

Chapitre 1 : Introduction

1. Définitions

- **Enzymologie** : Science qui étudie les enzymes
- **Génie enzymatique** : C'est l'ingénierie des protéines et l'exploitation des enzymes en passant par l'identification de leurs spécificités, les conditions de leur purification et leurs modifications ; dans le but d'améliorer leurs propriétés et les conditions optimales de catalyse enzymatique, et en fin la production à grand échelle à des fins appliquées (industries agroalimentaires, pharmaceutiques, chimiques, traitement des eaux usées,...etc.)
- **Enzyme** : 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).
- **Substrat** : Molécule qui entre dans une réaction pour y être définitivement transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme.
- **Produit** : Molécule qui résulte de la transformation du substrat au cours d'une réaction catalysée par une enzyme.
- **Ligand** : Molécule ayant au moins un site de fixation sur l'enzyme qui la reçoit.
- **Cofacteur** : 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.
- **Coenzyme** : Ce sont des molécules organiques, souvent des vitamines, qui servent de transporteurs de groupes fonctionnels ou d'électrons intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction, la plupart étant des dérivés de vitamine B. (Tableau I)
- **Structure de l'enzyme** : 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 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 (Fig.1) :

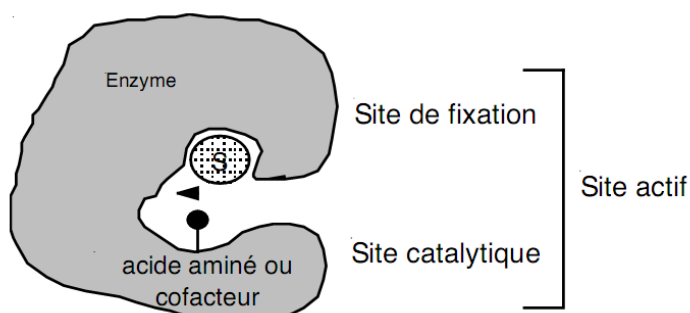


Fig.1 : Représentation schématique d'une enzyme.

- **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.

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

2. 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 ex : coupure d'une liaison peptidique pour les peptidases.

i) Spécificité de liaison (spécificité envers une liaison), Exp. peptidase, phosphatases, estérases,...etc.

ii) Spécificité pour un groupement chimique (spécificité envers un groupement chimique), Exp. Carboxyestérases (spécificité aux liaisons esters où sont engagées les acides organiques) ; Exp. Phosphoestérases (spécificité aux liaisons esters où sont engagées des groupements phosphatés),...etc.

iii) Spécificité absolue : Des spécificités pour un groupement chimique ou spécificité absolue généralement envers des substrats de faible PM (Exp. urease pour l'urée)

iiii) stéréospécificité (distinction entre les liaisons optiques (D et L), les anomères (α et β), ...etc.

3. Classification des enzymes

3.1. Oxydoréductases

nécessitent un coenzyme (NAD, NADP, FAD ou FMN)

$$A_{ox} + B_{red} \rightleftharpoons A_{red} + B_{ox}$$

• **Hydroxylases:** (=monooxygénases) catalysent la fixation d'un atome d'oxygène

$$\begin{array}{ccc} -CH_3 & \longrightarrow & -CH_2OH \\ -CH_2- & \longrightarrow & -CHOH- \end{array}$$

• **Déshydrogénases:**

lactate déshydrogénase

$$\begin{array}{ccc} CH_3-CHOH-COOH + NAD^+ & \rightleftharpoons & CH_3-CO-COOH + NADH + H^+ \\ \text{ac. lactique} & & \text{ac. pyruvique} \end{array}$$

• **Cytochromes:** ont un coenzyme hémique avec un ion, qui présente 2 états d'oxydation, ce qui en fait un transporteur d'électrons.

$$\begin{array}{ccc} Fe^{2+} & \rightleftharpoons & Fe^{3+} + 1e^- \\ \text{réduit} & & \text{oxydé} \end{array}$$

3.2. Transférases : catalysent le transfert de groupement autre que l'hydrogène entre deux substrats. Ces enzymes nécessitent un coenzyme.



• les transaminases: transfèrent les radicaux aminés $-NH_2$ d'un AA à un acide cétonique accepteur. Le coenzyme est le phosphate de pyridoxal.

• les phosphokinases ou kinases: transfèrent un P sur une molécule d'ADP. L'ion Mg^{++} est indispensable.

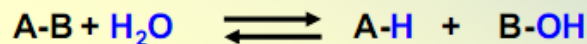


• Les transacétylases: transfèrent les radicaux acétyles ($-CH_2COOH$), le coenzyme est CoA

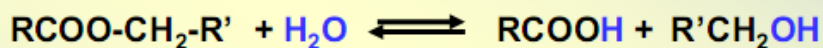
• Les transméthylases: transfèrent les radicaux méthyles ($-CH_3$), d'une molécule à une autre, le coenzyme est l'acide tetrahydrofolique.

3.3. Hydrolases

Catalysent la rupture d'une liaison avec fixation des éléments d'une molécule d'eau.



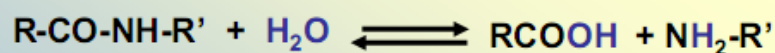
• Les estérases: hydrolysent les esters en acides gras et en alcool



• Les lipases: hydrolysent les glycérides en glycérol et en acides gras

• Les osidases: hydrolysent les osides
glucosidase, galactosidase

• Les enzymes protéolytiques: hydrolysent les liaisons peptidiques



3.4. Lyases

catalysent la rupture des liaisons C-C, C-N, C-O, C-S

- décarboxylase d'acide cétonique: le coenzyme est la thiamine pyrophosphate (TPP)

$$\text{R}-\text{CO}-\text{COOH} \rightleftharpoons \text{R}-\text{CHO} + \text{CO}_2$$

- décarboxylase d'acides aminés: le coenzyme est le phosphate de pyridoxal

$$\text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \rightleftharpoons \text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{CO}_2$$

Cas de la pyruvate déshydrogénase: 5 coenzymes
TPP, NAD⁺, FAD, Coenzyme A et Lipoate

3.5. Isomérases

catalysent le déplacement de groupes à l'intérieur d'une molécule sans que la formule brute varie

Epimérases: provoquent des interconversions d'oses

galactose \longleftrightarrow glucose

Mutases: catalysent le transfert d'un radical d'une partie d'une molécule à une autre

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \\ | \\ \text{CO} \\ | \\ \text{CoA} \end{array}$$

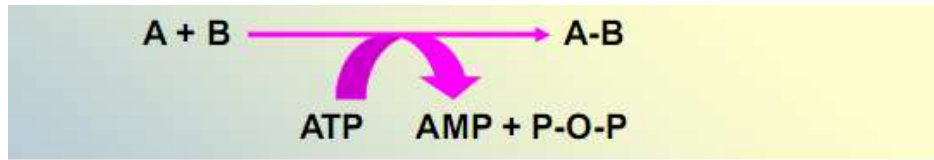
Methyl malonyl CoA

⇌

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COOH} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CO} \\ | \\ \text{CoA} \end{array}$$

Succinyl CoA

3.6. Ligases ou synthétases : catalysent la condensation de deux molécules



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

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.

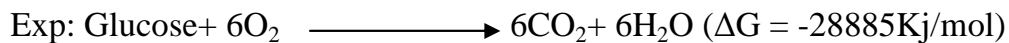
L'énergie est la capacité d'un système à effectuer un travail. L'énergie libre de Gibbs (G) : exprime l'énergie potentielle d'une molécule.

$$\Delta G = G_{\text{produit}} - G_{\text{substrat}}$$

Si

- $\Delta G < 0$: Réaction spontanée
- $\Delta G > 0$: Réaction non spontanée mais possible si elle est couplée à une réaction exergonique
- $\Delta G = 0$: Réaction en équilibre

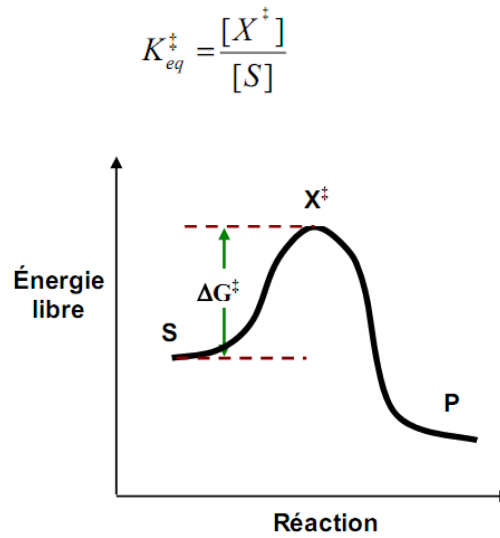
La plupart des réactions chimiques, non catalysées, bien que thermodynamiquement possible ($\Delta G < 0$), n'aboutissent qu'accidentellement à la transformation des molécules en produits et ceci avec de très faibles vitesses.



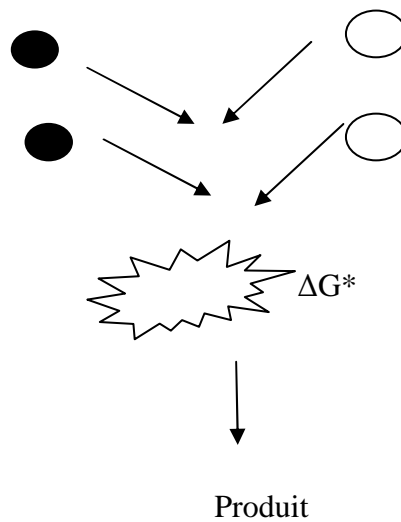
En effet, les molécules participantes à une réaction chimique passent par un état dont la structure est intermédiaire entre celles des réactifs et celles des produits. Cette structure intermédiaire est appelée « **Etat de transition** » qui implique des liaisons extrêmement faibles lui conférant une 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^*** ».

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

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

**Fig. 2 :** 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.

**Fig. 3 :** Heurtement des réactants, dégagement de chaleur et production d'énergie d'activation

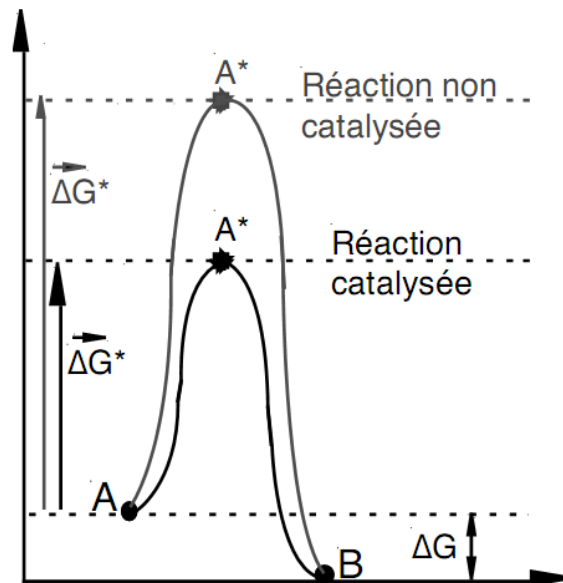


Fig. 3 : Les enzymes facilitent les réactions en abaissant l'énergie d'activation.

L'enzyme accélère une réaction en stabilisant l'état de transition et en conséquence diminue l'énergie d'activation. L'enzyme est capable de lier les réactants au sein de son site actif et former ainsi un complexe ES. 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.

Chapitre 2 : Cinétique enzymatique Michaélienne

- € **Cinétique enzymatique** : C'est l'étude des variations des vitesses de la réaction en fonction de la concentration en substrat.
- € **Vitesse de la réaction** : C'est le nombre de mole de substrat transformé ou en produit formé dans un volume et dans un temps donné.

Soit une réaction élémentaire : $A \longrightarrow P$

$$v = -\frac{d[A]}{dt}, \quad V = d[P] / dt$$

- € **La vitesse est exprimée en unités :**

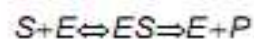
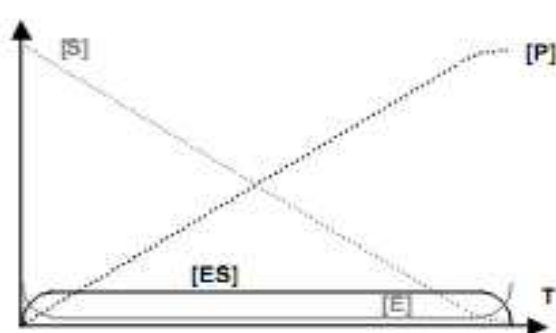
Unité internationale d'activité (UI) est la quantité d'enzyme transformant une μ mole de substrat par minute dans les conditions optimales de dosage.

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 moléculaire (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 (kcat) ou turn over de la réaction et s'exprime en seconde⁻¹.

2.1. Notion de vitesse initiale



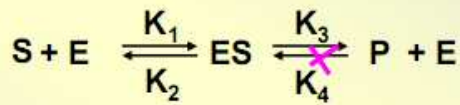
Mesure de l'apparition du produit au cours du temps ; Conditions expérimentales : T° , pH, salinité, etc. optimaux

$[S] \gg [E]$ et temps court \Rightarrow on cherche à rester dans les conditions où $[S] \gg [P]$
Dans ces conditions, $[S]$ et $[ES]$ sont

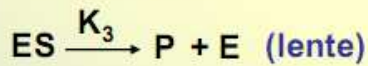
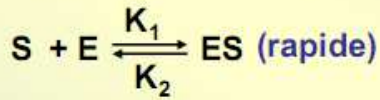
considérés comme des constantes : c'est la **phase stationnaire**.

On observe deux parties : 1) pente constante \Rightarrow vitesse constante, puis 2) apparition progressive d'un plateau \Rightarrow vitesse diminuée : les conditions initiales ne sont plus vérifiées, en particulier à cause de l'épuisement du substrat

2.2. Détermination de l'équation de Mikaelis Menten (V=F (S))



Conditions initiales



[E] = concentration totale de l'enzyme

[ES] = concentration du complexe Enz-Sub

[E]_L = concentration de l'enzyme libre

$$[E] = [E]_L + [ES] \longrightarrow [E]_L = [E] - [ES]$$

$$V = K_3[ES]$$

$$\text{Vitesse de formation de } [ES] = \frac{d[ES]}{dt} = K_1[E]_L[S] = K_1([E] - [ES])[S]$$

$$\text{Vitesse de disparition de } [ES] = -\frac{d[ES]}{dt} = K_2[ES] + K_3[ES] = [ES](K_2 + K_3)$$

Etat stationnaire: V de formation de [ES] = V de disparition de [ES]

$$K_1([E] - [ES])[S] = [ES](K_2 + K_3)$$

$$K_1([E] - [ES])[S] = [ES](K_2 + K_3)$$

$$\frac{([E] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{(K_2 + K_3)}{K_1} = K_M \quad [E][S] - [ES][S] = [ES] K_M$$

$$[ES](K_M + [S]) = [E][S] \quad [ES] = \frac{[E][S]}{K_M + [S]}$$

$$\text{Or, } V = K_3[ES]$$

$$V = K_3 \frac{[E][S]}{K_M + [S]}$$

$$V = V_{\max} \quad [E] = [ES]$$

$$V_{\max} = K_3 [E]$$

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

Equation de M-M

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

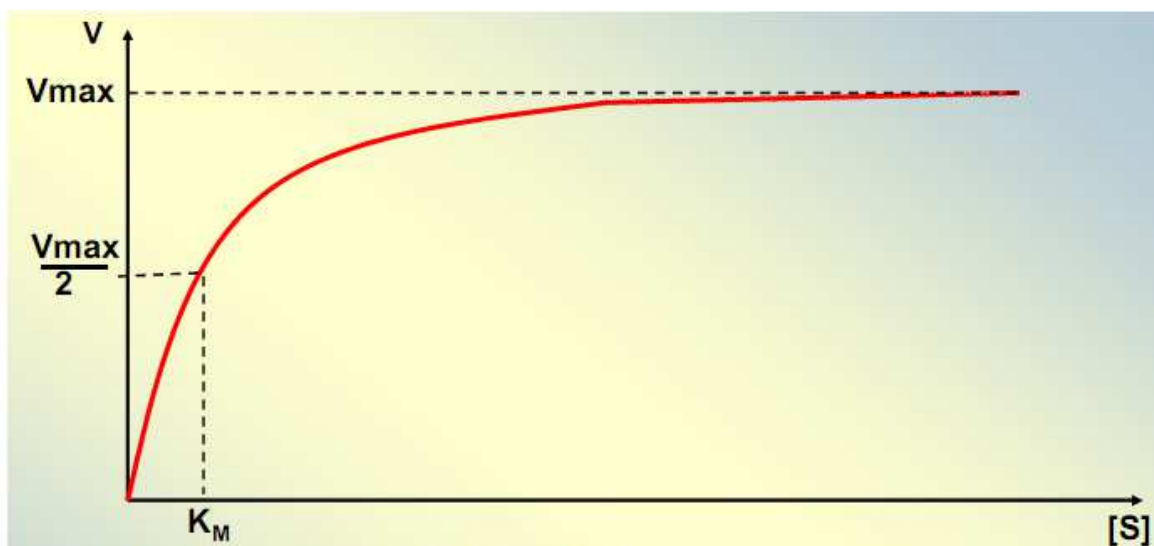
Cas particulier

Si $v = \frac{V_{\max}}{2}$

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

$$2[S] = K_M + [S]$$

$$K_M = [S]$$



1.1.3- Signification de V_{\max} et de K_M

V_{\max} est atteinte lorsque toute l'enzyme est saturée par le substrat

K_M est la valeur de S pour laquelle la vitesse de la réaction est $V_{\max}/2$

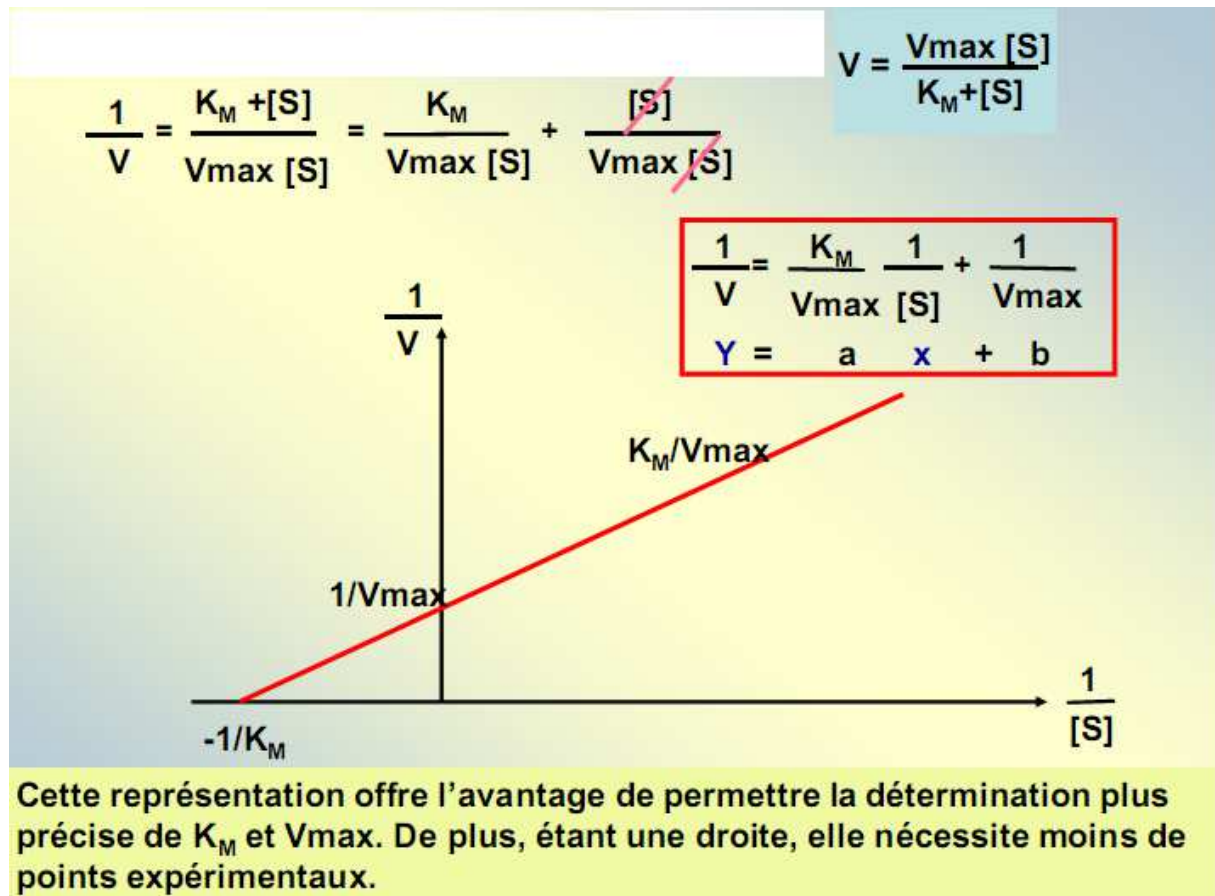
K_M est une grandeur expérimentale qui peut varier avec la structure du S , le pH, la température. **Chaque enzyme a un K_M caractéristique pour un S**

K_M indique l'affinité de l'enzyme pour le S

$K_M \nearrow$

affinité \searrow

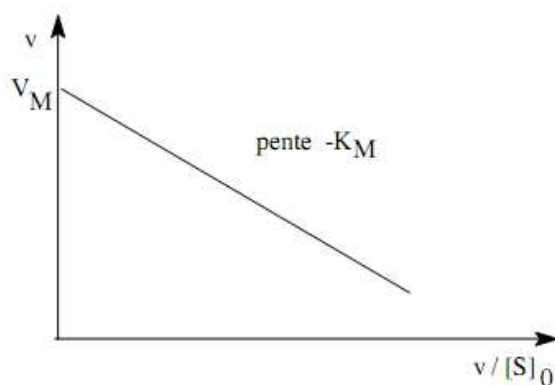
2.3. Représentation de Lineweaver et Burk



2.4. Représentation de Eadie et Hofstee

Cette représentation fût publiée par George Eadie en 1942 et Baren Hofstee en 1959 :

$$v = f\left(\frac{v}{[S]_0}\right)$$

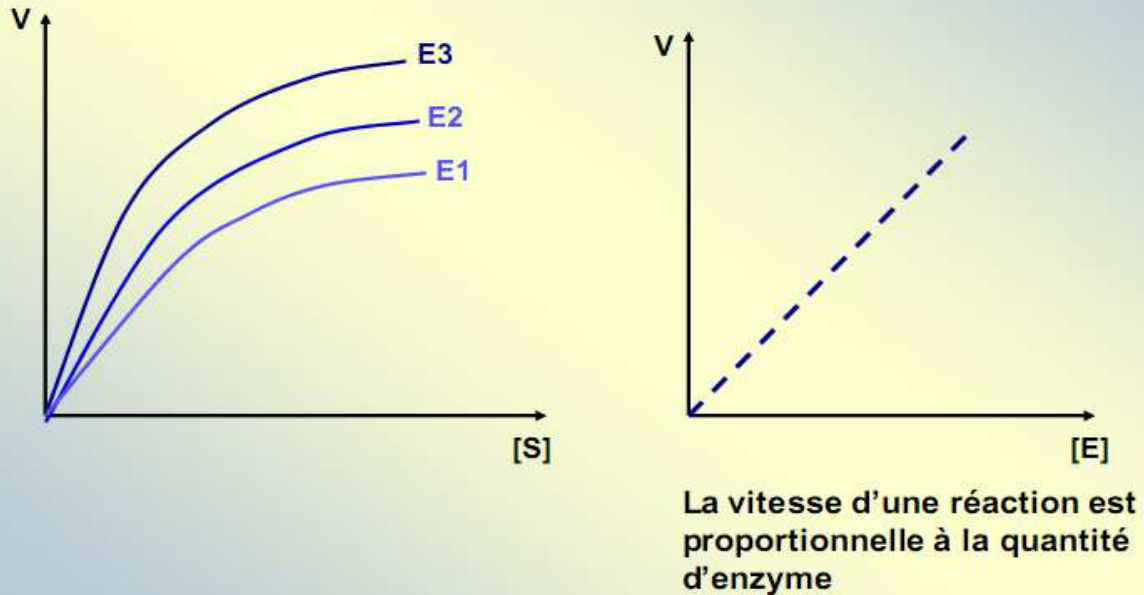


$$v = \frac{V_M [S]_0}{K_M + [S]_0} \Rightarrow v(K_M + [S]_0) = V_M [S]_0 \Rightarrow v = -K_M \left(\frac{v}{[S]_0}\right) + V_M$$

Cette représentation est une droite de pente $-K_M$ et qui coupe l'axe des v au point V_M .

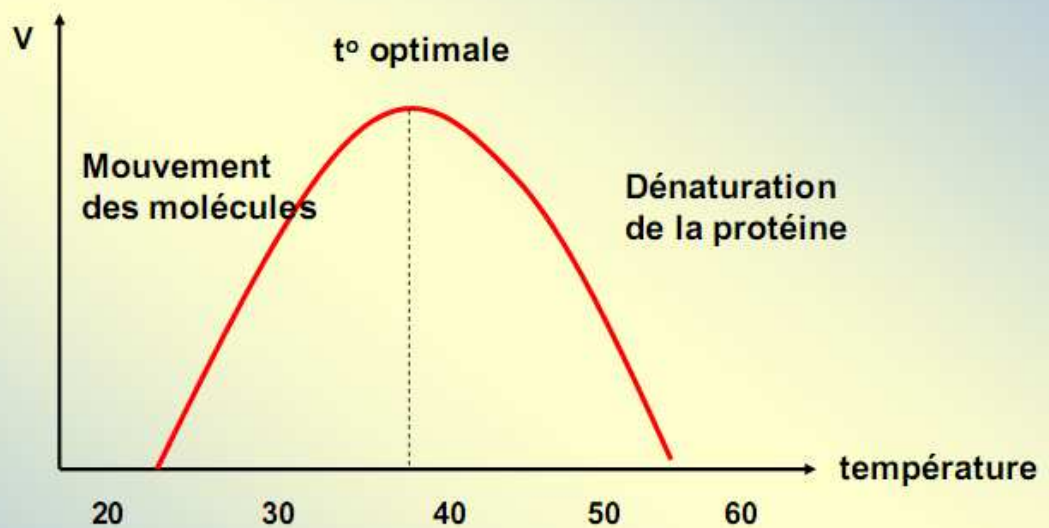
Chapitre 3 : Les effecteurs de la réaction enzymatique

3.1. Influence de la concentration en enzyme

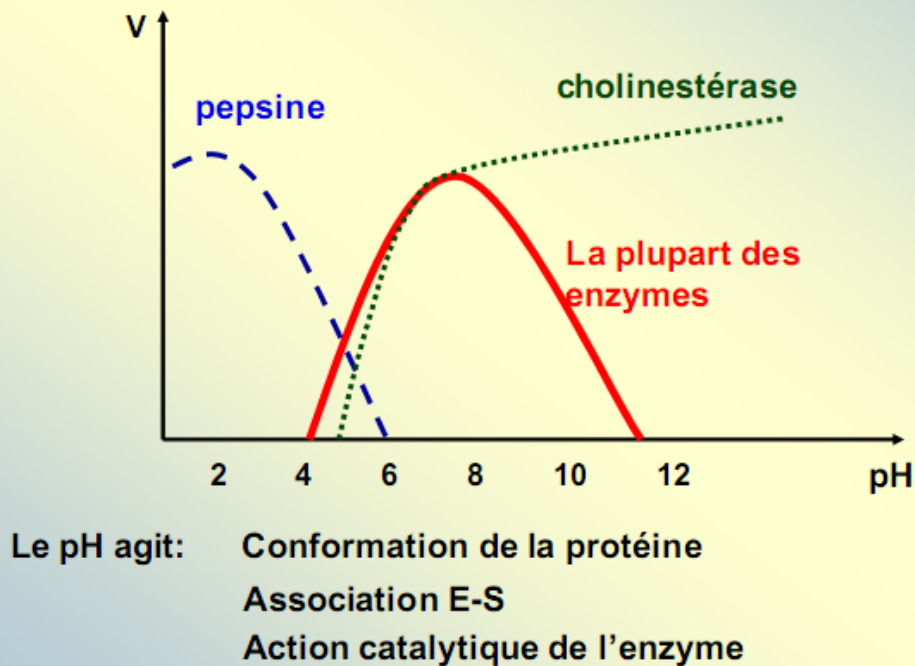


3.2. Les paramètres physicochimiques

3.2.1. Influence de la température



3.2.2. Influence du pH



3.3. Les paramètres chimiques

3.3.1. 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 Exp. Mg^{+2} stabilise la structure de la phosphatase

3.3.2. 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).

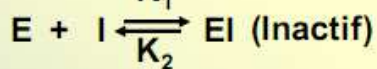
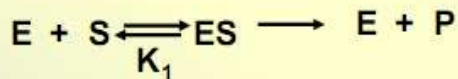
3.4. Effets des effecteurs



3.3.1. Les inhibiteurs réversibles

3.3.1.1. Inhibiteur compétitif

Exercée par un composé dont la structure ressemble à celle du S



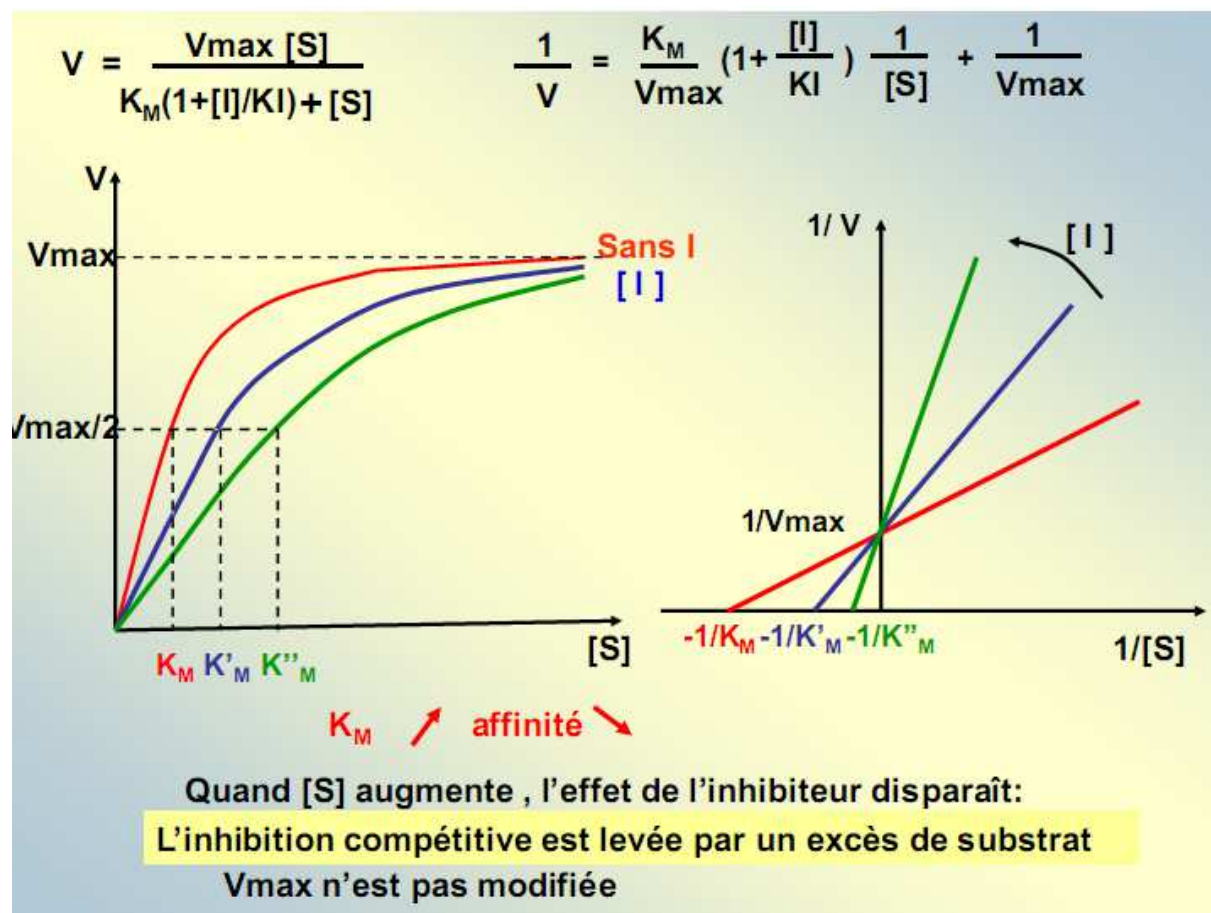
$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad [EI] = \frac{[E][I]}{K_I}$$



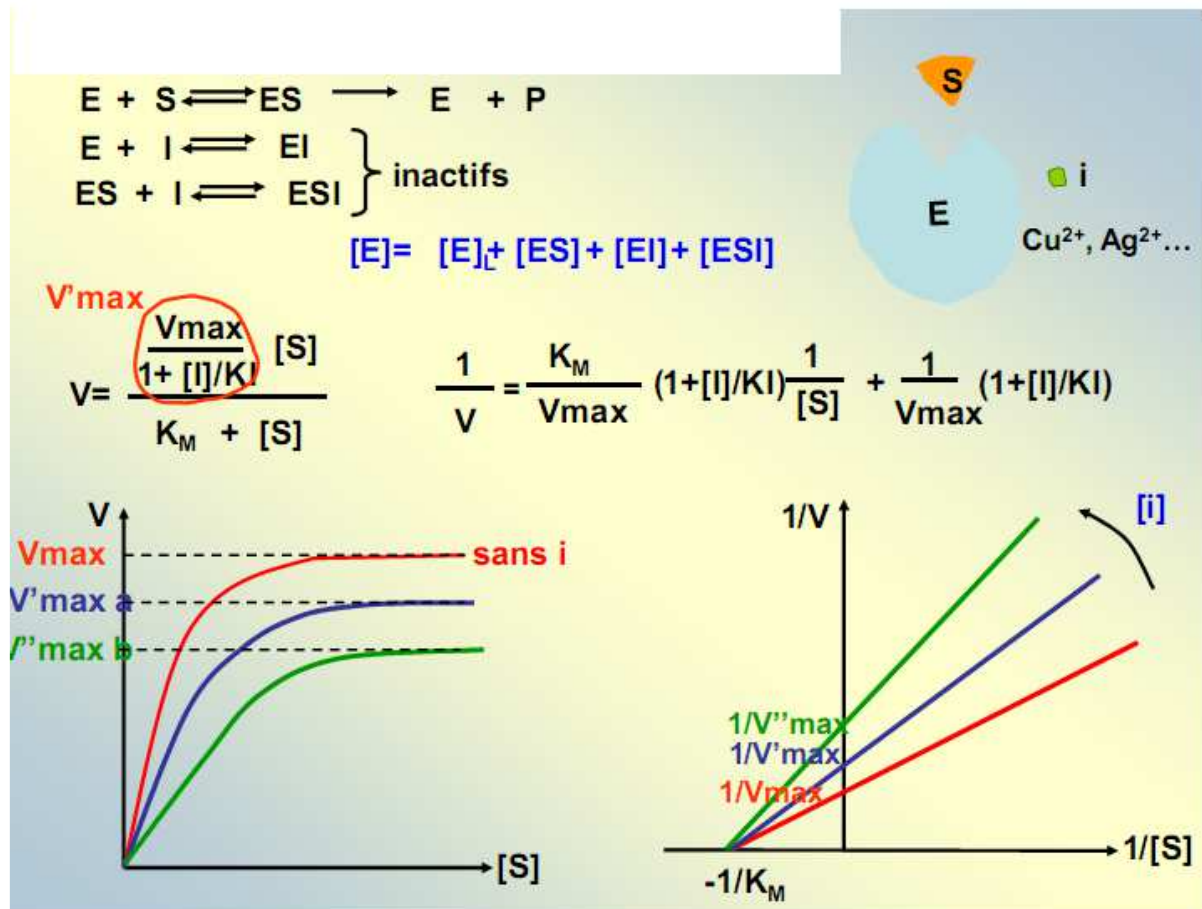
$$[E] = [E]_L + [ES] + [EI]$$

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{\underbrace{K_M(1+[I]/K_I) + [S]}_{K'_M}}$$

$$K'_M = K_M(1+[I]/K_I)$$



3.3.1.2. Inhibiteur non compétitif



Ce type d'inhibition n'est pas levé par un excès de substrat

K_M est inchangé, l'affinité de E pour S n'est pas affectée

V_{max} est diminuée par l'inhibiteur

3.3.1.3. Inhibiteur incompétitif

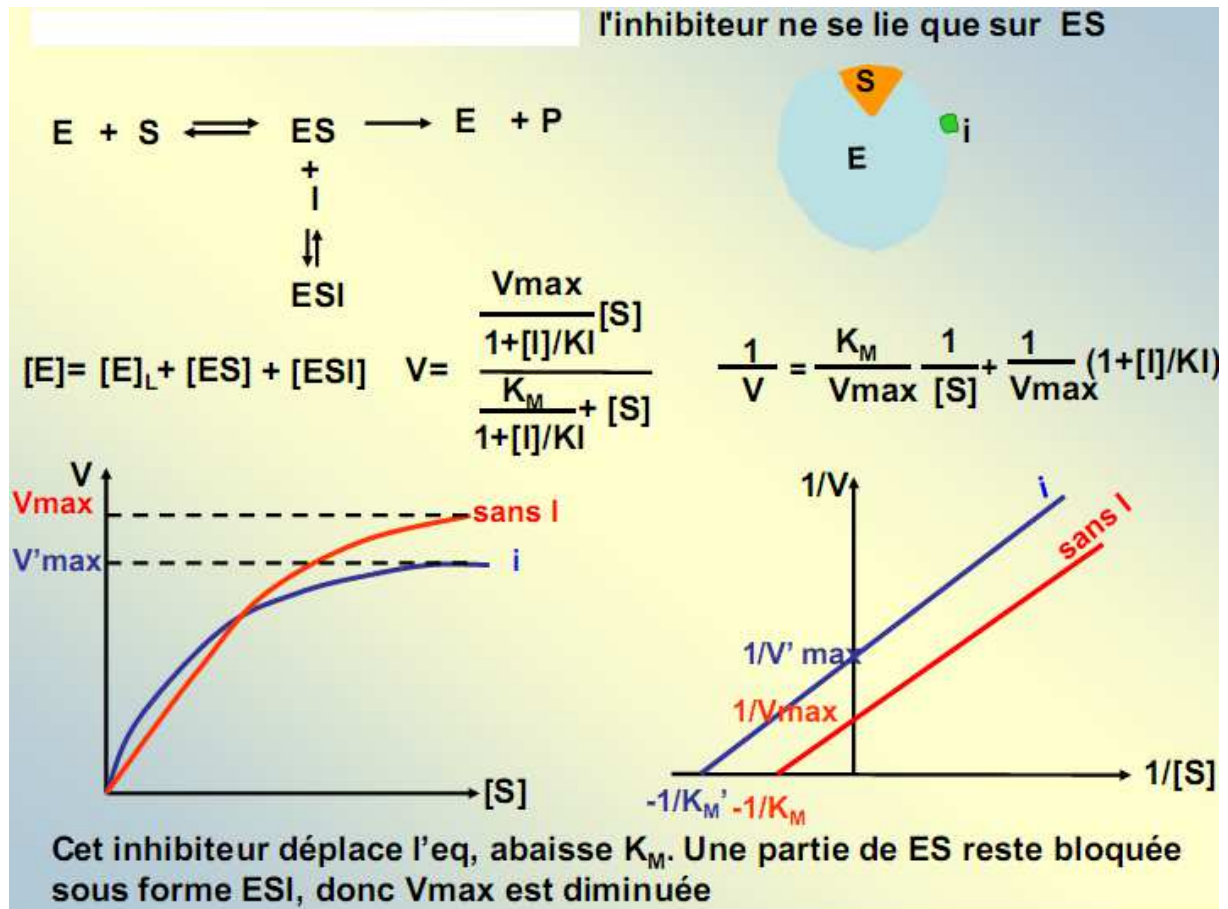


Tableau récapitulatif des inhibitions réversibles

	K_M	V_{\max}	Pente
Compétitive	\nearrow	$-$	\nearrow
Non compétitive	$-$	\searrow	\nearrow
Incompétitive	\searrow	\searrow	$-$

Chapitre 4 : Les enzymes industrielles

4.1. 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, ...).

a. Pour les 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 voir augmenter le nombre de gènes structuraux pour synthétiser l'enzyme désirée).

1. 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 I).

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.

2.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 (réaction de Maillard).

3.Conduite de la fermentation : Elle se fait dans un milieu riche, fortement aéré et agité où les paramètres physicochimiques sont régulés en continu (O₂, 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 en début ou leur apparition en cours de la fermentation.

- L'induction:

- 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.

b. Pour les 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).

c. Pour les 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.

4.2. Technologie : Le processus d'isolement des enzymes pures suit les étapes suivantes :

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 (Fig. 1).

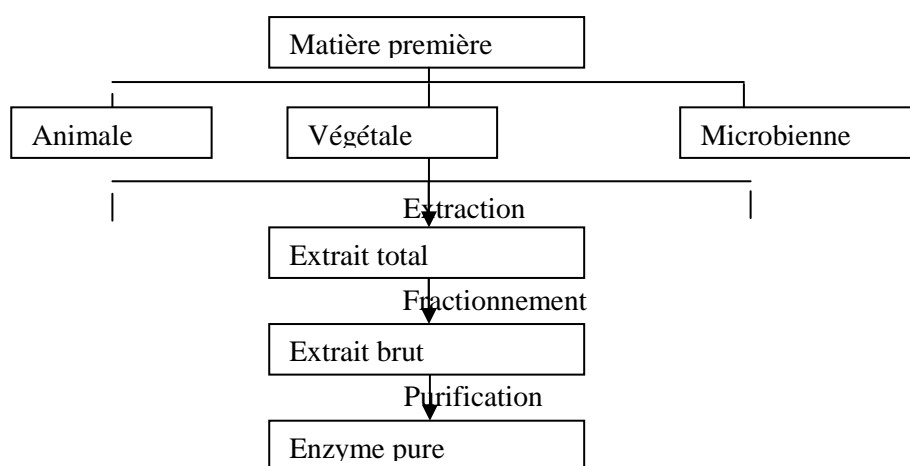


Fig. 1 : Représentation schématique d'un processus d'isolement et de purification d'une enzyme.

4.2.1. 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.

a. 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.

b. Procédés appliqués aux cellules microbiennes

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 « ballottinis », 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].

4.2.2. 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.

• **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 (**Fig. 2**). 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.

- **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.

- **Effet de 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.

- **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.

4.2.3. Purifications :

a. 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 sulfoniques (SO_3^-) (résine échangeuse de cation) ou d'ammonium quaternaire (NH_4^+) (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 (**Fig. 3,4**).

b. 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'élution, on utilise en général un compétiteur qui dissocie le complexe ligand-molécule à purifier. Il devra être en concentration suffisante (supérieure à son K_m).

c. 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 (Fig. 5).

4.3. Les 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.

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



a. 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.) (**Fig. 6**). 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.

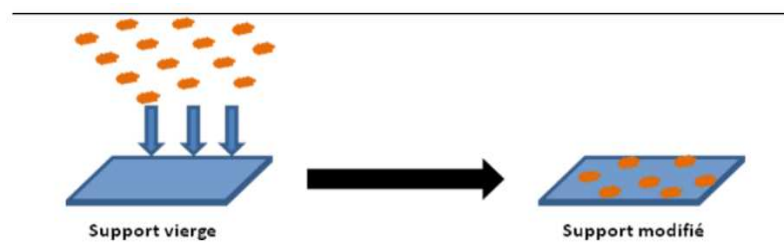
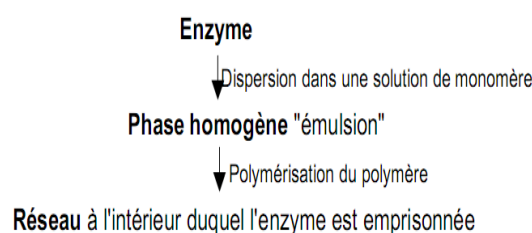


Fig. 6 : Adsorption des enzymes sur un support.

b. 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 (**Fig.7**). 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 ci-dessous:

Avantages	Inconvénient
<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 (ex.:pH élevé) peuvent s'avérer dénaturantes pour l'enzyme. - Méthode applicable que pour des substrats de petites tailles.

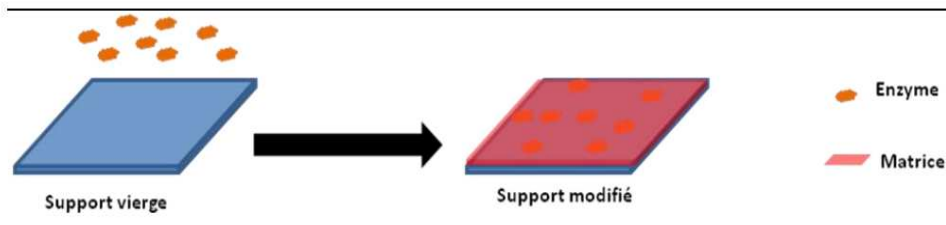


Fig. 7 : Encapsulation des enzymes.

c. 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 (**Fig.8**). 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.

Les tableaux suivants représentent respectivement les méthodes d'activation selon les supports utilisés et les avantages ainsi que les inconvénients de cette méthode.

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

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.

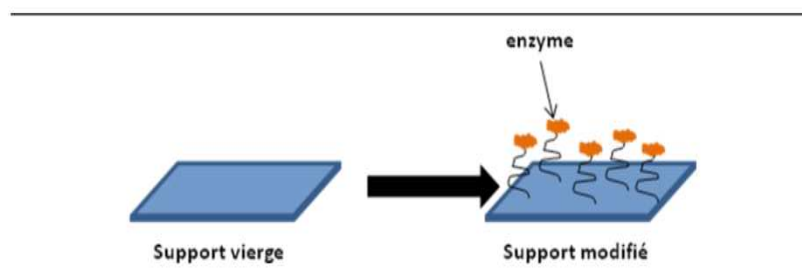


Fig. 8 : Greffage covalent des enzymes.

4.3.2. Propriétés des enzymes immobilisées : On peut citer trois principales propriétés des enzymes immobilisées:

- Stabilité et résistance aux conditions du milieu (pH, t°, acidité, ...).
- Activité catalytique préservée (site actif bien orienté).
- Fixation solide au support, permettant des lavages répétitifs sans perte de l'enzyme.