

**Les Enzymes**



**des Protéines**



**applications industrielles  
et médicales**

# Historique

- Avant 1900 : utilisation aveugle des enzymes
- Début XX<sup>ème</sup> siècle :
  - ♦ Taka-amylases
  - ♦ désencollage des textiles (Boidon-Effront)
  - ♦ extraits de pancréas pour le battage des Peaux (Röhm)
  - ♦ pancréatine dans détergent (« Burnus »)
- Fin XX<sup>ème</sup> siècle:
  - ♦ enzymes dans les lessives
  - ♦ transformation de la filière amidon
  - ♦ enzymes microbiennes pour la fabrication du fromage

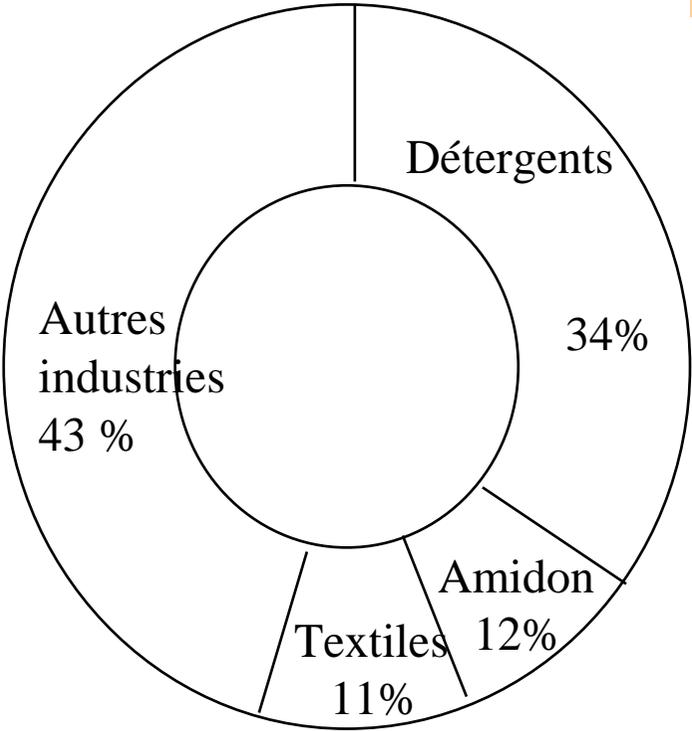
# MARCHE DES ENZYMES

3 Milliards d'€

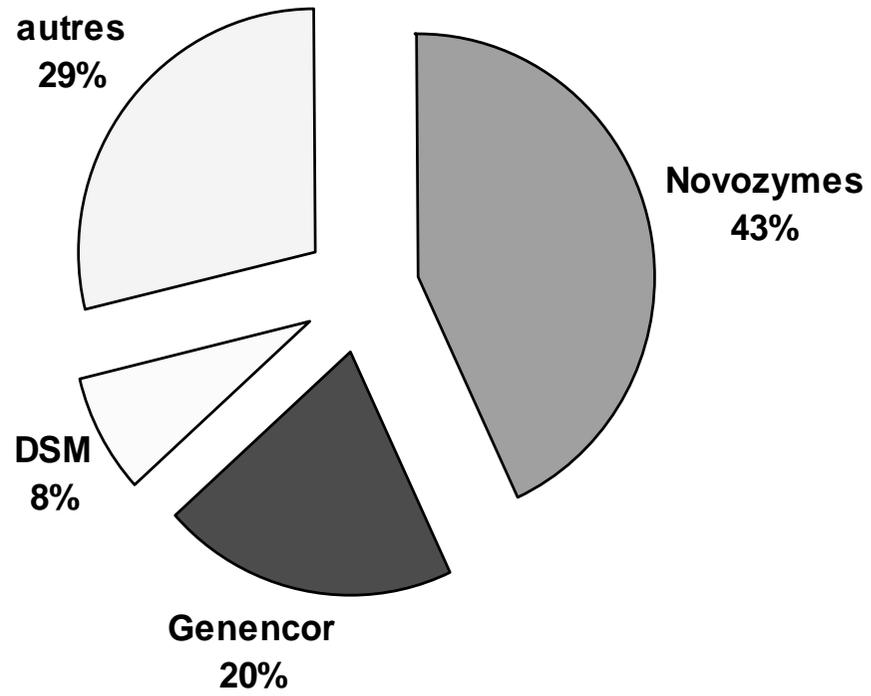
Chiffre d'affaires : + 8 %/an  
Volume consommé : + 20 % /an

- papeterie
- tannerie
- alimentation animale
- industrie chimique

- Alimentation humaine (25%)
- laiterie /fromagerie 48%
  - jus de fruits 20%
  - panification 18%
  - brasserie 7%



# PRINCIPAUX PRODUCTEURS



# Intérêt et limitations des enzymes

- Avantage :

- ◆ non-consommées au cours de la réaction
- ◆ taux de conversions élevés
- ◆ grande spécificité ( peu de sous-produits)
- ◆ non-toxiques et biodégradables
- ◆ utilisation en conditions « douces »
- ◆ production à grande échelle

- Inconvénients:

- ◆ coût
- ◆ stabilité
- ◆ catalyse en phase hétérogène

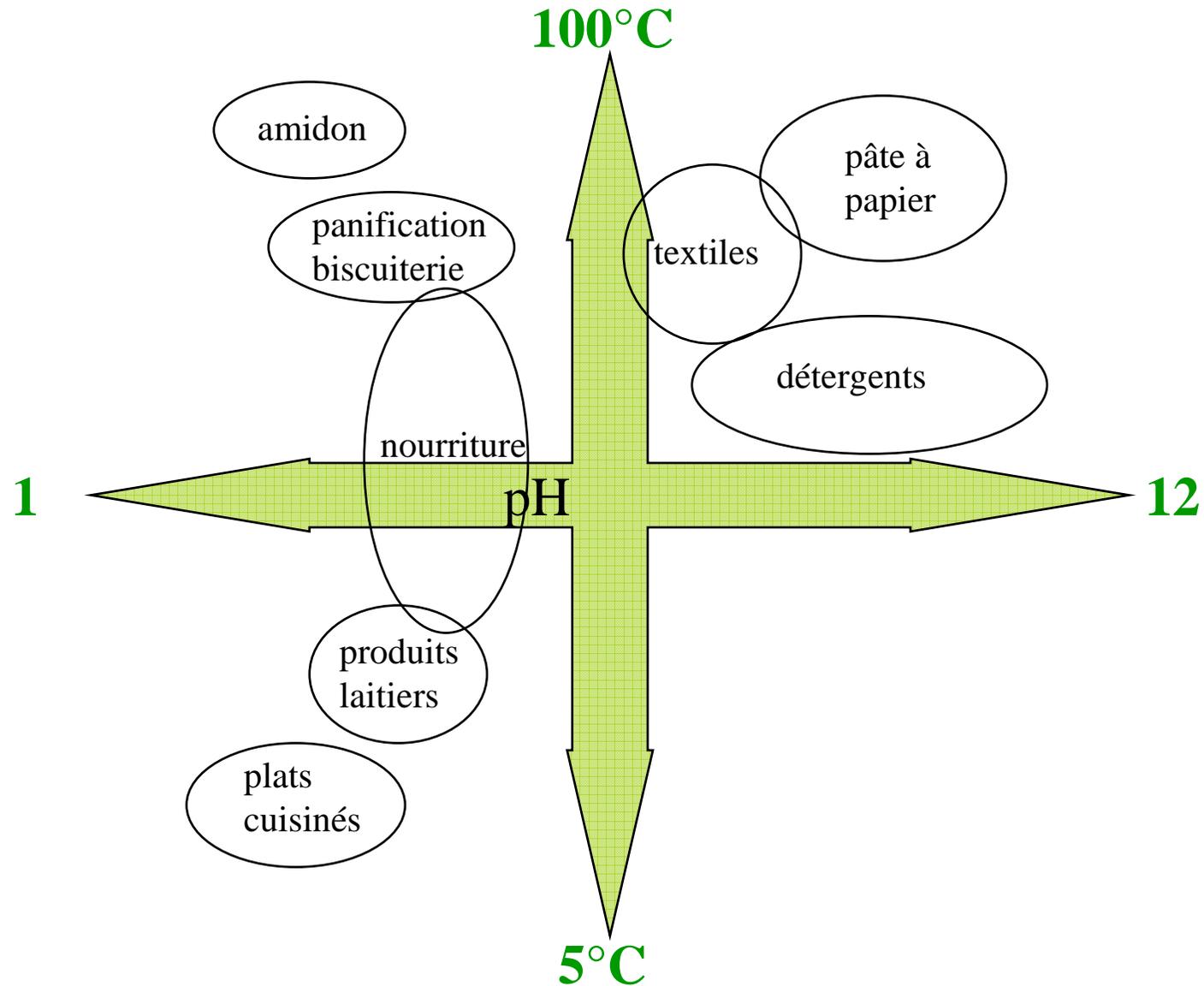
# Coût des enzymes

Enzymes	Catalyseurs chimiques
Lactate deshydrogénase 100000 \$/kg	Platine 12000 \$/kg
Aspartase 10000 \$/kg	Catalyseur de Sharpless 10000\$/kg
Lipase 5000 \$/kg	Ni-Raney 30 \$/kg
Glucose isomérase 500 \$/kg	
Protéase (lessives) 250 \$/kg	

Règle : contribution du coût de l'enzyme au coût final du produit (< 10%)

Exemple: aspartase dans la synthèse de l'aspartame: 0,1 \$/kg

# Applications industrielles: diversité des besoins



# Nature des enzymes...

## Essentiellement des hydrolases :

- protéases
- amylases
- lipases
- cellulases
- xylanase
- amyloglucosidase
- pullulanase
- lactase
- nitrilase...

## Avantages :

- réactions non équilibrées
- pas de co-facteurs

## Inconvénients des procédés impliquant des microorganismes par rapport à des enzymes...

Inconvénients	Avantages
Une proportion élevée de substrat est utilisée pour la synthèse de la biomasse	Certains produits requièrent un enchaînement de réaction complexes
Possibilités de réactions secondaires indésirables	
Condition de culture pour la croissance et la production parfois différentes	
Obligation de purifier le produit (problèmes d'extraction)	

# Origine des enzymes

- végétale :

- ◆ papaine

- papayer, 1ha (~2000 pieds) → 500 kg /an
- utilisation en brasserie et biscuiterie

- ◆ malt (orge germé: amylase,  $\beta$ -glucanase, carboxypeptidase)

- utilisation en brasserie

- animale:

- ◆ présure (extrait de la caillette de veaux : chymosine -pepsine)

- extraite sous forme de prochymosine et pepsinogène (traitement acide pour la libération des enzymes actives)
- veau de 18 mois →  $4 \cdot 10^6$  U coagulantes

- ◆ lysozyme

- extrait du blanc d'œuf (1t → 3 à 4 kg d'enzymes)
- hydrolyse du mucopolysaccharide des bactéries Gram +
- utilisation dans la fabrication du fromage pour éviter la croissance des *Clostridium* (fermentation butyrique → goût désagréable)

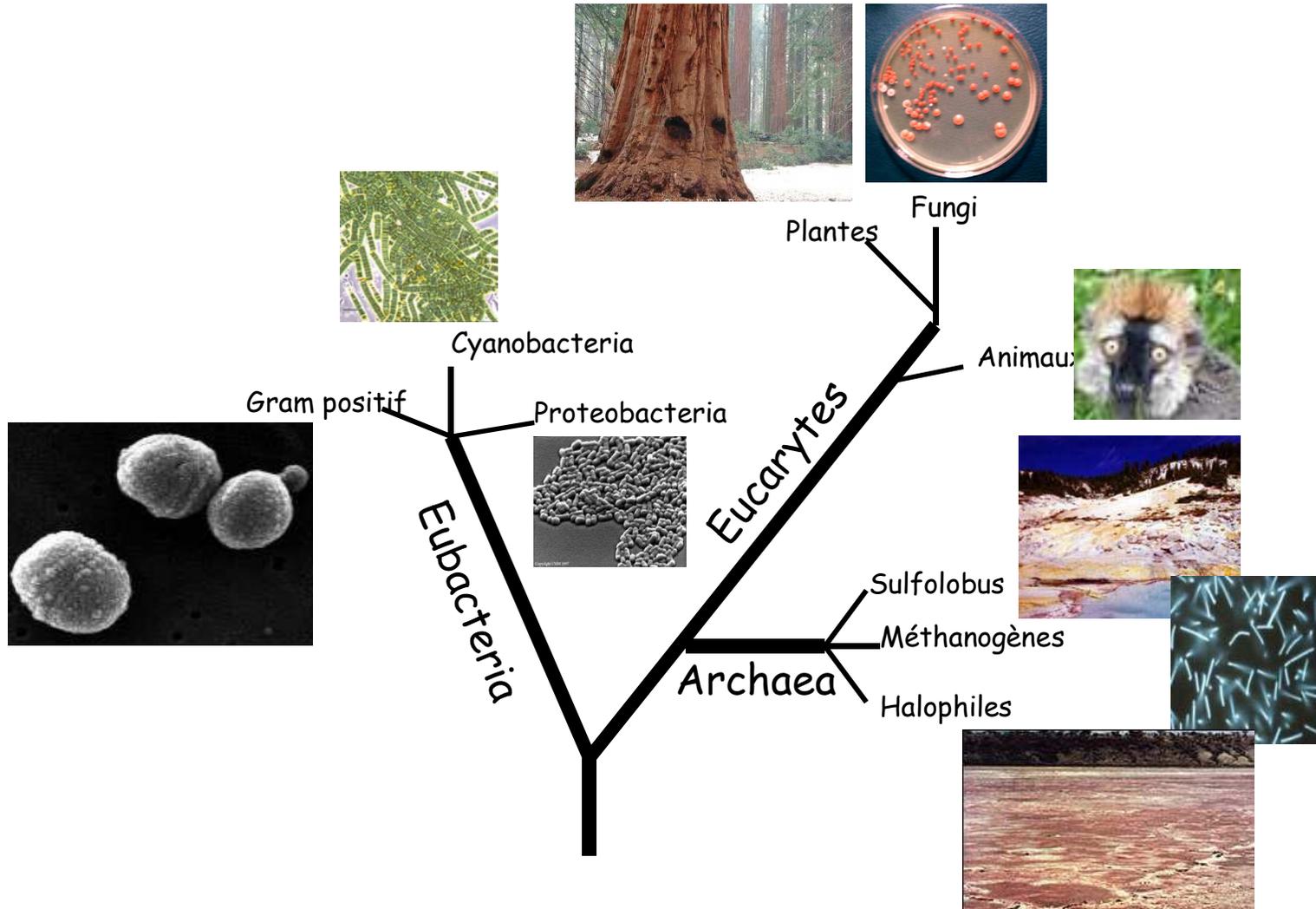


# Origine des enzymes

## Microbienne (90 % des enzymes industrielles)

- ◆ bactéries (*E.Coli*, *B. subtilis*, *B. Licheniformis*...)
- ◆ champignons filamenteux (*Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Trichoderma reesei*...)
- ◆ levures (*Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*...)
- ◆ archées

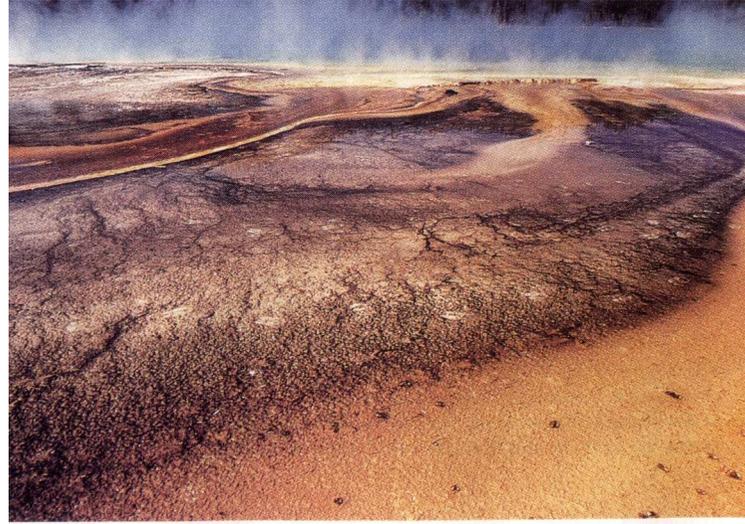
# Les 3 domaines du vivant



# Les extrêmophiles → extrêmozymes...



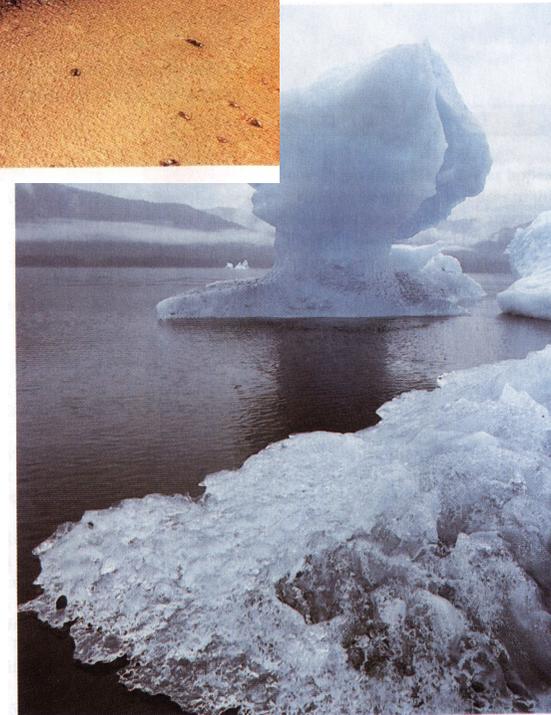
**$T > 90^{\circ}\text{C}$**



**pH 9-12**

**pH 1-3**

**$T < 10^{\circ}\text{C}$**



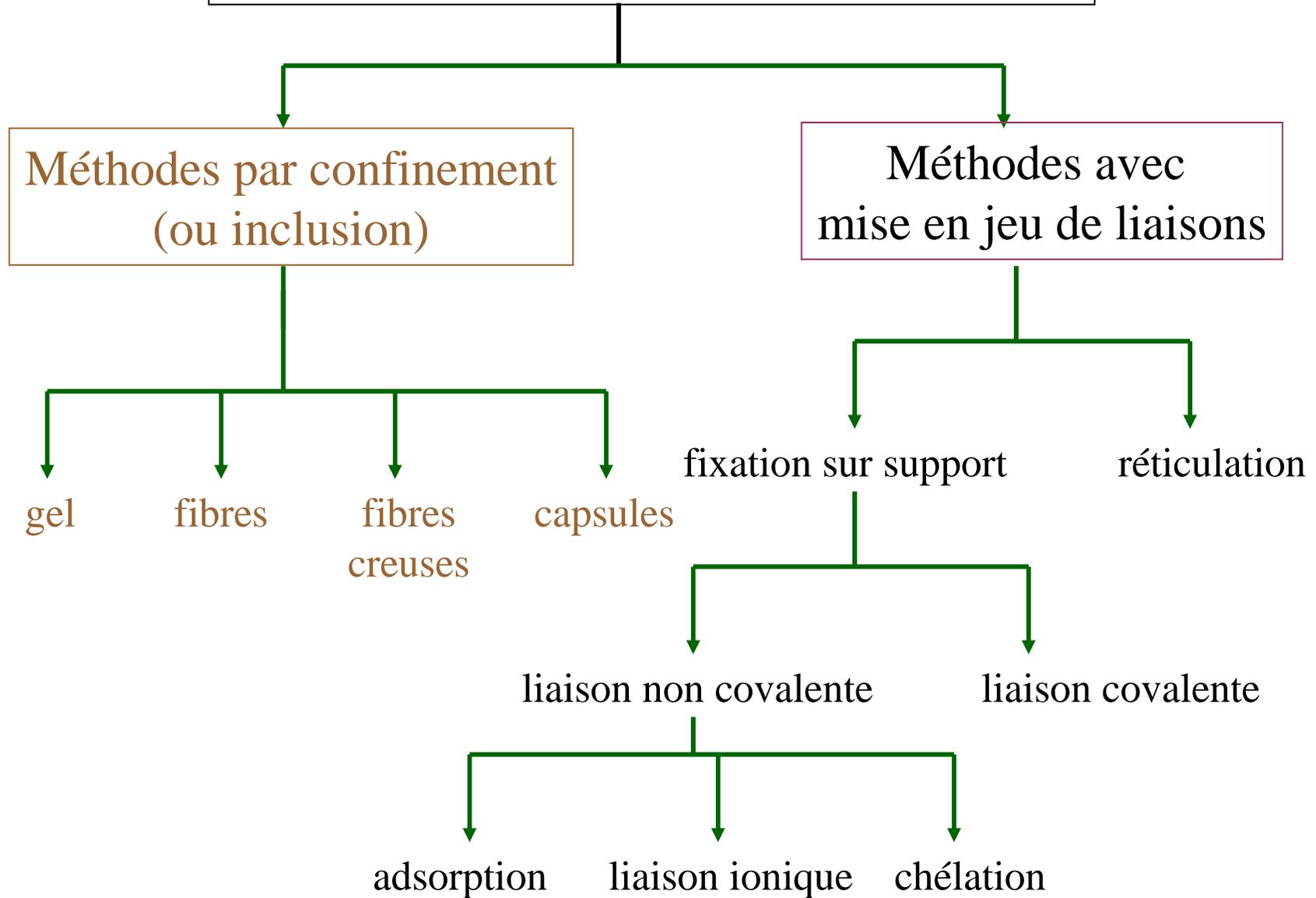
# Extrêmophiles

Extrêmophilie	Conditions de croissance	Origine
• Hyperthermophiles:	Temp > 80°C	solfatares littoraux
• Psychrophiles:	Temp < 10°C	sédiments glacés
• Alcalophile:	pH > 9	lacs alcalins, boues résiduaires
• Acidophiles:	pH < 3	solfatares
• Halophiles:	forte salinité	sédiments de lacs salés
• Barophiles:	pression > 300 atm	sédiments abyssaux

## Enzymes immobilisées

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Récupération et réutilisation des enzymes	Coût des supports
Adaptées aux opérations en continu	Problèmes de dénaturation
Produit final exempt d'enzymes	Réduction de l'activité (contraintes stériques, diffusionnelles)
Augmentation de la stabilité	

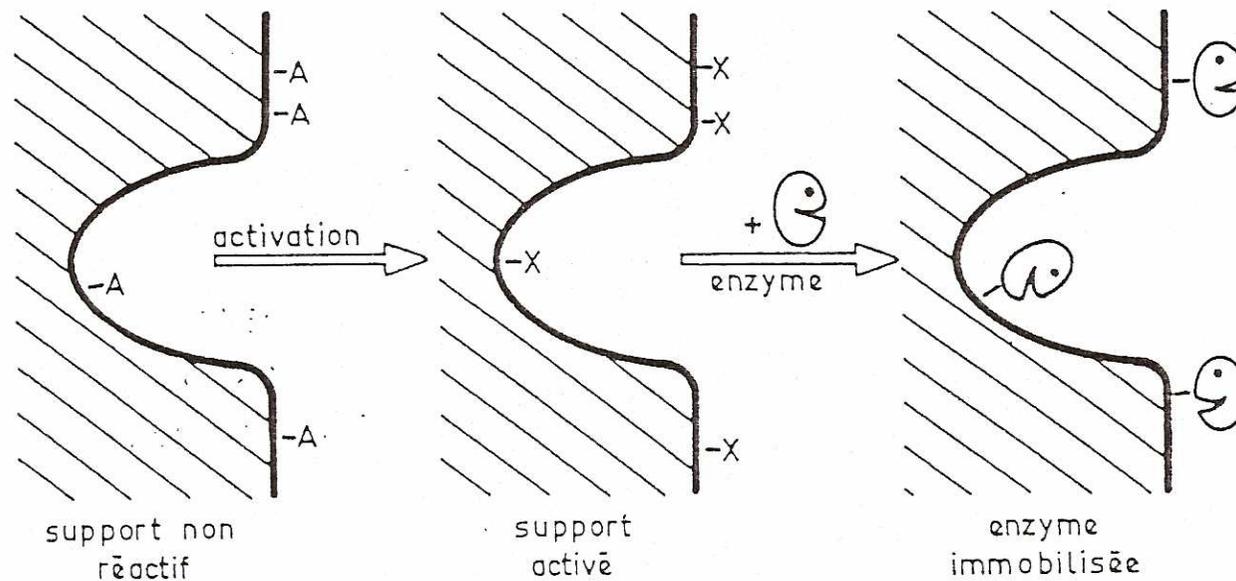
# Méthodes d'immobilisation des enzymes



# Immobilisation par liaisons covalentes

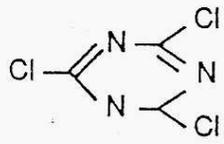
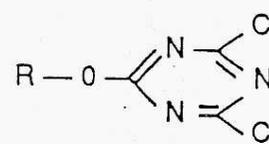
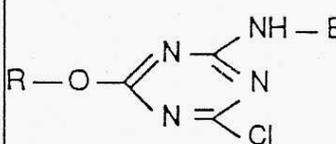
## Fixation sur support

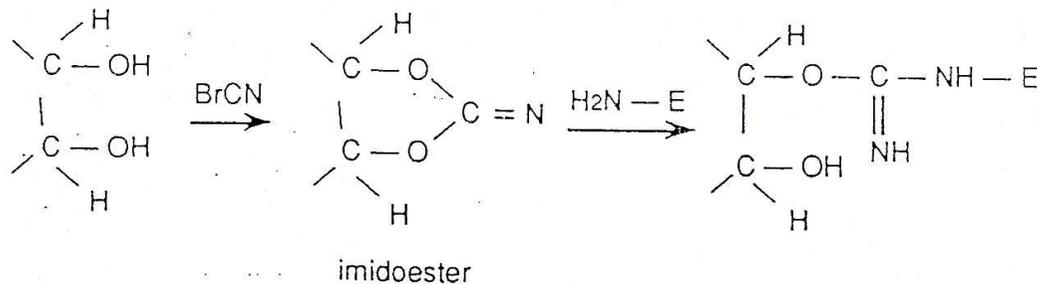
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"><li>- solidité de la fixation</li><li>- résistance accrue à la dénaturation</li><li>- faible quantité immobilisée</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- procédés coûteux</li><li>- risques de dénaturation, masquage</li><li>- mise en œuvre délicate</li><li>- supports organiques (mauvaises propriétés mécaniques)</li></ul>



# Immobilisation par liaisons covalentes

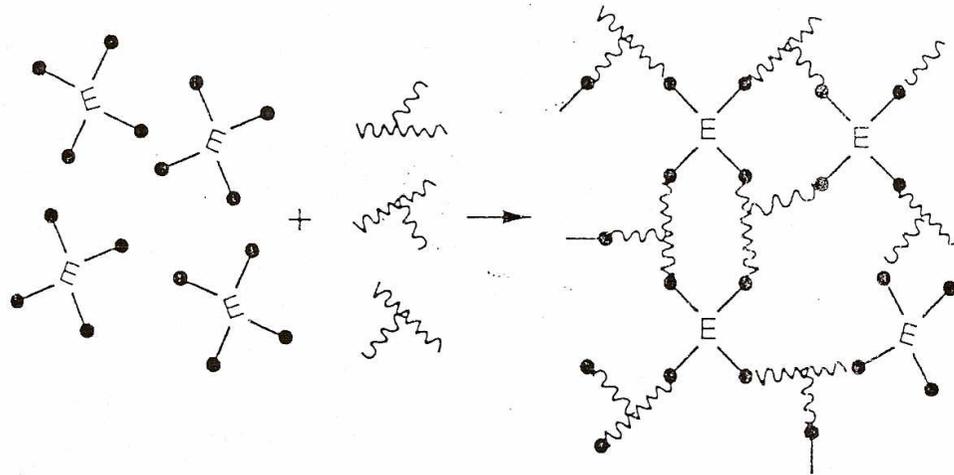
## Fixation sur support

groupe à activer (support)	activation		support ayant fixé l'enzyme
	réactifs	forme activée	
R — COOH	- méthanol - hydrazine - nitrite de sodium	$\text{R} - \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} - \text{N} = \text{N}^+ = \text{N}^-$ azoture	$\text{R} - \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} - \text{NH} - \text{E}$
R — COOH	R <sub>1</sub> — N = C = N — R <sub>2</sub> carbodiimide	$\text{R} - \text{C} - \text{O} - \underset{\text{N}^+ \text{H} - \text{R}_2}{\underset{\text{NH} - \text{R}_1}{\text{C}}}$ o. acyl iso urée	$\text{R} - \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} - \text{NH} - \text{E}$
R — OH	 triazine	 gpt triazinyl	

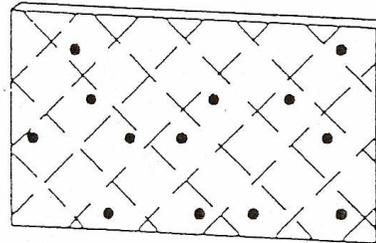


# Immobilisation par liaisons covalentes

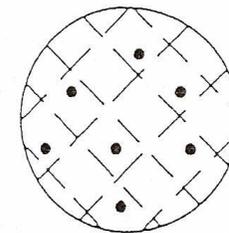
## Fixation par réticulation



fibre

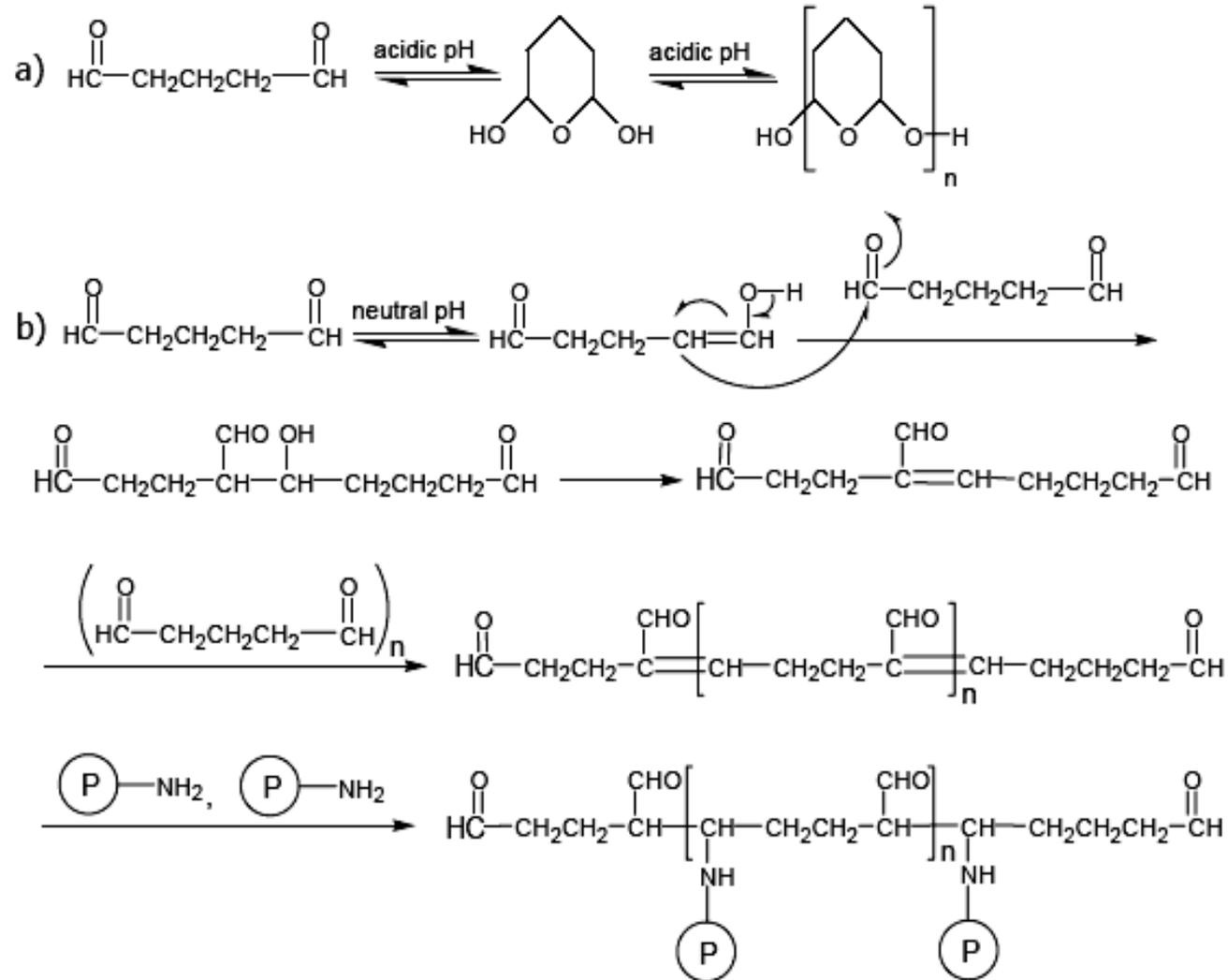


membrane



bille

## Réticulation au glutaraldéhyde



**Figure 1.** Polymerization of glutaraldehyde at a) acidic pH (redrawn from [32]) and b) at neutral pH and its cross-linking reaction with proteins (redrawn from [30]).

# Immobilisation par liaisons covalentes

## Fixation par réticulation

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- solidité de la fixation</li><li>- résistance accrue à la dénaturation et protéolyse</li><li>- propriétés anti-bactérienne</li><li>- applicable aux cellules entières</li><li>- réticulation de protéines cristallisées (méthode CLEC: cross linked enzyme crystal) →insolubilité dans l'eau, résistance mécanique, résistance à la protéolyse</li><li>ex: CLEC Subtilisine (Carlsberg) <math>t_{1/2}</math> 200j à 45°C dans l'octane (x 40/enzyme libre)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- réaction difficilement reproductible</li><li>- risques de dénaturation, masquage (limités par co-réticulation)</li><li>- accessibilité des substrats</li><li>- propriétés mécaniques médiocres</li></ul>

## Immobilisation par liaisons non covalentes

### 1) par adsorption :

- *liaisons faibles* : hydrogène, Van der Waals, hydrophobe
- *supports* : argile, verre, silice, alumine, céramique...

### 2) par liaisons ioniques :

- *fixation sur échangeur d'ions (anions ou cations)*
- *choix du support*: dépend du pH, supports variés: synthétiques (Trisacryl..), naturels (dextrans...), minéraux (silice et verre poreux)

### 3) par chélation :

- *surface activée par des métaux* :  $\text{TiCl}_3$ ,  $\text{SnCl}_4$ ,  $\text{ZrCl}_4$ ,  $\text{FeCl}_2$
- *surface* : verre, chitine, gélatine, nylon, cellulose...

## Immobilisation par liaisons non covalentes

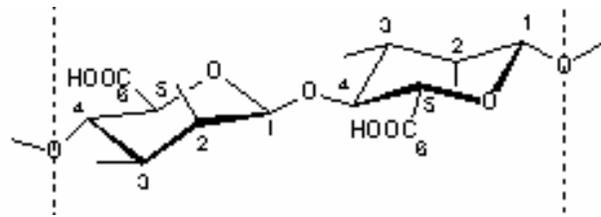
<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- simple à mettre en oeuvre</li><li>- peu de dénaturation</li><li>- possibilité de recharger le support</li><li>- grande variété de supports</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- fixation peu stable (fuite d'enzymes)</li><li>- capacité de fixation faible</li><li>- accessibilité des substrats</li><li>- modification des paramètres cinétiques (pH optimum)</li></ul>



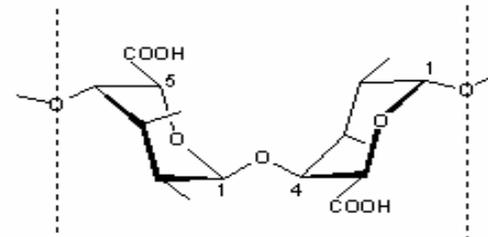
# Immobilisation par confinement ou inclusion

## Confinement dans un gel de polysides naturels

Alginate : extrait d'algues brunes, ac. polyuronique



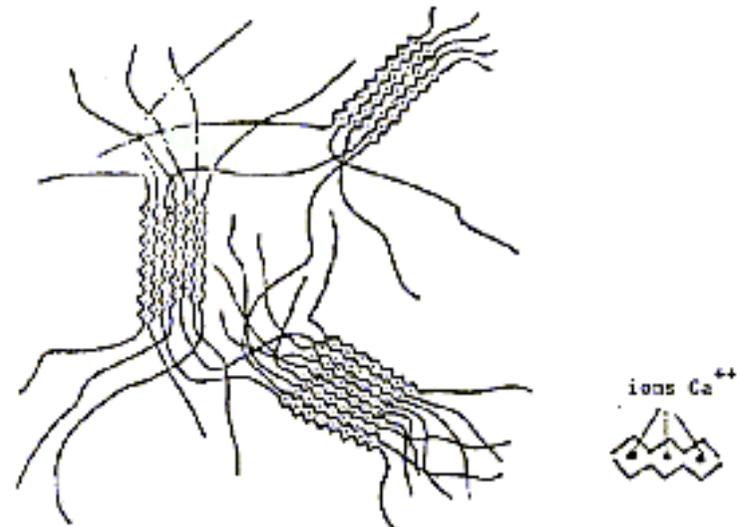
ac. D-mannuronique



ac. L-guluronique

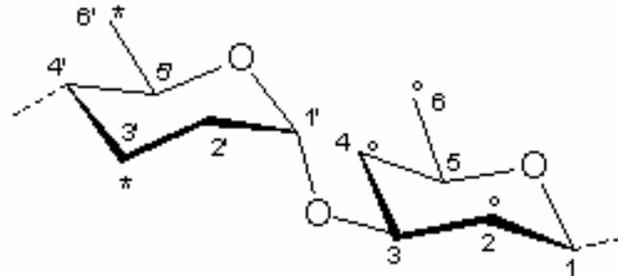
Propriétés:

- soluble sous forme de sels alcalins
- formation d'un gel en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$



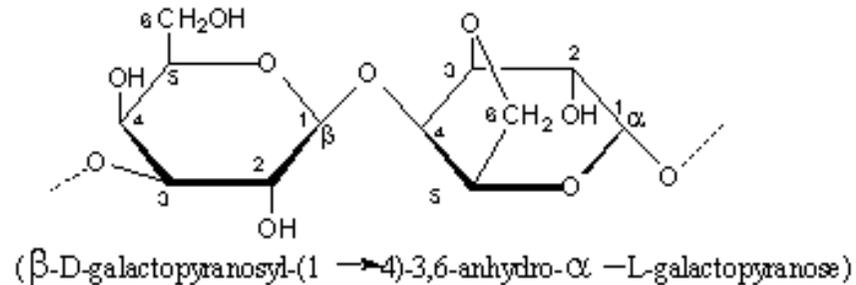
## Confinement dans un gel de polysides naturels

**Carraghénane** : Extrait des parois cellulaires d'algues brunes (rhodophycées)



(°) : sulfate, (\*) : 3',6'-anhydro avec OH en 3'

**Agar** : Extrait d'algues brunes (Gelidium, Gracilaria)



(β-D-galactopyranosyl-(1 → 4)-3,6-anhydro-α-L-galactopyranose)

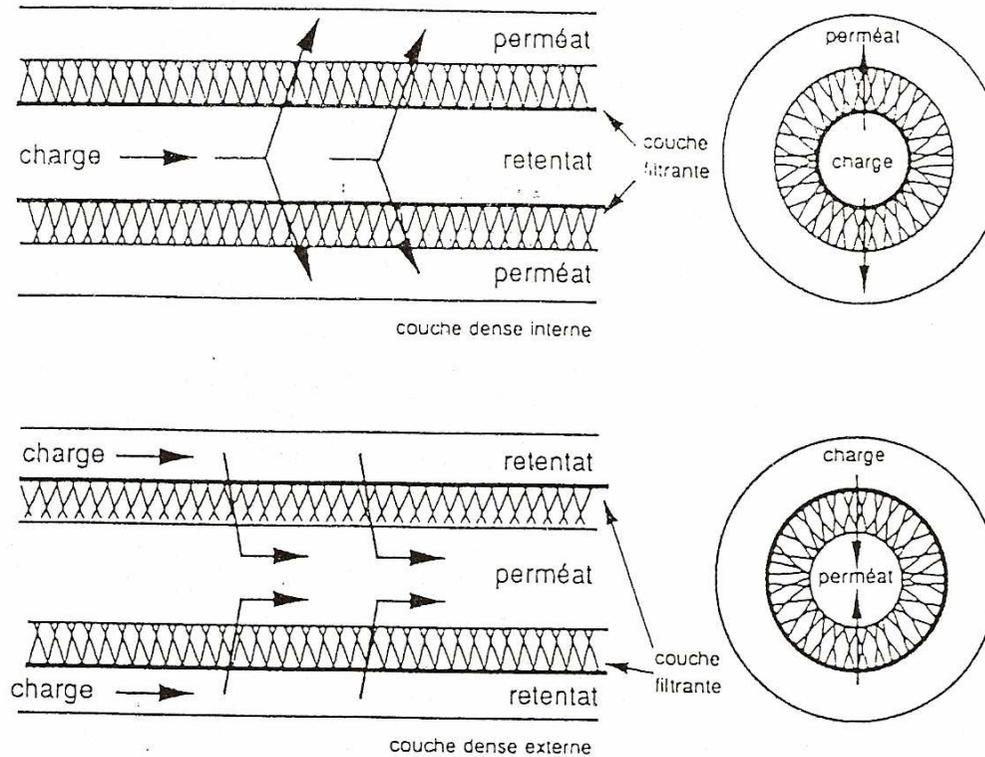
**Propriétés**: solubles à chaud, gélification à froid

## Confinement dans un gel de polysides naturels

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- simple à mettre en oeuvre</li><li>- économique</li><li>- bonne propriété mécanique</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- porosité importante (fuite d'enzymes)</li><li>- solubilisation à haute température (dénaturation des enzymes)</li><li>- contraintes diffusionnelles</li></ul>

# Immobilisation par confinement ou inclusion

## Confinement dans une fibre creuse



Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"><li>- rapport surface/volume élevé (<math>10000\text{m}^2/\text{m}^3</math>)</li><li>- choix de la porosité</li><li>- confinement simple</li><li>- absence de fuite d'enzyme</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- contraintes diffusionnelles</li><li>- risque d'inactivation (cisaillement)</li><li>- absorption du substrat dans la membrane</li></ul>

# Immobilisation par confinement ou inclusion

## Confinement dans membrane de collagène

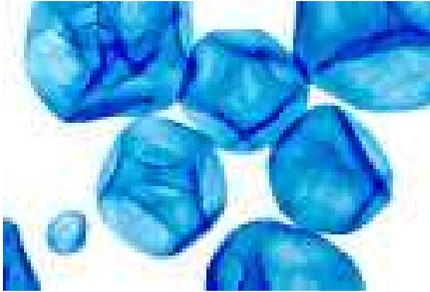
Principe :

- dispersion de collagène (15g/L) à pH acide ou basique
- séchage sur surface
- imprégnation avec solution d'enzymes

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- peu coûteux (peaux de saucisse)</li><li>- très grande stabilité (1 an au sec et 3 mois en utilisation)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- possibilité de fuite d'enzymes</li><li>- risque de lessivage (1/3 des enzymes sont fixées.)</li></ul>

# Immobilisation par confinement ou inclusion

## Confinement par microencapsulation



Avantage : évite les réactions immunologiques

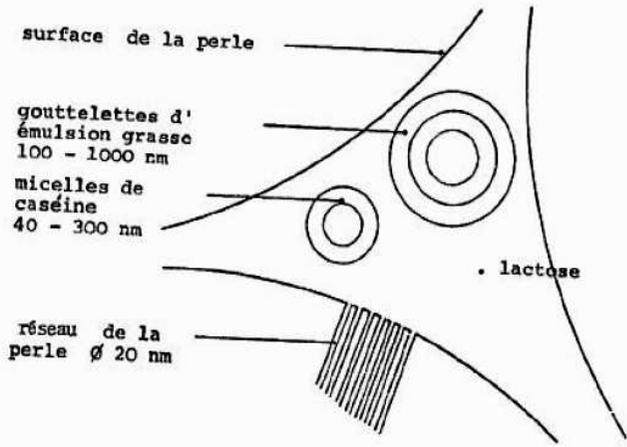
## Confinement dans des liposomes

Avantage : franchissement de la membrane

Inconvénient : confinement non permanent



## Exemples d'immobilisation industrielle des enzymes

Enzyme	Méthode d'immobilisation	Procédé
Glucose-isomérase	DEAE-cellulose Réticulation avec le glutaraldéhyde	Conversion du glucose en fructose (6 Mt/an)
Lactase	Fibres d'acétate de cellulose Billes de silices (Corning) Perles de plexiglas (Plexazym) Billes de céramique  	Hydrolyse du lactose en glucose + galactose

*Passage du lait à travers le PLEXAZYM*

## Exemples d'immobilisation industrielle des enzymes

**Aminoacylase** (*Aspergillus orizae*) : production d'a.a. de la série L (TANABE)

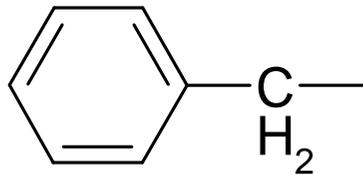
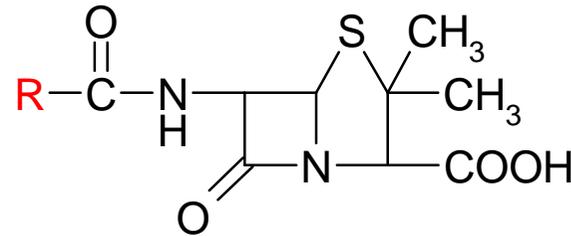
Conditions:

- immobilisation sur DEAE-Sephadex (colonne 1000 L → 6 à 20t /mois)
- après 30j de fonctionnement à 50°C → 60% de l'activité conservée
- fiabilité du support > 5 ans

Comparaison des coûts relatifs (%) du procédé continu et « batch »

	<b>batch</b>	<b>continu</b>
Matières premières	52	41
Enzyme	23	3,5
Main d'œuvre	20,5	6,0
Energie	4,5	4,5
DEAE-Sephadex	–	2,0
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>57</b>

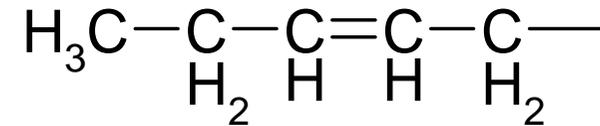
# Hémi-synthèse des Pénicillines



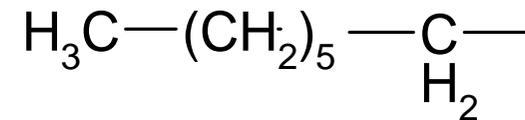
Pénicilline G

**Pénicilline  
acylase**

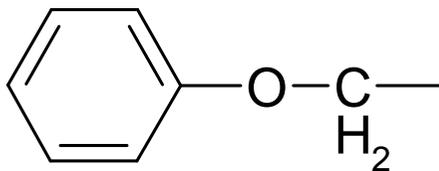
**6-APA  
(3500t/an)**



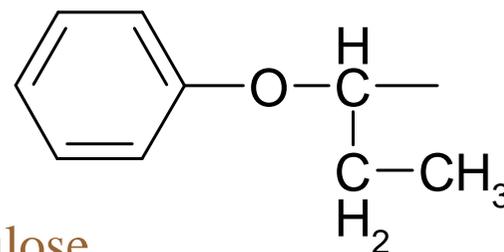
Pénicilline F



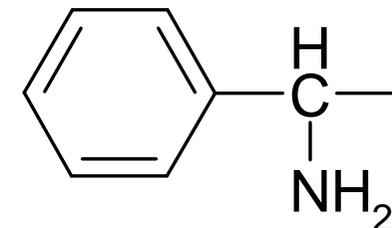
Pénicilline K



Pénicilline V



Propicilline



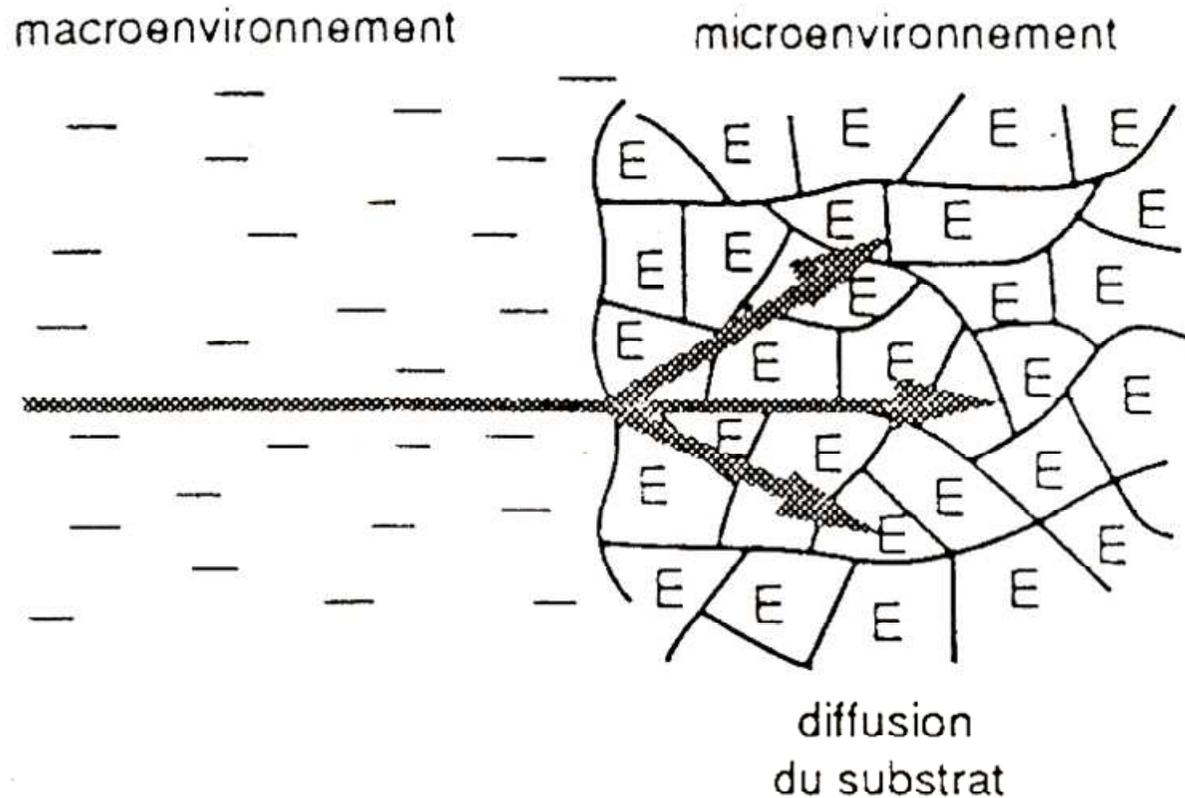
Ampicilline

Immobilisation:

- fibres de triacétate de cellulose
- polyacrylamide

# Conséquences de l'immobilisation des enzymes

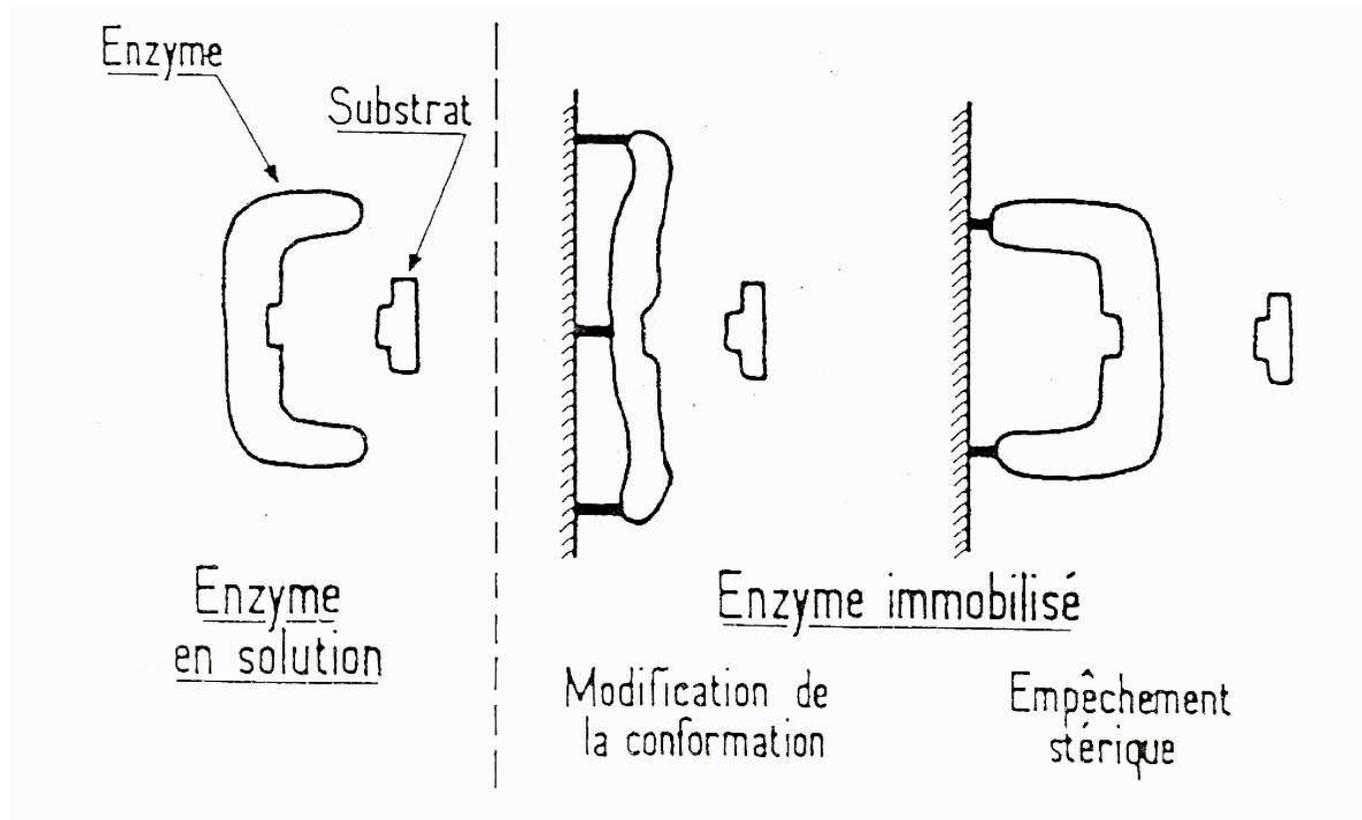
## Notion de macro- et micro-environnement



- modification des paramètres intrinsèques de l'enzyme
- effet de partition
- effets diffusionnels

# Conséquences de l'immobilisation des enzymes

## Modification des paramètres intrinsèques



### Effets -:

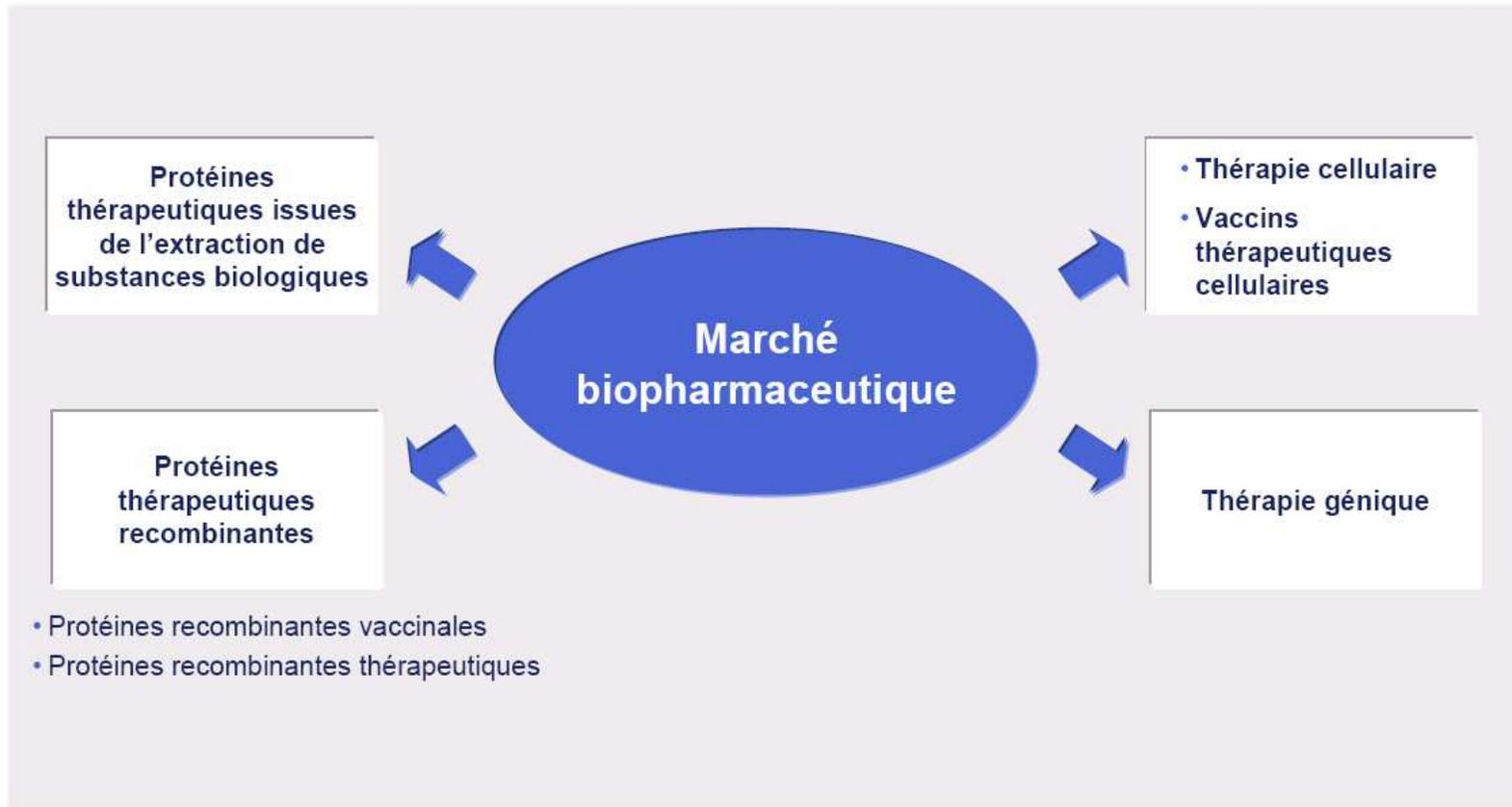
- diminution de l'activité
- structure non homogène
- encombrement stérique

### Effets +: Augmentation de la stabilité :

- à la température
- aux inhibiteurs
- diminution de la sensibilité aux protéases

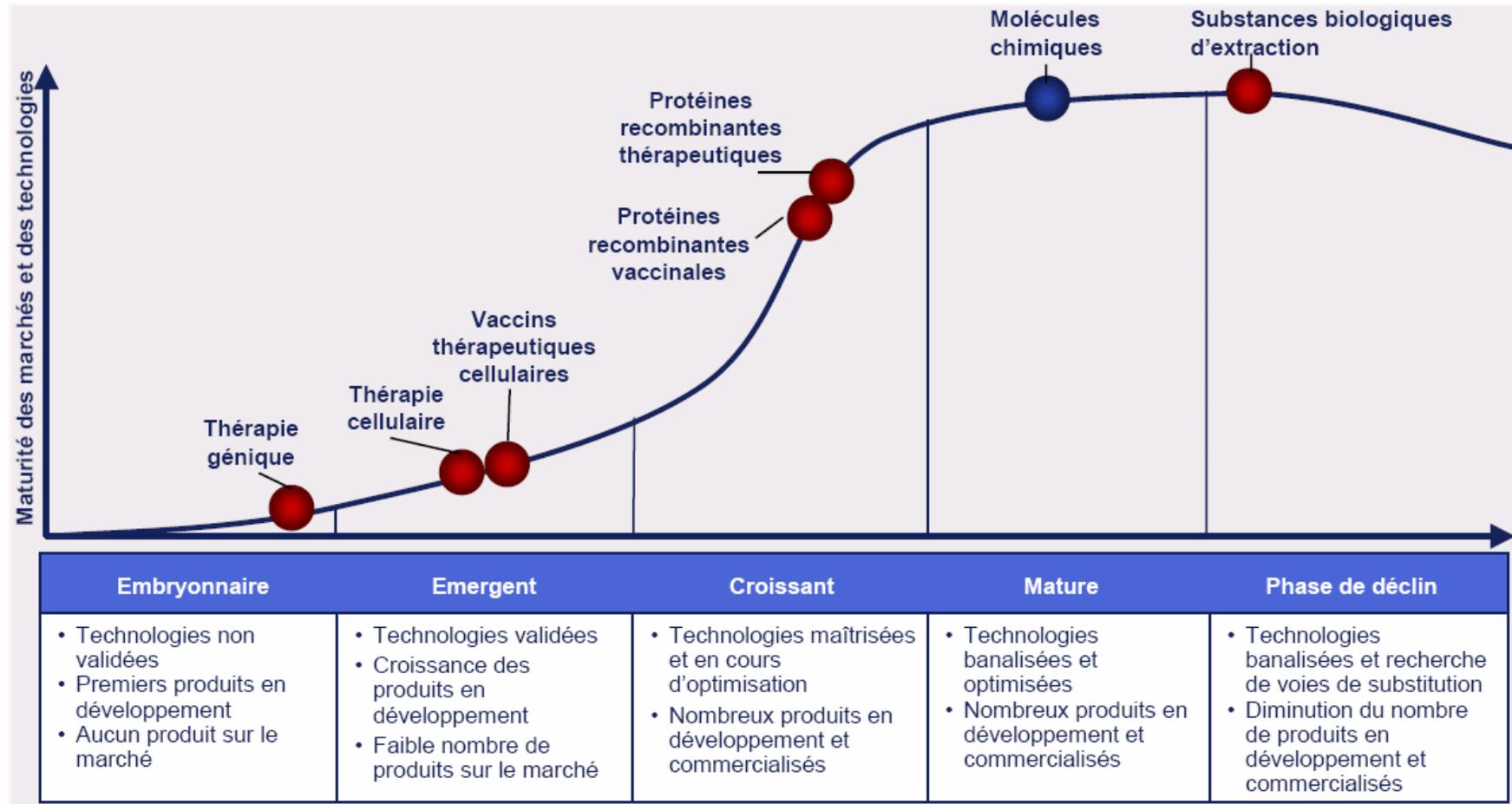
# Applications thérapeutiques des protéines

Le secteur biopharmaceutique est composé de quatre segments de marché principaux



# Applications thérapeutiques des protéines

Ces segments de marché présentent des niveaux de maturité différents



# Applications thérapeutiques des protéines

## Protéines thérapeutiques :

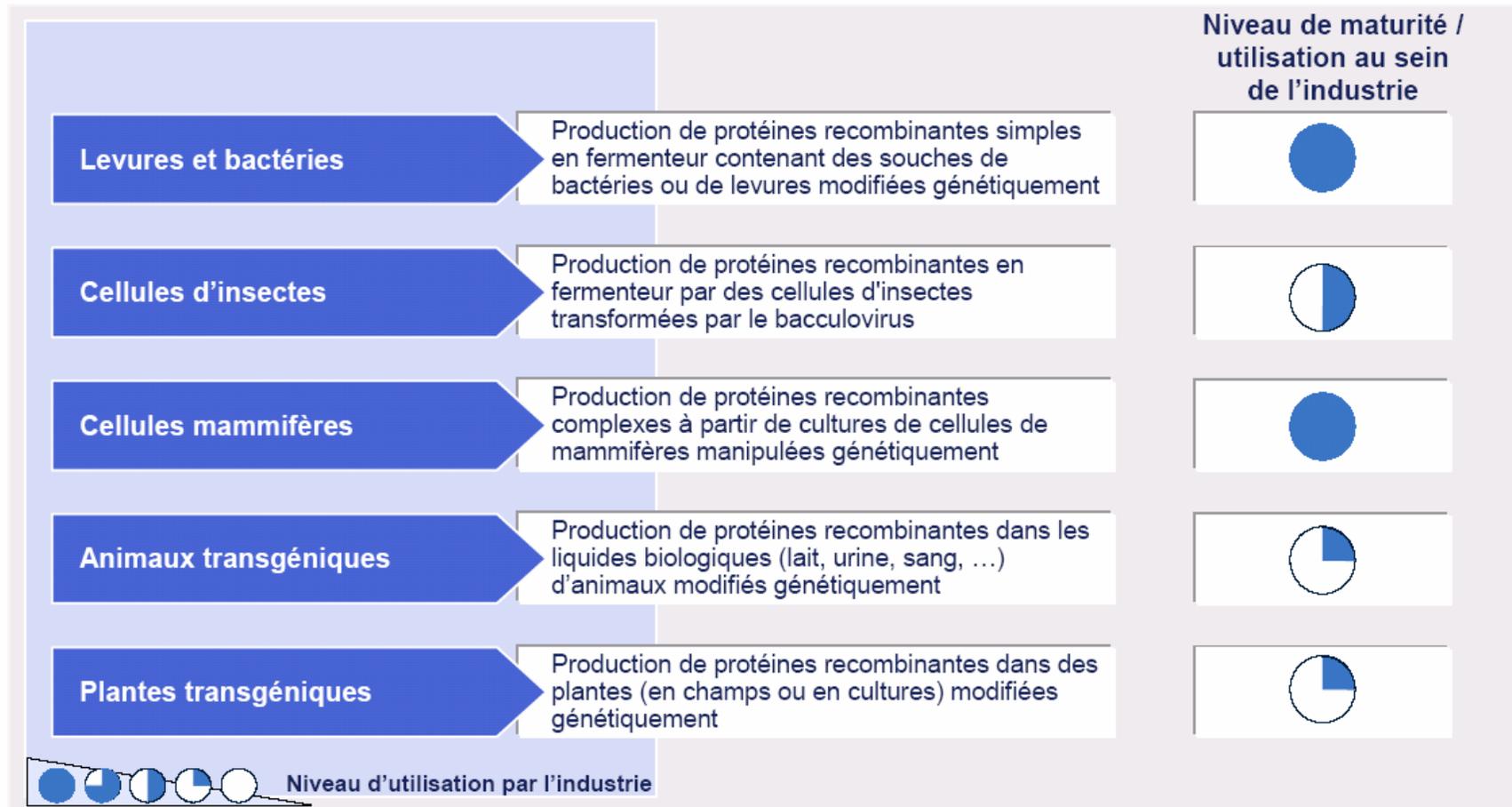
- anticorps (effet neutralisant ou ciblage)
- hormones (insuline, hormone de croissance...)
- cytokines (interférons, facteurs de croissance hématopoïétiques, interleukines)
- facteur de coagulation (r-FVIII)
- antigènes vaccinaux (vaccins)

## Avantages:

- médicaments de haute technologie, offrant des solutions pour des pathologies pour l'instant sans traitement satisfaisant
- traitements ciblés
- association avec d'autres traitements de fond (chimiothérapies)

# Applications thérapeutiques des protéines

Systemes d'expression utilisés pour la production des protéines recombinantes



# Applications thérapeutiques des enzymes

## La maladie de Pompe :

- Forme infantile de la glycogénose de type II (autosomale récessive ; 1 naissance sur 40000)
- Activité des  $\alpha$ -1,4-glucosidases absente
- Glycogène s'accumule dans les cellules du cœur et des muscles. Cela entraîne une surcharge lysosomale
- Les conséquences sont une cardiomyopathie hypertrophique et une hypotonie majeure

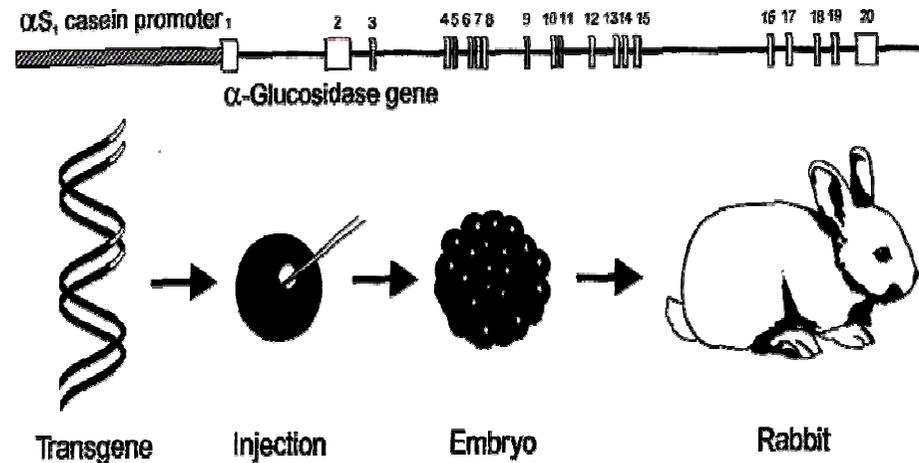
# Applications thérapeutiques des enzymes

## Thérapie par remplacement d'enzyme :

Thérapie de substitution possible grâce aux récepteurs de surface.

On utilise des enzymes recombinantes :

- Clonage du gène humain
- Production dans le lait d'une lapine transgénique

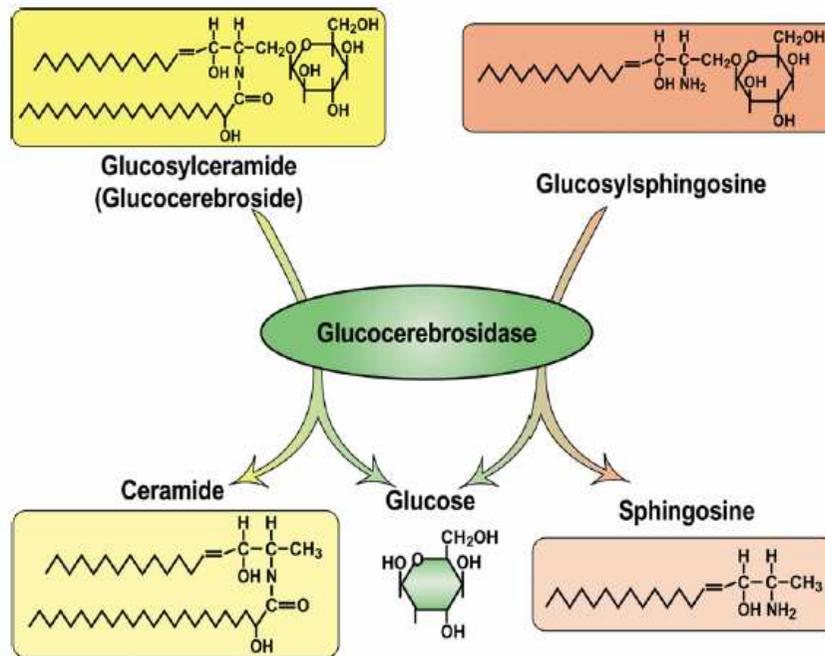


# Applications thérapeutiques des enzymes

## La maladie de Gaucher :

La maladie de Gaucher est la plus commune des maladies lysosomales (1 pour 50000 naissances).

Elle est due au déficit en  $\beta$ -glucosidase acide.



## Mécanisme d'action de la Glucocérébrosidase

### Symptomes:

type 1 : hépatosplénomégalie, Thrombopénie, anémie, atteinte osseuse.

type 2 et 3: troubles neurologiques

# Applications thérapeutiques des enzymes

## La maladie de Gaucher

### Stratégie enzymatique thérapeutique :

- Glucocérébrosidase recombinante (1996)(cellules d'ovaires d'hamster chinois)
- Injection de 60 UI/kg en intraveineuse tous les 15 j.
- Actuellement 3500 patients sont traités
- Enzyme modifiée (addition de résidus mannose) est ciblée 40 à 70 fois plus efficacement que l'enzyme originale.

### Résultats :

- Réduction de l'organomégalie
- élévation du taux d'hémoglobine
- Diminution de l'asthénie et des douleurs osseuses
- Possibilités d'allergie après injection