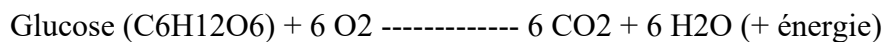


I. DEFINITIONS

A. Les Enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique qui accélèrent les processus chimiques se produisant à l'intérieur des cellules vivantes sans en modifier le résultat ou l'équilibre thermodynamique et sans subir d'altération globale. Comme tous les catalyseurs, les enzymes agissent à des concentrations très petites.

Exemple : la dégradation du glucose, substrat fondamental des cellules vivantes, qu'elles dégradent pour obtenir de l'énergie



-sans catalyse enzymatique, durée...plusieurs mois !!

-avec catalyse enzymatique, durée...quelques secondes !!

Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes substrats chimiques initiaux.

Les substrats sont les réactifs des réactions catalysées par les enzymes. Toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont **définitivement modifiées** sont appelées substrats. Chaque enzyme a une personnalité bien distincte et agit sur un ou plusieurs substrats uniques pour fabriquer un ou des **produits** spécifiques.

Le produit = La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation.

Cofacteur

De nombreuses protéines enzymatiques manquent d'activité catalytique lorsqu'un cofacteur, un composant non protéique, est absent. Lorsque c'est le cas, le composant protéique inactif d'une enzyme est appelé **apoenzyme**, et l'enzyme active avec le cofacteur sont appelés **holoenzyme**. Le cofacteur peut être soit un ion métallique, soit une molécule organique connue sous le nom **de coenzyme**. Les cofacteurs sont liés plus fermement par certaines enzymes que par d'autres. Lorsqu'un cofacteur est lié si étroitement qu'il est difficile de l'enlever sans endommager l'enzyme, on l'appelle parfois un **groupe prothétique**.

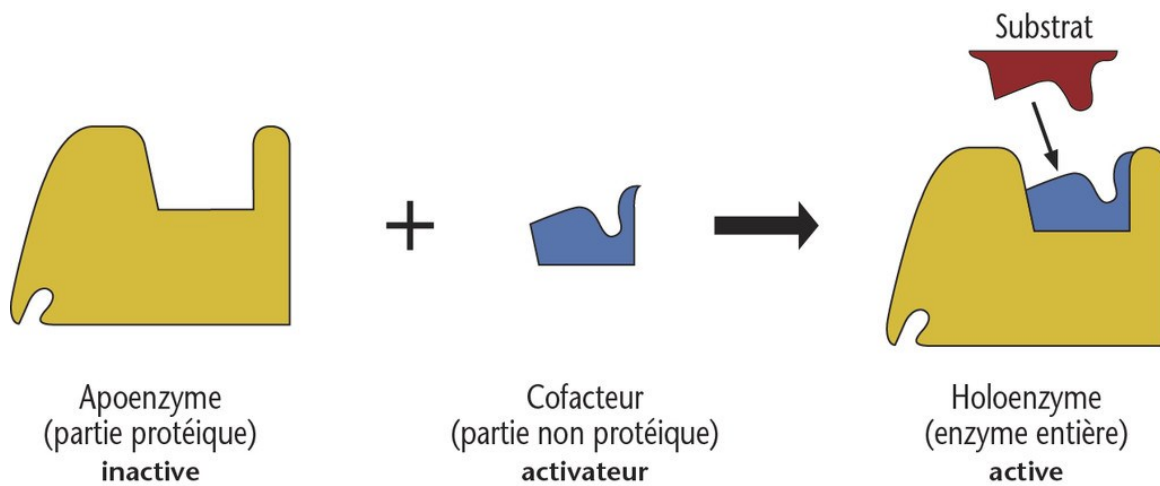


Figure 1 : Représentation graphique d'une holoenzyme et ces composants

Les cofacteurs ne sont pas transformés définitivement à la fin de cette réaction : ils interviennent pour **transporter le substrat, pour recevoir le produit ou comme participant à la structure de l'enzyme.**

Tableau 1 : Quelques enzymes avec leurs cofacteurs

Enzymes	Cofacteurs
Pyruvate kinase	K^+ and Mg^+
Cytochrome oxidase	Cu^{++}
Nitrate reductase	Mo
Arginase	Mn

Coenzyme

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 inscrite dans le patrimoine génétique d'une espèce, alors tout ou partie de la molécule du coenzyme doit être apporté à cette espèce par son alimentation : cet aliment indispensable s'appelle une vitamine. Les coenzymes sont des cofacteurs donc des molécules indispensables à la catalyse enzymatique.

- 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 : en effet, l'énergie mise en jeu par la liaison enzyme-coenzyme est du même ordre de grandeur que l'énergie mise en jeu dans la liaison enzyme-substrat ; dans ce cas, la concentration des coenzymes doit

être du même ordre de grandeur que celle du substrat (on dit stœchiométrique). Ces coenzymes sont appelés **coenzymes libres** parce qu'ils se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée.

- Lorsque au contraire les coenzymes sont liés aux enzymes par des liaisons fortes de type covalentes, 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.

Tableau 2 : Quelques coenzymes avec les groupements qu'ils transfèrent

Coenzymes	Groupement transféré
Phosphate Pyridoxal	Groupements Amines
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	Atomes Hydrogenes (electrons)
Flavin adenine dinucleotide (FAD)	Atomes Hydrogenes (electrons)
Co-enzyme A	Groupes Acyles

Ligands :

Toute molécule qui peut établir des liaisons spécifiques avec une protéine (enzyme). Pour chaque ligand, il existe au moins un site de fixation sur la protéine qui le reçoit.

Structure des enzymes

En plus des propriétés catalytiques, les enzymes présentent le comportement physico-chimique des protéines : leur solubilité, leurs propriétés électrophorétiques, leurs comportements électrolytiques et leur réactivité chimique. Puisque toutes les enzymes sont des protéines, une connaissance de la structure des protéines est clairement une condition préalable à toute compréhension des enzymes.

Les protéines sont des macromolécules (c'est-à-dire de grosses molécules) avec des poids moléculaires d'au moins plusieurs milliers daltons. On les trouve en abondance dans les organismes vivants, constituant plus de la moitié du poids sec des cellules. Deux types distincts sont connus : **les protéines fibreuses et globulaires**.

Les protéines fibreuses sont insolubles dans l'eau et physiquement résistantes, ce qui leur permet de jouer un rôle structurel. Les exemples incluent l' α -kératine (un composant des

cheveux, des ongles et des plumes) et le collagène (le principal élément fibreux de la peau, des os et des tendons).

En revanche, les protéines globulaires sont généralement solubles dans l'eau et peuvent être cristallisées à partir d'une solution. Ils ont un rôle fonctionnel dans les organismes vivants.

Toutes les enzymes sont des protéines globulaires.

Unité de base : Les acides aminés

Un acide aminé est une molécule qui répond, à pH neural, à la formule générale suivante :



Figure 2 : Structure de base des acides aminés

L'atome de carbone central dans cette structure est appelé carbone alpha ($C\alpha$) et le substituant, R, est appelé chaîne latérale d'acide aminé. Il existe 20 acides aminés comme éléments de base les plus courants pour la construction de protéines et de peptides. Les structures des chaînes latérales des 20 acides aminés naturels acides sont illustrés à la figure 3.1.

La plupart des acides aminés d'une protéine ou d'un peptide ont leurs groupes amino et carboxylates chargés sont neutralisés par la formation de liaisons peptidiques (dans cette situation, la structure des acides aminés qui reste est appelé **résidu d'acide aminé** de la protéine ou du peptide). Par conséquent, ce qui distingue chimiquement et physiquement un acide aminé d'un autre dans une protéine est l'identité de la chaîne latérale de l'acide aminé. Comme le montre la figure 3.1, ces chaînes latérales varient en structure chimique à partir de simples substituants, comme un proton dans le cas de la glycine, à des systèmes cycliques bicycliques complexes dans le cas du tryptophane. Ces différentes structures chimiques des chaînes latérales confèrent des réactivités chimiques très différentes aux acides aminés d'une protéine.

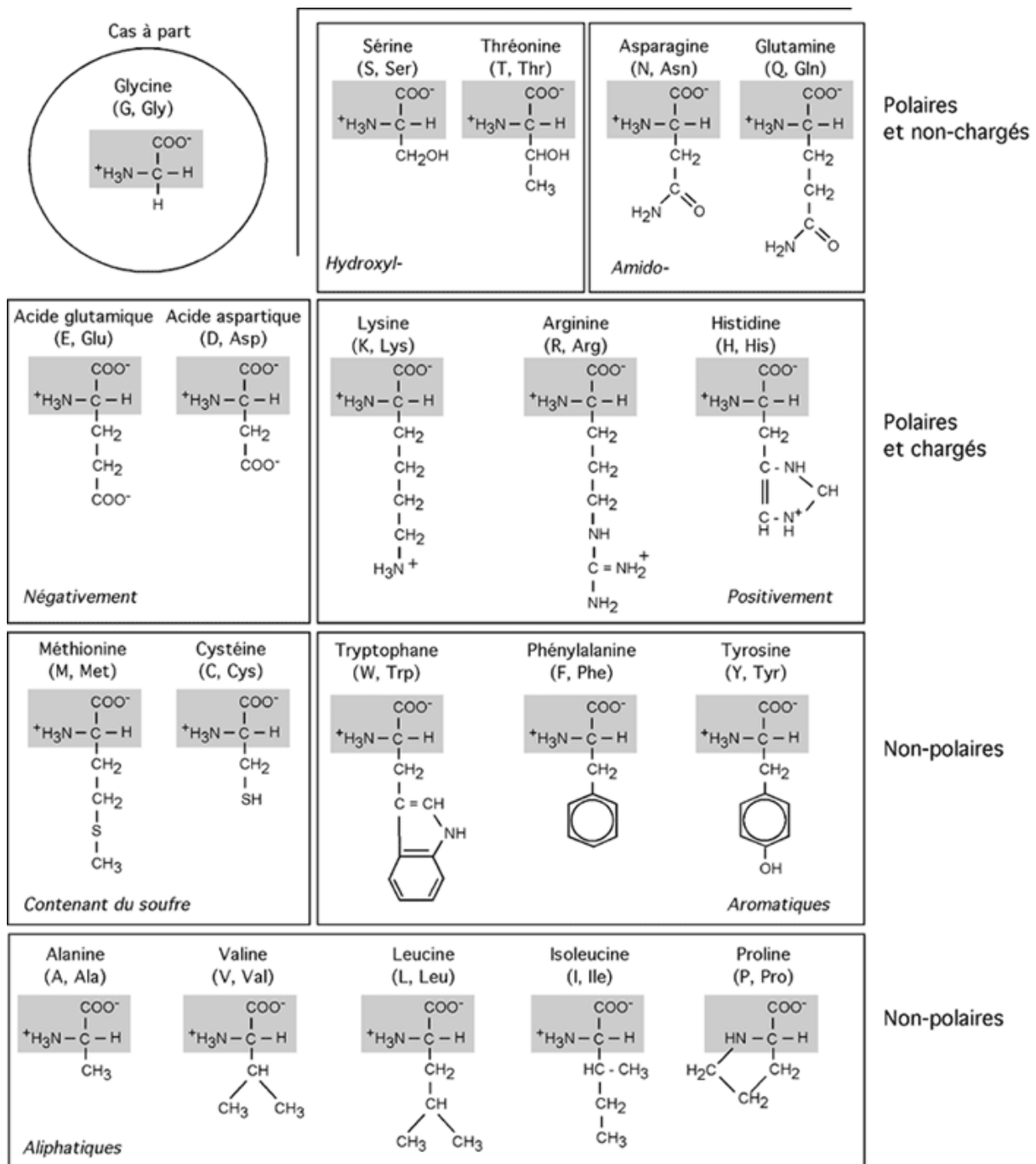


Figure 3 : Chaines latérales des 20 acides aminés constituant les protéines et les peptides

Séquence d'acides aminés ou structure primaire

La structure et la réactivité d'une protéine sont définies par l'identité des acides aminés qui composent sa chaîne polypeptidique et par l'ordre dans lequel ces acides aminés apparaissent dans la chaîne. Cette information constitue la séquence d'acides aminés ou la structure primaire de la protéine. Dans ces chaînes les acides aminés sont liés entre eux par des liaisons peptidiques. Nous avons vu que pour la plupart des acides aminés d'une telle chaîne, cependant,

le polypeptide final conservera toujours un groupe amine chargé à une extrémité de la chaîne et un groupement carboxylate chargé à l'autre extrémité. L'acide aminé terminal qui conserve le groupe amino chargé positivement est appelé extrémité N-terminale ou alors que l'acide aminé qui garde son groupement carboxyle est appelé extrémité C-terminale.

Structure secondaire

Le repliement local de la structure primaire, donne naissance à la structure secondaire qui est composé de régions locales (10 à 20 acides aminés) de structures tridimensionnelles stables et ordonnées maintenues ensemble par une **liaison hydrogène**, c'est-à-dire une liaison non covalente entre les hydrogènes acides (OH, NH) et les paires isolées comme indiqué dans la Figure 4. Il existe au moins trois formes stables de structure secondaire couramment observées dans les protéines : l'hélice- α , le feuillet- β et le tour- β .

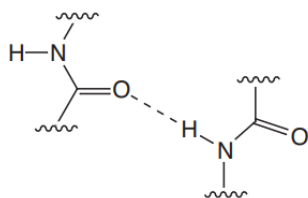


Figure 4 : Liaison hydrogène entre le carbone α et le groupement amine de deux liaisons peptidiques

Il existe au moins trois formes stables de structure secondaire couramment observées dans les protéines : l'hélice α , le feuillet β et le tour β .

L'hélice- α est une structure hélicoïdale **formée par une seule chaîne polypeptidique** dans laquelle des liaisons hydrogène sont formées entre l'oxygène carbonyle d'une liaison amide et le NH de la liaison amide quatre résidus en avant dans la chaîne, comme le montre la figure 5.

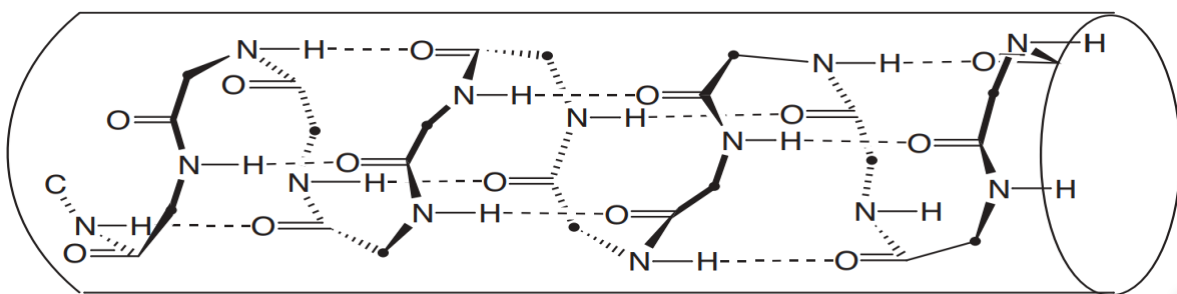


Figure 5 : Représentation d'un Hélice α . Les chaînes latérales des acides aminés sont représentées par des pontiers

Dans cette structure, chacune des liaisons amide forme deux liaisons hydrogène spécifiques, ce qui en fait une unité structurale très stable. Toutes les chaînes latérales d'acides aminés pointent vers l'extérieur à partir du pas de l'hélice, par conséquent, les chaînes latérales d'acides aminés qui sont distantes de quatre résidus dans la séquence primaire se retrouveront proches dans l'espace. Les interactions entre ces chaînes latérales peuvent conduire à d'autres interactions favorables au sein de l'hélice α , ou avec d'autres structures secondaires.

Le feuillet- β est une structure formée par deux brins polypeptidiques linéaires ou plus, maintenus ensemble par une série de liaisons hydrogène inter-brins. Il existe deux types de structures de feuillet- β : Le feuillet- β parallèle dans lequel les brins peptidiques avancent tous les deux dans la même direction ; et antiparallèle, dans lequel les brins peptidiques avancent dans des directions opposées. Les deux types sont illustré à la figure 6.

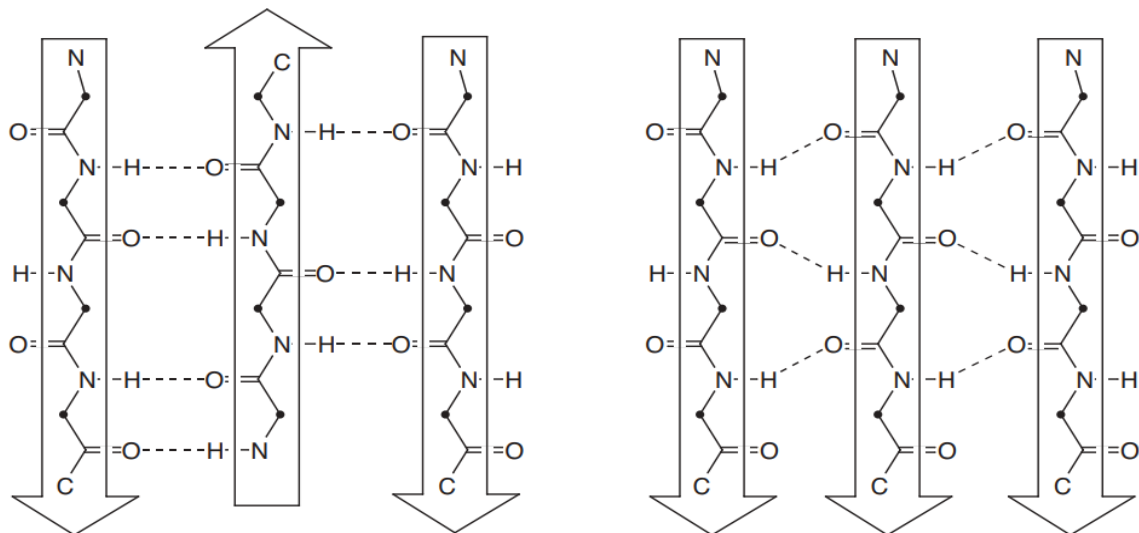


Figure 6 : Feuillet- β parallèle et antiparallèle

La spire (Le tour- β) est une structure souvent formée à l'extrémité d'un feuillet qui conduit à une tour de 180° dans le sens de la chaîne peptidique. Un exemple de virage est illustré à la figure 7, où le rôle de la liaison hydrogène dans la stabilisation de telles structures peut être vu.

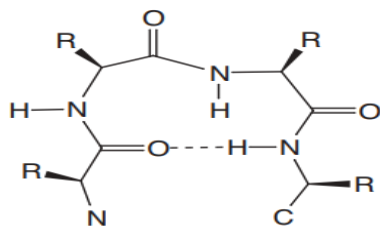


Figure 7 : Structure d'un tour- β

Structure tertiaire tridimensionnelle

Lorsque la séquence polypeptidique linéaire de la protéine est formée à l'intérieur des cellules par les ribosomes, la chaîne polypeptidique se replie spontanément pour former la structure tridimensionnelle de la protéine. D'autant plus remarquable qu'à partir d'une séquence de 100 à 1 000 acides aminés, une structure tridimensionnelle stable unique se forme. Les facteurs qui semblent être importants dans le processus de repliement sont : 1) le tassement des chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes et l'exclusion de l'eau; 2) formation d'interactions spécifiques non covalentes ; 3) formation de structures secondaires.

La structure tridimensionnelle des protéines, connue sous le nom de structure tertiaire, résulte de l'assemblage d'éléments de structure secondaire pour former une conformation globale stable, qui, **dans le cas des enzymes, est catalytiquement active**. L'emballage des unités structurales secondaires implique généralement d'enterrer les chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes à l'intérieur de la protéine et de positionner les chaînes latérales d'acides aminés hydrophiles à la surface.

Les protéines sont souvent constituées de motifs structurels communs, à partir desquels la structure protéique peut être catégorisée. Les familles courantes de structure protéique sont : 1) les protéines α -hélicoïdales ; 2) structures α/β ; 3) structures- β antiparallèles. Les membres de chaque classe sont illustrés ci-dessous, avec α -hélices et feuillet- β représentés sous forme de ruban. Les protéines en hélice sont constituées seulement des α -hélices qui s'emballent les unes sur les autres pour former la structure tertiaire comme dans le cas du cytochrome b562. Les structures α/β sont constituées de réseaux réguliers de structures feuillet- β -hélice- α - feuillet- β parallèles comme La flavoprotéine redox flavodoxine.

Souvent, les protéines sont constituées d'un certain nombre de "domaines", dont chacun contient une région de structure secondaire. Parfois, un domaine particulier a une fonction spécifique, telle que la liaison d'un substrat ou d'un cofacteur.

Structure quaternaire

Les protéines les plus grosses consistent souvent en plus d'une structure tertiaire, qui s'emboîtent pour former la structure « quaternaire » active. Dans certains cas, un certain nombre de sous-unités identiques peuvent se lier pour former un homodimère (deux sous-unités identiques), un trimère ou un tétramère, ou dans d'autres cas, des sous-unités non identiques s'emboîtent pour former des structures quaternaires très complexes. Un exemple familier est

l'hémoglobine, une protéine de transport d'oxygène de mammifère, qui consiste en un tétramère de sous-unités identiques de 16 kDa.

Enzymes monomériques

Ces enzymes ne sont constitués que d'une seule chaîne polypeptidique, donc elles ne peuvent être dissociées en unités plus petites. Très peu d'enzymes monomères sont connues et toutes catalysent des réactions hydrolytiques. En général, ils contiennent entre 100 et 300 résidus d'acides aminés et ont des poids moléculaires compris entre 13 000 et 35 000. Certains, par ex. carboxypeptidase A, sont associés à un ion métallique, mais la plupart agissent sans l'aide d'aucun cofacteur.

Un certain nombre d'enzymes monomériques sont des protéases (ou enzymes protéolytiques), c'est-à-dire qu'elles catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans d'autres protéines. Afin d'éviter qu'elles ne causent des dommages généralisés à toutes les protéines cellulaires, elles sont souvent synthétisées sous une forme inactive appelée **proenzyme ou zymogène**, et activées selon les besoins. De telles enzymes comprennent les sérine protéases, ainsi appelées en raison de la présence dans le site actif d'un résidu sérine essentiel, c'est-à-dire un résidu sérine dont la présence est essentielle pour l'activité enzymatique.

Les protéases à sérine

Les protéases à sérine chymotrypsine, trypsine et élastase, qui sont produites sous une forme inactive par le pancréas des mammifères, forment un groupe d'enzymes étroitement apparentées. Bien qu'environ 40% seulement de la structure primaire soit commune aux trois enzymes, la plupart des résidus d'acides aminés catalytiquement importants correspondent exactement. Des études de cristallographie aux rayons X ont également montré que leurs structures tertiaires sont très similaires. On pense qu'elles fonctionnent par un mécanisme identique et présentent un pH optimal similaire d'environ pH 8. Toutes sont des endopeptidases, hydrolysant les liaisons peptidiques au milieu des chaînes polypeptidiques, mais leurs spécificités sont différentes.

La chymotrypsine a une grande poche de liaison hydrophobe qui se liera aux chaînes latérales de la phénylalanine, du tryptophane et de la tyrosine, permettant le clivage de la liaison peptidique du côté carbonyle de l'un de ces résidus (**Figure 8**).

Dans la trypsine, l'aspartate remplace la sérine au fond de la poche de liaison, conférant à cette enzyme une spécificité pour le clivage des liaisons adjacentes aux résidus d'acides aminés avec des chaînes latérales basiques (chargé positivement), c'est-à-dire la lysine ou l'arginine (Figure 8).

Dans le cas de l'élastase, deux résidus de glycine à l'embouchure de la poche de liaison dans la chymotrypsine ou la trypsine sont remplacés par la valine et la thréonine, dont les chaînes latérales volumineuses bloquent la poche et permettent à l'enzyme de cliver spécifiquement les liaisons adjacentes aux résidus avec de petites particules non polaires. chaînes latérales, par ex. alanine (Figure 8).

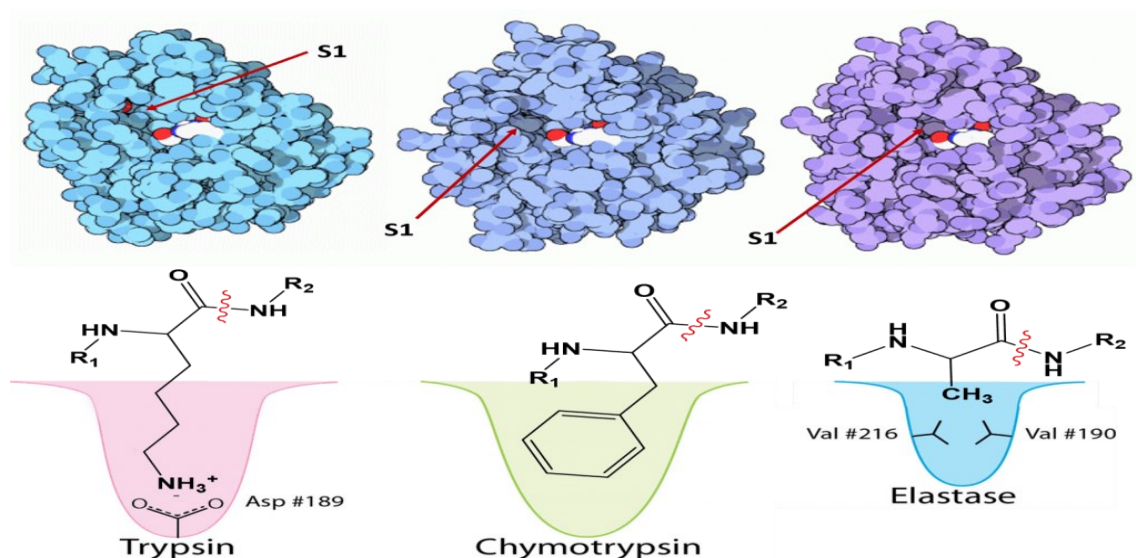


Figure 8 : Différentes spécificités des Protéases à sérine

Activation protéolytique du chymotrypsinogène

Cette enzyme est synthétisée dans le pancréas sous forme de chymotrypsinogène zymogène (ou pré-chymotrypsine). Il s'agit d'une seule chaîne polypeptidique de 245 résidus contenant cinq ponts disulfures intra-chaîne. En passant dans l'intestin, où les enzymes protéolytiques sont nécessaires pour digérer les protéines alimentaires, le chymotrypsinogène est attaqué par la trypsine. Cela rompt la liaison peptidique entre l'arginine-15 et l'isoleucine-16, produisant de la π -chymotrypsine. La molécule a déjà une activité enzymatique complète, mais d'autres changements ont alors lieu : un dipeptide est retiré des positions 14 et 15 par l'action d'une autre molécule de π -chymotrypsine, et une digestion supplémentaire de la chymotrypsine élimine un dipeptide des positions 147 et 148 pour donner le produit final, l' α -chymotrypsine (Figure 9)

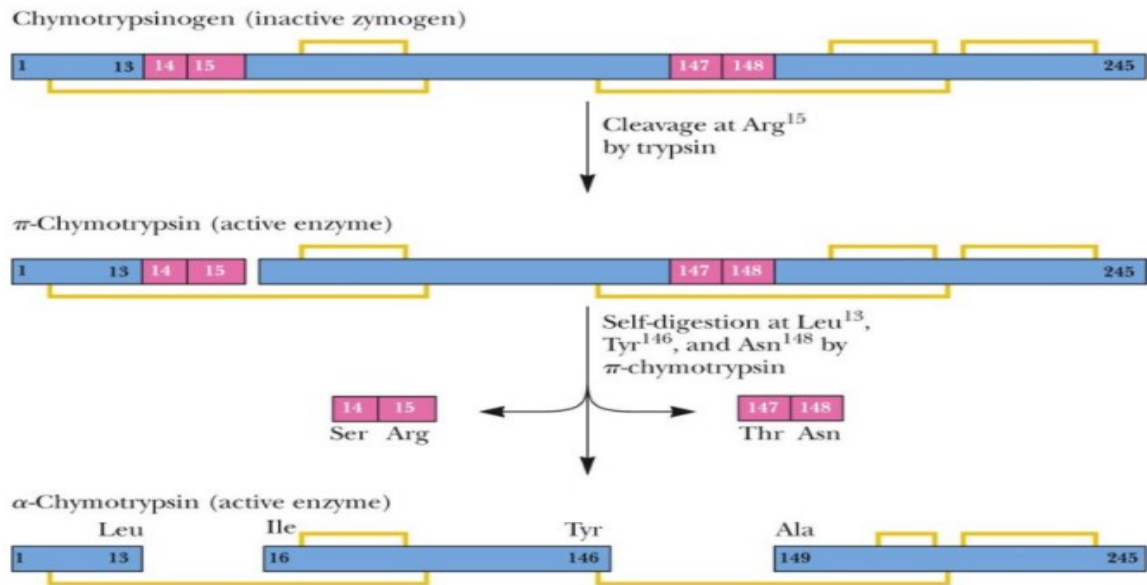


Figure 9 : Activation du Chymotrypsinogène par protéolyse

La chymotrypsine contient trois chaînes polypeptidiques liées par des ponts disulfures, ce n'est donc pas strictement une enzyme monomère, mais le système de numérotation séquentielle de la molécule de chymotrypsinogène d'origine est généralement conservé. En revanche, la trypsine est une véritable enzyme monomère.

Enzymes oligomériques

Elles sont constituées de deux chaînes polypeptidiques ou plus, généralement liés entre eux par des interactions non covalentes et jamais par des liaisons peptidiques. Les chaînes polypeptidiques constitutives sont appelées sous-unités et peuvent être identiques ou différentes les unes des autres. S'ils sont identiques, ils sont parfois appelés protomères. Les protéines dimères sont constituées de deux, les protéines trimères de trois et les protéines tétramères de quatre sous-unités. Le poids moléculaire est généralement supérieur à 35 000. La grande majorité des enzymes connues sont oligomériques : par exemple, toutes les enzymes impliquées dans la glycolyse possèdent soit deux soit quatre sous-unités. Il est donc raisonnable de supposer que les sous-unités de protéines oligomères acquièrent des propriétés en association qu'elles n'ont pas isolément. De telles enzymes ne sont pas synthétisées comme zymogènes inactifs, mais leurs activités peuvent être régulées de manière beaucoup plus précise par une rétro-inhibition. Ceci est possible car de nombreuses protéines oligomères présentent une allostérie, c'est-à-dire que leurs différents sites de liaison interagissent.

Lactate déshydrogénase

La Lactate déshydrogénase des vertébré (LDH) est un exemple d'enzyme oligomérique où chaque sous-unité a la même fonction, en l'occurrence catalyser la conversion réversible du pyruvate en lactate.

L'enzyme, que l'on trouve chez de nombreuses espèces, est un tétramère de poids moléculaire 140 000. Bien que chaque sous-unité ait un poids moléculaire d'environ 35 000, deux types, de composition différente en acides aminés, se retrouvent au sein de chaque type de sous unités : qui sont ; la forme M (LDH A), qui prédomine dans le muscle squelettique et d'autres tissus largement anaérobies ; et la forme H (LDH B), la sous-unité prédominante dans le cœur. Les deux types de sous-unités sont produites par des gènes distincts. Chaque monomère est catalytiquement inactif, mais il peut se combiner avec d'autres du même type ou de type différent pour produire l'enzyme tétramère active. Toutes les combinaisons de sous-unités H et M sont également possibles, donc cinq **isoenzymes** de la LDH peuvent exister : H4, H3M, H2M2, HM3 et M4 (**Figure 10**). Bien que ceux-ci catalysent la même réaction, ils le font avec des caractéristiques (les propriétés de H3M, H2M2 et HM3 étant intermédiaires entre celles de H4 et de M4) qui permettent aux différentes isoenzymes de jouer des rôles physiologiques différents.

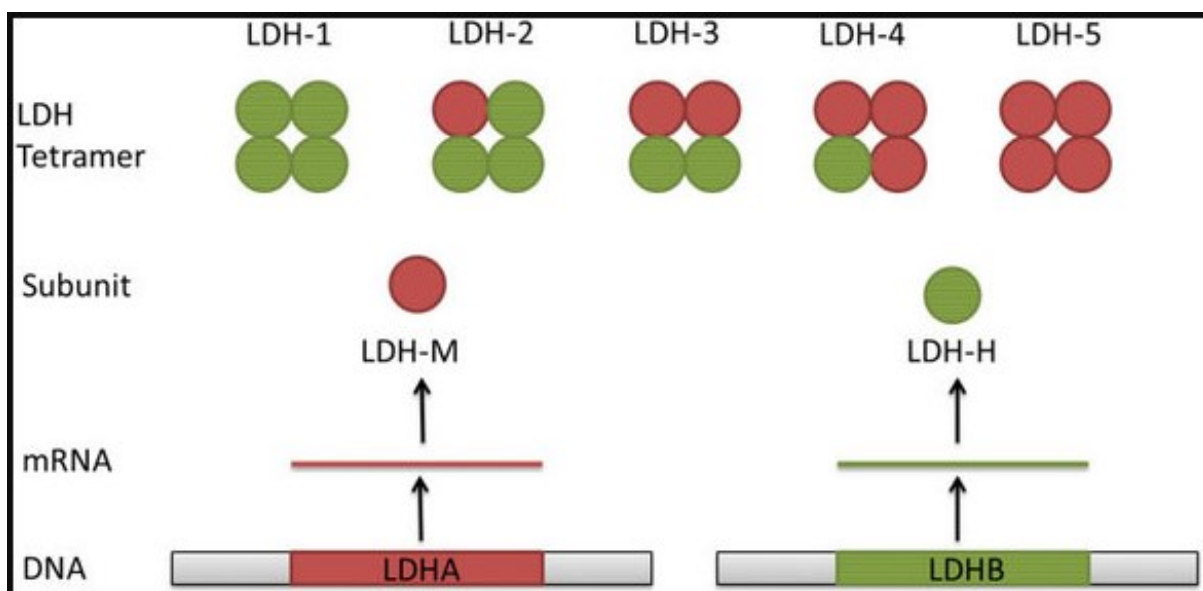


Figure 10 : Différentes isoformes de la Lactate déshydrogénase

Le pyruvate peut être produit à partir de glucides (par glycolyse) ou à partir d'acides aminés. Dans des conditions anaérobies, il peut subir une conversion médiée par la LDH en lactate. **Le lactate ne peut être produit qu'à partir de pyruvate et ne peut être métabolisé qu'en pyruvate.**

Lorsque l'oxygène est librement disponible, le pyruvate est métabolisé pour entrer dans le cycle de l'acide tricarboxylique. Le cycle de l'acide tricarboxylique et la voie de la glycolyse sont importants pour la production de l'énergie sous une forme d'ATP.

Dans des conditions aérobies, la majeure partie du pyruvate formé est canalisée dans le cycle de l'acide tricarboxylique pour assurer une production maximale d'ATP. Ainsi, les tissus qui disposent d'un apport abondant et constant en oxygène ne nécessitent normalement pas beaucoup de production de lactate pour avoir lieu et ont tendance à être riches en isoenzyme H4 : celle-ci convertit pyruvate en lactate à un taux relativement faible, le processus pouvant même être inhibé par le pyruvate.

Dans des conditions anaérobies, le cycle de l'acide tricarboxylique ne peut pas fonctionner, laissant la cellule dépendante de la glycolyse pour la production d'ATP. Sans un approvisionnement constant en NAD⁺, la glycolyse risque de s'arrêter, mais la conversion du pyruvate médiée par la LDH en lactate peut garantir le maintien des niveaux de NAD⁺. Par conséquent, dans les tissus qui peuvent devenir privés d'oxygène (Muscles), une isoenzyme LDH (M4) avec une capacité élevée de conversion du pyruvate en lactate est requise. Le lactate produit finit par se rendre au cœur ou au foie, via la circulation sanguine, et le pyruvate est reformé.

Le complexe multienzymatique pyruvate déshydrogénase

Le complexe multienzymatique pyruvate déshydrogénase est constitué par l'association de plusieurs enzymes distinctes. La Commission des enzymes a recommandé qu'un tel complexe soit considéré comme un système d'enzymes distinctes plutôt que comme une seule enzyme. Le complexe pyruvate déshydrogénase permet au pyruvate d'entrer dans le cycle de l'acide tricarboxylique, en catalysant sa conversion globale en acétyl-CoA (**Figure 11**).

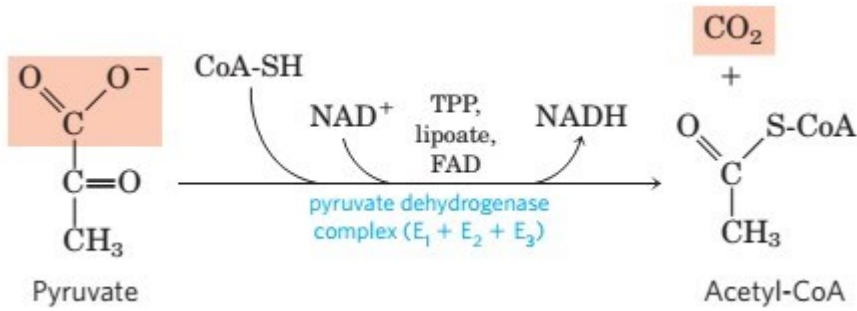


Figure 11 : Réaction de conversion du pyruvate en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase

Le complexe d'E. coli est constituée de 60 chaînes polypeptidiques et a un poids moléculaire d'environ 4 600 000. Trois activités catalytiques distinctes sont présentes : la pyruvate déshydrogénase (E1) (qui catalyse également une décarboxylation) ; dihydrolipoyl acétyltransférase (E2) ; et la dihydrolipoyl déshydrogénase (E3). L'ensemble du processus se déroule avec le substrat lié à l'enzyme, soit directement, soit via les cofacteurs thiamine pyrophosphate (TPP) et lipoate. Le TPP est associé à E1 tandis que la chaîne latérale du lipoate est liée de manière covalente, par une liaison amide, à un résidu lysyl de E2. La protéine E3 contient également un groupe prosthétique qui est le FAD (**Figure 12**).

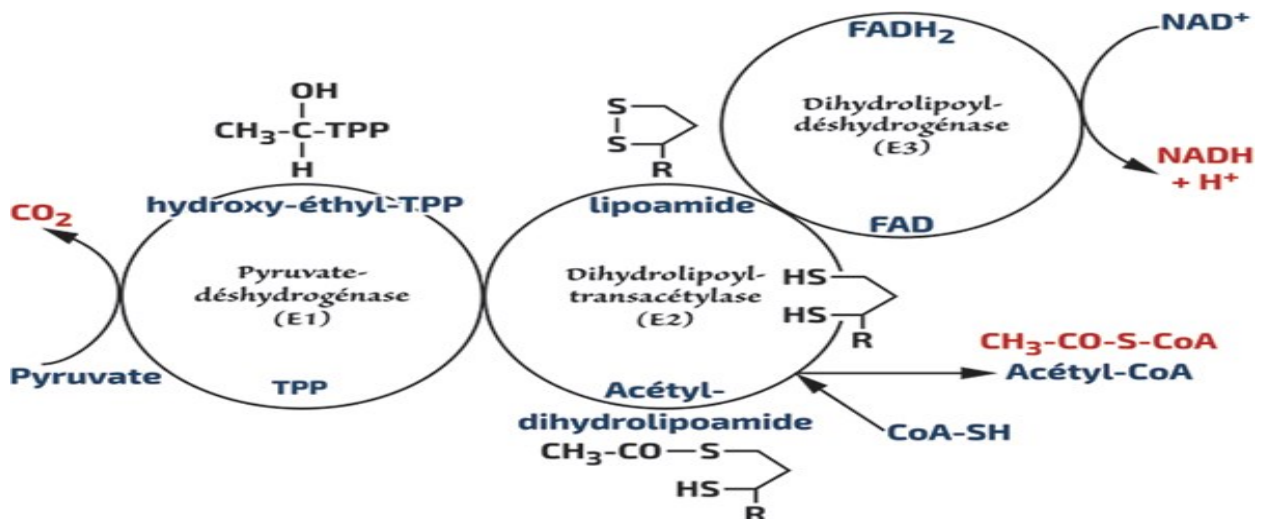
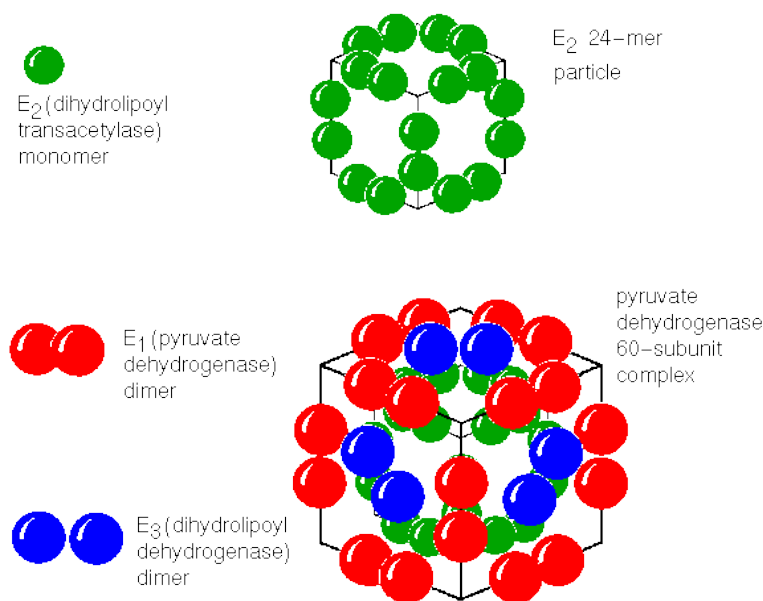


Figure 12 : Transformation du pyruvate en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase

Le complexe enzymatique a un diamètre d'environ 300 Å et ses caractéristiques ont été observées par microscopie électronique. Il a une structure polyédrique, chacune des sous-unités apparaissant approximativement sphérique. Le **complexe est maintenu par des forces non covalentes** et peut facilement subir une dissociation. A pH alcalin, les sous-unités de la protéine

E1 peut être séparée de celles des protéines E2 et E3. A pH neutre et à forte concentration d'urée, les protéines E2 et E3 peuvent être séparées l'une de l'autre. Si les différentes sous-unités sont mélangées à pH neutre en l'absence d'urée, le complexe multienzymatique se reformera spontanément, mais les sous-unités E1 et E3 ne se réassocieront que si E2 est présent.

Le noyau du complexe est constitué de **24 sous-unités de E2**, associées sous forme de trimères, avec un arrangement symétrique des sous-unités E1 et E3 autour de ce noyau cubique. Le long de chacune des douze arêtes du cube se trouve un dimère de **E1** et sur chacune des six faces du cube se trouve **un dimère de E3** (Figure 13).



Arrangement of subunits in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *E. coli*.
 Diagram adapted from Voet and Voet (1990), after Lester Reed

Figure 13 : Structure du complexe pyruvate déshydrogénase

Fonctionnement des enzymes

Le mécanisme d'action est basé sur une réaction chimique, dans laquelle l'enzyme se lie au substrat et forme finalement un complexe enzyme-substrat. Cette réaction a lieu dans une zone relativement petite de l'enzyme appelée **site actif ou catalytique**. En d'autres termes, le mécanisme d'action enzymatique est basé sur la nature de l'interaction enzyme-substrat, qui explique la spécificité de réaction des catalyseurs biologiques. **Le site actif ou catalytique d'une enzyme est constitué de plusieurs acides aminés, situés à distance les uns des autres**

dans la chaîne peptidique. Ces acides aminés sont rapprochés par le repliement résultant de la structure secondaire et tertiaire des enzymes.

Les chaînes latérales de résidus d'acides aminés au niveau du site catalytique fournissent des groupes pour la liaison avec des groupes spécifiques du substrat. Les cofacteurs assistent la catalyse. Le substrat forme des liaisons avec des résidus d'acides aminés dans le domaine de liaison au substrat du site actif. La liaison induit une réaction conformationnelle dans le site actif. Au cours de la réaction, l'enzyme forme un complexe **d'état de transition**. Au fur et à mesure que les produits de la réaction se dissocient, l'enzyme revient à son état d'origine.

Deux différents modèles postulés pour le mécanisme d'action enzymatique sont donnés ci-dessous.

Le modèle Fisher (modèle de serrure et de clé)

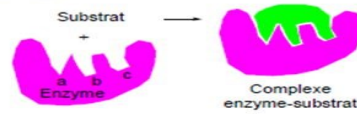
Il s'agit d'un modèle rigide du site catalytique, proposé par Emil Fischer en 1894. Le modèle explique l'interaction entre un substrat et une enzyme en termes d'analogie serrure et clé. Dans ce modèle, le site catalytique est supposé être préformé. Le substrat s'adapte comme une clé dans une serrure. L'inconvénient de ce modèle est la rigidité implicite du site catalytique. Le modèle ne peut pas expliquer les changements dans la structure enzymatique en présence de modulateurs allostériques (**Figure 14**).

Modèle d'ajustement induit

Contrairement à la méthode ci-dessus, ce modèle suggère un mode flexible pour le site catalytique. Pour surmonter les problèmes du modèle serrure et clé dus au site catalytique rigide, Koshland a proposé un modèle d'ajustement induit en 1963. La caractéristique importante de cette procédure est la flexibilité du site actif. Dans le modèle d'ajustement induit, le substrat induit un changement conformationnel dans le site actif de l'enzyme de sorte que le substrat s'insère dans le site actif de la manière la plus commode afin de favoriser la réaction chimique (**Figure 14**).

Deux modèles pour expliquer la spécificité des enzymes:

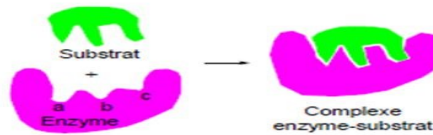
La complémentarité stérique entre l'enzyme et son substrat est à l'origine de cette spécificité et que les enzymes et les substrats se reconnaissent comme une clé s'adapte dans une serrure



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

Ajustement induit -----dynamique

-lors de la fixation de substrat, l'enzyme change de conformation
Suppose que l'enzyme a une structure flexible



13

Figure 14 : Modes de liaisons de l'enzyme à son substrat

Classification des enzymes

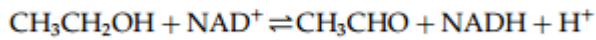
Les enzymes peuvent être regroupées en familles sur la base d'un certain nombre de critères différents. Ils peuvent être classés selon le type de substrat qu'ils transforment. Ils sont souvent nommés simplement en ajoutant « ase » à la fin du nom du substrat, d'où les classifications générales de «protéase», «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.

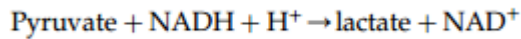
Oxydoréductases

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'O₂ 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^+ est un bon exemple de ces réactions.



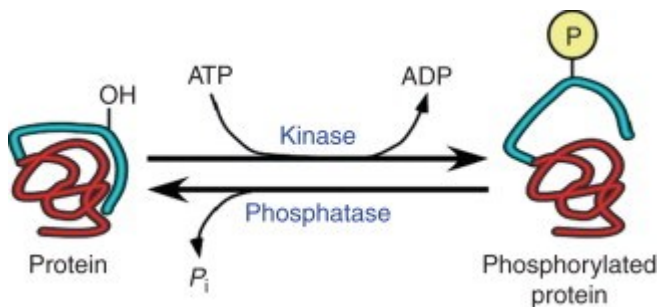
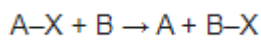
La réduction du pyruvate en lactate avec oxydation du $\text{NADH} + \text{H}^+$ est un autre exemple



Transférases

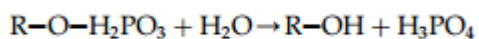
Les transférases catalysent le transfert d'un groupe spécifique, tel que méthyle, acyle, amino, glycosyle, ou phosphate, d'une substance à une autre. Le nom recommandé est normalement la transférase du groupe accepteur ou la transférase du groupe donneur.

Le nom systématique est formé en fonction du groupe donneur : accepteur transférase.



Hydrolases

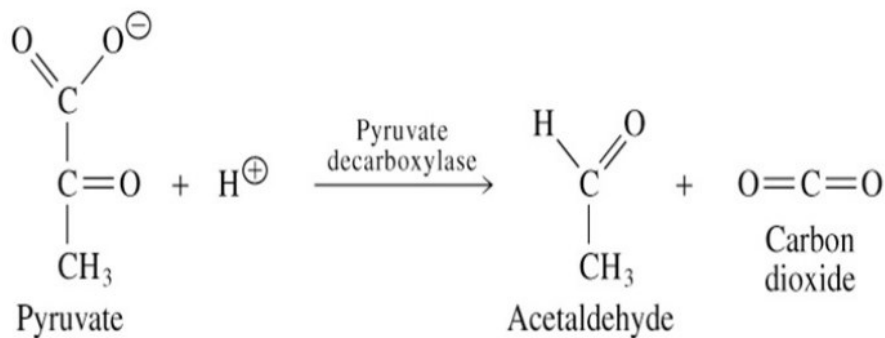
Les hydrolases catalysent le clivage hydrolytique de C – O, C – N, C – C et d'autres liaisons. Le nom recommandé se compose souvent simplement du nom du substrat avec le suffixe -ase. Le nom systématique inclut toujours l'hydrolase.



Lyases

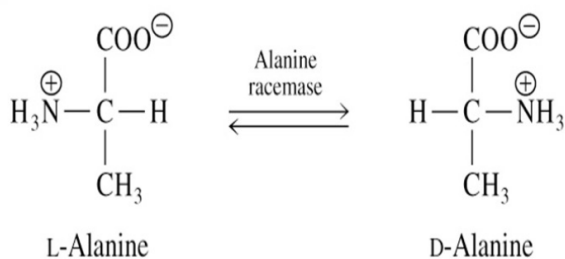
Les lyases catalysent le clivage des liaisons C – C, C – O, C – N et autres par élimination. Le nom recommandé est, par exemple, décarboxylase, aldolase, déshydratase (élimination du CO₂, de l'aldéhyde et de l'eau, respectivement). Le nom systématique est formé selon le groupe substrat-lyase. L'aspartate ammonia lyase (aspartase) catalyse la transformation de l'aspartate en fumarate par élimination d'une molécule d'ammonia (NH₃)

Aspartate → Fumarate + NH₃



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.

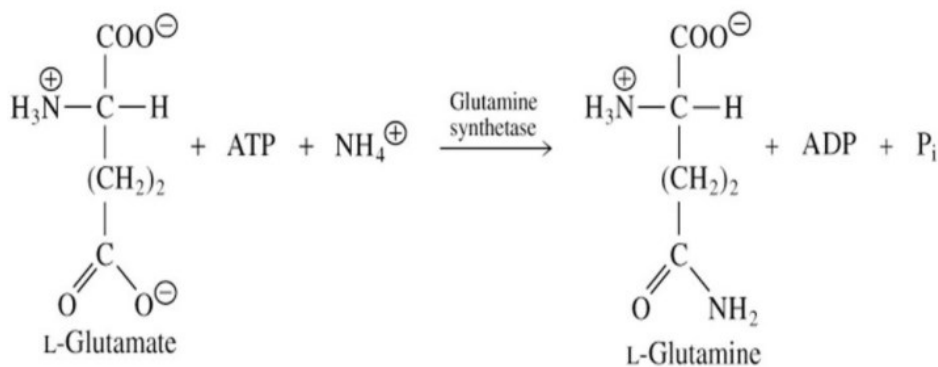


Alors que la triose phosphate isomérase transforme la dihydroxyacétone phosphate en glyceraldéhyde-3-phosphate.

dihydroxyacetone phosphate → glyceraldéhyde-3-phosphate

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).



Interactions Protéines-ligands

Importance des interactions protéines-ligands

Les protéines ont de nombreuses fonctions : en tant qu'enzymes, en tant que molécules régulatrices dont la liaison à d'autres protéines inhibent ou activent leur fonction, en tant que composants des structures microscopiques du cytosquelette, comme des moteurs dont les changements conformationnels agissent comme des moteurs moléculaires, comme des signaux via leur propre modification chimique, comme des détecteurs de signaux par la liaison de petites molécules, peptides ou protéines, comme des canaux sélectifs qui permettent le transport à travers les membranes cellulaires. **Dans tous ces rôles, les protéines se lient aux petites molécules, aux acides nucléiques et à d'autres partenaires protéiques formant un complexe transitoire ou à longue durée de vie par interactions non covalentes entre les composants du complexe.**

Ces interactions sont souvent très spécifiques en ce sens **qu'une protéine particulière se lie uniquement à une ou quelques autres molécules dans la cellule.** De nombreux processus cellulaires sont exécutés par un groupe de protéines qui agissent dans une manière coordonnée, par exemple, dans les voies métaboliques dans lesquelles une molécule initiale est modifiée par plusieurs enzymes dans une série de étapes (glycolyse), ou dans une voie de signalisation dans laquelle la liaison d'un signal extracellulaire provoque un changement de conformation qui permet à une kinase de devenir actif et phosphoryler une cible (ou des cibles), qui ensuite conduit à leur liaison d'autres protéines et ainsi de suite. **De tels réseaux d'interactions entre protéines sont étroitement régulés.**

Les changements dans les populations de complexes protéiques particuliers, ou des changements dans les populations des produits de réactions à médiation protéique, aussi faibles qu'un facteur de deux peut faire passer les cellules d'un état à un autre ; de la croissance à la stase, de la réplication à l'apoptose. Ces petites variations dans les populations moléculaires correspondent à de très petites différences dans la thermodynamique ou la cinétique de réactions.

Par conséquent, la caractérisation détaillée de l'interactions des protéines avec leurs partenaires de liaison est d'une importance primordiale dans une biologie quantitative et intégrative qui vise à comprendre les systèmes biologiques en fonction de leurs composants moléculaires. Le but ultime est peut-être de caractériser le comportement thermodynamique et cinétique des

composants des systèmes vivants avec suffisamment de détails pour que la réponse de ces systèmes aux stimuli (qu'il s'agisse de substrats naturels ou de médicaments) puisse être modélisée avec une précision suffisante pour que le comportement du système puisse être prévu ou modifié à volonté.

La liaison de divers composés aux protéines a fait l'objet de nombreuses études. De telles associations entrent dans le cadre de la théorie des équilibres multiples. Les études présentées par SCATCHARD (1949), sont parmi les plus classiques. Différents cas d'équilibres d'association protéine-ligand seront discutés, dont ceux des protéines possédant un ou plusieurs sites de liaison, indépendants ou dépendants, équivalents ou non équivalents.

Propriétés des interactions Protéines-ligands

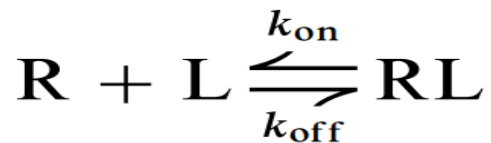
Trois facteurs caractérisent les interactions entre ligand et protéines :

- (1) Combien protéine et ligand sont présents (Leurs concentrations)
- (2) Combien de complexe Ligand-protéine est formé
- (3) A quelle vitesse les complexes se forment et se dissocient

Connaître ces faits pour chaque protéine et complexe permet, en principe, la prédiction des comportements de réseaux entiers d'interactions. Il permet également de prédire le résultat de toute modification du comportement d'une réaction (par exemple, à la suite d'une mutation ou de l'ajout d'un ligand compétitif qui modifie la quantité d'un complexe formé) sur le comportement du système dans son ensemble. Les approches biophysiques des interactions protéine-ligand concernent l'identification des composants moléculaires des complexes et la quantification de leurs populations à l'équilibre et la cinétique (taux) d'association et de dissociation. Le besoin d'informations sur ces caractéristiques sont communes à tous les types d'interactions (c'est-à-dire entre n'importe quelle paire de protéine, petite molécule, et acide nucléique).

Protéines possédant un site unique de liaison au ligand

Considérons la simple réaction de liaison dans laquelle chaque protéine, R, se lie à un seul ligand, L, pour former un complexe, RL, de manière réversible :



D'après la Loi d'action des masses, qui stipule que les vitesses d'association et de dissociation observées dans une expérience particulière sont égales aux constantes de vitesse multipliées par les concentrations appropriées de chaque espèce.

On peut définir à partir de cette équation la vitesse d'association (v_1) et de dissociation (v_2) comme suit :

$$\mathbf{Vitesse\ d'association\ } v_1 = [\mathbf{R}] \cdot [\mathbf{L}] \cdot k_{\text{on}} \text{ (M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}\text{)}$$

$$k_{\text{on}} = \text{constante (de taux) d'association (M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}\text{)}$$

v_1 = nombre d'évènements de liaison par unité de temps

La constante cinétique d'association (k_{on}) dépendra de la concentration du ligand libre, [L], et de la protéine libre, [R], présents dans la solution, car plus il y a de molécules de ligand et de protéines, plus ils sont susceptibles de s'approcher (se rencontrer) l'un de l'autre et s'associer. Un processus impliquant la collision de deux molécules est décrit par une cinétique de « second ordre ». Cette constante de vitesse d'association de second ordre, k_{on} , ($\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$), décrit la vitesse d'association pour un état standard (hypothétique) de 1 M protéine et 1 M ligand.

$$\mathbf{Vitesse\ de\ dissociation\ } v_2 = [\mathbf{RL}] \cdot k_{\text{off}} \text{ (en M.min-1)}$$

$$k_{\text{off}} = \text{constante de (taux de) dissociation (min-1)}$$

v_2 = nombre d'évènements de dissociation par unité de temps

La constante de vitesse de dissociation, k_{off} , est simplement une vitesse par minute, et ne dépend pas de la concentration car elle représente la probabilité avec laquelle chaque complexe

individuel présent dans solution se dissocie dans la seconde suivante (un processus dépendant d'une seule espèce est dit de premier ordre).

NB : *kon* et *koff* sont des constantes de vitesse et sont donc toujours exprimées avec une lettre k minuscule.

A l'équilibre, par définition, il n'y a pas de changement dans la concentration de tous les composants de la solution, ce qui signifie que la vitesse d'association des protéines libres et des ligands libres pour former des complexes est égal à la vitesse de dissociation des complexes dans leurs molécules constitutives.

$$\Rightarrow v_1 = v_2 \Rightarrow [R] \cdot [L] \cdot kon = [RL] \cdot koff$$

On organisant l'équation précédente on obtient :

$$\frac{kon}{koff} = \frac{[RL]}{[R] \cdot [L]} = Ka \text{ (M}^{-1}\text{)}. \text{ Sachant que } Ka \text{ et la constante d'association à l'équilibre}$$

On peut aussi déduire Kd (M) comme étant la constante de dissociation à l'équilibre et qui est inversement proportionnel à Ka

$$Kd = \frac{1}{Ka} = \frac{koff}{kon} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]}$$

Les unités de Kd sont molaires et sont fréquemment de l'ordre de μM à nM , **ce dernier représentant une affinité plus élevée**, une interaction moins dissociable. **Kd reflète l'affinité de L pour R. C'est la concentration de ligand qui occupe à l'équilibre 50 % des sites récepteurs.**

Capacité maximale de liaison

$$[R_{total}] = [R] + [RL] \Leftrightarrow [R] = [R_{total}] - [RL]$$

1/ On remplace $[R]$ dans l'équation de Kd

$$Kd = \frac{([R_{total}] - [RL]) \cdot [L]}{[RL]}$$

2/ On ajoute $[L]$ de part et d'autre de la réaction

$$Kd + [L] = \frac{([R_{total}] - [RL]) \cdot [L]}{[RL]} + \frac{[RL] \cdot [L]}{[RL]}$$

$$Kd + [L] = \frac{([RTotal] \cdot [L])}{[RL]} - \frac{[RL] \cdot [L]}{[RL]} + \frac{[RL] \cdot [L]}{[RL]}$$

Après simplification de l'équation on obtient :

$$Kd + [L] = \frac{[RTotal] \cdot [L]}{[RL]}$$

$$\Rightarrow [RL] = \frac{[RTotal] \cdot [L]}{Kd + [L]}$$

Sachant que $[Rtotal] = [Bmax] =$ Capacité maximale de liaison

$$\Rightarrow [RL] = \frac{[Bmax] \cdot [L]}{Kd + [L]}$$

Fraction de récepteurs occupés

La Fraction $[RL] / [Bmax]$ est définie comme étant la fraction de récepteurs occupés

$$\frac{[RL]}{[Bmax]} = \frac{[L]}{Kd + [L]}$$

Nous savons que : $Bmax = [Rtotal] =$ capacité maximale de liaison $= [RL] + [R]$

Donc :

1/ Quand $[L] = 0$, la fraction est égale à 0 \Rightarrow aucun site de liaison n'est occupé

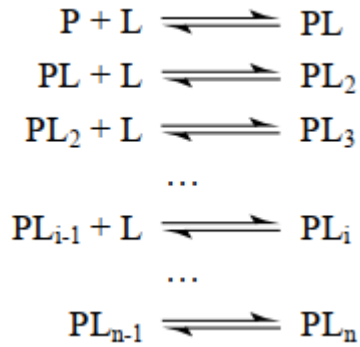
2/ Quand $[L] = Kd$, la fraction est égale à 0,5. On a donc 50 % d'occupation des sites de liaison.

3/ Quand $[L]$ très élevée, la fraction tend vers 1 (l'occupation des sites est totale : 100 %).

Le Kd représente donc la concentration en ligand qui permet la saturation de 50 % des sites récepteurs.

Protéines possédant plusieurs sites équivalents et indépendants

Considérons maintenant le cas le plus général où une protéine possède « n » sites qui sont équivalent et indépendant. Ceci est fréquemment rencontré avec les enzymes oligomères ayant un site de liaison au substrat sur chaque protomère. Il existe un système d'équilibres multiples tel que :



Comme tous les sites sont équivalents et indépendants, un ligand se liant à un site peut être défini par une seule constante d'association microscopique ou intrinsèque, K , qui est la même pour tous les sites récepteurs. Les constantes d'équilibre successives, $K_1, K_2, K_3 \dots K_i \dots K_n$, ne diffèrent de la constante microscopique, K , que par un facteur de probabilité ; la probabilité de liaison à la première molécule étant différente de la liaison à la seconde et ainsi de suite. Ainsi, nous avons les relations :

$$K_n = \frac{K}{n}$$

En effet, il existe n possibilités différentes pour la liaison de la première molécule de ligand et une seule pour la dissociation du complexe PL (d'où le facteur de probabilité n pour le premier équilibre). Il existe $(n - 1)$ façons de lier la deuxième molécule de ligand et deux façons de dissocier le complexe PL_2 , ce qui donne le facteur de probabilité $(n - 1)/2$ pour le deuxième équilibre et ainsi de suite. **Le nombre moyen de sites sur la molécule de protéine occupés par le ligand** peut être défini comme :

$$\bar{v} = \frac{\sum_{i=1}^n iPL_i}{\sum_{i=0}^n PL_i}$$

Cette équation a été simplifiée par SCATCHARD comme suit :

$$\frac{\bar{v}}{(L)} = K(n - \bar{v})$$

Le diagramme SCATCHARD, où $\bar{v} / (L)$ est tracé en fonction de \bar{v} est fréquemment utilisé pour les études de liaison de ligand impliquant des protéines solubles ou membranaires. La figure

12 montre la relation linéaire entre $\bar{v}/(L)$ et \bar{v} . L'ordonnée à l'origine de l'axe horizontal donne n , le nombre de sites, et à partir de la pente, nous obtenons K , la constante d'association intrinsèque. L'ordonnée à l'origine sur l'axe vertical est égale à nK . Ce diagramme permet une plus grande précision dans l'estimation des paramètres n et K , qui sont obtenus directement, plutôt qu'à partir de leurs inverses. Un nombre suffisant de points est requis, cependant, pour couvrir une gamme de concentrations de ligand suffisamment large pour inclure la valeur de K .

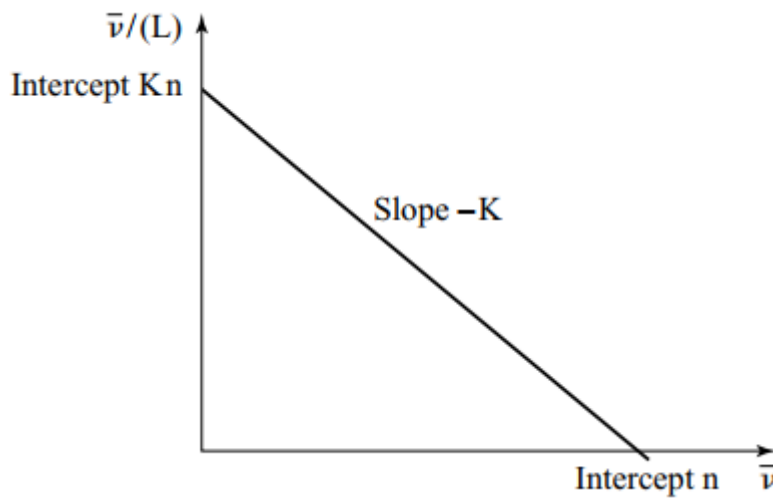


Figure 15 : Représentation de SCATCHARD pour l'interaction d'une protéine-ligands

De même, on peut définir le taux de saturation d'une protéine par le ligand Y_L :

$$Y_L = \frac{\bar{v}}{n} = \frac{K(L)}{1 + K(L)}$$

Pendant la saturation, \bar{v} varie de 0 à n tandis que Y_L varie de 0 à 1 ; Y_L représente le degré de saturation par rapport à un site.

Cinétique Enzymatique

Cinétique Enzymatique Michaelienne à un seul substrat

Evolution des réactions enzymatiques

Variation de la quantité de produit formé en fonction du temps

La figure 15 montre comment la quantité de produit formé évolue dans le temps. La cinétique révèle plusieurs phases.

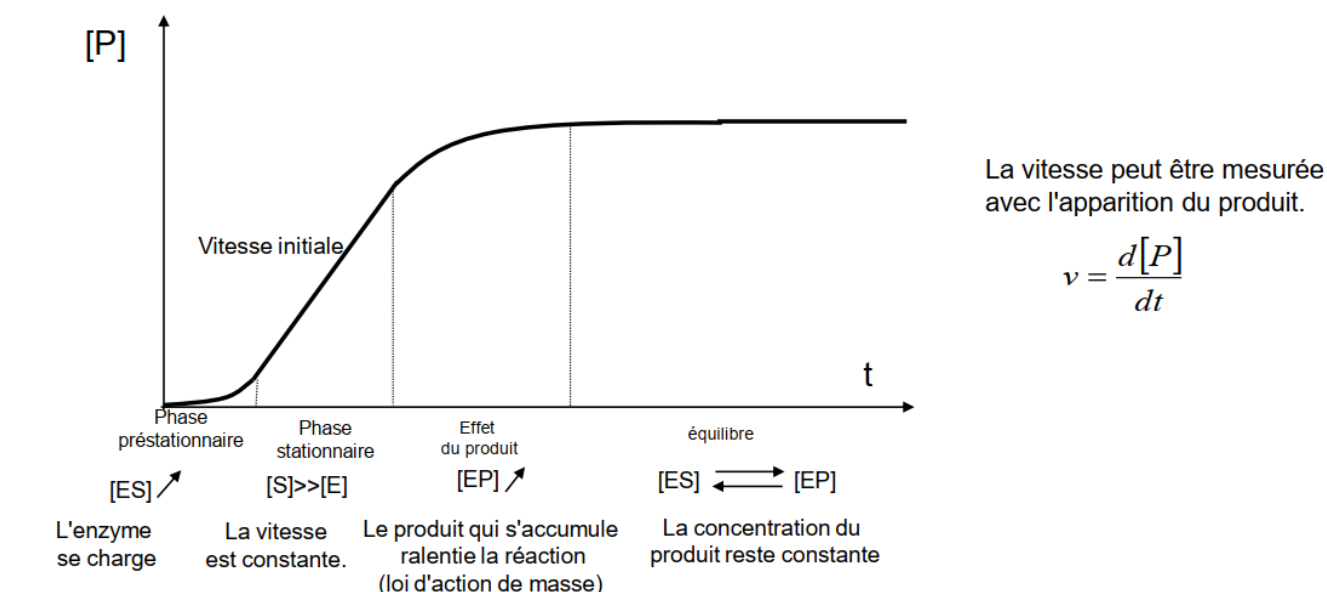


Figure 16 : Cinétique d'apparition des produits de réaction en fonction du temps mettant en évidence les différentes phases (a) phase pré-stationnaire (b) phase stationnaire (c) phase d'inhibition par les produits (d) en phase d'équilibre.

Phase de pré- stationnaire

Il s'agit d'une phase très courte au cours de laquelle les premières molécules du complexe ES se forment jusqu'à ce que la concentration de ce complexe intermédiaire atteigne une valeur constante (phase d'état stationnaire) (Figure 15. Phase a). **La phase pré-stationnaire ne dure qu'une fraction de seconde** et n'est pas détectable lors d'expériences cinétiques réalisées dans des conditions classiques. L'étude de cette phase nécessite l'utilisation de techniques rapides.

Phase stationnaire

Pendant la phase stationnaire, la vitesse d'apparition du produit P est constante (Figure 15. Phase b). **La théorie de MICHAELIS-MENTEN prédit que dans ces conditions la concentration du complexe enzyme-substrat, ES, est constante.**

Phase d'inhibition par les produits de réaction

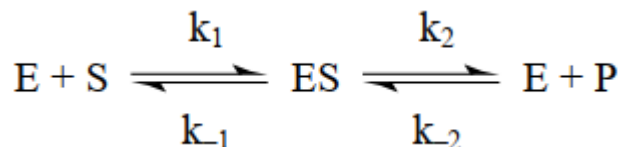
Dans cette phase les concentrations des produits de réaction ne sont plus négligeables et, par conséquent, la réaction inverse tend à abaisser leurs concentrations. Bien sûr, si la constante d'équilibre est grande, c'est-à-dire énormément en faveur de la formation de P, la réaction inverse sera négligeable (Figure 15. Phase c).

Phase d'équilibre

Au cours de cette phase, l'équilibre est atteint. Les quantités de S et P sont constantes. Dans ces conditions la quantité de P formé est égale à la quantité de S converti (Figure 15. Phase d).

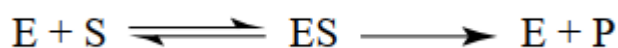
Théorie de Michaelis-Menten

La théorie de MICHAELIS-MENTEN rend compte de ces phénomènes dans des conditions où **la concentration en enzyme est très faible par rapport à la concentration en substrat.** Considérez la réaction simple suivante :



Si les investigations sont limitées à la **période initiale** de la réaction, la concentration du produit est négligeable et **la formation de ES à partir du produit peut être ignorée.** Ces conditions sont pratiquement atteintes lorsque **l'équilibre favorise fortement la formation de P**, ou dans les conditions initiales de la réaction lorsque **la concentration en P est nulle ou pratiquement nulle**, ou encore lorsque P subit des conversions ultérieures excluant la réaction inverse, comme décrit ci-dessous.

Dans ces conditions, la réaction se simplifie encore davantage pour :



Ce cas très simplifié, fut historiquement le premier schéma proposé (V. HENRI, L. MICHAELIS et M. MENTEN), et que George (G. E.) Briggs et John (J.B. S.) Haldane ont résolu en 1925 pour le cas général qui suppose un état stationnaire. En effet, l'équation générale des réactions enzymatiques, c'est-à-dire l'équation de MICHAELIS-MENTEN décrite ci-dessus, repose sur deux hypothèses :

- **Une faible concentration enzymatique**
- **La présence d'un état (stationnaire) stable**

Le taux de formation d'ES à tout moment t (**dans la période initiale où la concentration du produit est négligeable**)

$$v_1 = k_1[E][S]$$

où [E] est la concentration d'enzyme libre et [S] la concentration de substrat libre au temps t.

Également au temps t, le taux de dégradation de ES revient à E et S

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

où [ES] est la concentration du complexe enzyme-substrat à ce moment.

L'hypothèse de Michaelis-Menten était qu'un équilibre entre **l'enzyme, le substrat et le complexe enzyme-substrat était presque instantanément établi et maintenu**, la dégradation du complexe enzyme-substrat en produits étant trop lente pour perturber cet équilibre. En utilisant cette hypothèse, donc :

$$\Leftrightarrow v_1 = v_2 \Rightarrow [E] \cdot [S] \cdot k_1 = [ES] \cdot k_{-1}$$

On réorganisant l'équation on obtient :

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$$

où K_S est la constante de dissociation de ES.

La concentration totale d'enzyme présente [E₀] doit être la somme de la concentration d'enzyme libre [E] et de la concentration d'enzyme liée [ES]. Par conséquent, afin d'impliquer la concentration totale en enzyme [E₀] (**une quantité qui peut être facilement déterminée et spécifiée**) dans l'équation ci-dessus, la substitution suivante est effectuée :

$$[E] = [E_0] - [ES]$$

$$K_S = \frac{([\mathbf{E0}] - [\mathbf{ES}]) \cdot [\mathbf{S}]}{[\mathbf{ES}]}$$

$$\Rightarrow K_S [\mathbf{ES}] = ([\mathbf{E0}] - [\mathbf{ES}]) \cdot [\mathbf{S}]$$

$$K_S [\mathbf{ES}] = [\mathbf{E0}][\mathbf{S}] - [\mathbf{ES}][\mathbf{S}]$$

$$K_S [\mathbf{ES}] + [\mathbf{ES}][\mathbf{S}] = [\mathbf{E0}][\mathbf{S}]$$

$$[\mathbf{ES}] \cdot (K_S + [\mathbf{S}]) = [\mathbf{E0}][\mathbf{S}]$$

$$[\mathbf{ES}] = \frac{[\mathbf{E0}][\mathbf{S}]}{K_S + [\mathbf{S}]}$$

[ES] a été inclus de cette manière car ce terme régit la vitesse de formation des produits (la vitesse globale de réaction) selon la relation :

$$v_0 = k_2 \cdot [\mathbf{ES}]$$

Si nous substituons l'expression à [ES] dérivée ci-dessus, nous obtenons :

$$v_0 = \frac{k_2 \cdot [\mathbf{E0}][\mathbf{S}]}{K_S + [\mathbf{S}]}$$

De plus, nous savons que lorsque la concentration en substrat est très élevée, toute l'enzyme est présente sous forme de complexe enzyme-substrat et la vitesse initiale limite (V_{\max}) est atteinte. Dans ces conditions, $V_{\max} = k_2[\mathbf{E0}]$.

Par conséquent, nous pouvons remplacer $k_2[\mathbf{E0}]$ par V_{\max} dans l'expression de v_0 et obtenir :

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [\mathbf{S}]}{K_S + [\mathbf{S}]}$$

Michaelis et Menten ont en outre supposé que **le substrat était généralement présent à des concentrations beaucoup plus élevées que l'enzyme**. Ceci est généralement vrai, car les enzymes, comme tous les catalyseurs, sont souvent présentes à de très faibles concentrations. La formation du complexe enzyme-substrat à partir de l'enzyme et du substrat est un processus réversible.

Si nous faisons l'hypothèse que la concentration initiale du substrat [S₀] est très supérieure à la concentration initiale de l'enzyme [E₀], alors la formation du complexe enzyme-substrat entraînera une modification insignifiante de la concentration du substrat libre. Dans l'expression pour v₀ dérivée ci-dessus, nous pouvons substituer [S₀] (une quantité facilement spécifiée) pour [S], ce qui donne :

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S_0]}{K_s + [S_0]}$$

C'est une équation requise pour expliquer les résultats expérimentaux. Cependant, il n'est pas satisfaisant en ce que l'hypothèse d'équilibre de Michaelis-Menten ne peut pas être applicable de manière générale : certaines, voire de nombreuses réactions catalysées par des enzymes sont susceptibles de se dérouler à des vitesses suffisamment rapides pour perturber un tel équilibre.

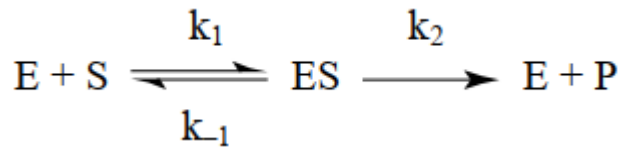
La modification de Briggs-Haldane de l'équation de Michaelis-Menten

L'équation dérivée par Michaelis et Menten a été modifiée par George (G. E.) Briggs et John (J.B. S.) Haldane (1925), qui ont introduit une hypothèse plus généralement valable, celle de l'état d'équilibre. Ils ont fait valoir que puisque la concentration de l'enzyme, et donc du complexe enzyme-substrat, était généralement très faible par rapport à la concentration du substrat, alors **le taux de changement de [ES] serait négligeable par rapport au taux de changement de [P] au cours de la période initiale de la réaction**, sauf pendant la très brève période au début pendant laquelle ES se formait pour la première fois.

En l'absence de produit, la concentration en ES serait déterminée par la concentration totale en enzyme, qui reste constante tout au long, et par la concentration en substrat, qui change d'une quantité négligeable, en pourcentage de sa valeur initiale, sur la période d'intérêt. Ainsi, **une fois ce complexe produit, il serait maintenu en régime permanent, c'est-à-dire qu'il se décomposerait aussi vite qu'il se formerait, [ES] restant constant.**

Des études de réaction rapide ont montré qu'il s'agit d'une hypothèse raisonnable pour la plupart des réactions catalysées par des enzymes dans les conditions indiquées ci-dessus. L'état d'équilibre est généralement établi en quelques millisecondes après le début de la réaction et est maintenue pendant quelques minutes jusqu'à ce que la concentration du produit, et donc la vitesse de la réaction inverse, devienne significative.

Considérant encore une réaction à 1 seul substrat et 1 seul site de fixation :



Le taux de formation d'ES à tout instant t (dans la période initiale où la concentration du produit est négligeable) = $k_1[E][S]$.

Le taux de décomposition de l'ES à ce moment = $k_{-1}[ES] + k_2[ES]$, puisque l'ES peut se décomposer pour former des produits ou reformer des réactifs.

En utilisant l'hypothèse de l'état d'équilibre :

$$[E].[S].k_1 = [ES].k_{-1} + [ES].k_2$$

$$\Rightarrow [E].[S].k_1 = [ES].(k_{-1} + k_2)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{[E].[S]}{[ES]}$$

K_m est une autre constante

En remplaçant $[E] = [E_0] - [ES]$ par sa valeur dans l'équation de K_m on obtient :

$$K_m = \frac{([E_0] - [ES]).[S]}{[ES]}$$

$$\Rightarrow [ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]}$$

En plus $v_0 = k_2.[ES]$

$$\Rightarrow v_0 = \frac{k_2.[E_0][S]}{K_m + [S]}$$

Sachant que $V_{max} = k_2[E_0]$.

$$\Rightarrow v_0 = \frac{V_{max}.[S]}{K_s + [S]}$$

Encore une fois: $[S_0] \approx [S]$

$$\Rightarrow v_0 = \frac{V_{max}.[S_0]}{K_m + [S_0]} \text{ à une concentration } [E_0] \text{ Constante}$$

Cette équation a la même forme que l'équation dérivée de Michaelis et Menten. La définition de la constante au dénominateur est tout ce qui a changé. Ainsi l'équation a conservé le nom **d'équation de Michaelis-Menten** et **K_M** est appelée **constante de Michaelis**. L'hypothèse d'équilibre est considérée comme un cas particulier de l'hypothèse d'état stationnaire plus générale, se produisant où $k_{-1} \gg k_2$.

Un graphique de v_0 contre $[S_0]$ aura la forme d'une hyperbole rectangulaire (Figure 16), compatible avec les résultats expérimentaux pour de nombreuses réactions catalysées par des enzymes.

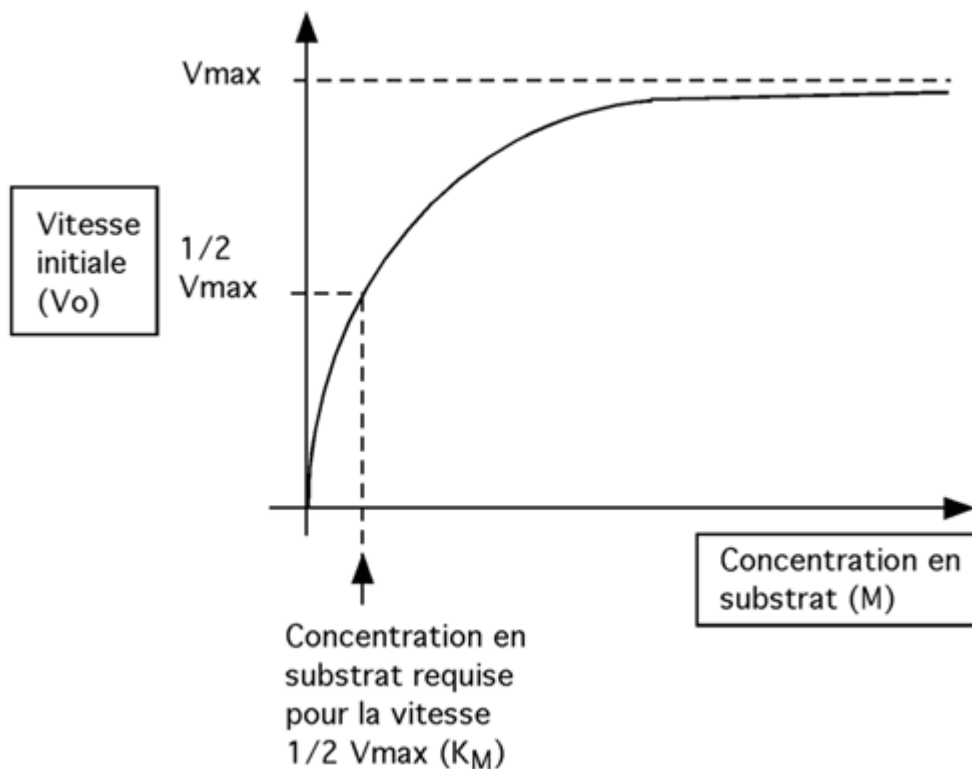


Figure 17 : Représentation graphique de v_0 en fonction de $[S_0]$ pour une réaction à un seul substrat et une seule fixation (Représentation Michaelis Menten)

- **V_{max}** , la vitesse initiale maximale à un $[E_0]$ particulier, peut être obtenue à partir du graphique illustré à la Figure 17 et elle aura les mêmes unités que la v_0 .
- **K_M** est la valeur de $[S_0]$ qui donne une vitesse initiale égale à $1/2 V_{max}$, et K_M aura les mêmes unités que $[S_0]$.

Représentation de Lineweaver-Burk

Le graphique de l'équation de Michaelis-Menten, v_0 contre $[S_0]$ (Figure 16), n'est pas satisfaisant comme moyen de déterminer V_{max} et K_M . La valeur de v_0 s'approche de V_{max}

de manière tangentielle, ne l'atteignant réellement, selon l'équation de Michaelis Menten, qu'à une concentration de substrat infinie.

Il est donc très difficile à utiliser un tracé de v_0 contre $[S_0]$ pour obtenir une valeur précise de V_{max} et donc de K_m . Le graphique, étant une courbe, ne peut pas être extrapolé avec précision vers le haut à partir des valeurs de v_0 à des concentrations non saturantes.

Hans Lineweaver et Dean Burk (1934) ont surmonté ce problème sans faire de nouvelles hypothèses. Ils ont simplement pris l'équation de Michaelis-Menten,

$$\Rightarrow v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S_0]}{K_m + [S_0]}, \text{ et l'ont inversé comme suit :}$$

$$\Rightarrow \frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S_0]}{V_{max} \cdot [S_0]}$$

$$\Rightarrow \frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S_0]} + \frac{[S_0]}{V_{max} \cdot [S_0]}$$

$$\Rightarrow \frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S_0]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Equation de Lineweaver-Burk})$$

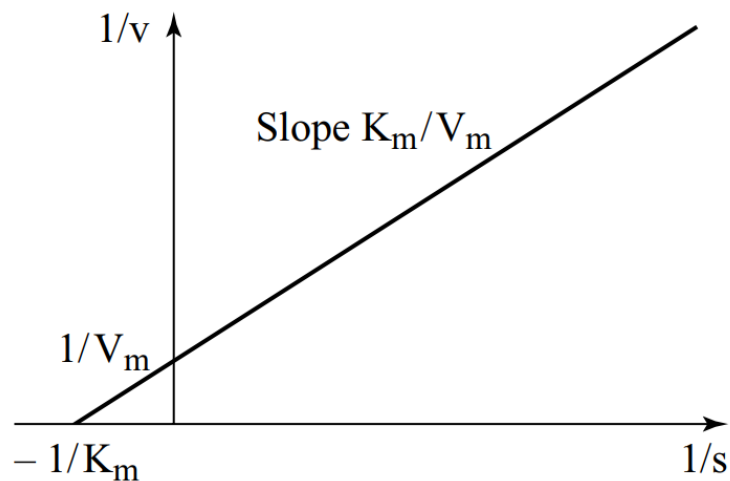


Figure 18 : Représentation Double inverse de Lineweaver-Burk

La pente de la droite obtenue en traçant $1/v$ en fonction de $1/s$ est égale à K_m/V_m et l'axe vertical à l'origine, $1/V_m$. L'ordonnée à l'origine sur l'axe horizontal donne la valeur $-1/K_m$

Cinétique enzymatique à deux substrats

La plupart des réactions biochimiques impliquent au moins deux substrats, il est donc nécessaire de considérer la cinétique de ces réactions. Il s'agit d'un sujet vaste et extrêmement complexe et, pour des raisons de simplicité, nous limiterons notre discussion à quelques exemples précis de réactions à deux substrats et à deux produits (bi-bi). Ce sont souvent des réactions de transfert d'un groupement d'une molécule à une autre (y compris des réactions d'oxydation/réduction) et peuvent être représentées au mieux par : $AX + B \rightleftharpoons BX + A$.

Nomenclature

Nous indiquerons ci-dessous quelques éléments de la nomenclature employée. Un schéma est tout d'abord défini par le nombre de substrats et le nombre de produits :

Un mécanisme **Uni Bi** correspond à un substrat et deux produits ;

Un mécanisme **Bi Bi** correspond à deux substrats et deux produits ;

Un mécanisme **Ter Bi** à trois substrats et deux produits ;

Un mécanisme **Ter Quad** comporte trois substrats et quatre produits.

Les mécanismes séquentiels sont ceux dans lesquels les substrats de réaction s'associent à l'enzyme dans un ordre défini et forment un complexe ternaire avant l'apparition du premier produit.

Pour **les mécanismes aléatoires**, il n'y a pas d'ordre défini.

Un mécanisme de ping-pong fait référence à un schéma réactionnel dans lequel l'enzyme oscille entre deux formes.

De plus, **Iso désigne un mécanisme** qui implique une isomérisation enzymatique.

Ici, la discussion est limitée aux mécanismes impliquant deux substrats.

Mécanisme Bi Bi Ping-Pong

Les 2 substrats A et B ne peuvent jamais se trouver en même temps sur l'enzyme.

Il s'agit d'un transfert entre A et B où A laisse sur l'enzyme un groupement qui sera renvoyé ultérieurement sur B ou vice versa. Dans ce mécanisme, l'enzyme oscille entre deux états, E et F :

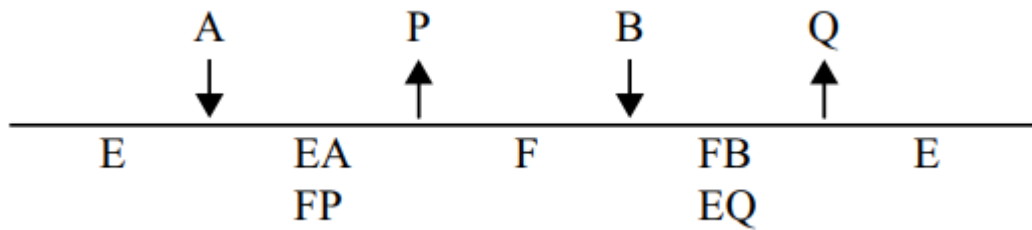


Figure 19 : Représentation Schématique du mécanisme réactionnel Bi Bi ping-pong

Exemples :

1/ La nucléotide diphosphate kinase ou NDPkinase :

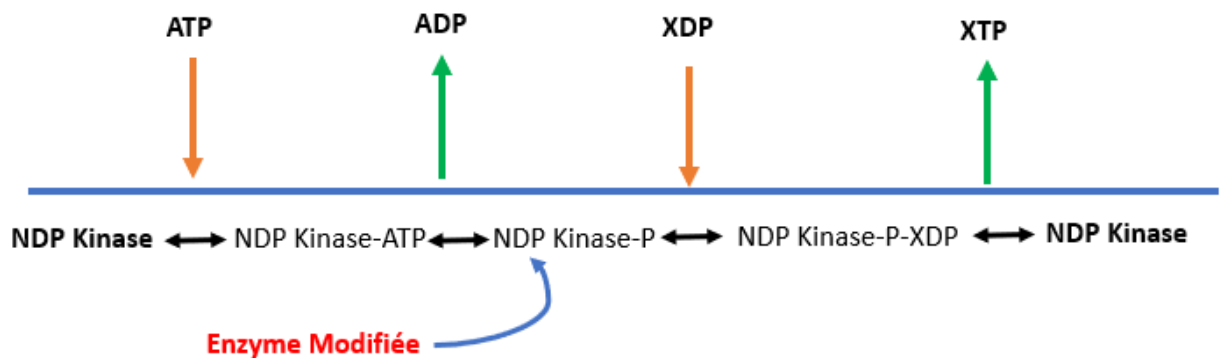
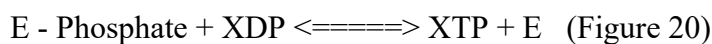
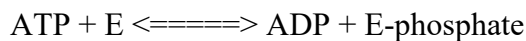
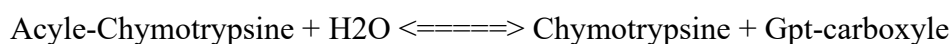
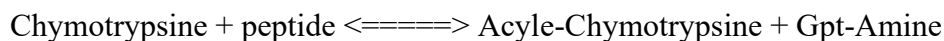
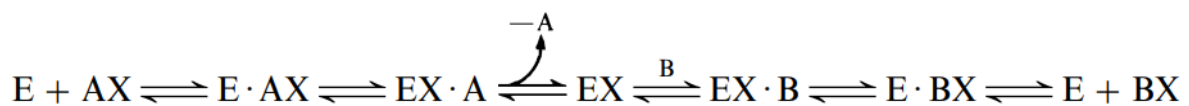


Figure 20 : Mécanisme réactionnel Bi Bi ping-pong de la NDP-Kinase

2/ La chymotrypsine



Un exemple de mécanisme non séquentiel est le mécanisme ping-pong bi-bi ou double déplacement :



En utilisant des hypothèses d'état stationnaire, l'équation de vitesse pour une réaction à double déplacement peut être obtenue :

$$v = \frac{V_{\max} [\text{AX}][\text{B}]}{K_m^{\text{B}} [\text{AX}] + K_m^{\text{AX}} [\text{B}] + [\text{AX}][\text{B}]}$$

Si nous fixons la valeur de [B], alors l'équation pour la variable [AX] devient :

$$v = \frac{V_{\max} [AX]}{K_m^{AX} + [AX] \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]}\right)}$$

Les tracés réciproques d'une réaction conforme au mécanisme de double déplacement pour des concentrations variables de [AX] à plusieurs concentrations fixes de [B] donneront un nid de lignes parallèles, comme le montre la figure 21.

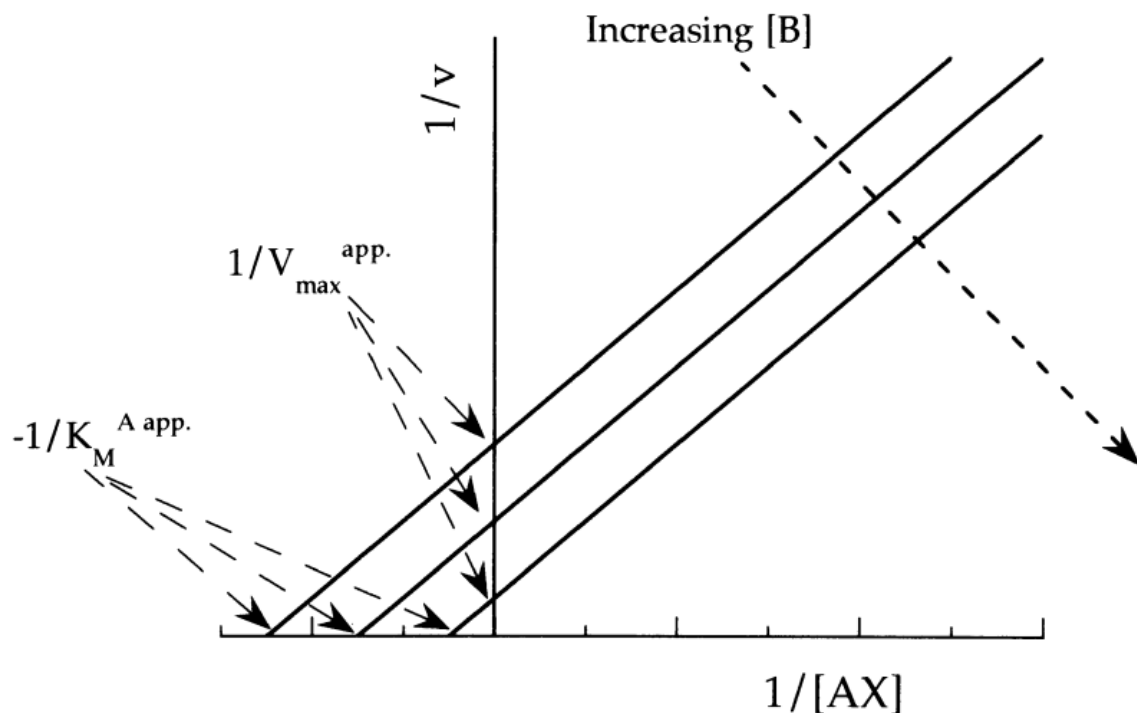


Figure 21 : Représentation Primaire double inverse $1/v = f(1/[AX])$ à différentes concentrations de [B] du mécanisme réactionnel Bi Bi ping-pong

Pour chaque concentration de substrat B, les valeurs de $1/V_{\max}$ et $-1/K_m^{AX}$ peuvent être déterminées à partir des interceptions y et x, respectivement, du tracé primaire à double inverse. Les données contenues dans la Figure précédente (Figure 21) peuvent être retracées comme représentations secondaires en termes de $1/V_{\max}$ en fonction de $1/[B]$, et $1/K_m^{AX}$ comme illustré à la Figure 22.

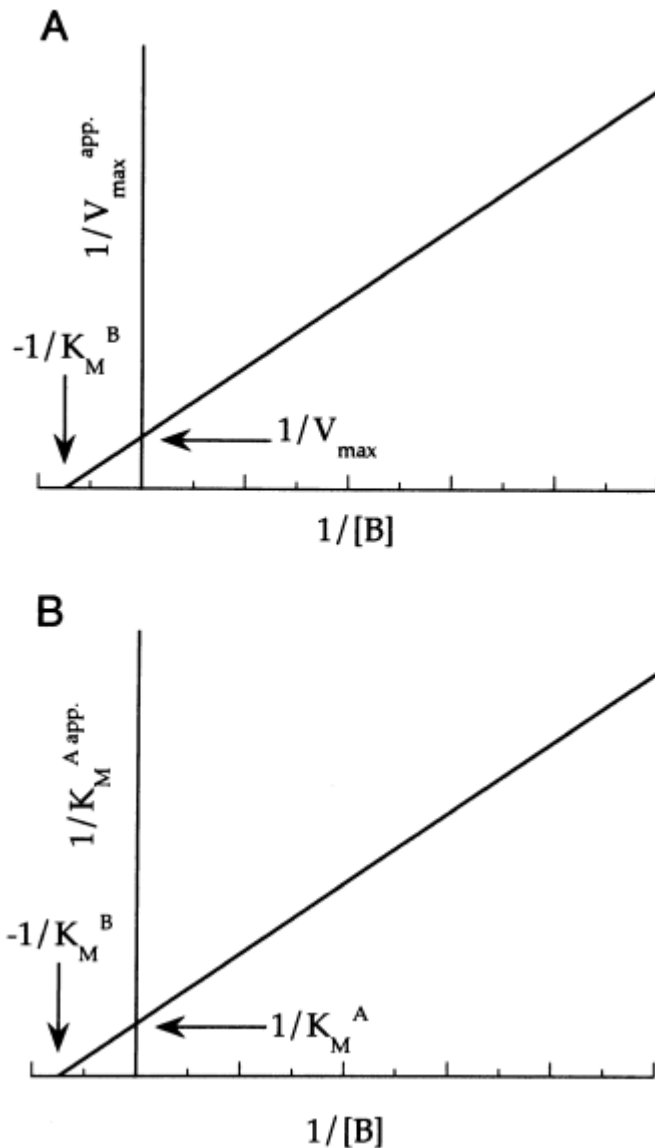


Figure 22 : Représentation secondaire ; **A)** $1/V_{max}$ en fonction de $1/[B]$ et **B)** $1/K_M^{AX}$ en fonction de $[B]$ du mécanisme réactionnel Bi Bi ping-pong

La valeur de $-1/K_M^B$ peut être déterminée à partir des intersections x de l'un ou l'autre des tracés de la figure 22. Les ordonnées à l'origine des deux tracés donnent des estimations de $1/V_{max}$ (pour le tracé $1/V_{max}$ en fonction de $1/[B]$) et $1/K_M^{AX}$ (pour le tracé $1/K_M$ en fonction de $1/[B]$ de représentations secondaire) pour la réaction, comme le montre la **Figure 22**.

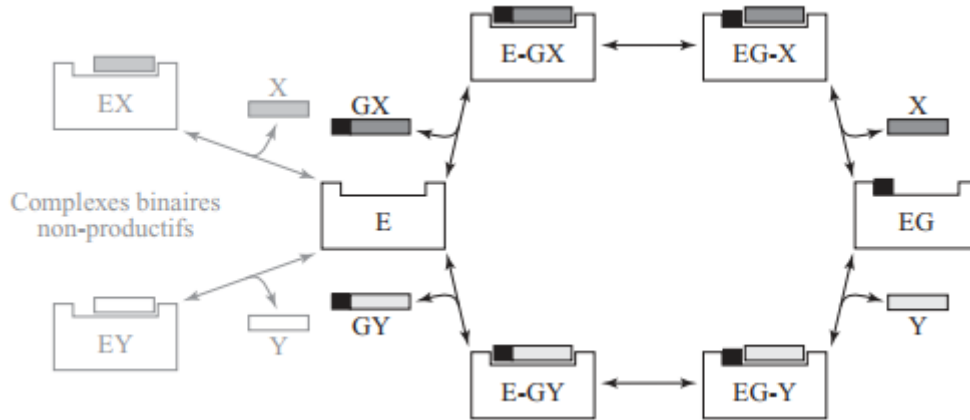


Figure 23 : Représentation schématique d'un mécanisme de transfert de groupement chimique G selon le mécanisme Bi Bi ping-pong

GX se lie d'abord à l'enzyme E, formant un complexe binaire E.GX (**G est généralement un petit groupe et ne participe pas à la réaction en tant que molécule libre, il n'est donc pas considéré comme un réactif séparé**). Une réorganisation intramoléculaire a lieu, la liaison E-G étant formée et la liaison X-G étant rompue. Le premier produit, X, est libéré avant l'arrivée du deuxième substrat. Y ne peut pas se lier à l'enzyme E mais peut se lier à l'enzyme modifiée EG. Puisqu'un seul substrat est présent sur l'enzyme à la fois, il ne peut y avoir qu'un seul site de liaison. Un autre réarrangement intramoléculaire a lieu, la liaison G-Y étant formée et la liaison E-G étant rompue. Le deuxième produit, GY, est alors libéré, laissant l'enzyme dans sa forme originale (Figure 23).

MÉCANISME THEORELL-CHANCE

Ce mécanisme a été proposé par CHANCE et THEORELL pour rendre compte de la cinétique des réactions catalysées par l'alcool déshydrogénase. Le substrat B, lors de la liaison, éjecte le premier produit de réaction et le convertit (**Figure 24**).

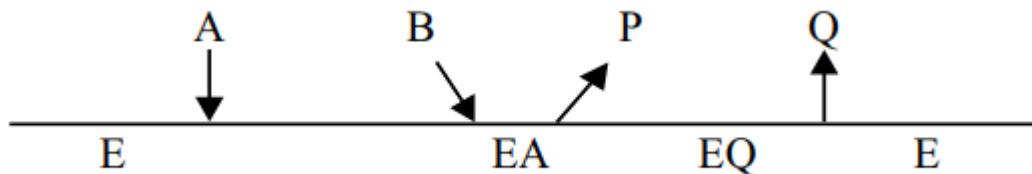


Figure 24 : Représentation Schématique du mécanisme réactionnel Bi Bi ping-pong

Exemple : Ce mécanisme rend compte des propriétés cinétiques de l'alcool déshydrogénase du foie de cheval (Figure 25)

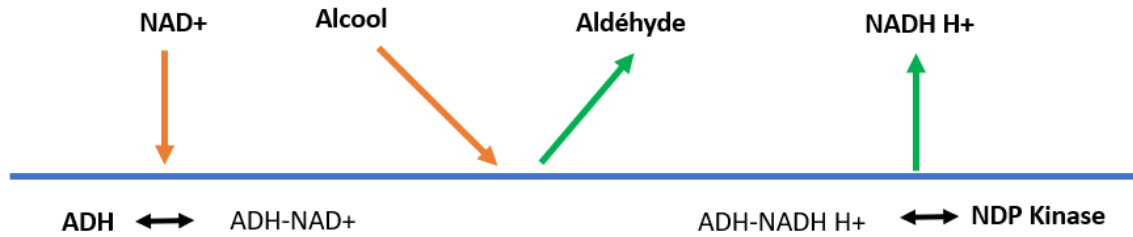


Figure 25 : Mécanisme réactionnel CHANCE et THEORELL de l'alcool déshydrogénase du foie de cheval

Dans les deux derniers schémas, le complexe réactionnel est un complexe binaire entre l'enzyme et un seul substrat.

Mécanisme bi bi aléatoire

Un mécanisme d'ordre aléatoire est un mécanisme dans lequel n'importe quel substrat peut se lier en premier à l'enzyme et n'importe quel produit peut partir en premier. C'est un mécanisme séquentiel et pour une réaction à deux substrats **implique la formation d'un complexe ternaire (un impliquant l'enzyme et les deux substrats)**. Le complexe réactif est le complexe ternaire EAB (Figure 26).

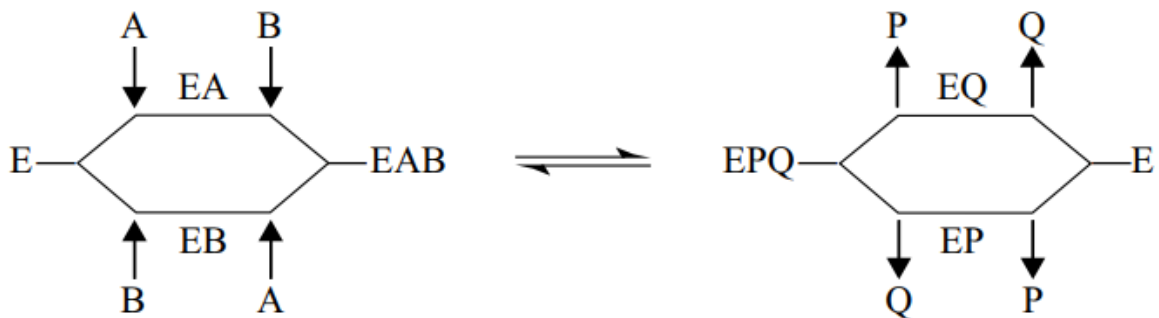


Figure 26 : Représentation Schématique du mécanisme réactionnel Bi Bi aléatoire

La figure 27 montre un exemple de la réaction de transfert du groupement G d'un donneur GX à un accepteur Y catalysée par l'enzyme E selon le mécanisme Bi Bi aléatoire :

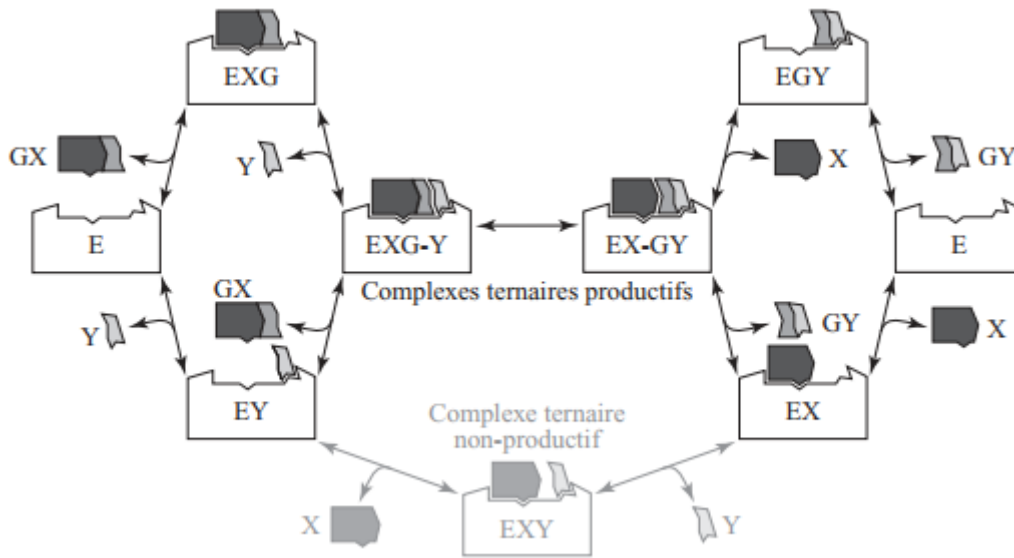


Figure 27 : Représentation schématique d'un mécanisme de transfert de groupement chimique G selon le mécanisme Bi Bi aléatoire

Dans ce cas on peut supposer que l'enzyme possède deux sites de fixation pour les substrats GX et Y (Figure 28)



Figure 28: Mode de fixation des substrats sur une enzyme agissant selon un mécanisme Bi Bi aléatoire

Cinétiques

Les réactions Bi Bi aléatoire se déroule selon le schéma réactionnel de la Figure 29.

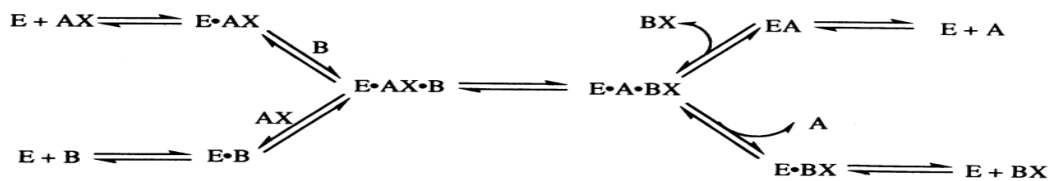


Figure 29 : Schéma réactionnel d'une réaction Bi Bi Aléatoire

Ici, la liaison de AX à l'enzyme libre (E) est décrite par la constante de dissociation K^{AX} , et la liaison de B à E est également décrite par K^B . Notez que la liaison d'un substrat peut très bien affecter l'affinité de l'enzyme pour le second substrat (**Liaison dépendente**). Par conséquent, nous pouvons trouver que la liaison de AX au complexe E·B préformé est décrite par la constante αK^{AX} . De même, depuis l'équilibre global entre E·AX·B et E doit être indépendant du chemin, la liaison de B au complexe préformé E·AX est décrite par αK^B .

Lorsque B est saturant, la valeur de αK^{AX} est égale à la constante de Michaelis pour AX ($\alpha K^{AX} = K_m^{AX}$). De même, lorsque AX sature, $\alpha K^B = K_m^B$.

La vitesse d'une telle réaction enzymatique est donnée par l'équation suivante :

$$v = K_{cat} [E \cdot AX \cdot B] = \frac{k_{cat}[Et][E \cdot AX \cdot B]}{[E] + [E \cdot AX] + [E \cdot B] + [E \cdot AX \cdot B]}$$

Si on exprime les concentrations des différentes espèces en fonction de la concentration en enzyme libre [E], on obtient :

$$v = \frac{V_{max} [AX][B]}{\alpha K^{AX} K^B + \alpha K^B [AX] + \alpha K^{AX} [B] + [AX][B]}$$

Si nous fixons la concentration de l'un des substrats, nous pouvons réorganiser et simplifier considérablement l'équation précédente. Par exemple, lorsque [B] est fixe et que [AX] varie, on obtient :

$$v = \frac{V_{max} [AX]}{\alpha K^{AX} \left(1 + \frac{K^B}{[B]}\right) + [AX] \left(1 + \frac{\alpha K^B}{[B]}\right)}$$

A des concentrations élevées et fixes de B, les termes $K^B/[B]$ et $\alpha K^B/[B]$ tendent vers zéro. Ainsi, aux concentrations saturantes de B on trouve :

$$v = \frac{V_{max} [AX]}{K_m^{AX} + [AX]} \quad (\text{Cinétique Michaelienne})$$

De même à des concentrations saturantes de [AX] on trouve :

$$v = \frac{V_{\max} [B]}{K_m^B + [B]} \text{ (Cinétique Michaelienne)}$$

Si nous mesurons la vitesse de réaction sur une gamme de concentrations AX à plusieurs concentrations fixes de B, les tracés réciproques afficheront un nid de lignes qui convergent vers la gauche de l'axe y, comme illustré à la figure 30.

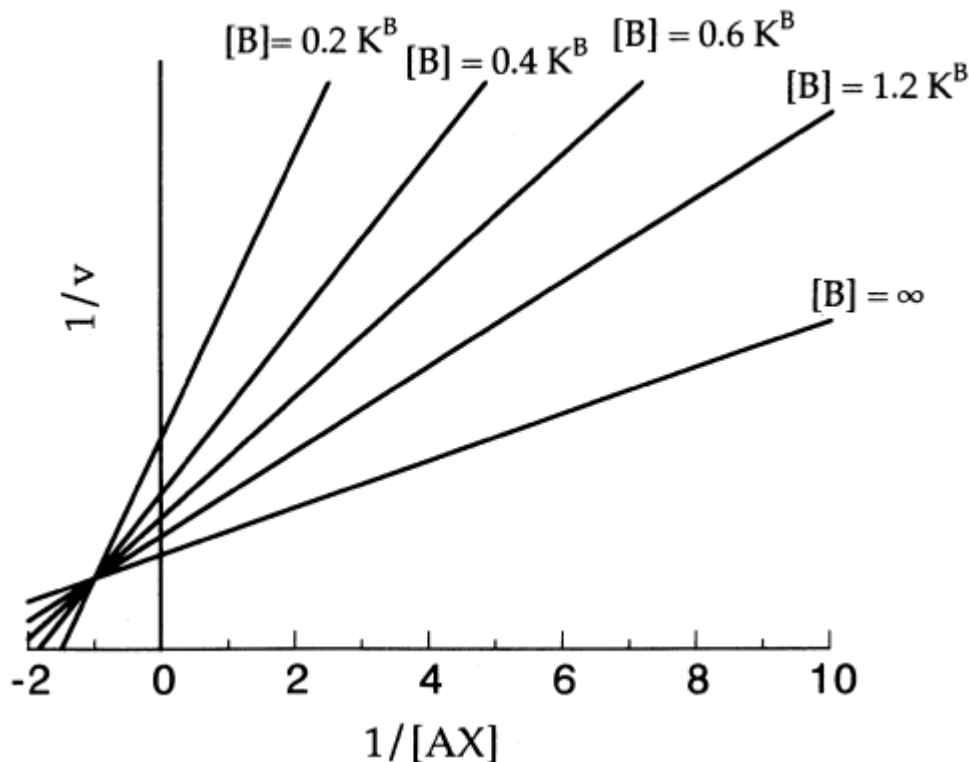


Figure 30 : Représentation Primaire double inverse $1/v = f(1/[AX])$ à différentes concentrations de [B] du mécanisme réactionnel Bi Bi ping-pong

Les données de la figure 30 peuvent être représentées sous la forme des pentes des droites en fonction de $1/[B]$, et des ordonnées à l'origine (c'est-à-dire $1/V_{\max}$) en fonction de $1/[B]$ comme dans la figure Figure 31.

L'ordonnée à l'origine Y du tracé de la pente en fonction de $1/[B]$ donne une estimation de $\alpha K^{AX} / V_{\max}$, et l'ordonnée à l'origine de ce graphique donne une estimation de $-1/K^B$.

Les interceptions y et x du tracé de $1/V_{\max}$ par rapport à $1/[B]$ donnent des estimations de $1/V_{\max}$ et $-1/\alpha K^B$, respectivement. Ainsi à partir des données contenues dans les deux présentations secondaires, on peut calculer les valeurs de K^{AX} , K^B et V_{\max} simultanément.

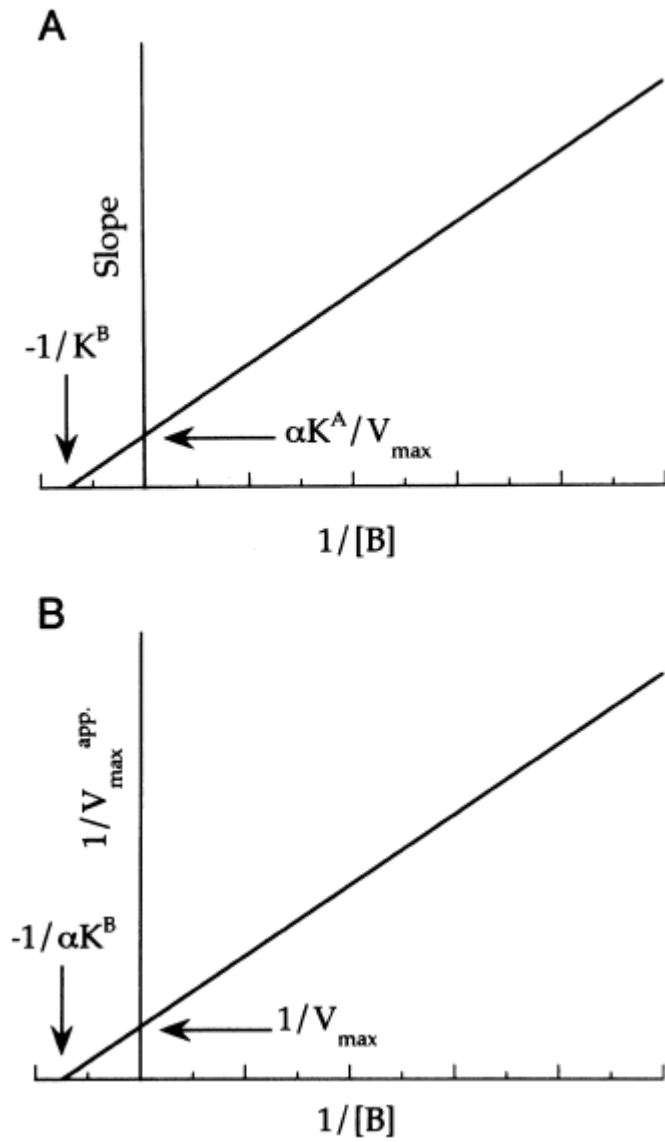


Figure 31 : Représentation secondaire ; **A**) Les pentes en fonction de $1/[B]$ et **B**) $1/V_{\max}$ en fonction de $1/[B]$ du mécanisme réactionnel Bi Bi Aléatoire

Mécanisme Bi Bi Ordonné

Les substrats s'associent à l'enzyme dans un ordre défini ; B ne peut se lier qu'au complexe EA et les produits de réaction sont libérés selon une séquence définie (Figure 32).

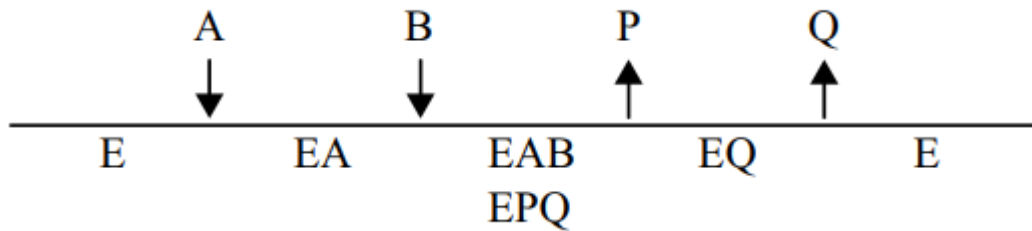


Figure 32 : Représentation Schématique du mécanisme réactionnel Bi Bi Ordonné

C'est un mode observé en particulier chez les déshydrogénases. Dans ce cas, le NAD^+ se fixe en premier, le substrat ensuite, le substrat oxydé repart en premier et le NADH , H^+ en dernier (Figure 33).

Exemple : L'alcool déshydrogénase

La fixation du NAD^+ est indispensable à la mise en conformité du site pour le substrat grâce à un changement de structure de la protéine dont chaque monomère possède deux domaines articulés l'un sur l'autre.

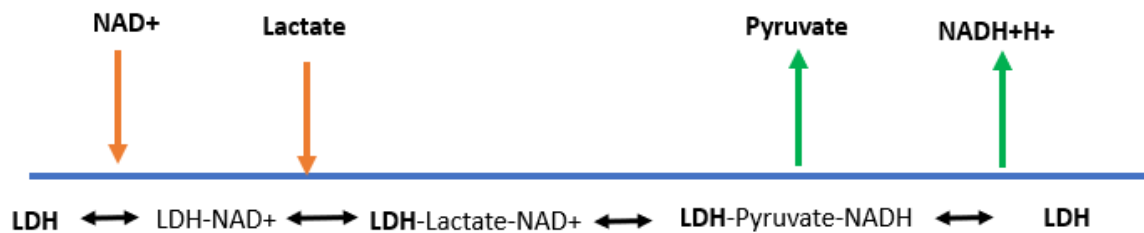


Figure 33 : Mécanisme Bi Bi ordonné de la lactate déshydrogénase

En absence du coenzyme (NAD^+), il n'y a pas de fixation du substrat

La fixation du substrat (NAD^+) entraîne un changement de conformation de l'enzyme et ce changement de conformation est appelé ajustement induit.

La figure 34 montre un exemple de la réaction de transfert du groupement G d'un donneur GX à un accepteur Y catalysée par l'enzyme E selon le mécanisme Bi Bi ordonné :

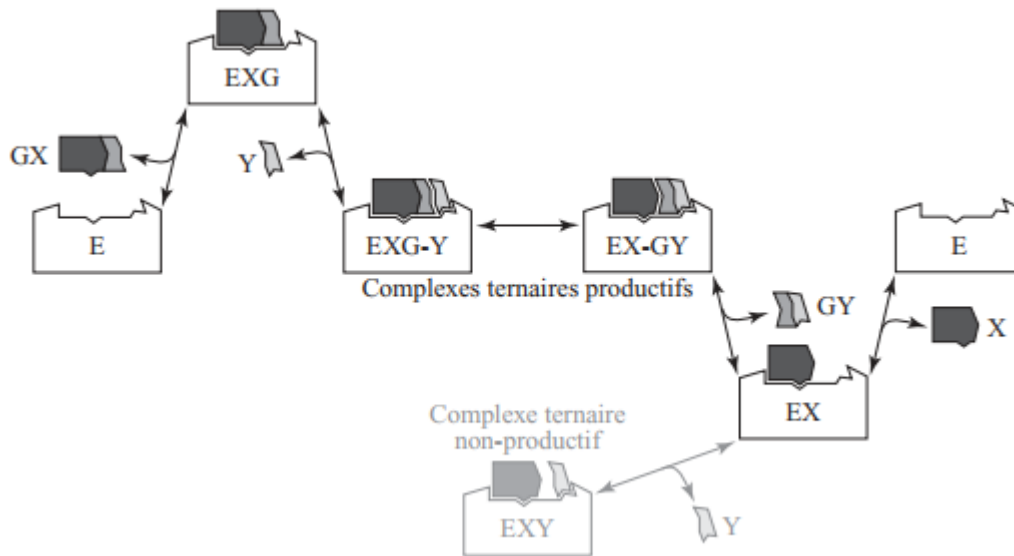
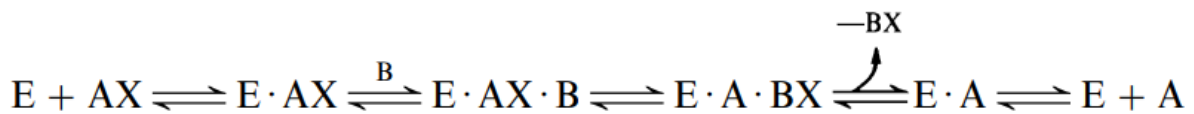


Figure 34 : Transfert d'un groupement G entre deux molécules GX et Y selon un mécanisme bi bi ordonnées

Dans les réactions bi bi ordonnées, un substrat, disons AX, doit se lier à l'enzyme avant que l'autre substrat (B) puisse se lier. Le mécanisme passe par la formation d'un **complexe intermédiaire ternaire**. Dans ce cas, le schéma réactionnel est le suivant :



Si la conversion du complexe $E \cdot AX \cdot B$ en $E \cdot A \cdot BX$ est l'étape limitant la vitesse de la catalyse, alors E, AX, B et $E \cdot AX \cdot B$ sont tous en équilibre, et la vitesse de la réaction sera être donné par :

$$v = \frac{V_{\max} [AX][B]}{\alpha K^{AX} K^b + \alpha K^B [AX] + [AX][B]}$$

Si, cependant, la conversion de $E \cdot AX \cdot B$ en $E \cdot A \cdot BX$ est aussi rapide que les autres étapes de la catalyse, des hypothèses d'état stationnaire doivent être utilisées dans la dérivation de l'équation de vitesse. Pour une réaction bi bi ordonnée obligatoire, le traitement à l'état d'équilibre donne l'équation suivante :

$$v = \frac{V_{\max} [AX][B]}{K^{AX} K m^b + K m^B [AX] + K m^{AX} [B] + [AX][B]}$$

Comme nous l'avons décrit, le terme K^{AX} dans l'équation est la constante de dissociation pour le complexe $E \cdot AX$, et $K m^{AX}$ est la concentration de AX qui donne une vitesse $\frac{1}{2} V_{\max}$ à concentration [B] fixe et saturante.

Le schéma des tracés réciproques observés pour [AX] varié à différentes valeurs fixes de [B] est identique à celui du modèle d'une réaction bi bi ordonnée aléatoire (notez la similitude

entre les équations). **Par conséquent, on ne peut pas faire la distinction entre les mécanismes bi bi ordonnés et aléatoires sur la seule base de représentation réciproques.**

Mécanisme Bi Bi Ordonné Iso

C'est le même mécanisme que précédemment, mais au cours de la réaction l'enzyme subit une isomérisation. Dans l'étape finale, il adopte à nouveau sa conformation active initiale (Figure 35):

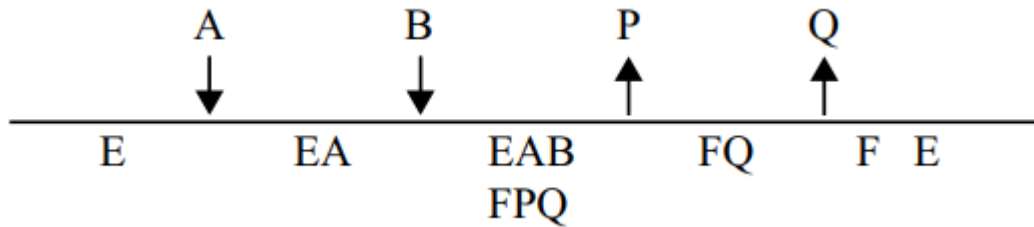


Figure 35 : Représentation Schématique du mécanisme réactionnel Bi Bi Ordonné

Dans ces Trois types de mécanisme le complexe ternaire est le complexe réactif.

Fonctionnement et régulation des enzymes allostériques

Notion de coopérativité

Comme nous l'avons déjà décrit certaines enzymes fonctionnent comme des complexes oligomériques de plusieurs sous-unités protéiques, chaque sous-unité étant composée de chaînes polypeptidiques identiques ou différentes. Dans certaines enzymes oligomères, chaque sous-unité contient un centre de site actif pour la liaison au ligand et la catalyse. Dans le plus simple cas, les sites actifs sur ces différentes sous-unités agissent indépendamment, comme si chacun représentait une unité catalytique distincte.

La liaison de ligands à un site actif de l'enzyme peut augmenter ou diminuer l'affinité des sites actifs sur les autres sous-unités pour la liaison de ligand. Lorsque l'affinité de liaison au ligand d'un site actif est affectée par l'occupation du ligand sur un autre site actif, on dit que les sites actifs agissent en coopération.

Coopérativité positive

Si la liaison du ligand à un site augmente l'affinité des autres sites.

Coopérativité négative

Si l'affinité des autres sites est diminuée par la liaison du ligand au premier site.

Coopérativité homotrope

Ce phénomène se produit lorsque la liaison d'une molécule d'un substrat ou d'un ligand affecte la liaison ultérieure du même substrat ou ligand à la protéine (c'est-à-dire que la liaison d'une molécule de « A » affecte la liaison d'autres molécules de type « A »).

Coopérativité hétérotrope

Elle se produit lorsque la liaison d'une molécule d'un substrat ou d'un ligand affecte la liaison d'un substrat ou d'un ligand différent à la protéine (c'est-à-dire que la liaison d'une molécule de « A » affecte la liaison d'autres molécules de type « B »).

Notion d'allostérie

Pour qu'une interaction coopérative se produise entre deux sites actifs à une certaine distance (par exemple, sur des sous-unités distinctes du complexe enzymatique), la liaison du ligand à un site doit induire un changement structurel dans la protéine environnante qui est transmis, via la chaîne polypeptidique, aux site(s) actif(s) distale.

Ce concept de changements structurels transmis dans la protéine, résultant en une communication à longue distance entre les sites, a été appelé « allostérie », et les enzymes qui affichent un tel comportement sont connus sous le nom d'enzymes allostériques.

Le mot « allostérique », qui dérive de deux mots grecs – allos signifiant différent, et stéréos, signifiant structure ou solide – a été inventé pour souligner que le changement structural au sein de la protéine provoque les interactions coopératives entre différents sites.

Effecteurs allostériques

Les petites molécules qui se lient à des sites autres que le site actif de l'enzyme et induisent un changement conformationnel de l'enzyme qui régule l'affinité du site actif pour son substrat (ou d'autres ligands) sont appelées **effecteurs allostériques**. Ces molécules peuvent augmenter l'affinité du site actif au substrat (c'est-à-dire, servant d'activateurs allostériques) ou diminuer cette affinité (c'est-à-dire, servant de répresseurs allostériques).

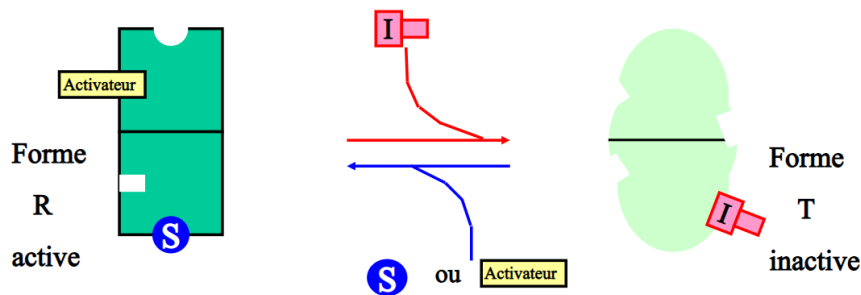


Figure X: Modifications structurelles induites par les effecteurs allostériques

Ces effecteurs peuvent agir par différents modes comme le montre la figure suivante

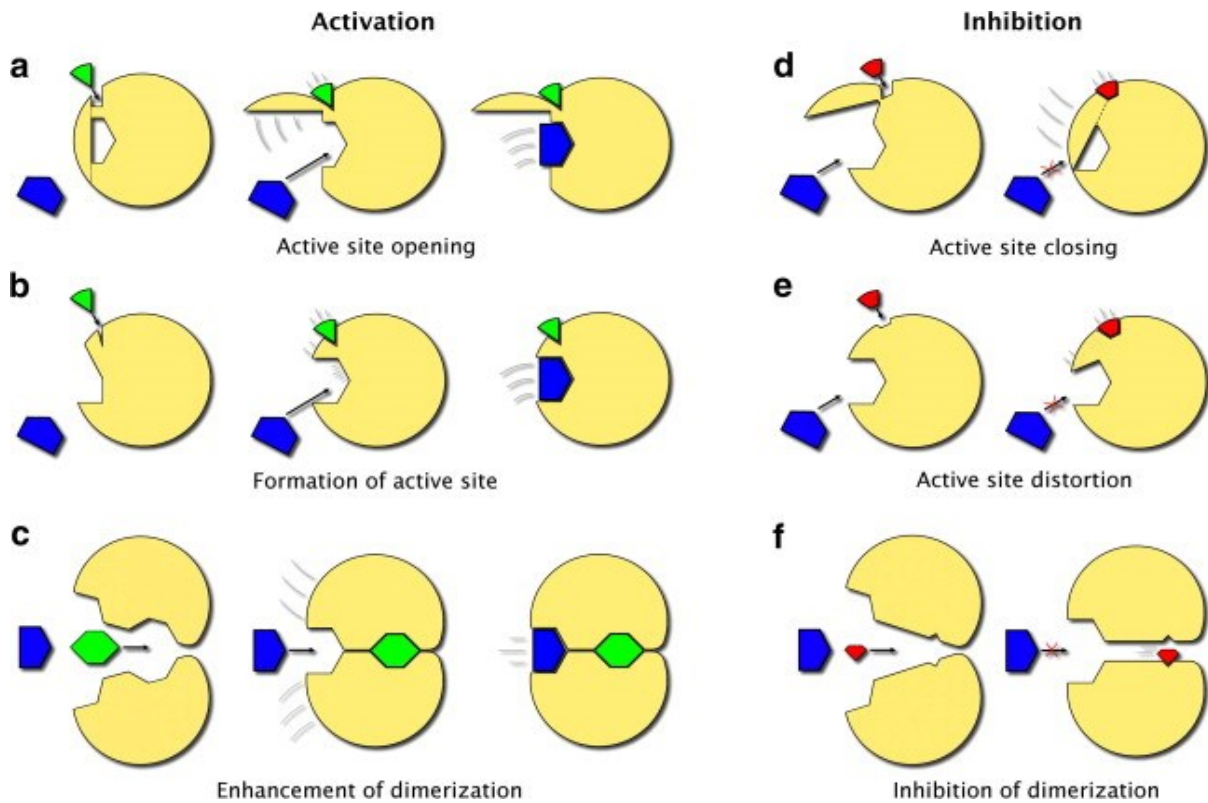


Figure X : Différents mode d'actions des effecteurs allostériques

Régulation allostérique

Les enzymes allostériques sont responsables du phénomène de régulation par rétro-inhibition observé dans la plupart des voies métaboliques. Le phénomène survient lorsqu'un des métabolites finaux inhibe l'activité de la première enzyme qui conduit à sa biosynthèse (Figure).

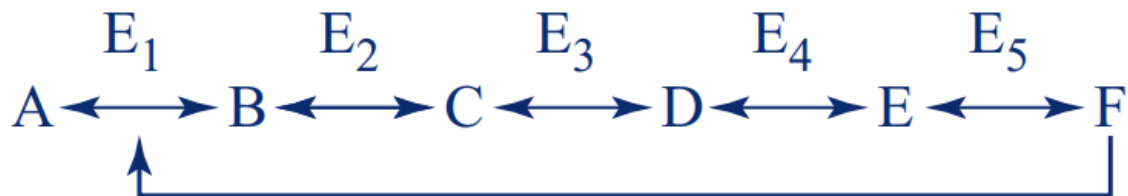


Figure X : Rétro-inhibition de la première enzyme d'une série de réactions par le produit finale

Si l'on considère la transformation du métabolite A en métabolite F, qui comporte cinq étapes catalysées chacune par une enzyme spécifique (E1 à E5), la rétro-inhibition consiste dans le fait que le métabolite final F inhibe l'activité de l'enzyme E1, limitant ainsi sa propre fabrication (Figure).

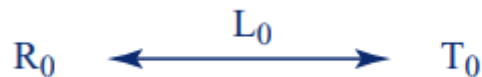
Modèles de comportement allostérique

Deux modèles théoriques ont été proposés pour expliquer l'allostérie des enzymes et autres protéines liant des ligands. Le premier, le **modèle séquentiel**, proposé par Koshland et ses collaborateurs (Koshland et al., 1966). Le second, le **modèle de transition concertée ou symétrique**, basé sur les travaux de Monod, Wyman et Changeux (1965) et qui a été largement appliqué à des protéines telles que l'hémoglobine, pour expliquer la coopérativité lors de la liaison au ligand.

Le modèle symétrique (concertée)

Le modèle symétrique concertée, également connu sous le nom de modèle MWC en l'honneur des scientifiques : Monod, Wyman et Changeux, suppose que :

- les enzymes allostériques sont des oligomères constitués d'unités identiques (sous-unités ou « protomères ») disposées symétriquement les unes par rapport aux autres et que chaque unité contient un seul site de liaison au ligand.
- L'oligomère global peut exister dans l'un ou l'autre de deux états conformationnels, reflétant soit un changement de structure quaternaire, soit des changements de structure tertiaire au sein des protomères individuelles, et ces deux conformations sont en équilibre.



Les états R_0 et T_0 font donc référence aux deux états conformationnels sans ligands liés à l'enzyme

- L'état conformationnel avec une **faible affinité pour le ligand est une structure tendue (T)** et cette structure est relâchée par la liaison du ligand et la transition conformationnelle associée. Pour cette raison, l'état de faible affinité de liaison est souvent appelé l'état « T » (pour tendu), et **la conformation de haute affinité est appelée l'état « R » (pour relâché ou détendu)**.

- La transition entre les deux états conformationnels se produit avec un maintien de la symétrie. Pour qu'il en soit ainsi, **toutes les unités de protomères doivent changer de conformation en même temps**- on ne peut pas avoir un oligomère dans un état conformationnel mixte (c'est-à-dire certains protomères dans une conformation et certains dans l'autre).

- La transition entre les deux états conformationnels est hautement concertée et il n'y a pas d'états hybrides ou intermédiaires impliqués. L'affinité du site de liaison du ligand sur un protomère dépend de l'état conformationnel de cette unité protomère. En d'autres termes, le ligand d'intérêt va se lier préférentiellement à l'un des deux états conformationnels du protomère. Ainsi, la liaison d'un ligand à un site de liaison déplacera l'équilibre entre les états conformationnels en faveur de la conformation de liaison de ligand préférée.

- Étant donné que les protomères de l'oligomère changent de conformation simultanément, la liaison du ligand à un site a pour effet de basculer tous les sites de liaison du ligand vers la forme d'affinité supérieure.

Ainsi, le modèle MWC explique une forte coopérativité positive en termes d'observation selon laquelle l'occupation d'un seul site de liaison de ligand induit tous les autres sites de liaison de la protéine oligomérique à adopter leur conformation de haute affinité.

Les transitions entre Les états « T » et « R » sont concertées, comme décrit, à des fins comptables, les diagrammes du modèle MWC désignent différents états d'occupation du ligand des deux conformations R et T, où x indique le nombre de ligands liés à l'oligomère. Par conséquent, une enzyme tétramérique pourrait se trouver en principe dans les états R_0 à R_4 , et T_0 à T_4 (Figure). La constante d'équilibre entre ces deux états « vides », **la constante allostérique**, est symbolisée par « L »:

$$L = \frac{[T_0]}{[R_0]}$$

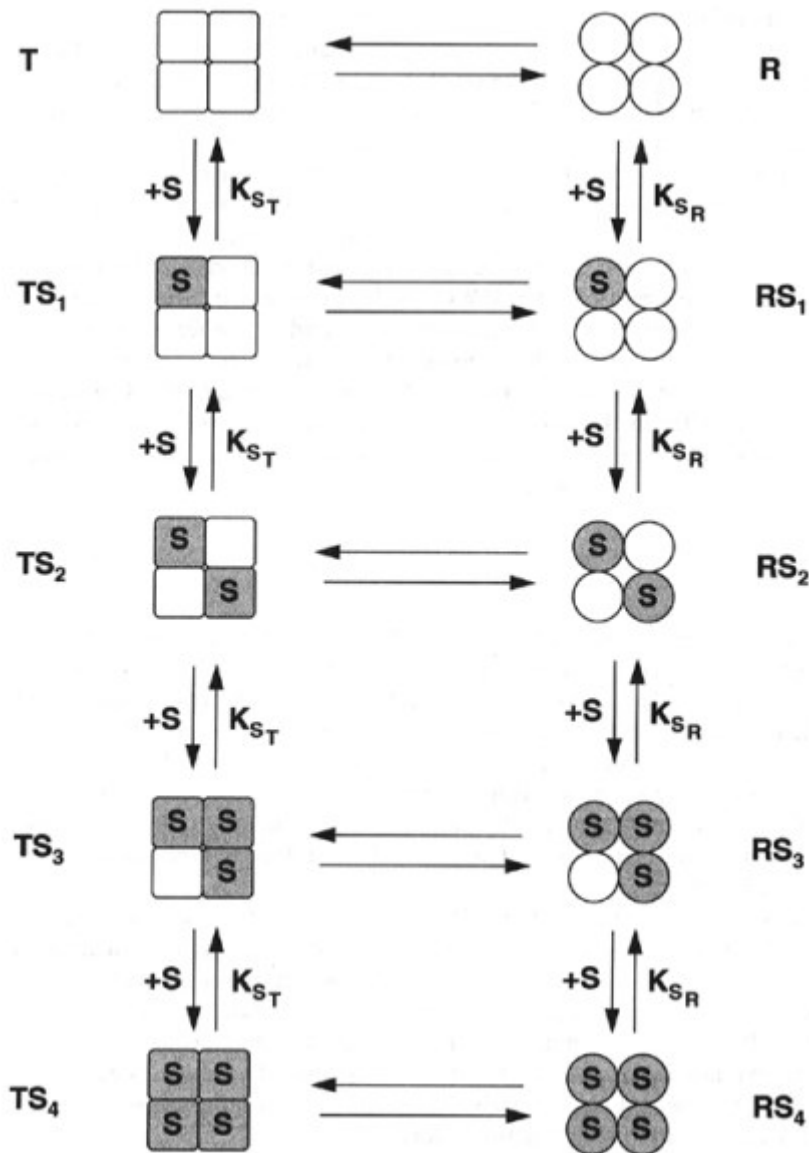


Figure : Différents états d'une enzymes tétramériques selon le modèle symétrique

Modèle séquentiel [KOSHLAND, NÉMÉTHY & FILMER, 1966]

Le modèle séquentiel peut expliquer les phénomènes anti-coopératifs aussi bien que coopératifs. Ce modèle est basé sur la théorie de l'ajustement induit développée précédemment par KOSHLAND pour expliquer l'efficacité des réactions enzymatiques basées sur la flexibilité de structures protéiques.

Le modèle séquentiel ne prend pas du tout en compte la conservation de la symétrie et suppose l'existence de conformations hybrides. Il repose sur les postulats suivants :

- La protéine n'existe sous une forme A qu'en l'absence du ligand ; La liaison du ligand à une sous-unité induit un changement conformationnel de la sous-unité vers une conformation B; ce

changement conformationnel de la sous-unité concernée provoque des variations dans les interactions entre sous-unités ;

- Le ligand se lie préférentiellement à l'une des deux conformations.

- Le mécanisme proposé confère une importance particulière aux interactions entre sous-unités, et les formalismes qui décrivent le mécanisme dépendent de la géométrie de la molécule oligomérique. Si un tétramère est considéré, la nature des interactions dépend de la disposition spatiale des sous-unités (Fig. X ci-dessous).

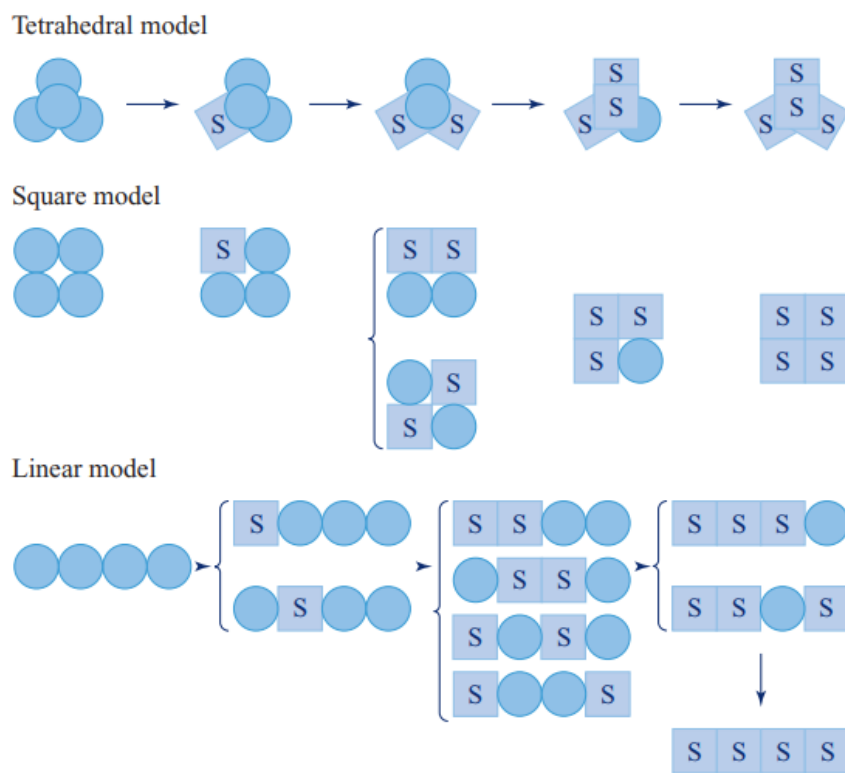


Figure X :

- Tous les sites sont équivalents et indépendants en l'absence de ligand. Au cours du processus dynamique, le substrat « apprend » à l'enzyme la conformation qu'elle doit adopter.

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**).

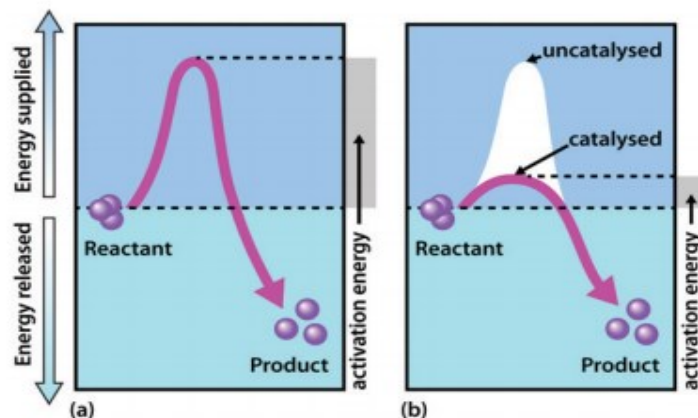


Figure 5 : Mécanisme de catalyse enzymatique

- 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**).

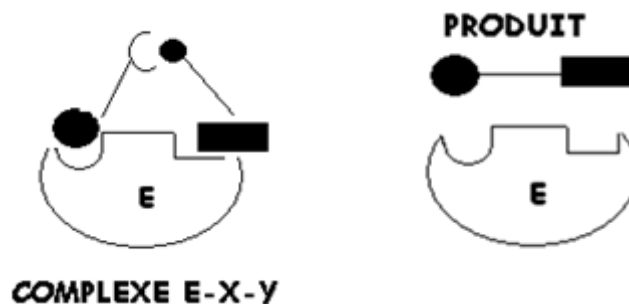


Figure 6 : Catalyse par effet de proximité et d'orientation

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 :

Saccharose + saccharose phosphorylase \rightleftharpoons glucosyl-enzyme + fructose

Glucosyl-enzyme + Pi \rightleftharpoons glucose-1-phosphate + 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).

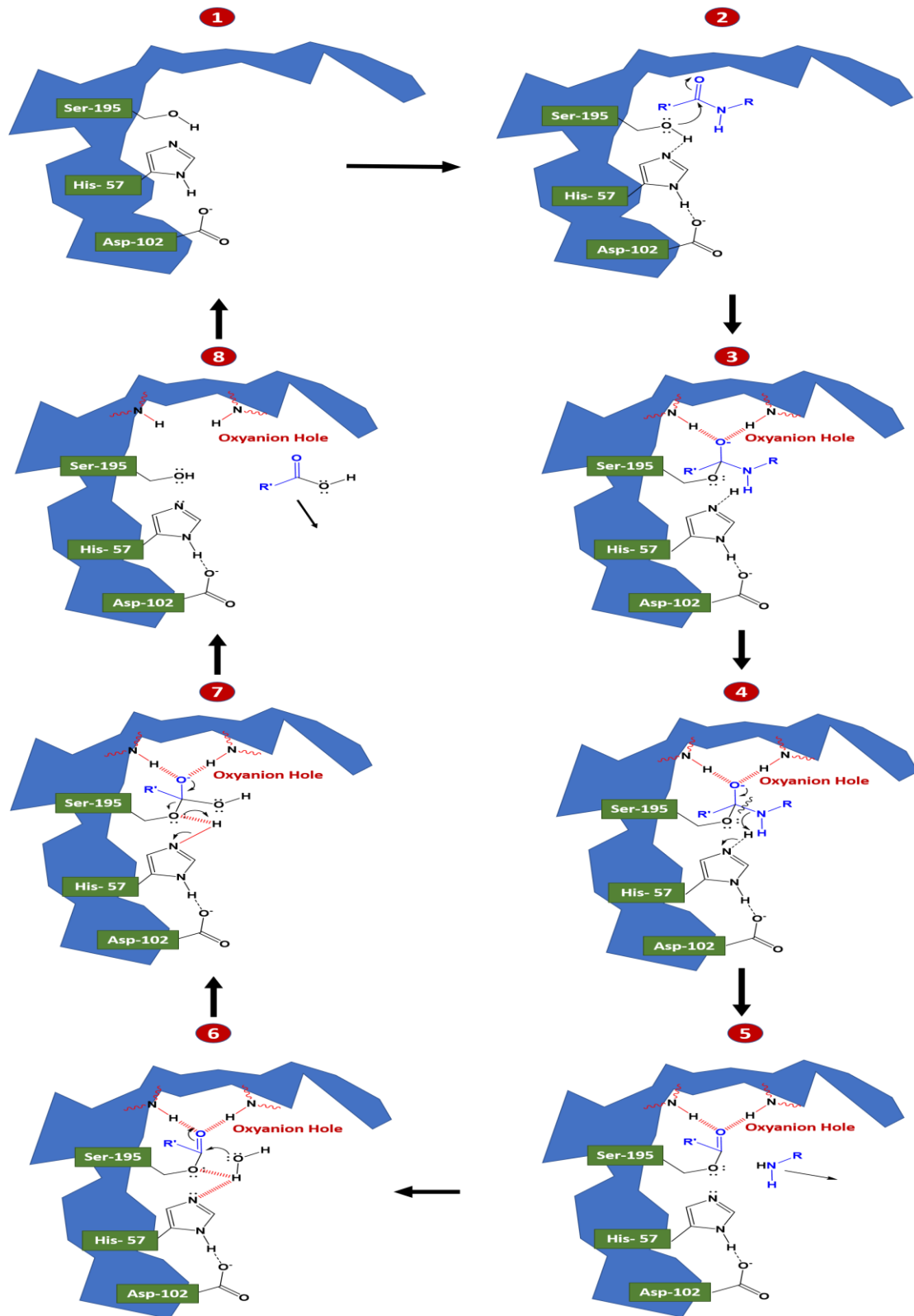


Figure 7 : Mécanisme de catalyse de la chymotrypsine

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 (H_3O^+) ou un ion hydroxyde (OH^-), respectivement, est utilisé directement dans le mécanisme de réaction, et le pH de la solution affecte la vitesse de catalyse. La catalyse acido-basique générale se produit lorsque des molécules autres que l'ion hydronium (H_3O^+) ou un ion hydroxyde (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 des 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 Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ou 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 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ou 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.

Chapitre : 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 1 montre la contribution des différents organismes à la production des enzymes commerciale.

Tableau 1 : 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 1 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.

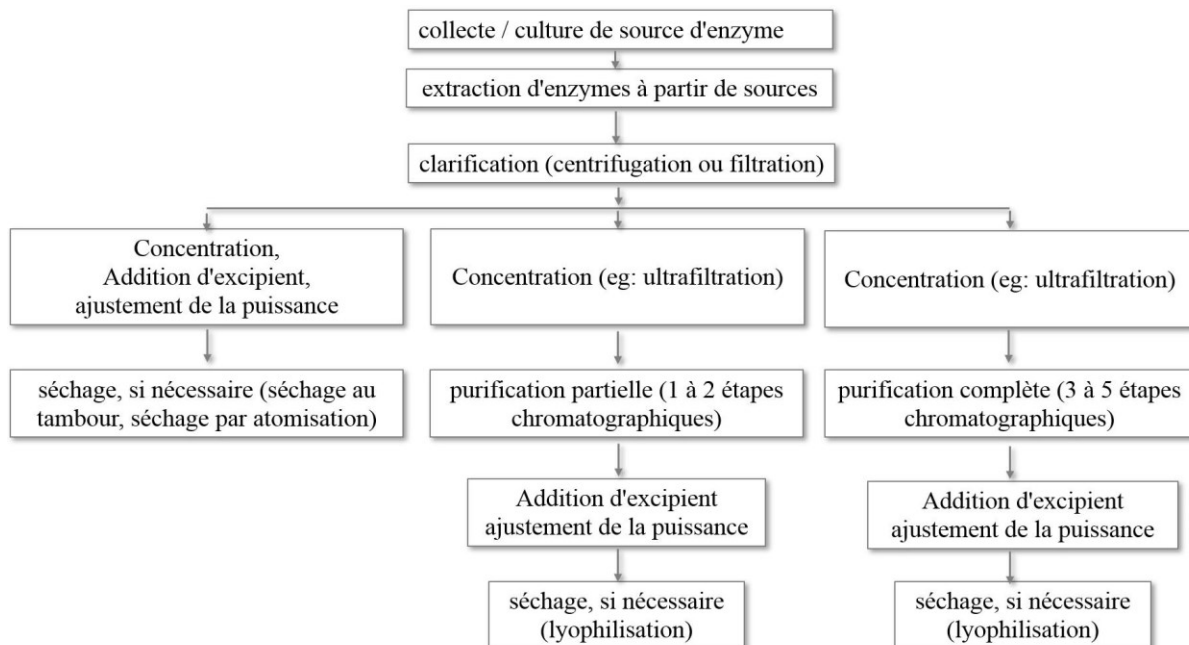


Figure 1 : Procédure générale de production des enzymes industrielles (à gauche), analytique (Centre), et thérapeutique (à droite)

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 des 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 2).

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.

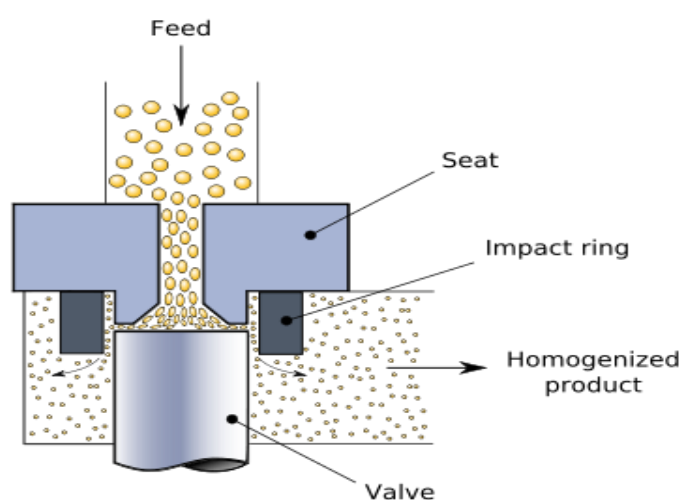


Figure 2 : Rupture mécanique cellulaire par homogénéisateur Manton-Gaulin

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. 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.

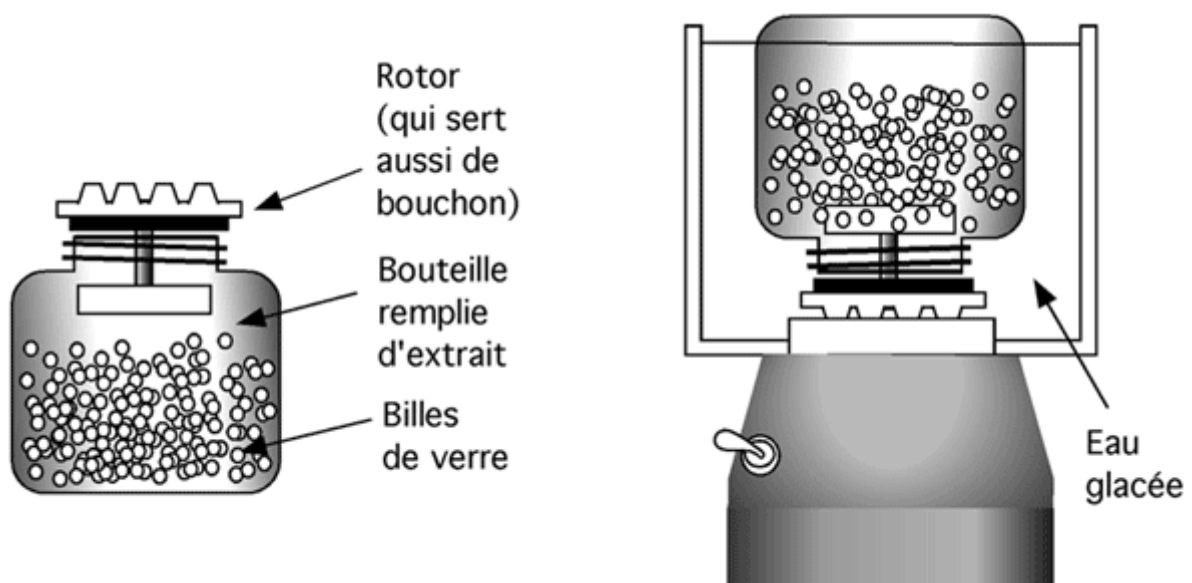


Figure 3 : Schéma représentant l'appareil utilisé dans l'extraction par billes de verre

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 4**). 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.

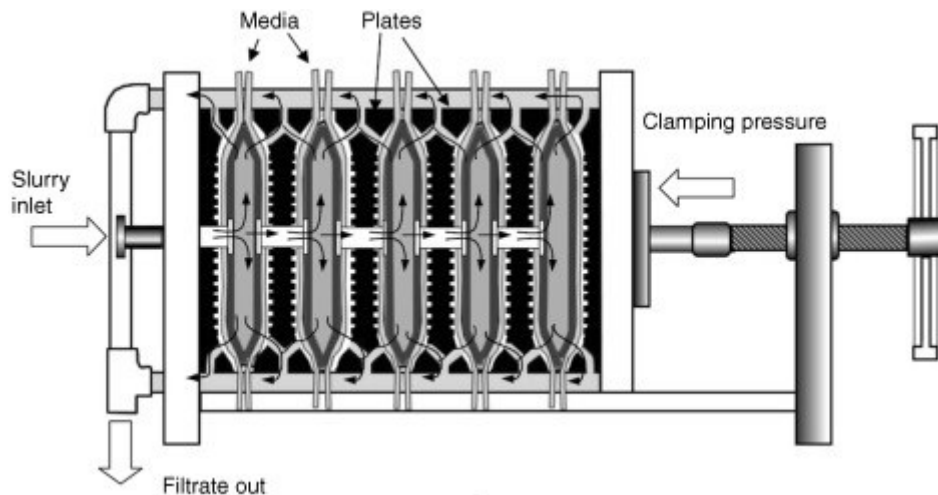


Figure 4: Filtre à plaques

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 5**) 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.**

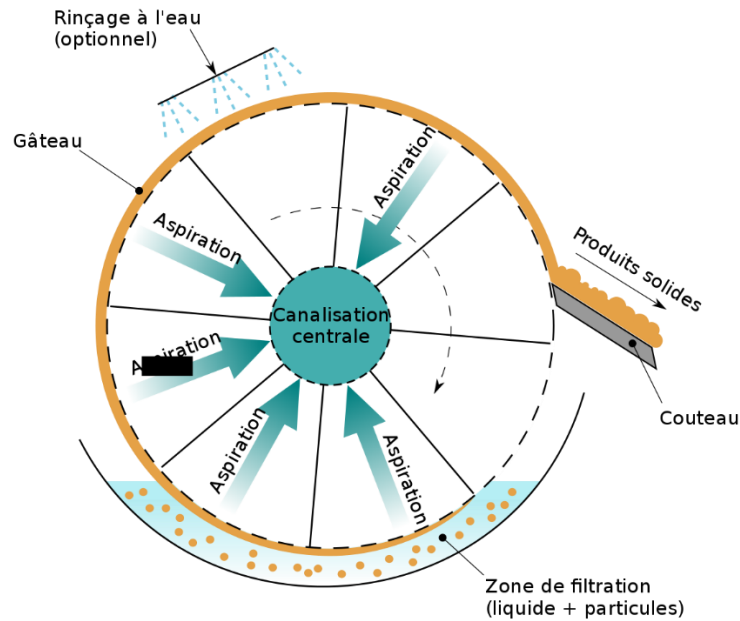


Figure 5 : Représentation schématique d'un Filtres à vide

c) Filtration à flux croisé

Dans les méthodes conventionnelles, la suspension s'écoule perpendiculairement au matériel filtrant (**Figure 6** à gauche). En filtration tangentielle, le flux entrant s'écoule parallèlement à la zone du filtre (**Figure 6** 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/m²/h peuvent être atteints.

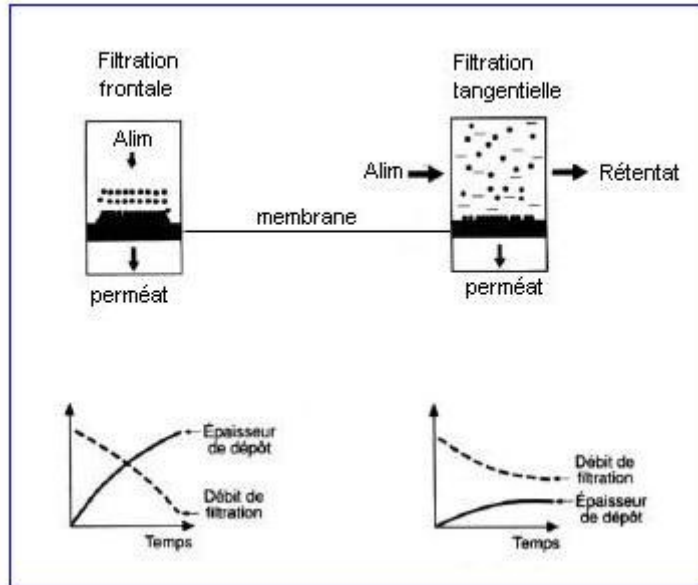


Figure 6: Différence entre filtration frontale et filtration tangentielle