Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Recherche d'une activité alcool déshydrogénase à partir de fragments peptidiques d'une enzyme native

Hayen, Pierre

Award date:
1989

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.

Download date: 02. May. 2026

150689

Unité de Biochimie cellulaire

Promoteur : J. Remacle

Recherche d'une activité alcool déshydrogénase à partir de fragments peptidiques d'une enzyme native.

Pierre Hayen

Année 1988-1989

Au terme de ce mémoire, je tiens tout 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 annee.

Ensuite, je voudrais remercier tout spécialement Edouard Delaive, pour son aide technique et sa collaboration constante et efficace, et Etienne Magonet pour sa gentillesse, sa disponibilité, et surtout pour le temps qu'il a consacré à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Isabelle K, Carine, Manoëlle et Isabelle A. pour leur aide dactylographique, aux deux "Marc", Philippe, et Martine ainsi qu'à tous les autres membres du laboratoire de Biochimie Cellulaire pour leur sympathie. Je pense tout spécialement à Dominique Delforge pour les longues soirées qu'il a passées à mes côtés et pour toute l'aide qu'il m'a apportée dans ce mémoire.

Toute ma reconnaissance va également à Madame Labidi pour sa précieuse contribution lors de l'achèvement de ce travail.

ABREVIATIONS UTILISEES.

aa : Acide aminé

Abs : Absorbance

ADH : Alcool déshydrogénase

Ala : Alanine

AlaDH : L-Alanine déshydrogénase

Arg : Arginine

Asn : Asparagine

Asp : Acide aspartique

Cys : Cystéine

DEAE : Diéthylaminoéthane

DO : Densité optique ou absorbance

E1 : Extrait cellulaire brut

E2 : Fraction purifiée à la température

E3 : Fraction purifiée à l'acétone

E4 : Fraction purifiée au sulfate d'ammonium

EA : Fraction purifiée sur amicon

ED : Fraction purifiée par DEAE-cellulose

EDTA : Ethylène diamine tétra acétate de sodium

EF : Fraction purifiée par Séphacryl G200

Gln : Glutamine

Glu : Acide glutamique

Gly : Glycine

H-ADH : Alcool déshydrogénase de foie de cheval

His : Histidine

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

Hyp : Hydroxyproline

Ile : Isoleucine

LDH : Lactate déshydrogénase

Leu : Leucine

Lys : Lysine

Met : Méthionine

NAD^+ : Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

Nle : Norleucine

Phe : Phénylalanine

PM : Poids moléculaire

Pro : Proline

RMN : Résonnance magnétique nucléaire

RX : Rayons X

Ser : Sérine

TFA : Acide trifluoroacétique

Thr : Thréonine

TRIS : Tri-(Hydroxyméthyl)-amino-méthane

Trp : Tryptophane

Tyr : Tyrosine

Val : Valine

Y-ADH : Alcool déshydrogénase de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION. 1
1.1. Avant-propos 1
1.2. Idée générale du travail. 1
1.3. La vision enzymologique des chimistes. 2
1.3.1. Définition, avantages et désavantages des enzymes. 2
1.3.1.1. Définition. 2
1.3.1.2. Avantages des enzymes 2
1.3.1.3. Désavantages des enzymes. 3
1.3.2. Méthode pour créer une "enzyme" artificielle. 3
1.3.3. Exemples "d'enzymes synthétisées". 4
1.3.3.1. Les cyclodextrines. 4
1.3.3.2. Les éthers couronnés 5
1.3.3.3. Les Katapinates. 7
1.3.4. Conclusions sur la vision enzymologique des chimistes. 8
1.4. La vision enzymologique des biologistes. 8
1.4.1. Synthèse d'un peptide ayant une activité identique à celle du lysozyme 8
1.4.1.1. Aperçu structurel du lysozyme 8
1.4.1.2. Le travail de NAITHANI et DHAR 9
1.4.1.3. Le travail de SUSHMA et MATHUR. 10
1.4.1.4. Une approche plus rationelle. 11
1.4.2. L'adénylate cyclase 11
1.4.2.1. Travail réalisé par l'équipe de HOLLAND. 11
1.4.2.2. Caractérisation du peptide. 12
1.4.2.3. Conclusions 12
1.4.3. CuDIPS et Ebselen 13
1.4.3.1. Le CuDIPS 13
1.4.3.2. L'Ebselen. 13
1.5. GENERALITES SUR L'ALCOOL DESHYDROGENASE 14
1.5.1. Choix de l'enzyme. 14
1.5.2. Description de l'ADH 15
1.5.2.1. Introduction 15
1.5.2.2. Comparaison entre l'ADH du foie de cheval (H.ADH) et l'ADH de levure (Y.ADH). 15
1.5.2.3. Description du domaine liant le coenzyme 16
1.5.2.4. Description du domaine catalytique. 17
1.5.2.5. Caractéristiques de la réaction catalysée par l'ADH. 19
1.5.2.6. Mécanisme réactionnel. 20
1.5.3. Les différents isoenzymes de l'ADH de levure 21

1.6. Objectifs du travail. 22
1.6.2. Discussion de la méthode employée. 23
1.6.3. Méthodologie suivie. 24

II. MATERIELS ET METHODES. 25
A. Matériels. 25
A.1. Réactifs divers. 25
A.2. Constituants des gels. 25
A.3. Réactifs biologiques 25
B. MEthodes. 26
B.1. Le spectrophotomètre. 26
B.1.1. Principe 26
B.1.2. Loi de Lambert - Beer. 26
B.1.3. Matériels. 27
B.1.4. Dosage de l'ADH. 27
B.1.5. Dosages colorimétriques 28
B.1.5.1. Dosage du phosphate. 28
B.1.5.2. Dosage des protéines 28
B.1.5.3. Révélation de l'activité ADH à la phénazine méthosulfate (PMS) et au bleu de nitrotetrazolium (NBT). 29
C. PURIFICATION DE L'ADH DE LEVURE. 31
C.1. Buts de la purification 31
C.2. Extraction de l'ADH 31
C.2.1.Introduction 31
C.2.2. Description de la méthode. 32
C 3. Amélioration qualitative de la méthode de purification. 38
C.3.1. Purification par Séphacryl S 200 38
C.3.2. Vérification de la pureté de l'ADH par HPLCà tamis moléculaire. 38
C.3.3. Gels d'électrophorèse en présence de S.D.S. 39
C.4. Amélioration quantitative de la méthode de purification. 43
C.4.1. Etude de l'influence de la température sur la purification de l'ADH 43
C.4.2. Mise au point de la précipitation à l'acétone et influence sur les pertes en ADH. 44
C.4.2.1. Mise au point d'une méthode de mesure de l'effet de l'acétone restant dans le dialysat après 2 heures de dialyse 45
C.4.3. Mise au point d'une méthode permettant l'étude de l'influence du

sulfate d'ammonium sur la précipitation de l'ADH....45
C.5. Lyse protéinique....46
C5.1. Etapes de lyse....46
C.5.2.Vérification de la lyse de l'ADH par HPLC à colonne à phase inverse....47
C.5.3. Etape de séparation des peptides obtenus après lyse de l'ADH (tamis moléculaire Superose 12)....47
C.5.4. Etape de dosage....48

III. RESULTATS....51
3.1. Introduction....51
3.2. Purification de l'ADH....51
3.2.1. Estimation de la pureté de la fraction E4....51
3.2.2. Estimation de la pureté après DEAE....52
3.3. Amélioration qualitative de la purification de l'ADH....54
3.3.1. Etapes supplémentaires de purification....54
3.3.2. Amélioration qualitative apportée par la séphacryl G 200....55
3.3.3. Vérification de la pureté par électrophorèse....56
3.3.4. Estimation de la quantité d'ADH purifiée....57
3.3.5. Estimations des pertes d'ADH et de protéines au cours de la purification....57
3.4. Amélioration quantitative de la purification de l'ADH....59
3.4.1. Etude de l'influence de la température sur les pertes en ADH....59
3.4.2. Etude de l'influence de la précipitation à l'acétone sur les pertes en ADH....61
3.4.3.Etude de l'influence du sulfate d'ammonium sur les pertes en ADH....64
3.4.4. Etude de l'influence de la purification à la colonne DEAE cellulose sur les pertes....65
3.4.5. Etude de l'influence de la purification par Amicon sur les pertes en ADH....67
3.5. Rendement final après modifications de la purification....68
3.5.1.Quantité d'enzyme recueilli après purification....68
3.5.2. Qualité de l'enzyme après purification totale....68
3.6. Lyse de l'ADH....69

3.6.1. Introduction. 69
3.6.2. Etapes de la lyse. 69
3.6.3. Vérification de la lyse par HPLC en phase inverse. 71
3.6.4. Analyse des résultats par chromatographie HPLC en tamis moléculaire. 72

IV. CONCLUSIONS GENERALES 78

BIBLIOGRAPHIE 80

I. INTRODUCTION.

1.1. AVANT-PROPOS.

Depuis plusieurs années, les enzymes suscitent, vu leurs propriétés remarquables, un intérêt sans cesse croissant auprès des scientifiques. Ces molécules sont, en effet, des catalyseurs spécifiques de choix et présentent un intérêt dans un bon nombre de réactions industrielles.

Malheureusement; leur relative instabilité, leur coût élevé, la nécessité d'employer des cofacteurs généralement très coûteux et leurs conditions d'utilisation très exigentes, entravent encore une utilisation beaucoup plus large.

L'unité de Biochimie cellulaire a, quant à elle, décidé d'apporter sa contribution à l'étude de quelques unes de ces enzymes. Des études approfondies, sur la glutathione peroxidase (GPX), la superoxyde dismutase (SOD), l'alanine déshydrogénase (alaDH), l'alcool déshydrogénase (ADH),.(Pigeolet E., sous presse; Michiels C.,1988; Delforge D.,1988; Bille V., 1989) sont ou ont été réalisées.

C'est précisément dans le cadre d'études sur l'ADH que s'inscrit ce travail. Après une étude menée au Laboratoire au sujet de l'influence du microenvironnement sur l'ADH immobilisée en vue de la régénération du cofacteur NADH (Bille V.,1987), nous nous proposons de vérifier s'il n'y a pas moyen d'obtenir une activité alcool déshydrogénase qui ne nécessiterait pas l'ensemble de la chaîne de l'enzyme et qui pourrait, de ce fait, faire l'objet de modifications plus faciles à réaliser afin d'obtenir des caractéristiques particulières comme une spécificité mois importante ou une stabilité plus grande.

1.2. IDEE GENERALE DU TRAVAIL.

L'idée de ce mémoire est de rechercher une activité enzymatique ADH au niveau d'un peptide. L'idée peut sembler *a priori* illusoire. Dans son livre "Principes de biochimie" Lehninger

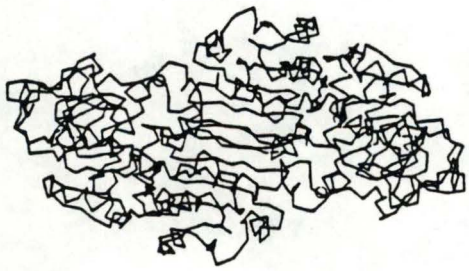


Figure 1 : Stéréodiagramme des 748 atomes des carbones α et des 4 atomes de zinc de l'ADH de cheval (Branden et al., 1975)

(1977) nous montre, en prenant comme modèle l'hémoglobine, que l'activité protéinique est non seulement fonction du site actif mais, également du reste de la macro-molécule qui peut subir de nombreuses variations conformationnelles absolument nécessaires pour que la réaction puisse se dérouler. De nombreux exemples acréditent ce modèle. La mutation d'un acide aminé (a.a) peut dans certains cas, inhiber complètement l'activité de l'enzyme même si cet acide aminé n'a aucun rapport avec le site actif. Pouvions-nous dès lors espérer retrouver une activité ADH à partir de peptides? La première réponse qui vient à l'esprit est non. Pourtant, voici quelques travaux qui vont donner une autre dimension à cette idée.

1.3. LA VISION ENZYMOLOGIQUE DES CHIMISTES.

1.3.1. Définition, avantages et désavantages des enzymes.

1.3.1.1. Définition.

Pour les chimistes, les enzymes sont des macromolécules de taille considérable (supérieure à 10 000 daltons) constituées d'acides aminés et parfois d'un groupement aprotéinique (métal, groupement pyrol ...).

Elles agissent en 2 étapes:

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

1.3.1.2. Avantages des enzymes.

Les chimistes voient à travers les enzymes des propriétés inconnues avec les catalyseurs chimiques.

D'abord, les enzymes provoquent une augmentation de la vitesse de réaction inégalable par des catalyseurs chimiques. Et de plus, la réaction est très spécifique, elle est même généralement

stéréospécifique: c'est un avantage que ne possède aucun catalyseur chimique traditionnel.

Finalement, les enzymes travaillent tellement vite que les réactions secondaires indésirables non catalysées n'ont jamais le temps de se produire.

Les enzymes constituent donc pour leur domaine une véritable révolution puisqu'elles constituent le passage d'une réaction aléatoire à une réaction organisée.

1.3.1.3. Désavantages des enzymes.

Les enzymes présentent malheureusement une série de désavantages qui sont parfois le revers de leurs qualités.

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

Les enzymes travaillent généralement en milieu aqueux dans des conditions de pH et de température très spécifiques, alors que pour certaines applications, il serait intéressant de faire des réactions en solvant organique ou à haute température.

1.3.2. Méthode pour créer une "enzyme" artificielle.

Suivant la définition "chimique" de l'enzyme, la recherche nécessaire à la synthèse d'une "enzyme" se décompose en 2 parties:

- D'abord, les chimistes recherchent un récepteur dont la structure tridimensionnelle peut accueillir de façon sélective deux ou plusieurs substrats. C'est l'ETAPE DE RECONNAISSANCE .
- Dès que ce récepteur est découvert, il est modifié afin de favoriser la réaction. C'est l'ETAPE DE TRANSFORMATION.

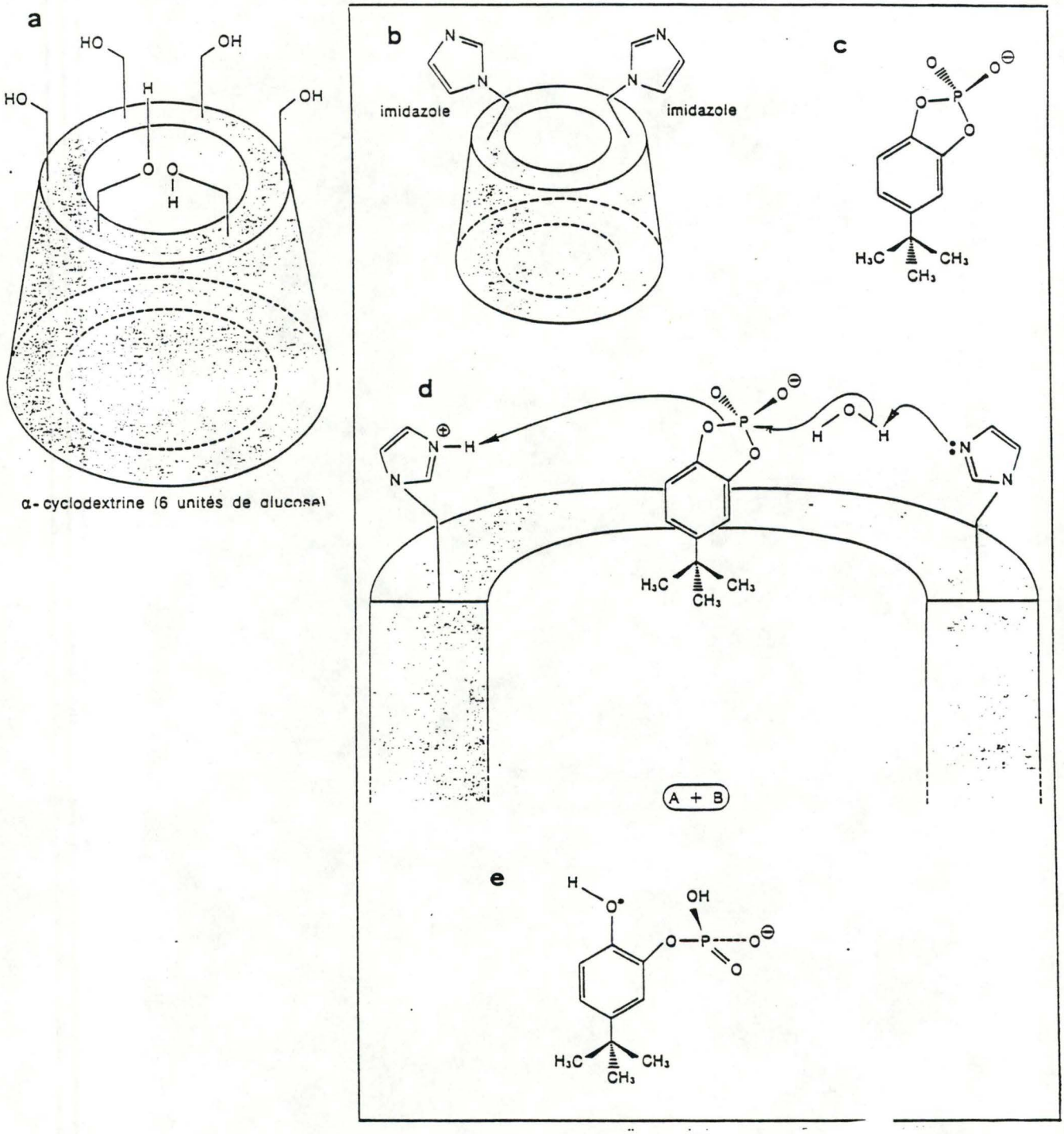


Figure 2 : a) Schéma d'une cyclodextrine
b) Cyclodextrine sur laquelle deux groupements imidazole ont été greffés
c) Schéma du substrat nommé "phosphate cyclique"
d) Mécanisme suggéré pour expliquer la coupure de la liaison phosphore-hydrogène
e) Produit stéréospécifique (un seul isomère) produit par cette réaction (Kellogg, 1984)

1.3.3. Exemples "d'enzymes synthétisées".

Les exemples de catalyseurs " biologiques " synthétisés sont nombreux. Nous vous en présentons trois qui nous ont particulièrement paru intéressants.

1.3.3.1. Les cyclodextrines.

a) Recherche d'un récepteur.

Les cyclodextrines, premier récepteur à être utilisé en chimie enzymologique (CRAMER, 1984), sont des oligosaccharides cycliques composés de six ou sept unités de glucose. Elles sont facilement isolables à partir de l'amidon et ont la forme d'un tore dont le diamètre des deux extrémités est différent. On trouve des groupements CH_2OH à la petite extrémité et des groupements -CHOH- à la grande extrémité (fig. 2). L'avantage d'une telle molécule est qu'elle se dissout dans l'eau grâce aux groupements hydrophiles (OH) de ses extrémités. L'intérieur de la molécule est hydrophobe; il peut donc attirer des molécules apolaires (comme des hydrocarbures) qui s'adaptent très bien à cette cavité. Un récepteur à sélectivité hydrophobe a donc été découvert; naturellement, ce récepteur n'a pas d'activité en tant que tel.

b) Recherche d'une activité.

Pour réaliser cet objectif, R. BRESLOW (1982) et I. TABUSHI (1982) commencèrent par analyser le mécanisme réactionnel simple et bien étudié de la ribonucléase de boeuf, qui de surcroît, est très bien connue tridimensionnellement.

Ils constatent la présence, au niveau du site actif, de deux histidines situées de part et d'autre de l'ARN en voie d'hydrolyse.

Ils décident alors de fixer deux groupements imidazoles sur l'extrémité étroite des cyclodextrines (réaction possible, car les groupements RH_2OH sont plus réactionnels que les groupements RHOH-) (fig.2).

Le résultat de cette modification chimique est l'existence d'une activité hydrolytique sur un phosphate cyclique d'un analogue nucléotidique (fig. 2c).

Le mécanisme proposé par BRESLOW et TABUSHI est le suivant: le groupement hydrophobe du "phosphate cyclique" (analogue nucléotidique) se place dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine modifiée laissant émerger la tête hydrophile entre les deux groupements imidazoles catalysant le transfert d'électrons. La liaison phosphate cyclique de l'analogue nucléotidique est hydrolysée en un point unique (fig.2d). Cette réaction manifeste une sélectivité réactionnelle absolue puisqu'ils obtiennent un seul isomère (Fig. 2e).

c) Conclusions.

Cette enzyme artificielle possède bien certaines caractéristiques de l'enzyme naturelle. La spécificité réactionnelle en est sans doute la meilleure preuve. Malheureusement, elle n'accélère la réaction que d'un facteur 50, ce qui est peu par rapport aux enzymes naturelles (facteurs d'accélération pour ces derniers sont de 10^6 à 10^{14}). De plus, les substrats acceptés par la ribonucléase A et l'enzyme artificielle sont un peu différents. Le premier hydrolyse le RNA et l'autre , l'"analogue nucléotidique". Le RNA n'est pas hydrolysé par l'enzyme artificielle et l'"analogue nucléotidique" n'est jamais hydrolysé par la ribonucléase A de boeuf.

1.3.3.2. Les éthers couronnés.

Les éthers couronnés sont le 1,4,7,10,13,16-l'hexaoctacylcodécane. C'est une synthèse de 6 molécules d'éthylène glycol (CH_2OH - CH_2OH).

a) Recherche d'un récepteur.

Les éthers couronnés ont 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.

Par la suite, il fut découvert que les groupements NH_4^+ et R-NH_3^+ forment, eux aussi, des complexes très stables avec les éthers couronnés. En effet, en plus de l'interaction ionique, il se forme trois ponts hydrogènes entre les hydrogènes du " substrat "

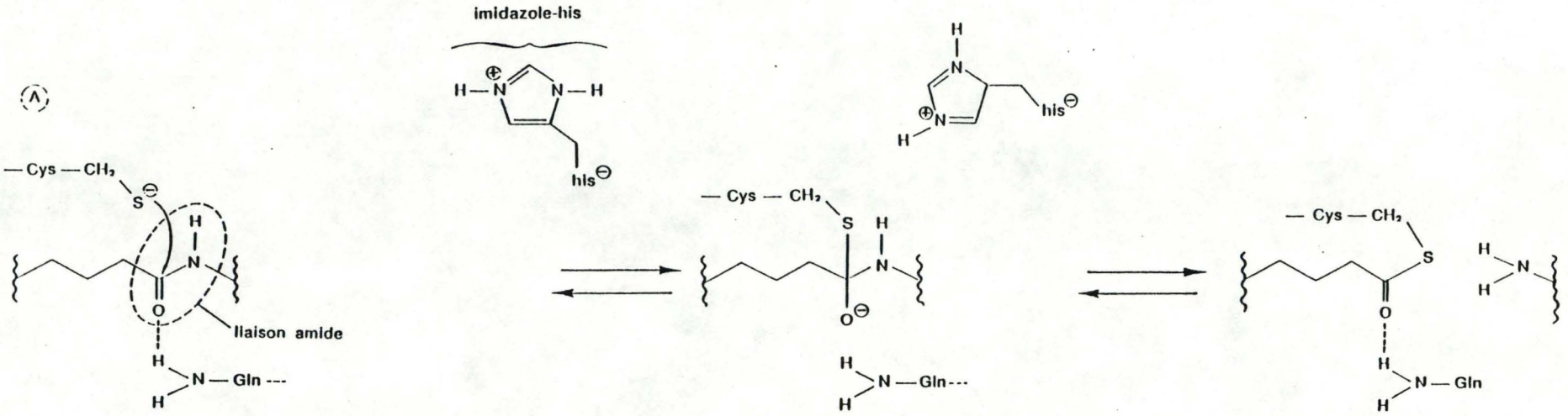


Figure 3 : a) Mécanisme d'hydrolyse de la papaïne
b) Ether-couronne modifié par la fixation de quatre groupements SH. Il peut fixer un groupement ammonium et couper une liaison ester du 4-nitrophényl estérifié à un dipeptide (Kellogg, 1984)

et les oxygènes des éthers couronnés. L'équipe de LEHM (1988) et CRAM (1983) décida d' utiliser les propriétés de ce récepteur pour complexer les groupements NH_3^+ de petits peptides.

b) Recherche d'un site actif.

Après avoir mis en évidence ces récepteurs, LEHM et CRAM analysèrent le site actif de la papaïne, peptidase dont le mécanisme actif est relativement simple et bien connu. La figure 3a montre que le groupement imidazole de l'histidine du site actif prend l'ion H^+ de la cystéine.

Le groupement S^- ainsi créé va réagir avec le carbone électrophile d'une liaison amide du peptide à hydrolyser. A ce moment, le carbone venant de recevoir le doublet électronique du S^-, libère la paire électronique de la liaison peptidique qui retourne sur l'azote formant un groupe $-NH_2$. La partie postérieure du peptide à hydrolyser est libérée. Ensuite un ion OH^-, venant de l'eau, se substitue au soufre de la cystéine terminant la réaction d'hydrolyse du peptide. Le mécanisme sera complètement terminé lorsque la cystéine sera reprotonée en prenant son proton déposé sur l'imidazole de l'histidine.

Après avoir constaté l'importance de la cystéine dans le mécanisme enzymatique de la papaine, les chimistes ont greffé sur chaque éther couronné quatre groupements chimiques portant un -SH terminal (fig. 3b). Ils constatèrent que ce récepteur actif est capable d'hydrolyser une liaison ester du 4-nitrophénol estérifié à un dipeptide (la liaison liaison ester est de même conformation spatiale mais beaucoup moins stable que la liaison peptidique).

c) Conclusion.

Dans ce cas également, on constate que cette enzyme artificielle possède bien certaines caractéristiques de l'enzyme naturelle, mais que les substrats acceptés par les deux enzymes sont quelque peu différents

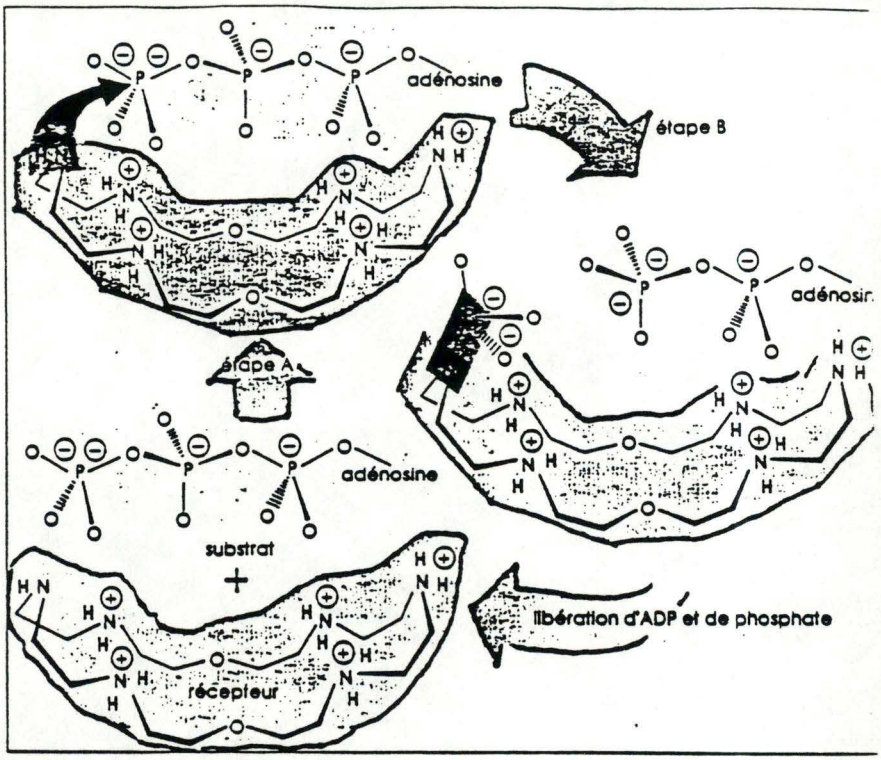


Figure 4 : Mécanisme de réaction ATPasique des katapinates
Etape A : fixation du substrat (ATP)
Etape B : lyse de l'ATP et du phosphate (Hosseini, 1988)

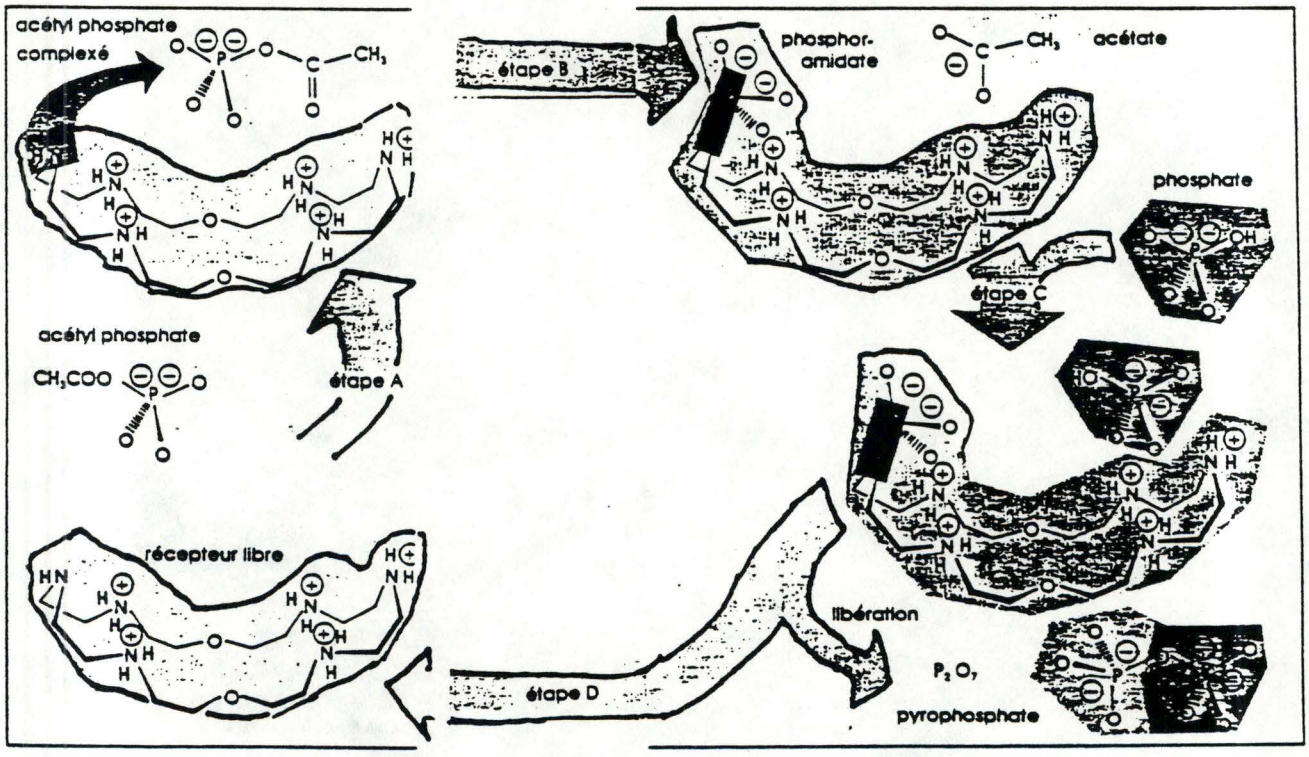


Figure 5 : Mécanisme de réaction des katapinates sur l'acétyl phosphate
Etape A : fixation de l'acétyl phsophate sur le katapinate
Etape B : hydrolyse de la liaison avec création d'un intermédiaire phosphoramide et libération de l'acétate
Etape C: fixation du phosphate sur l'intermédiaire et libération de pyrophosphate

1.3.3.3. Les Katapinates.

Les Katapinates aussi appelés $24N_6O_2$ sont l'hexaaza-1,4,7,13,16,19-dioxa-10-22-tétracicosane.

a) Recherche d'un récepteur.

Les Katapinates sont des récepteurs anioniques capables de fixer et de sélectionner des ions négatifs, et plus particulièrement des nucléotides comme l'ATP ou l'ADP (les charges négatives étant portées par les groupements phosphates).

b) Activité.

L'activité du Katapinate est intrinsèque; une des 6 fonctions amines n'étant pas protonée à pH=7, elle peut réagir avec la fonction phosphate de l'ATP; il apparaît dès lors un groupe phosphoramide et un ADP. Après libération du phosphate et de l' ADP, un cycle identique peut recommencer. On constate une sélectivité de la part des Katapinates: en effet, l'hydrolyse de l'ATP par rapport à celle de l'ADP se réalise 9 fois plus vite (Fig. 4). Notons aussi que la réaction est de 100 fois à 1000 fois plus rapide en présence de Katapinates.

c) Du catabolisme à l'anabolisme.

L'acétylphosphate (autre substrat pouvant être utilisé par les Katapinates) est capté par le $24N_6O_2$. Ensuite, il y a hydrolyse comme pour l'ATP: une des 6 fonctions amines non protonées forme un intermédiaire de type phosphoramide, alors que l'acétyl s'en va. Cet intermédiaire (Katapinate phosphoramide) va jouer le rôle d'un nouveau récepteur anionique. Cette fois, c'est un phosphate inorganique qui est sélectionné. Dans ce nouveau complexe, les deux phosphates sont très proches l'un de l'autre et il y a une réaction de transfert où le phosphate attaque le phosphoramide pour donner un pyrophosphate libéré dans le milieu aqueux (fig. 5). Ce pyrophosphate n'est jamais observé dans une réaction où les Katapinates sont absents. En effet, en milieu aqueux (pH supérieur à 2), les groupements phosphates se repoussent empêchant toute réactivité.

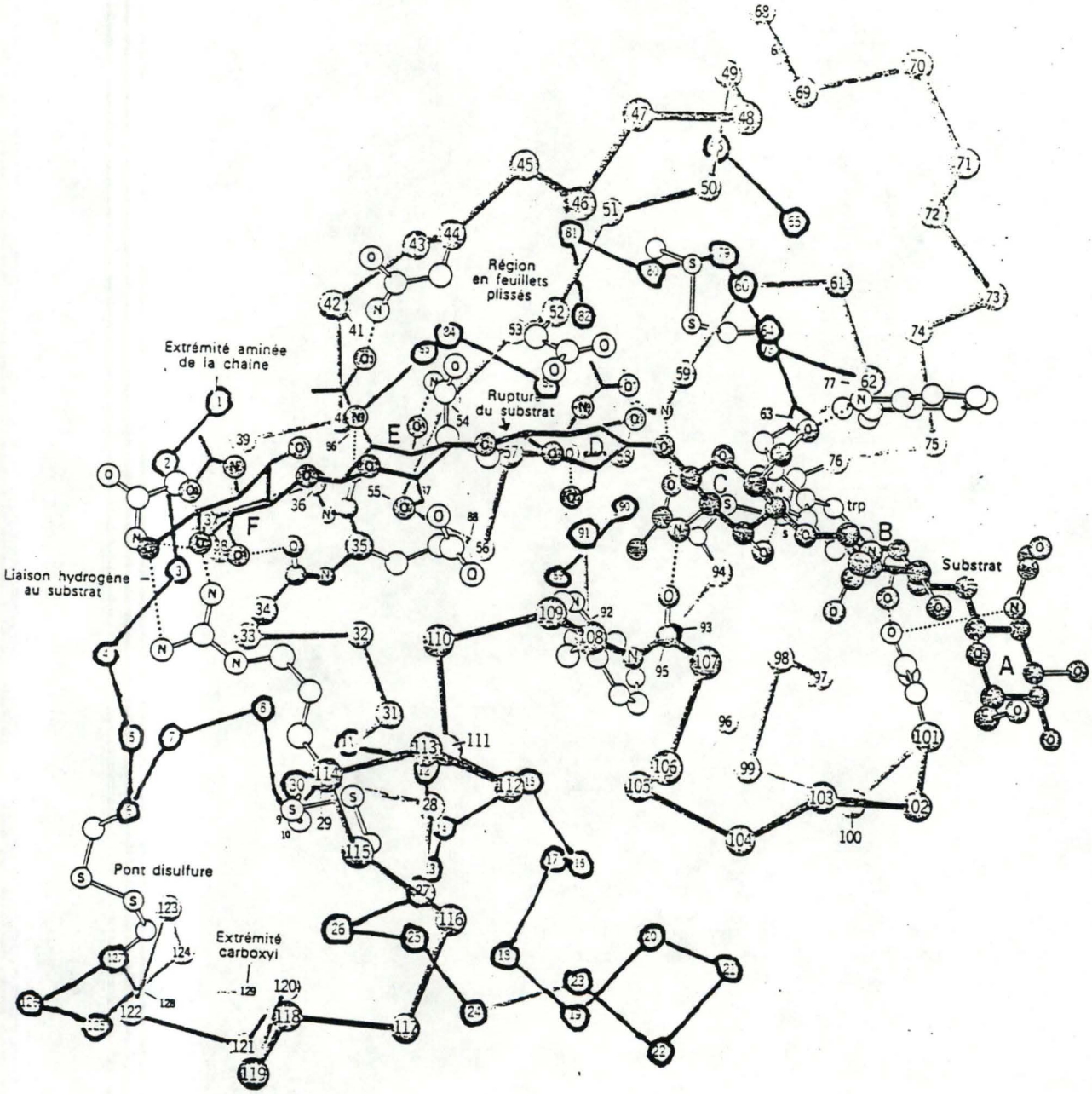


Figure 6 : Structure tridimentionnelle du lysozyme (Lenhinger, 1977)

1.3.4. Conclusions sur la vision enzymologique des chimistes.

La vision des chimistes est très importante pour ce travail; elle décompose le mécanisme réactionnel des enzymes en ses rudiments les plus simples (fixation - activité). Mais elle prouve surtout que quelques éléments importants 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 des enzymes naturelles. La totalité de l'enzyme n'est donc pas nécessaire pour produire une activité catalytique.

KELLOGG (1984) proposait au début de son article l'hypothèse suivante: à l'origine de la vie, les peptides étaient de petite taille mais avaient déjà une activité catalytique semblable à celle qu'on retrouve chez les enzymes actuelles.

Au cours de l'évolution, ils se sont complexifiés et ont été triés par le mécanisme de sélection: les peptides les plus efficaces ont été conservés, les autres ont été éliminés. Suivant cette hypothèse, l'enzyme est donc un édifice qui s'est complexifié au cours du temps afin de gagner en vitesse et en sélectivité.

Dans un tel contexte, l'idée de rechercher une activité catalytique sur un morceau d'enzyme peut dès lors se concevoir.

1.4. LA VISION ENZYMOLOGIQUE DES BIOLOGISTES.

1.4.1. Synthèse d'un peptide ayant une activité identique à celle du lysozyme .

1.4.1.1. Aperçu structurel du lysozyme.

Le lysozyme est un petit monomère comprenant 129 acides aminés et posédant une masse moléculaire de 14300 daltons. Sa structure tertiaire est une des mieux connue. Elle a été mise en évidence par diffraction aux R.X. en 1965 (fig. 6)

Les acides aminés importants du site actif sont bien connus grâce à l'étude aux R.X. du complexe enzyme inhibiteur. Le lysozyme est une enzyme hydrolysant la paroi de certaines bactéries. Les parois de *Micrococcus lysodeikticus* étant le substrat le plus

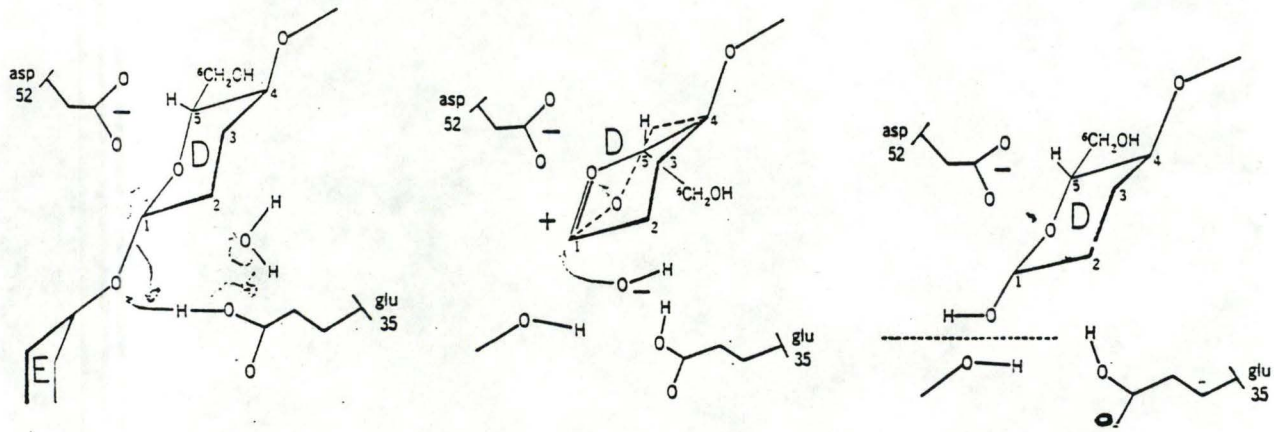


Figure 7 : Mécanisme réactionnel suggéré par Phillips (Lehninger, 1977)

utilisé pour doser l'activité du lysozyme. Le mécanisme de cette réaction proposé par PHILLIPS (1966) suggère une protonation de l'oxygène de la liaison glycosidique des polymères de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuranique des parois bactériennes. Cette protonation de l'oxygène glycosidique entraîne une fission de la chaîne du polymère. Ceci est permis grâce à l'ionisation de l'acide glutamique 35 et à la stabilisation de cette ionisation grâce à l'acide aspartique 52 (fig. 7). De plus, on a 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.

1.4.1.2. Le travail de NAITHANI et DHAR.

NAITHANI et DHAR (1967) ont eu l'idée de synthétiser un peptide possédant un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe en introduisant dans les deux domaines des fonctions carboxyliques.

La synthèse de ce peptide nécessite deux étapes:

Un peptide de L-phénylalanine et de L-glutamate est synthétisé de façon aléatoire. La quantité de L-phénylalanine (acide aminé hydrophobe) est 6,5 fois plus importante que celle du glutamate (acide aminé portant le groupement carboxylique). Ensuite, on fait subir à ce peptide une deuxième polymérisation avec des proportions en L-glutamate 12 fois plus importantes que celles en L-phénylalanine. On obtient dès lors un peptide nommé PG dont la masse moléculaire moyenne vaut 63650 daltons et le rapport L-phénylalanine / L-glutamate est de:1/0,3.

Cette même équipe a synthétisé, par la même technique, un autre peptide nommé GcG, polymère de C-cholestéryl -L-glutamate, C-benzyl-L-glutamate et de L-glutamate en proportion 1 : 0,67 : 0,66 , la masse moléculaire moyenne valant 12000 daltons.

Ils constatent que les peptides PG et GcG ont une activité lytique sur les suspensions de parois de *Micrococcus lysodeikticus;* l'activité des PG et des GcG est respectivement 30 fois et 200 fois

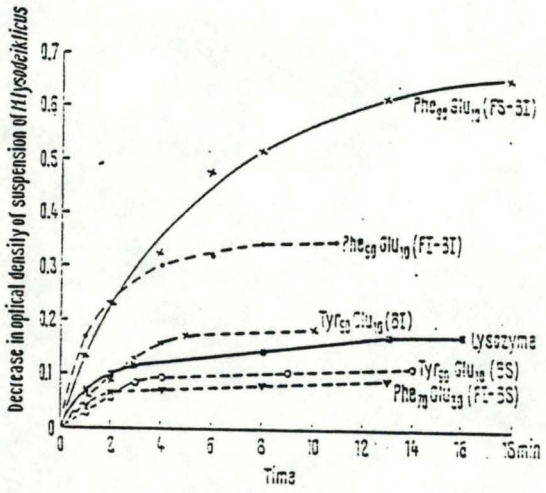


Figure 8 : Comparaison de l'activité des différentes copolymères (0,5 mg/ml) avec le lysozyme (0,05 mg/ml) (Sushma, 1969)

inférieure à celle du lysozyme. Les lysats venant de l'enzyme et des deux polymères synthétisés ont été comparés par des techniques d'électrophorèses et de chromatographies sur papier. Aucune différence n'a pu être mise en évidence. Les peptides synthétisés montrent bien une activité identique mais inférieure à celle du lysozyme.

1.4.1.3. Le travail de SUSHMA et MATHUR.

Des travaux similaires ont été menés par SUSHMA et MATHUR (1969). Ils ont changé la phénylalanine par la tyrosine, ils ont également joué sur le rapport des acides aminés pour voir les modifications cinétiques de ces différents peptides. Lors d'une même synthèse (polymérisation aléatoire) il est normal d'obtenir une série de peptides différents au niveau de leur structure primaire bien que leur proportion finale en acides aminés soit identique.

Vu que leurs structures primaires diffèrent, Sushma et Mathur sont parvenus à séparer ces peptides en jouant sur leurs propriétés de solubilité (solubles ou insolubles dans l'acide formique - solubles ou insolubles dans le bicarbonate de sodium).

La figure 8 montre l'activité des peptides séparés suivant leurs propriétés de solubilisation. Le groupe de peptides comprenant 90% de Phe et 10% de Glu, soluble dans l'acide formique et insoluble dans le bicarbonate de sodium montre la plus grande activité, elle vaut 1/3 de celle du lysozyme. Elle est suivie par le groupe de peptides de même composition que celle ci-dessus mais qui est insoluble à la fois dans l'acide formique et dans le bicarbonate de sodium; l'activité vaut 1/6 de celle du lysozyme. Le groupe de peptides comprenant 90% de tyrosine et 10% de Glu, insoluble dans le bicarbonate de sodium montre une activité valant 1/10 de celle du lysozyme. Le groupe de même composition mais soluble dans le bicarbonate de sodium montre une activité encore plus faible valant 1/15 de celle du lysozyme. Finalement, le groupe de peptides ayant une composition de Phe 70% et de Glu 10% insoluble dans l'acide formique mais soluble dans le bicabonate de sodium a la plus faible activité, elle vaut 1/20 de celle du lysozyme.

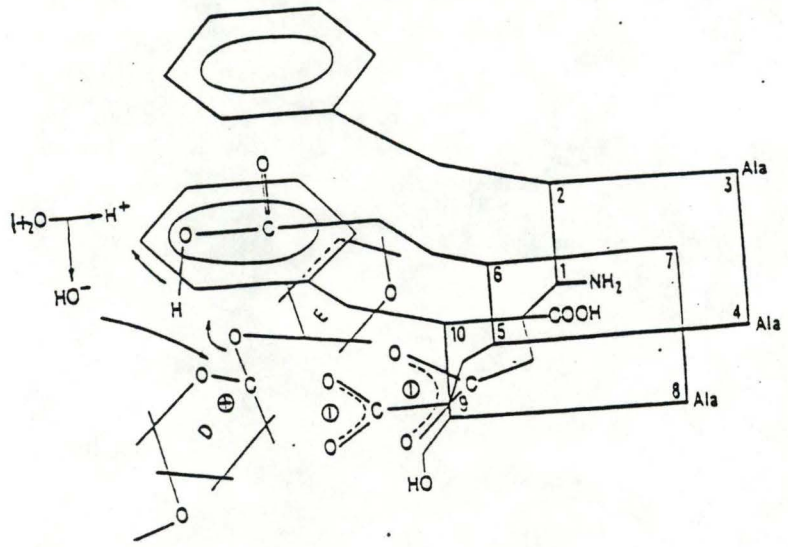


Figure 9 : Représentation tridimentionnelle du décapeptide possédant une activité lysozyme (FI : insoluble dans l'acide formique, FS : soluble dans l'acide formique, BI : insoluble dans le bicarbonate, BS : soluble dans le bicarbonate) (Chakravartry, 1972)

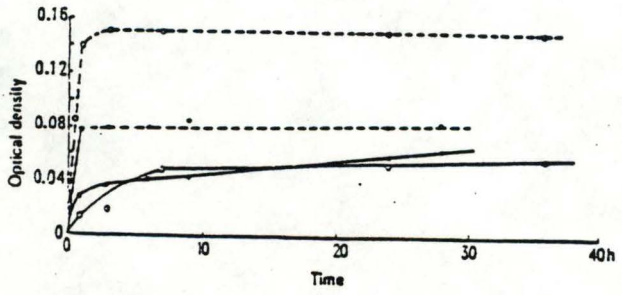


Figure 10 : Comparaison de l'activité du lysozyme (0,5 mg/ml) (---) et du décapeptide (2,5 mg/ml) (___) (Chakravartry, 1972)

1.4.1.4. Une approche plus rationelle.

DHAR et son équipe (1973) synthétisent un peptide de 10 acides aminés possédant à la fois un domaine hydrophobe et un domaine hydrophile dans lesquels ils introduisent du Glu. La structure primaire de ce peptide est Glu-Phe-Ala-Ala-Glu-Glu-Ala-Ala-Ser-Phe. Les règles élémentaires de repliement des peptides (KOTELCHUCK et SCHERAGA, 1969) prédisent la formation d'une hélice a, puisque les 8 premiers acides aminés sont constructeurs d'hélices a (seule la sérine est un acide aminé dit destructeur de chaînes a). Cette estimation structurale fut confirmée par une analyse aux R.X. Ainsi, dans l'espace, on retrouve la Glu 6 dans un environnement hydrophobe puisqu'elle est flanquée "en haut et en bas " d'un cycle benzène provenant de la Phe 2 et de la Phe 10 (fig. 9). L'environnement hydrophile est également créé et il est le résultat de la proximité spatiale des Glu 1 et 5. Le site actif est constitué des groupements carboxyliques de la Glu 1 ou 5 avec la Glu 6.

On constate que ce décapeptide possède une activité hydrolytique sur la chitine ou le dextrant. Le graphe de l'activité enzymatique est donné à la figure 10.

1.4.2. L'adénylate cyclase.

1.4.2.1. 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; ce qui forme l'AMP cyclique. La masse moléculaire de cette enzyme vaut 95000 daltons.

L'équipe de HOLLAND (1988) a placé un gène d'adénylate cyclase dans un plasmide à la suite d'un promoteur induit à 42°C. A cette tempérautre, l'enzyme produit de forte quantité d'adénylate cyclase qui précipite partiellement dans *E.coli* . On constate que l'enzyme précipitée a perdu son activité. Pour tenter de récupérer une activité plus grande, les auteurs ont ajouté de la trypsine sur l'adénylate cyclase purifiée préalablement. La figure 12 montre la

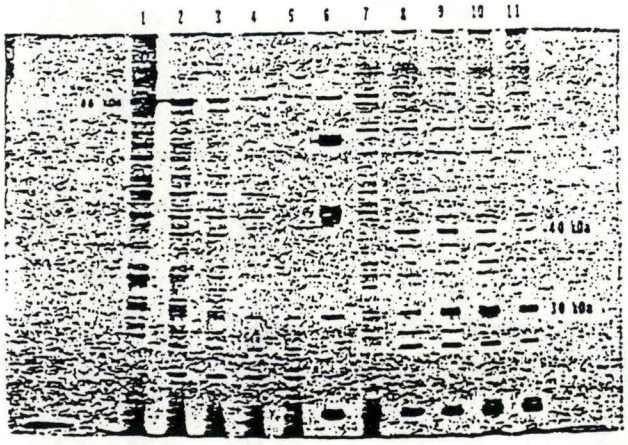


Figure 11 : Gel SDS sur le digestat de l'enzyme. Les pistes 1 à 5 contiennent la fraction insoluble provenant de la digestion trypsinique. Les pistes 7 à 11 contiennent la fraction soluble du digestat trypsinique. Les pistes 1 et 7 correspondent à une digestion de 0 heure, les pistes 2 et 8 à une digestion de 5 minutes, les pistes 3 et 9, à une digestion de 60 minutes, les pistes 4 et 10, à une digestion de 360 minutes et les pistes 5 et 11, à une digestion de 480 minutes (Mitchell et al., 1987)

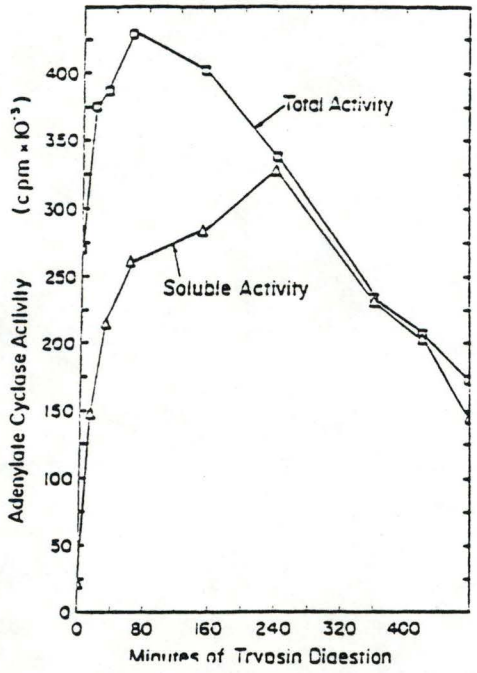


Figure 12 : Dépendance de l'activité totale et soluble de l'adénylate cyclase en fonction du temps de digestion

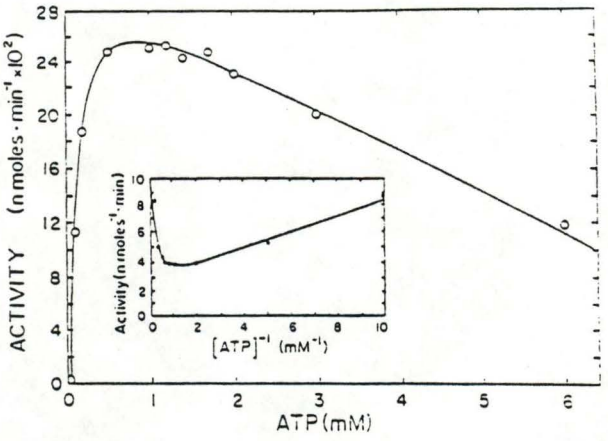


Figure 13 : Dependance de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en ATP (concentration en magnèsium fixée à 20 mM) (Mitchell et al., 1987)

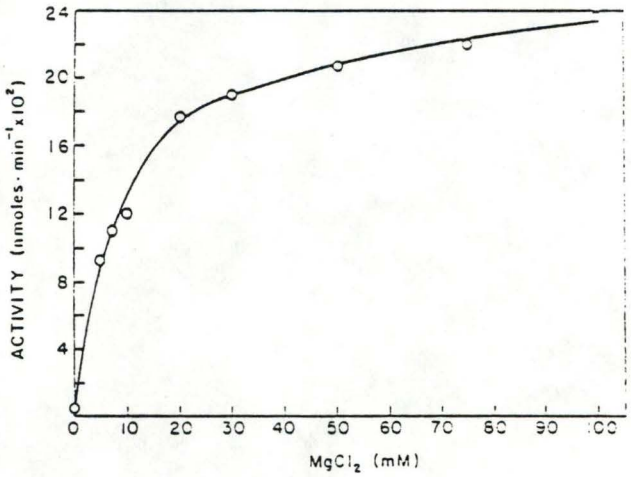


Figure 14 : Dépendance de la vitesse de réaction en fonction du magnésium (concentration en ATP constante à 1 mM)

variation d'activité totale et soluble en fonction de la digestion trypsinique. Ce graphe est couplé à un gel d'électrophorèse (Fig. 11) On constate qu'après 360 minutes de lyse trypsinique, on a une forte concentration de peptides faisant 30000 daltons et une faible concentration en peptides de 40000 daltons. Après 480 minutes, la bande de 40000 daltons a disparu et celle de 30000 a diminué. En plus, si nous comparons la courbe de l'activité soluble avec l'intensité des bandes de 30000 daltons, on peut déduire que c'est le peptide de 30000 daltons qui a une activité.

1.4.2.2. Caractérisation du peptide.

Le peptide de poids moléculaire valant 30000 daltons est isolé. La relation entre l'activité de ce peptide avec la concentration en ATP est montrée sur la figure 13 . On constate que la courbe passe par un optimum correspondant à une concentration en ATP de 0,9 mM. Cette expérience se déroule à une concentration de Mg Cl_2 constante (20 mM).

La relation existant entre l'activité et la concentration en $MgCl_2$ est présentée sur la figure 14 (le Mg^{++} est un cofacteur indispensable pour le déroulement de la réaction). 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 K_m et le V_{max} de l'enzyme et du peptide.

	V_{max}	K_m
Adénylate cyclase	700 nmol/min.mg	0,1 mM
Peptide	435 nmol/min.mg	0,25 mM

Ces mesures ont été réalisées avec des concentrations en ATP inférieures à 0,9 mM et avec une concentration en Mg^{++} égale à 20 mM

1.4.2.3. Conclusions.

La similitude entre les courbes et les constantes cinétiques du peptide et de l'enzyme initiale prouve qu'un morceau digéré de 30000 daltons a gardé le domaine catalytique de l'enzyme intact ou

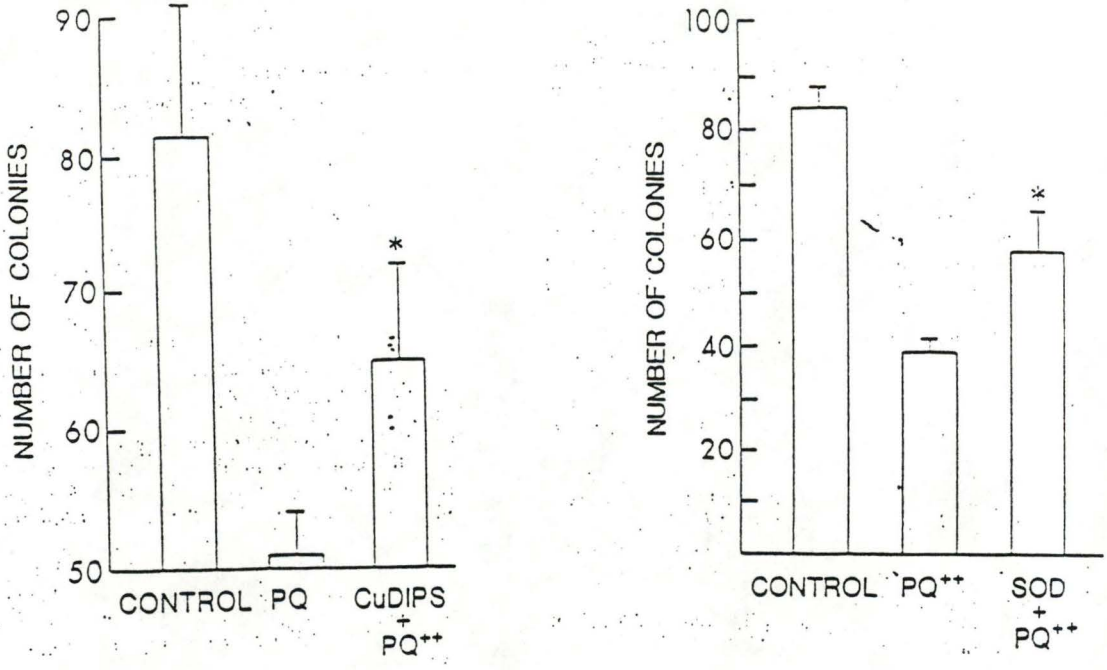


Fig. 15 : comparaison entre la protection due à la SOD (200 µmoles) et au CuDIPS (180 nmoles) sous un empoisennement au paraquat (Darr et al., 1988).

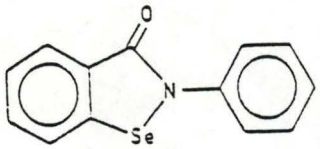


Fig. 16 : représentation de la molécule d'ebselen (Maiorino et al., 1988).

Substrate	Ebselen	GPX K_i(mM^{-1} min^{-1})	PHGPX
Hydrogen peroxide	6.6×10^5	2.9×10^5	1.9×10^5
Cumene hydroperoxide	3.0×10^1	1.0×10^6	1.3×10^3
Linoleic acid hydroperoxide	1.8×10^2	1.8×10^6	2.3×10^6
Phosphatidyl choline hydroperoxides	8.8×10^2	—	7.0×10^5

Fig. 17 : comparaison des constantes cinétiques K1 de l'ebselen par rapport à la GPX et la PH GPX pour différents substrats (Maiorino et al., 1988).

partiellement intact. On constate donc qu'une perte des 2/3 de la séquence de l'enzyme n'a affecté que faiblement son activité.

1.4.3. CuDIPS et Ebselen.

1.4.3.1. Le CuDIPS.

CuDIPS est l'abréviation de diisopropylsalicylate de cuivre; il s'agit en fait, d'un complexe cuivrique. On constate que ce complexe a une activité semblable à la superoxyde dismutase (SOD) qui possède, elle aussi, un groupement cuivrique complexé indispensable à son activité catalytique.

La réaction chimique est en fait une réaction de dismutation et peut s'écrire de la manière suivante:

$$Cu^{2+} + O_2^{\circ -} \qquad Cu^{+} + O_2$$

$$Cu^{+} + O_2^{\circ -} + 2H^{+} \qquad Cu^{2+} + H_2O_2$$

Des expériences ont été menées sur des cultures de cellules ovariennes de hamsters. Ces cellules sont empoisonnées par le paraquat qui interagit avec les diaphorases cellulaires. Le paraquat est réduit en un monocation bleu, qui donne son électron spontanément à l'oxygène, formant à ce moment, un superoxyde. Ce superoxyde, toxique pour la cellule, peut être transformé par la SOD ou le CuDIPS. Les résultats de cette protection sont présentés à la figure 15. Il est facile de constater que l'activité de la SOD est plus importante que celle du CuDIPS. Pour une protection similaire dans un milieu contenant 200 micromoles de paraquat, il faut soit 180 nanomoles de SOD soit 2 micromoles de CuDIPS.

1.4.3.2. L'Ebselen.

L'Ebselen est le 2 phényl-1,2 benzoi soselenazol-3-(2H)-one. En fait, il s'agit d'un hétérocycle contenant un sélénium (cfr fig.16). L'Ebselen a une activité semblable à la glutathione peroxydase (GSHPX) qui contient également un sélénium.

En effet, la GSHPX et l'Ebselen sont tous deux :

- des antioxydants empêchant la peroxydation des lipides dans les microsomes et les cellules isolées.
- des protecteurs de cellules contre les stress oxydatifs.
- des inhibiteurs directs de la 5' lipoxygénase (chez les leucocytes animaux) et de la cyclooxygénase.
- des inhibiteurs de la sécrétion des PGE_2 et de la glucoronidase de macrophages.

Le mécanisme de la réaction est le suivant:

ROOH + E.Cys Se H -----> E.Cys Se OH + ROH

E.Cys Se OH + GSH -----> E.Cys Se - SG + H_2 O

E.Cys Se SG + GSH -----> E.Cys Se H + GSSG

Les expériences montrent également que l'activité de l'Ebselen est moins importante que celle de la GSHPX, la figure 17 compare les K_1 , on constate que l'enzyme est mille à dix mille fois plus rapide que l'Ebselen.

1.5. GENERALITES SUR L'ALCOOL DESHYDROGENASE.

1.5.1. Choix de l'enzyme.

Outre le fait que travailler sur l'ADH insère cette étude dans un projet du Laboratoire , il existe d'autres avantages pour lesquels cette enzyme fut retenue pour notre travail.

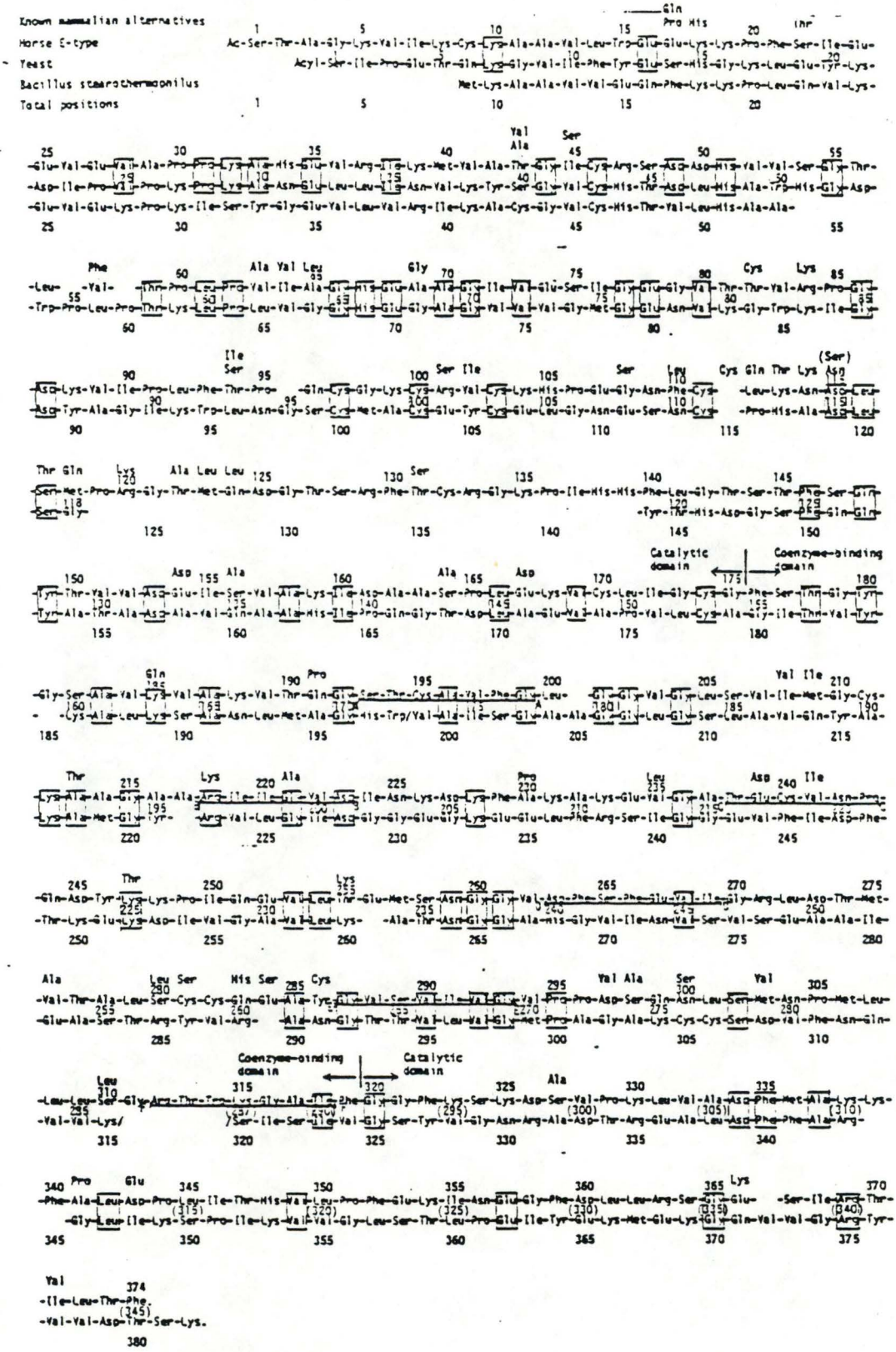


Fig. 18 : alignement des structures primaires de l'ADH de cheval, l'ADH de levure et l'ADH de Bacillus stearothermophilus (Jörnvall et al., 1978).

D'abord, il fallait une enzyme que nous pouvions utiliser en grosse quantité. Elle devait être peu coûteuse et facilement disponible. L'ADH était intéressante car nous pouvions la purifier nous-mêmes, à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, pour un prix très raisonnable. Elle avait de surcroît un avantage méthodologique très important : il est très facile de suivre directement au spectrophotomètre l'oxydation du NADH (ce qui entraîne une diminution d'absorbance) ou la réduction du NAD^+ (accompagnée d'une augmentation d'absorbance). Enfin, la catalyse de réduction 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.

L'alcool déshydrogénase (ADH) de levure fut la première déshydrogénase à NAD^+ à être cristallisée (en 1937). Cela allait permettre d'étudier de manière plus précise la 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^+ - oxydoréductase.

Dans les années suivantes, de nombreuses autres ADH allaient être isolées à partir d'animaux ou de végétaux. Celle 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.

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

Une première étude menée par JÖRNVALL (1977) montre que l'alignement des séquences en acides aminés de la H.ADH et du Y.ADH révèle une identité positionnelle de 25% (cfr fig. 18).

Par après, la structure du Y.ADH a été comparée à la structure tertiaire de la H.ADH bien connue cristallographiquement. Les résultats proposés par JÖRNVALL et BRANDEN (1978) montrent non

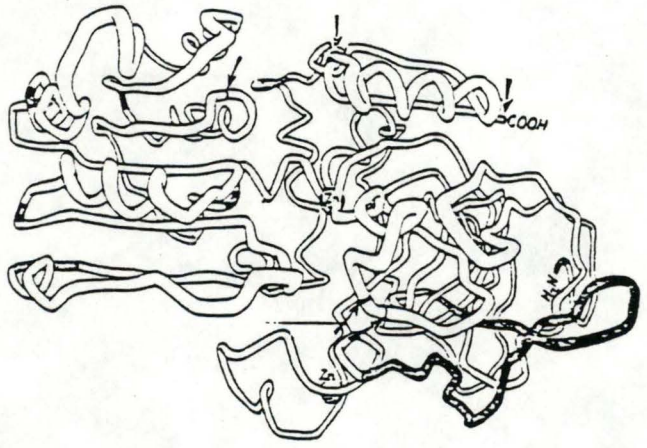


Fig. 19 : Structure tertiaire d'un monomère de HADH. Les zones noires représentent les segments absents chez l'ADH de levure (Jörnvall et al., 1978).

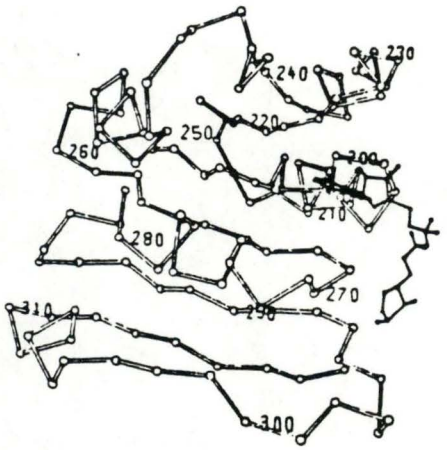


Fig. 20 : Stéréodiagramme des positions des carbones α du domaine de liaison du coenzyme (Branden et al., 1975).

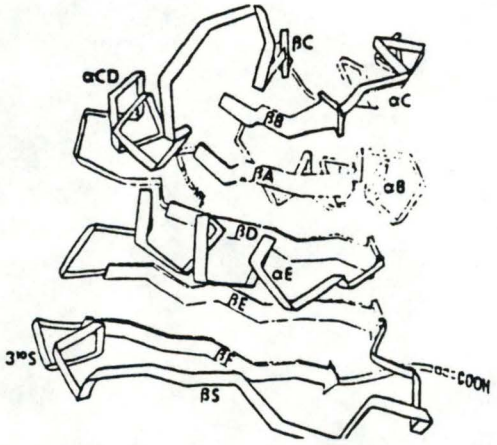


Fig. 21 : Diagramme illustrant le repliement des chaînes α et β dans le domaine de liaison du coenzyme (Branden et al., 1975).

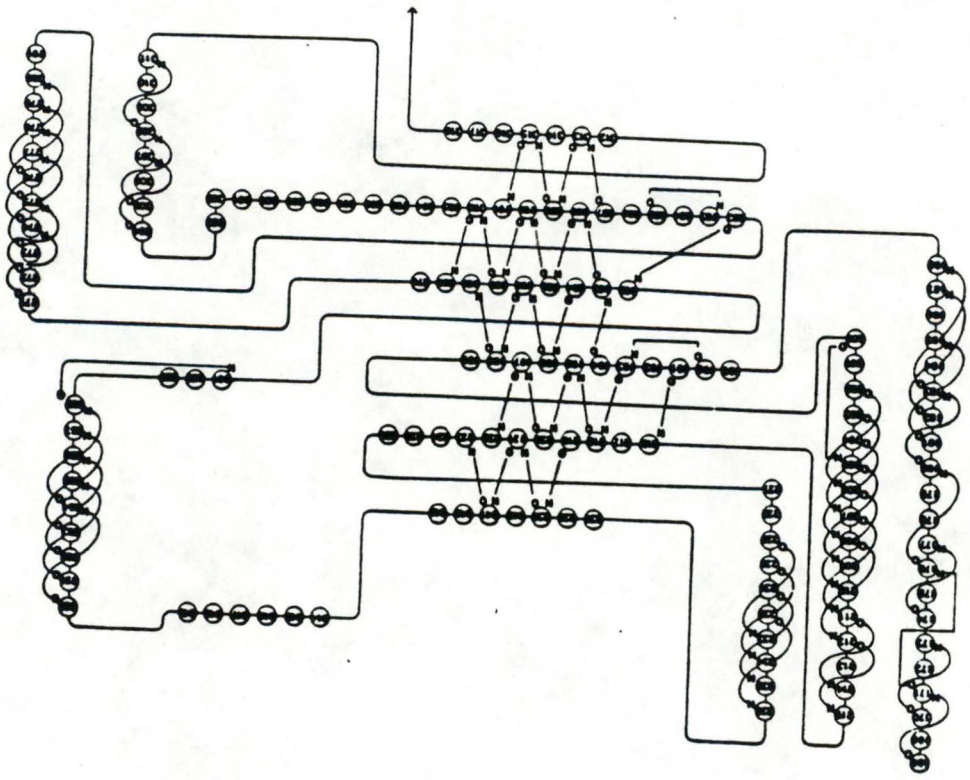


Fig. 22 . Diagramme illustrant les ponts hydrogènes dans le domaine de liaison du coenzyme (Branden et al., 1975).

seulement une large homologie entre les structures tertiaires des deux ADH, mais également une haute similitude entre le mécanisme enzymatique de ces deux protéines.

D'après 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.

Notons simplement que la grande différence entre les deux enzymes réside dans le fait que l'Y.ADH est tétramérique, alors que l'H.ADH est dimérique et possède une boucle (Loop) (fig. 19).

1.5.2.3. Description du domaine liant le coenzyme.

Le domaine liant le coenzyme est appelé "petit domaine" et comprend les acides aminés 176 à 318. Il est construit par 6 chaînes ß de taille similaire. Ces chaînes ß ont même direction et même sens. Elles sont reliées entre elles par des chaînes α. Cette disposition particulière va créer une crevasse pouvant accepter le coenzyme (cfr fig. 20). Le coenzyme est lié aux extrémités carboxyles des chaînes BA, BB, BD, aux chaînes AB et AE et aux boucles reliant BA à AB et BD à AE (cfr fig. 21) (WEINER 1969 et WEINER 1972).

MASBACH (1972) et LINDBERG (1973) ont étudié les acides aminés intervenant dans la liaison du nucléotide. Ils constatent que le groupe adénine est lié à une poche hydrophobe située au sommet de la crevasse (près de la surface de l'enzyme). Ils constatent qu'il n'y a aucune interaction spécifique avec le groupe adénine mais seulement une interaction hydrophobique très générale. On peut dès lors facilement expliquer la grande variation des acides aminés de cette partie du site catalytique chez les différents organismes (cfr fig. 23). La seule condition imposée est le remplacement d'un acide aminé hydrophobe par un autre acide aminé hydrophobe de taille similaire.

Le groupement ribose de l'adénosine ribose est lié à l'enzyme par une interaction spécifique: l'oxygène du groupement carboxyl de l'Asp 223 crée un pont hydrogène avec l'hydrogène du groupement hydroxyl situé sur le C_2' du ribose (fig. 24). La glycine 199 et la lysine 228 sembleraient protéger le groupement Asp 223 en réalisant des liaisons hydrogènes en l'absence du cofacteur. Cela

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. 23 : comparaison des acides aminés intervenant dans le site actif et dans le site de liaison du cofacteur et du substrat (Jörnvall et al., 1978).

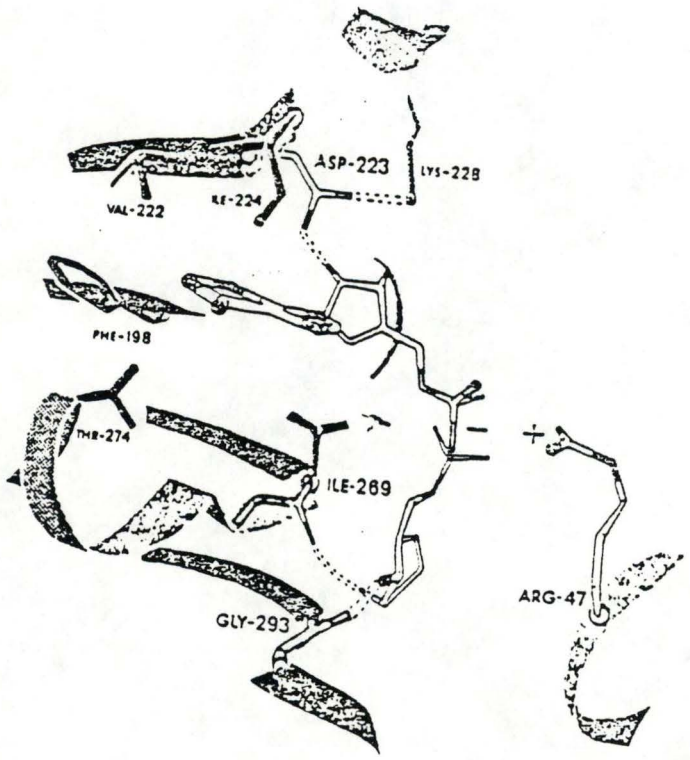


Fig. 24 : diagramme représentant les acides aminés jouant un rôlde important dans la liaison du cofacteur (Branden et al., 1975).

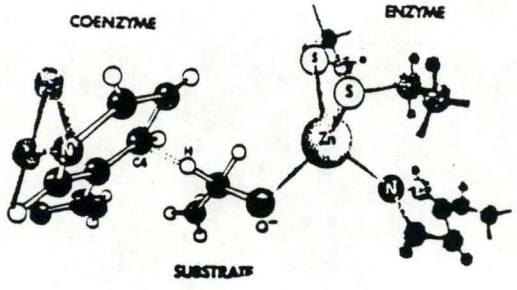


Fig. 25 : schéma représentant la position du substrat et du coenzyme par rapport au Zn. On peut noter la proximité entre l'hydrogène de l'alcool et le C_4 du groupement nicotinamide (Popjak et al., 1970).

empêche la formation de liaisons hydrogènes indésirées avec un groupement parasite entré par hasard au niveau du site de liaison du cofacteur, et qui empêcherait la fixation du cofacteur. L'importance de ces deux acides aminés nous est montrée par leur invariance dans les ADH de tous les organismes. Signalons également que la Ser 269 et la Gly 225 intéragissent avec ce groupement ribose mais de façon non spécifique.

Le groupe pyrophosphate est envoyé vers la chaîne latérale de la sérine (ou Ile 269 pour H.ADH). Et de plus, il existe une liaison ionique avec l'His 47 (Y.ADH).

Le ribose du groupement nicotinamide est lié par 2 liaisons ponts hydrogènes un peu particulières. En effet, les oxygènes de la chaîne principale des Ser 269 et Gly 293 forment des ponts hydrogènes avec les hydrogènes des groupements hydroxyl des C_3' et C_2'.

Enfin, le groupe nicotinamide est positionné à une distance de 4,5 A° (POPJAK, 1970) de l'atome Zn grâce à de fins ajustements réglés par la poche hydrophobe (fig. 25).

En effet, les acides aminés Thr 178, Ile 203, Val 268, Val 292 Gly 293 et Ile 318 sont identiques dans l'ADH de levure et dans l'ADH du foie de cheval (exception faite pour Ile 203 qui est changé en Val 203 dans la H.ADH) (JÖRNVALL,1978 ; HOLBROOK,1975 ; YONETANI,1963).

L'approche du site de liaison du cofacteur nous permet de comprendre la haute spécificité de l'enzyme pour le NADH ou le NAD^+ (voir les conditions de l'expérience). On peut constater que le cofacteur est orienté avec une grande précision vers le zinc, centre de la réaction; ceci aura son importance lors de l'explication du mécanisme enzymatique.

1.5.2.4. Description du domaine catalytique.

Le domaine catalytique comprend les acides aminés 1 à 175 et 319 à 374. La figure 26 nous montre un enchevêtrement de feuillet α et ß beaucoup plus complexe que pour le petit domaine.

Les acides aminés formant le site actif sont Trp 57, Trp 93, Asn 110, Leu 116, Tyr 140, Thr 141 et Ala 296. La Ser 48 et Ile 318 sont en fait à la frontière des 2 domaines.

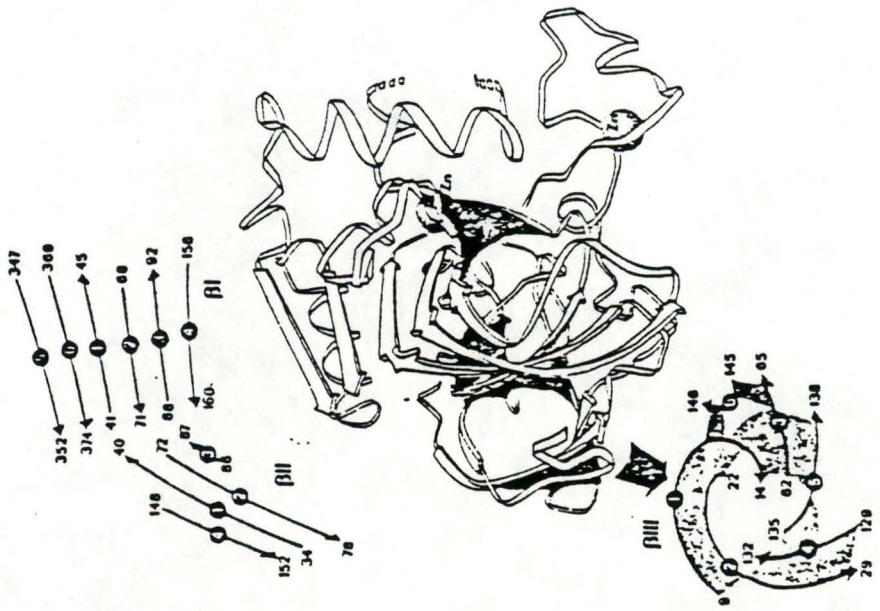


Fig. 26 : Diagramme illustrant le repliement des chaînes α et β dans le domaine catalytique (Branden et al., 1975).

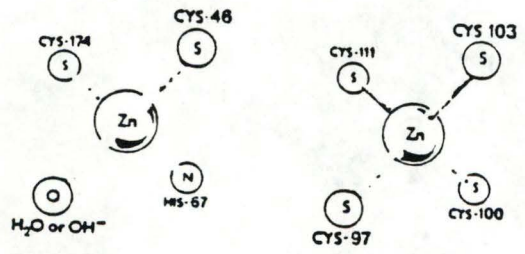


Fig. 27 : Atome de Zn catalytique lié aux deux cystéines, à l'histidine et à une molécule d'eau (Branden et al., 1975).

Dans cette poche accueillant le substrat, il y a trois acides aminés hydrophiles: la Ser 48 qui joue un rôle direct dans le mécanisme réactionnel (cfr 1.2.3.6.), la TYR 140 et la THR 141. Les acides aminés restants sont hydrophobes (JÖRNVALL, 1978).

On connaît moins bien les interactions entre le substrat et l'enzyme, mais il est probable qu'elles ne soient pas spécifiques. D'abord parce qu'il existe une forte variabilité entre les acides aminés du site de liaison du substrat suivant l'origine de l'ADH et ensuite parce que la spécificité du substrat n'est pas absolue. En effet, l'ADH réagit avec le 1-propanol, le 2-propanol, le 1-butanol, le n-octanol et même avec le méthanol mais avec, pour ce dernier, une activité inférieure à 1% de l'activité avec l'éthanol (DICKINSON,1972 ; MANI et CALL).

Outre cette poche de substrat, le domaine catalytique contient, chez l'ADH de levure, un ou deux atomes de zinc (VANDERHEIDEN, 1962 et CURDEL, 1963). L'atome de zinc qui intervient dans le mécanisme enzymatique est toujours présent. Il est lié au centre du monomère à 25 A° de profondeur par 2 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 zinc (cfr fig. 27). L'eau liée au zinc est impliquée dans un système "ponts hydrogènes" avec la Thr 48 et l'His 51 (WEINER,1968) (fig. 28). L'importance de ce zinc et de ces ponts hydrogènes sera explicitée plus loin lors du mécanisme cinétique.

Le deuxième atome de zinc n'est pas toujours présent chez l'ADH de levure. Lorsqu'il est présent, il forme quatre liaisons sulfures avec les Cys 97, 100, 103 et 111 (cfr fig. 27).

Lorsqu'il est absent, il est hautement probable, selon VENKATACHALAM (1968), que les cystéines forment des ponts disulfures entre elles.

Le rôle de ce second atome zinc est mal connu: il n'est pas essentiel pour l'activité catalytique (AKENSON, 1964). WEINER (1968) montre qu'il n'intervient pas dans la liaison du coenzyme.En effet, un ADH ne possédant aucun atome zinc (même pas le zinc dit catalytique) est capable de fixer le coenzyme (NAD^+ ou NADH). AKENSON (1964) suggère que le zinc joue un rôle dans la stabilité tertiaire ou quaternaire de l'enzyme. Cependant, des expériences menées par DRUM (1967), HARRISON (1967) et GREEN (1969)

montrent qu'il n'est pas nécessaire pour l'association des sous unités.

1.5.2.5. Caractéristiques de la réaction catalysée par l'ADH.

La réaction classique de l'ADH est la suivante:

$$CH_3\text{-}CH_2OH + NAD^+ \quad CH_3\text{-}CHO + NADH + H^+$$

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

$$K_{éq} = \frac{(CH_3 - CHO)\ (H^+)\ (NADH)}{(CH_3 - CH_2OH)\ (NAD^+)} \quad (à 20°C) = 8{,}0\ 10^{-12}\ M$$

On peut donc constater que l'oxydation de l'alcool et la réduction concomitante du cofacteur 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 DNEK,1982):

Ethanol $\quad$ Acétaldéhyde : $\quad E'_o = + 0{,}197$ V

$NAD^+ + H_2 \quad NADH + H^+ \quad E'_o = - 0{,}320$ V

d'où $\Delta E' = - 0{,}12$ V.

et $\Delta G = - n F E'$ où n: nombre d'électrons échangés
F: constante de FARADAY

$\Delta G = + 23{,}739$ Kj mole $^{-1}$

1.5.2.6. Mécanisme réactionnel.

Le mécanisme réactionnel (NAD^+ + éthanol donne NADH + H^+

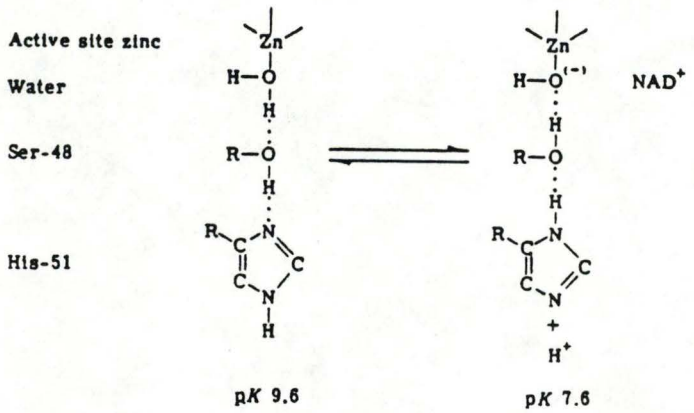


Fig. 28 : diagramme illustrant le "jeu" de ponts hydrogène de la molécule d'eau avec la Ser 48 (Thr 48 chez YADH) et l'histidine 21 ainsi que le mécanisme de protonateur de l'eau liée au Zn induit par la liaison du cofacteur (Branden et al., 1975)

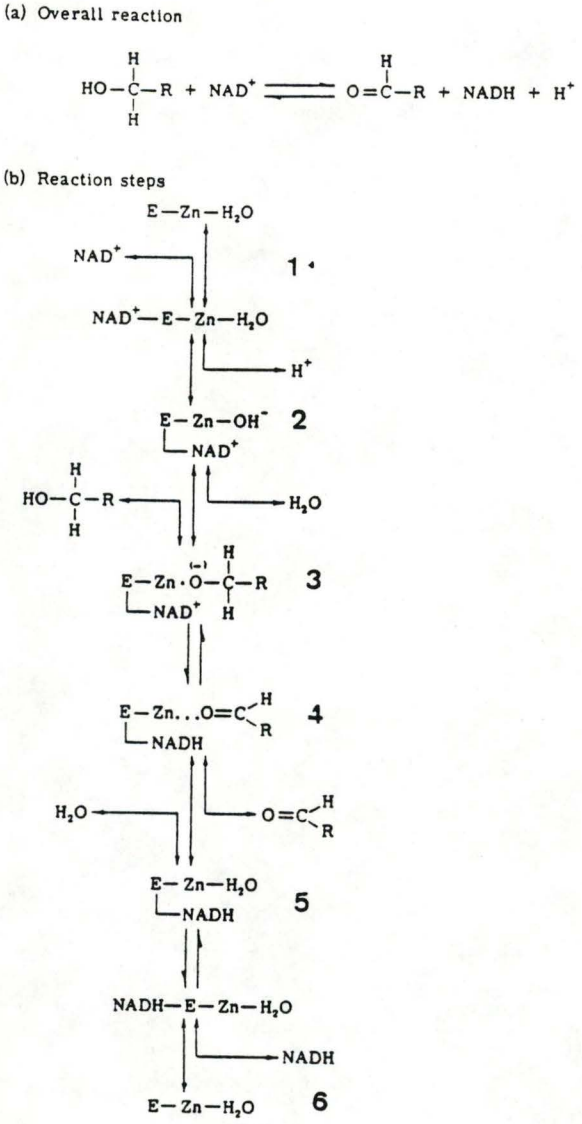


Fig. 29 : Mécanisme réactionnel de l'ADH (Branden et al., 1975)

1/ Fixation du cofacteur.

2/ Protonation de l'eau suite à la fixation du cofacteur.

3/ Déprotonation de l'éthanol et déplacement de l'eau par l'alcoolate formé

4/ Transfert de l'hydrure venant de l'alcool et allant réduire le NAD^+. Nous obtenons de l'acétaldéhyde et du NADH.

5/ L'acétaldehyde est libéré dans le milieu et une molécule d'eau se relie au Zn.

6/ Le NADH est libéré.

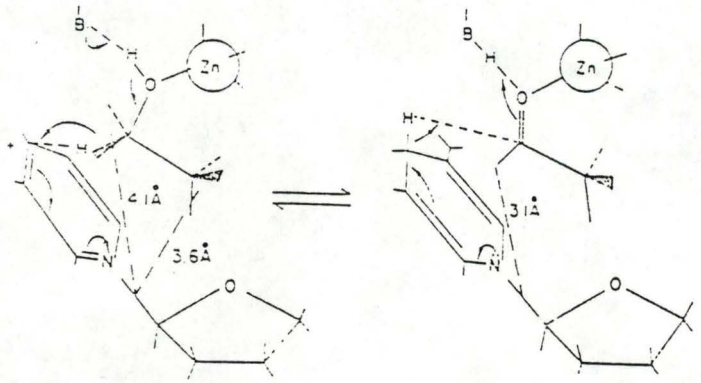


Fig. 30 : rôle du Zn dans les mécanismes de réaction de l'alcool déshydrogénase de HADH. Ce mécanisme suggéré par des études cristalographiques et cinétiques(Popjak et al., 1970).

+ acétaldéhyde) suggéré par EKLUND (1975) est une catalyse électrophile essentiellement médiée par l'atome zinc. (cfr fig.29 et 30)

Ce mécanisme se déroule dans une région de pH comprise entre 6 et 10 avec un optimum d'activité pour l'ADH comprise entre un pH de 8 à 9 (SUND et THEORELL, 1963).

Les études cristallographiques montrent qu'une molécule d'eau est liée à l'atome zinc catalytique (cfr 1.2.3.4.). TANIGUCHI (1969) constate que le proton H^+ est libéré lors de la fixation du cofacteur et ne nécessite nullement la transformation du NAD^+ en NADH (ceci fut mis en évidence par des inhibiteurs remplaçant le substrat alcool).

EKLUND (1975) suggère alors que l'arrivée de la charge positive du NAD^+ au niveau du cycle catalytique déplace le pK de l'eau liée au zinc de 9,6 à 7,6. A ce moment, l'eau se transforme en un groupe hydroxyl par suite de la perte du proton lié par pont hydrogène à la sérine 48.

Ce proton H^+ va entraîner, grâce au jeu de ponts hydrogènes entre l'eau (liée au zinc), la sérine 48 et l'histidine 51, la libération dans le milieu extérieur d'un proton venant de l'imidazole. (cfr fig.28)

La base hydroxyle liée au zinc est neutralisée par le proton de l'éthanol, ce dernier se tranforme en alcoolate. L'alcoolate ayant une haute affinité pour le groupement métallique, va déplacer l'eau du zinc. Cette liaison zinc-alcoolate a été confirmée par des études cristallographiques (DUNN et HUTCHINSON, 1973) et de RMN (SLOAN et MILDVAN, 1974).

La proximité et l'orientation adéquate entre le cofacteur et le substrat vont permettre un transfert direct de l' hydrure sur l'atome C_4 du groupement nicotinamide. A ce moment, l'acétaldéhyde ayant moins d'affinité pour le zinc que l'eau est redéplacée par celle-ci qui se retrouve à pK de 9,6 (suite à la perte de la charge positive du cofacteur). Le retrait du NADH est l'étape limitante de vitesse. Son départ est probablement dû à une perte hydrophile partielle suite à la disparition de sa charge positive (EKLUND,1975).

1.5.3. Les différents isoenzymes de l'ADH de levure.

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	βIII:2	superficial
33 or 34		Leu	Ser	Val-36 or Arg-37	βII:1	superficial
168		Met	Arg	Thr-190	R9 (before βA)	superficial
178		Ala	Val	Leu-200	$\alpha\beta$	cleft between domains
216		Glu	Asp	Thr-238	βC (start)	superficial
229		Gly	Ser	Gln-251	αCD (start)	superficial
235		Thr	Ile	Ser-258	αCD (end)	superficial
237		Gly	Val	Gly-260	αCD (at bend)	superficial
265		Thr	Val	Ser-289	βE (middle)	subunit interface
270		Met	Leu	Val-294	between βE and R13	subunit interface
277		Cys	Ser	Leu-301	βS	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	α4	cleft between domains
338		Val	Ala	Ser-367	between α4 and β1:6	cleft between domains

Fig. 31 : Tableau comparant les acides aminés différents dans l'ADH 1 et l'ADH 2.

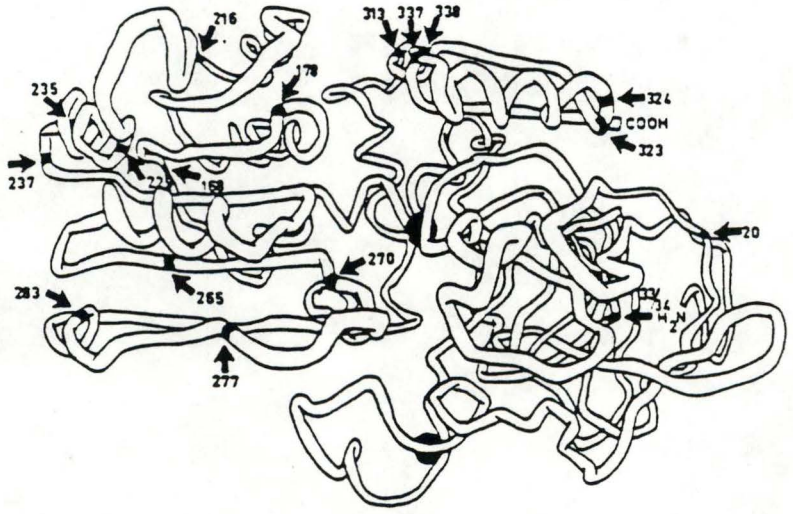


Fig. 32 : modèle d'un monomère de HADH. Les zones noires représentent les acides aminés différents entre l'ADH 1 et l'ADH 2 (Wills et al., 1979).

TABLEAU IV

TENEUR DES DIFFERENTS 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. 33 : Teneur des différents extraits en ADH 1 et ADH 2 suivant le milieu de culture.

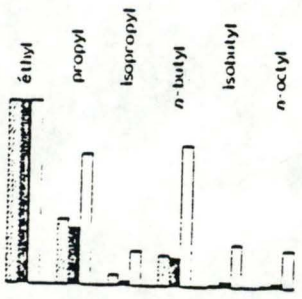


Fig. 34 : Spectres de spécificité de l'ADH 1 ■, de l'ADH 2 □ et de l'ADH commercial ▨ (Schimpfessel, 1967).

Le terme ADH de levure recouvre en fait au moins trois isoenzymes (dans GANZHORN et CALL,1987) (fig. 31 et 32).

L'isoenzyme 1 appelé ADH 1 et codée par le gène adc est une enzyme cytoplasmique (WILLS et JÖRNVALL,1979).

Elle est produite par *Saccharomyces cerevisiae* lorsqu'elle assimile le sucre selon un mécanisme fermentaire. Son rôle est de réduire l'acétaldéhyde en éthanol afin de régénérer le NADH en NAD^+ (SCHIMPFESSEL, 1967). L'ADH 1 est la moins thermostable, elle est complètement dénaturée après un traitement thermique de 61°C pendant 20 minutes (SUGAR, 1971).

L'isoenzyme 2, appelée ADH 2, est également une enzyme cytoplasmique. Elle est codée par le gène adr qui est induit par la présence de l'oxygène et hautement répressé par le glucose (WILLS et JÖRNVALL, 1979). L'enzyme ADH 2 sera bien représentée si *S. cerevisiae* croît sur une source de carbone comme l'éthanol, le lactate, le glycérol ou l'acétate. Elle peut représenter jusque 63% del'ADH cytoplasmique si elle pousse dans un milieu "éthanol" (cfr fig.33) (SCHIMPFESSEL, 1967). Cette ADH appartient au métabolisme oxydatif. Elle transforme l'éthanol en acétaldéhyde qui sera repris pour d'autres voies métaboliques. C'est l'ADH qui possède la spécificité la plus étendue pour les alcools en C_3 et C_4 (à mettre en relation avec son mécanisme et le milieu de culture) (SCHIMPFESSEL, 1967) (fig. 34). Sous un traitement de 61°C pendant 20 minutes, elle n'est pas complètement dénaturée (SUGAR, 1971).

Le pourcentage d'identité, lorsqu'on aligne la structure primaire de l'ADH 1 et 2, est très élevé; il est de 94%. Sur les 284 acides aminés comparés (qui représentent 82% de la structure primaire de l'ADH), 15 AA -17 par rapport à une ADH commerciale- sont différents. La table comparant ces 15 acides aminés différents est donnée à la figure 31. On constate aisément que parmi ceux-ci, seul l'acide aminé 277 appartient au site actif (lie le groupement adénine).

L'isoenzyme 3 (ADH3) est mitochondriale. Elle est codée par le gène adm et n'est produite qu'en faible quantité (WILLS et JÖRNVALL, 1979). Son activité n'a pas encore pu être attribuée de manière spécifique à l'un ou l'autre cas. Toutefois cette forme est beaucoup plus thermostable que les 2 autres puisque c'est la seule qui résiste à une dénaturation thermique de 70°C pendant 20 minutes (SUGAR, 1971).

Dans les levures commerciales, l'isoenzyme I représentent environ 1% des protéines solubles de la levure (WILLS et JORNVALL,1979) et l'isoenzyme II est pratiquement inexistante.

1.6. OBJECTIFS DU TRAVAIL.

1.6.1.Importance du problème.

Comme nous l'avons exposé au paragraphe 1.2., l'idée générale de notre travail est de découvrir un peptide possédant une activité ADH et de structure différente de l'enzyme initiale.

L'ADH est une enzyme intéressante d'un point de vue économique puisqu'elle peut regénérer le cofacteur (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. BILLE (1987 et 1988) a déjà développé une méthode d'immobilisation permettant d'accentuer de façon très nette la stabilité de l'ADH. Ce système d'immobilisation permettait de réaliser des synthèses utilisant le NADH, en permettant également la regénération du cofacteur par couplage de l'ADH avec l'enzyme de synthèse, dans ce cas, l'alanine déshydrogénase (alaDH).

$$\text{Pyruvate} + NH_4^+ \xrightarrow[NADH]{\text{alaDH}} \text{L-Alanine}$$

$$\text{Acétaldéhyde} \xrightarrow[\text{ADH}]{NAD^+} \text{Ethanol}$$

Nous voudrions quant à nous tenter d'obtenir un fragment d'ADH possédant une activité catalytique. Ceci dans le but de diminuer la spécificité de l'enzyme (oxydation du méthanol, substrat moins

coûteux, ou d'autres alcools), d'augmenter sa stabilité (activité à 100°c) et d'attribuer peut-être de nouvelles propriétés à cette ADH modifiée.

1.6.2. Discussion de la méthode employée.

Deux possibilités s'offraient à nous:

- soit un synthèse aléatoire où la seule contrainte était de replacer les acides aminés importants du site actif dans un environnement le plus proche possible de celui de l'enzyme natif (cfr. exemple du lysozyme, §1.4.1.).

- soit réaliser une lyse de l'enzyme et regarder si un des peptides obtenus possèdait encore une activité enzymatique (cfr exemple de l'adénylate cyclase, §1.4.2.).

Nous avons choisi la seconde possibilité pour les raisons suivantes:

- le site catalytique de l'ADH comprend un atome zinc lié de manière covalente à deux cystéines et une histidine. Ce zinc, comme nous l'avons vu précédemment, joue un rôle indispensable dans la réaction. Reproduire une telle synthèse par voie abiotique nous semble relativement complexe et mal connu .

- une des propositions émise, à propos de l'évolution des protéines, nous dit que les réactions étaient catalysées au départ par de petits atomes métalliques ou de petits peptides contenant parfois un atome métallique. Lors de l'évolution, ces catalyseurs se sont complexifiés en tentant d'exclure l'atome métallique et en le remplaçant par une construction protéinique pouvant jouer le même rôle. C'est une manière pour la vie de gagner une plus grande indépendance vis-à-vis de son milieu extérieur (une bactérie, une algue, une plante... peuvent synthétiser tous les acides aminés à condition d'avoir une source d'énergie suffisante. Par contre, si certains ions métalliques sont déficients dans le milieu, ils deviennent un facteur limitant pour la croissance et le développement de la vie).

A partir de cette hypothèse, il est logique de penser que les atomes métalliques jouant un rôle déterminant au niveau du site catalytique sont indispensables et probablement non remplaçables par une chaîne peptidique seule, 3.5 milliards d'années d'évolution n'ayant pas réussi cette substitution.

Il était donc logique de concevoir un peptide possédant un atome de zinc dans son site actif. La manière la plus simple de l'obtenir était d'aller chercher ce morceau dans l'enzyme native lysée par une enzyme protéasique.

1.6.3. Méthodologie suivie.

Pour mener à bien ce travail, nous nous proposons de:

- Purifier l'ADH en quantité suffisante à partir de levures *Saccharomices Cerevisiae.*
- Améliorer au maximum cette technique de purification afin d'obtenir l'enzyme pûre en grande quantité.
- Lyser cette enzyme purifiée par 2 protéases : la trypsine et la chymotrypsine.
- Vérifier la réalisation de la lyse par HPLC en phase inverse.
- Séparer les peptides obtenus par HPLC tamis moléculaire (Superose 12).
- Tester et comparer les peptides obtenus par les différentes lyses quant à :
  - -leur activité ADH
  - -leur concentration en protéines
  - -leur contenu en zinc (Absorption atomique)

II. MATERIELS ET METHODES.

A. MATÉRIELS.

A.1. Réactifs divers.

Tous les réactifs courants (solvants, sels, tampons...,) sont de pureté analytique et proviennent de la firme Merck (Darmstadt, R.F.A.) ou de la firme Janssen chimica (Beerse, Belgique). Tous ont été utilisés sans purification préalable.

A.2. Constituants des gels.

Pour les polymérisations, l'acrylamide, le méthylène N, N'-bisacrylamide et la 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 (Darmstadt, R.F.A.).

Les deux premiers produits ont été recristallisés de la manière suivante:

- Pour l'acrylamide, 87,5 g. sont dissous dans 1250 ml. de chloroforme et portés à 50°C. La solution est filtrée à chaud avant d'être refroidie à 4°C pendant une nuit.

Les cristaux obtenus sont rincés par de l'acétone froid (4°C) et sont séchés à l'abri de la lumière.

- Pour le méthylène N, N'-bisacrylamide, la procédure est analogue: 12,5 g. sont dissous dans 1250 ml d'acétone à 50°C puis la solution 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.

A.3. Réactifs biologiques.

L'alcool déshydrogénase de levure (A-3263) et la nicotinamide adénine dinucléotide (oxydée) dit NAD^+ (N-1511) ont été obtenus auprès de Sigma Chemical Company.

B. METHODES.

B.1. Le spectrophotomètre.

B.1.1. Principe.

Pour de nombreuses molécules, il peut exister une interaction entre une onde électrostatique incidente et les électrons des molécules du milieu. Cette interaction dépend de trois choses:

- l'énergie de l'onde, c'est-à-dire la longueur d'onde.
- le groupe chromophore de la molécule sensible aux électrons.
- la nature du reste de la molécule.

B.1.2. Loi de Lambert - Beer.

Par le principe exposé ci-dessus, on constate une diminution d'intensité (- dI) survenant lorsqu'une lumière d'intensité I traverse une tranche dx de matière contenant une espèce chimique absorbante et qui se trouve à une concentration c

soit $dI = - \alpha c I dx$

où α, est le coefficient d'absorption; il dépend de l'énergie de l'onde et de la nature de la molécule.
Par calcul, on peut montrer que l'absorbance est proportionnelle à la concentration.

$Abs = \text{Log } I_f / I_i = \varepsilon c l.$

où ε = coeff. d'exctinction molaire pour une longueur d'onde fixée.
c = la concentration de l'espèce absorbante.
l = la longueur de la cuvette (constante valant 1 cm).

B.1.3. 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 (Japon).

B.1.4. Dosage de l'ADH.

a) Principe.

L'ADH réduit le NAD^+ en NADH. On peut suivre la réduction de ce composé directement au spectrophotomètre réglé à 340 nm. Le graphe ci-contre montre la différence d'absorbance entre le NAD^+ et le NADH.

b) Réactifs.

- tampon pyrophosphate 0,011 M pH = 8,5
- éthanol 6 M
- NAD^+ 0,05 M
- fractions à doser.

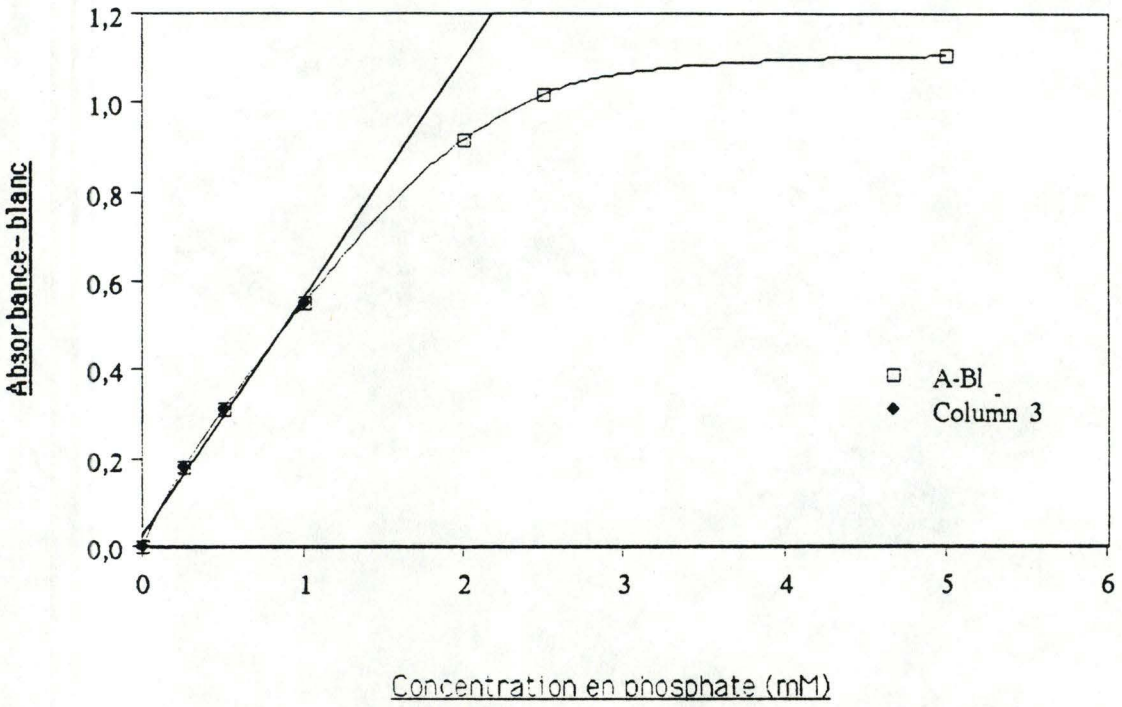
c) Mode opératoire.

- 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 2 cuvettes dans le spectrophotomètre réglé à 340 nm.
- Lire l'activité donnée par l'ordinateur sur un morceau de droite d'au moins 40 sec.

N.B. Cette activité doit toujours être inférieure à 1.



Droite d'étalonnage du dosage des phosphates et détermination de la zone de linéarité.

B.1.5. Dosages colorimétriques.

B.1.5.1. Dosage du phosphate.

a) Principe.

Le phosphate est dosé suivant la méthode de FISKE et SUBAROW (1925) améliorée par BARTLETT (1959).

Phosphate + acide molybdique -----> acide phosphomolybdique

Acide phosphomolybdique + AANS* --->acide phosphomolybdeux (couleur bleue)

* l'AANS est l'amino-naphtal-sulfonique, il joue le rôle de réducteur.

b) Réactifs.

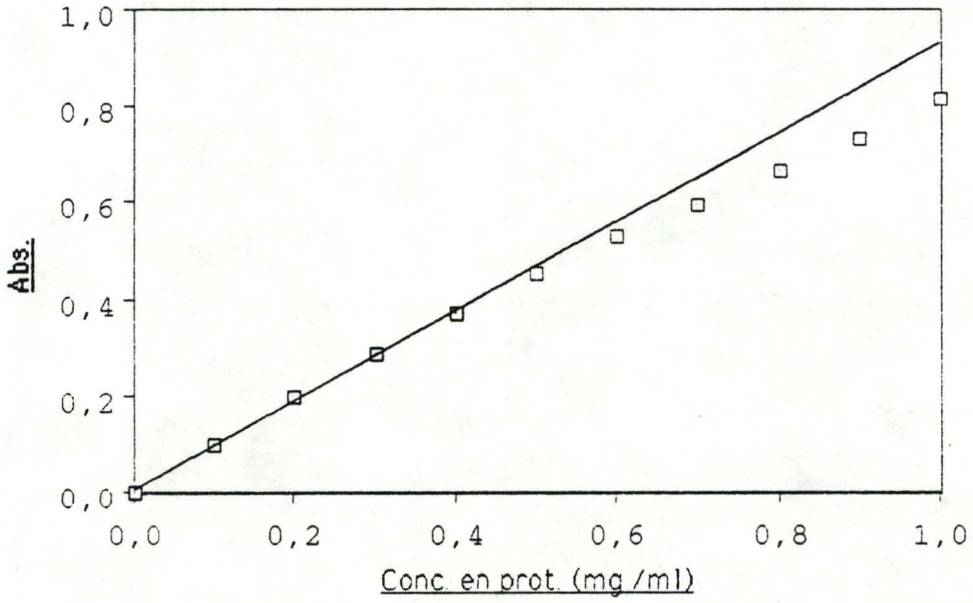
Blanc		0,5 ml d'eau
Etalon phosphate	H_3PO_4	0,5 mM
Molybdate acide	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}4H_2O$	0,01 M
	H_2SO_4	2,5 M
AANS	AANS	2,1mM
	$NaSO_3$	8,5 mM
	$NaHSO_3$	0,281 M

c) Méthode.

- Prélever 1 ml de solution phosphate à doser.
- Ajouter 0,5 ml de molybdate acide.
- L'étape de réduction du complexe phosphomolybdique est fonction du temps (étape limitante de vitesse). Il faut donc placer l'AANS de minute en minute.
- Attendre 20 minutes (compter à partir du premier tube).
- Lire les tubes au spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 650 nm (contre le blanc).

N.B. Vérifier que les valeurs obtenues tombent dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage montrée ci-contre (sinon diluer).

B.1.5.2. Dosage des protéines.



Droite d'étalonnage du dosage des protéines.

a) Principe.

Les protéines sont dosées selon la méthode proposée par LOWRY et al (1953). Les protéines dénaturées à l'hydroxyde de sodium présentent tous leurs groupements aux réactifs. La coloration est due à la formation d'un complexe entre le cuivre et les liasisons peptidiques et à la réduction du complexe phosphomolybdique en complexe phosphomolibdeux (couleur bleue) par les groupements tyrosines et tryptophanes de la protéine.

b) Réactifs.

Na OH		1N
Mixture alcaline (préparée juste avant emploi)		
$Na\ CO_3$	100 ml	0,19 M
$Cu\ SO_4$	1 ml	0,04 M
$Na\ K\ C_4\ H_4\ O_6\ .1\ H_2\ O$		0,07 M

Réactif de Folin: solution stock diluée 2 fois

Blanc	0,5 ml d'eau	
Etalon	0,5 ml de SAB	0,2 mg/ml
Fractions à doser.		

c) Méthode.

- Dénaturer 0,5 ml des fractions protéiniques avec du NaOH.
- Après 30 minutes, ajouter 5 ml de mixture alcaline.
- Après 15 minutes, ajouter de minute en minute 0,5ml de Folin.
- Après 30minutes, lire de minute en minute les tubes avec le spectrophotomètre réglé à 540nm (ou à 660nm).

N.B. Vérifier que les absorbances tombent dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage (cfr. ci-contre).sinon diluer.

B.1.5.3. Révélation de l'activité ADH à la phénazine méthosulfate (PMS) et au bleu de nitrotetrazolium (NBT).

a) Principe de la réaction.

L'enzyme est incubé dans une solution contenant du NAD^+, de l'éthanol, de la phénazine méthosulfate (PMS), et du bleu de nitrotétrazolium (NBT). Une série de réactions successives se produisent (voir fig.) : les deux électrons et les deux ions H captés par le NADH sont transférés au NBT, via le PMS. Ce dernier, sous forme réduite, est intensément coloré en bleu (bleu de formazan).

b) Matériel

Préparer les réactifs suivants:

A. Tampon pyrophosphate 0,06M pH8,5
B. Bleu de nitrotétrazolium 0,04%
C. Ethanol 3M.
D. NAD^+ 0,015M
E. Phénazine méthosulfate 0,005%. A garder à l'abri de la lumière.
F. HCl 0,5M.

c) Méthode

-Préparer le mélange réactionnel H_2O/A/B/C/D/E dans les proportions (40:10:4:4:4:4), à coserver à l'abris de la lumière.
- Pipeter 0,1 ml d'éluat des échantillons à doser (dilué 20X) dans une série de tubes.
- Ajouter 2,9 ml du mélange réactionnel à chaque tube, de minute en minute (conservation à l'abris de la lumière).
- Après 5 min. de réaction, ajouter 0,5 ml d'HCl 0,5 M à chaque tube, toujours de minute en minute.
- Lire l'absorbance de chaque tube à 603nm, de minute en minute.

C. PURIFICATION DE L'ADH DE LEVURE.

C.1. Buts de la purification.

Le premier but recherché, lors de la purification de l'ADH de levure, était de tendre vers une pureté totale de l'enzyme. Nous ne voulions aucun contaminant de nature protéinique lors de nos expériences de lyse trypsinique ou chymotrypsinique (cfr *). Ainsi, l'origine d'un éventuel peptide possédant une activité catalytique semblable à l'ADH ne pouvait être imputée qu'à l'ADH.

Le second but était de récolter de grandes quantités d'ADH car chaque lyse nécessite 25 ou 50 mg d'ADH / ml de solution (cfr B.7.1.).

Il est évident que ces deux buts se contrecarrent; pureté et quantité d'un produit vont rarement de paire. La méthode de purification que nous possédions au laboratoire nous donnait une ADH relativement pure. Après amélioration de cette méthode, nous avons pu obtenir une ADH "parfaitement" pure. Malheureusement, les concentrations en enzymes étant assez faibles. Nous avons dès lors étudié en détail toutes les étapes de cette purification afin de mieux situer les pertes pour améliorer le rendement sans augmenter les contaminants.

C.2. Extraction de l'ADH.

C.2.1. Introduction.

La méthode de purification de l'ADH utilisée au laboratoire, s'inspire des méthodes de purification proposées par RACKER (1955) ,COWGILL (1957) et DICKINSON (1972).

Les grandes étapes de la purification sont:

- purification par la température.
- purification à l'acétone.
- purification au sulfate d'ammonium.

- purification sur DEAE.

C.2.2. Description de la méthode.

1) Séchage des levures.

a) Matériel.

2 kg de levures (Saccharomyces cerevisiae venant de chez GIST - BROCADES).

b) Méthode.

- Etaler finement les deux kilos de levure et les couvrir d'un fin papier.
- Laisser sécher à l'air ambiant pendant deux jours.
- Congeler à -20° Cjusqu'à utilisation.

2) Libération de l'ADH.

a)Matériel.

- Levure.
-Tampon Na_2HPO_4 0,066 M + EDTA 0,001 M.
- Bain chauffant de marque KTM (Allemagne).
- Homogénéiseur de marque IKA RW 15 (Allemagne)
- Centrifugeuse BECKMAN , model J-21 B, rotor JA-21.

b)Méthode.

- Placer 300 g de levures dans un Erlenmeyer de 2 L.
- Ajouter 1020 ml de tampon (340 ml pour 100 g de levures).
- Placer l'Erlenmeyer dans le bain chauffant à 37° C pendant deux heures et homogénéiser.
- Laisser reposer deux heures à température ambiante.

- Centrifuger à 14000 RPM à 2° C pendant 20 minutes.
- Garder le surnageant et jeter le culot.
- Mesurer le volume. C'est la **fraction E1**.

3) Purification à la température.

a)Matériel.
- Fraction E1.
- Bain chauffant de marque KTM.
- Centrifugeuse BECKMAN (même rotor).
- Glace.

b)Méthode.

- Chauffer pendant 15 minutes à 55° C au bain-marie la fraction E1.
- Agiter de temps en temps.
- Refroidir à 4° C dans la glace.
- Centrifuger à 14000 RPM (T = 2° C) pendant 20 minutes.
- Garder le surnageant et jeter le culot.
- Mesurer le volume du surnageant. C'est la **fraction E2**.

4) Purification à l'acétone.

a)Matériel.

- Fraction E2 + barreau métallique.
- Glace.
- Acétone congelée à -20° C.
- Centrifugeuse BECKMAN (même rotor).
- Agitateur magnétique modèle M 21/1 de marque FRAMO (Allemagne).
- Membrane de dialyse (20 DM x 100 FT) de marque VISKASE.
- Tampon phosphate 0,001 M pH= 7,5; EDTA 0,001 M.

b) Méthode.

Partie 1.

- Placer l'Erlenmeyer contenant la fraction E2 dans un bain de glace sous l'agitateur magnétique.
- Ajouter goutte à goutte l'acétone pour avoir une concentration finale de 33%.
- Après l'addition d'acétone, continuer d'agiter pendant 15 minutes.
- Centrifuger à -4° C à 14000 RPM pendant 20 minutes.
- Garder le surnageant et jeter le culot. C'est le **surnageant acétonique**.

Partie 2.

- Les deux premières opérations sont identiques à celles de la partie 1.
- Ajouter goutte à goutte l'acétone pour avoir une concentration finale de 58%.
- Agiter 15 minutes.
- Centrifuger à -4° C, 14000 RPM pendant 20 minutes.
- Garder le culot et jeter le surnageant.

Partie 3.

- Resuspendre le culot dans 150 ml de tampon phosphate (50 ml pour 100 g de levures).
- Dialyser contre 5 L de tampon phosphate pendant 1 heure (en chambre froide, 4°C).
- Redialyser contre 5 L de tampon phosphate pendant une nuit (en chambre froide, 4° C).
- Centrifuger le dialysat à 14000 RPM, T = -4° C, pendant 20 minutes.
- Garder le surnageant et jeter le culot.
- Mesurer le volume. C'est la **fraction E3.**

5) Purification au sulfate d'ammonium.

a)Matériel.

- Tampon phosphate 0,01 M pH = 7.
- Fraction E3 + barreau métallique.
- Membrane de dialyse (idem ci-dessus).
- Agitateur magnétique.
- Bain de glace.
- Sulfate d'ammonium (36 g par 100 ml).
- Solution de sulfate d'ammonium à 20%.
- Centrifugeuse (idem ci-dessus).

b)Méthode.

Partie 1.

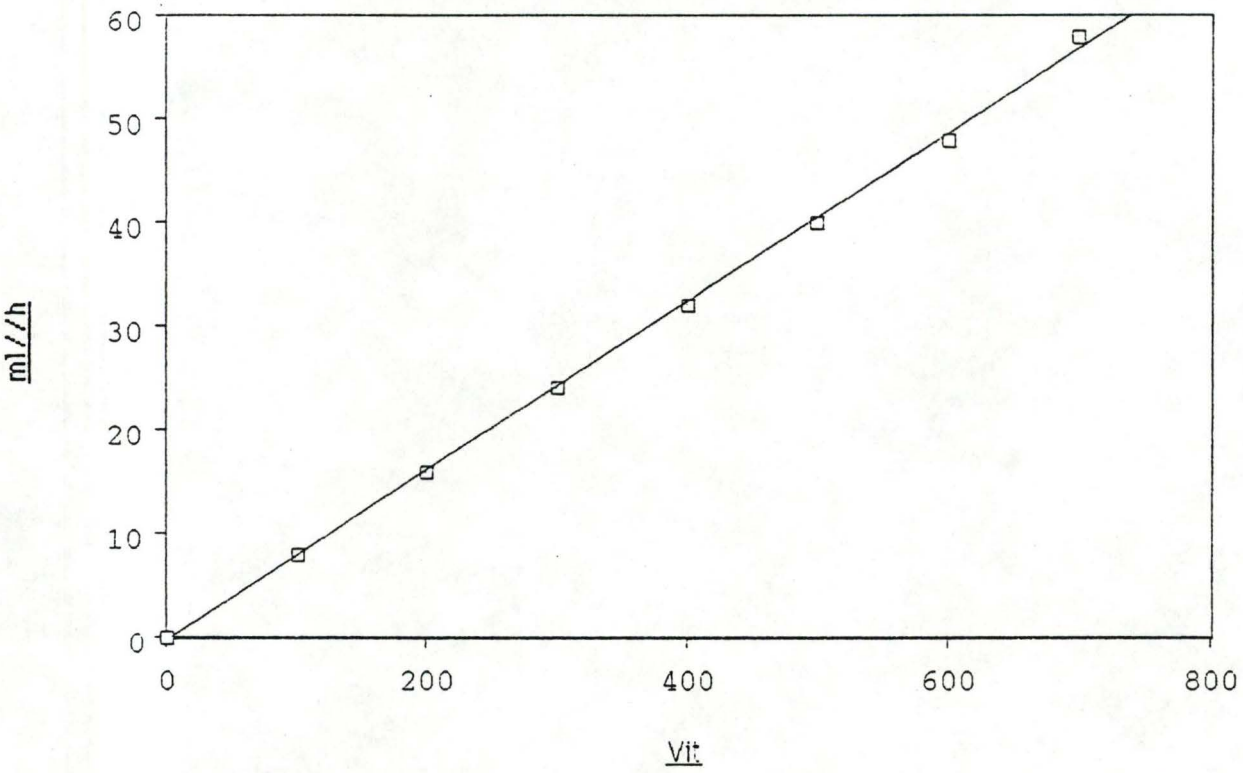
- Placer le bassin de glace contenant l'Erlenmeyer avec la fraction E3 sur l'agitateur magnétique.
- Allumer l'agitateur.
- Verser petit à petit les grains de sulfate d'ammonium (36 g de sulfate d'ammonium pour 100 ml de solution E3).
- Agiter encore 15 minutes à 0° C.
- Centrifuger à -4° C pendant 20 minutes à une vitesse de 14000 RPM.
- Jeter le surnageant.

Partie 2.

- Resuspendre le culot dans du sulfate d'ammonium à 20% (15 ml de solution pour 100 g de levures).
- Agiter 15 minutes à 0° C.
- Centrifuger à -4° C pendant 20 minutes à vitesse de 14000 RPM.
- Garder le surnageant et jeter le culot.

Partie 3.

- Dialyser le surnageant pendant 24 heures en changeant 4 fois le tampon phosphate (volume 5 L).
- Mesurer le volume. C'est la **fraction E4**.



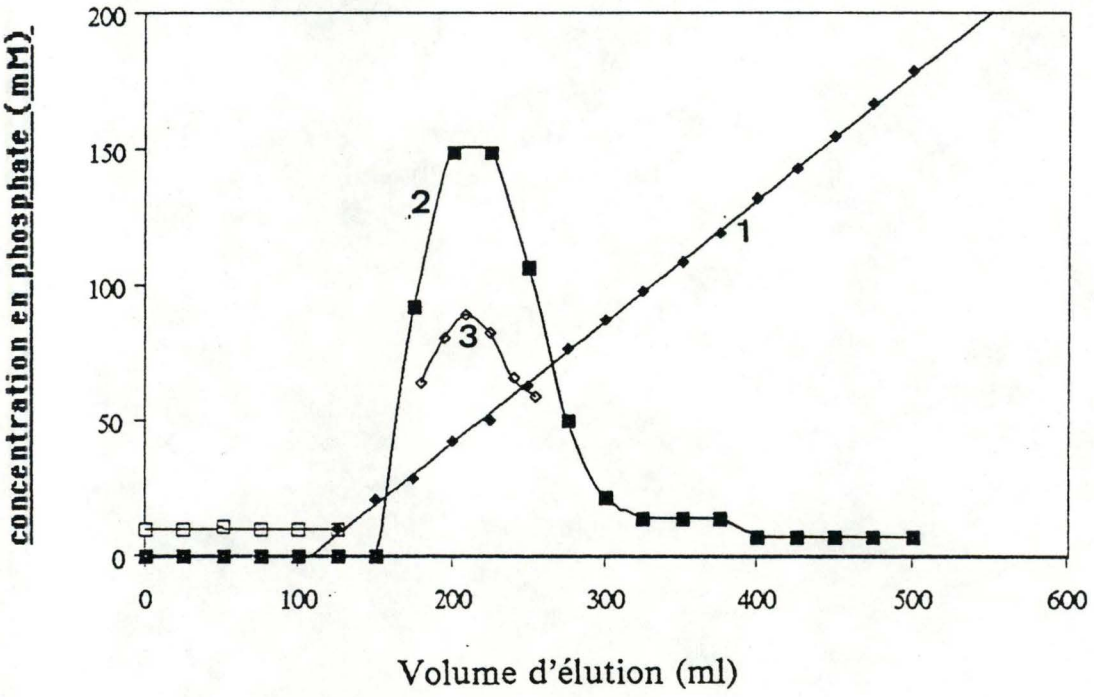
Relation entre la vitesse de la pompe Pharmacia utilisée pour la DEAE et le débit.

6) Purification par DEAE cellulose.

6a)Préparation de la colonne DEAE cellulose.

Pour une colonne de 250 ml (3,2 x 50 cm):
- Peser 150 g. de DEAE cellulose.
- Ajouter un litre de NaOH 0,1 N ,pendant 2 heures.
- Filtrer sur buchner avec deux filtres WATHMAN N° 1.
- Rincer le gel sur buchner avec 10 L d'eau bidistillée.
- Resuspendre le filtrat dans un berlin contenant un litre d'HCl 0,1 N pendant ,2 heures.
- Filtrer sur buchner muni de deux filtres WATHMAN N° 1
- Rincer le gel sur buchner avec 10 L d'eau bidistillée.
- Resuspendre le filtrat dans un berlin contenant un litre de KO H 1N pendant 2 heures.
- Filtrer sur buchner avec deux filtres WATHMAN N°1.
- Rincer avec 1 litre de tampon phosphate 10 mM pH=7,0.
- Resuspendre le filtrat dans un minimum de tampon phosphate 10 mM pH=7,0.
- Transvaser dans une colonne préparée (ouate - billes de verre) la solution
- Laisser tasser en veillant à ne pas assécher le dessus du gel.
- Ajouter de la solution jusqu'au moment où on atteint le volume désiré.

a)Matériel.
- Colonne DEAE cellulose (cfr B.6.1)
- Pompe minipuls de marque GILSON (France) (cfr calibration de la pompe ci-contre).
- Tampon phosphate 0,01 M pH = 7.
- Tampon phosphate 0,1 M pH = 7.
- Appareil à gradient phosphate BIORAD.
- Détecteur UVICORDS II, 2238, LKB (Suède).
- Enregistreur, BIOCAL 2065 CHOPPER BAR RECORDER de marque LKB (Suède).
- Collecteur TDC 220 A de marque GILSON (France).



Elution de l'ADH par un gradient phosphate

1) gradient phosphate
2) absorbance à 280 nm
3) absorbance de la réaction spécifique de l'ADH (NBT-PMS).

b)Méthode.

Partie 1.

- Raccordements (cfr schéma).
- Déposer la fraction E4 sur la colonne DEAE.
- Rincer la colonne une nuit avec le tampon phosphate 0,01 M.

Partie 2.

- Connecter l'appareil à gradient préalablement rempli de 500 ml de tampon phosphate 0,1 M dans la cuve B et de 500 ml de tampon phosphate 0,01 M dans la cuve A où se trouve le barreau métallique mélangeur.
- Allumer le détecteur (réglé à 280 nm; I = 1), l'enregistreur et le collecteur.
- Garder la fraction qui se trouve dans le pic donné par l'enregistreur (vérifier la présence d'ADH: cfr méthode de localisation de l'ADH après DEAE cellulose).
- Doser les phosphates.
- Voir élution de l'ADH par gradient phosphate ci-contre.

NB. Localisation de l'ADH après DEAE.

Le graphe UNICORD est le tracé d'une détection réalisée à 280 nm. Nous avons donc une détection spécifique des protéines mais non de l'ADH. Il fallait donc vérifier si ce pic correspondait bien à un pic d'ADH. Pour cela, nous avons réalisé un dosage au nitrotétrazolium (cfr B1.5.3.) spécifique de l'ADH sur les tubes correspondant au pic.

Si nous superposons graphiquement ces deux résultats, nous constatons une superposition des deux pics. Cela prouve que le pic d'élution obtenu sur le chromatogramme est bien de l'ADH. Si nous ajoutons le dosage des phosphates à ce graphe superposé, on peut constater que l'ADH s'élue à une concentration en phosphates de ± 50 mM.

C 3. Amélioration qualitative de la méthode de purification.

C.3.1. Purification par Séphacryl S 200

1a) Fabrication de la colonne séphacryl S 200.

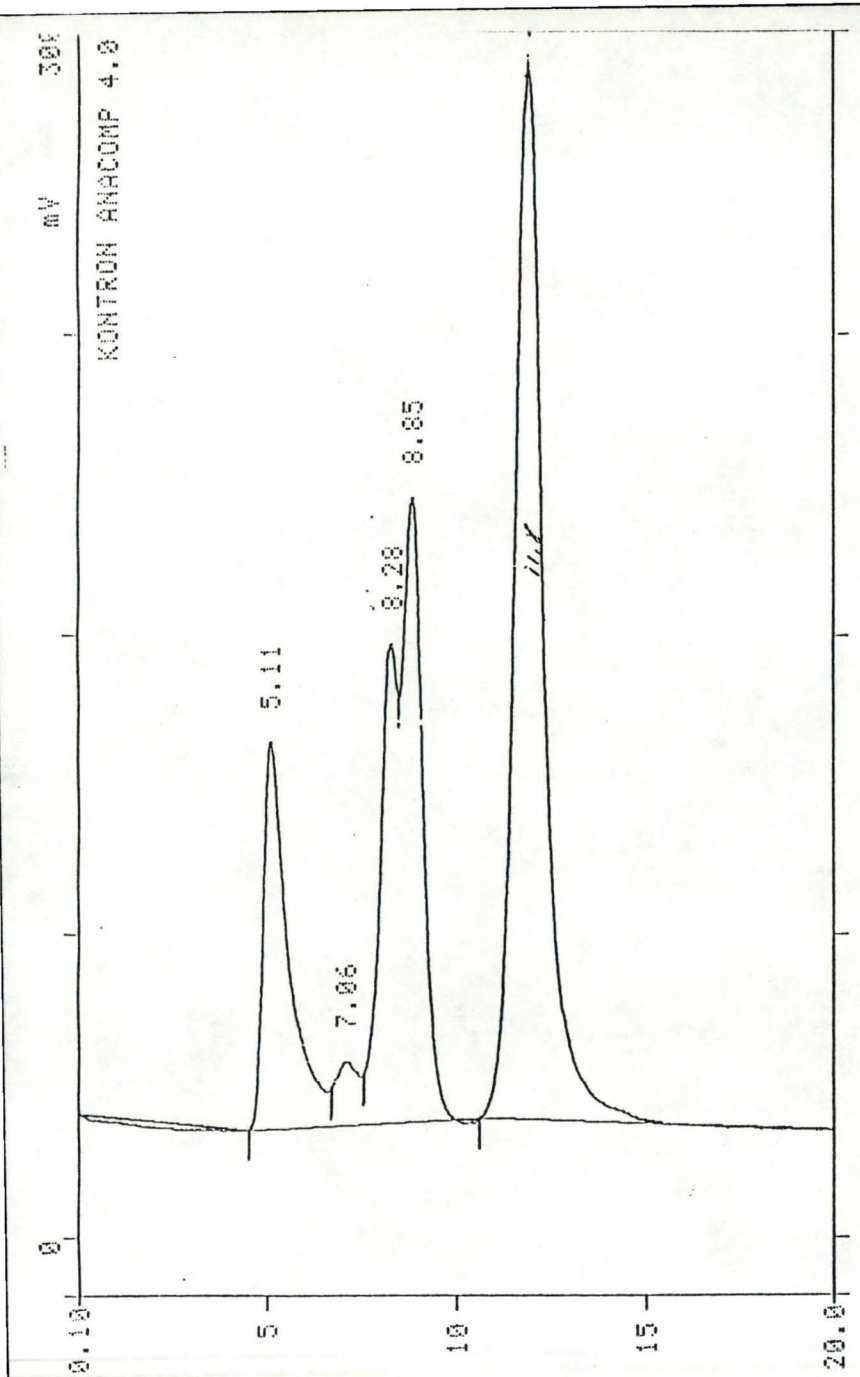
- Verser dans une colonne préparée (ouate - billes de verre) le séphacryl S 200 (vendu prêt à l'emploi par la firme PHARMACIA (belqique).
- Laisser tasser une nuit.

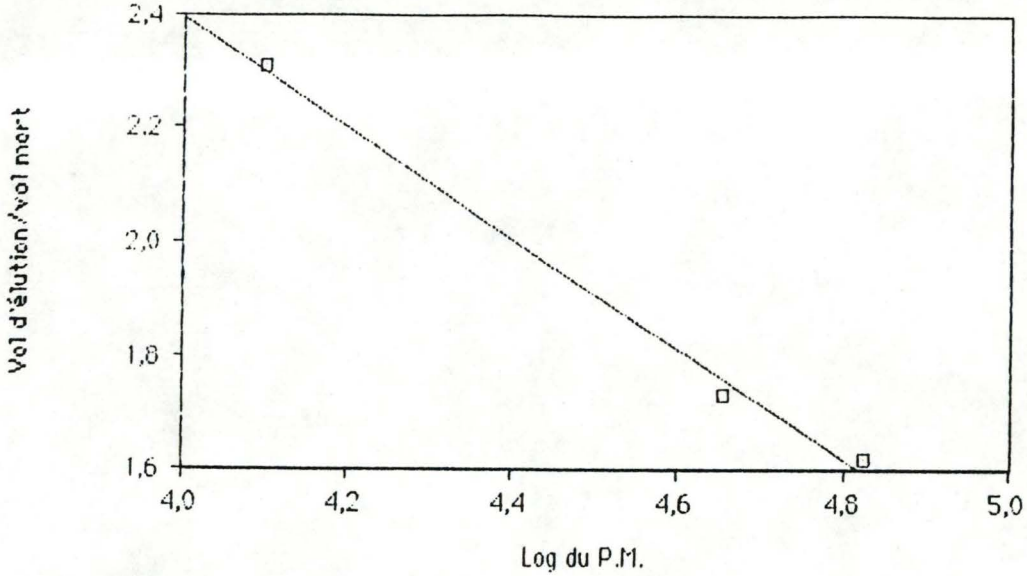
Chromatographie.

- Placer 2ml d'échantillon concentré sur AMICON PM 10 sur la colonne
- Raccorder la colonne aux appareils de détection (cfr. DEAE-cellulose); vitesse de la pompe GILSON sur 200.

C.3.2. Vérification de la pureté de l'ADH par HPLCà tamis moléculaire.

L'HPLC est un appareil HPLC 420 de marque KONTRON (Suisse).
L'intégrateur-enregistreur est un anacomp 220 de marque KONTRON (Suisse).
Le détecteur UV est un UVIKON 735 LC (KONTRON).
La colonne : tamis moléculaire de type TSK, gel G 3000 SW de marque LKB (Suisse) (voir étalonnage ci-contre).





Etalonnage de la colonne LKB tamis moléculaire TSKG3000SW.

-Solvant: tampon phosphate 0,1 M pH = 7,0(dégazé).
-Flux: 1 ml par minute.
-Durée: 40 minutes.
-Détecteur UV: 280 nm.
-Volume de l'injection: de 10 à 500 µl.
-Les échantillons sont préalablement filtrés sur membrane de 0,45 µm.

Vérification de la pureté de l'ADH par électrophorèse

C.3.3. Gels d'électrophorèse en présence de S.D.S.

a) Principe.
En présence de S.D.S.,les protéines sont complètement dénaturées. Le S.D.S. étant chargé négativement, rend toutes les protéines négatives quelque soit leur charge de départ. Ainsi, la mobilité des protéines est directement proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire.(SHAPIRO et al, 1967 et WEBER et OSBORN, 1969).

b) Matériel.
Le système d'électrophorèse est le miniprotéan II fabriqué par BIORAD (U.S.A.).

1 Gel de séparation: acrylamide 12,5% - Tris 0,375 M pH = 8,8.

Par plaque:

Acrylamide/bis	30%/0,78%		2,1 ml
Tris + HCl	1,5 M	pH =8,8	1,25 ml
Temed			2,5 µl
H_2O distillée			1,57 ml
SDS	10%		50 µl

Dégazer le mélange sous cloche à vide pendant 15 minutes
Persulfate d'ammonium 25 µl
(juste avant de couler le gel).

2 Gel d'empilement: acrylamide 4 % - Tris 0,125 M pH=6,8.

Par plaque:				
Acrylamide/bis	30%/0,78%		0,33 ml	
Tris + HCl	1,5 M	pH = 6,8		0,63 ml
Temed			2,5 µl	
H_2O distillée			1,53 ml	
SDS 10%	25 µl			

Dégazer le mélange sous cloche à vide pendant 15 minutes

Persulfate d'ammonium 12,5 µl
(juste avant de couler le gel).

c) Méthode.

1. Coulage des gels.

- Le système d'électrophorèse comprend 2 supports par cuve; pour chaque support,glisser dans l'ordre la plaque de verre de 10 x 8 cm, les 2 spacers, la plaque de verre de 10 x 7 cm.
- Fixer le support au statif.
- Ajouter le persulfate d'ammonium dans le gel de séparation puis mélanger.
- Couler ce gel jusque 1,5 cm de la hauteur de la petite plaque.
- Couvrir le gel de n-butanol.
- Ajouter le persulfate dans le gel d'empilement puis mélanger.
- Laisser polymériser 45 minutes.
- Enlever soigneusement le n-butanol.
- Couler ce gel jusqu'au sommet de la petite plaque.
- Glisser le peigne entre les deux plaques.
- Laisser polymériser 45 minutes.

2. Traitement des échantillons.

Matériel:

Bleu de bromophénol	0,05%	50 µl
Mercaptoéthanol	20%	7 µl
Fraction protéinique		50 µl
Etalon	10000 à 100000	10 µl

fourni par la firme BIORAD.

Méthode:

- Placer dans un eppendorff le bleu de bromophénol, la fraction protéinique ou l'échantillon et le mercaptoéthanol.
- Placer les eppendorff dans un bain à 100°C (bain de marque GERHARDT (Allemagne)).

3. Dépot des échantillons.

- Retirer les peignes et remplir l'espace libéré par du tampon de migration (cfr ci-dessous).
- Déposer dans chaque puit 10 µl d'échantillon traité.
- Placer les supports sur la pièce portant les électrodes.
- Placer l'ensemble au centre de la cuve.

4. Migration.

a) Matériel:

Le tampon de migration se compose de:

Tris	25 mM
Glycine	0,192 M
SDS	0,1%

b) Méthode.

- Remplir la cuve centrale et la cuve extérieure.
- Allumer le générateur (Electrophorésis Power Supply E 532 de marque CONSORT, Belgique).
- Régler le voltage sur 200 volts.

- Arrêter le générateur lorsque le front du bleu de bromophénol atteint le bord inférieur des plaques.

5. Démoulage des gels.

- Retirer du support les deux plaques de verre contenant le gel.
- Décoller délicatement le gel d'entre ces deux plaques.
- Placer le gel dans le récipient de fixation.

6. Fixation et coloration.des protéines.

+ Fixation des protéines: fixer les protéines dans le gel en plongeant les gels dans du TCA 12% pendant 30 minutes.
+ Coloration des protéines

a) Matériel.

Solution colorante:

Bleu de Coomassie	0,25%
Méthanol	45,4%
Acide acétique	9,2%
Eau	45,4%

Solution de décoloration:

Ethanol	30%
Acide acétique	10%
Acétone	60%

b) Méthode.

- Plonger les gels 1 heure dans la solution de coloration.
- Sortir les gels et les rincer à l'eau.
- Plonger les gels dans le bassin contenant la solution de décoloration pendant 4 heures et placer le récipient sur l'agitateur orbitale (Red-Rotor, Model PR 70 de marque HOEFER Scientific instruments, U.S.A.).

7. Séchage.

- Couvrir les gels de papier cellophane préalablement humidifié.
- Laisser sécher à température de 70 °C pendant 2 à 3 heures sur le DRYGEL model SE 1160 de marque HOEFER Scientific instruments, U.S.A. L'appareil est raccordé à une pompe à membrane MZ 2C de marque Vacuumbrand GMBH (Allemagne).

C.4. Amélioration quantitative de la méthode de purification.

C.4.1. Etude de l'influence de la température sur la purification de l'ADH

a) Matériel

- Centrifugeuse Beckman, Rotor JA 14.
- Fraction E1
- Bain chauffant KTM

b) Méthode

- Placer le bain à bonne température pour obtenir la température homogène désirée dans le tube.
- Placer 5 ml d'échantillon E dans 5 tubes et plonger dans le bain.
- Quand la température de la fraction atteint la température voulue (45°C, 50°C, 55°C et 60°C), déclencher le chronomètre.
- Retirer les tubes après 1, 2.5, 5, 10 et 15 min. et les plonger immédiatement dans la glace.
- Centrifuger à 2°C à une vitesse de 17500 RPM pendant 20 min.
- Récolter le surnageant et doser l'activité ADH ainsi que les protéines.

- Comparer les activités et les protéines avec un tube resté à température ambiante.

N.B. : le temps moyen pour que la fraction E1 passe de 4°C à la température désirée est de 3 min.

C.4.2. Mise au point de la précipitation à l'acétone et influence sur les pertes en ADH.

a) Matériel :

- centrifugeuse BECKMAN J21B, rotor JA14
- rotavapor et bain chauffant modèle RE III de marque BÜCHI (Suisse)
- fraction E2
- acétone
- lyophilisateur "Freeze DRYER MODULYO" de marque EDWARDS (Angleterre) couplé à une pompe à 2 étages modèle EDWARDS 5

b) Méthode :

- prélever dans des tubes numérotés de 1 à 8,5 ml de solution E2
- ajouter goutte à goutte l'acétone pour obtenir dans chaque tube la concentration indiquée ci-contre (*).
- laisser 15 minutes dans la glace
- centrifuger à -4°C à 17500 RPM pendant 20 minutes
- pour chaque tube (y compris celui contenant 0 % d'acétone), placer le surnageant dans le ballon du rotavapor.
- Laisser évaporer l'acétone 30 minutes (le bain est à température de 30°C).
- Lyophyliser pendant une nuit chaque surnageant "évaporé"
- ajouter 5 ml de tampon phosphate 0,01 M pH 7 au lyophylisat de chaque tube
- réaliser le dosage de l'ADH et des protéines
- réaliser une électrophorèse pour estimer les bandes contaminantes perdues lors de chaque purification à l'acétone.

C.4.2.1. Mise au point d'une méthode de mesure de l'effet de l'acétone restant dans le dialysat après 2 heures de dialyse.

- prélever 5 ml de dialysat
-ajouter 1 ml de HCl 2 N pour dénaturer irréversiblement et complétement l'ADH (ainsi que les autres protéines)
- on centrifuge sur JANESKI pendant 10 minutes
- on neutralise l'HCl avec 1 ml de NaOH 2 N (vérifier que les solutions sont exactement de même titrage)
- on porte à 10 ml avec du tampon phosphate 10 mM pH 7
- on prélève 0,2 ml de cette solution
- on l'ajoute à 0,7 ml de la solution de dosage de l'enzyme
- dans la cuvette témoin, plaçer 0,7 ml de solution de dosage et 0,2 ml de phosphate 10 mM pH 7, NaCl 0,2 N
- ajouter 0,1 ml d'enzyme commerciale diluée (Sigma) dans ces cuvettes que l'on teste contre un témoin.

C.4.3. Mise au point d'une méthode permettant l'étude de l'influence du sulfate d'ammonium sur la précipitation de l'ADH.

a) Matériel :
- centrifugeuse BECKMAN, rotor JA14
- fraction E3 dialysée
- ADH Sigma : 10 mg/ml
- sulfate d'ammonium

b) Méthode :

- la méthode employée est un peu spéciale car le sulfate d'ammonium interférait avec le dosage de l'ADH
- nous avons dès lors pris 2 séries de 8 tubes contenant 5 ml de solution E3
- nous avons ajouté du premier au huitième tube de chaque série 0, 10, 20, 30, 40, 50,55, 60 % de sulfate d'ammonium
- dans la série A, nous avons ajouté 0,1 ml de la solution ADH (contient du zinc)
- dans la série B, nous avons ajouté 0,1 ml de la solution SAB (ne contient pas de zinc)

- nous avons centrifugé sur BECKMAN à - 4°C à une vitesse de 17500 RPM pendant 20 minutes
- le surnageant est conservé et dosé
- les protéines sont dosées
- l'ADH est dosée par détecteur à ionisation de flamme (détection du zinc)

On soustrait les valeurs des tubes correspondant aux 2 séries. La variation entre les 2 valeurs nous donne une indication sur le comportement de l'ADH ajoutée en présence de sulfate d'ammonium.

C.5. Lyse protéinique.

C5.1. Etapes de lyse.

a) *Matériel.*
- Bain chauffant de marque KTH (Allemagne).
- 1,9 ml de solution phosphate 0,01 M ph= 7,5 et d'urée 4M.
- 50 mg d'ADH.
- 0,1 ml de solution trypsinique ou chymotrypsinique à 5 mg/ml.
- 0,05 ml de solution d'inhibiteur trypsinique (Soybean) à 10 mg/ml.

b) *Méthode.*

- Placer 50 mg d'ADH dans une éprouvette.
- Déposer 1,9 ml de solution phosphate - urée.
- Ajouter 0,1 ml de solution trypsinique ou chymotrypsinique.
- Placer le temps nécessaire pour la lyse dans le bain à 37° C.
- Si le temps est inférieur à 8 heures, placer 0,1 ml de solution inhibitrice.
- Congeler après la lyse les fractions à -70° C.

C.5.2.Vérification de la lyse de l'ADH par HPLC à colonne à phase inverse.

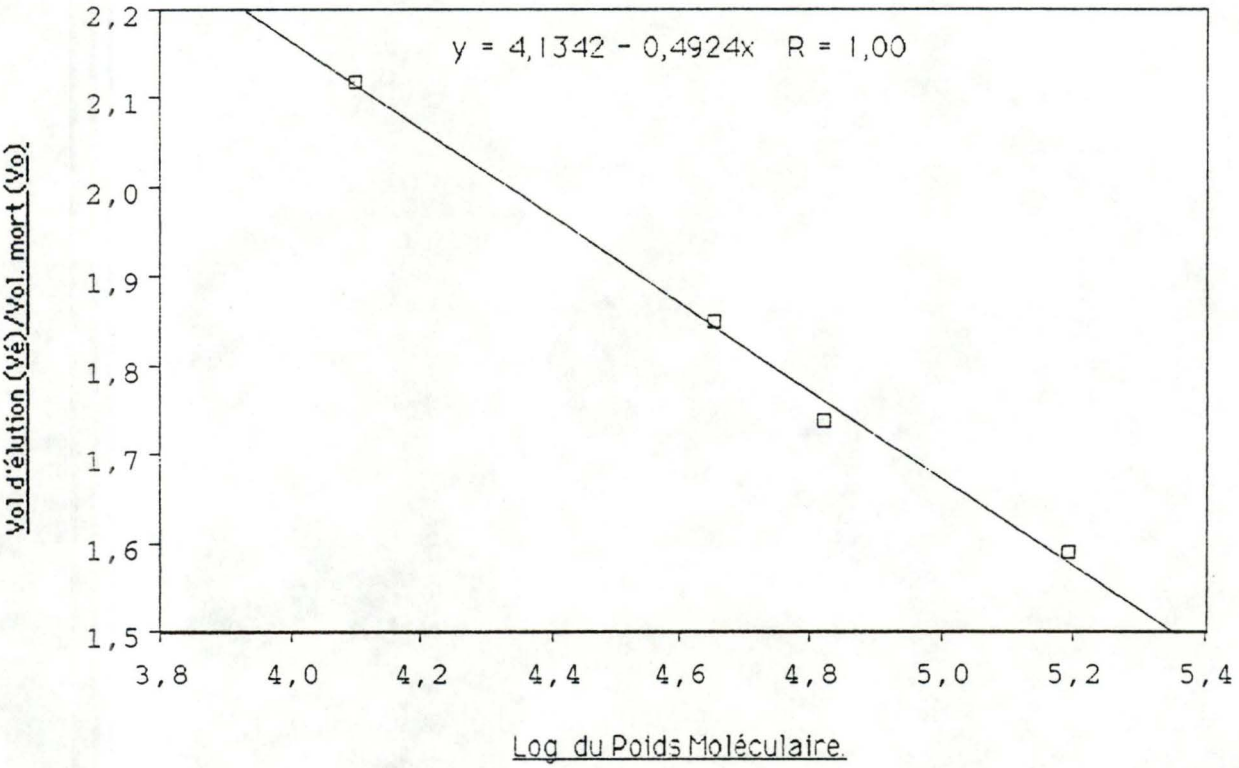
a) *Matériel.*

L'HPLC est un appareil H 82 C système 600 de marque KONTRON (Suisse). Le détecteur est un UVIKON 735 LC (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 47554-1).

- Solvant A: H_2 O, TFA; 0,05% dégazé.
- Solvant B: H_2 O, acétonitrile, TFA (20 : 80 : 0,05) dégazé.
- Flux: 1 ml / min.
- Gradient: 0 à 100% de B en 100 minutes.
- Détecteur UV: 220 nm.
- Volume de l'injection: 250 µl.
- Les échantillons sont filtrés sur membrane avec pores de 0,45 µm.

C.5.3. Etape de séparation des peptides obtenus après lyse de l'ADH (tamis moléculaire Superose 12).

L'HPLC est un appareil HPLC 420 de marque KONTRON (Suisse). L'intégrateur-enregistreur est un anacomp 220 de marque KONTRON (Suisse).
Le détecteur UV est un UVIKON 735 LC (KONTRON).
Colonne: superose 12 (voir étalonnage ci-contre).
Solvant: tampon phosphate 0,05 M pH = 7,5; Na Cl 0,9% (dégazé).



Etalonnage SEPHAROSE

	PROT.	Ve	Ve/Vo	Log PM
1	Thyrogl	7		
2	IGg	11,14	1,59	5,19
3	SAB	12,21	1,74	4,82
4	OV	12,96	1,85	4,65
5	CC	14,89	2,12	4,1
6				

Etalonnage de la colonne superose 12.

Flux: 0,5 ml par minute.
Durée: 60 minutes.
Détecteur UV: 280 nm.
Volume de l'injection: 100 µl
Les échantillons sont centrifugés 10 minutes à la JANETSKY.

C.5.4. Etape de dosage.

La séparation des peptides est réalisée deux fois à partir de la même lyse.pour les dosages (2 séries de dosages).

a) Série A de tubes.

- Placer dans chaque tube 1 ml de solution:
  + 1,5 ml d'éthanol 6 M.
  + 10 ml de pyrophosphate 0,06 M pH= 8,5.
  + 40 ml d'eau distillée.
  + 75 mg de NAD^+.
- Blanc: + 0,5 ml d'eau distillée.

b) Série B de tubes.

- Placer dans chaque tube 1 ml de solution contenant les mêmes composés que ci-dessus plus 20 mg de Zn SO_4 (soit 1 µ mole de Zn^{++} /L).
- Blanc:+ 0,5 ml d'eau distillée.

c) Méthode.

- Lire l'absorbance de tous ces tubes à 340 nm après avoir placé le ml de solution.
- Laisser agir une nuit à température ambiante.
- Relire l'absorbance de ces tubes à 340 nm.
- Calculer les différences d'absorbance entre les deux lectures.On obtient ainsi le graphe du dosage du NADH.
- Doser le zinc par détecteur à ionisation de flamme.
- Réaliser le graphique final qui est une superposition:
  du graphique de dosage des protéines (280 nm)
  du graphique de dosage du zinc.
  du graphique de dosage du NADH.

III. RESULTATS.

3.1. INTRODUCTION.

Nous nous proposons dans un premier temps de décrire la pureté de l'ADH isolée selon la technique habituelle renseignée dans la littérature. Ensuite, nous développerons les améliorations tant qualitatives que quantitatives que nous avons apportées à cette purification. Puis, nous parlerons enfin de la lyse protéinique de l'ADH.

3.2. PURIFICATION DE L'ADH

Après avoir terminé la purification de l'ADH suivant la technique décrite dans la littérature RACKER (1955), COGWILL (1957) et DICKINSON (1972), et utilisée au laboratoire, nous avons voulu étudier, de manière plus approfondie, les deux dernières étapes de la purification (faction E4 et DEAE cellulose). Nous voulions suivre l'évolution de la purification et estimer la pureté de l'ADH après purification totale.

3.2.1. Estimation de la pureté de la fraction E4.

Nous avons d'abord injecté sur HPLC tamis moléculaire LKB, 10 µl de **solution E4** - dernière fraction ADH isolée - (diluée 10 fois) afin d'en estimer la pureté (Fig A).

Nous constatons la présence de 4 pics:

- un premier petit pic s'éluant à 2,5 minutes; il est appelé pic d'injection (artéfact dû à l'injection).
- un second petit pic s'éluant à 4,9 minutes représente le volume mort de la colonne (passage de protéines de haut poids moléculaire ou protéines agglomérées). Après collecte de ce pic, nous constatons que l'activité ADH y est nulle.

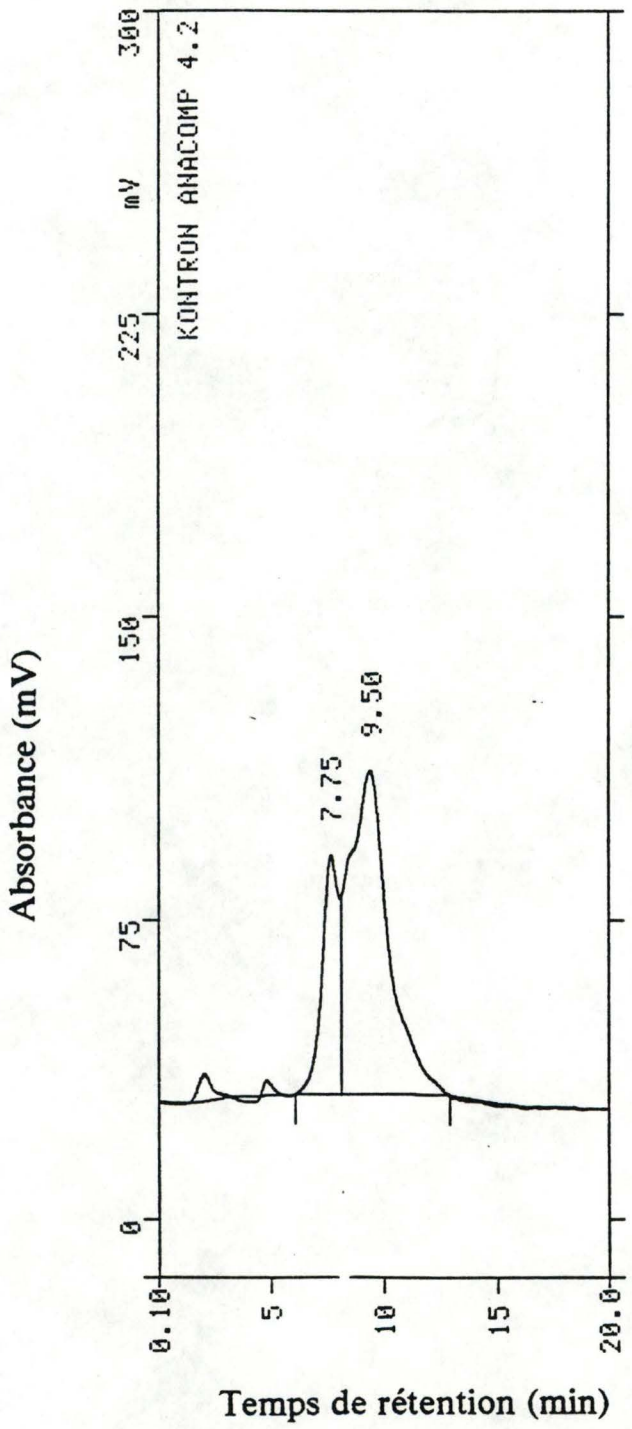


Fig A : Estimation de la pureté de la fraction E4. 10 µl (dilution 10 x) sont injectés sur HPLC à tamis moléculaire (colonne LKB).

- le troisième pic s'élue à 7,75 minutes; il a le profil d'un pic uniforme (une protéine dans ce pic). Après récolte de ce pic, nous constatons que l'activité ADH y est très importante.

N° du test Act.Tot.(U)	Dilution.	ΔAbs/min	Vol de la	fraction
1	11	0,114	3,3 ml	20,04

- le quatrième pic est très important et s'élue à 9,5 minutes; il se compose de la sommation d'au moins 2 pics. L'activité ADH y est très faible.

N° du test	Dilution	Δ Abs/min	Vol de la fraction	Act.Tot.(U)
1	1	0,066	6,6 ml	2,1
2	1	0,072	6,6 ml	2,3

L'activité ADH de ce pic est 10 fois moins importante que celle du pic 7,75. Cette faible activité correspond, sans doute, au non retour à la ligne de base entre les deux pics. Ce quatrième pic comprend donc les protéines contaminantes.

Conclusions:

Le pic ADH peut être donc être assimilé au pic s'éluant à 7,75 minutes.

Nous constatons que dans la fraction E4, les contaminants sont encore très nombreux. Une estimation nous en est donnée par l'intégration des deux grands pics: 76,84% de contaminants pour 23,16% d'enzyme ADH.

3.2.2. Estimation de la pureté après DEAE.

Nous avons voulu voir si au cours de l'élution par gradient phosphate de l'ADH fixée sur la DEAE cellulose, nous constations l'apparition de protéines contaminantes

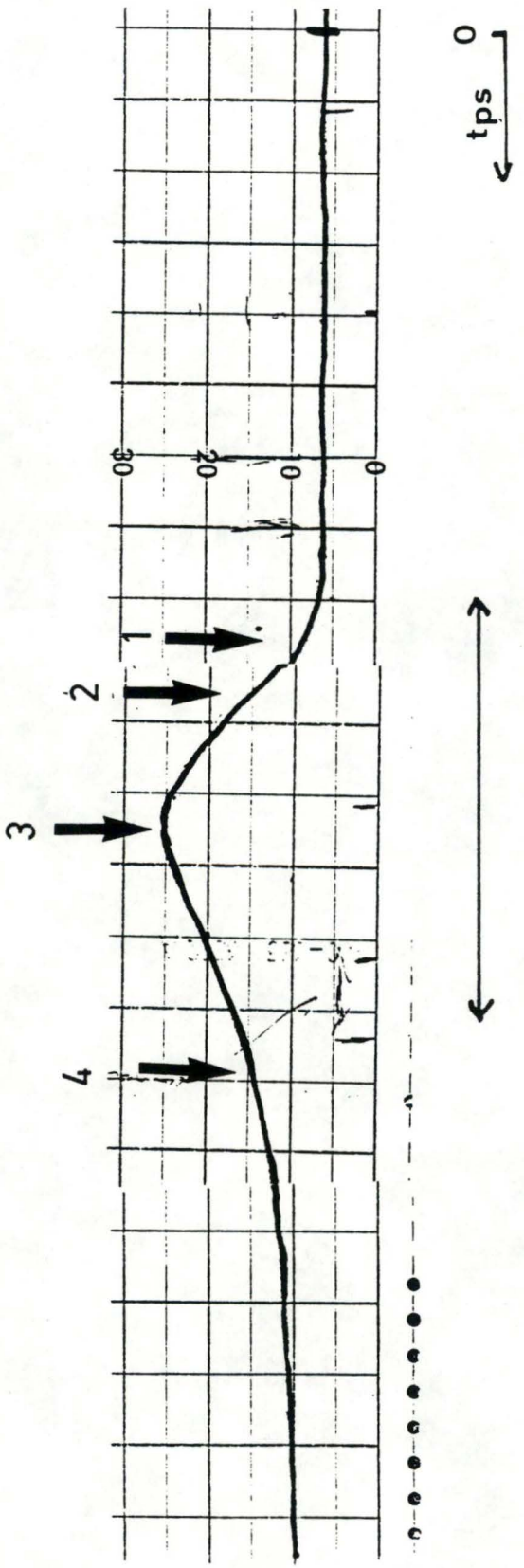


Fig. B : Chromatogramme obtenu après passage du gradient phosphate sur la colonne DEAE. Les flèches 1, 2, 3, 4 représentent l'endroit où on collecte des échantillons pour les injecter sur HPLC.

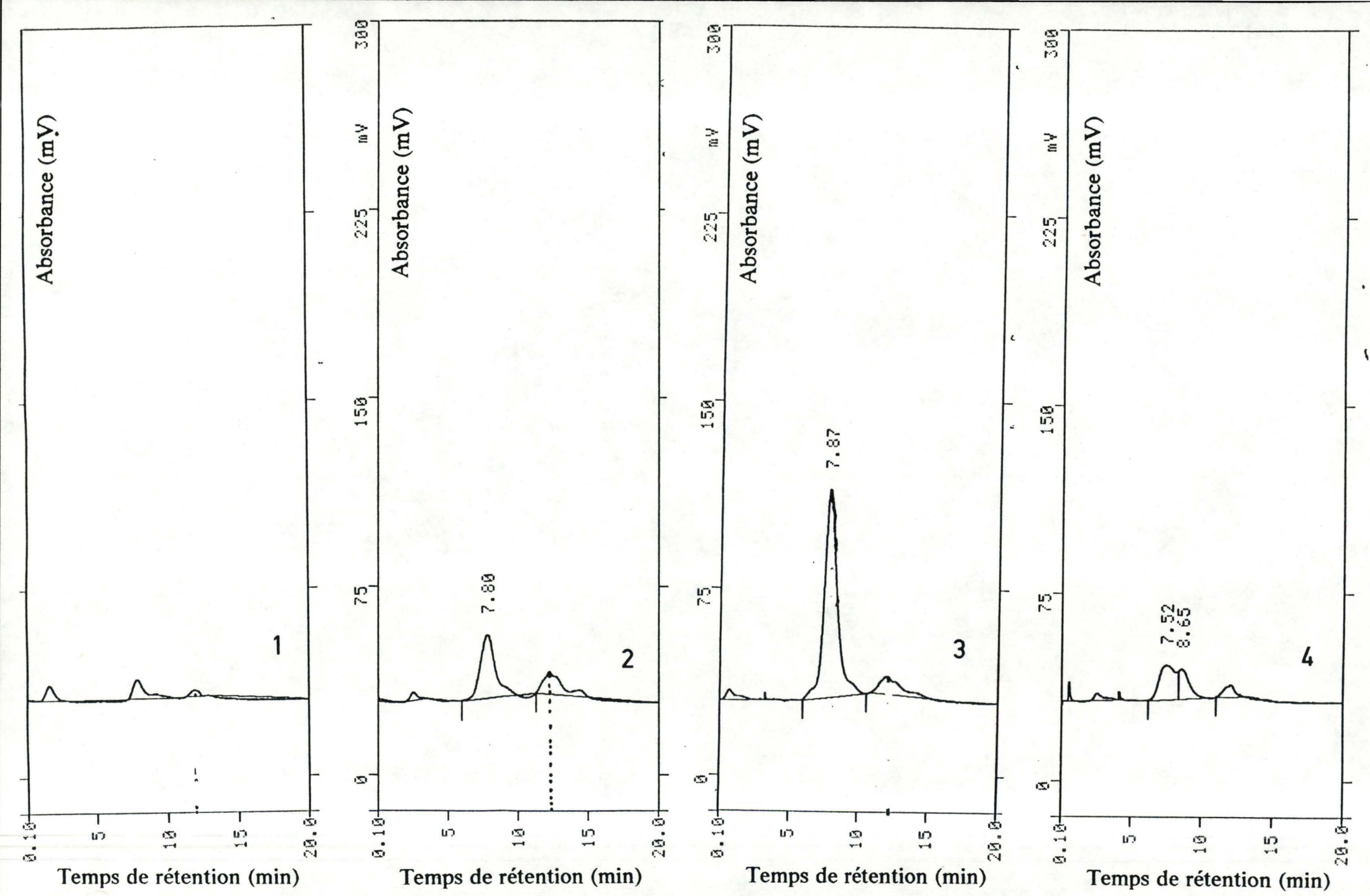


Fig. C : Les 4 chromatogrammes estiment la pureté à différents endroits

Après élution de l'ADH sur DEAE grâce à un gradient phosphate, nous avons sélectionné une série de tubes correspondant au pic d'enregistrement DEAE cellulose (Fig. B).

Nous avons testé la pureté par HPLC (tamis moléculaire LKB) à 4 endroits différents du pic d'enregistrement DEAE (Fig. C):

- deux tests avant le maximum d'absorbance du pic.
- un test au maximum d'absorbance du pic.
- et un test après le maximum d'absorbance du pic.

a) Echantillon pris dans le tube récolté correspondant au maximum d'absorbance du pic.

Nous voyons l'existence de 4 pics:

- un pic d'injection.
- un pic correspondant au volume mort de la colonne (quasi inexistant).
- un pic s'éluant à 7,87 minutes et possèdant une forte activité ADH.
- un pic peu important s'éluant à 12,16 minutes et ne possédant aucune activité ADH.

b) Echantillon pris dans les tubes récoltés avant le maximum du pic.

Nous constatons 4 pics; ce sont les mêmes que ceux signalés ci-dessus, mais leur intensité est moins forte.

c) Echantillon pris dans le tube après le maximum du pic.

Nous constatons l'apparition d'un nouveau contaminant s'éluant vers 8,65 minutes.

d) Conclusion.

Ces différentes injections nous ont permis de détecter et d'éliminer un contaminant s'éluant à 8,5 minutes simplement en retirant quelques tubes correspondant à la fin de l'enregistrement de la DEAE. Malgré cela, la pureté de notre enzyme est loin d'être suffisante. Nous avons désiré obtenir une pureté supplémentaire en essayant d'éliminer les pics s'éluant à 4,9 minutes et à 12,3 minutes.

3.3. AMÉLIORATION QUALITATIVE DE LA PURIFICATION DE L'ADH.

Devant cette constatation de manque de pureté, nous avons décidé d'ajouter de nouvelles étapes de purification, afin d'améliorer la qualité de notre enzyme.

3.3.1. Etapes supplémentaires de purification

Pour augmenter la pureté de notre enzyme, nous avons introduit une nouvelle étape de purification dans la méthode habituellement utilisée. Elle consiste à faire passer l'échantillon sur une colonne séphacryl G 200.

Cette colonne possède plusieurs avantages:

- elle sépare des molécules de 200000 à 40000. L'ADH est une molécule de poids moléculaire de 160000. Grâce à cette colonne nous pourrons séparer les contaminants du volume mort (4,9 minutes) et la protéine s'éluant à 12,3 minutes du tamis moléculaire LKB HPLC.
- c'est une colonne qui résiste très bien au tassement.
- elle est facile à fabriquer.

Vu que le dépôt sur Séphacryl G200 ne peut excéder 2 ml, nous avons décidé de concentrer le volume sur AMICON (Irlande) avec une membrane AMICON PM 10 (retenant les molécules de poids moléculaire supérieur à 10000) sous une pression de 1,5 bars.

Lorsque le volume est réduit à 2mL, on centrifuge sur JANETSKY, puis on dépose le surnageant sur la colonne séphacryl G 200 connectée à une pompe GILSON (vitesse 200).

Le chromatograme obtenu est donné ci-contre (Fig.D):

- nous constatons une première élévation de la ligne de base correspondant au volume mort de la séphacryl G 200; cela correspond probablement au contaminant s'éluant à 4,96 minutes (volume mort du tamis moléculaire LKB). L'activité ADH de ce petit " pic " est nulle.

- ensuite, nous constatons un pic très important où l'activité ADH est très forte. Ce pic correspond donc au pic ADH.
- la petite élévation de la ligne de base suivant ce pic ne montre aucune activité.
- en fin de chromatogramme séphacryl G 200, on distingue encore un petit pic. C'est probablement le contaminant s'éluant à 12,38 minutes détecté sur HPLC. En effet, la droite d'étalonnage séphacryl G 200 (cfr matériels et méthodes) nous montre que ce petit pic a un poids moléculaire d'environ 10000; ce qui correspond au poids moléculaire trouvé par la droite d'étalonnage du tamis moléculaire LKB après injection sur l'HPLC.

Remarque: Ce pic est minuscule sur cette chromatographie séphacryl, alors que sur le chromatogramme HPLC obtenu après DEAE cellulose, il avait une certaine importance. Or, nous savons que, d'une part, une molécule s'éluant à 12,38 minutes sur HPLC a un poids moléculaire d'environ 10000.et que, d'autre part , lors de la concentration sur membrane AMICON PM 10, les protéines inférieur à 10000 sont éliminées. Nous pouvons donc supposer qu'une importante élimination du contaminant "12,38 minutes" se réalise lors de la concentration sur AMICON.

Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en injectant sur HPLC (tamis moléculaire LKB) 10 µl (dilué 10 fois) d'une solution obtenue après DEAE cellulose, concentrée sur AMICON et centrifugée (fig. E).

On constate une disparition presque totale du pic "12,38 minutes", ce qui confirme l'hypothèse de la "purification" inattendue réalisée par l'AMICON.

3.3.2. Amélioration qualitative apportée par la séphacryl G 200.

L' injection de 200 µl d'une solution obtenue après passage sur séphacryl G 200 nous montre :

+ une disparition presque totale du pic correspondant au volume mort sur HPLC après DEAE cellulose .

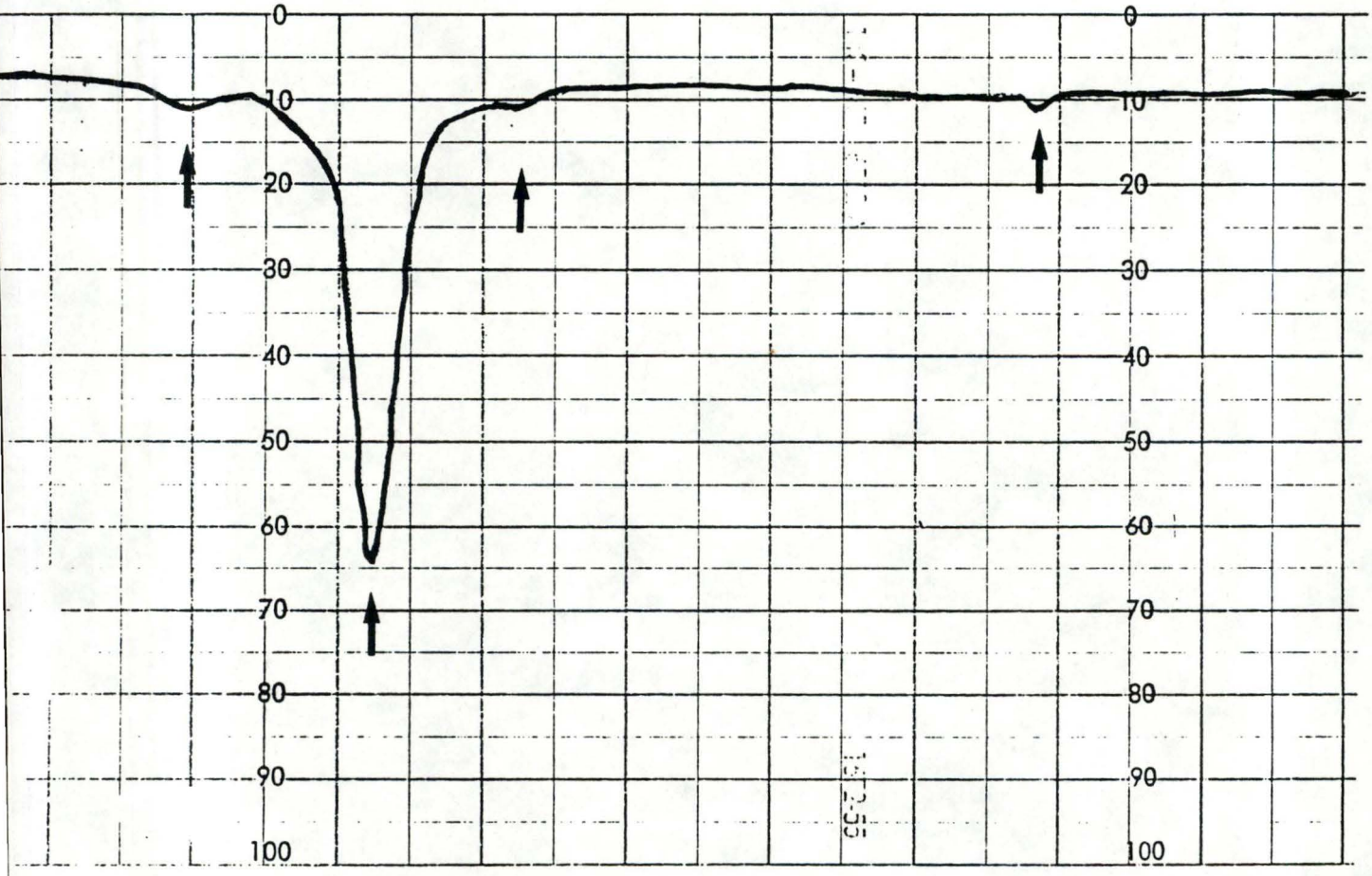


Fig. D : Chromatogramme de la séphacryl S 200.

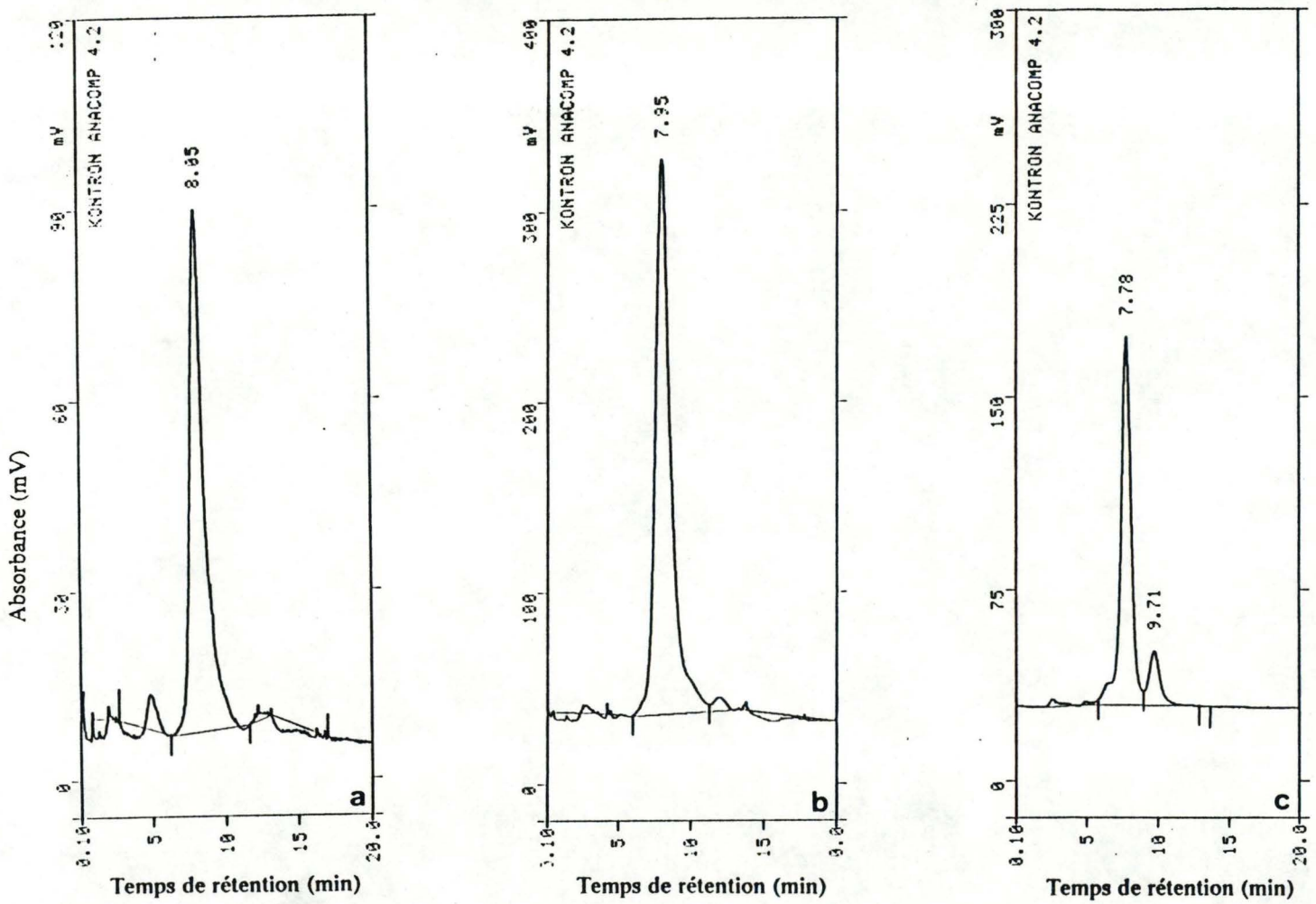


Fig. E : a : Chromatogramme HPLC sur tamis moléculaire après concentration sur Amicon.

b : Chromatogramme HPLC après Séphacryl S 200.

c : Chromatogramme HPLC sur l'ADH commercial (Sigma).

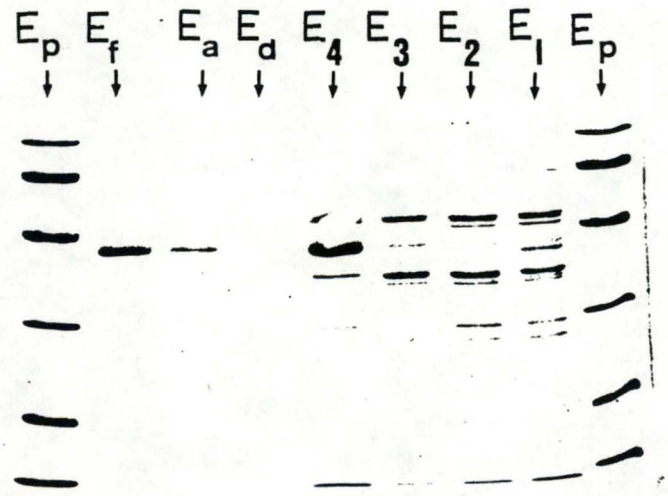


Fig. F : Electrophorèse sur SDS. Les pistes A, B, C, D, E, F, G représentent E1, E2, E3, E4, ED, EA, EF. La piste p sert à étalonner le gel.

		Activité totale de l'ADH (UE)		Quantité totale de protéines (mg)		Activité spécifique (UE/mg prot)	Purification
			perte		perte		
Extraction 1	E 1	672 000	–	64 800	–	10,4	–
	E 2	469 000	30%	35 100	46%	13,4	X 1,3
	E 3	357 000	24%	18 150	51%	19,7	X 1,5
	E 4	186 000	48%	4 665	75%	38,8	X 2,0
	ED	6 975	96%	28,65	99,5%	243	X 6,6
	EA	5 301	24%				
	EF	4 665	12%				
Extraction 2	E 1	877 500	–	67 800	–	12,9	–
	E 2	619 500	29%	35 400	48%	17,5	X 1,4
	E 3	423 000	32%	15 750	55%	26,9	X 1,5
	E 4	223 500	47%	4 380	72%	51,0	X 1,9
	ED	8 925	96%	36,3	99,2	245	X 8,2
	EA	6 514					
	EF	5 797					

Fig. G : Tableau montrant la purification de l'enzyme à chaque étape.

+ une atténuation encore plus marquée pour le contaminant de poids moléculaire estimé à 10000 .

Conclusion:

-Nous pouvons maintenant estimer posséder une enzyme "pratiquement" pure, en constatant toutefois que la purification apportée par la séphacryl G 200 est peu significative. L'essentiel de l'élimination du contaminant PM 10000 est réalisée par la filtration sur AMICON PM 10.

-Nous avons comparé notre chromatogramme " d'enzyme pure" avec celui de l'ADH commerciale vendue comme pure (Fig. E b et E c). Il est facile de constater que le degré de pureté de notre enzyme est meilleur; en effet, nous n'avons pas de pics s'éluant à 9,71 minutes, ni même d'épaulement avant le pic 7,78 minutes correspondant à l'ADH.

3.3.3. Vérification de la pureté par électrophorèse.

L'électrophorèse représente un test très sensible et couramment utilisé dans la littérature pour étudier la purification d'une protéine. Nous l'avons utilisée pour nous donner une idée qualitative mais globale de notre purification.

Toutes les étapes de purification ont donc été suivies par électrophorèse. (Fig. électrophorèses).

Signalons d'emblée que les fractions E1, E2, E3 et E4 avaient la même concentration en protéines lors du dépôt dans les puits du gel d'électrophorèse.Pour les autres fractions il nous fut impossible de garder une concentration en protéines constante car la bande ADH serait alors devenue trop importante. Nous constatons une apparition très nette de la bande ADH à partir de la fraction E4. La fraction correspondant à la DEAE n'a pas été révélée car l'enzyme était trop diluée. Par contre, on voit bien la haute pureté se manifestant déjà au niveau de notre enzyme concentrée par AMICON puis centrifugée.

La fraction déposée après séphacryl G 200 ne montre plus qu'une seule bande protéinique correspondant à l'ADH.(comparer à l'enzyme commerciale).

3.3.4. Estimation de la quantité d'ADH purifiée.

Après avoir fait toutes ces purifications, il fallait mesurer la quantité d'enzyme produit.

Deux méthodes ont été utilisées pour calculer la masse d'ADH:

- la technique du folin.
- la lyophilisation : nous avons lyophilisé la totalité de la fraction correspondant au pic ADH sur le chromatogramme séphacryl G 200. Après avoir calculé la quantité de sels provenant du tampon phosphate, nous pouvons déduire la masse de l'ADH après pesée du lyophilisat.

Les deux méthodes donnent des résultats similaires (pour 2 purifications):

	Folin (mg)	Lyophilisation (mg)	Moyenne
Extrait 1:	20,2	19,9	+/- 20 mg
Extrait 2:	23,7	24,5	+/- 24 mg

Comme on peut le constater, le rendement final en ADH est très faible. Nous avons alors voulu estimer les pertes d'ADH et de protéines au cours de la purification.

3.3.5. Estimations des pertes d'ADH et de protéines au cours de la purification.

a) Résultats.

Lors des deux premières purifications totales, nous avons pour chaque fraction mesurer la quantité totale de protéines et

l'activité totale d'ADH . La figure G donne les valeurs.de ces deux extractions.

b) Constatations.

1 Par un rapide calcul, on peut constater que la concentration en ADH correspond à 4,3% et à 5,4% de la fraction protéinique. Ceci est différent de la valeur proposée dans la littérature.où l'ADH représente 1% des protéines cytoplasmiques (cfr 1.5.3.). Il est donc probable que la méthode d'extraction (cfr 3.2.2.2.) de l'ADH privilégie la sortie de certaines protéines.

En tous cas, la méthode pour extraire l'ADH ne semble pas lyser complètement les cellules de levure. En effet, des études au microscope à contraste de phase et à fond noir ne montrent aucune différence entre la levure fraîche, la levure ayant séjourné 4 heures dans le tampon phosphate 0,066 M et la levure centrifugée. La solution "4 heures tampon phosphate 0,066 M" visionnée sur microscope à fond noir ne révèle pas la présence de parois (non montrée).

2 Les variations d'ADH entre les deux extractions peuvent varier relativement fort. (4,3% et 5,4% soit 20% de différence entre les deux valeurs).

Cette différence peut être expliquée par :

- le milieu de culture où croissent les levures (cfr 3.2.2.); toutes les levures n'ont pas été achetées à la même date.
- le temps de séchage peut varier d'une fois à l'autre ;or nous savons que l'enzyme se dénature lorsqu'elle est laissée à température ambiante.(BILLE, 1985).

3 L'énorme perte d'ADH se réalise avec la chromatographie sur DEAE (colonne de ± 100 ml),puisque nous avons 96% de perte avec l'étape précédente. mais, d'autre part, l'étape de purification DEAE est une des meilleures, puisque toutes les protéines contaminantes ont presque disparues .

Finalement, nous constatons qu'il ne nous reste, après purification totale, que 20 et 24 mg d'enzyme purifiée.

Ces quantités sont insuffisantes pour la suite de notre travail: chaque lyse protéinique nécessite 25-50 mg d'enzyme. Il était donc absolument nécessaire d'améliorer quantitativement la purification de notre enzyme.

Pour réaliser cet objectif, nous nous proposons de décomposer toutes les étapes de purification afin d'estimer plus finement les pertes et d'améliorer la concentration finale en enzyme.

3.4. AMÉLIORATION QUANTITATIVE DE LA PURIFICATION DE L'ADH.

Nous avons réexaminé chacune des étapes de la purification, afin d'estimer son efficacité et de vérifier dans quelles mesures, il n'était pas possible de l'améliorer.

3.4.1. Etude de l'influence de la température sur les pertes en ADH.

Nous avons voulu vérifier si 15 minutes de dénaturation à 55°C lors de la purification de l'ADH permettaient une purification optimale et une perte minimale d'activité pour l'ADH.

a) Résultats :

L'étude de l'influence de la température sur les pertes en ADH a été réalisée suivant le mode opératoire décrit au paragraphe III.C.3. Nous avons pu établir un graphique du dosage (Fig. H, I et J) des protéines et de l'ADH en fonction de la température

- Nous constatons que plus la température augmente, plus la purification augmente. Après 10 minutes à 60°C, nous purifions 1.6 fois pour seulement 1.4 fois après 15 minutes à 55°C.

-Nous avons voulu voir s'il existait une concordance entre les valeurs de pertes en protéines et en ADH données dans notre tableau de purification (Fig. G).

Dans les deux cas, nous trouvons ± 30% d'ADH dénaturée pour ± 45% de perte en protéines.

b) Conclusions

Malgré ces constatations, nous avons décidé de conserver la température de 55°C pendant 15 minutes. En effet, purifier

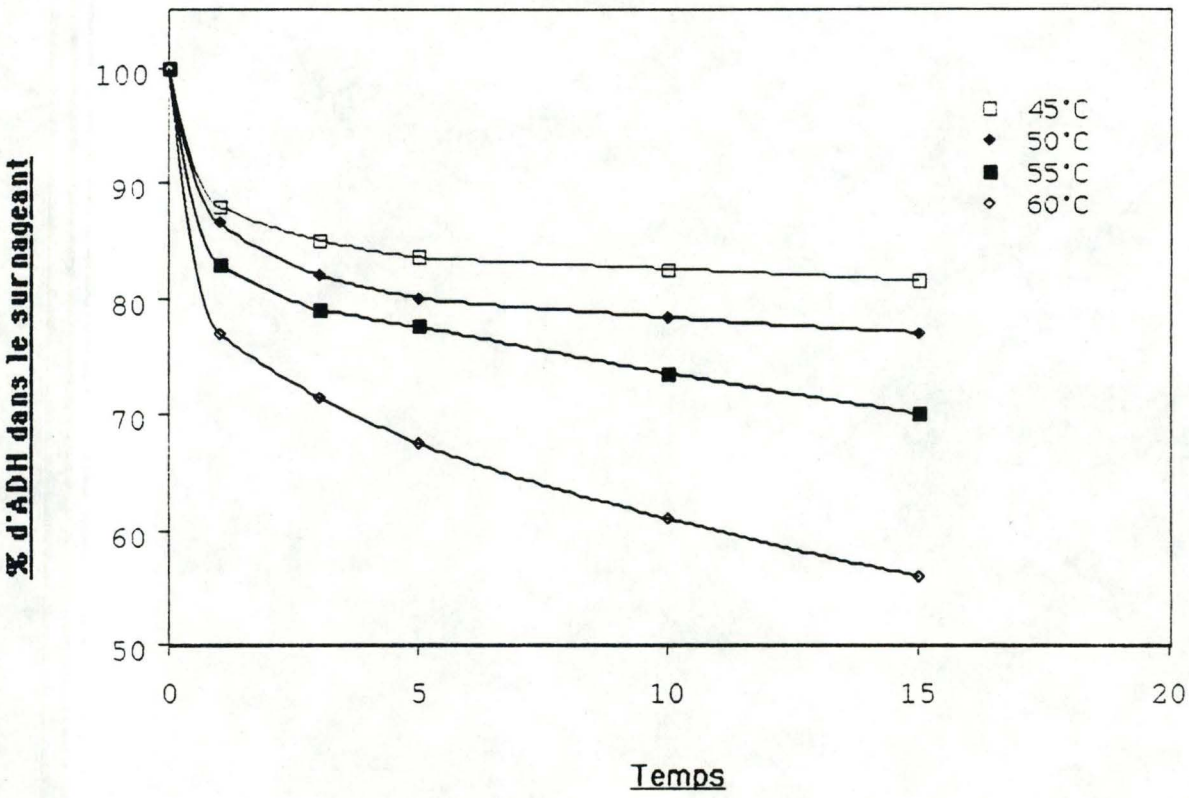


Fig. H : Pourcentage de dénaturation de l'ADH en fonction de la température et du temps.

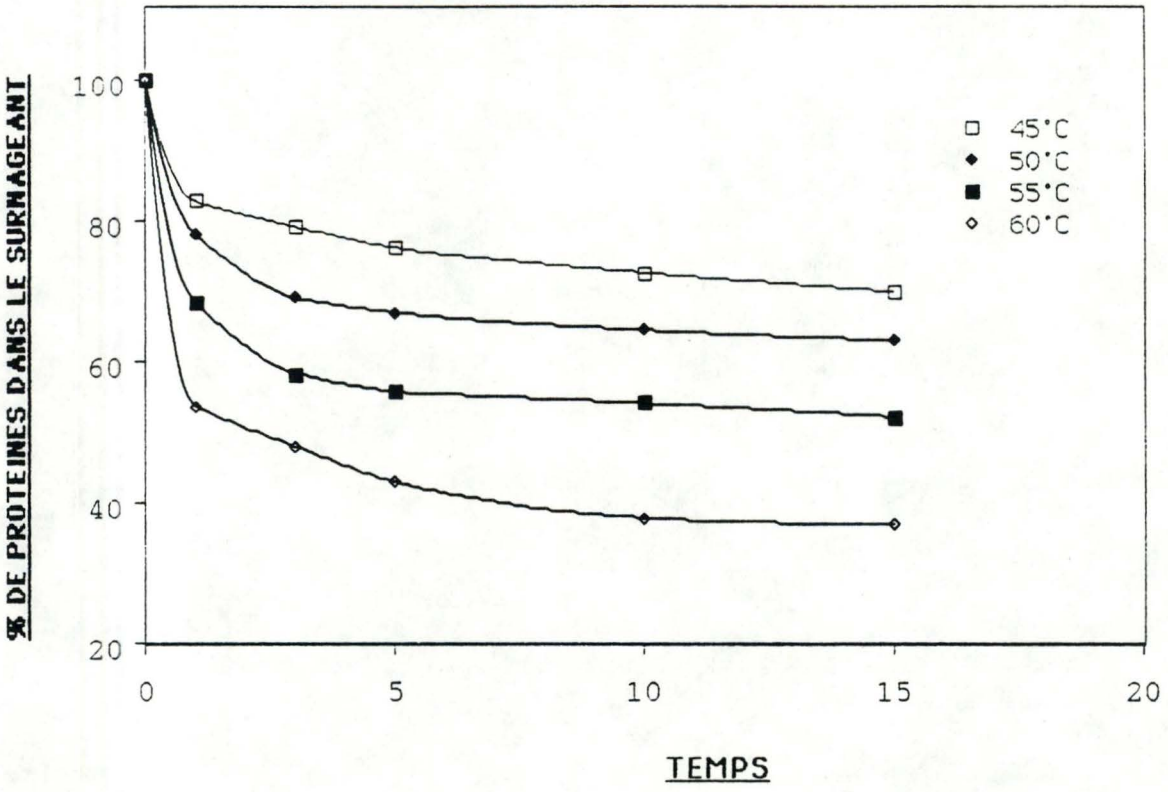


Fig. I : **Pourcentage de dénaturation des protéines en fonction du temps et de la température.**

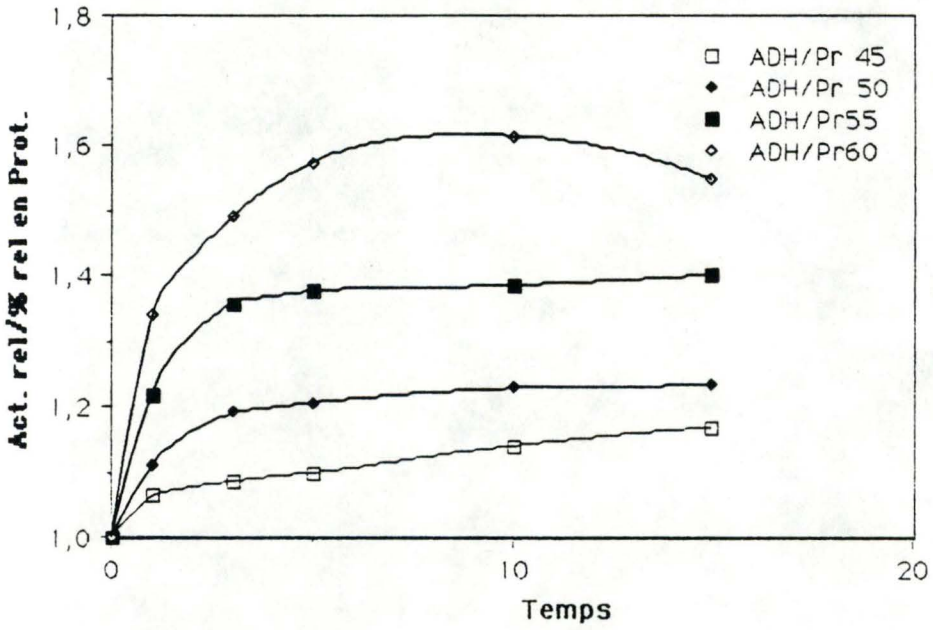


Fig. J : Purification de l'enzyme en fonction de la température et du temps·

l'enzyme à 60°C pose problème : cette température provoque une importante dénaturation de l'ADH, puisque après 15 minutes à 60°C, 45% d'activité ADH sont perdus.

3.4.2. Etude de l'influence de la précipitation à l'acétone sur les pertes en ADH.

Nous avons voulu vérifier si les deux pourcentages d'acétone renseignés dans la littérature (33 et 52 %) permettaient une purification optimale et une perte minimale d'activité pour l'ADH.

L'étude de l'influence de la précipitation à l'acétone sur les pertes en ADH a été réalisée suivant le mode opératoire que nous avons élaboré et décrit au § III.C.4..

a) Précipitations pour différentes concentrations en acétone.

Nous avons établi un graphique (Fig.K) du dosage des protéines et de l'ADH en fonction du pourcentage d'acétone.

-Ce graphique nous prouve que les deux pourcentages d'acétone employés lors de la purification de l'ADH, donnés dans la littérature sont biens choisis. Lors de la première purification à l'acétone (33 %), on ne perd que ± 10 % d'ADH pour 37 % de protéines. Pour une concentration de 52 % d'acétone, on perd ± 6 % d'ADH mais 18 % de protéines. Soit au total ± 16 % d'ADH pour ± 55 % de protéines.

Nous avons voulu voir s'il existait une concordance entre les valeurs de pertes en protéines et en ADH données dans notre tableau de purification (Fig. G) et celles trouvées par cette expérience.

- Nous constatons que la perte totale de protéines correspond bien à celle trouvée dans le tableau de purification (1) puisque nous avons obtenu pour les deux cas des valeurs de 51 % et 55 %.

- Le pourcentage de perte obtenu pour l'ADH peut sembler différent. Nous avons, en effet, 16 % de perte renseignée ici, pour 24 % ou 32 % de perte renseignée dans le tableau de purification. Notons cependant qu'il faut compter que l'ADH subit une perte d'activité de ± 10 % après 15 heures à 4°C (Bille, 1985). Or, le temps de dialyse suivant la précipitation à l'acétone dure généralement entre 15 et 20 heures.et se déroule à 4°C. Cette correction nous permet donc d'obtenir des chiffres très similaires pour les deux méthodes.

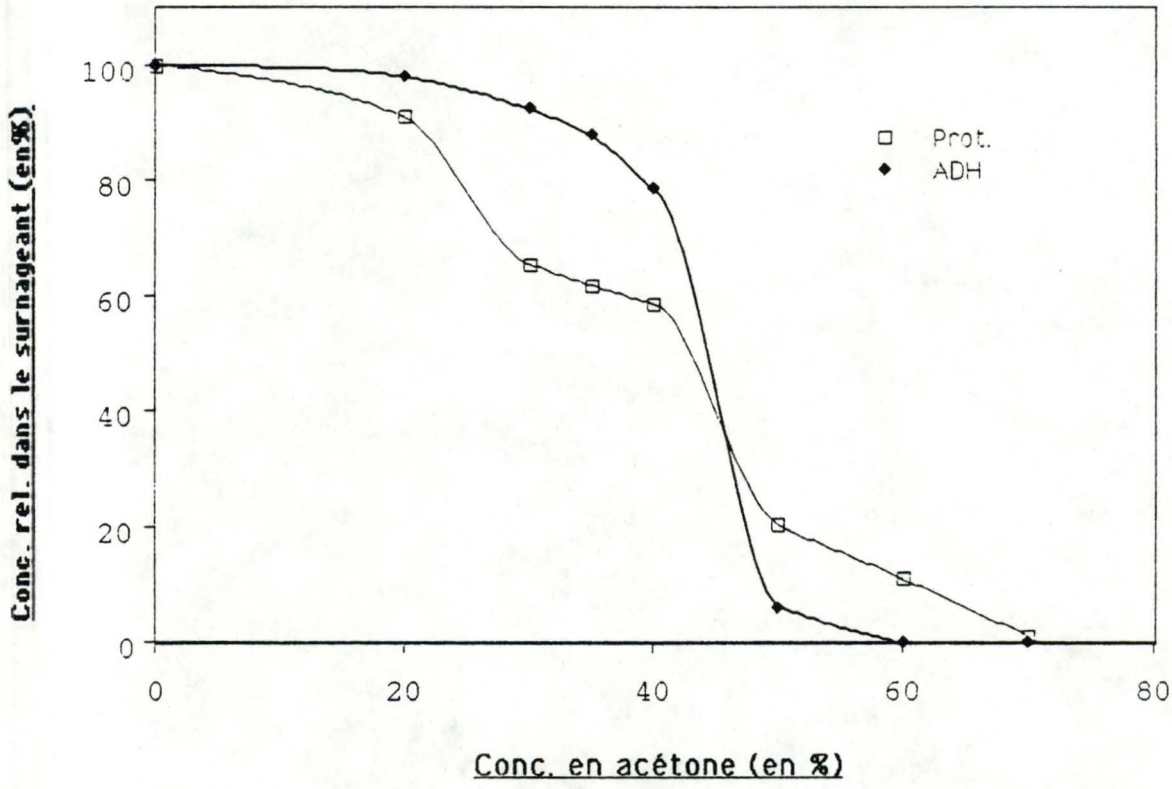
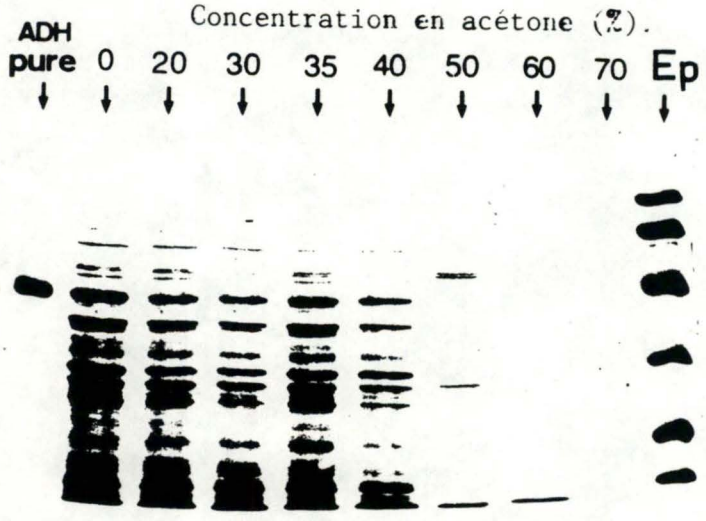


Fig. K : Graphe superposant la dénaturation de l'ADH et la dénaturation des protéines en fonction de la concentration en acétone (%).



Electrophorèse de la fraction E_3

b) Vérification par électrophorèse

Nous avons voulu vérifier "visuellement" la dénaturation des protéines réalisée par la précipitation à l'acétone et examiner le comportement des protéines contaminantes vis à vis de l'ADH. Nous avons alors réalisé une électrophorèse de chaque surnageant obtenu avec les différents pourcentages en acétone testés.

Nous avons déposé le même volume de fraction dans chaque puits du gel. On constate (Fig. électrophorèses) que c'est vers 35 % en acétone que la bande d'ADH apparaît le mieux (en accord avec l'analyse précédente).

On peut également constater que 2 ou 3 protéines semblent avoir un comportement similaire à l'ADH vis-à-vis de l'acétone .

A 50 % d'acétone, la majorité des protéines dont l'ADH semble avoir disparu.

A 60 %, on ne voit plus qu'une petite bande.

Ces résultats d'électrophorèse concordent donc bien avec ceux obtenus par dosage.

c) Amélioration de la méthode.

Suite à toutes ces constatations, nous avons préféré modifier quelque peu la précipitation à l'acétone en privilégiant les gains en ADH aux dépends de la pureté.

Nous avons légèrement augmenté la deuxième concentration en acétone, la portant de 51 % à 58 %. Ainsi, ± 13 % de protéines sont dénaturés pour seulement ± 2 % d'ADH.

Mais la grande amélioration a été la réduction du temps de dialyse. Nous avons réduit ce temps à 2 heures avec renouvelement du tampon de dialyse après 1 heure. Ces changements montrent une amélioration de 10 à 15 % sur les pertes en ADH.

Remarque : Sachant que l'acétone est en fait un inhibiteur compétitif de l'éthanol, il était absolument nécessaire de voir si 2

heures de dialyse suffisaient à éliminer pratiquement tout l'acétone du dialysat.

Nous avons alors mis sur pied un test nous permettant de doser l'acétone résiduelle dans le dialysat.

Dans un premier temps, nous avons voulu voir l'influence de l'acétone sur l'ADH.

-Nous avons réalisé une expérience montrant l'activité relative de l'ADH suivant le pourcentage d'acétone dans le milieu de dosage (le dosage s'est effectué dans une cuvette de 3 ml. On a placé 2,9 ml de solution de dosage aux concentrations habituelles plus de l'acétone aux concentrations désirées (Fig. L).

- Le graphe nous montre qu'il existe une diminution linéaire d'activité en fonction de la concentration en acétone (inhibition compétitive). Nous possédons donc un test sensible à l'acétone puisqu'il permet de détecter des concentrations inférieures à 0,1 % en acétone dans le milieu de dosage.

Dans un second temps, nous avons utilisé ce test pour estimer la concentration en acétone éventuellement encore présente dans le dialysat, après 2 heures de dialyse.

Nous avons réalisé le test en double suivant le mode opératoire que nous avons élaboré et qui est décrit au §III.C.4.

cuvette témoin	Abs/min
test 1	0,333
test 2	0,333

cuvette avec dialysat	Abs/min
test 1	0,330
test 2	0,330

Il semble donc qu'il reste très peu (< 0,1 %) ou pas d'acétone dans le dialysat après 2 heures de dialyse. A ces concentrations très faibles, l'acétone n'est pas gênant pour la suite des opérations

où il sera encore dilué. Conclusion : le temps de dialyse de 2 heures est suffisant.

d) Conclusions.

Nous pouvons donc conclure que les deux étapes de précipitation à l'acétone doivent être réalisées à 33% et 58%, et que le temps de dialyse, suivant les précipitations, peut être réduit à 2 heures.

3.4.3.Etude de l'influence du sulfate d'ammonium sur les pertes en ADH.

Dans le même ordre d'idée que pour l'acétone, nous avons voulu vérifier si les deux concentrations en sulfates d'ammonium (20 - 36 gr/100 ml) renseignées dans la littérature, permettaient une purification optimale et une perte minimale d'activité pour l'ADH.

a) Précipitation au sulfate d'ammonium.

Pour étudier l'influence du sulfate d'amonium sur les pertes en ADH, nous avons élaboré le mode opératoire décrit au §III.C.5.

Par cette étude (Fig.M), il apparait que les 36 grammes de sulfate d'amonium par 100 ml de solution , employés lors de la purification habituelle, diminuent 60 % des protéines pour seulement 18 % d'ADH. Les 20 grammes de sulfates d'ammonium pour 100 ml de solution, employés également habituellement, éliminent ± 10 % de protéines et d'ADH.Nous constatons donc que ces deux concentrations en sulfate d'ammonium sont idéalement choisies.

Au total, nous avons ± 70 % de protéines éliminées pour 28 % d'ADH perdu. Comme précédemment, le chiffre des protéines correspond plus ou moins à celui obtenu dans notre tableau de purification (Fig. G) alors que celui de l'ADH est sous-estimé. La différence de 20 % correspond, comme pour l'acétone, à la longue dialyse de 2 jours (entre 36 et 48 heures).

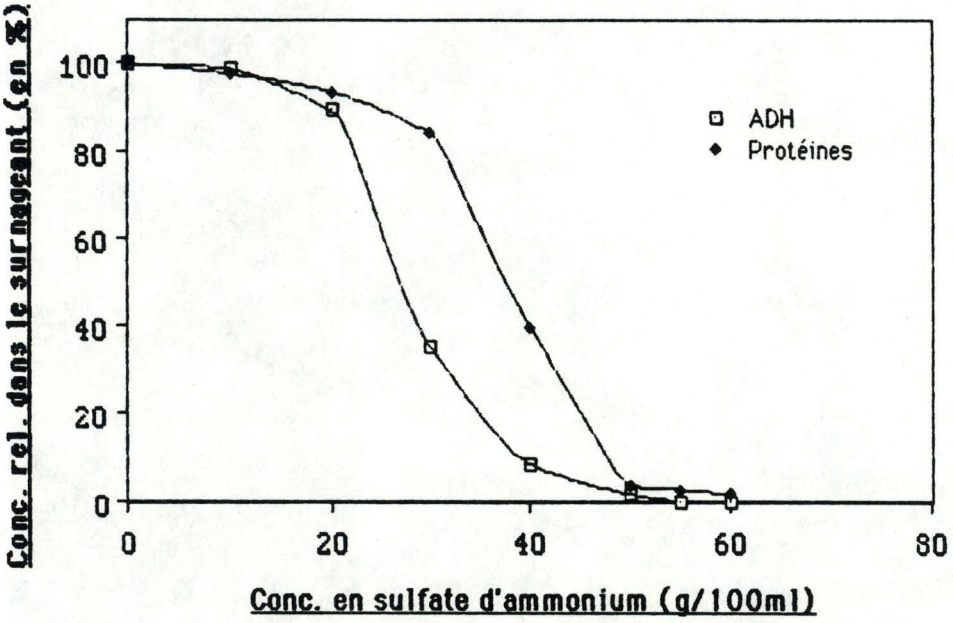


Fig. M : Graphe montrant la dénaturation de l'ADH et des protéines en fonction de la concentration au sulphate d'ammonium.

b) Amélioration apportée :

Suite à ces résultats, le seul changement apporté à cette technique est la diminution du temps de dialyse (extrapolation avec la dialyse de l'acétone). Nous avons ramené ce temps à 4 heures en changeant toutes les heures le tampon de dialyse. Nous constatons un gain final en ADH de 15 % .

3.4.4. Etude de l'influence de la purification à la colonne DEAE cellulose sur les pertes.

Le tableau de purification (Fig. G) que nous avons établi nous montre que la colonne DEAE est la meilleure étape de purification. Malheureusement, les pertes en ADH sont très grandes (96 %). Nous avons dès lors étudié avec soin cette étape pour voir à quels niveaux se situaient ces pertes.

a) Analyse des différentes étapes de la purification par DEAE cellulose.

1. Etape de rinçage (phosphate 10 mM pH 7.0)

Après fixation des protéines chargées négativement sur la DEAE cellulose, un premier rinçage par du tampon phosphate 10 mM pH 7,0 permet d'éliminer les protéines non retenues par le gel.

Vu que lors des 30 premières minutes de ce rinçage), l'absorbance à 280 nm augmente très fort, nous avons voulu savoir si la charge totale de la colonne était capable de retenir toute l'ADH chargée négativement à pH 7,0.

Pour cela, nous avons récolté pendant 30 min le liquide de rinçage à la sortie de la colonne, nous en avons injecté 200 µl sur l'HPLC à tamis moléculaire LKB.

Nous constatons la présence de deux pics s'éluant à 7.62 et 9.13 min (Fig. N). Nous avons dosé l'activité de l'ADH au niveau de ces deux pics. On remarque une faible activité au niveau du non-retour à la ligne de base entre les deux pics.

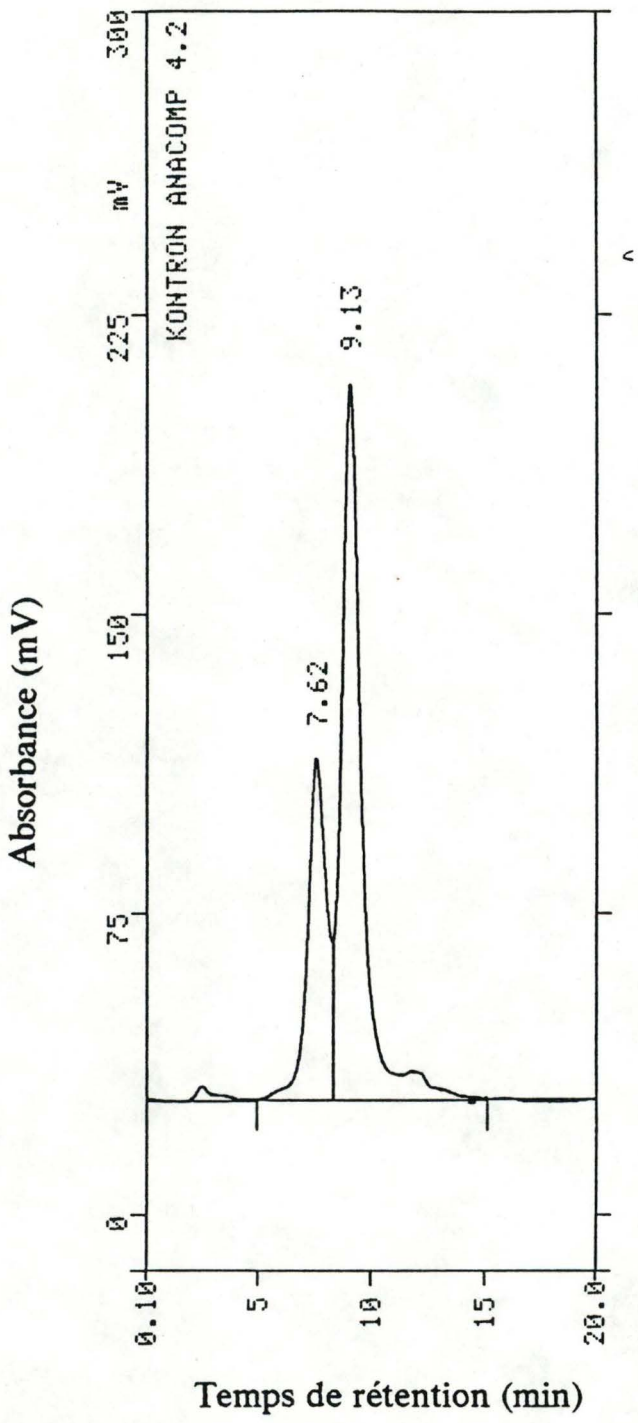


Fig. N : Chromatogramme représentant les protéines libérées lors du rinçage de la colonne.

n° du test	dilution	D Abs/min	Vol de la fraction	act tot.(U/ml)
1	1	0,252	2 ml	2,42
2	1	0,252	2 ml	2,42

- Cette activité est beaucoup trop faible pour représenter la surface d'un des deux pics. Elle représente une faible élution tout à fait normale de l'enzyme qui n'est liée que par une liaison électrostatique à la colonne.

Conclusions :

- Ce chromatogramme nous prouve que la capacité de charge de la colonne DEAE est suffisante pour retenir la totalité de l'ADH. Si ce n'était pas le cas, nous aurions découvert dans le chromatogramme un pic ADH avec une activité plus importante.
- Pour augmenter notre rendement final, nous avons diminué le temps de rinçage de la colonne DEAE. Nous avons ramené ce temps à deux heures au lieu d'une nuit. Ce temps est suffisant pour éliminer toutes les protéines non chargées négativement à pH 7.0 et permet de diminuer l'élution "normale" de l'ADH.

2. Rinçage de la colonne par du KCl 1 N.

Après décrochage de l'ADH par un gradient phosphate, le gel DEAE cellulose est rinçé par du KCl 1N. Ceci, pour détacher toutes les protéines encore fixées sur la DEAE. Nous avons voulu savoir si nous retrouvions de l'ADH à ce niveau. Pour cela, nous avons collecté la solution de rinçage à la sortie de la colonne à trois endroits différents sur le chromatogramme DEAE et réalisé une injection sur HPLC pour chacun des échantillons (Fig. O).

L'analyse d'une injection (fig. P) de 200 µl par HPLC à tamis moléculaire LKB présente pour chacun des échantillons une série de pics se chevauchant, ce qui est le signe d'une abondante diversité

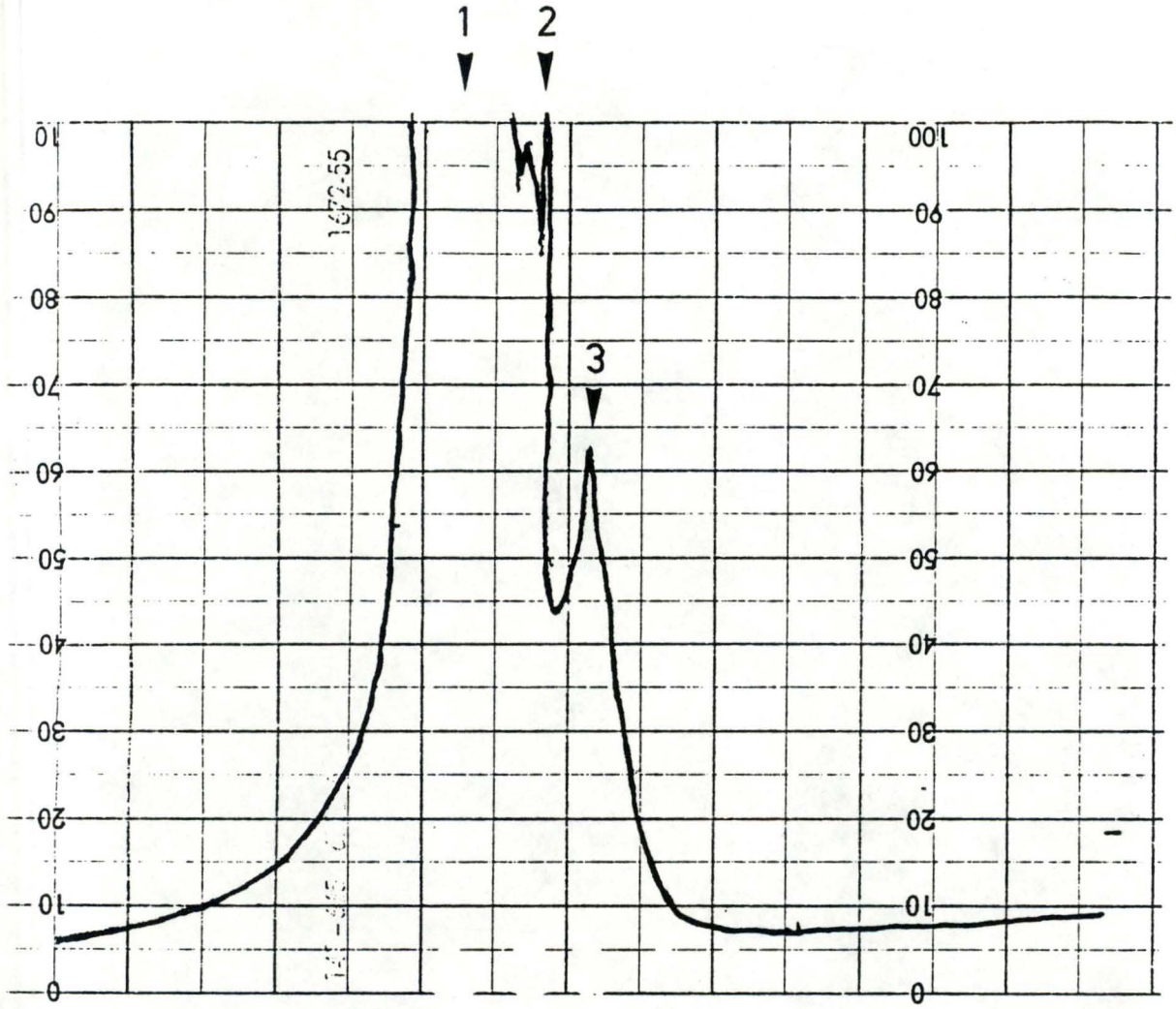


Fig. O : Chromatogramme montrant la concentration des protéines restées fixées sur la DEAE après gradient phosphate et éluées par une forte concentration en KCl. Les flèches 1, 2, 3 représentent les endroits où nous avons collecté des échantillons pour injection sur HPLC sur tamis moléculaire.

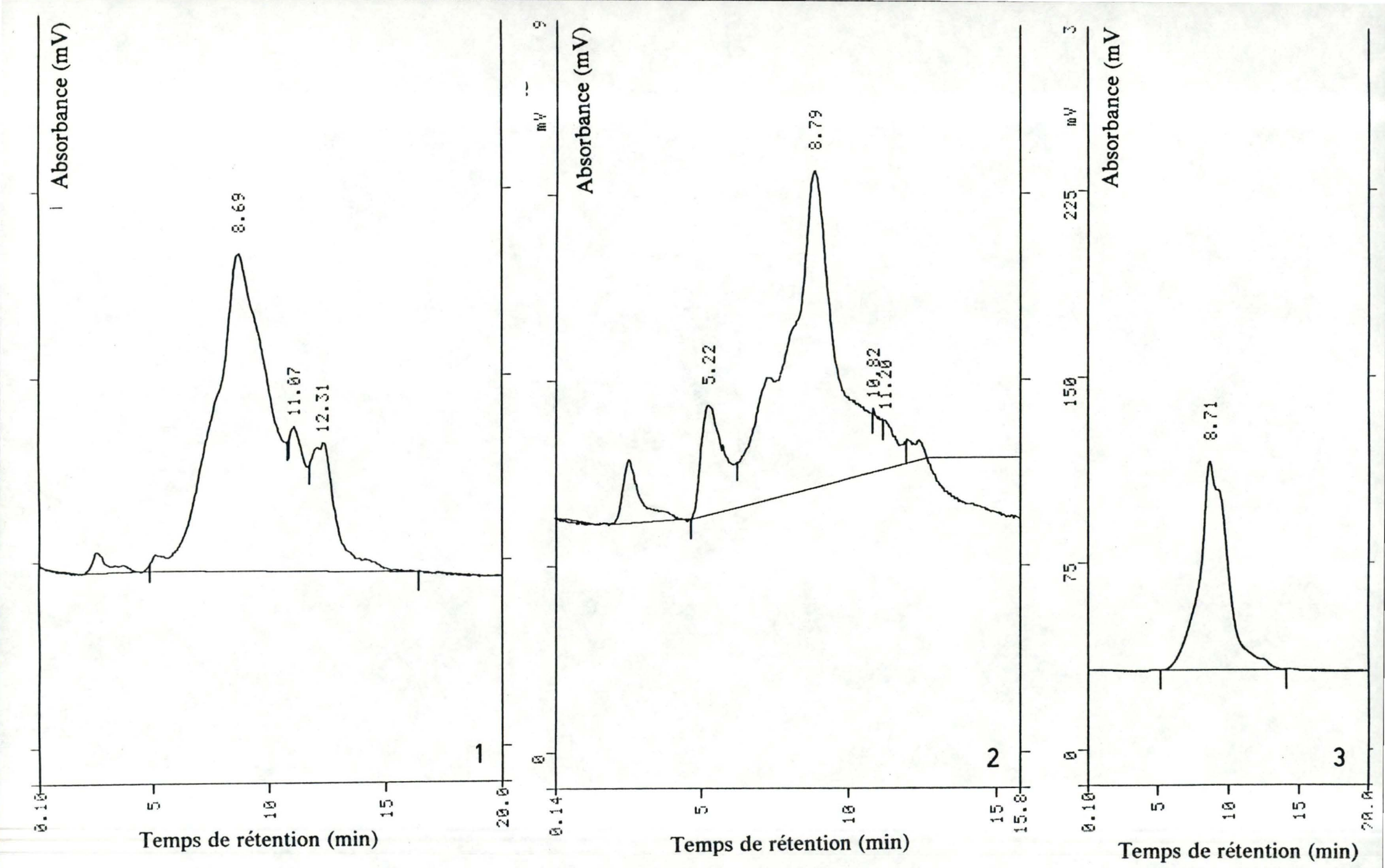


Fig. P : Chromatogramme HPLC des 3 échantillons prélevés à 3 endroits différents du pic DEAE de rinçage KCl 1 N.

de protéines. Pour chaque chromatogramme, nous avons mesuré une activité ADH non négligeable entre 7 et 9 min.

n° du pic	dilution	D Abs/min	Vol de la fraction	activité(U/ml)
1	1	O,272	2 ml	2,60
2	1	0,270	2 ml	2,60
3	1	0,055	2 ml	0,50

Conclusions :

La grosse perte d'ADH se réalise lors du lavage de la colonne avec une solution de KCl 1 N. Malheureusement, sur cette étape, il est difficile d'intervenir sans amener des contaminants protéiniques indésirables.

3.4.5. Etude de l'influence de la purification par Amicon sur les pertes en ADH.

La concentration sur Amicon du pic ADH à la sortie de la DEAE nous permettait d'éliminer en quantité importante le contaminant de PM égal à 10000. Malheureusement, la concentration de protéines dans un faible volume (2ml) entraîne une précipitation protéinique importante.

En effet, le tableau de purification (Fig. G) que nous avons établi nous permet de constater que 30 % d'ADH sont perdus par cette étape. Pour diminuer cette perte, tout en éliminant en grande partie le contaminant de PM égal à 10000, nous avons décidé de concentrer 5 fois (50 ml à 10 ml), afin d'enlever les 4/5 du contaminant.

Nous avions constaté que la Séphacryl G 200 augmentait les pertes en ADH tout en diminuant très peu les contaminants. Nous avons dès lors décidé de ne plus passer l'échantillon sur une Séphacryl G 200, ce qui permet de gagner encore 10 % d'ADH.

Pour conserver l'enzyme que nous considérons à ce moment comme pure, nous lyophilisons les 10 ml de solution obtenue après concentration sur Amicon.

3.5. RENDEMENT FINAL APRES MODIFICATIONS DE LA PURIFICATION.

3.5.1.Quantité d'enzyme recueilli après purification.

Après avoir estimé l'origine des pertes d'ADH par des expériences partielles, nous avons désiré voir comment se comportait notre méthode d'extraction améliorée lors d'une purification totale.

Voici le tableau (Fig. Q) récapitulatif de cette extraction.

- Nous constatons que les prévisions issues des expériences partielles sont bien confirmées par ce tableau de purification.
- Si nous dosons la quantité finale de protéines, nous obtenons une valeur de 80 mg, ce qui représente une quantité d'ADH 4 fois supérieure aux extractions précédentes.

Le premier but de notre travail est donc atteint. Nos possédons une méthode nous permettant d'avoir une quantité d'enzyme suffisante.

3.5.2. Qualité de l'enzyme après purification totale.

Sa quantité est une chose, la qualité en est une autre. Nous avons étudié la pureté de l'enzyme par HPLC et par électrophorèse.

Le chromatogramme (Fig. R) nous montre que l'enzyme possède un degré de pureté très élevé. Les pics de contaminants, s'éluant dans le volume mort de la colonne et de 11 à 12 min, ne sont présents qu'à l'état de traces.

L'électrophorèse confirme cette constatation puisque dans la piste EA, nous voyons une forte bande que représente l'ADH et deux ou trois fines bandelettes qui sont des contaminants (n'oublions pas que la bande de l'ADH commercial possède cinq ou six fines taches).

	Activité totale de l'ADH (UE)		Quantité totale de protéines (mg)		Activité spécifique (UE/mg prot)	Purification
		perte		perte		
	787 000		66 200			
2	559 000	29%	35 700	46%	11,9	
3	475 000	15%	17 100	52%	15,6	X 1,3
4	304 000	36%	4 959	71%	61,3	X 3,9
5	21 200	93%	90,2	98,7%	236,1	X 3,8
A	19 360	9%	80,2	10%	241,4	X 1,0

Fig. Q : Tableau de purification , établi avec les améliorations apportées à la technique de purification.

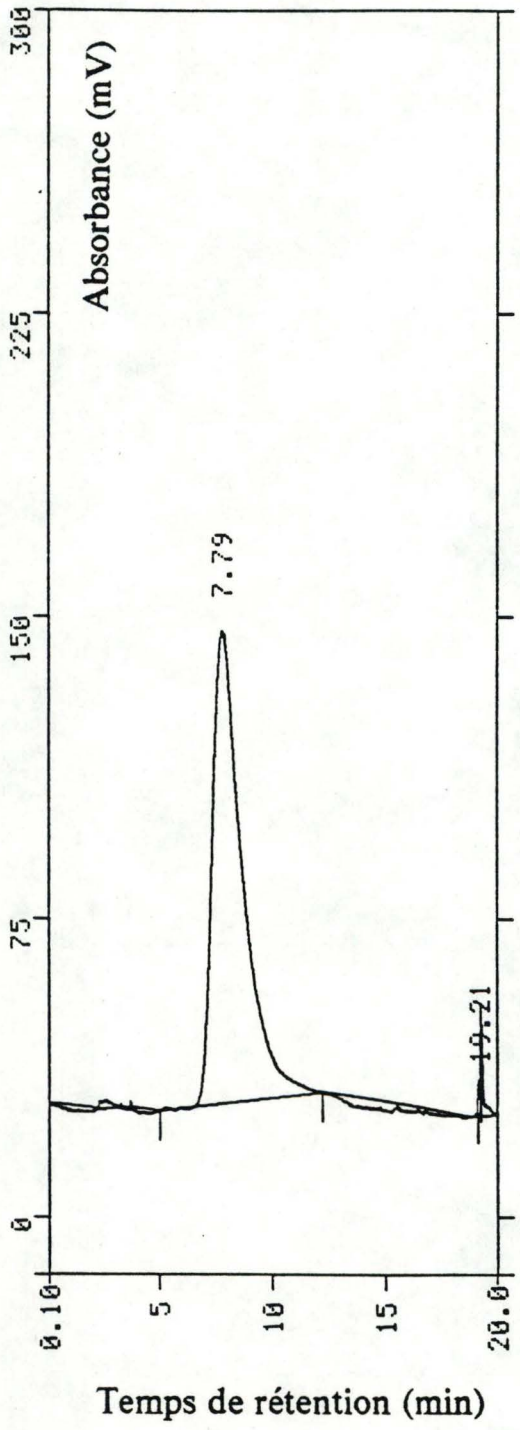


Fig. R : Chromatogramme HPLC de l'enzyme purifiée avec la nouvelle technique de purification.

Fig. S : Electrophorèse sur les différentes fractions.

3.5.3. Conclusion :

Nous avons une enzyme quasi pure que nous pouvons extraire en grande quantité.

3.6. LYSE DE L'ADH.

3.6.1. Introduction.

Toutes les études sur la purification de l'ADH nous ont permis d'obtenir l'enzyme en quantité suffisante pour la suite du travail. De plus, nous avons constaté que l'enzyme obtenue était plus pure que l'ADH commerciale. Dans ces conditions, nous pouvons donc envisager les lyses protéiniques et rechercher un peptide ayant une activité catalytique.

Avant d'entamer la lyse proprement dite, il nous paraît intéressant d'examiner a priori les résultats pouvant être attendus. En effet, les protéases telles que la trypsine et la chymotrypsine ont une activité spécifique. Elles réalisent le clivage des liaisons peptidiques au niveau de certains acides aminés bien précis : arginine ou lysine pour la trypsine et tyrosine, tryptophane ou phénylalanine pour la chymotrypsine. Ainsi, connaissant la structure primaire de l'YADH1, nous avons pu estimer le nombre et la taille des peptides résultant de la lyse protéasique. De plus, comme nous l'avons mentionné, dans notre introduction théorique, la présence de l'atome zinc est indispensable à l'ativité catalytique. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux peptides contenant cet atome. Nous présentons aux figures S et T les différents fragments attendus de la lyse trypsinique et chymotrypsinique.

3.6.2. Etapes de la lyse.

a) Fragments attendus après lyse trypsinique.

La trypsine peut couper l'ADH 1 de levure à 30 sites différents. Il n'y aura cependant que 29 peptides indépendants, car le Zn

catalytique, par ses liaisons covalentes à la Cys 46 et 174 et à l'His 67, rassemble 3 peptides. De plus, dans l'Y ADH 1, il n'y a qu'un seul pont disulfure entre deux cystéines qui sont l'une à côté de l'autre.

Description du peptide intéressant pour notre travail :

Le "peptide" qui nous intéressait particulièrement est le peptide contenant le Zn catalytique. Comme on vient de le dire, il s'agit, en fait, de trois peptides liés par le Zn catalytique. Sa taille totale est de 110 acides aminés. Il comprend la majorité des a.a. importants pour la fixation du substrat éthanol, c'est-à-dire le Trp 95, l'Asn 110, la Thr 120, le 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. Et finalement, on retrouve aussi les deux a.a. jouant le "jeu" de pont hydrogène avec l'eau liée au Zn catalytique, c'est-à-dire la Thr 48 et l'His 51. Notons à titre de remarque que le second atome de Zn est compris également dans ce peptide.

b) Fragments attendus après lyse chymotrypsinique.

On constate que la chymotrypsine coupe l'YADH 1 à 26 endroits différents. Le nombre de peptides obtenus sera de 24 : on a trois peptides attachés à l'atome Zn catalytique (comme dans le cas de trypsine). De plus, l'autre atome de Zn relie deux peptides.

Description du peptide catalytique :

Le "tri-peptide" contenant l'atome de Zn catalytique possède la Thr 46 et l'His 51 qui font un jeu de pont hydrogène avec l'eau liée au Zn catalytique. Le peptide comporte aussi la Thr 178. Le site de liaison du substrat éthanol ainsi que le second atome de Zn ne sont plus présents dans ce peptide.

Nous avons réalisé la lyse protéinique de l'ADH par la trypsine et la chymotrypsine suivant le mode opératoire décrit plus haut.

3.6.3. Vérification de la lyse par HPLC en phase inverse.

Nous voulions une preuve expérimentale à toutes ces considérations théoriques. Pour savoir si la lyse avait bien eu lieu et si le nombre de peptides correspondait bien au nombre de peptides prévu, nous avons réalisé une chromatographie sur une colonne C 18 en phase inverse. Ce type de chromatographie sépare les peptides suivant leur hydrophobicité. Les solvants et le gradient utilisés pourront même nous permettre de séparer des peptides différant par un seul acide aminé (Mant, 1987).

Plus les peptides seront hydrophobes et plus ils seront retenus sur la colonne. Ce chromatogramme ne pourra cependant nous donner qu'une idée qualitative très générale de la séparation des peptides.

a) Comparaison des chromatogrammes après injection de 100 µl de lysat trypsinique obtenu après 8 heures et 24 heures de lyse. (Fig. 36 et 37)

On constate que la lyse de 24 heures est plus prononcée que la lyse de 8 heures. En effet, nous constatons sur le chromatogramme "24 heures", une intensité plus marquée de certains pics déjà présents sur le chromatogramme "8 heures" (preuve : pour une même quantité injectée, les échelles sont différentes). D'autres pics du chromatogramme "8 heures" semblent par contre disparaître sur le chromatogramme "24 heures". Cela peut s'expliquer par la plus longue activité de la trypsine (agissant 24 heures) sur un peptide incomplètement lysé. Cela entraîne une augmentation des peptides lysés (augmentation de certains pics) et une diminution de peptides incomplètement lysés (diminution de pics) ainsi que l'apparition ou le déplacement d'autres pics.

Notons que les deux pics s'éluant avant 5 minutes représentent le pic d'injection et le pic d'élution de l'urée et que l'injection du mélange trypsine ADH non lysé, montre que les pics s'éluant après 55 minutes sont soit de l'ADH, soit de la trypsine, ou des contaminants protéiniques de la trypsine.

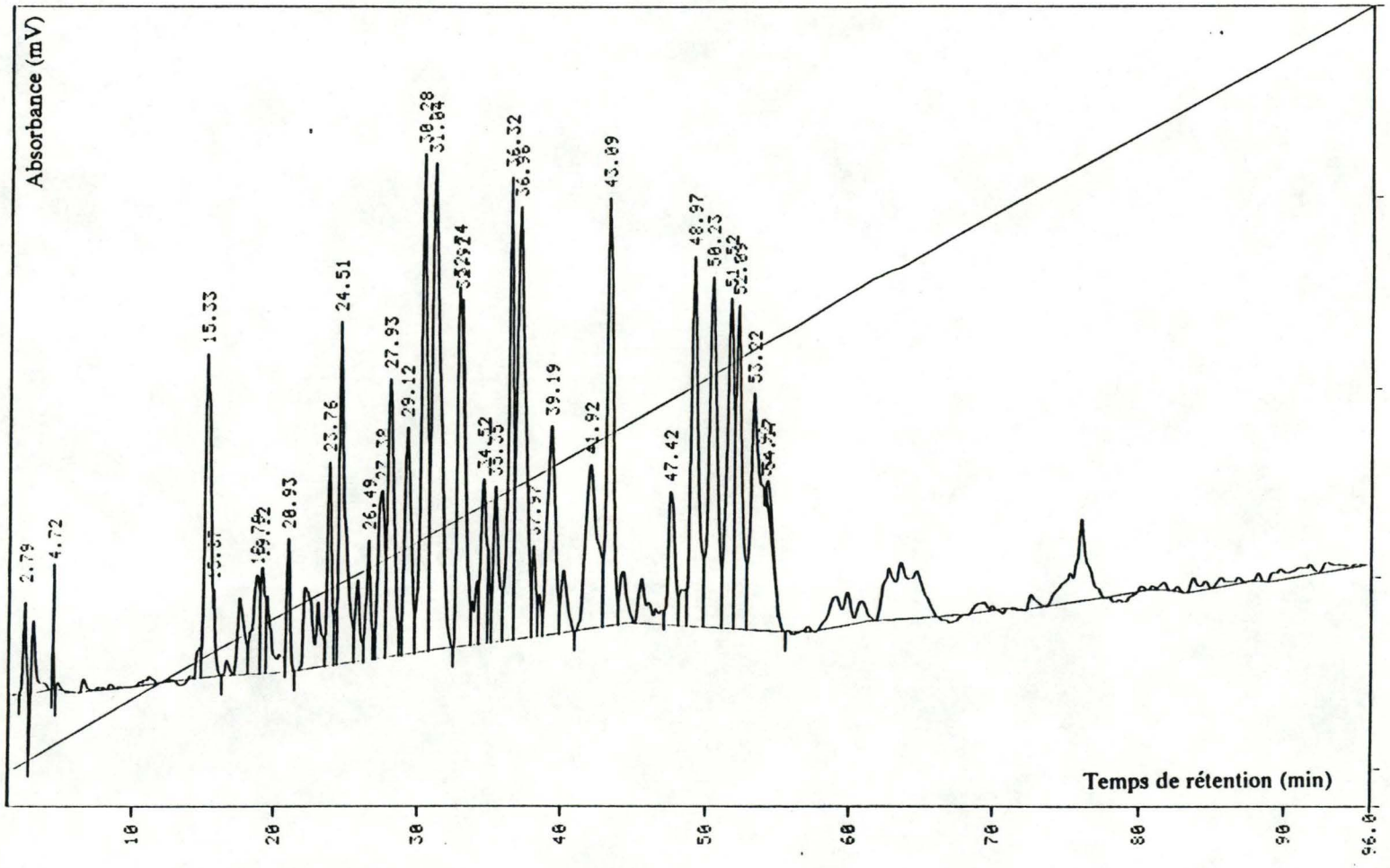


fig.36 : Chromatographie HPLC phase inverse C18 après lyse trypsinique durant 8 heures.

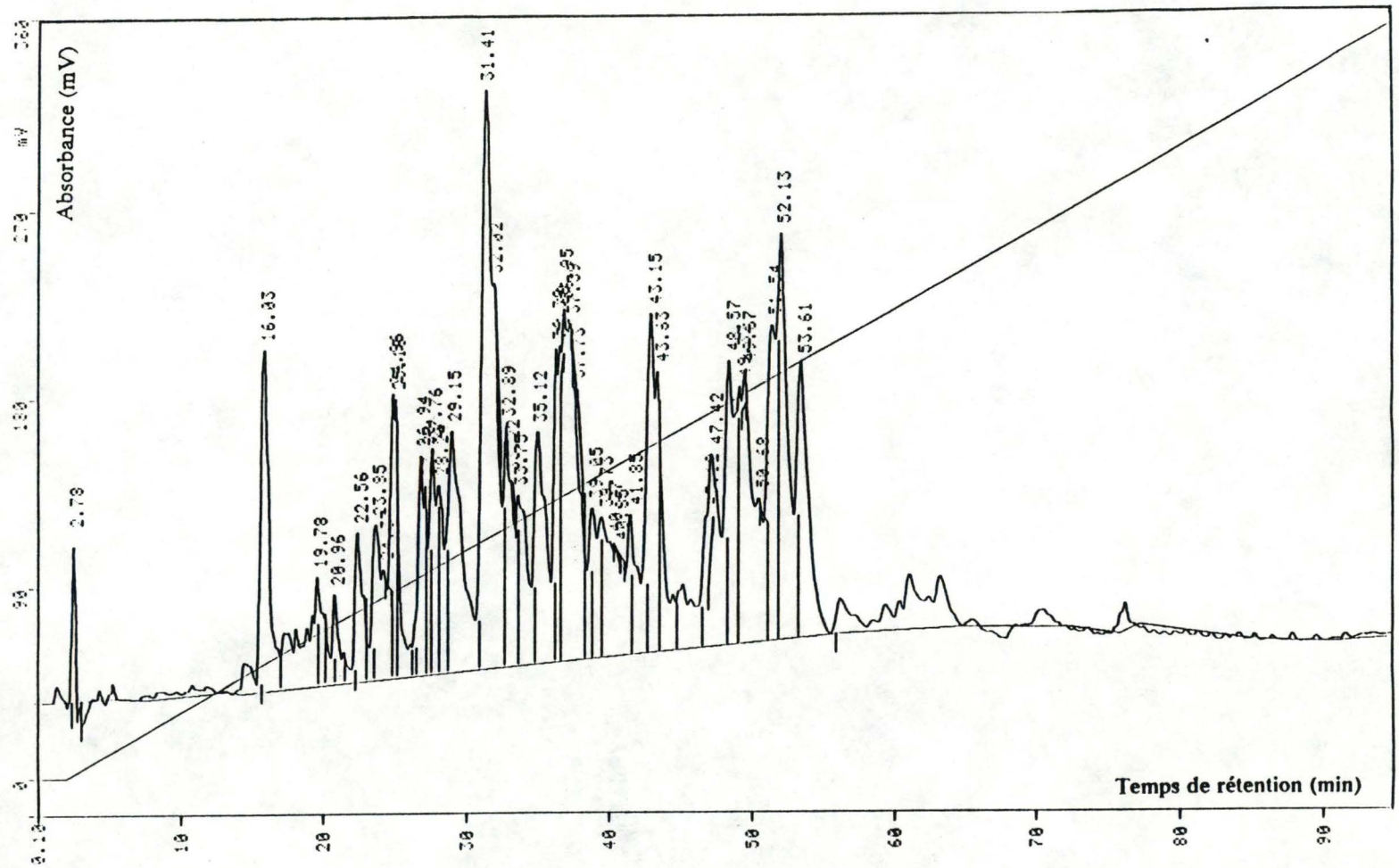


fig.37 : Chromatographie HPLC phase inverse C18 après lyse trypsinique durant 24 heures.

Si nous calculons le nombre de pics retenus par l'ordinateur (c'est-à-dire ayant une surface d'intégration supérieure à 0,5 % de la surface totale) nous obtenons 27 pics (pour 8 heures de lyse) et 29 pics (pour 24 heures de lyse). Ceci semble être un argument en faveur des prédictions réalisées ci-dessus.

b) Comparaison des chrommatogrammes obtenus après 8 heures et 24 heures de lyse à la chymotrypsine. (Fig. 38 et 39)

Les mêmes remarques que celles concernant la trypsine peuvent être faites : la lyse de 24 heures est plus efficace que celle de 8 heures et le nombre de peptides prévus correspond plus ou moins au nombre de pics donné par l'intégrateur du chromatogramme.

c) Conclusion générale.

La lyse peptidique a bien eu lieu et semble suivre le principe de haute spécificité proposé par Lehninger (1977).

3.6.4. Analyse des résultats par chromatographie HPLC en tamis moléculaire.

La lyse trypsinique et chymotrypsinique va servir à réaliser deux sortes de dosage. En effet, dans l'introduction théorique, nous avons présenté l'exemple du CuDIPS, composé organique complexant les ions Cu^{++} et possédant une activité SOD et l'exemple de l'ebselène, composé organique liant de façon covalente un atome Se, ce qui produit une activité GPX.

Nous avons voulu vérifier, d'une part, si l'addition du Zn ionique aux divers peptides ne créait pas une activité ADH et, d'autre part,si le peptide lié de façon covalente au Zn catalytique possédaient encore une activité intrinsèque.

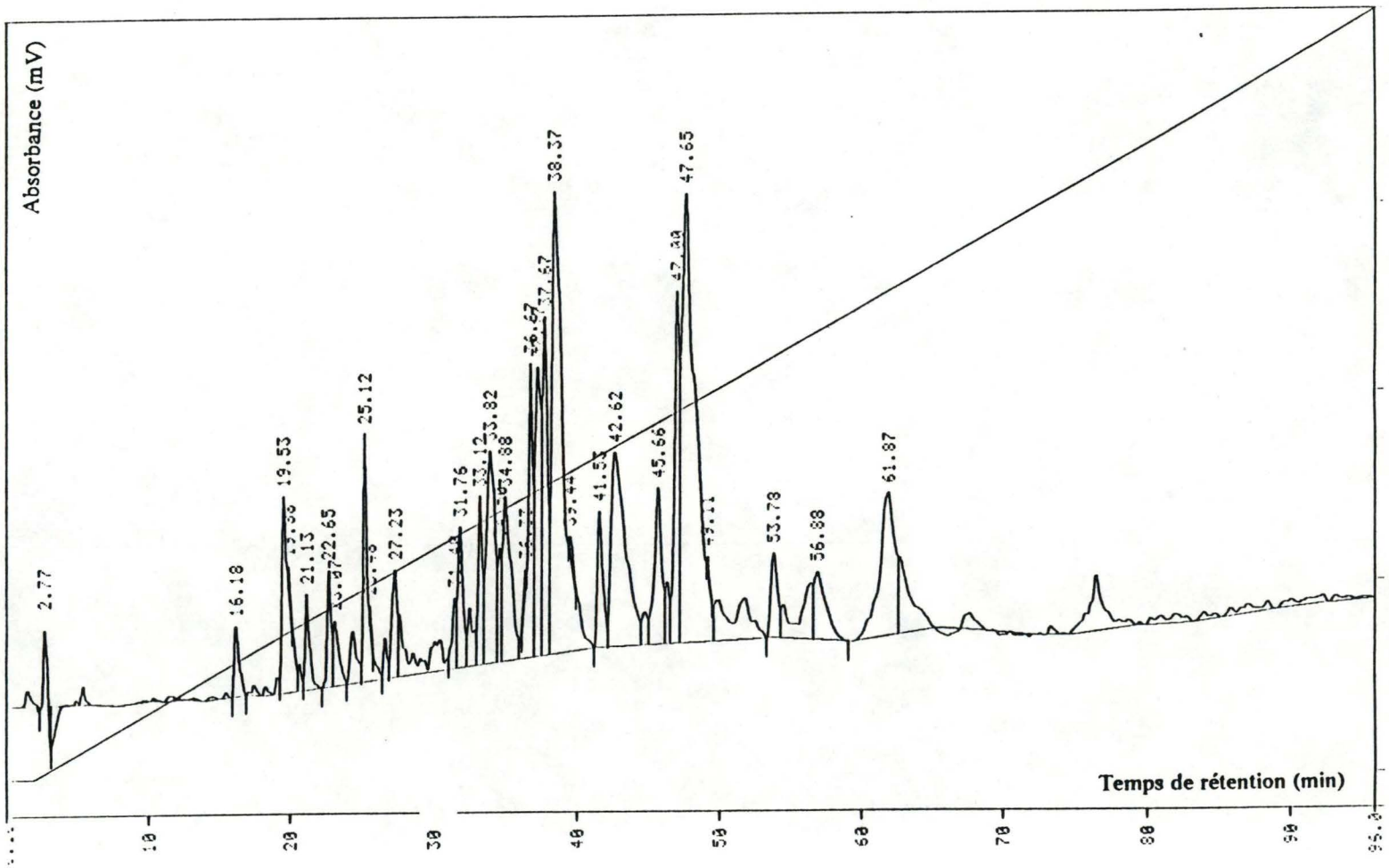


fig.38 : Chromatographie HPLC phase inverse C18 après lyse chymotrypsinique durant 8 heures.

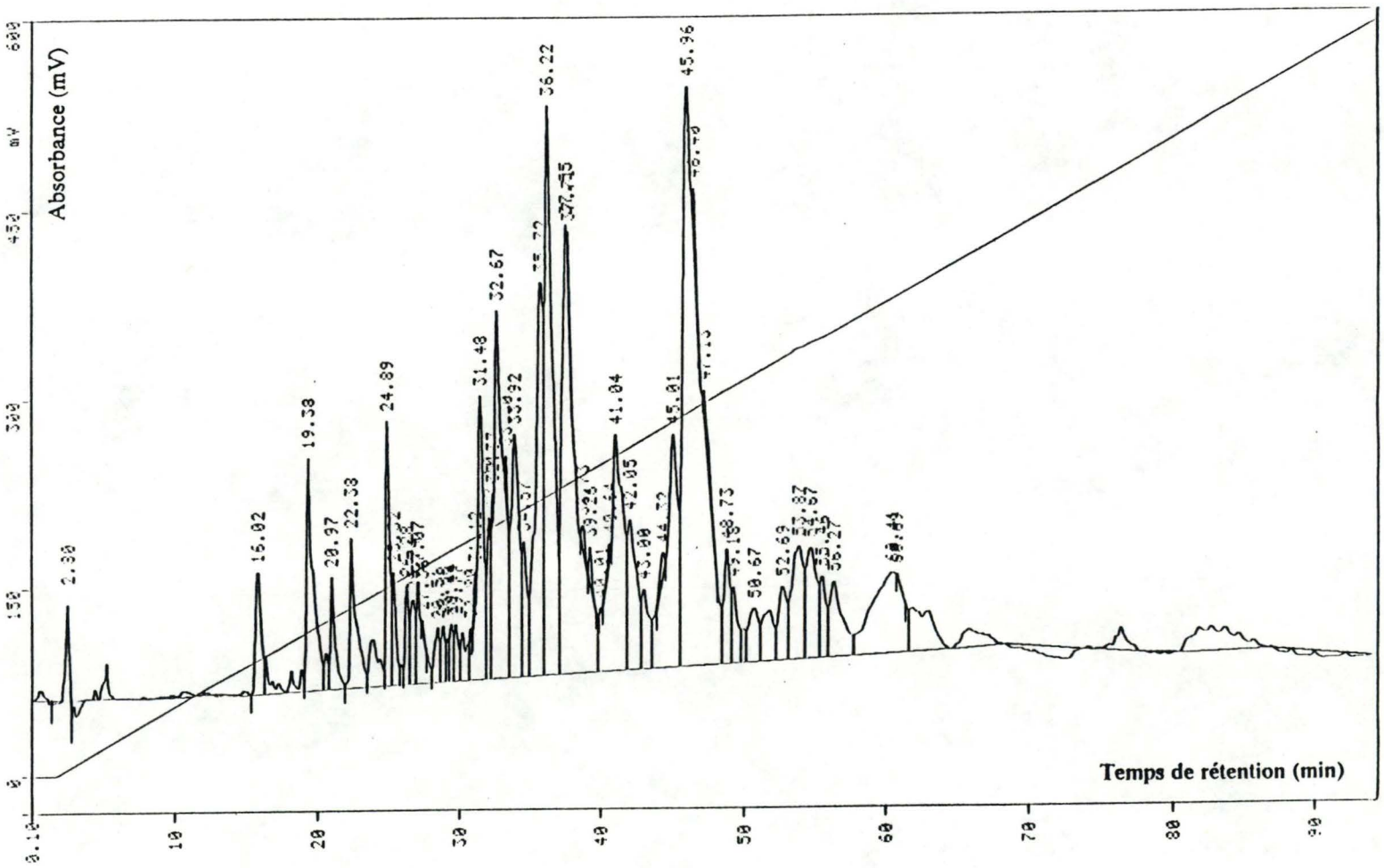


fig.39 : Chromatographie HPLC phase inverse C18 après lyse chymotrypsinique durant 24 heures.

Pour cela, nous avons réalisé deux séries d'expériences; après la séparation des peptides, nous avons ajouté du Zn ionique dans la première série de tubes. Dans la deuxième série de tubes, nous n'avons pas ajouté de Zn ionique. Ainsi, nous avons pu doser le Zn provenant de l'enzyme au niveau des peptides lysés. Les résultats sont présentés ci-dessous en correspondance avec un chromatogramme HPLC tamis moléculaire (superose 12).

a) Lyse à la trypsine (24 heures)

1. Chromatogramme de l'HPLC (Fig. 40).
- Nous constatons la présence d'un contaminant s'éluant dans le volume mort de la Superose 12 et non digéré par la trypsine.
- L'ADH s'éluant à la 24ème minute a complètement disparu, ce qui prouve une lyse efficace.
- Nous voyons trois pics correspondant aux peptides digérés.

2. Dosage d'une activité alcool déshydrogénase (Sans zinc).(Fig. 41)
Nous constatons une activité ADH imporante entre le 34ème et 40ème tube avec un maximum au 36ème tube.

3. Dosage d'une activité alcool déshydrogénase (avec zinc).(Fig. 42).
Nous constatons une similitude au niveau de l'activité ADH obtenue sans Zn.
En effet, il n'y a qu'un pic qui se situe entre le 34ème et le 40ème tube avec un maximim aux environs au 36ème tube. Il faut remarquer cependant que l'activité est fortement diminuée.

4. Dosage du zinc.(Fig. 41).
Plusieurs pics de Zn sont observés sur le chromatogramme. Le premier pic correspond au 24ème tube. Il s'agit de l'emplacement de l'ADH native non digérée ou faiblement digérée, mais totalement inactivée, puisque nous ne retrouvons pas d'activité à 340 nm.

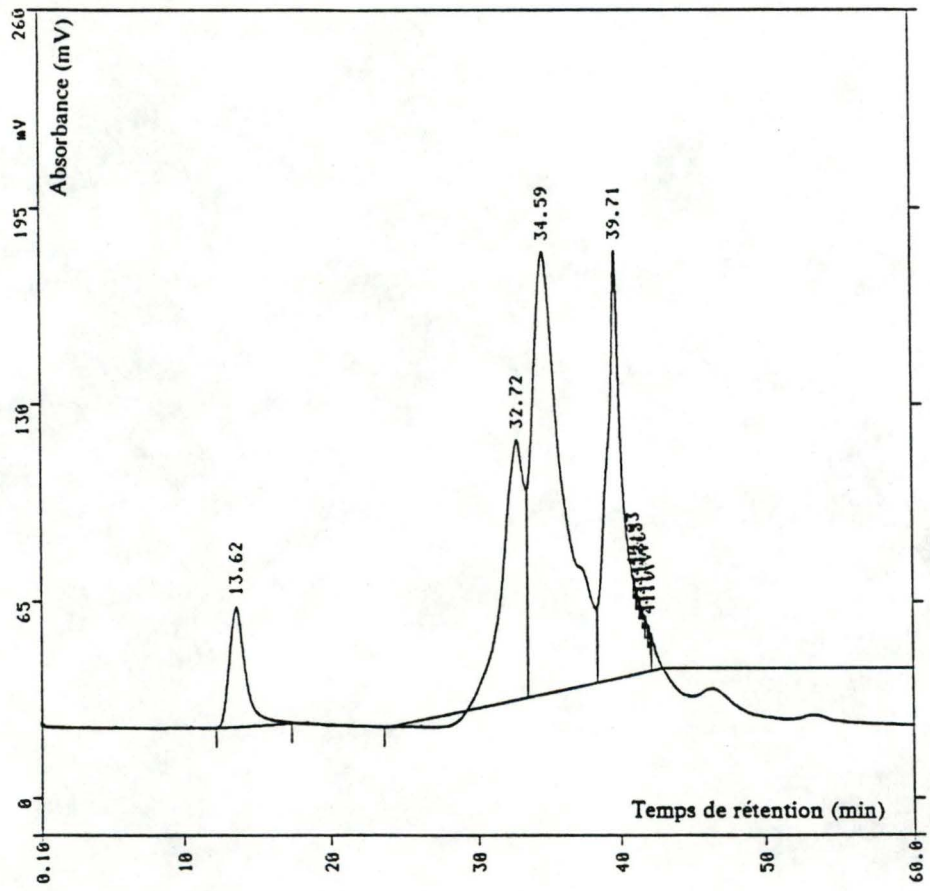


fig.40 : Chromatographie HPLC sur tamis moléculaire après lyse trypsinique durant 24 heures.

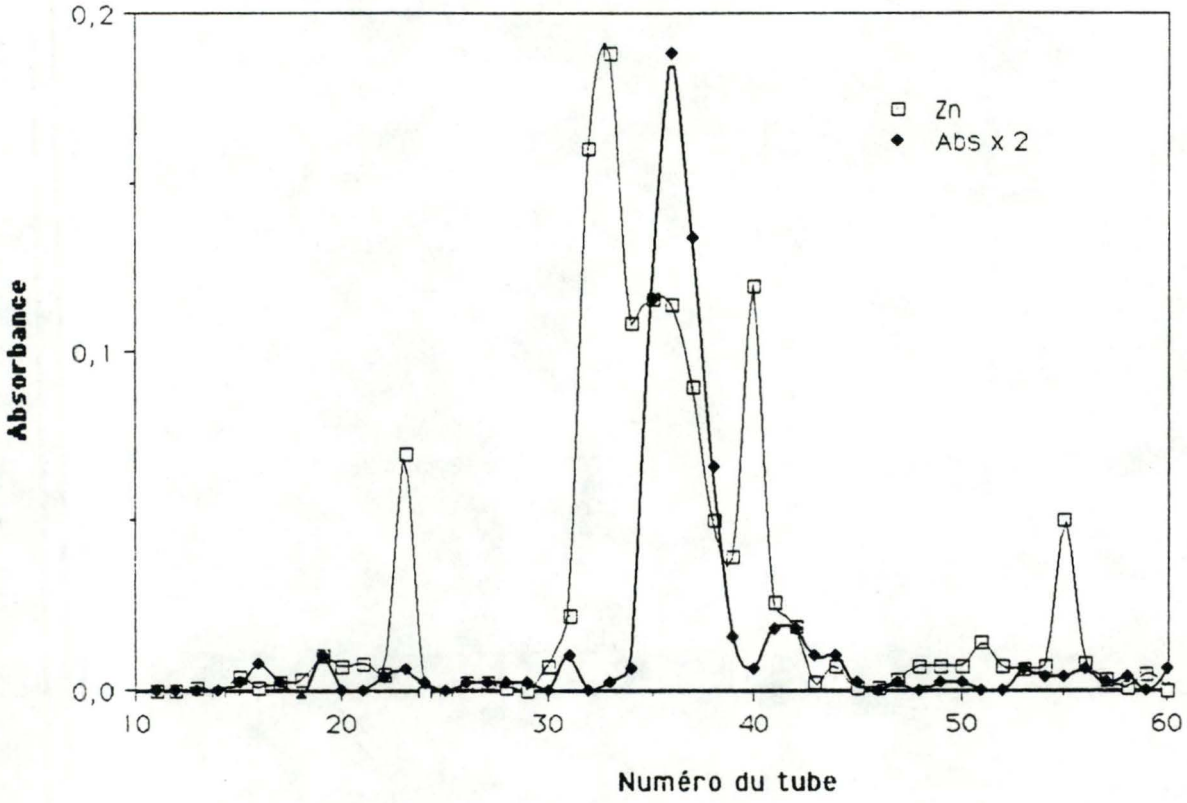


fig.41 : Expérience réalisée sans zinc ionique : superposition de la variation d'absorbance à 340nm (valeurs doublées) et de l'absorbance du zinc, après séparation du lysat trypsinique (24h) sur tamis moléculaire sépharose 12.

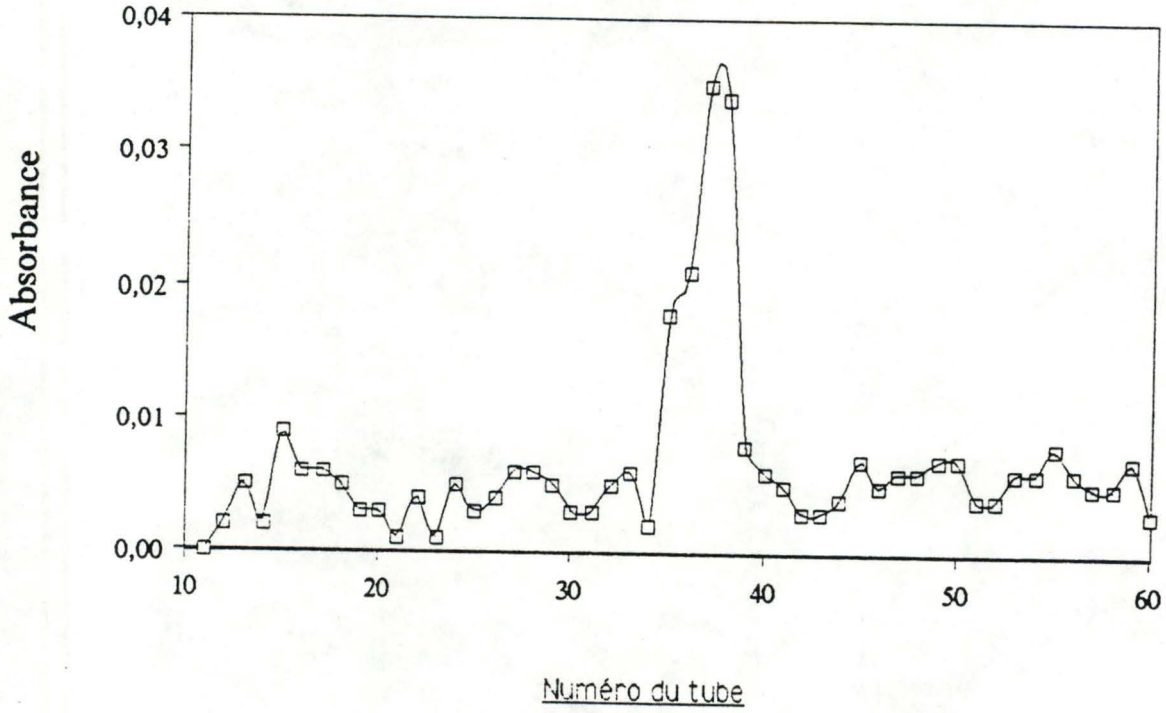


fig.42 : Dosage de l'activité du peptide (variation d'absorbance à 340nm). Cette expérience est réalisée avec du zinc ionique dans la solution de dosage (cette concentration extérieure en zinc empêche de détecter le zinc intrinsèque de l'ADH).

Ensuite, nous observons un pic principal au 33ème tube, épaulé d'un large pic ayant son maximum au 36ème tube. Au 41ème tube se situe un fin pic. Enfin, il y a un petit pic au 55ème tube. Il passe dans le volume total de la colonne. C'est donc du zinc non lié probablement libéré lors de la lyse.

Conclusion.

- La majorité du zinc est fixé aux peptides puisque la quantité de zinc passant dans le volume total de la colonne est faible.
- On trouve une activité catalytique dans les fractions dont l'optimum du pic (tube 36) correspond à l'optimum d'un pic de zinc.
- On ne constate pas de différence entre la localisation avec et sans le Zn sinon une diminution importante de l'activité.

b) Lyse à la chymotrypsine (8 heures).

1. Chromatogramme en HPLC.(Fig. 43)
Après 8 heures de lyse par la chymotrypsine, cinq pics de peptides sont détectés sur le tamis moléculaire. Le premier pic s'élue à 31,04 min. Le pic ADH a complètement disparu. L'ADH est donc lysée.

2. Activité ADH (sans zinc).(Fig. 44).
L'activité est très élevée entre le 21ème et le 29ème tube. Il est le résultat de l'existence de traces d'ADH non lysée. Ensuite, nous constatons la présence d'un pic adossé partiellemnt au grand pic et ayant son optimum d'activité au 29ème tube. Finalement, nous retrouvons une activité ADH entre le 34ème et le 40éme tube. Une activité au niveau de ces tubes avait déjà été détectée dans l'expérience précédente.

3. Activité ADH (avec zinc).(Fig. 45).
Les mêmes remarques que ci-dessus peuvent être faites.

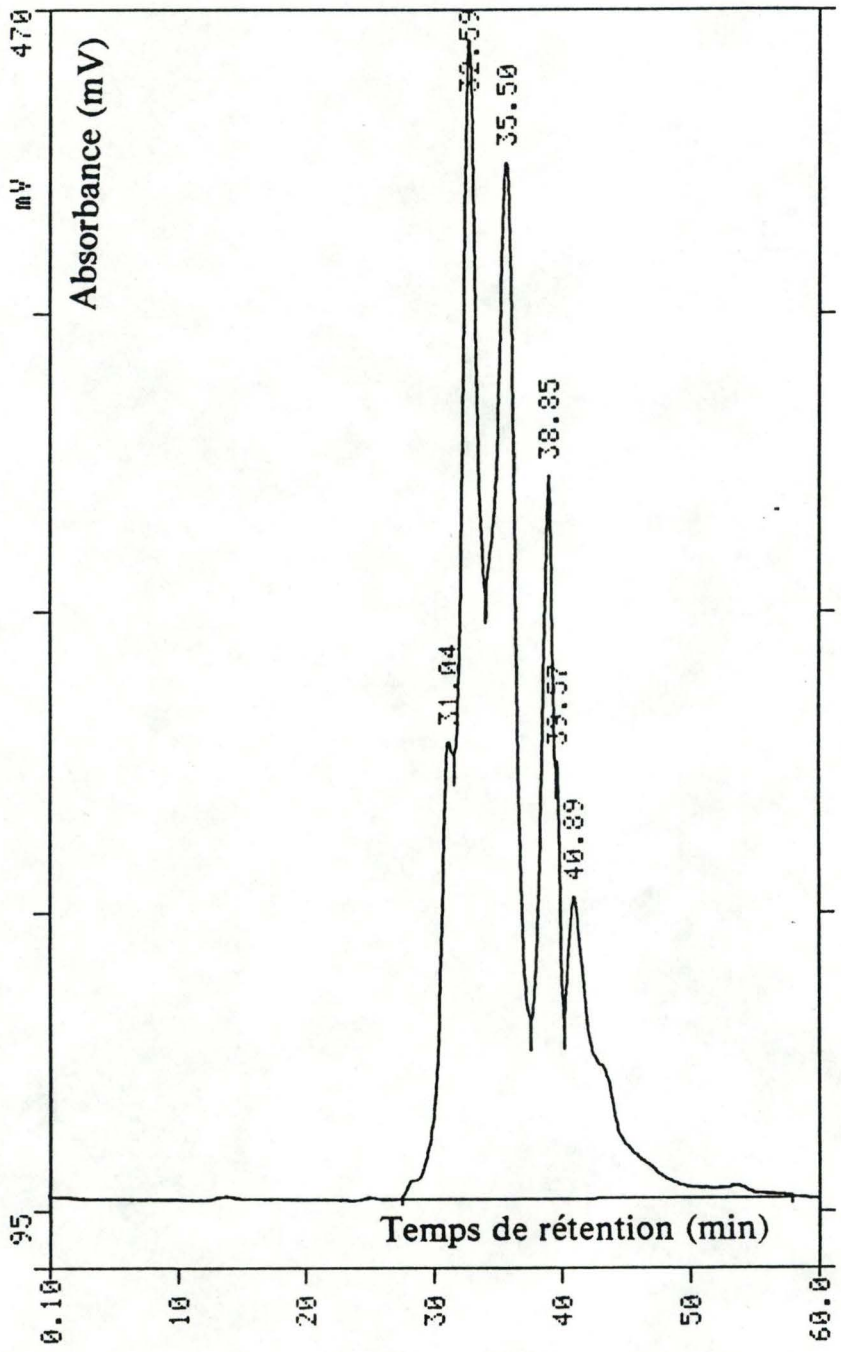


fig.43 : Chromatographie HPLC sur tamis moléculaire après lyse chymotrypsinique durant 8 heures.

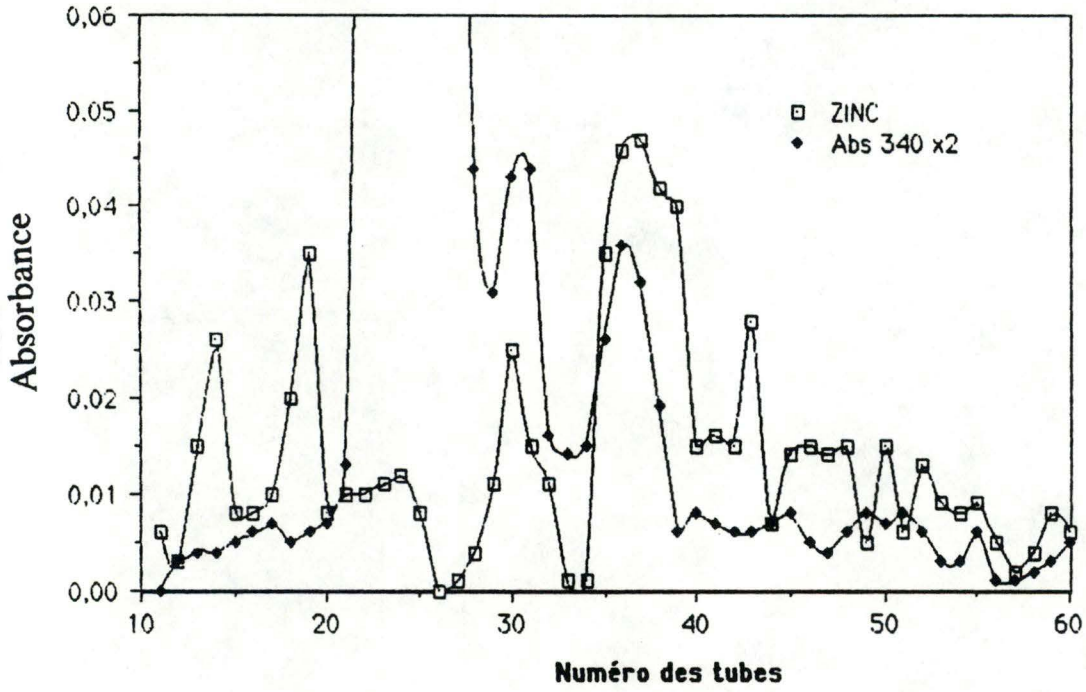


fig.44 : Expérience réalisée sans zinc ionique : superposition de la variation d'absorbance à 340nm (valeurs doublées) et de l'absorbance du zinc, apres.séparation du lysat chymotrypsinique.(24h).sur tamis moléculaire sépharose 12.

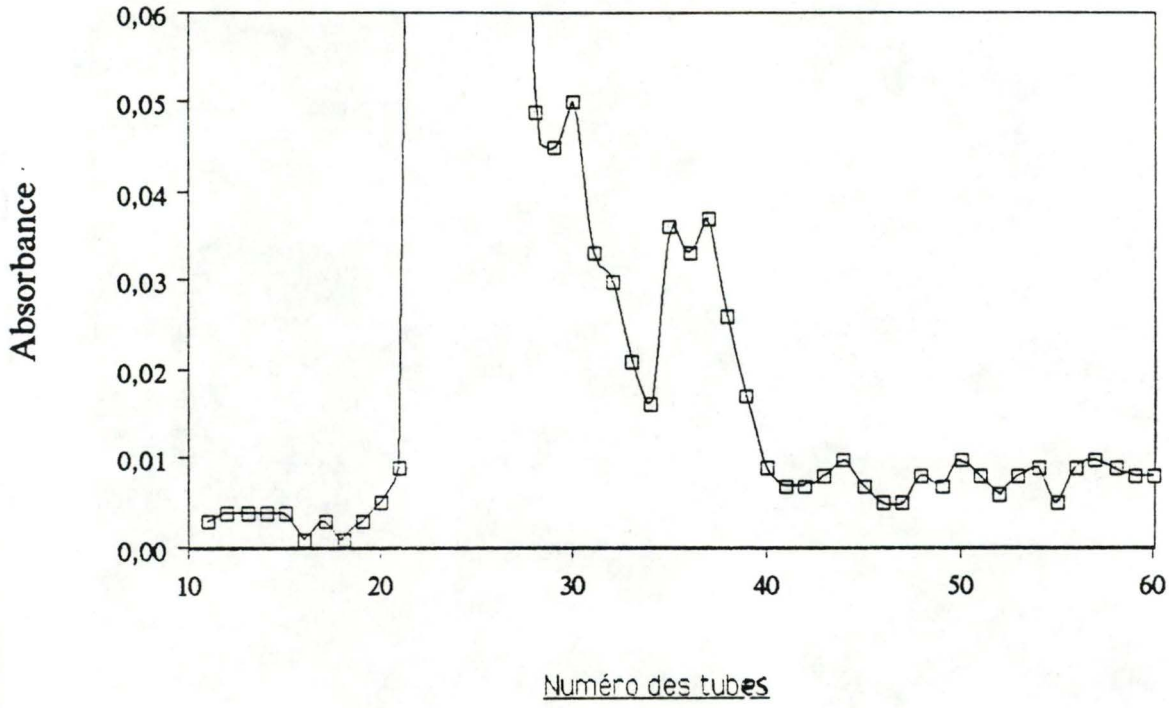


fig.45 : Expérience réalisée avec du zinc ionique. Dosage de l'activité du peptide à 340nm

4. Dosage du zinc. (Fig. 44).

Nous constatons la présence de nombreux petits pics de zinc et d'un grand pic correspondant au 15ème tube. Ce pic est probablement un agglomérat d'ADH précipité qui passe au niveau du volume mort. Le pic suivant pourrait être l'attaque enzymatique de cet agglomérat, ce qui diminuerait sa masse moléculaire et augmenterait son temps d'élution. Nous constatons que à l'activité ADH correspond une faible quantité de zinc. Il y a retour de la quantité de Zn à la ligne de base correspondant à la fin du pic ayant une activité ADH. Nous trouvons un pic zinc au 30ème tube et un petit pic d'activité associé. Ensuite, nous trouvons un autre pic zinc, important et centré entre le 35ème et le 40ème tube. A ce pic correspond une activité ADH. Nous avons encore par la suite quelques petits pics.

Conclusions.

Avec la chymotrypsine appliquée durant 8 heures, nous constatons que la lyse n'est pas complète, il reste encore de l'ADH,... Cependant, on peut déceler la présence d'un pic et peut-être de deux pics d'activité ADH ne correspondant pas à l'enzyme. Nous constatons une similitude étroite entre les deux graphes d'activité (avec ou sans zinc).

c) Lyse à la chymotrypsine (24 heures).

1. Chromatogramme en HPLC. (Fig. 46).

Le chromatogramme en tamis moléculaire provenant de lyse de l'ADH par la chymotrypsine pendant 24 heures montre six pics importants.

Nous constatons que le premier pic s'élue à 32,64 minutes, avec le dernier pic à 43,02 minutes.

Si nous comparons avec la lyse à la chymotrypsine pendant 8 heures, on observe un déplacement des pics vers la droite. Ceci est logique puisque la lyse est plus longue.

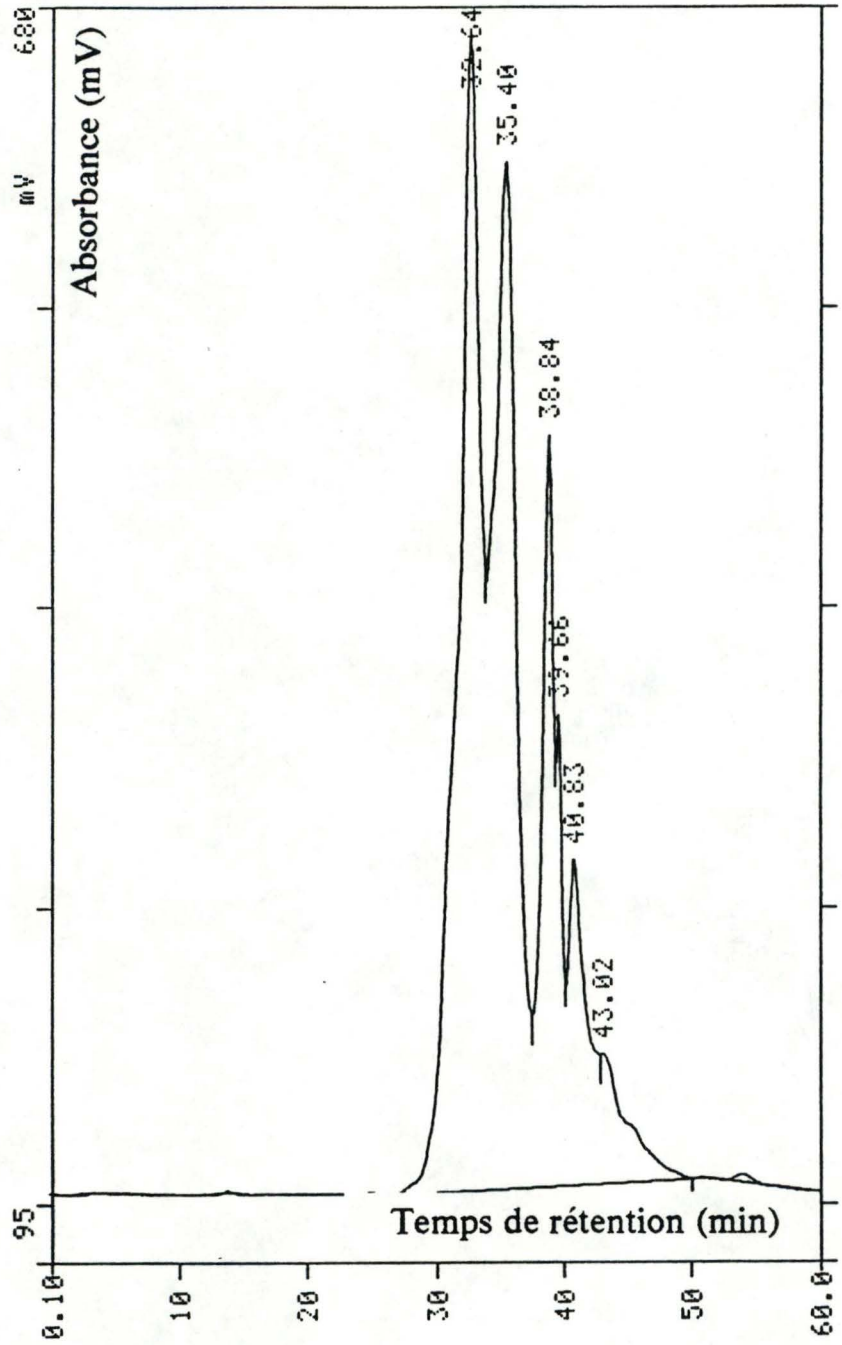


fig.46 : Chromatographie HPLC sur tamis moléculaire après lyse chymotrypsinique durant 24 heures.

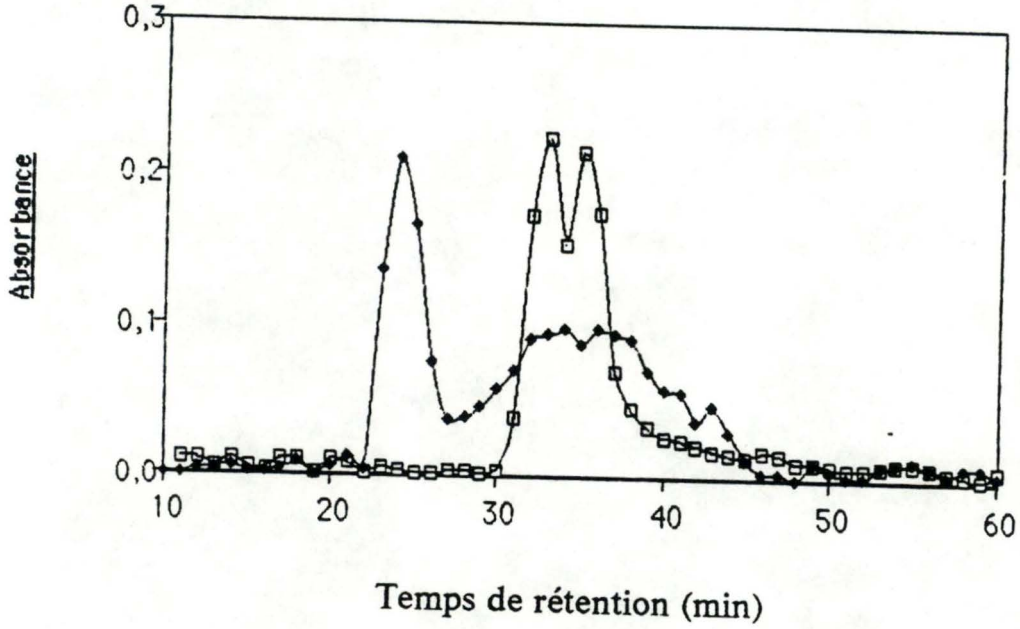


fig.47 : Expérience réalisée sans zinc ionique. Mesure de l'activité ADH peptidique et de l'absorbance du zinc intrinsèque de l'enzyme (échelle double).

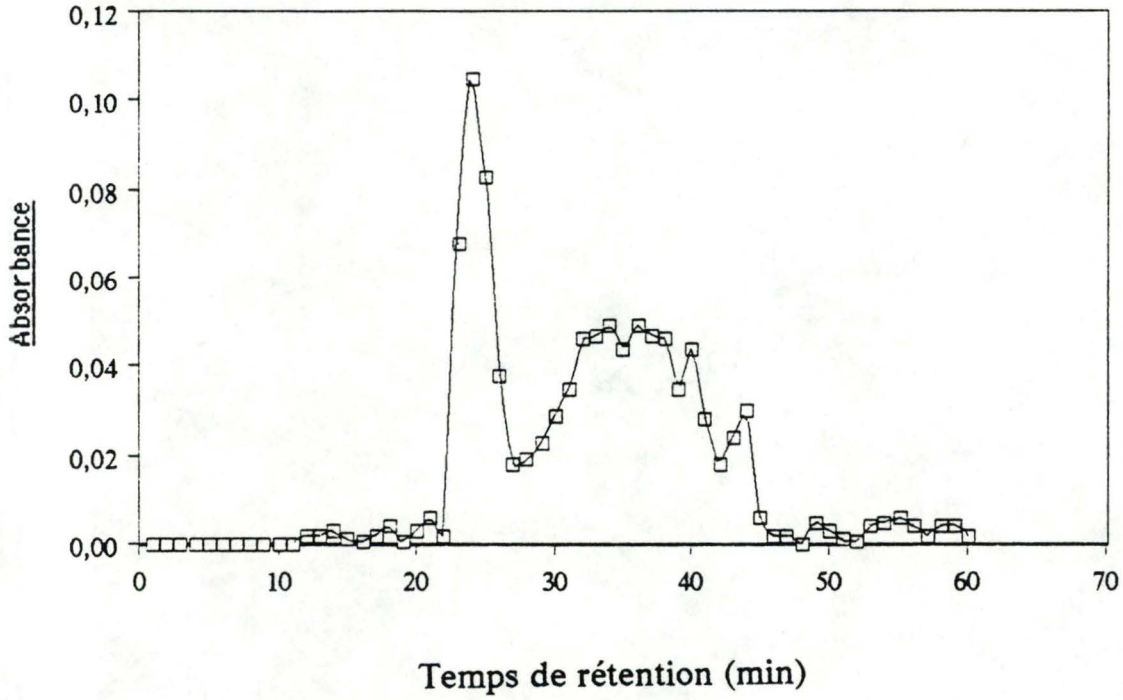


fig.48 : Expérience réalisée avec du zinc ionique. Dosage de l'activité du peptide à 340nm

Si nous superposons le graphe d'activité avec le chromatogramme, nous pouvons estimer que le peptide s'élue à 35,40 minutes.

2. Dosage du zinc. (Fig. 47).
Nous constatons la présence d'un "double pic" commençant au 30ème tube et finissant au 40ème tube.

3. Activité ADH (sans zinc) (Fig. 47).
L'activité se retrouve au 24ème tube, ainsi qu'au niveau des tubes 30 à 40. Pour le tube 24, il s'agit de traces d'ADH non lysée, entre les tubes 30 à 40, nous trouvons le peptide catalytique. Cette activité se trouve au même endroit que le pic zinc.

4. Activité ADH (avec zinc). (Fig. 48).
Nous ne remarquons pas de différence de localisation avec l'activité obtenue sans ajouter de zinc excepté au niveau de l'importance de l'activité.

Conclusion.
Dans ce cas-ci, la majorité du zinc est également liée aux peptides. En effet, l'activité catalytique se situe entre les tubes 30 et 40 dans lesquels on trouve également le Zn provenant de l'enzyme. On ne constate aucune différence entre les graphes d'activité à 340 nm, que ce soit avec ou sans zinc.

d) Lyse de l'albumine bovine sérique (SAB). (Fig. 49);

Nous voulions voir si en utilisant une autre protéine, ne contenant pas de zinc, nous pouvions retrouver une activité catalytique afin de vérifier si nos résultats ne résultent pas d'un artéfact. La SAB a été hydrolysée dans les mêmes conditions que l'ADH et la séparation des peptides a été réalisée sur tamis moléculaire. On constate que la lyse a bien eu lieu puisque on détecte au moins onze pics. La mesure de l'activité ADH est

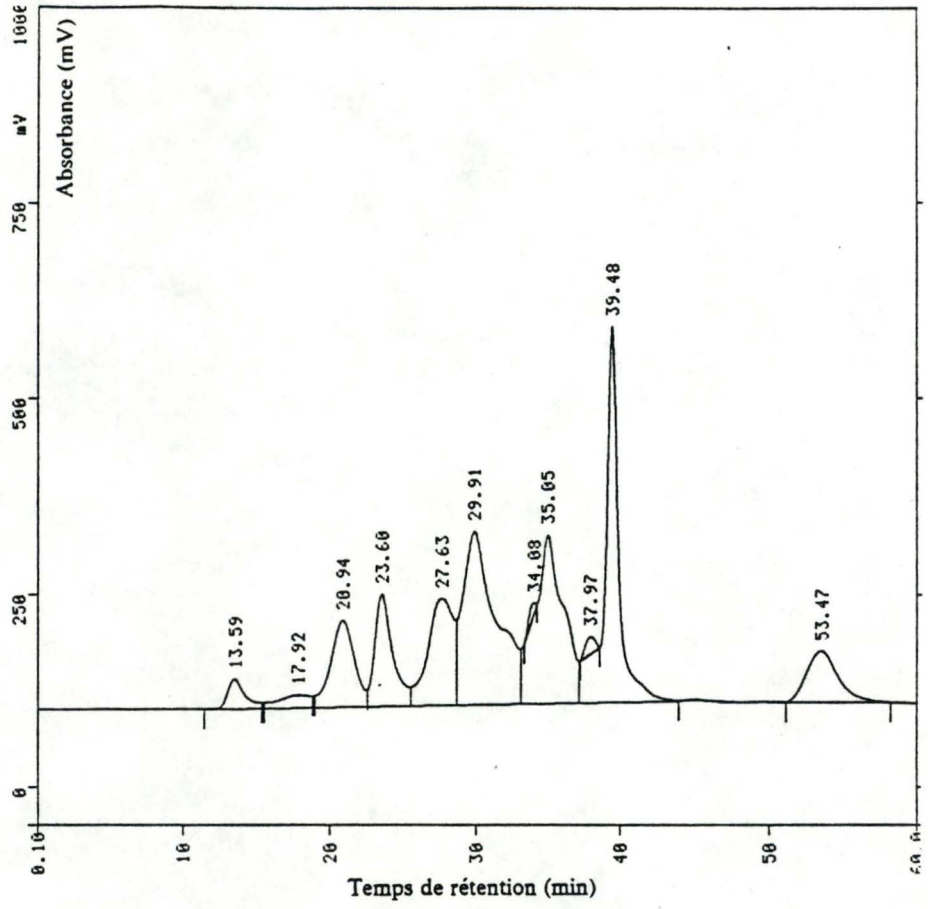


fig. 49 : Chromatographie HPLC sur tamis moléculaire après lyse de la SAB durant 24 heures.

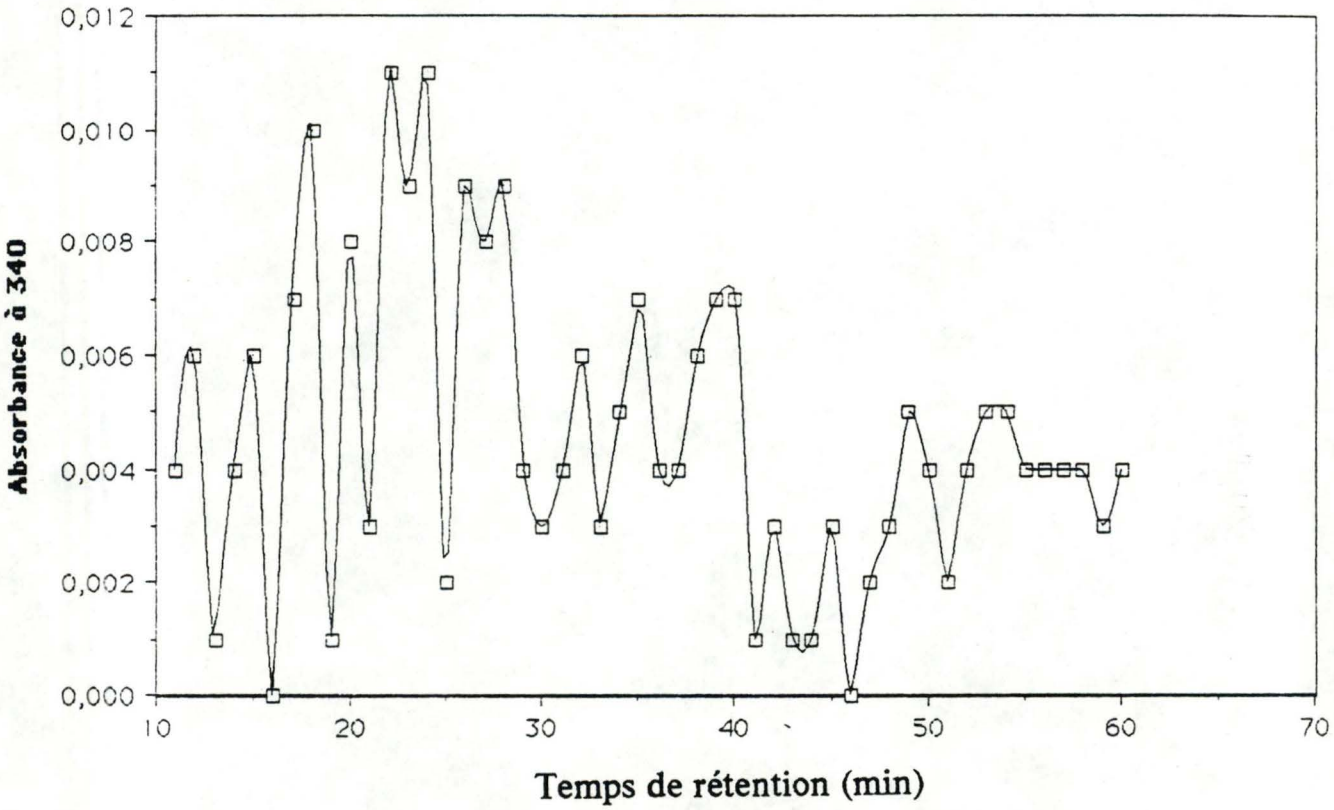


fig.50 : Expérience réalisée avec du zinc ionique. Dosage de l'activité du peptide à 340nm

cependant négative partout avec ou sans Zn. (Fig. 50). Ceci démontre malgré tout une certaine spécificité du peptide que nous avons isolé de l'ADH et l'absence d'action d'un Zn exogène ajouté à des peptides obtenus par hasard.

IV. CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons pu montré une activité alcool déshydrogénase sur un peptide isolé de l'ADH par hydrolyse à la trypsine ou la chymotrypsine. L'activité détectée sur le chromatogramme obtenu en tamis moléculaire correspondait à un des tubes contenant une quantité importante de zinc. On peut donc supposer que ce peptide contenant le zinc de l'enzyme correspond bien à un fragment de l'enzyme ayant une partie des acides aminés du site actif de l'enzyme et que c'est sa composition précise qui permet cette activité déshydrogénase. En effet, aucun des autres peptides ne possède cette activité et aucun des peptides isolés de l'albumine n'a non plus d'activité que ce soit seul ou en présence de Zinc.

Nous avions dans l'introduction de ce chapitre essayer de prévoir quelle pourait être la partie de l'enzyme qui conserverait le zinc lié au site actif. La coupure à la trypsine doit normalement donner un peptide de cent dix acides aminés contenant le zinc et deux acides aminés du site actif (Ser et His) avec en plus plusieurs acides aminés qui lient le substrat. Par contre, la coupure à la chymotrypsine donne un peptide plus petit qui est de 86 acides aminés dans lequel le deuxième zinc a disparu ainsi que plusieurs acides aminés qui lient le substrat. Cette prévision concorde bien avec les résultats puisque dans les deux cas, nous obtenons un peptide avec une activité enzymatique mais qui est environ deux fois plus élevée sur le peptide obtenu avec la trypsine que sur celui obtenu avec la chymotrypsine. De plus, la présence de zinc qui a en général un effet inhibiteur sur l'activité de l'enzyme et du peptide provenant de la trypsine a un effet activateur sur celui de la chymotrypsine. Ce résultat bien qu'encore inexpliqué pourrait être mis en rapport avec la perte du deuxième zinc dans ce peptide. Il est évident de toute manière qu'étant donné la nécessité absolue d'avoir le zinc du site actif pour obtenir une activité enzymatique, on peut supposer que ce zinc joue le rôle fondamental dans le transfert d'électrons de l'alcool vers le NAD^+.

En ce qui concerne les perspectives, l'observation que nous avons faite est intéressante à plusieurs niveaux. D'abord du point de vue fondamental, elle montre que des peptides associés ici à un

métal peuvent avoir des activités enzymatiques même si celles-ci sont faibles. Ceci confirmerait l'hypothèse évolutive des enzymes qui suppose qu'au départ, certains peptides associés ou non à d'autres molécules auraient eu spontanément certaines activités et qu'ils aient pu par la suite être sélectionnés et complexifiés de manière à augmenter leur vitesse de catalyse et leur spécificité.

D'un point de vue plus pratique, la possibilité d'obtenir des catalyseurs petits sans doute beaucoup moins spécifiques que l'enzyme naturel est aussi intéressante. En effet, ce matériel se prête bien à une série d'études et de modifications qui pourraient peut-être conduire à l'avenir à la fabrication de catalyseurs pouvant oxyder de manière donnée les fonctions alcools de diverses molécules organiques. Pour ce faire, il faudra augmenter fortement le vitesse de catalyse. Ceci est possible évidemment en augmentant la température de travail. Cette courbe d'activité en fonction de la température sera particulièrement intéressante puisqu'elle indiquera si oui ou non il existe pour ces peptides un phénomène de "dénaturation" comme pour les enzymes naturels. Si ce n'est pas le cas, l'élévation de température pourra amener des augmentations considérables de la vitesse de la réaction.

Une deuxième recherche s'oriente vers la modification de ce peptide par exemple en lui ajoutant d'autres acides aminés présents dans le site actif ou le site de fixation, et qui ont été éliminés par l'hydrolyse. Evidemment, les chimistes pourraient aussi utiliser ce peptide comme base de greffagfe de groupements pouvant modifier la catalyse de la réaction.

Ainsi donc, la démarche que nous avons entreprise s'est révélée positive mais il faudra encore beaucoup de travail aux chercheurs s'ils veulent pouvoir modifier à façon les propriétés des enzymes que la nature a patiemment façonnés au cours des millénaires.

BIBLIOGRAPHIE

AKESON A., (1964).
On the zinc content of horse liver alcohol dehydrogenase.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 17:211-214.

ANDREU D. et MERRIFIELD R. B., (1985).
N-terminal analogues of cecropin A: Synthesis, antibacterial activity, and conformational properties.
Biochemistry, 24:1683-1688.

BARTLETT G. R., (1959).
Phosphorus assay in column chromatography.
J. Biol. Chem., 234:466-468.

BERGMEYER H. U., (1974).
Methods of enzymatic analysis,
Academic Press, New York.

BILLE V., PLAINCHAMP D. et REMACLE J., (1987a).
Affinity and stability modification of immobilised alcohol dehydrogenase through multipoint copolymerisation.
Biochim. Biophys. Acta, 915:393-398.

BILLE V., (1987b).
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.

BILLE V., PLAICHAMP D., LAVIELLE S., CHASSAING G. et REMACLE J., (1989).
Effect of the microenvironnement on the kinetic properties of immobilized enzymes.
Eur. J. Biochem., 180:41-47.

BRÄNDEN C.-I., JÖRNVALL H., EKLUND H., et FURUGREN B., (1975).
Alcohol dehydrogenases.
in The Enzymes, BOYER et al., eds., Academic Press, New York, Vol. 11, Chap. 3 : 103-190.

BRESLOW R., (1982).
Artificiel enzymes.
Science, 218:532-537.

CHAKRAVARTY P. K., MATHUR K. B., et DHAR M. M., (1972).
The synthesis of a decapeptide with glycosidase activity.
Experientia, 29:786-788.

CLELAND W. W., (1970).
Steady-state kinetics.
in The Enzymes, BOYER et al., Academic Press, New-York, Vol.2, Chap.1:1-63.

COTGREAVE I. A., DUDDY S. K., KASS G. E. N., THOMPSON D. et MOLDEUS P.,(1989).
Studies on the anti-inflammatory activity of ebselen.
Biochem. Pharmacol., 38:649-656.

CRAM D. J., (1983).
Cavitands: organic hosts with enforced cavities.
Science, 219:1177-1183.

CZEISLER J. L. et HOLLIS D. P., (1973).
NMR studies of alcohol dehydrogenases. Binding of inhibitors to the yeast and liver enzymes.
Biochemistry, 12:1683-1689.

DARR D. J., YANNI S. et PINNELL S., (1988).
Protection of chinese hamster ovary cells from paraquat-mediated cytotoxicity by a low molecular weight mimic of superoxyde dismutase (DF-Mn).
Free Rad. Biol. Med., 4:357-363.

DELFORGE D., (1988).
Caractérisation de l'alanine déshydrogénase avant et après son activation au SPDP dans une perspective d'immobilisation par liens peptidiques.
Mémoire de licence en Sciences Biologiques, FUNDP, Namur.

DICKINSON F. M., (1970).
The binding of dihydronicotinamide-adenine dinucleotide and pyridine-3-aldehyde-adenine dinucleotide by yeast alcohol dehydrogenase.
Biochem. J., 120:821-830.

DICKINSON F. M. et MONGER G. P., (1973).
A study of the kinetics and mechanism of yeast alcohol dehydrogenase with a variety of substrates.
Biochem. J., 131:261-270.

DRUM D. E., HARRISON J. H., LI T. K., BETHUNE J. L. et VALLEE B. L., (1967).
Structural and functional zinc in horse liver alcohol dehydrogenase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57:1434-1440.

DRUM D. E., LI T. K. et VALLEE B. L., (1969a).
Considerations in evaluating the zinc content of horse liver alcohol dehydrogenase preparations.
Biochemistry, 8:3783-3791

DRUM D. E., LI T. K. et VALLEE B. L., (1969b).
Zinc isotope exchange in horse liver alcohol dehydrogenase.
Biochemistry, 8:3792-3797.

DRUM D. E. et VALLEE B. L., (1970).
Differential chemical reactivities of zinc in horse liver alcohol dehydrogenase.
Biochemistry, 9:4078.

DUNN M. F. et HUTCHINSON J. S., (1973).
Roles of zinc ion and reduced coenzyme in the formation of a transient chemical intermediate during the equine liver alcohol dehydrogenase-catalysed reaction of an aromatic aldehyde.
Biochemistry, 12:4882-4892.

EKLUND H., NORDSTRÖM B., ZEPPEZAUER E., SÖDERLUND G., OHLSSON I., BOIWE T. et BRÄNDEN C.-I., (1974).
The structure of horse liver alcohol dehydrogenase.
FEBS Letters, 44:200-204.

FISKE C. H. et SUBBAROW Y., (1925).
The colorimétric determination of phosphorus.
J. Biol. Chem., 66:375-400.

GREEN R. W. et Mc KAY R. H., (1969).
The bihavior of horse liver alcohol dehydrogenase in guanidine hydrochloride solutions.
J. Biol. Chem., 244:5034-5043.

HOLBROOK J., LILJAS A., STEINDEL S. J. et ROSSMANN M. G., (1975).
Lactate dehydrogenase.
in The Enzymes, BOYER et al., eds., Academic Press, New York, Vol. 11, Chap. 4 :191-292.

HOLLAND M. M., LEIB T. K., et GERLT J. A., (1988).
Isolation and characerization of a small catalytic domain released from the adenylate cyclase from *Escherichia coli* by digestion with trypsin.
J. Biol. Chem., 263:14661-14668.

HOSSEINI M. W., (1989).
La catalyse supramoléculaire.
La Recherche, 20:24-32.

JÖRNVALL H., (1977).
Differences between alcohol dehydrogenases. Structural properties and evolutionary aspects.
Eur. J. Biochem., 72:443-452.

JÖRNVALL H., EKLUND H. et BRÄNDEN C.-I., (1978).
Subunit conformation of yeast alcohol dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 253:8414-8419.

KELLOGG R. M., (1984).
Les enzymes artificielles,
La recherche, 156:819-829.

LABOUZE E., (1988).
Le remodelage des protéines.
Biofutur,n°74:29-32.

LANGE L. G., RIORDAN J. F. et VALLEE B. L., (1974).
Functional arginyl residues as NADH binding sites of alcohol dehydrogenases.
Biochemistry, 13:4361-4370.

LEHN J. M., (1988)
Supramolecular chemistry - Scope and perspectives. Molecules, supermolecules and molecular devices.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 27: 89-112.

LEHNINGER A. L., (1977).
Principes de biochimie.
Flammarion, Paris, p.121.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., (1951).
Protein measurement with Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193:265-275.

LUTSTORF U. et MEGNET R., (1968).
Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae.* 1. Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-4.
Arch. Biochem. Biophys., 126:933-944.

MACKENZIE K. F., EDDY C. K. et INGRAM L. O., (1989).
Modulation of alcohol dehydrogenase isoenzyme levels in Zymomonas mobilis by iron and zinc.
J. Bacteriol.,171:1063-1067.

MAIORINO M., ROVERI A., COASSIN M. et URSINI F., (1988).
Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxydase activity of ebselen (PZ51).
Biochem. Pharmacol., 37:2267-2270.

MANT C. T., TORNE BURKE T. W.et HODGES R. S., (1987).
Optimization of peptide separation in reversed phase HPLC.
Chromatographia, 24:565-572.

MICHIELS C. et REMACLE J., (1988).
Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to calculate their physiological importance.
Eur. J. Biochem., 177:435-443.

MILDVAN A. S. et WEINER H., (1969).
Interaction of a spin-labeled analogue of nicotinamide adenine dinucleotide with alcohol dehydrogenase.
J. Biol. Chem., 244:2465-2475.

MILDVAN A. S., (1970).
Oxidation reduction reactions involving metals.
in The Enzymes, BOYER et al., eds., Academic Press, New-York, Vol.2, Chap.9:525-528.

MUTTER M., (1988).
Nature's rules and chemist's tools: a way for creating novel proteins.
TIBS, 13:260-265.

NAITHANI V. K. et DHAR M. M., (1967).
Synthetic substitute lysozymes.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 29:368-372.

PIGEOLET E., CORBISIER P., HOUBION A., LAMBERT D.,
MICHIELS C., RAES M., ZACHARY M.-D. et REMACLE J., (1989).
Glutathion peroxydase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals.
Mech. Ageing Dev., sous presse.

POPJAK G., (1970).
Stereospecificity of enzymes reactions.
in The Enzymes, BOYER et al., Acad. Press., New York, Vol. 2, p. 115-215.

RACKER E., (1955).
Alcohol dehydrogenase from baker's yeast.
in Methods in enzymology, COLOWICK S. P. et KAPLAN N. O., eds., Academic Press, New York, Vol. 1 :500-503.

SAMUNI A., KRISCHNA C. M., RIESZ P., FINKELSTEIN E. et RUSSO A., (1988).
A novel metal-free low molecular weight superoxyde dismutase mimic.
J. Biol. Chem., 263:17921-17924.

SCHIMPFESSEL L., (1968).
Présence et régulation de la synthèse de deux alcool deshydrogénases chez la levure *Saccharomyces cerevisiae.*
Biochim. Biophys. Acta, 151:317-329.

SCHIMPFESSEL L., SUGAR J., et CROKAERT R., (1969).
Multiplicité et régulation des déhydrogénases alcooliques chez *Saccharomyces cerevisiae.*
Arch. Int. Physiol. Bioch., 77:556-557.

SEKHAR V. S. et PLAPP B. V., (1988).
Mechanism of binding of horse liver alcohol dehydrogenase and nicotinamide adenine dinucleotide.
Biochemistry, 27:5082-5088.

SKERKER P. S. et DOUGLAS S. C., (1989).
Thermostability of alcohol dehydrogenase: evidence for distinct subunits with different deactivation properties.
Biotechnol. Bioengin., 33:62-71.

SLOAN D.L. et MILDVAN A. S., (1974).
in Alcohol and aldehyde metabolizing system, THURMAN R. G. et al., Eds., Academic Press, New York, p. 69.

SRIVASTAVA S., MATHUR K. B., et DAHR M. M., (1969).
Synthetic substitute enzymes: Part III Glutamic acid copolymers with lysozyme-like activity.
Experientia, 26:11-12.

SUGAR J., SCHIMPFESSEL L., ROZEN E., et CROKAERT R., (1970).
The mitochondrial alcohol dehydrogenase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae.*
Arch. Int. Physiol. Bioch., 78:1009-1010.

SUGAR J., SCHIMPFESSEL L., ROZEN E. et CROKAERT R., (1971).
Electrophoretic study of the multiple molecular forms of yeast alcohol dehydrogenase.
Arch. Int. Physiol. Bioch., 4:849-850.

SUND H. et THEORELL H., (1963).
Alcohol dehydrogenases.
in The Enzymes, BOYER et al., eds., Academic Press, New York, Vol. 7, Chap.2 :25-83.

TABUSHI I., (1982).
Cyclodextrin catalysis as a model for enzyme action.
Acc. Chem. Res., 15:66-72.

TANIGUCHI S., THEORELL H. et AKESON A., (1967).
Dissociation constants of the binary complex of homogeneous horse liver alcohol dehydrogenase and nicotinamide adenine dinucleotide.
Acta Chem. Scand., 21:1903-1920.

VANDERHEIDEN B. S., MEINHART J. O., DODSON R. G. et KREBS E. G., (1962).
The preparation and properties of crystalline yeast aldolase.
J. Biol. Chem., 237:2095-2098.

WEINER H., (1968).
A polarization of fluorescence study of alcohol dehydrogenase and its binary and ternary complexes.
Arch. Biochem. Biopys., 126:692-699.

WEINER H., (1969).
Interaction of a spin-labeled analog of nicotinamide adenine dinucleotide with alcohol dehydrogenase. I. Synthesis, kinetics, and electron paramagnetic resonance studies.
Biochemistry, 8:526-533.

WEINER H., IWEIBO I. et COLEMAN P.L., (1972).
in "Structure and function of oxydation reduction enzymes", AKESON et EHRENBERG, eds., Pergamon, Oxford, p.619.

WILLS C. et JÖRNVALL H., (1979).
The two major isozymes of yeast alcohol dehydrogenase.
Eur. J. Biochem., 99:323-331.

YONETANI T., (1963).
Studies on liver alcohol dehydrogenases complexes. I. The coenzyme-binding sites and effects of adenosine diphosphate ribose and O-Phenanthroline.
Acta Chem. Scand., 17:S96-S101.

ZEPPEZAUER E., SAMAMA J.-P. et EKLUND H., (1982).
Crystal structure determinations of coenzyme analogue and substrates complexes of liver alcohol dehydrogenase: binding of 1,4,5,6-terahydronicotinamide adenine dinucleotide and *trans*-4-(N,N-dimethylamino)cinnamaldehyde to the enzyme.
Biochemistry, 21:4895-4908.