



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Isolement et caractérisation d'un fragment peptique possédant une activité alcool déshydrogénase

Martin, Benoit

Award date:
1990

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tel. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Isolement et caractérisation d'un fragment peptidique possédant une activité alcool déshydrogénase.

MARTIN Benoît

Résumé

De nombreuses recherches visent à modifier les propriétés touchant à la spécificité et à la stabilité à haute température des enzymes, afin d'utiliser pleinement leurs potentialités.

Dans cette optique nous avons tenté de modifier les propriétés d'une enzyme (l'alcool déshydrogénase) en réduisant sa structure tridimensionnelle. En effet, il apparaît que la structure complète des enzymes n'est pas toujours nécessaire pour posséder une activité enzymatique, nous avons ainsi pu obtenir un fragment peptidique possédant toujours une activité alcool déshydrogénase bien réelle, après une lyse trypsinique de 48 heures.

La caractérisation de ce peptide a montré que ses propriétés (point isoélectrique, spécificité et stabilité face à la température) sont différentes de celles de l'enzyme native. Ce peptide possède une spécificité moindre spécialement vis-à-vis du méthanol, mais malheureusement une stabilité thermique moins bonne que l'enzyme.

D'après le modèle théorique de la lyse trypsinique, ce peptide serait en fait composé de trois peptides associés entre eux par un ion zinc. Une dissociation de ce complexe zinc-peptide a pu être montrée en milieu acide.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1990

Promoteur : J. Remacle

Au terme de ce mémoire, je tiens tous d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Remacle, qui m'a accueilli dans son laboratoire, et qui m'a prodigué ses judicieux conseils durant toute cette année.

Ensuite je voudrais remercier tout spécialement Edouard Delaive pour son aide technique constante et efficace quelque soit la difficulté de l'expérience; ainsi qu'Etienne Magonet pour sa gentillesse et sa disponibilité, et pour ses nombreux conseils lors de la rédaction de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au membres du laboratoire, Etienne Magonet, Dominique Delforge, Pierre Hayen, travaillant également dans le domaine des peptides, pour leur aide et leurs conseils "peptidiques".

La mise en page de ce travail a été facilité par l'aide de Marc Dieu et de Manoëlle, et je les en remercie tous les deux.

Je remercie également tous les membres du laboratoire de biochimie cellulaire pour leur sympathie, et pour leurs encouragements tout au long de ce travail, ainsi que pour la bonne ambiance qu'ils y font régner.

Avant de commencer la présentation de ce travail, je remercie Christine Pirotte, Michel Vantroyes et Didier Moureau pour leur amitié qui n'a pas fait faux bond tout au long de cette année.

ABREVIATION

a.a.	Acide aminé
Abs	Absorbance
ADH	Alcool déshydrogénase
ADP	Adénosine diphosphate
Ala	Alanine
AlaDH	Alanine deshydrogénase
AMP	Adénosine monophosphate
APS	Persulfate d'ammonium
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
Cys	Cysteine
Dil.	dilution
DTT	Dithiothreitol
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GPX	Glutathone peroxydase
His	Histidine
HPLC	High pressure liquid chromatography
Ile	Isoleucine
Kj	Kilo joule
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	Nicotinamide adenine dinucléotide (forme réduite)
NBT	Bleu de nitrotétrazolium
Phe	Phénylalanine
pI	point isoélectrique
PMS	Phénazine méthosulfate
RX	Rayon X
SAB	Standart albumine bovine
SDS	Dodecylsulfate de sodium
SOD	Superoxyde dismutase
TCA	Acide trichloro acétique
TFA	Acide trifluoro acétique
TEMED	Tétraméthyl éthylène diamine
Thr	Thréonine
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
V	Volt
Y-ADH	Yeast alcohol dehydrogenase

Table des matières

I.INTRODUCTION	1
1.1 avant-propos.....	2
1.2 définition, avantages et inconvénients des enzymes.....	2
1.2.1 définition.....	2
1.2.2 avantages des enzymes.....	3
1.2.3 inconvénients des enzymes.....	3
1.3 modifications des propriétés des enzymes.....	4
1.3.1 introduction.....	4
1.3.2 avantages des modifications.....	4
1.3.3 résultats obtenus.....	5
1.3.4 étude réalisée au laboratoire.....	6
1.4 recherche d'une activité enzymatique à partir d'un fragment peptidique.....	8
1.4.1 introduction.....	8
1.4.2 une approche chimique de l'enzymologie.....	9
1.4.2.1 introduction.....	9
1.4.2.2 création chimique "d'enzymes artificielles".....	10
1.4.2.3 exemple d'"enzymes synthétisés".....	11
1.4.2.3.1 les éthers-couronnes.....	11
1.4.2.3.1.1 introduction.....	11
1.4.2.3.1.2 recherche d'un récepteur.....	11
1.4.2.3.1.3 recherche d'une activité.....	12
1.4.2.3.1.3.1 introduction.....	12
1.4.2.3.1.3.2 travaux de LEHN.....	13
1.4.2.3.1.3.3 travaux de CRAM.....	14
1.4.2.3.1.4 conclusion.....	15
1.4.2.3.2 les katapinates.....	15
1.4.2.3.2.1 introduction.....	15
1.4.2.3.2.2 recherche d'un récepteur.....	15
1.4.2.3.2.3 recherche d'une activité.....	16
1.4.2.3.2.4 conclusion.....	16
1.4.2.3.3 les cyclodextrines.....	17
1.4.2.3.3.1 introduction.....	17
1.4.2.3.3.2 recherche d'un récepteur.....	17
1.4.2.3.3.3 recherche d'une activité.....	18
1.4.2.3.3.4 conclusion.....	19
1.4.2.4 conclusion générale sur le point de vue de la chimie.....	20

1.4.3	une approche biochimique de l'enzymologie.....	21
1.4.3.1	introduction.....	21
1.4.3.2	le lysozyme : une enzyme très imitée.....	21
1.4.3.2.1	enzyme native.....	21
1.4.3.2.1.1	aperçu structurel du lysozyme.....	21
1.4.3.2.1.2	activité du lysozyme.....	22
1.4.3.2.2	synthèse proprement dite.....	23
1.4.3.2.2.1	travaux de NAITHANI et DHAR.....	23
1.4.3.2.2.2	travaux de SRIVASTAVA.....	24
1.4.3.2.2.3	travaux de CHAKRAVARTY.....	24
1.4.3.2.3	conclusion.....	25
1.4.3.3	l'adenylate cyclase.....	26
1.4.3.3.1	travail réalisé par l'équipe de HOLLAND.....	26
1.4.3.3.2	caractérisation du peptide.....	27
1.4.3.3.3	conclusion.....	27
1.5	généralité sur l'alcool deshydrogénase.....	28
1.5.1	choix de l'enzyme.....	28
1.5.2	description de l'ADH.....	29
1.5.2.1	introduction.....	29
1.5.2.2	comparaison entre H-ADH et Y-ADH.....	30
1.5.2.3	caractéristique de l'enzyme.....	31
1.5.2.4	caractéristiques de la réaction catalysée par l'ADH.....	32
1.5.2.5	description du domaine liant le coenzyme.....	32
1.5.2.6	description du domaine catalytique.....	34
1.5.2.7	spécificité de l'enzyme.....	35
1.6	recherche d'un fragment peptidique de l'ADH ayant conservé une activité enzymatique.....	36
1.7	objectif du travail.....	37
1.7.1	introduction.....	38
1.7.1.1	séparation et purification des peptides.....	38
1.7.1.1.1	introduction.....	38
1.7.1.1.2	méthode de chromatographie.....	39
1.7.1.1.3	synthèse générale.....	40
1.7.1.2	caractérisation.....	41
1.7.1.3	détermination du fragment peptidique obtenu par lyse trypsinique.....	41
1.7.2	méthodologie suivie.....	42

II MATERIEL ET METHODE..... 43

2.1 MATERIEL.....	43
2.1.1 réactifs divers.....	43
2.1.2 constituants des gels.....	43
2.1.3 réactifs biologiques.....	44
2.2 METHODE.....	44
2.2.1 dosage spectrométrique.....	44
2.2.1.1 matériels.....	44
2.2.1.2 dosage de l'ADH.....	44
2.2.1.2.1 principe.....	44
2.2.1.2.2 réactifs.....	45
2.2.1.2.3 mode opératoire.....	45
2.2.1.3 dosage des proteines.....	46
2.2.1.3.1 principe.....	46
2.2.1.3.2 réactifs.....	46
2.2.1.3.3 mode opératoire.....	47
2.2.2 lyse protéinique.....	47
2.2.2.1 étape de lyse.....	47
2.2.2.1.1 matériels.....	47
2.2.2.1.2 mode opératoire.....	47
2.2.2.2 vérification de la lyse de l'ADH par HPLC à colonne à phase inverse.....	48
2.2.2.2.1 matériel.....	48
2.2.2.2.2 méthode.....	48
2.2.2.3 séparation des peptides obtenus après lyse de l'ADH (tamis moléculaire superose 12).....	49
2.2.2.3.1 matériel.....	49
2.2.2.3.2 méthode.....	49
2.2.2.4 étape de dosage.....	50
2.2.2.4.1 dosage de l'activité.....	50
2.2.2.4.1.1 matériel.....	50
2.2.2.4.1.2 mode opératoire.....	50
2.2.2.4.2 dosage des protéines.....	50
2.2.2.4.2.1 selon la méthode de LOWRY et Al (1953).....	50
2.2.2.4.3 dosage du zinc.....	51
2.2.2.5 Chromatographie G 10.....	51
2.2.2.5.1 principe.....	51
2.2.2.5.2 matériel.....	51
2.2.2.5.3 fabrication de la colonne.....	52
2.2.2.5.4 chromatographie.....	52

2.2.2.6	révélation des peptides.....	53
2.2.2.6.1	isolement des peptides sur gel d'acrylamide et révélation de l'activité.....	53
2.2.2.6.1.1	préparation de gel d'électrophorèse.....	53
2.2.2.6.1.2	électrophorèse.....	53
2.2.2.6.1.3	démoulage des gels	54
2.2.2.6.1.4	révélation de l'activité de l'ADH.....	54
2.2.2.7	dissociation des peptides.....	55
2.2.2.7.1	principe.....	55
2.2.2.7.2	matériel.....	55
2.2.2.7.3	méthode.....	55

III RESULTATS.....56

3.1	introduction.....	56
3.2	etapes de la lyse.....	56
3.2.1	vérification de la lyse par HPLC en phase inverse.....	56
3.2.1.1	introduction.....	56
3.2.1.2	analyse du chromatogramme.....	57
3.2.1.3	conclusion.....	57
3.2.3	analyse des résultats obtenus par chromatographie HPLC en tamis moléculaire.....	58
3.2.3.1	chromatogramme de l'HPLC.....	58
3.2.3.2	dosage de l'activité alcool deshydrogenase.....	60
3.2.3.3	conclusion.....	60
3.2.4	vérification de l'activité alcool deshydrogénase.....	60
3.2.4.1	commentaire relatif au graphique.....	61
3.2.4.2	conclusion.....	61
3.3	caractéristiques biochimiques du peptide.....	61
3.3.1	introduction.....	61
3.3.2	étude de la spécificité du peptide.....	62
3.3.2.1	introduction.....	62
3.3.2.2	analyse du graphique.....	62
3.3.2.3	quantification de l'activité face à différents alcools	63
3.3.2.4	conclusion.....	64
3.3.3	étude de l'influence de la température sur le peptide.....	64
3.3.3.1	introduction.....	64
3.3.3.2	graphique.....	65
3.3.3.3	conclusion.....	66
3.3.3.4	stabilité du peptide à 20° et 37° C.....	66

3.4	amélioration de l'activité du peptide par l'étude des conditions d'hydrolyse trypsique de l'ADH.....	67
3.4.1	recherche des conditions optimum pour l'obtention du peptide à 20° C.....	67
3.4.1.1	effet de la durée de l'hydrolyse.....	67
3.4.1.1.1	hydrolyse pendant 24 heures.....	68
3.4.1.1.1.1	analyse du chromatogramme.....	68
3.4.1.1.1.2	dosage de l'activité alcool déshydrogénase.....	68
3.4.1.1.1.3	conclusion.....	69
3.4.1.1.2	hydrolyse pendant 48 heures.....	69
3.4.1.1.2.1	analyse du chromatogramme.....	69
3.4.1.1.2.2	conclusion.....	70
3.4.1.1.2.3	dosage de l'activité alcool déshydrogénase.....	70
3.4.1.1.3	conclusion.....	71
3.4.1.2	effet de différents agents.....	71
3.4.1.2.1	effet de l'urée.....	71
3.4.1.2.1.1	analyse du chromatogramme.....	72
3.4.1.2.1.2	dosage de l'activité alcool déshydrogénase.....	72
3.4.1.2.1.3	conclusion.....	72
3.4.1.2.2	effet de la concentration en sel.....	73
3.4.1.2.2.1	tampon d'élution 10 mM.....	73
3.4.1.2.2.1.1	analyse du chromatogramme.....	73
3.4.1.2.2.1.2	dosage de l'activité alcool.....	74
3.4.1.2.2.2	tampon d'élution 50 mM NaCl 0,9 %.....	74
3.4.1.2.2.2.1	analyse du chromatogramme.....	74
3.4.1.2.2.2.2	dosage de l'activité.....	74
3.4.1.2.2.3	conclusion.....	75
3.4.1.2.3	conclusions générales.....	76
3.5	isolement du peptide par électrophorèse.....	76
3.5.1	dosage des protéines.....	76
3.5.1.1	analyse du graphique.....	77
3.5.1.1.1	dosage de l'activité alcool déshydrogénase.....	77
3.5.1.1.2	dosage des protéines.....	77
3.5.1.2	conclusion.....	77
3.5.2	premiers essais.....	78
3.5.3	recherche de quantité plus importantes.....	78
3.5.3.1	chromatographie G 10.....	79
3.5.3.1.1	analyse du chromatogramme.....	79
3.5.3.1.2	dosage de l'activité.....	79
3.5.3.1.3	vérification par HPLC.....	79
3.5.3.1.4	conclusion.....	80
3.5.3.2	colonne superose 12.....	80

3.5.4 électrophorèse.....	81
3.5.4.1 analyse des électrophorèse.....	81
3.5.4.2 conclusion.....	81
3.6 essai de séparation des peptides liés au zinc.....	82
3.6.1 introduction.....	82
3.6.2 dosage du zinc.....	83
3.6.2.1 analyse du graphique.....	83
3.6.2.1.1 dosage de l'activité ADH.....	83
3.6.2.1.2 dosage du zinc.....	83
3.6.2.2 conclusion.....	83
3.6.3 utilisation de différents agents susceptibles de réduire les liaisons zinc-peptide.....	83
3.6.3.1 utilisation du DTT.....	83
3.6.3.1.1 analyse des chromatogrammes en tamis moléculaire.....	83
3.6.3.1.2 analyse des chromatogrammes en phase inverse.....	86
3.6.3.2 influence du pH.....	87
3.6.3.2.1 analyse du chromatogramme en tamis moléculaire.....	88
3.6.3.3 conclusion.....	88
 IV CONCLUSION GENERALE	 90

I INTRODUCTION

1.1 Avant-propos

Depuis plusieurs années, les enzymes suscitent, vu leurs propriétés remarquables, un intérêt sans cesse croissant auprès des scientifiques et des industriels. Ces molécules sont, en effet, des catalyseurs spécifiques et d'applications industrielles. Ils représentent des outils de choix en biotechnologie, dans les domaines agro-alimentaires, thérapeutiques ou dans l'industrie des sucres.

L'unité de Biochimie Cellulaire s'est intéressée à divers enzymes du fait de leurs propriétés particulières ou de leur utilisation possible. De nombreux travaux sont, ou ont été réalisés sur la glutathione peroxidase (GPX) (PIGEOLET, 1990), la superoxyde dismutase (SOD) (MICHIELS, 1988), l'alanine deshydrogénase (alaDH) (DELFORGE, 1988), l'alcool déshydrogénase (ADH) (BILLE, 1989).

Malheureusement, plusieurs problèmes limitent encore l'utilisation des enzymes, notamment le manque de stabilité de ces molécules protéiques face à une modification de leur environnement physiologique (la température, le pH, les solvants, les métaux lourds, ...), leur coût élevé, la régénération des cofacteurs qui n'est pas encore réalisé facilement et a un coût raisonnable.

Ces conditions d'utilisation très exigeantes ont suscité de nombreux travaux visant à modifier les propriétés de ces enzymes, afin notamment de les stabiliser face à leur environnement et de parvenir ainsi à utiliser pleinement leurs potentialités (BROCK, 1988; MOZHAEV et Al., 1988; KLIBANOV, 1983)

C'est principalement dans le cadre des études sur les modifications des propriétés de l'ADH de levure que s'inscrit ce travail. Après une étude réalisée au laboratoire à propos de

l'influence du microenvironnement sur l'ADH immobilisée (BILLE et Al., 1989) en vue de la régénération du cofacteur (BILLE, 1987), nous nous sommes proposés depuis l'année dernière (HAYEN, 1989) de tenter d'obtenir une activité alcool déshydrogénase ne nécessitant pas l'ensemble de la chaîne protéique de l'enzyme. Ce fragment peptidique pourrait de ce fait, faire l'objet de modifications plus faciles à réaliser afin d'obtenir des caractéristiques particulières comme une spécificité moins importante ou une stabilité plus grande de l'enzyme.

1.2 Définition, avantages et inconvénients des enzymes

1.2.1 Définition

Les enzymes sont des macromolécules de taille considérable issues de l'enchaînement séquentiel de motifs élémentaires : les acides aminés. Elles peuvent contenir un groupement aprotéinique (ion métallique, groupement pyrol, ...)

Ces molécules sont des biocatalyseurs aux propriétés nombreuses et possédant une efficacité étonnante qui a permis l'apparition et le développement des systèmes vivants.

Elles agissent en deux étapes :

- Elles fixent d'abord leur substrats spécifiques suivant une orientation adéquate au niveau de leur site actif;
- Ensuite, les substrats étant rapprochés et bien orientés, peuvent réagir de façon très souvent spécifique.

1.2.2 Avantages des enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs aux propriétés surpassant de loin celles des catalyseurs chimiques.

- Pour une même réaction se déroulant à la même température, les enzymes provoquent des accélérations considérables des vitesses de réaction, inégalables par des catalyseurs chimiques. La vitesse de réaction peut être multipliée par un facteur 10^6 à 10^{20} .

- Inchangés en fin de réaction ils sont prêts à recommencer la même réaction sur une nouvelle molécule.

- Les enzymes réalisent la réaction de catalyse, dans des conditions compatibles avec la vie (37° C, dans l'eau). Ces mêmes réactions pourraient parfois se réaliser par des méthodes chimiques mais moyennant des conditions beaucoup plus rigoureuses de pression et de température et l'emploi de solvants non aqueux c'est-à-dire des conditions de vie tout à fait opposées

- Ce sont surtout des catalyseurs spécifiques : les enzymes savent reconnaître spécifiquement la molécule qui va être modifiée. Cette molécule est appelée substrat.

Ces énormes avantages font que les enzymes représentent dans leur domaine une véritable révolution puisqu'elles constituent le passage d'une réaction aléatoire à une réaction organisée.

1.2.3 Inconvénients des enzymes

Malheureusement les enzymes présentent une série de désavantages, lorsque l'on veut les utiliser comme outils de laboratoire ou d'industrie, désavantages qui sont parfois le revers de leurs qualités et qu'il est nécessaire de considérer.

Leur haute spécificité peut parfois être très gênante. Il serait quelquefois intéressant de disposer d'enzymes s'attaquant à une famille de composés chimiques plutôt qu'à un seul de ces composés (voir un seul isomère). Par exemple, avoir une enzyme qui pourrait oxyder des alcools synthétiques.

De plus les enzymes sont généralement très peu stables face à leur environnement. Les enzymes travaillent préférentiellement en milieu aqueux dans des conditions de pH et de température très spécifiques : elles sont très sensibles à des variations de température et de pH, à l'emploi de solvants organiques, à la présence de métaux lourds présents dans le milieu.

Ces quelques inconvénients limitent fortement leur utilisation.

1.3 Modifications des propriétés des enzymes

1.3.1 Introduction

Comme on vient de le voir, la nature protéique des enzymes rend ces molécules relativement instables. Ces limitations auxquelles ne sont pas soumis les catalyseurs chimiques freinent considérablement l'essor de la technologie enzymatique.

Dès lors pourquoi ne pas tenter de modifier les propriétés des enzymes, afin d'utiliser pleinement leurs potentialités

1.3.2 Avantages des modifications de propriétés des enzymes

Les modifications de propriétés des enzymes visent principalement à modifier la stabilité de ces molécules face à deux composantes de leur environnement : la haute température et les solvants organiques (LENDERS et Al., 1984; MOZHAEV et Al., 1988; BILLE, 1987) .

D'une part c'est ainsi que la stabilisation des enzymes à haute température constitue un objectif majeur des recherches en biotechnologie enzymatique car la possibilité de travailler à température élevée constitue un avantage considérable.

Cette propriété permet d'augmenter la solubilité des enzymes et de diminuer la viscosité de la solution. Ces deux phénomènes ajoutés à l'élévation de la température permettent également d'observer une augmentation de la vitesse de réaction.

Le fait de travailler à température plus élevée permet également d'éviter des contaminations et des multiplications bactériennes ce qui permet par exemple une utilisation prolongée des bioréacteurs enzymatiques et donc une diminution de leur coût d'utilisation.

D'autres part, dans de nombreuses applications, les substrats potentiels ne sont que très peu solubles dans les solvants polaires, or les enzymes, de par leur nature même, sont très labiles dans les milieux non polaires (BIGELOW, 1967).

Diminuer cette labilité faciliterait donc énormément la réaction de catalyse.

Citons également une autre tentative de modification des enzymes consistant à élargir leur spécificité de substrat. Cela permettrait la production de nouveaux "produits enzymatique" et une diminution du coût d'utilisation de ces enzymes

1.3.3 Résultats obtenus

Une foule de travaux est réalisée à l'heure actuelle sur les enzymes. Parmi les plus intéressants on peut citer les travaux de MARTINEK et MOZHAEV.

MARTINEK et son équipe (MARTINEK et Al., 1975) ont étudié

les effets de différents agents dénaturants du type de l'urée ou d'autres amides (par exemple l'acrylamide) sur la stabilité thermique de l' α -chymotrypsine et de la trypsine. Cette étude fut réalisée sur les enzymes natives et immobilisées.

Ils ont pu montrer que lorsqu'on utilise des concentrations croissantes de 0 à 7 M d'urée, l'inactivation de la protéine est de moins en moins marquée. Les conditions expérimentales dans lesquelles ils ont travaillé sont les suivantes : 57° C, tampon acétate 0,01 M pH 5 KCl 0,1 M

Les mêmes effets ont pu être observés lorsqu'on utilise une solution d'acrylamide comme agent dénaturant.

D'après les résultats qu'ils ont obtenus, ils en ont conclu que les différents agents dénaturants utilisés étaient capables de modifier les propriétés de thermoinactivation des enzymes utilisés.

MOZHAEV et son équipe (MOZHAEV et Al., 1988) ont quant à eux étudié la thermostabilité des mêmes protéases en utilisant une autre approche. Ils ont rendu la surface de ces enzymes plus hydrophile en y fixant par liaisons covalentes différents groupements.

Dans le cas de la trypsine, ils ont transformé les résidus tyrosine de la surface de l'enzyme en aminotyrosine. Tandis que dans le cas de l' α -chymotrypsine ils ont fixé des groupements carboxyliques sur des lysines.

Ces deux types de méthodes utilisées pour rendre l'enzyme plus hydrophiles, ont permis d'augmenter la thermostabilité des enzymes.

1.3.4 Etude réalisée au laboratoire

Comme on le voit des travaux très intéressants sont réalisés sur ce sujet. Notre mémoire s'inscrit dans un ensemble plus large de

recherches entreprises au laboratoire, en utilisant l'alcool déshydrogénase comme modèle et que l'on peut résumer comme suit.

L'ADH est une enzyme intéressante d'un point de vue économique puisqu'elle peut régénérer le coenzyme (toujours très coûteux) NAD^+ en NADH. Mais sa haute spécificité vis-à-vis de l'éthanol (substrat assez coûteux) et son manque de stabilité aux températures élevées (40°C = température d'activité optimale) limitent son utilisation.

Il serait donc intéressant de pouvoir en modifier les propriétés.

Au laboratoire, BILLE (BILLE, 1987) a mis au point une méthode originale permettant d'immobiliser et de modifier les propriétés et notamment les propriétés de stabilité de l'alcool déshydrogénase de levure en utilisant des bras peptidiques fixés de manière covalente sur la surface de l'enzyme.

L'enzyme est d'abord activée, afin de greffer des bras polypeptidiques de composition connue. Finalement l'enzyme est immobilisée de manière covalente par une copolymérisation entre l'extrémité activée du bras peptidique et les monomères d'acrylamide.

La composition de ces bras peut varier suivant la propriété (charge positive ou négative, hydrophilicité, hydrophobicité) que l'on désire étudier quant à son influence sur la stabilité de l'enzyme.

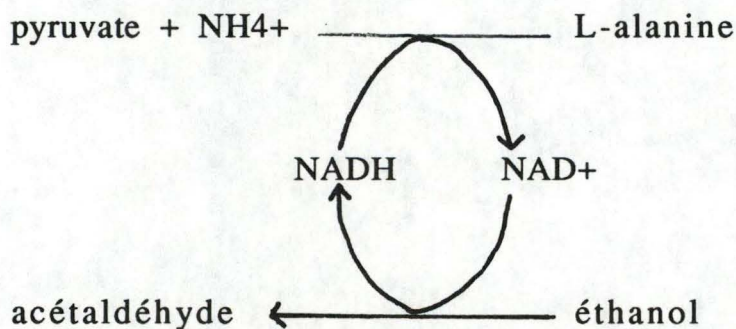
Nous avons pu remarquer des effets importants de la composition de bras peptidiques sur les propriétés de l'enzyme. Les effets observés pouvaient être attribués aux interactions dynamiques entre le microenvironnement et la structure de la protéine. Des effets importants ont pu être spécialement observés sur l'énergie d'activation, sur les paramètres cinétiques et sur la stabilité de l'enzyme.

Par exemple l'utilisation d'un bras peptidique hydrophile (polysérine) permet d'obtenir une rigidification plus importante de l'enzyme (énergie d'activation doublée) et une plus grande stabilité, face à la température, l'interaction des différents acides aminés hydrophiles en périphérie de l'enzyme avec ceux du peptide pourrait expliquer ces résultats.

A l'opposé l'utilisation d'un bras peptidique hydrophobe (polyvaline) déstabilise l'enzyme à haute température. Une hypothèse émise à ce sujet supposerait une interaction du peptide avec les acides aminés hydrophobes et internes de l'enzyme.

Actuellement des études sont toujours réalisées au laboratoire sur l'alcool déshydrogénase et en parallèle sur l'alanine déshydrogénase afin d'améliorer au maximum la stabilité de ces enzymes.

Ces études pourraient permettre un système de régénération du cofacteur par couplage de l'ADH avec une enzyme de synthèse utilisant le NADH, dans ce cas, l'alanine déshydrogénase (alaDH).



1.4 Recherche d'une activité enzymatique à partir d'un fragment peptidique

1.4.1 Introduction

Comme nous venons de le voir, de nombreux travaux sont réalisés à l'heure actuelle pour tenter de modifier les propriétés des enzymes.

Cependant toutes ces études sont réalisées à partir de la totalité de la structure de la protéine. Et de cette structure, de la longueur et de la composition de l'entièreté de la chaîne protéique constituant l'enzyme, dépendent notamment la spécificité de cette enzyme et sa souplesse moléculaire (conditionnant son comportement face à la température).

Dès lors, il est tentant de réfléchir différemment, et d'imaginer qu'en réduisant cette structure, par exemple par une lyse protéasique, on puisse modifier les propriétés de l'enzyme, et surtout ses propriétés de spécificité.

Mais est-il pensable d'espérer retrouver à partir d'une enzyme totale un fragment peptidique constitutif de cette enzyme, d'abord possédant toujours une activité catalytique et ensuite, possédant des propriétés différentes de l'enzyme native ?

A priori, non puisque l'on sait, que l'activité protéinique est non seulement fonction du site actif mais, également du reste de la macromolécule qui peut subir de nombreuses variations conformationnelles absolument nécessaires pour que puisse se dérouler la réaction.

Et de nombreux exemples accréditent ce modèle. La mutation d'un acide aminé peut dans certains cas, inhiber complètement l'activité de l'enzyme même si cet acide aminé n'a aucun rapport avec le site actif.

Pourtant quelques travaux ont donné une autre dimension à cette idée.

1.4.2 Une approche chimique de l'enzymologie

1.4.2.1 Introduction

Les chimistes sont actuellement confrontés à des problèmes de synthèse de complexité croissante. Ils ont besoin de produire

des molécules de plus en plus sophistiquées et souvent les méthodes de synthèse organique ne suffisent plus pour mener à bien ces travaux.

Les chimistes se sont donc intéressés aux exploits des enzymes et ont tenté de tirer parti de l'enseignement que leur donnait la nature, afin de créer des enzymes artificielles douées des mêmes propriétés que les produits biologiques

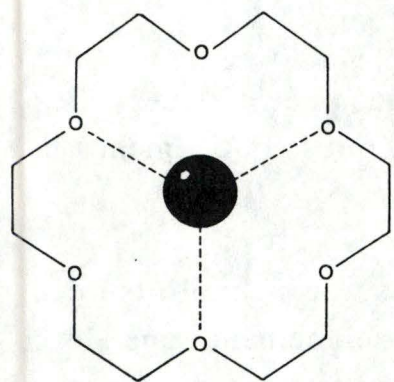
1.4.2.2 Création chimique d'une "enzyme artificielle"

La démarche la plus générale, mais la plus complexe est de synthétiser une molécule de nature chimique différente d'une enzyme, mais présentant le même comportement afin de catalyser une réaction bien définie et utile au chimiste.

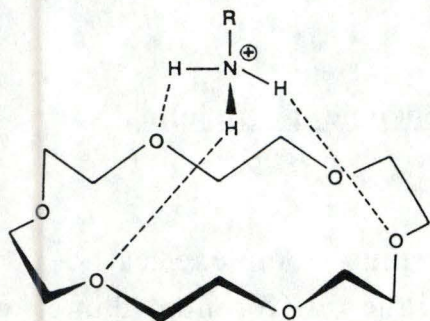
Suivant la définition "chimique" de l'enzyme, la recherche nécessaire à la synthèse d'une "enzyme" se décompose en deux parties :

- D'abord , on recherche un récepteur dont la structure tridimensionnelle peut accueillir de façon sélective le ou les substrats. C'est l'étape de RECONNAISSANCE. Cette reconnaissance d'un substrat par son récepteur implique à la fois une complémentarité de leur géométrie (dimension, forme) et de leurs site de liaison (nature, nombre, charge, ...).

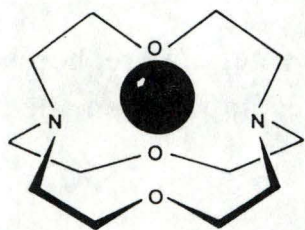
-Ensuite dès que le récepteur est découvert, il subit, par voie de synthèse, les modifications structurales qui lui donneront une activité catalytique. C'est l'étape de TRANSFORMATION.



A



B



C

fig. 1 : A) composé prototype des éthers-couronnes
 B) éther-couronne complexant l'ion ammonium
 C) éther-couronne présentant une cavité sphérique
 permettant la complexification d'ions alcalins
 (KELLOGG, 1984)

1.4.2.3 Exemples "d'enzymes synthétisés"

Les exemples de catalyseurs "biologiques" synthétisés chimiquement sont nombreux. Parmi les plus intéressants, nous pouvons citer :

1.4.2.3.1 Les éthers-couronnes

1.4.2.3.1.1 Introduction

Les éthers-couronnes constituent une classe de composés capables d'effectuer une réaction déterminée. Il ne proviennent pas de substances naturelles, et ne sont pas hydrolysables.

Le composé prototype de la série est le 18-couronne-6 (fig. 1). On a donné le nom de "couronne" à ces substances car leurs atomes d'oxygène peuvent pointer vers le haut comme les pointes d'une couronne.

Ce composé cyclique constitué de six molécules d'éthylène-glycol ($\text{CH}_2\text{-OH-CH}_2\text{OH}$) a été isolé et étudié pour la première fois en 1967 par C.J. PEDERSEN (KELLOGG, 1984).

1.4.2.3.1.2 Recherche d'un récepteur

Les éthers-couronnes possèdent des propriétés très intéressantes puisqu'ils sont capables de sélectionner les ions alcalins avec lesquels ils se complexent. Ainsi les ions Na^+ et K^+ forment des complexes très stables avec ces molécules. A l'inverse l'ion Li^+ sera trop petit et l'ion Cs^+ sera trop grand.

Au cours des années suivantes, l'équipe de LEHN et de CRAM (1983) (KELLOGG, 1984) ont développé des éthers-couronnes

pouvant complexer des cations comme le cation ammonium NH_4^+ (fig. 1 B).

Des ions ammoniums R-NH_3^+ , où l'un des hydrogènes est remplacé par un groupement carboné R peuvent également se complexer à l'éther-couronne, car en effet seuls trois atomes d'hydrogène sont engagés dans la formation du complexe.

C'est ainsi que l'équipe de LEHN et de CRAM (1983) (KELLOGG, 1984) ont développé la fabrication d'enzymes artificielles à partir des éthers-couronnes, dans le but de complexer les groupements NH_3^+ de petits peptides.

1.4.2.3.1.3 Recherche d'une activité

1.4.2.3.1.3.1 Introduction

Dans une protéine, les acides aminés sont reliés entre eux par des liaisons amide ($-\text{N}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-$) encore appelées liaisons peptidiques. Or dans la nature, ces liaisons sont hydrolysées par des enzymes, des protéases telles que la papaine et la serine peptidase.

Il était intéressant pour les chimistes de réussir à mettre au point une protéase artificielle capable de couper la liaison amide.

La stabilité de cette liaison est tellement grande qu'elle peut seulement être hydrolysée dans des conditions expérimentales rigoureuses par des catalyseurs acides ou basiques classiques, en concentration élevée et à haute température (KELLOGG, 1984; HOSSEINI, 1989). Or les protéases réalisent cette hydrolyse avec une facilité déconcertante.

L'équipe de LEHN et l'équipe de CRAM ont alors eu chacune une approche différente de cette étude que l'on peut résumer comme suit.

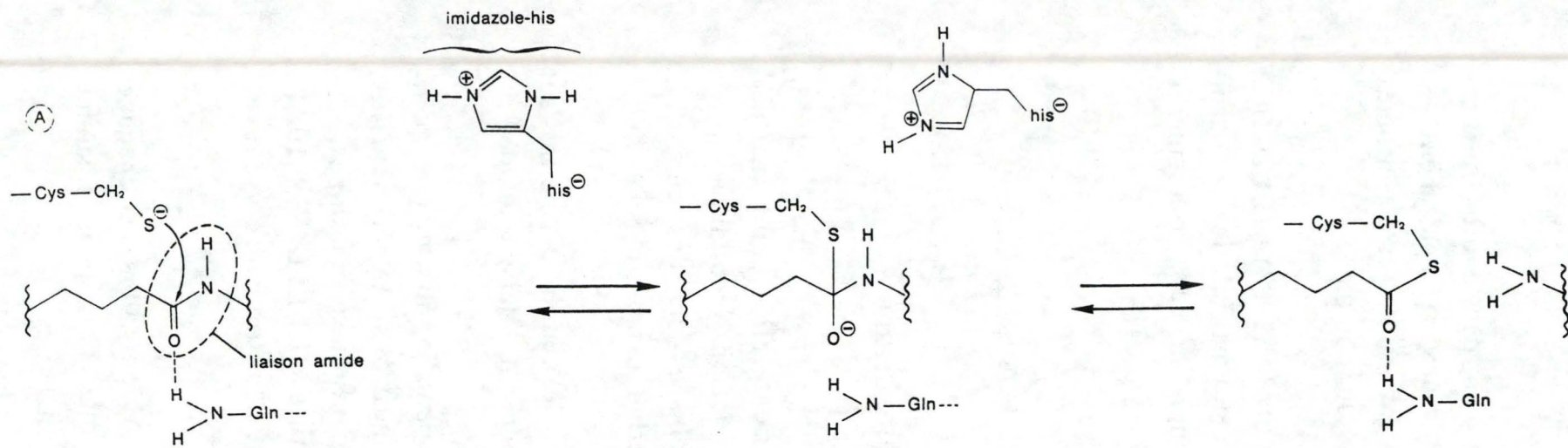


fig. 2 : mécanisme d'hydrolyse de la papaine (KELLOGG, 1984)

1.4.2.3.1.3.2 Travaux de LEHN

Après avoir mis en évidence ces récepteurs, l'équipe de LEHN analysa le site actif de la papaïne, peptidase dont le mécanisme actif est relativement simple et bien connu.

Le mécanisme de l'hydrolyse de la liaison peptidique par la papaïne se déroule en plusieurs étapes (fig. 2).

La première étape est l'attaque de la liaison par un groupement nucléophile, riche en électrons, tel que le S^- d'une cystéine (groupement fixé sur le site actif de l'enzyme). Le S^- était représenté à l'origine par un groupement SH, mais le proton a été arraché par le groupe imidazole d'une histidine proche de la cystéine dans le site actif.

Lors de l'addition du S^- , la charge négative est transférée sur l'atome d'oxygène qui devient O^- et est stabilisé par une liaison hydrogène. Ceci constitue la deuxième étape.

Dans la troisième étape, l'imidazole se déplace vers le groupement NH de la liaison peptidique à hydrolyser, pour lui donner son proton excédentaire. La partie du peptide qui a été transférée sur la cystéine est relarguée ultérieurement (KELLOGG, 1984).

Après avoir constaté l'importance de la cystéine dans le mécanisme enzymatique de la papaïne, LEHN et son équipe ont synthétisé un dérivé d'un éther-couronne possédant quatre groupements terminés chacun par une fonction thiol (fig. 3) (KELLOGG, 1984).

Ils constatèrent que le récepteur actif était capable d'hydrolyser une liaison ester du 4-nitrophénol estérifié à un dipeptide (la liaison ester est de même conformation spatiale que la liaison amide, mais beaucoup moins stable que la liaison peptidique). Le dipeptide est fixé sur l'éther-couronne par trois liaisons hydrogène entre les groupements ammonium et trois des oxygènes de l'éther-couronne.

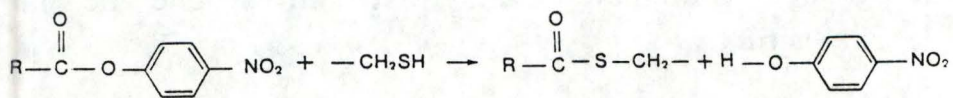
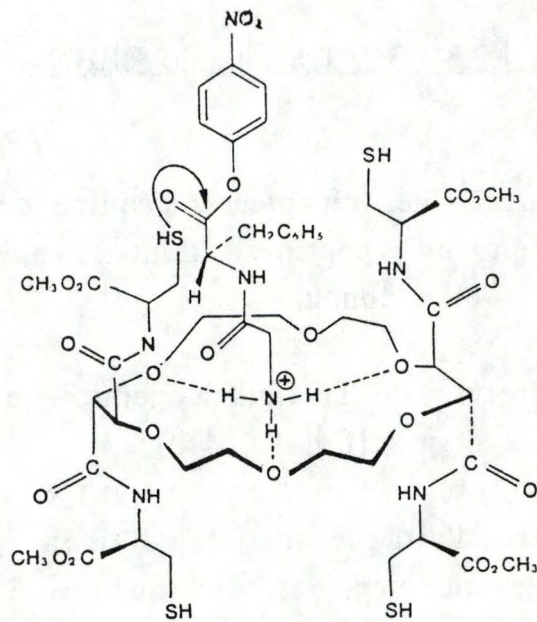


fig. 3 : A) éther-couronne synthétisé par l'équipe de LEHN
 B) équation générale de la réaction réalisée par l'éther-couronne de LEHN (KELLOGG, 1984)

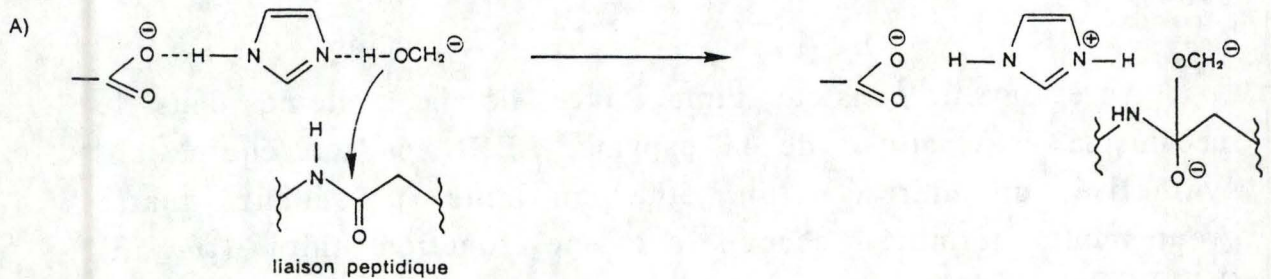


fig. 4 : mécanisme d'hydrolyse de la serine peptidase
 (KELLOGG, 1984)

1.4.2.3.1.3.3 Travaux de CRAM

CRAM et ses collaborateurs ont abordé quant à eux le problème des peptidases artificielles d'une manière tout à fait différente. Ils ont tenté de synthétiser directement un récepteur comportant tous les éléments du site actif catalysant l'hydrolyse de la liaison peptidique au sein d'une autre peptidase naturelle du type trypsine.

Les protéases à sérine sont des enzymes qui peuvent également couper les liaisons peptidiques en une série d'étapes; mais dans ce cas, c'est le groupement alcool (-CH₂OH) de la sérine (au lieu du thiol (SH) de la cystéine dans l'exemple de la papaïne) qui doit attaquer le groupement carbonyle (fig. 4).

La première étape de la réaction consiste à activer le groupement -CH₂OH et à le rendre nucléophile en lui arrachant son atome d'hydrogène. Cette activation est effectuée par l'intermédiaire d'un groupement imidazole. Les étapes suivantes, semblables à celle d'hydrolyse par la papaïne, permettront la coupure de liaisons peptidiques.

CRAM et son équipe (CRAM et Al., 1983) ont donc imaginé un éther-couronne modifié où l'on retrouverait à peu près le même type d'arrangement spatial des groupements actifs que dans l'enzyme (fig. 5).

Dans l'état actuel des choses, ils ne sont pas encore parvenus à synthétiser l'éther-couronne, mais un précurseur a déjà pu être obtenu (fig.6). Le précurseur porte bien les groupements -CH₂OH nécessaires pour attaquer le carbonyle, mais est encore dépourvu de la "machinerie" nécessaire au transfert d'un proton.

Cependant, il est déjà capable d'induire la transformation d'un substrat modèle, un ester activé sous forme complexé.

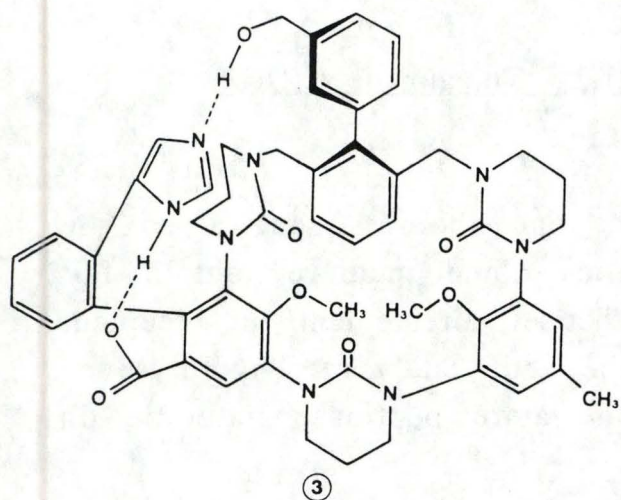


fig. 5 : éther-couronne imaginé par CRAM (KELLOGG, 1984)

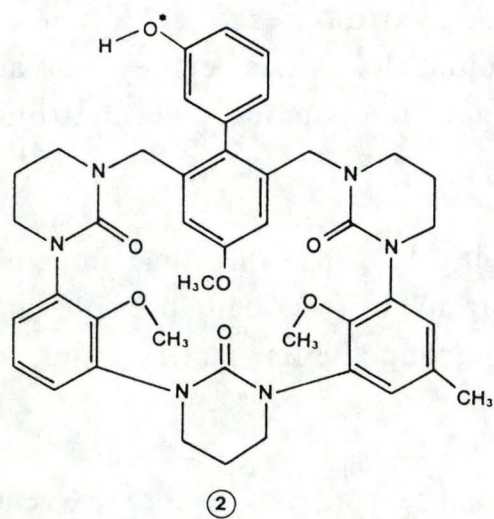


fig. 6 : précurseur actuellement obtenu par l'équipe de CRAM (KELLOGG, 1984)

1.4.2.31.4 Conclusions

Au vu de ces quelques exemples on peut déjà constater qu'il est possible de réaliser une catalyse "enzymatique" à partir de très petites molécules, simplement par greffage de quelques fonctions particulières à leur surface

1.4.2.3.2 Les katapinates

1.4.2.3.2.1 Introduction

Les anions, atomes ou molécules chargés négativement, jouent un rôle fondamental aussi bien dans le monde minéral que dans le monde vivant. En effet la majorité des substrats biologiques prenant part à des réactions enzymatiques sont anioniques.

Le phénomène de complexification d'anions par des molécules possédant une forme sphérique fut découvert en 1968 par C.H. PARK (HOSSEINI, 1989).

Ces composés possédant une cavité tridimensionnelle furent appelés katapinates.

Le composé modèle de cette famille est l'hexaaza-1, 4, 7, 13, 16, 19-dioxa-10, 22-tetraicosane, appelé aussi pour des raisons de commodité $24N_6O_2$ (HOSSEINI, 1989).

Il s'agit d'un cycle à 24 atomes contenant en plus des atomes de carbone, six atomes d'azote et deux atomes d'oxygène.

1.4.2.3.2.2 Recherche d'un récepteur

Les katapinates sont des récepteurs anioniques capables de fixer et de sélectionner des ions négatifs, et plus particulièrement

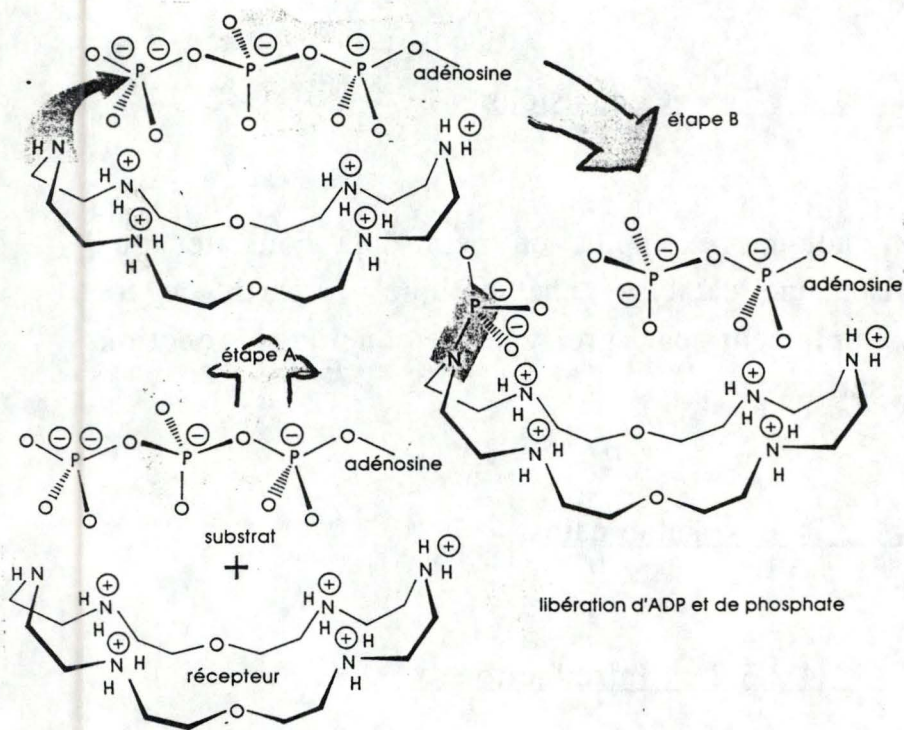


fig. 7 : mécanisme réactionnel ATPase des katapinates
 étape A : fixation du substrat
 étape B : lyse de l'ATP et du phosphate (HOSSEINI, 1989)

des nucléotides comme l'ATP ou l'ADP (les charges négatives étant portées par les groupements phosphates).

1.4.2.3.2.3 Recherche d'une activité

L'ATPase catalyse la réaction de coupure par hydrolyse d'une liaison entre un atome de phosphore et un atome d'oxygène au sein de la chaîne phosphatée.

En l'absence de tout catalyseur, enzyme naturelle ou artificielle, la réaction de coupure est relativement rapide en milieu acide (pH 0,5) et lente en milieu neutre (pH 7) (HOSSEINI, 1989).

En présence de $24N_6O_2$, il est possible d'effectuer la même réaction mais à une vitesse plus rapide et à pH 7.

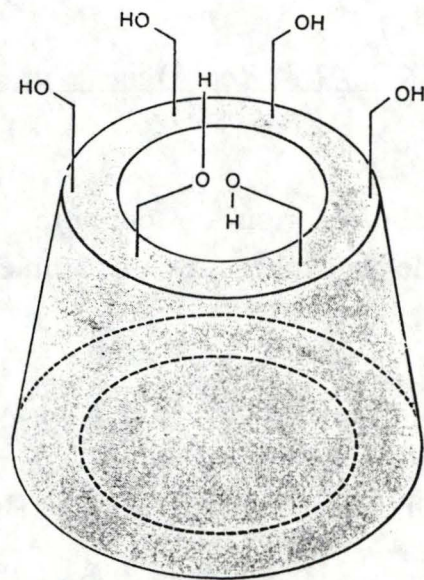
En effet l'activité des katapinates est intrinsèque; une des six fonctions amines étant protonée à pH 7, elle peut réagir avec la fonction phosphate de l'ATP, il apparaît dès lors un groupe phosphoramide et un ADP (fig. 7).

Après libération du phosphate et de l'ADP, un cycle identique peut recommencer.

On constate même une certaine sélectivité de la part des katapinates. En effet ces enzymes artificielles catalysent d'une part l'hydrolyse de l'ATP en ADP et d'autre part l'hydrolyse de l'ADP en AMP, contrairement à l'enzyme native l'ATPase. Il a été calculé que l'ATP est transformé en ADP trois fois plus vite que l'ADP n'est transformé en AMP par $24N_6O_2$ (HOSSEINI, 1989).

1.4.2.3.2.4 Conclusion

Dans cet exemple, il apparaît que les katapinates, tout comme l'enzyme naturelle, complexent le substrat, l'hydrolysent, libèrent



α -cyclodextrine (6 unités de alucose)

fig. 8 : structure d'une cyclodextrine (KELLOGG, 1984)

les deux produits de la réaction en solution., puis recommencent le cycle catalytique sur une autre molécule de substrat.

Cette imitation de l'enzyme naturelle n'est cependant pas encore parfaite car la sélectivité du substrat est différente de celle observée pour l'ATPase.

Cette enzyme "artificielle" est loin d'atteindre la sélectivité parfaite de l'enzyme naturelle. Et donc, fait intéressant pour la suite de notre travail, cela permet de supposer qu'il est possible de modifier la sélectivité d'un enzyme en réduisant sa structure

1.4.2.3.3 Les cyclodextrines

1.4.2.3.3.1 Introduction

Jusque fin des années 1970, les chimistes n'obtenaient que des molécules possédant bien l'une des caractéristiques des enzymes, à savoir la reconnaissance et la complexation spécifique du substrat, mais elles étaient encore dépourvues de propriétés de transformation qui font d'une enzyme un catalyseur.

Ce pas fut franchi par BRESLOW et TABUSHI (BRESLOW, 1982; TABUSHI, 1977; KELLOGG, 1984).

1.4.2.3 3.2 Recherche d'un récepteur

Ces chimistes utilisèrent comme récepteurs des composés naturels extraits de l'amidon : les cyclodextrines (fig. 8).

Les cyclodextrines sont des molécules d'oligosaccharides cycliques formés par l'enchaînement de six molécules de glucose.

Chaque molécule de cyclodextrine a la forme d'un tore, c'est-à-dire d'un cylindre creux dont le diamètre est différent aux deux

extrémités. L'extrémité la plus étroite porte exclusivement les groupements $-CH_2OH$ des molécules de glucose, l'extrémité la plus large est bordée par les groupements $-CHOH-$ de ces mêmes sucres, tandis que l'intérieur du cylindre est constitué par les parties hydrocarbonées des molécules.

L'équipe de CRAMER a montré dès 1954 (HOSSEINI, 1989) que la forme toroïde des cyclodextrines leur permet d'accueillir diverses molécules à l'intérieur de leur cavité.

Grâce aux groupements hydroxyles ($-OH$) présents à leur extrémité, les cyclodextrines se dissolvent facilement dans l'eau. Mais comme l'intérieur de leur cavité est tapissée par les parties très peu polaires des molécules de glucose, elles peuvent servir de refuge à des molécules électriquement neutres et non polaires comme les hydrocarbures cycliques. Ceux-ci y sont retenus par des interactions fortes.

Cet accueil de molécules hôtes présente une certaine analogie avec le site actif des enzymes où vient se fixer le substrat.

1.4.2.3.3 Recherche d'une activité

Cependant les cyclodextrines ne peuvent pas être utilisées telles quelles comme enzymes artificielles : en effet aucun de leurs groupements hydroxyles ne possède d'activité catalytique intrinsèque appréciable. Il était donc nécessaire de faire subir des transformations à cette molécule.

BRESLOW et TABUSHI ont mis au point différentes techniques pour fonctionnaliser l'extrémité comportant les groupements $-CH_2OH$.

L'approche qui a été utilisée, vise à imiter la réaction de catalyse de l'enzyme naturelle, en faisant réaliser une réaction similaire par l'enzyme artificielle.

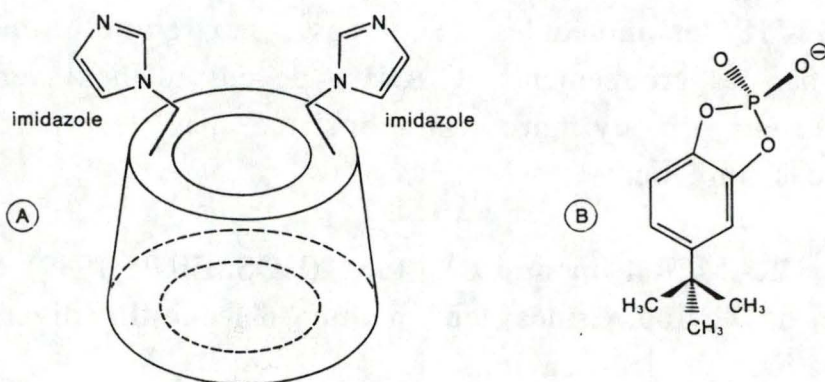


fig. 9 : A) cyclodextrine sur laquelle deux groupements imidazole ont été greffés

B) schéma du substrat nommé "phosphate cyclique"
(KELLOGG, 1984)

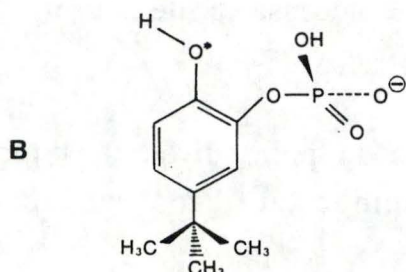
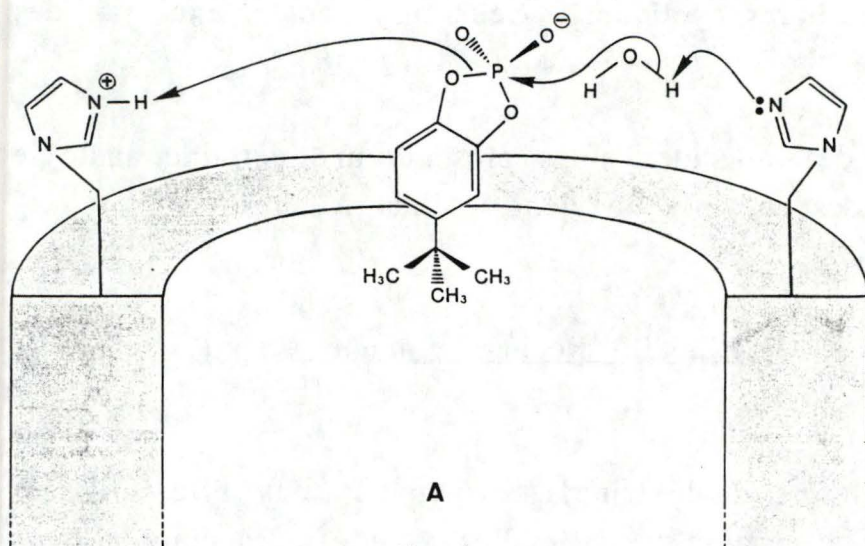


fig. 10 : A) mécanisme suggéré pour expliquer la coupure de la liaison phosphore-hydrogène

B) produit stéréospécifique (un seul isomère) produit par cette réaction (KELLOGG, 1984)

Cette approche a été utilisée pour "imiter" la ribonucléase A du pancréas de boeuf. Cette enzyme hydrolyse l'ARN en libérant les nucléotides qui le composent. La portion de l'ARN qui doit être coupée vient se placer dans le site actif de l'enzyme, entre deux groupements histidines situés l'un en face de l'autre.

Les modifications introduites sur la cyclodextrine ont donc abouti à l'insertion de deux groupements imidazoles situés l'un en face de l'autre (fig. 9 A)

La spécificité de cette enzyme artificielle a alors pu être testée sur un composé analogue aux nucléotides : un ester phosphate cyclique (fig. 9 B).

Le phosphate se place dans la cavité de la cyclodextrine et est hydrolysé, les groupements imidazoles catalysant la réaction (fig. 10 A). Et le produit de la fig. (fig. 10 B) est obtenu . On obtient aucune trace de l'isomère portant le groupement phosphate sur l'autre oxygène du cycle.

1.4.2.3.3.4 Conclusions

Cette enzyme artificielle possède bien certaines caractéristiques de l'enzyme naturelle, en particulier une certaine spécificité puisqu'elle hydrolyse la liaison phospho-diester en un point unique.

Mais l'efficacité de cette molécule n'atteint pas encore la rapidité de réaction de l'enzyme naturelle. La vitesse de réaction n'est multipliée que d'un facteur 50 (KELLOGG, 1984), ce qui est peu par rapport à l'augmentation de la vitesse de réaction pour l'enzyme (de l'ordre de 10^6 à 10^{14}).

1.4.2.4 Conclusions générales sur le point de vue de la chimie

Cette approche chimique sur la création d'enzyme artificielle apporte de nombreuses informations intéressantes.

Un des problèmes de la synthèse en chimie n'est pas tellement la synthèse du produit mais de savoir rendre la réaction suffisamment sélective pour obtenir uniquement le produit désiré.

En effet au lieu d'effectuer les réactions en solution (environnement où un grand nombre de réactions différentes et indésirables sont possibles), ces enzymes doivent permettre d'immobiliser temporairement le produit dans un site de géométrie très précise. De plus une seule transformation se produit puisqu'il n'y a qu'un seul type de groupement réactionnel dans le site actif.

Les récepteurs synthétiques peuvent être considérés comme des modèles de sites actifs d'enzymes pour l'étude des mécanismes de réactions mis en jeu lors d'une transformation enzymatique et de la nature des étapes élémentaires qui les composent.

Même si les enzymes artificielles produites jusqu'à présent sont encore loin de posséder la spécificité et le pouvoir d'accélération des enzymes naturelles, la connaissance des mécanismes de réaction, des structures biochimiques et le pouvoir de la chimie de synthèse devraient permettre de résoudre ces différents problèmes.

Cette approche décompose le mécanisme réactionnel des enzymes en ses rudiments les plus simples (fixation-activité) et elle prouve que quelques éléments seulement du site actif de l'enzyme greffé sur un récepteur sélectif, sont suffisants pour donner une activité catalytique même si celle-ci est loin de l'efficacité obtenue par les enzymes naturelles.

La totalité de l'enzyme n'est donc pas nécessaire pour produire une activité catalytique, et cette réduction de taille

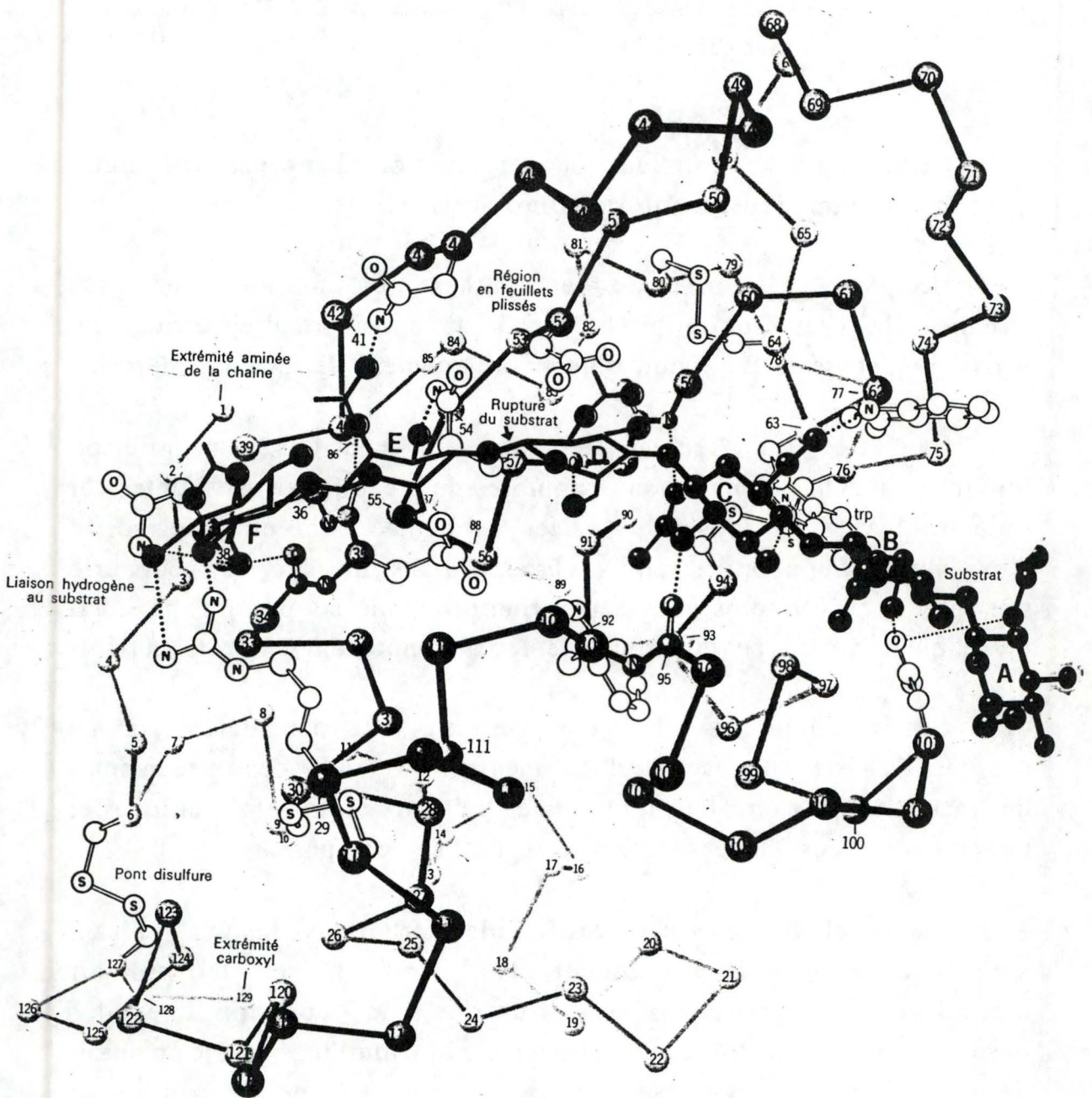


fig. 11 : structure tertiaire du lysozyme (LEHNINGER, 1977)

entraîne une certaine spécificité mais moins pointue que les enzymes naturelles.

1.4.3 Une approche biochimique de l'enzymologie

1.4.3.1 Introduction

Pour les biochimistes, la vision enzymatique est quelque peu différente, les enzymes sont avant tout les unités fonctionnelles du métabolisme cellulaire.

Ce sont des protéines qui catalysent des réactions chimiques spécifiques. Elles fixent la molécule de substrat et forment un complexe transitoire enzyme-substrat qui se détruit pour libérer l'enzyme libre et ses produits.

Les biochimistes aussi ont tenté d'imiter l'enzyme native à partir d'une structure réduite. Mais comme on va le voir, la loge constitutive de l'enzyme artificielle n'est pas "neutre", mais constitue une molécule complexe et dynamique comme en témoignent les exemples ci dessous.

1.4.3.2 Le lysozyme "une enzyme très imitée"

1.4.3.2.1 L'enzyme native

1.4.3.2.1 1 Aperçu structurel

Les études cristallographiques par diffraction aux rayons X réalisées par BLAKE en 1965 (NAITHANI ET AL., 1967) ont permis de déterminer la structure tertiaire du lysozyme (fig. 11).

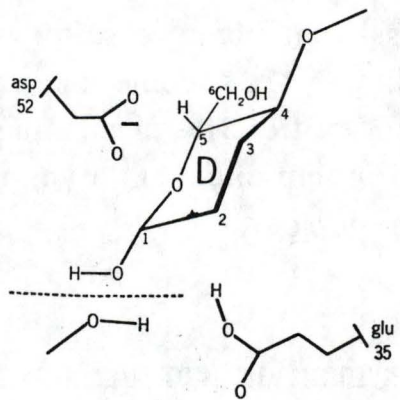
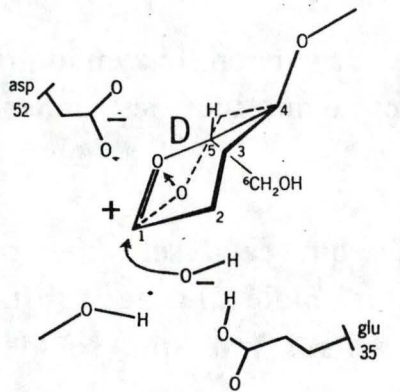
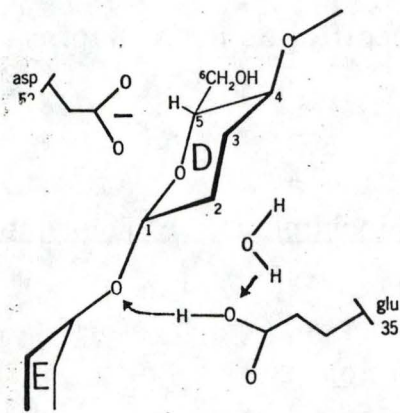


fig. 12 : mécanisme réactionnel suggéré par PHILLIPS
(LEHNINGER, 1977)

Le lysozyme est une enzyme qui se présente sous la forme d'un monomère, constitué de 129 acides aminés, pour une masse moléculaire de 13 930 daltons (LEHNINGER, 1977).

Cette enzyme se rencontre dans le blanc d'oeuf et dans les larmes humaines.

La connaissance de la structure tertiaire, ainsi que les études par diffraction aux rayons X sur le complexe inhibiteur-enzyme réalisées par PHILLIPS en 1965 (NAITHANI et Al., 1967), ont permis de déterminer quels étaient les acides aminés importants formant le site actif et intervenant dans le mécanisme de réaction.

1.4.3.2.1.2 Activité du lysozyme

La réaction catalysée par le lysozyme est le clivage hydrolytique de polysaccharides complexes contenus dans les parois protectrices des cellules de certaines famille de bactéries. Le lysozyme réalise en fait une réaction de β 1-4 glucosaminidase

Les parois de Micrococcus lysodeikticus constituent le substrat le plus utilisé pour doser l'activité du lysozyme.

Le mécanisme de cette réaction proposé par PHILLIPS en 1966 (PHILLIPS, 1966) est décrit à la fig.12. Il s'agit en fait d'une protonation de l'atome d'oxygène de la liaison glycosidique des polymères de N-acetylglucosamine et d'acide N-acetylmurannique des parois bactériennes (fig. 13). Cette protonation de l'oxygène glycosidique entraîne une scission de la chaîne du polymère grâce à l'ionisation du carbone γ de l'acide glutamique 35 et à la stabilisation du cation par l'ion carboxylate de l'acide aspartique 52.

On a de plus constaté que l'environnement de ces deux acides aminés joue un rôle déterminant pour la réaction. L'acide glutamique 35 se trouve dans un environnement hydrophobe tandis que l'acide aspartique 52 est lui dans un environnement hydrophile.

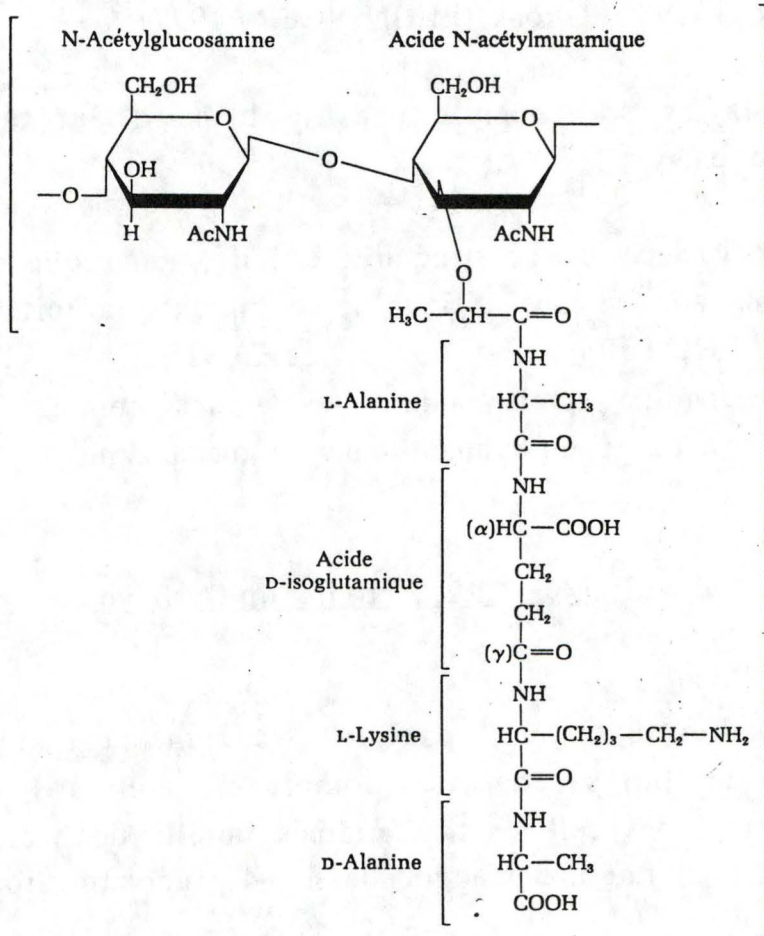


fig. 13 : polymère de N-acétylglucosamine et d'acide acétylmuramique (LEHNINGER, 1977)

1.4.3.2.2 Synthèse proprement dite

1.4.3.2.2.1 Travaux de NAITHANI et DHAR

Au vu de ces constatations, NAITHANI et DHAR (NAITHANI et Al., 1967) ont eu l'idée de synthétiser deux peptides possédant un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe en introduisant dans ces deux domaines des groupements carboxyliques, ceci dans l'espoir de parvenir avec ce peptide à mimer l'activité du lysosyme.

Le premier peptide synthétisé de façon aléatoire est composé de L-phénylalanine (a.a. hydrophobe) et de L-glutamate (a.a. hydrophile).

Le peptide obtenu est dénommé PG, et a une masse moléculaire de 63 650 daltons. Le rapport L-phénylalanine /L-glutamate est de 1/0,3.

Le second peptide dénommé GcG a été synthétisé de la même manière que pour le peptide PG et par la même équipe. Ce peptide est constitué de γ -cholesteryl-L-glutamate, de γ -benzyl-L-glutamate et de L-glutamate en proportion 1/0,67/0,66. La masse moléculaire de ce peptide vaut 12 000 daltons.

NAITHANI et DHAR constatèrent que les peptides PG et GcG possédaient bien une activité lytique sur les suspensions de Micrococcus lysodeikticus.

Cependant l'activité était respectivement 30 et 190 fois moindre que l'activité de l'enzyme native : le lysozyme.

Les glycopeptides formés par la dégradation de la paroi cellulaire des bactéries Micrococcus lysodeikticus après réaction avec les deux polymères et avec le lysozyme, ont été comparés au moyen de techniques d'électrophorèse et de chromatographie sur papier ce qui a permis de constater leur parfaite identité. Les peptides synthétisés montraient donc bien une activité identique mais inférieure à celle du lysozyme.

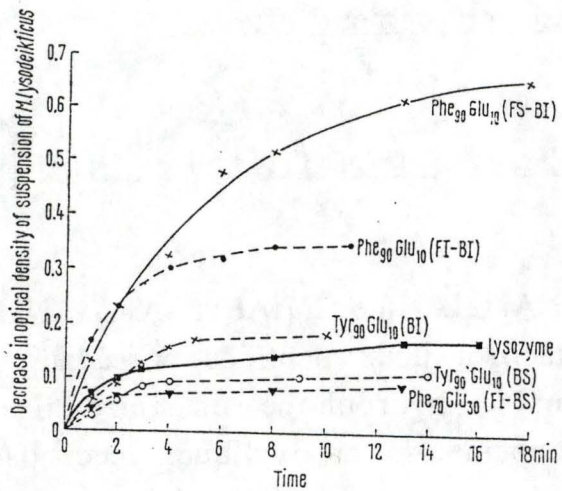


fig. 14 : comparaison de l'activité des différentes copolymérisation (0,5 mg/ml) avec le lysozyme (0,05 mg/ml)
 FS : soluble dans l'acide formique
 FI : insoluble dans l'acide formique
 BS : soluble dans le bicarbonate de sodium
 BI : insoluble dans le bicarbonate de sodium
 (SRIVASTAVA et Al., 1969)

1.4.3.2.2 Travaux de SRIVASTAVA et MATHUR

SRIVASTAVA et MATHUR (SRIVASTAVA et Al., 1969) ont réalisé des travaux similaires à ceux de NAITHANI et DHAR. Ils ont synthétisé différents peptides possédant toujours une zone hydrophile et une zone hydrophobe. La seule différence par rapport aux travaux de NAITHANI est qu'ils ont utilisé la tyrosine à la place de la phénylalanine comme acide aminé hydrophobe.

Ils ont également joué sur le taux des différents acides aminés (Tyr, Glu) intervenant dans la composition des différents peptides.

SRIVASTAVA ET MATHUR ont séparé les différents peptides obtenus après synthèse en jouant sur leurs propriétés de solubilité (soluble ou insoluble dans l'acide formique, soluble ou insoluble dans le bicarbonate de sodium).

La fig. 14 montre l'activité des peptides obtenus après séparation suivant leurs propriétés de solubilisation, comparée à celle du lysozyme natif.

Selon la composition des différents peptides obtenu après synthèse, l'activité observée représente un pourcentage compris entre 0 et 30 % de l'activité de l'enzyme native.

1.4.3.2.3 Travaux de CHAKRAVARTY

Expérience encore plus marquante : CHAKRAVARTY et son équipe (CHAKRAVARTY et Al., 1973) ont synthétisé un peptide de dix acides aminés de longueur, possédant à la fois un domaine hydrophobe et un domaine hydrophile.

La structure primaire de ce décapeptide est Glu-Phe-Ala-Ala-Glu-Glu-Ala-Ala-Ser-Phe.

Les règles de repliement des peptides (CHAKRAVARTY et Al., 1973) permettent de prédire la formation d'une hélice α , puisque

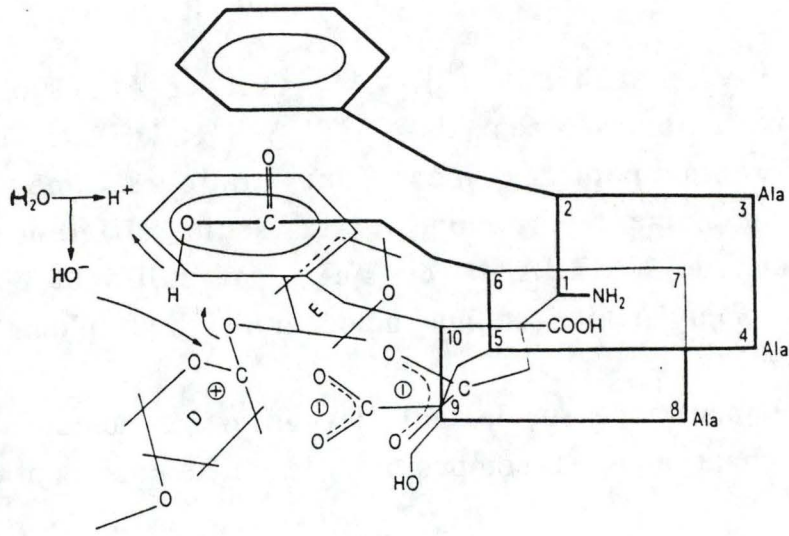


fig.15 : représentation tridimensionnelle du décapeptide possédant une activité lysozyme (CHAKRAVARTY et Al., 1972)

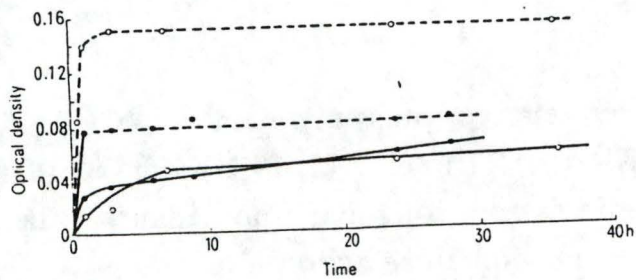


fig.16 : comparaison de l'activité du lysozyme (0,5 mg/ml) (----) et du décapeptide (2,5 mg/ml) (____) (CHAKRAVARTY et Al., 1972)

les 8 premiers acides aminés sont stabilisant de l'hélice α (seule la sérine 9 est un acide aminé dit destructeur d'hélice α). Cette estimation structurale a été confirmée par une étude cristallographique par RX (fig. 15).

Ainsi dans l'espace, on retrouve la Glu 6 dans un environnement hydrophobique puisqu'elle est flanquée "en haut et en bas" d'un cycle benzénique provenant de Phe 2 et Phe 10; le groupement méthyl de Ala 7 contribue également à l'environnement hydrophobique.

L'environnement hydrophilique nécessaire à l'activité du lysozyme est également créé puisqu'il est le résultat de la proximité spatiale des Glu 1 et Glu 5.

Le site actif est constitué des groupements carboxyliques de la Glu 1 ou Glu 5 avec la Glu 6.

CHAKRAVARTY et son équipe constatèrent que ce décapeptide possédait une activité hydrolytique sur la chitine ou le dextrant. Cette activité est significative mais inférieure à celle du lysozyme de blanc d'oeuf, comme le montre la fig. 16.

1.4.3.2.3 Conclusion

Tous ces travaux indiquent donc qu'il est possible dans certains cas, par un enchaînement judicieux d'acides aminés, de constituer un peptide doté d'une activité enzymatique.

Pourquoi, dès lors, ne pas espérer retrouver une activité enzymatique sur un fragment peptidique provenant d'une enzyme totale, pouvoir isoler ce peptide et le caractériser, surtout après la publication de l'équipe de HOLLAND décrite ci-dessous.

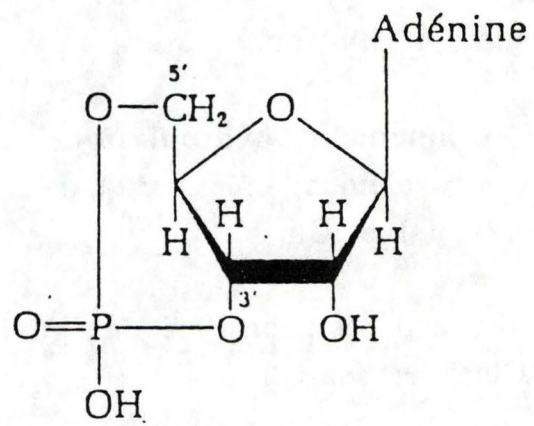


fig. 17 : structure de l'AMP cyclique (LEHNINGER, 1977)

1.4.3.3 L'adénylate cyclase

1.4.3.3.1 Travail réalisé par l'équipe de HOLLAND

L'adénylate cyclase catalyse le transfert intramoléculaire du groupe adénylyl de l'ATP libéré de son pyrophosphate en un groupe 3'-hydroxyl; ceci forme l'AMP cyclique (fig. 17).

L'équipe de HOLLAND (HOLLAND et Al., 1988) a introduit un gène d'adénylate cyclase dans un plasmide à la suite d'un promoteur induit à 42° C. A cette température, le plasmide produit de forte quantité d'adénylate cyclase mais qui précipite partiellement dans E. coli.

On constate alors que l'enzyme précipitée a perdu son activité et qu'il s'agit en réalité d'une protéine hybride adénylate cyclase β -galactosidase. Pour tenter de récupérer une activité plus grande, les auteurs ont testé l'effet de la trypsine sur l'adénylate cyclase.

La fig.18 montre la variation d'activité totale et soluble en fonction de la digestion trypsinique.

On peut constater qu'après 360 minutes de lyse trypsinique, on a une forte concentration en peptide de 30 000 daltons et une faible concentration en peptides de 40 000 daltons. Après 480 minutes, la bande correspondant aux peptides de 40 000 daltons a disparu et celle de 30 000 a diminué.

D'après l'analyse en électrophorèse (fig. 19) ils ont pu déduire que le peptide de 30 000 daltons possédait une activité enzymatique.

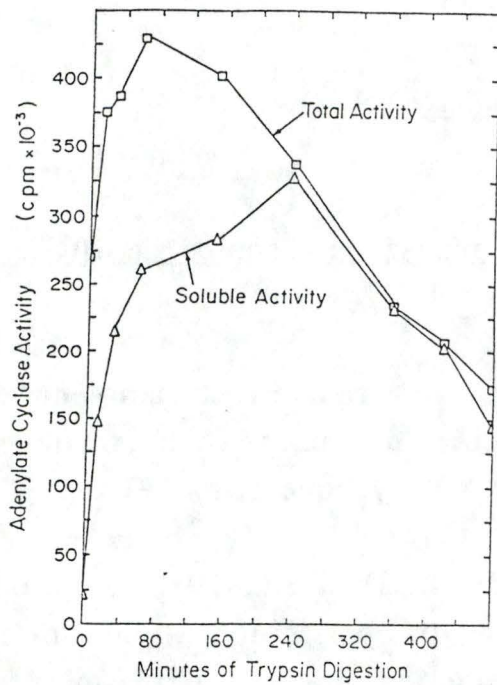


fig. 18 : dépendance de l'activité totale et soluble de l'adénylate cyclase en fonction du temps de digestion (HOLLAND et Al., 1988)

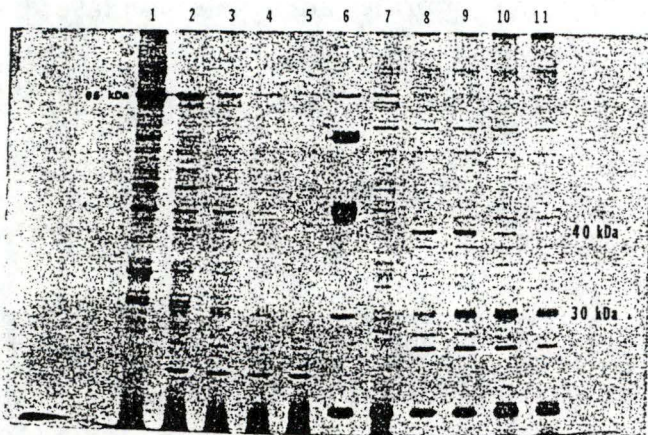


fig. 19 : gel SDS sur la digestion de l'enzyme. Les pistes 1 à 5 contiennent la fraction insoluble provenant de la digestion trypsique. Les pistes 6 à 11 contiennent la fraction soluble du digestat trypsique. Les pistes 1 et 7 correspondent à une digestion de 0 heure, les piste 2 et 8 à une digestion de 5 minutes, es pistes 3 et 9 à une digestion de 60 minutes et les pistes 4 et 10 à une digestion de 360 minutes et les pistes 5 et 11 à une digestion de 480 minutes. La piste 6 conteint les proteines étalon (HOLLANDet Al., 1988)

1.4.3.3.2 Caractéristiques du peptide

Ce peptide de 30 000 daltons a été isolé et séquencé. Il est constitué de 260 a.a. (il comprend les résidus compris entre le 82ème et le 342ème a.a.)

Sa caractérisation biochimique a montré (fig. 20) la relation existant entre l'activité de ce peptide et la concentration en ATP. On constate que la courbe passe par un optimum correspondant à une concentration en ATP de 0,9 mM. Cette expérience se déroule en présence d'une concentration en MgCl₂ constante (20 mM) (Le Mg⁺⁺ est un cofacteur indispensable au bon déroulement de la réaction).

La relation existant entre l'activité et la concentration en MgCl₂ est présentée à la fig. 21. Cette expérience se déroule en présence de concentration en ATP constante (1 mM).

Dans ces deux relations, on constate que l'allure des courbes de l'adénylate cyclase et du peptide est identique.

Le tableau ci-dessous donne la comparaison entre le Km et le Vmax de l'enzyme et du peptide.

	Km	Vmax
Adénylate cyclase	700 nmole/min mg	0,1 mM
peptide	435 nmole/min mg	0,25 mM

1.4.3.3 Conclusion

La similitude entre les courbes et les constantes cinétiques du peptide et de l'enzyme native prouve qu'un morceau digéré de 30 000 daltons a gardé le domaine catalytique de l'enzyme intact ou partiellement intact.

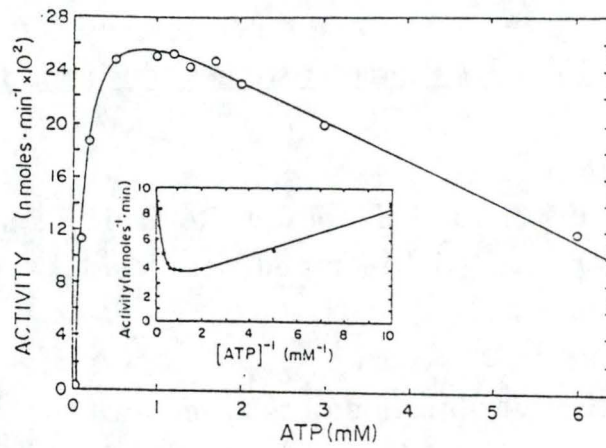


fig. 20 : dépendance de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en ATP (concentration en magnésium fixée à 20 mM) (HOLLAND et Al., 1988)

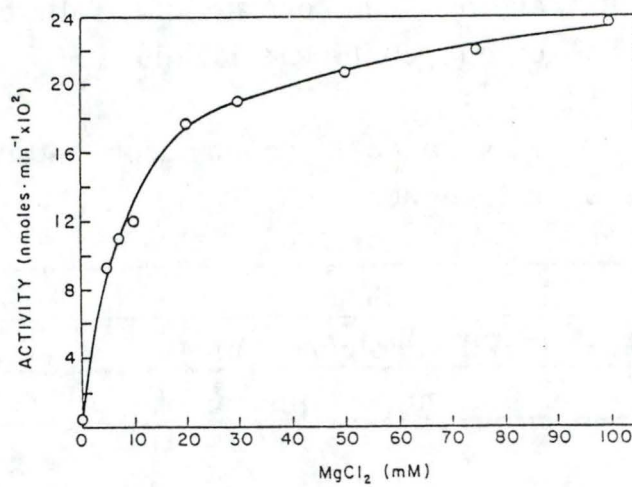


fig. 21 : dépendance de la vitesse de réaction en fonction du magnésium (concentration en ATP constante à 1 mM) (HOLLAND et Al., 1988)

Nous pouvons constater que la perte des 2/3 de la séquence primaire de l'enzyme n'a affecté que faiblement son activité.

C'est la même démarche que nous avons tenté dans ce travail, déjà commencé par HAYEN (HAYEN, 1989) en utilisant une enzyme plus difficile car composée de plusieurs sous-unités et utilisant un cofacteur, l'alcool déshydrogénase.

1.5 | L'alcool déshydrogénase de levure

1.5.1 choix de l'enzyme

Il nous fallait une enzyme que nous pouvions utiliser en grosse quantité. De plus celle-ci devait être peu coûteuse et facilement disponible. Un atout supplémentaire était un dosage fiable et facilement réalisable

Pour ces raisons, notre choix s'est porté sur l'ADH.

Nous pouvions la purifier nous-même à partir de la levure Saccharomyces cerevisiae pour un prix très intéressant.

Cette enzyme nécessite la présence du NAD^+ comme cofacteur et, il est très facile de suivre directement au spectrophotomètre l'oxydation du NADH (ce qui entraîne une diminution d'absorbance à 340 nm) ou la réduction du NAD^+ (ce qui entraîne une augmentation d'absorbance) (ce qui représente un avantage méthodologique important).

En outre, cette étude sur l'ADH s'insère dans un projet du laboratoire visant à modifier les propriétés de cette enzyme en solution.

Il existe encore d'autres avantages pour lesquels cette enzyme fut retenue pour notre travail par exemple la catalyse de réduction

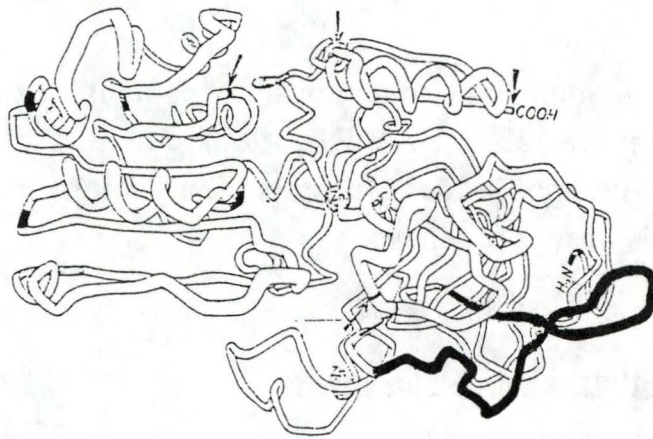


fig. 22 : structure tertiaire d'un monomère de H-ADH. Les zones noires représentent les segments absents chez l'ADH de levure (JÖRNVALL et Al., 1978)

des fonctions alcool dans des conditions douces pourrait avoir des applications en synthèses chimiques de molécules.

1.5.2 Description de l'ADH

1.5.2.1 Introduction

La cristallisation de l'alcool deshydrogénase (ADH) de levure par NEGELEIM et WULFF en 1937 (SUND, 1963) fut la première cristallisation couronnée de succès pour une deshydrogénase NAD^+ dépendante.

Cette réussite allait permettre d'étudier de manière plus précise le mode d'action de cette enzyme, ainsi que le mécanisme réactionnel par lequel elle catalyse la réaction d'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde.

Cette antériorité explique le numéro officiel de classification de l'enzyme dans la nomenclature du U.I.B. :

E.C. 1.1.1.1 : alcool NAD^+ -oxydoréduction

Au cours des années suivantes, de nombreuses autres ADH allaient être isolées à partir de divers animaux (porc, homme, lapin, bactérie, ...) ou de végétaux (pois, riz, maïs, ...) (SUND, 1963).

L'alcool deshydrogénase du foie de cheval allait être la plus étudiée, et aujourd'hui encore la structure tertiaire et quaternaire, le mécanisme réactionnel et les détails du comportement cinétique de cette enzyme sont mieux connus que les propriétés de l'ADH de levure.

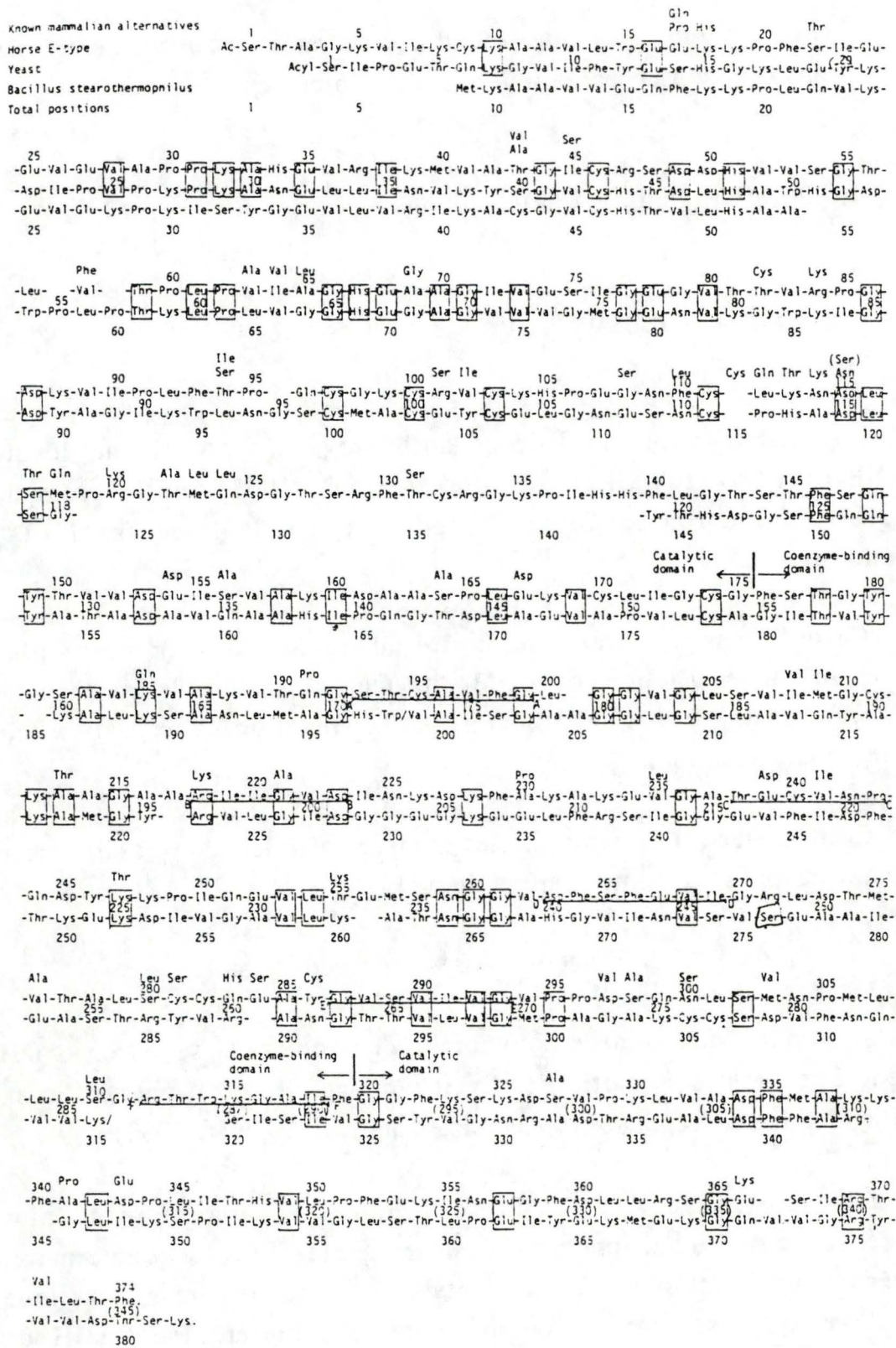


fig. 23 : alignement des structures primaires de l'ADH de cheval, l'ADH de levure et l'ADH de Bacillus stearothermophilus (JÖRNVALL et Al., 1978)

1.5.2.2 Comparaison entre l'ADH du foie de cheval (H-ADH) et l'ADH de levure (Y-ADH)

Quoique l'ADH du foie de cheval et l'ADH de levure catalysent la même réaction, il n'en est pas moins vrai que ces deux protéines sont des enzymes différentes, possédant des caractéristiques propres (poids moléculaire, constante cinétique, ...) (SUND, 1963).

L'enzyme de levure peut se dissocier en ces différents monomères sous l'influence de différents composés, tandis que l'enzyme du foie de cheval ne le peut pas (SUND, 1963).

En effet la plus grande différence existant entre ces deux enzymes est la structure quaternaire : l'ADH du foie de cheval est constituée de deux monomères (fig. 32) tandis que l'ADH de levure est constituée quand à elle de quatre monomères

Malgré ces différences, il existe plusieurs propriétés similaires. La recherche d'inhibiteurs a montré que le coenzyme est lié à l'enzyme par différents liens (SUND, 1963). Il semble d'après le point de vue chimique que l'intermédiaire formant le complexe enzyme-coenzyme-substrat a la même ou une structure similaire pour l'ADH du foie de cheval (H-ADH) et l'ADH de levure (Y-ADH).

Une étude menée par JÖRNVALL (JÖRNVALL, 1977) montre que l'alignement des séquences en acide aminés de la H-ADH et de Y-ADH révèle une identité positionnelle de 25 % et une similarité de 36 % (fig. 23).

La comparaison suggère donc que l'alcool déshydrogénase de levure et du foie de cheval contiennent au moins une chaîne de 21 a.a. de différence dans leur séquence qui explique la dimension différente des monomères (H-ADH 374 a.a., Y-ADH 348 a.a.) (JÖRNVALL, 1977).

En outre il apparaît que la plupart des régions conservées chez Y-ADH sont celles contenant les structures qui construisent et entourent le site actif chez l'alcool déshydrogénase du foie de cheval.

La structure tertiaire de Y-ADH a été également comparée à la structure tertiaire de la H-ADH, bien connue cristallographiquement. Les résultats proposés par JÖRNVALL et BRANDEN (JÖRNVALL et Al., 1978) montrent non seulement une large homologie entre les structures tertiaires des deux alcool déshydrogénases, mais également une haute similitude entre le mécanisme enzymatique de ces deux protéines.

D'après JÖRNVALL (JÖRNVALL, 1977), il est permis d'extrapoler à l'enzyme de levure les connaissances de la structure tertiaire et du site catalytique de l'ADH du foie de cheval. Ce travail de détermination de la structure de l'ADH de levure à partir de la connaissance de la structure de l'ADH de foie de cheval est actuellement réalisée par CRONET.

1.5.2.3 Caractéristique de l'enzyme de levure

L'enzyme de levure est principalement extraite de Saccharomyces cerevisiae.

L'estimation de la masse moléculaire de l'alcool déshydrogénase de levure varie entre 140 et 150 000 daltons selon la technique utilisée, alors que son point isoélectrique (pI) est de 5,4 (BRANDEN et Al., 1975).

La protéine est tétramérique et chaque sous-unité est composée de 348 a.a.

L'ADH de levure est instable lorsqu'elle se trouve dans des solutions ayant un pH inférieur à 6 ou supérieur à 8,5 (SUND, 1963).

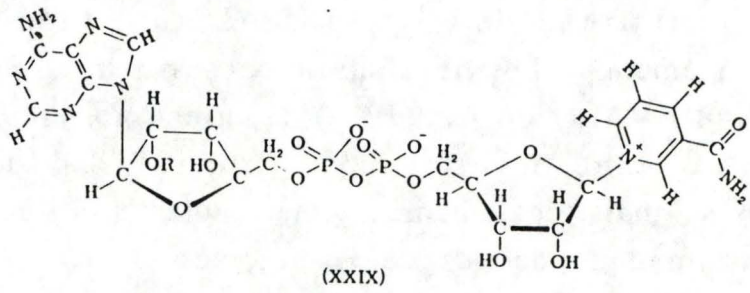


fig. 24 : structure du NAD+ (POPJAK, 1970)

1.5.2.4 Caractéristiques de la réaction catalysée par l'ADH

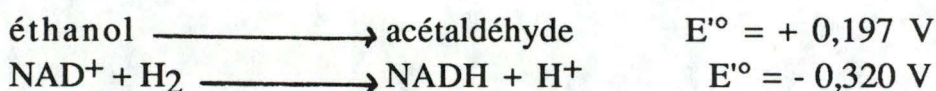
La réaction classique de l'ADH consiste en l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde.



Cette équation est caractérisée par une constante d'équilibre (BERGMAYER, 1974).

$$K_{\text{eq}} (\text{à } 20^\circ \text{ C}) = \frac{(\text{CH}_3\text{-CHO})(\text{H}^+)(\text{NADH})}{(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH})(\text{NAD}^+)} = 8,0 \cdot 10^{-12} \text{ M}$$

On peut donc constater que l'oxydation de l'alcool et la réduction concomitante du coenzyme sont thermodynamiquement défavorisées. Ceci peut également s'illustrer par le calcul de la variation de l'énergie libre entre les réactifs et les produits (PRICE et Al., 1982).



$$\text{d'où } \Delta E' = - 0,12 \text{ V}$$

$$\text{et } \Delta G_0 = - n F E' \text{ où } n : \text{ nombre d'électron échangés}$$

$$F : \text{ constante de Faraday qui vaut } 96,5 \text{ KJ V}^{-1} \text{ mole}^{-1}$$

$$\Delta G_0 = + 23,739 \text{ KJ mole}^{-1}$$

1.5.2.5 Description du domaine liant le coenzyme

Le coenzyme utilisé par l'alcool déshydrogénase pour réaliser la réaction d'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde est le nicotinamide adenine dinucléotide dit NAD^+ (fig 24).

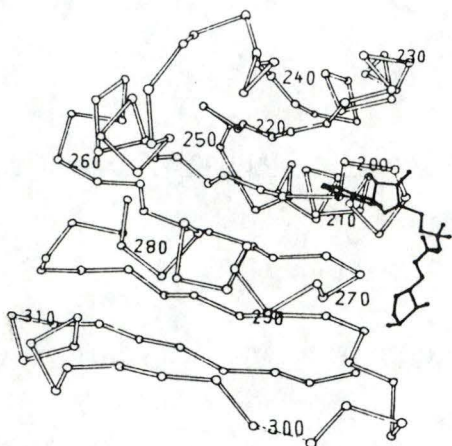


fig. 25 : stéréodiagramme des positions des carbones α du domaine de liaison du coenzyme (BRANDEN et Al., 1975)

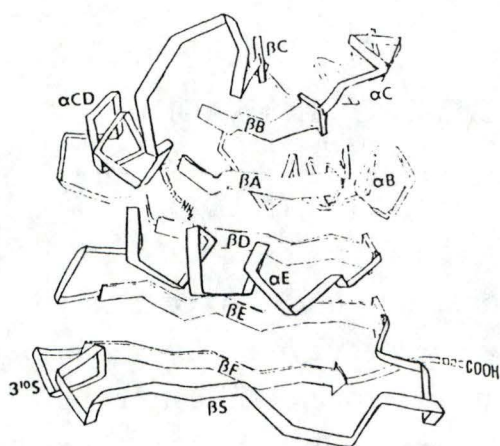


fig. 26 : diagramme illustrant le repliement des chaines α et β dans le domaine de liaison du coenzyme (BRANDEN et Al., 1975)

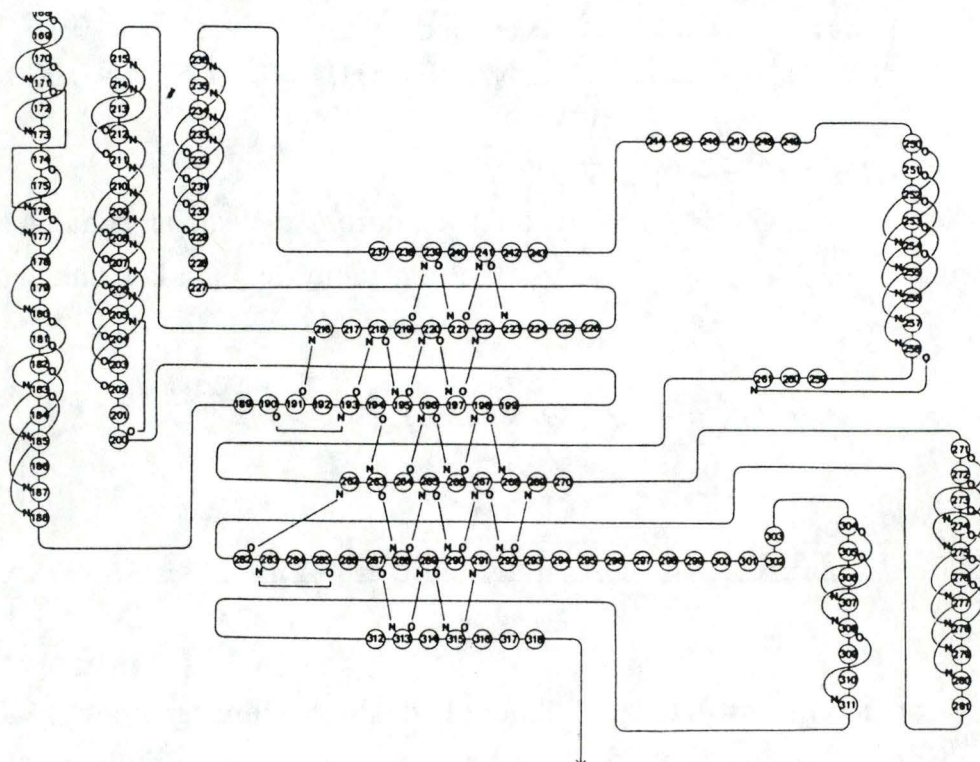


fig. 27 : diagramme illustrant les ponts hydrogènes dans le domaine de liaison du coenzyme (BRANDEN et Al., 1975)

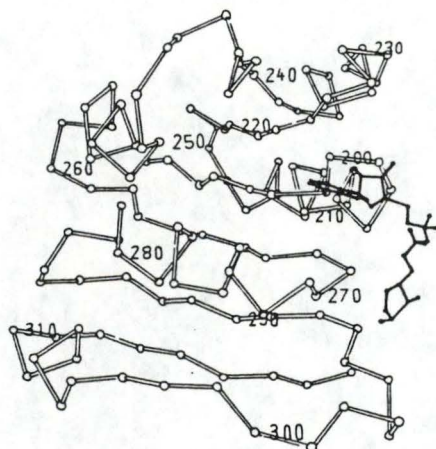


fig. 28 : stéréodiagramme des positions des carbones α du domaine de liaison du coenzyme et les liens de la molécule d'ADP-ribose (BRANDEN et Al., 1975)

Numbers refer to the sequence of the horse protein.

Function	Horse liver	Yeast
Adenine binding pocket Interior	198 Phe	Ser
	222 Val	Ile
	224 Ile	Gly
	243 Pro	Phe
	250 Ile	Val
	274 Thr	Ala
	277 Thr	Ala
Surface	271 Arg	Ser
	273 Asp	Ala
Adenosine ribose binding	223 Asp	Asp
	199 Gly	Gly
	269 Ile	Ser
	225 Asn	Gly
	228 Lys	Lys
Pyrophosphate binding	47 Arg	His
	269 Ile	Ser
Nicotinamide ribose	293 Gly	Gly
Nicotinamide	178 Thr	Thr
Substrate binding pocket	57 Leu	Trp
	93 Phe	Trp
	110 Phe	Asn
	116 Leu	Leu
	140 Phe	Tyr
	141 Leu	Thr
	296 Pro	Ala
	318 Ile	Ile
Acid-base system	48 Ser	Thr
	51 His	His
Ligands to active site zinc atom	46 Cys	Cys
	67 His	His
	174 Cys	Cys

fig. 29 : comparaison des acides aminés intervenant dans le site actif et dans le site de liaison du coenzyme et du substrat (JÖRNVALL et Al., 1978)

Le domaine fixant le coenzyme encore appelé le "petit domaine", comprend les acides aminés 176 à 318.

Ce domaine est construit de 6 brins parallèles de plan β ($\beta A - \beta F$). Ces chaînes β sont de taille similaire et sont reliées entre elles par des hélices α ($\alpha A, \alpha B, \alpha C, \alpha CD, \alpha E$ et $3^{10} S$) (fig. 26) (BRANDEN et Al., 1975).

Cette disposition particulière va créer une crevasse dans laquelle le coenzyme va pouvoir se fixer (fig. 28).

MOSBACH (1972) et LINDBERG(1973) (BRANDEN et Al., 1975) ont étudié les acides aminés qui interviennent dans la liaison du nucléotide. Ils ont constaté que le groupe adénine est lié à une poche hydrophobe situé à une extrémité de la crevasse. Il y a seulement une interaction hydrophobique générale (fig. 29).

Cette constatation permet d'expliquer la grande variété des résidus hydrophobiques que l'on peut observer dans l'enzyme de différents organismes dans cette partie du site catalytique. L'unique condition imposée pour la liaison de ce groupement adénine est donc de remplacer un a.a. hydrophobe par un autre a.a. hydrophobe de taille similaire.

Le groupe ribose de l'adénosine ribose est lié à l'enzyme par une interaction spécifique : l'oxygène du groupement carboxylique de l'Asp 223 crée une liaison par pont hydrogène avec l'hydrogène du groupement hydroxyl situé sur le C'2 du ribose (fig. 30) (BRANDEN et Al., 1975).

Ce pont hydrogène avec l'Asp 223 semble être d'une importance capitale dans la fixation du coenzyme avec l'enzyme, car on peut observer une invariance dans d'autres déshydrogénases (BRANDEN et Al., 1975). La glycine 199 et la lysine 228 sembleraient protéger le groupement Asp 223 en réalisant des liaisons hydrogène en l'absence du coenzyme. Cela empêche la formation de liaisons hydrogènes indésirées avec un groupement parasite entré par hasard au niveau du site de liaison du coenzyme, et qui empêcherait la fixation de ce dernier.

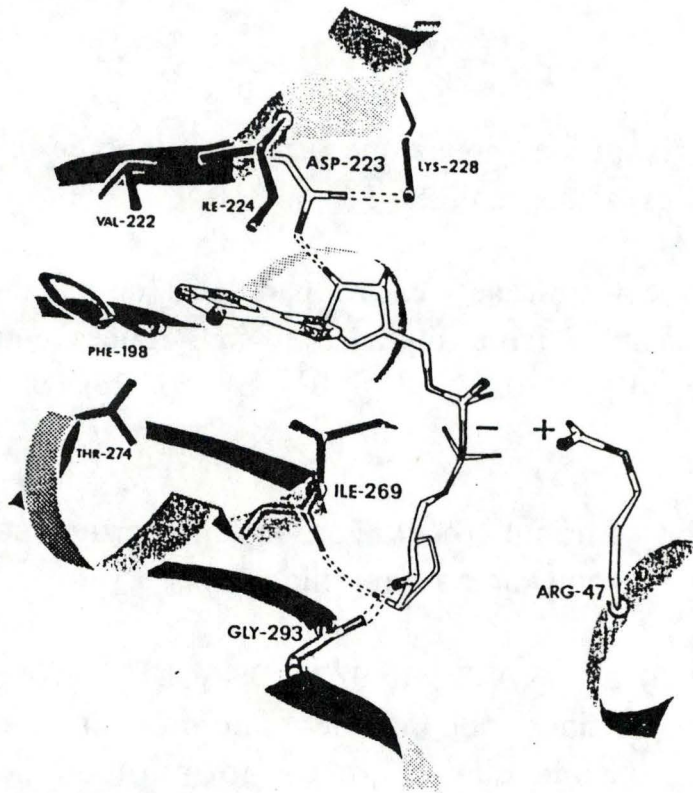


fig. 30 : diagramme représentant les acides aminés jouant un rôle important dans la liaison du coenzyme (BRANDEN et Al., 1975)

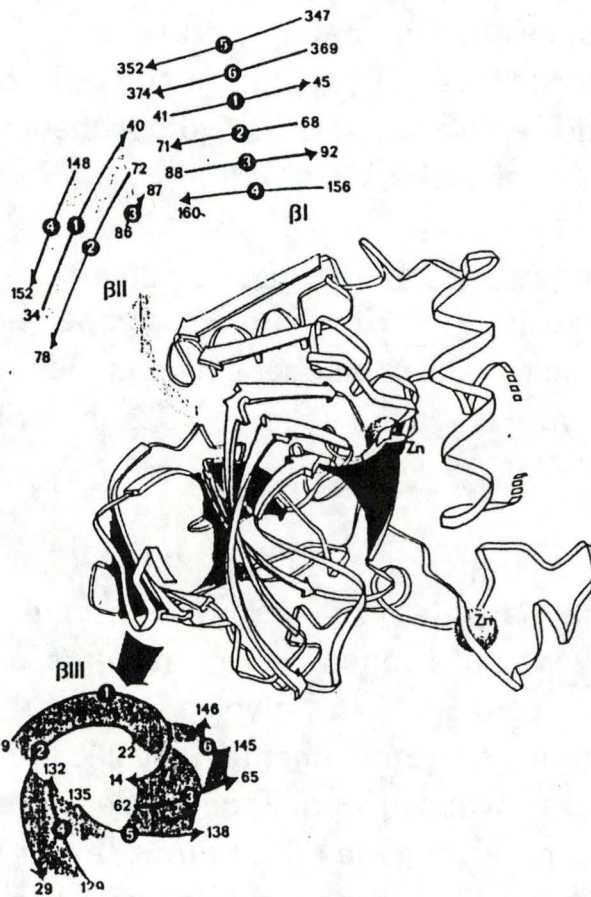


fig. 31 : diagramme illustrant le repliement des chaînes α et β dans le domaine catalytique (BRANDEN et Al., 1975)

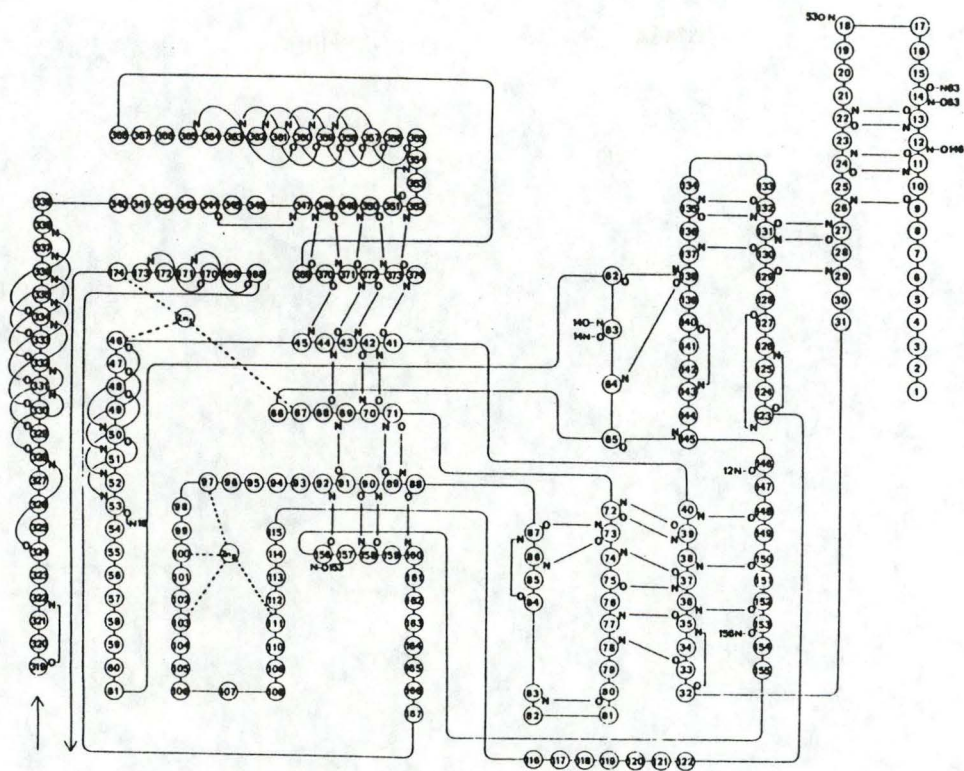


fig. 32 : diagramme illustrant les ponts hydrogènes dans le domaine catalytique (BRANDEN et Al., 1975)

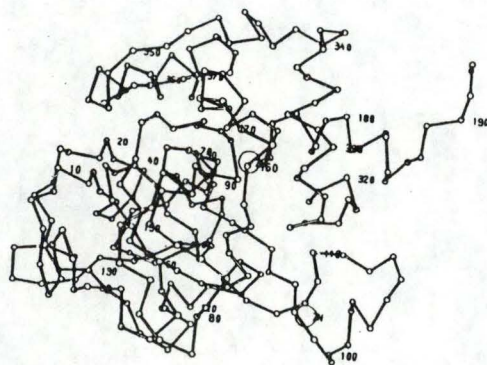


fig. 33 stéréodiagramme des positions des carbones α du domaine catalytique (BRANDEN et Al., 1975)

Le nicotinamide s'ajuste scrupuleusement dans la poche formée par les résidus Thr 178, Ile 203, Val 268, Val 292, Gly 293 et Ile 318.

De cette façon grâce à de fins ajustements réglés par la poche hydrophobique (POPZAK, 1970), le groupe nicotinamide est positionné à une distance de 4,5 Å de l'atome de Zn

L'approche du site de liaison du coenzyme est donc très spécifique. Si l'orientation du coenzyme est modifiée, on peut observer un encombrement stérique entre la chaîne latérale de l'Ile 20 et la portion amide du nicotinamide (POPZAK, 1970; BRANDEN, 1975; JÖRNVALL 1978).

1.5.2.6 Description du domaine catalytique

La structure tertiaire, comme le montre la fig. 31 est beaucoup plus complexe que celle du domaine liant le coenzyme. Le domaine catalytique est en réalité constitué d'un réseau complexe de structure β , il est composé de trois régions principales appelées β I, β II, β III, chaque région est composée principalement de plans β antiparallèles.

Les acides aminés formant le site actif sont Trp 57, Trp 93, Asn 110, Leu 116, Tyr 140, Thr 141, Ala 296. La Thr 48 et Ile 318 sont en fait à la frontière des deux domaines (JÖRNVALL et Al., 1978).

Dans cette poche accueillant le substrat, il y a trois acides aminés hydrophiles : la Thr 48 qui joue un rôle direct dans le mécanisme réactionnel, la Tyr 140, la Thr 141. Les acides aminés restants sont hydrophobes.

Outre cette poche de substrat, le domaine catalytique contient chez l'ADH de levure quatre atomes de zinc, un atome par sous-unité (BRANDEN et Al., 1975).

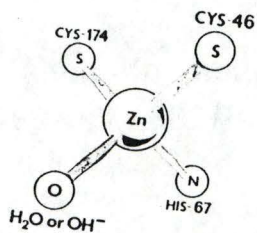


fig. 34 : atome de zinc catalytique lié aux deux cystéines, à l'histidine et à une molécule d'eau (BRANDEN et Al., 1975)

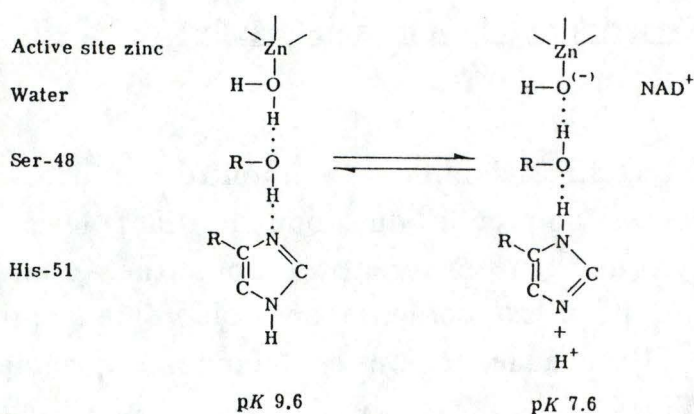


fig. 35 : diagramme illustrant le "jeu de ponts hydrogène" de la molécule d'eau avec la Ser 48 (Thr chez Y-ADH) et His 512 ainsi que le mécanisme protonateur de l'eau liée au zinc induit par la liaison du coenzyme (BRANDEN et Al., 1975)

Position in yeast enzyme	Residue in			Corresponding position and residue in horse enzyme [8]	Corresponding region in tertiary structure of liver enzyme [6]	
	isozyme I	commercial preparation	isozyme II		designation [6]	approximate position
20		Tyr	His	Ile-23	β III:2	superficial
33 or 34		Leu	Ser	Val-36 or Arg-37	β II:1	superficial
168		Met	Arg	Thr-190	R9 (before β A)	superficial
178		Ala	Val	Leu-200	$\alpha\beta$	cleft between domains
216		Glu	Asp	Thr-238	β C (start)	superficial
229		Gly	Ser	Gln-251	α CD (start)	superficial
235		Thr	Ile	Ser-258	α CD (end)	superficial
237		Gly	Val	Gly-260	α CD (at bend)	superficial
265		Thr	Val	Ser-289	β E (middle)	subunit interface
270		Met	Leu	Val-294	between β E and R13	subunit interface
277		Cys	Ser	Leu-301	β S	subunit interface
283		Glu	His	Gln-307	3 ¹⁰ S	subunit interface
313	Val	Ile	Val	Asp-343	between R15 and R16	cleft between domains
323		Ser	Ala	Glu-353	R17	superficial
324		Thr	Ser	Lys-354	R17	superficial
337	Ile	Val	Ile	gap at 366/367	α 4	cleft between domains
338		Val	Ala	Ser-367	between α 4 and β I:6	cleft between domains

fig. 36 : tableau comparant les acides aminés différents dans l'ADH-1 et l'ADH-2 (WILLIS et Al., 1979)

TENEUR DES DIFFÉRENTS EXTRAITS EN ALCOOL DÉSHYDROGÉNASES I ET II		
Origine de l'extrait	Alcool déshydrogénase I (%)	Alcool déshydrogénase II (%)
Glucose/air (phase exponentielle)	93	7
Glucose/air (phase stationnaire)	64	36
Glucose/azote	98	2
Ethanol	37	63
Lactate	55	45

fig. 37 : teneur des différents extraits en ADH-1 et ADH-2 suivant le milieu de culture (SHIMPFESSEL, 1968)

Cet atome de zinc intervient dans le mécanisme enzymatique. Il est lié au centre du monomère à 25 Å de profondeur par deux liaisons sulfures provenant des Cys 46 et 174 et par une liaison nitrogène de l'His 67. Une molécule d'eau ou un ion hydroxyle (en fonction du pH) termine ainsi la construction d'un tétramère autour de l'atome de zinc (fig. 34). L'eau liée à l'atome de zinc est impliquée dans un système de "pont hydrogène" avec la Thr 48 et His 51 (fig. 35) (BRANDEN et Al., 1975).

Ce zinc et ces ponts hydrogène ainsi que l'orientation très spécifique des deux substrats sont d'importance capitale dans le mécanisme cinétique de l'enzyme (BRANDEN et Al., 1975).

1.5.2.7 Spécificité de l'ADH

Le terme ADH recouvre en fait trois isoenzymes (fig. 36 et 37).

Si l'on se limite dorénavant à l'isoenzyme I, dont est composée la préparation commerciale d'ADH de levure, sa spécificité pour l'acétaldéhyde n'est pas absolue (BOWEN et Al., 1986), elle réagit également avec la butaraldéhyde.

Dans l'autre sens, qui est d'ailleurs celui qui est conventionnellement étudié, l'enzyme réagit avec l'éthanol, qui est son substrat de référence, mais également avec d'autres alcools.

L'ADH de levure semble, d'une manière générale, active sur de nombreux alcools primaires et secondaires (1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, ...) même cyclique (SUND et Al., 1963; DICKINSON et Al., 1973), toutefois l'activité diminue avec la longueur de la chaîne (fig.38) et avec la proximité d'un groupement présentant un important encombrement stérique comme un phényle (VAN EYS et Al. 1957). Par contre son activité sur le méthanol est très faible; on observe une activité relative inférieure à 1 % par rapport à l'éthanol (MANI et Al, 1970).

TABLE XVI
SUBSTRATE SPECIFICITY OF YEAST ADH; ACTIVITY WITH ALCOHOLS

Buffer:	?	Tris, 0.033 M		Pyrophosphate, 0.02 M	Glycine, 0.033 M	Phosphate, 0.05 M		Tris, 0.05 M	Pyrophosphate, 0.05 M	
pH:	8.45	8.2		8.9	8.4	7.7		9.3	9.3	
Temperature:	25°	Room temperature		25°	Room temperature	20°		?	25°	
[DPN ⁺] (M):	?	1.1 × 10 ⁻⁴		2 × 10 ⁻⁴	2.5 × 10 ⁻³	?		1.5 × 10 ⁻⁴	1.35 × 10 ⁻³	
[Alcohol] (M):	—	0.1		0.2	0.3	0.01-0.8		0.005	—	
[ADH] (M):	?	?		1.5 × 10 ⁻⁸	1.3 × 10 ⁻⁷ (?)	?		?	?	
Ref.:	(196)	(160)		(176)	(161)	(197)		(195)	(198)	
Alcohol	K _m (M)	Rate	K _m (M)	Rate	Rate	Rate	K _m (M)	Rate	K _m (M)	Rate (maximal)
Ethanol	1.3 × 10 ⁻²	100	1.4 × 10 ⁻²	100	100	?	1.6 × 10 ^{-2a}	100	2.1 × 10 ⁻³ (?)	100
CH ₃ CD ₂ OH									3.0 × 10 ⁻³	69
Methanol	5.6 × 10 ⁻²	0.2		0/3 ^b				0.8	1.3 × 10 ⁻¹	4
<i>n</i> -Propanol	1.7 × 10 ⁻²	38.1		36	44			~65		
<i>n</i> -Butanol	1.8 × 10 ⁻²	36		17.5	26	260	1.8 × 10 ⁻²	~60		
<i>n</i> -Pentanol				12.5 ^c	14	120	4.0 × 10 ⁻²			
<i>n</i> -Hexanol								~30		
<i>n</i> -Heptanol						100		~45		
<i>n</i> -Octanol				1.3 ^f				~40		
<i>n</i> -Decanol								~20		
Isopropanol	5.0 × 10 ⁻²	1.6		6.6	27	130			1.4 × 10 ⁻¹	39
<i>sec</i> -Butanol		0.4		0/1.5 ^b						
Isobutanol	2.6 × 10 ⁻²	0		0/2.5 ^b	17	8		0.4		
Isopentanol					0.2	0		0.4		
Allyl alcohol				100						
Cinnamyl alcohol		40 ^d	3.6 × 10 ⁻²							
Ethyleneglycol		0.7		3.9 ^b				0.12		
Propandiol-1,2						6				
Propandiol-1,3						8				
Butandiol-1,3						45-90				
Butandiol-1,4						6-8				
Glycerol				0.4 ^b				0.7		
Erythritol								0.2		
L-Arabitol								0.15		
Glycolic acid								1.7		
D(-)-Lactic acid								0.3		
DL-β-Hydroxybutyric acid								0.1 ^e		
2-Chloroethanol								0.8		
Aminoethanol				0				2.2		

^a At pH 7.8.
^b Concentration 0.01 M compared to the rate with 0.01 M ethanol.
^c Concentration 0.03 M compared to the rate with 0.03 M ethanol.
^d Concentration of cinnamyl alcohol 0.0033 M.
^e Tested at 0.01 M concentration.
^f Saturated concentrations compared to the rate with 0.01 M ethanol.

fig. 39 : tableau représentant l'activité de l'alcool déshydrogénase vis-à-vis de différents alcools (SUND et Al., 1963)

Changer cette spécificité vis-à-vis du méthanol permettrait notamment de produire du NADH de façon moins coûteuse qu'en utilisant de l'éthanol.

1.6 Recherche d'un fragment peptidique de l'ADH ayant conservé une activité enzymatique

Toutes les considérations précédentes sur la structure de l'ADH et de son site catalytique montrent bien à quel point la catalyse enzymatique réalisée par cette enzyme est complexe.

Le site actif de l'enzyme est très étendu et regroupe des acides aminés parfois très distants l'un de l'autre. De plus, comme on vient de l'expliquer le changement ou la déficience d'un seul de ces acides aminés pourrait bloquer la réaction.

Il semblait donc illusoire d'espérer récupérer un peptide résultant d'une hydrolyse protéasique de l'enzyme native (qui de plus est tétramérique), ayant conservé une activité enzymatique.

Et pourtant ...

Un premier travail (HAYEN, 1989) a permis de constater qu'une telle utopie était bien réalisable. En effet, après avoir effectué une lyse trypsique de l'ADH et séparé les différents fragments obtenus, il a pu observer qu'un de ces fragments possédait encore une activité catalytique.

Il était intéressant de connaître la nature de ce fragment, et sa situation dans l'enzyme native.

Les protéases telles que la trypsine ont une activité spécifique.

La trypsine ne catalyse que l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans lesquelles le groupement carboxyle est fourni soit par une lysine, soit par une arginine, quelle que soit la longueur ou la séquence en acide aminé de la chaîne (LEHNINGER, 1977).

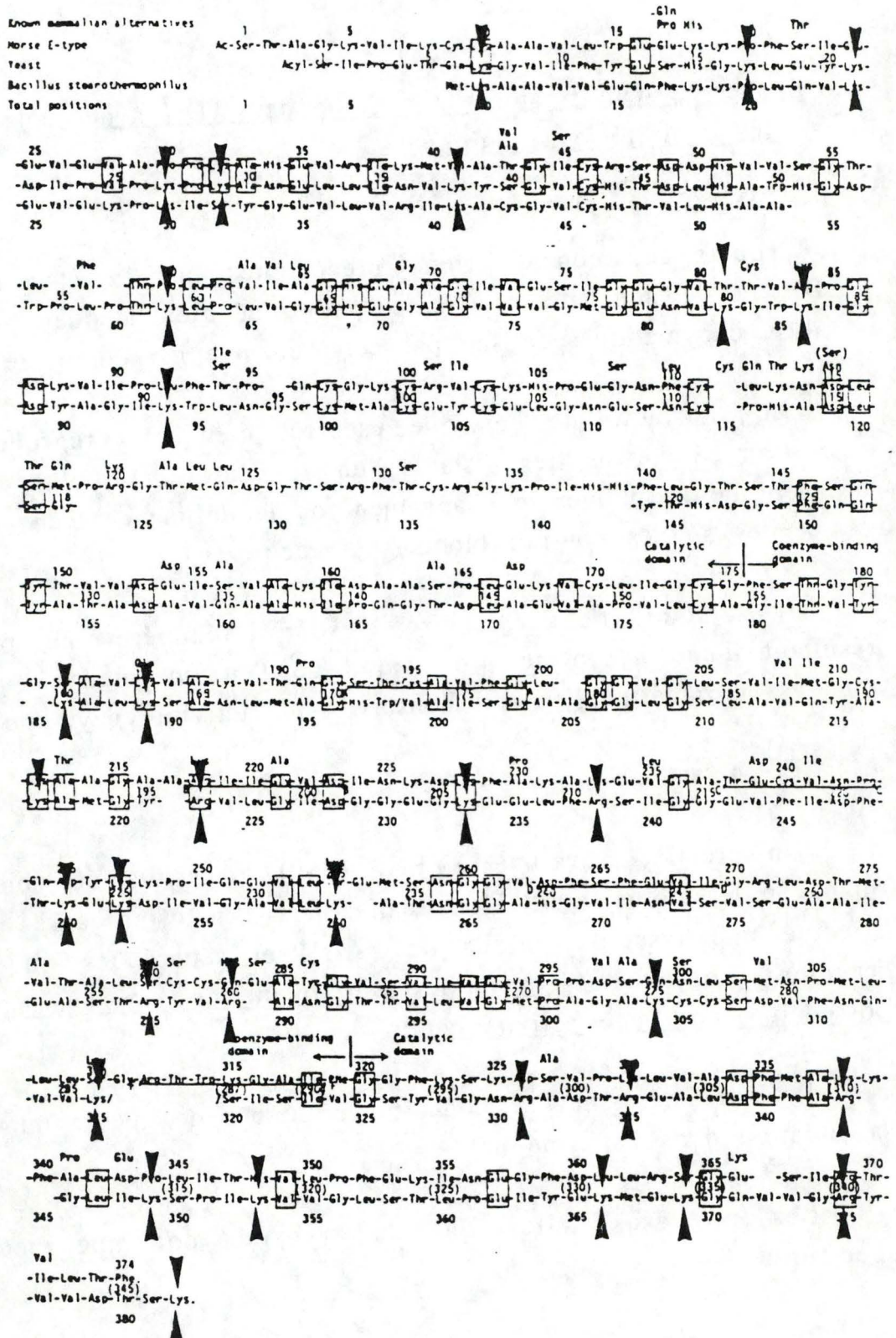


fig. 40 : site d'action (flèche) de la trypsine sur l'ADH de levure (Lys et Arg)

Connaissant la structure primaire de l'Y-ADH-1, nous pouvons estimer le nombre et la taille des peptides résultant de la lyse protéasique.

La trypsine peut couper l'ADH-1 de levure à 31 sites différents (fig. 40), ce qui devrait donner en théorie 32 fragments peptidiques. On obtiendra 30 fragments indépendants, car le zinc catalytique, par ses liaisons à la Cys 46 et 174 et à l'His 67, rassemble trois peptides.

De plus, dans l'Y-ADH-1 il n'y a qu'un seul pont disulfure entre deux cystéines qui sont situées l'une à côté de l'autre (en position 305-306)

En outre, comme nous l'avons mentionné, dans la description de l'ADH, la présence de l'atome de zinc est indispensable à l'activité catalytique.

Nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux peptides contenant cet atome.

Comme nous venons de le dire, il s'agit en réalité d'un tripeptide.

La taille totale de ce tripeptide est de 110 acides aminés. Il comprend la majorité des acides aminés importants pour la fixation du substrat éthanol, c'est-à-dire le Trp 95, Asn, 110, Thr, 120, Trp 57, il comporte également la Thr 178 qui joue un rôle important dans l'orientation du coenzyme et qui est intermédiaire aux deux domaines de fixation (fixation du substrat, fixation du coenzyme).

Au vu de ces considérations théoriques, il a été montré (HAYEN, 1989) que la présence du zinc pouvait être détectée en même temps que l'activité alcool déshydrogénase au niveau du fragment peptidique nous intéressant.

Dans le but de montrer que l'activité observée ne résultait pas d'un artefact, HAYEN (HAYEN, 1989) a réalisé une lyse d'une autre protéine ne contenant pas de zinc : l'albumine bovine sérique (SAB).

La mesure de l'activité enzymatique éventuellement présente dans ce lysat, montre une absence totale d'activité ce qui montre malgré tout une certaine spécificité du peptide isolé à partir de l'ADH.

1.7 Objectif du travail

1.7.1 Introduction

Ayant découvert ce peptide à activité catalytique, il nous restait à tenter de l'isoler, afin de le caractériser et de déterminer s'il correspondait bien au fragment peptidique attendu par la lyse trypsinique.

Ceci dans le but de diminuer la spécificité de l'enzyme (oxydation du méthanol, substrat moins coûteux, ou d'autres alcools), d'augmenter la stabilité et d'attribuer peut-être de nouvelles propriétés à cette ADH modifiée.

Ces trois étapes ont constitué le but de notre travail.

1.7.1.1 Séparation et purification du peptide

1.7.1.1.1 Introduction

Depuis une dizaine d'années, la biologie moléculaire réalise de très grand progrès, spécialement dans les domaines de l'ingénierie des protéines et des méthodes du DNA recombinant.

Certaines de ces molécules, peptides ou protéines, nécessitent un contrôle de qualité et de pureté car elles sont utilisées dans des produits thérapeutiques.

Pour tester la présence de contaminant , les techniques de séparation ont du faire un bond en avant et tenter d'abaisser au maximum les limites de détection.

1.7.1.1.2 méthode de chromatographie

La chromatographie sur tamis moléculaire est probablement la méthode la moins utilisée pour isoler les protéines et les peptides ou des protéines. cependant une des limitations de cette méthode est la difficulté de séparation de grands volumes et de mélanges complexes surtout si les poids moléculaires sont très proches, car dans ce cas les pics de séparation des protéines se superposent.

Une autre technique utilisée pour isoler une protéine ou un peptide est la chromatographie échangeuse d'ions. Pour cette technique il est important d'utiliser des conditions compatibles avec l'activité enzymatique (KENNETH, 1985). Il est également possible de connaître des informations sur le point isoélectrique de la protéine étudié (LAURENT, 1982;KENNETH, 1985).

Mais la technique de chromatographie qui est la plus utilisée pour la purification des peptides, est certainement la chromatographie en phase inverse. Cette méthode permet de séparer divers constituants en jouant sur leur propriétés hydrophile-hydrophobe, c'es-à-dire sur des propriétés propres à chaque peptide ou chaque protéine. Ce type de chromatographie peut de ce fait, selon les solvants et le gradient employés, permettre d'isoler des peptides différant par un seul acide aminé (MANT, 1987; BURCHE, 1988). Le type de support le plus utilisé est un ligand C 8 ou C 18 (KENNETH, 1985).

Un désavantage de cette méthode est son incompatibilité avec la purification des enzymes. La plupart des enzymes ne sont en effet pas compatibles avec les conditions générales d'utilisation de cette chromatographie. Il est nécessaire d'utiliser des solvants organiques inactivent l'enzyme.

Parmi les méthodes d'analyses modernes, l'HPLC présente un intérêt tout particulier, elle complète aujourd'hui de façon idéale les techniques chromatographiques plus anciennes : chromatographie sur colonne classique, chromatographie sur couche mince, chromatographie gazeuse. En effet sous de fortes pressions, il est possible de chromatographier des protéines avec un haut pouvoir de résolution et une très grande vitesse de séparation. Après des débuts laborieux, cette technique connaît un réel essor dans le domaine peptidique;

Le grand avantage de cette méthode de chromatographie sur colonne est la possibilité d'analyser de très faible quantité de produits, en couplant au système, à la sortie de la colonne de chromatographie un détecteur ultraviolet ou à fluorescence (KENNETH, 1985).

1.7.1.1.3 Synthèse générale sur les techniques

Purifier totalement un peptide bien précis n'est pas chose aisée comme on vient de le voir. L'amélioration de la purification et des techniques d'analyse des peptides a toujours constitué un des objectifs majeurs, si pas l'objectif principal, des firmes commerciales spécialisées en techniques de purification. Actuellement des techniques de plus en plus performantes sont développées : électrophorèse en microcapillaire, FPLC, nouvelles colonnes.

La technique d'HPLC était une des méthodes les plus rapides et les plus performantes pour la purification et l'analyse des peptides, nous l'avons essentiellement utilisée.

Nous nous sommes tournés vers la colonne Superose 12, tamis moléculaire qui des limites d'exclusion comprise entre 1 000 et 300 000. Ces conditions tamis moléculaire permettent de préserver une activité enzymatique en effet nous ne possédons aucune indication sur le peptide sur sa structure et donc nous devons être

très prudents dans notre démarche, nous avons également utilisé l'HPLC en phase inverse pour les raisons évoquées ci-dessus .

1.7.2.2 Caractérisation

Ce peptide, une fois purifié, doit être caractérisé biochimiquement.

- Son activité doit être quantifiée par rapport à l'enzyme native et nous avons tenté de l'améliorer en jouant sur différents paramètres.
- Sa spécificité vis-à-vis d'autres alcools doit être étudiée et si elle existe, elle doit être quantifiée.
- L'étude de sa résistance à la dénaturation thermique sera également un paramètre important de notre travail

1.7.2.3 Détermination du fragment peptidique obtenu par lyse trypsinique

Le fragment peptidique possédant une activité ADHase contient d'après la détermination des sites d'action de la trypsine, l'atome de zinc indispensable à l'activité enzymatique. Et cet atome doit relier trois bras peptidiques.

Nous nous proposons, afin de vérifier cette hypothèse, de réduire les liaisons entre les cystéines et l'histidine des peptides et cet atome de zinc, afin de libérer dans le milieu ces trois peptides.

Nous avons choisi l'HPLC en phase inverse, pour les raisons évoquées plus haut, car cette méthode permet en effet de séparer des peptides différant par un seul acide aminé; or dans le cas de la dissociação du tripeptide présent nous sommes en présence de trois peptides plus ou moins semblables. L'éventuel relarguage de

ces peptides après l'action d'un réducteur sur le fragment peptidique pourra donc être mis en évidence par cette technique.

1.7.2 Méthodologie suivie

Pour mener à bien ce travail, nous nous proposons de

- lyser l'ADH de levure au moyen d'une protéase : la trypsine
- vérifier l'action hydrolytique de la trypsine par analyse en chromatographie HPLC en phase inverse
- séparer les peptides obtenus par tamis moléculaire (Superose 12)
- tester et comparer les peptides obtenus après lyse quant à
 - leur activité ADH
 - leur concentration en protéines
 - leur contenu en zinc (absorption atomique)
- caractériser les peptides obtenus quant à
 - leur stabilité thermique
 - leur spécificité
- tenter d'améliorer l'activité obtenue
- montrer l'association de plusieurs peptides formant le site catalytique

II MATERIEL ET METHODES

2.1 MATERIEL

2.1.1 REACTIFS DIVERS

Tous les réactifs (tampons, sels, solvants, ...) sont de pureté analytique et proviennent de la firme MERCK (Darmstad, R.F.A.) ou de la firme JANSSEN Chimica (Beerse, Belgique). Tous ont été utilisés sans purification préalable.

2.1.2 CONSTITUANTS DES GELS

Pour les polymérisations, l'acrylamide, le méthylène N,N'-bisacrylamide et le tétraméthyl éthylène diamine (TEMED) proviennent de la firme JANSSEN Chimica (Beerse, Belgique) tandis que le persulfate d'ammonium a été obtenu auprès de la firme MERCK (Darmstad, R.F.A.).

Le tétraméthyl éthylène diamine et le persulfate d'ammonium ont été utilisés sans purification préalable, tandis que l'acrylamide, le méthyl N, N' bisacrylamide ont été recristallisés de la manière suivante :

- Pour l'acrylamide, 87,5 gr sont dissous dans 1 250 ml de chloroforme et portés à 55° C. La solution ainsi obtenue est filtrée à chaud avant d'être refroidie à 4° C pendant une nuit. Les cristaux recueillis par filtration sont rincés par du chloroforme froid (4° C) et sont séchés à l'abri de la lumière.

- Pour le méthyl N, N' bisacrylamide la procédure est analogue : 12,5 gr sont dissous dans 1 250 ml d'acétone à 50° C, ensuite la solution obtenue est filtrée à chaud. Après cristallisation

à 4° C, les cristaux sont recueillis par filtration et lavés par de l'acétone froid (4° C) avant d'être séchés à l'abri de la lumière.

2.1.3 Réactifs biologiques

L'alcool déshydrogénase de levure a été obtenue auprès de la firme BIOZYME (South Wales, Grande-Bretagne).

Le nicotinamide adénine dinucléotide (oxydée) dit NAD⁺ a été obtenu auprès de SIGMA Chemical Company (St. Louis, U.S.A.).

2.2 **METHODE**

2.2.1 Dosage spectrométrique

2.2.1.1 Matériels

Tous les dosages spectrophotométriques sont réalisés sur un spectrophotomètre UVIKON 810 de marque KONTRON (Suisse). Le spectrophotomètre est relié à un ordinateur REDSTONE (Taïwan). L'écran de visualisation et le clavier sont de marque PHILIPS (Hollande) (système monitor 80), l'imprimante est une EPSON HI 80.

2.2.1.2 Dosage de l'ADH

2.2.1.2.1 Principe

L'ADH réduit le NAD⁺ en NADH. On peut suivre la réduction de ce composé directement au spectrophotomètre réglé à 340 nm.

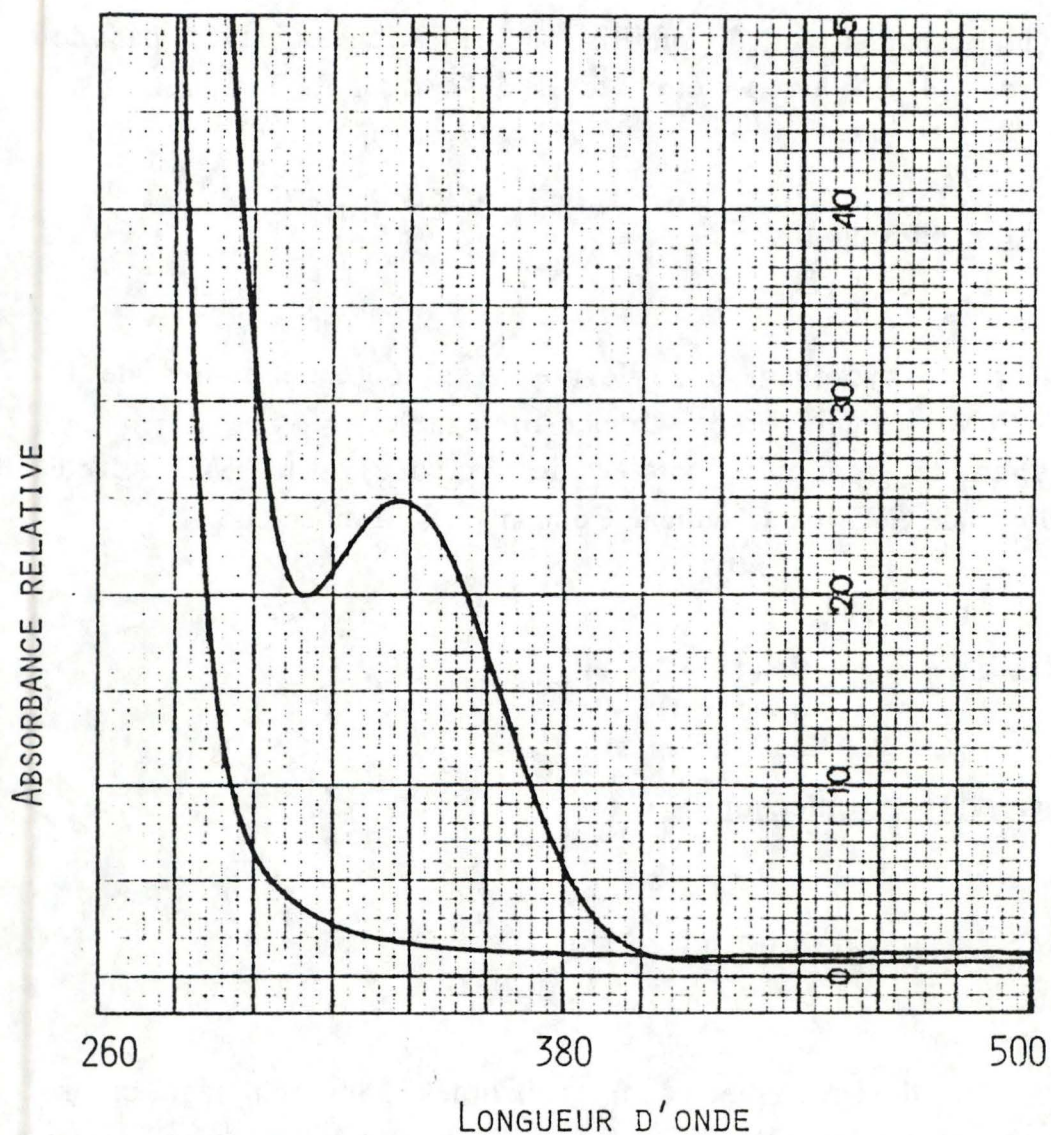


fig. 41 : spectres comparés du b-NAD⁺ et du b-NADH. Ces enregistrements ont été réalisés au moyen d'un spectrophotomètre UVIKON 810 (KONTRON), avec un balayage de 100 nm/min et un enregistrement de 20 nm/cm. La lecture se fait contre un blanc d'eau bidistillée.

Le graphe de la fig. 41 montre la différence d'absorbance entre le NAD^+ et le NADH .

2.2.1.2.2 Réactifs

- tampon pyrophosphate	0,06 M	pH 8,5
- éthanol	6 M	
- NAD^+	0,05 M	
- fraction à doser		

2.2.1.2.3 Mode opératoire

- Placer dans deux cuvettes
 - 2,7 ml de tampon pyrophosphate
 - 0,1 ml d'éthanol
 - 0,1 ml d'enzyme dilué
- Placer 0,1 ml d'eau dans la cuvette de référence.
- Placer 0,1 ml de NAD^+ dans l'autre cuvette.
- Introduire les deux cuvettes dans le spectrophotomètre dont la longueur d'onde est réglée à 340 nm.
- Mesurer la variation d'absorbance pendant un intervalle de temps d'au moins 40 secondes.

N.B. Cette variation d'absorbance doit toujours être inférieure à 1. L'activité peut être calculée par la formule

$$\text{Activité (U/ml)} = \frac{\Delta \text{ d'absorbance} \times \text{dil. échantillon} \times \text{dil. totale}}{\epsilon_{\text{NAD}^+} 340 \text{ nm}}$$

Avec ϵ pour le NAD^+ à 340 nm qui vaut $6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{moles}$.

2.21.3 Dosage des protéines

2.2.1.3.1 Principe

Les protéines sont dosées selon la méthode proposée par LOWRY et Al. (1953).

Les protéines dénaturées par l'hydroxyde de sodium ont leur structure native détruite et présentent tous leurs groupements aux réactifs.

La coloration est due d'une part à la formation d'un complexe entre le cuivre et les liaisons peptidiques et d'autre part à la réduction du complexe phosphomolybdique en complexe phosphomolybdeux (couleur bleue) par les groupements tyrosine et tryptophane de la protéine.

2.2.1.3.2 Réactifs

- NaOH 1N
- mixture alcaline (préparée juste avant l'emploi)

Na ₂ CO ₃	100 ml	0,19 M
CuSO ₄ .5H ₂ O	1 ml	0,04 M
NaKC ₄ H ₄ O ₆ .1H ₂ O	1 ml	0,07 M
- réactif de Folin : solution stock diluée deux fois
- blanc 0,5 ml d'eau
- étalon 0,5 ml de SAB 0,2 mg/ml
- fraction à doser 0,5 ml solution enzymatique

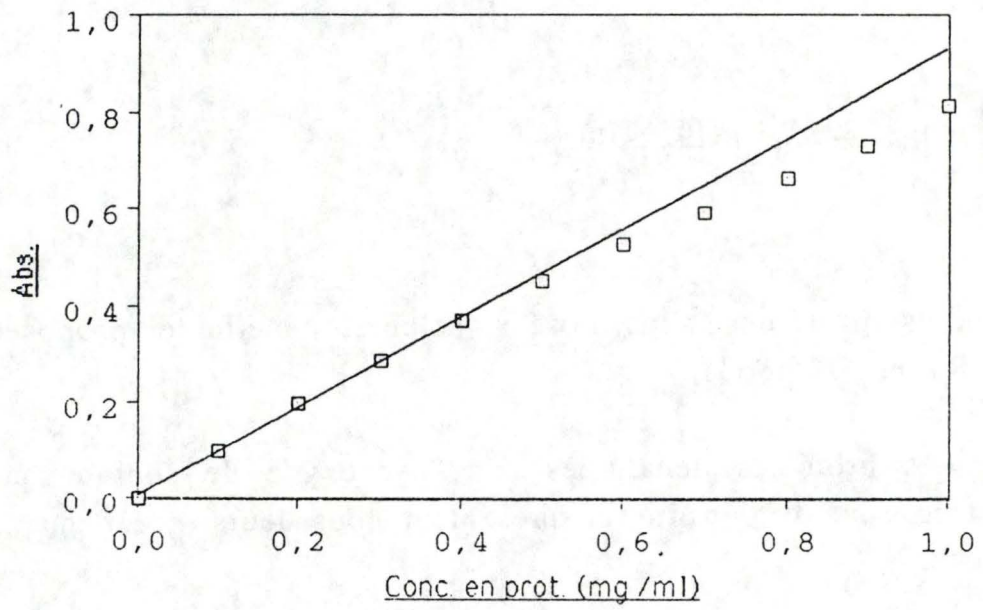


fig. 42 : droite d'étalonnage du dosage des protéines.

C) Mode opératoire

- Prélever 0,5 ml des fractions à doser
- Ajouter 0,5 ml de NaOH 1N.
- Laisser agir à température ambiante pendant 30'
- Ajouter 5 ml de mixture alcaline
- Après 15', ajouter de minute en minute 0,5 ml de réactif de Folin
- Après 30', lire de minute en minute l'absorbance au spectrophotomètre réglé à 540 nm

N.B. Vérifier que les absorbances se situent dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage (cf fig. 42) sinon diluer l'échantillon.

2.2.2 Lyse protéinique

2.2.2.1 Etape de la lyse

2.2.2.1.1. Matériels

- bain chauffant de marque KTM (Allemagne)
- 1,9 ml de solution phosphate 0,01 M pH 7,5 et d'urée 4 M
- 50 mg d'ADH
- 0,1 ml de solution trypsinique à 5 mg / ml

2.2.2.1.2 Mode opératoire

- placer 50 mg d'ADH dans une éprouvette
- déposer 1,9 ml de solution phosphate urée
- ajouter 0,1 ml de solution trypsinique
- placer le temps nécessaire pour la lyse dans le bain soit à 37° C, soit à 20° C

2.2.2.2 Vérification de la lyse de l'ADH par HPLC à colonne à phase inverse

2.2.2.2.1 Matériels

L'HPLC est un appareil H 82 C système 600 de marque KONTRON (Suisse). Le détecteur est un UVIKON 220 (KONTRON). L'intégrateur-enregistreur est un ANACOMP 220 (KONTRON). La colonne est une R-Sil-C-18, HL (25 x 0,4 cm) de marque ALLTECH (n° est C-8020, PIT 47 554-1).

2.2.2.2.2 Méthode

Solvant A : H₂O, TFA 0,05 %

Solvant B : H₂O, acétonitrile, TFA (20, 80, 0,05).

Les solvants A et B ont été dégazés.

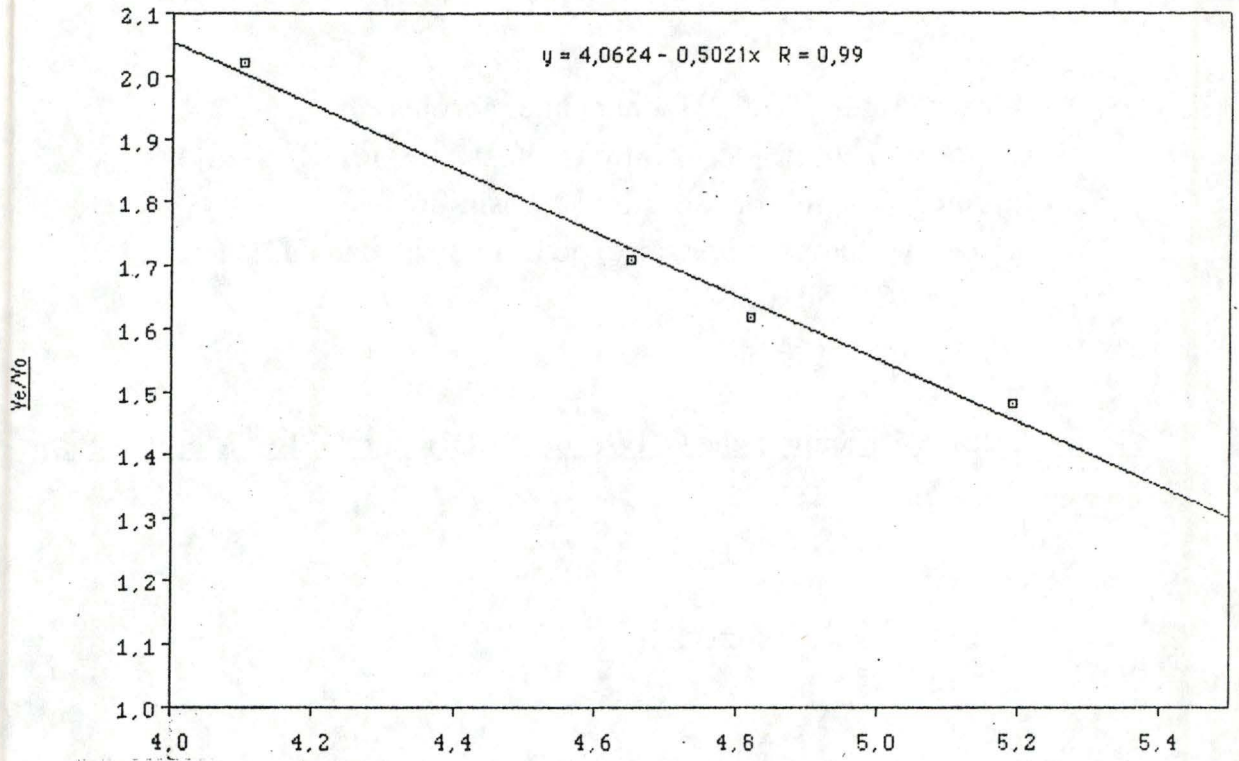
Flux : 1 ml / min

Gradient : 0 à 100 % de B en 100 minutes.

Détecteur UV : 220 nm.

Volume d'injection : 100 µl.

Les échantillons ont été centrifugés au moyen d'une centrifugeuse JANETSKY pendant 10 minutes avant l'injection.



Log PM

Proteines	V_e/V_o	Log PM
IgG	1,48	5,19
SAB	1,62	4,82
OY	1,71	4,65
CC	2,02	4,1

V_o 7,27ml

fig. 43 : étalonnage de la colonne HPLC Superose 12.

2.2.2.3 Séparation des peptides obtenus après lyse de l'ADH (tamis moléculaire superose 12).

2.2.2.3.1 Matériel

L'HPLC est un appareil HPLC 420 de marque KONTRON (Suisse). L'intégrateur-enregistreur est un ANACOMP 820 de marque KONTRON (Suisse). Le détecteur UV est un détecteur UVIKON 735 LC (KONTRON).

2.2.2.3.2 Méthode

Colonne : Superose 12. (La droite d'étalonnage est représentée à la fig. 43)

Solvant : tampon phosphate 0,05 M pH 7,5 NaCl 0,09 %
ou

tampon phosphate 0,01 M pH 7,5

Flux : 0,5 ml / min.

Durée : 60 minutes.

Détecteur UV : 280 nm.

Volume d'injection : 100 μ l.

Les échantillons sont centrifugés au moyen de la centrifugeuse JANETSKY pendant 10 minutes avant l'injection.

2.2.2.4 "Etapes" de dosage

2.2.2.4.1 Dosage de l'activité

2.2.2.4.1.1. Matériel

Ajouter dans chaque tube contenant chacun 0,5 ml d'échantillon 1 ml de solution composée de :

tampon pyrophosphate 0,06 M pH 8,5	18,75	ml
eau distillée	81,25	ml
éthanol 6 M	5	ml
NAD ⁺	165	mg

Blanc : 0,5 ml de tampon d'élution.

2.2.2.4.1.2 Mode opératoire

- Ajouter 1 ml de solution dans chaque tube.
- Laisser agir le temps nécessaire soit à 37° C, soit à température ambiante (voir paragraphe 3.3.3 et 3.4).
- Lire l'absorbance de tous les tubes à 340 nm.

2.2.2.4.2 Dosage des protéines

2.2.2.4.2.1 Dosage des protéines selon la méthode de LOWRY et Al (1953).

On utilise la méthode de LOWRY et Al (1953) pour doser les protéines après passage sur HPLC tamis moléculaire (Superose 12).

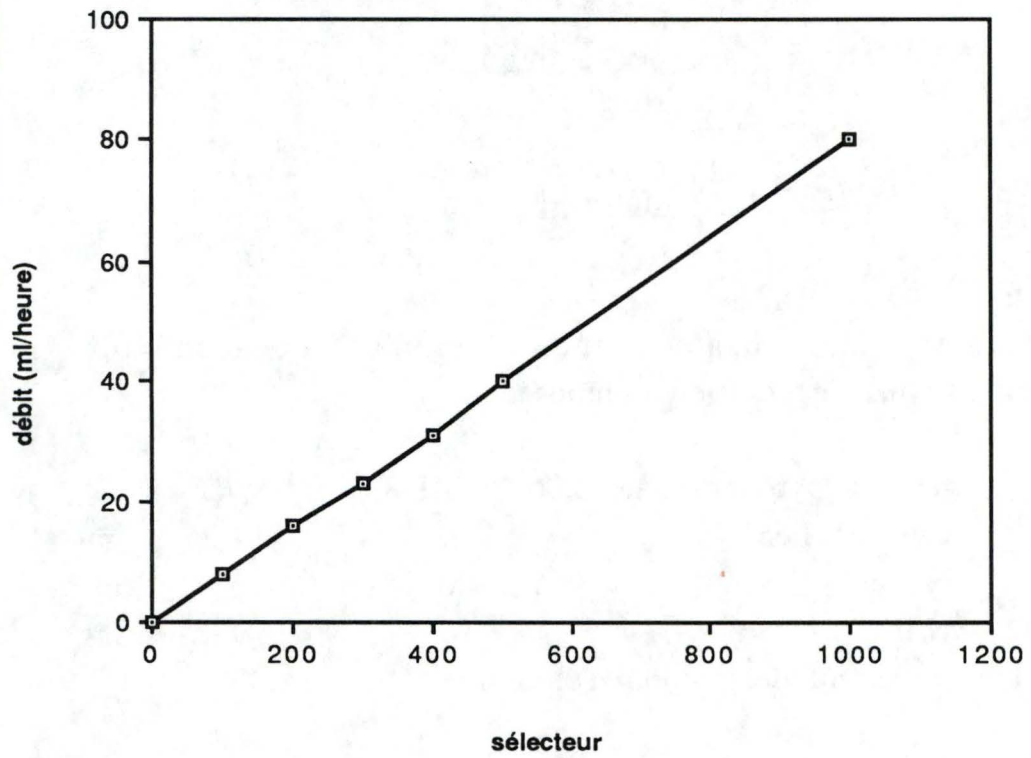


fig. 44 : relation entre la vitesse de la pompe GILSON utilisée pour la colonne Séphadex G 10 et le débit.

Cette méthode a déjà été décrite précédemment au paragraphe 2.2.1.3.

2.2.2.4.3 Dosage du zinc

La présence du Zinc a été mesurée par détecteur à ionisation de flamme.

L'appareil est un PHILIPS XU 9200 X (Hollande).

N.B. Nous avons réalisé deux passages successifs de la même lyse sur tamis moléculaire (Superose 12) afin de récolter du matériel en quantité suffisante pour réaliser toutes les analyses prévues.

2.2.2.5 Chromatographie Séphadex G 10

2.2.2.5.1 Principe

La chromatographie Séphadex G 10 est une chromatographie tamis moléculaire permettant de séparer des molécules de poids moléculaire compris entre 0 et 1 000 daltons

2.2.2.5.2 Matériel

Le gel de la chromatographie Séphadex G 10 a été obtenu auprès de la firme PHARMACIA (Uppsala, Suède).

La pompe est de marque GILSON (France) (la droite d'étalonnage est représenté à la fig. 44).

Le détecteur est de marque UVICOR Ds II, 2 238 LKB Suède.

L'enregistreur est un BIOCAL 2 065 Chapper Bar Recorder de marque LKB (Suède)

Le collecteur TDC 220 A de marque GILSON (France).

2.2.2.5.3 Fabrication de la colonne

La colonne utilisée est caractérisée par les dimensions suivantes : diamètre 0,9 cm et longueur 85 cm

- faire gonfler le gel dans l'eau bidistillée durant une nuit
- verser le gel dans la colonne préparée (ouate-bille de verre)
- laisser tasser six heures
- rincer avec du tampon Phosphate 10 mM pendant 24 heures

2.2.2.5.4 Chromatographie

- Raccorder la colonne au différents appareils de détection
- Dépôt : 0,3 ml de lyse trypsinique
- Débit 20 ml/heure (cf fig. 44)
- Collecteur 1,5 minute par tube

2.2.2.6 Révélation des peptides

2.2.2.6.1 Isolement des peptides sur gel de polyacrylamide et révélation de l'activité ADH

2.2.2.6.1.1. Préparation des gels d'électrophorèse

Les gels (au nombre de 9) sont préparés en mélangeant rapidement les éléments suivants :

- 10 ml de solution acrylamide 30 % et méthylène N,N'-bisacrylamide 0,8 %.
- 7 ml tampon tris 0,1 M pH 8,9.
- 17 ml eau bidistillée.
- 100 µl TEMED.
- 1 ml solution persulfate d'ammonium à 1 %.

N.B. Avant d'ajouter le TEMED et la solution de persulfate d'ammonium, il faut dégazer la solution afin d'éviter toute bulle d'air.

Cette solution est coulée dans des tubes d'électrophorèse jusqu'à à environ 2 cm du sommet, avant d'être recouverte délicatement par 0,5 cm d'eau bidistillée. On laisse polymériser 3 heures.

2.2.2.6.1.2 Electrophorèse

Losque le gel est polymérisé, on enlève l'eau bidistillée le surmontant, on dépose alors 40 µl d'une solution enzymatique préparée dans du Tris 0,1 M pH 8,9, diluée deux fois dans du sucrose 50 %, à la surface du gel.

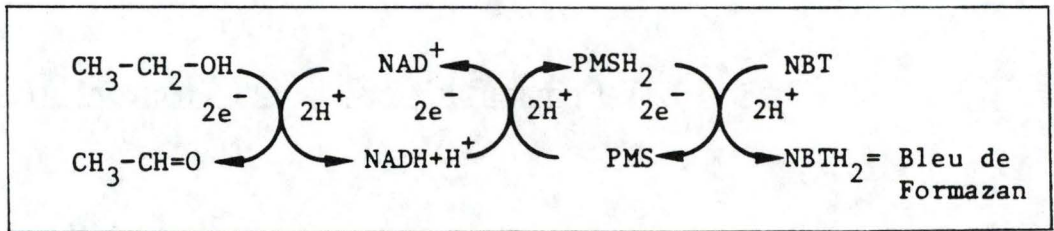


fig. 45. réaction de coloration spécifique des gels pour déceler l'activité ADH. La coloration est obtenue par une suite de réactions d'oxydation couplées.

On complète le tube avec du tampon 0,02 M pH 8,9 en évitant tout mélange avec l'échantillon.

Après avoir immergé les tubes de gel avec ce même tampon, on réalise l'électrophorèse pendant 1 H 30 sous un courant de 8mA par tube et un circuit de refroidissement autour de la cuve d'électrophorèse est enclenché à ce moment.

2.2.2.6.1.3 Démoulage des gels

Les gels sont démoulés en injectant au moyen d'une seringue une solution d'extran à 4 % entre la paroi du tube et le gel.

Ensuite rincer abondamment le gel à l'eau bidistillée pour éliminer totalement l'extran qui pourrait dénaturer les protéines.

2.2.2.6.1.4 Révélation de l'activité de l'ADH

On incube les gels 1 heure à température ambiante dans une solution de révélation préparée extemporanément et constituée de

- Bleu de nitrotétrazolium (NBT)	0,042 %	50,4	mg
- Phénazine méthosulfate (PMS)	0,0034 %	4,08	mg
- NAD ⁺	1,25 mM	108	mg
- Ethanol absolu	25 mM	0,16	ml

dans une solution tampon Tris-HCl 0,02 M pH 8,9. On porte le volume à 120 ml.

On laisse révéler les gels à l'abri de la lumière pendant une heure.

Le mécanisme de la réaction de coloration est représenté à la fig. 45.

2.2.2.7 Dissociation des peptides

2.2.2.7.1 Principe

Nous avons utilisé différents agents pouvant déplacer le complexe peptide-zinc

2.2.2.7.2 Matériel

Le dithiothréitol (DTT) a été obtenu auprès de la firme Sigma (St. Louis, U.S.A.), tandis que l'acide trifluoroacétique (TFA) a été obtenu auprès de la firme JANSSEN CHIMICA (Beerse, Belgique).

2.2.2.7.3 Méthode

- Ajouter à 0,5 ml d'échantillon contenant le peptide

soit

- 1 ml d'une solution de DTT 0,1 M
- laisser incubé pendant 2 heures
- injecter 100 μ l sur HPLC superose 12
- tampon d'élution :
tampon phosphate 0,05 M pH 7,5 NaCl 0,9 %

soit

- 0,4 ml d'une solution TFA 0,5 %
- laisser incubé pendant 12 heures
- injecter 100 μ l sur HPLC superose 12
- tampon d'élution :
tampon phosphate 0,05 M pH 7,5 NaCl 0,9 %

ou

tampon TFA 0,1 %

III RESULTATS

3.1 Introduction

Nous nous proposons dans un premier temps de décrire les différentes étapes de la lyse protéasique de l'ADH et de vérifier l'activité enzymatique dans les fragments peptidiques obtenus.

Ensuite, nous développerons la caractérisation biochimique du peptide, et les améliorations apportées en vue d'une augmentation de son rendement quantitatif et qualitatif.

Et enfin, nous parlerons des électrophorèses effectuées sur ce peptide et des essais réalisés pour dissocier les trois peptides liés au zinc.

3.2 Etape de la lyse

Nous avons réalisé la lyse protéinique de l'ADH de levure par la trypsine selon le mode opératoire détaillé au paragraphe 2.2.2.1.

3.2.1 Vérification de la lyse par HPLC en phase inverse

3.2.1.1 Introduction

Pour savoir si la lyse protéasique avait bien eu lieu, nous avons réalisé une chromatographie sur une colonne C 18 en phase inverse en HPLC (voir paragraphe 2.2.2.2).

Nous avons utilisé cette méthode car nous pouvions séparer des peptides même s'ils sont peu différents notamment au niveau de la

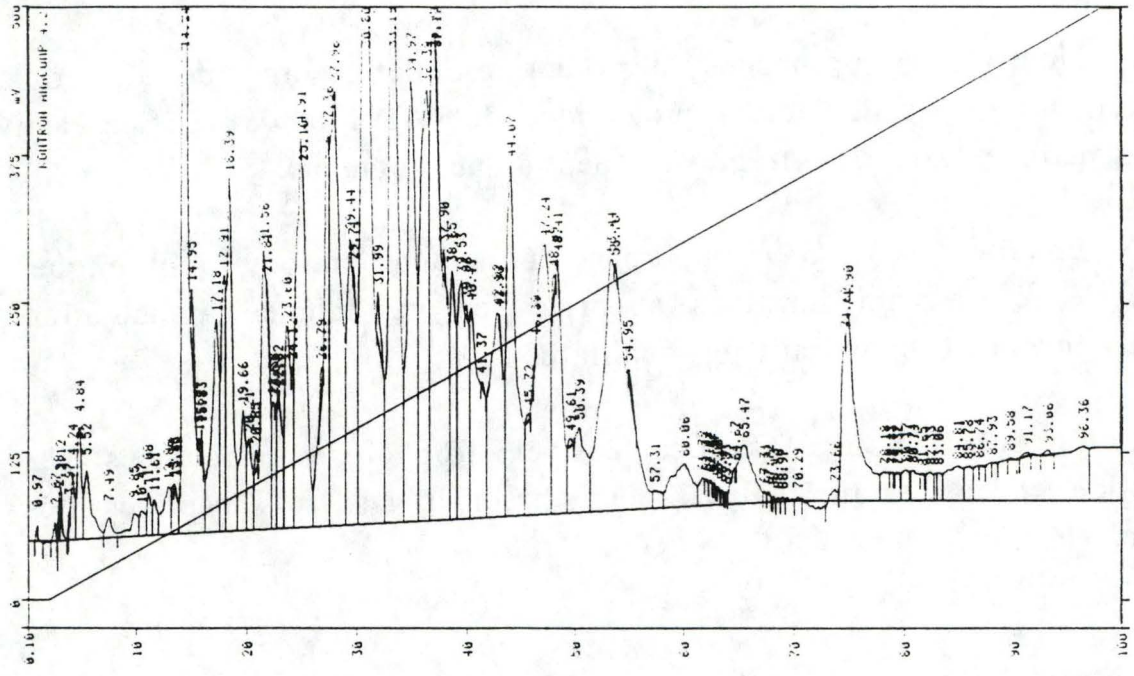


fig. 46 : chromatographie HPLC phase inverse C 18 après lyse trypsinique durant 24 heures

taille (MANT, 1987) . Par cette méthode nous pouvions aussi vérifier si le nombre de peptides obtenus correspondait bien à ce qu'on attendait d'après une lyse trypsinique "théorique"

Ce chromatogramme ne pourra cependant nous donner qu'une idée qualitative très générale de la lyse trypsinique.

3.2.1.2 Analyse du chromatogramme

Nous pouvons constater la présence de nombreux pics sur le chromatogramme présenté à la fig. 46.

Notons que les pics situés avant 5 minutes correspondent aux pics d'injection et au pic de solvant présent dans l'échantillon, et que les petits pics situés au-delà de 60 minutes correspondent à l'effet du gradient).

Si nous calculons le nombre de pics retenus par l'ordinateur, ayant une surface d'intégration supérieur à 0,5 % de la surface totale, nous obtenons 30 pics. Ces constatations penchent en faveur des prédictions réalisées ci-dessus.

3.2.1.3 Conclusion

La lyse peptidique a bien eu lieu et semble suivre le principe de haute spécificité proposé par LEHNINGER (LEHNINGER, 1977). Mais parmi ce grand nombre de peptides en existe-il un possédant toujours une activité catalytique ?

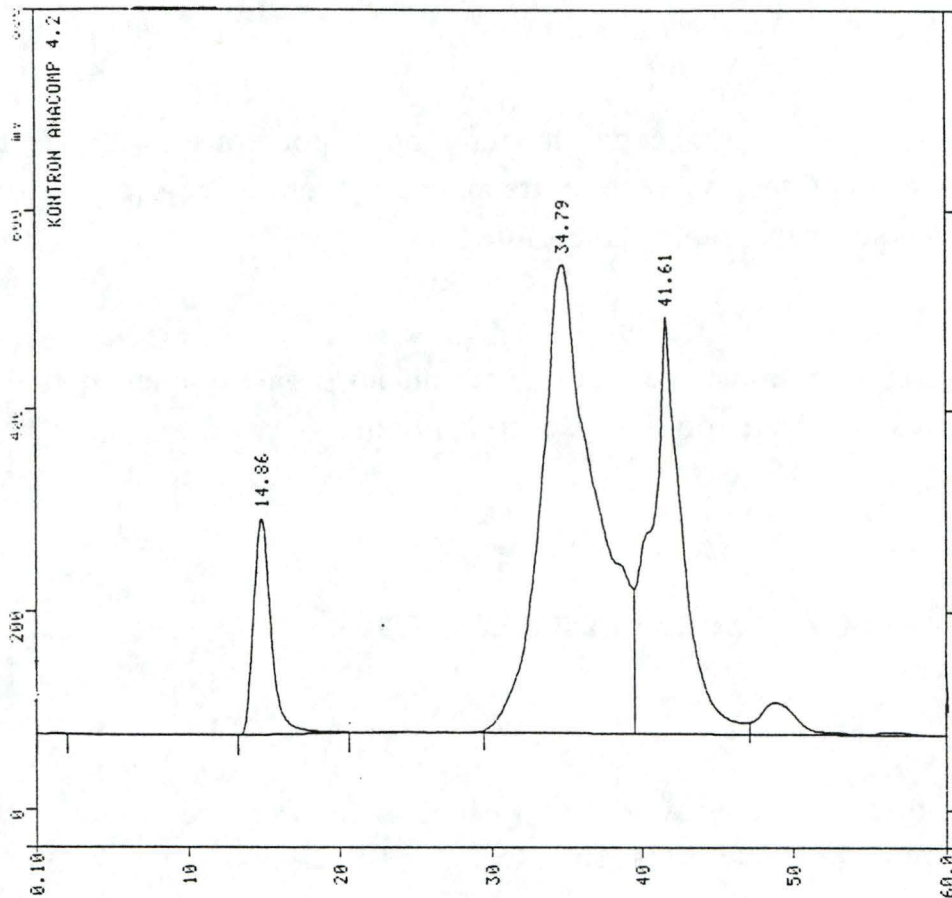


fig. 47 : chromatogramme HPLC sur une colonne Superose 12 en tamis moléculaire après lyse trypsinique durant 24 heures à 37° C.

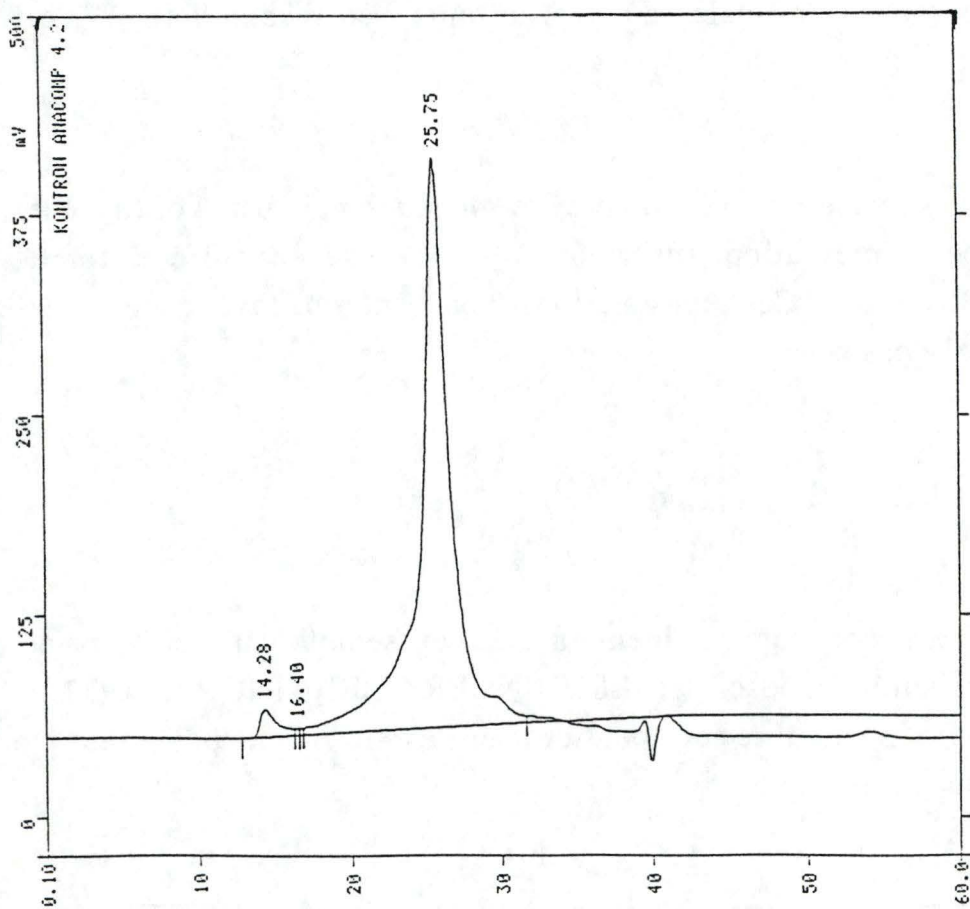


fig.48 : chromatogramme HPLC sur Superose 12 en tamis moléculaire, de l'ADH native

3.2.3 Analyse des résultats par chromatographie HPLC tamis moléculaire

Nous avons voulu vérifier si le peptide lié au zinc catalytique possédait encore une activité intrinsèque; pour cela, nous avons déposé 100 μ l de lyse trypsine à 37° C sur une colonne tamis moléculaire (Superose 12).

Cela nous permettait une séparation des peptides obtenus dans des conditions non dénaturantes. Nous pouvions donc à ce moment détecter la présence d'une activité enzymatique dans ces peptides partiellement purifiés.

3.2.3.1 Chromatogramme de l'HPLC (fig. 47)

Le tampon d'élution utilisé est un tampon phosphate 50 mM NaCl 0,9 % pH 7,5.

L'analyse du chromatogramme révèle la présence de quatre pics principaux. L'injection de différents contrôles a permis de déterminer la nature de ces différents constituants.

Le pic s'éluant après 14 minutes contient un contaminant, non digéré par la trypsine.

Les peptides obtenus après digestion s'éluent entre 33 minutes et 47 minutes.

Nous ne retrouvons pas la présence de l'ADH native qui s'élué normalement à la 24ème minute (fig. 48).

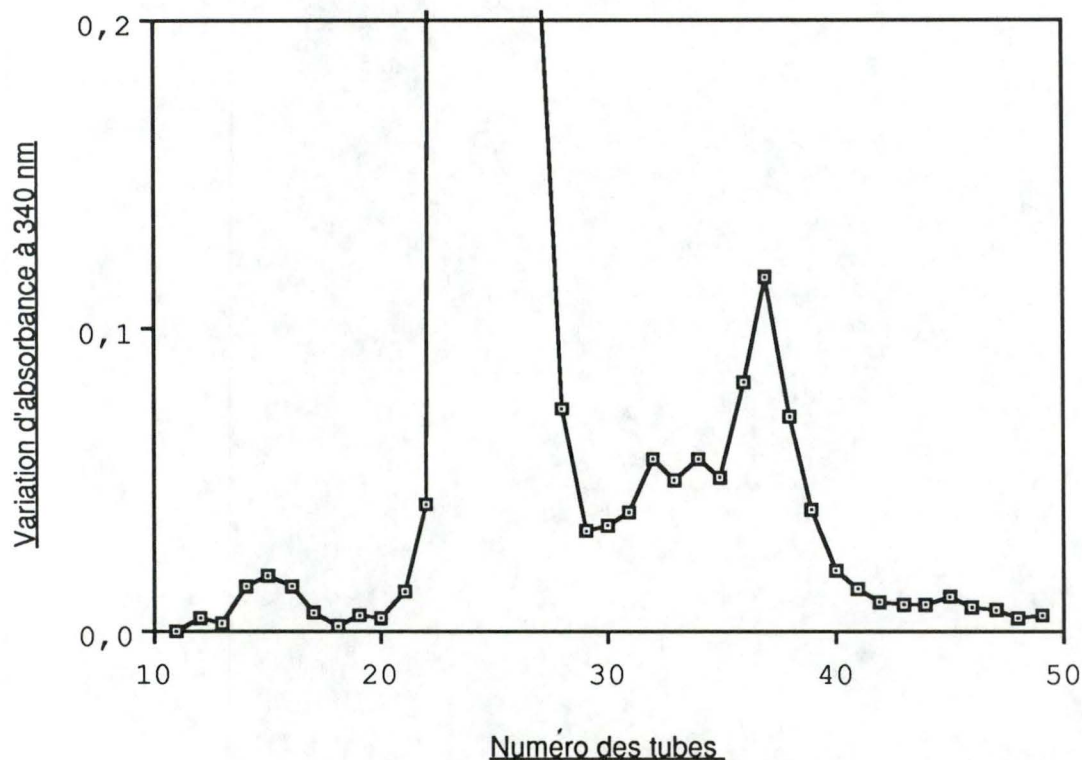


fig. 49: dosage de l'activité du "peptide " (variation d'absorbance à 340 nm) lecture après 15 heures d'incubation à 20° C.

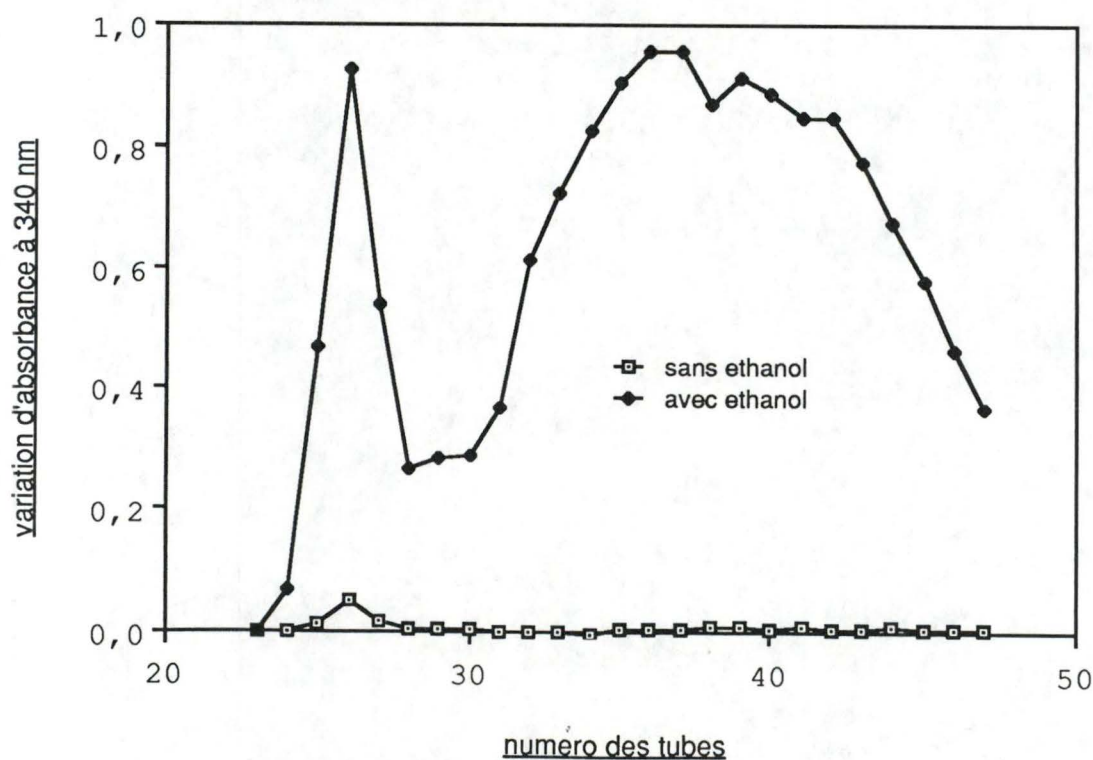


fig. 50 : dosage de l'activité en présence ou non d'éthanol (variation d'absorbance à 340 nm, après passage sur HPIC Superose 12 en tamis moléculaire. Lecture après 24 heures d'incubation à 20° C.

3.2.3.2 dosage d'une activité alcool déshydrogénase (fig. 49)

Le dosage de l'activité enzymatique réalisé sur chacun des tubes récoltés après Superose 12 (voir paragraphe 2.2.2.3) permet de constater une activité alcool deshydrogenase très importante entre les tubes 23 et 28. Celle-ci correspond à la présence de traces d'ADH non digérée.

Le pic d'activité détecté entre les tubes 35 et 39 avec un maximum au tube 37 révèle la présence possible d'un peptide ayant gardé une activité enzymatique

3.2.3.3 Conclusion

Nous observons bien une activité catalytique entre le tube 35 et 39 (avec un maximum au tube 37), mais il serait intéressant avant tout de vérifier que cette activité peptidique détectée n'est pas un artéfact.

3.2.4 Vérification de l'activité alcool déshydrogénase

Pour tenter de vérifier la présence éventuelle d'un artéfact, nous avons réalisé deux injections de la lyse trypsinique sur HPLC tamis moléculaire.

Les différents fragments ainsi séparés, ont été mis en présence ou non d'un des deux substrats indispensables à la réaction : l'éthanol.

Les tubes récoltés après passage, ont ainsi été incubés pendant 24 heures à 20° C soit en présence d'une solution réactionnelle (décrite au paragraphe 2.2.2.4), soit en présence d'une solution réactionnelle contenant tous les réactifs sauf l'éthanol.(fig. 50)

3.2.4.1 Commentaire relatif au graphique (fig. 50)

En présence d'éthanol, nous pouvons constater une activité importante comprise entre les tubes 23 et 28 et qui correspond à la présence de trace d'ADH non hydrolysée. Nous constatons également une activité alcool déshydrogénase comprise entre les tubes 31 et 43, celle-ci correspond au peptide.

En absence d'éthanol, nous pouvons remarquer que l'activité est nulle entre les tubes 32 et 43. Toutefois nous observons une activité à peine détectable au tube 26.

3.2.4.2 Conclusion

Nous pouvons donc conclure au vu du graphique de la fig. 50 que l'activité observée n'est pas un artéfact, mais bien une activité alcool déshydrogénase provenant d'un peptide de poids moléculaire inférieur à l'enzyme et résultant d'une lyse trypsinique

3.3 Caractéristique biochimique du peptide

3.3.1 Introduction

Etant parvenu à isoler ce peptide possédant une activité ADH, il restait à étudier les éventuelles modifications des propriétés acquises par ce fragment peptidique (spécificité, activité face à la température milieu de réaction).

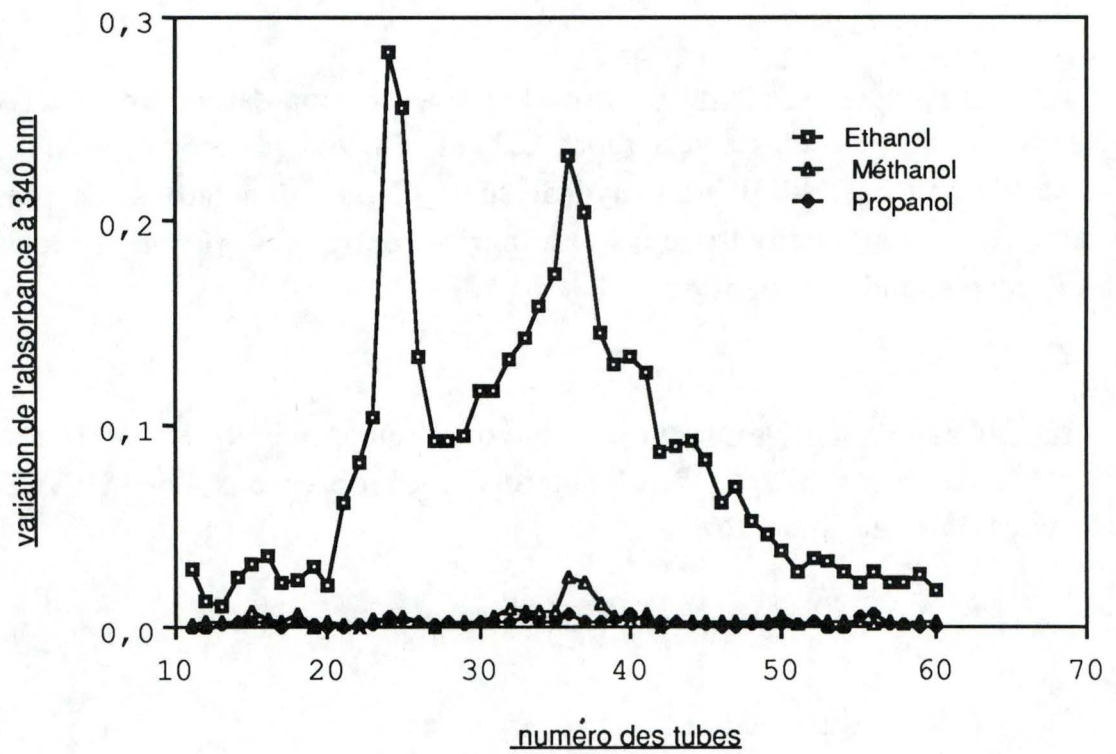


fig. 51 : diagramme représentant le comportement du peptide vis-à-vis de différents alcools

3.3.2 Etude de la spécificité du peptide

3.3.2.1 introduction

Lors de l'introduction, nous avons exprimé le souhait d'une spécificité moins importante du peptide vis-à-vis de son second substrat l'éthanol, afin de pouvoir oxyder différents alcools et spécialement le méthanol d'un coût nettement moins élevé.

Pour réaliser cette étude, nous avons effectué trois passages de la lyse trypsine sur HPLC tamis moléculaire Superose 12 et le contenu des tubes récoltés a été incubé pendant 24 heures à 20° C en présence de différents alcools : méthanol, éthanol, 1-propanol, qui sont en fait les alcools primaires les plus simples.

3.3.2.2 Analyse du graphique

Le graphique représentant les résultats d'activité obtenus, après incubation en présence de différents alcools, est présenté à la fig. 51.

En ce qui concerne l'activité du "peptide" vis-à-vis de l'éthanol, nous pouvons remarquer la présence de deux pics. Le premier compris entre les tubes 21 et 27 avec un maximum au tube 24, correspond à la présence de traces d'acool déshydrogénase non digérée par la trypsine. Le deuxième pic est situé entre les tubes 31 et 39 avec un maximum au tube 36, ce pic correspond au peptide qui nous intéresse pour ce travail (voir paragraphe 3.2.3.2).

Lorsqu'on compare l'intensité de l'absorbance, nous remarquons que l'activité correspondant à la présence d'ADH est légèrement plus importante que celle correspondant à la présence du peptide.

En ce qui concerne l'activité du "peptide" vis-à-vis du méthanol, nous pouvons remarquer une activité pratiquement nulle pour tous les tubes, cependant il existe une légère activité comprise entre les tubes 34

et 38, ce qui correspond au peptide et une activité plus faible au tube 24 correspondant à l'enzyme.

Pour le propanol, nous ne décelons aucune variation d'absorbance que ce soit pour le tube contenant les traces d'ADH ou pour les tubes contenant le peptide (SUND et Al., 1963).

Suite à ces constatations, nous avons voulu quantifié l'activité du peptide par rapport à celle de l'ADH vis-à-vis de ces différents substrats.

3.6.3 Quantification de l'activité face à différents alcools

Pour comparer l'activité de l'ADH à celle du peptide nous avons réaliser une solution d'ADH contenant $2\mu\text{g/ml}$ tandis que le peptide se trouve être en concentration d'e $0,4\text{ mgde protéine/ml}$ dans le tube 32.

Nous avons calculé la valeur de l'activité enzymatique selon la formule expliquée au paragraphe 2.2.1.2.3

Lorsqu'on applique cette formule pour connaître l'activité de l'ADH et du peptide face aux deux alcools (éthanol et méthanol), nous obtenons

	activité méthanol(U/ml)	activité éthanol(U/ml)
ADH native	10,85	299,76
peptide	2,41	20,14

Si l'on réalise le pourcentage de l'activité face au méthanol par rapport à celle obtenue face à l'éthanol nous obtenons pour l'ADH native et pour le peptide respectivement 3,62 et 12 %

3.3.2.4 Conclusion

Dans l'étude de la spécificité du peptide et de l'enzyme native, nous avons d'abord pu montrer que le peptide possédait la capacité d'oxyder différents alcools autres que l'éthanol alors que l'enzyme native ne possédait apparemment pas cette capacité.

D'après les études quantitatives, nous observons que le peptide possède une spécificité 3 fois moins élevée que l'ADH native, en ce qui concerne l'activité méthanol-éthanol.

Ces observations permettent de confirmer la première hypothèse formulée lors de l'introduction à savoir que la réduction d'une structure enzymatique pourrait diminuer la spécificité de l'enzyme pour ses substrats.

3.3.3 Etude de l'influence de la température sur le peptide

3.3.3.1 Introduction

Après ces résultats de spécificité très encourageants, nous avons voulu étudier la sensibilité du peptide face à la température, de manière à cerner les deux paramètres essentiels en modification des propriétés des enzymes.

Dans l'introduction, nous avons en effet également exprimé le souhait d'obtenir un peptide possédant une stabilité plus importante face à une augmentation de la température.

Pour réaliser cette étude, nous avons incubé les tubes récoltés après passage sur HPLC Superose 12 à différentes températures (20°, 37°, 60° et 80° C) en présence des substrats et mesuré les produits de réaction après des temps différents (1, 2, 3 et 24 heures).

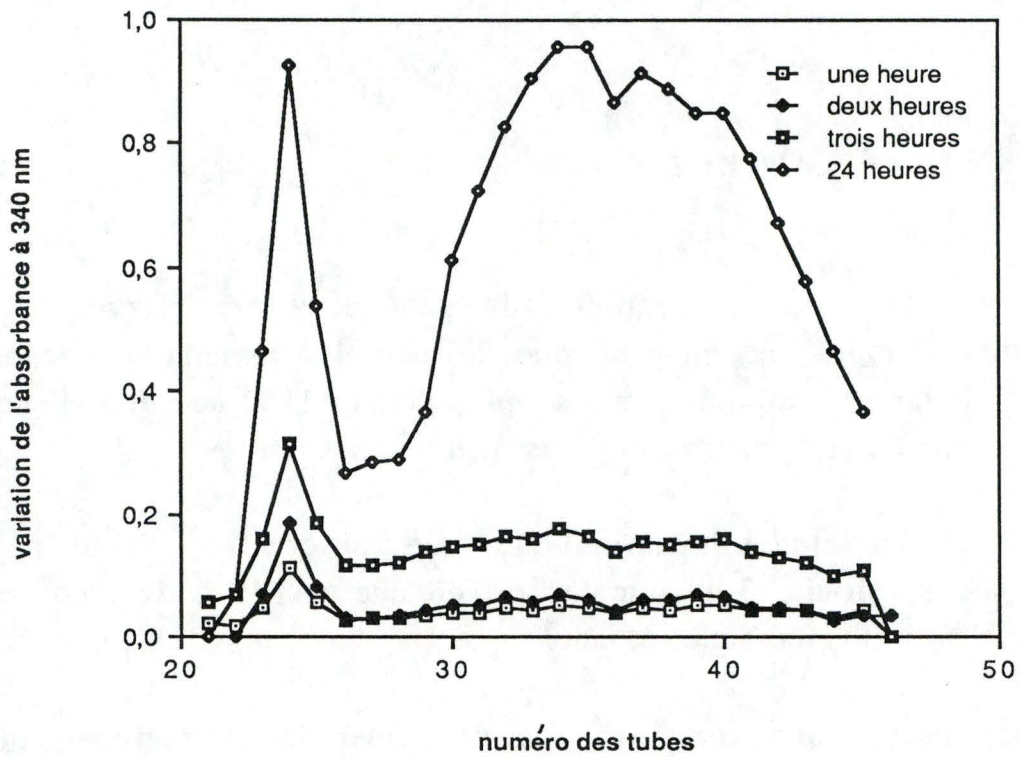


fig. 52 : évolution de l'activité au cours du temps (1-2-3-24 heures) à une température de 20° C., du contenu des différents tubes après passage sur HPLC Superose 12 en tamis moléculaire

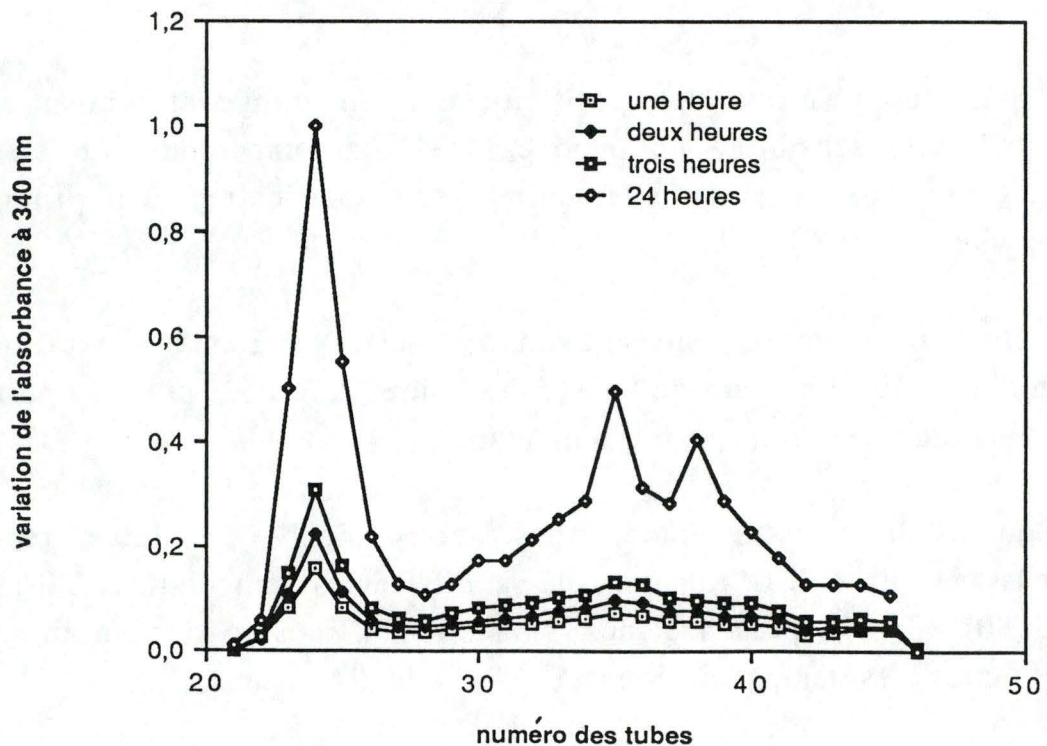


fig. 53 : évolution de l'activité au cours du temps (1-2-3-24 heures) à une température de 37° C., du contenu des différents tubes après passage sur HPLC Superose 12 en tamis moléculaire

3.3.3.2 Graphique

A 20° C (fig. 52) après 1, 2, ou 3 heures d'incubation, nous remarquons que l'activité correspondant à l'ADH se marque de plus en plus.

Par contre, c'est seulement après 3 heures que l'on commence à deviner l'activité du peptide.

Après 24 heures, il n'y a plus d'équivoque, l'activité de l'ADH est très bien marquée, ainsi que l'activité du peptide. Nous constatons que l'activité du peptide est aussi bien marquée que celle de l'ADH. Cela pourrait s'expliquer par des traces en ADH non digérée plus faible que lors des expériences précédentes

A 37° C (fig. 53), après 1, 2 ou 3 heures, nous remarquons que l'activité correspondant à l'ADH (tube 22 à 26) se marque de plus en plus au cours du temps.

Après 3 heures nous commençons à deviner l'activité du peptide (le profil de celle-ci est légèrement plus marqué que lors du graphique précédent).

Après 24 heures, l'activité de l'ADH est très bien marquée. L'activité du peptide présente est nettement moins élevée que dans le cas de la cinétique à 20° C. Cependant, nous pouvons remarquer la présence de deux pics. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'hydrolyse n'ait pas été complète et qu'il y aurait un peptide qui aurait un poids moléculaire plus conséquent que celui de l'autre fragment.

A 60° C (fig. 54) nous remarquons un très léger pic situé à l'endroit de l'ADH (tube 22 à 26). Pour le peptide nous n'observons plus d'activité que ce soit après 1, 2, 3, ou 24 heures.

A 80° C. (fig. 55) nous n'observons plus d'activité que ce soit à l'endroit du peptide ou à l'endroit de l'ADH.

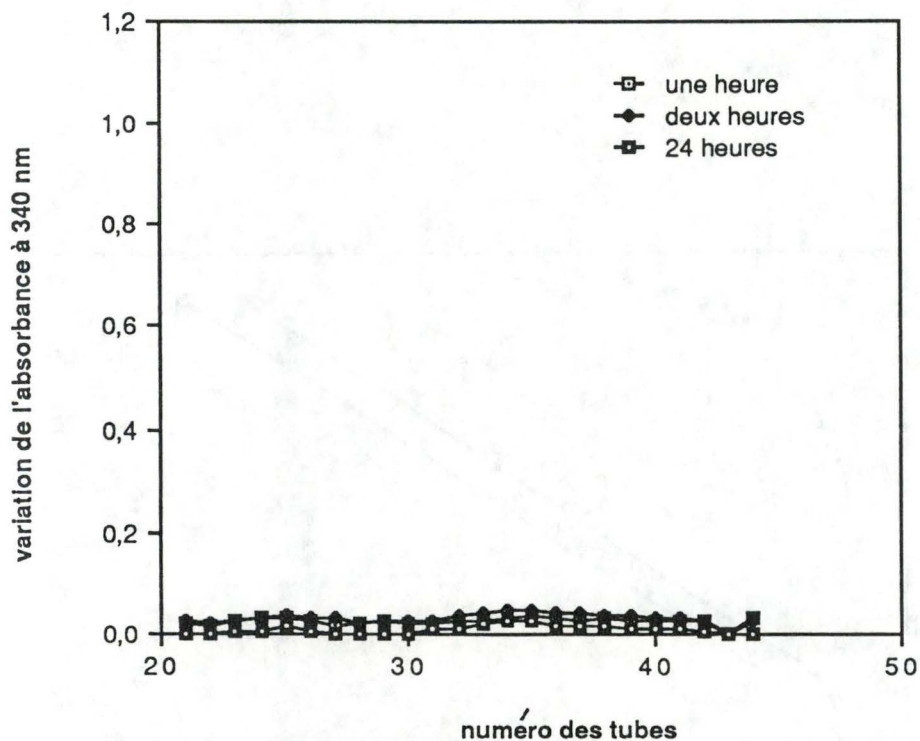


fig. 55 : évolution de l'activité au cours du temps (1-2-3-24 heures) à une température de 80° C., du contenu des différents tubes après passage sur HPLC Superose 12 en tamis moléculaire

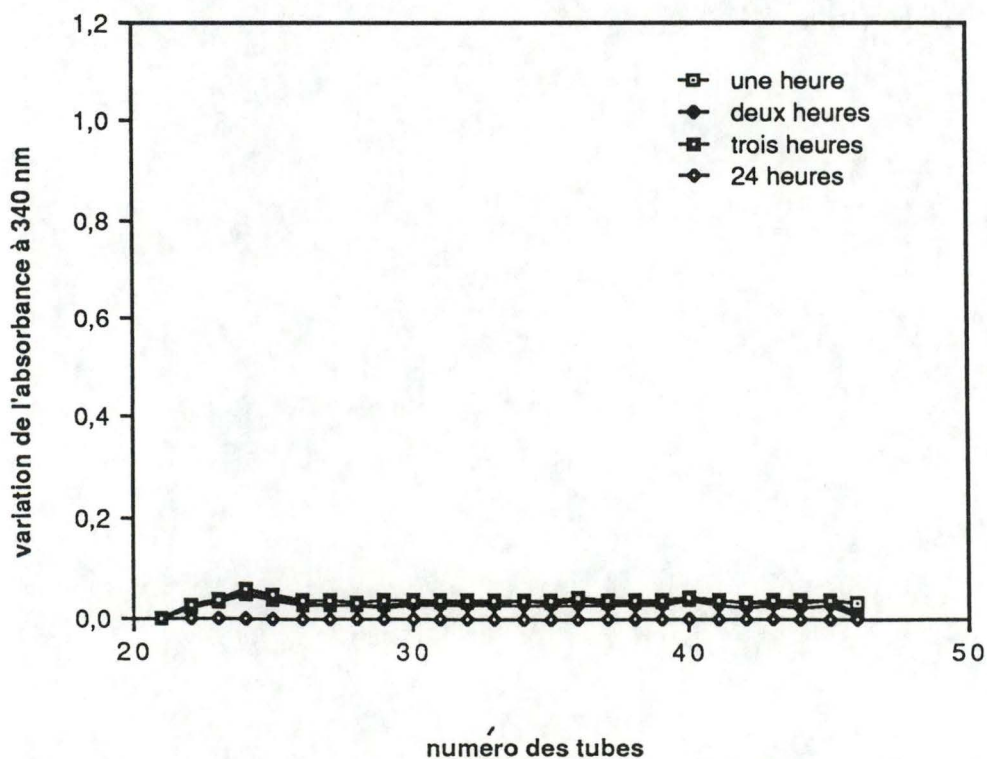


fig. 54 : évolution de l'activité au cours du temps (1-2-3-24 heures) à une température de 60° C., du contenu des différents tubes après passage sur HPLC Superose 12 en tamis moléculaire

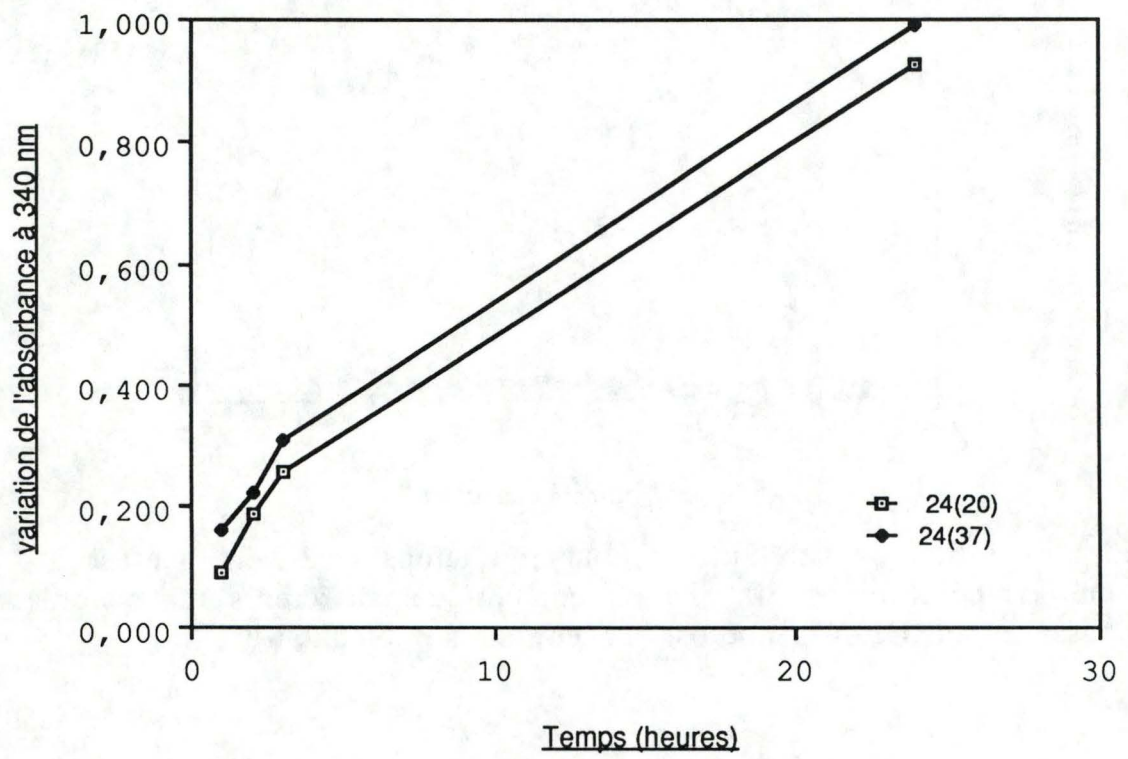


fig 56 : comparaison de la stabilité à 20° et 37° C. pour le tube contenant l'ADH (tube 24)

3.3.3.3 Conclusion

D'après ces différentes courbes nous pouvons dire que lorsque la température d'incubation est supérieure à 37° C. , nous n'observons plus d'activité que ce soit pour l'ADH ou pour le peptide. L'activité de l'ADH n'est pas influencée par la température dans une zone comprise entre 20° et 37° C. Pour le peptide par contre nous observons une diminution d'activité qui est bien distincte à 37° C.

Au vu de ces résultats montrant une activité beaucoup moins importante du peptide face à une augmentation de température, nous avons voulu caractériser cette influence de la température en étudiant la stabilité du peptide à 20° et 37° C.

3.3.3.4 Stabilité du peptide

Pour étudier la stabilité du peptide à 20° et 37° C nous avons donc incubé les tubes où était détectée l'activité, à ces deux températures pendant 1, 2, 3, et 24 heures.

Nous avons alors mis en graphique l'évolution de l'activité enzymatique (représentée par la lecture de l'absorbance à 340 nm) en fonction du temps.

Pour le tube 24 (fig. 56) (tube correspondant à l'ADH), nous pouvons remarquer que les deux courbes ont la même allure. La courbe à 37° C. est supérieure à celle obtenue à 20° C. Cela est logique puisque l'enzyme alcool déshydrogénase possède une activité optimale pour une température du milieu de réaction égale à 40° C et que l'augmentation de température agit favorablement sur la vitesse de la réaction.

En ce qui concerne le peptide du tube 35 et 38 (fig. 57 et 58), nous remarquons que la pente de la courbe à 37° C s'incurve et devient moins forte que celle obtenue pour la courbe à 20° C.

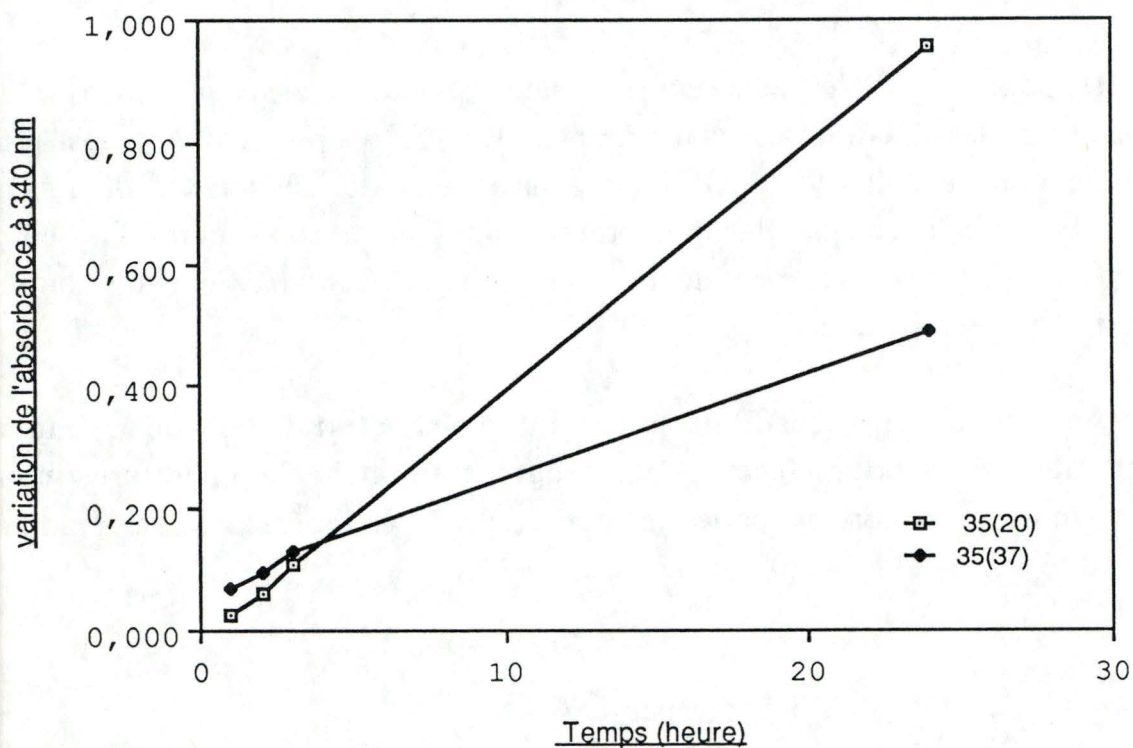


fig 57 : comparaison de la stabilité à 20° et 37° C. pour le tube contenant le peptide (tube 35)

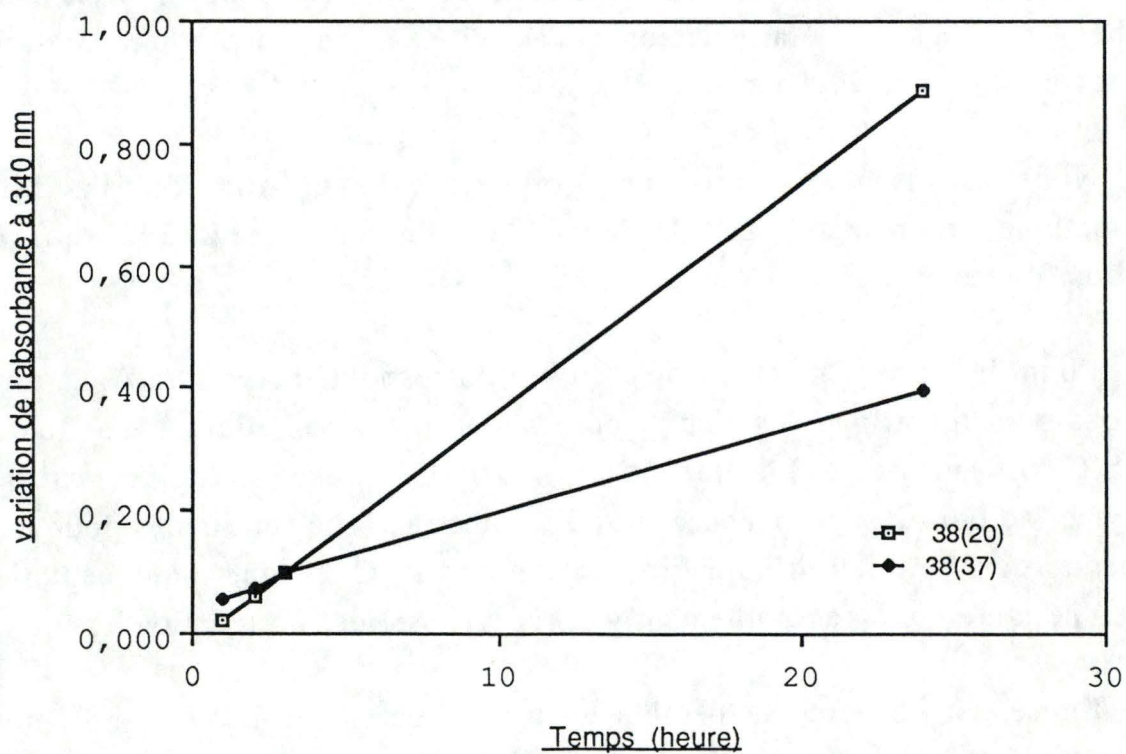


fig 58 : comparaison de la stabilité à 20° et 37° C. pour le tube contenant le peptide (tube 38)

Au vu de ces observations, nous pouvons conclure que l'activité du peptide semble plus stable à 20° C qu'à 37° C, alors que pour l'alcool déshydrogénase nous n'observons pas de différence à 20° et 37° C.

Le comportement du peptide face à la température est différent de celui de l'ADH, mais à l'encontre de nos espoirs, le peptide semble moins stable que l'enzyme native. Sa réduction de taille lui permet peut-être un déploiement plus facile de sa structure.

Cette constatation cependant allait nous permettre d'améliorer de façon qualitative le rendement de l'hydrolyse.

3.4 Amélioration de l'activité du peptide par l'étude des conditions d'hydrolyse trypsinique de l'ADH

3.4.1 Recherche des conditions optimales à 20° C.

Au vu des résultats de stabilité, nous avons pensé qu'en réalisant les hydrolyses trypsinique à 20° C et non plus à 37° C. comme précédemment, nous pouvions récupérer un maximum d'activité du peptide.

Différents paramètres, vu ce changement de température, devaient alors être envisagés.

3.4.1.1 Effet de la durée d'hydrolyse

La température d'hydrolyse étant diminuée, il était important de vérifier l'efficacité de l'hydrolyse à 20° C et éventuellement de la modifier. La durée de l'hydrolyse constitue le premier paramètre que nous avons étudié.

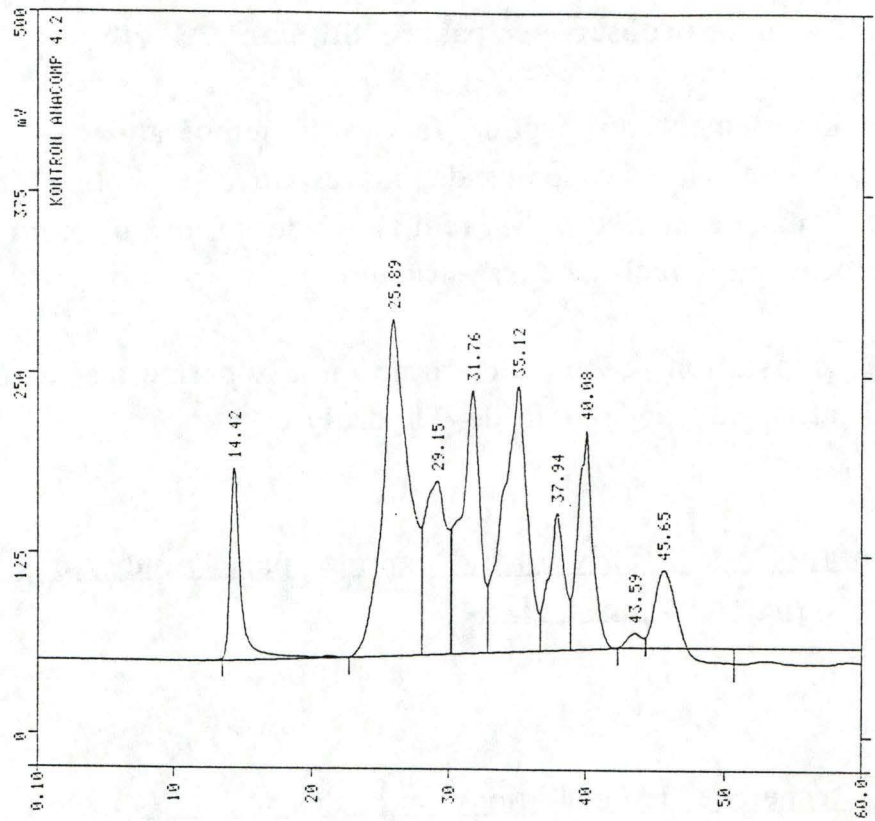


fig.59 : chromatogramme HPLC Superose 12 en tamis moléculaire après lyse trypsinique pendant 24 heures à 20° C.

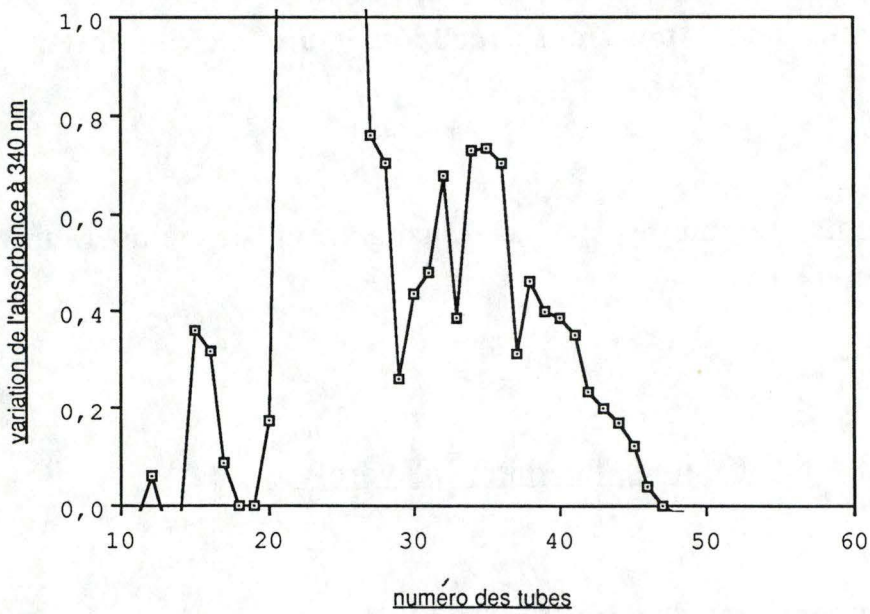


fig 60 : dosage de l'activité du peptide (variation d'absorbance à 340 nm) après une hydrolyse de 24 heures à 20° C.

3.4.1.1.1 Hydrolyse pendant 24 heures

Dans notre recherche des conditions optimales, nous avons commencé par réaliser une lyse trypsinique pendant 24 heures à 20° C.

3.4.1.1.1.1 Analyse du chromatogramme

Le chromatogramme obtenu après passage du lysat trypsinique sur HPLC tamis moléculaire Superose 12 est représenté à la fig. 59.

Sur celui-ci nous pouvons observer de nombreux pics.

Le pic s'éluant après 14 minutes (cest-à-dire dans le volume mort de la colonne Superose 12), contient comme dans les exemples précédents un contaminant non digéré par la trypsine.

Il est important de remarquer que le pic s'éluant à 25 minutes est relativement important. Il correspond à la présence d'ADH non digérée par la trypsine.

Le pics s'éluant entre 29 et 45 minutes correspondent aux différents fragments de la lyse trypsinique.

3.4.1.1.1.2 Dosage de l'activité alcool déshydrogénase (fig. 60)

Le dosage de l'activité enzymatique sur chacun des tubes récoltés à la sortie de la colonne nous permet de constater une variation d'absorbance très importante du tube 20 à 29. Ceci indique une partie importante d'ADH non hydrolysée.

Nous observons cependant la présence de 2 pics aux tubes 30-34 et 34-38 correspondant au peptides. La présence de deux pics peut s'expliquer par le fait que la digestion trypsinique n'ait pas été totale.

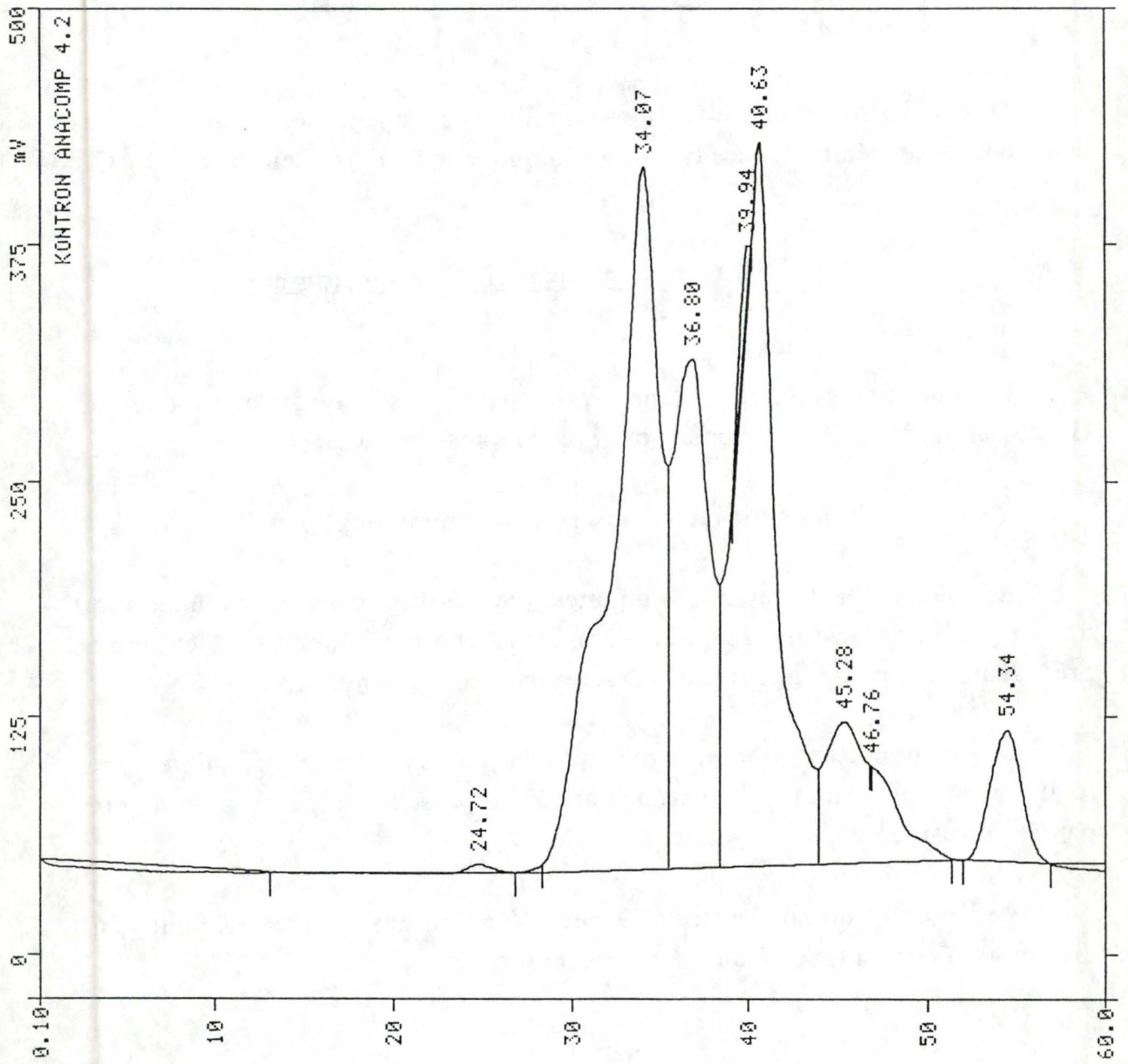


fig.61 : chromatogramme HPLC Superose 12 en tamis moléculaire après lyse trypsinique pendant 48 heures à 20° C.

Certains peptides sont totalement hydrolysés (condition précédentes et montrent une activité; d'autres par contre, de masse beaucoup plus importante, du à une hydrolyse moindre, possèdent également bien sur une activité enzymatique

3.4.1.1.3 Conclusion

Au vu de ces observations, et si nous les comparons avec celles obtenues pour une lyse réalisée à 37° C, il apparaît qu'une hydrolyse à 20° C pendant 24 heures n'est pas suffisante pour obtenir le peptide souhaité

3.4.1.1.2 Hydrolyse pendant 48 heures

Sachant qu'une diminution de la température entraînant une perte d'efficacité de cette hydrolyse, mais permettait de préserver au maximum l'activité enzymatique du peptide, nous avons prolongé l'hydrolyse nous avons donc réalisé une hydrolyse pendant 48 heures à 20° C.

3.4.1.1.2.1 Analyse du chromatogramme

Le chromatogramme obtenu après passage sur HPLC Superose 12 est représenté à la fig. 61.

Le pic situé à l'endroit de passage de l'enzyme native (c'est-à-dire à la 24ème minute) est toujours présent mais est nettement moins important que lors d'une hydrolyse de 24 heures.

Les autres pics s'éluant après 24 minutes correspondent aux différents fragments peptidiques obtenus après la digestion par la trypsine.

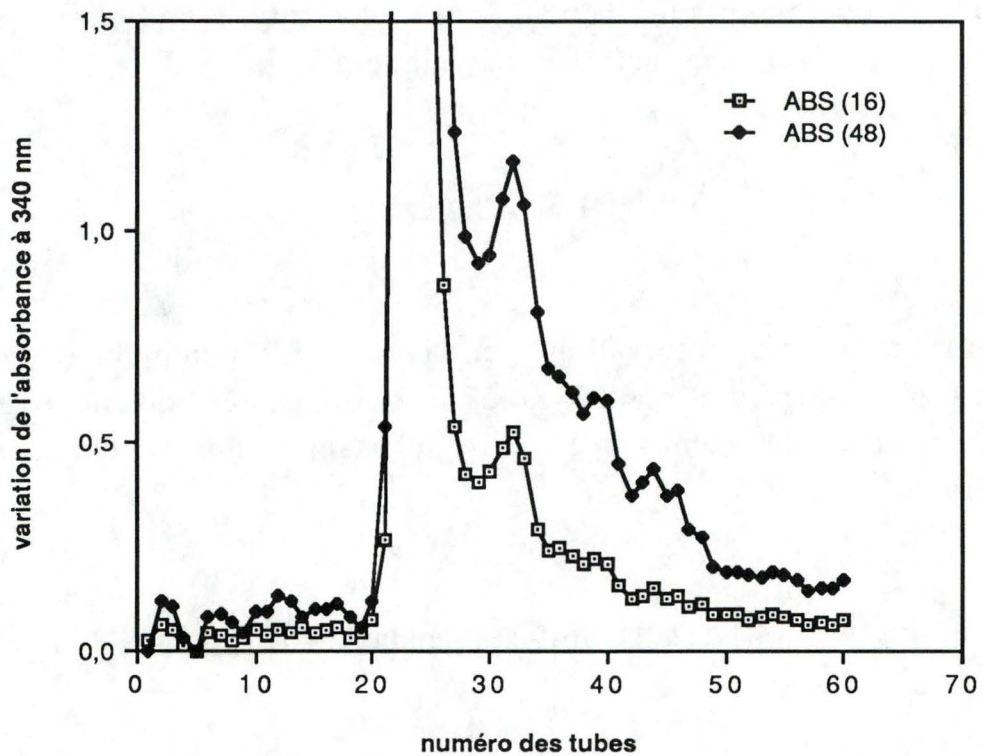


fig 62 : dosage de l'activité du peptide (variation d'absorbance à 340 nm) après une hydrolyse de 48 heures à 20° C.

On constate une diminution du nombre de pics et une augmentation des pics 34 et 41

3.4.1.1.2.2 Conclusion

48 heures d'hydrolyse sont nécessaires à 20° C pour obtenir une bonne digestion de l'enzyme. Le profil obtenu est légèrement différent de celui à 37° C. Le reliquat d'ADH non hydrolysé est un peu plus important

3.4.1.1.2.3 Dosage de l'activité alcool déshydrogénase

Ces conditions d'hydrolyse ne nous permettant pas d'obtenir une hydrolyse vraiment parfaite de l'ADH, nous avons voulu savoir si la diminution de la quantité de peptide obtenue (pic ADH plus important-pics contaminants) allait nous obliger à modifier également notre dosage.

Nous avons dosé l'activité alcool déshydrogénase du peptide en présence de la solution réactionnelle, dont la composition est décrite au paragraphe 2.2.2.4.2 après 16 heures d'incubation et après 48 heures (fig. 62).

Après 16 heures d'incubation, en présence de la solution réactionnelle, nous pouvons remarquer la présence de deux pics. Le premier très important correspondant au tube 21 à 28, correspond à la présence de l'ADH non digérée par la trypsine. Le deuxième pic compris entre les tubes 29 et 34 correspond au peptide.

Après 48 heures d'incubation, en présence de la solution réactionnelle, nous pouvons observer le même profil de la variation d'absorbance. La variation d'absorbance est plus importante pour le peptide tandis que pour l'ADH nous sommes au maximum depuis plus de 24 heures. Ce pic ADH à l'inverse de l'hydrolyse à 37° C dépasse

largement le pic d'activité du peptide, vu la proportion plus importante d'ADH non hydrolysée.

3.4.1.1.3 Conclusion

Nous constatons que l'hydrolyse n'est pas encore totale après 48 heures, mais nous obtenons une variation d'absorbance qui est beaucoup plus importante que pour une hydrolyse de 24 heures.

Pour la suite des expérimentations nous utiliserons dorénavant une hydrolyse de 48 heures suivie d'une lecture d'activité de 48 heures également.

3.4.1.2 Effet de différents agents

Une hydrolyse de 48 heures à 20° C nous permettant de préserver l'activité du peptide, nous nous sommes intéressés à l'effet de différents agents employés en cours d'hydrolyse, sur cette activité peptique.

3.4.1.2.1 Effet de l'urée

Puisqu'une hydrolyse pendant 48 heures est nécessaire, nous craignons une dénaturation partielle ou totale du peptide qui pourrait entraîner une perte d'activité enzymatique, c'est pourquoi nous avons réalisé une hydrolyse trypsinique en absence d'urée (agent permettant une dénaturation de l'enzyme et une bonne digestion trypsinique) dans l'espoir de, peut-être, encore augmenter le rendement en activité du peptide.

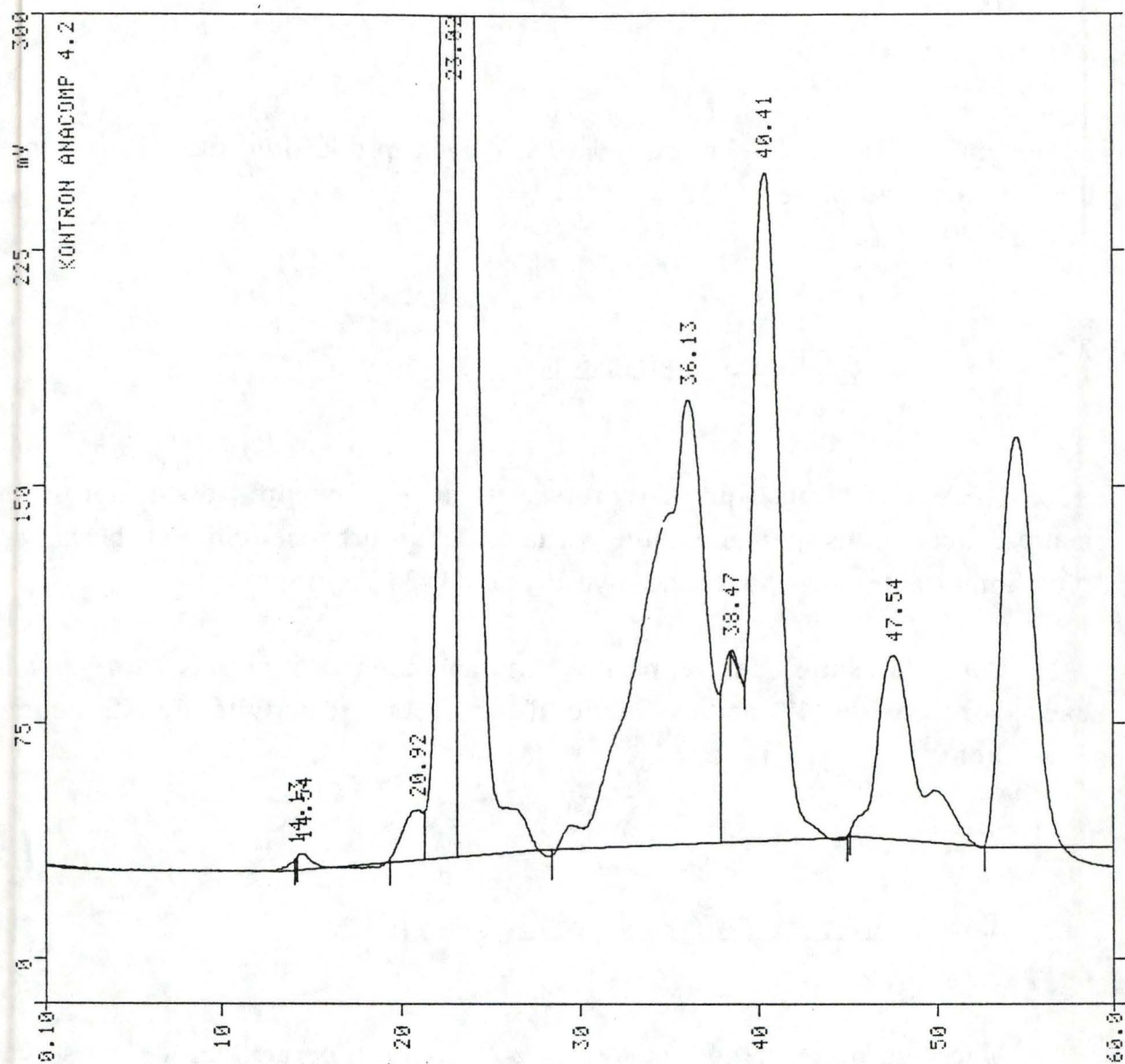


fig.63 : chromatogramme HPLC Superose 12 en tamis moléculaire après lyse trypsinique pendant 48 heures à 20° C., en absence d'urée

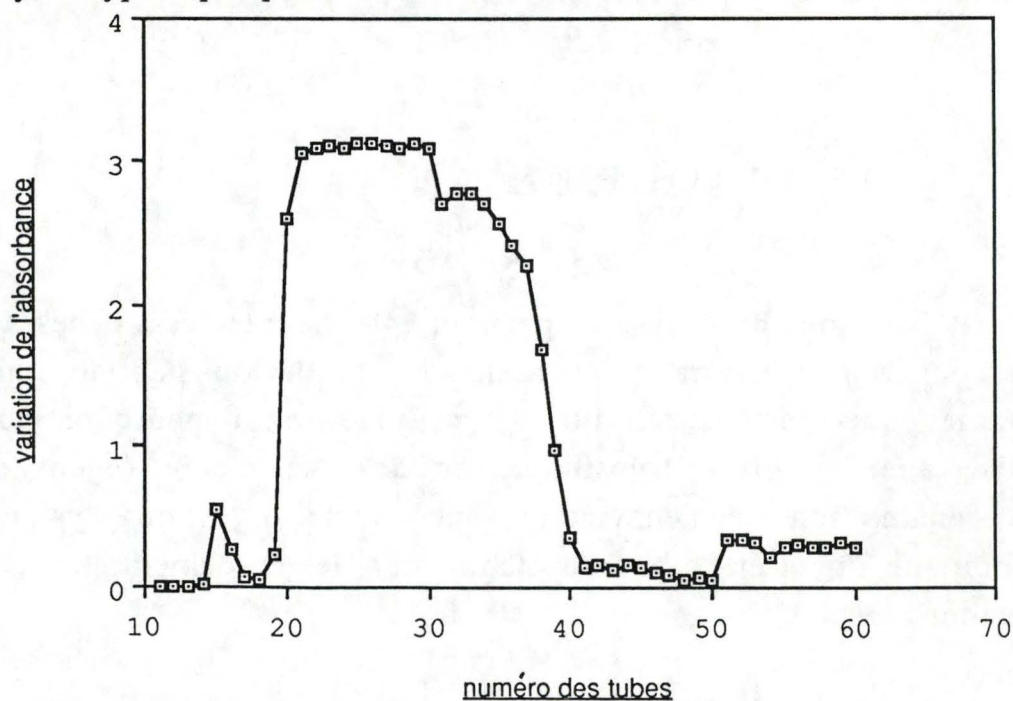


fig 64 : dosage de l'activité du peptide (variation d'absorbance à 340 nm) après une hydrolyse de 48 heures à 20° C., en absence d'urée

3.4.1.2.1.1 Analyse du chromatogramme

Le chromatogramme obtenu après passage sur HPLC Superose 12 est représenté à la fig. 63.

L'analyse de celui-ci permet de constater la présence d'un pic très important s'éluant après 23 minutes et en fait situé à l'endroit où s'élué l'alcool déshydrogénase.

Les autres pics représentés après 23 minutes sur le chromatogramme correspondent aux différents fragments peptidiques obtenus après digestion trypsinique.

On obtient un profil plus ou moins semblable à une lyse traditionnelle (prédominance des pics 36' et 40') mais leur importance est beaucoup moins marquée que précédemment

3.4.1.2.1.2 Dosage de l'activité alcool déshydrogénase

Nous pouvons constater la présence d'un large pic saturant le spectrophotométrique s'étalant du tube 20 au tube 30 avec un épaulement apparaissant au tube 37 (fig. 64).

3.4.1.2.1.3 Conclusion

D'après ces observations, nous pouvons déduire que la présence de l'urée est indispensable pour mener à bien l'hydrolyse de l'ADH. En effet, en absence d'urée, l'hydrolyse nest pas complète et par conséquent ne nous permet pas une séparation des pics d'activité de l'enzyme native et du peptide.

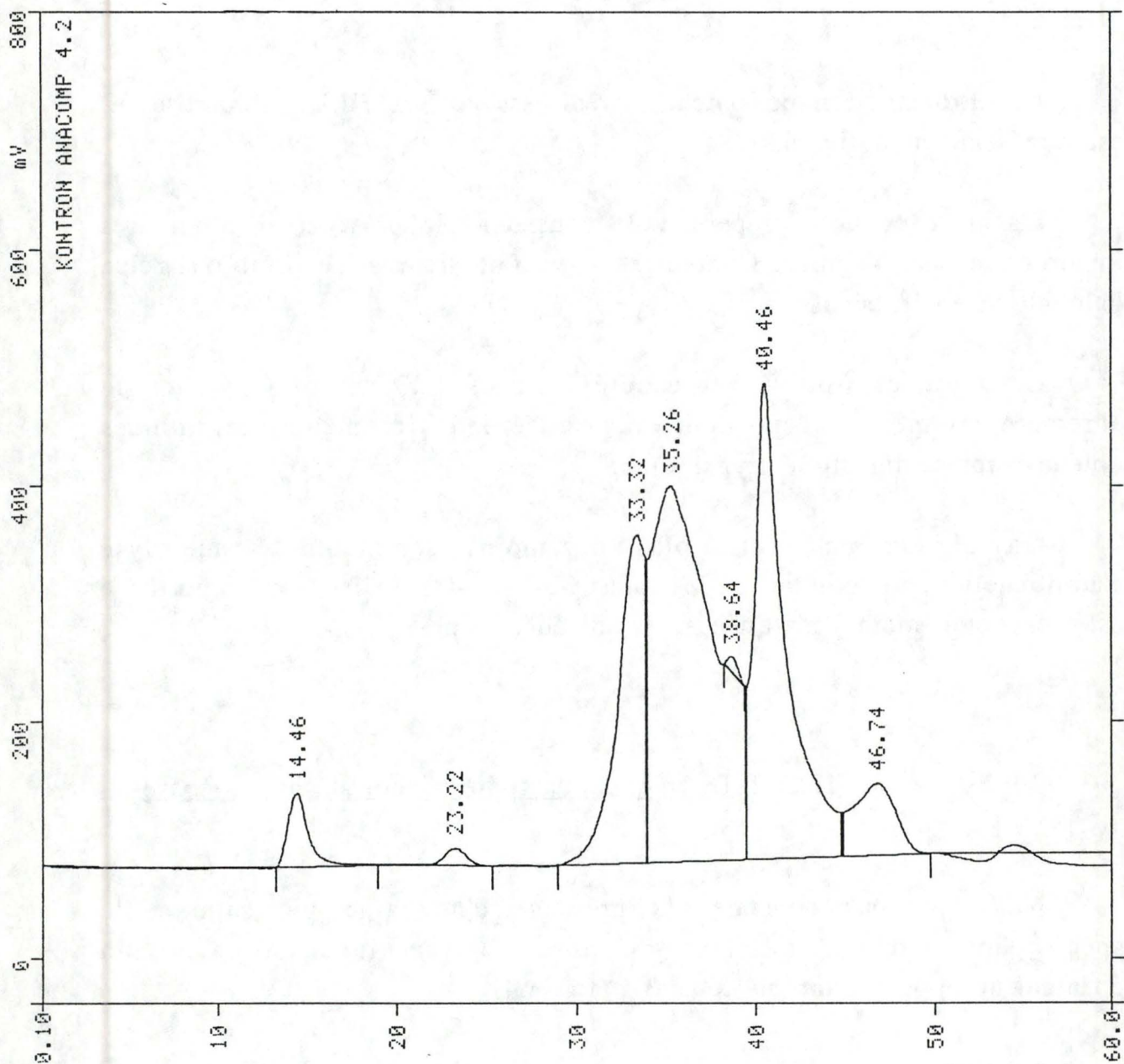


fig.65 : chromatogramme HPLC Superose 12 en tamis moléculaire après lyse trypsinique pendant 48 heures à 20° C., en utilisant un tampon d'élution phosphate 10 mM

3.4.1.2.2 Effet de la concentration en sels

Dans notre recherche des conditions optimales, nous avons également essayé de savoir si la concentration en sels du tampon d'élution pouvait exercer un effet sur l'activité du peptide.

Pour tester cette hypothèse nous avons utilisé deux tampons d'élution différents pour l'HPLC. Le premier est un tampon phosphate 10 mM pH 7,5 alors que le deuxième est un tampon phosphate 50 mM NaCl 0,9 % pH 7,5.

Nous allons d'abord exposer les observations que nous avons obtenues lorsqu'on utilise un tampon d'élution de 10 mM, ensuite nous exposerons celles obtenues avec un tampon 50 mM et ceci pour une hydrolyse 48 heures à 20° C en présence d'urée.

3.4.1.2.2.1 Tampon phosphate 10 mM pH 7,5

3.4.1.2.2.1.1 Analyse du chromatogramme

Le chromatogramme obtenu après HPLC est représenté à la fig. 65.

Nous remarquons que le pic s'éluant après 14 minutes est toujours présent. Ce pic contient un contaminant non digéré par la trypsine.

La présence de traces d'enzyme non digérée peut être visualisée sur le chromatogramme avec le pic s'éluant après 23 minutes. Ce pic est très faible comme décrit au paragraphe 3.4.1.1.2

Les autres pics correspondent aux différents fragments peptidiques obtenus après digestion par la trypsine.

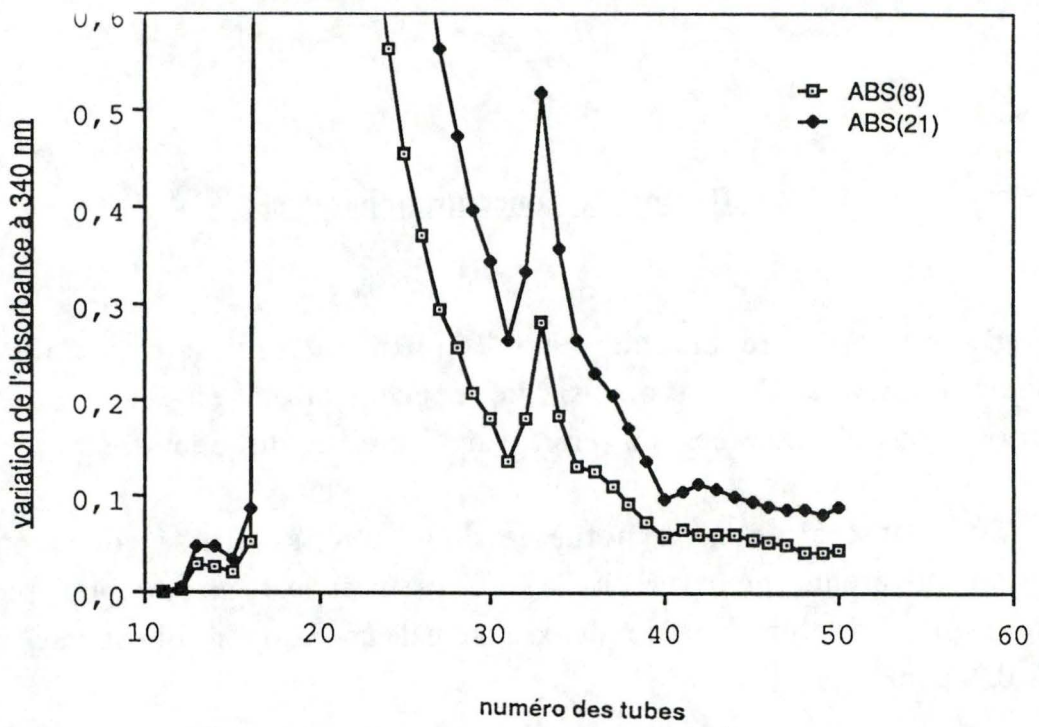


fig 66 : dosage de l'activité du peptide (variation d'absorbance à 340 nm) après une hydrolyse de 48 heures à 20° C., en utilisant un tampon d'élution phosphate 10 mM

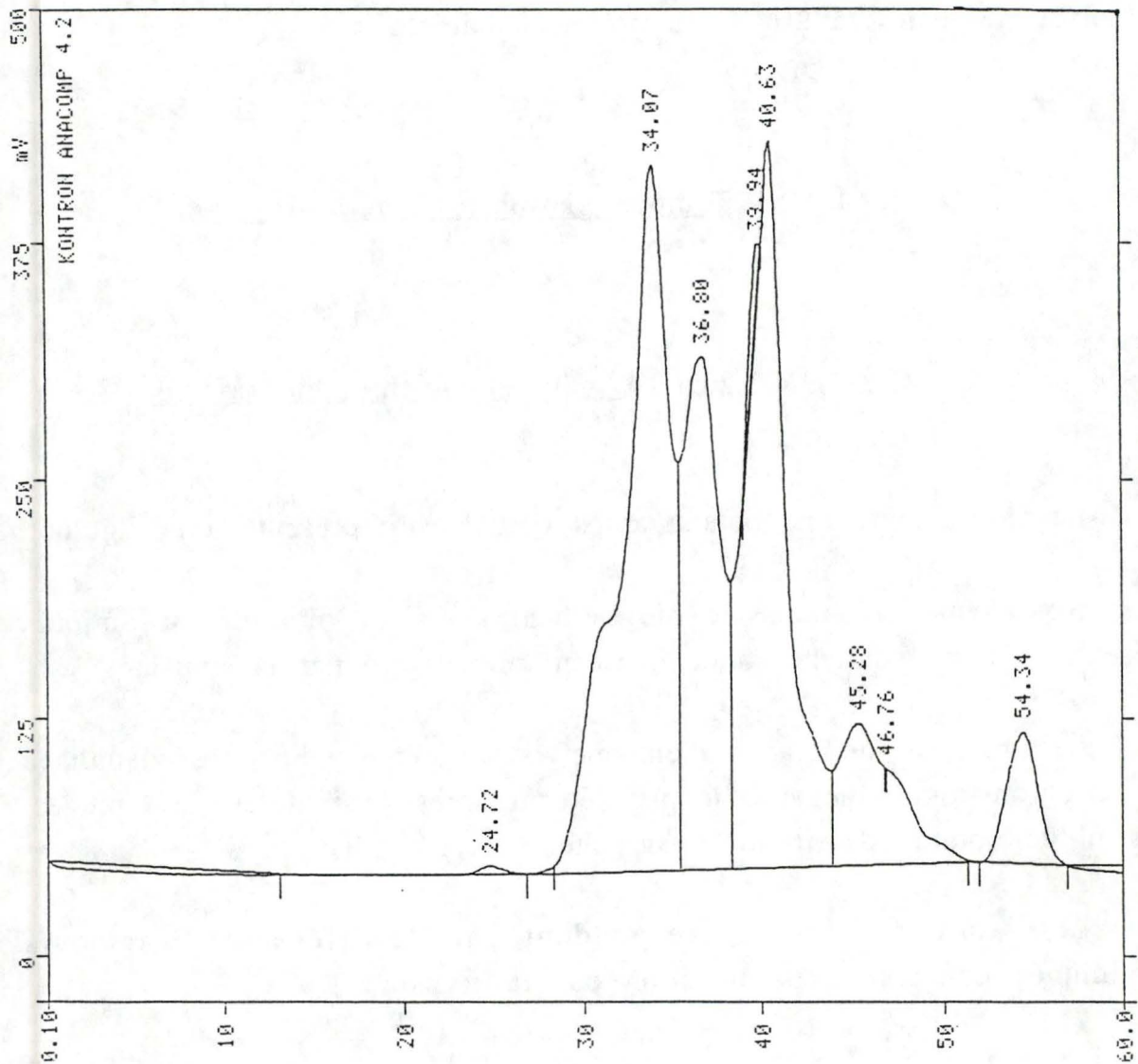


fig.67 : chromatogramme HPLC Superose 12 en tamis moléculaire après lyse trypsinique pendant 48 heures à 20° C., en utilisant un tampon d'élution phosphate 50 mM NaCl 0,9 %

3.4.1.2.2.1.2 Dosage de l'activité alcool déshydrogénase

Nous avons dosé l'activité alcool déshydrogénase après 8 heures et après 21 heures d'incubation du peptide (fig. 66).

Après 8 heures d'incubation, nous remarquons la présence de deux pics. Le premier correspondant à la présence de traces d'ADH non hydrolysée se situe aux tubes 20 à 29. Le deuxième pic correspond au peptide et se situe aux tubes 31 à 35. Pour le peptide nous pouvons observer une variation d'absorbance de 0,3.

Après 21 heures d'incubation, nous obtenons le même profil mais avec une variation d'absorbance plus marquée pour le peptide.

3.4.1.2.2.2 Tampon phosphate 50 mM NaCl 0,9 % pH 7,5

3.4.1.2.2.2.1 Analyse du chromatogramme

Le chromatogramme obtenu après passage sur HPLC tamis moléculaire est représenté à la fig. 67.

Le pic situé à l'endroit de passage de l'enzyme native (c'est-à-dire à la 24ème minute) est toujours présent. Les autres pics s'éluant après 24 minutes correspondent aux différents fragments peptidiques obtenus après la digestion par la trypsine.

3.4.1.2.2.2.2 Dosage de l'activité alcool déshydrogénase (fig. 68)

Nous avons dosé l'activité alcool déshydrogénase après 16 heures d'incubation du peptide en présence de la solution réactionnelle, dont la composition est décrite au paragraphe 2.2.2.4.1) et après 48 heures.

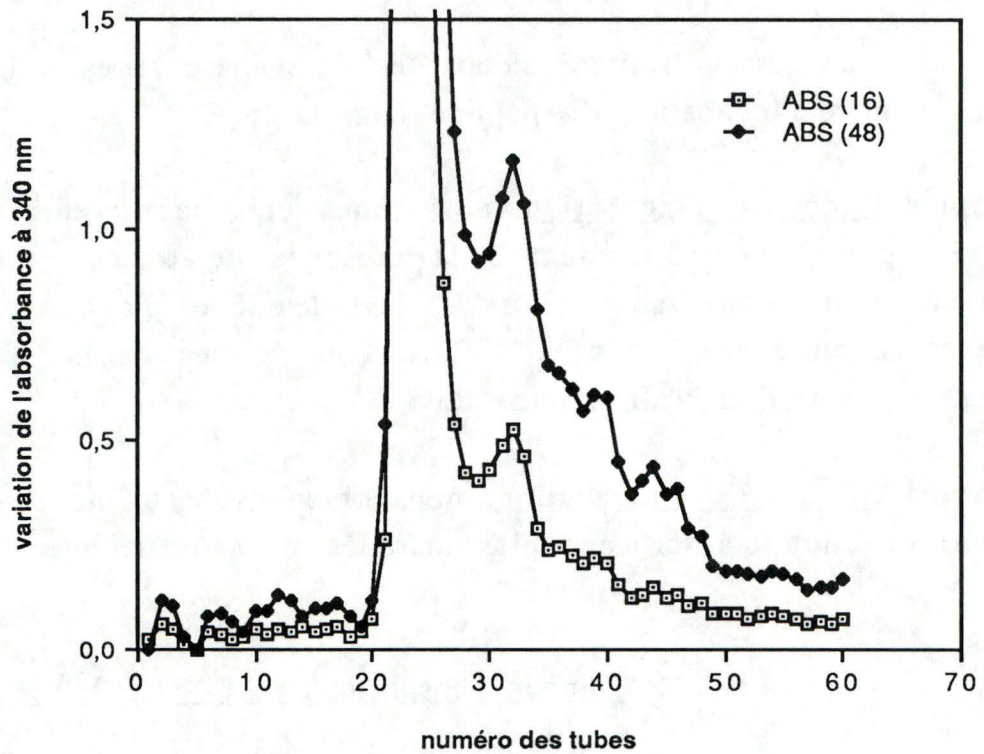


fig 68 : dosage de l'activité du peptide (variation d'absorbance à 340 nm) après une hydrolyse de 48 heures à 20° C. en utilisant un tampon d'éluion phosphate 50 mM NaCl 0,9 %

Après 16 heures d'incubation, en présence de la solution réactionnelle, nous remarquons la présence de deux pics. Le premier correspondant aux tubes 21 à 28 correspond à la présence de l'ADH non digérée par la trypsine, le deuxième pic compris entre les tubes 29 et 34 correspondant au peptide.

Après 48 heures d'incubation, en présence de la solution réactionnelle, nous pouvons observer le même profil de la variation d'absorbance. La variation d'absorbance est plus importante pour le peptide et attend une variation d'absorbance supérieure à 1.

3.4.1.2.2.3 Conclusion

Que l'on utilise un tampon 10 mM ou un tampon 50 mM pour l'élution de la colonne (Superose 12), nous obtenons un profil chromatographique partiquement semblable et des intensités de pics tout à fait comparables.

Pour ce qui concerne la variation d'absorbance, nous pouvons constater la présence de deux pics, l'un correspondant à l'ADH native et l'autre au peptide, quelque soit le tampon d'élution utilisé.

Il est à remarquer que l'emplacement des pics n'a pas été influencé par les différents types d'élution.

Mais la variation d'absorbance est plus importante dans le cas de l'élution avec un tampon phosphate 50 mM NaCl 0,9 % que dans le cas de l'élution avec un tampon phosphate 10 mM.

Le tampon phosphate 50 mM et NaCl 0,9 % stabiliserait donc notre peptide et permettrait d'obtenir une plus grande variation d'absorbance et donc une plus grande activité.

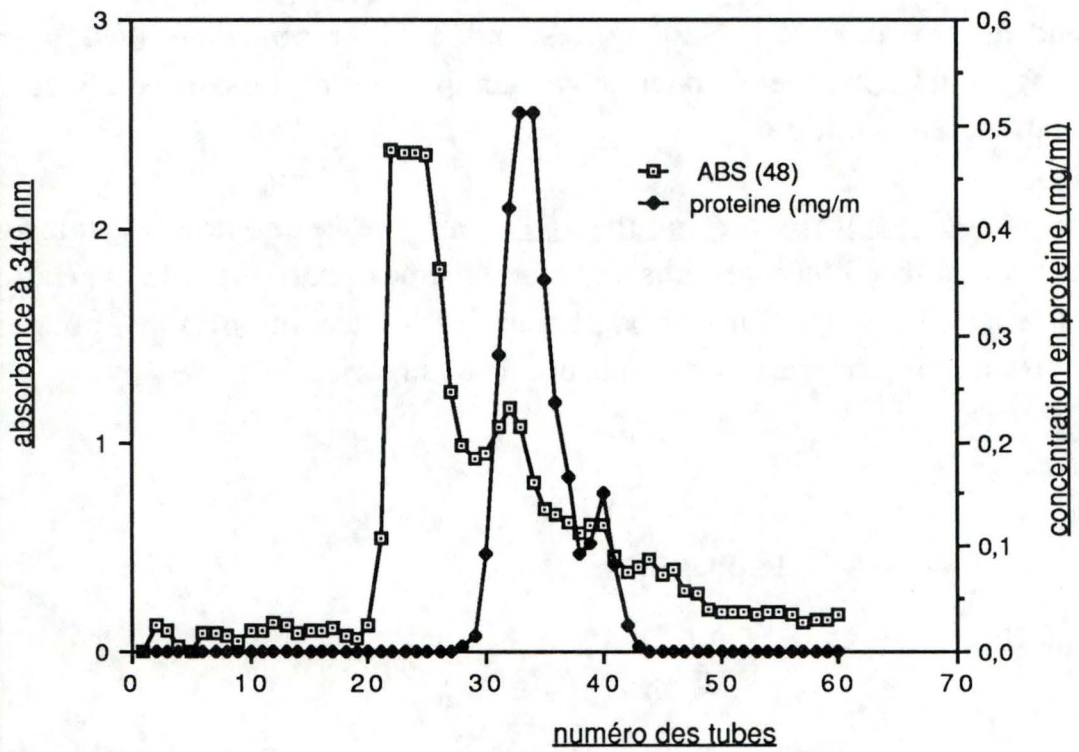


fig . 69 : superposition de la variation d'absorbance à 340 nm et de l'absorbance des proteines après séparation du lysat trypsinique (48 heures) sur tamis moléculaire Superose 12. Tampon d'éluion phosphate 50 mM

3.41.2.3 Conclusion générale

Après avoir étudié différents facteurs pouvant influencer l'activité peptidique, nous pouvons conclure que pour obtenir une activité peptidique plus importante, il est nécessaire de réaliser une hydrolyse à 20° C pendant 48 heures en présence d'urée et d'utiliser un tampon phosphate 50 mM NaCl 0,9 % pH 7,5 pour l'élution de la chromatographie tamis moléculaire (Superose 12). La lecture de l'activité présente dans les tubes récoltés à la sortie de l'HPLC se fera quant à elle après 48 heures.

Pour la suite des expérimentations nous avons utilisé ces conditions de travail.

3.5 Isolement et caractérisation du peptide par électrophorèse

Les conditions nécessaires à une activité optimale du peptide étant établies, nous avons tenté de séparer le peptide à activité catalytique des contaminants éventuellement présents avec lui dans le tube d'élution sur tamis moléculaire et de montrer que l'activité enzymatique détectée était bien due à un seul peptide.

Nous avons choisi la technique d'électrophorèse pour mener à bien cette recherche car elle nous permet une séparation des peptides sur base de leur charge.

3.5.1 Dosage des protéines (fig 69)

Avant de vouloir isoler le peptide qui nous intéressait, il était nécessaire de connaître la quantité de matériel à notre disposition.

Nous avons donc réalisé un dosage des protéines selon la méthode de LOWRY (LOWRY et Al., 1953) sur chacun des tubes récoltés à la sortie de l'HPLC, nous avons couplé ce dosage à la mesure de l'activité enzymatique.

3.5.1.1 Analyse du graphique

3.5.1.1.1 Dosage de l'activité alcool déshydrogénase

L'activité de l'alcool déshydrogénase présente deux pics dont le premier correspond à la présence d'ADH non digérée par la trypsine et le second correspond à la présence du peptide.

3.5.1.1.2 Dosage des protéines

Nous observons, à l'endroit de l'ADH (tube 21 à 28) que la concentration en protéines est indétectable par le dosage de LOWRY (ceci confirme ce qui a été dit précédemment concernant le faible reliquat d'ADH).

Nous pouvons observer un pic avec un épaulement qui se situe entre les tubes 30 et 41 avec un maximum au tube 33-34 (fig. 69).

Ces pics peuvent être mis en relation avec le chromatogramme HPLC de la fig. 70.

3.5.1.2 Conclusion

Le profil du chromatogramme obtenu après HPLC et le profil du dosage des protéines coïncident bien; la présence d'ADH peut être considérée comme quasi nulle et les pics HPLC de faible poids moléculaire correspondent bien à la présence de peptides.

Comme nous travaillons avec le tube 32, nous avons pu en conclure par ce dosage que nous travaillons sur 0,4 mg de protéines/ml.

3.5.2 Essais préliminaires d'électrophorèse

Nous avons réalisé des tests préliminaires d'électrophorèse en utilisant les conditions d'expérimentations que nous avons développées.

D'après ces tests, nous avons déduit que pour réaliser les électrophorèses, il nous fallait premièrement des quantités plus grandes de matériel c'est-à-dire des quantités détectables par une coloration spécifique et deuxièmement que la force ionique de l'échantillon était trop élevée.

En ce qui concerne la force ionique la solution était simple, nous avons utilisé un tampon d'élution contenant moins de sel, c'est-à-dire un tampon phosphate 20 mM pH 7,5 au lieu d'un tampon phosphate 50 mM NaCl 0,9 % pH 7,5.

Pour l'amélioration du rendement quantitatif de peptide, la solution n'était pas aussi évidente. Comme expliquée au paragraphe 3.5.1, la concentration en protéines de notre échantillon valait 0,5 mg/ml, ce qui compte tenu du volume de l'échantillon, représentait, en fait 0,2 mg de protéines. Cette quantité n'étant pas suffisante, il nous fallait rechercher une méthode nous procurant des quantités plus importantes de protéines et donc de peptides.

3.5.3 Recherche d'une technique permettant d'améliorer le rendement quantitatif en peptide

Il était intéressant d'obtenir, comme nous venons de le mentionner, des quantités de peptides relativement plus importantes pour pouvoir réaliser les expérimentations envisagées. Pour ce faire nous pensions utiliser une chromatographie en tamis moléculaire sur une colonne de Sephadex G 10 de grande dimension. Malgré le taux d'exclusion faible, nous pensions malgré tout obtenir une séparation du peptide et de l'ADH s'éluant dans le volume mort de la colonne.

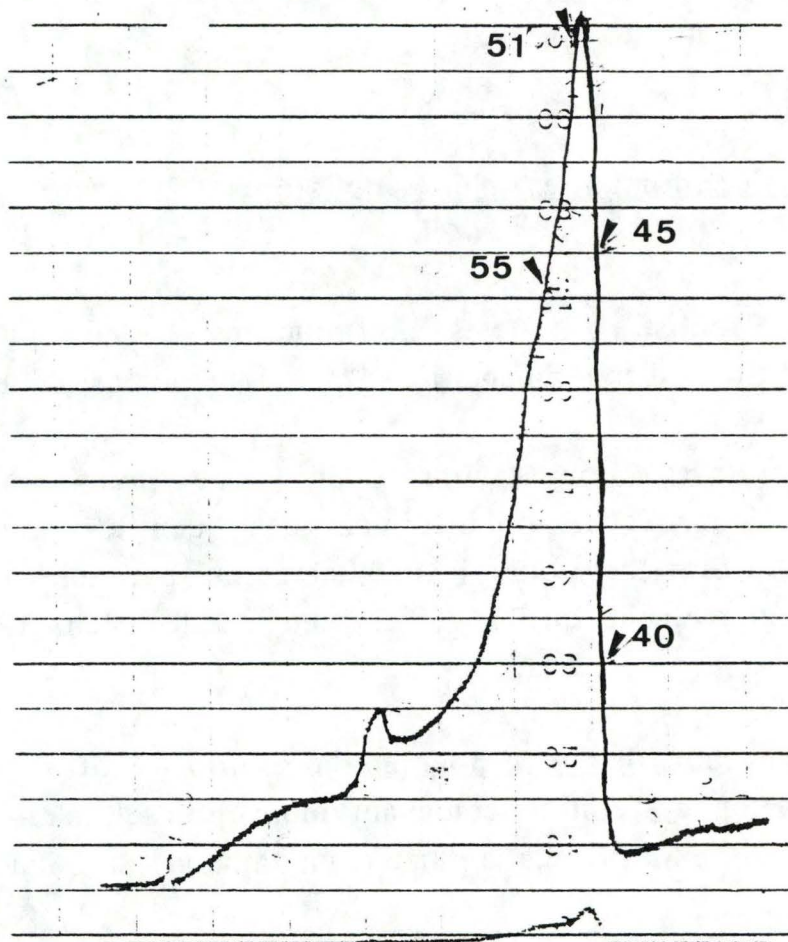


fig. 70 : chromatogramme obtenu après passage sur la colonne Séphadex G 10 tamis moléculaire

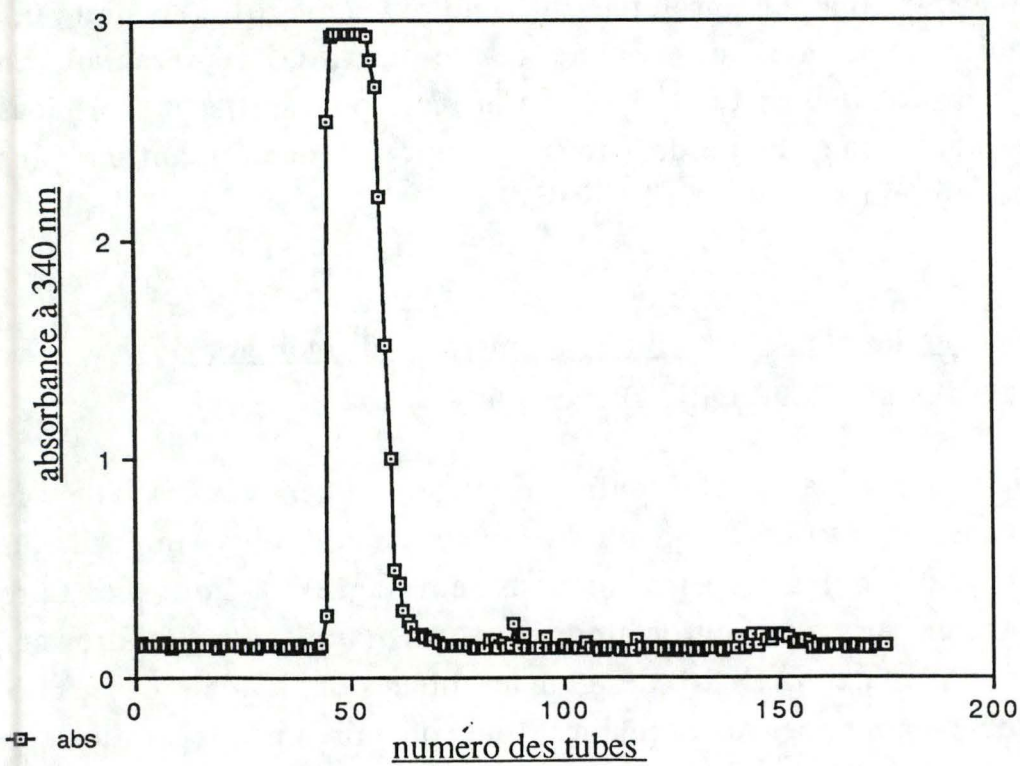


fig. 71 : dosage de l'activité du peptide après passage sur chromatographie Séphadex G 10 tamis moléculaire

3.5.3.1 Chromatographie Séphadex G 10

3.5.3.1.1 Analyse du chromatogramme

Le chromatogramme obtenu est représenté à la fig. 70.

Nous remarquons la présence de deux pics, l'un très marqué s'éluant au volume mort de la colonne et l'autre beaucoup plus faible s'éluant après 156 minutes

3.5.3.1.2 Dosage de l'activité alcool déshydrogénase

Le graphique du dosage est représenté à la fig 71

Nous pouvons remarquer la présence d'un pic très large qui est compris entre la 77ème minute et la 110 ème minute. L'activité présente dans le deuxième pic du chromatogramme est nulle. Il ne peut donc pas s'agir du peptide nous intéressant pour notre travail. Nous ne pouvons donc pas obtenir la séparation des pics d'activité de l'ADH non hydrolysée et du peptide comme lors d'un passage sur HPLC Superose 12.

3.5.3.1.3 Vérification par HPLC

Nous avons voulu vérifier par HPLC, si malgré tout il n'était pas possible d'obtenir une fraction de ce large pic obtenu en Séphadex G 10 ne contenant que le peptide.

Pour tester cette hypothèse, nous avons prélevé 100 µl dans différents tubes situés à différents endroits du pic obtenu en Séphadex G 10, et nous les avons injectés sur HPLC Superose 12. Pour chaque injection nous avons vérifié l'activité alcool déshydrogénase.

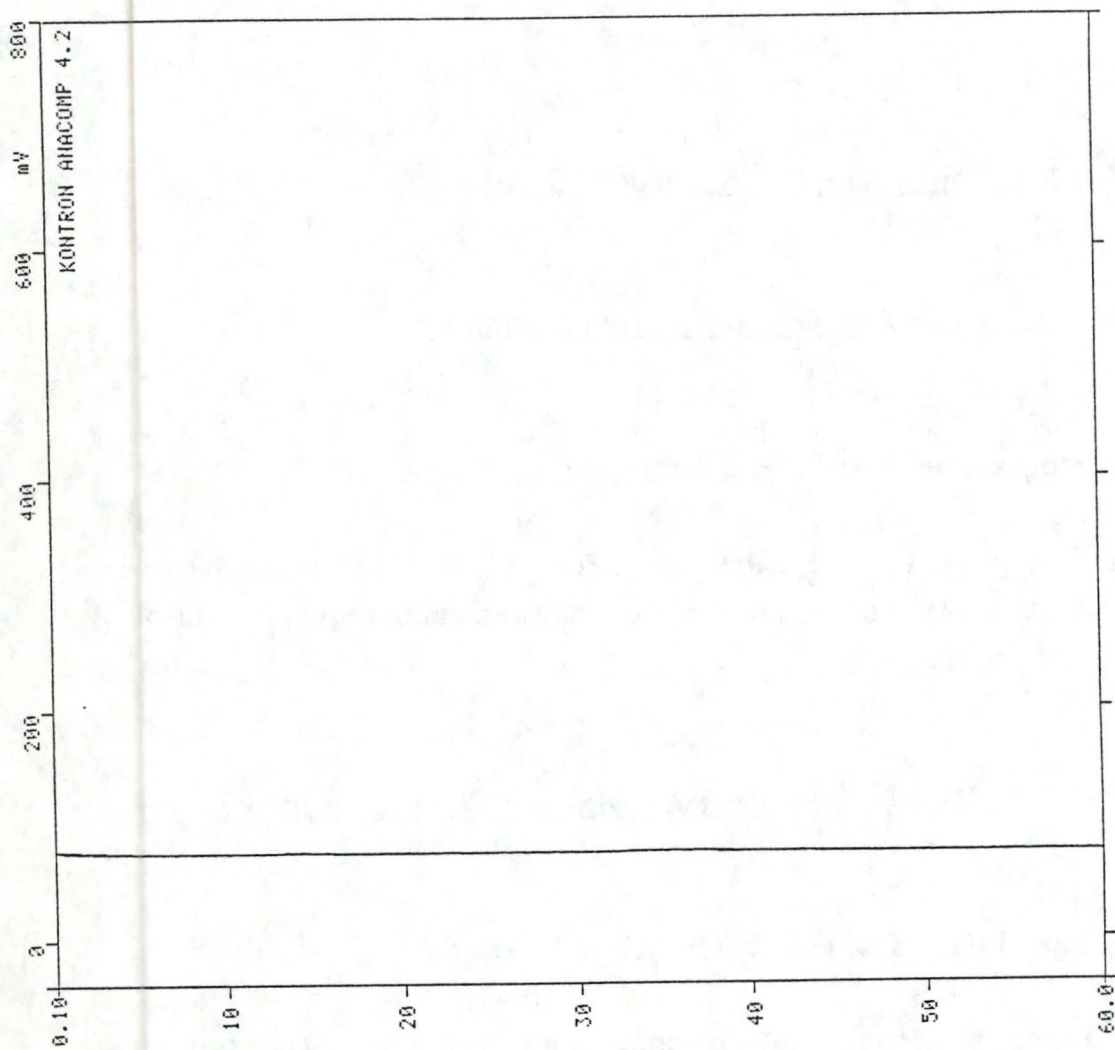


fig 72 : chromatogramme obtenu après passage sur HPLC Superose 12 du tube 40 obtenu après tamis moléculaire sur la colonne Séphadex G 10 tamis moléculaire

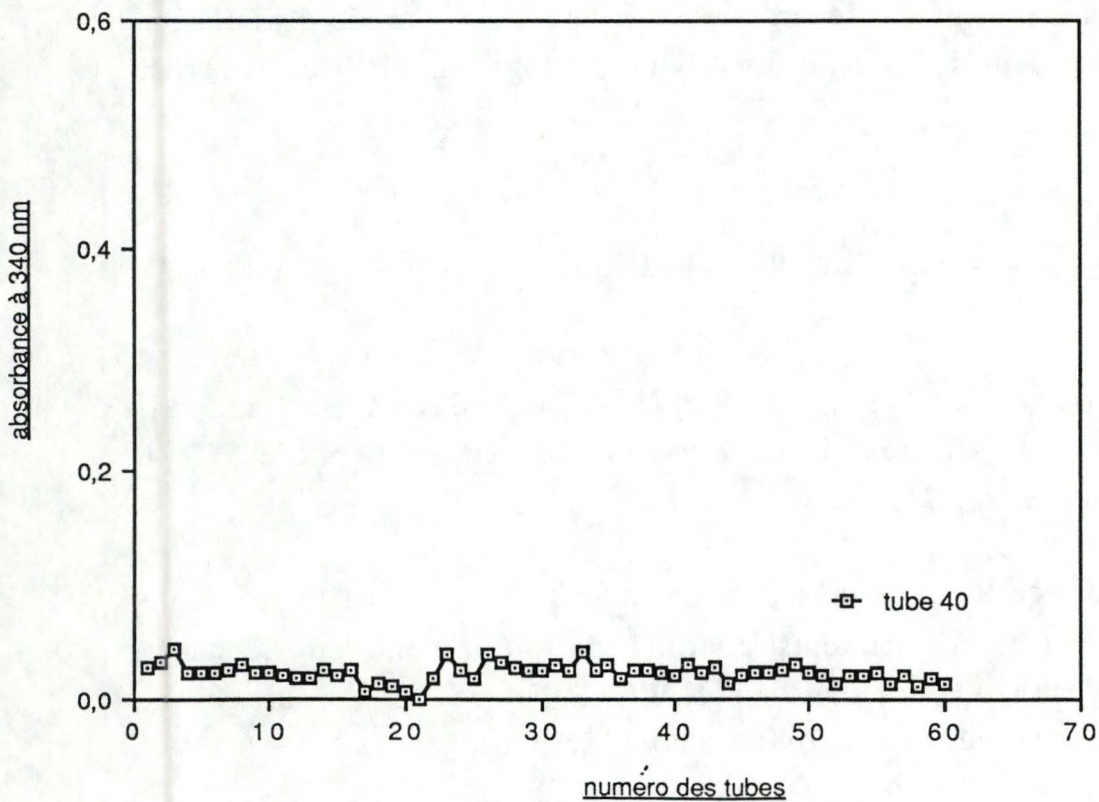


fig. 73 : dosage de l'activité après passage sur HPLC Superose 12 en tamis moléculaire du tube 40 obtenu avec la colonne Séphadex G 10 tamis moléculaire

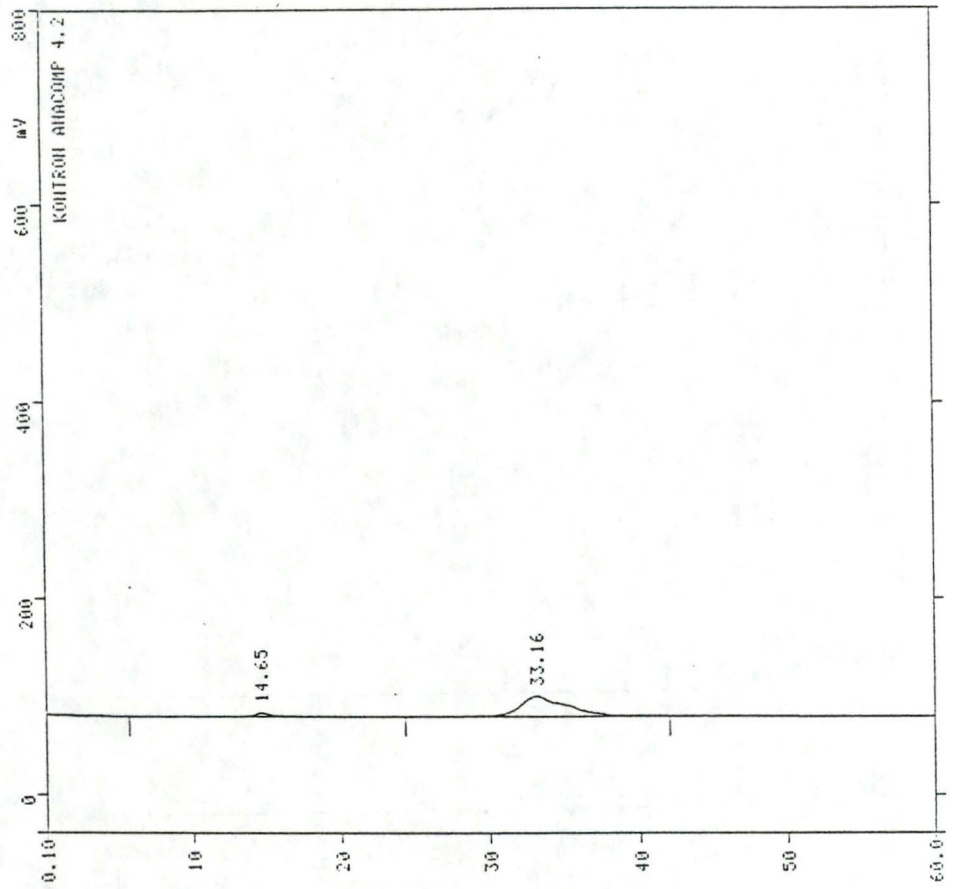


fig 74 : chromatogramme obtenu après passage sur HPLC Superose 12 du tube 45 obtenu avec la colonne Séphadex G 10 tamis moléculaire

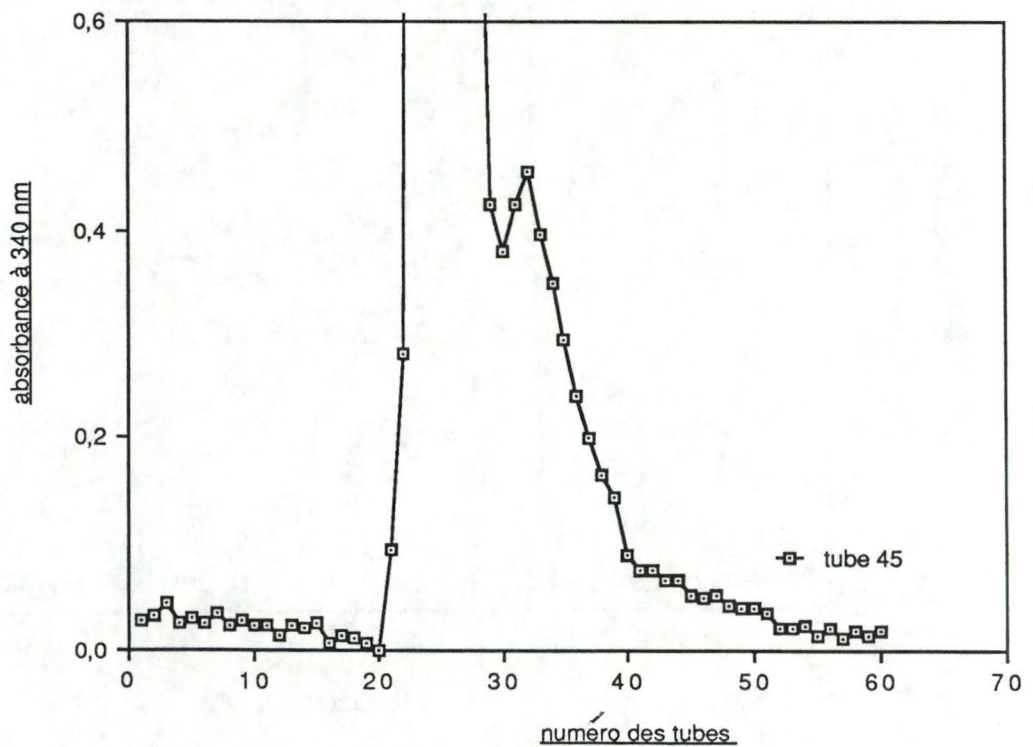


fig. 75 : dosage de l'activité après passage sur HPLC Superose 12 en tamis moléculaire du tube 45 obtenu avec la colonne Séphadex G 10 tamis moléculaire

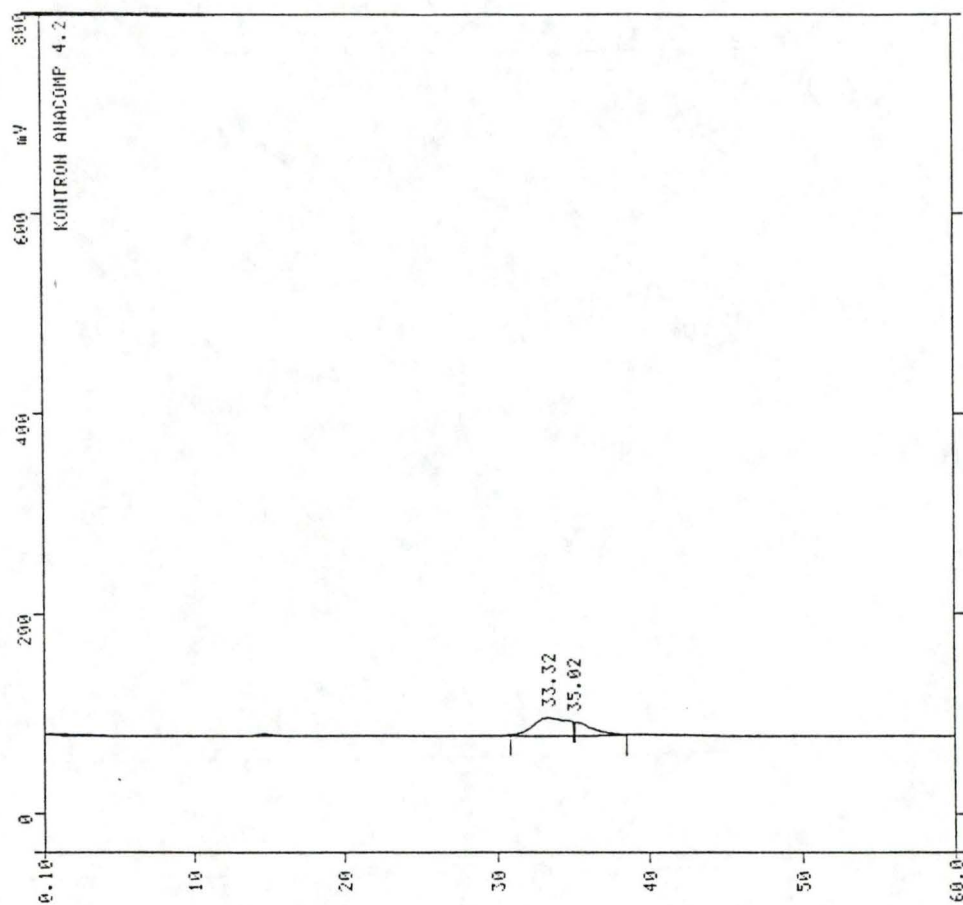


fig 76 : chromatogramme obtenu après passage sur HPLC Superose 12 tamis moléculaire du tube 51 obtenu avec la colonne Séphadex G 10 tamis moléculaire

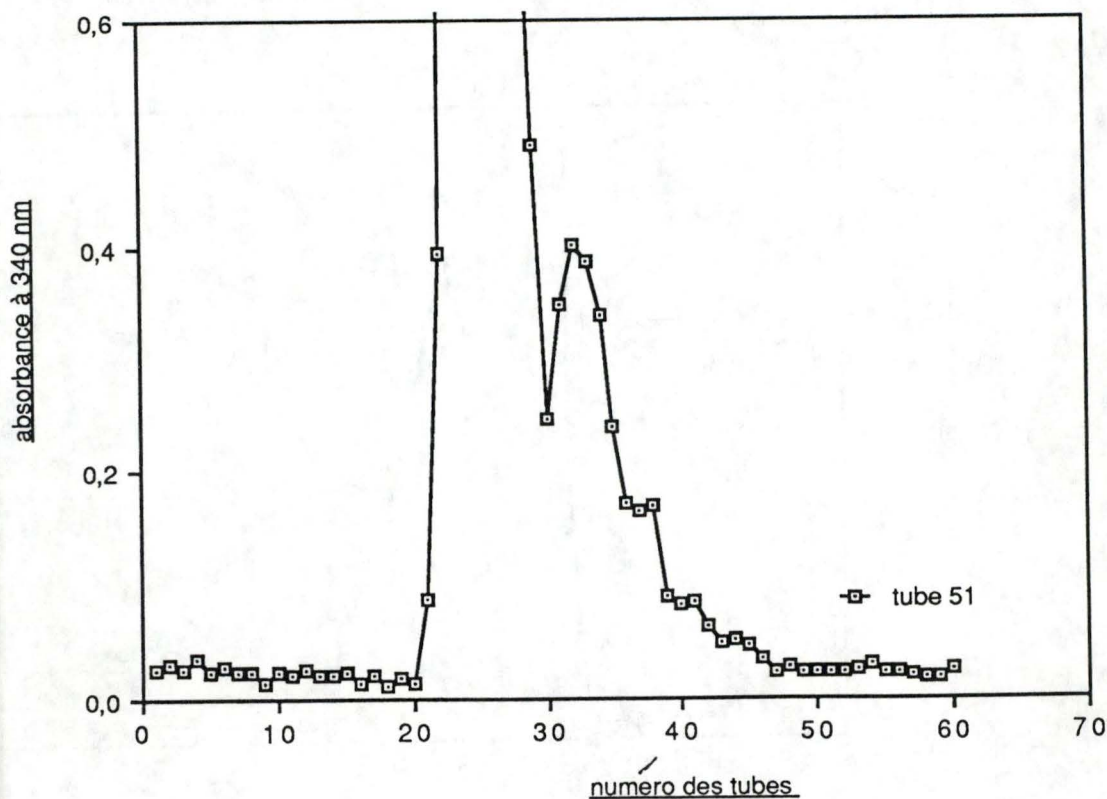


fig. 77 : dosage de l'activité après passage sur HPLC Superose 12 en tamis moléculaire du tube 51 obtenu avec la colonne Séphadex G 10 tamis moléculaire

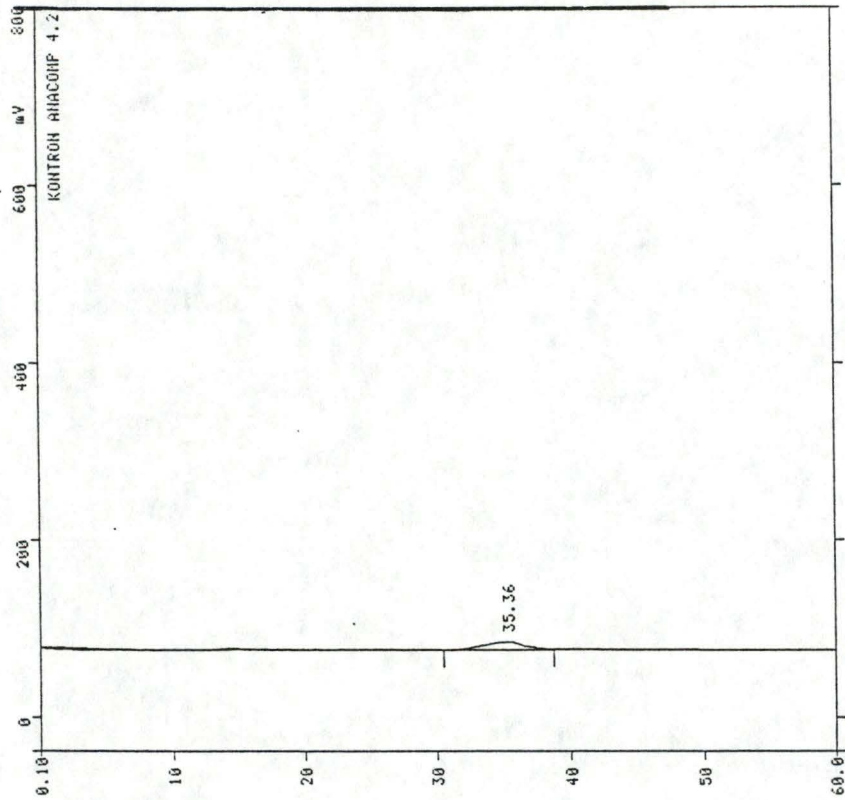


fig 78 : chromatogramme obtenu après passage sur HPLC Superose 12 tamis moléculaire du tube 55 obtenu avec la colonne Séphadex G 10 tamis moléculaire

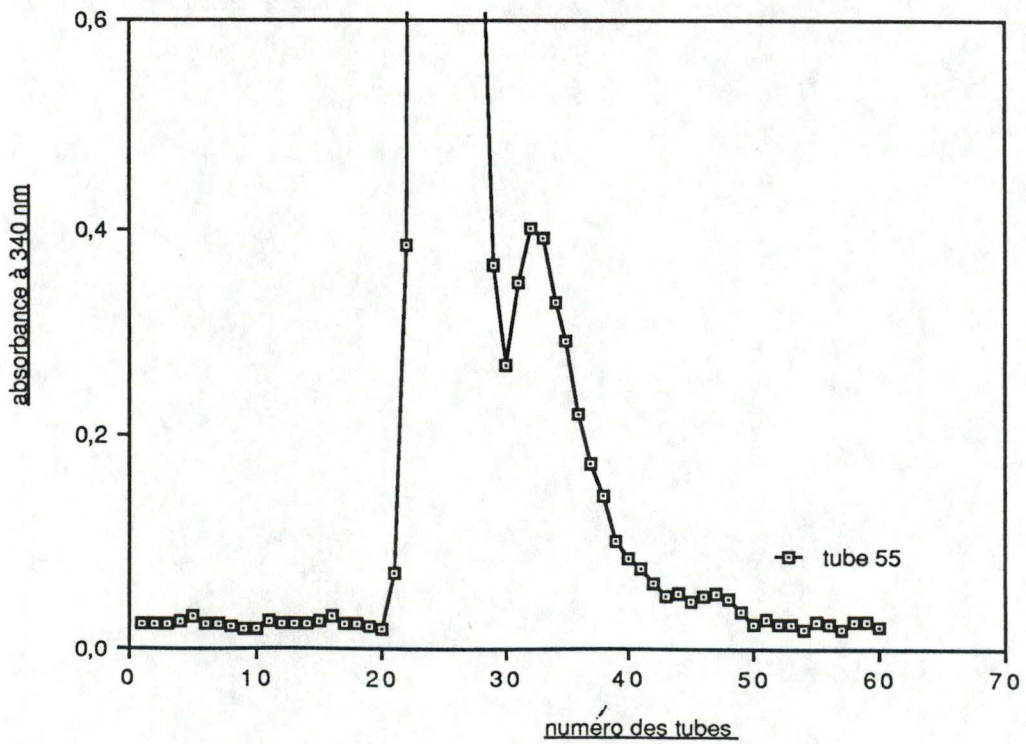


fig. 79 : dosage de l'activité après passage sur HPLC Superose 12 en tamis moléculaire du tube 55 obtenu avec la colonne Séphadex G 10 tamis moléculaire

Les différents profils de chromatographie obtenus après passage sur HPLC sont représentés aux fig. 72-74-76-78.

3.5.3.1.4 Conclusion

D'après les dosages de l'activité alcool déshydrogénase réalisés après les différents passages sur HPLC tamis moléculaire (Superose 12) (fig. 73-75-77-79), nous pouvons dire que la séparation obtenue après passage sur Séphadex G 10 n'est pas suffisante

En effet pour chaque tube injecté, nous pouvons déceler une activité ADH qui "parasite" l'échantillon et donc fausserait les colorations spécifiques que nous voulons utiliser en électrophorèse.

Pour résoudre ce problème de quantité de matériel, nous avons donc dû trouver un autre système.

3.5.3.2 Colonne Superose 12

Devant ces échecs, nous avons préféré ne pas nous attarder davantage sur ce problème, disposant d'une technique, la Superose 12, nous permettant une bonne séparation des peptides entre eux et de l'ADH, nous avons préféré conserver cette technique.

Nous avons alors décidé de réaliser plusieurs passages successifs sur HPLC tamis moléculaire Superose 12 (au nombre de 6) dans un tampon d'élution à faible force ionique et de rassembler les tubes correspondant aux peptides de chacun de ces passages. Le volume d'échantillon, ainsi obtenu, a été lyophilisé. Le lyophilisat a été resuspendu dans quelque μl de tampon tris-HCl 0,1 M pH 8,9 (préparation qui a pu être déposée sur le gel d'électrophorèse).

Cette méthodologie assez longue nous permettait cependant d'obtenir des quantités suffisantes de peptides relativement bien purifiés pour réaliser la suite des expérimentations.

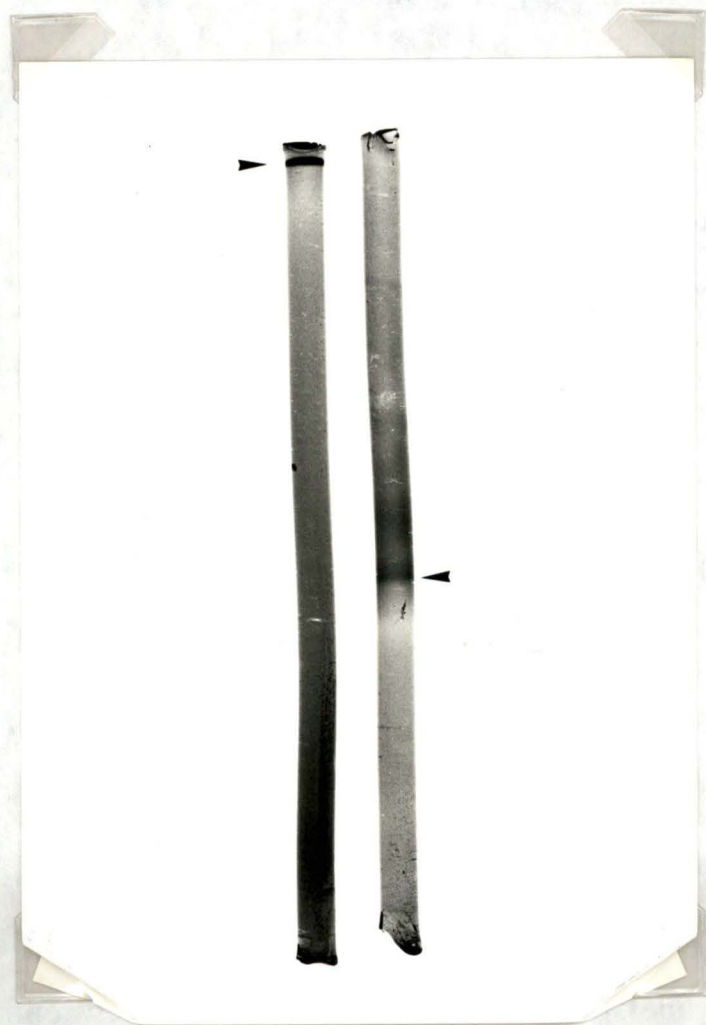


fig. 80 : photo obtenue après électrophorèse sur gel d'acrylamide.
A gauche le gel sur lequel nous avons déposé le peptide
A droite le gel sur lequel nous avons déposé l'ADH native

3.5.4 Révélation du peptide par électrophorèse

Afin de séparer le peptide, nous avons réalisé des électrophorèses sur gel d'acrylamide. Au cours de ces électrophorèses, la migration des échantillons est influencée par la charge des protéines déposées sur le gel. Cette propriété allait donc permettre de séparer le peptide de ses éventuels contaminants.

3.5.4.1 Analyse des électrophorèses (fig. 80)

Nous avons réalisé une électrophorèse sur les 6 fractions peptidiques concentrés comme décrite au paragraphe 2.2.2.6.1

Après une heure de migration, nous avons coloré les gels selon la méthode exposée au paragraphe 2.2.2.6.1.4, qui permet donc de révéler la présence d'une activité alcool déshydrogénase.

Après coloration, le gel sur lequel nous avons déposé un échantillon de peptides présente une bande près du sommet. Nous pouvons observer sur le gel contrôle sur lequel nous avons déposé de l'ADH native à même concentration, la présence d'une bande située environ au milieu de celui-ci.

Le peptide a donc nettement moins migré que l'ADH.

3.5.4.1.2 Conclusion

Au vu de cette électrophorèse nous pouvons dire que nous avons bien mis en évidence un peptide résultant d'une digestion trypsique de l'ADH, et possédant bien une activité ADHase, nous pouvons également en conclure que le peptide, possède des propriétés électrophorétiques très différentes par rapport à celles de l'enzyme native.

Dans le paragraphe relatif aux caractéristiques générales de l'alcool déshydrogénase de levure, nous notons que le point isoélectrique de cette enzyme est de 5,4. Le point isoélectrique du peptide nous est inconnu mais nous pouvons l'estimer d'après les résultats de l'électrophorèse. En effet, nous savons que lorsque nous sommes, à un pH isoélectrique caractéristique, le peptide ne migre pas dans un champ électrique (LEHNINGER, 1977). Nous pouvons donc en conclure vu l'absence de migration de la bande peptidique au sommet du gel que le peptide a un point isoélectrique proche de 8,9.

Nous avons alors abordé la dernière partie de notre travail qui consistait à vérifier la présence d'un tripeptide lié à l'atome de zinc dans notre fragment peptidique.

3.6 Essai de séparation des différents peptides liés au zinc

3.6.1 Introduction

D'après les différents sites d'action de la trypsine, nous avons émis l'hypothèse que le peptide qui intéressait notre travail, c'est-à-dire le "peptide" catalytique, était composé de trois peptides liés au zinc.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de dissocier ce complexe formé de trois peptides liés au zinc par la Cys 46 et 174 ainsi que par l'His 67.

Nous nous proposons donc après avoir réalisé la réduction de ces liaisons de séparer les fragments en HPLC tamis moléculaire et en phase inverse (C 18).

Mais avant toute chose, il fallait d'abord être tout à fait certain de la présence de ce zinc dans le tube catalytique. Nous avons dosé le zinc, par absorption atomique (voir paragraphe 2.2.2.7), afin de montrer sa présence dans le tube présentant de l'activité. Nous avons superposé ce dosage à celui de l'activité enzymatique.

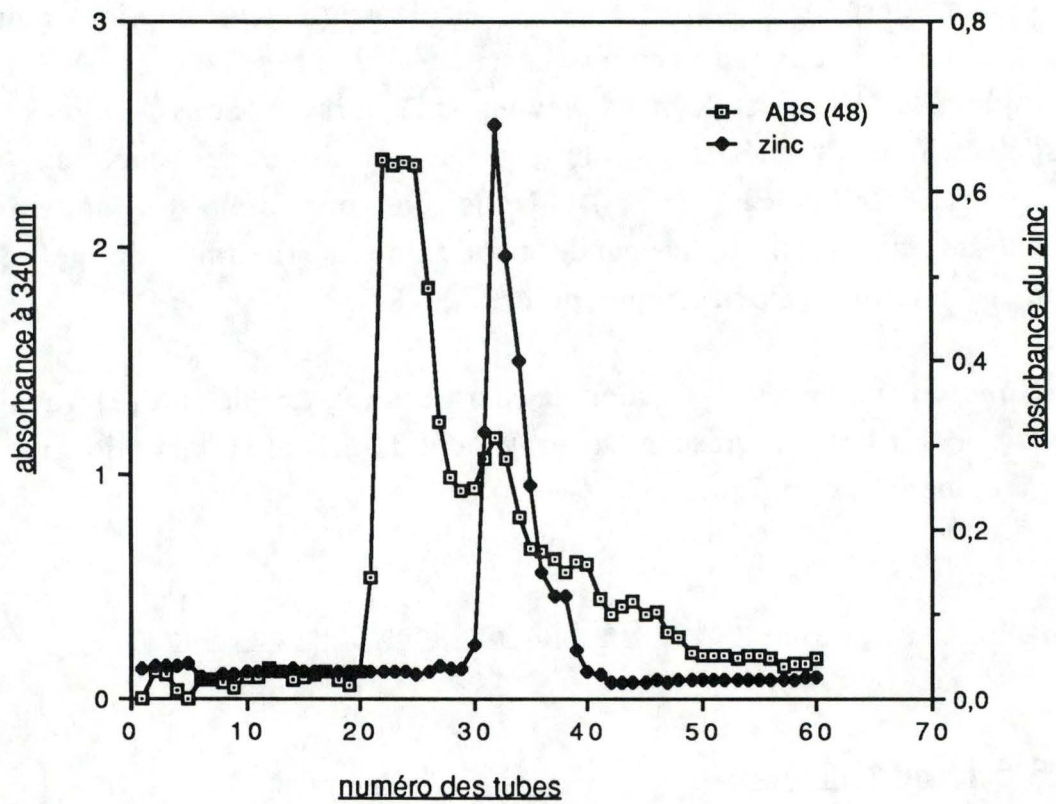


fig. 81 : superposition de la variation d'absorbance à 340 nm et de l'absorbance du zinc après séparation du lysat trypsinique (48 heures) sur tamis moléculaire Superose 12

3.6.2 Dosage du zinc

Il est à signaler que pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé le contenu du tube 32 obtenu sur la Superose 12 c'est-à-dire le tube présentant le maximum d'activité pour le peptide, en utilisant les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire l'utilisation d'un tampon phosphate 50 mM pH 7,5 NaCl 0,9 % pour l'HPLC tamis moléculaire.

3.6.2.1 Analyse de la chromatographie (fig.81)

3.6.2.1.1 Dosage de l'activité alcool déshydrogénase

Nous pouvons remarquer comme précédemment la présence de deux pics. Le premier correspond à la présence de trace d'ADH non hydrolysée (tube 21 à 29). Le deuxième correspond à la présence du peptide (tube 29 à 34 avec un maximum au tube 32).

3.6.2.1.2 Dosage du zinc

Nous pouvons observer la présence d'un seul pic qui est compris entre les tubes 30 à 38 avec un maximum au tube 32.

3.6.2.2 Conclusion

Le maximum de la variation d'absorbance à 340 nm et donc de l'activité est situé au tube 32. Nous pouvons remarquer que le maximum de l'absorbance pour le zinc se situe également au tube 32. Ces deux observations apportent un argument en faveur de l'hypothèse émise ci-dessus, elles prouvent la présence dans les tubes où se trouve

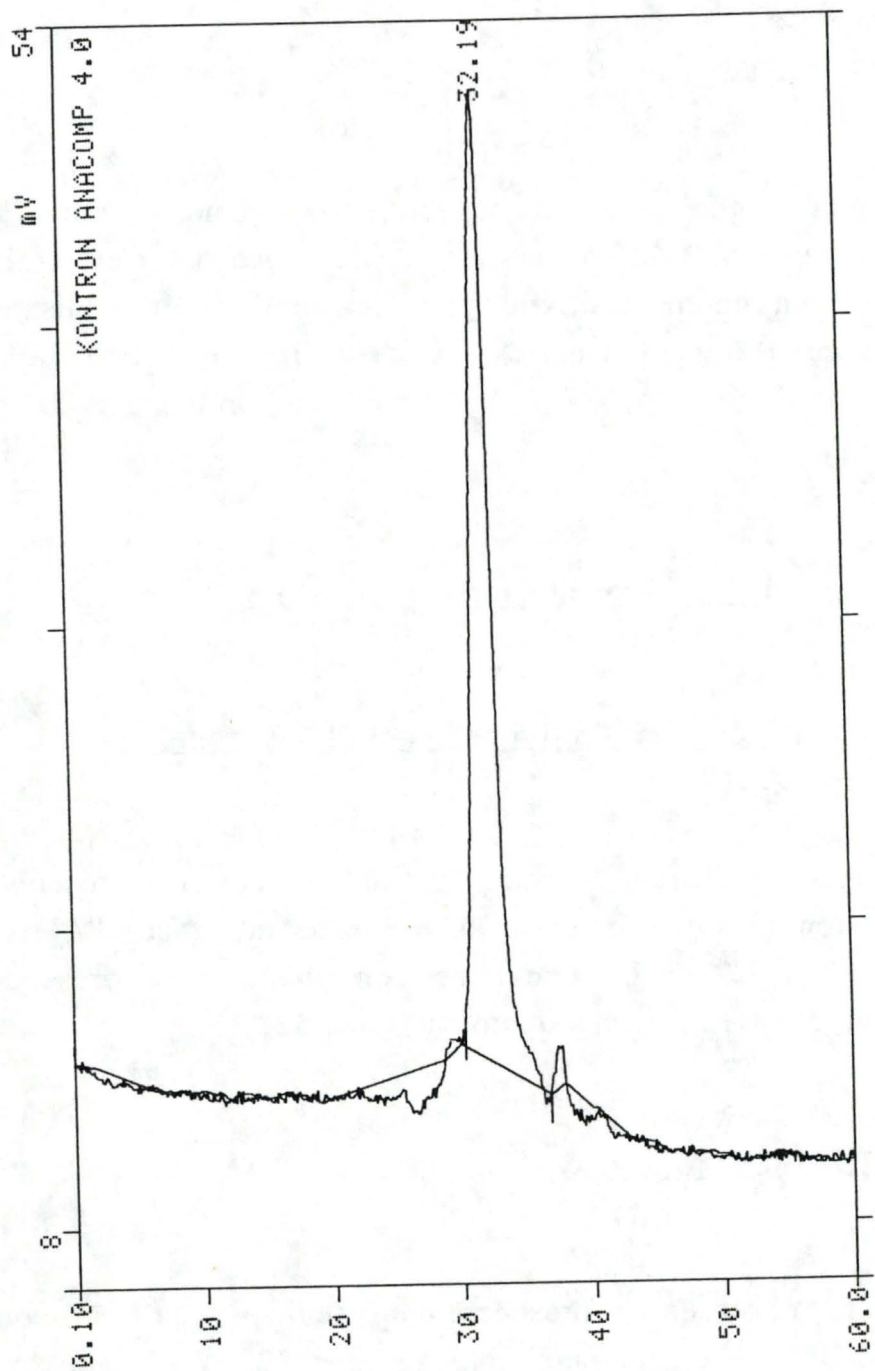


fig. 82 : chromatogramme en HPLC Superose 12 en tamis moléculaire du tube 32 en absence de DTT

l'activité catalytique et indique aussi que notre hypothèse de trois fragments peptidiques vaut la peine d'être vérifiée.

3.6.3 utilisation de différents agents susceptibles de réduire les liaisons zinc-peptide

Nous avons tenté de réduire cette liaison zinc-peptide en utilisant principalement deux agents : le DTT et le pH.

3.6.3.1 Utilisation du DTT

Nous avons utilisé le dithiothréitol (DTT), réducteur agissant dans des conditions douces, dans l'espoir de déplacer l'équilibre du complexe et donc de le dissocier.

Pour ce faire, nous avons utilisé le mode opératoire décrit au paragraphe 2.2.2.7 sur le tube n° 32 obtenu sur la Superose 12

Pour tenter de mettre en évidence une dissociation, nous avons injecté 100 µl d'échantillon réduit sur HPLC tamis moléculaire (Superose 12).

Si dissociation il y a eu, nous devrions observer la présence de plusieurs pics, tandis que si la dissociation n'a pas eu lieu, il doit y avoir un seul pic (identique à celui du contrôle).

3.6.3.1.1 Analyse des chromatogrammes en tamis moléculaire

Pour avoir un contrôle de la dissociation, nous avons injecté 100 µl d'échantillon peptidique n'ayant subi aucun traitement. Le chromatogramme obtenu est représenté à la fig. 82

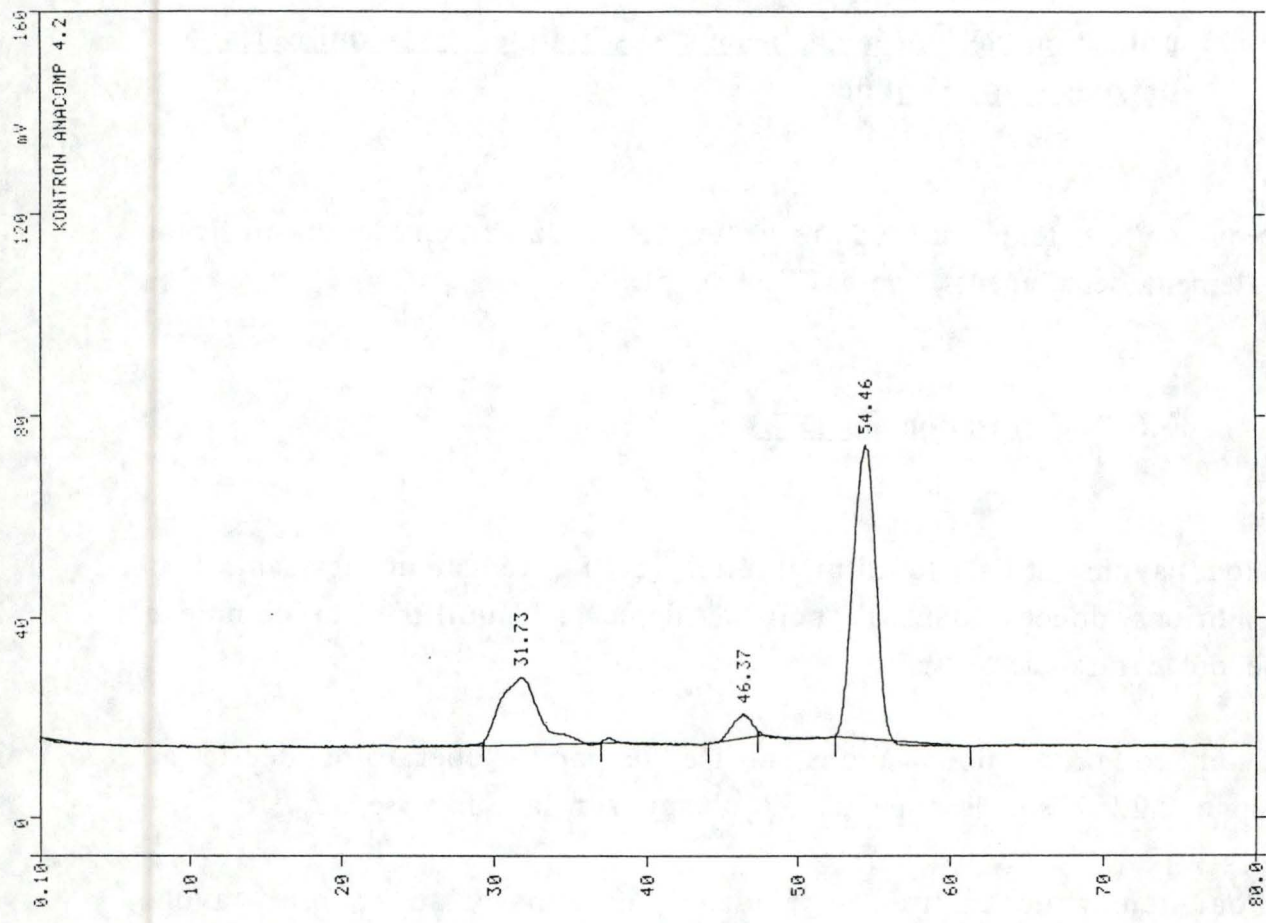


fig. 83 : chromatogramme en HPLC Superose 12 en tamis moléculaire du tube 32 en présence de DTT

Nous pouvons remarquer la présence d'un seul pic s'éluant après 32 minutes, ce qui correspond à ce que nous attendions vu la sélection à l'origine du tube 32.

Lorsqu'on injecte sur HPLC Superose 12, 100 μ l de l'échantillon qui a été mis en présence de DTT, nous obtenons le chromatogramme représenté à la fig. 83.

Le pic déjà observé lors du chromatogramme précédent est toujours présent à 32 minutes, mais nous remarquons la présence de deux nouveaux pics s'éluant respectivement après 46 et 54 minutes.

Donc nous pouvons remarquer la présence de trois pics dans cet échantillon réduit.

A première vue nous pouvions penser que l'objectif était atteint, puisque deux nouveaux pics correspondant à de petits poids moléculaires étaient détectés. Cependant le contrôle obtenu en injectant la solution de DTT sur la Superose 12 montre la présence de deux pics qui s'éluent respectivement après 46 et 54 minutes (fig. 84).

Nous pouvons donc conclure que les observations faites lors du chromatogramme précédent ne correspondent pas à ce qu'on attendait c'est-à-dire ne représentent pas des pics de peptides.

Après analyse de ces deux pics, nous pouvons dire que le pic situé à 46 minutes contient du DTT polymérisé, (en effet la molécule de DTT peut se polymériser en formant des ponts disulfures), et que le pic situé à 54 minutes contient du DTT sous forme libre.

Nous avons voulu cependant analyser la composition du pic de peptides s'éluant à 32 minutes, car il se pouvait que malgré la réduction, les trois peptides soient restés associés.

Nous avons réinjecté l'échantillon "réduit" sur une colonne HPLC phase inverse (C 18) permettant, comme mentionné plus haut, de séparer spécifiquement chaque peptide.

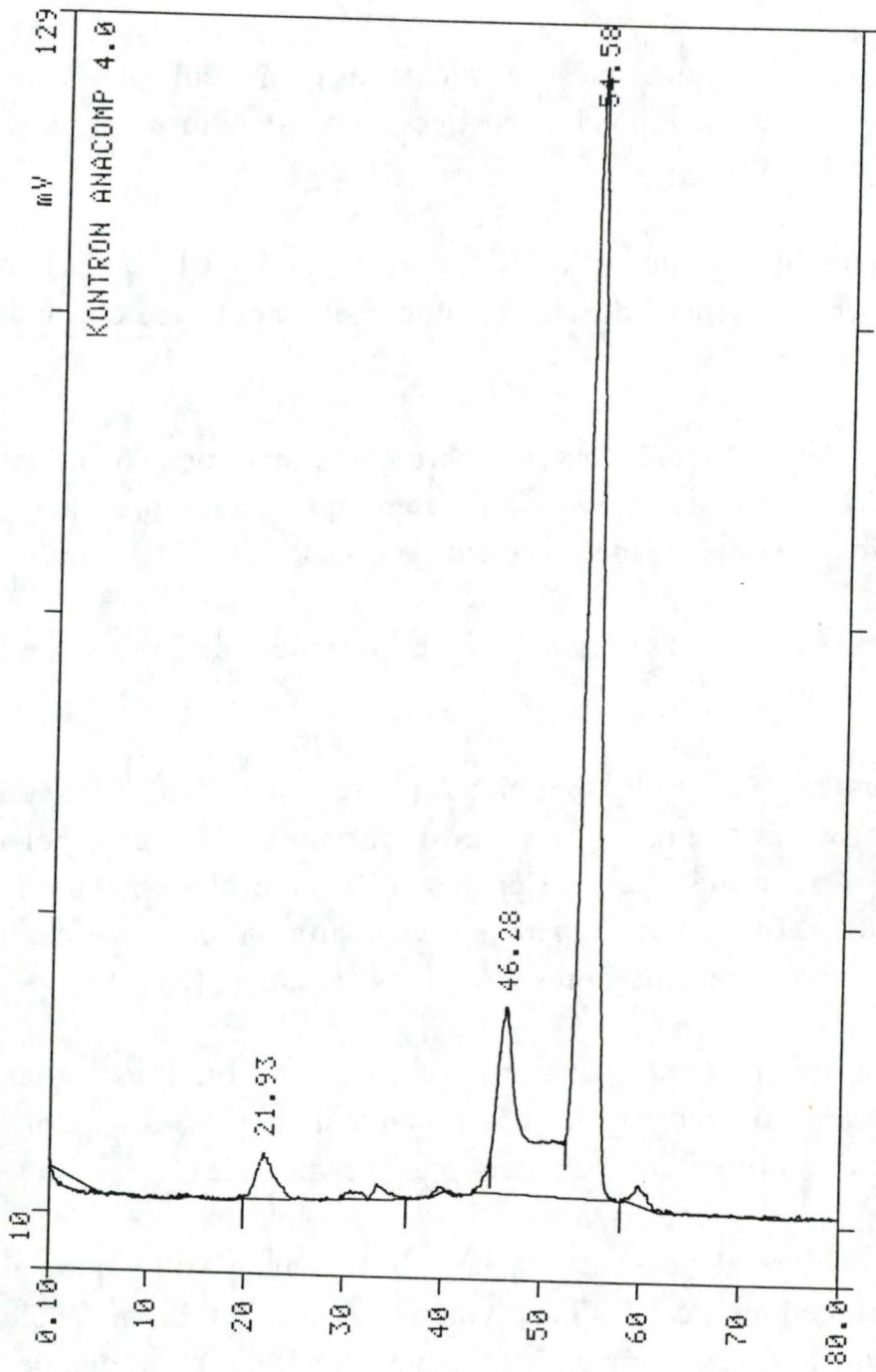


fig. 84 : chromatogramme en HPLC Superose 12 en tamis moléculaire d'une solution de DTT

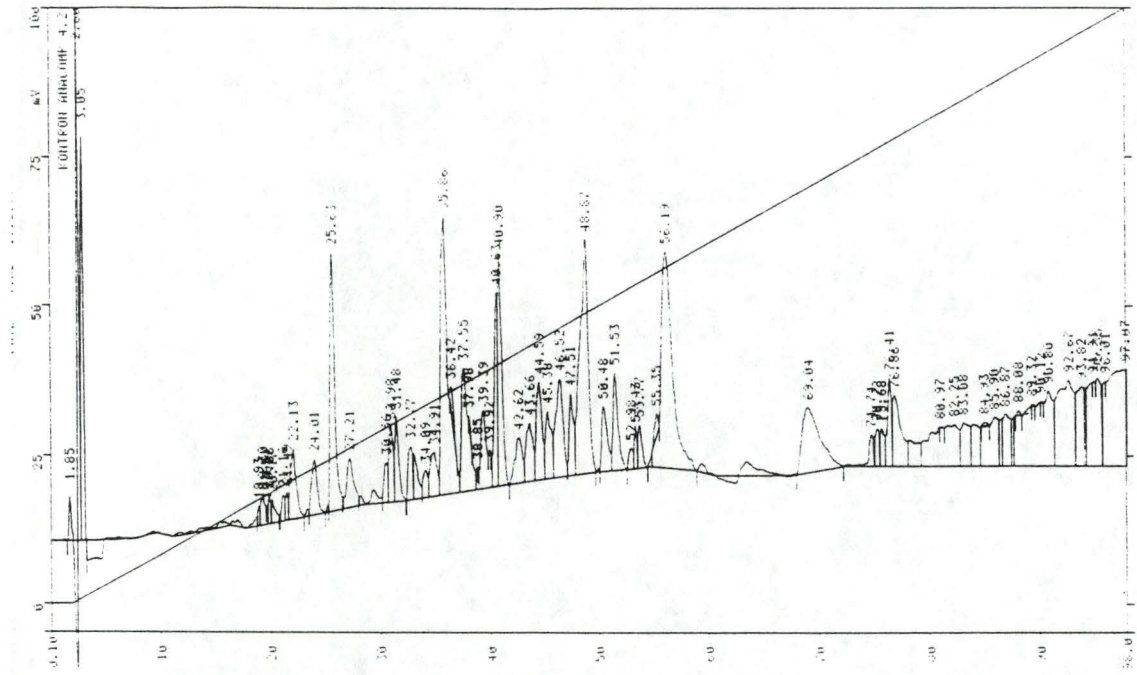


fig. 85 : chromatographie en HPLC phase inverse du tube 32 en absence de DTT

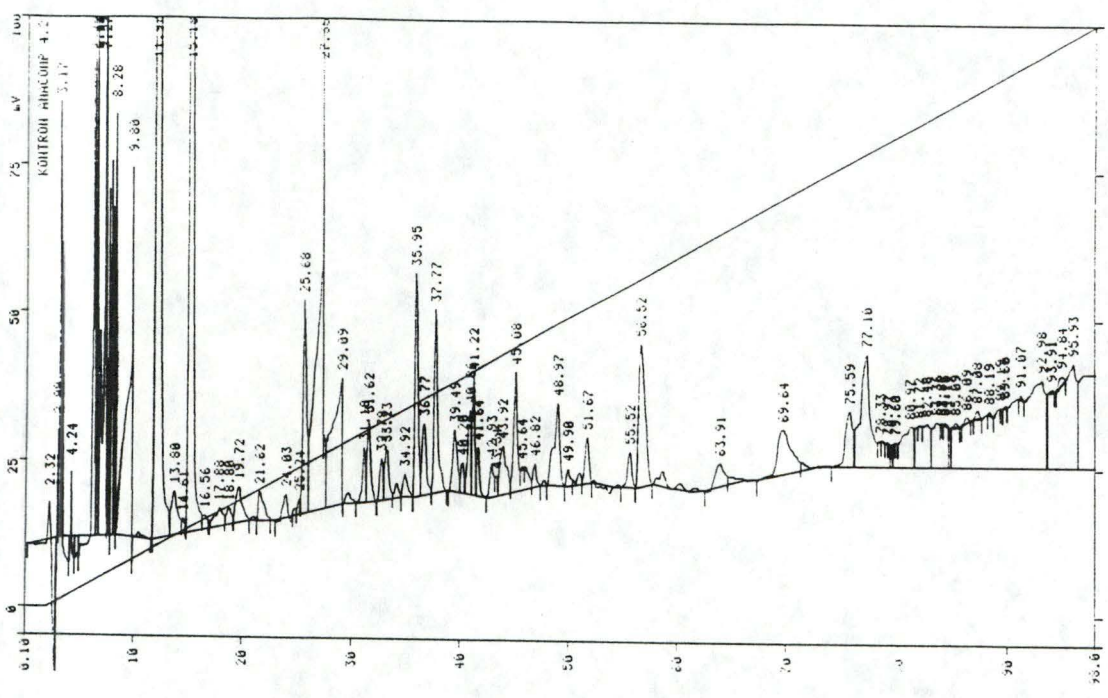


fig. 87 : chromatographie en HPLC Superose 12 en tamis moléculaire du tube 32 en présence de DTT

3.6.3.1.2 Analyse des chromatogrammes en HPLC phase inverse(C-18)

Le chromatogramme, obtenu après injection de 100 μ l du tube 32 ne contenant pas de DTT et nous servant de contrôle, est représenté à la fig. 85. Les conditions d'utilisation de la phase inverse sont identiques à celles utilisées pour vérifier la réalisation de la lyse trypsinique (cf. 2.2.2.2)

Sur celui-ci nous pouvons remarquer de nombreux pics. Les pics situés avant 5 minutes correspondent aux pics d'injection, tandis que les petits pics situés après 60 minutes correspondent aux variations dues au gradient.

Les pics, s'éluant entre 20 et 60 minutes, nous intéressent tout particulièrement car ils correspondent aux peptides présents dans le tube 32.

Comme autre contrôle, nous avons injecté 100 μ l d'une solution de DTT.

Sur le chromatogramme représenté à la fig. 86 nous pouvons observer la présence de deux pics principaux situés après 11 et 16 minutes et donc correspondant au DTT.

Connaissant le profil chromatographique du DTT, nous pouvons injecter 100 μ l d'une solution de peptide réduit au DTT.

Le chromatogramme obtenu après HPLC phase inverse est représenté à la fig. 87. Sur celui-ci nous pouvons observer la présence de nombreux pics, mais dont la composition de certains est connue.

En effet les pics situés dans les 8 premières minutes correspondent au pics d'injection; ceux situés entre 11 et 16 minutes correspondent au DTT (cf fig. 87) et des pics situés après 60 minutes ne sont pas intéressants pour l'analyse.

Le zone qui nous intéresse est la zone comprise entre 20 et 60 minutes, car cette zone correspond aux peptides présents dans le tube 32.

Si on compare cette zone avec celle obtenue lors du chromatogramme observé en absence de DTT, nous pouvons remarquer un profil assez semblable.

Nous pouvons cependant noter quelques différences dans ces chromatogrammes. En effet d'une part, certains pics sont nettement plus marqués en absence de DTT (pics situés à 25, 35, 40; 48, et 56 minutes). D'autre part, certains pics présentent une intensité plus grande (pics situés à 27, 37, et 45 minutes) en présence de DTT qu'en absence de DTT

Cette observation allait dans le sens d'une modification de certains peptides après réduction. Il nous fallait cependant tenir compte d'un autre paramètre expérimental.

En effet, les injections en phase inverse se déroulent dans des solutions acidifiées par la présence de TFA. Le pH des solvants sont en fait compris entre 2 et 3. Peut-être ce pH acide serait-il responsable de la possible dissociation du zinc des peptides ? Nous avons donc voulu étudié l'effet de ce pH sur la dissociation des peptides.

3.6.3.2 Influence du pH

Nous avons étudié l'influence du pH sur la dissociation du complexe peptides-zinc car, comme on vient de le souligner, lors d'une injection en phase inverse nous utilisons un solvant composé de 0,05 % de TFA et d'eau. Le pH de cette solution est de 2,5.

Pour se situer dans des conditions de pH semblables, nous avons ajouté 0,4 ml de solvant TFA à 0,5 % au tube 32 récolté lors de la lyse trypsinique. Ce volume d'acide d'obtenir un pH de 2.

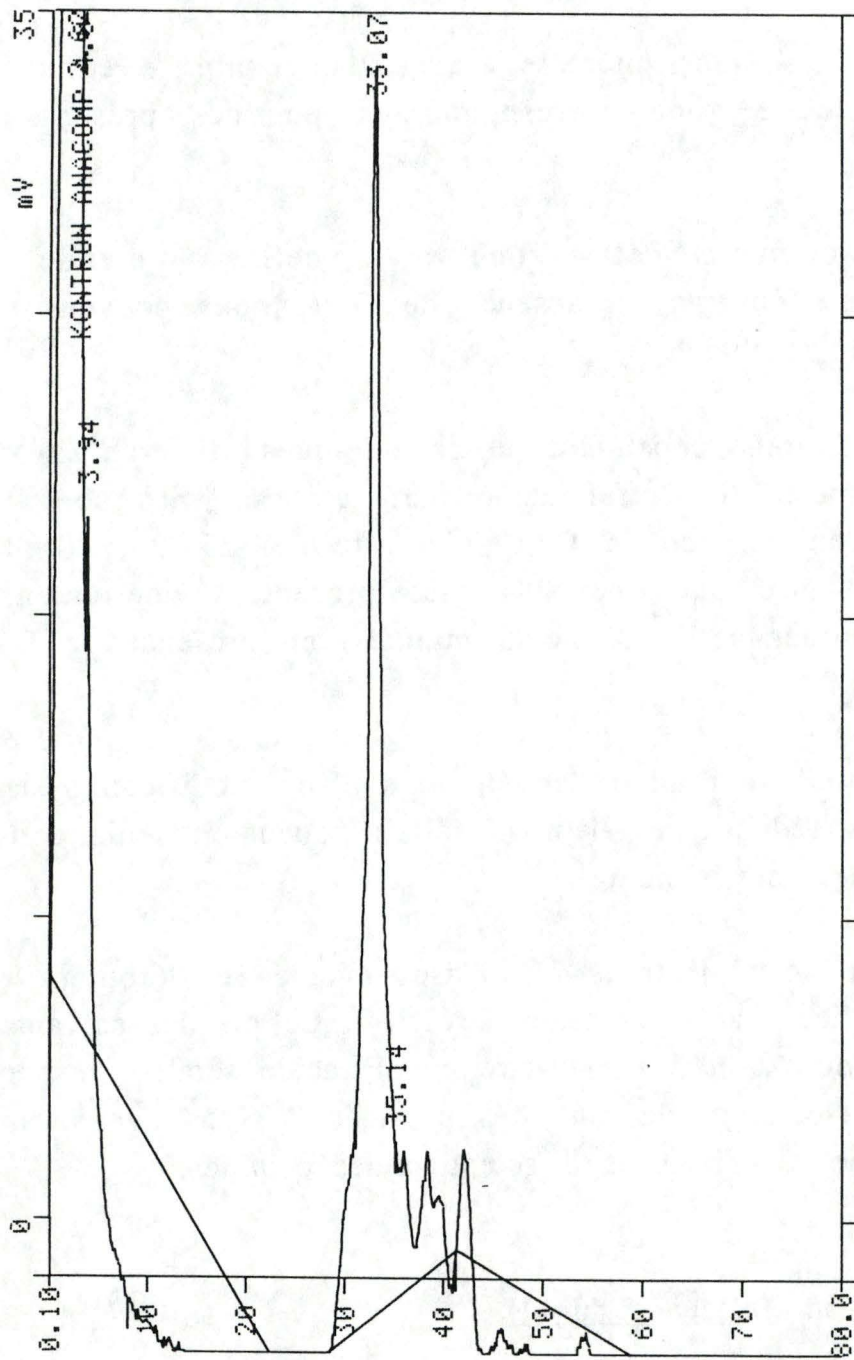


fig. 88 : chromatographie en HPLC Superose 12 en tamis moléculaire du tube 32 incubé pendant 12 heures en milieu acide. Tampon d'éluion phosphate 50 mM

Après une incubation de 12 heures dans ce milieu acide, nous avons injecté 100 μ l d'échantillon sur la colonne Superose.

3.6.3.2.1 Analyse du chromatogramme en tamis moléculaire

Le chromatogramme obtenu est représenté à la fig. 88.

Nous pouvons remarquer la présence sur celui-ci d'un pic principal présent dans le tube tandis que les petits pics postérieurs pourraient représenter les peptides dissociés. Le chromatogramme témoin a été présenté à la fig. 82.

Etant donné que nous observons la présence de plusieurs pics, nous avons essayé d'injecter 100 μ l de l'échantillon incubé en milieu acide, mais en utilisant cette fois un tampon d'élution acide et non plus dans un tampon phosphate à pH 7,5. Ce tampon se compose de TFA 0,1 % et d'eau. Il présente un pH de 2,5.

Nous avons utilisé ce tampon d'élution acide afin d'éviter une éventuelle réassociation des différents fragments peptidiques.

Le chromatogramme obtenu en utilisant ce tampon est représenté à la fig. 89.

Nous pouvons remarquer la présence de trois pics. Le premier se situe à 33 minutes, c'est-à-dire à l'endroit habituel. Les deux autres s'éluent plus loin et correspondent donc à des peptides de poids moléculaire plus faibles.

3.6.4 Conclusion

Cette dernière expérience indique donc qu'en milieu acide et après réduction au DTT, on observe une dissociation de certains peptides contenus dans le tube correspondant à 32 minutes d'élution de la Superose 12.

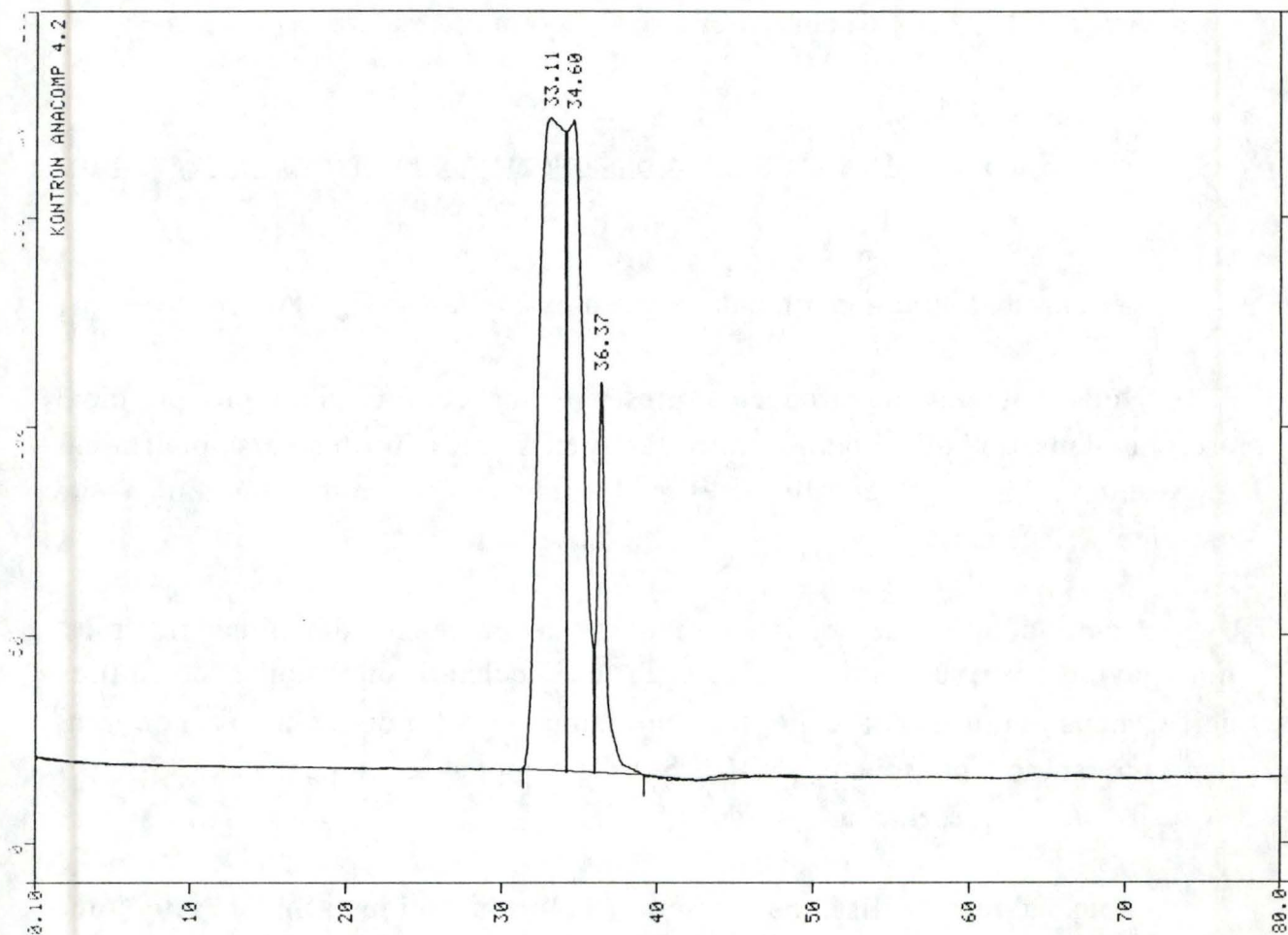


fig. 89 : chromatographie en HPLC Superose 12 en tamis moléculaire du tube 32 incubé pendant 12 heures en milieu acide. Tampon d'élution solution TFA 0,1 %

Cette dissociation pourrait donc correspondre aux prévisions établies dans l'introduction à savoir la dissociation de peptides liés au zinc et qui posèderaient l'activité alcool déshydrogénase.

L'analyse en phase inverse sur une colonne C 18 étant réalisé en milieu acide est donc difficile à interpréter puisqu'il se peut qu'une partie déjà du complexe zinc-peptide ait été dissocié par le milieu d'élution de la chromatographie.

Malgré tout, on observe une modification de l'intensité de certains de ces pics après une addition de DTT (fig. 87). Ces résultats confirment la difficulté d'analyse des peptides tout en gardant l'activité enzymatique. En effet, ils indiquent que dans les conditions d'analyse et, de chromatographie réalisées sur Superose 12 qui permettaient de garder l'activité catalytique, ce qui favorisait aussi des interactions non covalentes entre les peptides, et créeraient ainsi des associations qui fausseraient l'analyse des peptides et la détermination des divers poids moléculaires.

Ceci explique sans doute la raison pour laquelle autant de peptides se retrouveraient dans ce tube 32 de la chromatographie sur Superose lorsqu'ils étaient analysés en conditions de dissociation à pH 2,5 en phase inverse (fig. 85). C'est l'ensemble de ce comportement des peptides qui a complexifié l'analyse de ce fragment peptidique au cours de ce travail.

IV CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de ce travail, nous avons étudié les caractéristiques biochimiques d'un peptide obtenu après lyse trypsinique de l'ADH, et possédant une activité alcool déshydrogénase.

Avant de procéder aux différentes analyses, nous avons vérifié la véracité de cette activité en incubant les fragments peptidiques obtenus après la lyse, en présence ou en absence d'un de ces deux substrats : l'éthanol. Lorsque le milieu ne contient pas ce substrat, nous ne pouvons observer aucune activité alcool déshydrogénase, ce qui indique que l'activité observée n'est pas due à un artéfact.

Dans les études concernant la modification des protéines, deux grands axes de recherche sont actuellement envisagés, l'un vise à diminuer la spécificité de l'enzyme, tandis que l'autre vise à augmenter la stabilité à haute température. Nous avons essayé de voir si le fragment peptidique intéressant pour notre travail, possédait des propriétés modifiées quand à la spécificité et la stabilité à haute température.

D'une part, dans l'étude sur la spécificité de ce fragment peptidique, nous avons pu montrer une spécificité moins grande vis-à-vis de différents substrats alcooliques et spécialement vis-à-vis du méthanol.

D'autre part, dans l'étude relative à la stabilité à haute température du fragment peptidique, nous n'avons pas pu montrer de modification de propriétés allant dans ce sens. En réalité la stabilité à basse température est la meilleure.

Après ces caractérisations biochimiques, nous avons étudié différents agents (durée d'hydrolyse, urée, sels) pouvant influencer l'activité et son rendement.

Après avoir testé ces agents, nous en avons conclu que l'hydrolyse de l'ADH par la trypsine devait se dérouler en présence d'urée, pendant

48 heures à une température de 20° C et que le tampon d'éluion utilisé pour la séparation des fragments peptidique était un tampon phosphate 50 mM pH7,5 NaCl 0,9 %. Ces conditions expérimentales nous ont permis d'obtenir un meilleur rendement de l'activité.

D'après les considérations théoriques relatives à la lyse trypsinique, nous avons émis l'hypothèse que le fragment peptidique possédant une activité était en fait composé de trois peptides reliés entre eux par un atome de zinc. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de dissocier le complexe zinc-peptide en utilisant différents "réducteurs" (DTT et pH). Nous avons pu montrer qu'il y avait une dissociation du complexe, après réduction et en maintenant le peptide en milieu acide.

Pour que ce travail soit complet, il serait intéressant d'isoler ces fragments et de pouvoir réaliser leur séquencage, ceci afin d'obtenir la séquence primaire de ces fragments et de pouvoir positionner ceux-ci dans la structure primaire de l'ADH native, afin de pouvoir infirmer ou confirmer l'hypothèse formulée en début de ce travail.

Le fait d'avoir pu mettre en évidence un fragment peptidique obtenu après une lyse trypsinique d'une enzyme, fragment possédant une activité catalytique enzymatique et des caractéristiques biochimiques différentes de celles de l'enzyme native, permet de formuler diverses perspectives, spécialement dans le domaine de l'ingénierie des protéines.

En effet, ces résultats montrent qu'il est possible d'obtenir des catalyseurs plus petits qui, par une moindre spécificité, peuvent dans notre cas oxyder d'autres alcools et peut-être des fonctions alcools sur diverses molécules organiques.

Pour ce faire, il faudra évidemment augmenter la vitesse de réaction qui est très faible.

Les apports biochimiques et chimiques ne manquent cependant pas à partir du moment où une séquence peptidique pourra se révéler comme capable de réaliser la catalyse d'une réaction chimique intéressante.

BIBLIOGRAPHIE

AKESON, A.,

on the zinc content of horse liver alcohol dehydrogenase,
Biochemical and biophysical research communications,
1964, vol. 17, n° 3, pp. 211-214

BERGMEYER, H. V.,

Methods of enzymatic analysis, New-york, Academic Press,
1974.

BIGELOW, C. C.,

On the average hydrophobicity of proteins and the relation
between it and protein structure, Journal theoretical biology,
1967, vol. 16, pp. 187-211.

BILLE, V.,

Developpement d'une méthode d'immobilisation
enzymatique avec modification du microenvironnement.
Répercussions sur les propriétés d'un système enzymatique
immobilisé., Dissertation présentée pour l'obtention du grade
de docteur en sciences, FUNDP, Namur, 1987, 196 p.

BILLE, V., PLAINCHAMP, D., REMACLE, J.,

Affinity and stability modification of immobilised alcohol
dehydrogenase through multipoint copolymerisation,
Biochimica biophysica acta, 1987, vol. 915, pp. 393-398

BILLE, V., PLAINCHAMP, D., LAVIELLE, S., CHASSAING, G., REMACLE, J.,

Effect of the microenvironment on the kinetic properties of
immobilised enzymes, European journal of biochemistry,
1989, vol. 180, pp. 41-47.

BRANDEN, C.-I., JÖRNVALL, H., EKLUND, H., FURUGREN, B.,

Alcohol dehydrogenases, in : BOYER, P., LARDY, H.,
MYRBÖCK, K., The enzyme : oxydation-reduction part A
dehydrogenase (I) electron transfert (I), 3rd ed.,
vol. 11, ch. 3, New-york, Academic press, 1975, pp.103

BRESLOW, R.,

Artificial enzyme, Science, 1982, vol. 218, n° 5, pp. 532-537.

BROCK, T. D.,

La vie à haute température, La recherche, 1988,
vol. 19, n° 198, pp. 476-485

BOWEN, W. R., PAUGH, S. J. R., SCHAMBURGH, M. J. D.,

Inhibitor of horse liver and yeast ADH by aromatic and
aliphatic aldehydes, J. Chem. Techn. Biotchnol., 1986,
vol. 36, n° 4, pp. 191-196

CHAKRAVARTY, P. K., MATHUR, K. B., DHAR, M. M.,

The synthesis of a decapeptide with glycosidase activity,
Experientia, 1972, vol. 29, pp. 786-788.

CRAM, D. J.,

Cavitands : organic hosts with enforced cavities., Science,
1983, vol. 219, n° 4 589, pp. 1 177-1 183.

DELFORGE, D.,

Caractérisation de l'alanine deshydrogenase avant et après
son activation au SPDP dans une perspective d'immobilisation
par liens peptidiques, Mémoire de licence en sciences
biologiques, FUNDP, Namur, 1988, 102 p.

DICKINSON, F. M.,

The binding of dihydronicotinamide-adenine dinucleotide
and pyridine-3-aldehyde-adenine dinucleotide by yeast
alcohol dehydrogenase., Biochemical journal, 1970,
vol. 120, pp. 821-830.

DICKINSON, F. M., MONGER, G. P.,

A study of the kinetics and mechanism of yeast alcohol
dehydrogenase with a variety of substrates,
Biochemical journal, 1973, vol. 131, pp. 261-270.

DRUM, D. E., HARRISON, J. H., TING-KAI, L., BETHUME, J. L., VALLE, B. L.,
Structural and functional zinc in horse liver alcohol
dehydrogenase, Biochemistry, 1967, vol. 57, pp. 1434-1440.

DUNN, M. F.,
mechanisms of zinc ion catalysis in small molecules and
enzymes, in FEE, J.A., DUNN, M.F., SCHNEIDER, W., ORCHIN, M,
BOLLINGER, D.M., Structure and bonding 23, New-York,
Springer-Verlag, 1975, 191 p.

DUNN, M. F., HUTCHINSON, J. S.,
Roles of zinc ion and reduced coenzyme in the formation of a
transient chemical intermediate during the aquine liver
alcohol dehydrogenase catalysed reduction of an aromatic
aldehyde, Biochemistry, 1979,
vol. 12, n° 24, pp. 4 882-4 892.

EKLUND, H.,
Nicotinamide nucleotide dependent enzyme : coenzyme
binding in alcohol dehydrogenase, Biochemical society
transactions, 1989, vol. 17, pp. 293-296.

EKLUND, H., NORDSTRÖM, B., ZEPPEZAUER, E., SÖDERLUND, G., OHLSSON, I.,
BOIWE, T., BRANDEN, C.-I.,
The structure of horse liver alcohol dehydrogenase,
FEBS letters, 1974, vol. 44, n° 2, pp. 200-204.

HAYEN, P.,
Recherche d'une activité alcool déshydrogénase à partir de
fragments peptidiques d'une enzyme native, Mémoire de
licences en sciences biologiques, FUNDP, Namur, 1989, 79 p.

HEARN, M. T. W.,
General strategies in the separation of proteins by high-
performance liquid chromatographic methods,
Journal of chromatography, 1987, vol. 418, pp. 3-26.

- HOLLAND, M. M., LEIB, T. K., GERLT, J.A.,
Isolation and caractéization of a small catalytic domain
released from the adenylate cyclase from *Escherichia coli* by
digestion with trypsin, Jouranl of biological chemistry, 1988,
vol. 263, n° 29, pp. 14 661-14668.
- HOSSEINI, M.W.,
La catalyse supramoléculaire, La recherche, 1989,
vol. 20, n° 206, pp. 24-32.
- JÖRNVALL, H.,
The primary structure of yeast alcohol dehydrogenase,
European journal of Biochemistry, 1977, vol. 72, pp. 425-442.
- JÖRNVALL, H.,
Difference between alcohol dehydrogenase : structural
properties and evolutionary aspects,
European jouranl Biochemistrry, 1977, vol. 72, pp. 443-452.
- JÖRNVALL, H., EKLUND, H., BRANDEN, C.I.,
Subunit conformation of yeast alcohol dehydrogenase,
Journal of biological chemistry, 1978, vol.253, n° 23,
pp. 8 414-8 419
- KELLOGG, R. M.,
les enzymes artificielles, La recherche, 1984,
vol. 15, n° 156, pp. 819-837.
- KENNETH, J., WILSON, P. D.,
On introduction to protein/peptide isolation strategies for
primary structure determination,
User bulletin Applied biosystems, 1985, n° 1.
- KLIBANOV, A. M.,
Stabilization of enzyme against thermal inactivation,
Adances in Applied microbiology, 1983, vol. 29, pp. 1-28.

KLINMAN, J. P.,

Acid-base catalysis in the yeast alcohol dehydrogenase reaction, Journal of biological chemistry, 1975, vol. 250, n° 7, pp. 2 569-2 573.

LABOUZE, E.,

Le remodelage des protéines, Biofutur, 1988, n° 74, pp. 29-32.

LAURENT, J.,

Méthodes de purification d'enzymes, in :
DURAND, G., MANSON, P., Les enzymes, production et utilisation industrielle, Paris, Gauthier-Villars, 1982, 352 p.

LEHNINGER, A. L.,

Biochimie, 2ème éd.,
Paris, Flammarion médecine sciences, 1977, 1 088 p.

LENDERS, J. P., CRICHTON, R. R.,

The stabilization of amylolytic enzymes by covalent coupling to soluble polysaccharides, Biotechnology and bioengineering, 1984, vol. 24, pp. 1 343-1 351.

LORNE BURKE, T. W., MANT, C. T., HODGES, R.,

A novel approach to reversed phase preparative high performance liquid chromatography of peptide,
Journal of liquid chromatography, 1988, vol. 11, pp 1 229-1 247.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.,

Protein measurement with folin phenol reagent,
Journal of biological chemistry, 1951, vol. 193, pp. 265-275.

MANI, J. C., PIETRUSZKO, R., THEORELL, H.,

Methanol activity of alcohol dehydrogenase from human liver, horse liver, and yeast,
Archives of biochemistry and biophysics, 1970, vol. 40, pp. 52-59.

- MANT, C.T., LORNE BURKE, T.W., HODGES, R.S.,
Optimization of peptides separations in reversed-phase HPLC : isocratic versus gradient elution, Chromatographia, 1987, vol. 24, pp. 565-572.
- MARTINEK, K., GOLDMACHER, V. S., KLIBANOV, A. M., BEREZIN, I. V.,
Denaturing agents (urea, acrylamide, protect enzymes against irreversible thermoinactivation : a study with native and immobilized α -chymotrypsin and trypsin, FEBS letters, 1975, vol. 51, n° 1, pp. 152-155.
- MICHIELS C., REMACLE, J.,
Use of the inhibition of enzymatic antioxydant systems in order to calculate their physiological importance, European journal of biochemistry, 1988, vol. 177, pp. 435-443.
- MILDEVAN, A. S.,
Metals en enzyme catalysis, in : BOYER, P., LARDY, H., MYRBÖOCK, K., The enzyme : kinetics and mechanism, 3th ed., vol. 2, ch. 9, New-york, Academic press, 1975,
- MOZHAEV, V. V., SIKSNIS, V. A., MELIK-NUBAROV, N. S.,
GALKANTAITE, N. Z., DENIS, G. J., BUTKUS, E. P., ZASLAVSKY, B. Y., MESTECHKINA, N. M., MARTINEK, K.,
Protein stabilisation via hydrophilization : covalent modification of trypsin and α -chymotrypsin, European journal of biochemistry, 1988, vol. 173, pp. 147-154.
- MURALI, C., CREASER, E.H.,
Protein enineering of alcohol dehydrogenase-1. Effects of two amino acid changes in the active site of yeast ADH-1, Protein engineering, 1986, vol. 1, n° 1, pp. 55-57.
- NAITHAMI, V.K., DHAR, M.M.,
Synthetic substitute lysozyme, Biochemical and biophysical research communications, 1967, vol. 29, n° 3 pp. 368-372.

- OPPENHEIMER, H.L., GREEN, R.W., McKAY, R.H.? (1967),
Function of zinc in horse liver alcohol dehydrogenase,
Archives of biochemistry and biophysics, 1967,
vol. 19, pp. 552-559.
- PIGEOLET, E., CORBISIER, P., HOUBION, A., LAMBERT, D., MICHIELS, C.,
RAES, M, ZACHARY M.-D., REMACLE, J.,
Glutathion peroxydase, superoxide dismutase, and catalase
inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals.,
Mechanisms of ageing and development, 1990,
vol. 51, pp. 283-287.
- POPIAK, G.,
Stereospecificity of enzymatic reactions, in : BOYER, P.,
LARDY, H., MYRBÖCK, K., The enzyme : kinetics and
mechanism, 3th ed., vol. 2, ch. 3, New-york,
Academic press, 1975,
- PRICE, N. C., DWEK, R. A.,
Principles and problems in physical chemistry for
biochemists, Oxford, Clarendon Press, 1982.
- SEKHAR, V. C., PLAPP, B. V.,
Mechanism of binding of horse liver alcohol dehydrogenase
and nicotinamide adenine dinucleotide, Biochemistry, 1988,
vol. 27, n° 14, pp. 5 082-5 088.
- SKERKER, P.S., CLARK, D.S., (1989),
Thermostability of alcohol dehydrogenase : evidence for
distinct subunits with different deactivation properties,
Biotechnology and bioengineering, 1989, vol. 33, pp. 62-71.
- SRIVASTAVA, S., MATHUR, K.B., DHAR, M.M.,
Synthetic substitute enzymes : part III glutamic acid
copolymers with lysosyme like activity, Experientia, 1969,
vol. 26, pp. 11-12.

SUND, H., THEORELL, H.,

Alcohol dehydrogenase, in : BOYER, P., LARDY, H.,
MYRBÖCK, K., The enzyme : oxydation-reduction part A
nicotinamide nucleotide-linked enzymes, flavin nucleotide-
linked enzymes, 1st ed., vol. 7, ch. 2, New-york,
Academic press, 1963, pp. 25-83.

TABUSHI, I., (1982),

Cyclodextrin catalysis as a model for enzyme action,
Accounts of chemical research, 1982, vol. 15, pp. 66-72.

TANIGUCHI, S., THEORELL, H., AKENSON, A.,

Dissociation constants of the binary complex of homogeneous
horse liver alcohol deshydrogenase and nicotiniumamide
adenine dinucleotide, Acta chemica scandinavia, 1967,
vol. 21, pp. 1 903-1 920.

VAN EYS, J., KAPLAN, N.O., ,

Yeast alcohol dehydrogenase :III relation of alcohol structure
to activity, Journal of the american chemical society, 1957,
vol. 79, n° 11, pp. 2 782-2 786.