

---

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Mohamed KHIDER Biskra  
Faculté des Sciences Exacte et des  
Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature  
et de la Vie



جامعة محمد خيضر بسكرة  
كلية العلوم الدقيقة و علوم الطبيعة و الحياة  
قسم علوم الطبيعة و الحياة

Cours de :

## **Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique**

Destiné aux étudiants de :

**Master 2 Biochimie Appliquée et Microbiologie Appliquée**

Préparé par :

**Dr. Deghima Amirouche**

Année Universitaire 2021/2022

---

---

# Sommaire

<b>Chapitre I : Généralités en enzymologie</b> .....	1
<b>1. Introduction</b> .....	1
<b>2. Définitions et généralités</b> .....	3
<b>2.1. Les Enzymes</b> .....	3
<b>2.2. Les pro-enzymes</b> .....	4
<b>2.3. Substrat</b> .....	4
<b>2.4. Produit</b> .....	4
<b>2.5. Ligand</b> .....	4
<b>2.6. Cofacteur</b> .....	5
<b>2.7. Coenzymes</b> .....	5
<b>2.8. Structure des enzymes</b> .....	7
<b>2.9. Site actif</b> .....	9
<b>3. Classification des enzymes</b> .....	12
<b>3.1. Oxydoréductases</b> .....	12
<b>3.2. Transférases</b> .....	13
<b>3.3. Hydrolases</b> .....	13
<b>3.4. Lyases</b> .....	13
<b>3.5. Isomérases</b> .....	14
<b>3.6. Ligases</b> .....	14
<b>Chapitre II : Mécanismes de catalyse (action des effecteurs, régulation et activation des zymogènes)</b> .....	16
<b>1. Mécanismes de catalyse</b> .....	16
<b>1.1. Catalyse par effet de proximité et d'orientation</b> .....	17
<b>1.2. Catalyse covalente</b> .....	17
<b>1.3. Catalyse acido-basique</b> .....	20
<b>1.4. Catalyse électrostatique</b> .....	21
<b>1.5. Désolvation</b> .....	21
<b>1.6. Distorsion de contrainte</b> .....	21
<b>1.7. Catalyse par cofacteurs</b> .....	22
<b>2. Facteurs régissant l'activité catalytique</b> .....	23
<b>2.1. Température</b> .....	23
<b>2.2. pH</b> .....	23
<b>2.3. Activation</b> .....	24
<b>2.4. Inhibition</b> .....	25

---

---

2.5. Allostérie .....	31
2.6. Régulation biogénique de l'activité enzymatique .....	32
<b>Chapitre III : Production des enzymes .....</b>	<b>36</b>
1. Introduction .....	36
2. Isolation et Purification .....	36
2.1. Préparation des matières premières biologiques .....	38
2.2. Rupture cellulaire .....	41
2.3. Séparation de la matière solide .....	43
2.4. Concentration .....	52
2.5. Purification .....	57
2.6. Formulation du produit .....	63
2.7. Traitement des déchets .....	65
3. Contrôle de l'activité enzymatique .....	65
3.1. Unités Enzymatiques .....	66
3.2. Quantification des protéines .....	67
<b>Chapitre IV : Enzymes d'intérêt industriel .....</b>	<b>69</b>
<b>(Caractéristiques structurales, sources et propriétés, modes d'action et intérêt pratique) .....</b>	<b>69</b>
1. Peptidases .....	69
1.1. Types catalytiques .....	69
1.2. Peptidases regroupées selon la réaction catalysée .....	70
1.3. Principales sources des protéases .....	72
1.4. Applications industrielles .....	74
2. Les enzymes amylolytiques .....	75
2.1. Caractéristiques structurelles et mécanisme catalytique .....	76
2.2. Dégradation de l'amidon .....	77
2.3. Sources d' $\alpha$ -amylase .....	78
2.4. Applications des $\alpha$ -amylases dans l'industrie alimentaire .....	79
3. Enzymes cellulolytiques .....	80
3.1. Sources des cellulases .....	82
3.2. Applications industrielles .....	83
4. Les enzymes pectolytiques .....	84
4.1. Biochimie des parois cellulaires des fruits .....	84
4.2. Les pectinases .....	86
4.3. Applications des pectinases .....	87
<b>Chapitre V: Les enzymes immobilisées .....</b>	<b>90</b>

---

---

<b>1. Introduction</b> .....	90
<b>2. Enzymes immobilisées</b> .....	90
<b>2.1. Avantages des enzymes immobilisées</b> .....	91
<b>2.2. Méthodes d'immobilisation des enzymes</b> .....	91
<b>2.3. Réacteurs d'enzymes</b> .....	98
<b>2.4. Application des enzymes immobilisées</b> .....	103
<b>Chapitre VI : Utilisation des enzymes en chimie fine</b> .....	107
<b>1. Produits chimiques fins</b> .....	107
<b>2. Sélectivité</b> .....	108
<b>2.1. Chimio-sélectivité</b> .....	109
<b>2.2. Régiosélectivité</b> .....	109
<b>2.3. Énantiosélectivité</b> .....	110
<b>3. Exemples d'application</b> .....	111
<b>3.1. Lipase</b> .....	111
<b>3.2. Estérase</b> .....	112
<b>4. Marqueurs d'affinité</b> .....	113
<b>5. Marqueurs suicides</b> .....	114
<b>5.1. Applications thérapeutiques</b> .....	115

---

---

## Liste des figures

Figure 1: Les différents composants de l'holoenzyme .....	7
Figure 2: Différents niveaux structurels des protéines (Cas de l'hémoglobine).....	8
Figure 3: Configuration spatial du site actif d'une enzyme .....	10
Figure 4: Modèles de la spécificité des enzymes .....	10
Figure 5: Effet d'une enzyme sur la réduction de l'énergie d'activation requise pour démarrer une réaction où (a) n'est pas catalysée et (b) est une réaction catalysée par une enzyme. ....	16
Figure 6: Catalyse enzymatique par effet de proximité et d'orientation .....	17
Figure 7: Mécanisme de catalyse de la chymotrypsine.....	19
Figure 8: Effet de la température sur l'activité enzymatique .....	23
Figure 9: Effet du pH sur l'activité enzymatique.....	24
Figure 10: Inhibition compétitive réversible de la succinate déshydrogénase par le malonate ...	26
Figure 11: Différents types d'inhibition compétitive (Fixation exclusive) .....	27
Figure 12: Mode d'action d'un inhibiteur non-compétitif .....	28
Figure 13: Inhibition non-compétitive de la fructose 1,6-bisphosphatase par l'AMP .....	28
Figure 14: Mode d'action d'un inhibiteur incompétitive .....	29
Figure 15: Inhibition incompétitive de la phosphatase alcaline par le L-phénylalanine.....	30
Figure 16: Inhibition irréversible de la glycopeptide transpeptidase par la pénicilline .....	31
Figure 17: Mécanismes d'actions des effecteurs allostériques .....	32
Figure 18: Mécanisme d'activation du chymotrypsinogène.....	34
Figure 19: Cascade d'activation des zymogènes des protéinases à sérine .....	35
Figure 20: Procédure générale de production des enzymes industrielles (à gauche), analytique (Centre), et thérapeutique (à droite) .....	37
Figure 21 : Rupture mécanique cellulaire par homogénéisateur Manton-Gaulin.....	41
Figure 22: Schéma représentant l'appareil utilisé dans l'extraction par billes de verre .....	42
Figure 23: Représentation schématique d'un filtre à plaques .....	44
Figure 24: Représentation schématique d'un Filtres à vide.....	45
Figure 25: Différence entre filtration frontale et filtration tangentielle .....	46
Figure 26: Représentation schématique d'un Décanteurs (centrifugeuses à spirales) .....	47
Figure 27: Représentation schématique d'une centrifugeuse à bol tubulaire .....	48
Figure 28: Représentation schématique d'un séparateur (décanteur à assiettes).....	49
Figure 29: Filtration avec et sans floculation .....	50
Figure 30: Floculation par un mélange de polyélectrolyte cationique et anionique .....	51
Figure 31: Procédure de dialyse .....	56
Figure 32: Domaine de cristallisation des enzymes.....	58
Figure 33: Chromatographie échangeuse d'ions.....	60
Figure 34: Chromatographie d'exclusion stérique .....	61
Figure 35: Chromatographie d'affinité.....	62
Figure 36: Classification des peptidases selon la réaction catalysée.....	70
Figure 37: Structure tri-dimensionnelle de : a) $\alpha$ -amylase de <i>Aspergillus oryzae</i> , b) amyloamylase de <i>Thermus aquaticus</i> .....	76
Figure 38: Mécanisme de catalyse d'une amylase.....	77
Figure 39: Enzymes dégradants l'amidon .....	78
Figure 40: Applications industrielles des enzymes amylolytiques.....	80
Figure 41: Dégradation enzymatique de la cellulose .....	82
Figure 42: Structure de la paroi cellulaire végétale.....	84
Figure 43: Structure et composition chimique de la pectine.....	85

---

---

<b>Figure 44: Enzymes dégradant la pectine, Ara : arabinose, Gal : galactose, GalA : Acide galacturonique, OMe : Méthyl ester, OAc : ethyl ester, Rha: rhamnose, Xyl: xylose.....</b>	<b>86</b>
<b>Figure 45: Résumé des applications industrielles des enzymes dégradant la paroi cellulaire .....</b>	<b>89</b>
<b>Figure 46: Différentes méthodes d'immobilisation des enzymes .....</b>	<b>92</b>
<b>Figure 47: Immobilisation par adsorption électrostatique.....</b>	<b>93</b>
<b>Figure 48: Différentes méthodes d'inclusion des enzymes .....</b>	<b>94</b>
<b>Figure 49 : Couplage covalent par carbodiimide et glutaraldehyde .....</b>	<b>96</b>
<b>Figure 50 : Réticulation des enzymes en utilisant le glutaraldehyde.....</b>	<b>97</b>
<b>Figure 51: Différents types de réacteurs enzymatiques.....</b>	<b>98</b>
<b>Figure 52 : Application des enzymes immobilisées dans différents domaines.....</b>	<b>103</b>
<b>Figure 53 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur de glucose .....</b>	<b>104</b>
<b>Figure 54 : Production de lait sans lactose en utilisant la lactase immobilisée.....</b>	<b>105</b>
<b>Figure 55 : Comparaison de la production chimique complexe et enzymatique en une étape de l'acide 6-amino pénicillinique. Me = méthyle (CH<sub>3</sub>), Bu = butyle (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>).....</b>	<b>108</b>
<b>Figure 56 : Représentation schématique de la capacité de reconnaissance enzymatique des substrats polyfonctionnels. ....</b>	<b>110</b>
<b>Figure 57 : Enantiomère du Thalidomide, S-Thalidomide (Thérapeutique), R-Thalidomide (Toxique).....</b>	<b>111</b>
<b>Figure 58: Antagonistes doubles NK1/NK2 : Désymétrisation enzymatique du diéthyle 3-[3',4'-dichlorophényl] glutarate par la lipase B.....</b>	<b>112</b>
<b>Figure 59: Agoniste des récepteurs β<sub>3</sub> : désymétrisation du diéthyl méthyl-(4-méthoxyphényl) propanedioate.....</b>	<b>112</b>
<b>Figure 60 : Complexe irréversible marqueur d'affinité-enzyme .....</b>	<b>113</b>

---

---

## Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Taux d'augmentation de la vitesse de quelques enzymes</i> .....	3
<i>Tableau 2: Différents vitamines agissants comme coenzymes</i> .....	6
<b>Tableau 3: Contribution relative des différents organismes à la production des enzymes commerciales.</b> .....	36
<b>Tableau 4: Différents type de centrifuge utilisés lors de l'extraction des enzymes</b> .....	47
<b>Tableau 5: Quelques protéases et leurs sources microbiennes</b> .....	73
<b>Tableau 6: Applications industrielles des cellulases</b> .....	83
<b>Tableau 7 : Applications industrielles des pectinases</b> .....	88
<b>Tableau 8 : Production d'antibiotiques par des enzymes immobilisées</b> .....	105

## Chapitre I : Généralités en enzymologie

### 1. Introduction

Depuis le début de l'histoire humaine, l'homme a utilisé des enzymes indirectement. La 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 sont des procédés vieux de plusieurs milliers d'années où les activités catalytiques des enzymes sont responsables des 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. La protéase-présure qui coagule les protéines du lait est utilisée depuis des centaines d'années dans la préparation du fromage. Plusieurs milliers d'enzymes ont été identifiées à ce jour. Ce groupe de biomolécules a trouvé sa première application industrielle au début des années 1900. Aujourd'hui, un ensemble d'enzymes sont utilisées à des fins industrielles, analytiques et thérapeutiques. La première enzyme commerciale a probablement été signalée en Allemagne en 1914. Il a été démontré que l'utilisation de la trypsine, la protéase isolée des animaux, améliorait le pouvoir de lavage du détergent par rapport aux produits traditionnels. Le succès dans l'amélioration de la qualité du détergent a déclenché des efforts vers la sélection de protéases appropriées pour une application dans des détergents.

Par la suite, une percée dans l'utilisation commerciale des enzymes s'est produite avec l'introduction de protéase microbienne dans la poudre à laver à un coût abordable. La première protéase alcaline commerciale extraite du genre *Bacillus* sp. a été commercialisé en 1959 et la production de détergent ajouté aux enzymes est rapidement devenu un grand marché en quelques années. Pendant la période où l'utilisation de protéases alcalines dans les détergents est devenue populaire, l'utilisation d'enzymes

dans les industries de transformation des aliments a également pris de l'ampleur en parallèle. Les enzymes de clarification des fruits, appelées pectinase, étaient utilisé dans les unités de fabrication de jus de fruits depuis 1930. Les enzymes hydrolysant l'amidon en dextrine et en glucose sont largement entrées dans l'industrie alimentaire en 1960 et plus ou moins complètement remplacé le processus d'hydrolyse acide de l'amidon. Les enzymes d'hydrolyse de l'amidon ( $\alpha$ -amylase et amyloglucosidase) pour la production de glucose sont rapidement devenues le deuxième groupe d'enzymes utilisé dans l'industrie après la protéase détergente.

Les enzymes peuvent être extraites de tout organisme vivant. Les sources d'enzymes commerciales couvrent un large éventail, des micro-organismes aux plantes en passant par les sources animales.

Les microbes sont préférés aux plantes et aux animaux car ils sont des sources bon marché, leur teneur en enzymes est prévisible et les substrats de croissance sont obtenus comme matières premières standard. En outre, le génie génétique a ouvert une nouvelle ère de technologie enzymatique avancée. La technologie de l'ADN recombinant a permis d'obtenir des enzymes présentes dans des sources précieuses, d'être synthétisées dans des micro-organismes à croissance facile et également de produire des enzymes sur mesure avec les propriétés souhaitées selon les exigences des clients. Les enzymes conservant leur activité dans des conditions extrêmes de température, de pH et de concentrations de sel, partiellement actives dans les solvants organiques, deviennent toutes une réalité. Les perspectives de l'industrie des enzymes semblent très brillantes avec une position de marché accrue pour une utilisation existante, une nouvelle utilisation d'enzymes connues et de nouvelles enzymes ayant de nouvelles applications industrielles. La production industrielle totale d'enzymes dans le monde était estimée à 1,5 milliard de dollars américains en 1997 et elle a enregistré un taux de croissance

annuel moyen de 4,0%. Les applications des enzymes pour l'alimentation humaine et animale dominant constamment l'utilisation d'enzymes industrielles à l'échelle mondiale.

## 2. Définitions et généralités

### 2.1. Les Enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques ou biocatalyseurs de nature protéique. Ce sont des acteurs omniprésents dans la vie de la cellule. Toutes les réactions chimiques se déroulent dans la cellule ou le milieu cellulaire, en présence d'une enzyme. 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 (Tableau 1), sans en modifier le résultat ou l'équilibre thermodynamique. A la fin de la réaction, la structure de l'enzyme se retrouve inchangée.**

*Tableau 1 : Taux d'augmentation de la vitesse de quelques enzymes*

Enzyme	Taux d'augmentation de la vitesse
Carbonic anhydrase	$10^6$
Chorismate mutase	$10^6$
Triose phosphate isomerase	$10^9$
Carboxypeptidase A	$10^{11}$
AMP nucleosidase	$10^{12}$
Phosphoglucomutase	$10^{12}$
Succinyl CoA transferase	$10^{13}$
Staphylococcal nuclease	$10^{14}$
Orotidine monophosphate decarboxylase	$10^{17}$

- Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes éléments chimiques initiaux.
- Les protéines enzymatiques sont synthétisées par des êtres vivants. Cette synthèse est déterminée génétiquement

- L'enzymologie est l'étude de la relation structure-fonction des enzymes.
- Le substantif « enzyme » est du genre féminin.
- Toutes les enzymes sont des protéines.

## 2.2. Les pro-enzymes

Appelés aussi zymogènes sont des enzymes synthétisés sous forme inactive ; l'activité ne s'exerce que lorsqu'elle perd une partie de sa structure. Prenons l'exemple de quelques enzymes digestives :

**Pepsinogène (proenzyme) + HCL  $\longrightarrow$  Pepsine (enzyme)**

**Trypsinogène (proenzyme) en présence de la pepsine  $\longrightarrow$  Trypsine (enzyme)**

Il existe dans la nature des biocatalystes non protéiques tels que les Ribozymes (catalyseurs constitués de RNA) et des DNAzymes (catalyseurs formés de DNA). On les appelle aussi acides nucléiques catalyseurs.

## 2.3. Substrat

Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme. Toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement modifiées sont appelées substrats.

## 2.4. Produit

Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme. La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation est appelée produit.

## 2.5. Ligand

Élément chimique ayant une liaison spécifique avec une enzyme. Toutes les molécules ayant une liaison spécifique avec une protéine sont appelées ligands. Pour chaque ligand, il existe au moins un site de fixation sur la protéine qui le reçoit.

## 2.6. Cofacteur

Elément chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique :

- Pour transporter ou compléter un substrat ;
- Pour accepter un produit ;
- Comme participant à la structure de l'enzyme.

Les cofacteurs peuvent être des ions comme l'atome de Zinc de l'anhydrase carbonique ou de petites molécules minérales habituellement présentes dans les milieux biologiques, à commencer bien sûr par la molécule d'eau. Certains cofacteurs sont des molécules plus complexes synthétisées par les cellules : nous les appellerons coenzymes. Ce sont des molécules biologiques intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction.

## 2.7. Coenzymes

Les coenzymes sont des molécules biologiques c'est-à-dire que leur synthèse naturelle ne peut être faite que par des cellules vivantes. Lorsque cette synthèse n'est pas possible, alors tout ou partie de la molécule du coenzyme doit être apportée à cette espèce par son alimentation : cet aliment indispensable s'appelle **une vitamine (Tableau 2)**.

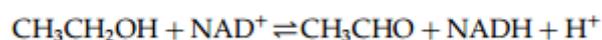
Lorsque les coenzymes sont liés à l'enzyme par des liaisons de type électrostatique ou plus faiblement encore, cette liaison est renouvelée à chaque réaction effectuée : Ces coenzymes sont appelés coenzymes libres parce qu'ils se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée.

**Tableau 2: Différents vitamines agissant comme coenzymes**

Vitamin	Coenzyme	Reaction-mediated and metabolic roles
Biotin	Biocytin	Carboxylation, nonphotosynthetic fixation of carbon dioxide
Cobalamin, B <sub>12</sub>	Adenosyl cobalamin, B <sub>12</sub>	Alkylation, intermolecular rearrangements
Coenzyme A	CoA	Acyl transfer
Folic acid	Tetrahydrofolate	One carbon group transfer
Lipoic acid	Lipoic acid	Acyl transfer
Nicotinamide	Nicotinamide	Oxidation–reduction
Niacin	Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD <sup>+</sup>	Redox-active
Pantothenate, B <sub>3</sub>	CoA	Acyl transfer
Pyridoxine, B <sub>6</sub>	Pyridoxal phosphate	Amino group transfer
Riboflavin, B <sub>2</sub>	Flavin dinucleotide, FAD	Oxidation–reduction
Thiamine, B <sub>1</sub>	Thiamine pyrophosphate, TPP	Aldehyde transfer
Vitamin A	Retinol, carotenoid	Vision
Vitamin K	Vitamin K	Carboxylation of glutamate residues
Vitamin C	Ascorbic acid	Oxidation–reduction
Vitamin D	Ergocalciferol, β-carotene, ergosterol, steroid	Photolysis, photochemical reaction, calcium adsorption
Vitamin E	Tocopherol, terpenes	Reducing agent

Lorsque au contraire les coenzymes sont liés aux enzymes par des liaisons fortes de type covalent, leur concentration est nécessairement la même que celle de l'enzyme, c'est-à-dire très petite (on dit catalytique). Ces coenzymes sont appelés coenzymes liés parce qu'ils ne se dissocient pas de l'enzyme.

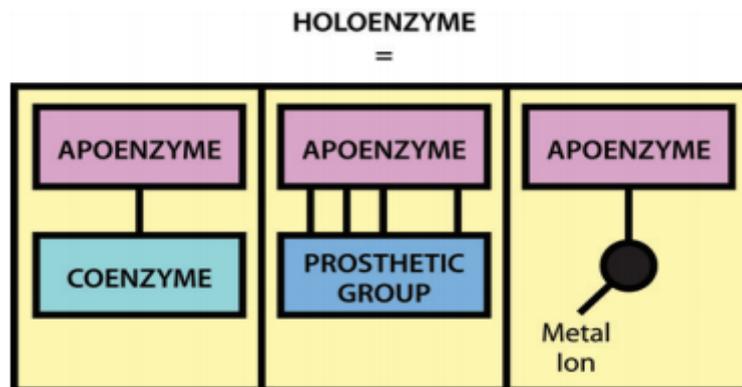
Une molécule organique telle que le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) sert un groupe spécifique avec des activités catalytiques pour les réactions d'oxydoréduction catalysées par les déshydrogénases. Une réaction typique catalysée par l'alcool déshydrogénase est présentée comme suit :



Les formes de NAD<sup>+</sup> et NADP<sup>+</sup> sont connues comme les premières coenzymes reconnues. Ils sont impliqués dans un grand nombre de réactions enzymatiques. La

conversion du  $\text{NAD}^+$  en forme réduite de NADH s'accompagne d'une modification marquée des propriétés spectrophotométriques de la coenzyme.

Lorsqu'une enzyme nécessite un cofacteur pour son activité, le composant protéique inactif est généralement appelé apoenzyme, et l'apoenzyme plus le cofacteur (c'est-à-dire l'enzyme active) est appelé holoenzyme (Figure 1).



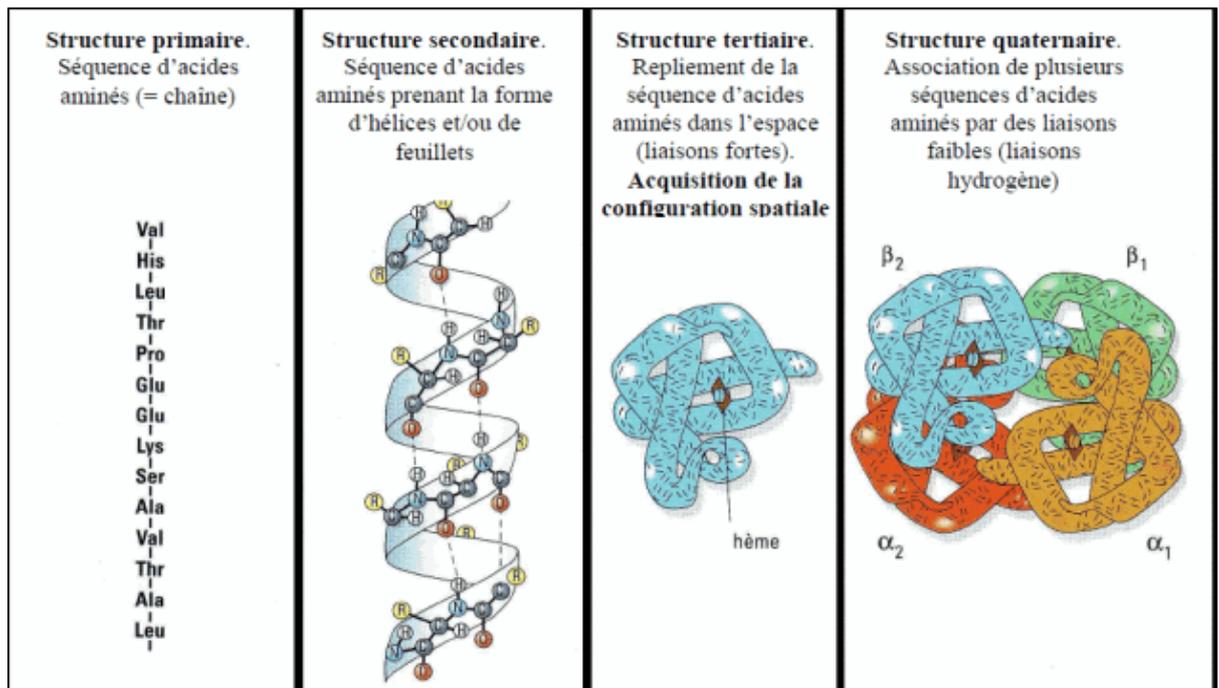
*Figure 1: Les différents composants de l'holoenzyme*

## 2.8. Structure des enzymes

Les enzymes sont des protéines et, en tant que telles, se prêtent aux mêmes méthodes d'analyse structurales et chimiques des protéines.

### 2.8.1. Structure Primaire

Les enzymes sont constituées de plusieurs acides  $\alpha$ -aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une **liaison amide**. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1 000 kDa. L'ordre, dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la **structure primaire** des enzymes (le nombre, la nature des acides aminés, et surtout l'ordre d'enchaînement) (**figure 2**).



**Figure 2: Différents niveaux structurels des protéines (Cas de l'hémoglobine)**

### 2.8.2. Structure Secondaire

Ces acides aminés vont avoir tendance à se replier sur eux-mêmes afin de former des arrangements secondaires principalement en hélices  $\alpha$  et en feuillets  $\beta$  (figure 2) ; cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes et pont disulfure (liaison entre deux atomes de Soufre présent dans trois acides aminés différents). La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne principale d'une protéine. L'existence de structures secondaires vient du fait que les repliements énergétiquement favorables de la chaîne peptidique sont limités et que seules certaines conformations sont possibles.

### 2.8.3. Structure tertiaire (tridimensionnelle)

Les acides aminés d'une séquence protéique se comportent comme des molécules ionisées, chargées électriquement (positivement ou négativement). Il peut alors s'établir des interactions (attractions ou répulsions) entre différents acides aminés. Dans une structure tertiaire, des régions hélicoïdales ou plissées de la chaîne polypeptidique

se replient les unes sur les autres et forment une molécule en forme de boule, ou molécule globulaire. La structure tertiaire est maintenue par des liaisons (covalentes, hydrogène ...) entre des acides aminés souvent très éloignés sur la chaîne primaire.

#### 2.8.4. Structure quaternaire

Une structure quaternaire peut même être décrite pour les très grosses enzymes (**figure 2**). L'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques -identiques ou différentes - par des liaisons non-covalentes, liaisons dites faibles (liaison H, liaison ionique, interactions hydrophobes et force de Van der Waals). Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité permettant à celle-ci de reconnaître un substrat en particulier via une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif.

#### 2.9. Site actif

Le site actif d'une enzyme est la région tridimensionnelle qui se lie au substrat. Ces sites sont des cavités de caractère non polaire et dans lesquelles les substrats s'insèrent (**Figure 3**). L'eau est normalement exclue du site actif lorsque le substrat est lié, sauf si elle est un réactif. Le site actif consiste d'au moins deux parties fonctionnelles, qui peuvent ou non être voisines sur la chaîne polypeptidique (si non, la structure tertiaire les amène près l'une de l'autre) :

- **le site de reconnaissance** du substrat est constitué de certains acides aminés qui sont associés avec l'orientation du substrat, et donc, avec la spécificité de l'enzyme
- **le site catalytique** est constitué des résidus qui sont directement impliqués dans la formation et rupture des liens chimiques. Ces résidus sont souvent localisés dans le fond de la cavité, et dans la majorité des cas, possèdent des chaînes latérales ioniques ou réactives (ex. His, Lys, Cys, Ser, Asp, Glu).

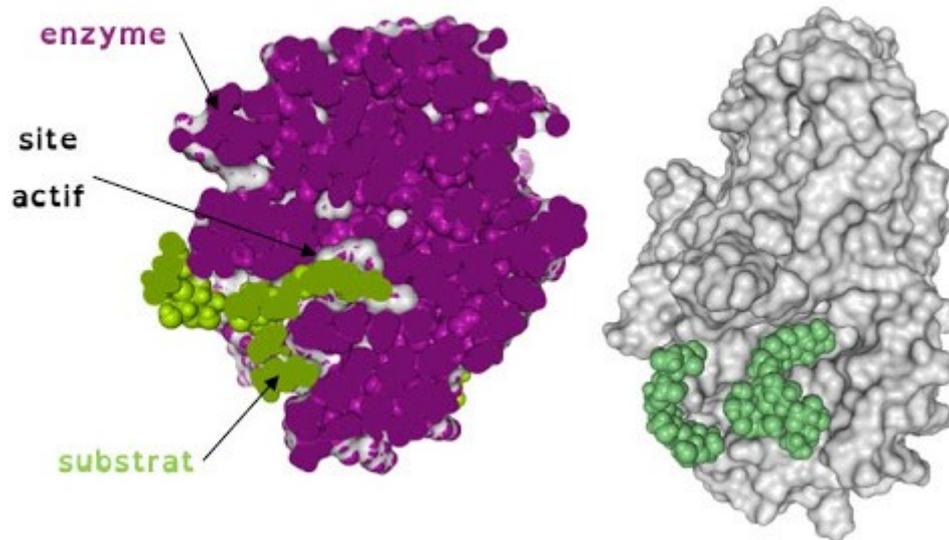
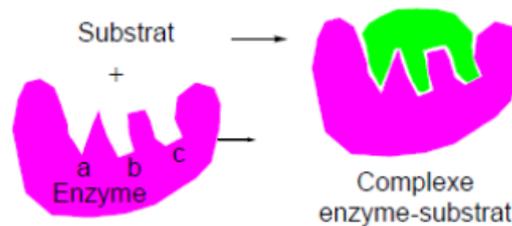


Figure 3: Configuration spatiale du site actif d'une enzyme

❖ Deux modèles pour expliquer la spécificité des enzymes:

**Clé-serrure:** la forme du site actif est complémentaire à celle du substrat



**Forme induite:** l'enzyme change sa conformation lors de la liaison du substrat.

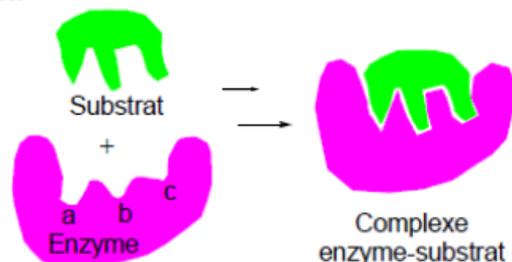


Figure 4: Modèles de la spécificité des enzymes

L'hypothèse selon laquelle la spécificité enzymatique résulte de la nature complémentaire du substrat et de son site actif a été proposée pour la première fois par le chimiste allemand Emil Fischer en 1894, et est devenue connue sous le nom de « l'hypothèse : clé et serrure » de Fischer, selon laquelle seule une clé de la taille et de la forme correctes (le substrat) s'insère dans le trou de la serrure (le site actif) de l'enzyme.

**Il est étonnant que cette théorie ait été proposée à une époque où il n'était même pas établi que les enzymes étaient des protéines (Figure 4).**

Au fur et à mesure que l'on en apprenait davantage sur la structure des enzymes grâce à des techniques telles que la cristallographie aux rayons X, il est devenu clair que les enzymes ne sont pas des structures rigides, mais sont en fait de forme assez flexible. À la lumière de cette découverte, en 1958, Daniel Koshland a étendu les idées de Fischer et a présenté le « modèle d'ajustement induit » de la liaison du substrat et de l'enzyme, dans lequel la molécule d'enzyme change légèrement de forme pour s'adapter à la liaison du substrat. L'analogie couramment utilisée est le « modèle de la main dans le gant », où la main et le gant ont une forme largement complémentaire, mais le gant est moulé autour de la main au fur et à mesure qu'il est inséré afin de fournir une correspondance parfaite (Figure 4).

Puisque c'est le site actif seul qui se lie au substrat, il est logique de se demander quel est le rôle du reste de la molécule protéique. La réponse simple est qu'il agit **pour stabiliser le site actif et fournir un environnement approprié pour l'interaction du site avec la molécule de substrat**. Par conséquent, le site actif ne peut pas être séparé du reste de la protéine sans perte d'activité catalytique, bien que des études d'évolution dirigée (ou forcée) en laboratoire aient montré qu'il est parfois possible de générer des enzymes plus petites qui conservent leur activité.

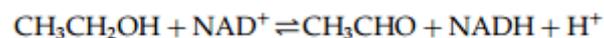
### 3. Classification des enzymes

Les enzymes peuvent être regroupées en familles sur la base d'un certain nombre de critères différents. Ils peuvent être classés selon le type de substrat qu'ils transforment. Ils sont souvent nommés simplement en ajoutant « ase » à la fin du nom du substrat, d'où les classifications générales de « protéase », «carbohydase», «lipase», «pectinase», etc. Les enzymes dégradant les polymères sont également souvent classées comme « Endo- » ou « exo- » selon la position des liaisons dans le substrat attaqué par l'enzyme.

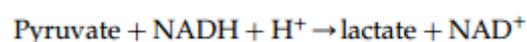
La méthode de classification enzymatique la plus complète et la plus reconnue internationalement est basée sur le type de réaction catalysée. En utilisant ce système, les enzymes sont classées dans l'une des six catégories de base : oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases.

#### 3.1. Oxydoréductases

Cette classe englobe toutes les enzymes qui catalysent les réactions redox. Le nom recommandé est déshydrogénase dans la mesure du possible, mais la réductase peut également être utilisé. L'oxydase n'est utilisée que lorsque l'O<sub>2</sub> est l'accepteur de la réduction. Le nom systématique est formé selon le donneur : accepteur oxydoréductase. L'oxydation de l'éthanol en aldéhyde avec réduction du NAD<sup>+</sup> est un bon exemple de ces réactions.

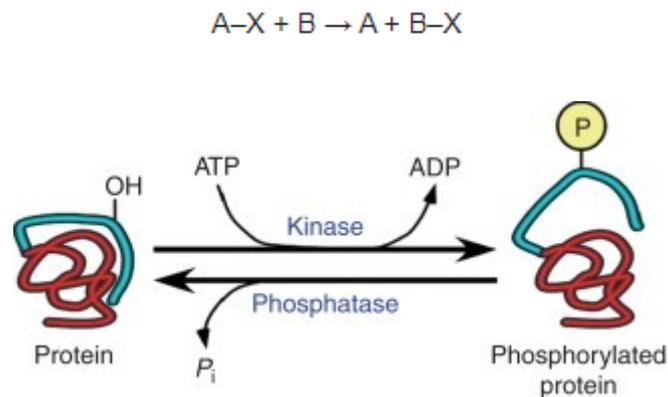


La réduction du pyruvate en lactate avec oxydation du NADH + H<sup>+</sup> est un autre exemple



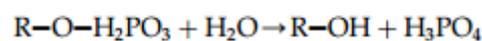
### 3.2. Transférases

Les transférases catalysent le transfert d'un groupe spécifique, tel que méthyle, acyle, amino, glycosyle, ou phosphate, d'une substance à une autre. Le nom recommandé est normalement la transférase du groupe accepteur ou la transférase du groupe donneur. Le nom systématique est formé en fonction du groupe donneur : accepteur transférase.



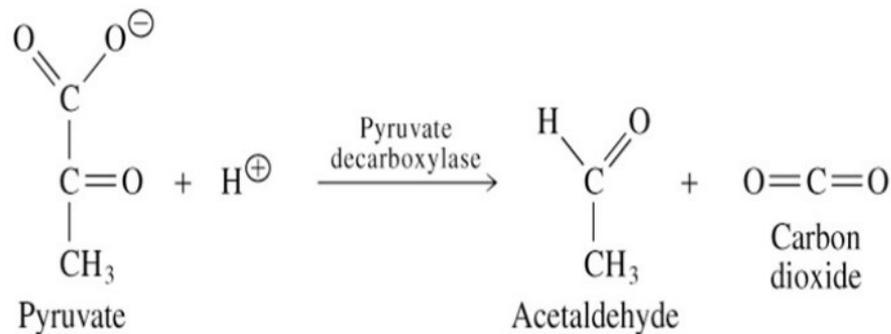
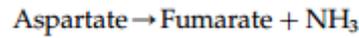
### 3.3. Hydrolases

Les hydrolases catalysent le clivage hydrolytique de C – O, C – N, C – C et d'autres liaisons. Le nom recommandé se compose souvent simplement du nom du substrat avec le suffixe -ase. Le nom systématique inclut toujours l'hydrolase.



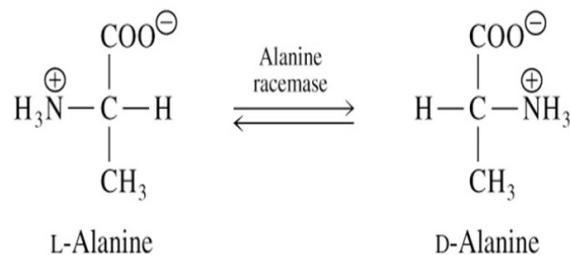
### 3.4. Lyases

Les lyases catalysent le clivage des liaisons C – C, C – O, C – N et autres par élimination. Le nom recommandé est, par exemple, décarboxylase, aldolase, déshydratase (élimination du CO<sub>2</sub>, de l'aldéhyde et de l'eau, respectivement). Le nom systématique est formé selon le groupe substrat-lyase. L'aspartate ammonia lyase (aspartase) catalyse la transformation de l'aspartate en fumarate par élimination d'une molécule d'ammonia (NH<sub>3</sub>)

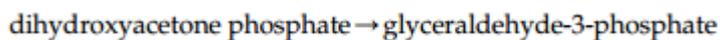


### 3.5. Isoméras

Les isoméras catalysent les réarrangements géométriques ou structurels au sein d'une molécule. Les différents types d'isomérisation conduisent aux noms racémase, épimérase, isomérase, tautomérase, mutase ou cycloisomérase. L'alanine racémase catalyse la conversion du L-alanine en D-alanine.



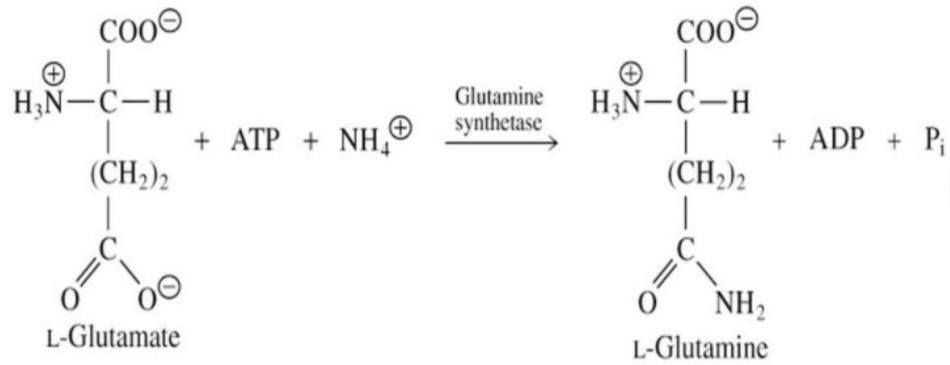
Alors que la triose phosphate isomérase transforme la dihydroxyacétone phosphate en glyceraldéhyde-3-phosphate.



### 3.6. Ligases

Les ligases catalysent la jonction de deux molécules, couplée à l'hydrolyse d'une liaison pyrophosphate dans l'ATP ou un autre nucléoside triphosphate. Le nom recommandé incluait souvent la synthétase, mais la recommandation actuelle est d'utiliser plutôt les noms de type X – Y ligase, pour éviter toute confusion avec le nom synthase (qui ne se

limite pas aux enzymes de classe 6). Le nom systématique est formé par X : Y ligase (formant l'ADP).

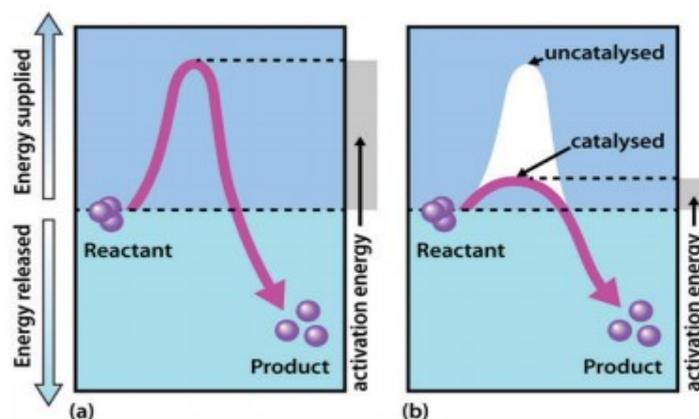


## Chapitre II : Mécanismes de catalyse (action des effecteurs, régulation et activation des zymogènes)

### 1. Mécanismes de catalyse

Tout d'abord, une enzyme est un catalyseur et est responsable de l'accélération de la vitesse d'une réaction qui est naturellement lente. Certaines des réactions chimiques sont relativement rapides même sans catalyseur. Par exemple, la dismutation des anions superoxyde et l'élimination du peroxyde d'hydrogène sont tous très rapide. Ces taux ne sont cependant pas assez rapides, de sorte que la nature a fait évoluer des enzymes (superoxyde dismutase et catalase, respectivement) pour les accélérer davantage. Une enzyme est un catalyseur qui :

- a. Accélère la vitesse d'une réaction en abaissant la barrière d'énergie d'activation. Il peut convertir une réaction complexe en un certain nombre de réactions plus simples - chaque étape ayant sa propre barrière d'énergie d'activation plus petite (**Figure 5**).



**Figure 5: Effet d'une enzyme sur la réduction de l'énergie d'activation requise pour démarrer une réaction où (a) n'est pas catalysée et (b) est une réaction catalysée par une enzyme.**

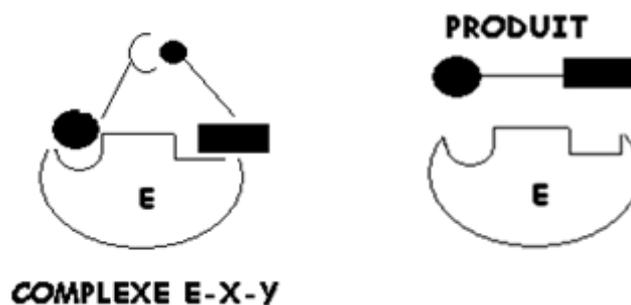
- b. Ne change pas la constante d'équilibre pour une réaction particulière, mais accélère l'approche de l'équilibre. Comme la position d'équilibre peut être

atteinte dans les deux sens (avant ou arrière), en principe, les enzymes peuvent accélérer les vitesses dans les deux sens.

Pour atteindre ces objectifs les enzymes utilisent l'un des mécanismes suivants :

### 1.1. Catalyse par effet de proximité et d'orientation

Dans la catalyse par approximation, l'enzyme augmente la vitesse de réaction en se liant à de multiples substrats et en les positionnant favorablement pour que la réaction puisse se dérouler. La liaison avec l'enzyme réduit l'entropie de rotation des substrats qui seraient autrement flottant librement de manière aléatoire en solution, et permet le positionnement correct des substrats pour la réaction (**Figure 6**).



**Figure 6: Catalyse enzymatique par effet de proximité et d'orientation**

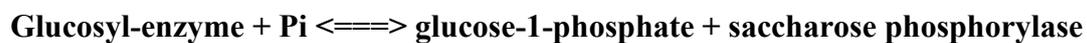
En plus de positionner correctement les substrats pour interagir les uns avec les autres, la catalyse par approximation convertit une réaction qui aurait été du second ordre, avec des substrats flottant librement en solution, en une réaction de premier ordre, où tous les substrats sont maintenus en place par l'enzyme et se comportent comme une seule molécule. Cela peut considérablement améliorer la vitesse catalytique de la réaction de  $10^5$  à  $10^7$  fois plus rapide, selon le système enzymatique.

### 1.2. Catalyse covalente

La catalyse covalente implique la formation d'une liaison covalente entre l'enzyme et au moins l'un des substrats impliqués dans la réaction, cela implique souvent la formation d'un **nucléophile**. Plusieurs groupes R d'acides aminés peuvent servir de nucléophile et

se trouvent souvent sur le site actif des enzymes (Lys, His, Cys, Asp & Ser). Les chaînes latérales nucléophiles sont souvent activées par la déprotonation provoquée par les chaînes latérales voisines, telles que l'histidine qui peut agir comme une base. Alternativement, l'eau peut également activer le nucléophile. La formation de liaison covalente intermédiaire entre l'enzyme et le substrat permet le clivage de la liaison et l'élimination d'un groupe partant.

Exemple de la réaction catalysée par le saccharose phosphorylase :



Les protéases à sérine sont un autre exemple d'enzymes utilisant la catalyse covalente avec d'autres types de catalyse. Le mécanisme en détails de la catalyse enzymatique des enzymes Protéases de type chymotrypsine est détaillé dans la figure suivante (**figure 7**).

Le mécanisme de réaction a été décomposé en un processus en huit étapes. Dans les étapes 1 à 3, le substrat protéique se lie à la protéase et est orienté pour placer le carbone carbonyle du substrat à proximité du résidu sérine du site actif. La catalyse acide-base permet l'activation du résidu sérine pour médier l'attaque nucléophile sur le substrat protéique. L'intermédiaire oxyanion covalent représenté en 3 et 4 est stabilisé par le trou oxyanion (Les groupement amines des AA de la protéase).

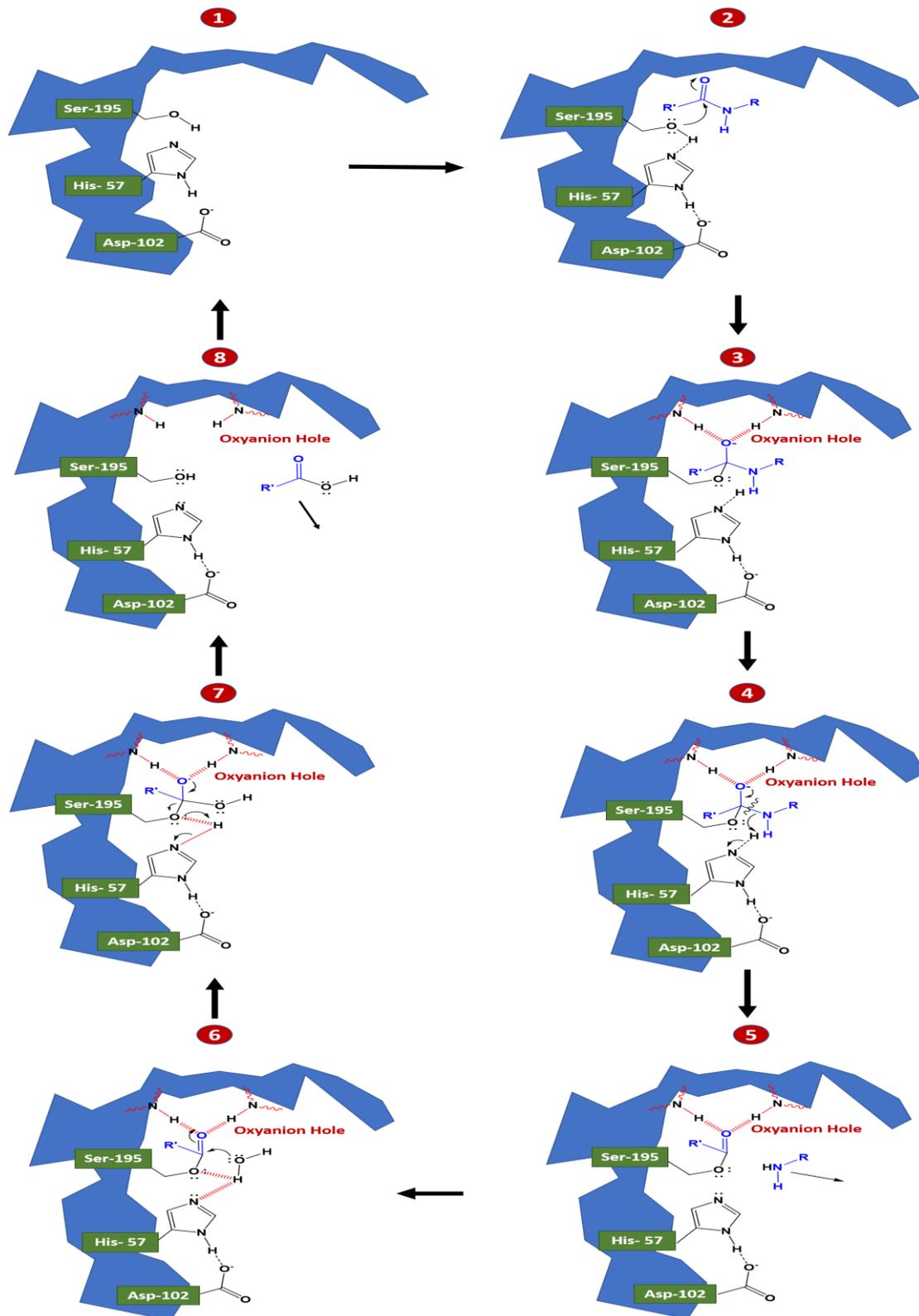


Figure 7: Mécanisme de catalyse de la chymotrypsine

Le rebond des électrons pour reformer le groupe carbonyle provoque le clivage de la liaison peptidique et l'élimination de la partie N-terminale du peptide du site actif, montré

dans 5. L'eau pénètre dans le site actif et médie l'attaque nucléophile sur le carbone carbonyle de l'intermédiaire enzyme-substrat, comme indiqué en 6 et 7. Lorsque la liaison carbonyle est reformée, la sérine agit comme un groupe partant et le peptide C-terminal est libéré de l'enzyme. La triade catalytique dans le site actif de l'enzyme est récupérée et l'enzyme est réinitialisée pour un autre cycle d'activité catalytique, comme indiqué en 8.

Dans l'ensemble, chaque acide aminé de la triade effectue une tâche spécifique dans ce processus :

- La sérine a un groupe -OH qui est capable d'agir comme un nucléophile, attaquant le carbone carbonyle de la liaison peptidique scissile du substrat (catalyse covalente).
- Une paire d'électrons sur l'azote histidine a la capacité d'accepter l'hydrogène du groupe sérine -OH, coordonnant ainsi l'attaque de la liaison peptidique (catalyse acide / base).
- Le groupe carboxyle sur l'acide aspartique se coordonne à son tour avec l'histidine, ce qui rend l'atome d'azote mentionné ci-dessus beaucoup plus électro-négatif grâce au processus de désolvatation.

### 1.3. Catalyse acido-basique

La catalyse acide-base est impliquée dans tout mécanisme de réaction qui nécessite le transfert d'un proton d'une molécule à une autre. Il est très courant de voir ce mécanisme combiné avec la catalyse covalente car de nombreux nucléophiles sont activés par l'élimination d'un proton, y compris les groupes fonctionnels alcool, thiol et amine. Les enzymes qui utilisent la catalyse acide-base peuvent être sous-groupées davantage en réactions acide-base spécifique ou acide-base générale. Une catalyse acido-basique

spécifique se produit si un ion hydronium ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) ou un ion hydroxyde ( $\text{OH}^-$ ), respectivement, est utilisé directement dans le mécanisme de réaction, et le pH de la solution affecte la vitesse de catalyse. La catalyse acido-basiques générale se produit lorsque des molécules autres que l'ion hydronium ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) ou un ion hydroxyde ( $\text{OH}^-$ ) sont la source du don ou de l'acceptation de protons. Le plus souvent, un résidu d'acide aminé du site actif est utilisé pour accepter ou donner un proton dans le mécanisme de réaction. Dans les réactions acide-base générales, le pH est généralement maintenu constant dans un système tamponné.

#### 1.4. Catalyse électrostatique

La catalyse électrostatique se produit lorsque le site actif de l'enzyme stabilise l'état de transition de la réaction en formant des interactions électrostatiques avec le substrat. Les interactions électrostatiques peuvent être des interactions ioniques, ioniques-dipôles, dipôles-dipôles ou hydrophobes. La liaison hydrogène est l'une des interactions électrostatiques les plus courantes formées dans le site actif.

#### 1.5. Désolvation

Les sites actifs enzymatiques peuvent devenir dépourvus d'eau et imiter les caractéristiques de réaction de la phase gazeuse. Cela peut déstabiliser l'état polarisé des groupes chargés tels que les acides et les bases. Ainsi, la forme neutre de ces types de résidus devient l'état privilégié. Ceci est dû à des altérations significatives du pKa des résidus du site actif dans l'environnement non polaire. Cela peut amener des résidus normalement acides tels que le glutamate à extraire un proton de l'histidine et à se comporter comme une base, par exemple.

#### 1.6. Distorsion de contrainte

En chimie organique, certaines structures telles que les structures cycliques à trois et quatre chaînons, telles que les époxydes, étaient très réactives. Les sites actifs enzymatiques peuvent également utiliser une distorsion de contrainte dans un substrat lié

pour augmenter la réactivité de la molécule et favoriser la formation de l'état de transition. De nombreuses enzymes qui fonctionnent par le modèle d'ajustement induit utilisent également la distorsion de contrainte dans leur mécanisme catalytique. Dans l'état non lié, ils restent dans un état catalytique faible, cependant l'interaction avec le substrat induit la déstabilisation du site actif de l'enzyme ou peut induire une contrainte dans le substrat provoquant l'initiation de l'activité catalytique de l'enzyme.

### 1.7. Catalyse par cofacteurs

Environ un tiers des enzymes connus nécessitent la présence d'ions métalliques pour leur activité catalytique. On distingue deux catégories d'enzymes nécessitant des ions métalliques, selon la force des interactions ion-protéine :

- 1- Les **métalloenzymes** où les ions métalliques sont fortement liés, le plus souvent des ions de métaux de transition tels que  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Co}^{3+}$ .
- 2- Des enzymes activés par des métaux qui se lient faiblement à des ions métalliques en solution, généralement des ions de métaux alcalins ou alcalino-terreux tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les ions métalliques participent au processus catalytique selon trois modalités principales :

- 1- En se liant aux substrats de sorte à les orienter correctement pour la réaction.
- 2- En participant à des réactions d'oxydo-réduction par des changements réversibles de l'état d'oxydation de l'ion métallique.
- 3- En stabilisant électro-statiquement ou en masquant des charges négatives.

## 2. Facteurs régissant l'activité catalytique

### 2.1. Température

Au fur et à mesure que la température augmente, la vitesse des mouvements moléculaires et donc la vitesse de réaction augmente (1 sur la figure 8), mais en même temps il y a une inactivation progressive causée par la dénaturation de l'enzyme (protéine) qui est suivie d'une forte baisse provoquée par la dénaturation thermique de l'enzyme (2 sur la figure 8). L'optimum est généralement compris entre 40 et 60 °C. Certaines enzymes insensibles à la température peuvent présenter un optimum à presque 100 °C

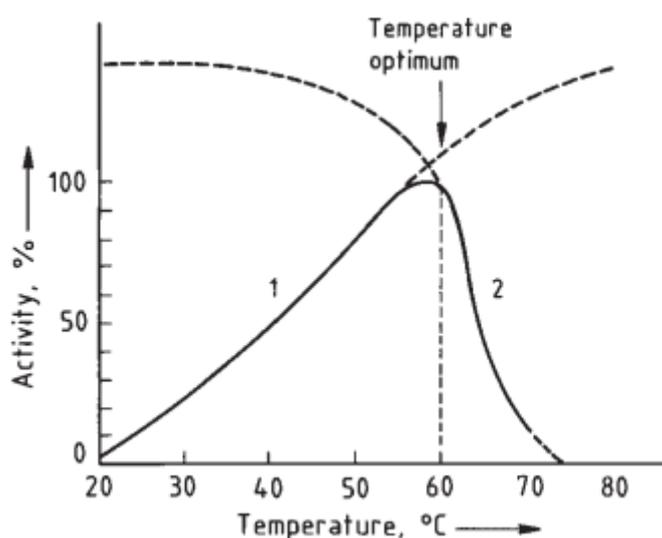
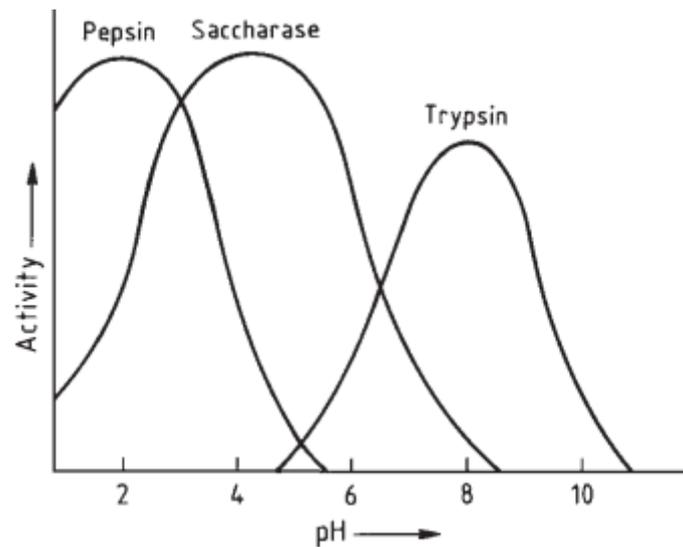


Figure 8: Effet de la température sur l'activité enzymatique

### 2.2. pH

La plupart des enzymes ont un pH optimal caractéristique auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale, et au-dessus et au-dessous duquel la vitesse diminue (**figure 9**). Le profil de pH dépend d'un certain nombre de facteurs. Au fur et à mesure que le pH change, l'ionisation des groupes à la fois sur le site actif de l'enzyme et sur le substrat peut s'altérer, influençant la liaison du substrat au site actif. Ces effets sont souvent réversibles.



**Figure 9: Effet du pH sur l'activité enzymatique**

Par exemple, si nous prenons une enzyme avec un pH optimal de 7,0 et la plaçons dans un environnement à pH 6,0 ou 8,0, les propriétés de charge de l'enzyme et du substrat peuvent être sous-optimales, de sorte que la liaison et donc la vitesse de réaction sont abaissées. Si nous réajustons ensuite le pH à 7,0, les propriétés de charge et donc l'activité maximale de l'enzyme sont souvent restaurées. Cependant, si nous plaçons l'enzyme dans un environnement acide ou alcalin plus extrême (par exemple à pH 1 ou 14), bien que ces conditions ne conduisent pas réellement à des changements dans la structure covalente très stable de la protéine (c'est-à-dire sa configuration), elles peuvent bien produire des changements dans la conformation (forme) de la protéine de telle sorte que, lorsqu'elle est revenue à pH 7,0, la conformation d'origine et donc la pleine activité catalytique de l'enzyme ne sont pas restaurées.

### 2.3. Activation

De nombreux effecteurs chimiques activent ou inhibent l'activité catalytique des enzymes. En plus des substrats et des coenzymes, de nombreuses enzymes nécessitent des composés non protéiques ou, dans certains cas, des composés protéiques pour être pleinement actifs. L'ion activateur peut être impliqué directement dans la réaction en

complexant la coenzyme ou le cosubstrat (par exemple, des ions Fe liés à la flavine ou au complexe ATP-Mg). Dans d'autres cas, l'ion fait partie de l'enzyme et agit soit comme stabilisateur de la conformation active (par exemple, ions Zn dans la phosphatase alcaline), soit participe directement au site actif (par exemple, ions Mn dans l'isocitrate déshydrogénase (EC 1.1.1.42) et les ions Zn ou Co dans les Carboxypeptidases).

## 2.4. Inhibition

Les substances qui réduisent l'activité d'une réaction catalysée par une enzyme sont appelées inhibiteurs. Ils agissent en influençant directement ou indirectement les propriétés catalytiques du site actif. Les inhibiteurs peuvent être étrangers à la cellule ou des composants naturels de celle-ci. Ceux de cette dernière catégorie peuvent représenter un élément important de la régulation du métabolisme cellulaire. De nombreuses toxines et également de nombreux agents pharmacologiquement actifs (à la fois des drogues illicites et des médicaments sur ordonnance et en vente libre) agissent en inhibant des processus spécifiques catalysés par des enzymes.

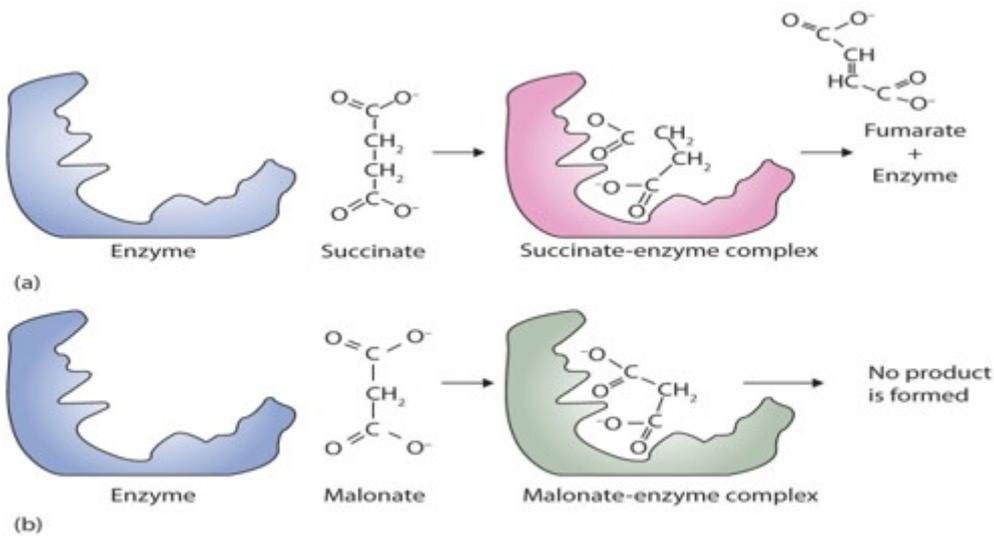
### 2.4.1. Inhibition réversible

Les inhibiteurs sont classés comme des inhibiteurs réversibles lorsqu'ils se lient de manière réversible à une enzyme par des liaisons non covalentes.

#### 2.4.1.1. Inhibition Compétitive

Une molécule qui est structurellement similaire au substrat peut être capable de se lier de manière réversible au site actif de l'enzyme et donc d'agir comme un inhibiteur compétitif. Par exemple, **le malonate est un inhibiteur compétitif de l'enzyme succinate déshydrogénase**, car il est capable de se lier au site actif de l'enzyme en raison de sa similarité structurelle étroite avec le substrat naturel de l'enzyme, le succinate (voir ci-dessous). Lorsque le malonate occupe le site actif de la succinate déshydrogénase, il

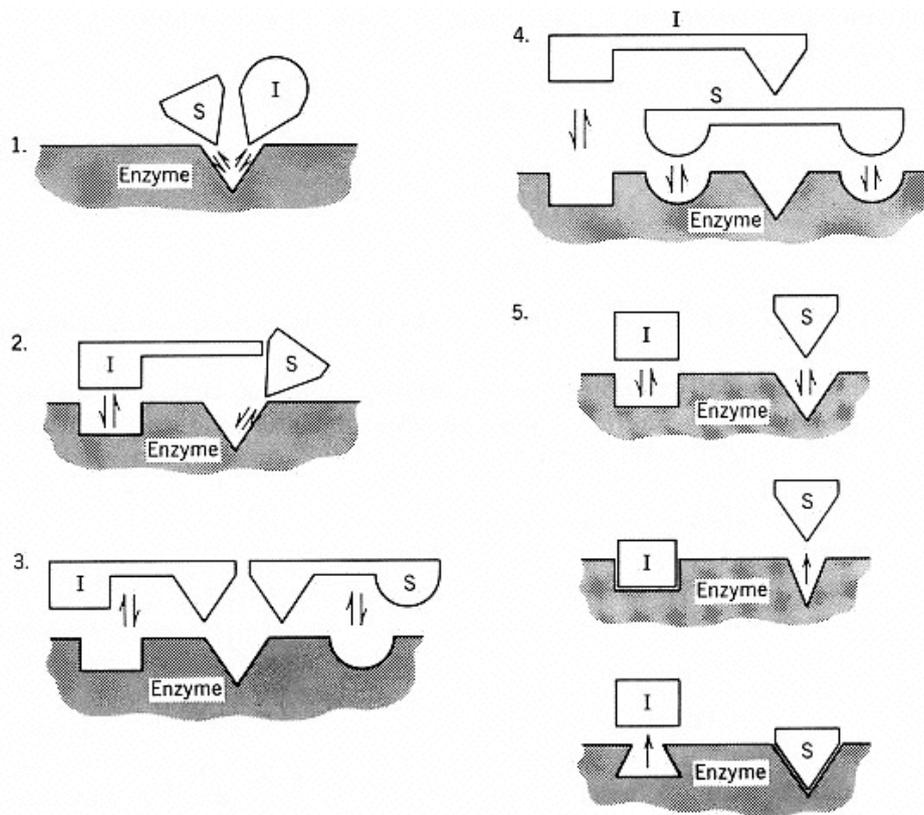
empêche le substrat naturel, le succinate, de se lier, ralentissant ainsi la vitesse d'oxydation du succinate en fumarate (c'est-à-dire inhibant la réaction) (**Figure 10**).



**Figure 10: Inhibition compétitive réversible de la succinate déshydrogénase par le malonate**

Le degré auquel un inhibiteur compétitif interfère avec l'activité d'une enzyme dépend des concentrations relatives du substrat et de l'inhibiteur. Si l'inhibiteur est présent en quantités relativement importantes, il bloquera initialement la plupart des sites actifs. Mais comme la liaison est réversible, certaines molécules de substrat finiront par se lier au site actif et être converties en produit. L'augmentation de la concentration du substrat favorise le déplacement de l'inhibiteur du site actif. L'inhibition compétitive peut être complètement inversée en ajoutant le substrat de sorte qu'elle atteigne une concentration beaucoup plus élevée que celle de l'inhibiteur.

Il existe cependant d'autres modèles où le substrat et l'inhibiteur se fixent sur des sites distincts. L'inhibition est malgré tout de type compétitif pour diverses raisons structurales (**Figure 11**).



**Figure 11: Différents types d'inhibition compétitive (Fixation exclusive)**

#### 2.4.1.2. Inhibition non compétitive (fixation non exclusive)

Les inhibiteurs réagissent avec l'enzyme sur un site distinct du site actif. Par conséquent, la liaison de l'inhibiteur ne bloque pas physiquement le site de liaison au substrat, mais elle empêche une réaction ultérieure en empêchant les ajustements conformationnels du site actif qui devrait avoir lieu pour qu'il y ait catalyse. Cela signifie que l'inhibiteur et le substrat peuvent se lier simultanément à une molécule d'enzyme pour former des complexes ES, EI ou ESI, sachant que le complexe ternaire ESI est inactif. La plupart des inhibiteurs non compétitifs sont chimiquement sans rapport avec le substrat et leur inhibition ne peut pas être surmontée en augmentant la concentration du substrat. De tels inhibiteurs réduisent en effet la concentration de l'enzyme active en solution, **réduisant ainsi le  $V_{max}$**  de la réaction (une partie des molécules d'enzyme se trouvant sous la forme EI et ESI, conjointement au complexe ES, il y a donc moins de molécules d'enzyme productives). Cependant, ils **ne modifient pas la valeur de  $K_m$** .

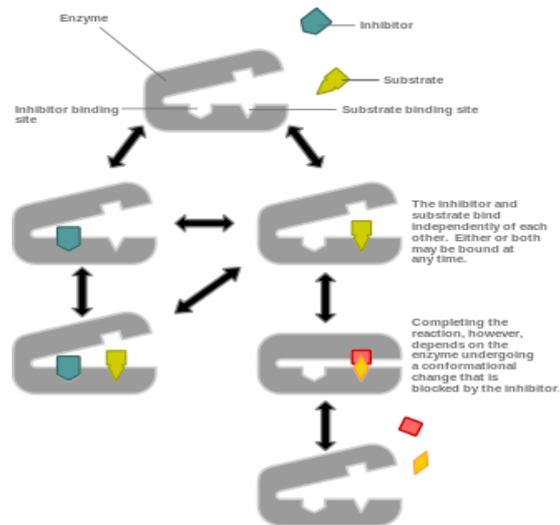


Figure 12: Mode d'action d'un inhibiteur non-compétitif

L'AMP exerce cette inhibition sur la fructose 1,6-bisphosphatase (Figure 13)

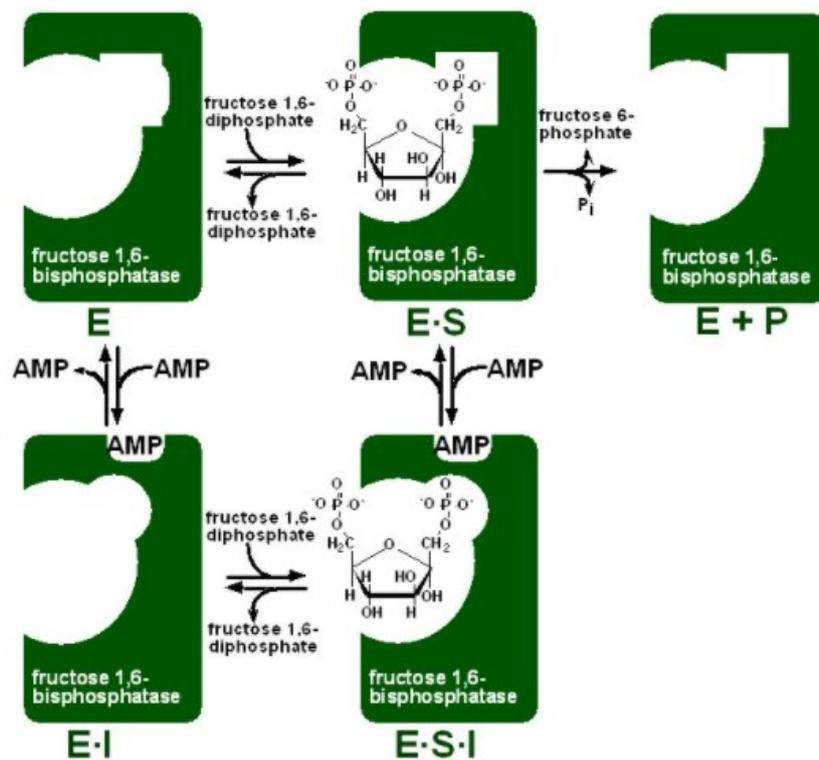
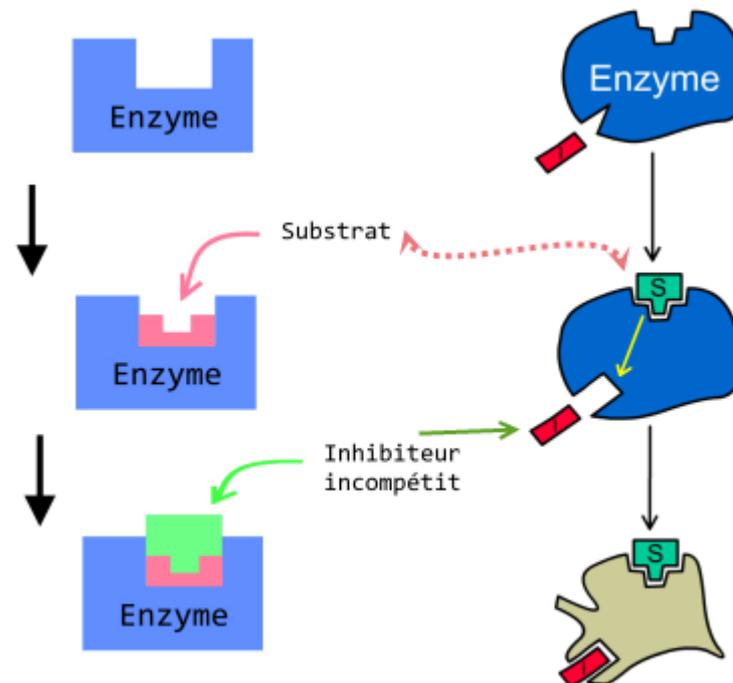


Figure 13: Inhibition non-compétitive de la fructose 1,6-bisphosphatase par l'AMP

#### 2.4.1.3. Inhibition incompétitive

Cette inhibition survient lorsque l'inhibiteur ne peut se lier à l'enzyme qu'une fois une molécule de substrat s'est elle-même liée. En tant que telle, l'inhibition est plus

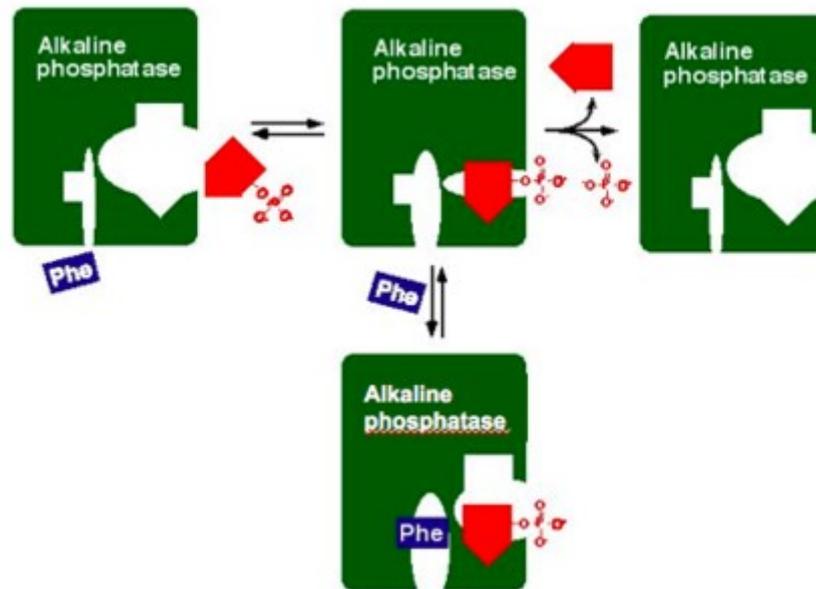
significative à des concentrations élevées de substrat et entraîne une réduction de la  $V_{max}$  de la réaction. Une inhibition incompétitive entraîne également une réduction de  $K_m$ , cela signifie que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est en fait augmentée lorsque l'inhibiteur est présent. Cet effet se produit parce que la liaison de l'inhibiteur au complexe ES élimine efficacement ce complexe et affecte ainsi l'équilibre global de la réaction favorisant la formation du complexe ES.



**Figure 14: Mode d'action d'un inhibiteur incompétitive**

Il est à noter cependant que, puisque  $V_{max}$  et  $K_m$  sont tous deux réduits, les vitesses de réaction observées avec l'inhibiteur présent sont toujours inférieures à celles en l'absence de l'inhibiteur incompétitif.

Un exemple de ce type d'inhibition est exercé par l'acide aminé L-phénylalanine sur la phosphatase alcaline (Figure 14).



**Figure 15: Inhibition incompétitive de la phosphatase alcaline par le L-phénylalanine**

#### 2.4.1.4. Inhibition par substrat

Une concentration élevée du substrat (ou de coenzyme) peut diminuer l'activité catalytique d'une enzyme. **Des exemples sont l'action de l'urée sur l'uréase (E.C. 3.5.1.5).** L'activité de l'invertase est considérablement réduite en présence de fortes concentrations de saccharose (son substrat).

#### 2.4.1.5. Inhibition par le produit final

Dans de nombreux systèmes multienzymatiques, le produit final de la séquence de réaction peut agir comme un inhibiteur spécifique d'une enzyme au début ou près du début de la séquence. Le résultat est que la vitesse de la séquence entière de réactions est déterminée par la concentration à l'état d'équilibre du produit final. Ce type d'inhibition est également appelée Feed-back inhibition ou rétro-inhibition. La  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus niger* est fortement inhibée par le galactose (son produit). Les produits d'une réaction enzymatique font partie des inhibiteurs compétitifs les plus couramment rencontrés.

### 2.4.2. Inhibition irréversible et poisons

Si un inhibiteur se lie de façon permanente à une enzyme, il est connu comme un inhibiteur irréversible. De nombreux inhibiteurs irréversibles sont donc de puissantes toxines. La glycopeptide transpeptidase catalyse la formation de liaisons croisées entre les acides aminés D dans les parois cellulaires des bactéries. Cette enzyme catalyse également la réaction inverse, l'hydrolyse des liaisons peptidiques. Au cours de l'hydrolyse de la liaison peptidique tendue dans la pénicilline, l'enzyme active l'inhibiteur (pénicilline), qui modifie ensuite de manière covalente une sérine de site actif dans l'enzyme. En effet, l'enzyme «se suicide» en hydrolysant la liaison peptidique tendue dans la pénicilline. La pénicilline est appelée dans ce cas un inhibiteur kamikaze.

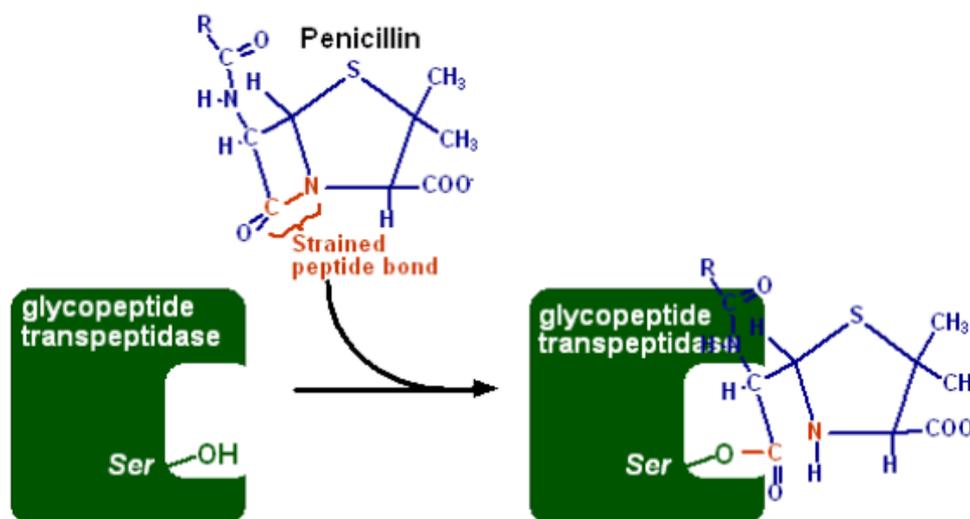
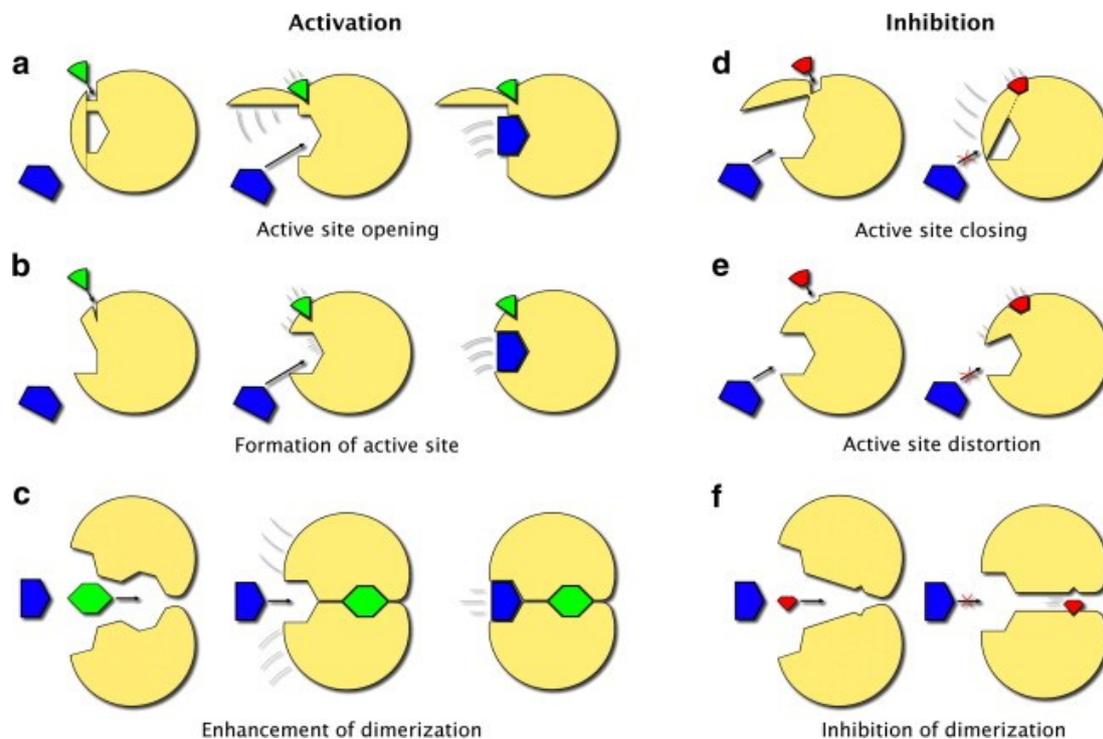


Figure 16: Inhibition irréversible de la glycopeptide transpeptidase par la pénicilline

### 2.5. Allostérie

Les enzymes allostériques sont des enzymes régulatrices clés qui contrôlent les activités des voies métaboliques en répondant aux inhibiteurs et aux activateurs. Les enzymes à régulation allostérique ont une structure quaternaire et sont composés de deux ou plusieurs sous-unités structurellement similaires ou identiques (protomères), chacune avec un site de liaison pour le substrat et un autre site de liaison indépendant pour l'effecteur allostérique. La liaison de l'effecteur modifie la conformation de la sous-unité

et son centre actif, ce qui affecte alors la conformation et donc l'activité catalytique de la molécule entière (Figure 17). La coopération du substrat et de l'effecteur régule l'activité catalytique globale de l'enzyme en fonction de la concentration du métabolite.



**Figure 17: Mécanismes d'actions des effecteurs allostériques**

Les cosubstrats ayant un rôle central dans le métabolisme, tels que l'acétyl-CoA, l'ATP ou l'AMP, peuvent également influencer la vitesse des séquences de réactions par régulation allostérique. Par exemple, la phosphofructokinase, la première enzyme de la voie énergétique Embden – Meyerhof – Parnass, est inhibée par une concentration élevée d'ATP (c'est-à-dire un bilan énergétique positif). Une concentration élevée d'AMP, d'autre part, (c'est-à-dire un déficit énergétique) met fin à cette inhibition.

## 2.6. Régulation biogénique de l'activité enzymatique

En principe, l'activité enzymatique peut également être contrôlée en régulant la quantité d'enzyme dans la cellule. Cela peut être accompli en régulant la biosynthèse d'enzymes individuelles ou de plusieurs enzymes fonctionnellement liées par induction ou répression, ou par attaque spécifique d'enzymes protéolytiques.

### 2.6.1. Les zymogènes : précurseur des protéases

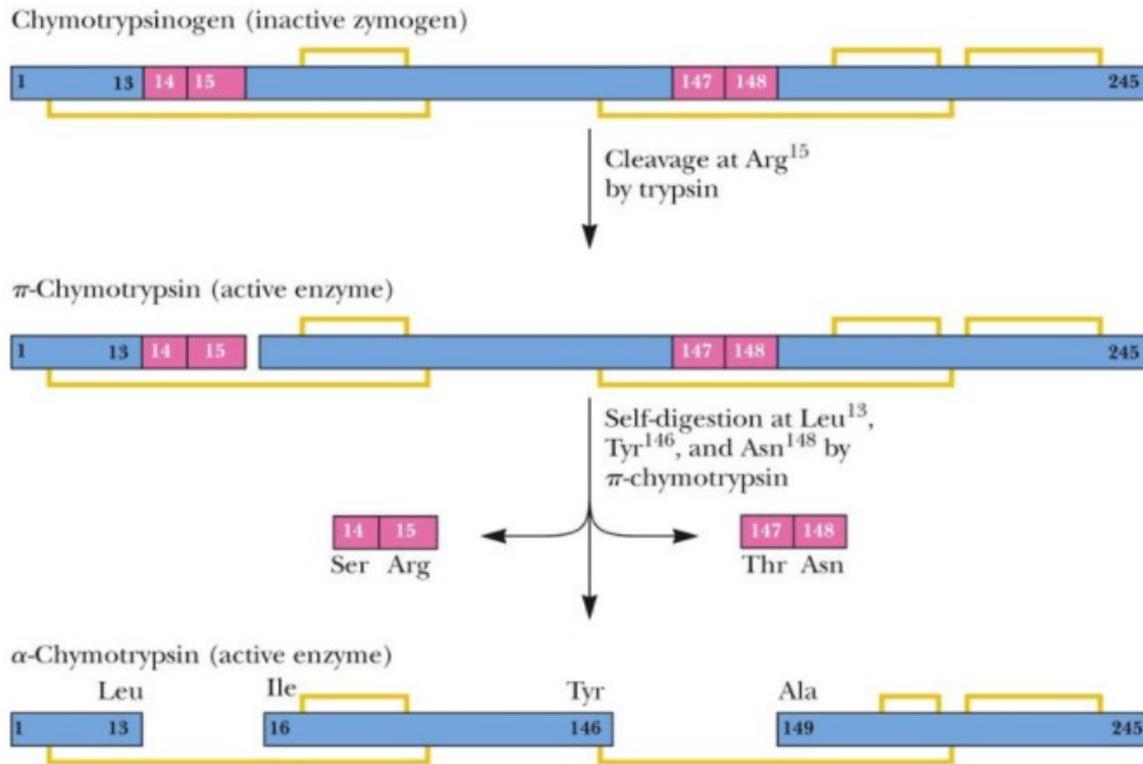
Tout comme les interactions allostériques peuvent être utilisées pour modifier la structure tertiaire (et donc l'activité) des protéines, le précurseur d'une enzyme peut être clivé et la structure tertiaire modifiée. Cela transforme le précurseur en une enzyme active. Les précurseurs inactifs sont collectivement appelés zymogènes.

Les zymogènes des enzymes protéolytiques sont constitués de la protéase intacte avec une extension N-terminale. La conversion du zymogène inactif à la protéase active mature nécessite une protéolyse limitée généralement d'une seule liaison peptidique. Les réarrangements moléculaires accompagnent l'élimination protéolytique du prosegment du zymogène, conduisant finalement à la protéase mature. Les prosegments des zymogènes varient en taille de deux résidus pour certains des granzymes à plus de 150 résidus pour la protéase  $\alpha$ -lytique, une sérine protéase bactérienne.

Par exemple, la chymotrypsine (E.C. 3.4.21.1), est synthétisée sous forme de zymogène inactif et convertie en enzyme active par la trypsine (E.C. 3.4.21.4). La chymotrypsine provient du pancréas, mais pas en tant qu'enzyme active. Si elle y était active, elle endommagerait les protéines du pancréas, car son « travail » est de dégrader les protéines. Au lieu de cela, le pancréas produit un précurseur inactif de la chymotrypsine, appelé chymotrypsinogène.

Le chymotrypsine zymogène, chymotrypsinogène, se compose d'une seule chaîne polypeptidique et possède cinq liaisons disulfures qui aident à déterminer sa structure tertiaire et à la maintenir inactive en tant qu'enzyme. Lorsque le chymotrypsinogène est libéré dans l'intestin grêle, une autre protéase, la trypsine, le clive assez spécifiquement entre l'arginine-15 et l'isoleucine-16, formant la  $\pi$ -chymotrypsine. La  $\pi$ -chymotrypsine agit alors sur elle-même pour cliver deux morceaux. Cela laisse la forme finale de l'enzyme, l' $\alpha$ -chymotrypsine, qui en raison des clivages de la chaîne d'origine a

maintenant trois chaînes polypeptidiques plus courtes maintenues ensemble par des liaisons disulfures (Figure 18). Les clivages entraînent des changements dans la structure tertiaire, de sorte que la forme finale est une enzyme active.



**Figure 18: Mécanisme d'activation du chymotrypsinogène**

D'autres enzymes protéolytiques sont aussi biosynthétisées sous forme de précurseurs inactifs, la Figure 19 montre la cascade d'activation des protéinases à sérine.

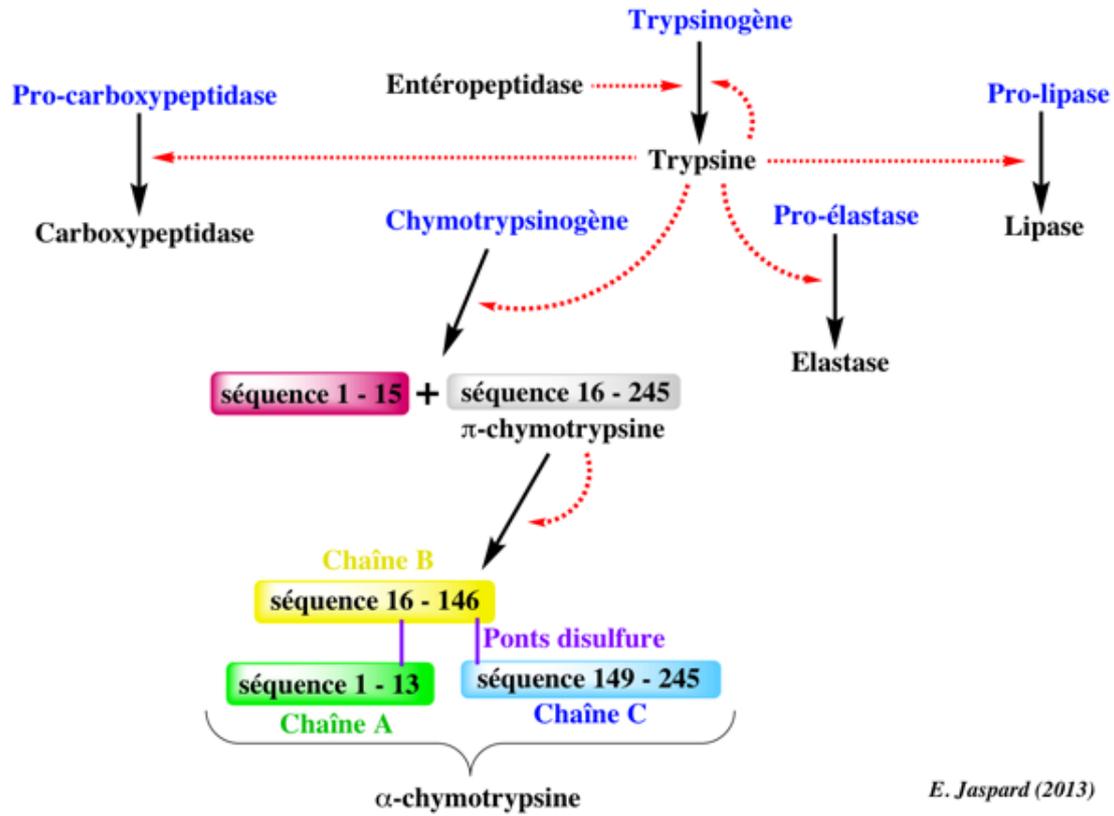


Figure 19: Cascade d'activation des zymogènes des protéinases à sérine

## Chapitre III : Production des enzymes

### 1. Introduction

La technologie enzymatique est principalement engagée dans la production, isolement, purification et utilisation d'enzymes soit sous forme soluble soit forme immobilisée, au profit de l'humanité. Avec le progrès dans la technologie de l'ADN recombinant, l'ingénierie enzymatique produit un groupe d'enzymes plus efficace et diversifié avec applications en microbiologie, biochimie, diagnostic, thérapeutique, biocatalyse ... etc. L'objectif global de cette la technologie émergente consiste à produire des produits durables uniques à fonction spécifique pour répondre aux besoins d'une population croissante.

### 2. Isolation et Purification

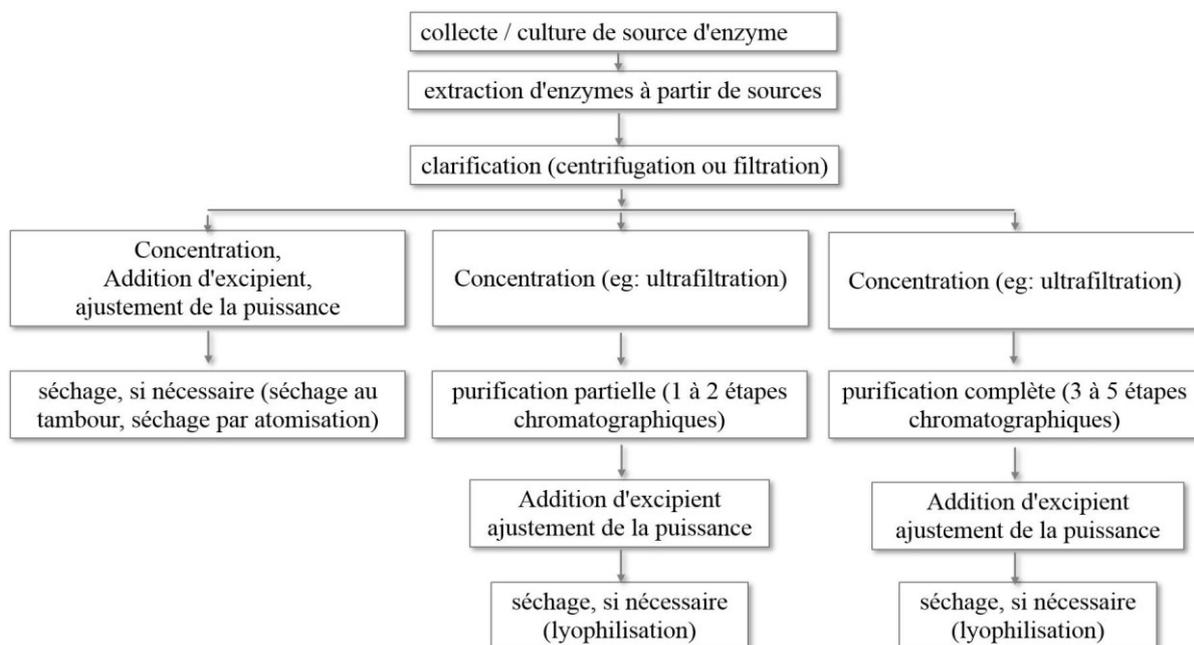
Les matières premières pour l'isolation des enzymes sont des organes animaux, du matériel végétal et des micro-organismes. Le tableau 3 montre la contribution des différents organismes à la production des enzymes commerciale.

**Tableau 3: Contribution relative des différents organismes à la production des enzymes commerciales.**

Organism	Relative contribution
Fungi	60%
Bacteria	24%
Yeast	4%
Streptomyces	2%
Higher animals	6%
Higher plants	4%

Les enzymes sont universellement présentes dans les organismes vivants ; chaque cellule synthétise un grand nombre d'enzymes différentes pour maintenir ses réactions

métaboliques. Le choix des procédures de purification enzymatique dépend de leur emplacement. Isolement des enzymes intracellulaires impliquent souvent la séparation de mélanges biologiques complexes. Alors que, les enzymes extracellulaires sont généralement libérées dans le milieu avec seulement quelques autres composants. Les enzymes sont des protéines très complexes et leur degré élevé de la spécificité en tant que catalyseurs ne se manifeste qu'à l'état natif. La conformation native est atteinte dans des conditions spécifiques de pH, de température et de force ionique. Par conséquent, seulement des méthodes douces et spécifiques peuvent être utilisées pour l'isolement enzymatique. La figure 20 montre la séquence d'étapes impliquées dans la récupération des enzymes. Le degré de pureté des enzymes commerciales va des enzymes brutes à des formes très purifiées et dépend de l'application.



**Figure 20: Procédure générale de production des enzymes industrielles (à gauche), analytique (Centre), et thérapeutique (à droite)**

## **2.1. Préparation des matières premières biologiques**

### **2.1.1. Organes animaux**

Les organes animaux doivent être transportés et stockés à basse température pour conserver l'activité enzymatique. Les organes doivent être débarrassés de la graisse et du tissu conjonctif avant de les geler. Les organes congelés peuvent être hachés avec des machines généralement utilisées dans l'industrie de la viande, et les enzymes peuvent être extraites avec une solution tampon. Outre le broyage mécanique, la digestion enzymatique peut également être utilisée. La graisse attachée aux organes interfère avec les étapes de purification ultérieures et peut être éliminée avec des solvants. Cependant, l'activité enzymatique pourrait être influencée négativement par cette procédure.

### **2.1.2. Matériel végétal**

Le matériel végétal peut être broyé avec différents concasseurs ou broyeurs, et les enzymes souhaitées peuvent être extraites avec des solutions tampons. Les cellules peuvent également être lysées par un traitement antérieur avec des enzymes lytiques.

### **2.1.3. Les microorganismes**

Les microorganismes sont une importante source d'enzymes. Un gène peut être transféré dans un microorganisme pour que cet organisme produise une protéine qu'il ne produit pas naturellement. Alternativement, la modification du génome d'un microorganisme peut modifier les propriétés des protéines afin qu'elles puissent être isolées et purifiées plus facilement. De telles modifications pourraient, par exemple, provoquer la libération d'enzymes intracellulaires dans le milieu externe ; modifier la charge nette et, par conséquent, les propriétés chromatographiques des protéines ; ou conduire à la formation de protéines fusionnées.

La plupart des enzymes utilisées dans le commerce sont des enzymes extracellulaires, et la première étape de leur l'isolement est la séparation des cellules de la solution. Pour les enzymes intracellulaires, qui sont aujourd'hui isolées en quantités croissantes, la première étape consiste à broyer pour rompre les cellules.

### 2.1.3.1. Avantages économiques

**La quantité d'enzyme produite et le temps de production favorise grandement l'utilisation de micro-organismes.** Par exemple, lors de la production de la présure (une enzyme de coagulation du lait utilisée dans la fabrication du fromage), l'approche traditionnelle consiste à utiliser l'enzyme extraite de l'estomac d'un veau (une jeune vache se nourrissant encore du lait de sa mère). La quantité moyenne de présure extraite de l'estomac d'un veau est de 10 kg, et il faut plusieurs mois d'élevage intensif pour produire un veau. En comparaison, un fermenteur de 1000 litres de *Bacillus subtilis* recombinant peut produire 20 kg d'enzyme en 12 h. Ainsi, le produit microbien est clairement préférable d'un point de vue économique et est **exempt des problèmes éthiques qui entourent l'utilisation des animaux.** En effet, la plupart des fromages actuellement vendus dans les supermarchés sont fabriqués à partir de lait coagulé avec des enzymes microbiennes (convient donc aux végétariens).

**Un autre avantage de l'utilisation d'enzymes microbiennes est leur facilité d'extraction.** De nombreuses enzymes microbiennes utilisées dans les processus biotechnologiques sont sécrétées de manière extracellulaire, ce qui simplifie grandement leur extraction et leur purification. **Les enzymes intracellulaires microbiennes sont également souvent plus faciles à obtenir que les enzymes animales ou végétales équivalentes,** car elles nécessitent généralement moins d'étapes d'extraction et de purification.

Les sources animales et végétales doivent généralement être transportées vers l'installation d'extraction, **alors que lorsque des micro-organismes sont utilisés, la même installation peut généralement être utilisée pour la production et l'extraction.** De plus, les enzymes animales et végétales commercialement importantes sont souvent situées dans un seul organe ou tissu, **de sorte que le matériau restant est essentiellement un déchet dont l'élimination est nécessaire.**

**Enfin, les enzymes d'origine végétale et animale présentent de grandes variations de rendement et peuvent n'être disponibles qu'à certaines périodes de l'année,** alors qu'aucun de ces problèmes n'est associé aux enzymes microbiennes.

#### 2.1.3.2. Avantages techniques

Les enzymes microbiennes ont souvent des propriétés qui les rendent plus aptes à une exploitation commerciale. Par rapport aux enzymes d'origine animale et végétale, **la stabilité des enzymes microbiennes est généralement élevée.** Par exemple, la stabilité à haute température des enzymes des microorganismes thermophiles est souvent utile lorsque le procédé doit fonctionner à des températures élevées (par exemple pendant le traitement de l'amidon).

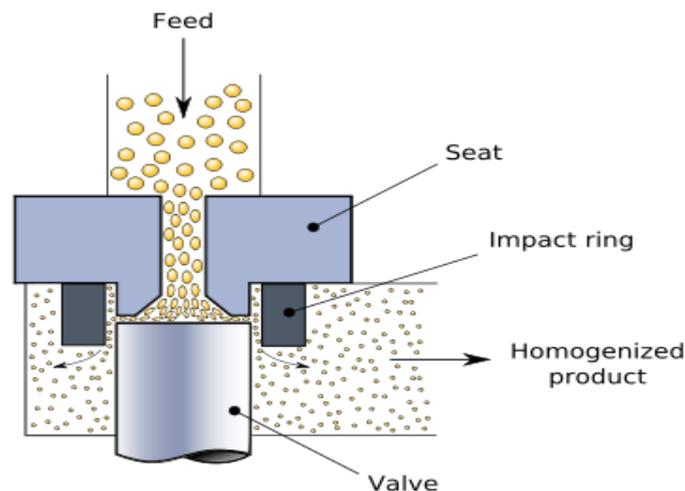
Les micro-organismes sont également très sensibles à la modification génétique pour produire des enzymes nouvelles ou modifiées, **en utilisant des méthodes relativement simples telles que l'insertion de plasmides.** La manipulation génétique des animaux et des plantes est techniquement beaucoup plus difficile, coûte plus cher et fait toujours l'objet de préoccupations éthiques importantes, en particulier au Royaume-Uni.

## 2.2. Rupture cellulaire

### 2.2.1. Rupture cellulaire par méthodes mécaniques

L'**homogénéisation à haute pression** est la méthode la plus courante de rupture cellulaire. La suspension cellulaire est pressée à travers une valve et heurte un anneau d'impact (par exemple, un homogénéisateur Manton-Gaulin) (Figure 21).

Les cellules sont rompues par les forces de cisaillement et la décompression simultanée. Selon le type de machine, sa capacité varie de 50 à 5000 L / h. Les parois cellulaires rigides des petites bactéries ne sont que partiellement rompues aux pressions jusqu'à 55 MPa (550 bars) atteintes par cette méthode.



**Figure 21 : Rupture mécanique cellulaire par homogénéisateur Manton-Gaulin**

Cependant, des pressions plus élevées entraîneraient une exposition supplémentaire à la chaleur ( $2,28^{\circ}\text{C}$  pour 10 MPa). Par conséquent, l'augmentation du rendement enzymatique résultant d'une rupture cellulaire améliorée pourrait être contrecarré par une inactivation partielle provoquée par le chauffage et des forces de cisaillement plus élevées. Par conséquent, **un refroidissement efficace doit être fourni.**

Le **broyage humide des cellules** dans un broyeur à billes à grande vitesse est une autre méthode efficace de rupture cellulaire (Figure 22). Des billes de verre d'un diamètre de

0,2 à 1 mm sont utilisées pour briser les cellules. Son contenant amovible est rempli de petites billes de verre sur lesquelles on verse la suspension de cellules. La suspension se répartit entre les billes. Il est important de remplir complètement le contenant et de ne pas y laisser d'air pour éviter de faire de la mousse et d'oxyder les protéines. Le tout est alors scellé et on lance la machine, qui fait furieusement tourbillonner les billes de verre dont l'action abrasive a tôt fait de réduire les cellules en charpie. Séparer les billes du lysat est très facile parce que les billes coulent au fond dès que l'agitation cesse. Compte tenu des paramètres optimaux tels que la vitesse d'agitation, le nombre et la taille des billes de verre, le débit, la concentration cellulaire et la température, une libération de protéines allant jusqu'à 90% peut être obtenue en un seul passage.

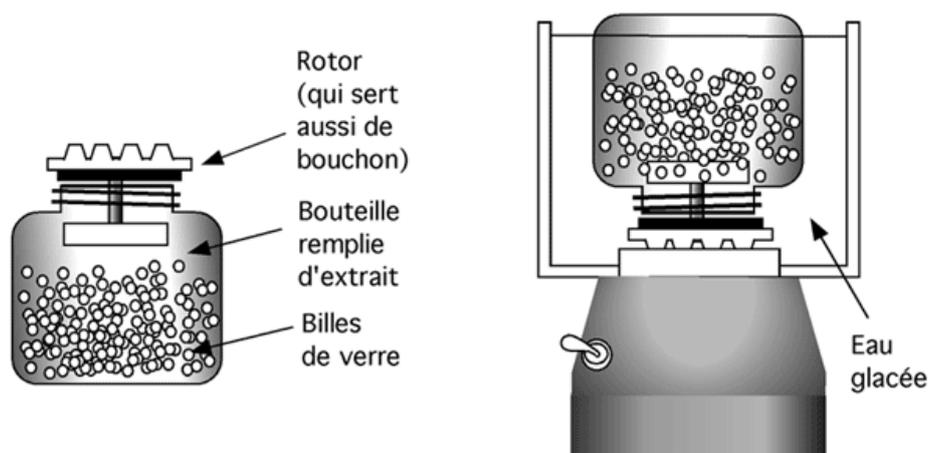


Figure 22: Schéma représentant l'appareil utilisé dans l'extraction par billes de verre

### 2.2.2. Rupture cellulaire par des méthodes non mécaniques

Les cellules peuvent fréquemment être rupturées par une **lyse chimique, thermique ou enzymatique**. Le **séchage des micro-organismes** et la préparation de poudres d'acétone sont des procédures standard dans lesquelles la structure de la paroi cellulaire est modifiée pour permettre l'extraction ultérieure du contenu cellulaire. **Les ultrasons à des fréquences déterminées** sont généralement utilisés en laboratoire, Dans cette procédure, les cellules sont rupturées par cavitation. **Une température optimale doit être maintenue en refroidissant la suspension cellulaire car la chaleur est générée dans**

le processus. Des problèmes supplémentaires peuvent résulter de la génération de radicaux libres. Des **méthodes basées sur des enzymes** ou une **autolyse** peuvent aussi être utilisées. Si la protéine est justement dans un compartiment cellulaire, on utilise généralement un détergent doux (Triton, Tween, etc., quelquefois déoxycholate) pour la libérer en dissolvant les membranes de ce compartiment. L'emploi de détergent doit souvent être fait de façon contrôlée car ils peuvent briser les lysosomes, ce qui libèrent des enzymes hydrolytiques (protéases, nucléases, etc) qui peuvent attaquer et détruire les enzymes ou autres molécules qu'on veut isoler. Des précautions particulières doivent être prises si on travaille avec des enzymes sensibles à la dégradation ou peu nombreuses. Certains tissus comme le pancréas et le foie sont reconnus pour contenir de grandes quantités de ces enzymes, ce qui pose tout un défi quand on travaille avec ces tissus. Une solution fréquente à ce problème est l'inclusion dans les solutions d'inhibiteurs de protéases qui sont soit physiologiques (inhibiteur de trypsine, antipaïne. leupeptine...) ou artificiels (E64, PMSF...). Pour maximiser leur action, on les emploie souvent en mélange ("cocktails") à large spectre d'action. Ensuite on utilise diverses techniques pour séparer l'enzyme recherchée de toutes les autres présentes.

### 2.3. Séparation de la matière solide

Après la rupture cellulaire, l'étape suivante est la séparation des enzymes extracellulaires ou intracellulaires des cellules ou des fragments cellulaires, respectivement. Cette opération est assez difficile en raison de la petite taille des cellules bactériennes et de la légère différence entre la densité des cellules et celle du milieu de fermentation. Les grandes cellules, par exemple les cellules de levure, peuvent être éliminées par **décantation**.

#### 2.3.1. Filtration

Le taux de filtration est fonction de la surface du filtre, de la pression, de la viscosité et de la résistance offertes par le filtre et le milieu de filtration. Pour un liquide propre, tous ces termes sont constants ce qui se traduit par un débit constant pour une perte de charge constante. Le volume cumulé de filtrat augmente linéairement avec le temps. Lors de la filtration des suspensions, l'épaisseur croissante du filtre de filtration formé et la résistance concomitante diminuent progressivement le débit. Des difficultés supplémentaires peuvent survenir en raison de la compressibilité du matériel biologique. Dans ce cas, la résistance offerte par le filtre et donc la vitesse de filtration dépendent de la pression appliquée. **Si la pression appliquée dépasse une certaine limite, le filtre peut s'effondrer et un blocage total du filtre peut en résulter.**

#### a) Filtres à pression

Un filtre-pressé (filtre à plaques, filtre à chambre) est utilisé pour filtrer les petits volumes ou pour éliminer les précipités formés lors de la purification (**Figure 23**). La capacité de retenir la matière solide est limitée et la méthode est plutôt exigeante en travail. Cependant, ces filtres conviennent parfaitement à la filtration fine de solutions enzymatiques.

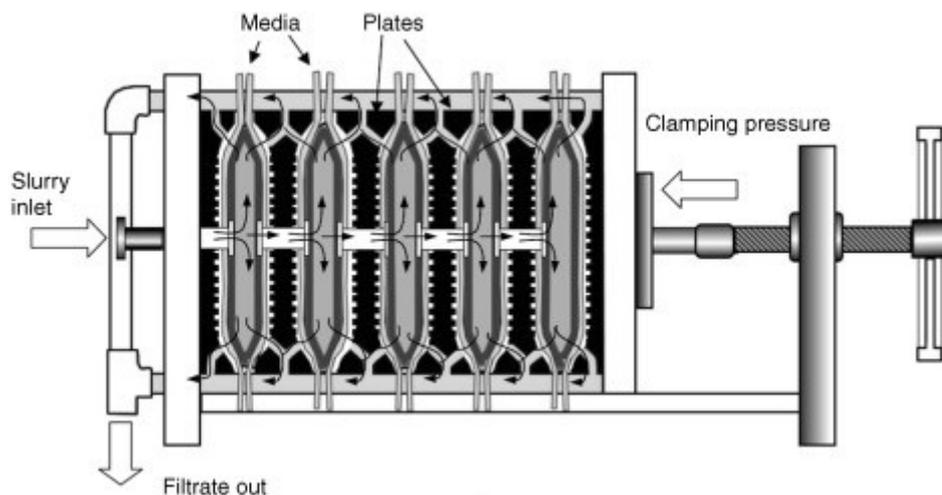
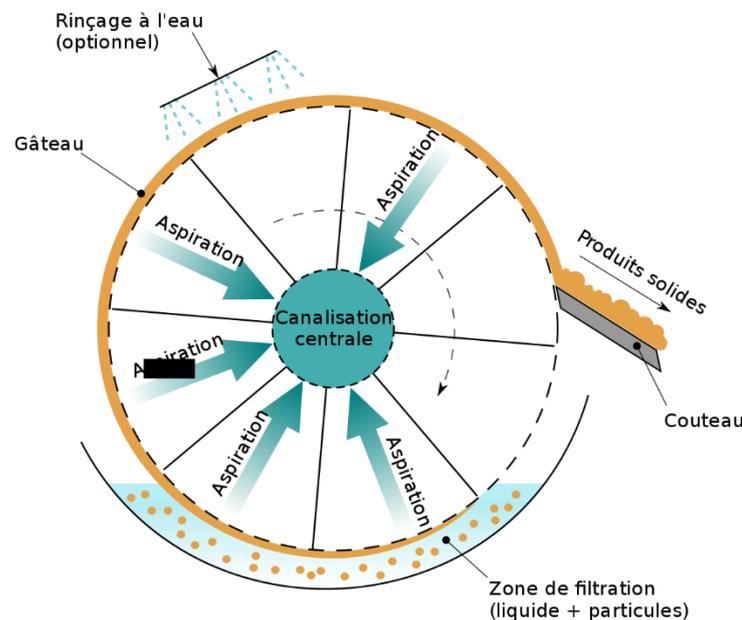


Figure 23: Représentation schématique d'un filtre à plaques

**b) Filtres à vide**

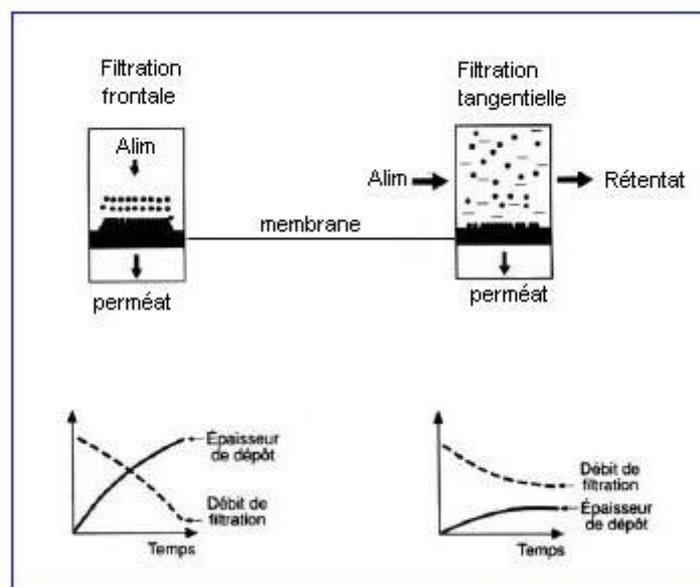
La filtration sous vide est généralement la méthode de choix car les matériaux biologiques sont facilement compressibles. Un filtre à vide rotatif (**Figure 24**) est utilisé dans la filtration continue de grands volumes. La suspension est généralement mélangée avec un adjuvant de filtration, par exemple du kieselguhr (une roche sédimentaire siliceuse), avant d'être appliquée au filtre. Le tambour de filtre est recouvert d'une mince couche d'adjuvant de filtration (pré-couche). Le tambour est divisé en différentes sections afin que le filtre puisse également être lavé et séché. La couche externe est ensuite éliminée en utilisant une série de fils sans fin ou par une décharge par raclage (couteau). L'enlèvement d'une mince couche de pré-couche expose à chaque fois une nouvelle zone de filtrage. **Ce système est utile pour éviter une augmentation de la résistance avec l'accumulation des débris sur le filtre au cours de la filtration.**



**Figure 24: Représentation schématique d'un Filtres à vide**

### c) Filtration à flux croisé

Dans les méthodes conventionnelles, la suspension s'écoule perpendiculairement au matériel filtrant (**Figure 25** à gauche). En filtration tangentielle, le flux entrant s'écoule parallèlement à la zone du filtre (**Figure 25** à droite), évitant ainsi l'accumulation des débris de filtration et la résistance accrue à la filtration. Pour maintenir un débit de filtration suffisamment élevé, cette méthode doit consommer une quantité d'énergie relativement importante, sous la forme des débits élevés sur les membranes. Avec les membranes maintenant disponibles, des taux de perméat de 30–50 L/m<sup>2</sup>/h peuvent être atteints.



**Figure 25: Différence entre filtration frontale et filtration tangentielle**

#### 2.3.2. Centrifugation

La vitesse de sédimentation d'une cellule bactérienne d'un diamètre de 0,5  $\mu\text{m}$  est inférieure à 1 mm/h. Une séparation économique ne peut être obtenue que par sédimentation dans un champ centrifuge. La gamme d'applications des centrifugeuses dépend de la taille des particules et de la teneur en solides (tableau 4).

Tableau 4: Différents type de centrifuge utilisés lors de l'extraction des enzymes

Type of centrifuge	Solids content, %	Particle size, $\mu\text{m}$
Multichamber separator	0–5	0.5–500
Desludging disk separator	3–10	0.5–500
Nozzle separator	5–25	0.5–500
Decanter	5–40	5–50 000
Sieve centrifuge	5–60	5–10 000
Pusher centrifuge	20–75	100–50 000

### a) Décanteurs (centrifugeuses à spirales)

Appelée aussi tamiseur centrifuge, elles fonctionnent avec de faibles forces centrifuges et sont utilisés dans la séparation de grosses cellules ou la précipitation des protéines. La matière solide est déchargée en continu par un transporteur à vis se déplaçant à une vitesse de rotation différentielle (Figure 26).

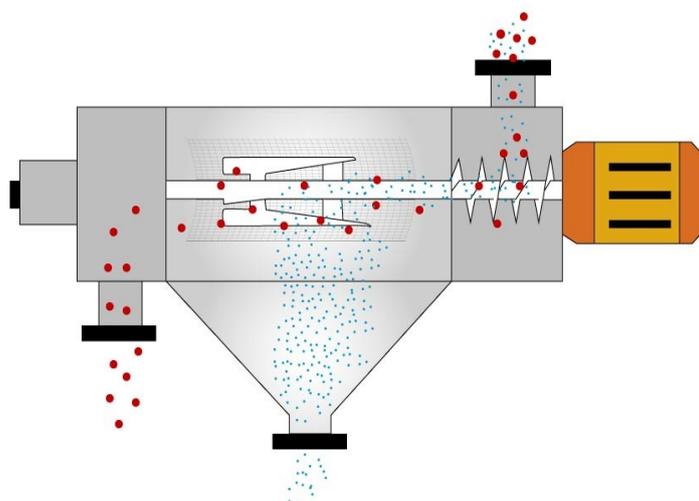


Figure 26: Représentation schématique d'un Décanteurs (centrifugeuses à spirales)

### b) Centrifugeuses à bol tubulaire

Elles sont conçues pour des forces centrifuges très élevées et peuvent être utilisées pour sédimenter de très petites particules. Cependant, ces centrifugeuses ne peuvent pas être utilisées un processus continu. De plus, les matières solides doivent être éliminées à la

main périodiquement. Elles sont particulièrement adaptées à la séparation de deux phases liquides, ou à la clarification d'une phase liquide peu chargée en particules. Elles trouvent des applications dans le raffinage de l'huile végétale (séparation des savons), et dans la clarification des liquides (industrie pharmaceutique, chimique et alimentaire). Le flux de fluide entrant et sortant de la centrifugeuse est continu. La phase la plus lourde se décharge par la sortie gauche et le fluide plus léger se décharge par la sortie droite (Figure 27).

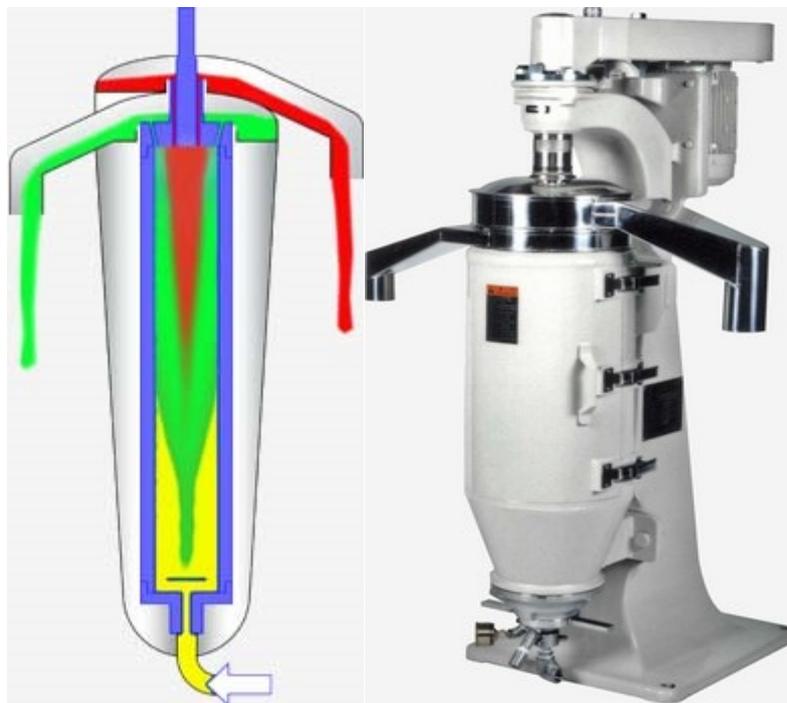


Figure 27: Représentation schématique d'une centrifugeuse à bol tubulaire

### c) Séparateurs (centrifugeuses à disques)

Elles sont aussi appelées décanteur à assiettes et peuvent être utilisés dans l'élimination continue des solides d'une suspension. Les solides sont évacués par un port de décharge à commande hydraulique (décharge intermittente) ou par un agencement de buses (décharge continue). Les bactéries et les fragments cellulaires peuvent être séparés par une combinaison de forces, jusqu'à 15 000 gravimétries. Des centrifugeuses à

empilement de disques qui peuvent être stérilisées à la vapeur sont utilisées pour l'ADN recombinant techniques en système fermé (Figure 28).

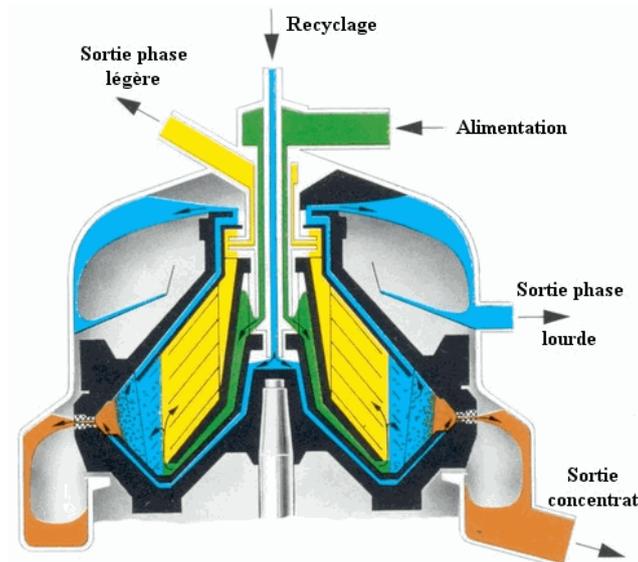
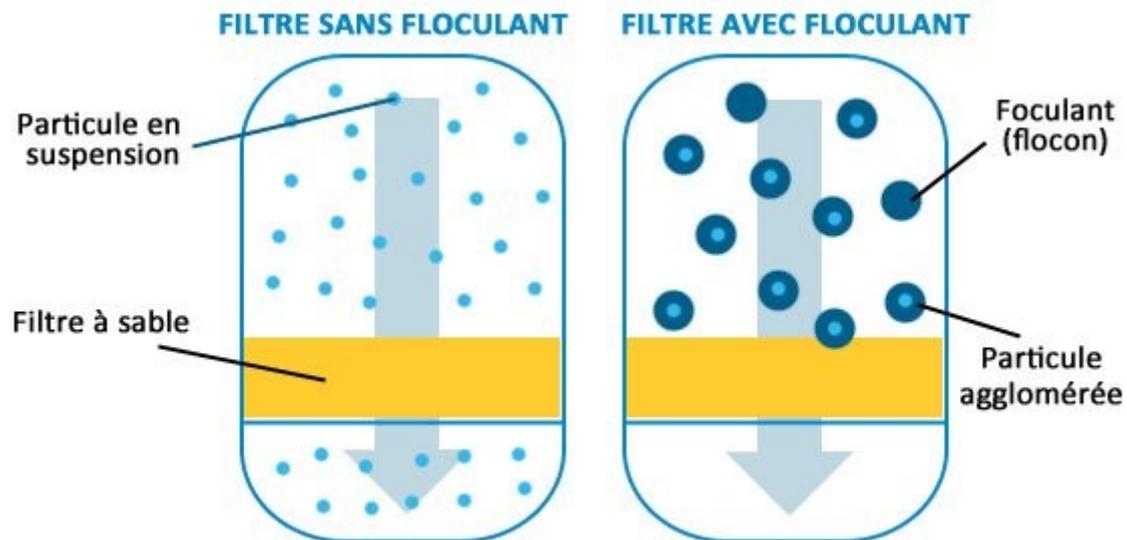


Figure 28: Représentation schématique d'un séparateur (décanteur à assiettes)

### 2.3.3. Flocculation

La séparation des cellules bactériennes ou des débris cellulaires par filtration ou centrifugation peuvent entraîner des difficultés considérables en raison de leur petite taille et de leurs propriétés physiques (Figure 29). La nature compressible des cellules est le principal facteur limitant pour l'utilisation de la filtration comme étape de séparation pour les supprimer. La faible perméabilité d'un culot cellulaire typique se traduit par un débit de filtration souvent trop lent pour être pratique. **En élimination cellulaire par centrifugation, la petite taille et la faible différence de densité entre les cellules ou les débris cellulaires entraîne une faible vitesse de sédimentation.** La flocculation des suspensions cellulaires a été rapportés pour faciliter la séparation des cellules à la fois par filtration et centrifugation.

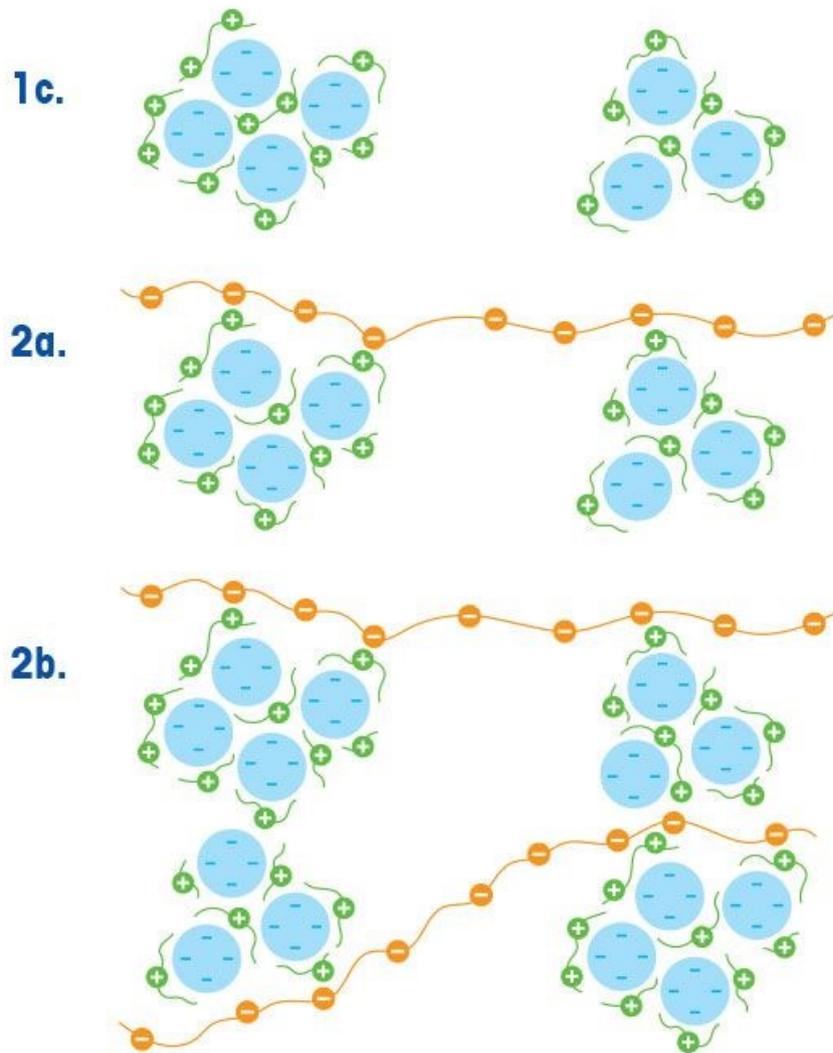
La floculation est le processus par lequel des particules déstabilisées sont amenées à venir ensemble, établir un contact et former ensuite des agrégats plus gros (Figure 30).



**Figure 29: Filtration avec et sans floculation**

Les agents floculants sont des additifs capables d'augmenter le degré de floculation d'une suspension. Ils peuvent être organique ou inorganique, et naturel ou synthétique. Les floculants organiques synthétiques sont de loin les agents les plus couramment utilisés pour la floculation cellulaire dans les procédés industriels. Il s'agit généralement de substances polymères chargées, solubles dans l'eau, d'un poids moléculaire moyen allant d'environ 103 à supérieur à 5106 Kda et sont généralement appelés polyélectrolytes et peuvent être chargé positivement ou négativement et sont appelés polyélectrolytes cationiques (polyéthylèneimine et polyvinyleamine) et anioniques (poly (acide acrylique), pectines et alginates), respectivement. Les polyélectrolytes contenant à la fois des charges positives et négatives sont appelés polyampholytes (polybétaines). La floculation des débris cellules par les polyélectrolytes est un processus en deux étapes. La première étape est la neutralisation de la charge de surface sur les cellules en suspension ou les débris cellulaires. La seconde étape implique la liaison de ces particules

de gros agrégats. Dans certains cas, la floculation peut également fournir une purification en éliminant sélectivement les protéines indésirables, les acides nucléiques, les lipides et l'endotoxine du bouillon cellulaire.



**Figure 30: Floculation par un mélange de polyelectrolyte cationique et anionique**

#### 2.3.4. Extraction liquide-liquide

Les extractions liquide-liquide (LLE) constituent une alternative de purification intéressante. L'extraction liquide-liquide est le transfert de certains composants d'une phase à une autre lorsque des phases liquides non miscibles ou partiellement solubles sont mises en contact les unes avec les autres. Ce procédé est largement utilisé dans l'industrie chimique en raison de sa simplicité, de ses faibles coûts et de sa facilité de

mise à l'échelle. C'est une méthode utilisée pour isoler les enzymes intracellulaires dans un système aqueux à deux phases. Cette méthode est basée sur le mélange de différents polymères, par exemple le dextrane (phase inférieure) et le poly (éthylène glycol) (phase supérieure), ou un polymère et un sel (phosphate potassium/phosphate sodium) en solution aqueuse, à une certaine concentration les deux polymères vont constituer deux phases aqueuses non miscibles **séparant ainsi les molécules selon leurs coefficients de partage.**

On peut chimiquement modifier l'un des polymères en attachant un ligand pour lequel des récepteurs existent sur le matériau d'intérêt. Dans le dernier cas, la procédure qui en résulte est appelée **partitionnement par affinité**. Le partage d'affinité (AP) est basé sur l'interaction préférentielle / biospécifique entre la molécule et les ligands d'affinité. L'interaction aboutit à un complexe de ligand d'affinité biomolécule qui se répartit sélectivement en l'une des phases laissant les substances ou protéines contaminantes dans l'autre phase. On peut atteindre une pureté de 90% par cette méthode.

## 2.4. Concentration

La concentration enzymatique dans le matériau de départ est souvent très faible. Le volume de matériau à traiter est généralement très important et des quantités importantes de déchets doivent être éliminées. Ainsi, si l'épuration économique doit être réalisée, le volume de départ de la matière doit être diminuée par concentration. Seules des procédures de concentration modérée qui n'inactivent pas les enzymes peuvent être utilisées. Celles-ci comprennent les méthodes thermiques, la précipitation et, de plus en plus, la filtration sur membrane.

### 2.4.1. Méthodes thermiques

Seul un bref traitement thermique peut être utilisé pour la concentration car les enzymes sont thermolabiles. Des évaporateurs avec des composants rotatifs qui produisent un film

liquide mince (évaporateur à couche mince, évaporateur centrifuge à couche mince) ou des évaporateurs à circulation (évaporateur à tube long) peuvent être utilisés.

### 2.4.2. Précipitation

Les enzymes sont des protéines très complexes possédant à la fois des groupes ionisables et hydrophobes qui interagissent avec le solvant. En effet, les protéines peuvent être amenées à s'agglomérer et, finalement, à précipiter en modifiant leur environnement. La précipitation est en fait une procédure simple pour concentrer les enzymes.

#### a) Précipitations avec des sels

Des concentrations élevées de sel agissent sur les molécules d'eau entourant la protéine et modifient les forces électrostatiques responsables de la solubilité. Le sulfate d'ammonium est couramment utilisé pour la précipitation ; par conséquent, c'est un agent efficace pour concentrer les enzymes. Les enzymes peuvent également être fractionnées, dans une mesure limitée, en utilisant différentes concentrations de sulfate d'ammonium. **La corrosion de l'acier inoxydable et du ciment par le sulfate d'ammonium est un inconvénient, qui pose des problèmes supplémentaires dans le traitement.** Le sulfate de sodium est plus efficace de ce point de vue, mais il est moins soluble et doit être utilisé à des températures de 35–40 °C. La concentration optimale de sel nécessaire à la précipitation doit être déterminée expérimentalement et varie généralement de 20 à 80% de saturation.

#### b) Précipitation avec des solvants organiques

Les solvants organiques influencent la solubilité des enzymes en réduisant la constante diélectrique du milieu. L'effet de solvation des molécules d'eau entourant l'enzyme est modifié ; l'interaction des molécules de protéines est augmentée ; et par conséquent, une

agglomération et une précipitation se produisent. Les solvants couramment utilisés sont l'éthanol et l'acétone. Des résultats satisfaisants ne sont obtenus que si la concentration de solvant et la température sont soigneusement contrôlées car les enzymes peuvent être facilement inactivées par des solvants organiques.

### c) Précipitations avec des polymères

Les polymères généralement utilisés sont les polyéthylèneimines et poly (éthylène glycols) de différentes masses moléculaires. Le mécanisme de cette précipitation est similaire à celui des solvants organiques et résulte d'une modification de l'effet de solvation des molécules d'eau entourant l'enzyme. La plupart des enzymes précipitent au polymère à des concentrations allant de 15 à 20%.

### d) Précipitation au point isoélectrique

Les protéines sont des ampholytes et portent à la fois des groupes acides et basiques. La solubilité des protéines est fortement influencée par le pH et est minimale au point isoélectrique auquel la charge nette est nulle. Parce que la plupart des protéines ont des points isoélectriques dans la gamme acide, ce processus est également appelé précipitation acide. Les précipitations sont généralement effectuées à petite échelle. Des problèmes peuvent survenir lors de l'extension de ce processus. Le temps de mélange, le temps de séjour dans le réacteur (qui affecte la formation d'agglomérats et l'activité enzymatique) et les forces de cisaillement générées par l'agitation (qui affecte les agrégats formés) sont des paramètres critiques. Lorsque le volume en cours de traitement est important, le temps de mélange est suffisamment long et, en particulier avec des solvants organiques, une dénaturation des protéines peut se produire. Des expériences ont été menées pour surmonter les difficultés de ce type en utilisant un processus continu.

### 2.4.3. Ultrafiltration

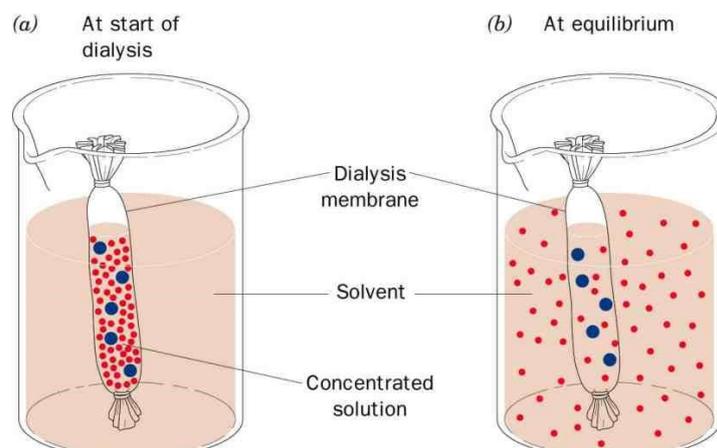
Une membrane semi-perméable permet la séparation des molécules de solvant des molécules d'enzyme plus grosses car seules les molécules plus petites peuvent pénétrer dans la membrane lorsque la pression osmotique est dépassée. C'est le principe de tous les procédés de séparation membranaire, y compris l'ultrafiltration. L'ultrafiltration et la filtration à flux transversal sont basées uniquement sur l'effet tamisage. Dans le traitement des enzymes, la filtration à flux transversal est utilisée pour récolter les cellules, tandis que l'ultrafiltration est utilisée pour la concentration et le dessalage. Les membranes disponibles pour l'ultrafiltration peuvent exclure des molécules allant de 1000 to 300 000 dalton.

La membrane semi-perméable exclut les molécules plus grosses, qui ont tendance à s'accumuler près de la surface de la membrane. En raison des différents taux de diffusion de molécules de différentes tailles, la capacité de séparation de la membrane change. Ainsi, la membrane retient les petites molécules plus fortement que ce que l'on pourrait attendre de sa porosité. Cet effet limite l'applicabilité de la séparation membranaire. La formation de couches de gel sur la membrane est réduite en maintenant un écoulement turbulent ou un écoulement laminaire à haut débit. La perte de perméabilité est également causée par un encrassement de la membrane ou un dépôt sur la membrane. En particulier, des agents anti-mousses issus de solutions de fermentation se déposent sur la membrane et rendent la concentration des enzymes plus difficile.

#### 2.4.4. Dialyse

La solution contenant l'enzyme d'intérêt doit être traitée avant que les étapes de purification ne soient possibles. Les enzymes peuvent être séparées des petites molécules en profitant de la plus grande taille des enzymes par rapport aux autres molécules (Figure 31). La dialyse à travers une membrane semi-perméable (SEM), telle qu'une membrane de cellulose avec des pores bien définis est souvent réalisée pour séparer une protéine de

choix des autres contaminants. La solution de protéines partiellement purifiée est placée dans un sac de dialyse et le sac est suspendu dans un volume beaucoup plus grand de tampon de force ionique appropriée. Les molécules de protéines ayant des dimensions nettement supérieures au diamètre des pores du sac de dialyse sont retenues, alors que les plus petites molécules et les ions traversent les pores de ces membranes et émergent dans le dialysat à l'extérieur du sac. Cette technique est utile pour enlever un sel ou d'autres petites molécules, mais elle ne fait pas la distinction entre les différentes protéines efficacement. Des sacs de dialyse de poids moléculaire défini sont souvent utilisés pour purifier des protéines de taille définie. Par exemple, un sac de dialyse ayant un poids moléculaire de 12 000 peut être utilisé en toute sécurité pour purifier des protéines ayant poids de ~ 20 000 mais ne peut pas convenir aux protéines avec un poids moléculaire de 10 000. Souvent, entre les différentes étapes de purification, il faut éliminer les sels ou produits utilisés dans ces méthodes, on utilise alors une dialyse ou une ultrafiltration.



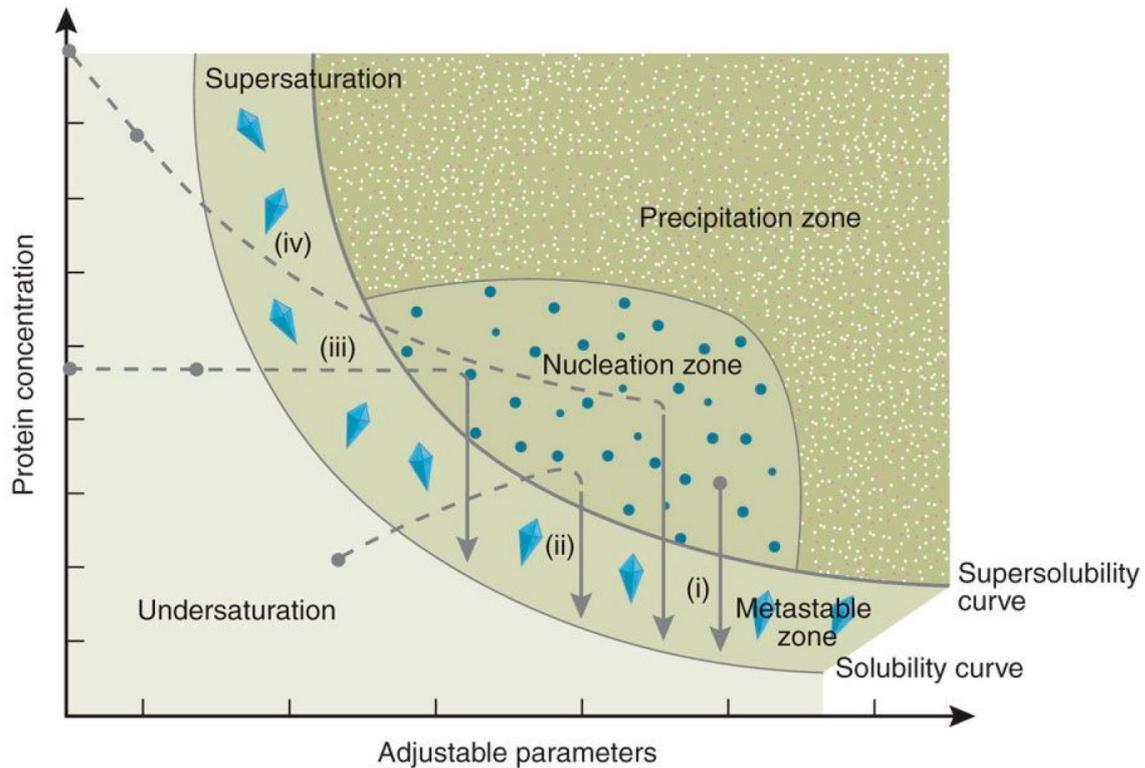
**Figure 31: Procédure de dialyse**

## 2.5. Purification

Pour de nombreuses applications industrielles, des préparations enzymatiques partiellement purifiées suffiront ; cependant, les enzymes à des fins diagnostique et à usage médical doivent être hautement purifiées. Les procédures spéciales utilisées pour la purification enzymatique sont la cristallisation, l'électrophorèse et la chromatographie.

### 2.5.1. La cristallisation

La cristallisation est une technique de purification qui peut être utilisée pour concentrer et dessaler les protéines de la même manière que la précipitation. La cristallisation des protéines est une technologie de séparation puissante car elle concentre, purifie et stabilise simultanément le produit. La cristallisation est une précipitation contrôlée à partir d'une solution aqueuse avec quatre variables principales qui contrôlent la morphologie et la récupération des cristaux : la concentration en protéines, la concentration en précipitant (Sels, tampons, Poly (Ethylène) glycol, et des solvants), le pH et la température. Elle est similaire à la précipitation en ce que des particules solides sont formées à partir d'une solution. Cependant, les précipités ont une morphologie mal définie et sont caractérisés par une petite taille des particules, tandis que les cristaux sont très ordonnés avec des tailles de particules généralement plus grandes pour la cristallisation (**Figure 32**). Plusieurs protéines ont été cristallisées à des concentrations entre 0.5 et 50 mg/ml. Les grandes molécules nécessitent moins de concentrations alors que pour les plus petites molécules de plus grandes concentrations sont demandées pour la cristallisation.



**Figure 32: Domaine de cristallisation des enzymes**

### 2.5.2. Électrophorèse

L'électrophorèse est une technique de séparation utilisant la migration des molécules chargées dans un champ électrique. Les protéines possédant de nombreux groupements ionisables et sont des molécules amphotères dont la charge dépend du pH du milieu ainsi que de leur propre pHi.

Si  $\text{pH} < \text{pHi}$  la charge nette est positive

Si  $\text{pH} = \text{pHi}$  la charge nette est neutre

Si  $\text{pH} > \text{pHi}$  la charge nette est négative

Cette technique est utilisée pour purifier les enzymes au niveau des laboratoires. Selon les conditions, les procédures suivantes peuvent être utilisées : électrophorèse de zone, la focalisation isoélectrique (IEF), SDS-PAGE. La chaleur générée par l'électrophorèse et

les interférences causées par la convection sont des problèmes associés à l'application de cette méthode à l'échelle industriel.

### 2.5.3. Chromatographie

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique, qui sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

La classification des chromatographies peut se faire en fonction des **mécanismes de séparation**. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : **la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers**. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique.

#### a) Chromatographie par échange d'ions

Cette technique est souvent efficace au cours des **premières étapes du processus de purification**.

La solution protéique est ajoutée à une colonne contenant un polymère insoluble (par exemple de la cellulose) qui a été modifié afin que ses caractéristiques ioniques déterminent le type d'ion mobile (c'est-à-dire cation ou anion) qu'il attire. Les protéines dont la charge nette est opposée à celle du matériau échangeur d'ions s'y lieront, tandis que toutes les autres protéines passeront à travers la colonne (Figure 33). Un changement ultérieur de pH ou l'introduction

d'une solution saline modifiera les forces électrostatiques, permettant à la protéine retenue d'être à nouveau récupérée (Elution).

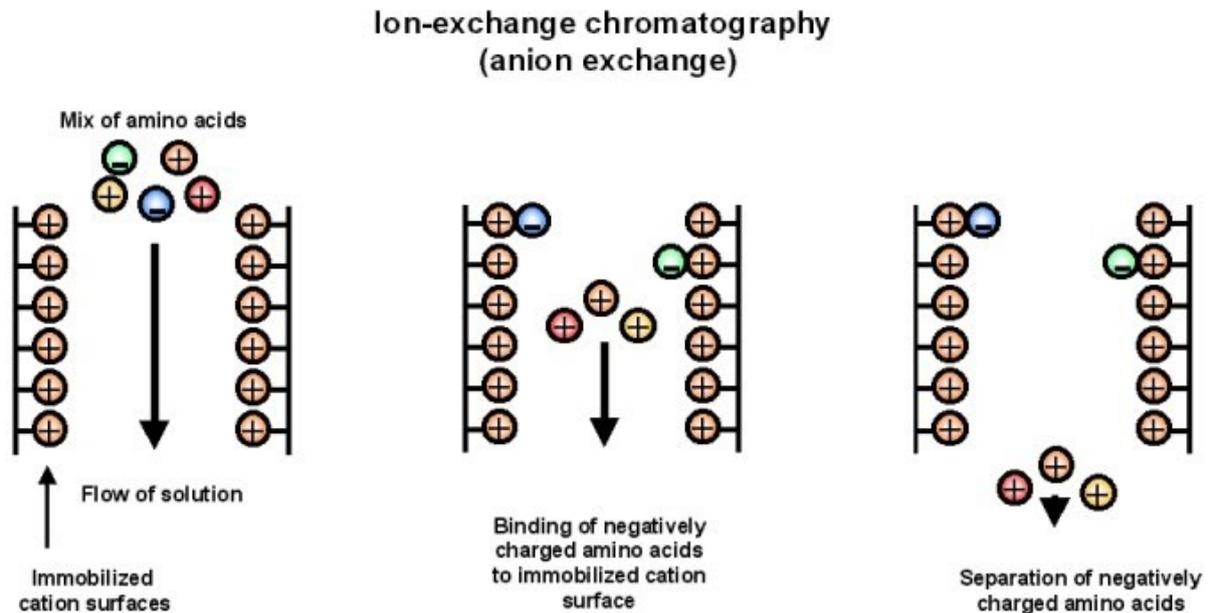


Figure 33: Chromatographie échangeuse d'ions

#### b) Filtration sur gel

Cette méthode peut être utilisée dans les étapes ultérieures d'un protocole de purification pour séparer les molécules sur la base de la taille moléculaire. Les colonnes contenant un lit de particules de gel réticulées tels que Sephadex sont utilisés. Ces particules de gel excluent les grosses molécules de protéines tout en permettant l'entrée de molécules plus petites. La séparation se produit parce que les molécules de protéines plus grosses suivent un chemin le long de la colonne entre les particules de Sephadex (occupant une plus petite fraction du volume de la colonne) (Figure 34). Les molécules plus grosses ont donc un temps d'élution plus court et sont d'abord récupérées à partir de la colonne de filtration sur gel.

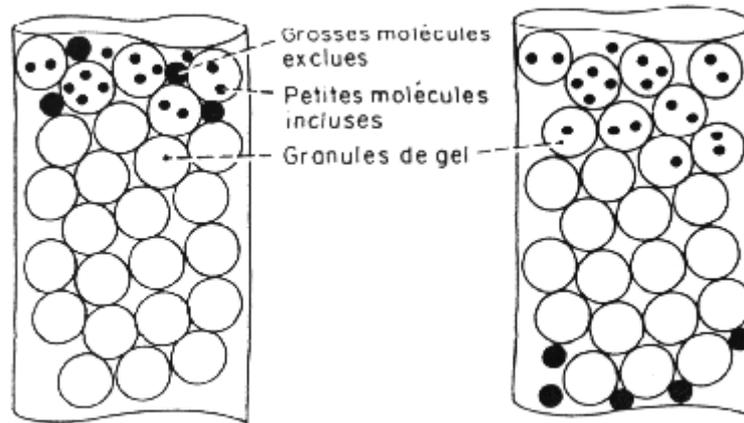
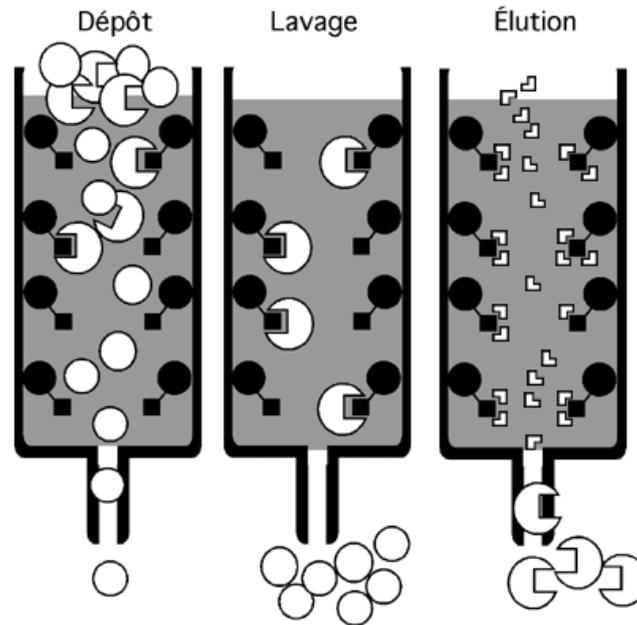


Schéma du tamisage moléculaire.

**Figure 34: Chromatographie d'exclusion stérique**

### c) Chromatographie d'affinité

Ces procédures peuvent souvent permettre aux protocoles de purification d'être considérablement simplifiés. Typiquement, en ce qui concerne la purification enzymatique, une colonne serait remplie d'une phase stationnaire particulière à laquelle une molécule de ligand telle qu'un analogue de substrat, un inhibiteur ou un cofacteur de l'enzyme d'intérêt serait fermement liée. Comme le mélange d'échantillon est passé à travers la colonne, l'enzyme interagit avec et se lie au ligand immobilisé, étant retenu dans la colonne lorsque tous les autres composants du mélange passent à travers la colonne (Figure 35). Par la suite, une solution du ligand est introduite dans la colonne pour libérer (éluer) et ainsi récupérer l'enzyme liée de la colonne sous une forme hautement purifiée.



**Figure 35: Chromatographie d'affinité**

Il existe de nombreuses procédures alternatives de chromatographie d'affinité capables de séparer les enzymes en se liant à des zones de la molécule loin de leur site actif. Les progrès de la biologie moléculaire nous permettent de purifier des protéines recombinantes, y compris des enzymes, grâce à un **marquage d'affinité**. Dans une approche typique, le gène de l'enzyme d'intérêt serait modifié pour coder pour une autre séquence d'acides aminés courte au N- ou C- terminal.

Par exemple, une procédure de marquage à la polyhistidine est disponible pour donner des produits protéiques avec six résidus histidine consécutifs ou plus à leur extrémité N- ou C- terminale. Lorsqu'un mélange contenant la protéine d'intérêt marquée est ensuite passé à travers une colonne contenant une résine d'agarose d'acide **nickel-nitrilo-triacétique** (Ni-NTA), les résidus d'histidine sur la protéine recombinante se lient aux ions nickel attachés à la résine de support, en retenant la protéine, tandis que d'autres composants protéiques et non protéiques traversent la colonne. L'éluion de la protéine

liée peut alors être accomplie en ajoutant de l'imidazole à la colonne, ou en réduisant le pH à 5-6 pour déplacer la protéine marquée His des ions nickel.

De telles techniques sont donc capables d'isoler rapidement et très efficacement une enzyme à partir d'un mélange complexe en une seule étape, et fournissent typiquement des puretés de protéines allant jusqu'à 95%.

## 2.6. Formulation du produit

Les enzymes sont vendues sous forme de concentrés liquides stabilisés ou sous forme de particules solides. La formulation doit minimiser les pertes d'activité enzymatique pendant le transport, le stockage et l'utilisation. Les enzymes sont souvent exposées à des environnements humides, chauds ou oxydants dans les applications industrielles telles que les détergents, les textiles, les aliments et les boissons. Les formulations améliorent la stabilité en neutralisant les principales forces de désactivation : dénaturation, désactivation du site catalytique et protéolyse.

Une préparation enzymatique doit être formulée en fonction de son application. À des fins d'analyse, il doit être facile à pipeter et - si possible - exempt de stabilisants et de conservateurs qui pourraient altérer sa fonction. Par exemple, la glutamate déshydrogénase (E.C. 1.4.1.3) ne doit contenir aucune trace d'ammoniac s'il doit être utilisé pour le dosage enzymatique de l'urée ou de l'ammonium.

Dans les kits de réactifs utilisés pour l'analyse enzymatique dans les laboratoires cliniques ou pour l'analyse alimentaire, l'enzyme peut être utilisée de préférence sous forme lyophilisée. Comparé aux solutions enzymatiques, le matériau solide est dans certains cas plus facile à mélanger avec d'autres composants solides et stable pendant une période de temps plus longue, même à une température légèrement élevée.

### 2.6.1. La stabilité

Un facteur très important dans l'application des enzymes est leur stabilité sous forme concentrée ou diluée et après mélange avec d'autres substances. Cela s'applique à la fabrication de produits à des fins pharmaceutiques, de chimie alimentaire ou d'analyse enzymatique. Certains enzymes peuvent être stabilisés en ajoutant du glycérol (50% en volume), du sulfate d'ammonium (environ 3,2 mol / L) ou du chlorure de sodium (3 mol / L) à leur solution aqueuse. De plus, de nombreuses enzymes peuvent être conservées sous forme lyophilisée pendant une longue période de temps en présence de stabilisants tels que des sels, des conservateurs, des protéines inertes (principalement de l'albumine sérique bovine) ou des glucides.

La plupart des enzymes utilisées dans l'analyse sont stockées à env. 4 °C ; les solutions d'endonucléases de restriction doivent être maintenues à -20 °C ou moins pour maintenir l'activité catalytique. Pour éviter la dégradation par l'humidité, la préparation enzymatique réfrigérée doit être réchauffée avant ouverture. **La congélation et la décongélation peuvent, dans certains cas, altérer l'activité des enzymes.**

En particulier pour les applications dans des kits de test commerciaux, certaines enzymes sont modifiées par immobilisation, par exemple par réticulation covalente avec des biopolymères comme la cellulose ou le dextrane. Cela améliore la stabilité des solutions et / ou la résistance à la chaleur.

### 2.6.2. Emballage

Une sélection rigoureuse des matériaux d'emballage est très importante pour la manipulation des enzymes. Les bouteilles et les bouchons utilisés pour les enzymes lyophilisées doivent être absolument étanches pour empêcher l'accès à l'humidité. Des bouteilles en verre ou en plastique ainsi que bouchons (caoutchouc ou plastique) ne doit libérer aucune trace de métaux lourds ou d'autres substances inactivant les enzymes dans

la solution ou suspension enzymatique. Dans certains cas, les enzymes doivent être protégées de la lumière et conditionnées dans des bouteilles en verre brun.

### **2.7. Traitement des déchets**

En raison de la concentration généralement faible d'enzyme dans la matière de départ, le volume de matière à traiter est important et des quantités substantielles de déchets sont accumulées. Le milieu de fermentation épuisé peut encore contenir de grandes quantités de nutriments. Cependant, le recyclage n'est généralement pas possible en raison de la présence de métabolites dans le milieu. Les restes d'organes solides et mycélium, qui sont utilisés comme aliments pour animaux, peuvent être séparés. Ces derniers doivent être soigneusement vérifiés pour la présence des métabolites indésirables, comme des antibiotiques, avant d'être donnés aux animaux.

Dans les techniques de l'ADN recombinant, la nécessité de maintenir un confinement absolu est de grande préoccupation. Les déchets doivent être inactivés chimiquement ou thermiquement avant leur élimination, pour s'assurer qu'aucun organisme vivant ne s'échappe dans l'environnement.

## **3. Contrôle de l'activité enzymatique**

La qualité des préparations enzymatiques est caractérisée par l'activité, la pureté, la stabilité, la formulation et le conditionnement. Ces paramètres dépendent les uns des autres, mais la formulation et le conditionnement sont faciles à contrôler et à maintenir constants. Les autres paramètres s'influencent mutuellement de manière à ce que la qualité soit considérée comme fonction de l'activité, pureté et stabilité

Après chaque étape de concentration ou de purification l'activité enzymatique est calculée pour vérifier l'efficacité des méthodes utilisées.

### 3.1. Unités Enzymatiques

Il est difficile de mesurer la quantité d'enzyme en unités de masse ou de concentration molaire ; l'activité enzymatique est définie en termes de vitesse de réaction.

L'Unité International (I.U.) est la quantité d'enzyme requise pour convertir 1  $\mu\text{mol}$  de substrat en produit en 1 min à une température et pH spécifiés (ex. pH 7.0 et 25°C) et sous des conditions de saturation du substrat :

$$\text{I.U.} = 1\text{-}\mu\text{mol substrat consommé/min}$$

Le katal (kat) est l'unité d'activité catalytique. C'est la quantité d'enzyme qui transforme 1 mole de substrat par seconde. C'est l'unité la plus cohérente avec le système International mais pas trop utilisée.

Il existe une relation entre l'IU et le katal :

$$1 \text{ IU} = 1 \mu\text{mol/min} = 16,69 \text{ nmol/s} = 16,67 \text{ nkat}$$

L'activité spécifique d'une enzyme est l'activité catalytique par unité de masse de protéine (I.U./mg d'enzyme solide mesurée expérimentalement)

Le taux de roulement (« turnover number » en anglais) exprime l'activité catalytique en terme d'unités par mol d'enzyme pure (au lieu de mg de protéine).

Le taux de purification d'une enzyme est le rapport de l'AS mesurée après une étape de purification, sur l'AS mesurée à l'étape précédente.

Le rendement correspond à un nombre d'UE mesuré après une étape de purification, sur un nombre d'UE mesuré à l'étape précédente

### 3.2. Quantification des protéines

La teneur en protéines étant le point de référence le plus important pour la détermination de l'activité spécifique d'une préparation enzymatique, plusieurs méthodes de détermination des protéines sont brièvement décrites dans les paragraphes suivants. Toutes ces procédures sont basées sur des principes différents et dépendent de la composition en acides aminés des protéines enzymatiques, ils donneront donc des valeurs différentes.

#### 3.2.1. Absorption ultraviolette

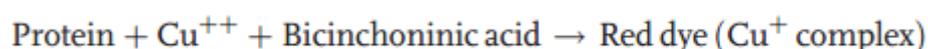
En raison de leur teneur en acides aminés aromatiques, les protéines présentent un maximum d'absorption à 270–280 nm. Pour de nombreuses protéines pures, référence des valeurs ont été établies pour l'absorbance à 280 nm d'une solution contenant 10 mg/mL ( $A_{1\ 280\%}$ ). WARBURG et CHRISTIAN ont trouvé une formule qui prend en compte la teneur en acide nucléique. Pour une plus grande précision, l'absorbance est également mesurée à des longueurs d'onde plus basses, par exemple 235 nm.

#### 3.2.2. Méthode de Biuret

La réaction des liaisons peptidiques avec les ions cuivre dans une solution donne un complexe violet qui peut être déterminé par photométrie. L'intensité est une fonction linéaire de la concentration protéique.

#### 3.2.3. Méthode BCA

La méthode BCA de la société Pierce est utilisée pour de nombreuses protéines échantillons. Il combine la méthode biuret avec les caractéristiques de BCA :



Le complexe permet la quantification spectrophotométrique des protéine en solutions aqueuses.

#### 3.2.4. Méthode de Lowry

La méthode de Lowry combine la réaction de biuret des protéines avec réduction du réactif phénol Folin – Ciocalteu (phosphomolybdique – phosphotungstique acide) par des résidus de tyrosine et de tryptophane. La réduction est favorisée par le cuivre – complexe protéique. Cette méthode est très sensible, mais elle est affectée par de nombreux autres composés. La méthode a été modifiée pour surmonter ces problèmes et obtenir une relation linéaire entre l'absorbance et la teneur en protéines.

#### 3.2.5. Liaison protéine-colorant

Des tentatives de liaison protéine-colorant ont été faites pour déterminer la concentration protéique en utilisant des colorants. La méthode publiée par BRADFORD prédomine désormais. Elle est basée sur le décalage du maximum d'absorption de Blue de Coomassie Brilliant G 250 de 465 à 595 nm, qui se produit lorsque le colorant se lie à la protéine.

#### 3.2.6. Analyse de Kjeldahl

Avant l'établissement des procédures colorimétriques, la concentration en protéines était calculée à partir de la teneur en azote en utilisant un facteur empirique.

## Chapitre IV : Enzymes d'intérêt industriel

### (Caractéristiques structurales, sources et propriétés, modes d'action et intérêt pratique)

#### 1. Peptidases

**Les peptidases sont toutes enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques.** Les peptidases sont également connues sous le nom de protéases, protéinases et enzymes protéolytiques. Ces enzymes sont nécessaires à la survie de toutes les créatures vivantes et sont codés par environ 2% des gènes de l'organismes. Il est estimé que 14% des 500 peptidases humaines sont à l'étude en tant que cibles médicamenteuses. Les peptidases sont importantes pour de nombreux processus biologiques, notamment la digestion des protéines alimentaires, le recyclage des protéines intracellulaires, la cascade de la coagulation sanguine, la présentation de l'antigène et l'activation d'une variété de protéines, notamment des enzymes, des hormones peptidiques et des neurotransmetteurs. En industrie les peptidases sont souvent utilisées en mélanges plutôt que des enzymes individuelles purifiées.

##### 1.1.Types catalytiques

Le type catalytique d'une peptidase concerne les groupes chimiques et les résidus acides aminés responsables des mécanismes de catalyse d'hydrolyse des liaisons peptidiques. Les six types catalytiques spécifiques qui sont reconnus sont : **Sérine, thréonine, cystéine, aspartique, glutamique et métallo-peptidases.**

- Dans les peptidases de type sérine, thréonine et cystéine, le nucléophile catalytique est le groupe réactif d'une chaîne latérale d'acide aminé, soit un groupe hydroxyle (sérine et thréonine peptidases) soit un groupe sulfhydryle (cystéine peptidases) déprotoné par un acide aminé basique voisin.
- Dans les aspartiques et les métallo-peptidases, le nucléophile est couramment une molécule d'eau activée. Dans les peptidases aspartiques, la molécule d'eau est directement liée par les chaînes latérales des résidus aspartiques. Dans les métallopeptidases, un ou deux ions métalliques divalents maintiennent la molécule d'eau en place, et les chaînes latérales d'acides aminés chargés sont des ligands pour les ions métalliques. Le métal est le plus souvent du zinc, mais peut également être du cobalt, du manganèse ou du cuivre.

- Les peptidases glutamiques n'ont été reconnues qu'en 2005, et il reste encore beaucoup à apprendre sur leurs mécanismes catalytiques, mais elles semblent employer une dyade catalytique Glu / Gln.
- Certaines peptidases semblent n'avoir qu'un seul résidu catalytique, qui est le résidu N-terminal. Celles-ci sont connues sous le nom d'hydrolases nucléophiles N-terminales (Ntn). Toutes les thréonine peptidases connues sont des Ntn-hydrolases.

## 1.2. Peptidases regroupées selon la réaction catalysée

En un sens, toutes les peptidases catalysent la même réaction : l'hydrolyse d'une liaison peptidique. Mais ils sont sélectifs pour la position de la liaison peptidique dans le substrat, pour les résidus d'acides aminés près de la liaison scissile, et pour d'autres caractéristiques du substrat qui ne sont toujours pas comprises. Les termes utilisés pour décrire les différentes spécificités sont expliqués ci-dessous et représentés schématiquement sur la **figure 36**.

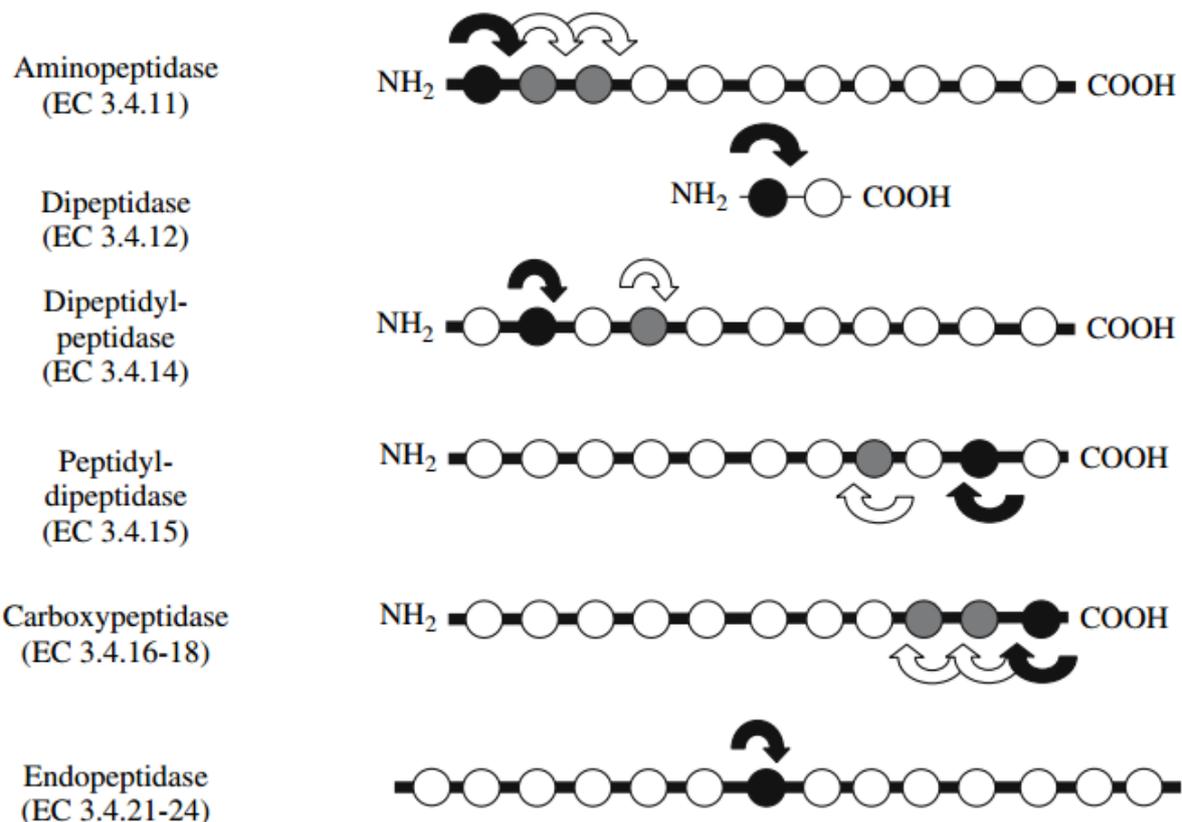


Figure 36: Classification des peptidases selon la réaction catalysée

### 1.2.1. Endopeptidases

Une endopeptidase hydrolyse les liaisons alpha-peptidiques internes dans une chaîne polypeptidique, tendant à s'éloigner de l'extrémité N-terminale ou C-terminale. Exemples d'endopeptidases sont la chymotrypsine, la pepsine et la papaïne. Les endopeptidases initient la digestion des protéines alimentaires, générant de nouvelles terminaisons N et C qui sont des substrats pour les exopeptidases qui complètent le processus.

### 1.2.2. Oméga-peptidases

Les oméga-peptidases forment le deuxième groupe de peptidases qui n'ont pas besoin d'une extrémité N-terminale ou C-terminale libre dans le substrat. Malgré leur manque d'exigence pour un groupe terminal chargé, ils agissent souvent à proximité d'un terminus ou de l'autre, et sont donc totalement distincts des endopeptidases. Certains peptides hydrolysent des liaisons qui ne sont pas des liaisons alpha; c'est-à-dire qu'il s'agit de liaisons isopeptidiques, dans lesquelles un ou les deux groupes amino et carboxyle ne sont pas directement liés à l'alphacarbon de l'acide aminé parent. Les oméga-peptidases sont un assortiment varié de enzymes, y compris les ubiquitinyl hydrolases, les pyroglutamyl peptidases et la gamma-glutamyl hydrolase.

### 1.2.3. Exopeptidases

Les exopeptidases nécessitent un groupe amino N-terminal libre, un groupe carboxyle C-terminal ou les deux, et hydrolysent une liaison pas plus de trois résidus de l'extrémité. Les exopeptidases sont en outre divisées en aminopeptidases, carboxypeptidases, dipeptidyl-peptidases, peptidyl-dipeptidases, tripeptidylpeptidases et dipeptidases. Il n'y a pas d'exopeptidases connues qui soient des peptidases aspartiques ou glutamiques.

### 1.2.4. Aminopeptidases

Une aminopeptidase libère un seul résidu d'acide aminé du N-terminal non bloqué de son substrat:  $Xaa + \text{peptide}$  (ou  $Xaa + (Xaa)_n$ ). Exemples sont l'aminopeptidase N et l'aminopeptidase C

### 1.2.5. Dipeptidases

Une dipeptidase hydrolyse un dipeptide, et nécessite que les deux extrémités soient libre:  $Xaa + Xaa$ . Des exemples sont la dipeptidase A et la dipeptidase membranaire.

### 1.2.6. Dipeptidyl-peptidases

Une dipeptidyl-peptidase hydrolyse une liaison dipeptidyle, c'est-à-dire qu'elle libère un dipeptide N-terminal de son substrat: dipeptide + peptide (ie  $(Xaa)_2 + (Xaa)_n$ ). Des exemples sont la dipeptidyl-peptidase I et la dipeptidylpeptidase III.

### 1.2.7. Tripeptidyl-peptidases

Une tripeptidyl-peptidase hydrolyse une liaison tripeptidyle, libérer un tripeptide de l'extrémité N-terminale de son substrat : tripeptide + peptide (c'est-à-dire  $(Xaa)_3 + (Xaa)_n$ ).

### 1.2.8. Peptidyl-dipeptidases

Une peptidyl-dipeptidase hydrolyse un dipeptide de l'extrémité C-terminale de son substrat : peptide + dipeptide (c'est-à-dire  $(Xaa)_n + (Xaa)_2$ ). Un exemple est la peptidyl-dipeptidase A.

### 1.2.9. Carboxypeptidases

Une carboxypeptidase hydrolyse un seul résidu du C-terminal non bloqué de son substrat: peptide + Xaa (ou plus précisément:  $(Xaa)_n + Xaa$ ). Des exemples sont la carboxypeptidase A1

## 1.3. Principales sources des protéases

Des protéases de toutes sources, c'est-à-dire des bactéries, des champignons, des virus, des plantes, des animaux et des humains, ont été identifiées en raison de leurs rôles physiologiques importants. La papaïne, la bromélaïne, les kératinases et la ficine sont des protéases bien connues **d'origine végétale**. La papaïne, extraite du latex des fruits de *Carica papaya*, est la protéase végétale qui a une longue histoire d'utilisation. La bromélaïne, une cystéine protéase, est extraite et purifiée des fruits d'ananas. D'autres sources potentielles de sérine protéases végétales sont le latex de *Wrightia tinctoria*, *Ipomoea carnea*, *Fistulosa*, *Euphorbia milii*.

**L'extraction des protéases des plantes consomme beaucoup de temps.**

La meilleure **source animale** des protéases est le quatrième estomac des veaux non-quittés, où on les trouve avec la pepsine, mais le rapport pepsine / présure est faible. La chymosine est également extraite de l'estomac de veau avec une solution saline. Des approches similaires ont été utilisées pour produire de la pepsine bovine. Les protéases animales, telles que pancréatine, trypsine, pepsine, la chymotrypsine et la rénine sont produites et préparées sous forme pure en grandes quantités mais ces quantités sont insuffisante pour répondre à la demande industrielle mondiale.

Les **micro-organismes** représentent une source brillante d'enzymes en raison de la facilité des manipulations de leurs génomes et de leurs grandes diversités. La plupart des protéases neutres et alcalines du commerce sont produites par des membres du genre *Bacillus* (**Tableau 5**). Les protéases neutres de bactéries sont actives à un pH étroit (pH 5–8) et présentent une thermotolérance relativement faible. **Mais à cause à leur vitesse de réaction intermédiaire, ces protéases provoquent moins d'amertume dans les hydrolyses des protéines alimentaires par rapport aux protéinases animales** ; par conséquent, ils sont fréquemment utilisés dans l'industrie alimentaire. *Pseudomonas* est une bactérie à Gram négatif qui produit des enzymes protéolytiques alcalines. Une variété de protéases diverses a été isolées à partir de plusieurs souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Les champignons produisent une plus grande variété d'enzymes protéolytiques que les bactéries, par exemple, *Aspergillus oryzae* produit des protéases neutres, acides et alcalines.

**Tableau 5: Quelques protéases et leurs sources microbiennes**

Types	pH	Application	Classification	Sources
Alcaline	9-11	Industrie des détergents et du cuir	Sérine protéases, Subtilisine Carlsberg et Subtilisine novo	Principalement produit par des espèces bactériennes, telles que <i>A. salinivibrio</i> sp, <i>Cryptococcus aureus</i> , champignons, <i>Bacillus</i> sp
Acide	3,8 -5,6	Sauce soja, hydrolysats de protéines, aides digestives et en production de matériel d'assaisonnement, défrichage bière et jus de fruits, amélioration de la texture de la pâte de farine et tendre le muscle fibrille	Protéases aspartiques, Pepsine (A1), Rétropepsine (A2)	Principalement produit par des espèces fongiques, telles que <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. fumigatus</i> et <i>A. saitoi</i>
Neutre	5 - 8	Industrie alimentaire, industrie brassicole	Neutrased, Thermolysine	Genre <i>Bacillus</i>

## 1.4. Applications industrielles

En plus d'être utilisé dans l'industrie du fromage, les peptidases sont également utilisées pour attendrir la viande, clarifier les bières et améliorer les saveurs des fromages et des aliments pour animaux de compagnie. Les peptidases sont utilisées dans l'industrie du cuir pour enlever les poils et rendre le cuir plus souple. Les peptidases sont également largement utilisées dans les matériaux de nettoyage, tels que les poudres de lavage et le liquide de nettoyage des lentilles de contact. En plus d'être la cible des médicaments, les peptidases sont utilisées en médecine pour éliminer les parasites gastro-intestinaux (anthelminthiques), éliminer les peaux mortes des brûlés (débridement), déterminer les groupes sanguins et pour soulager les maux de dos en digérant le contenu cartilagineux de la hernie intervertébrale (chimonucléolyse).

### 1.4.1. Industrie laitière (Fabrication du fromage)

L'application la plus importante des protéases dans l'industrie laitière est la fabrication du fromage. Les protéases coagulantes du lait animal et microbien appartiennent à une classe de protéases **aspartates acides**. Les protéases participent à la maturation du fromage, hydrolyse des protéines de lactosérum et développement de la saveur. En outre, l'enzyme utilisée pour le débitage des hydrolysats de protéines (éliminer l'amertume des peptides), la synthèse d'aspartame (un dipeptide composé de deux acides aminés naturels, l'acide L-aspartique et la L-phénylalanine) et d'accélération des temps d'affinage du fromage. Des protéases ont également été utilisées pour la production de protéines de lait à faible allergène, qui est utilisé comme ingrédient dans les préparations lactées pour bébé

Environ 80% des protéines du lait sont constituées de caséine, qui est par nature hydrophobe. Les caséines bovines peuvent être subdivisées en quatre espèces de phosphoprotéines qui existent, en raison de leur faible solubilité dans l'eau, en agglomérats. Les quatre espèces de caséine  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ - et  $\kappa$  se trouvent à des concentrations molaires relatives d'environ 4: 1: 4: 1 : 6.

Les caséines s'agrègent en forment des submicelles, qui forment ensemble la micelle de caséine. La surface externe de la micelle de caséine est constituée de submicelles contenant une teneur relativement élevée en molécules de  $\kappa$  caséine. **Des parties hydrophiles et chargées négativement des molécules de  $\kappa$ -caséine forment la périphérie de la micelle et garantissent la stabilité des micelles grâce à la répulsion électrostatique et entropique.** Les enzymes coagulantes ciblent spécifiquement une partie distincte des  $\kappa$ -caséine, hydrolysant la liaison Phe-Met (au niveau de l'acide aminé 105-106) et provoquant ainsi la déstabilisation de

l'ensemble des micelles, qui s'agrègent les unes aux autres. La partie de la  $\kappa$ -caséine séparée est appelée caséino macro peptide (CMP). Les ions calcium facilitent l'agrégation des micelles de caséine mais n'affectent pas la réaction enzymatique. La réaction enzymatique est très sensible au pH mais moins à la température. Le taux d'agrégation est fortement affecté par la température entre 25 et 35 °C. L'emprésurage est ainsi décrit par la réaction enzymatique et par agrégation de caséine micellaire.

**La maturation du fromage** est principalement due à la dégradation protéolytique de la protéine caséine. Les endoprotéases telles que la plasmine endogène du lait et les enzymes coagulantes sont responsables de la génération de fragments polypeptidiques de caséine.

La plasmine est une endoprotéase alcaline de type trypsine qui se trouve dans le lait également sous sa forme plasminogène inactive. Elle est principalement associée à la micelle de caséine. La plasmine peut devenir plus ou moins active lorsque les inhibiteurs d'activation de la plasmine et du plasminogène sont séparés par la fraction de lactosérum. Les exoprotéases, provenant des cultures initiales bactériennes, décomposent en outre une partie de ces peptides en d'acides aminés libres. Ces acides aminés fonctionnent comme des précurseurs pour les composés aromatiques (responsable du goût du fromage) qui sont synthétisés par les enzymes cataboliques des cultures de départ. De cette manière, les différents types de cultures de départ sont responsables des caractéristiques typiques des variétés de fromages. Dans cette description simplifiée, il est clair que les coagulants jouent un rôle important dans le mécanisme de maturation.

## 2. Les enzymes amylolytiques

La cellulose et l'amidon sont les polymères les plus abondants sur Terre. Ils sont tous deux constitués d'unités monomères de glucose qui sont cependant liées différemment pour former des chaînes polymères : l'amidon contient le glucose lié par les liaisons  $\alpha$ -glucosidiques, tandis que le glucose de la cellulose est lié par les liaisons  $\beta$ -glucosidiques. Par conséquent, ces deux sources importantes d'énergie pour les animaux, les plantes et les micro-organismes sont hydrolysées biochimiquement par deux groupes différents d'enzymes : l'amidon par  $\alpha$ -glycoside **hydrolases** et la cellulose par  $\beta$ -glycoside **hydrolases**. L'amidon (amylon en grec) se compose de deux fractions distinctes : amylose - glucanes linéaires  $\alpha$ -1,4 liés, et amylopectine - glucanes linéaires  $\alpha$ -1,4 liés ramifiés avec des liaisons  $\alpha$ -1,6, donc les enzymes responsables de son hydrolyse sont appelées enzymes amylolytiques ou simplement amylases.

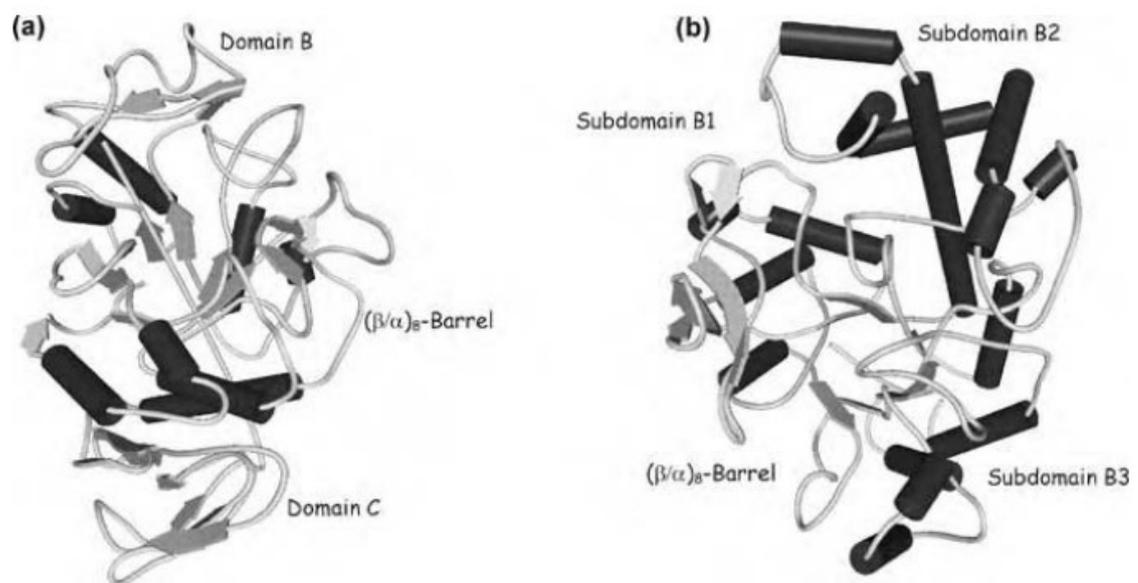
Les enzymes amylolytiques forment un grand groupe d'enzymes parmi lesquelles les plus courantes et les plus connues sont les  $\beta$ -amylases,  $\alpha$ -amylases et glucoamylases.

### 2.1. Caractéristiques structurelles et mécanisme catalytique

Les Glucosyl Hydrolase contiennent des hydrolases (EC 3) comme  $\alpha$ -Amylase, Oligo-1,6-glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase, Pullulanase, Amylopullulanase, Cyclomaltodextrinase, Maltotetrahydrolase, Isoamylase et également des transférases et des isomérases des classes d'enzymes 2 et 5. Ces enzymes constituent la famille des  $\alpha$ -amylases.

Tous Les membres du clan GH-H partagent plusieurs caractéristiques (Figure 37):

- (i) Structure conservée (domaine catalytique) formé par le  $(\beta/\alpha)_8$ -pli en tonneau (TIM-baril) (Figure 36)



**Figure 37: Structure tri-dimensionnelle de : a)  $\alpha$ -amylase de *Aspergillus oryzae* , b) amylo maltase de *Thermus aquaticus***

- (ii) Un mécanisme catalytique commun dans lequel l'aspartate du brin  $\beta 4$  (Asp 193) agit comme une base (nucléophile) et le glutamate du brin  $\beta 5$  (Glu 2019) agit comme un donneur de protons (catalyseur acide / base) à l'aide du troisième résidu, l'aspartate du brins  $\beta 7$  (Asp 294), essentiel pour la liaison au substrat (stabilisateur d'état de transition) (Figure 38).

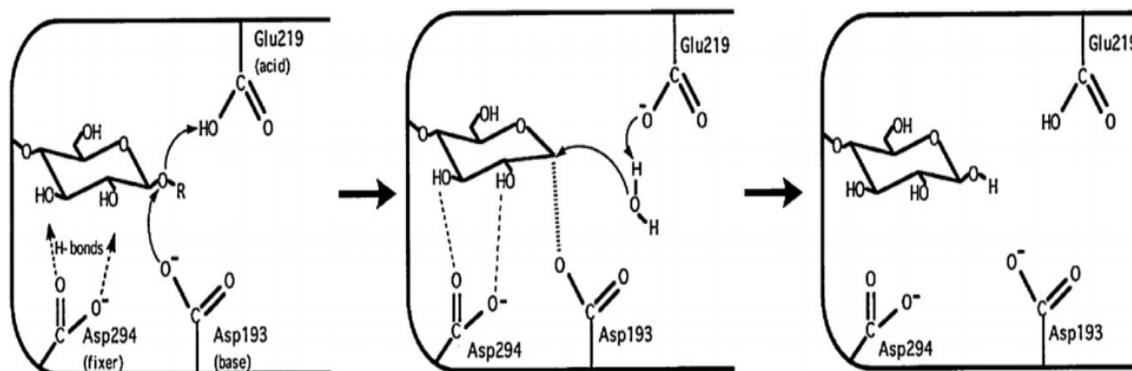
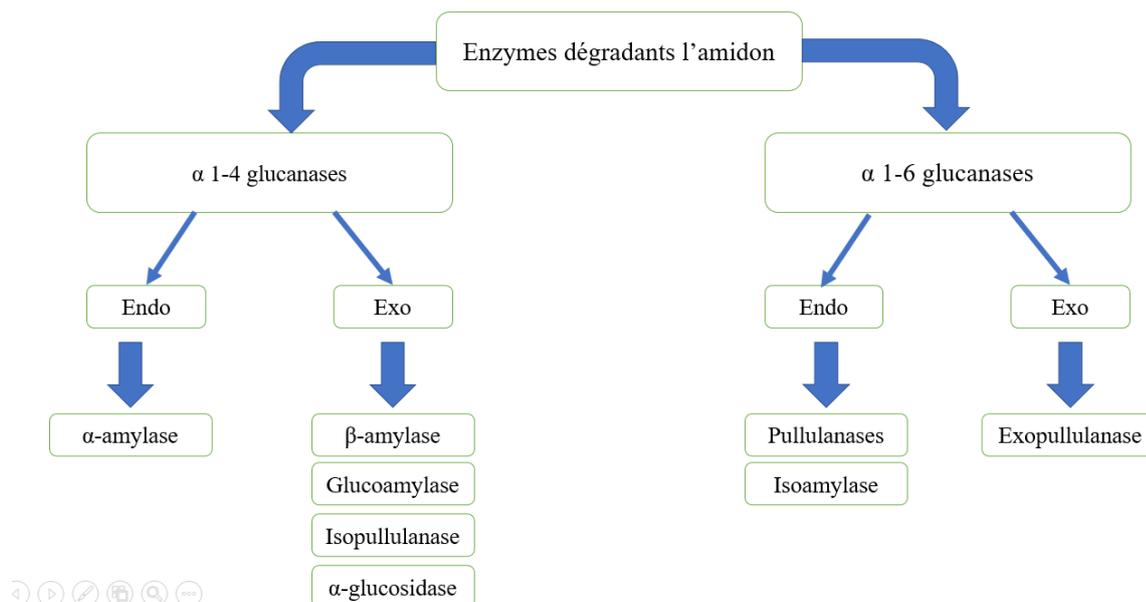


Figure 38: Mécanisme de catalyse d'une amylase

## 2.2. Dégradation de l'amidon

La dégradation industrielle de l'amidon est généralement initiée par des  $\alpha$ -amylases ( $\alpha$ -1,4-glycanohydrolases) (Figure 39). Les amylases catalysent le clivage des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques dans la région interne de la molécule, provoquant ainsi une diminution rapide du poids moléculaire et de la viscosité du substrat. Ces enzymes **endo-agissant** peuvent être divisées en  $\alpha$ -amylases liquéfiantes ou saccharidiques qui dégradent préférentiellement les substrats contenant plus de quinze ou quatre unités de glucose, respectivement. Une hydrolyse prolongée de l'amylose conduit à une conversion des glucides en maltose, maltotriose et oligosaccharides de différentes longueurs de chaîne, parfois suivie d'une deuxième étape dans la réaction libérant le glucose du maltotriose.

Il existe deux groupes principaux d'enzymes de déramification à action endo qui peuvent cliver les liaisons  $\alpha$ -1,6-glycosidiques existant aux points de ramification de l'amylose, du glycogène, du pullulane et des oligosaccharides apparentés. Le premier groupe sont les pullulanases qui attaquent spécifiquement les liaisons  $\alpha$ -1,6-, libérant des oligosaccharides linéaires de résidus de glucose liés par des liaisons  $\alpha$ -1,4. Le deuxième groupe d'enzymes de déramification sont les néopullulanases et les amylopullulanases, qui sont actives à la fois sur les liaisons  $\alpha$ -1,6- et  $\alpha$ -1,4-.



**Figure 39: Enzymes dégradants l'amidon.**

### 2.3.Sources d' $\alpha$ -amylase

Bien que les  $\alpha$ -amylases soient largement distribuées dans diverses bactéries, champignons, plantes et animaux ainsi que chez les êtres humains, la production commerciale a été limitée à seulement quelques souches sélectionnées de champignons et de bactéries.

Chez les animaux, le pancréas et les glandes salivaires sont les principales sources de  $\alpha$ -amylase.

Chez les plantes, elle est généralement présente dans les parties vertes, mais les grains et les parties amylacées ont des concentrations maximales. **La  $\beta$ -amylase ne se trouve que dans les plantes et donne du maltose comme produit principal.**

Parmi les microorganismes, l' $\alpha$ -amylase est produite par plusieurs champignons et bactéries. L'espèce bactérienne la plus largement utilisée est le *Bacillus* spp. Mésophile, à savoir *B. amyloliquefaciens* et *B. licheniformis*, qui sont largement utilisés pour la production commerciale de l'enzyme. *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus* et *B. licheniformis* sont également largement étudiés en tant que bons producteurs d'  $\alpha$ -amylase thermostable.

Les sources fongiques d' $\alpha$ -amylase sont principalement les espèces *Aspergillus* et quelques espèces de *Penicillium*, telles que *P. brunneum*, *P. fellutanum*.

Les pullulanases sont généralement produites par les plantes, par ex. riz, orge, avoine et haricot, ainsi que par des micro-organismes mésophiles tels que : *Klebsiella*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bacillus* et *Streptomyces*.

#### 2.4.Applications des $\alpha$ -amylases dans l'industrie alimentaire

De nombreux procédés biotechnologiques industriels, environnementaux et alimentaires utilisent cette enzyme à un stade ou à un autre. En plus d'être utilisé comme une source alimentaire majeure, l'amidon est très largement récolté et transformé en une variété de produits tels que les hydrolysats d'amidon, le sirop de glucose, le fructose, les dérivés de malto-dextrine, etc. Certaines applications industrielles importantes de l' $\alpha$ -amylase sont (Figure 40):

##### 2.4.1. Production de glucose et de fructose à partir d'amidon

L'une des principales utilisations commerciales de l' $\alpha$ -amylase est la production de glucose. Le processus enzymatique de conversion de l'amidon en sirop à haute teneur en glucose commence par la **liquéfaction en dextrines à chaîne courte par l'action de l' $\alpha$ -amylase** de *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus* ou *B. licheniformis*. Ensuite, la saccharification pour former un sirop de glucose à haute concentration (> 95%) se fait en traitant l'hydrolysats d'amidon avec des exo-glucoamylases fongiques dont *A. niger* est la principale source. Une autre utilisation industrielle importante du traitement de l'amidon est la conversion de sirop à haute teneur en glucose en sirop à haute teneur en fructose. Ce processus est réalisé en utilisant l'enzyme glucose isomérase. Le sirop de fructose est un édulcorant et un additif important largement utilisé dans une grande variété d'aliments et de boissons transformés allant des boissons gazeuses et aux fruits aux yaourts et pains.

##### 2.4.2. Industrie de l'alcool

L'amidon brut est largement converti par hydrolyse et fermentation en éthanol, autres spiritueux distillés et biocarburants. Les amidons tels que les céréales et les pommes de terre sont fréquemment utilisés comme substrat de l'alcool éthylique.

##### 2.4.3. Industries de la boulangerie

Dans l'industrie de la boulangerie, l' $\alpha$ -amylase joue un rôle majeur dans l'amélioration de la quantité, de l'arôme et du goût du produit. Étant le principal constituant du pain, l'amidon provoque de la dureté et le rend désagréable à manger avec l'âge car l'amidon se cristallise.

L'ajout d'enzymes amylase et lipase dans la fabrication du pain réduit cette cristallisation et prolonge la durée de conservation.

L'enzyme est fréquemment utilisée lors de la préparation de muffins, de petits pains mous, de petits pains et de pains partout où des caractéristiques supplémentaires sont souhaitées, telles que le conditionnement de la pâte ou une couleur de croûte améliorée.

#### 2.4.4. Industrie d'alimentation du bétail

Une préoccupation majeure de la production industrielle d'aliments pour animaux est qu'elle n'est pas entièrement dégradée et digérée par le bétail, ce qui entraîne une sous-utilisation de l'alimentation animale. Les protéines et les minéraux ne sont pas non plus pleinement utilisés. Les aliments non digérés excrétés par les animaux entraînent également des problèmes environnementaux. Pour améliorer cela, des enzymes sont mélangées dans l'alimentation animale lors de la production à grande échelle. L' $\alpha$ -amylase, la xylanase, la phytase et la protéase sont mélangées à cet effet. **L'enzyme hydrolyse les polymères d'amidon en fructose et glucose, ce qui augmente la digestibilité des glucides.**

<b>Conversion d'amidon</b>	Gélification, liquéfaction, Saccharification de l'amidon	Dégradation complète ou partiel pour produire les sucraants	<b>Glucose et sirops</b>
<b>Boulangerie</b>	Conversion de l'amidon dans les pates en sucres fermentables	Production de sucres qui seront convertis en Ethanol par les levures	<b>Production de carburant</b>
<b>Détergents</b>	Dégradation des résidus des aliments féculents (Pomme de terre) pour donner des dextrans	Clarification des jus par dégradation d'amidon trouble et insoluble	<b>Jus de fruits</b>
<b>Textiles</b>	Elimination d'agents d'encollage textile / produits chimiques tels que l'amidon	Liquéfaction d'amidon pour obtenir la viscosité souhaité des fibres	<b>Papier</b>
<b>Brassage</b>	Conversion de l'amidon des graines en maltose	Contrôler la douceur des bonbons	<b>Bonbons</b>

**Figure 40: Applications industrielles des enzymes amylolytiques**

### 3. Enzymes cellulolytiques

Afin de permettre l'utilisation de la cellulose insoluble en tant que telle, de multiples activités enzymatiques sont nécessaires. Différentes caractéristiques de la cellulose, comme le degré de polymérisation (DP), la cristallinité, la taille des particules et la surface, influencent l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique.

La dégradation de la cellulose est accomplie par un ensemble d'enzymes glycosyl hydrolase (**GH**) avec des activités catalytiques complémentaires. Les cellulases ont différentes spécificités pour hydrolyser les Liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques qui relient les unités de glucose dans la fibre de cellulose. Ils sont divisés en trois classes principales : les endoglucanases (endo-1-4- $\beta$ -glucanase; EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) et  $\beta$ -glucosidase (CE 3.2.1.21).

- a. **Les endoglucanases (EC 3.2.1.4)** clivent en interne les liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques dans les régions amorphes de la cellulose, libérant ainsi des extrémités de chaîne réductrices et non réductrices.
- b. **Les exoglucanases (EC 3.2.1.91)** également appelées cellobiohydrolases (**CBH**), éliminent les dimères (cellobiose) de l'extrémité de la chaîne cellulose. Certains CBH ne peuvent travailler que sur extrémités réductrices alors que d'autres clivent les unités de cellobiose uniquement aux extrémités non réductrices. Le produit principal des cellobiohydrolases est le disaccharide cellobiose, qui est clivée en unités de glucose par l'enzyme  $\beta$ -glucosidase.
- c. **Les  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21)** hydrolysent les dimères de glucose et dans certains cas gluco-oligosaccharides en glucose.
- d. **Les oxydases cellulolytiques (LPMO)** sont caractérisées par une spécificité du substrat plus large comparé aux cellulases, elles attaquent également la région cristalline de la cellulose. Les LPMO catalysent le clivage oxydant de la cellulose cristalline présentant ainsi une action synergique avec les enzymes hydrolytiques (endoglucanases et cellobiohydrolases). Le LPMO clive les liaisons glycosidiques, conduisant à la formation d'unités de glucose oxydées en position C1 (acide gluconique) et / ou en position C4 (4-cétoglucose). Le site actif du LPMO contenant du cuivre doit être réduit après chaque réaction afin de garantir le renouvellement de l'enzyme et les mécanismes différents de la réduction pouvant aider au recyclage du LPMO ont été identifiés. Les électrons peuvent être restaurés au LPMO par les moyens suivants : (i) oxydation de la cellobiose par la cellobiose déshydrogénase (CDH), (ii) oxydation du monolignol lors de la dégradation de la lignine et (iii) réduction médiée par  $H_2O_2$  (**Figure 41**).

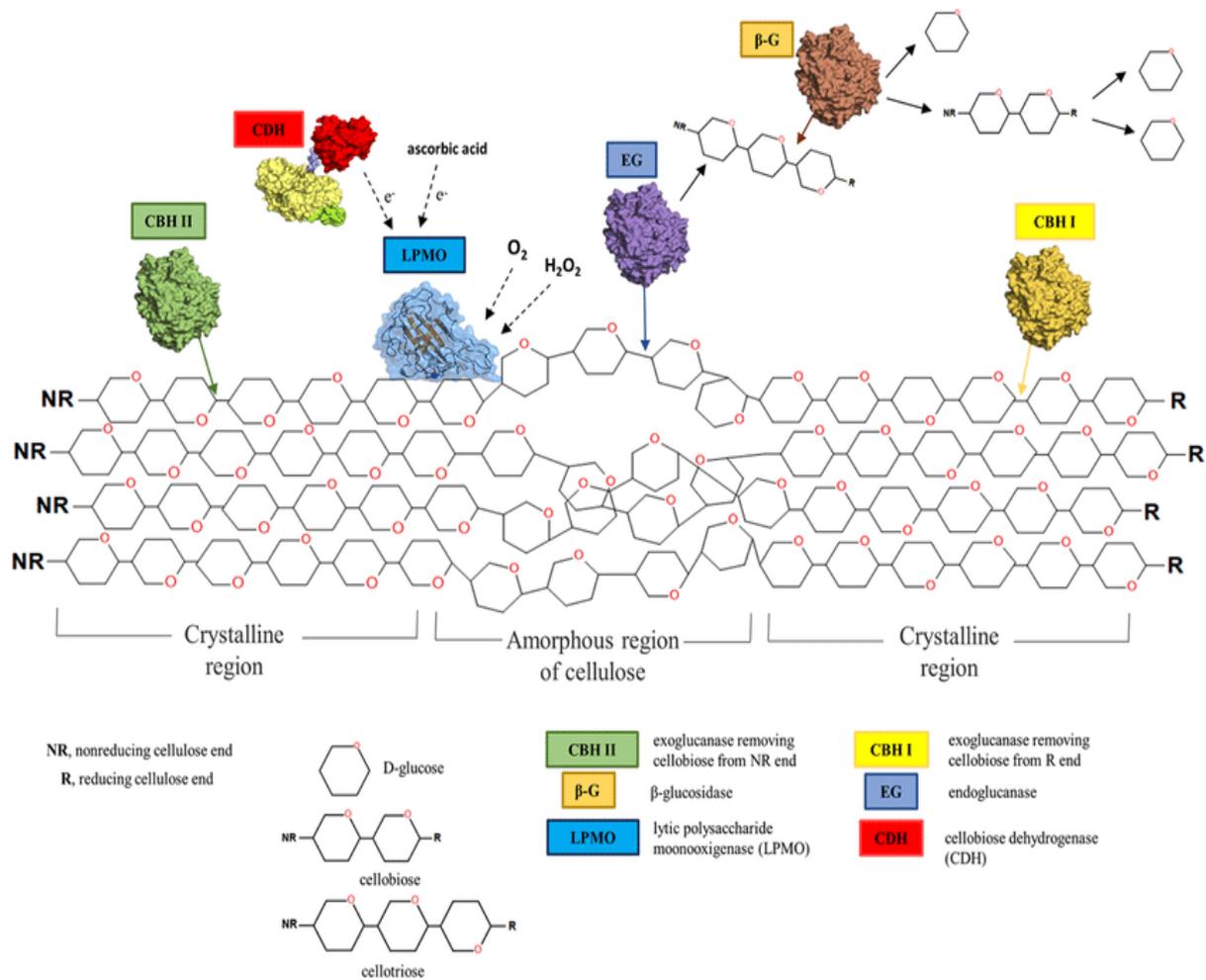


Figure 41: Dégradation enzymatique de la cellulose

### 3.1. Sources des cellulases

Les cellulases sont fabriquées par une variété de populations fongiques, telles que *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Phoma*.

Les bactéries aérobies, telles que *Acidothermus*, *Bacillus*, *Celvibrio*, *Pseudonoma*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* et *Xanthomonas*; et les bactéries anaérobies, telles que *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Caldocellum*, *Acetovibrio*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Pseudonocardia* et *Thermo anaerobacter*.

Les Champignons filamenteux, *Aspergillus* se démarque comme producteur clé d'enzymes cellulolytiques. *A. niger*, un microorganisme en fermentation, produit des enzymes cellulolytiques, des acides organiques et d'autres produits de grande valeur.

### 3.2.Applications industrielles

Outre l'utilisation de ces enzymes hydrolytiques dans les industries alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, détergente et textile, elles sont également utilisées dans l'industrie de la pâte de bois et du papier, dans la gestion des déchets et dans les domaines médical et pharmaceutique.

- Dans l'industrie alimentaire, les cellulases sont utilisées dans l'extraction de constituants du thé vert, des protéines de soja, des huiles essentielles, des produits aromatiques et de la fécule de patate douce.
- Associées aux hémicellulases et aux pectinases, elles sont utilisées dans l'extraction et la clarification des jus de fruits. Après le broyage des fruits, **les enzymes sont utilisées pour améliorer la liquéfaction par la dégradation de la phase solide.**
- Ces enzymes sont également utilisées dans la fabrication du vinaigre d'orange et dans l'extraction et la clarification des jus d'agrumes.

Les cellulases complètent les pectinases dans les industries des jus et du vin en tant qu'agents d'extraction, de clarification et de filtration, avec une augmentation du rendement et de la saveur. D'autres applications sont résumées dans le **tableau 6**

**Tableau 6: Applications industrielles des cellulases**

Industrie	Application
Biocarburant	Production d'éthanol, solvants et acides organiques, production de nourriture animale à haute énergie et valeur nutritionnelle
Traitements d'aliments	Amélioration d'extraction des jus de fruits et légumes, clarification des jus, amélioration de la macération et extraction des couleurs de fruits
Textiles	Bio polissage, bio finition et bio stoning
Papier et pulpe	Elimination d'encre et blanchiment
Agriculture	Améliore la qualité des sols, et contrôle de pathogènes
Médicale	Anti-biofilms et traitement des phytobézoard
Autres	Réduction des déchets de biomasse, extraction de l'huile d'olive et les caroténoïdes

## 4. Les enzymes pectolytiques

### 4.1. Biochimie des parois cellulaires des fruits

La pulpe des fruits et légumes est composée de cellules. Elles sont entourées d'une paroi cellulaire qui résiste à la pression interne et aux chocs externes (Figure 42). Les polysaccharides constituent 90 à 100% des polymères structuraux des parois des cellules végétales en croissance, appelés **parois cellulaires primaires**. Les parois cellulaires secondaires se développent à partir des parois cellulaires primaires pendant la croissance cellulaire.

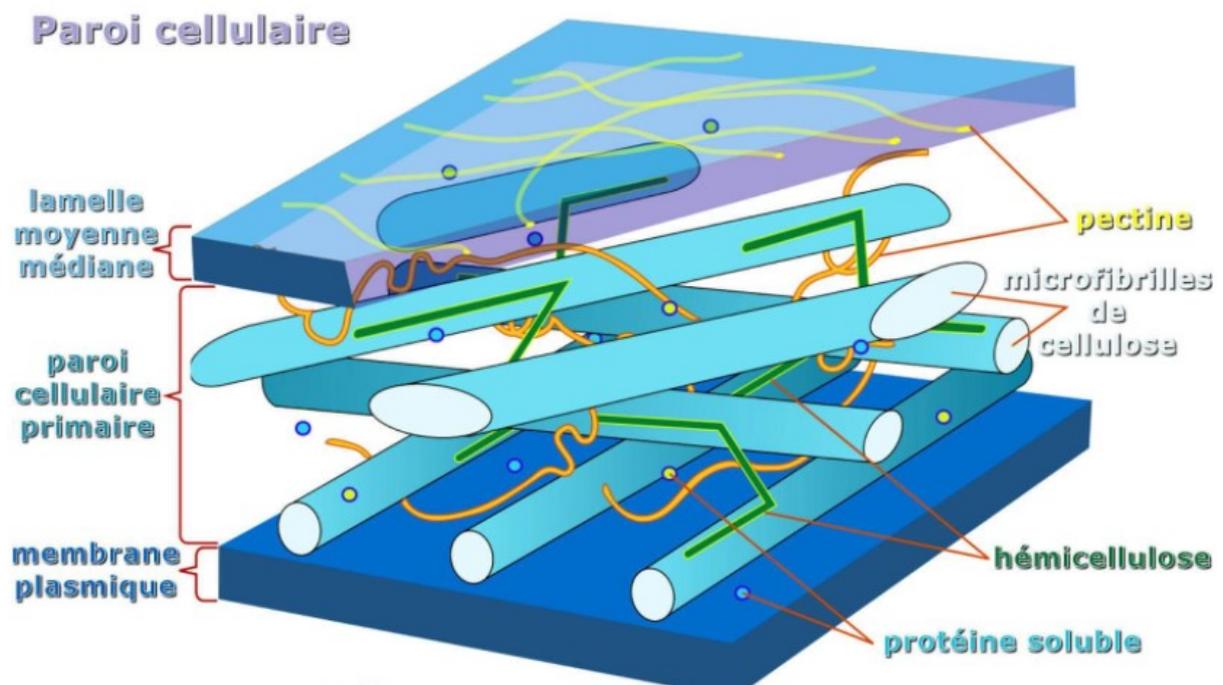
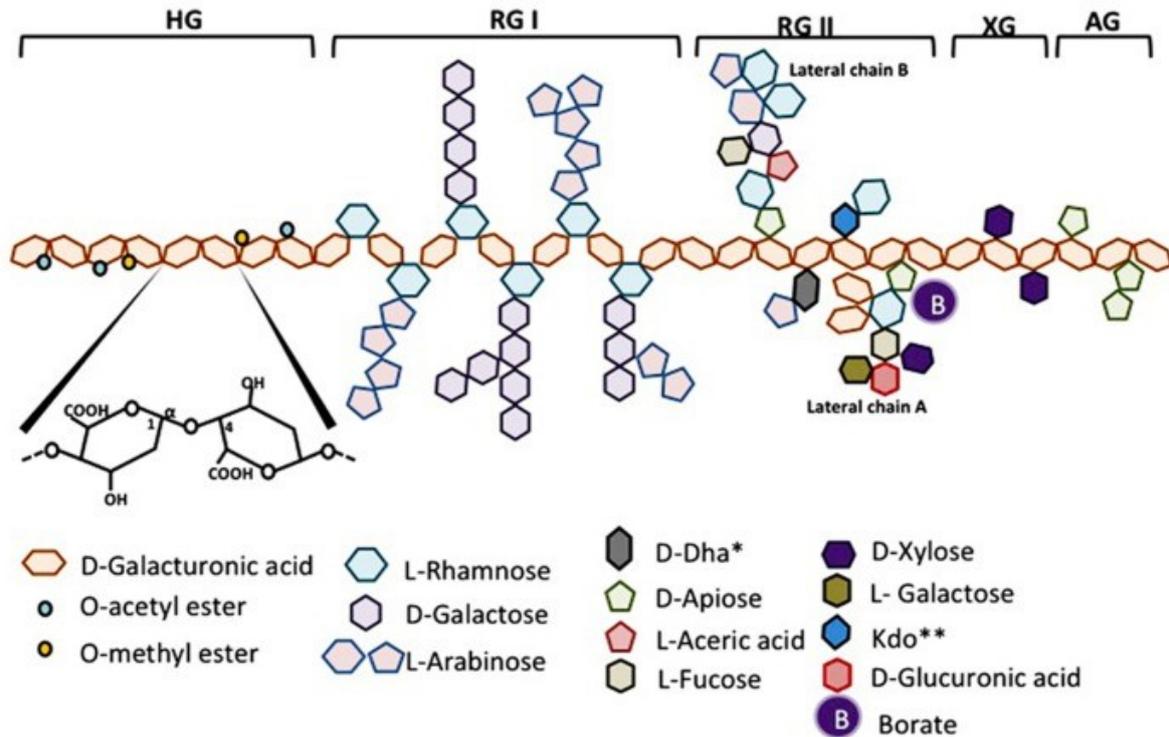


Figure 42: Structure de la paroi cellulaire végétale

#### 4.1.1. La pectine

La **pectine** est le principal composant polysaccharidique structural des lamelles de fruits et des parois cellulaires (Figure 42). Trois polysaccharides pectiques sont présents dans toutes les parois cellulaires primaires : l'homogalacturonane (HG) et les rhamnogalacturonanes (RG) I et II (Figure 43).



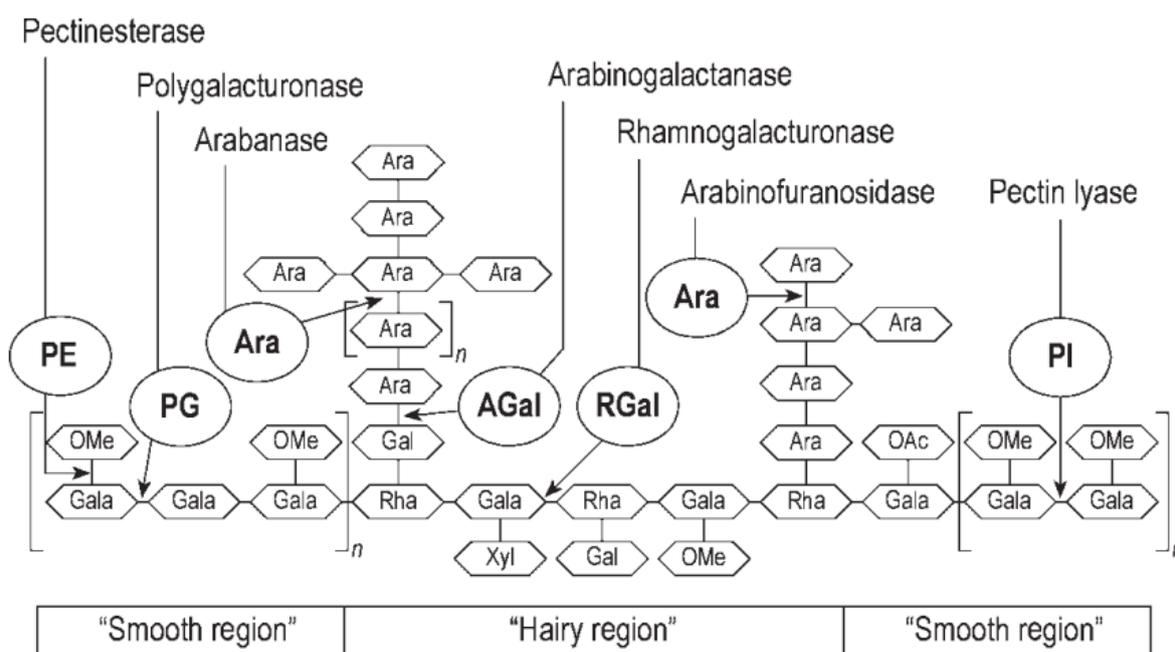
**Figure 43: Structure et composition chimique de la pectine**

Des modèles récents divisent la pectine en régions dites lisses d'homogalacturonane non ramifié (HG) (60–90%) et en régions velues de rhamnogalacturonane I hautement ramifié (10–40%).

- L'homogalacturonane** est un homopolymère de résidus d'acide (1-4)- $\alpha$ -D-galactosyluronique, capable de former des gels. Les groupes carboxyle des résidus d'acide galactosyluronique de l'homogalacturonane de la paroi cellulaire primaire peuvent être méthyl-estérifiés en position C-6 et acétylestérifiés en position C-2 ou C-3.
- Le rhamnogalacturonan I (RGI)** a un squelette de jusqu'à 100 répétitions du disaccharide rhamnose-galactose. La chaîne latérale peut varier en taille d'un seul résidu glycosyle à 50 résidus glycosyle ou plus.
- Le rhamnogalacturonan II (RGII)** est un polysaccharide complexe de faible poids moléculaire (environ 4,8 kdalton) avec un squelette de neuf résidus d'acide (1-4) - $\alpha$ -D-galactosyluronique et quatre chaînes latérales attachées à O-2 ou O-3 du squelette.

## 4.2. Les pectinases

Les pectinases commerciales pour l'industrie des jus de fruits proviennent de souches sélectionnées d'*Aspergillus* sp. Les pectinases sont définies et classées sur la base de leur action vis-à-vis de la pectine (figure 44).



**Figure 44: Enzymes dégradant la pectine, Ara : arabinose, Gal : galactose, GalA : Acide galacturonique, OMe : Méthyl ester, OAc : ethyl ester, Rha: rhamnose, Xyl: xylose.**

### 4.2.1. La pectine lyase (PL)

Une pectine dépolymérase de type endo qui a une grande affinité pour les longues chaînes hautement méthylées et agit par  $\beta$ -élimination de l' $\alpha$ -1,4 homogalacturonane méthylé avec formation d'oligo-uronides insaturés en C4-C5.

### 4.2.2. La pectine méthylestérase (PME)

Élimine les groupes méthoxyle de la pectine et diminue en même temps l'affinité du PL pour ce substrat. Cela entraîne la formation de méthanol et de pectine moins méthylée. La PME d'*Aspergillus* a une forte affinité pour la pectine hautement méthoxylée telle que la pectine de pomme. La déméthylation avec PME génère des groupes d'acide carboxylique libres et la pectine devient chargée négativement.

### 4.2.3. La polygalacturonase (PG)

Existe sous deux formes : endo-PG et exo-PG. Les deux types n'agissent que sur la pectine avec un degré d'estérification inférieur à 50–60%. L'**Endo-PG** agit de manière aléatoire sur le squelette  $\alpha$ -1,4-polygalacturonique et entraîne une diminution prononcée de la viscosité. **Exo-PG** agit à l'extrémité non réductrice de la chaîne, elle libère de petits fragments de la chaîne et ne réduit pas significativement la viscosité. Sept endo-PG, deux exo-PG et sept isoenzymes PL d'*Aspergillus niger* ont été décrits.

### 4.2.4. Autres enzymes

Différentes enzymes agissant sur le rhamnogalacturonan I ont été identifiées et purifiées à partir d'*Aspergillus sp.* La RGase A a été identifiée comme une hydrolase qui divise la liaison  $\alpha$ -D-GalAp-(1-2) –  $\alpha$ -L-Rhap de RGI, tandis que la RGase B semble être une lyase qui divise la Liaison  $\alpha$ -l-Rhap-(1-4)–  $\alpha$ -D-GalAp par  $\beta$ -élimination.

Bien que la structure du substrat RGII ait été décrite, les enzymes capables de l'hydrolyser sont encore inconnues et n'ont pas encore été décrites.

Les arabanases sont des pectinases, car elles éliminent l'arabinose lié de manière covalente au squelette de l'homogalacturonane. Trois enzymes ont été décrites : une endo-arabinanase ( $\alpha$ -1-5; ABFA) et deux arabinofuranosidases, à savoir l'exo-arabinofuranosidase A ( $\alpha$ -1-2;  $\alpha$ -1-3) (ABFA) et exo-arabinofuranosidase B ( $\alpha$ -1-3;  $\alpha$ -1-5; ABFB). Tous les trois sont produits par *Aspergillus niger*.

Des activités élevées sont nécessaires pour la transformation des pommes et des poires. En général, l'activité de la pectinase et le rapport des différentes pectinases peuvent varier dans différentes préparations commerciales.

## 4.3. Applications des pectinases

D'un point de vue industriel, les pectinases sont classées en deux types, les pectinases acides et alcalines. **Les pectinases acides** ont de nombreuses applications dans l'extraction et la clarification des jus claires (pomme, poire, raisins et vin) et trouble (citron, orange, ananas et mangue) et la macération des tissus végétaux (tableau 2). De plus, les pectinases acides sont utiles dans l'isolement des protoplastes et la saccharification de la biomasse.

Les **pectinases alcalines** ont applications potentielles dans le décapage du coton, le dégommeage des fibres végétales pour améliorer la qualité des fibres, la fermentation du café et du thé, l'industrie du papier et pour la purification des virus végétaux (Tableau 7).

**Tableau 7 : Applications industrielles des pectinases**

Application	Le but
Stabilisation des troubles	Pour précipiter la matière hydrocolloïde présent dans les jus de fruits
Clarification du jus de fruit	Dégradation des substances formant un nuage pectique, par conséquent, le jus peut être facilement filtré et traité
Extraction de jus et d'huile	Pour surmonter la difficulté de pressage pulpe de fruit pour donner du jus et de l'huile
Macération	Pour décomposer les tissus des légumes et les fruits pour donner des produits pulpeux utilisés comme matériau de base pour les jus, nectar comme dans le cas d'aliments pour bébés, pudding et yogourt
Liquéfaction	Pour décomposer les glucides végétaux fermentescibles en sucres simples par des enzymes
Rouissage des cultures à fibres	Pour libérer les fibres des cultures en fermentant avec des micro-organismes qui dégradent la pectine
Traitement des eaux usées	Pour dégrader les substances pectiques dans les eaux usées des industries de transformation des agrumes
Fermentation du café et du thé	Pour éliminer la couche de mucilage du grain de café. Pour améliorer la fermentation du thé et la propriété de formation de mousse du thé
Préservation du bois	Pour éviter l'infection du bois en augmentant la perméabilité des conservateurs de bois

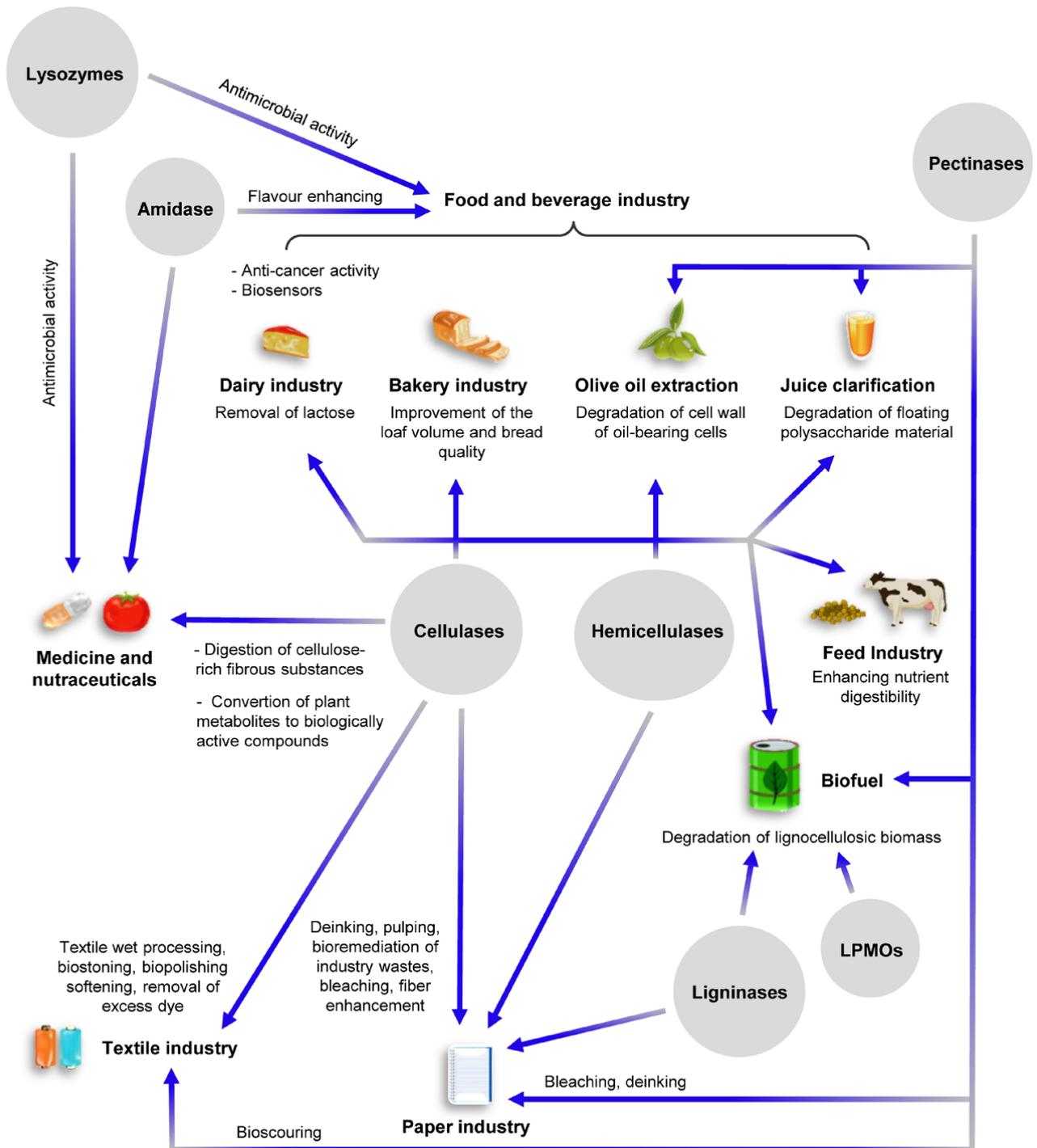


Figure 45: Résumé des applications industrielles des enzymes dégradant la paroi cellulaire

## Chapitre V: Les enzymes immobilisées

### 1. Introduction

Les industries pharmaceutique, agroalimentaire, des détergents et des biocarburants ont bénéficié des avantages de la catalyse enzymatique dans les applications à l'échelle commerciale, tandis que d'autres industries, telles que la conversion du gaz naturel et la production en chimie fine, n'envisagent que récemment leur utilisation. Dans la production chimique à l'échelle industrielle, les enzymes sont des catalyseurs attrayants en raison de conditions de réaction douces (température, pH et pression), d'une sélectivité élevée des produits et l'obtention de produits souhaités sans aucun produit intermédiaire comme contaminant, et en fin un faible impact environnemental. Les caractéristiques souhaitables des enzymes et leurs applications industrielles répandues sont souvent entravées par les facteurs suivants :

- Manque de stabilité opérationnelle à long terme
- Courte durée de conservation
- Difficultés et Cout très élevé de leur récupération et leur réutilisation après la réaction.

Les enzymes de l'organisme vivant sont attachées à membrane cellulaire ou emprisonné dans les cellules et organites cellulaires. Cette observation a conduit au concept que les enzymes isolées pures peuvent en fait mieux fonctionner lorsqu'elles sont immobilisées. Donc les inconvénients précédents peuvent généralement être surmontés par l'immobilisation d'enzymes.

### 2. Enzymes immobilisées

Les enzymes immobilisées sont des enzymes physiquement confinées ou localisées dans un espace limité avec rétention de leurs activités catalytiques, qui peuvent être utilisées de manière répétée et continue. Cette définition est applicable aux enzymes, des organites cellulaires, des cellules microbiennes, des cellules végétales et des cellules animales, c'est-à-dire à tous les types de biocatalyseurs. En enzymologie appliquée, l'immobilisation enzymatique peut être définie comme le confinement des molécules enzymatiques dans une matrice/un support solide. Dans certains cas, ces biocatalyseurs sont liés à ou dans des matériaux de support insolubles (supports) par liaison chimique ou physique. Dans d'autres cas, les biocatalyseurs sont libres, mais confinés à des domaines ou espaces limités de matériaux de support (piégeage). Il est

important de noter que les molécules de substrat et les produits formés doivent entrer et sortir librement de la phase à laquelle les enzymes sont restreintes.

### **2.1. Avantages des enzymes immobilisées**

L'utilisation d'une forme insoluble (immobilisées) d'une enzyme dans un procédé offre un certain nombre d'avantages tels que :

- a) Utilisation répétée de la même enzyme dans la mesure du possible
- b) Capacité de terminer la réaction à n'importe quel stade par l'élimination de l'enzyme insoluble
- c) Séparation facile de l'enzyme du produit et du substrat non transformé
- d) Amélioration générale de la stabilité enzymatique dans une plus large plage de conditions de fonctionnement (p. ex., pH, température, etc.)
- e) Fonctionnalité pour une utilisation dans des processus continue
- f) Immobilisation dans la conformation préférée et au lieu préféré

### **2.2. Méthodes d'immobilisation des enzymes**

Divers matériaux peuvent être utilisés comme matrice ou système de support pour l'immobilisation d'enzymes, généralement des polymères inertes et des matériaux inorganiques. La matrice porteuse idéale doit avoir les propriétés suivantes : (i) être économique, (ii) inertie, (iii) stabilité, (iv) résistance physique, (v) capacité à améliorer la spécificité/activité enzymatique, (vi) régénérabilité, (vii) capacité à réduire l'inhibition du produit et (viii) capacité à empêcher l'adsorption non spécifique et la contamination bactérienne. La plupart des matrices n'ont que certaines des propriétés ; par conséquent, la sélection de la matrice porteuse pour l'immobilisation de l'enzyme doit être choisie en fonction des propriétés et des limites des matrices.

Des points importants doivent être respecté lors de l'immobilisation d'une enzyme :

1. L'activité biologique de l'enzyme doit être conservée
2. L'enzyme doit être plus stable que son homologue soluble
3. Le coût de l'immobilisation ne doit pas être trop élevé
4. L'enzyme doit pouvoir être utilisé à plusieurs reprises

Selon les modes d'interaction entre les enzymes et supports, les méthodes d'immobilisation d'enzymes peuvent être classées en méthodes physiques et méthodes chimiques. Adsorption et le piégeage pourraient être attribué à des méthodes physiques, dans lesquelles il n'y a pas d'interactions covalentes entre les enzymes et les matrices, tandis que la fixation covalente et la réticulation appartiennent aux méthodes chimiques. Dans certains cas, de multiples interactions enzyme-support sont exploitées pour l'immobilisation des enzymes. Les méthodes d'immobilisation d'enzymes sont présentées dans la figure 46.

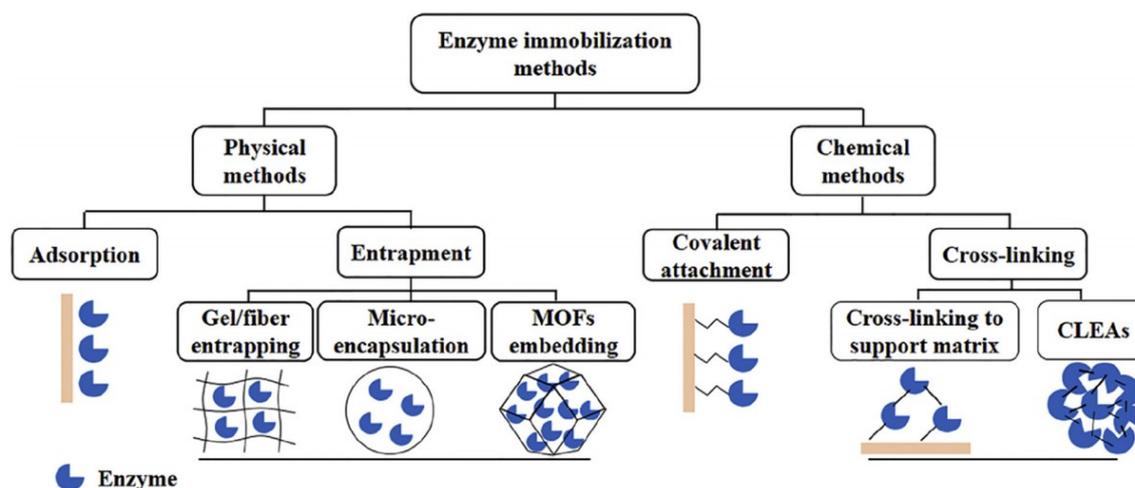


Figure 46: Différentes méthodes d'immobilisation des enzymes

### 2.2.1. Méthodes Physiques

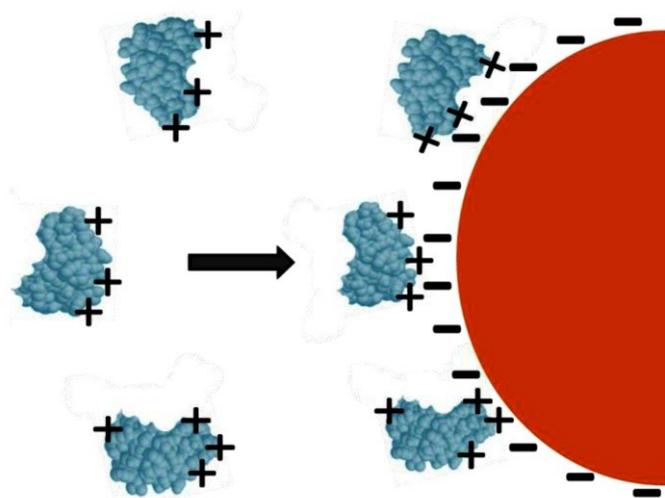
#### a) Adsorption

L'adsorption est une méthode simple et pratique pour l'immobilisation des enzymes. Il s'agit d'une adsorption physique, ionique et par affinité, parmi lesquelles, l'adsorption physique est généralement la plus utilisée. Dans ce mode d'immobilisation, les supports couramment utilisés sont les résines échangeuses de cations et d'anions, le charbon actif, le gel de silice, l'alumine, le verre à pores contrôlés et les céramiques. L'adsorption est réalisée par liaisons H, forces de van der Waals, interactions électrostatiques (Figure 47) ou interactions hydrophobes, et les enzymes sont adsorbées sur les surfaces des supports ou immobilisées dans les pores des matériaux mésoporeux. Parmi les avantages de cette méthode :

- Facile à réaliser et aucun réactif n'est requis
- Étape d'activation très peu impliquée
- Méthode relativement bon marché et peu coûteuse

- Moins perturbatrice pour les protéines que les méthodes chimiques (Rétention d'activité)

Cependant, en adsorption physique, les interactions entre enzymes et supports d'immobilisation sont faibles et réversibles. Les forces de liaison sont sensibles aux changements de pH, de température et de force ionique, résultant en une mauvaise stabilité des enzymes immobilisées. De plus, les enzymes libérées contamineront la solution substrat/produit.



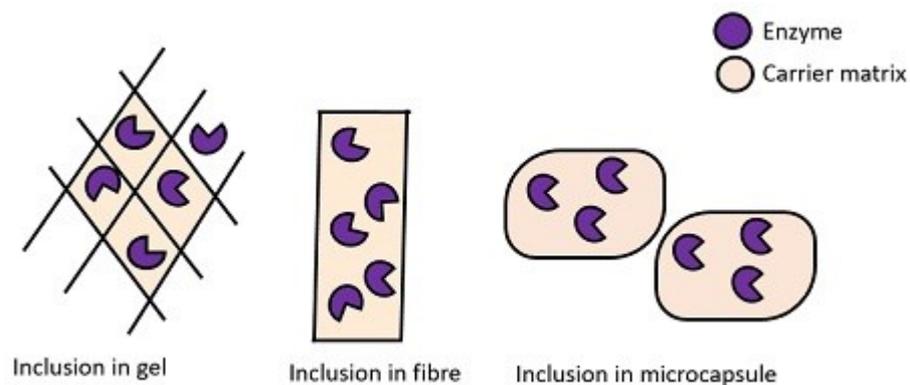
**Figure 47: Immobilisation par adsorption électrostatique**

### **b) Inclusion ou piégeage**

En tant que protéines, les enzymes ont tendance à s'agréger, diminuant ainsi les activités catalytiques. Le piégeage est une méthode d'immobilisation dans laquelle les enzymes sont incluses dans des réseaux polymériques à faible coût. Cela pourrait être une stratégie pratique pour éviter l'agrégation des enzymes. Diverses matrices peuvent être utilisées pour le piégeage, comme le chitosane, alginate de calcium, collagène, triacétate de cellulose, polyacrylamide, gélatine, Agar, caoutchouc de silicone, alcool polyvinylique et polyuréthane (Figure 48).

Dans cette méthode, les enzymes sont immobilisées par piégeage gel/fibre ou micro-encapsulation. Les enzymes sont retenues dans les réseaux du gel tandis que les substrats et les produits sont autorisés à traverser, ce qui réduit la fuite des enzymes, améliore la stabilité et permet la génération de réactions enzymatiques. Comme il n'y a pas de liaisons covalentes entre les enzymes et les matrices de support, les conformations enzymatiques sont maintenues, assurant les activités catalytiques élevées.

Cependant, des barrières de diffusion peuvent empêcher les substrats macromoléculaires de traverser les réseaux, ce qui est un désavantage de cette technique. Outre l'occlusion dans les réseaux polymères, les charpentes métalliques (MOF = Metal organic framework) ont été récemment développées pour intégrer des enzymes. Le squelette imidazolate zéolitique (ZIF-8) est couramment utilisé pour piéger l'enzyme. De plus, la polyvinylpyrrolidone (PVP) est généralement utilisée comme dispersant et stabilisant pour protéger l'enzyme de l'inactivation par un solvant organique. L'enzyme protégée par PVP est mélangée avec du nitrate de zinc et du 2-méthylimidazole pour synthétiser le MOF intégré à l'enzyme



**Figure 48: Différentes méthodes d'inclusion des enzymes**

Avantage de la méthode de piégeage :

- Rapide
- Bon marché (matrice à faible coût disponible)
- Des conditions douces sont requises
- Moins de chance de changement de conformation de l'enzyme

Inconvénient de la méthode de piégeage :

- Fuite d'enzyme
- Limitation de la diffusion des pores
- Risque de contamination microbienne

### 2.2.2. Méthodes chimiques

#### a) Couplage covalent

La fixation covalente est une méthode conventionnelle pour l'immobilisation des enzymes. Dans cette méthode, des liaisons covalentes sont formées par réactions chimiques entre les matériaux de support (matrice) et les groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés des enzymes, tels que la lysine, la cystéine ou l'acide aspartique et glutamique. De plus, les groupes fonctionnels des groupes amino, carboxyliques, imidazole, indolyse et hydroxyle et phénoliques sont aussi favorables à la formation de liaisons covalentes. Les liaisons covalentes sont stables et donc peuvent éviter la fuite d'enzymes du support matriciel améliorant ainsi la stabilité des enzymes immobilisées. Cependant, les sites actifs enzymatiques peuvent être inactivés en raison des réactions chimiques entre les molécules enzymatiques et le support matriciel, ce qui entraînera des diminutions des activités catalytiques. Le dicyclohexylcarbodiimide, diazotation, bromure du cyanogène et le glutaraldéhyde sont utilisés comme matrice pour le couplage covalent.

La méthode au dicyclohexylcarbodiimide est connue sous forme de chlorhydrate de 1-éthyl-3-(diméthyl-aminopropyl) carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS). L'EDC et le NHS ont été utilisés comme catalyseurs pour faciliter les réactions de couplage des amines, favorisant ainsi la fixation covalente des lysozymes aux couches de polyamide carboxylé. Les liaisons amide sont formées en raison des réactions entre les groupes carboxyle des couches de polyamide et les groupes amino des enzymes.

La méthode de couplage au glutaraldéhyde est la plus couramment utilisée pour immobiliser les enzymes sur des matrices à fonction amino basée sur la réaction de base de Schiff. Dans ce processus, un groupe aldéhyde de la molécule de glutaraldéhyde a réagi avec le groupe amino de la molécule d'enzyme, et l'autre groupe aldéhyde a réagi avec le groupe amino de la matrice (Figure 49).

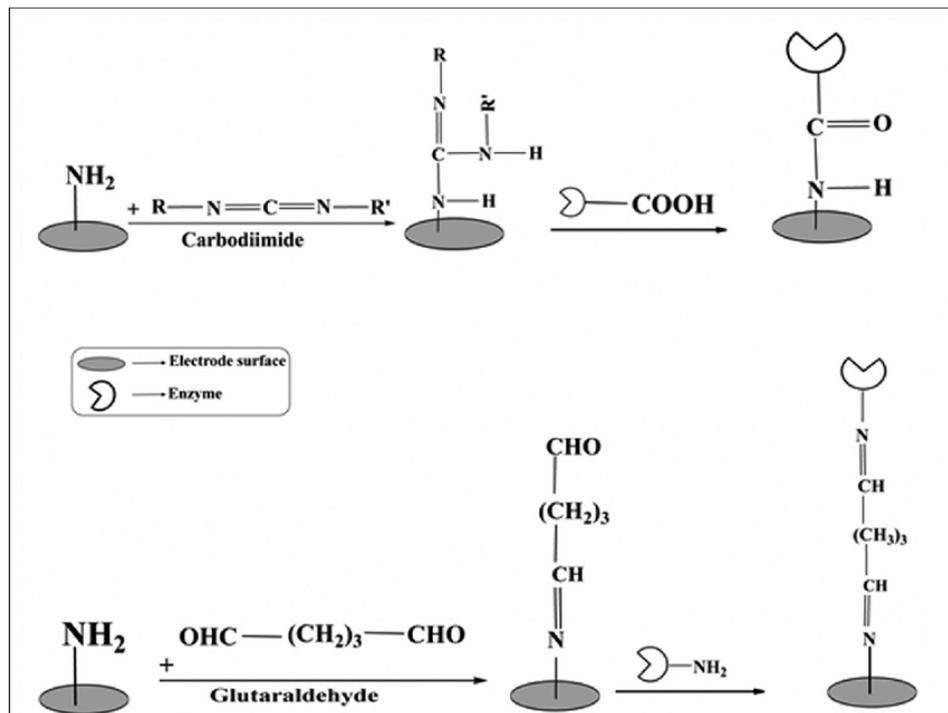


Figure 49 : Couplage covalent par carbodiimide et glutaraldehyde

Avantage de la méthode de liaison covalente :

- Forte liaison de l'enzyme au support
- Pas de problème de fuite ou de désorption
- Méthode relativement simple
- Une variété de supports avec différents groupes fonctionnels disponibles
- Large applicabilité

Inconvénient de la méthode de liaison covalente :

- Modification chimique de l'enzyme conduisant à une perte de conformation fonctionnelle
- Inactivation enzymatique par changement de conformation lorsqu'elle subit des réactions au site active (Ceci peut être surmonté par l'immobilisation en présence d'un substrat enzymatique ou d'un inhibiteur compétitif)

### b) La réticulation

Sur la base de réactions intermoléculaires, les enzymes sont réticulées en les matrices de support à l'aide de réactifs bifonctionnels. Dans cette méthode, avec des liaisons covalentes,

les enzymes sont fermement immobilisées pour améliorer la réutilisabilité et la stabilité. Cependant, les enzymes peuvent perdre leurs activités catalytiques au cours du processus de réticulation. Le glutaraldéhyde, l'isocyanate et le N, N0-éthylène bis maléimide sont les réactifs bifonctionnels couramment utilisés, parmi lesquels le glutaraldéhyde est le plus couramment utilisé. De plus, les enzymes peuvent être réticulées les unes aux autres pour former les agrégats enzymatiques réticulés (CLEA).

Pour la préparation des CLEA, les précipitants doivent d'abord être utilisés pour l'agrégation des enzymes, puis à l'aide de réactifs bifonctionnels, les enzymes agrégées sont réticulées les unes aux autres (Figure 50). Après agrégation, les sites actifs enzymatiques sont protégés, préservant ainsi les activités catalytiques. Le sulfate d'ammonium à 75 % a été utilisé pour précipiter la peroxydase de raifort (HRP), puis en utilisant du glutaraldéhyde ou de l'éthylène glycol-bis (acide succinique N-hydroxysuccinimide) comme agent de réticulation, les HRP-CLEA ont été formés. Les HRP-CLEA résultants ont été utilisés pour dégrader les polluants et conservent près de 60% de leurs activités initiales après 7 cycles répétés.

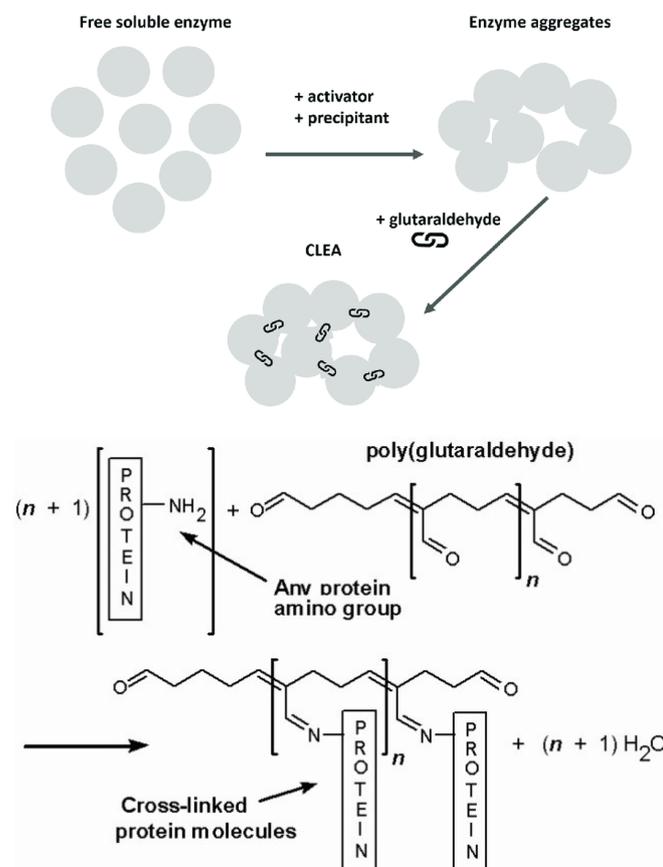


Figure 50 : Réticulation des enzymes en utilisant le glutaraldéhyde

Avantage de la méthode de réticulation :

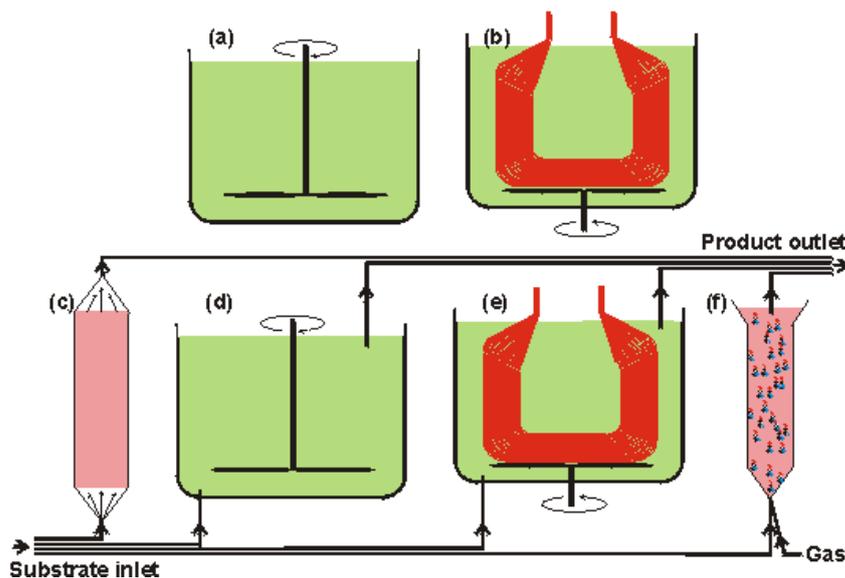
- Principalement utilisé comme moyen de stabiliser l'enzyme adsorbée et également pour empêcher les fuites

Inconvénient de la méthode de réticulation :

- La réticulation peut entraîner une modification significative du site actif de l'enzyme, ce qui peut conduire à une perte d'activité

### 2.3. Réacteurs d'enzymes

Un réacteur enzymatique se compose d'un récipient, ou d'une série de récipients, utilisé pour effectuer la transformation souhaitée par voies enzymatiques. Quelques types de réacteurs sont représentés sur la figure 51.



**Figure 51: Différents types de réacteurs enzymatiques.** a. Réacteur discontinu à réservoir agité (STR), qui contient la totalité de l'enzyme et des substrats jusqu'à ce que la conversion soit terminée ; b. réacteur à membrane discontinu (MR), où l'enzyme est maintenue dans des tubes à membrane qui permettent au substrat de se diffuser à l'intérieur et au produit de se diffuser à l'extérieur. Ce réacteur peut souvent être utilisé de manière semi-continue, en utilisant la même solution enzymatique pour plusieurs lots ; c. un réacteur à lit fixe (PBR), également appelé réacteur à écoulement piston (PFR), contenant un lit décanté de particules d'enzymes immobilisées ; d. Réacteur à cuve agitée à flux continu (CSTR) qui est une version à fonctionnement continu de (a); (e) un réacteur à membrane à flux continu (CMR) qui est une version à fonctionnement continu de (b); e. réacteur à lit fluidisé (FBR), où le flux de gaz et/ou de substrat maintient les particules d'enzymes immobilisées dans un état fluidisé.

Tous les réacteurs auraient en outre des serpents de chauffage/refroidissement (intérieur dans les réacteurs (a) et (d) et extérieur, généralement, dans les réacteurs (b), (c), (e) et (f)) et les réacteurs agités peuvent contenir des barrières afin d'augmenter (réacteurs (a), (b),

(d) et (e) ou diminuer (réacteur (f)) l'efficacité d'agitation. Les réacteurs continus ((c) -(f)) peuvent tous être utilisés dans un mode de recyclage où une partie, ou la plupart, du flux de produit est mélangé avec le flux de substrat entrant. Tous les réacteurs peuvent utiliser des enzymes immobilisées. De plus, les réacteurs (a), (b) et (e) (plus les réacteurs (d) et (f), si des membranes semi-perméables sont utilisées à leurs sorties) peuvent être utilisés avec l'enzyme soluble.

Plusieurs facteurs importants déterminent le choix du réacteur pour un procédé particulier. En général, le choix dépend du :

- Le coût d'une productivité prédéterminée dans les spécifications du produit.
- La forme de l'enzyme (c'est-à-dire libre ou immobilisée), la cinétique de la réaction
- Les propriétés chimiques et physiques d'un support d'immobilisation, y compris s'il est particulaire, membraneux ou fibreux, et sa densité, sa compressibilité, sa robustesse, la taille des particules et la régénéralité.
- Le besoin éventuel du contrôle du pH et de la température, à l'alimentation et à l'élimination des gaz et à la stabilité de l'enzyme, du substrat et du produit.

### 2.3.1. Réacteur à réservoir agité (Stirred-tank reactor : STR)

Le type le plus courant de réacteur enzymatique utilisé aujourd'hui est le STR (**Figure 51.a**). Les principes de fonctionnement des bioréacteurs à cuve agitée sont relativement simples. Les substrats et les enzymes sont introduits dans un réservoir, qui est normalement équipé de chicanes fixes (Barrières) qui améliorent l'efficacité de l'agitation, améliorant ainsi le transfert de masse. Le contrôle de la température et du pH est toujours nécessaire dans les STR pour garantir les conditions optimales des enzymes. La structure de STR est simple ; et à l'intérieur du réacteur, l'enzyme et le substrat peuvent être mélangés facilement, ce qui entraîne une baisse résistance à la diffusion. De plus, le contrôle de STR est facile. Ainsi, STR est idéal pour les applications industrielles - en particulier pour le traitement de substrats avec une viscosité élevée ou une faible solubilité - et peut offrir aux fabricants à la fois de faibles coûts d'investissement et de faibles coûts d'exploitation. D'autre part, STR présente certains inconvénients tels qu'une faible efficacité de réaction, un apport d'énergie élevé nécessaire pour l'agitation et la nécessité de séparer les enzymes des produits une fois que la bioréaction souhaitée a eu lieu. En fonction du mode de fonctionnement, le STR peut être classé en tant que réacteur à réservoir agité discontinu (BSTR) et réacteur à réservoir agité continu (CSTR)

**a) Réacteur à réservoir agité discontinu (BSTR)**

Le BSTR est le type de réacteur le plus simple. En fait, la configuration de réacteur la plus simple pour toute réaction enzymatique est le mode batch (discontinu). Un réacteur discontinu idéal est supposé être bien mélangé de sorte que le contenu soit de composition uniforme à tout moment. BSTR est l'un de ces réacteurs dans lequel tout le produit est retiré, aussi rapidement que cela est pratiquement possible, après un temps déterminé. Enzymes libres et immobilisées peuvent être utilisées dans BSTR. Le BSTR est utile pour les solutions de substrat à haute viscosité et pour les enzymes immobilisées avec une activité relativement faible. Cependant, un problème qui se pose toujours c'est qu'une enzyme immobilisée a tendance à se décomposer lors d'une agitation physique. Le système discontinu est généralement adapté à la production de quantités relativement faibles de produits chimiques.

**b) Réacteur à réservoir agité continu (CSTR)**

Le CSTR est un réacteur idéal avec une alimentation continue de réactifs basés sur l'hypothèse que le contenu du réacteur est bien mélangé (**Figure 51.d**). Le courant de substrat est pompé en continu dans le réacteur et en même temps le courant de produit est retiré. Par conséquent, les concentrations des divers composants du flux de sortie sont supposées être les mêmes que les concentrations de ces composants dans le réacteur. Le CSTR est un réacteur facile à construire, polyvalent et bon marché, qui permet une charge simple de biocatalyseur et remplacement. Comparé au BSTR, le CSTR est plus efficace ; mais l'équipement est relativement plus compliqué.

Le coût élevé des enzymes empêche toujours leur ajout continu à l'alimentation d'un CSTR ; par conséquent, l'enzyme doit être conservée dans le réacteur. Pour cela, la méthode la plus courante consiste à utiliser un réacteur combiné CSTR/UF, qui est une combinaison d'un CSTR avec une unité d'ultrafiltration. Un dispositif à membrane d'ultrafiltration continue est ajouté à la sortie du CSTR ; ainsi le produit traverse l'unité d'ultrafiltration, où l'enzyme est retirée et recyclée dans le réacteur. Un dispositif à fibres creuses peut également être utilisé, et ses caractéristiques sont essentiellement les mêmes que celles d'une membrane d'ultrafiltration. La combinaison de la membrane CSTR et UF convient pour un substrat de poids moléculaire élevé et un produit de faible poids moléculaire. Alternativement, l'immobilisation de l'enzyme dans un culot maintenu dans le réacteur est une autre solution. Parfois, des particules magnétiques

sont utilisées pour immobiliser les enzymes, ce qui facilite la séparation des enzymes du réacteur par un champ magnétique.

### 2.3.2. Réacteurs membranaires (MR)

Le réacteur membranaire (**Figure 51.e**) est une combinaison fonctionnelle de catalyse enzymatique et de séparation membranaire. La principale exigence d'un MR est une membrane semi-perméable qui permet le libre passage des molécules de produit mais contraint les molécules d'enzyme. Le MR peut être utilisé en mode batch ou continu et permet une séparation facile de l'enzyme du produit. Si un substrat est capable de diffuser à travers la membrane, il peut être introduit de part et d'autre de la membrane par rapport à l'enzyme, sinon il doit se trouver dans le même compartiment que l'enzyme. Nous avons déjà discuté d'un cas simple de MR en tant que combinaison d'unités CSTR et UF, qui convient le plus souvent les enzymes libres. La différence dans ce modèle se produit principalement dans les configurations où le flux de substrat est du côté de la membrane opposée à celle de l'enzyme et la réaction est sévèrement limitée par sa diffusion à travers la membrane et la diffusion des produits en sens inverse. Dans ces circonstances, la réaction peut être encore plus sévèrement affectée par l'inhibition du produit.

Le choix habituel pour MR est un réacteur à fibres creuses constitué d'un module préformé contenant des centaines de fibres tubulaires minces ayant chacune un diamètre intérieur de ~200-300  $\mu\text{m}$  et un diamètre extérieur de ~300-900  $\mu\text{m}$ . La diffusion du substrat à travers la paroi tubulaire lui permet de faire contact avec l'enzyme gélifiée et être transformé en produit. La diffusion ultérieure du produit facilite la séparation pour sa récupération. Sous l'influence de la pression différentielle le long de la paroi tubulaire, le produit s'écoule à l'intérieur des tubes, éventuellement collecté au niveau d'un collecteur multitube.

Les avantages de la RM sont les suivants : (1) en raison de la facilité avec laquelle les systèmes de RM peuvent être mis en place, ils sont souvent utilisés pour la production à petite échelle (grammes à kilogrammes), en particulier lorsqu'un système multienzymatique ou une régénération de coenzyme est nécessaire et (2) MR permet un remplacement facile des enzymes dans les processus impliquant des enzymes particulièrement labiles et il peut également être utilisé pour les réactions biphasiques. Les principaux inconvénients de la RM sont le coût des membranes, l'encrassement des membranes et le besoin de changer les membranes à intervalles réguliers.

### 2.3.3. Réacteurs à support particulaire (PBR)

Le PBR est une sorte de réacteur rempli d'enzymes immobilisées, dans lequel le substrat pénètre à une extrémité d'un tube cylindrique et le flux de produit part à l'autre extrémité (**Figure 51.c**). La caractéristique la plus importante d'un PBR est que la solution de réaction s'écoule à travers le réacteur sous la forme d'un écoulement piston ; ils sont donc aussi appelés réacteurs pistons (PFR). Le tube long et l'absence de dispositif d'agitation empêche le mélange complet du fluide dans le réacteur. Idéalement tous le courant de substrat s'écoule à la même vitesse, parallèlement à l'axe du réacteur sans rétro-mélange. Afin de produire une prise idéale dans les PBR, un régime d'écoulement turbulent est préféré à un écoulement laminaire, car cela entraîne un mélange amélioré et un transfert de chaleur normal à le débit et un rétro-mélange axial réduit. En raison du type d'écoulement à l'intérieur du réacteur, il est également appelé réacteur enzymatique à écoulement tubulaire.

Généralement, des enzymes immobilisées sont utilisées dans le PBR. Le PBR continu (CPBR) est le réacteur le plus largement utilisé pour les enzymes, qui présentent les avantages suivants par rapport à un PBR batch : facilité de contrôle et d'exploitation automatiques ; réduction des coûts de main-d'œuvre ; stabilisation des conditions opératoires, et facilité de contrôle qualité des produits. Un avantage significatif du PBR est que des concentrations élevées d'enzymes immobilisées peuvent être utilisées. Avec l'enzyme immobilisée dans le lit du réacteur, la solution du substrat pour la conversion est passée à travers pour la conversion en produit. Le produit est collecté en continu comme effluent du bioréacteur. Concernant l'efficacité de conversion du PBR, tout degré requis de la réaction peut être réalisée en utilisant un PBR idéal avec une longueur appropriée. En outre, par rapport au CSTR, les PBR sont les réacteurs préférés pour les processus impliquant l'inhibition du produit, l'activation du substrat et la réaction réversible.

Les inconvénients du PBR sont les suivants :

1. La conception des PBR ne permet ni de contrôler le pH, ni la température lorsqu'il y a est une production de chaleur excessive, un problème qui peut être particulièrement visible dans les réacteurs à grande échelle.
2. Les concentrations du substrat et du produit changent le long du réacteur.

3. Les enzymes immobilisées sont facilement encrassées par la formation colloïdale ou les précipités, d'où la question du nettoyage ou du changement les enzymes immobilisées apparaissent.

4. Un cercle vicieux de contre-pression accrue, de déformation des particules et de débit restreint peut éventuellement entraîner l'absence de débit du tout par le PBR

5. Des canaux peuvent se former dans le lit du réacteur en raison d'une chute de pression excessive, d'un tassement irrégulier ou d'un chargement inégal du substrat, provoquant des différences de débit à travers le lit.

#### 2.4. Application des enzymes immobilisées

La figure 52 montre l'application des enzymes immobilisées dans différents domaines industriels.

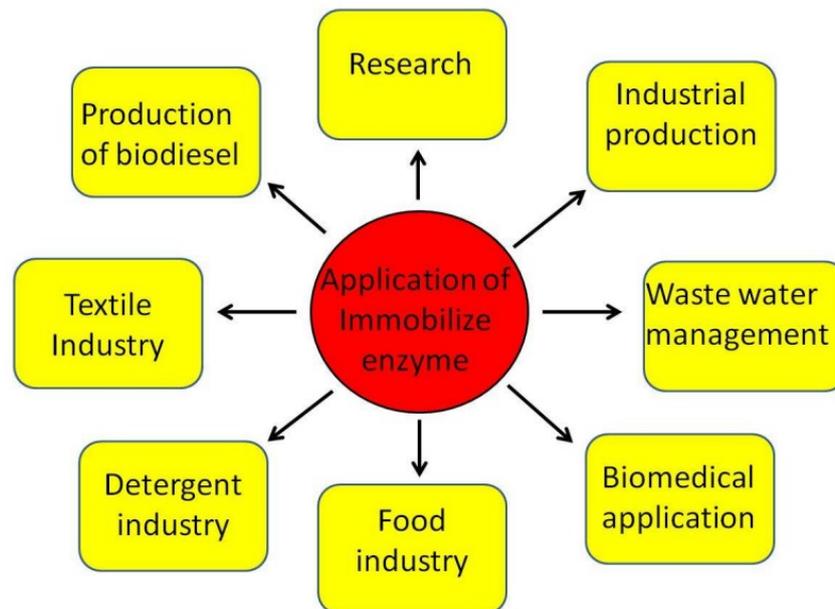
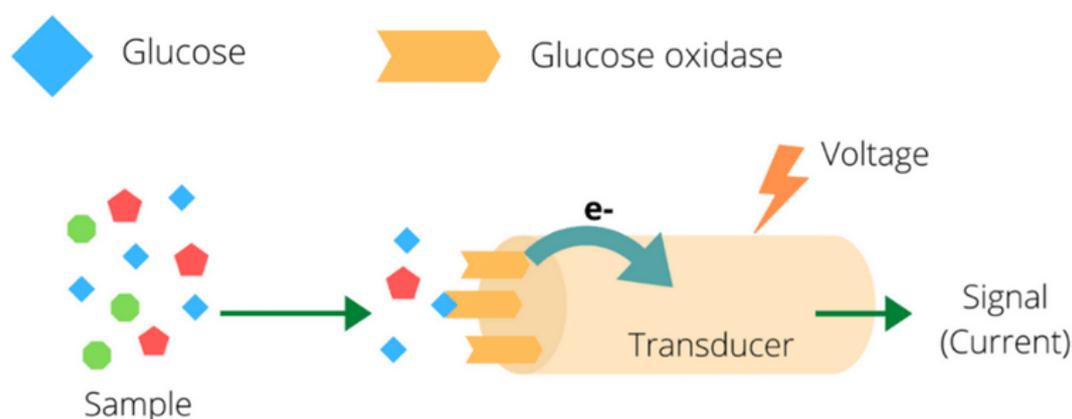


Figure 52 : Application des enzymes immobilisées dans différents domaines

##### 1. Application biomédicale

Biocapteur: Les biocapteurs sont des dispositifs de surveillance électroniques qui utilisent la spécificité d'une enzyme et la technique d'immobilisation d'enzymes pour détecter des espèces biologiques comme le glucose et l'urée dans des mélanges complexes (sang, urine) (Figure 53).



**Figure 53 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur de glucose**

Le biocapteur idéal est celui qui a la capacité de détecter de faibles concentrations des analytes, d'interpréter les résultats instantanément et également la capacité de différencier les espèces en fonction des molécules de reconnaissance piégées à sa surface.

D'autres applications incluent, la détection de toxines dans les aliments et l'eau, les produits pharmaceutiques, la surveillance environnementale et les industries alimentaires et agricoles. Les biocapteurs (à base d'enzymes) sont également utilisés pour détecter des analytes tels que les métaux lourds, les pesticides organophosphorés et organochlorés, les glycoalcaloïdes et les insecticides.

## 2. Applications industrielles des enzymes immobilisées

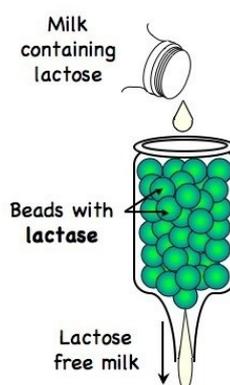
Certaines enzymes immobilisées sont utilisées pour la synthèse des antibiotiques. En utilisant l'enzyme pénicilline acylase/amidase immobilisée pour produire de l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) par désacylation de la chaîne latérale dans la pénicilline G ou V. Il s'agit de l'application la plus importante des enzymes immobilisées dans l'industrie pharmaceutique. Le tableau 8 montre des exemples d'enzymes immobilisées utilisées pour la synthèse de divers antibiotiques.

**Tableau 8 : Production d'antibiotiques par des enzymes immobilisées**

Enzymes	Support d'immobilisation	Antibiotique produit
Penicillin acylase d' <i>E. coli</i>	Polyacrylamide	Cephalexin
Penicillin G acylase	Membrane nylon hydrolon	Cephalexin
Penicillin G acylase d' <i>E. coli</i>	Silica gel	6-APA
Acetyl xylan esterase	CKEAs using glutaraldehyd	Desacetyl $\beta$ -lactam

### 3. Enzymes immobilisées dans l'industrie alimentaire

Les enzymes immobilisées sont utilisées dans le traitement des échantillons d'aliments et leur analyse. Par exemples ces enzymes (lactase) sans utilisées pour la production de lait sans lactose (Figure 9). De la même manière la glucose isomérase est utilisée pour transformer le glucose en fructose et produire du sirop de fructose.



**Figure 54 : Production de lait sans lactose en utilisant la lactase immobilisée**

### 4. Production de biodiesel

Le biodiesel a gagné en importance pour sa capacité à remplacer les combustibles fossiles qui risquent de s'épuiser d'ici un siècle. Le biodiesel est un carburant liquide produit par triglycérides et estérification d'alcool en présence de catalyseur. La production de biodiesel par

immobilisation de lipase réduit le coût car elle peut être utilisée à plusieurs reprises et a plus de stabilité.

### **5. Enzymes immobilisées pour la bioremédiation**

La biorestauration est une technique qui implique l'utilisation d'enzymes et d'organismes biologiques pour éliminer les polluants d'un site contaminé. Le traitement des eaux usées est de la plus haute importance car les industries augmentent à un rythme rapide et donc leurs effluents dans l'environnement. Les effluents des industries du textile, du papier, du cuir sont riches en colorants, cancérigènes même à faible concentration. Ainsi, des enzymes comme la peroxydase, la laccase, l'azoréductase, etc., peuvent jouer un rôle important pour dégrader ces colorants. Mais en raison de conditions environnementales difficiles, ces enzymes perdent leur activité, et donc l'utilisation de système d'immobilisation de traitement de l'eau à base d'enzymes est un moyen idéal.

## Chapitre VI : Utilisation des enzymes en chimie fine

### 1. Produits chimiques fins

Le principe sous-jacent à la définition du terme « chimie fine » est une segmentation à trois niveaux de l'univers des produits chimiques en matières premières, chimie fine et chimie de spécialité. La chimie fine représente la plus petite partie, environ 4% du chiffre d'affaires total de 2500 milliards de dollars de l'industrie chimique mondiale.

**Les produits de base** (matières premières) sont des produits chimiques de grand volume, à bas prix, homogènes et standardisés, produits dans des usines dédiées et utilisés pour une grande variété d'applications. Les prix, généralement inférieurs à 1 \$/kg, sont cycliques et totalement transparents. Les produits pétrochimiques, les produits chimiques de base, les produits chimiques lourds organiques et inorganiques, les monomères (en grand volume), les fibres de base et les plastiques font tous partie des produits de base. Des exemples typiques de produits isolés sont l'éthylène, le propylène, l'acrylonitrile, caprolactame, méthanol, toluène, o-xylène, anhydride phtalique, poly(chlorure de vinyle) soude et acide sulfurique.

**La chimie fine** est une substance chimique complexe, unique et pure. Ils sont produits en quantités limitées (jusqu'à 1000 MT par an) dans des usines polyvalentes par des procédés chimiques ou biotech(nologiques) en lots multiples. Ils sont basés sur des spécifications rigoureuses, sont utilisés pour un traitement ultérieur dans l'industrie chimique et sont vendus à plus de 10 \$/kg. Ces composés peuvent être des blocs de construction, des intermédiaires avancés ou des ingrédients actifs dans la synthèse chimique. Des exemples typiques de produits uniques sont les  $\beta$ -lactames, les imidazoles, les pyrazoles, les triazoles, les tétrazoles, les pyridines, les pyrimidines et d'autres composés N-hétérocycliques.

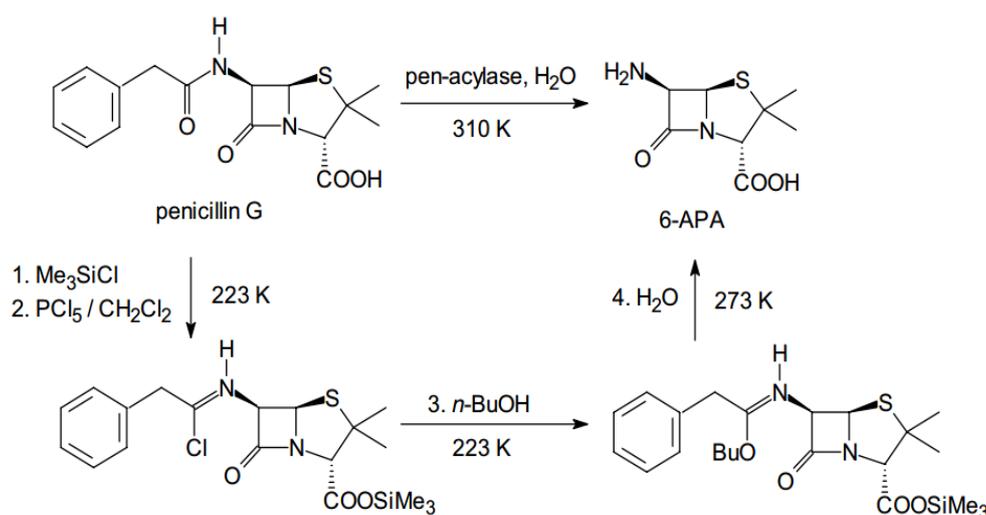
### Biocatalyse

La biocatalyse présente de nombreuses caractéristiques intéressantes, notamment dans le cadre de la réduction des déchets. Les catalyseurs enzymatiques sont biodégradables et dérivés de ressources renouvelables. Les réactions biocatalytiques sont généralement effectuées dans des réacteurs à cuve agitée, de sorte qu'aucun équipement spécialisé n'est nécessaire, bien que dans des cas spécifiques d'autres types de réacteurs sont préférés. Habituellement, les conditions de réaction sont douces et un solvant compatible avec l'environnement, l'eau, est utilisé. L'utilisation d'enzymes contourne souvent le besoin d'étapes de protection et de déprotection des groupes fonctionnels.

### Exemple Pratique

Un excellent exemple est la production d'acide 6-amino pénicillinique (6-APA) à partir de la pénicilline G (Figure 1). La voie chimique est connue sous le nom du clivage de Delft, cette désacylation chimique était difficile à exécuter car la pénicilline G contient à la fois un groupe fonctionnel amide secondaire et tertiaire, le premier étant le site de clivage souhaité mais le dernier étant plus sensible au clivage chimique. D'autres inconvénients de cette voie sont qu'elle nécessite quatre étapes chimiques, une température très basse ( $-50^{\circ}\text{C}$ ), divers réactifs stoechiométriques, dont le pentachlorure de phosphore ( $\text{PCl}_5$ ) hautement réactif et dangereux, et l'utilisation d'un solvant indésirable ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). En revanche, l'hydrolyse enzymatique de la pénicilline G en 6-APA en utilisant la pénicilline acylase immobilisée (pen-acylase) se déroule en une étape à température ambiante ( $37^{\circ}\text{C}$ ) et avec de l'eau comme solvant (**Figure 53**).

Une caractéristique intéressante de la biocatalyse est qu'il est possible d'atteindre des chimio-, régio- et stéréosélectivités qui sont difficiles ou impossibles à atteindre par des moyens chimiques.



**Figure 55 : Comparaison de la production chimique complexe et enzymatique en une étape de l'acide 6-amino pénicillinique. Me = méthyle ( $\text{CH}_3$ ), Bu = butyle ( $\text{C}_4\text{H}_9$ ).**

## 2. Sélectivité

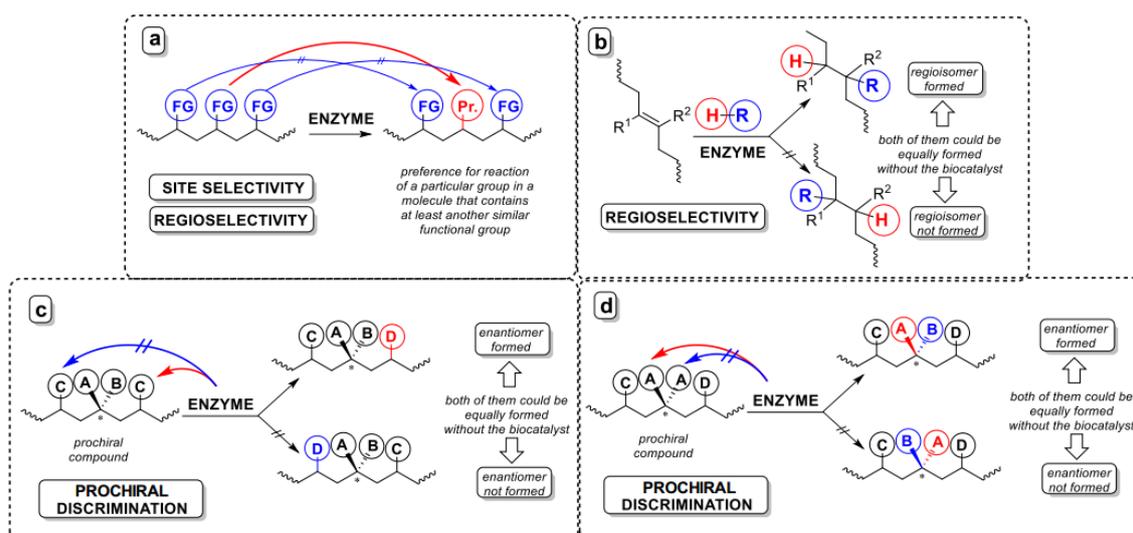
En synthèse organique, trois types de sélectivité, à savoir la chimiosélectivité, la régiosélectivité et la stéréosélectivité, y compris l'énantiosélectivité, ont toujours été reconnues comme importantes. La sélectivité peut être obtenue en choisissant des matières premières, des réactifs, des solvants, des conditions de réaction et, plus important encore, des catalyseurs appropriés.

### 2.1. Chimio-sélectivité

La chimiosélectivité est le résultat préférentiel d'une réaction par rapport à un ensemble d'autres réactions possibles, à partir des mêmes réactifs. Un exemple est l'hydrogénation partielle sélective d'un alcyne ( $C\equiv C$ ) en l'alcène correspondant ( $C=C$ ), mais pas plus loin en l'alcane ( $C-C$ ). Dans une autre définition, la chimiosélectivité fait référence à la réactivité sélective d'un groupe fonctionnel en présence d'autres. Ce type de chimio-sélectivité est traditionnellement obtenu en protégeant un ou plusieurs groupements, bloquant ainsi leur réactivité. Cependant, cela ajoute des étapes supplémentaires à la synthèse et puisque les réactions de protection et de non-protection donnent rarement des rendements de 100 %, des matériaux précieux peuvent être perdus.

### 2.2. Régiosélectivité

La régiosélectivité est la préférence d'une direction de création ou de rupture de liaison chimique par rapport à toutes les autres directions. Il s'applique à la formation de molécules qui ont la même formule moléculaire mais diffèrent par la façon dont leurs atomes sont connectés. Pour ces substrats homo-multifonctionnels, le terme régiosélectivité décrit la préférence pour la réaction d'un atome ou d'un groupe particulier dans une molécule qui contient au moins un atome ou groupe du même type (**figure 54.a**). Ce type de régiosélectivité est souvent appelé sélectivité de site, afin de le distinguer de la capacité de former un régioisomère principalement à partir de l'autre sur en plus d'une liaison multiple (**Figure 54.b**). La capacité de reconnaître la prochiralité lors de la conversion d'un seul des groupes adjacents au centre stéréogénique (**figure 54.c**) ou d'un seul des groupes fonctionnels attachés à un centre pro-stéréogénique (**figure 54.d**) est également remarquable, dans chaque cas conduisant principalement à un énantiomère par rapport à l'autre. Dans ce cas, conjointement avec une bonne activité enzymatique, il est nécessaire que l'enzyme présente la sélectivité souhaitée pour donner le produit cible, et la spécificité souhaitée ; c'est-à-dire la capacité de reconnaître le substrat initial mais pas le premier produit de réaction et d'arrêter la réaction à ce stade.



**Figure 56 : Représentation schématique de la capacité de reconnaissance enzymatique des substrats polyfonctionnels.**

(a) régiosélectivité (généralement appelée sélectivité de site) dans la transformation de certains groupes fonctionnels (FG, en bleu) en un produit (Pr en rouge) sans en altérer les autres ; (b) régiosélectivité lors de l'ajout d'un réactif asymétrique (R-H) à une double liaison asymétrique ; (c) discrimination prochirale par transformer seulement un groupe fonctionnel adjacent au centre stéréogène; (d) discrimination prochirale en ne transformant qu'un groupement fonctionnel directement rattaché au centre pro-stéréogénique.

### 2.3. Énantiosélectivité

Dans la production de produits chimiques fins, et en particulier de produits pharmaceutiques, il existe un intérêt croissant pour la production de composés chiraux purs constitués d'un seul énantiomère (isomère optique). Dans les produits pharmaceutiques, il n'est souvent pas sûr d'utiliser des mélanges d'énantiomères ; l'effet recherché réside presque toujours dans un seul des énantiomères, tandis que l'autre énantiomère est inactif ou a même un effet néfaste. Un bon exemple est le Thalidomide (avec plus de 50 noms commerciaux, dont Softenon, Contergon et Distoval) (**Figure 55**) qui a été introduit comme médicament sédatif à la fin des années 1950 et était généralement utilisé par les femmes enceintes comme traitement des nausées matinales. Cependant, le médicament s'est avéré causer des graves défauts de naissances, qui ont été attribué à l'énantiomère (S), et en 1961, la thalidomide a été retirée du marché.

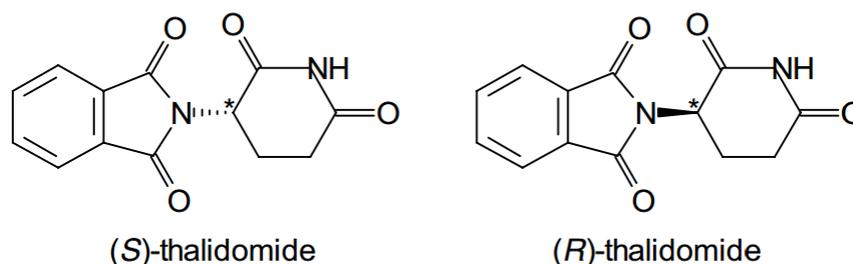


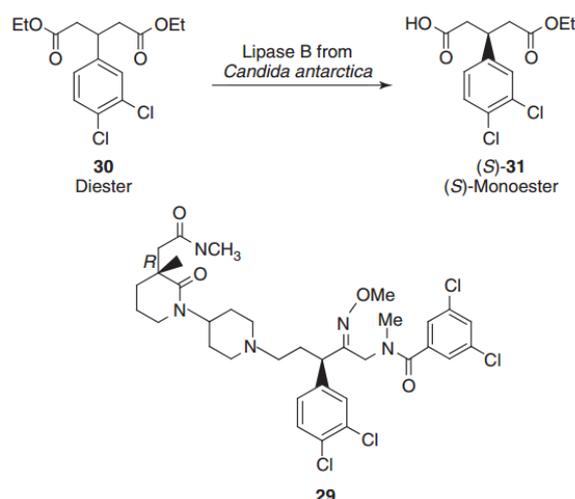
Figure 57 : Enantiomère du Thalidomide, S-Thalidomide (Thérapeutique), R-Thalidomide (Toxique)

### 3. Exemples d'application

#### 3.1. Lipase

##### Antagonistes doubles NK1/NK2 : Désymétrisation enzymatique du diéthyle 3-[3',4'-dichlorophényl] glutarate

Les tachykinines sont un groupe d'hormones neuropeptidiques biologiquement actives qui sont largement distribuées dans tout le système nerveux. Ils sont impliqués dans une variété de processus biologiques tels que la transmission de la douleur, l'inflammation, la vasodilatation et la sécrétion. L'effet des tachykinines est modulé via des récepteurs couplés aux protéines G tels que la neurokinine 1 (NK1) et la neurokinine 2 (NK2). Ainsi, les antagonistes des récepteurs NK non peptidiques sont potentiellement utiles dans le traitement d'une variété de maladies chroniques comprenant l'asthme, le bronchospasme, l'arthrite et la migraine. La relation structure-activité de plusieurs antagonistes non peptidiques NK1/NK2 a conduit à la découverte d'une nouvelle classe d'agents à base d'oxime, antagonistes doubles de NK1/NK2 tels que le composé 29 (**Figure 56**). L'activité biologique du composé 29 (**Figure 56**) réside principalement dans le R,R-diastéréoisomère. Un procédé enzymatique de désymétrisation du diéthyle 3-(3',4'-dichlorophényl) glutarate prochiral (composé 30 **figure 56**) en (S)-monoester (composé 31 **figure 56**) correspondant a été développé en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* avec l'enzyme libre ou immobilisée. À 100 g/L d'entrée de substrat, un rendement de réaction de 97 % a été obtenus pour le (S)-monoester souhaité. Le processus a été étendu pour produire 200 kg de produit avec un rendement isolé global de 80 %.

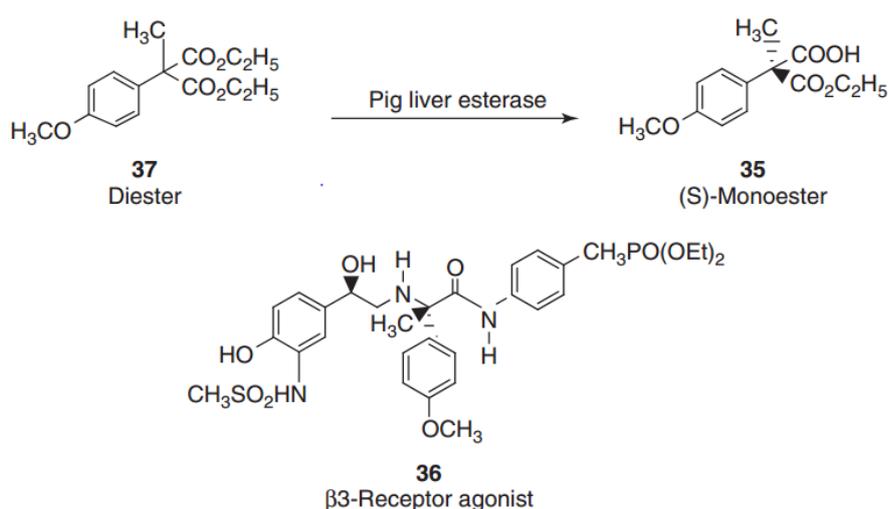


**Figure 58: Antagonistes doubles NK1/NK2 : Désymétrisation enzymatique du diéthyle 3-[3',4'-dichlorophényl] glutarate par la lipase B.**

### 3.2. Estérase

#### Agoniste des récepteurs $\beta_3$ : désymétrisation du diéthyle méthyl-(4-méthoxyphényl) propanedioate

Le (S)-monoester 35 (**figure 57**) est un intermédiaire clé pour la synthèse des agonistes des récepteurs  $\beta_3$  36 (**figure 57**). L'hydrolyse enzymatique énantiosélective du diester 37 (**figure 57**) en l'ester acide souhaité 35 par l'estérase hépatique de porc a été démontrée. Les rendements de réaction dépendent du cosolvant utilisé. Des rendements élevés (> 91 %) ont été obtenus avec du méthanol, de l'éthanol et du toluène comme cosolvants. L'éthanol a donné le rendement de réaction le plus élevé (96,7 %) pour l'ester acide souhaité 35 (**Figure 57**).



**Figure 59: Agoniste des récepteurs  $\beta_3$  : désymétrisation du diéthyl méthyl-(4-méthoxyphényl) propanedioate**

#### 4. Marqueurs d'affinité

Les méthodes utilisées pour étudier les sites actifs permettent le développement de médicaments très spécifiques visant les résidus catalytiques du site actif d'une enzyme. Les marqueurs d'affinité sont des analogues de substrat qui réagissent avec un ou plusieurs des acides aminés qui composent le site actif ; la détermination de la séquence de l'enzyme marquée permet l'identification des acides aminés du site actif avec précision.

Un marqueur d'affinité (RL) consiste en 1) une substance biologiquement active (R) (ligand ou analogue de substrat) capable de former un complexe réversible avec une protéine donnée (P), et 2) un groupe partant correctement positionné, chimiquement ou photochimiquement réactif (L) (Figure 57). Lors de l'incubation, le marqueur d'affinité interagit avec son homologue protéique (enzyme) par acylation ou alkylation des groupes nucléophiles des chaînes latérales des acides aminés, entraînant la formation d'un complexe protéine-ligand irréversible. Ce processus est illustré dans la figure 58 et décrit dans la formule suivante :

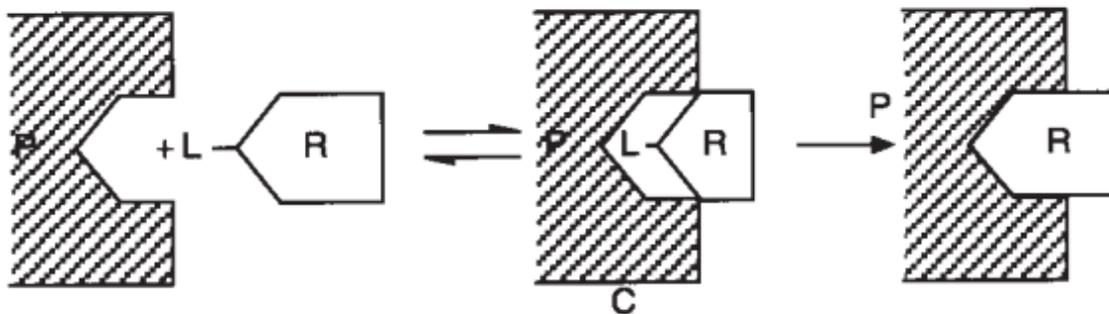
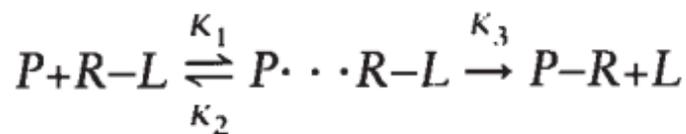


Figure 60 : Complexe irréversible marqueur d'affinité-enzyme

La formation du complexe réversible initial ( $P \cdot \cdot \cdot R-L$ ) augmente la concentration locale du réactif au site actif par rapport à sa concentration en solution. Cela garantit que la réaction de marquage aura lieu au site de liaison et pas ailleurs. Après la formation du complexe réversible ( $P \cdot \cdot \cdot R-L$ ), un ou plusieurs groupes fonctionnels au site actif réagissent chimiquement avec le marqueur d'affinité (L), ce qui entraîne une liaison covalente pour former P-R. La protéine marquée par affinité est soit totalement soit partiellement inactivée en raison de la formation de liaison covalente. Les critères expérimentaux d'un bon marqueur d'affinité sont les suivants:

- 1) Sa réaction avec une protéine donnée doit conduire à une inactivation concomitante de l'activité de liaison réversible.
- 2) Il ne doit pas marquer de manière significative des protéines non apparentées (Spécificité).
- 3) Il devrait faciliter la localisation précise de la liaison covalente dans le site actif de la protéine.

Lors de la planification d'un réactif de marquage d'affinité, il faut s'assurer que le groupe réactif (L) est relativement petit et n'interfère pas de manière significative avec l'interaction protéine-ligand. Il faut également tenir compte de la disponibilité de précurseurs radiomarqués et de la facilité de synthèse et de stabilité. Enfin, le résidu obtenu au laboratoire doit rester stable aux techniques de dégradation afin de permettre son identification.

Puisqu'un agent de marquage d'affinité contient un groupe fonctionnel réactif, non seulement il peut réagir avec le site actif de l'enzyme cible, mais il peut également réagir avec des milliers de nucléophiles associés à de nombreuses autres enzymes et biomolécules dans le corps. Par conséquent, ces inactivateurs sont potentiellement très toxiques. En fait, de nombreux médicaments de chimiothérapie anticancéreuse sont des agents de marquage d'affinité, et ils sont assez toxiques. Donc, ils ne sont pas aussi communs dans la conception de médicaments que d'autres types d'inhibiteurs d'enzymes.

**Exemples :** Les antibiotiques (Pénicillines et céphalosporines/céphamycines) et l'Aspirine (Acide acétyle salicylique) sont des marqueurs d'affinité.

## 5. Marqueurs suicides

Un marqueur suicide est un composé non réactif qui porte une similitude structurale avec le substrat ou le produit d'une enzyme. Une fois que l'inactivateur se lie au site actif, l'enzyme cible, via son mécanisme catalytique normal, convertit le composé inactif en un produit actif qui va inactiver l'enzyme avant de s'échapper du site actif. Par conséquent, ces inactivateurs agissent initialement comme substrats pour l'enzyme cible. Bien que le produit forme généralement une liaison covalente avec l'enzyme cible, elle n'est pas. Cependant, l'enzyme cible doit transformer l'inactivateur en espèce inactivante réelle, et l'inactivation doit avoir lieu avant la libération de cette substance du site actif. Parce qu'il y a une étape supplémentaire dans le processus d'inactivation par rapport à celui d'un marqueur d'affinité. Les deux principales caractéristiques de ce type d'inactivateur qui le différencie d'un agent de marquage d'affinité sont sa non-réactivité initiale et l'exigence pour l'enzyme de catalyser une réaction sur elle, la

convertissant ainsi en un produit, c'est-à-dire l'espèce inactivatrice proprement dite. Souvent, cette espèce d'inactivateur converti est assez réactif, et agit donc comme un agent de marquage d'affinité qui est déjà sur le site actif de l'enzyme cible ne se produit pas nécessairement à chaque fois que le l'inactivateur est transformé en une espèce inactivante ; parfois, il s'échappe du site actif. Le rapport du nombre turnover qui donne un produit libéré par événement d'inactivation, est appelé ratio de partage.

### 5.1. Applications thérapeutiques

Les marqueurs suicide sont des composés non réactifs, et c'est la caractéristique clé qui les rend si propices à la conception de médicaments. Par conséquent, les alkylations et acylations non spécifiques d'autres protéines ne devraient pas être un problème. Dans le cas idéal seulement l'enzyme cible sera capable de catalyser la réaction appropriée pour la conversion de l'inactivateur en l'espèce activée, et l'inactivation se produira à chaque renouvellement, c'est-à-dire que le rapport de partage sera de zéro (aucun métabolite formé par événement d'inactivation). Cela peut être très important pour la consommation potentielle de médicaments. Si le rapport de partage est supérieur à zéro, les espèces activées libérées peuvent réagir avec d'autres protéines, entraînant éventuellement un effet toxique. Dans ce cas, l'inactivateur est appelé un inactivateur métaboliquement activé. Alternativement, l'espèce libérée peut être hydrolysée par le milieu aqueux avant réaction avec d'autres biomolécules, mais le produit formé peut être toxique ou peut être métabolisé en d'autres substances toxiques. Dans les conditions idéales mentionnées ci-dessus, l'inactivateur serait un candidat médicament puissant car il serait hautement spécifique de l'enzyme et faiblement toxique. En fait, la -difluorométhylornithine (éflornithine), un inactivateur basé sur un mécanisme spécifique de l'ornithine décarboxylase, a été administrée à des patients à raison de 30 g par jour pendant plusieurs semaines avec seulement des effets secondaires mineurs.

Dans le domaine thérapeutique les marqueurs suicide comprennent le médicament antidépresseur sulfate de phénelzine (Nardil) et le médicament antihypertenseur, le chlorhydrate d'hydralazine (Apo-Hydral), qui inactivent tous deux la monoamine oxydase.

L'acide clavulanique, un composé utilisé pour protéger les pénicillines et céphalosporines contre la dégradation bactérienne (inactive les bêta-lactamases) ; l'agent antiviral, la trifluridine (Viroptic), qui inactive la thymidylate synthase ; gemcitabine HCl (Gemzar). Un médicament antitumoral qui inactive la ribonucléotide réductase, l'agent antihyperuricémique, l'allopurinol (Aloprim), qui inactive la xanthine oxydase ; et le médicament antithyroïdien, le méthimazole (Tapazole), qui inactive la peroxydase thyroïdienne.

## Références bibliographiques

- Aehle, W. (2007). *Enzymes in Industry: Production and Applications* (3rd ed.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 768–778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
- Chapman, J., Ismaili, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial Applications of Enzymes : Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- Giovannoni, M., Gramegna, G., Benedetti, M., & Mattei, B. (2020). Industrial Use of Cell Wall Degrading Enzymes: The Fine Line Between Production Strategy and Economic Feasibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(April), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00356>
- Givol, D. (1998). Affinity labeling. In Peter J. Delves (Ed.), *Encyclopedia of Immunology* (2nd ed., pp. 5–52). Elsevier.
- Krauss, I. R., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 11643–11691. <https://doi.org/10.3390/ijms140611643>
- Laskowski, R. A., Gerick, F., & Thornton, J. M. (2009). The structural basis of allosteric regulation in proteins. *FEBS Letters*, 583(11), 1692–1698. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.019>
- Liu, D. M., Chen, J., & Shi, Y. P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332–342. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>
- Pelley, J. W. (2012). Enzymes and Energetics. *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*, 29–37. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-07446-9.00004-0>
- Pinto, G. P., Brás, N. F., Perez, M. A. S., Fernandes, P. A., Russo, N., Ramos, M. J., & Toscano, M. (2015). Establishing the Catalytic Mechanism of Human Pancreatic  $\alpha$ -Amylase with QM/MM Methods. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(6), 2508–2516. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00222>
- Polaina, J., & MacCabe, A. P. (Eds.). (2007). *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Dordrecht: Springer.
- Pollak, P. (2011). *Fine Chemicals: The Industry and the Business* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470946404>

- Punekar, N. S. (2018). *Enzymes Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. Singapore: Springer Nature.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(June), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>
- Silverman, R. B. (2004). Enzyme Inhibition and Inactivation. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 227–321. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-051337-9.50010-9>
- Singh, R., Singh, A., & Sachan, S. (2019). Enzymes Used in the Food Industry : Friends or Foes ? In *Enzymes in Food Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00048-7>
- Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 79). <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>
- Ward, O. P. (2011). Proteases. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (2nd ed., pp. 571–582). Academic Press.
- Yan, X., Maria Aparecida, S., Pontes, M. Z. R., Michele, V., & Adalberto, P. (2003). Liquid-liquid extraction of enzymes by affinity aqueous two-phase systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(4), 741–750. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132003000400030>
- Zhang, C., & Xing, X. H. (2011). Enzyme Bioreactors. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edition, Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00099-4>