incubation la concentration en produit est de 10 $\mu\text{mol/L}$. Donc par L de milieu réactionnel : 10 μmol de substrat (parmi les 10 mmol = 10 000 μmol de départ) ont été transformés en 10 μmol de produit.

Le % de substrat transformé est donc : $[(10/10000) \times 100] = 0,1\%$.

Calculer le % de substrat consommé après 10 minutes d'incubation selon le protocole évoqué dans la question 2. Même raisonnement. Le % de substrat transformé est donc : $[(30/10000) \times 100] = 0,3\%$.

Question 4

– Si on admet que pour être en condition de vitesse initiale pendant les 10 minutes d'incubation il faut que la consommation de substrat pendant ce laps de temps soit inférieure ou égale à 5 %, quelle est la concentration d'activité enzymatique maximale mesurable avec cette technique (concentration d'activité enzymatique du milieu d'incubation en UI/L) ?

Une concentration d'activité catalytique du milieu d'incubation de 1 UI/L entraîne la consommation de 0,1% du substrat en 10 minutes d'incubation. Pour avoir 5% de consommation de substrat en 10 minutes avec cette même technique, il faut avoir une concentration d'activité enzymatique 50 fois plus importante, donc de 50 UI/L = concentration d'activité maximale mesurable avec cette technique.

Les concentrations d'activité supérieures entraîneraient la consommation de plus de 5% du substrat en 10 minutes : nous ne serions plus en conditions de vitesse initiale pendant toute la durée des mesures et donc les mesures de vitesse sur 10 minutes ne seraient plus exactes.

Exercice 3

Une enzyme présente dans le plasma a une masse molaire de 70 kDa ($K_m = 3 \cdot 10^{-4}$ M). Sa concentration catalytique mesurée dans un plasma selon les conditions conventionnelles est égale à 126 UI. L⁻¹

Question 1

- Exprimer cette concentration en $\mu\text{kat.L}^{-1}$.

- Pour quelle concentration en substrat la vitesse de réaction enzymatique sera-t-elle égale au quart de la vitesse maximum?

Question 2

- En admettant que, dans les conditions conventionnelles de l'énoncé, la vitesse de réaction enzymatique correspond à v_{max} et en sachant que la prise d'essai de sérum est diluée au quart dans le volume réactionnel final, quelle est la v_{max} mesurée dans ce mélange réactionnel?

Question 3

Sachant que la concentration en enzyme dans le volume réactionnel final est de 35 ng.L^{-1} , calculer la constante catalytique de l'enzyme

Solution de l'exercice 3

Question 1 : Exprimer cette concentration en $\mu\text{kat.L}^{-1}$. Pour quelle concentration en substrat la vitesse de réaction enzymatique sera-t-elle égale au quart de la vitesse maximum?

Concentration catalytique = $126 \text{ UI/L} = 126 \cdot 10^{-6} \text{ mol.min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} = (126 \cdot 10^{-6})/60 = 2,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol. s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} = 2,1 \mu\text{kat/L}$

$$V_0 = v_{\text{max}} [S]/(K_m + [S]) = v_{\text{max}}/4$$

$$[S]/(K_m + [S]) = 1/4$$

$$(K_m + [S]) / [S] = 4$$

$$K_m/[S] + 1 = 4$$

$$K_m/[S] = 3$$

$$[S] = K_m/3 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Question 2 : En admettant que, dans les conditions conventionnelles de l'énoncé, la vitesse de réaction enzymatique correspond à v_{max} et en sachant que la prise d'essai de sérum est diluée au quart dans le volume réactionnel final, quelle est la v_{max} mesurée dans ce mélange réactionnel?

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E_0]$$

Si dilution au $1/4$ dans milieu réactionnel

$$[E_0] (\text{milieu réactionnel}) = [E_0] (\text{sérum}) / 4$$

$$V_{\text{max}} (\text{milieu réactionnel}) = V_{\text{max}} (\text{sérum})/4 = 31,5 \mu\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

Question 3 : sachant que la concentration en enzyme dans le volume réactionnel final est de 35 ng.L^{-1} , calculer la constante catalytique de l'enzyme

$$V_{\text{max}} = K_{\text{cat}} [E_0]$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/[E_0]$$

$$[E_0] = 35 \cdot 10^{-9} / 70\,000 = 5 \cdot 10^{-13} \text{ M}$$

$$K_{\text{cat}} = (31,5 \cdot 10^{-6} / 60) / 5 \cdot 10^{-13} = 1,05 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$$

Exercice 4

L'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) est purifiée à partir d'un homogénat de torpille électrique. A chaque étape de la purification on dose la concentration catalytique (U/mL) et la concentration en protéines totales. Les résultats sont reportés ci-dessous.

Etape de purification	Volume (ml)	Protéines (g/ml)	Concentration catalytique (UI/ml)
Homogénat	150	600	12
Précipitation par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	300	150
Affinité (éluat)	20	6	51

Question 1 : Calculer l'activité spécifique de chaque fraction, ainsi que les rendements et degrés de purification pour l'ensemble de la purification.

Le K_m de l'enzyme pour son substrat est de 0,30 mM. Pour mesurer les concentrations catalytiques du tableau ci-dessus, chaque fraction est préalablement diluée au $1/1000^{\text{ème}}$, le temps de mesure est de 1 min et les conditions du dosage (dans les conditions conventionnelles retenues pour la définition de l'unité de l'activité enzymatique) sont telles que 90% des sites actifs de l'enzyme $[(\text{ES})/(\text{E})_t = 0,9]$ sont occupés par le substrat acétylcholine.

Question 2 : Quelle doit être la concentration en acétylcholine (en mM et en unités K_m) dans les conditions du dosage?

Question 3 :

a) Calculer pour la 2ème étape de purification [précipitation par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] la vitesse initiale (v_0) mesurée dans le milieu réactionnel. Quelle serait la V_{max} ?

b) En déduire, après 1 min d'incubation, la concentration résiduelle en substrat (en mmol/L et en unités K_m).

c) Calculer la vitesse (v) correspondant à cette concentration et l'exprimer en % de la vitesse initiale (V_0) mesurée.

Solution de l'exercice 4

L'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) est purifiée à partir d'un homogénat de torpille électrique. A chaque étape de la purification on dose la concentration catalytique (UI/mL) et la concentration en protéines totales. Les résultats sont reportés ci-dessous.

Question 1 : Calculer l'activité spécifique de chaque fraction, ainsi que les rendements et les degrés de purification pour l'ensemble de la purification.

Activité spécifique homogénat = $12/600 = 0,02$ UI/mg protéines

Activité spécifique precip. = $150/300 = 0,5$ UI/mg protéines

Activité spécifique éluat = $51/6 = 8,5$ UI/mg protéines

Activité éluat : $51 \times 20 = 1020$ UI

Activité homogénat : $12 \times 150 = 1800$ UI

$R\% = (1020/1800) \times 100 = 56\%$

Degré de purification = facteur d'enrichissement = activité spécifique finale/ activité spécifique initiale = $8,5/0,02 = 425$

Question 2 : Le K_m de l'enzyme pour son substrat est de 0,30 mM. Pour mesurer les concentrations catalytiques du tableau ci-dessus, chaque fraction est préalablement diluée au $1/1000^{\text{ème}}$, le temps de mesure est de 1 min et les conditions du dosage (dans les conditions conventionnelles retenues pour la définition de l'unité de l'activité enzymatique) sont telles que 90% des sites actifs de l'enzyme $[(ES)/(Et) = 0,9]$ sont occupés par le substrat acétylcholine.

- Quelle doit être la concentration en acétylcholine (en mM et en unités K_m) dans les conditions du dosage?

$$V_0 = k_{cat} [ES] = 0,9 k_{cat} [Et] = 0,9 v_{max}$$

D'après MM :

$$V_0 = v_{max} \cdot [S]/(K_m + [S]) = 0,9$$

$$v_{max} [S]/(K_m + [S]) = 0,9$$

$$[S] = 0,9 (K_m + [S])$$

$$0,9 k_m = 0,1 [S]$$

$$[S] = 9 k_m = 2,7 \text{ mM}$$

Question 3:

a) Calculer pour la 2^{ème} étape de purification [précipitation par $(NH_4)_2SO_4$] la vitesse initiale (v_0) mesurée dans le milieu réactionnel. Quelle serait la V_{max} ?

b) En déduire, après 1 min d'incubation, la concentration résiduelle en substrat (en mmol/L et en unités K_m).

a) Concentration catalytique = $150 \text{ UI/mL} = 150\,000 \text{ UI/L}$

Dilution au $1/1000$ de l'échantillon : $[E]_t / 1000$

$$V_0 = k_{cat} [E]_t [S] / (k_m + [S])$$

$$V_0 = 150\,000/1000 = 150 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$V_0 = 0,9 V_{max}$$

$$V_{max} = (1/0,9) \times v_0 = 166 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

b) Concentration résiduelle = concentration de départ - concentration de substrat consommé en 1 min = $2,7 - 0,15 = 2,55 \text{ mM}$

c) Calculer la vitesse (v) correspondant à cette concentration et l'exprimer en % de la vitesse initiale (V_0) mesurée.

$$v = v_{max} [S] / (k_m + [S])$$

$$= 166 \cdot 10^{-6} \times 2,55 \cdot 10^{-3} / (0,3 \cdot 10^{-3} + 2,55 \cdot 10^{-3})$$

$$= 148,5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$v/v_0 = 148,5/150 = 99\%$$

$$v = 99\% v_0$$

Exercice 5

Une enzyme présente dans le plasma a une masse molaire de 70 kDa ($K_m = 3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Sa concentration catalytique mesurée dans un plasma selon les conditions conventionnelles est égale à $126 \text{ UI} \cdot \text{L}^{-1}$

Question 1 :

- Exprimer cette concentration en $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$.

- Pour quelle concentration en substrat la vitesse de réaction enzymatique sera-t-elle égale au quart de la vitesse maximum?

Question 2 : En admettant que, dans les conditions conventionnelles de l'énoncé, la vitesse de réaction enzymatique correspond à v_{max} et en sachant que la prise d'essai de sérum est diluée au quart dans le volume réactionnel final, quelle est la v_{max} mesurée dans ce mélange réactionnel?

Question 3 : sachant que la concentration en enzyme dans le volume réactionnel final est de $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, calculer la constante catalytique de l'enzyme

Solution de l'exercice 5

Question 1

- Exprimer cette concentration en $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$.

$$\text{Concentration catalytique} = 126 \text{ U/L} = 126 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} = (126 \cdot 10^{-6})/60$$

$$= 2,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} = 2,1 \mu\text{kat/L}$$

- Pour quelle concentration en substrat la vitesse de réaction enzymatique sera-t-elle égale au quart de la vitesse maximum?

$$V_0 = v_{\text{max}} [S]/(K_m + [S]) = v_{\text{max}}/4$$

$$[S]/(K_m + [S]) = 1/4$$

$$(K_m + [S]) / [S] = 4$$

$$K_m/[S] + 1 = 4$$

$$K_m/[S] = 3$$

$$[S] = K_m/3 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Question 2 : En admettant que, dans les conditions conventionnelles de l'énoncé, la vitesse de réaction enzymatique correspond à v_{max} et en sachant que la prise d'essai de sérum est

diluée au quart dans le volume réactionnel final, quelle est la v_{max} mesurée dans ce mélange réactionnel?

$$V_{max} = k_{cat} [E_t]$$

Si dilution au $\frac{1}{4}$ dans milieu réactionnel $[E_0]$ (milieu réactionnel) = $[E_0]$ (sérum) / 4

$$V_{max} (\text{milieu réactionnel}) = V_{max} (\text{sérum})/4 = 31,5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

Question 3 : sachant que la concentration en enzyme dans le volume réactionnel final est de $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, calculer la constante catalytique de l'enzyme

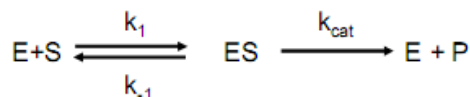
$$V_{max} = K_{cat} [E_t]$$

$$K_{cat} = V_{max} / [E_t]$$

$$[E_t] = 35 \cdot 10^{-9} / 70\,000 = 5 \cdot 10^{-13} \text{ M}$$

$$K_{cat} = (31,5 \cdot 10^{-6} / 60) / 5 \cdot 10^{-13} = 1,05 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$$

Exercice 6



Pour une enzyme E1 agissant sur le substrat S, on donne :

$$k_1 = 10^9 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$k_{-1} = 10^4 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$k_{cat1} = 10^2 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

- Calculer k_m1

Pour une enzyme E2 agissant sur le même substrat S, on donne :

$$k_1 = 10^9 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$k_{-1} = 10^4 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$k_{cat2} = 10^6 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

- Calculer k_m2

- Calculer les efficacités catalytiques de : E1 et E2

Nous souhaitons comparer les activités enzymatiques de E1 et E2 sur diverses concentrations en substrat S. Pour cela nous allons évaluer les activités d'une solution de E1 et d'une solution de E2 de concentration identique : $[E1] = [E2] = 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

- Calculer v_{max1} et v_{max2} ($\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) correspondant à $[E1]$ et $[E2]$ de chacune de ces solutions. Comparer ces 2 valeurs en calculant le rapport v_{max2}/v_{max1} .

- Calculer les vitesses initiales v_1 et v_2 ($\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) de ces 2 solutions d'enzyme pour $[\text{S}] = 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Comparer ces 2 valeurs en calculant le rapport v_2/v_1 .

- Calculer les vitesses initiales v_1 et v_2 ($\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) de ces 2 solutions d'enzyme pour $[\text{S}] = 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. Comparer ces 2 valeurs en calculant le rapport v_2/v_1 .

- Comment expliquer l'impact de la concentration $[\text{S}]$ sur les rapports v_2/v_1 ? Pour une enzyme E1 agissant sur le substrat S, on donne : $k_1 = 10^9 \text{ mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, $k_{-1} = 10^4 \text{ mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$,

$$k_{\text{cat}1} = 10^2 \text{ mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

Solution de l'exercice 6

- Calculer k_{m1}

$$K_m = k_{-1} + k_{\text{cat}}/k_1$$

$$K_{m1} = k_{-1} + k_{\text{cat}}/K_1 = 1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

- Calculer k_{m2}

$$K_{m2} = k_{-1} + k_{\text{cat}2} / k_1 = 1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$$

- Calculer les efficacités catalytiques de E1 et E2

$$\text{Efficacité catalytique} = k_{\text{cat}}/K_m$$

$$\text{Pour E1 : } k_{\text{cat}1}/K_{m1} = 10^2/10^{-5} = 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$\text{Pour E2 : } k_{\text{cat}2}/K_{m2} = 10^6/10^{-3} = 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

Nous souhaitons comparer les activités enzymatiques de : E1 et E2 sur diverses concentrations en substrat S. Pour cela nous allons évaluer les activités d'une solution de E1 et d'une solution de E2 de concentration identique : $[\text{E1}] = [\text{E2}] = 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$

- Calculer $v_{\text{max}1}$ et $v_{\text{max}2}$ ($\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) correspondant à $[\text{E1}]$ et $[\text{E2}]$ de chacune de ces solutions. Comparer ces 2 valeurs en calculant le rapport $v_{\text{max}2}/v_{\text{max}1}$.

$$v_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \cdot [\text{E}t]$$

$$v_{\text{max}1} = k_{\text{cat}1} \cdot [\text{E1}] = 10^2 \cdot 10^{-10} = 10^{-8} \text{ mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$v_{\text{max}2} = k_{\text{cat}2} \cdot [\text{E2}] = 10^6 \cdot 10^{-10} = 10^{-4} \text{ mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$v_{\text{max}2}/v_{\text{max}1} = 10^4$$

- Calculer les vitesses initiales v_1 et v_2 ($\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) de ces 2 solutions d'enzyme pour $[\text{S}] = 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Comparer ces 2 valeurs en calculant le rapport v_2/v_1 .

$$\text{Vitesse initiale : } v_0 = v_{\text{max}} [\text{S}] / (K_m + [\text{S}])$$

$$V_1 = 10^{-8} \cdot 10^{-4} / (10^{-5} + 10^{-4}) = 0,9 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$V_2 = 10^{-4} \cdot 10^{-4} / (10^{-3} + 10^{-4}) = 0,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$v_2/v_1 = 103$$

- Calculer les vitesses initiales v_1 et v_2 ($\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) de ces 2 solutions d'enzyme pour $[S] = 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Comparer ces 2 valeurs en calculant le rapport v_2/v_1 .

$$V_1 = 10^{-8} \cdot 10^{-2} / (10^{-5} + 10^{-2}) = 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$V_2 = 10^{-4} \cdot 10^{-2} / (10^{-3} + 10^{-2}) = 0,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$v_2/v_1 = 0,9 \cdot 10^4$$

- Comment expliquer l'impact de la concentration $[S]$ sur les rapports v_2/v_1 ?

Pour la concentration en substrat de $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[S]$ est $>$ à 10 Km pour les 2 enzymes, elles sont saturées par le substrat. La vitesse de réaction se rapproche de la vitesse maximale qui pour une concentration en enzyme donnée est proportionnelle à k_{cat} ($V_{max} = k_{cat} \cdot [Et]$).

Le rapport entre v_2 et v_1 est donc égal au rapport entre k_{cat2} et k_{cat1} .

Pour la concentration en substrat $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[S] = 10 \text{ km}_1 = 0,1 \text{ Km}_2$

Donc E_1 est à sa vitesse maximale mais pas E_2 , donc le rapport v_2/v_1 est plus faible que lorsque les deux enzymes sont à leurs vitesses maximales.

Exercice 7

On mesure la vitesse initiale pour différentes concentrations de substrat.

$[S] \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0,0125	0,025	0,05	0,1
$V_i \mu\text{mol} \cdot \text{minute}^{-1}$	133	167	190	Compléter

1. Donner la signification de V_{max} et K_m .
2. Déterminer graphiquement les constantes cinétiques de cette enzyme.

Solution de l'exercice 7

1. Signification de K_m et V_{max}

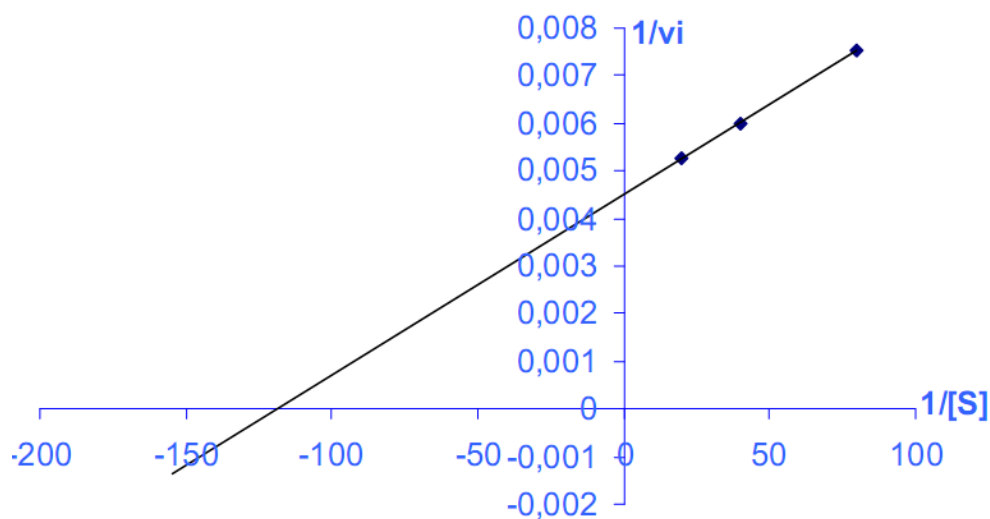
- La constante de Michaelis K_m est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est à la moitié de la vitesse initiale maximale. Cette constante est une concentration, elle a la même unité : $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

- La vitesse maximale V_{max} (dont l'unité est $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est égale au produit de la constante catalytique k_{cat} de l'enzyme par la concentration totale $[Et]$ d'enzyme : $V_{max} = k_{cat} \cdot [Et]$

2. Calcul de V_{max} et K_m :

$1/[S] \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$	80	40	20
$1/V_i \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{minute}$	$7,52 \cdot 10^{-3}$	$5,99 \cdot 10^{-3}$	$5,26 \cdot 10^{-3}$

Représentation de Lineweaver et Burk en coordonnées inverses :



Calcul de $1/V_{\max}$: lorsque $1/[S] = 0$, $1/v_i = 1/V_{\max}$ donc $1/V_{\max} = 0,0045 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{minute}$ donc $V_{\max} = 222 \mu\text{mol} \cdot \text{minute}^{-1}$

Calcul de $1/K_m$: lorsque $1/v_i = 0$, $1/[S] = -1/K_m$ donc $-1/K_m = -112,5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ donc $K_m = 8,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Calcul de v_i quand $[S] = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: si $[S] = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ alors $1/[S] = 10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, d'après l'équation de la droite $1/v_i = 4,9 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{minute}$ donc $v_i = 204 \mu\text{mol} \cdot \text{minute}^{-1}$

Exercice 8

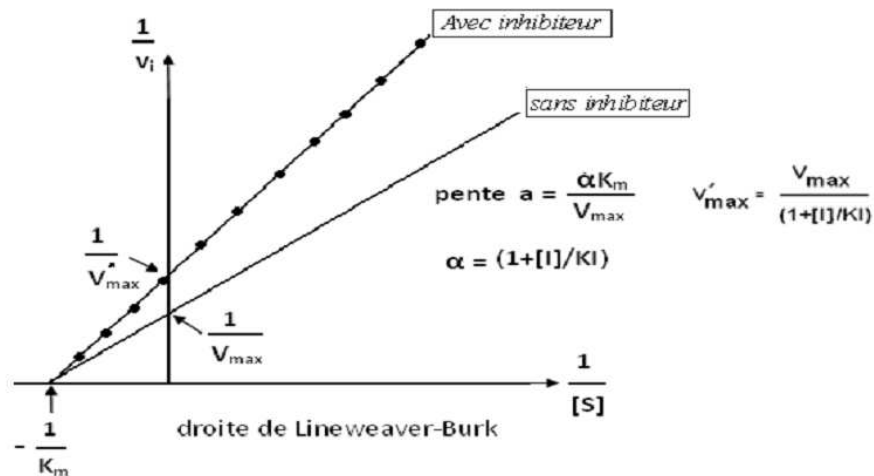
L'activité d'une enzyme [E] est mesurée en fonction de la concentration en substrat [S] en absence et en présence d'inhibiteur [I] (à une concentration de 10^{-6} M). On trouve les résultats suivants :

[S] x 10 ² (M)	Sans inhibiteur	Avec inhibiteur
	V _i (μmol min ⁻¹)	V _i (μmol min ⁻¹)
2	5,0	2,50
5	7,14	3,57
7,5	7,87	3,95
10	8,34	4,17
20	9,09	4,54

1. Déterminer V_{\max} et K_m en absence et en présence d'inhibiteur.
2. Préciser le type d'inhibition exercée par I sur l'enzyme. Justifier.
3. Calculer la constante de dissociation K_I correspondant.

Solution de l'exercice 8

1- Graphe $1/V_i$ en fonction de $1/[S]$



Calcul de K_m et V_{max}

a- En absence de I :

$$K_m = 2,10^{-2} \text{ M}$$

$$V_{max} = 10 \mu\text{mol min}^{-1}$$

b- En présence de I :

$$K'_m = 2,10^{-2} \text{ M}$$

$$V'_{max} = 5 \mu\text{mol min}^{-1}$$

2- Ainsi, l'inhibition de l'enzyme par **I** est de type **non compétitif**.

En effet, après extrapolation, les droites des inverses se coupent sur l'axe des $1/[S]$ et passent toutes par le même K_m , tandis que les V_{max} sont différentes.

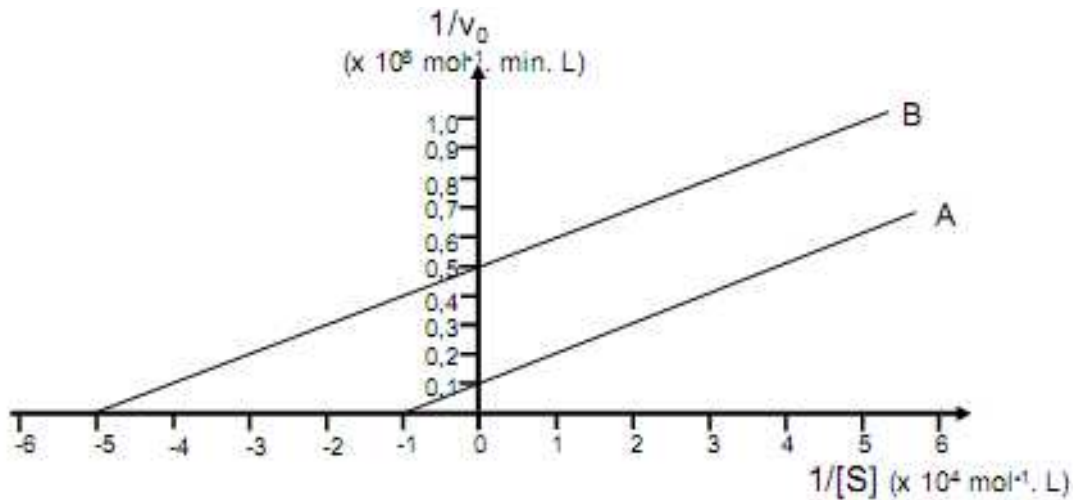
3- Calcul de la constante de dissociation K_I

En présence d'inhibiteur non compétitif, nous avons la relation suivante :

$$V'_{max} = \frac{V_{max}}{(1+[I]/K_I)} \quad \text{et donc} \quad K_I = \frac{V'_{max} [I]}{V_{max} - V'_{max}}$$

En présence de d'inhibiteur à une concentration 10^{-6} M , la valeur de $K_I = 10^{-6} \text{ M}$

Exercice 9



La courbe A représente les résultats d'une étude cinétique de l'activité d'une enzyme E sur son substrat S dans des conditions bien définies.

La courbe B représente les résultats d'une cinétique obtenue dans les mêmes conditions mais en présence, dans le milieu d'incubation, d'un inhibiteur à une concentration $[I] = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

- Calculer le K_m de l'enzyme pour son substrat
- Calculer V_{\max}
- A quoi correspond la pente de la courbe A? Utilisez cette réponse pour vérifier les résultats trouvés précédemment. Bien préciser les unités.
- Indiquer, en justifiant votre réponse, dans quel type d'inhibition on peut classer l'inhibiteur.
- Calculer le K_i de l'inhibiteur pour l'enzyme

Solution de l'exercice 9

La courbe A représente les résultats d'une étude cinétique de l'activité d'une enzyme E sur son substrat S dans des conditions bien définies.

- Calculer le K_m de l'enzyme pour son substrat
- D'après le graphique ($1/v_0 = f(1/[S])$) (Droite A),
- $$-1/K_m = 1 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$$

$$K_m = 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

- La courbe A représente les résultats d'une étude cinétique de l'activité d'une enzyme E sur son substrat S dans des conditions bien définies.
- Calculer V_{\max}

D'après le graphique ($1/v_0 = f(1/[S])$) (Droite A),

$$1/V_{\max} = 0,1 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{L}$$

$$V_{\max} = 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$V_{\max} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

- A quoi correspond la pente de la courbe A? Utilisez cette réponse pour vérifier les résultats trouvés précédemment. Bien préciser les unités.

La pente de la droite est $K_m/v_{\max} = 10 \text{ min}$

Graphiquement, la pente calculée à partir du point de coordonnées $1/v_0 = 0 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{L}$; $1/[S] = 1 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ et du point de coordonnées $1/v_0 = 0,1 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{L}$; $1/[S] = 0 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$:

$$\text{Pente} = (0,1 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{L}) / (1 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}) = 10 \text{ min}$$

La courbe B représente les résultats d'une cinétique obtenue dans les mêmes conditions mais en présence, dans le milieu d'incubation, d'un inhibiteur à une concentration $[I] = 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

- Indiquer, en justifiant votre réponse, dans quel type d'inhibition on peut classer l'inhibiteur.

Inhibition incompétitive : pente K_m/v_{\max} est identique en présence de l'inhibiteur, $K_m' = K_m/[1 + ([I]/K_i)]$, $v_{\max}' = V_{\max}/[1 + ([I]/K_i)]$, donc les droites représentant les cinétiques en présence et en absence d'inhibiteur sont parallèles.

- Calculer le K_i de l'inhibiteur pour l'enzyme

Dans l'inhibition incompétitive :

$$V_{\max}' = \frac{V_{\max}}{(1 + \frac{[I]}{K_i})} \quad \text{et} \quad K_m' = \frac{K_m}{(1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

$$1/v_{\max \text{ app}} = 0,5 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{L}$$

$$v_{\max \text{ app}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$v_{\max \text{ app}} = v_{\max} / (1 + [I]/K_i)$$

$$1 + [I]/K_i = v_{\max} / v_{\max \text{ app}}$$

$$[I]/K_i = (v_{\max} / v_{\max \text{ app}}) - 1$$

$$K_i = [I] / ((v_{\max} / v_{\max \text{ app}}) - 1) = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Exercice 10

La cétostéroïde-isomérase catalyse l'isomérisation de différents Δ^5 -3-cétostéroïdes pour former des Δ^4 -3-cétostéroïdes conjugués tels que la Δ^4 -androstène-3,17-dione ou la testostérone.

On étudie donc la réaction catalysée par cette enzyme (E) sur la Δ^5 -androstène-3,17-dione, en absence et en présence d'un inhibiteur (I), la 19-nortestostérone

On suit la réaction enzymatique en mesurant l'absorbance à $\lambda = 248$ nm et on obtient les résultats présentés dans le tableau ci-dessous.

[S] ₀ (mM)	v_i (U.A.min ⁻¹) / [I] = 0	v_i (U.A.min ⁻¹) / [I] = 5.5 μM
0.083	0.08	0.051
0.122	0.11	0.072
0.195	0.15	0.106
0.238	0.17	0.122
0.340	0.20	0.150
0.580	0.26	0.200
0.870	0.29	0.240
1.170	0.30	0.270

1. Est-on en condition de substrat saturant ?
2. Déterminez V_{max} , K_M et k_{cat} (en s⁻¹) par la représentation des doubles inverses.
3. Déterminez les paramètres cinétiques V_{max} app et K_M app en présence de l'inhibiteur. Calculez la constante K_I . De quel type d'inhibition s'agit-il ?

Données : [Et] = 7.3 M

Solution de l'exercice 10

1. [S] étudiée la plus faible = $8,3 \cdot 10^{-5}$ M et [Et] = $7,3 \cdot 10^{-12}$ M, donc [S] \gg [E] : on est en conditions de substrat saturant.

2. Détermination des paramètres cinétiques V_{max} et k_m en présence et en absence de l'inhibiteur et détermination de K_i

$$1/V_{max} \text{ app} = 2,5 \text{ U.A.}^{-1} \cdot \text{min} \Rightarrow V_{max} = 0,4 \text{ U.A.} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$1/K_M \text{ app} = 1,75 \text{ mM}^{-1} \Rightarrow K_M = 0,57 \text{ mM}$$

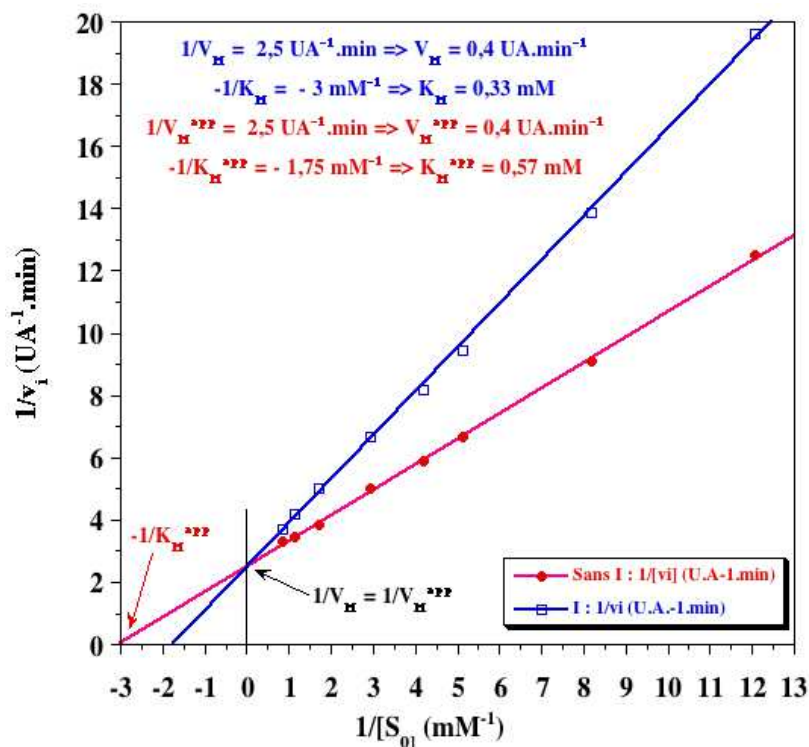
$$1/V_{max} = 2,5 \text{ U.A.}^{-1} \cdot \text{min} \Rightarrow V_{max} = 0,4 \text{ U.A.} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$1/K_M = 3 \text{ mM}^{-1} \Rightarrow K_M = 0,33 \text{ mM}$$

$V_{Max} = V_{Max}^{app}$ et $K_M \neq K_M^{app}$, donc l'inhibiteur est compétitif.

$$k_{cat} = V_{Max} / [E]_0 = 3,2 \cdot 10^6 \text{ min}^{-1} = 5,4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$$

$$K_I = (K_M \times [I]) / (K_M^{app} - K_M) = 6,7 \text{ μM}$$



Exercice11

Un mélange de trois acides aminés : Asp (pHi = 2,87), Arg (pHi = 10,76) et Leu (pHi = 6), est soumis à une chromatographie sur colonne échangeuse de cations. L'éluion est effectuée à l'aide d'un tampon à pH = 6.

Question

dans quel ordre peut-on prévoir la sortie de ces acides aminés ?

Solution de l'exercice 11

Si les trois acides aminés ont été retenus sur la colonne, c'est que la charge de la colonne a été réalisée à un pH inférieur au plus petit des pHi, soit un pH inférieur à 2,87, afin que les acides aminés se présentent sous une forme chargée positivement et qu'ils puissent être retenus sur la résine échangeuse de cations, chargée négativement.

Acide aminé	pHi	Charge à pH < 2,87	à	Charge à pH 6
Asp	2,87	+		-
Leu	6	+		Neutre
Arg	10,76	+		+

À un pH de 6, Asp est chargé négativement; il est donc élué de la colonne. La leucine est ensuite éluée. L'Arginine, toujours chargée positivement à pH = 6 reste sur la colonne et n'est donc pas éluée.

Exercice 12

On veut séparer 3 acides-aminés : l'acide L-glutamique, la L-leucine et la L-lysine par chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$). Les pH isoélectriques de l'acide L-glutamique, de la L-leucine et de la L-lysine sont respectivement : 3,22 ; 5,98 ; 9,74, à 25 °C.

On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7.

Question

1 - Quels acides aminés sont élués et dans quel ordre ? (On considérera que les interactions acide aminé-résine sont uniquement d'ordre électrostatiques).

Solution de l'exercice 12

1 - Cet exercice met en jeu une chromatographie échangeuse d'ions. Une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) est chargée négativement et est donc une résine échangeuse de cations. Lorsque le pH est supérieur au pH_i ($\text{pH} > \text{pH}_i$), l'acide aminé est chargé négativement (forme anionique). Lorsque le pH est inférieur au pH_i ($\text{pH} < \text{pH}_i$), l'acide aminé est chargé positivement (forme cationique).

Le tableau ci-dessous donne les charges des 3 acides aminés, à pH = 2 et à pH = 7.

Acides aminés	pH_i	Charge à pH 2	Charge à pH 7
Glu	3,22	+	-
Leu	5,98	+	-
Lys	9,74	+	+

Ainsi, à pH 2, les trois acides aminés sont chargés positivement et seront retenus lors du passage sur la colonne. A pH = 7, seuls Glu et Leu, chargés négativement, seront élués. Lys reste fixé à la colonne. Glu est élué en premier ($\text{pH}_i = 3,22$) puis Leu l'est ensuite ($\text{pH}_i = 5,98$)

Références bibliographiques

- [1]. Cornish-Bowden, A., Jasmin, M. & Saks, V. (2005). Cinétique enzymatique. Ed. EDP Sciences, France. pp. 462 (ISBN : 2-86883-742-5)
- [2]. Coutouly, G. (1999). Génie enzymatique : Une introduction. Ed. Elsevier Masson, Paris. pp. 244 (ISBN : 2-225-81972-6).
- [3]. Charnock, S.J. & Mc-Cleary, B.V. (2005). Les enzymes: Applications industrielles et analytiques. Extrait de la revue des Œnologues, N° 116 : 1-5.
- [4]. Jaspard, E. (2019). Enzymologie fondamentale. Ed. Ellipses, France. pp. 334 (ISBN : 978-2-340-03515-7)
- [5]. Lèger, C. (2019). Cours Cinétique enzymatique : Chimie des biomolécules. (http://bip.cnrs-mrs.fr/bip06/pdf/enzymo/cours_cinetique_enzymatique.pdf)
- [6]. Linden, G. (2012). Transformation des produits alimentaires par les enzymes. Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés : 1-17.
- [7]. Marouf, A. & Tremblin, G. (2015). Abrégé de biochimie appliquée. Ed. EDP Sciences, Paris. pp. 592. (ISBN : 2759817768)
- [8]. Ouali, A. & Larreta-Garde, V. (1997). Enzymes et produits carnés dans : Enzymes en agroalimentaire. Éd. Collection Universités Francophones - tec et doc, Paris. pp. 78-94.
- [9]. Raisonnier, A. (2002). Cours d'enzymologie élémentaire. Université Paris-VI, faculté de médecine Pierre et Marie curie, France. (http://umvf.cerimes.fr/media/ressWikinu/Biochimie_UPMC/P6biochimie-ee.pdf)
- [10]. Rouau, X. (1996). Les hémicellulases en panification. *Industries des Cereales*, (1): 13-19.
- [11]. Sine, J.P. (2010). Enzymologie et application. Ed. Ellipses, Paris. pp. 462 (ISBN 978-2-7298-5324-2).
- [12]. Viratelle, O. (1974). Enzymologie: travaux dirigés. Volume 14 of Collection Méthodes, Paris (Hermann). pp. 257 (ISBN 2705657568)
- [13]. Viratelle, O. (1993). Protéines et enzymes : TD, Paris(Hermann). pp. 346 (ISBN 2-7056-6185-9)