

# MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR-INGENIEUR EN BIOCHIMIE APPLIQUEE**

par

Denis VIOT



**LA GLUCOSE ISOMERASE DE  
*STREPTOMYCES VIOLACEONIGER***

**I - PARAMÈTRES ENZYMATIQUES  
II - PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES**

Présenté le 22 Juin 1984 à 10 H 30 devant la Commission d'Examen

|               |      |           |
|---------------|------|-----------|
| Président :   | J.   | MONTREUIL |
| Rapporteurs : | S.   | BOUQUELET |
|               | G.   | TIRABY    |
| Examineurs :  | P.J. | SICARD    |
|               | A.   | VERBERT   |

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur S. BOUQUELET dans le laboratoire de Chimie Biologique de l' Université des Sciences et Techniques de LILLE I, laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217 :  
- Relations structure-fonction des constituants membranaires - ( Directeur Professeur J. MONTREUIL ).

L'étude a été conduite sous contrat et en relation avec les laboratoires de la société ROQUETTE Frères -LESTREM (62)- sous la direction de Monsieur P.J. SICARD, Directeur Recherche&Développement.

- REMERCIEMENTS -

Avant d'entamer l'étude systématique des différentes parties de ce mémoire, je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à tous ceux qui, de près ou de loin, par leurs conseils, leur expérience, leur collaboration, m'ont aidé à réaliser cette étude de la glucose isomérase de St. violaceoniger.

# - P L A N -

| GENERALITES                                    | PAGES |
|--|-------|
| A - LES ENZYMES EN INDUSTRIE                   | 2     |
| I PRÉSENTATION                                 |       |
| II MARCHÉ DE LA GLUCOSE ISOMÉRISE              |       |
| <br>   |       |
| B - LE FRUCTOSE                                | 5     |
| I INTÉRÊTS DU FRUCTOSE                         |       |
| II MOYENS DE PRODUCTION DES SIROPS DE FRUCTOSE | 9     |
| III ELÉMENTS DU MARCHÉ DES SIROPS DE FRUCTOSE  | 12    |
| <br>   |       |
| C - LA GLUCOSE ISOMERASE                       |       |
| I DÉFINITION - HISTORIQUE                      | 16    |
| II PRODUCTION DE L'ENZYME                      | 17    |
| III IMMOBILISATIONS DE L'ACTIVITÉ              | 19    |
| IV ÉTUDES DE LA GLUCOSE ISOMÉRISE              |       |
| 4-1 - METHODES D'EXTRACTION                    | 24    |
| 4-2 - METHODES DE PURIFICATION                 | 26    |
| 4-3 - PROPRIETES ENZYMATIQUES                  | 28    |
| 4-4 - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES             | 31    |

# MATERIEL ET METHODES

|      |   |    |
|------|---|----|
| I    | LE MICRO-ORGANISME ET LE MILIEU DE CULTURE    | 40 |
| II   | DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ GLUCOSE ISOMÉRASE |    |
| II   | ESTIMATIONS DE LA QUANTITÉ DE PROTÉINES       | 42 |
| IV   | ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE       |    |
| V    | ISOÉLECTROFOCALISATION                        | 43 |
| VI   | DOSAGE DES FONCTIONS THIOLS                   |    |
| VII  | IMMUNO-ÉLECTROPHORÈSE MONODIMENSIONNELLE      | 44 |
| VIII | COMPOSITION CHIMIQUE EN OSES                  | 45 |
| IX   | THERMOSTABILITÉ ET TEMPÉRATURE OPTIMALE       |    |
| X    | PH OPTIMUM ET STABILITÉ AU PH                 | 46 |
| XI   | CINÉTIQUES ENZYMATIQUES                       |    |
| XII  | EFFETS DE DIFFÉRENTS AGENTS SUR L'ACTIVITÉ    | 47 |
| XIV  | PRÉPARATION DE L'ENZYME                       |    |
|      | 14-1 - EXTRACTION                             |    |
|      | 14-2 - ELIMINATION DES ACIDES NUCLEIQUES      | 48 |
|      | 14-3- TRAITEMENT THERMIQUE                    | 49 |
|      | 14-4- METHODES CHROMATOGRAPHIQUES             |    |

# RESULTATS - DISCUSSION

|   |    |
|---|----|
| A - PURIFICATION DE L'ENZYME                          | 53 |
| I RAPPEL DU SCHÉMA DE PURIFICATION ANTÉRIEUR          |    |
| II ELABORATION DU NOUVEAU PROTOCOLE                   | 55 |
| 2-1 - ETUDE DES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION     |    |
| 2-2 - PURIFICATION DE L'EXTRAIT BRUT                  |    |
| a) élimination des acides nucléiques                  | 59 |
| b) précipitation thermique                            | 61 |
| c) chromatographie sur DEAE Tris Acryl M              |    |
| d) gel filtration                                     |    |
| 2-3 - PURETE DE LA SOLUTION FINALE                    | 63 |
| a) électrophorèse - SDS                               |    |
| b) immunoelectrophorèse                               |    |
| c) chromatographie FPLC                               | 65 |
| 2-4 - UTILISATION DU PROTOCOLE POUR UNE AUTRE SOUCHE  | 67 |
| B - PROPRIETES ENZYMATIQUES                           |    |
| I ACTION DU COBALT ET DU MAGNÉSIUM                    | 72 |
| II OPTIMA D'ACTIVITÉ                                  |    |
| 2-1 - PH OPTIMUM                                      | 72 |
| 2-2 - TEMPERATURE OPTIMALE                            | 74 |
| 2-3 - TRANSFORMATIONS CHIMIQUES DU GLUCOSE AUX OPTIMA |    |
| III STABILITÉ DE L'ACTIVITÉ                           |    |
| 3-1 - STABILITE A LA TEMPERATURE                      | 74 |
| 3-2 - STABILITE AU PH ACIDES                          | 78 |
| IV EFFET DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT              | 80 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| V    | ACTION DE DIFFÉRENTS AGENTS SUR L'ACTIVITÉ                             | 83  |
|      | 5-1 - EFFET DES METAUX LOURDS  |     |
|      | 5-2 - CINETIQUES D'ACTIVATION PAR $\text{Co}^{2+}$ et $\text{Mg}^{2+}$ | 83  |
|      | 5.2.1. en tampon MOPS pH 7,0   |     |
|      | 5.2.2. en tampon Tris pH 7,0   | 88  |
|      | 5-3 - EFFET DES REACTIFS SPECIFIQUES DES GROUPEMENTS THIOLS            | 90  |
|      | 5-4 - CINETIQUE D'ACTION DE $\text{Hg}^{2+}$                           | 92  |
|      | 5-5 - EFFETS DU DTT SUR L'ACTIVITE                                     | 92  |
|      | 5-6 - CONCLUSIONS  | 95  |
| VI   | INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE  | 97  |
|      | 6-1- EFFET SUR L'ACTIVITE  |     |
|      | 6-2 - EFFET SUR LA STABILITE AU pH                                     | 99  |
| VII  | INFLUENCE DU SDS   |     |
|      | 7-1- EFFET SUR LA STABILITE AU pH                                      | 99  |
|      | 7-2- EFFET SUR LES CINETIQUES D'ISOMERISATION                          | 101 |
| VIII | CONCLUSIONS  | 104 |

|   |     |
|---|-----|
| C - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES                    | 106 |
| I POINT ISOÉLECTRIQUE                               | 106 |
| II COMPOSITION EN SUCRES                            | 106 |
| IV DÉTERMINATION DES GROUPEMENTS THIOLS             | 110 |
| V MASSE MOLÉCULAIRE                                 | 112 |
| 5-1 - GEL FILTRATION                                |     |
| 5-2 - ELECTROPHORESE PAG-SDS                        |     |
| VI EFFET DU SDS SUR LA STRUCTURE DE L'ENZYME NATIVE | 114 |
| 6-1 - EFFETS DU SDS                                 |     |
| 6-2 - EFFET DU SDS + $\beta$ MERCAPTOETHANOL        | 114 |
| 6-3 - EFFET DU GLUCOSE SUR L'ACTION DU SDS          | 116 |
| 6-4 - EFFET DU pH SUR L'ACTION DU SDS               | 116 |
| VII INFLUENCE DU SDS SUR L'ENZYME DESTABILISÉE      | 118 |
| VII EFFET DE LA CONGÉLATION SUR LA STRUCTURE        | 120 |
| IX CONCLUSION                                       |     |
| CONCLUSIONS GÉNÉRALES                               | 125 |
| BIBLIOGRAPHIE                                       | 128 |



## ABREVIATIONS UTILISEES

|  |   |
|--|---|
| Ac A   | : Tamis moléculaire en Acrylamide-Agarose.                                    |
| A.S.   | : Activité de la glucose isomérase ( $U \cdot mg^{-1}$ ).                     |
| B.S.A.   | : Sérum Albumine Bovine.  |
| Cétavlon   | : Bromure de cétyl-triméthylammonium.   |
| C.P.G.   | : Chromatographie en phase gazeuse.   |
| D.E.A.E.   | : Diéthylamino-éthyl.   |
| D.T.N.B.   | : 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoate).   |
| DTT  | : Dithiothréitol.   |
| E, Enz.  | : Enzyme (Glucose Isomérase).   |
| EM   | : Complexe Enzyme-Métal.  |
| EMS  | : Complexe Enzyme-Métal-Substrat.   |
| ES   | : Complexe Enzyme-Substrat.   |
| Enz.-Co <sup>2+</sup>                            | : Complexe Enzyme-Cobalt.   |
| Enz.-Mg <sup>2+</sup>                            | : Complexe Enzyme-Magnésium.  |
| E.D.T.A.   | : Ethylène Diamine Tétracétate de sodium.                                     |
| F.P.L.C.   | : Chromatographie Liquide et rapide des protéines.                            |
| Fru.   | : D-Fructose.   |
| G.I.   | : Glucose (Xylose) Isomérase.   |
| Gal NAc  | : N-Acétyle Galactosamine.  |
| Glc.   | : D-Glucose.  |
| Glc NAc  | : N-Acétyle D-Glucosamine.  |
| I  | : Inhibiteur.   |
| K <sub>av</sub>                                  | : Constante d'éluion d'un composé; $K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)}$ |
| K <sub>M</sub>                                   | : Constante de Michaelis (M).   |
| log  | : Logarithme décimal.   |
| Man.   | : D-Mannose.  |
| MOPS   | : Acide Morpholinopropane sulfonique.   |
| M.M.   | : Masse moléculaire.  |
| nEM  | : n-Ethyl Maleïmide.  |
| P.A.G.   | : Gel de Polyacrylamide.  |
| pCMB   | : Parachloromercuribenzoate.  |
| SDS  | : Dodécyl Sulfate de sodium.  |
| Tp PO <sub>4</sub>                               | : Tampon Phosphate de sodium.   |
| Tris   | : 2-Amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propane-diol.                                   |
| V <sub>max</sub>                                 | : Vitesse maximale théorique de réaction enzymatique.                         |
| V <sub>e</sub> , V <sub>o</sub> , V <sub>t</sub> | : Volume d'éluion, volume d'exclusion, volume total.                          |

**HISTORIQUE**

**GENERALITES**

Cette étude réalisée pour la société Roquette Frères S.A concerne la glucose isomérase produite par Streptomyces violaceoniger utilisée industriellement sous forme immobilisée pour fabriquer du fructose à partir de sirops de glucose. Ces sirops sont le résultat d'hydrolyses enzymatiques de l'amidon.

Le principal objectif de l'enzymologiste est d'étudier les mécanismes réactionnels de façon à élucider la régulation des voies métaboliques par l'intermédiaire des enzymes.

Par contre, la finalité de l'industriel sera une application des connaissances scientifiques de façon à produire à grande échelle des biens consommables dans les conditions les plus rentables. Ainsi il doit prendre en considération les travaux de recherche fondamentale et en extrapoler les résultats de façon à optimiser son système de production notamment lorsqu'il y a utilisation d'enzymes dans le process de fabrication.

L'utilisation des enzymes en industrie suscitant beaucoup d'intérêt à l'heure actuelle, il paraît intéressant de résumer dans <sup>un</sup> premier temps pourquoi elles sont préférées à la conversion chimique lorsqu'il y a le choix, et quelle est la place de la bioconversion en général.

Dans un second temps, il semble nécessaire de parler du fructose et de le situer dans le marché des sucres pour comprendre les raisons de son essor.

Par ailleurs, parmi les différents moyens de production du fructose, nous verrons les avantages de l'isomération du glucose par voie enzymatique et les moyens mis en oeuvre pour "rentabiliser" l'enzyme notamment en l'utilisant sous forme immobilisée.

L'objet des travaux présentés ici étant l'étude de l'enzyme purifiée il est nécessaire enfin de faire le point sur les méthodes d'isolement et les propriétés des isomérases décrites dans la littérature, ce qui permettra, par la suite de les comparer à l'enzyme de St. violaceoniger utilisée par la société Roquette Frères.

Ainsi le chapitre "Généralités" n'a pas la prétention d'être une revue exhaustive et détaillée mais au contraire d'indiquer des points de repère et de replacer les travaux réalisés dans leur contexte.

## A - LES ENZYMES EN INDUSTRIE

### I - PRÉSENTATION

Les enzymes sont utilisées pour la production de biens depuis l'antiquité. La bioconversion était à l'époque réalisée de façon empirique mais pouvait néanmoins être reproduite par des ensemencements appropriés

Dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, ces phénomènes ont été peu à peu élucidés et détaillés.

La connaissance des mécanismes d'action des microorganismes et des enzymes fut alors portée dans l'industrie. On apprit très vite à les maîtriser dans des procédés tels que la fabrication de différents produits laitiers, ou de produits alimentaires en général mais aussi dans d'autres secteurs tels que l'industrie du cuir et des textiles, la production de détergents, l'épuration des eaux résiduaires...

On sait également se servir de micro-organismes pour la production de substances bien définies comme l'alcool, l'acétone, l'acide lactique, des acides aminés, des vitamines, des antibiotiques...

Dans tous ces mécanismes, il s'agit de l'action d'enzymes qui sont toutefois utilisées sous forme de microorganismes vivants. Ce n'est que plus tard que des préparations enzymatiques enrichies ont été réalisées à partir de matières végétales ou animales. Ce fut le cas des amylases et protéases à partir du pancréas de boeuf, de l'amylase à partir du malt, de la papaine du suc de certaines variétés de Papaya.

On a ensuite préparé des enzymes à l'aide de micro-organismes, par exemple les amylases et protéases à partir de bactéries et de champignons.

Mais parmi les quelques 2000 enzymes caractérisées, une quinzaine seulement sont utilisées industriellement (tableau I page 3).

Les principales réactions catalysées par des enzymes peuvent être classées en deux groupes :

#### \* Réacteur à enzymes dites de première génération :

Ce groupe d'enzymes catalyse des réactions de simples transformations sans besoin de cofacteurs organiques.

TABLEAU I : PRINCIPALES UTILISATIONS D'ENZYMES EN INDUSTRIE

| SECTEUR INDUSTRIEL                  | ENZYMES UTILISEES   | BUT   |
|-------------------------------------|---|---|
| Amidonnerie -<br>Glucoserie         | Amylases - Amyloglucosidases (1900)<br><br>Glucose isomérase (1960)       | Hydrolyse de l'amidon (liquéfaction-saccharification)<br><br>Augmentation du pouvoir sucrant (isomérisation du glucose) |
| Brasserie                           | Protéases (Papaine)   | Elimination du trouble de précipitation à froid   |
| Laiterie<br>Fromagerie              | Lactase (1960)<br>(présure animale, enzymes coagulantes fongiques (1970)) | Hydrolyse du lactose<br>Coagulation des protéines du lait<br>Transformation en fromage                                  |
| Boissons (cidres, jus de fruits...) | Pectinases (1940)   | Hydrolyse de la pectine - Amélioration de la filtration et de la brillance  |
| Sucrerie                            | Invertase (1910)  | Hydrolyse du saccharose   |
| Industrie des détergents            | Protéases<br>Lipases (1960)   | Augmentation du pouvoir détersif des lessives   |

Ventes totales d'enzymes : 1,2 milliards de francs en 1980

40 p.100 pour l'amidonnerie glucoserie :

Amylases : 60 millions de francs  
 Amyloglucosidase : 180 millions de francs  
 Glucose isomérase : 280 millions de francs

- les enzymes peuvent être excrétées dans le milieu par les cellules productrices. C'est le cas des hydrolases (amylases, cellulases, lactases, lipases, protéases...).

- d'autres enzymes de première génération sont intracellulaires. C'est le cas de racémases (utilisées pour la préparation industrielle de L-acides aminés) et d'autres notamment de la glucose isomérase qui nous intéresse ici pour l'isomérisation réversible du glucose en fructose.

\* Enzymes dites de seconde génération :

Ces enzymes sont généralement intracellulaires. On trouve dans cette catégorie les enzymes qui catalysent des réactions endergoniques.

Il est donc nécessaire que ces réactions soient couplées à d'autres productrices d'énergie (besoin en ATP par exemple).

Les oxydo-réductases, qui ne peuvent travailler qu'en présence de co-substrat, tel que le  $\text{NAD}^+$ , appartiennent aussi à cette catégorie.

Ainsi, le besoin de cofacteur implique une contrainte de régénération du système.

Ceci peut-être un facteur limitant pour le développement de cette catégorie d'enzyme. Ce qui explique qu'elles ne connaissent pas encore à ce jour d'applications à grande échelle.

## II - MARCHE DE LA GLUCOSE ISOMERASE

Nous verrons par la suite que la glucose isomérase est utilisée sous forme immobilisée. Ceci est d'autant plus important que les quantités d'enzymes sont en définitive très faibles : en effet, étant un catalyseur de ce fait réutilisable, les quantités nécessaires sont de l'ordre du gramme par tonne de produit obtenu.

Les 280 millions de francs de glucose isomérase ne représentent que 70 tonnes d'enzyme vendues.

Mais 1 kg d'enzyme immobilisée peut être utilisé plus de 3000 heures et exposé à 10 tonnes de substrat... ce qui fait qu'en réalité, le coût de 4000F/kg d'enzyme représente peu dans le prix de revient de la production de fructose.

La vente de glucose isomérase se fait essentiellement aux Etats Unis, au Japon et se développe actuellement en Europe.

A coté du leader sur le marché qu'est Novo Industries avec Sweetzyme® d'autres

.../...

fournisseurs sont à mentionner : GiSt Brocades commercialise la glucose isomérase isolée de Actinoplanes missouriensis, Miles Kalichemie celle de ST.albus. Une comparaison de ces enzymes commerciales a été réalisée par Vaherie et coll (127)

Toutefois certaines amidonnerie-glucoseries utilisent leur propre enzyme issue de sélection de souches de leur propriété. Ainsi ROQUETTE FRERES S.A produit des sirops de fructose depuis 1976 avec une glucose isomérase de St. violaceoniger.

## B - LE FRUCTOSE

### I) INTÉRÊT DU FRUCTOSE

#### 1-1) NOTIONS DE POUVOIR SUCRANT : (PS)

La saveur sucrée est déterminante pour l'emploi des sucres dans les boissons, car il faut dans le cas des boissons concentrées (apéritifs, liqueurs) la diminuer pour un "corps" donné et dans le cas des boissons diluées, avoir une saveur sucrée maximum.

On a coutume d'admettre, si on attribue au saccharose la référence 1,0, les différents coefficients suivants :

0,7 à 0,8 pour le glucose et le sorbitol

1,3 pour le sucre inverti ou isomérose

1 à 1,7 pour le fructose (ou lévulose).

Il semble que seul le  $\beta$  D-fructopyranose soit "sucrant" et le fructose est connu pour cristalliser seulement sous cette forme. C'est pourquoi le monosaccharide cristallisé est le plus sucrant. (PS = 1,7).

Par ailleurs, le P.S du fructose est plus élevé à faible température :

1,43 à 5°C, et 0,7 à 0,8 à 60°C.

Enfin, le PS diminue aussi avec une concentration en fructose croissante, et il augmente en milieu acide (à condition que le pH soit supérieur à pH 3,0)

Toutefois, il est à noter que dans les mélanges, la saveur sucrée résultante n'est pas la moyenne arithmétique de celles des composants. En général, elle a tendance à être plus élevée, en particulier lorsqu'il y a présence de saccharose.

Les petites molécules donnent en outre une saveur sucrée plus "fugitive", et elles sont généralement, le fructose en particulier, un bon support de l'arôme.

.../...

## 1-2) ELEMENTS DE NUTRITIONS

La quantité d'hydrates de carbone dans la ration alimentaire représente une part importante : en moyenne 45 à 50 p.100. L'apport énergétique de ces glucides est de 4 Kcal/g (soit 17,0 Kjoules/g).

Parmi ceux-ci, on a coutume de distinguer les sucres à absorption lente (polymères de type amidon, dextrines) et ceux à absorption rapide (chaines courtes et surtout le glucose). La différence réside dans le fait que les premiers subissent au départ une hydrolyse intestinale avant absorption et le glucose est ainsi libéré progressivement pour passer dans le sang.

Ainsi, les glucides assimilables sont métabolisés sous forme de monosaccharides et sont immédiatement phosphorylés avant toute étape métabolique proprement dite.

Contrairement à d'autres composés, il n'y a pas de glucides indispensables car quelle que soit leur structure, tous rejoignent la glycolyse au niveau des différents carrefours que constituent les premières étapes de cette voie métabolique.

Mais le grave problème actuel est que la proportion de sucres à absorption rapide a beaucoup augmenté provoquant de nombreux troubles nutritionnels (athérome, diabète, obésité...).

Ainsi, au point de vue bilan énergétique, 1 gramme de fructose apporte autant d'énergie qu'un gramme de glucose de référence.

Mais, le pouvoir sucrant du cétose étant en moyenne de 1,3 donc légèrement supérieur, la quantité ingérée est moindre à saveur sucrée égale et apporte donc globalement moins d'énergie.

### \* Fructose : sucré non insulino-gène :

Le second avantage, beaucoup plus important du fructose par rapport au glucose (qui est présent dans le saccharose) est qu'il est non insulino-dépendant. En effet, le passage membranaire de celui-ci est passif alors que le transport actif du glucose ne se réalise que par sécrétion d'insuline.



Ainsi, l'intérêt diététique du fructose est considérable dans le cas des diabétiques (2,5 millions en France) chez qui il y a déficit en insuline.

Ces deux avantages - sucre hypocalorique et non insulino-gène - ne s'appliquent qu'au fructose pur.

Mais comme nous le verrons par la suite ce dernier est en grande partie commercialisé sous forme d'"isoglucose" ou "isomérose" de composition voisine du sucre inverti soit moitié glucose, moitié fructose. Ainsi, diététiquement parlant, on se retrouve pratiquement dans les conditions de digestion du saccharose. Les différences résident dans le fait que l'on diminue les risques de caries dentaires. En effet, les bactéries de la cavité buccale synthétisent la plaque dentaire en se nourrissant essentiellement de disaccharides.

### 1-3 METABOLISME DU FRUCTOSE

Le schéma I page 8 montre que le fructose est métabolisé par une voie parallèle à celle du glucose. Ces réactions se déroulent uniquement au niveau du foie, l'aldolase musculaire ne pouvant pas agir sur le fructose 1-phosphate qui est la forme principale du fructose phosphorylé.

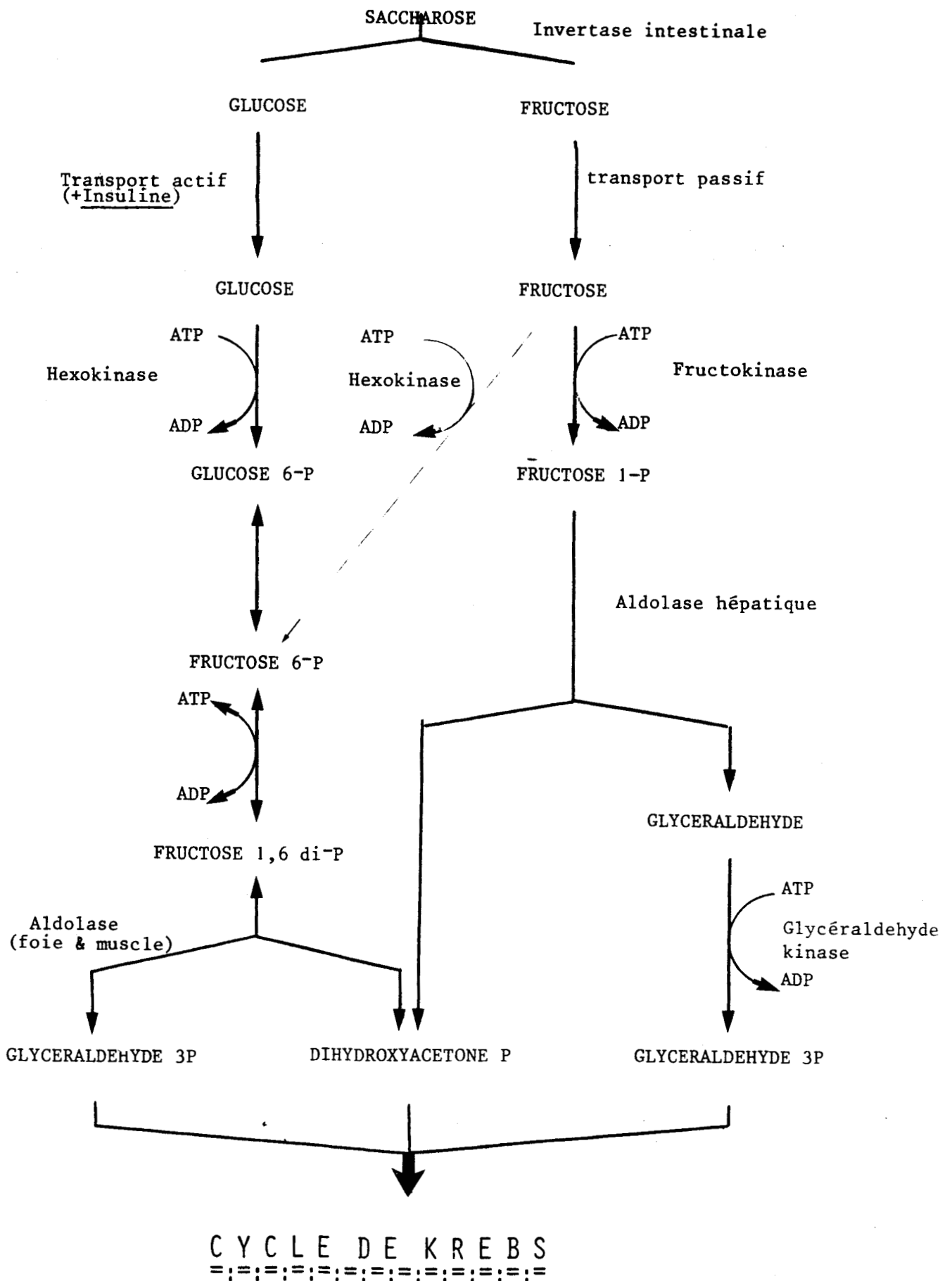
On constate donc que le fructose rejoint la glycolyse au niveau du fructose 1-6 diphosphate.

Lorsque glucose et fructose sont présents ensemble, comme dans le cas de l'absorption de saccharose, on constate une accumulation de glucose dans le sang car le fructose est métabolisé 10 à 20 fois plus rapidement. Cette hyperglycémie se traduit par des décharges d'insuline. Une fréquence trop importante peut à la longue se traduire par un diabète par "dérèglement" des cellules du pancréas sécrétrices de l'hormone hypoglycémisante.

### INTOLERANCES AU FRUCTOSE :

Il existe une maladie héréditaire dans laquelle l'ingestion de fructose, ou de composés le contenant, entraîne différents troubles : hypoglycémie, manifestations digestives et hépatiques. Cette maladie est due à un abaissement de l'activité aldolasique du foie. Il est probable qu'à la suite d'une mutation

SCHEMA 1 : MÉTABOLISMES COMPARÉS DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE



une substitution d'un acide aminé a fait disparaître l'activité enzymatique de la protéine sans supprimer son activité antigénique (87). Il y a donc accumulation de fructose 1-phosphate qui inhibe la glycogénolyse.

Le second trouble possible est dû à l'absence de fructokinase ; le fructose ingéré est dans ce cas non métabolisé et excrété tel quel dans les urines.

## II) MOYENS DE PRODUCTION DE SIROPS DE FRUCTOSE :

Le fructose est un sucre naturel que l'on trouve dans les différents organismes vivants notamment dans le règne végétal. Il est en quantité importante dans les fruits (d'où son nom), dans le miel (41 à 47 p.100 M.S), dans les racines de certaines plantes sous forme libre ou combinée. Dans ce dernier cas, il est en concentration relative plus importante. Il peut donc être produit industriellement par hydrolyse de ces saccharides. La seconde voie possible est la production par isomérisation du glucose. Le schéma N° 2 page 10 en résume les différents moyens de production.

### 2-1 PRODUCTION PAR HYDROLYSE :

#### a) hydrolyse de l'inuline :

Cet homo-polysaccharide de réserve se rencontre principalement dans la chicorée et le topinambour. Il est composé de 97 p.100 de fructose et 3 p.100 de glucose. L'hydrolyse de l'inuline conduit donc à un sirop de très haute teneur en fructose et peut être conduite de 2 façons :

\* par voie chimique : en milieu acide ( $H_2SO_4$  concentré) pH 1-2, à 100°C pendant 1 à 2 heures. L'inconvénient est que le fructose est facilement dégradé dans ces conditions ce qui conduit à la formation d'une coloration et de produits de dégradation (environ 5p.100 de difructose dianhydre par exemple).

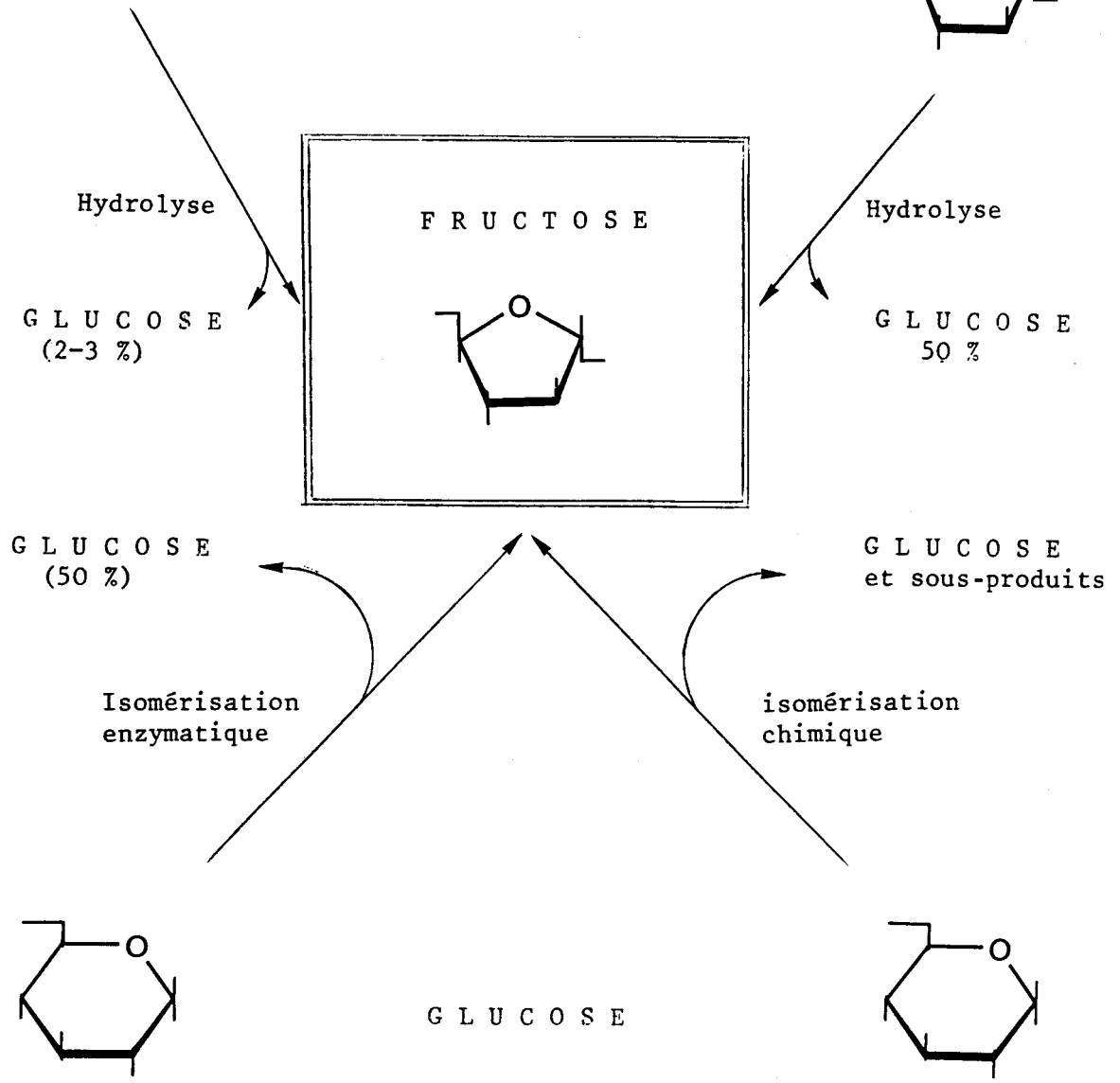
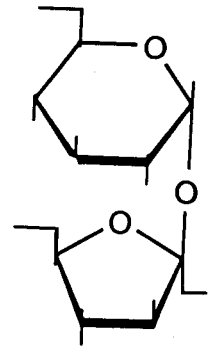
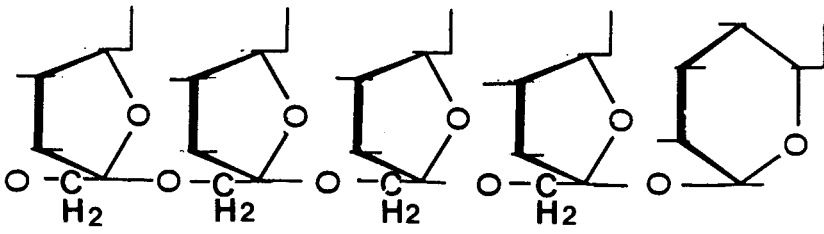
\* par voie enzymatique : bien qu'encore peu développée, cette voie semble plus intéressante. Des inulinases ont été isolées de souches d'Aspergillus et de levures (Pichia polymorpha ...) (INRA-ENSA de Montpellier). Les réactions secondaires sont limitées puisque l'on travaille à pH 4,5, 60°C avec l'enzyme de champignon et à 35°C avec celle des levures.

#### b) Hydrolyse du saccharose :

Le saccharose, forme de transport des sucres dans le règne végétal est isolé essentiellement de la betterave et de la canne à sucre. Il peut

I N U L I N E

S A C C H A R O S E



SCHEMA 2 : MOYENS DE PRODUCTION DE FRUCTOSE

.../...

être hydrolysé par la saccharase (ou invertase) et conduit donc à la production d'un mélange équimolaire de glucose et de fructose.

Cette hydrolyse peut aussi être conduite par voie chimique : le procédé Boeringer ( 7) permet par exemple d'hydrolyser le saccharose dans une colonne de résine type polystyrène sulfonée qui est partiellement sous forme  $\text{Ca}^{2+}$ . Les deux produits obtenus sont élués séparément par chromatographie sur la même colonne, le fructose ayant une affinité plus importante que le glucose vis à vis de l'ion calcium.

## 2-2) PRODUCTION PAR ISOMERISATION :

\* Isomérisation chimique : le glucose n'est pas stable à pH alcalin et peut ainsi s'isomériser en fructose (37, 93)

Un grand nombre de travaux ont été réalisés sur cette isomérisation en milieu basique depuis 1949. Toutefois, le procédé ne s'est pas vu industrialisé à cause des problèmes de coloration, de goût et de composition de la solution ainsi traitée.

\* Isomérisation enzymatique : La voie enzymatique est quant à elle très étudiée et utilisée industriellement comme dans le cas de l'hydrolyse du saccharose. Le principe est donc d'utiliser la xylose-isomérase (EC.5.3.1.5) qui isomérisé aussi le glucose dans des conditions physico-chimiques telles que le fructose est dégradé de façon insignifiante (pH 7,0 à 7,5, 60°C à 65°C).

Ainsi l'instabilité des sucres, notamment des cétooses, aux pH extrêmes à des températures élevées, fait que, dans les deux cas, les voies enzymatiques de conversion sont préférées; non seulement elles sont moins coûteuses en énergie, mais elles sont aussi spécifiques.

En effet, la particularité des biocatalyseurs que sont les enzymes est de fixer le substrat au niveau d'un "site actif" avant de le transformer. Il y a donc spécificité d'action mais aussi spécificité de substrat de par la conformation spatiale donnée du site.

Il faut néanmoins garder à l'esprit que l'on est en présence de matériel biologique et que la nature protéique de l'enzyme peut soulever des problèmes de stabilité d'activité (dénaturation de la protéine ou action d'agents spécifiques des acides aminés composant le site actif).

.../...

### 2-3) PRODUCTION DE SIROP DE FRUCTOSE PUR :

Que ce soit par hydrolyse du saccharose par l'invertase ou isomérisation du glucose par l'isomérase, on obtient un mélange équimolaire de glucose et de fructose.

Ainsi, lorsque l'on désire un sirop de fructose pur pour diabétique par exemple, il est nécessaire d'éliminer le glucose résiduel qui représente près de la moitié de la composition de la solution. La séparation est aussi nécessaire pour la production de SHTF (Sirop à Haute Teneur en Fructose):

\* Oxydation sélective du glucose par la glucose oxydase suivie d'une précipitation du gluconate (43). Le fructose en solution est alors concentré et cristallisé. L'inconvénient de ce système est la production de grandes quantités d'acide gluconique.

\* Précipitation du fructose à la chaux. Sous forme de fructosate de calcium, il y a précipitation alors que le glucose reste en solution (38). Ce procédé qui a connu des applications industrielles a été abandonné essentiellement pour des raisons économiques.

\* Chromatographie sur résine : Le fructose interagit préférentiellement avec une résine cationique type polystyrène sulfonée chargée en calcium ou sur résine anionique sous forme de bisulfite. C'est de loin cette méthode de séparation en colonne qui est la plus utilisée. Le glucose obtenu peut ensuite être recyclé sur réacteur d'isomérase immobilisée.

## III) ELÉMENTS DU MARCHÉ DES SIROPS DE FRUCTOSE

L'envolée des cours mondiaux du saccharose en 1974 a fait le lit de l'isoglucose. De plus, les dérivés de l'amidon présentent des propriétés technologiques intéressantes pour certaines fabrications : ainsi, l'isoglucose est très soluble et ne cristallise pas, ce que recherchent les confiseurs et les fabricants de confitures par exemple. De plus, le fructose est très hygroscopique. Ainsi, lors de la conservation de produits alimentaires type pâtisseries sèches, il y a moins d'évaporation donc enrichissement en eau moindre en surface de l'aliment. Ce dessèchement moins rapide permet ainsi de limiter la contamination microbienne de surface, d'où un temps de conservation plus long de ces produits alimentaires emballés. Par contre, au niveau de la fabrication, une attention particulière doit

TABLEAU 2

ORGANISATION DES MARCHÉS DU SUCRE ET DE L'ISOGLUCOSE DANS LA CEE

L'organisation communautaire du sucre, mise en place en juillet 1968, repose sur trois principes : une garantie de prix limitée à certaines quantités, une solidarité financière interprofessionnelle liant agriculteurs de la betterave et sucriers, une neutralité budgétaire.

La politique agricole commune cherchant à maintenir un revenu décent aux agriculteurs, ainsi qu'un approvisionnement normal de la CEE se caractérise par un mécanisme de prix à plusieurs degrés, qui du plus bas au plus élevé sont : le prix d'intervention auquel la CEE s'engage à stocker les denrées (soutien des cours devenus trop bas), le prix seuil qui est le prix d'intervention plus les frais de transport et de commercialisation, le prix indicatif enfin ou prix d'orientation qui est le but à atteindre en matière de prix.

La production de sucre est découpée en trois parties, le quota A légèrement inférieur à la consommation de la CEE pour qui le prix d'intervention est égal au prix indicatif, ce quota est toujours commercialisé ; le quota B dont le volume représente le quart du quota A, est destiné à l'exportation, et une « restitution » comble l'écart de prix entre le prix d'intervention et le cours mondial actuellement plus bas (si le prix mondial venait à être supérieur au prix d'intervention, il y aurait au contraire un prélèvement à l'exportation). Le financement de cette restitution est assuré par une cotisation de 2 % prélevée sur les sucres des quotas A et B, et de 30 % supplémentaires sur les sucres B.

Une partie de cette cotisation est supportée par les producteurs de betteraves dont la production est elle aussi dévisée en quota A et B. En fin de campagne le solde de cette gestion est reporté sur la campagne suivante une fois. En cas de solde négatif persistant la taxe qui frappe le quota B passe à 39,5 %, ce taux est en vigueur depuis 1980/1981. Parallèlement la production de betterave est réduite.

Reste enfin le sucre hors quota qui ne fait l'objet d'aucune garantie, ni à l'intérieur de la CEE, ni à l'exportation. Sa commercialisation dans la CEE n'est possible que pour des emplois non alimentaires. Enfin des organismes d'intervention versent une restitution à la production pour les sucres A et B utilisés par l'industrie chimique, ce qui assure le principe du choix communautaire, sans pénaliser les industries européennes vis-à-vis de la concurrence qui bénéficie des cours mondiaux.

Les producteurs d'amidon bénéficient aussi d'une restitution à la production (de plus en plus symbolique) lors de l'emploi industriel de l'amidon. Avant 1979 l'isoglucose bénéficiait de cette restitution d'où un prix du produit fini abaissé. A la demande des industriels du sucre, cette restitution fut abolie pour l'isoglucose, et arguant que la surproduction de l'époque dans la CEE était due à l'isoglucose, ils ont obtenu que le marché de l'isoglucose soit calqué sur celui du sucre. La vente d'isoglucose est soumise à un quota A et B, et une taxe à la production sert à soutenir la politique du sucre. Au début tout l'isoglucose était taxé comme un sucre B ! Or si les sucriers peuvent répercuter 60 % des prélèvements sur les producteurs de betteraves les producteurs d'isoglucose ne peuvent le faire ; la taxe a pu être revue mais après un procès. Actuellement la production d'isoglucose est répartie de la façon suivante :

- quota A, deux fois la production durant la période de référence soit du 1<sup>er</sup> novembre 1978 au 30 mars 1979
- quota B, 23,6 à 27,5 % du quota A.

Les taxes sont identiques à celles du sucre. Le hors quota doit être exporté, proposition irréaliste car la matière première est acquise au prix européen, très supérieur au prix mondial, et l'isoglucose voyage difficilement.

|                       | SUCRE A<br>en T | SUCRE B<br>en T | PRODUCTION<br>SUCRIERE | ISOGLUCOSE A<br>en T matière sèche | ISOGLUCOSE B |
|-----------------------|-----------------|-----------------|------------------------|------------------------------------|--------------|
| France Métropolitaine | 2 530 000       | 759 232,8       | 5 130 000              | 15 887                             | 4 135        |
| RFA                   | 1 990 000       | 612 312,9       | 3 396 000              | 28 882                             | 6 802        |
| Bénélux               | 680 000         | 146 000         | 1 030 000              | 56 667                             | 15 583       |
| Grande-Bretagne       | 1 040 000       | 104 000         | 1 092 000              | 21 696                             | 5 787        |
| Pays-Bas              | 690 000         | 182 000         | 1 044 000              | 7 426                              | 1 749        |
| Italie                | 1 320 000       | 248 250         | 2 048 000              | 16 569                             | 3 902        |
| Grèce                 | 290 000         | 29 000          | 323 000                | 10 522                             | 2 478        |
| Irlande               | 182 000         | 18 200          | 163 000                | —                                  | —            |
| Danemark              | 328 000         | 96 629,3        | 480 000                | —                                  | —            |

Cette organisation générale des sucres tend à aligner les prix du saccharose et de l'isoglucose tout en laissant la compétition ouverte sur les autres caractéristiques des produits, dans la limite des quotas... Ce système protège l'industrie sucrière, réduit les importations de maïs, base de la fabrication de l'isoglucose et favorise soit l'importation directe du produit, soit de pratiquer de subtiles slaloms entre les réglementations. Dernier détail, par la convention de Lomé la CEE s'est engagée à importer du sucre de canne à partir des pays de l'Afrique, des Caraïbes et du Pacifique (ACP) à des conditions préférentielles. Ce sucre qui est réexporté, au frais cette fois de la communauté, contribue à accroître le volume du sucre excédentaire à gérer.

Source : BIOFUTUR - MARS 1984

TABLEAU 3

QUOTAS DE DIFFERENTES SOCIETES EUROPEENNES

| Pays                       | BLEU*  | RFA              | Grande-Bretagne         | Italie  | France   | Pays-Bas          | Grèce                       |
|----------------------------|--------|------------------|-------------------------|---|----------|-------------------|-----------------------------|
| Société                    | Amylum | Maizena<br>(CPC) | Tunnel Ref.<br>(Amylum) | SPAD et FRAGD<br>(Roquette Liquid gaz)<br>(CPC) | Roquette | Zetmeel-Bedrijven | Biamyl et Zaade<br>(Amylum) |
| Quota total<br>(en tonnes) | 72 250 | 34 440           | 27 483                  | 20 380  | 20 022   | 9 134             | 7 878 5 122                 |

\* Belgique, Luxembourg, Economic Union.

Source: The EC policy on Isoglucose Report for the sub programme Biosociety of the FAST Program).

.../...

être portée sur le fait que le fructose se dégrade plus facilement par réaction de Maillard.

Enfin, son utilisation est idéale dans la fabrication de boissons, des crèmes glacées... (très soluble, pas de recristallisation, haute viscosité, bon support de l'arôme sont ses qualités essentielles).(46)

Ainsi, les intérêts technologiques de ce produit et la limitation de l'indépendance vis à vis de pays producteurs de saccharose ont engendré un véritable "boom de l'isoglucose" aux Etats Unis dès 1967.

L'isoglucose détient actuellement 33 p.100 du marché américain des sucres et des édulcorants.

Mais au niveau Communauté Européenne, l'introduction de l'isomérase fait encore l'objet de limitations strictes.

En effet, la production communautaire de sucre est déjà excédentaire.

Depuis 1968, un mécanisme de garanties du prix du sucre a donc été établi en limitant les quantités produites. De plus, de par la convention de Lomé, la C.E.E s'est engagée à importer du sucre de canne provenant des ACP (Pays d'Afrique, des Caraïbes et du Pacifique).

Ainsi la production étant déjà limitée par un système de quotas, il n'y avait au départ aucune place pour l'isoglucose produit à partir de l'amidon de maïs (tableau 3 page 13 ).

Une demande intérieure existait cependant pour certaines fabrications. Elle a été satisfaite par une importation très limitée de sirops de fructose. Mais les frais de transport augmentaient leur coût, les législations nationales étaient différentes pour chacun des pays de la Communauté, autant dire que l'essor de ces sirops était très limité.

De plus, les sucriers européens, arguant que les excédents communautaires de sucre étaient dus à l'isoglucose, ont obtenus en 1979 que son marché soit réglementé de la même façon que celui du sucre blanc. Ainsi, depuis lors, la vente de l'isoglucose est soumise à un système de quotas. De plus, une taxe à la production, qui a fait augmenter de 20 p.100 le coût du produit, sert à soutenir la politique sucrière (tableau 2 page 13).

Par ailleurs, il est à noter que l'utilisation accrue d'édulcorants (tels que l'aspartame pour lequel est prévu un essor considérable), va entraîner inévitablement une consommation moins importante de saccharose. Ce qui ne risque pas d'arranger le problème sucrier européen dans les pro-



## TABLEAU 4

### HISTORIQUE DE LA PRODUCTION DES SIROPS DE FRUCTOSE

|                |   |
|----------------|---|
| 1957           | Mise en évidence de l'activité glucose-isomérase  |
| 1960           | Premiers brevets d'utilisation de l'enzyme<br>(Corn Product Company, Miles Laboratories, (US))<br>Sanmatsu Kogyo Comp. (Japon)                        |
| 1967           | Production industrielle de fructose par isomérisation enzymatique<br>Standard Brands (US)   |
| 1967-72        | Production par d'autres sociétés (CPC ...)  |
| 1972           | Apparition des isomérases fixées.<br>Mise sur le marché de Zweetzyme® par Novo (enzyme de <u>Bacillus coagulans</u> )                                 |
| 1974           | <u>Flambée des cours sucriers mondiaux</u>  |
| fin<br>1975    | Développement de la production de sirop de fructose en Belgique, R.F.A.   |
| 1976           | Mise sur le marché de sirops de fructose de "seconde génération"<br>(55 à 90 P.100 de fructose) (HFCS)<br>Production mondiale : 680.000 T (Mat.Sèche) |
| 5juin<br>1979  | Arrêté autorisant la production (sous quotas) de sirops de fructose<br>par ROQUETTE FRERES S.A (Isomérase de <u>St. violaceoniger</u> )               |
| 15mars<br>1983 | Autorisation d'utilisation d'isomérases en France de :<br>- <u>St Olivochromogenes</u> (CPC international)<br>- <u>B. Coagulans</u> (Novo)            |

.../...

chaines années.

Enfin, pour ne citer que l'aspartame, les édulcorants peuvent même être considérés comme des concurrents potentiels de l'isoglucose. Par exemple, le gros marché que représente Pepsi Cola s'est ouvert pour l'isomérase : la société a autorisé l'incorporation de 80 p.100 d'isoglucose à 55 p.100 de fructose dans les colas vendus à la fontaine, 50 p.100 pour ceux vendus en cannettes.

L'aspect diététique dans le marché des soft drinks est de plus en plus pris en considération, et l'incorporation d'aspartame est autorisée par la FDA depuis juillet 1983 dans les boissons gazeuses.

Ainsi une étude du consultant américain ELDIB fait apparaître que le dipeptide prendrait 10 p.100 du marché des sirops de fructose dans les boissons gazeuses. Mais cela n'empêchera pas la croissance de la production de ces derniers à un rythme de 2 à 3 p.100 par an surtout des sirops de fructose dits de "seconde génération" ou SHTF.

Le tableau N° 4 page 15 retrace dans ses grandes lignes, l'histoire de la production des sirops de fructose.

## C) LA GLUCOSE ISOMERASE

### I) DÉFINITION - HISTORIQUE

Deux catégories d'enzymes ont été étudiées. Un grand nombre de micro-organismes possèdent en effet cette activité, mais une isomérase véritablement spécifique du glucose n'existe pas selon NOLTMAN (86). Les enzymes décrites sont en fait soit la D-Xylose isomérase (E C.5.3.1.5), soit la D-Glucose 6 phosphate isomérase (E C.5.3.1.9).

En 1957, MARSHALL et KOII (73) sont les premiers auteurs à avoir mis en évidence une souche Pseudomonas hydrophila, possédant une enzyme capable d'isomériser le glucose en fructose. Ils ont déposé un brevet (74) à la suite de cette découverte.

Ensuite, dès 1960, TSUMURA et SATO (122) ont commencé leurs travaux sur cette activité en étudiant Aerobacter cloacae. Puis, ils ont été les premiers auteurs à mettre en évidence l'activité glucose isomérase chez le genre Streptomyces sp. en 1965 (124).

.../...

.../...

Par la suite, l'activité a été caractérisée chez d'autres micro-organismes, tels que Lactobacillus brevis (130), différentes espèces de Streptomyces sp. (111, 119, 124, 115, 58, 51, 107, 98, 90, 13, 16) et des bactéries telles que Arthrobacter sp. (65), Escherichia intermedia (83), Bacillus coagulans (21).

Ainsi, de nombreuses et différentes souches de bactéries et champignons ont été testées. Il est à noter que toutes les activités glucose-isomérase sont d'origine microbienne et que les levures ne possèdent pas ce potentiel (13, 9, 41).

Parmi les souches décrites, certaines produisent une enzyme qui a besoin d'arsenate pour exprimer son activité sur le glucose. Ceci indique qu'elles sont probablement des hexose-phosphate isomérases. Elles ne peuvent donc être exploitées en industrie alimentaire : c'est le cas de Ps. hydrophila (73) Aerobacter cloacae (123), A. aerogenes (81), E. freundii (81), E. intermedia (83) par exemple.

Par contre, les bactéries hétérolactiques, Bacillus sp. et les actinomycètes tels que Streptomyces sp. sont décrites comme possédant la D-xylose isomérase qui, elle, n'a pas besoin d'arsenate pour isomériser le glucose. Ces souches sont donc étudiées plus en détail.

→ Ainsi, dans la suite de cet exposé, quand le terme "glucose isomérase" sera utilisé, il sera sous-entendu "xylose isomérase", enzyme qui est étudiée ici.

Nous avons pu constater précédemment que l'intérêt économique de cette enzyme est très important ce qui justifie un nombre impressionnant de brevets à son sujet. Brevets portant à la fois sur ses modes d'utilisation (notamment sous forme immobilisée) mais aussi sur les souches productrices et leur amélioration génétique.

## II) PRODUCTION DE L'ENZYME

### 2-1) LE MICRO-ORGANISME :

La souche microbienne retenue devra répondre à deux critères importants :

- . elle doit pouvoir se cultiver facilement en fermenteur et,
- . elle doit permettre une optimisation de la production d'enzyme.

L'augmentation d'activité produite peut être obtenue par mutation classique (radioactivité, rayonnements U.V., agents chimiques tels que l'éthylène-

.../...

ne-imine ou la 8 éthoxy-caféine par exemple). On peut ainsi obtenir des mutants contenant 30 à 50 p.100 d'activité en plus.

L'autre possibilité est le clonage du gène de la glucose isomérase. Cette dernière technique suscite beaucoup d'intérêt à l'heure actuelle. Le clonage a été réalisé avec succès chez E. COLI par ABOU-SABE (MAS. LABORATOIRES). La technique consiste à isoler le morceau d'ADN codant la synthèse de la protéine et à l'insérer dans un plasmide (vecteur qui est une sorte de minichromosome bactérien). Ce plasmide est ensuite introduit dans le patrimoine génétique d'un micro-organisme. En général, lorsque le gène est inséré, il s'exprime peu ou pas. De nombreuses étapes de "chirurgie génétique" sont donc nécessaires pour que l'expression du gène passe sous le contrôle des éléments de régulation de la cellule-hôte (signaux d'initiation ou "promoteurs", signal de terminaison...). Enfin, lorsque l'on désire une sur-production de la protéine, une manipulation supplémentaire consiste à introduire un gène empêchant les arrêts éventuels de transcription. La protéine codée devient alors majoritaire dans la cellule-hôte. On devine la complexité technique de ces manipulations mais les résultats escomptés méritent l'investissement encore nécessaire en travail fondamental avant la réelle application industrielle.

Notons enfin qu'en raison de leur acceptabilité dans l'industrie alimentaire, les micro-organismes hôtes sont choisis essentiellement parmi les levures (9, 41), les Streptomyces sp. et les bactéries du genre Bacillus.

## 2-2) LE MILIEU DE CULTURE :

La plupart des souches ont besoin de xylose pour induire la production de xylose isomérase (124, 21, 81, 137, 89).

Devant le coût élevé de ce monosaccharide, de nombreuses souches de Streptomyces sp. ont été sélectionnées de façon à produire l'enzyme à partir de polysaccharides moins coûteux : les xylanes que l'on trouve dans les déchets lignocellulosiques tel que la paille par exemple (113, 137, 116, 16, 98,77). Dans ces conditions ISHAQUE et coll. (47, 60) montrent qu'il y a production, en même temps, d'enzymes cellulolytiques.

Notons aussi que certaines souches mutées ont été décrites comme pouvant produire l'enzyme en absence de xylose ou dérivés (CPC International 1973).

Les sources d'azote organiques ou inorganiques dans le milieu sont très variées. Toutefois il est intéressant de noter que certaines substances

.../...

azotées peuvent stimuler la production d'isomérase. DANNO (22) montre que la thréonine et le glyco-colle active la production d'enzyme chez Bacillus coagulans. Dans le cas de St. olivochromogenes ATCC 21114 c'est le nitrate d'ammonium ainsi que le glyco-colle qui augmentent les rendements en enzyme ( 118, 123).

De plus, l'adjonction de cations tels que  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ , est presque toujours mentionnée pour augmenter l'activité isomérase du milieu de culture. Nous verrons en effet par la suite, que certains cations sont des activateurs de l'enzyme.(125)

Le milieu est ajusté à pH 6,8 - 7,2 et maintenu en aérobiose par agitation continue et bullage d'air.

De nombreuses conditions de cultures de microorganismes producteurs de glucose-isomérase se trouvent rassemblées dans la revue générale de CHEN(13).

### III) IMMOBILISATION DE L'ACTIVITÉ GLUCOSE ISOMÉRASE

Comme tout catalyseur, une enzyme, après réaction, se retrouve à son état initial. Et quand les conditions physico-chimiques le permettent, (faible viscosité du substrat, faible taille...) il est intéressant de fixer cette enzyme de façon à la réutiliser. Les conditions sont requises dans le cas de l'isomérisation du glucose.

Ainsi l'enzyme peut être immobilisée de deux façons :

#### 3-1 IMMOBILISATION DES CELLULES :

La glucose-isomérase est une enzyme intracellulaire. L'intérêt de ce mode de fixation est d'éviter les coûts de purification de l'enzyme et par ailleurs de la laisser dans son environnement ce qui peut permettre d'obtenir une meilleure stabilité de l'activité enzymatique.

Dans la plupart des cas, avant immobilisation, les cellules subissent un traitement thermique (60 à 85°C selon les auteurs, pendant 10 minutes). Ceci permet de stabiliser l'activité en dénaturant une grande partie des protéases (70) et en fixant par ailleurs l'enzyme dans ou sur la membrane du microorganisme (116). Ce traitement thermique peut être réalisé d'autant plus facilement que les glucose-isomérases décrites sont stables dans ces conditions, surtout lorsque certains cations protecteurs, tels que le cobalt, sont ajoutés dans le milieu.

.../...

Les différentes méthodes, que l'on peut classer en quatre groupes sont répertoriées dans le tableau n° 5 page 21.

Elles peuvent bien sûr être combinées. La méthode la plus souvent utilisée est l'inclusion des cellules dans un gel qui est ensuite ponté à l'aide de glutaraldéhyde. Les cellules ainsi traitées peuvent être utilisées en réacteurs, cette dernière solution étant beaucoup plus avantageuse. Dans ce cas, le mélange tanné est filé pour être mis sous forme de granulés qui sont ensuite séchés.

Ce procédé a été retenu par ROQUETTE FRERES pour immobiliser son enzyme de St. violaceoniger (27, 44, 133).

Les industriels ont tout de suite saisi l'intérêt de l'immobilisation de la glucose isomérase et les méthodes sont donc toutes brevetées.

TAKASAKI en 1976 a revendiqué aussi la co-fixation de gluco-amylase de Rhizopus sp. sur le mycélium de Streptomyces de façon à produire l'isomérose directement à partir de l'amidon (120) D'autres études sont en cours dans ce sens (3).

### 3-2) IMMOBILISATION DE L'ENZYME EXTRAITE ET PURIFIEE

Bien que les différentes glucose isomérases utilisées industriellement à ce jour soient sous forme de préparation de cellules immobilisées, une série d'études a été engagée dans le but de fixer l'enzyme seule.

Ainsi, des étapes d'extraction et de purification sont nécessaires mais il est à noter que certaines souches sélectionnées contiennent jusqu'à 10p.100 d'isomérase (115, 116).

L'avantage certain de cette méthode est l'obtention d'une plus grande activité par unité de volume (132).

Par ailleurs, il semblerait qu'ainsi immobilisée, l'activité soit plus stable que fixée dans la cellule (1), et que le contact soit plus aisé entre l'enzyme et le substrat.

Enfin, l'intérêt de la purification avant fixation est d'éliminer tout le matériel cellulaire inutile : on diminue ainsi le risque de réactions enzymatiques indésirées, et la coloration de la solution sortante.

TABLEAU 5 : IMMOBILISATION DE L'ACTIVITÉ GLUCOSE-ISOMÉRIASE

| TECHNIQUE D'IMMOBILISATION                                 | CELLULES | ENZYME PURIFIÉE | SOUCHES              | Réf.             |
|--|----------|-----------------|----------------------|------------------|
| <u>Traitement thermique</u> :                              | X        |                 | St. albus            | 116, 117         |
| (60-85°C, 10 min)  |          |                 | St. species          | 18, 33, 70       |
|  |          |                 | St. flavogriseus     | 97               |
| <u>Floculation</u> : Polyelectrolytes :                    | X        |                 | B. coagulans         | 75 128           |
| MgCO <sub>3</sub>  | X        |                 | ST. albus            | 96               |
| Chitosanes   | X        |                 | Arthrobacter sp.     | 66               |
|  |          |                 | L. Brevis            | 126              |
| <u>Emprisonnement</u> :                                    |          |                 |                      |                  |
| Gel de polyacrylamide                                      | X        | X               | Streptomyces sp.     | 107, 15          |
| Collagène + Glutaraldéhyde                                 | X        | X               | St. phaeochromogenes | 129, 130, 62, 95 |
| Fibres de cellulose + glutaraldéhyde                       | X        | X               | A. missouriensis     | 29               |
|  |          |                 | St. species          | 37               |
| Triacétate de cellulose                                    |          | X -             |                      |                  |
| Fibres creuses Amicon                                      |          | X               |                      | 62               |
| <u>Polymérisation</u> :                                    |          |                 |                      |                  |
| Glutaraldéhyde   | X        |                 | St. olivaceus        | 79               |
| <u>Adsorption</u> :  |          |                 |                      |                  |
| - DEAE Sephadex  | X        | X               |                      | 49               |
| - DEAE cellulose   |          | X               | St. flavogriseus     |                  |
|  |          |                 | B. coagulans         | 45               |
|  |          |                 | L. brevis            |                  |
| - Résine anionique poreuse                                 |          | X               |                      | 78               |
| - Duolite A <sub>7</sub>                                   |          | X               |                      | 59               |
| - Polystyrène sulfoné, V5 <sup>+</sup> + glutaraldéhyde    |          | x               | St. phaeochromogenes | 63               |
| <u>Fixation covalente</u> :                                |          |                 |                      |                  |
| s-triazinyl Duolite A <sub>7</sub>                         |          | X               |                      | 59               |
| Billes de verres activées                                  |          | X               | St. species          | 67               |
|  |          | X               | St phaeochromogenes  | 108              |
| Agar ponté à l'épichlorhydrine activé au B <sub>r</sub> CN |          | X               |                      | 76               |
| Chitosanes   |          | X               |                      | 50, 109          |
|  |          |                 |                      | 135              |

.../...

Un intérêt particulier semble se dégager en faveur de la fixation covalente sur un matériau insoluble tel que des billes de verre. On obtient ainsi des propriétés mécaniques excellentes pour une surface de contact importante.

### 3-3) COMPORTEMENT DE L'ENZYME IMMOBILISEE :

D'une façon générale, l'immobilisation permet de stabiliser l'activité (88). L'enzyme de St. phaeochromogenes semble ainsi être moins sensible à la température une fois adsorbée sur DEAE cellulose et encore moins sensible quand elle est fixée sur billes de verre activées (104, 5) Par ailleurs il a été reporté dans différentes études que l'enzyme fixée présente une affinité 2 à 4 fois plus faible selon les cas (5, 40, 50, 115, 14) La méthode idéale d'immobilisation ne semble pas être encore mise au point à ce jour. En effet, les rendements de fixation sont généralement corrects (plus de 50 p.100 de l'activité initiale), mais les demi-vies annoncées restent faibles (10 à 40 j en général).

### 3-4) PRECAUTIONS D'UTILISATION DE L'ENZYME IMMOBILISEE :

La demi-vie d'un réacteur sera fonction de différents paramètres : Parmi les plus importants, on note :

#### a) La stérilité du milieu :

En effet la prolifération microbienne peut être désastreuse. L'isomérisation d'une solution concentrée à une température de l'ordre de 60°C permet de minimiser les risques.

#### b) La température :

Bien que la température optimale des glucose isomérases se situe vers 70 - 75 °C, il est préférable de travailler à 60 - 65°C, ce qui permet de plus de minimiser les dégradations du fructose.

#### c) Les impuretés dans le substrat :

Les particules solides peuvent nuire à la résistance mécanique par colmatage du réacteur et doivent donc être éliminées.

.../...



Les peptides et les ions : doivent être aussi éliminés par traitement sur charbon et sur résine échangeuse d'ions. La conductivité est en effet un facteur important. Le calcium par exemple est inhibiteur de l'activité. Dans le cas de Sweetzyme<sup>®</sup>, les auteurs préconisent un apport supplémentaire de magnésium si le substrat contient plus de 15 ppm de Ca<sup>2+</sup> de façon à obtenir un rapport Mg<sup>2+</sup> /Ca<sup>2+</sup> = 20.

Les sucres hydrogénés : ou autres saccharides que le dextrose (D-glucose) sont aussi des inhibiteurs de l'activité glucose isomérase.

De plus, hormis les modifications de goût qu'ils peuvent conférer au sirop sortant, ces composés et les polysaccharides peuvent poser des problèmes de recyclage lors de l'isomérisation du sirop de glucose résiduel séparé sur résine, car ils restent présents.

La présence d'oxygène : Il est important enfin de minimiser la pO<sub>2</sub> soit par évaporation ou dégazage du substrat, certaines glucose isomérases y étant sensibles.

Agents stabilisants : Des précautions doivent être prises à ce sujet car le produit est destiné à l'alimentation et doit donc respecter certaines normes.

Quoiqu'il en soit, aucun stabilisant chimique n'a été mentionné dans le cas de la glucose isomérase si ce n'est les cations tels que Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup> selon la source de l'enzyme. Ces cations sont à la fois protecteurs et activateurs de la glucose isomérase.

Par ailleurs, l'incorporation de sulfite ou de bisulfite dans la liqueur à isomériser permet non seulement de réduire la coloration mais aussi d'augmenter la stabilité du réacteur de par leur pouvoir réducteur (18).

L'utilisation industrielle de la glucose isomérase ne pût être envisagée qu'une fois les propriétés physico-chimiques et enzymatiques de l'enzyme connues. Pour ce faire, il fût nécessaire de l'extraire et de la purifier.

## IV) ÉTUDES DE LA GLUCOSE ISOMÉRASE

### 4-1) METHODES D'EXTRACTION DE LA GLUCOSE ISOMERASE

La glucose isomérase étant une enzyme endocellulaire, il est nécessaire de perméabiliser la membrane du microorganisme pour la libérer. Les méthodes utilisées peuvent être classées en deux groupes. Elles sont regroupées dans le tableau 6 page 25.

#### \* Extraction par des moyens mécaniques :

Différentes méthodes physiques de désintégration des parois sont utilisées mais ne sont pas applicables pour des préparations à grande échelle car elles sont trop coûteuses et parfois trop longues.

On trouve aussi la désintégration des cellules par ultrasonage, le broyage, le pressage, ("French press"), l'homogénéisation, le concassage (en utilisant de l'alumine, des billes de verre, de la silice).

#### \* Extraction par lyse des cellules :

L'enzyme est facilement libérée de cette manière.

On distingue néanmoins deux types de lyse :

- l'autolyse : qui consiste à incuber les cellules sans réactif dans des conditions favorisant l'action des hydrolases intrinsèques.

- la lyse chimique : qui, par contre, permet d'accélérer la perméabilisation de la membrane en ajoutant différents réactifs : le lysozyme est souvent utilisé mais les détergents cationiques permettent souvent d'obtenir de meilleurs rendements d'extraction.

Les activités spécifiques des solutions ainsi obtenues peuvent être 1,2 à 1,5 fois supérieures à celles obtenues par les moyens physiques : c'est le cas par exemple de St flavogriseus (12).

Des études ont été réalisées de façon à comparer les différentes méthodes (12, 36, 26) pour différentes souches de Streptomyces sp. Les conclusions sont toutes en faveur de la lyse chimique. Néanmoins, les détergents anioniques (Lauryl sulfate de sodium, dioctyl sulfosuccinate de sodium...) et les détergents neutres (Tween 80) ne sont pas efficaces.

L'utilisation de détergents cationiques par contre permet d'obtenir, de façon sélective, le maximum de solubilisation d'activité isomérase. De plus, cette technique efficace est rapide, simple et peu coûteuse.

TABLEAU 6 : MÉTHODES D'EXTRACTION DE GLUCOSE ISOMÉRASES

MÉTHODES PHYSIQUES

| SOUCHES              | MÉTHODES - CONDITIONS                | REFERENCE                                  |
|----------------------|--------------------------------------|--|
| E. intermedia HN500  | Broyage abrasif                      | NATAKE (1964) (83)                         |
| Lactobacillus brevis | Broyage en présence d'alumine pH 7,4 | YAMANAKA(1968) (137)                       |
| Streptomyces sp.     | Ultrasonage 30 mn à 8Kc ou pressage  | CHOU (1976) (16)                           |
| St. phaeochromogenes | Sonage 10 mn à 10 Kc.                | STRANDBERG (1971) (107), ATTIA (1980) (41) |
|                      | Sonage                               | TSUMURA (1976) (124)                       |
|                      |                                      | TAKASAKI(1966) (112)                       |

LYSE

|   |   |                         |
|---|---|-------------------------|
| St. griseofuscus S.41                         | Autolyse 1 mois, 4°C, pH 7,5                                  | KASUMI (1981) (53)      |
| B. stearothermophilus<br>St. olivochromogenes | Lysozyme 0,0015 P.100 + toluène 1 P.100<br>24 H, 50°C, pH 7,5 | SUEKANE (1978)(110)     |
| St. flavogriseus                              | Cetavlon 0,1 P.100 ; 24 H 37°C, pH 7,0                        | CHEN et COLL (1979)(12) |
| Streptomyces sp.                              | Chlorure de cetylpyridinium 0,1 P.100, 6H, 40°C, pH 6,5       | TAKASAKI (1969) (115)   |
| Bacillus coagulans                            | Lysozyme + toluène 1 P.100, 20 H, 20°C                        | DANNO (1970) (22)       |

Elle permet en outre, de supprimer ou diminuer la dénaturation de l'enzyme par action des protéases cellulaires, ce qui intervient généralement dans le cas de l'autolyse.

A noter enfin que ces méthodes peuvent être combinées : broyage mécanique et lysozyme (12), lysozyme et toluène (110) par exemple.

Quoi qu'il en soit, l'extraction est toujours réalisée à pH voisin de la neutralité et à une température n'excédant jamais 50°C. Ce dernier facteur est important, car une température supérieure entraîne, comme l'ont montré TAKASAKI et coll.(116), la fixation de l'enzyme sur les structures cellulaires.

#### 4-2) METHODES DE PURIFICATION DE L'ENZYME

Les schémas de purification sont aussi nombreux qu'il y a eu d'études sur l'enzyme soluble. Néanmoins, les méthodes peuvent être classées par catégorie. Le tableau N° 7 page 27 résume ces différentes techniques utilisées.

##### a) Précipitation des acides nucléiques :

L'élimination du matériel nucléique est réalisée par précipitation à l'aide d'un sel de manganèse (36, 136, 84, 137,) ou par l'utilisation de sulfate de protamine (105),

##### b) Précipitation de l'enzyme :

Cette méthode est très largement utilisée. La précipitation est réalisée soit à basse température par des solvants organiques, notamment l'acétone, soit par fractionnements au sulfate d'ammonium.

##### c) Chromatographie d'échange d'ions :

D'une façon générale, ces précipitations sont suivies d'un ou deux fractionnements sur résine anionique (DEAE cellulose ou DEAE Sephadex A-50).

##### d) Etapes ultérieures :

Les étapes précédentes permettent souvent d'obtenir des préparations enzymatiques homogènes, elles sont parfois suivies d'une gel filtration (Sephadex G-200 par exemple) ou d'une cristallisation (par dialyse contre du sulfate d'ammonium ou par utilisation de solvants organiques).

La combinaison des méthodes mentionnées plus haut peut être complétée par d'autres techniques telles que la précipitation au rivanol (84), la chromatographie d'affinité (68) et le traitement thermique. (La glucose isomérase, thermostable, supporte un traitement thermique permettant d'éliminer les pro-

TABLEAU 7 : MÉTHODES DE PURIFICATION DE GLUCOSE-ISOMÉRASES (AVEC HOMOGENÉITE VÉRIFIÉE)

| SOUCHES               | ETAPES                         | FACTEUR DE PURIFICATION | RECUPERATION D'ACTIVITE P.100 | REFERENCES                    |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Lactobacillus. brevis | 1a + 2 + 7 + 6a + 4a + 6b      | 11,5                    | 21,7                          | YAMANAKA (1963) (136)         |
| E. intermedia HN-500  | 1a + 8 + 4a                    |                         |                               | TAKASAKI et COLL (1969) (84)  |
| B. coagulans HN-68    | 1a + 2 + 4a + 4a + 6b + 6 a    | 43,0                    | 36,6                          | DANNO G (1970) (22)           |
| St. albus TY-5        | 3 + 4b + 4a + 6a + 5a          | 10,0                    | 3,4                           | TAKASAKI et COLL (1969) (115) |
| St. olivochromogenes  | 2 + 4a + 5b + 6b               | 73                      | 40                            | SUEKANE et COLL (1968) ( 110) |
| B. stearothermophilus | 7 + 2 + 4a + 5c + HA. Ultrogel | 56                      | 14,3                          |                               |
| St. griseofuscus S-41 | 4a + 4a + 2 + 6                | 4,3                     | 33                            | KASUMI et COLL (1981) (51)    |
| St flavogriseus       | 2 + 4b + 4a                    | 12,6                    | 11                            | CHEN et COLL (1979) (12)      |

LÉGENDE TABLEAU 7

- 1 - Précipitation des acides nucléiques
  - 1a) a l'aide de  $Mn^{2+}$
  - 1b) a l'aide de sulfate de protamine
- 2 - Précipitation au sulfate d'ammonium
- 3 - Précipitation à l'acétone à basse température
- 4 - Chromatographie sur résines échangeuses d'ions.
  - 4a) DEAE Sephadex A 50
  - 4b) DEAE cellulose
- 5 - Gel filtration
  - 5a) G-200
  - 5b) G-150
  - 5c) Biogel P200
- 6 - Cristallisation
  - 6a) à l'acétone
  - 6b) au sulfate d'ammonium
- 7 - Traitement à la chaleur
- 8 - Traitement au rivanol

.../...

téines thermolabiles).

L'homogénéité de la solution enzymatique finale est vérifiée soit par ultra-centrifugation soit par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant.

Le rapport d'activité glucose isomérase sur xyloë isomérase reste constant lors de la purification. Une preuve supplémentaire est donc apportée pour confirmer que l'on se trouve bien en présence d'une seule et même enzyme (51, 22, 136)

Notons enfin qu'il est souvent mentionné un facteur de purification faible pour une homogénéité finale acceptable. Si ce rapport

$$\frac{\text{Activité spécifique finale}}{\text{Activité spécifique de l'extrait brut}}$$

est de 10 par exemple, cela signifie que près de 10 p.100 des protéines totales de l'extrait brut sont de la glucose-isomérase. Ceci paraît élevé au premier abord, mais certaines souches ont subi des mutations et sont davantage productrices d'enzyme. Par ailleurs, ce résultat est fonction de la sélectivité de la méthode d'extraction choisie et montre l'importance qui doit être attachée à cette étape.

Ceci est d'autant plus important lorsqu'il est envisagé une immobilisation de l'enzyme pure : le nombre d'étapes de purification devra être limité à une ou deux. L'application à grande échelle est alors envisageable et peu coûteuse d'autant qu'ainsi les pertes d'activité en cours de purification sont minimisées.

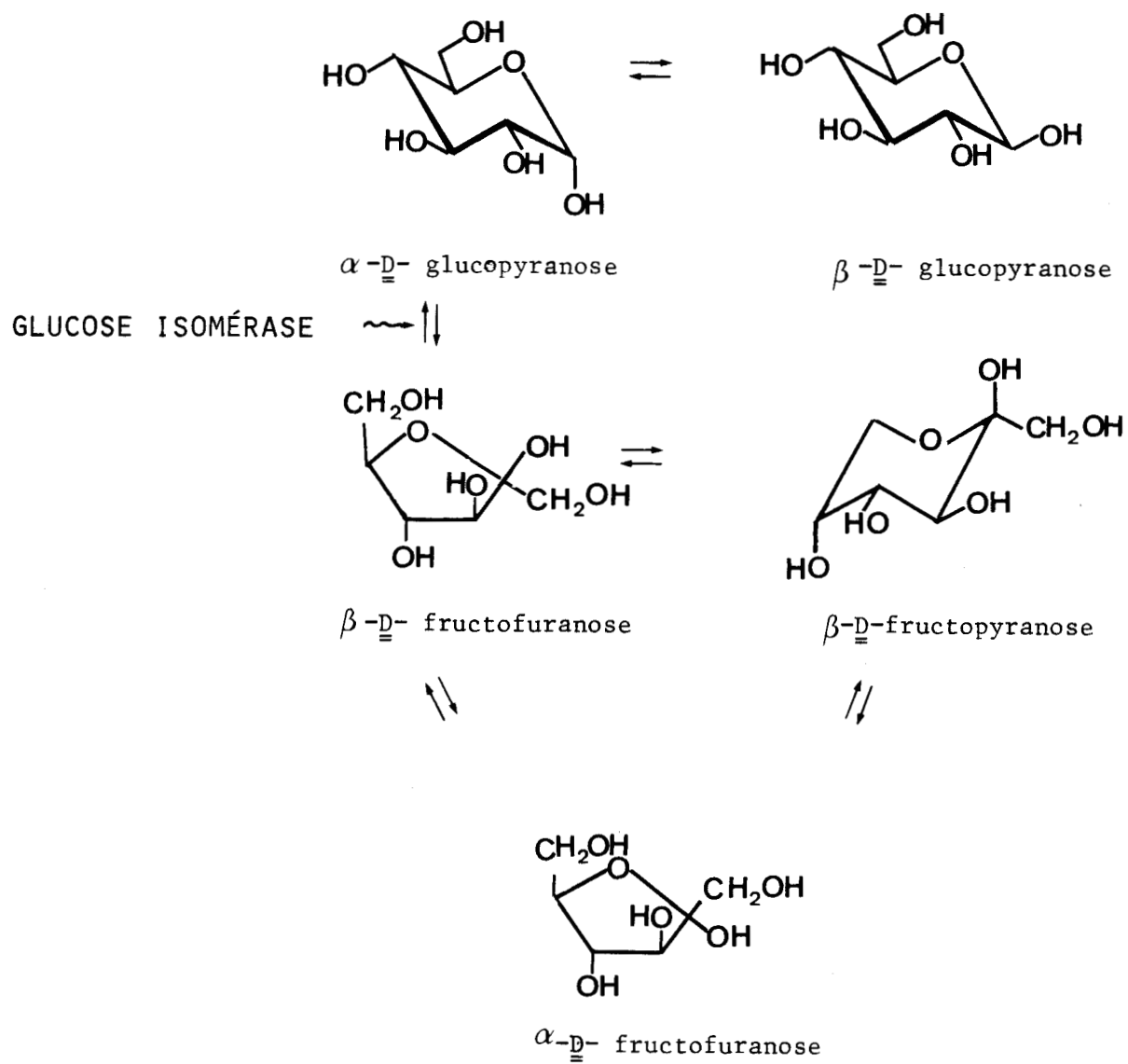
#### 4-3) PROPRIETES ENZYMATIQUES DE LA GLUCOSE-ISOMERASE

##### 4.3.1 Spécificité de l'enzyme

###### a) Spécificité anomérique :

La glucose-isomérase catalyse l'isomérisation réversible du glucose en fructose. Elle est spécifique de la forme  $\alpha$ -D-glucopyranose et le produit obtenu est le  $\beta$ -D-fructofuranose (35,100,40) comme le montre le schéma 3 page 29. Mais le substrat originel de l'enzyme est le D-xylose transformé réversiblement en D-Xylulose.

.../...



**SCHEMA 3 : SPÉCIFICITÉ ANOMÉRIQUE DE LA GLUCOSE ISOMÉRASE**

.../...

b) spécificité de substrat :

D'autres monosaccharides tels que des pentoses, hexoses, désoxysucres et monosaccharides phosphorylés ont été testés en tant que substrats potentiels de l'enzyme. Les derniers ne le sont pas. Par contre des pentoses tels que le D-xylose, le D-ribose, le L-arabinose, et leurs cétooses respectifs, ainsi que le L-rhamnose sont isomérisés (110,136,58,21)

Quand les groupements hydroxyles des carbones 3 et 4 sont en position équatoriale, (cas du glucose et du xylose) on obtient le maximum d'isomérisation.

L'étude de BOCK et coll. (1983) met en évidence que des modifications mineures au niveau du C<sub>3</sub> (3-désoxy ou 3 O-méthylglucose) ne modifient pas la réaction d'isomérisation. Par contre, la position de l'hydroxyle, qui doit être libre, sur le carbone 4 est primordiale (6).

La configuration "trans" des hydroxyles sur le C<sub>2</sub> et le C<sub>4</sub> participe à l'isomérisation. Ainsi, D-galactose, D-lyxose, D-arabinose ne sont pas des substrats, ni des inhibiteurs de l'activité enzymatique.

Les constantes d'affinité (Km) ont été déterminées pour le glucose, le xylose et le ribose. Elles varient selon la souche productrice de l'enzyme et sont de 0,086 à 0,92 ; 0,005 à 0,093 ; 0,35 à 0,67 M respectivement. Une certaine précaution doit être prise pour comparer ces enzymes, car les conditions expérimentales (nature du système tampon utilisé, pH, concentration et qualité des métaux activateurs utilisés) ne sont pas identiques. L'affinité plus faible pour le glucose est à relier au fait que l'on est en présence de la xylose-isomérase.

4.3.2 Mécanisme d'action :

Toutes les études de glucose isomérases isolées de différentes souches, concluent, de façon unanime, que la présence d'ions divalents est nécessaire pour l'expression de l'activité.

Plusieurs études du mécanisme d'action ont été conduites en utilisant la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) pour mettre en évidence à la fois la spécificité de substrat et les interactions entre le substrat, le site actif de l'enzyme et le métal.

.../...



.../...

YOUNG et coll.(1975) ont ainsi conclu que deux petits ligands (molécule d'eau par exemple) interviennent pour la liaison du métal et celle du substrat pour former avec l'enzyme, le complexe ternaire actif (110,140).

Par contre, l'utilisation de l'eau lourde,  $D_2O$ , montre qu'il n'y a pas d'incorporation de deutérium dans la composition du produit. Il y a donc besoin en solvant mais pas d'échange et seulement un transfert stéréospécifique des protons du  $C_2$  du glucose sur le  $C_1$  du fructose (6,94).

#### 4-4) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

\* la température : la plupart des glucose isomérases décrites présentent une température optimale comprise entre 70 et 80°C. (tableau 8 page 32 )

\* pH optimum : compris entre pH 7,5 et 9,0 pour la majeure partie des isomérases décrites, il est parfois plus faible pour certaines (pH 6 - 7)

Nous avons vu que ces conditions ne sont jamais utilisées en pratique (cf. page 11) pour des problèmes d'instabilité des sucres et de l'enzyme.

De plus dans ces conditions, un monosaccharide non métabolisable, le D-psicose, apparait dans la solution isomérisée. Pour pallier ce problème, il est nécessaire que le temps de réaction soit le plus court possible et que le pH du sirop isomérisé sortant soit rapidement abaissé après réaction.

##### 4.4.2 Exigences en ions métalliques :

La glucose isomérase a besoin de cations divalents, tels que  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ou une combinaison de ceux-ci pour exprimer son activité.

$Mn^{2+}$  est mentionné pour les bactéries (Bacillus, Lactobacillus...), alors que les isomérases de Streptomyces préfèrent le  $Mg^{2+}$  et/ou  $Co^{2+}$ . (tableau 8 page 32 ).

Par dialyse à l'équilibre DANNO (22) a montré que l'enzyme de B. coagulans présente 4 sites de fixation de métal par molécule d'enzyme. TAKASAKI a trouvé le même résultat pour l'enzyme de St. albus (16), et

.../...

TABLEAU 8 : PROPRIÉTÉS DES GLUCOSE ISOMERASES (XYLOSE ISOMÉRASES)

|                                   | STREPTOMYCES<br>OLIVOCHROMOGE-<br>NES (10)             | STREPTOMYCES<br>FLAVOGRISEUS<br>(13)                  | LACTOBACILLUS<br>BREVIS<br>(137)       | STREPTOMYCES<br>ALBUS<br>(116)   | STREPTOMYCES<br>GRISEOFUSCUS<br>(51)   | BACILLUS<br>COAGULANS<br>(22)                                  |                   |
|-----------------------------------|--|---|--|--|--|--|-------------------|
| SPECIFICITE DU SUBSTRAT           | D-Glc, D-Fru<br>Xylulose                               | D-Glc,<br>D <sub>5</sub> Xyl                          | D-Xyl, D-Rib<br>D-Glc                  | D-Glc,<br>D-Xyl  | D-Xyl,<br>D-Glc, D-Rib   | D-Glc,<br>D-Xyl, D-Rib   |                   |
| $K_m$                             | D Glc<br>D Xylose                                      | 0,25 M<br>0,033 M                                     | 0,249 M<br>0,078 M                     | 0,92 M<br>0,005 M  | 0,16 M<br>0,032 M  | 0,22 M<br>0,054 M  | 0,09 M<br>0,077 M |
| $V_{max}$<br>( $\mu$ mole/min/mg) | D Glc<br>D Xylose                                      | 5,33<br>21,84   |  |  | 17,6<br>44,2   |  |                   |
| Température optimale              | 80°C   | 70°C  | -                                      | 80°C   | 85°C   | 75°C   |                   |
| Thermostabilité (100 p.100)       | 55°C pdt 30 min  | 70°C pdt 10 min                                       | 60°C pdt 30 min                        | 70°C pdt 10 min  | 80°C pdt 30min   | 70°C pdt 10 min  |                   |
| pH optimum                        | 8 - 10   | 7,5   | 6 - 7                                  | 8 - 8,5  | 8,5  | 7,0  |                   |
| Stabilité au pH                   | > 4  | 5 < pH < 11,0   | -                                      | 4,5 < pH < 11  | 5 < pH < 11  | -  |                   |
| Métaux activateurs                | Mg <sup>++</sup> , Co <sup>++</sup>                    | Mg <sup>++</sup> , Co <sup>++</sup>                   | Mn <sup>++</sup> , (Co <sup>++</sup> ) | Co <sup>++</sup> , Mg <sup>++</sup>  | Mg <sup>++</sup> , Co <sup>++</sup>  | Mg <sup>++</sup> , Co <sup>++</sup> , Mn <sup>++</sup>         |                   |
| Inhibiteurs                       | Mn <sup>++</sup> , Zn <sup>++</sup> , Cu <sup>++</sup> | Ag <sup>+</sup> , Cu <sup>++</sup> , Mg <sup>2+</sup> | EDTA                                   | Ag <sup>++</sup> , Hg <sup>++</sup> , Cu <sup>++</sup><br>Sorbitol<br>Mannitol | Zn <sup>++</sup> , Fe, Mg <sup>++</sup><br>Cu <sup>++</sup> , Cd <sup>++</sup> EDTA<br>polyols, D-Man<br>D gal, L-Ara,<br>Tris | Cu <sup>++</sup> , Ca <sup>++</sup> , Ni <sup>++</sup><br>Tris |                   |

.../...

KASUMI et coll. pour celle de St. griseofuscus (55), tous deux par mesure d'absorption atomique. L'étude de KASUMI et coll. (55) a mis en évidence que 3 atomes sont facilement éliminés sans affecter l'activité alors que le quatrième est indispensable : l'arracher ne peut se faire que par des moyens drastiques qui entraînent une dénaturation irréversible de l'enzyme..

#### Rôle du métal :

Le métal est défini comme ayant plus un rôle structural que catalytique (24,140). Il servirait donc pour la mise en conformation de l'enzyme et le site actif serait ainsi de taille à fixer le substrat.

Les études de cinétiques de l'isomérisation en fonction de la présence de métal donnent néanmoins des résultats différents selon l'origine de l'enzyme. La fixation du métal dans le cas de l'enzyme de L. Brevis est décrite comme étant un mécanisme bi-bi ordonné : le substrat ne peut se fixer que sur le complexe enzyme-métal (138). Ces résultats ont été confirmés par RMN (101,140)

Par contre, le mécanisme a été décrit comme étant de type bi-bi aléatoire entre les deux "substrats" (glucose et métal) dans le cas de St. griseofuscus (54).

Dans le cas de B. coagulans, DANNO (24) a mis en évidence que le cation ne modifie pas le Km de l'enzyme et de ce fait est un activateur vrai.

Par contre pour l'isomérase de St. griseofuscus, KASUMI et coll. (54) obtiennent des cinétiques différentes : la fixation du métal favorise celle du substrat et vice et versa. Il y a donc variation de Km.

De plus, les glucose-isomérases sont activées par au moins deux métaux, soit le  $Mg^{2+}$  et le  $Co^{2+}$  soit le  $Mn^{2+}$  et le  $Co^{2+}$  ou les trois. Le cobalt présente dans tous les cas près de 10 fois plus d'affinité pour l'enzyme ( $K_a \simeq 10^{-4} M$ ) que les autres cations.

Quand les deux métaux sont présents dans le milieu, deux cas de figure sont reportés ; il peut y avoir :

- \* compétition : c'est le cas de l'isomérase de St. griseofuscus (54)
- \* fixation des deux métaux de façon incompétitive à différents sites de la molécule, comme dans le cas de l'enzyme de St. albus (98) et de B. coagulans (24).

Dans le cas de B. coagulans, le cobalt augmente les vitesses d'isomérisation du glucose et du ribose, alors que le manganèse active davantage l'isomérisation du xylose (24). Il en est de même pour L. brevis (138,4)

Par contre, les isomérases de Streptomyces albus (58), de St. flavogriseus (13) et de St. griseofuscus sont près de deux fois plus actives sur le glucose lorsqu'elles travaillent en présence de magnésium.

Les autres cations, tels que les métaux lourds sont inhibiteurs de l'activité (tableau 8 page 32).

#### 4.4.3 Stabilité de l'activité enzymatique :

L'étude de stabilité de l'enzyme vis à vis de différents facteurs est conduite généralement en travaillant sur l'enzyme débarassée de métaux ou l'enzyme saturée en métal.

En effet, les cations engendrent une modification de la conformation du site actif mais aussi de la protéine entière (ceci a été montré par variations de fluorescence et par modifications de spectre de dichroïsme circulaire).

##### \* stabilité à la température :

La glucose isomérase d'une façon générale est thermostable. Elle conserve son activité à des températures de l'ordre de 65 à 75°C et mieux encore lorsqu'elle est sous forme de complexe binaire enzyme-métal, le cobalt étant encore plus protecteur que les autres métaux. Par exemple, l'enzyme de St. griseofuscus présente encore 70p.100 d'activité résiduelle après 30 minutes de traitement à 90°C en présence de cobalt, alors que, sans addition de métal, l'activité retrouvée est de 50 p.100 et en présence de magnésium, l'enzyme est totalement destabilisée (54).

##### \* stabilité au pH :

L'enzyme est stable dans la gamme de pH 5 à 10,0 (tableau 8 page 32) Peu d'études de ce type de stabilité ont été conduites.

#### 4.4.4 Propriétés physiques de quelques glucose isomérases :

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 9 page 35.

On constate que les glucose isomérases, bien qu'elles soient isolées de micro-organismes différents, présentent des propriétés assez voisines. Elles constituent donc un groupe d'enzymes homogène .

La masse moléculaire est toutefois assez variable (entre 120.000 et 190.000 dalton).

TABLEAU 9 : PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DE GLUCOSE ISOMÉRASES

|  | BACILLUS<br>COAGULANS<br>(22) | St. OLIVOCROMO-<br>GENES<br>(110) | B. STEAROTHERMO-<br>PHILUS<br>(110) | St. GRISEOFUS-<br>CUS<br>(52) | LACTOBACILLUS<br>BREVIS<br>(137) |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Point isoélectrique                                      | 4,9                           | ND                                | ND                                  | 4,0                           | ND                               |
| Coeff. de sédimenta-<br>tion ( $S_{20,w}$ )              | 10,4 S                        | 7,55 S                            | 9,35 S                              | 8,50 S                        | 8,0 S                            |
| Coeff. de diffusion<br>( $10^{-7}$ cm <sup>2</sup> /sec) | ND                            | 5,87                              | 6,82                                | 4,60                          | 4,00                             |
| rayon de Stockes   | 35,4Å                         | 51 Å                              | 53 Å                                | 47,3Å                         | -                                |
| Coeff. d'extinction<br>( $E_{1cm}^{1\%}$ )               | 10,6                          | ND                                | ND                                  | 11,4                          | 10,0                             |
| Volume spécifique<br>(Ml/g)                              | 0,705                         | 0,725                             | 0,736                               | 0,730                         | 0,690                            |
| Masse moléculaire<br>( $10^3$ daltons)                   | 175                           | 120                               | 130                                 | 180                           | 157                              |

#### 4.4.5 Structure de la glucose isomérase

Certains auteurs ont déterminé la composition en acides aminés . Les proportions annoncées sont relativement homogènes. (tableau 10 p.37) Les différences proviennent essentiellement du nombre de fonctions thiol que renferment les différentes glucose isomérases : de 0 à 6 moles de SH par mole d'enzyme. (tableau 11 P. 37)

Parmi celles qui contiennent des demi-cystines, seule l'isomérase de St. griseofuscus en présente six dont quatre associées sous forme de deux ponts disulfures intrachaines (53).

Par ailleurs, aucune des glucose-isomérases contenant des groupements sulphydryls libres n'est inhibée par les réactifs spécifiques (PCMB, NEM, Iodoacétate...)

- La structure quaternaire de l'enzyme a été par contre beaucoup plus étudiée. Bien que les masses moléculaires apparentes des différentes glucose isomérases soient quelque peu hétérogènes, les auteurs annoncent néanmoins une structure tétramérique.

Néanmoins, SUEKANE et coll. (11) ont avancé que la glucose isomérase de St. olivochromogenes est composée de 2 sous unités de 56 000 Daltons.

La masse moléculaire de la sous unité est comprise entre 40 et 50 000 daltons.

Les glucose-isomérases sont décrites comme étant composées de sous unités identiques ou très similaires , de même masse moléculaire et dimension.

Le NH<sub>2</sub> terminal a été déterminé et, unique par tétramère, il varie selon l'origine de l'enzyme : Méthionine pour St. albus (42) Sérine pour St. griseofuscus S-41 (53).

BRIGGS et coll. ont récemment décodé le gène de E. coli porteur de la séquence nucléotidique correspondant à la glucose isomérase. Le fragment de 1,6 k bases porte le code d'un poly-peptide de 333 résidus d'acides aminés (9).

A noter que c'est approximativement la taille moyenne d'un monomère de glucose isomérase selon les valeurs obtenues par les moyens biochimiques. (Tableau 10 page 37).

TABLEAU 10 : COMPOSITION EN ACIDES AMINES

DE GLUCOSE ISOMÉRASES

(Résidus/mole)

| SOUCHE                        | B. COAGULANS (22) | ST. GRISEOFUSCUS (52) | ST. OLIVOCROMOGÈNES (110) | B. STÉAROTHERMOPHILUS (010) |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Masse moléculaire (K Daltons) | 130               | 180                   | 120                       | 130                         |
| Acide aspartique              | 182               | 181                   | 100                       | 100                         |
| Thréonine                     | 87                | 79                    | 46                        | 55                          |
| Sérine                        | 70                | 36                    | 24                        | 41                          |
| Acide glutamique              | 136               | 176                   | 89                        | 112                         |
| Proline                       | 44                | 87                    | 46                        | 27                          |
| Glycocolle                    | 106               | 157                   | 84                        | 80                          |
| Alanine                       | 140               | 214                   | 114                       | 86                          |
| Demi-cystine                  | 0                 | 6                     | 0                         | 0                           |
| Méthionine                    | 27                | 70                    | 16                        | 19                          |
| Valine                        | 53                | 29                    | 47                        | 54                          |
| Isoleucine                    | 51                | 45                    | 30                        | 39                          |
| Leucine                       | 135               | 166                   | 88                        | 92                          |
| Tyrosine                      | 58                | 37                    | 19                        | 45                          |
| Phénylalanine                 | 96                | 97                    | 49                        | 62                          |
| Tryptophane                   | 13                | 38                    | 14                        | 16                          |
| Histidine                     | 49                | 52                    | 22                        | 29                          |
| Lysine                        | 120               | 128                   | 25                        | 63                          |
| Arginine                      | 61                | 27                    | 73                        | 43                          |
| TOTAL                         | 1428              | 1625                  | 886                       | 964                         |

TABLEAU 11 : GROUPEMENTS THIOLS DE GLUCOSE ISOMÉRASE

| SOUCHE                | AUTEUR          | REFERENCE | SM LIBRES TOTAUX      | S-S             | METHODE DE DETERMINATION                    | INHIBITEUR                                   |
|-----------------------|-----------------|-----------|-----------------------|-----------------|---|--|
| St. griseofuscus      | KASUMI          | 1981      | 2 mole/mole (180.000) | 2 (intrachaine) | DTNB. dénât. GuHCl 1/2 Cys<br>= 6 SH totaux | PCMB → 0                                     |
| St. olivochromogènes  | SUEKANE         | 1978      | 0                     | 0               | 1/2 Cystine (hydrolyse HCl)                 |  |
| B. stéarothermophilus | SUEKANE         | 1978      | 0                     | 0               | 1/2 Cystine (hydrolyse HCl)                 |  |
| Pasturella pestis     | SLEIN           | 1962      | ND                    | ND              |   | besoin réducteur<br>PCMB, NaM<br>Iodoacétat. |
| St. albus             | HOGHE-ANGELETTI | 1975      | 4 mole/mole (157000)  | 0               | DTNB (dénaturé Gu-HCl)                      |  |
| B. coagulans          | DANNO           | 1967      | 0                     | 0               | 1/2 Cystine (hydrolyse HCl)                 | PCMB → 0                                     |
| L. Brevis             | YAMANAKA        | 1968      | 0                     | 0               | 1/2 Cystine (hydrolyse HCl)                 |  |

Relation structure - activité :

L'activité de la glucose isomérase a été étudiée par certains auteurs en présence de dénaturants tels que le SDS, la guanidine -HCL, l'urée.

Tous sont en accord pour montrer que les sous unités sont reliées par des liaisons faibles , il n'y a pas de pont disulfure inter-chaine et que la perte d'activité correspond à une dissociation de l'édifice moléculaire .

La réversibilité de l'inactivation par dissociation a été approfondie dans certains cas mais les résultats ne sont pas homogènes selon les souches étudiées :

DANNO (25) indique que dans le cas de B. coagulans, les ions métalliques tels que  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  qui sont des protecteurs vis à vis de la dénaturation thermique, favorisent la dissociation de l'enzyme par le SDS.

Par contre, KASUMI et coll.(1981) (53) montrent que  $CO^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  ne favorisent pas cette action dissociante du SDS sur l'isomérase de St. griseofuscus. Au contraire , le Cobalt protège la structure quaternaire de l'enzyme native.

De la même façon, le profil d'inactivation de l'isomérase de St. griseofuscus S-41 par la guanidine-HCL est différent de celui de B. coagulans. Pour la seconde, une concentration en Guanidine-HCL inférieure ou égale à 4,0 M entraîne une dissociation réversible et pour une concentration de 5,8 M, une dissociation irréversible. (25)

La dénaturation par l'urée est comme dans le cas du SDS, fonction du pH (55). Elle est réversible après dilution de l'urée 8M à condition toutefois que l'action de l'urée ne soit pas testée à un pH inférieur à pH 5,0 sauf si l'enzyme est saturée en Cobalt (55,25).

Ainsi les glucose isomérases isolées de différents microorganismes présentent des points communs : elles sont toutes intracellulaires, elles sont thermostables et stables au pH surtout alcalin et isomérisent la glucose bien que leur substrat préférentiel soit le xylose. Pour ce faire, la présence de métaux est indispensable : au nombre de quatre, ils semblent jouer plus un rôle structural que catalytique, notamment pour la mise en conformation du site de catalyse. L'enzyme ne semble fonctionner que lorsqu'elle est sous forme oligomérique et est sensible aux métaux contaminants et aux polyols.



.../...

Sa structure quaternaire est peu rigide et une dissociation en monomères correspond à une perte d'activité.

Par ailleurs ces glucose isomérases présentent aussi des différences selon la souche productrice : le tétramère présente une masse moléculaire variable (de 120 à 190 K daltons) et la dissociation réversible ne s'opère pas dans les mêmes conditions. Le rôle des métaux dans les cinétiques d'isomérisation ne semble pas constant de même que leurs sites de fixation ne semblent pas identiques.

De plus, ces cations jouent un rôle important dans la spécificité de substrat et selon la souche présentant l'activité, c'est tantôt le magnésium, tantôt le cobalt ou le manganèse qui présente les maxima d'isomérisation du glucose.

Enfin, du point de vue stabilité de l'activité, certaines enzymes notamment de Streptomyces sp présentent des fonctions thiols alors que d'autres pas. Les premières sont donc potentiellement sensibles à l'oxydation donc plus fragiles.

L'intérêt commercial de l'utilisation industrielle de la glucose isomérase incite donc à bien maîtriser les paramètres de l'enzyme. Ce n'est donc qu'après avoir purifié l'enzyme que l'on peut, à partir de préparations homogènes, mettre à jour ses différentes propriétés. Certaines seront communes aux glucose isomérases décrites, d'autres pas.

# TRAVAUX PERSONNELS

## I) LE MICRO-ORGANISME ET LE MILIEU DE CULTURE

Le micro-organisme étudié est Streptomyces violaceoniger qui a été sélectionné par le laboratoire de microbiologie des Etablissements ROQUETTE FRERES.

Cet actinomycète a été cultivé pendant 50 heures à 30°C sur un milieu dont la composition est la suivante :

|                          |                               |                        |
|--------------------------|-------------------------------|------------------------|
| <u>Source d'azote</u>    | : Corn Steep (50 p.100 de MS) | 70 g.l <sup>-1</sup>   |
| <u>Source de carbone</u> | : Maltodextrines MD05         | 20 g.l <sup>-1</sup>   |
|                          | Xylose                        | 48 g.l <sup>-1</sup>   |
| <u>Minéraux</u>          | : Sulfate de magnésium        | 1 g.l <sup>-1</sup>    |
|                          | Chlorure de cobalt            | 0,08 g.l <sup>-1</sup> |

La présence de xylose est indispensable à cette souche pour induire la production de glucose isomérase.

Les fermentations sont conduites en aérobiose par agitation continue et bullage d'air à 1 v.v.m. (volume par volume par minute)

La culture est réalisée en fermenteur de 2 l. ou de 20 l. (volumes utiles de 1,4 et 15 l. respectivement).

## II) DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ GLUCOSE ISOMÉRISE

### 2-1) L'ISOMERISATION :

L'activité de la glucose isomérase a été mesurée par colorimétrie après une isomérisation dans un milieu dont la composition est la suivante :

|  | (ml)      | concentration finale |
|--|-----------|----------------------|
| Tampon phosphate de sodium pH 7,5, 50 mM | 0,5       | 12,5 mM              |
| D- Glucose (ALDRICH)                     | 3,2 M 0,5 | 0,8 M                |
| Chlorure de magnésium (MERCK)            | 0,04M 0,5 | 10 mM                |
| Eau distillée                            | 0,5       |                      |
| Solution enzymatique                     | 0,04      |                      |

.../...

.../...

Après une pré-incubation de 5 minutes à 58°C de la solution enzymatique en présence du tampon phosphate, la réaction est déclenchée en ajoutant le magnésium et le substrat. L'isomérisation est de une heure à 58°C. La réaction est arrêtée par addition de 4 ml d'acide perchlorique (R.P. CARLO ERBA) 0,5 N et le fructose formé est dosé par la méthode de DISCHE et BORENFREUND (30).

## 2-2) DOSAGE DU FRUCTOSE PAR COLORIMETRIE :

La méthode utilisée est la méthode à la cystéine-carbazole.

### a) Réactifs

\* solution de chlorhydrate de cystéine : la solution doit être impérativement préparée extemporanément en dissolvant 0,75 g de chlorhydrate de L-cystéine (ALDRICH-EUROPE) dans de l'eau distillée q.s;q 50 ml.

\* solution de carbazole : 120 mg de carbazole ( PROLABO) sont dissous dans 100 ml d'éthanol absolu. Etant donné que nous avons utilisé une micro-méthode, il est nécessaire d'utiliser de l'éthanol absolu et non à 95°, afin d'éviter la formation d'un léger trouble néfaste pour la lecture spectrophotométrique. Cette solution peut être conservée un mois à 4°C.

\* solution d'acide sulfurique : on ajoute 450 ml d'acide sulfurique (NORMAPUR) à 190 ml d'eau distillée de façon à obtenir une solution à 65 p.100.

### b) Mode opératoire

A 200  $\mu$ l de milieu réactionnel, préalablement dilué du 1/5° au 1/50° selon l'activité, on ajoute 40  $\mu$ l de la solution de chlorhydrate de cystéine. Après agitation, on ajoute 40  $\mu$ l de solution de carbazole et, après agitation, on verse 1,2 ml de la solution d'acide sulfurique. Après agitation et incubation de 30 minutes à 40°C, les tubes sont refroidis rapidement et la lecture de la densité optique est effectuée à 560 nm dans les 15 minutes qui suivent.

### c) Résultats

Avant d'utiliser cette micro-méthode, nous avons vérifié que l'on obtient les mêmes résultats qu'avec les volumes originaux préconisés par DISCHE et BORENFREUND (30). Le fait d'avoir diminué tous les volumes de réactifs d'un facteur 10 ne modifie pas la précision du dosage.

Les courbes étalon, montrent que la loi de BEER-LAMBERT est respectée pour des concentrations en fructose comprises entre 10 et 110  $\mu\text{g}$  par ml.

Le glucose interfère légèrement avec le dosage, et c'est la raison pour laquelle un témoin substrat, ainsi qu'un témoin enzyme sont toujours dosés de façon à minimiser l'erreur.

Une unité glucose isomérase (U) est définie comme étant la quantité d'enzyme produisant 1 mg de fructose dans les conditions décrites page 40

### III) ESTIMATION DE LA QUANTITÉ DE PROTÉINES

La quantité de protéines a été déterminée selon la méthode au bleu de COOMASSIE (8). La méthode de LOWRY (71) a seulement été utilisée pour l'enzyme purifiée (les interférences en début de purification sont trop nombreuses (32,92)). La courbe étalon a été tracée en utilisant la sérum albumine bovine (B.S.A.) comme témoin pour les deux méthodes.

Les repérages lors des différents fractionnements chromatographiques ont été effectués par lecture de la densité optique à 280 nm.

### IV) ELECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE :

Les électrophorèses en plaques (10 X 13 cm) ont été réalisés en présence de SDS 0,1 p.100 selon la méthode de WEBER et coll. (131) modifiée par KERKAERT (56). Le gel utilisé est soit homogène à 7,5 p.100 soit, dans la plupart des cas sous forme de gradient 5-25 p.100, ce qui permet d'obtenir une meilleure résolution.

Les échantillons sont traités dans un tampon contenant du SDS (B.D.H) (64) 5 p.100 pour être dénaturés totalement, ils sont portés à 100°C, 4mn en présence d'EDTA 5mM. Des dépôts de 10  $\mu\text{l}$  sont réalisés pour des solutions contenant 0,2 mg de protéines par ml.

L'électrophorèse est conduite à courant constant de 40 mA jusqu'à ce que le marqueur (bleu de bromophénol) ait migré jusqu'en bas du gel. (2H30 de migration).

Ensuite le gel est coloré par la méthode au nitrate d'argent de Morissey (80).

La calibration est réalisée en utilisant le kit de Pharmacia.

N.B : Lors de la détermination de la masse moléculaire en gel homogène de 7,5 P.100 en acrylamide, du  $\beta$ mercaptoéthanol est ajouté dans les échantillons de façon à ne pas avoir de variation de mobilité par rapport aux témoins de masse qui en contiennent 4,5 p.100.

A noter enfin, que la présence de ce réducteur entraîne l'apparition d'artéfacts (bandes à 68 et 54 K daltons) lors de la révélation, surtout au nitrate d'argent (121)

## V) ISOÉLECTROFOCALISATION :

La détermination du point isoélectrique a été déterminée en veine liquide dans une colonne modèle 8101 (LKB 110 ml) contenant un mélange d'ampholines (LKB) pH 3,5 - 10 (Anode en bas). Le gradient, en Ethylène Glycol est coulé à  $60 \text{ ml. h}^{-1}$  et l'enzyme introduite dans la solution légère. Après focalisation pendant 66 heures à  $2^{\circ}\text{C}$  à puissance constante de 11 W, la solution est éluée à  $60 \text{ ml. h}^{-1}$  en fractions de 2 ml. Le pH et l'absorbance à 280 nm ont été reportés pour chaque fraction ainsi que l'activité du pic obtenu.

## VI) DOSAGE DES FONCTIONS THIOLS :

La quantité de thiols a été déterminée selon la méthode au DTNB de ELLMAN (34) en utilisant un spectrophotomètre Cary 219 VARIAN double faisceau muni de cuves à deux compartiments.

Le SDS a été choisi comme agent dénaturant pour doser les groupements thiols libres totaux ( 28, 39 ).

Un compartiment de la cuve contient 1 ml de DTNB (ALDRICH) 10 mM, EDTA 10 mM pH 7,0, l'autre contient l'échantillon (au minimum  $0,02 \mu$  mole de SH) en solution dans un tampon tris-glycocolle 50 mM pH 9,0, SDS 2 p.100, EDTA 10 mM (Cet échantillon a préalablement été porté à ébullition pendant 4 minutes pour doser les thiols totaux).

Les thiols libres apparents sont dosés en absence de SDS et sans traitement thermique.

Le zéro est ajusté par rapport à la cuve de référence contenant les mêmes réactifs sans protéine. Puis après mise en contact par agitation de la cuve échantillon, l'absorbance à 412 nm est enregistrée.

.../...

La méthode a été vérifiée en utilisant une gamme de chlorhydrate de cystéine (ALDRICH). La loi de Beer-Lambert est respectée pour des quantités inférieures ou égales à  $0,2 \mu$  mole de SH dans le milieu réaction de 2ml.

Le coefficient d'extinction molaire a été déterminé expérimentalement (3 essais) et utilisé pour le calcul.

La coloration est stable pendant au moins une heure. La présence d'EDTA dans le milieu inhibe l'auto-oxydation des thiols (2).

## VII) IMMUNO-ELECTROPHORÈSE MONODIMENSIONNELLE

### 7-1) PREPARATION DE L'IMMUNSERUM TOTAL :

L'antisérum est préparé par le laboratoire de ROQUETTE FRERES par injection intra-dermique à un lapin (Néo-zelandais, femelle de 3 kg environ) selon la méthode VAITUKAITIS. (x)

La solution injectée est composée de 0,9 à 2,5 mg de protéines dans 1,5 ml, 1,5 ml de sérum physiologique et 3 ml d'adjuvant complet de Freud. (ACF).

L'antisérum total est préparé à l'aide d'un extrait brut débarassé des acides nucléiques et mucopolysaccharides.

Le sang, prélevé à la veine de l'oreille (8 ml), est laissé une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  et centrifugé le lendemain.

Le premier prélèvement a lieu 1 mois après l'injection et un rappel en sous-scapulaire (0,5 ml d'ACF, 0,5 ml de sérum physiologique, 1,5 ml de solution enzymatique) a lieu le lendemain. Par la suite, les prélèvements ont lieu tous les 15 jours jusqu'à abattage.

Le sérum obtenu est conservé congelé. Les différents prélèvements sont rassemblés et les anticorps précipités à pH 7,0 par du sulfate d'ammonium à 40 p.100. Le culot de centrifugation est repris dans un volume minimal de tampon PBS ( $\text{Tp PO}_4$  5mM pH 7,4, NaCl 9 p.1000) et dialysé contre ce même tampon 48 h à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Le volume final d'antisérum est de 54 p.100 du volume initial traité.

L'antisérum est réparti en fraction de 1 ml et conservé congelé.

### 7-2) IMMUNOELECTROPHORESE MONODIMENSIONNELLE

La méthode utilisée est de SCHEIDEGGER (99a). L'agar est coulé à raison de 1 ml/cm de longueur sur une plaque de 8,5 x 20 cm.  $5 \mu\text{l}$  des solutions de protéine d'une concentration de  $0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$  sont déposés dans des puits décentrés à 1/3 de la largeur de la plaque. L'électrophorèse

.../...

est conduite pendant 20 min. à  $15 \text{ V.cm}^{-1}$ .

$50 \mu\text{l}$  d'antisérum préalablement dilué au 1/10<sup>e</sup> sont déposés dans les gouttières pratiquées dans le gel.

Après diffusion 48 heures en chambre humide, la plaque est lavée, séchée et colorée au réactif à l'Amidoschwartz.

## VIII) COMPOSITION CHIMIQUE EN OSES :

Le dosage des sucres est réalisé par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

La technique de ZANETTA et coll. (141) a été utilisée pour préparer les échantillons.

1,5 ou 3 mg de protéines dosées et 20  $\mu\text{g}$  de mésoinositol (témoin interne) sont lyophilisés dans un tube Sovirel. Les produits sont méthanolysés 24 heures à  $80^\circ\text{C}$  par un mélange de méthanol-acide chlorhydrique 0,5 N. Le tube est alors refroidi. Après délipidation par l'heptane (3 fois), les réactifs sont évaporés sous courant d'azote. Le résidu sec est repris par  $50 \mu\text{l}$  de dichlorométhane,  $50 \mu\text{l}$  d'anhydride trifluoroacétique et porté 5 minutes à  $150^\circ\text{C}$  dans un bain de sable.

Le tube est refroidi et porté à nouveau 5 min. à  $150^\circ\text{C}$ .  $7 \mu\text{l}$  sont alors injectés dans une colonne de verre remplie de silicone OV-210 sur support Chromosorb W (H.P.) à 5 p.100 (100-120 mesh). Le chromatographe utilisé est de type Varian modèle 2100.

Les paramètres analytiques sont les suivants :

- température du détecteur et de l'injecteur :  $200^\circ\text{C}$
- gradient de température : 100 à  $220^\circ\text{C}$  ;  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ .
- gaz vecteur (azote) 10 ml/min.

## IX) TEMPÉRATURE OPTIMALE ET THERMOSTABILITE

\* La température optimale a été étudiée pour un temps d'isomérisation d'une heure à différentes températures (de  $60$  à  $90^\circ\text{C}$ ). Un témoin substrat a été porté dans les mêmes conditions pour apprécier la dégradation du glucose.

\* La thermostabilité a été étudiée pour une incubation de 30 minutes aux différentes températures en présence de cobalt 1,7 mM ou de magnésium 10 mM à pH 7,5. L'activité résiduelle est ensuite déterminée selon le protocole décrit page 40.

Pour les températures de  $60$  et  $70^\circ\text{C}$ , la stabilité a été étudiée en fonction du temps. Un échantillon est prélevé, refroidi dans un bain de glace et l'activité résiduelle est mesurée selon la méthode habituelle.



## X) PH OPTIMUM-ET STABILITÉ AU PH :

10-1) LE pH OPTIMUM a été déterminé selon le protocole décrit page 40 en utilisant différentes solutions tampon 50 mM :

|                            | gamme de pH |
|----------------------------|-------------|
| Tampon phosphate de sodium | 5,8 - 8,0   |
| Tampon tris maléate        | 6,0 - 8,5   |
| Tampon tris-HCL            | 7,0 - 9,5   |
| Tampon glycine - NaOH      | 8,5 - 10,5  |

10-2) LA STABILITE AU pH a été étudiée dans la zone acide, pour des solutions enzymatiques préalablement débarassées de métal ou saturées en cobalt ou en magnésium. Elles sont obtenues en les pré-incubant 45 minutes à 37°C en présence d'EDTA 40 mM, ou de  $MgCl_2$  80 mM ou de  $COCl_2$  8 mM;

Une aliquote de chacune de ces solutions est alors placée dans différentes conditions de pH ; de la même façon, l'étude a été complétée par l'influence du SDS 1p.100 ou du NaCl 2M sur la stabilité au pH.

Solutions tampon utilisées :

Tampon acétate de Sodium : pH 3,0 ; pH 4,0 et pH 5,0

Tampon phosphate de sodium : pH 6,0 et pH 7,0

La composition finale du milieu est donc une solution tampon 50 mM renfermant du  $MgCl_2$  10mM ou  $COCl_2$  1 mM ou EDTA 5 mM puis du NaCl 2M ou du SDS 1p.100 (lors de l'étude de l'effet de ces deux agents).

Après incubation d'une nuit à température ambiante, et mesure du pH final du milieu, l'activité résiduelle est analysée pour 40  $\mu$ l de prélèvement selon le protocole décrit page 40.

## XI) CINETIQUES ENZYMATIQUES

La solution enzymatique est diluée dans un Tp  $PO_4$  50 mM pH 7,5 de façon à avoir 1,5 U dans le milieu réactionnel, d'un volume de 2 ml.

L'activité enzymatique est alors déterminée selon le protocole décrit page 40 avec des concentrations finales en glucose de 100, 125, 200, 400, 600 mM.

Les paramètres apparents  $K_m$  et  $V_{max}$  sont déterminés selon la méthode de Lineweaver-Burk (69),  $K_i$  par la méthode de Dixon (31).

### Effet des ions métalliques :

Pour cette étude le milieu est maintenu à pH 7,0 par un tampon MOPS 0,1 M. Ce système tampon a été choisi pour éliminer les risques de formation de complexes minéraux qu'il y a avec le phosphate par exemple.

Le protocole est identique au précédent, avec des concentrations en cations variant de  $10^{-6}$  à  $10^{-1}$  M.

## XIII) EFFET DE DIFFÉRENTS AGENTS SUR L'ACTIVITÉ

Leur influence sur l'activité est étudiée en utilisant le protocole page 40. Le milieu réactionnel est donc composé de Tp  $PO_4$  12,5 mM pH 7,5, Glc 0,8M,  $Mg^{2+}$  10 mM et du réactif à différentes concentrations.

Lorsqu'une pré-incubation est nécessaire, elle est de 30 mn à 37°C avant l'ajout de substrat (glucose + magnésium).

Pour le calcul du  $K_i$ , le protocole décrit ci-dessus est alors utilisé.

## XIV) PRÉPARATION DE L'ENZYME

Toutes les centrifugations lors des étapes de purification sont réalisées à 4°C, pendant 30 minutes à 3450 g.

### 14-1) PRÉPARATION DE L'EXTRAIT BRUT :

Le milieu de fermentation est centrifugé et les extractions sont réalisées sur le culot brut recueilli.

#### a) Comparaison de méthodes :

Différents moyens de libération de l'activité ont été comparés sur un volume de 30 ml de suspension cellulaire, dont 3 ml de réactif.

La suspension mère est obtenue en répartissant la masse M de culot dans 5 X M ml de Tp  $PO_4$  50 mM pH 7,0.

Les réactifs utilisés sont en solution dans l'eau et sont les suivants

### CONCENTRATIONS (p.100)

|                                     | <u>de la solution mère</u> | <u>finale</u> |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------|
| SAPONINE (PROLABO)                  | 0,2                        | 0,02          |
| CHOLATE DE SODIUM (SIGMA)           | 1,0                        | 0,1           |
| TOLUENE (CARLO-ERBA)                | -                          | 1,0           |
| LYSOZYME (SIGMA)                    | 1,5                        | 0,1           |
| CHLORURE DE CETYLPYRIDINIUM (MERCK) | 1,0                        | 0,1           |
| CETAVLON (MERCK)                    | 1,0                        | 0,1           |

Chacune de ces suspensions ont été portées à 50°C ou 30°C dans certains cas et la lyse a été effectuée pendant 1h, 2h et 3h sous agitation douce et continue.

La désintégration des cellules a aussi été réalisée sur le même volume, à 4°C par sonage de 2, 5 et 10 minutes, à amplitude maximale (appareil PG-100 MSE, 150 W muni d'une sonde en titane Ø 9,5 mm).

L'activité libérée est ensuite testée sur le surnageant de centrifugation.

b) Méthode retenue :

La suspension cellulaire est préparée en dispersant la masse M de culot dans 2,5 x M ml de  $\text{Tp PO}_4$  50 mM pH 7,0 préalablement tempéré à 30°C.

A ce volume V de suspension (de l'ordre de 2000 ml) sont ajoutés 0,0364 X V ml d'une solution de lysozyme (SIGMA) à 1,5 p.100 et 0,0545 X V ml de cetavlon à 2 p.100. On obtient ainsi des concentrations finales respectives de 0,05 p.100 et 0,1 p.100.

La lyse est effectuée à 30 - 35°C pendant 90 minutes sous agitation douce et continue.

Le surnageant de centrifugation constitue l'extrait brut de glucose isomérase.

14-2) ELIMINATION DES ACIDES NUCLEIQUES :

\* Précipitation par le manganèse :

Le mode opératoire a été le suivant :

A 10 volumes d'extrait brut est ajouté doucement 1 volume de chlorure de manganèse 1 M et le pH est maintenu à pH 7,0 à l'aide de soude 0,5N. Ces opérations sont faites sous agitation continue

Après repos d'une nuit à 4°C, la solution est centrifugée et le surnageant récupéré.

\* PRECIPITATION PAR LE CETAVLON :

Ce détergent a été décrit comme agent flocculant des acides nucléiques (103,79a). L'avantage est qu'il permet aussi d'éliminer les mucopolysaccharides en présence d'EDTA (102).

Cette méthode a donc été retenue par la suite.

A un volume Y d'extrait brut sont ajoutés lentement et sous agitation 5Y/12 ml d'EDTA 0,2 M et Y/4 ml de Cetavlon 1p.100 de façon à obtenir une concentration finale de 50 mM et 0,15 p.100 respectivement (pH final 6,7).

Après repos à 4°C pendant une nuit, le milieu est centrifugé comme précédemment.

#### 14-4) TRAITEMENT THERMIQUE :

Le surnageant obtenu précédemment est ajusté à pH 7,5 par NaOH 0,5N sous agitation. Le milieu est alors porté à 60°C (température finale) pendant 10 minutes.

La solution est alors filtrée sur papier Whatman 3 puis sur filtre Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### \* Concentration - Dialyse :

Ces deux opérations sont réalisées à l'aide d'un DC2 (Amicon) muni d'une membrane H1P10. La solution concentrée 10 fois est dialysée contre un tampon  $\text{PO}_4$  25 mM pH 7,5 pendant une nuit.

#### 14-5) METHODES CHROMATOGRAPHIQUES :

Toutes les séparations sont réalisées à température ambiante.

##### 14.5.1) Chromatographie sur DEAE Tris Acryl M (IBF)

La résine équilibrée dans un tampon  $\text{PO}_4$  50 mM pH 7,5 est conditionnée dans une colonne de dimension variable selon les quantités injectées. A titre indicatif, la colonne préparative est de 1050 ml (4,7 X 61cm).

L'élution est effectuée par un gradient discontinu de NaCl 0 ; 0,2M; 0,3M ; 1M) dans le tampon  $\text{PO}_4$  10 mM pH 7,5. Dans le cas de la colonne préparative les débits sont de 30 ml.h<sup>-1</sup> pour l'injection, et 60 ml.h<sup>-1</sup> pour l'élution.

Les fractions enzymatiques de 15 ml sont concentrées sur membrane Amicon PM -10 et conservées à 4°C après filtration sur membrane Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  et adjonction d'azide de sodium et d'EDTA (concentrations 0,02 p.100 et 10 mM respectivement).

##### 14.5.2) Tamisage moléculaire

###### a) Détermination de la masse moléculaire

Elle a été réalisée sur une colonne de Sepharose CL6B (Pharmacia)

de 250 ml (1,6 x 124 cm) équilibrée dans un Tp  $\text{PO}_4$  20 mM pH 7,5 ; NaCl 0,5 M, EDTA 5 mM.

Un volume de 2 ml est injecté et élué à  $8 \text{ ml.h}^{-1}$ . Les fractions recueillies sont de 2 ml.

la colonne a été calibrée à l'aide des témoins de masses moléculaires (Biorad) dans les mêmes conditions : 200  $\mu\text{l}$  d'une solution de bleu Dextran à  $\text{Ip.100}$  sont toujours ajoutés aux échantillons pour vérifier le  $V_0$  de la colonne.

b) Gel filtration en SDS  $\text{Ip.100}$

Elle a été réalisée sur colonne de Sephadex G-100 (Pharmacia) de 200 ml (1,6 X 100 cm) équilibrée en tampon Tris/HCl 50 mM pH 8,9, SDS  $\text{Ip.100}$ . 2 à 5 mg de protéines préalablement traités au SDS  $\text{Ip.100}$  sont injectés et élués à  $8 \text{ ml.h}^{-1}$ . des fractions de 2 ml sont recueillies.

c) Gel filtration sur AcA 44 (IBF)

Le gel est conditionné dans une colonne de 40 ml (1,2 X 30 cm). Il est équilibré soit en eau déminéralisée, ou en NaCl 1M ou en Tp  $\text{PO}_4$  20mM pH 6,8. Le volume d'injection est de 1 ml et la chromatographie est réalisée à  $8 \text{ ml.h}^{-1}$ . Les fractions recueillies sont de 1 ml.

14.5.3) Chromatographie d'adsorption sur HA Ultrogel (IBF)

Le gel d'hydroxyl apatite - agarose est équilibré dans un tampon  $\text{PO}_4$  5 mM pH 6,8. Sur une colonne de 315 ml (27,5 X 3,8 cm) , sont injectés 10 ml de solution préalablement équilibrée dans le Tp  $\text{PO}_4$  5 mM pH 6,8. Après lavage, l'éluion est réalisée par 2 volumes de Tp  $\text{PO}_4$  20 mM puis 200 mM pH 6,8 ; le débit est de  $32 \text{ ml.h}^{-1}$  et les fractions recueillies sont de 16 ml.

14.5.4) Chromatographies d'affinité :

a) Thiopropyl Sepharose CL6B : (Pharmacia)

Le gel a été lavé selon le protocole Pharmacia et conditionné dans une colonne de 27 ml (1,6 X 13,5 cm) dans un Tp  $\text{PO}_4$  20 mM pH 7,5, NaCl 0,3M EDTA 1mM. Un volume de 1,5 ml contenant 4,5 mg de protéines dans le tampon ci-dessus a été injecté à un débit de  $4 \text{ ml.h}^{-1}$ . Le volume des fractions est de 1 ml.

b) Chelating Sepharose 6B (Pharmacia)

Le gel a été préparé selon le protocole Pharmacia et saturé en co-

./...

balt par trois passages d'une solution à 0,5 p.100 de chlorure de cobalt sur la colonne de 14 ml (1,2 x 13 cm). Une fois saturée en cobalt le gel est équilibré dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,5 NaCl 1M.

0,6 mg d'enzyme purifiée dans 1 ml de ce tampon a été injecté à un débit de 4 ml.h<sup>-1</sup>

Après lavage de la colonne avec le tampon de départ (3 volumes de colonne), l'élution est réalisée à 8 ml. h<sup>-1</sup> en abaissant le pH par un tampon chélateur :

- 3 volumes de colonne de tampon citrate 50 mM pH 6,0 ; NaCl 1M
- 3 volumes de colonne de tampon citrate 50 mM pH 5,0 ; NaCl 1M

Les fractions recueillies sont de 2 ml.

### c) Chromatographie rapide des protéines (F.P.L.C.)

La chromatographie d'échange d'ions est réalisée sur résine MONO -Q (PHARMACIA) équilibrée en tampon Tris- HCl 50 mM pH 8,5.

50 µl d'une solution enzymatique à 8 mg.ml<sup>-1</sup>, soient 400 µg de protéines sont injectés et chromatographiés selon la programmation du gradient suivant:

| Temps (min.) | p. 100 de A | p. 100 de B |
|--------------|-------------|-------------|
| 0            | 50          | 50          |
| 5            | 50          | 50          |
| 15           | 35          | 65          |
| 17           | 0           | 100         |

A : Tampon Tris- HCl 50 mM pH 8,5

B : Tampon Tris- HCl 50 mM pH 8,5 , NaCl 1 M.

Les paramètres sont les suivants : Débit : 1 ml. min<sup>-1</sup>  
Pression : 33 bars.

**RESULTATS**

**DISCUSSION**

## A- PURIFICATION DE LA GLUCOSE ISOMERASE

La glucose isomérase est une enzyme endocellulaire. Il est donc nécessaire de l'extraire en détruisant les structures membranaires. La libération de tout le matériel endocellulaire nécessite une purification en plusieurs étapes pour obtenir une solution homogène de l'enzyme. Au cours de l'étude préliminaire (DEA) une méthode avait été proposée.

### I) RAPPEL DU SCHEMA DE PURIFICATION ANTERIEUR

La comparaison de quelques méthodes d'extraction nous a montré que la lyse des cellules à 50°C pendant 3 heures en présence de Cetavlon 0,1 p.100 est préférable à une méthode physique (Homogénéisation, congélations décongélations) ou à une autolyse à 4°C. Cette dernière a été utilisée pour extraire l'enzyme de St. griseofuscus (51) mais une perte notable d'activité a été observée dans notre cas.

La lyse chimique avait été choisie puisqu'elle permettait d'obtenir l'activité spécifique (50 U/mg) et totale maximale par rapport aux autres techniques.

La purification était réalisée selon le schéma 4 décrit page 54.

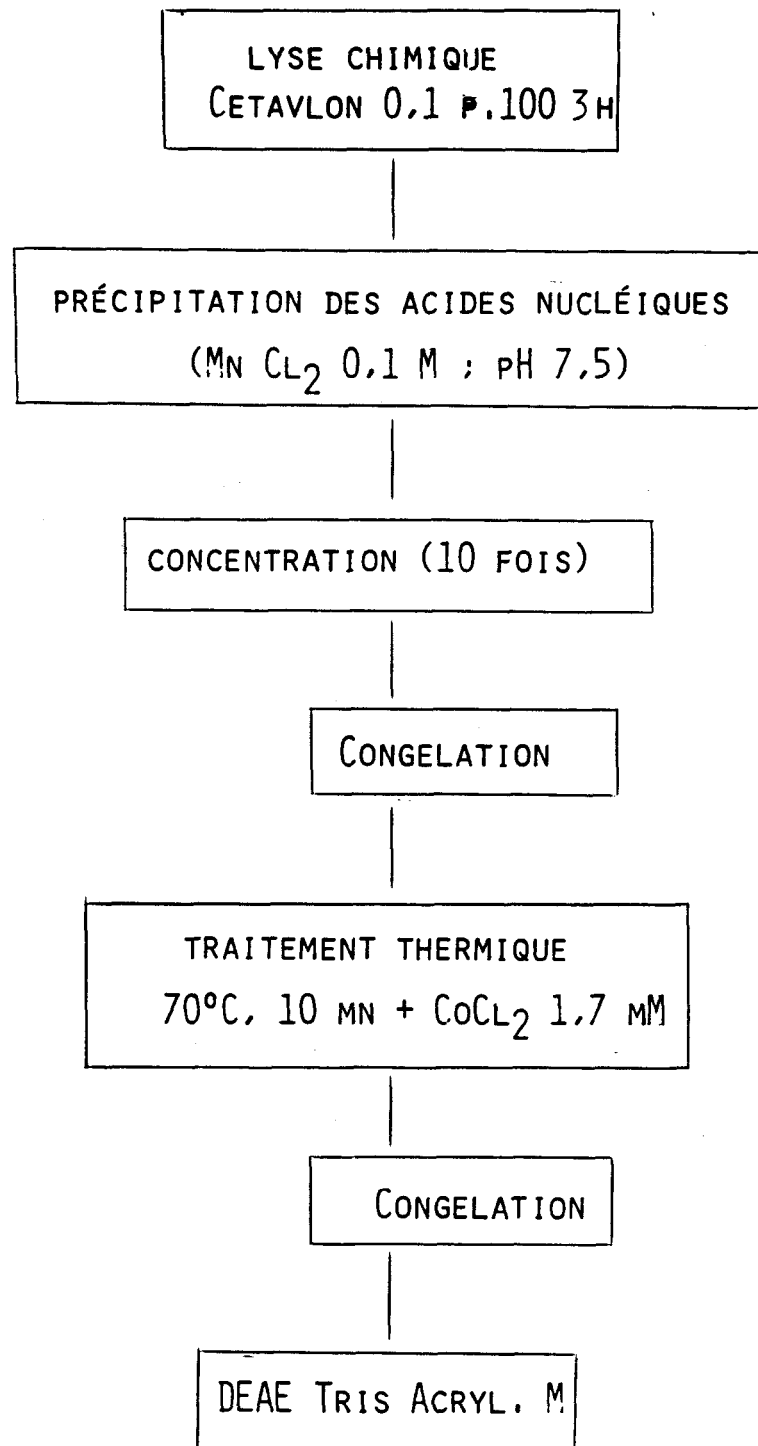
Les acides nucléiques étaient précipités par le chlorure de manganèse et le surnageant concentré 10 fois sur DC-2 Amicon équipé d'une membrane - fibre creuse - HIP10.

Le concentrat était stocké à -20°C pour subir en fonction des besoins un traitement thermique.

Cette étape était conduite à 70°C pendant 10 minutes à pH 8,0 en présence de  $\text{COCl}_2$  1,7 mM. Elle permettait de récupérer la totalité de l'activité. En effet nous verrons par la suite, qu'en présence de cobalt, l'enzyme est thermostable. La solution était à nouveau congelée pour être conservée. Enfin, le surnageant était injecté sur DEAE Tris Acryl M dans les conditions décrites page 49.

Ce protocole, s'il nous donnait une solution homogène, présentait néanmoins un certain nombre d'inconvénients. Il a en effet été abandonné en raison de problèmes d'instabilité de l'activité enzymatique.





SCHEMA N° 4 : ANCIEN PROTOCOLE DE PURIFICATION DE LA  
GLUCOSE ISOMÉRISE

.../...

Les différents points susceptibles de destabiliser l'enzyme peuvent se résumer comme suit :

- \* au niveau de l'extraction, un traitement à 50°C pendant trois heures peut être dénaturant.
- \* la précipitation des acides nucléiques par la méthode utilisée entraîne l'adjonction de cations contaminants à forte concentration.
- \* Bien que décrite comme étant thermostable, l'enzyme après traitement thermique à 70°C peut présenter une structure fragilisée.
- enfin, la congélation à deux reprises, des solutions en cours de purification réalisée dans le souci d'éviter l'action de protéases ou toute dénaturation en général, peut entraîner des modifications de conformation moléculaire.

C'est pourquoi ce protocole a été entièrement remanié tout en détaillant l'effet de chacune de ses étapes pour déceler celle (ou celles) qui entraîne une chute d'activité.

## II) ELABORATION DU NOUVEAU PROTOCOLE DE PURIFICATION DE L'ENZYME

### 2-1) ETUDE DE DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION

Etant donné l'importance de la méthode d'extraction de l'activité, une comparaison de méthodes, essentiellement chimiques, a été conduite. La méthode de référence est restée la lyse chimique à 50°C pendant 3 heures. Néanmoins, dans le souci de diminuer le temps d'extraction, une cinétique d'extraction a été réalisée pour tous les traitements (1, 2 et 3 heures).

Les résultats des comparaisons de méthode sont reportés dans le tableau 12 page 56.

Dans un premier temps, on constate que peu d'activité est libérée par la lyse à 50°C avec des réactifs tels que lasaponine 0,02 p.100, le cholate de sodium 0,1 p.100 et le toluène 1 p.100.

**TABLEAU 12 : COMPARAISON DE METHODES D'EXTRACTION**

**ACTIVITÉ ET ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DES EXTRAITS BRUTS**

| TRAITEMENT CHIMIQUE<br>A 50°C                     | ACTIVITE LIBEREE (U/40 µl) |      |      | ACTIVITE SPECIFIQUE ( U/mg de prot ..) |      |       |
|---|----------------------------|------|------|--|------|-------|
|   | 1h                         | 2h   | 3h   | 1h                                     | 2h   | 3h    |
| Témoin  | 0,17                       | 0,17 | 0,31 | 13,0                                   | 11,5 | 15,4  |
| Saponine (0,02 p.100)                             | 0,20                       | 0,40 | 0,78 | 12,5                                   | 17,7 | 38,8  |
| Cholate de sodium (0,1 p.100)                     | 0,32                       | 0,38 | 0,25 | 14,7                                   | 14,8 | 10,8  |
| Toluène (1 p.100)                                 | 0,52                       | 0,50 | 0,68 | 19,7                                   | 17,3 | 16,6  |
| Lysozyme (0,1 p.100)                              | 4,27                       | 3,93 | 3,25 | 18,2                                   | 13,8 | 15,5  |
| Chlorure de Cetylpyridinium (0,1 P.100)           | 2,18                       | 2,47 | 2,16 | 34,7                                   | 35,3 | 35,1  |
| Bromure de Cetyltriméthyl ammonium<br>(0,1 p.100) | 2,32                       | 2,53 | 2,32 | 40,6                                   | 42,7 | 50,0  |
| TRAITEMENT PHYSIQUE                               | 2 mn                       | 5 mn | 10mn | 2 mn                                   | 5 mn | 10 mn |
| Sonage  | 2,89                       | 3,80 | 3,73 | 11,3                                   | 11,7 | 12,5  |
| METHODES ASSOCIEES                                |                            |      |      |  |      |       |
| Lysozyme 0,1 p.100 + Toluène 1 p.100              | 3,22                       | 4,02 | 2,45 | 18,8                                   | 15,0 | 15,9  |
| Lysozyme 0,1 p.100, 1h, 50°C + sonage             | 4,23                       | 4,16 | 4,22 | 14,0                                   | 13,5 | 12,7  |
| Cetavlon 0,1 p.100, 1h, 50°C + Sonage             | 3,43                       | 3,32 | 3,14 | 27,1                                   | 24,0 | 19,0  |
| Lysozyme 0,1 p.100 + Cetavlon 0,1p.100<br>50°C    | 4,27                       | -    | -    | 22,7                                   | -    | -     |
| Lysozyme 0,1 p.100 + Cetavlon 0,1 p.100<br>30°C   | 4,10                       | -    | -    | 21,6                                   | -    | -     |

.../...

Par contre, les détergents cationiques libèrent l'activité de façon sélective puisque les activités spécifiques des surnageants sont de l'ordre de 40 U/mg. CHEN et coll. avaient déjà décrit l'action sélective de ces détergents. (11)

Néanmoins, le lysozyme 0,1 p.100 permet, en une heure de traitement, de libérer près de 70 p.100 d'activité en plus (4,27 U relatives au lieu de 2,53 U). Mais son action n'est pas sélective puisqu'il libère beaucoup plus de protéines contaminantes : ceci se traduit par une activité spécifique de 18 U/mg au lieu de 40 à 50 U/mg dans le cas des détergents cationiques.

Le sonage pendant 10 mn donne des résultats voisins de ceux obtenus à l'aide du lysozyme au point de vue rendement d'extraction. Mais cette méthode physique est encore moins sélective puisque l'activité spécifique du surnageant est seulement de 12,5 U/mg<sup>-1</sup>.

Dans un second temps, l'étude de l'association des moyens les plus efficaces a été conduite : l'association lysozyme 0,1 p.100 et toluène 1 p.100 couramment utilisée dans la littérature n'apporte pas de meilleurs résultats que l'action du lysozyme seul.

Il en est de même pour l'association lysozyme 0,1 p.100 pendant une heure puis sonage. Le maximum d'activité est donc bien libéré par une seule de ces deux méthodes.

Par contre l'association lysozyme et Cetavlon, tout en libérant le maximum d'activité, permet d'obtenir un surnageant d'activité spécifique légèrement supérieure à celle obtenue par action du lysozyme seul.

Enfin, l'utilisation de ces deux agents combinés à 30°C (température de culture du micro-organisme) pendant une heure permet d'obtenir des résultats analogues à ceux obtenus à 50°C.

Ainsi, le fait de travailler à 30°C pendant une heure permet d'exclure les risques de dénaturation de l'enzyme comme cela pourrait être le cas dans le schéma de purification antérieur .

.../...

TABLEAU 13 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CULOT DE  
 =====

MYCELIUM SUR LE RENDEMENT D'EXTRACTION  
 =====

| TRAITEMENT  | VOLUME TOTAL<br>DE LA SOLUTION<br>TRAITEE (ml)<br>(REACTIFS COMPRIS) | CONCENTRATION DE<br>CULOT DANS LA<br>SUSPENSION A TRAI-<br>TER<br>(g de culot/ml) | QUANTITE DE<br>CULOT TRAITÉ<br>(g) | ACTIVITE<br>TOTALE<br>LIBEREE<br>(U) | ACTIVITE<br>SPECIFIQUE<br>U/g DE CULOT |
|---|--|---|------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Lysozyme 0,1 p.100, 1h, 50°C                          | 300  | 0,172   | 49,9                               | 15125                                | 303                                    |
| Lysozyme 0,1 p.100, + Cetavlon 0,1<br>p.100, 1h, 50°C | 99   | 0,172   | 14,6                               | 4780                                 | 327                                    |
| Lysozyme 0,05 p.100 + Cetavlon 0,1<br>p.100, 1h, 30°C | 60   | 0,172   | 10,0                               | 2887                                 | 290                                    |
| Lysozyme 0,05 p.100 + Cetavlon 0,1<br>p.100, 1h, 30°C | 4771   | 0,290   | 1218                               | 529000                               | 434                                    |
|   | 2290   | 0,290   | 605                                | 270720                               | 447                                    |

.../...

Par ailleurs, une concentration en lysozyme de 0,05 p.100 est suffisante. De plus, étant conduit par la suite à traiter des quantités de cellules de l'ordre de 500 grammes ou davantage, il est préférable de travailler sur un volume de suspension le plus faible possible. Ainsi, au lieu de disperser le culot de mycélium dans 5 fois son poids de tampon, par la suite, la proportion a été doublée de façon à obtenir une solution plus concentrée (0,29 g de culot/ml de suspension). Ceci n'altère pas les rendements d'extraction, et au contraire permet de les augmenter légèrement comme le montre le tableau 13 page 58.

—> Ainsi, le protocole final retenu pour extraire la glucose isomérase de St. violaceoniger est la lyse chimique d'une suspension de 0,29 g de culot cellulaire/ml par l'association lysozyme 0,05 p.100 et cetavlon 0,1 p.100 pendant une heure à 30°C.

Le tableau 13 page 58 résume les résultats d'extractions obtenus au cours de l'étude : il montre que la méthode est reproductible.

Un fermenteur de 15 Litres produisant près de 3 kg de culot de mycélium frais de St. violaceoniger dans les conditions décrites page 40 permet donc d'obtenir 1 273 000 unités soit 106 U extraites/ml de milieu de fermentation.

## 2-2 PURIFICATION DE L'EXTRAIT BRUT

Les résultats de purification de la glucose-isomérase sont résumés dans le tableau 15 page 64.

### a) Elimination des acides nucléiques :

La combinaison du Cetavlon 0,15 p.100 et de l'EDTA 50 mM, à 4°C permet de flocculer les acides nucléiques et une partie des mucopolysaccharides libérés par le lysozyme lors de l'extraction. La filtrabilité de la solution en est donc améliorée mais le milieu reste encore trouble. Pour un taux de récupération d'activité enzymatique de 88 p. 100, cette étape permet d'augmenter l'activité spécifique de 40 p. 100.

Cette méthode a été retenue après l'avoir comparée à la précipitation à l'aide de  $MnCl_2$  0,1 M. En effet on obtient des facteurs de récupération et de purification identiques dans les deux cas. (Tableau 14 page 60 ) Mais la méthode au Cetavlon présente le double avantage de ne pas introduire les métaux contaminants (pas de  $Mn^{2+}$ ) et de contenir de l'EDTA 50 mM. Après centrifugation, le surnageant est trai-

TABLEAU 14 : PRÉCIPITATIONS COMPARATIVES DES ACIDES NUCLÉIQUES

PAR LE MANGANÈSE ET LE CETAVLON.

|                                | VOLUME<br>(ml) | PROTEINES LIBEREES (mg/ml) |      | PROTEINES<br>TOTALES<br>(mg) | ACTIVITE<br>SPECIFIQUE<br>(U/mg) | ACTIVITE<br>TOTALE<br>(U) | p.100 DE<br>RECUPERATION | ACIDES<br>NUCLEIQUES<br>(mg/ml) (2) |
|--------------------------------|----------------|----------------------------|------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
|                                |                | (1)                        | (2)  |                              |                                  |                           |                          |                                     |
| Témoin                         | 25             | 4,36                       | 5,37 | 109                          | 19,34                            | 2 108                     | -                        | 2,13                                |
| Précipitation Mn <sup>++</sup> | 31             | 2,14                       | 2,77 | 66,6                         | 22,80                            | 1 518                     | 72                       | 0,10                                |
| Précipitation au<br>Cetavlon   | 48             | 0,98                       | 1,04 | 47,4                         | 31,68                            | 1 490                     | 71                       | 0,06                                |

(1) : Dosage des protéines par la méthode au bleu de Coomassie

(2) : Dosage des protéines et acides nucléiques par la méthode spectrophotométrique (48)

$$\text{Quantité de protéines } (\mu\text{g/ml}) = 183 \times \text{DO}_{230} - 75,8 \text{ DO}_{260}$$

$$\text{Quantité d'acides nucléiques } (\mu\text{g/ml}) = 49,1 \times \text{DO}_{260} - 3,48 \text{ DO}_{230}$$

.../...

té par la chaleur.

b) Précipitation thermique :

Le surnageant, est ajusté à pH 7,5 par de la soude 0,5 N sous agitation, puis porté à 60°C pendant 10 minutes.

Cette étape de purification est particulièrement intéressante, puisque 50 p.100 des protéines sont flocculées alors que l'on récupère la totalité de l'activité.

La filtration sur papier Whatmann 3 puis sur filtre Millipore 0,45 µm est alors réalisable dans les meilleures conditions et le filtrat est d'une parfaite brillance.

La concentration et la dialyse de cette solution sur membrane Amicon H1 P10 (seuil de coupure : 10.000 daltons) ne sont pas des étapes de purification mais permettent d'atténuer la coloration jaunâtre de la solution.

c) Chromatographie sur DEAE Tris Acryl M :

Cette méthode de fractionnement par échange d'ions est décisive et très reproductible. Les fractions contenant l'activité glucose isomérase sont obtenues par élution avec le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,5 renfermant du NaCl 0,3 M.

Le profil chromatographique obtenu est reporté dans la figure 1 page 62 . Les fractions recueillies sont réunies. L'analyse de la solution permet de constater qu'on récupère en moyenne 65 p.100 de l'activité injectée pour un facteur de purification de 2,2 (tableau 15 page 64 ).

En réalité ce dernier est de 3,14 puisque le traitement à l'EDTA 10 mM de cette solution permet de faire passer l'activité spécifique de 150 à 220 U.mg<sup>-1</sup> sans perte de protéines.

L'utilisation d'une colonne préparative de 1050 ml ne modifie pas les résultats ni le facteur de purification qui était obtenu précédemment sur colonne de 200 ml.

A noter enfin que l'injection de 1,5 g de protéines à 30 ml.h<sup>-1</sup> sur la colonne de 1050 ml n'entraîne qu'une perte de 0,3 p.100 de l'activité



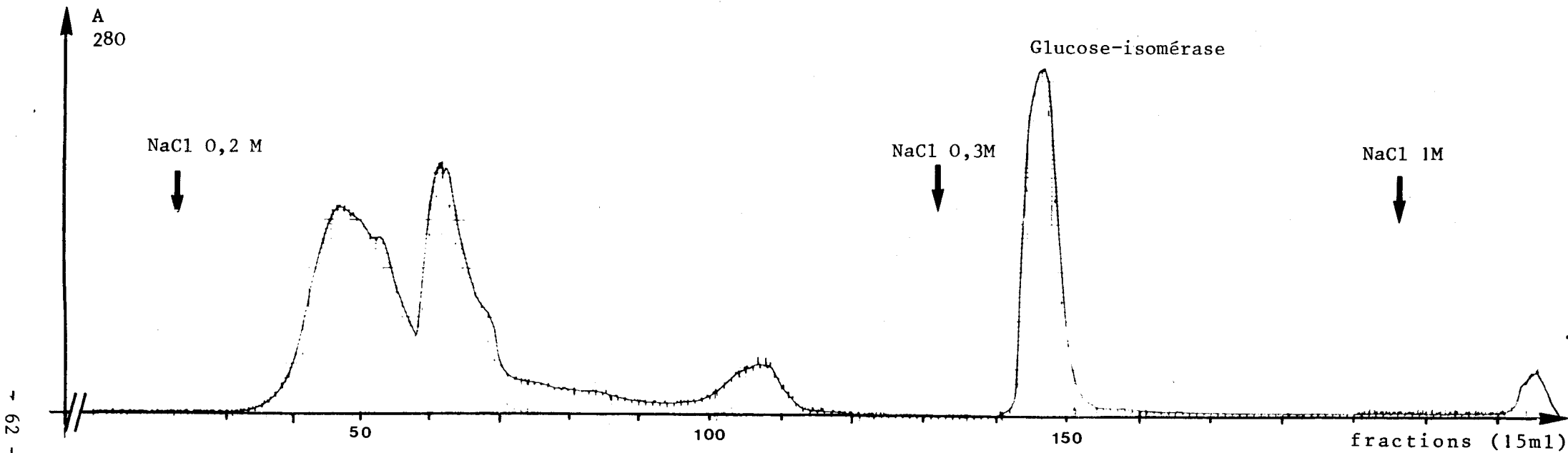


FIGURE 1 : PROFIL D'ÉLUTION SUR DEAE TRIS ACRYL M PH 7,5 (COLONNE PRÉPARATIVE)

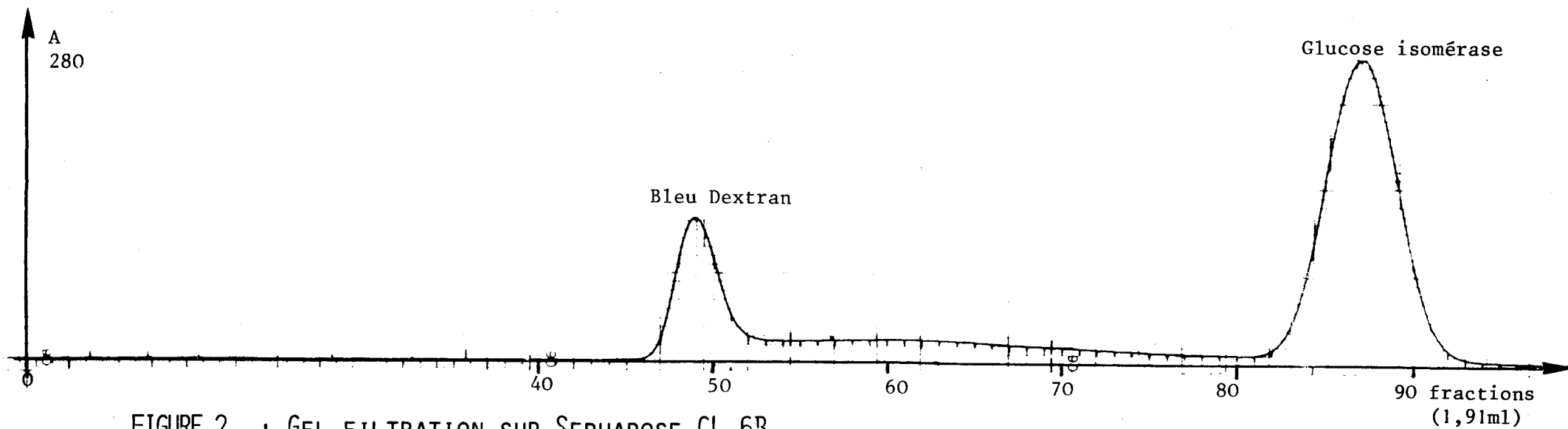


FIGURE 2 : GEL FILTRATION SUR SEPHAROSE CL 6B

.../...

injectée, éluée par le tampon de départ. La colonne n'est donc pas encore saturée dans ces conditions.

d) Gel filtration sur Sepharose CL 6B

L'injection à  $8 \text{ ml.h}^{-1}$  de 2 ml de la solution précédente ne permet pas d'obtenir une purification supplémentaire puisque l'activité spécifique reste à  $220 \text{ U.MG}^{-1}$ .

L'enzyme est éluée en un pic symétrique comme l'indique la figure 2 page 62 ( $V_t = 250 \text{ ml}$  ;  $V_e = 166 \text{ ml}$ ).

2-3) PURETE DE LA SOLUTION ENZYMATIQUE FINALE

a) Test par électrophorèse en SDS :

Pour étudier la pureté, l'électrophorèse est conduite dans un gradient de gel de polyacrylamide 5-25 p.100. Ce gradient permet d'obtenir une meilleure résolution.

Les échantillons traités au SDS sont, après migration, révélés au nitrate d'argent : cette méthode est décrite comme sensible au nanogramme.

Les électrophorègrammes des différentes solutions au cours de la purification sont reportés dans la figure 3a page 66.

Le dernier dépôt - fraction DEAE- présente deux bandes à 130 et 43 K daltons. Nous verrons ultérieurement que ces bandes correspondent toutes deux à la glucose-isomérase (le composé le plus lourd est le résultat de réassociation par l'intermédiaire de ponts disulfures car l'adjonction de mercaptoéthanol à l'échantillon fait disparaître cette bande de 130 Kdaltons). Le critère "une bande en électrophorèse" est donc respecté.

b) Test par immunoélectrophorèse :

La solution en fin de purification a, après migration électrophorétique, diffusé contre un antiserum total .

Cet antiserum a été préparé par injection à un lapin avec une solution de surnageant issu de l'étape de précipitation des acides

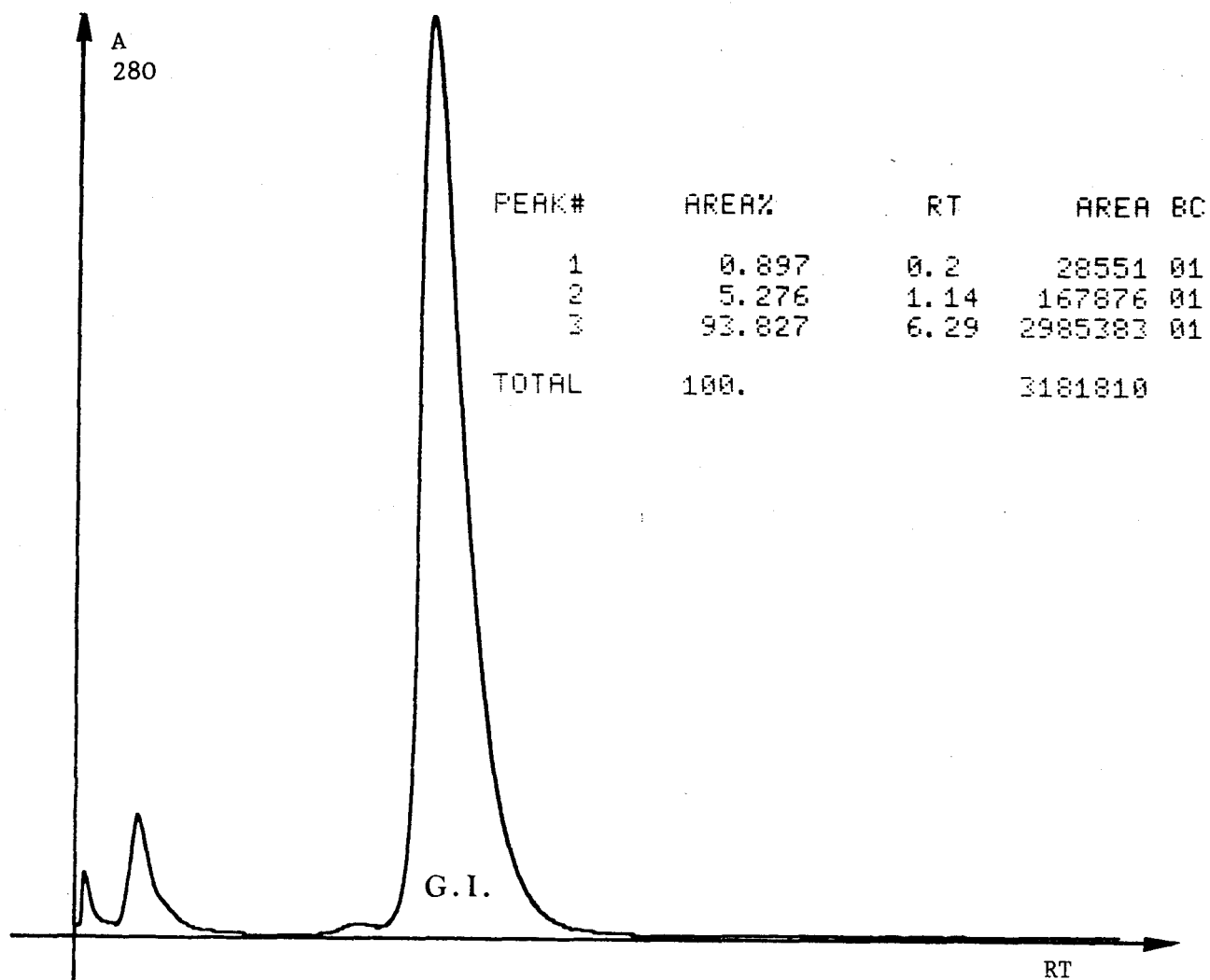


FIGURE 4 : CHROMATOGRAMME FPLC

TABLEAU 15 : SCHEMA DE PURIFICATION DE LA GLUCOSE ISOMÉRISE

| ETAPES                    | VOLUME (ml) | PROTEINES TOTALES (mg) | ACTIVITE SPECIFIQUE (U/mg prot.) | ACTIVITE TOTALE (U) | p.100 DE RECUPERATION | FACTEUR DE PURIFICATION |
|---------------------------|-------------|------------------------|----------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|
| Extrait brut              | 1480        | 7200                   | 22,7                             | 163640              | -                     | -                       |
| Traitement au Cetavlon    | 1140        | 4461                   | 32,3                             | 144000              | 88                    | 1,42                    |
| Traitement à 60°C, 10 mn. | 1362        | 2090                   | 69                               | 144000              | 88                    | 3,04                    |
| Concentration & dialyse   | 66          | 1846                   | 78                               | 144000              | 88                    | 3,44                    |
| DEAE Tris Acryl M         | 131,0       | 605                    | 150                              | 90720               | 55                    | 6,61                    |
| Traitement à l'EDTA 10 mM | 135         | 605                    | 220                              | 133060              | 81,3                  | 9,69                    |
| Gel filtration            | -           | -                      | 220                              | -                   | 96                    | 9,69                    |

.../...

nucléiques. On obtient donc avec la solution enzymatique finale un arc de précipitation comme l'indique la figure 3b page 66.

c) Test par chromatographie rapide (FPLC)

L'injection d'un échantillon de solution enzymatique finale sur résine Mono - Q<sup>®</sup> équilibrée en tampon Tris-HCl pH 8,5 indique une solution homogène à plus de 93 p.100 (exprimé en rapport de surface de pics) comme l'indique la figure 4 page 64 . L'enzyme est éluée dans ces conditions à l'aide d'une force ionique  $\mu = 0,6$  (NaCl 0,6M) Les traces de contaminants sont des peptides de faible taille qui étaient adsorbés sur la molécule enzymatique.

Ainsi ce protocole définitivement établi présente de bons résultats, reproductibles, et plusieurs avantages :

- les trois premières étapes (extraction et précipitations) sont très rapides, simples et peuvent être réalisées à grande échelle.
- l'utilisation d'une colonne de DEAE Tris-Acryl M préparative apporte des résultats identiques à ceux obtenus sur colonne analytique.
- le taux de récupération d'activité est de 78 p.100 en fin de schéma de purification. Dans le meilleur des cas, il est de 40 p.100 dans la littérature, pour la purification de l'enzyme de St. olivochromogenes (110).
- La précipitation des acides nucléiques par le Cetavlon en présence d'EDTA évite d'ajouter des ions contaminants qui auraient du être éliminés par la suite.
- le traitement thermique est réalisé à 60°C à la température d'isomérisation. Il ne peut être suspecté d'être dénaturant comme nous le confirmons par la suite.
- ce schéma de purification n'utilise en aucun cas des précipitations de l'enzyme (par le sulfate d'ammonium ou des solvants organiques) ce qui est aussi préférable pour la préservation de la structure originelle de la molécule.

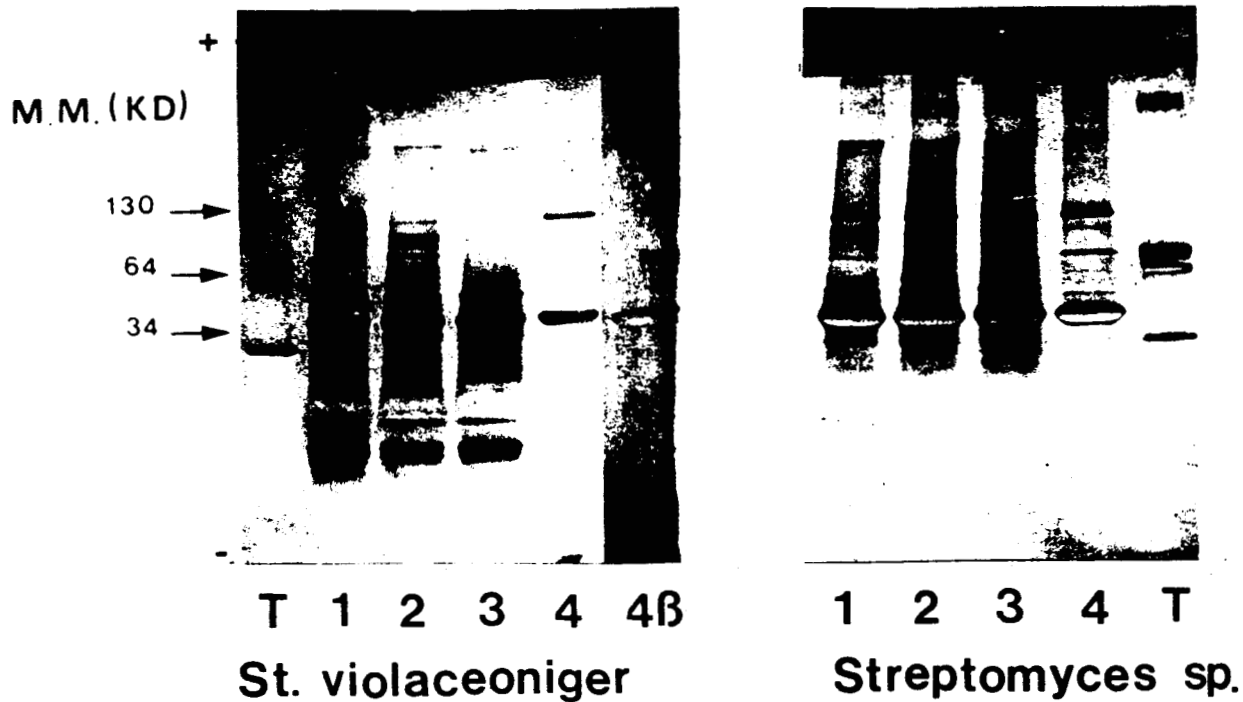


FIGURE 3A : SUIVI DE LA PURIFICATION EN ÉLECTROPHORÈSE  
 -PAG - 5-25 p.100 ; SDS 0,1 p.100

- T : Témoin de masses  
 1 : Extrait brut  
 2 : Traitement au Cetavlon  
 3 : Traitement thermique  
 4 : Etape D.E.A.E.  
 4β: Echantillon 4 traité au β-mercapto-éthanol.

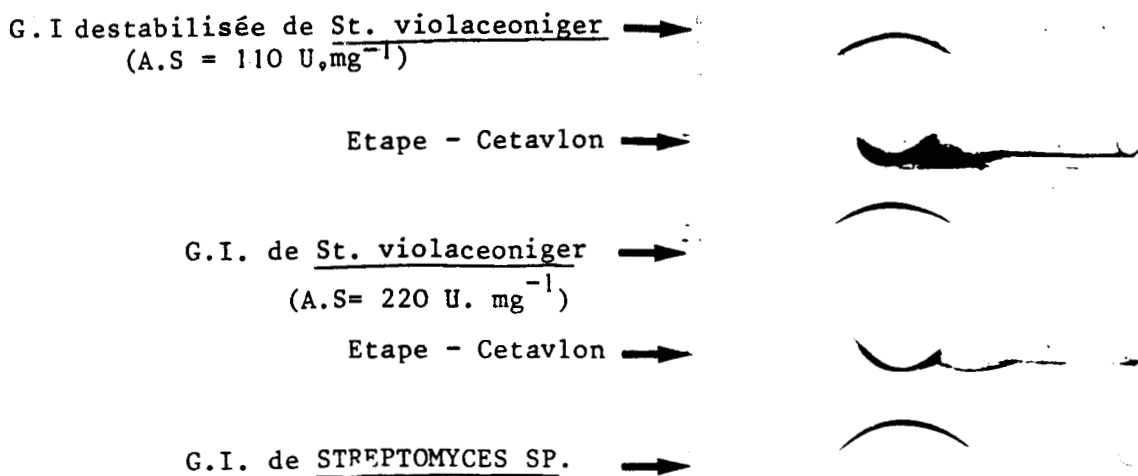


FIGURE 3B : IMMUNOELECTROPHORÈSE  
 (Antisérum total de St. violaceoniger)

.../...

- enfin, et c'est certainement le point le plus important, on obtient ainsi une solution d'activité spécifique maximale ( $220 \text{ U.mg}^{-1}$ ) alors qu'en purifiant selon le schéma antérieur l'activité spécifique finale était de  $100 \pm 10 \text{ U.mg}^{-1}$  à homogénéité équivalente.

De plus, cette solution à  $220 \text{ U.mg}^{-1}$  est stable puisque conservée à  $4^\circ\text{C}$  en flacon stérile elle présente encore toute son activité après au moins 5 mois.

#### 2-4) UTILISATION DU PROTOCOLE DE PURIFICATION POUR UNE AUTRE SOUCHE DE STREPTOMYCES SP.

Les travaux décrits ici portent sur la souche I de St. violaceoniger. Néanmoins, une autre souche de Streptomyces sp., appelée "souche II", a été comparée à la première en raison de sa forte activité isomérase apparente dans le fermenteur.

Ainsi, la glucose isomérase de chacune d'elles a été purifiée selon le protocole décrit ci-dessus. Les schémas respectifs de purification complétés par un suivi en électrophorèse de la purification sont reportés dans le tableau 15b page 68 et la figure 3a page 66.

L'électrophorèse comparative apporte deux éléments : d'une part l'enzyme des deux souches présente le même comportement, d'autre part, l'activité spécifique élevée de l'extrait brut de souche II ( $73 \text{ U.mg}^{-1}$ ) est en fait due à une proportion plus importante d'enzyme parmi les protéines totales solubilisées. En effet, par la suite, les facteurs de purification pour cette souche II restent faibles (2,57) car il y a peu de contaminants à éliminer.

Il est à noter par ailleurs que l'extrait brut contient probablement des inhibiteurs de l'activité puisqu'en fin de purification, on obtient plus d'activité apparente qu'il n'y en avait au départ.

A l'issue de l'étape sur DEAE et traitement à l'EDTA  $10 \text{ mM}$ , l'activité spécifique est de  $161 \text{ U.mg}^{-1}$ . La gel filtration est nécessaire pour parfaire la purification de l'enzyme de souche II pour obtenir une activité spécifique voisine de celle de la souche I ( $188 \text{ U.mg}^{-1}$ ).

TABLEAU 15B : PURIFICATIONS COMPAREES DES G.I. DE SOUCHE I ET II

===== ::

| ETAPES                     | S O U C H E I                |                                  |                           |                               |                                 | S O U C H E I I              |  |                           |                               |                                 |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                            | PROTEINES<br>TOTALES<br>(mg) | ACTIVITE<br>SPECIFIQUE<br>(U/mg) | ACTIVITE<br>TOTALE<br>(U) | p.100<br>DE RECU-<br>PERATION | FACTEUR DE<br>PURIFICA-<br>TION | PROTEINES<br>TOTALES<br>(mg) | ACTIVITE<br>SPECIFIQUE<br>APPARENTE<br>(U.mg <sup>-1</sup> ) | ACTIVITE<br>TOTALE<br>(U) | p.100<br>DE RECU-<br>PERATION | FACTEUR DE<br>PURIFICA-<br>TION |
| Extrait brut               | 11780                        | 22,7                             | 268 000                   | -                             | -                               | 24 64                        | 73   | 180 400                   | -                             | -                               |
| Traitement au<br>Cetavlon  | 7368                         | 32,3                             | 236 420                   | 88                            | 1,42                            | 2000                         | 105  | 210 000                   | 116                           | 1,44                            |
| Traitement à<br>60°C       | 3600                         | 65,6                             | 236 000                   | 88                            | 2,9                             | 1772                         | 105  | 186 000                   | 88                            | 1,44                            |
| Dialyse &<br>concentration | 3420                         | 69,0                             | 236 000                   | 88                            | 3,04                            | 1720                         | 108  | 186 000                   | 88                            | 1,48                            |
| DEAE Tris<br>Acryl M       | 1020                         | 150                              | 153 400                   | 57                            | 6,61                            | 1342                         | 104  | 139 530                   | 66                            | 1,42                            |
| Traitement à<br>l'EDTA     | 1020                         | 220                              | 225 000                   | 84                            | 9,70                            | 1320                         | 161  | 212 520                   | 100                           | 2,20                            |
| Gel filtration             | -                            | 220                              | -                         | -                             | 9,70                            | -                            | 188  | -                         | -                             | 2,57                            |

.../...

Le protocole de purification adopté est donc aussi applicable pour obtenir une solution homogène de glucose isomérase à partir d'une autre souche de Streptomyces sp.

Le test d'homogénéité en électrophorèse (figure 3a page 66) a été complété par une immunoélectrophorèse : la solution finale est testée contre l'anti-sérum total de la souche I. La réaction antigène-anticorps a bien lieu. L'arc de précipitation homogène se situe au même endroit que celui résultant de la précipitation antiglucose isomérase souche I - glucose isomérase souche I, comme le montre la figure 3b page 66.

Ainsi l'isomérase de la "souche II" présente les mêmes comportements chromatographiques (sur DEAE Tris Acryl, en gel filtration). Elle présente donc la même charge apparente. Ce dernier point est confirmé par les résultats en électrophorèse.

Par ailleurs, le caractère antigénique de la glucose-isomérase n'a jamais été décrit dans la littérature. Le fait que les enzymes de "souche I" et "souche II" présentent le même comportement en immuno-électrophorèse laisse à penser que ces enzymes sont de structure très voisine, d'autant plus qu'elles réagissent contre le même anti-sérum.

La comparaison a donc pour intérêt de vérifier le protocole de purification retenu et de mettre en évidence que la souche II produit la même enzyme - à quelques acides aminés près -

Ce n'est donc pas l'enzyme en tant que telle qui est plus active.

Ceci est en accord avec les résultats obtenus pour d'autres glucose isomérases .

Il est démontré que ces enzymes isolées de différentes souches font partie d'une famille homogène. Par exemple, en fin de purification, l'enzyme de St. griseofuscus présente une activité spécifique de  $18,9 \mu \text{ mole/mg}^{-1}$  ce qui correspond à  $204 \text{ U.mg}^{-1}$  selon notre définition de l'unité. Notre valeur  $220 \text{ U.mg}^{-1}$  est donc en accord avec ce résultat.

L'intérêt du schéma de purification choisi est de récupérer les 3/4 de l'activité initiale alors que KASUMI et coll. (5) n'en récupèrent que 33p.100



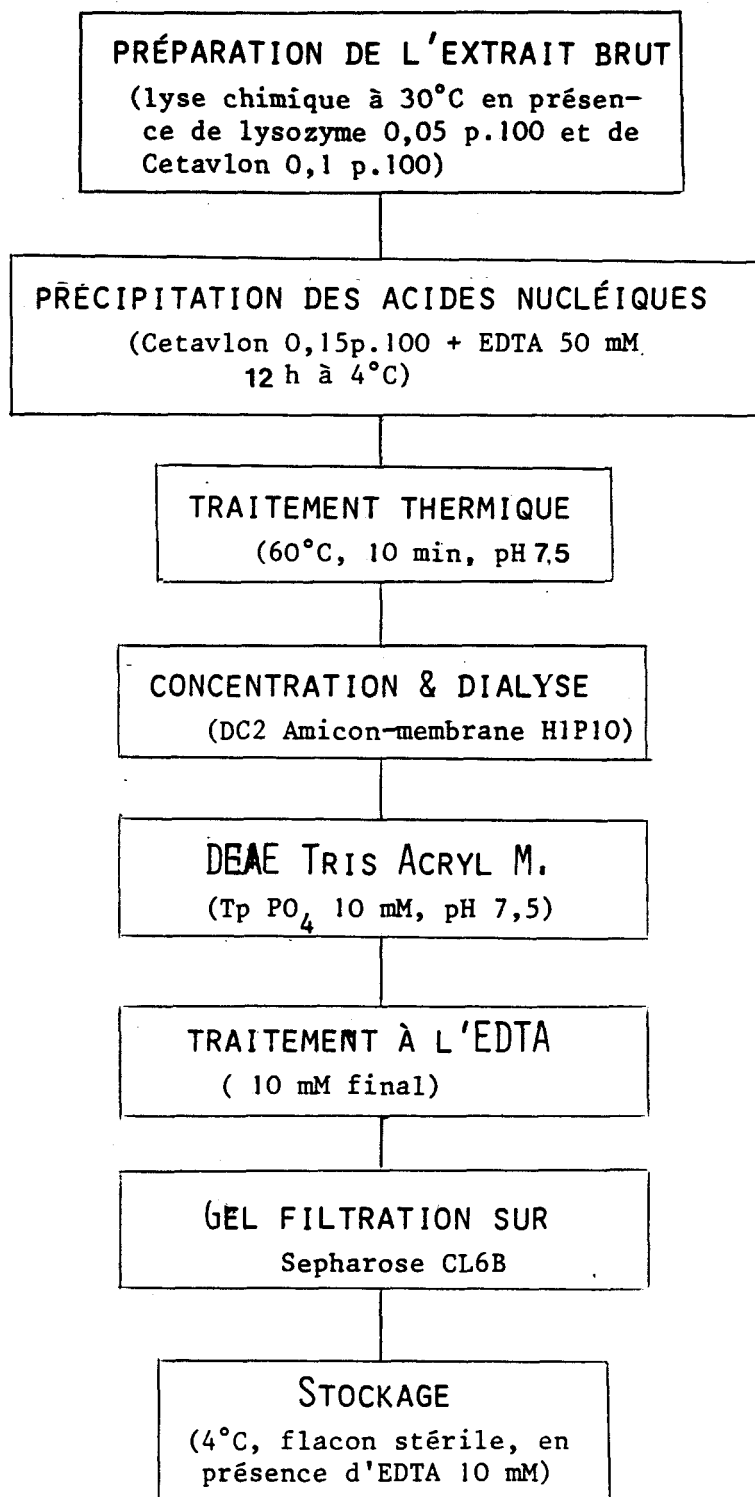
.../...

avec leur méthode.

Notons enfin, l'importance capitale de la première étape, l'extraction, qui, en étant la plus sélective possible, permet de simplifier la purification de l'extrait brut. Aussi l'extrait brut de "souche I" présente 10 p.100 de glucose isomérase, et celui de la "souche II", 39 p.100.

L'avantage le plus important est, rappelons le, d'obtenir d'une solution homogène qui est stable.

Par la suite, les propriétés enzymatiques et physico-chimiques ont été étudiées exclusivement pour l'enzyme de St. violaceoniger (souche I) préparée selon le protocole résumé dans le schéma N° 5 page 71.



**SCHEMA 5** : PROTOCOLE RETENU POUR LA PURIFICATION DE LA  
 =====  
 GLUCOSE ISOMÉRASE DE STREPTOMYCES SP.  
 =====

## B - PROPRIETES ENZYMATIQUES DE LA GLUCOSE ISOMERASE

L'enzyme de St. violaceoniger ne présente une activité détectable qu'en présence de cation. Il était indispensable, pour la suite des manipulations, de fixer exactement l'action de ces composés. C'est pour cette raison que nous traiterons l'action des ions métalliques avant toute autre propriété enzymatique.

### I) ACTION DU COBALT ET DU MAGNÉSIUM SUR L'ACTIVITÉ

La figure 4 page 73 résume les résultats obtenus. L'activité optimale de l'enzyme (préalablement débarrassée de cations) est obtenue pour des concentrations de  $10^{-2}$  M en ce qui concerne le cobalt, et de  $10^{-1}$  M en ce qui concerne le magnésium.

A ces concentrations optimales le magnésium permet d'obtenir une activité double de celle obtenue avec le cobalt.

Les faibles concentrations en cations - inférieures ou égales à  $10^{-5}$  M ne permettent pas de détecter une activité.

Notons aussi que l'activité, dans le cas du magnésium, est indépendante de l'anion utilisé (chlorure ou sulfate)

Dans la suite des manipulations, l'enzyme sera utilisée en présence de  $Mg^{2+}$  10 mM ou de  $Co^{2+}$  1mM. Dans les deux cas, l'activité est égale à 90 p.100 de l'activité maximale.

Lorsqu'elle est en présence des deux métaux à concentrations égales, l'enzyme présente un profil d'activité semblable à celui obtenu en présence de  $Co^{2+}$  seul. Ceci, en plus du fait que la glucose isomérase est mieux activée par des faibles concentrations en cobalt laisse supposer qu'elle est plus affine pour le cobalt.

### II) CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES OPTIMALES D'ACTIVITE

#### 2-1) PH OPTIMUM :

Le pH optimum de la glucose isomérase de St. violaceoniger est compris

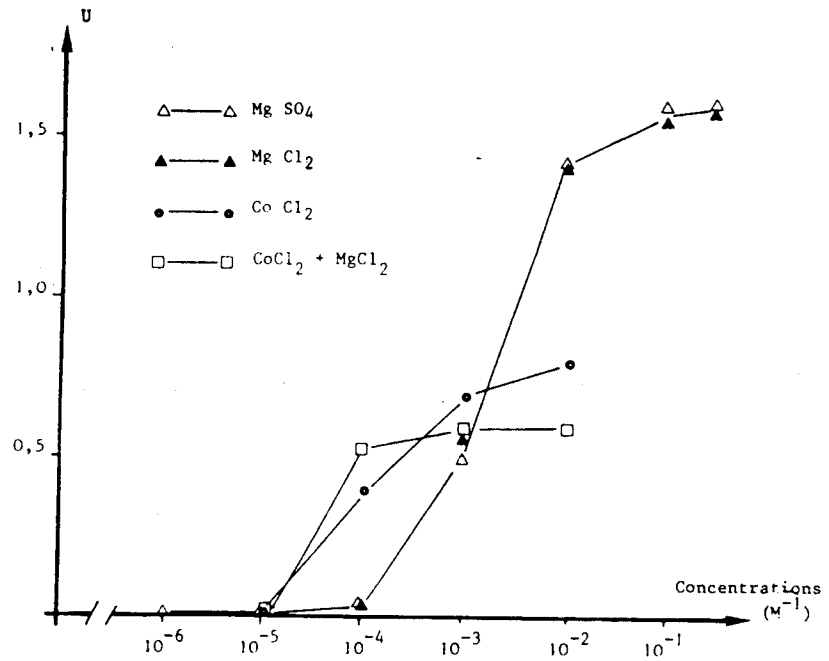


FIGURE 4 : EFFET DE LA CONCENTRATION EN CATIONS ACTIVATEURS  
SUR L'ACTIVITÉ

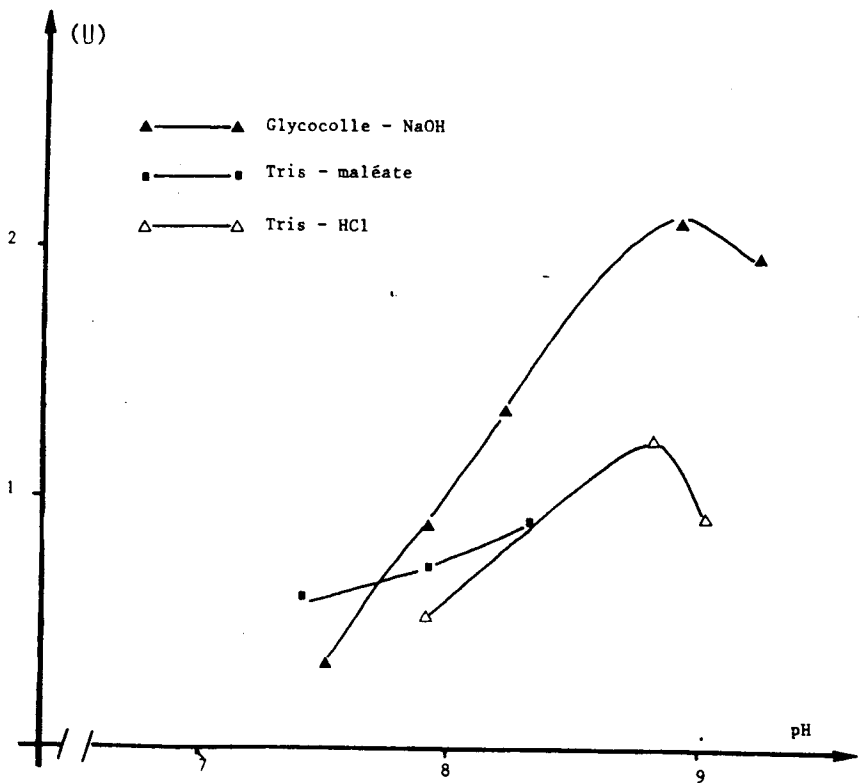


FIGURE 5 : pH OPTIMUM DE LA GLUCOSE ISOMÉRISE

.../...

entre pH 8,5 et pH 8,8 en présence de magnésium 10 mM, comme l'indique la figure 5 page 73 quelque soit la nature du système tampon utilisé.

On remarque cependant que le tampon Tris-HCl entraîne une réactivité plus faible de l'enzyme.

## 2-2) TEMPERATURE OPTIMALE

Le milieu d'isomérisation a été porté aux différentes températures pendant une heure et le fructose formé est dosé. Les résultats sont rassemblés dans la figure 6 page 75 . Dans ces conditions, la température optimale se situe entre 75 et 80°C.

Ces optima sont en accord avec les valeurs décrites dans la littérature.

Cependant ces paramètres ne peuvent pas être appliqués à une enzyme qui séjourne longtemps en réacteur car, dans ces conditions, il y a des réactions parasites qui se produisent.

## 2-3) TRANSFORMATIONS CHIMIQUES DU GLUCOSE AUX OPTIMA :

L'étude de l'influence du pH et de la température sur l'activité nous a conduit à mesurer la transformation chimique du substrat en dérivés cétoniques. A pH 8,5 et 75°C, le glucose subit des transformations chimiques. La quantité de dérivés cétoniques formés à 60°C en fonction du pH, d'une part, et en fonction de la température d'autre part, augmente dans les deux cas de façon exponentielle (figure 7 page 75 ). On peut donc obtenir en une heure d'incubation, plus de 1 p.100 de cétones dosés par la méthode décrite page 41.

Les réactions qui ont lieu dans le milieu semblent être des transformations de LOBRY de BRUYN-ALBERDA van EKENSTEIN (6,57). Ces composés n'ont pas été identifiés, mais ils peuvent être des inhibiteurs de l'activité enzymatique. On cherchera donc à minimiser ce phénomène.

C'est pourquoi, les activités enzymatiques sont mesurées à 58°C et à pH 7,0.

## III) STABILITE DE L'ACTIVITE

### 3-1) STABILITE A LA TEMPERATURE :

L'étude de ce paramètre a été conduite de deux façons :

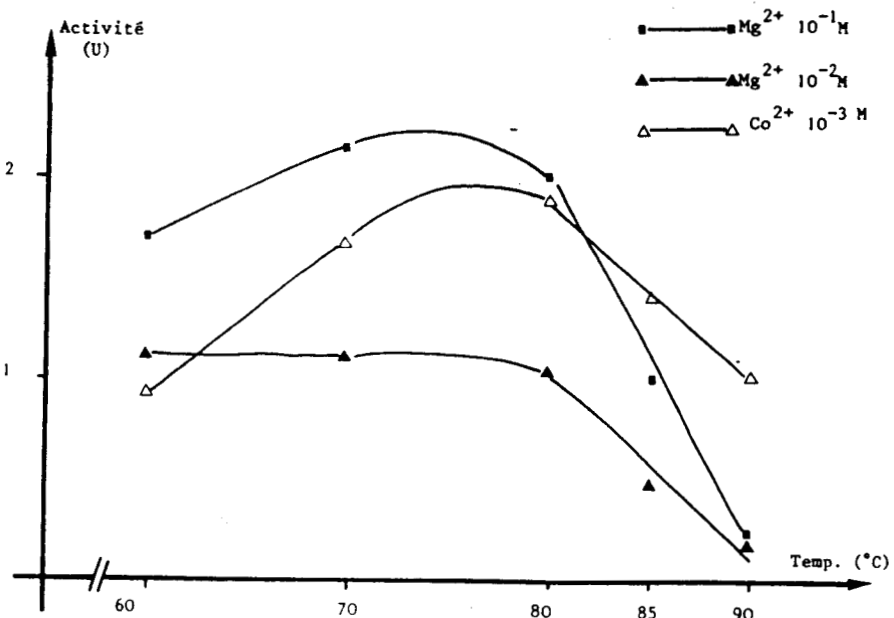


FIGURE 6 : EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR L'ACTIVITÉ

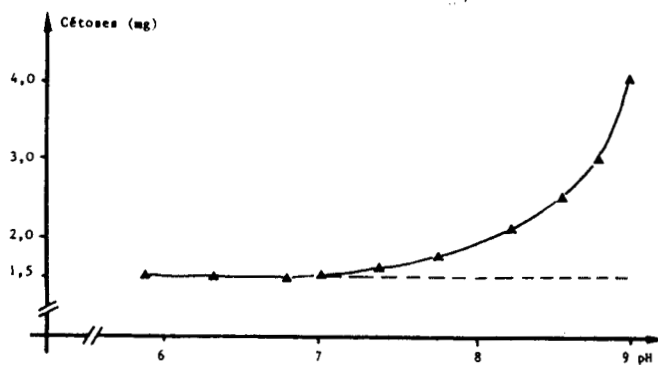


FIGURE 7A : DÉGRADATION DU GLUCOSE À 60°C EN FONCTION DU PH

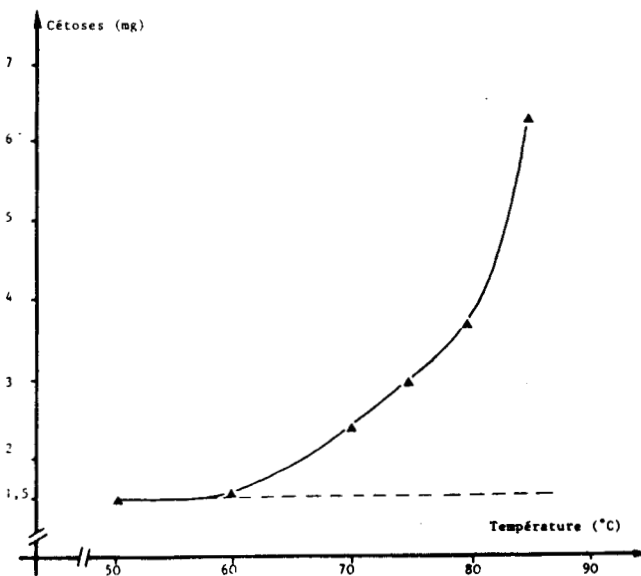


FIGURE 7B : DÉGRADATION DU GLUCOSE À PH 7,8 EN FONCTION DE LA T°

.../...

a) Mesure d'activité résiduelle après incubation à différentes températures :

Dans ce cas, l'enzyme est sous forme de complexe enzyme-métal : elle est en présence de magnésium  $10^{-2}$  M ou de cobalt  $10^{-3}$  M. Les résultats sont reportés dans la figure 8 page 77,

Le cobalt possède une action protectrice vis à vis de l'activité enzymatique. Une dénaturation notoire n'apparaît qu'à température de  $85^{\circ}\text{C}$  (75 p.100 d'activité résiduelle) alors que, dans les mêmes conditions, on obtient seulement 40 p.100 d'activité résiduelle lorsque l'enzyme est sous forme enzyme -  $\text{Mg}^{2+}$ .

Ce résultat complète l'étude de la température optimale représentée dans la figure 6 page 75,

En effet, à  $60^{\circ}\text{C}$  l'enzyme sous forme Enz -  $\text{Co}^{2+}$  a une activité inférieure à Enz -  $\text{Mg}^{2+}$ , mais à forte température, l'inverse se produit. Ceci parce que l'action protectrice du cobalt, au delà de  $75^{\circ}\text{C}$ , compense le fait qu'il soit moins activateur que  $\text{Mg}^{2+}$ . La température optimale et la stabilité à la température sont donc à relier. Le résultat obtenu reflète le compromis entre l'effet de la température sur la vitesse de réaction et celui sur la vitesse de dénaturation de l'enzyme. (rupture des liaisons faibles de la structure tertiaire de la protéine).

Le cobalt plus protecteur de l'activité mais moins activateur que le magnésium est commun aux glucose isomérases de Streptomyces sp. Il a été confirmé ici et laisse donc à penser que la structure spatiale de l'enzyme -  $\text{Co}^{2+}$  est plus stable que celle de l'enzyme -  $\text{Mg}^{2+}$ .

Les caractères principaux d'une enzyme thermostable sont

- a) soit la présence de ponts disulfures
- b) la glycosylation de la protéine
- c) une proportion importante de feuillet  $\beta$
- d) une grande hydrophobicité de la protéine.

KASUMI et coll. ( 53 ) ont avancé que l'isomérase de St. griseofuscus contient 2 ponts disulfures et qu'elle présente 36 p.100 de feuillet  $\beta$ .

Nous verrons ultérieurement que l'enzyme ici étudiée présente peu ou pas de chaîne saccharidique sur sa structure mais qu'elle est très hydrophobe.

Par ailleurs il est à ajouter qu'une enzyme métallo-dépendante est souvent plus stable à la température lorsqu'elle est sous forme de complexe enzyme-métal par rapport à l'apoenzyme. Ceci est le cas de la glucose-isomérase de St. violaceoniger.

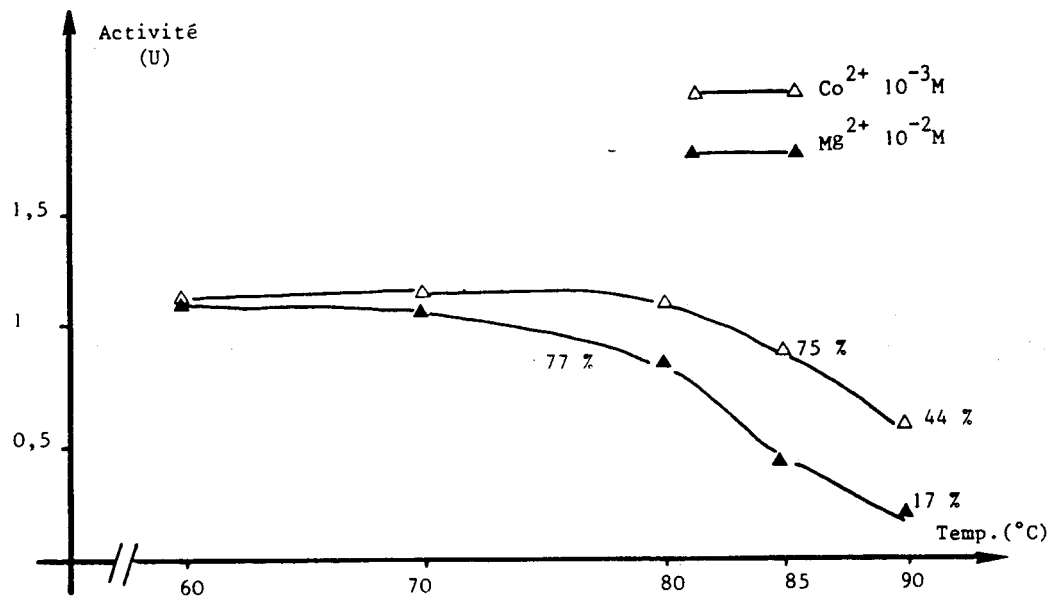


FIGURE 8 : STABILITÉ DE L'ACTIVITÉ EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE

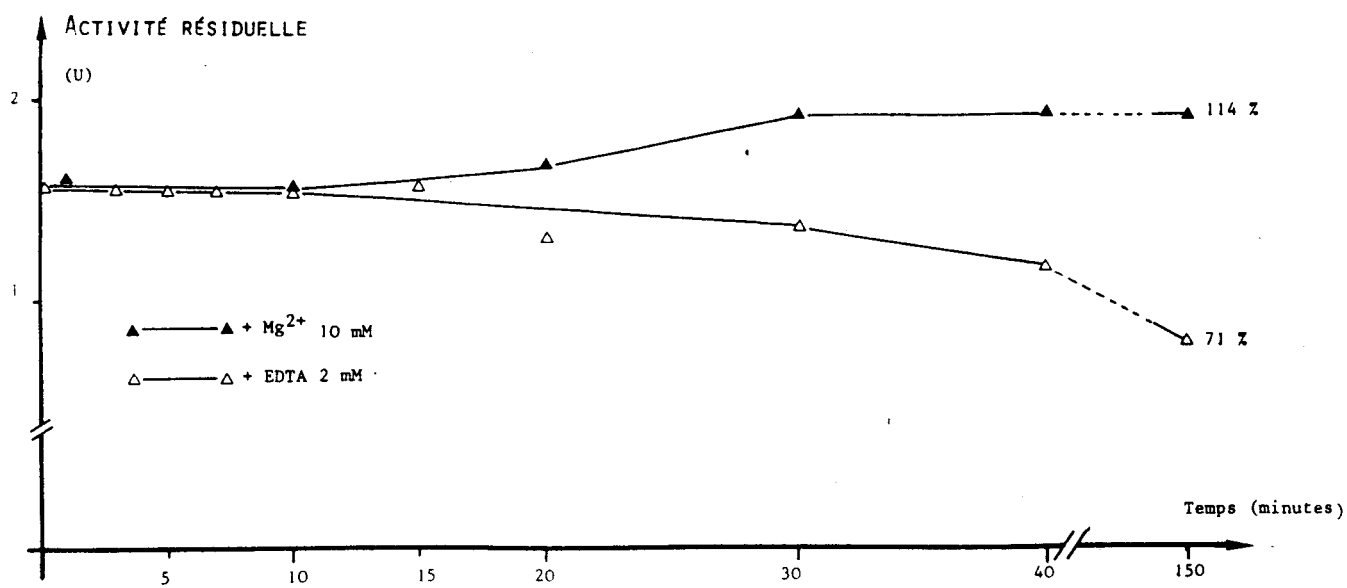


FIGURE 9 : STABILITÉ DE L'ACTIVITÉ À 60°C EN FONCTION DU TEMPS



.../...

b) Dans un second temps, l'activité résiduelle a été mesurée en fonction du temps pour l'enzyme pré-incubée soit à 60°C soit à 70°C (pré-incubation sans substrat).

\* A 70°C : L'activité résiduelle chute fortement pour une enzyme débarassée de cations. Les résultats sont rassemblés dans la figure 10 page 79 . L'enzyme , sans métal, ne présente déjà plus que 38 p.100 d'activité résiduelle après 10 mn de pré-incubation à 70°C et 0 P.100 après 30 mn.

Par contre, sous forme enzyme -  $Mg^{2+}$ , l'activité est mieux préservée puisqu'elle présente encore 86 p.100 d'activité après 20 minutes et 38 p.100 après 30 minutes.

\* A 60°C : La figure 9 page 77 montre qu'à cette température l'activité résiduelle pour l'enzyme sans métal après 2 h 30 d'incubation, est de 71 p. 100. Pour l'enzyme-  $Mg^{2+}$ , elle est de 114 p. 100.

Le métal - ici le magnésium- modifie donc la structure de l'enzyme et lui confère une meilleure stabilité face à la température.

Il est à noter cependant que la représentation log (p.100 d'activité résiduelle) en fonction du temps de pré-incubation à 70°C indique une dénaturation diphasique, que ce soit en présence ou non de magnésium. (figure 10 page 79 ). La dénaturation qui a lieu dans un premier temps ( pendant les 8 premières minutes) affecte peu l'activité. Le magnésium joue son rôle de protecteur puisque pendant la première phase, toute l'activité est préservée et la chute au cours de la seconde phase est faible.

Le tableau 16 page 79 résume les différentes activités résiduelles mesurées selon l'état de l'enzyme après 10 minutes de pré-incubation à 60 et 70°C. Seule l'enzyme sans métal perd de l'activité à 70°C. Ainsi dans les schémas-ancien et nouveau- de purification, l'activité n'est pas affectée par le traitement thermique dans les conditions décrites page 49.

Dans l'ancien protocole la perte d'activité ne peut donc être imputable au traitement thermique.

### 3-2- EFFET DES PH. ACIDES SUR LA STABILITE

Cette étude a été conduite pour les trois formes enzymatiques : enzyme sans métal (en présence d'EDTA 5 mM) enzyme -  $Mg^{2+}$  et enzyme -  $Co^{2+}$  .

Ces solutions sont préalablement saturées ou débarassées de métaux

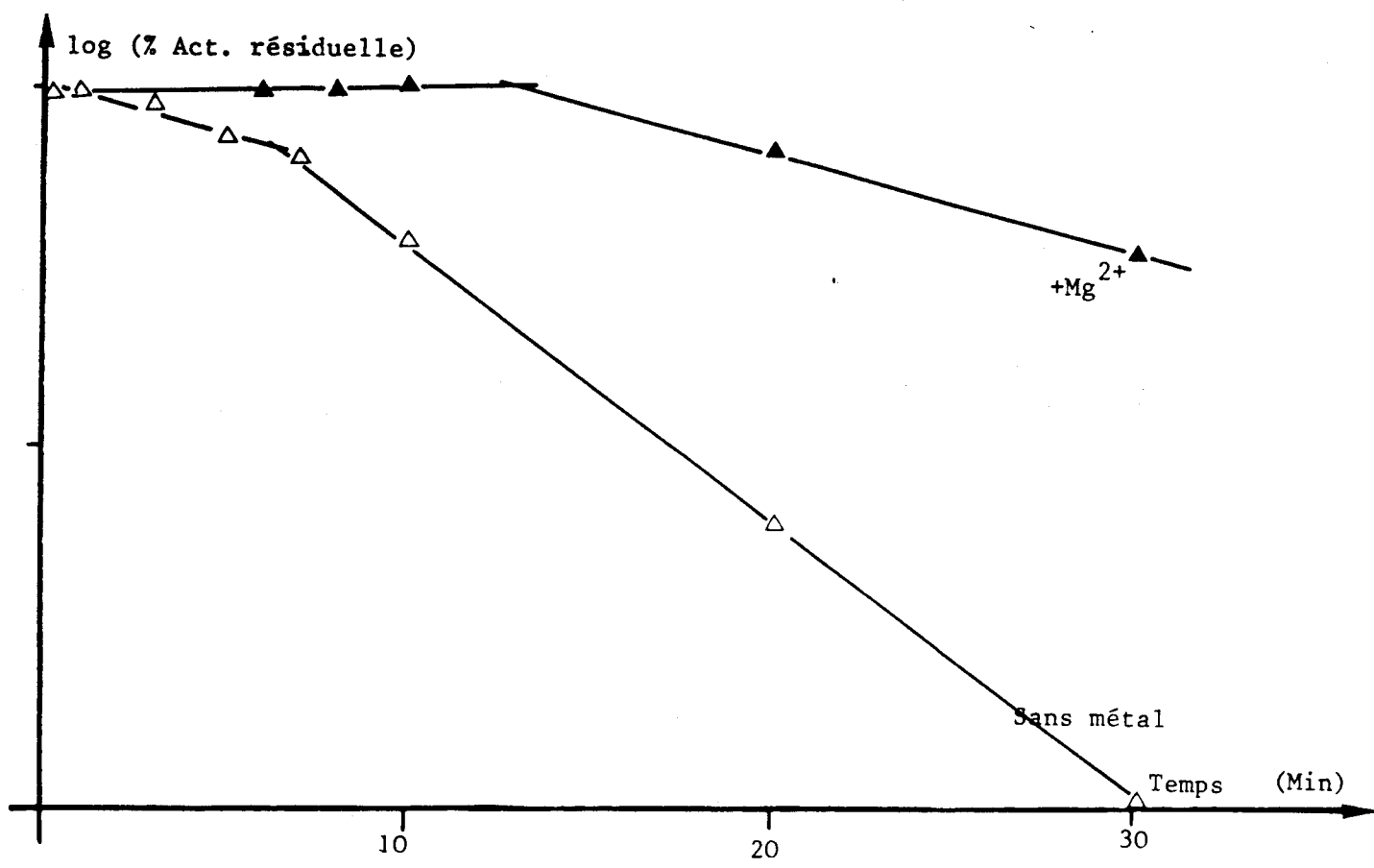


FIGURE 10 : STABILITÉ DE L'ACTIVITÉ À 70°C

TABLEAU 16 : ACTIVITÉ RÉSIDUELLE APRÈS 10 MIN DE TRAITEMENT THERMIQUE

|                            | TEMPERATURE DE TRAITEMENT |      |
|----------------------------|---------------------------|------|
|                            | 60°C                      | 70°C |
| Enzyme + EDTA (sans métal) | 100                       | 38   |
| Enzyme + Co <sup>2+</sup>  | 100                       | 100  |
| Enzyme + Mg <sup>2+</sup>  | 100                       | 100  |

.../...

avant l'incubation aux différents pH, pendant une nuit à température ambiante. Les activités résiduelles en fonction du pH final du milieu sont reportées dans la figure 19 page 100.

L'enzyme est, dans les trois cas, stable pour un pH supérieur à pH 5 et il y a perte significative en dessous de pH 5,0.

Le métal ne joue donc pas de rôle protecteur vis à vis du pH.

Ces stades de stabilité vis à vis des conditions physico-chimiques montrent que l'on est en présence d'une enzyme dont la structure est bien stable malgré sa forme oligomérique comme nous le verrons par la suite.

Très stable aux pH acides supérieurs à pH 5,0 et conservant bien son activité à 60°C, l'enzyme de St. violaceoniger fait donc bien partie de la famille homogène des glucose-isomérases de Streptomyces sp.

L'effet des pH basiques n'a pas été abordé car tous les auteurs sont en accord sur le fait que l'enzyme est stable jusqu'au moins pH 10,5.

#### IV) EFFET DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT :

La constante de Michaelis de l'enzyme pour le glucose a été déterminée en présence de  $Mg^{2+}$  10mM et de  $Co^{2+}$  10 mM.

Comme le montre la figure 11 page 81 la cinétique est de type michaelienne. Les  $K_m$  et  $V_{max}$  de l'enzyme sont résumés dans le tableau I7 page 81.

Ces valeurs seront utilisées lors de l'effet de différents agents sur l'activité mesurée dans ces conditions de concentration en métaux respectifs. Mais nous verrons par la suite que ces paramètres sont arbitraires puisqu'ils varient en fonction de la concentration en cations.

Notons toutefois qu'en présence de cobalt, l'enzyme présente près de 3 fois moins d'affinité vis à vis du glucose par rapport à l'enzyme  $Mg^{2+}$ . De plus, la vitesse maximale de l'enzyme  $-Co^{2+}$  est de 62 p.100 de celle de l'enzyme  $-Mg^{2+}$ . Le magnésium est donc bien plus activateur de la cobalt.

L'affinité du complexe Enzyme -  $Mg^{2+}$  est de 0,105 M lorsque la concentration en magnésium est de 10 mM. Cette valeur, qui représente la moyenne de 15 à 20 essais, est très importante. En effet, nous verrons par la suite qu'elle reflète l'absence d'inhibiteurs dans le milieu, notamment de métaux contaminants. Dans ce dernier cas, l'affinité diminue pour atteindre des valeurs de l'ordre de 0,6 M,

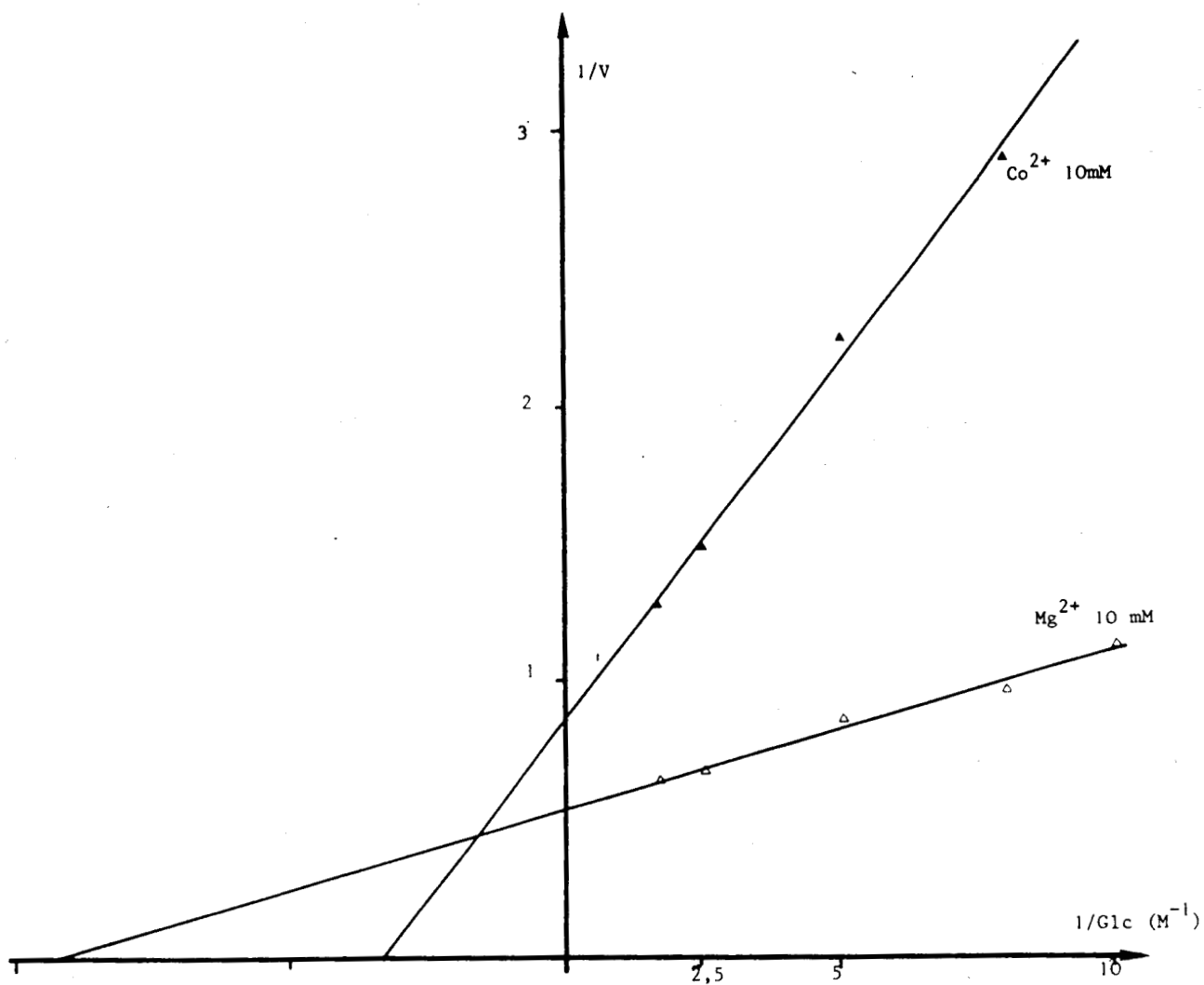


FIGURE 11 : CINÉTIQUES D'ISOMÉRISEMENT DE L'ENZYME,  $Mg^{2+}$  ET DE L'ENZYME -  $Co^{2+}$   
-REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK -

TABLEAU 17 : PARAMÈTRES DE L'ENZYME POUR LE GLUCOSE

|                          | $K_m (M)$ | $V_{max} (*)$<br>( $\mu mole/min/mg$ ) |
|--------------------------|-----------|--|
| Enzyme + $Mg^{2+}$ 10 mM | 0,110     | 20                                     |
| Enzyme + $Co^{2+}$ 10 mM | 0,30      | 12,4                                   |

(\*) exprimé en activité spécifique

TABLEAU 18: EFFET DES IONS MÉTALLIQUES SUR L'ACTIVITÉ  
 DE LA GLUCOSE ISOMÉRASE

| INHIBITEURS<br>(1 mM) | ACTIVITE RESIDUELLE             |          |                               |          |                                |          |
|-----------------------|---------------------------------|----------|-------------------------------|----------|--------------------------------|----------|
|                       | Enzyme + Co <sup>2+</sup> 10 mM |          | Enz. + Mg <sup>2+</sup> 10 mM |          | Enz. + Mg <sup>2+</sup> 100 mM |          |
|                       | U                               | p.100(★) | U                             | p.100(★) | U                              | p.100(★) |
| Témoin                | 1,2                             | 100      | 2,5                           | 100      | 2,8                            | 100      |
| Hg <sup>2+</sup>      | 0,13                            | 11       | 0                             | 0        |                                |          |
| Cu <sup>2+</sup>      | 0,64                            | 53       | 0                             | 0        |                                |          |
| Zn <sup>2+</sup>      | 0,73                            | 61       | 0                             | 0        |                                |          |
| Fe <sup>2+</sup>      | 0,55                            | 46       | 0,67                          | 27       |                                |          |
| Fe <sup>3+</sup>      | 0,66                            | 55       | 0                             | 0        |                                |          |
| Mn <sup>2+</sup>      | 1,18                            | 98       | 0,23                          | 9,4      | 0,72                           | 26       |
| Ca <sup>2+</sup>      | 1,18                            | 98       | 1,22                          | 49       | 2,53                           | 91       |

(★) p.100 d'activité résiduelle

## V) ACTION DE DIFFÉRENTS AGENTS SUR L'ACTIVITÉ :

### 5-1) EFFET DES METAUX LOURDS SUR L'ACTIVITE :

Le tableau 18 page 82 résume l'effet de quelques ions métalliques sur l'activité enzymatique. L'isomérisation est réalisée dans le milieu contenant 1mM de chaque ions étudié.

Quand le magnésium est utilisé comme activateur, l'inhibition par les métaux lourds est plus soulignée que lorsque l'enzyme est sous forme enzyme-Co<sup>2+</sup>.

Comme dans le cas de l'étude de la stabilité vis à vis des conditions physico-chimiques d'isomérisation (pH, température), le cobalt est plus protecteur de l'activité glucose-isomérase. Nous verrons ultérieurement que l'affinité de l'enzyme pour le cobalt est près de 10 fois plus importante que pour le magnésium.

Une concentration 10 fois plus importante en magnésium (100 mM) permet de lever l'inhibition surtout par le calcium.

### 5-2) CINETIQUES D'ACTIVATION PAR LE COBALT ET LE MAGNESIUM

Nous avons vu précédemment (figure 11 page 81 ) que la concentration en métal activateur influe sur la vitesse de réaction.

La vitesse initiale de formation du fructose a été étudiée en fonction de la concentration en métal respectif et en fonction de la concentration en substrat, pour une solution enzymatique préalablement débarassée de métal par l'EDTA.

#### 5.2.1 Cinétiques en tampon MOPS pH 7,0

##### a) Cinétiques d'action de l'enzyme-magnésium :

Les figures 12a et 12b page 84 indiquent les représentations selon la méthode de Lineweaver-Burk. Ainsi, les vitesses maximales théoriques, les affinités varient en fonction de la concentration en substrat pour des concentrations en métal fixées et inversement. Dans les deux cas de représentation, les droites se coupent en un point dans le cadran supérieur gauche.

##### b) cinétique d'action de l'enzyme - cobalt :

La même méthode a été utilisée pour étudier les variations de vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat et en cobalt . Le même phénomène est observé dans le cas de l'activation par le cobalt.

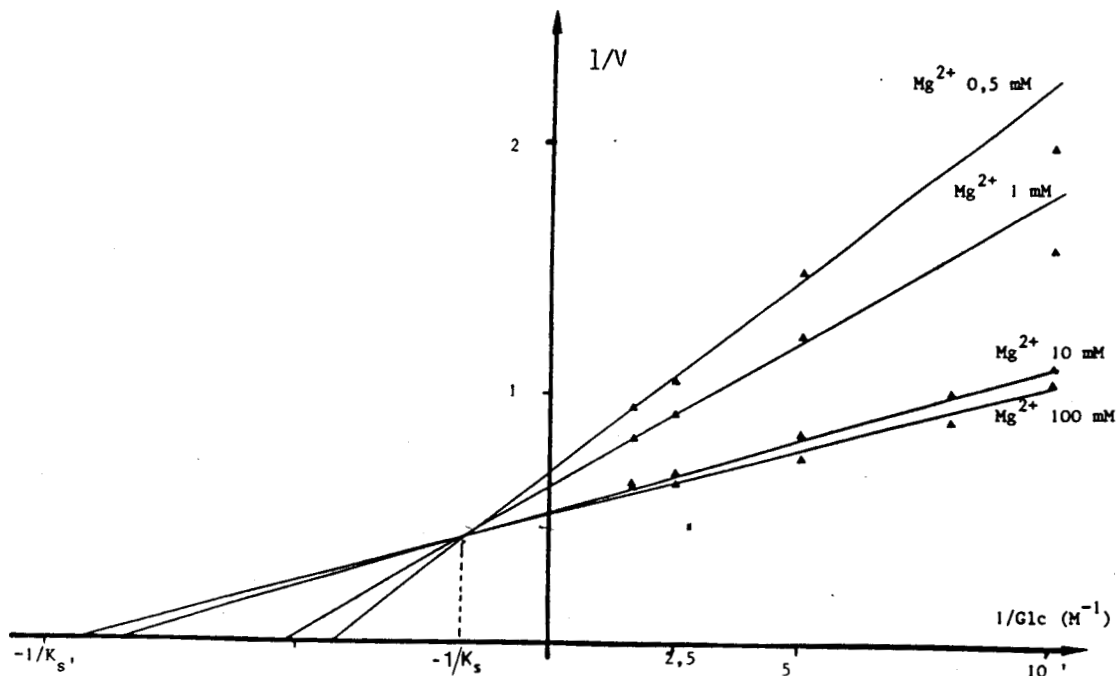


FIGURE 12 A : CINÉTIQUES D'ACTIVATION DE L'ENZYME PAR LE MAGNÉSIUM EN TAMPON MOPS 0,1 M PH 7,0  
- REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK-

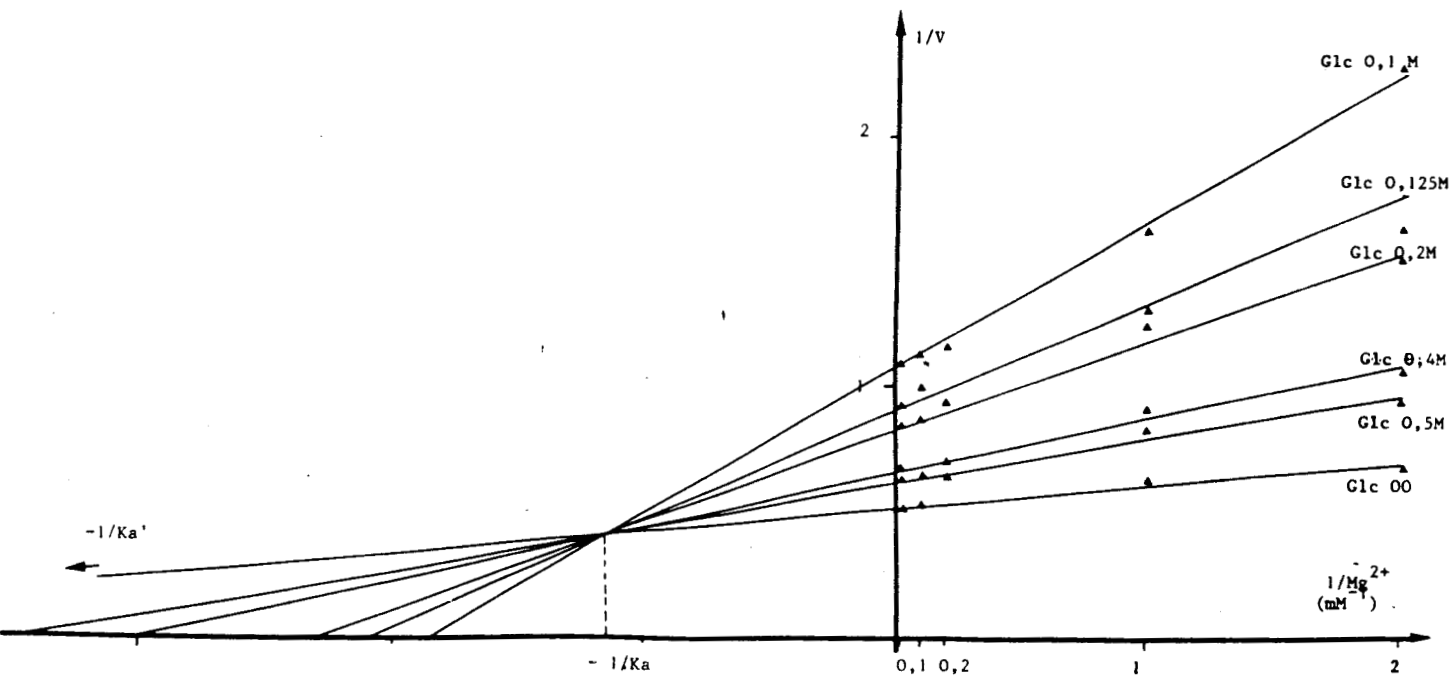
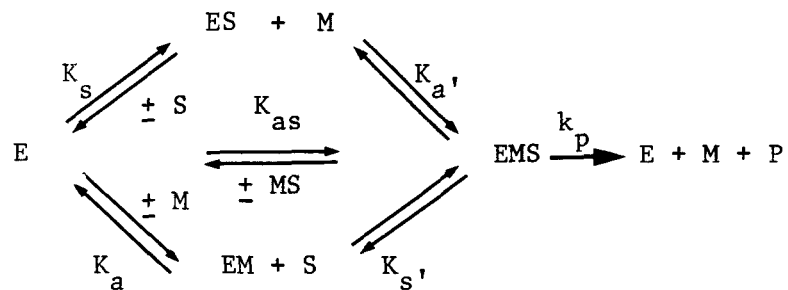


FIGURE 12B : CINÉTIQUE D'ISOMÉRIISATION EN TAMPON MOPS 0,1 M PH 7,0 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN  
MAGNÉSIUM À CONCENTRATIONS EN GLUCOSE VARIABLES  
- REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK-

.../...

c) Interprétation des résultats :

Le mécanisme de la réaction catalysée par une enzyme qui nécessite la présence d'un ion divalent est analogue à un système à deux substrats (72, 31). On peut envisager deux mécanismes possibles pour ces systèmes : La libération du produit nécessite soit la fixation des deux substrats sur l'enzyme, soit la fixation d'un seul substrat, le second étant lié dans un deuxième temps. On suppose donc que l'enzyme possède deux sites de fixation, un pour le substrat, un pour l'effecteur. En admettant l'hypothèse que la fixation de l'un des deux composés se fait indépendamment de l'autre, le système est le suivant :



$K_s$  et  $K_{s'}$  représentent les constantes de dissociation des étapes  $\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES}$  et  $\text{EM} + \text{S} \rightleftharpoons \text{EMS}$  respectivement. Par ailleurs,  $K_a$  et  $K_{a'}$  représentent les constantes de dissociation des étapes  $\text{E} + \text{M} \rightleftharpoons \text{EM}$  et  $\text{ES} + \text{M} \rightleftharpoons \text{EMS}$  et  $k_p$  représente la constante de vitesse de formation du produit.

La formation d'un complexe substrat - métal dans un premier temps, et la fixation de celui-ci sur l'enzyme par la suite, est une hypothèse non envisageable, car la concentration en métal est très largement inférieure à la concentration en substrat (facteur 20 à 80). Il y aurait donc, dans ce cas, une compétition entre enzyme - substrat et enzyme substrat-métal. La constante de dissociation  $K_{as}$  peut donc dans ce cas être négligée car voisine de l'infini.

Ainsi, l'équation générale de la vitesse, dans le cas d'un système séquentiel non ordonné, selon la théorie de Michaelis-Menten, est de forme :

$$v = \frac{K_p e}{\frac{K_{s'}}{S} + \frac{K_{a'}}{M} + \frac{K_a K_{s'}}{MS}}$$

$$(\text{avec } K_a K_{s'} = K_{a'} K_s)$$

Les représentations graphiques portent  $1/v$  en fonction de  $1/S$  ou de  $1/M$ .



.../...

Quand  $S$ , concentration en substrat, est la variable, l'équation devient :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s \left( \frac{K_{a'}}{M} + \frac{K_{a'}}{K_a} \right)}{V_{\max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \left( \frac{K_{a'}}{M} + 1 \right)$$

Le point d'intersection des droites a pour abscisse  $(-1 / K_a)$ .

De même, quand  $M$ , concentration en effecteur, est la variable, on a :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a \left( \frac{K_{s'}}{S} + \frac{K_{s'}}{K_s} \right)}{V_{\max}} \times \frac{1}{M} + \frac{1}{V_{\max}} \left( \frac{K_{s'}}{S} + 1 \right)$$

et le point d'intersection des droites a pour abscisse  $(-1/K_s)$ .

Les constantes de dissociation peuvent être déterminées par le calcul ou graphiquement. Le fait que les points d'intersection de chaque représentation se trouvent dans le cadran supérieur gauche indique que  $K_{a'}$  est inférieur à  $K_a$  et  $K_s$ . Le tableau n° 19 page 87 rassemble les résultats obtenus.

On constate que l'affinité de l'enzyme pour le substrat augmente (facteur 5,4) quand l'enzyme se trouve sous forme de complexe (enzyme-métal) ( $K_{s'} < K_s$ ). Le même phénomène se retrouve quand on étudie la formation du complexe enzyme-métal. En effet l'association de l'enzyme et du métal est favorisée quand le complexe de Michaelis est formé ( $K_{a'} < K_a$ ).

Nous sommes donc en présence d'un système séquentiel aléatoire d'une enzyme métallo-dépendante.

Par ailleurs, l'affinité de l'enzyme pour le cobalt est 12,4 fois plus importante que pour le magnésium ( $K_a = 70 \mu\text{M}$  pour le cobalt et  $K_a = 870 \mu\text{M}$  pour le magnésium). Ceci permet d'expliquer l'effet plus protecteur du cobalt lorsqu'il y a présence de métaux contaminants dans le milieu réactionnel.

.../...

TABLEAU 19 : CONSTANTES D'AFFINITÉ DE LA  
GLUCOSE ISOMÉRISE

| CONSTANTE | REACTION                        | Enzyme - Mg <sup>2+</sup>      | Enzyme - Co <sup>2+</sup>      |
|-----------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| $K_s$     | $E + S \rightleftharpoons E-S$  | $0,57 \pm 0,02 \text{ M}$      | $0,57 \pm 0,02 \text{ M}$      |
| $K_{s'}$  | $EM + S \rightleftharpoons EMS$ | $0,102 \pm 0,003 \text{ M}$    | $0,24 \pm 0,02 \text{ M}$      |
| $K_a$     | $E + M \rightleftharpoons EM$   | $0,87 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | $0,07 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ |
| $K_{a'}$  | $ES + M \rightleftharpoons EMS$ | $0,16 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ | $0,03 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ |

.../...

De plus on retrouve bien les paramètres de l'enzyme plus intéressants lorsque celle-ci est sous forme enzyme-Mg<sup>2+</sup>. (affinité et vitesse maximale 2,3 et 1,5 fois plus importantes respectivement).

Enfin l'enzyme sans métal présente une faible affinité, mais existante, pour le substrat ( $K_s = 0,57 \text{ M}$ ). Mais si on considère les deux voies possibles, la fixation préalable du métal est de loin plus importante, l'affinité de l'enzyme E pour le magnésium étant près de 600 fois supérieure à celle pour le substrat.

Enfin, le métal (magnésium ou cobalt) est un activateur indispensable, son absence ne permettant pas expérimentalement de déceler d'activité.

### 5.2.2 Cinétique d'activation par le magnésium en tampon Tris pH 7,0

Lorsque le tampon MOPS est remplacé par un tampon Tris, le magnésium agit alors comme un activateur vrai. Les représentations en fonction de  $1/\text{Mg}$  et  $1/\text{Glc}$  à différentes concentrations de l'autre "substrat" sont reportées dans les figures 13a et 13b page 89. Les affinités pour le glucose et le magnésium sont de 52 mM et 3 mM respectivement et la vitesse maximale est de  $0,95 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Ainsi lorsque le milieu est tamponné à pH 7,0 par le Tris, l'affinité est deux fois plus importante pour le substrat mais la vitesse maximale deux fois plus faible.

L'utilisation de ce tampon permet néanmoins de montrer que le complexe enzyme-métal est bien la forme prédominante de l'enzyme fonctionnelle. Nous avons déjà constaté, lors de la détermination du pH optimum, que le tampon Tris engendre une moindre activité de l'enzyme.

Le type d'inhibition par le Tris n'a pas été déterminé ici mais il est certain qu'il entraîne une diminution de 50 p.100 de la vitesse maximale.

Dans le cas de l'enzyme de B. coagulans DANNO (23) a mis en évidence que le Tris est un inhibiteur compétitif et KASUMI et coll. (51) a montré que celle de St. griseofuscus est inhibé de la même façon. Néanmoins, SLEIN (109) a montré que la D-xylose-isomérase de Pasteurella pestis est inhibée de façon <sup>non-</sup>compétitive.

.../...

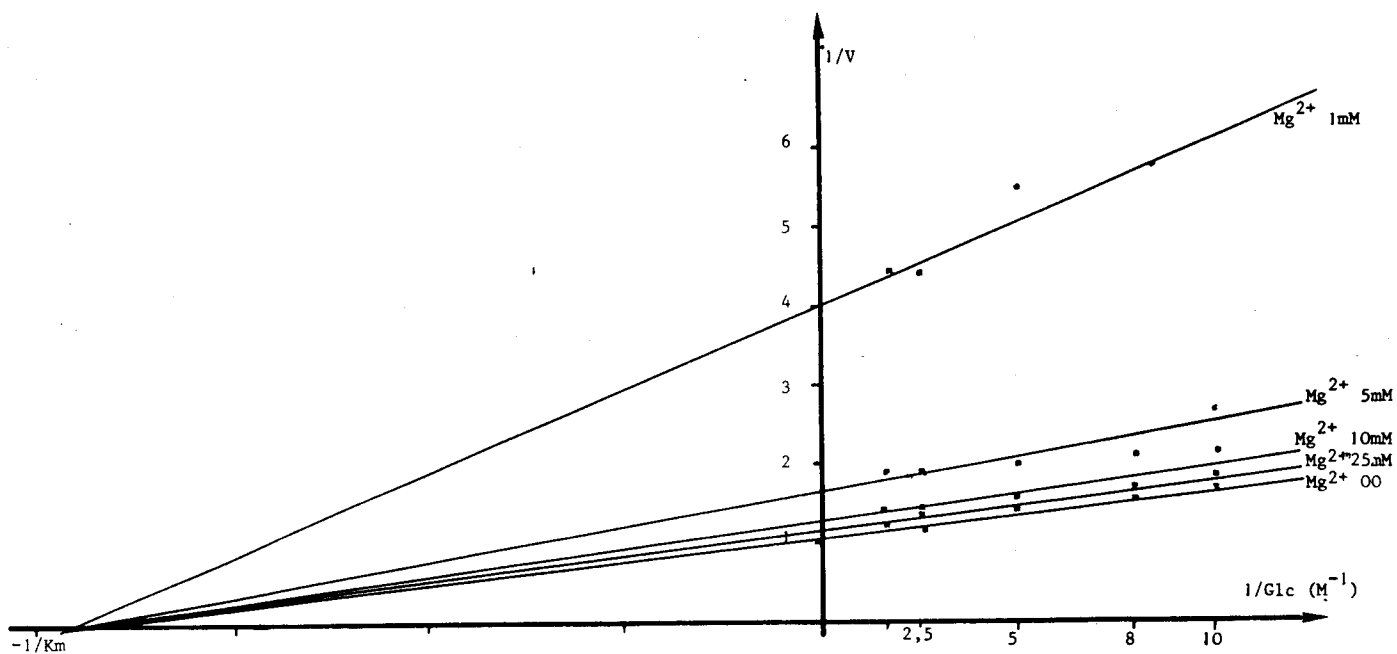


FIGURE 13 A : CINÉTIQUE D'ISOMÉRIISATION À CONCENTRATIONS EN MAGNÉSIUM CONSTANTES EN TAMPON TRIS-HCL PH 7,0 - REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK-

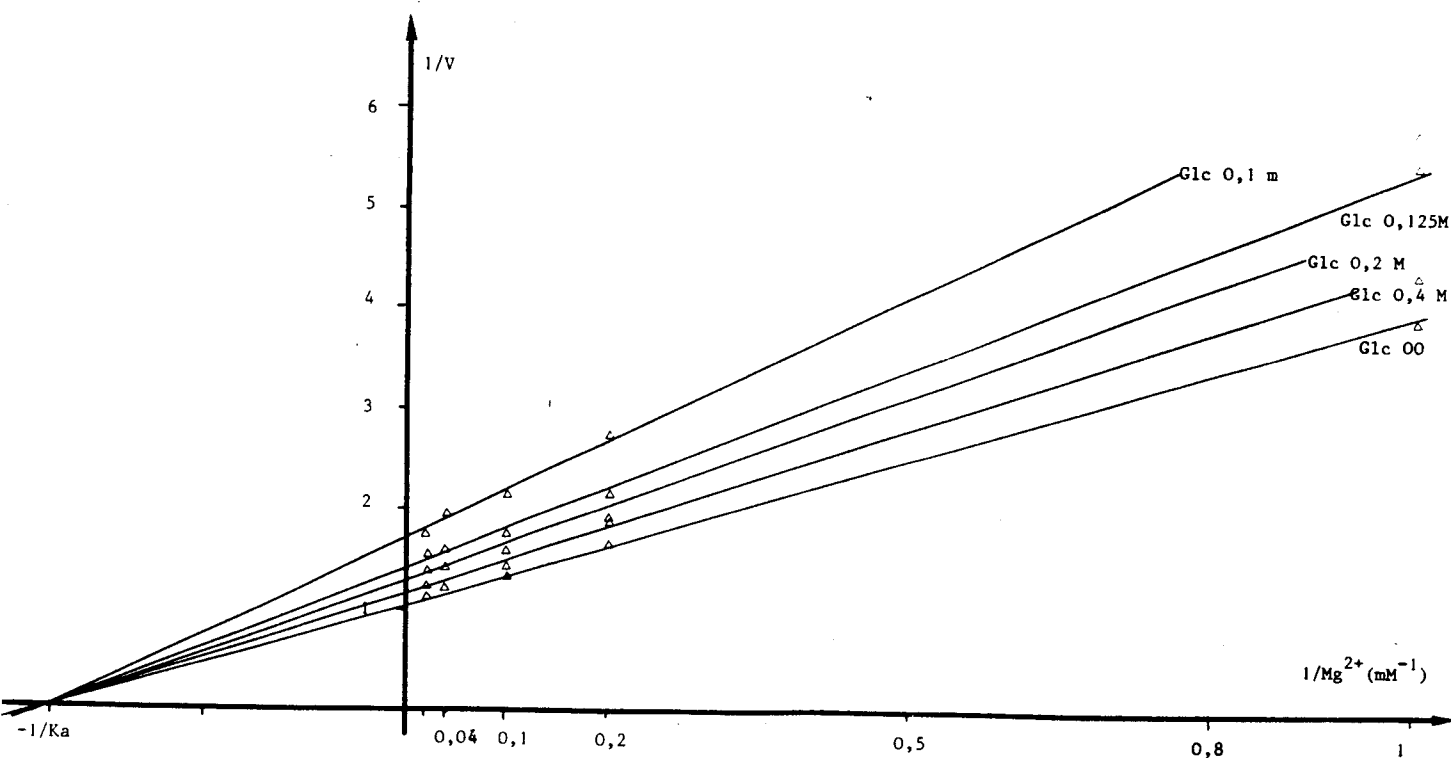


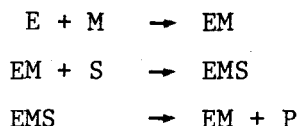
FIGURE 13 B : CINÉTIQUE D'ISOMÉRIISATION À CONCENTRATIONS EN GLUCOSE CONSTANTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN MAGNÉSIUM, EN TAMPON TRIS PH 7,0 -REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK-

.../...

Le plus intéressant est bien sûr la confirmation que le mécanisme réactionnel est un système ordonné.

Le rapport des constantes d'affinité du glucose et des métaux est en faveur de la fixation préalable du métal en tampon MOPS, mais la cinétique reste néanmoins celle d'un mécanisme "bi-bi aléatoire".

Le mécanisme réactionnel dominant et efficace est donc :



Mais il faut néanmoins garder à l'esprit que, bien qu'aucune activité ne soit détectée en absence de métal, l'enzyme E présente théoriquement une affinité ( $K_s = 0,57$  M) pour le substrat S seul.

### 5-3) EFFET DES REACTIFS SPECIFIQUES DES GROUPEMENTS THIOLS :

Nous verrons ultérieurement (page 110) que la glucose isomérase contient des groupements sulphydryls libres.

L'effet d'agents, notamment des dérivés mercureux ou mercuriques décrits comme étant des plus spécifiques des groupements thiols (47a) est reporté dans le tableau 20 page 91. Avant l'ajout de substrat, l'enzyme a été pré-incubée en présence de chaque réactif et, lorsqu'il y a lieu, une seconde pré-incubation dans les mêmes conditions a été réalisée en ajoutant du DTT 2 mM final.

Les mesures d'activités résiduelles montrent qu'il y a inhibition notoire par ces réactifs sauf dans le cas du pCMB et de la n Ethyl-maléimide.

Le pCMB n'est pas inhibiteur de façon significative pour des raisons de faible accessibilité. En effet, le chlorure méthylmercureux, sous forme monovalente comme lui, est inhibiteur.

L'ion mercurique est quant à lui totalement inhibiteur comme nous l'avions déjà constaté page 82.

Notons enfin que l'inhibition est levée par l'adjonction de réducteur (dithiothréitol ou DTT) ce qui est une preuve supplémentaire que les groupements thiols sont bien ciblés. Ceux-ci, ou au moins l'un d'entre eux, sont indispensables pour l'expression de l'activité de la glucose isomérase de St. violaceoniger.

TABLEAU 20 : EFFET DES RÉACTIFS SPÉCIFIQUES DES THIOLS LIBRES

| REACTIFS (0,5 mM)   | ACTIVITE RESIDUELLE |       |
|---|---------------------|-------|
|   | (U)                 | p.100 |
| Témoin sans réactif   | 1,1                 | 100   |
| PCMB  | 1,0                 | 91    |
| nE M  | 0,97                | 88    |
| (H <sub>3</sub> C- Hg <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> )<br>chlorure de méthyl mercureux  | 0,73                | 66,4  |
| + DTT 2 mM  | 1,03                | 94    |
| Acétate mercurique Hg <sup>2+</sup> , (CH <sub>3</sub> -COO <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> | 0                   | 0     |
| + DTT 2 mM  | 1,03                | 94    |
| Chlorure mercurique (Hg <sup>2+</sup> , 2Cl <sup>-</sup> )                              | 0                   | 0     |
| + DTT 2 mM  | 0,93                | 84,5  |

.../...

#### 5-4) CINETIQUE D'ACTION DE L'ION MERCURIQUE SUR L'ACTIVITE

Les variations de vitesse initiale d'isomérisation ont été étudiées en fonction de faibles concentrations en ion mercurique. La représentation des inverses selon Lineweaver-Burk et selon la méthode de Dixon indiquent une inhibition de type mixte hyperbolique. (figures 14 page 93).

Dans ce cas, le complexe secondaire formé par action de l'inhibiteur sur le complexe EMS peut se décomposer en redonnant le produit, l'inhibiteur et l'enzyme. Pour se rendre compte de cette propriété on trace le pourcentage d'activité résiduelle en fonction de  $\log (Hg)$ .

La courbe est sigmoïde comme dans le cas d'une inhibition par excès de substrat (figure 14c page 93) dans un premier temps, au niveau du site actif de l'enzyme et, quand la concentration en  $Hg^{2+}$  augmente, cette action se porte sur la totalité de la molécule.

Ce qui confirme que le site actif de l'enzyme contient au moins un groupement thiol.

#### 5-5) EFFET DU DTT SUR L'ACTIVITE ISOMERASE :

Le dithiothréitol, (ou "réactif de Cleland"), est un très bon réducteur ( $E'_0 = -0,32 V$ ) et est plus commode d'emploi que le  $\beta$ -mercaptoéthanol (17, 61).

L'action du DTT est différente selon l'état de l'enzyme, notamment selon son activité spécifique (qui peut varier à pureté électrophorétique équivalente).

##### a) Action du DTT à forte concentration (supérieure à 2mM)

Dans ce cas, le DTT agit comme inhibiteur compétitif sur l'activité. Les figures 16a et 16b page 94 montrent qu'il fait chuter l'affinité de l'enzyme pour le substrat et son  $K_i$  est de 4,9 mM. (Détermination selon la méthode de Dixon).

##### b) action du DTT à faible concentration (inférieure à 2 mM)

Dans ce cas le DTT n'a aucune action sur la vitesse de réaction de l'enzyme, en présence de Mg 10 mM lorsqu'elle présente son activité spécifique maximale (220 U.mg<sup>-1</sup>)

Par contre, lorsque l'enzyme purifiée présente une activité spécifique inférieure mais réversible par un traitement à l'EDTA par exemple, le DTT a une action activatrice (la vitesse maximale peut être multipliée par un facteur 2 avec toutefois une légère augmentation de  $K_m$ . L'exemple reporté dans la figure 17 indique que la solution enzymatique témoin con-

.../...

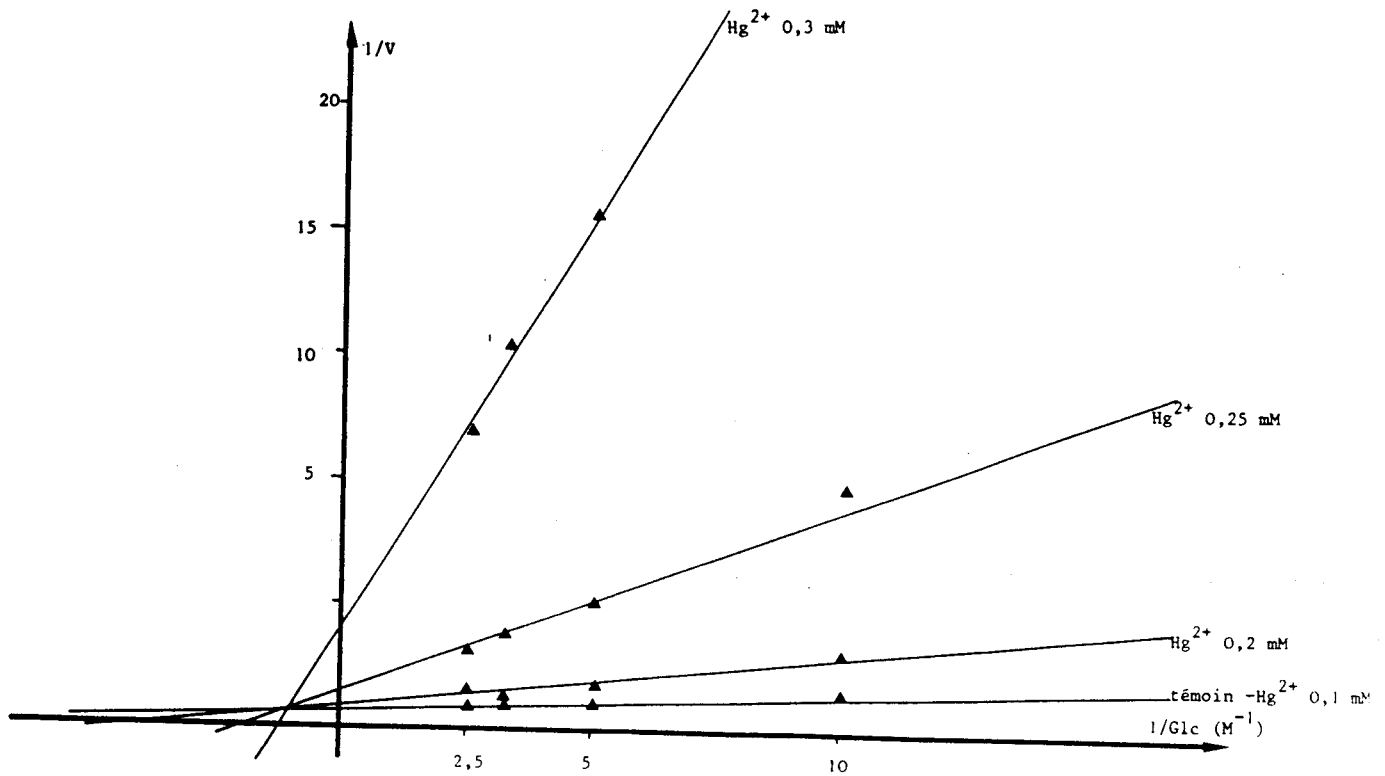


FIGURE 14 A : EFFET DE L'ION MERCURIQUE SUR L'ACTIVITÉ -REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK -

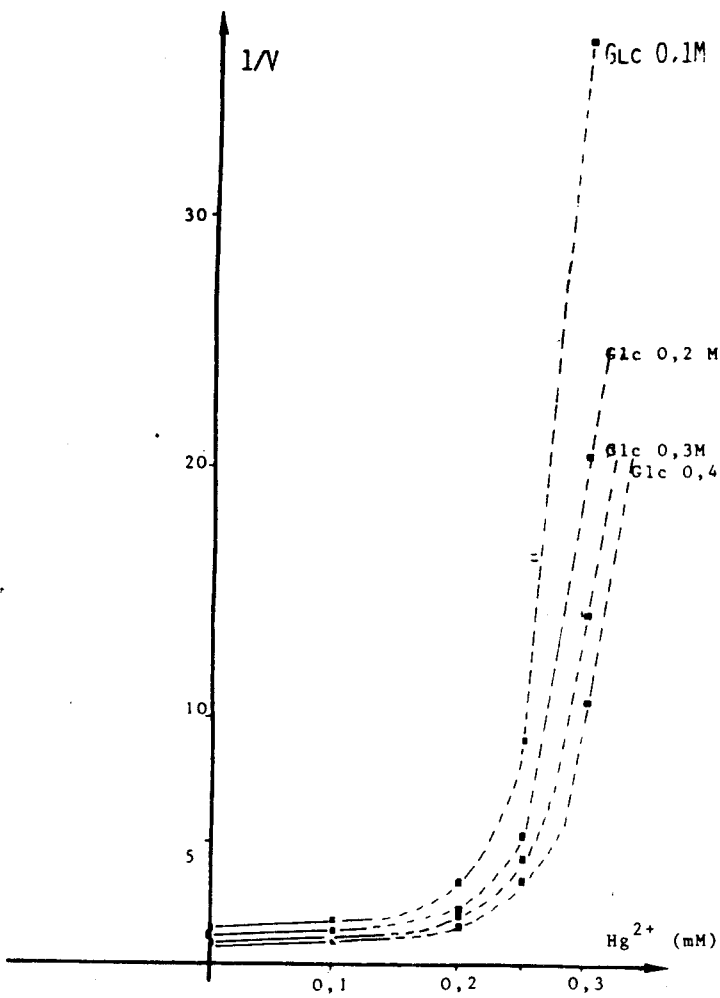


FIGURE 14 B : EFFET DE L'ION MERCURIQUE SUR L'ACTIVITÉ -REPRÉSENTATION DE DIXON-

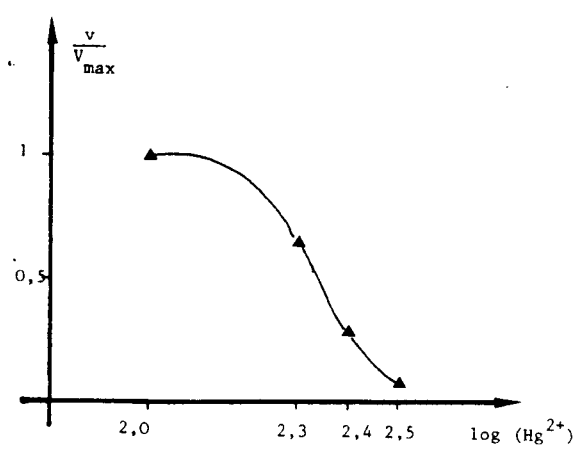


FIGURE 14 C : EFFET DE L'ION  $Hg^{2+}$  SUR L'ACTIVITÉ -REPRÉSENTATION DE KUHN-



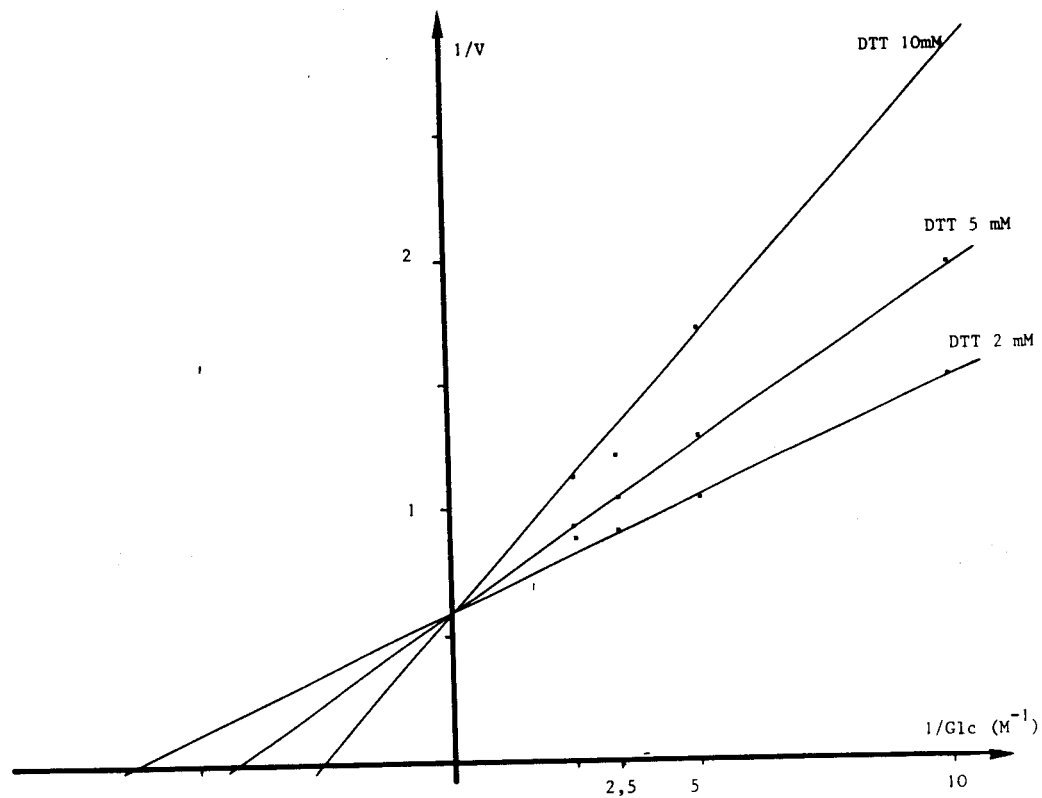


FIGURE 16 A : CINÉTIQUE D'ISOMÉRIISATION EN PRÉSENCE DE DTT À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS  
 - REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK -

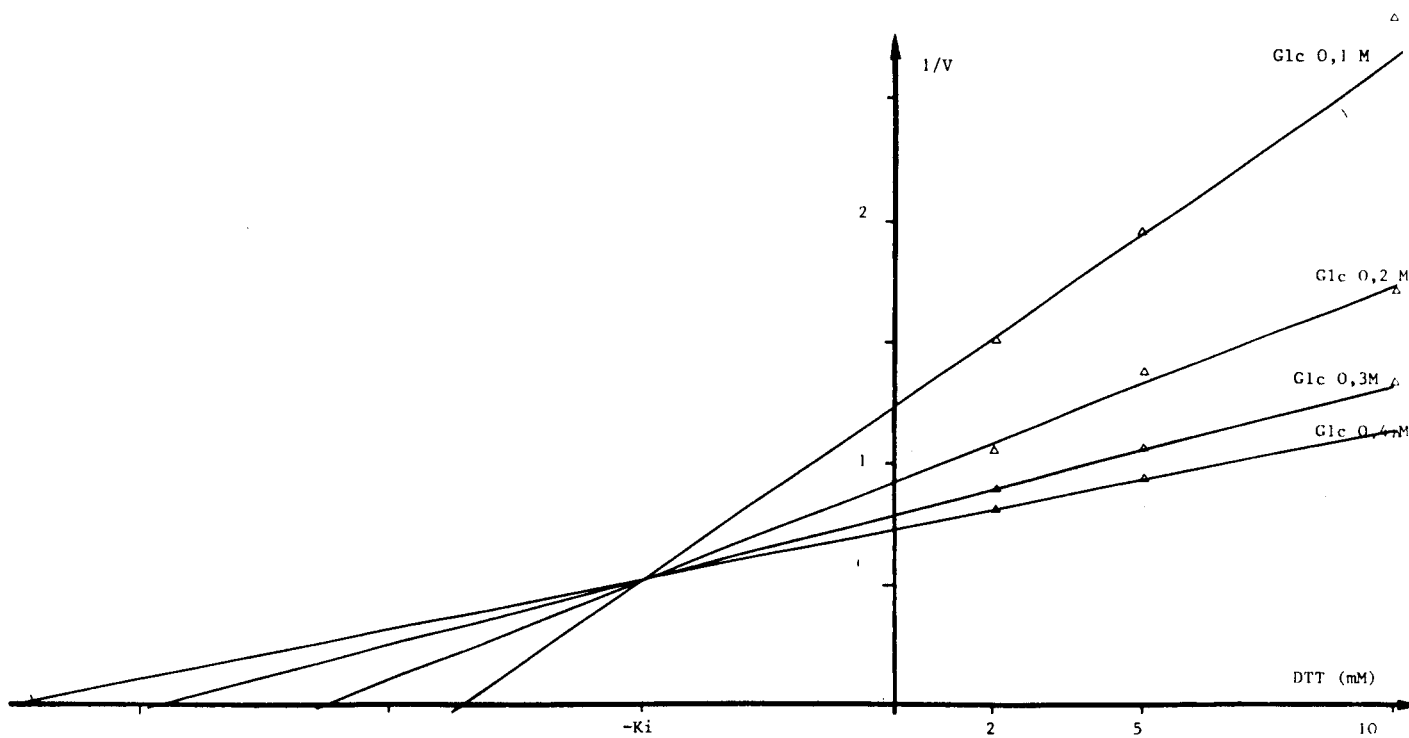


FIGURE 16 B : INHIBITION DE L'ACTIVITÉ PAR LE DTT À CONCENTRATIONS SUPÉRIEURES À 2MM  
 - REPRÉSENTATION DE DIXON -

.../...

tient des métaux contaminants ( $K_m = 0,140$  M au lieu de  $0,105$  M). L'adjonction de DTT à faible concentration permet d'augmenter l'affinité ( $K_m = 0,109$  M en présence de DTT  $0,5$  mM) et la vitesse maximale d'un facteur de 1,45.

L'action "chélatante" du DTT est comparée aussi à celle de l'EDTA dans le tableau 21 page 96 en étudiant l'évolution du rapport Activité en DTT / Activité témoin. On constate bien que, lorsque l'enzyme est préalablement traitée à l'EDTA, ce rapport tend vers 1,0 alors qu'en sortie de chromatographie, il pouvait être de l'ordre de 2,0. Ce phénomène d'inhibition par des cations contaminants est observé pour toutes les solutions après chromatographie même en utilisant de l'eau désionisée par le système Milli-Q<sup>®</sup> de Millipore. (Ce phénomène avait déjà été observé après chromatographie sur DEAE Tris Acryl M lors de la purification).

La pré-incubation en présence de DTT 2mM, 30 minutes à 37°C, permet donc de chélater les cations contaminants tout comme l'EDTA permet de le faire.

Le dithiothréitol est un dérivé soufré du thréose. Par ailleurs, cela n'apparaît pas dans la littérature, mais le pouvoir chélateur du DTT par cyclisation et formation d'un complexe avec métal est possible.

Ce qui explique qu'à faible concentration il soit activateur en augmentant la vitesse maximale et l'affinité à une valeur voisine de l'optimum ( $0,105$  M).

Par la suite, à forte concentration, il devient inhibiteur compétitif du glucose. Nous avons vu que différentes études ont mis en évidence que le site de fixation du métal est très proche de celui du glucose.

L'inhibition par le DTT peut donc s'expliquer par le fait que, de part la position de ses hydroxyles, il présente une affinité pour l'enzyme au niveau du ou des sites de liaison du glucose.

#### 5-6) CONCLUSIONS

Ainsi, de part les types d'inhibition obtenus au cours de l'étude, la présence d'au moins un groupement thiol au niveau du site est plus que probable.

De plus, nous avons vu précédemment que les agents spécifiques des thiols sont inhibiteurs de l'activité et que l'inhibition est levée par le DTT. Le cobalt est plus protecteur que le magnésium contre l'action de l'ion mercurique. Enfin, l'ion activateur est présent au niveau du site et il augmente l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Tout laisse donc à penser que le ou les groupements thiol au niveau du

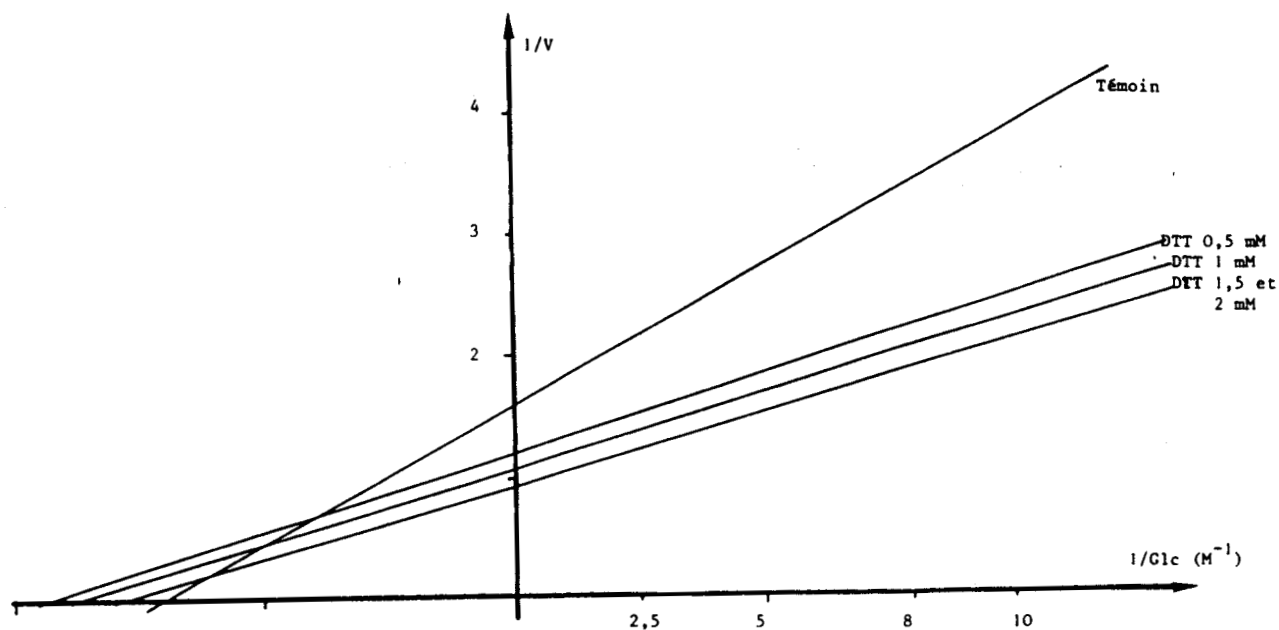


FIGURE 15 : CINÉTIQUE D'ACTIVATION D'UNE ENZYME CONTENANT DES MÉTAUX CONTAMINANTS  
 PAR LE DTT À FAIBLES CONCENTRATIONS - REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK-

TABLEAU 21 : EFFET CHÉLATEUR DU DTT SUR UNE SOLUTION  
 ENZYMATIQUE APRÈS GEL FILTRATION SUR ACA44

| Tp AcA utilisé           | Activité apparente | % récup. | Act. en DTT | % récup. | Act. DTT/ Act. |
|--------------------------|--------------------|----------|-------------|----------|----------------|
| Tp PO <sub>4</sub> 20 mM | 60                 | -        | 112         | -        | 1,8            |
| Ap. dialyse contre EDTA  | <u>90</u>          | 150      | <u>100</u>  | 89       | 1,1            |
| NaCl 1 M                 | 10                 | -        | 29          | -        | 2,9            |
| Ap. dialyse contre EDTA  | <u>19</u>          | 190      | <u>23</u>   | 79       | 1,2            |

.../...

site est indispensable et joue un rôle fondamental pour la formation du complexe enzyme-métal car :

- lorsque le DTT "active" l'enzyme, il joue en fait le même rôle que l'EDTA, en chélatant les cations contaminants au niveau de site de catalyse. (Ceux-ci confèrent à l'enzyme des vitesses et affinités plus faibles)

Si le métal contaminant ( $\text{Hg}^{2+}$  ou autre) n'était pas fixé en partie par un groupement thiol, le DTT ne pourrait pas l'ôter pour lever l'inhibition.

La présence d'un -SH au niveau du site de fixation du métal est justifiée aussi par les différences d'affinité de l'enzyme pour le cobalt et le magnésium. En effet le premier a une affinité de l'ordre de  $10^{-4}$  M. Ce qui justifie aussi la moindre inhibition par  $\text{Hg}^{2+}$  lorsque l'enzyme est activée par le cobalt puisque, dans ce cas, le complexe Enzyme-métal est plus "ferme".

## VI) INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE

### 6-1) EFFET SUR L'ACTIVITE

L'activité de la glucose isomérase a été étudiée en présence de chlorure de sodium (NaCl) ou de sulfate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) à différentes concentrations jusqu'à saturation des solutions.

a) NaCl n'a pas d'effet sur l'activité à une concentration inférieure ou égale à 2 M. Au delà, l'activité diminue, mais est encore de 50 p.100 par rapport à l'activité initiale à une concentration de 4,5 M en NaCl. Les activités obtenues sont reportées dans la figure 17 page 98.

b) Le sulfate d'ammonium agit sur l'activité de façon différente comme le montre la figure 18 page 98. La perte d'activité s'annonce dès les plus faibles concentrations (0,025 M). L'activité chute de façon exponentielle avec des concentrations croissantes en sel, que ce soit en présence de réducteur (DTT 2mM) ou non. L'activité est nulle en présence de sulfate d'ammonium à une concentration de 1,57 M.

Notons qu'à force ionique équivalente ( $\mu = 4,71$ ), l'enzyme présentait 40 p.100 de son activité initiale en présence de NaCl.

Le sulfate d'ammonium est reconnu comme étant un agent chaotropique donc peut modifier le degré d'hydratation du site actif de la molécule enzymatique.

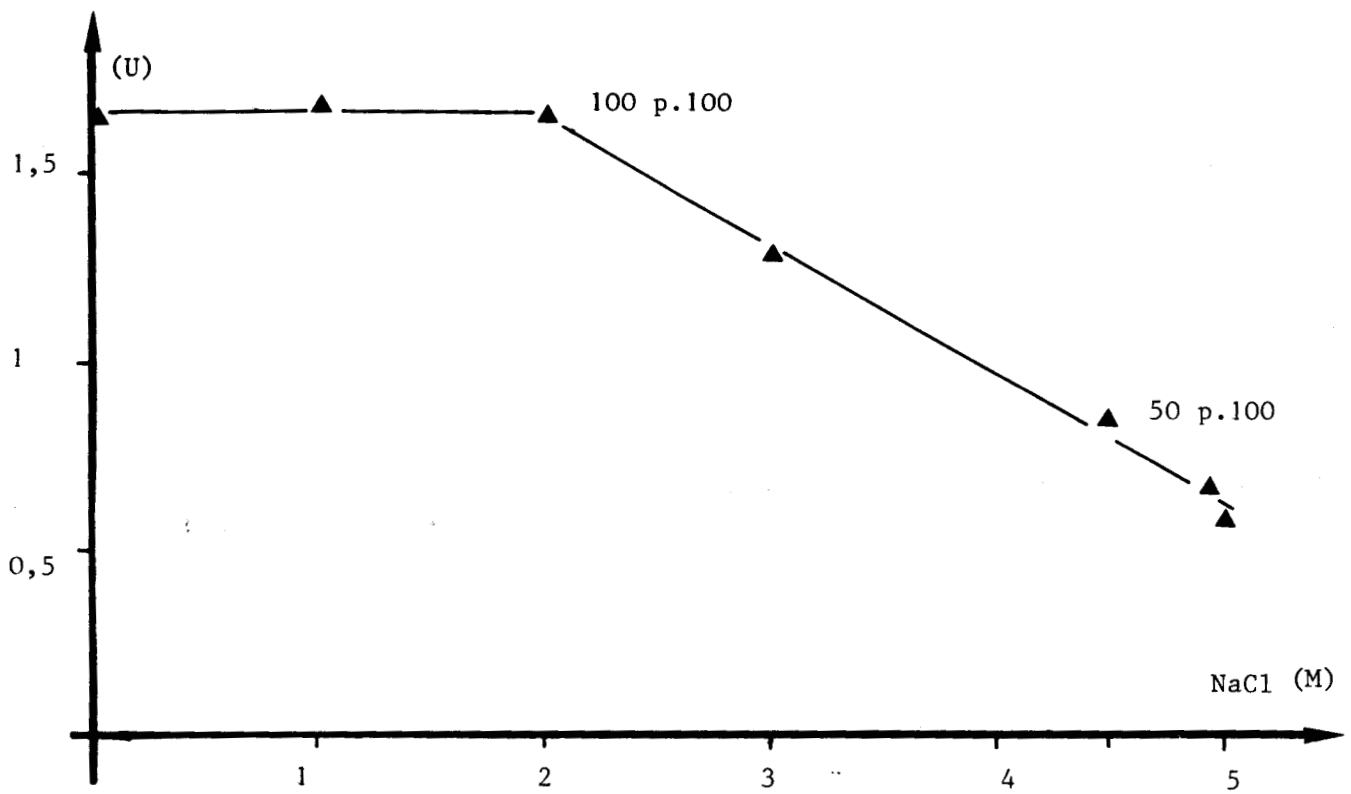


FIGURE 17 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN NaCl SUR L'ACTIVITÉ

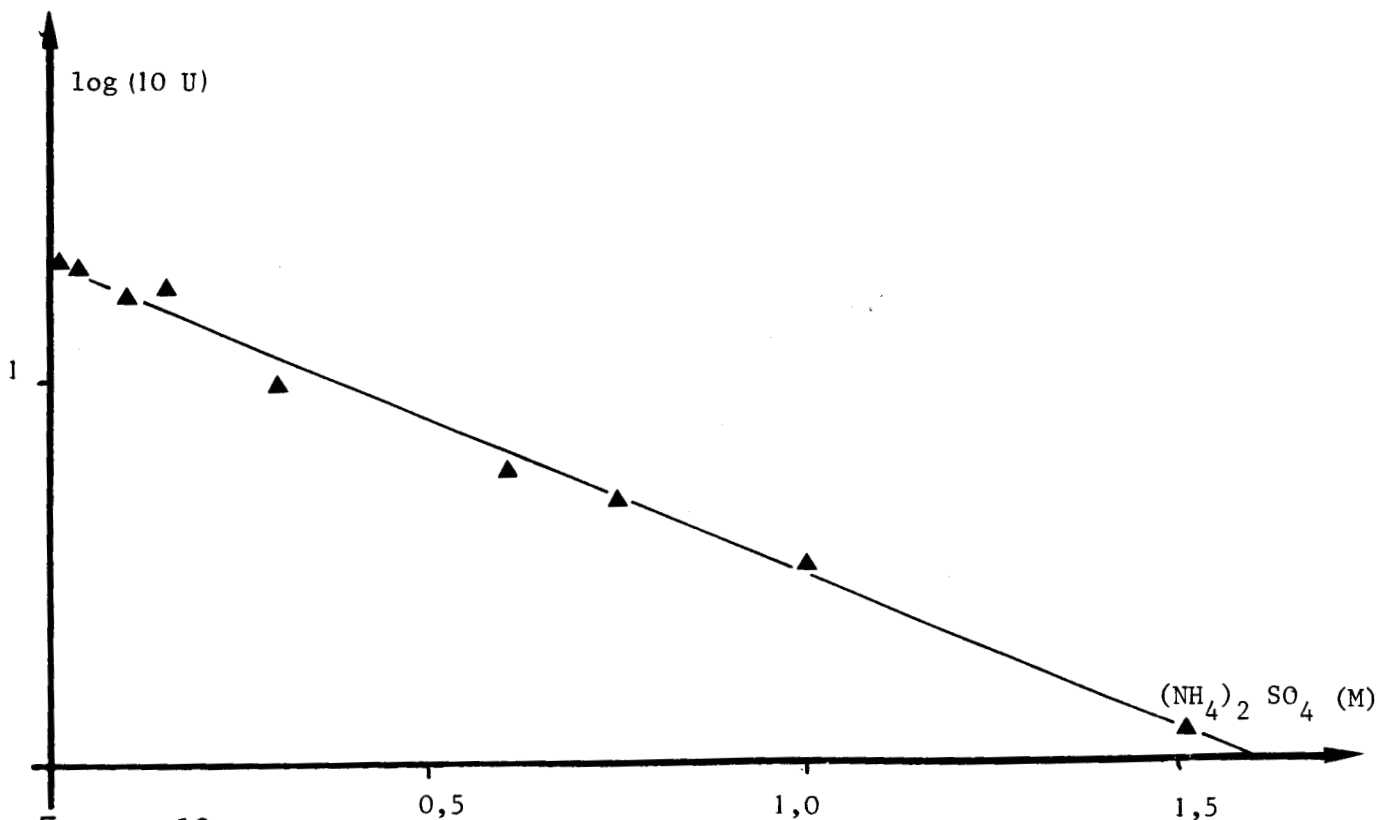


FIGURE 18 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SULFATE D'AMMONIUM SUR L'ACTIVITÉ.

.../...

Rappelons à ce propos que bien qu'il n'y ait pas échange avec l'eau, ce solvant est nécessaire pour la formation du complexe enzyme-substrat (140)

De plus, il peut modifier la structure tertiaire de l'enzyme et c'est la raison pour laquelle il n'est jamais utilisé dans notre protocole de purification.

#### 6-2) EFFET SUR LA STABILITE AU PH

Afin d'éviter l'action secondaire du sulfate d'ammonium, la force ionique conférée par le NaCl2M a été choisie pour l'étude de stabilité au pH. Celle-ci a été réalisée pour les trois "types" d'enzyme : enzyme sans métal, enzyme -  $Mg^{2+}$ , enzyme -  $Co^{2+}$ . Les résultats de stabilité au pH ont été déterminés selon le protocole page 46 et sont reportés dans la figure 19 page 100. Ainsi que ce soit en présence de métal activateur ou non, l'enzyme présente la même activité résiduelle après une nuit de pré-incubation à pH acide en présence NaCl2M. Elle est moins stable puisqu'elle ne présente que 75 p.100 d'activité résiduelle après traitement à pH 5,0 et 25 p.100 à pH 4,7, alors que sans force ionique, la totalité de l'activité est recouverte.

Ainsi, le glissement d'une unité pH de la courbe de stabilité de l'enzyme montre l'importance des liaisons de type ionique dans la structure de l'édifice moléculaire, que l'enzyme soit complexée au métal ou non. Le métal ( $Mg^{2+}$  ou  $Co^{2+}$ ) ne stabilise donc pas davantage la protéine face à l'action de la force ionique tout comme il n'avait déjà pas d'influence sur la stabilité au pH sans réactif.

### VII) INFLUENCE DU S.D.S

Le SDS est communément utilisé en tant qu'agent dissociant. Son action consiste à se fixer sur la protéine au niveau des régions hydrophobes en lui conférant alors une électronégativité correspondant à la charge du groupement sulfate du détergent. Ainsi, lorsqu'il y a accessibilité, toutes les régions hydrophobes sont chargées négativement ce qui entraîne une répulsion entre elles et dissociation des polypeptides.

#### 7-1) EFFET SUR LA STABILITE AU PH :

Comme précédemment, la stabilité de l'enzyme, suite à une incubation à différents pH acides, a été étudiée en présence de SDS 1 p.100.

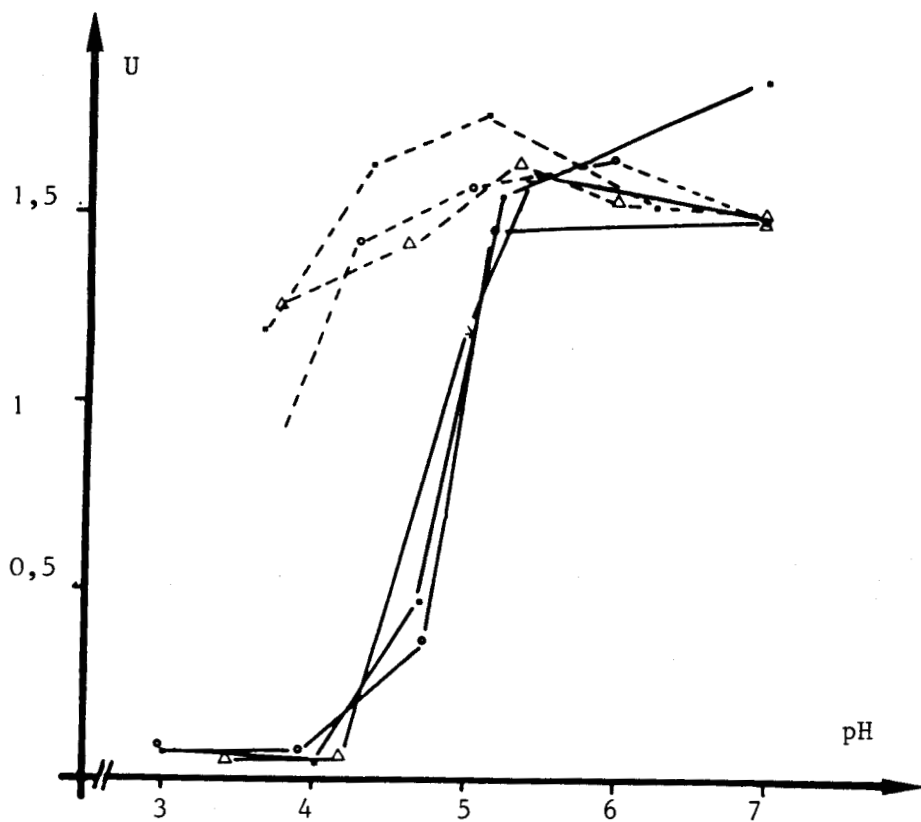


FIGURE 19 : INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE (NaCl 2M) SUR LA STABILITÉ AU pH

- △—△ Enzyme + EDTA
- Enzyme + Mg<sup>2+</sup>
- Enzyme + cobalt
- Témoin

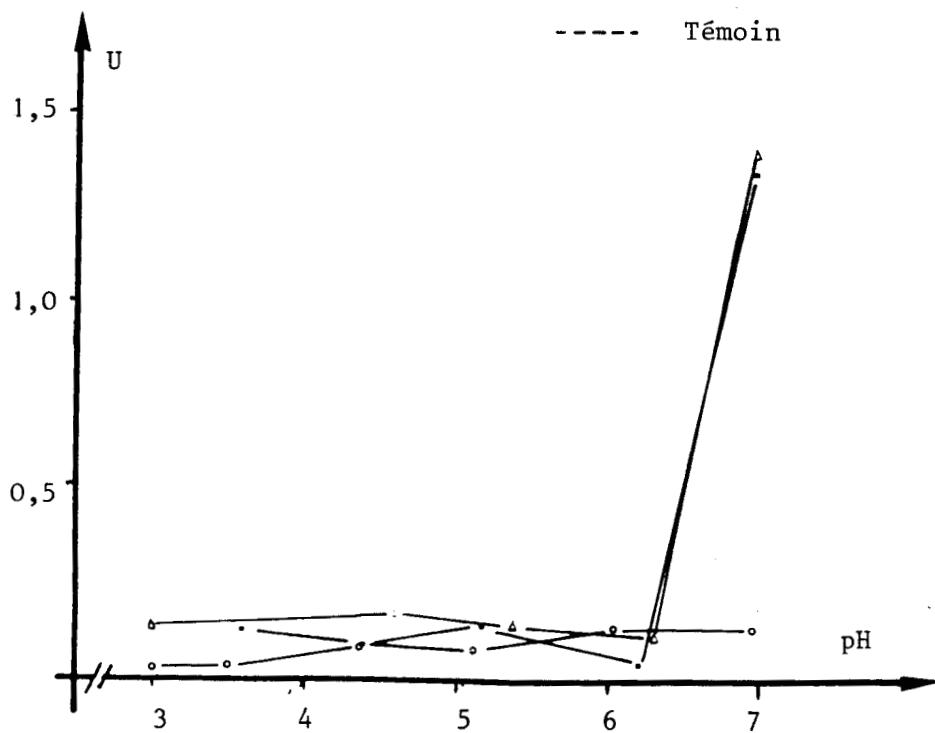


FIGURE 20 : INFLUENCE DU SDS SUR LA STABILITÉ AU pH

.../...

La figure 20 page 100 montre que l'enzyme, en présence du détergent n'est pas stable à pH inférieur à pH 7,0. puisque l'activité résiduelle est seulement de 9,6 p.100.

Par contre à pH 7,0, l'enzyme traitée à l'EDTA et celle sous forme Enzyme-Co<sup>2+</sup> présentent 96 p.100 d'activité résiduelle, alors que l'Enzyme Mg<sup>2+</sup> a été destabilisée.

A pH acide, le métal n'a donc pas un rôle protecteur contre l'action du SDS mais, au contraire, dans le cas du magnésium, celui-ci a plutôt un rôle de fragilisation. L'enzyme sous forme de complexe enzyme-Mg<sup>2+</sup> semble présenter une hydrophobicité plus importante que l'enzyme sans métal ou avec cobalt. Il favorise donc la fixation et la dissociation par le SDS à pH neutre.

Le rôle du métal vis à vis de la dénaturation de l'enzyme par le SDS est très variable selon les études comme nous l'avons vu page 38.

Le fait qu'il n'y ait pas de différence à pH acides selon la présence ou non de métal peut être dû au fait que l'ionisation du site de fixation du métal n'est pas adéquate. Ce qui signifie que le complexe enzyme-métal n'est peut être pas formé à pH acide. En effet nous verrons ultérieurement que le métal joue un rôle protecteur contre la dissociation par le SDS à pH 8,9 à 100°C.

#### 7-2) INFLUENCE DU SDS sur les cinétiques d'isomérisation

Le SDS a été testé à trois concentrations (0,01 , 0,1 et 1 p.100) sur 1,5 U de glucose isomérase.

Deux solutions enzymatiques purifiées ont été testées : l'une -solution 1 - est d'activité spécifique maximale, 220 U/mg , l'autre, -solution 2- à homogénéité équivalente, présente une activité spécifique diminuée de moitié (100 U/mg). Leur comportement en présence de SDS est reporté dans le tableau

22 page 102 . On constate en premier lieu quelle que soit la solution enzymatique, les affinités sont diminuées de façon identique et que le SDS 0,01 p.100 n'entraîne pas de modification des paramètres.

Mais une différence essentielle est observée pour l'effet du détergent à 0,1 p.100 sur la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) :  $V_{max}$  ne varie pas pour la solution 1 (AS = 220 U/mg) alors qu'elle est affectée pour la solution 2.

Ainsi pour la première solution, l'inhibition est de type compétitive alors que pour la seconde, l'inhibition est de type compétitive mixte. (figures 21a et 21b page 102 ).



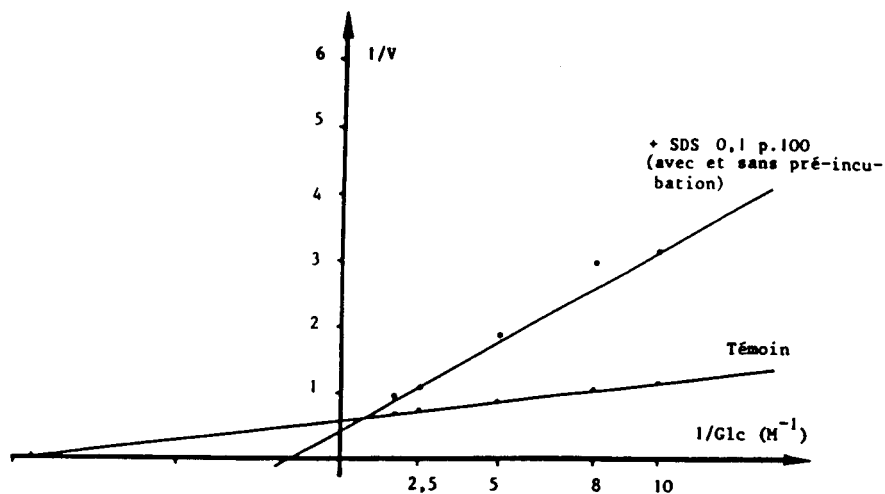


FIGURE 21 A : CINÉTIQUE D'ISOMÉRISEMENT DE L'ENZYME NATIVE (AS=220U.MG<sup>-1</sup>) EN PRÉSENCE DE SDS 0,1 p.100 -REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK-

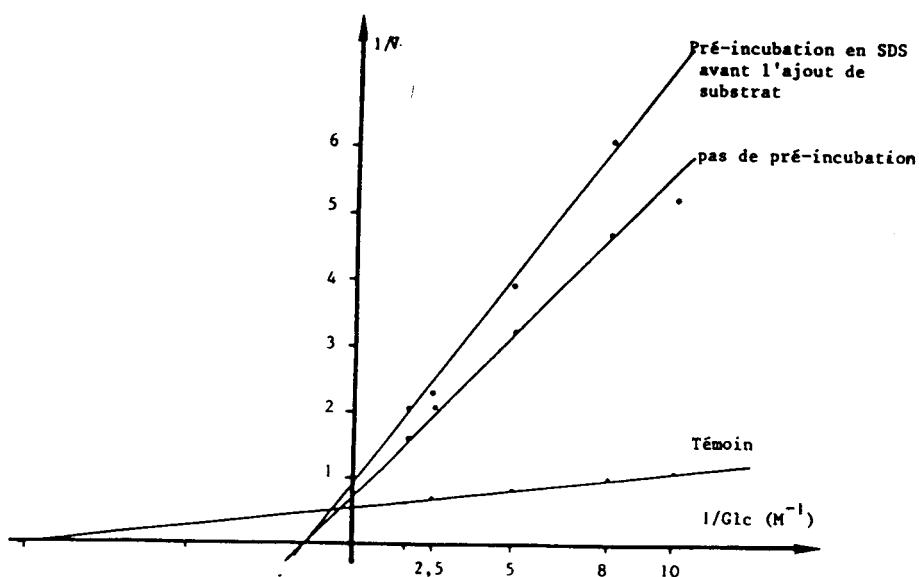


FIGURE 21 B : CINÉTIQUE D'ISOMÉRISEMENT DE L'ENZYME DESTABILISÉE (AS=110MG<sup>-1</sup>) EN PRÉSENCE DE SDS 0,1 p.100 - REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURK-

TABLEAU 22: PARAMÈTRES DES DEUX SOLUTIONS DE GLUCOSE ISOMÉRISE HOMOGÈNES EN PRÉSENCE DE SDS

| CONDITIONS                              | SOLUTION 1<br>(A.S. = 220 U/mg) |                  | SOLUTION 2<br>(A.S. = 110 U/mg) |                  |
|---|---------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|
|   | K <sub>m</sub>                  | V <sub>max</sub> | K <sub>m</sub>                  | V <sub>max</sub> |
| Témoin                                  | 0,102                           | 1,7              | 0,102                           | 1,8              |
| SDS. 0,1 p.100<br>avec pré-incubation   | 0,60                            | 2,1              | 0,70                            | 1,1              |
| sans pré-incubation                     | 0,60                            | 2,1              | 0,70                            | 1,43             |
| S.D.S 1. p.100<br>(sans pré-incubation) | 0,22                            | 1,7              | 0,22                            | 0,82             |

.../...

Ceci a été confirmé par l'effet de la pré-incubation en présence de SDS et EDTA avant d'ajouter les "substrats". Ceci pour éviter leur effet protecteur notamment du magnésium vis à vis de l'action dissociante du SDS à pH 7,5. La chute de  $V_{\max}$  est encore plus accentuée pour la solution 2 (A.S = 110 U/mg) avec néanmoins une affinité identique.

La tolérance de l'enzyme vis à vis du SDS est une propriété importante. L'étude de la structure de l'enzyme dans ces conditions nous montrera que l'enzyme est dissociée mais conserve son activité .

Le point le plus important est la différence de comportement de la solution 2 destabilisée. Pour cette solution on remarque un effet protecteur du magnésium contre la chute de vitesse en plus de la perte d'activité qui n'a pas lieu pour la solution 1. Ceci nous permettra d'avancer des hypothèses quant à la structure fonctionnelle de la molécule active.

## CONCLUSIONS

Les propriétés enzymatiques essentielles de la glucose-isomérase de St. violaceoniger sont les suivantes :

\* Si nous ne sommes peut être pas en présence d'une métallo-protéine, la glucose isomérase est au moins métal-dépendante. La présence de magnésium ou cobalt est nécessaire pour détecter l'activité. Contrairement aux enzymes d'origine bactérienne ( Bacillus sp., Lactobacillus brevis... ), celle-ci n'est pas activée par le manganèse mais au contraire inhibée.

Les autres métaux lourds sont, comme pour toutes les glucose-isomérases, des inhibiteurs de l'activité.

\* L'enzyme est de type michaélien. Les cinétiques d'activation par  $Mg^{2+}$  sont de type bi-bi aléatoire. Cependant, nous avons vu que la fixation préalable du métal donne un complexe binaire très actif. Néanmoins, l'enzyme seule présente une affinité théorique pour le glucose seul ( $K_s = 0,57M$ ). Le magnésium est 2 fois plus activateur de l'enzyme, et présente 10 fois moins d'affinité que le cobalt. Ce qui explique qu'à faibles concentrations -inférieures à  $10^{-4}M$ - le complexe enzyme -  $Co^{2+}$  soit plus actif.

\* L'enzyme, comme la majeure partie des isomérases de Streptomyces, présente des optimas de 75 -80°C et de pH 8,5 - 8,8. Mais ces conditions ne peuvent être respectées en raison de l'instabilité des sucres à ces valeurs.

\* La glucose isomérase est thermostable surtout lorsqu'elle est sous forme de complexe enzyme-métal.

Lorsque le métal est le cobalt, l'activité est encore mieux préservée puisqu'elle présente encore 44 p.100 d'activité après 30 minutes de traitement à 85°C.

\* l'activité supporte une force ionique (NaCl 2M) mais est inhibée fortement par le sulfate d'ammonium certainement à cause de son action chaotrope.

.../...

.../...

\* L'enzyme est stable aux pH acides à condition que le milieu soit à un pH supérieur à pH 4,0. Le glissement à pH 5,0 pour récupérer la totalité de l'activité en présence de force ionique (NaCl 2M) laisse à penser que des liaisons ioniques jouent un rôle important dans la structure de la molécule active.

\* L'enzyme contient des groupements thiols au niveau de son (ou de ses) site actif. Ceux ci jouent un rôle au niveau de la formation du complexe E-M.

\* La variation d'affinité est un bon test pour vérifier si l'enzyme contient des cations contaminants. Ceux-ci peuvent être éliminés par traitement à l'EDTA 10 mM ou par pré-incubation 30 minutes à 37°C en présence de DTT 2mM. Auquel cas, la constante d'affinité diminue à 0,105 M en présence de  $Mg^{2+}$  10 mM.

\* Enfin, l'enzyme est toujours active à 60°C en isomérisant un milieu qui contient par ailleurs du SDS. Néanmoins, l'affinité diminue. La vitesse maximale de réaction ne chute que pour la solution enzymatique destabilisée.

## C) PROPRIETES PHYSICO CHIMIQUES

### I) POINT ISO\_ÉLECTRIQUE

Le résultat de l'isoélectrofocusing en veine liquide est illustré dans la figure 22 page 107.

Le gradient d'ampholines a été coulé en éthylène glycol car le glycérol est inhibiteur de l'activité. (La présence de glycérol 2 p.100 dans le milieu d'isomérisation fait chuter l'activité de 84 p.100 dans les conditions d'isomérisation habituelles).

Les 2,2 mg de protéines injectées sont de la glucose isomérase homogène en électrophorèse. Le profil obtenu par mesure de l'absorbance à 280 nm est hétérogène.

Ce comportement anormal peut être du à la présence d'enzyme dénaturée ou à l'association de l'enzyme avec les ampholines.

Néanmoins, l'activité enzymatique est éluee en un pic symétrique correspondant à un pI de pH 4,2.

La valeur obtenue est en accord avec celles décrites pour l'enzyme de St. griseofuscus dont le pI est pH 4,0 (52) et celle du B. coagulans qui est de pH 4,9 (22). Elle est en outre en accord avec le comportement en chromatographie d'échange d'ions.

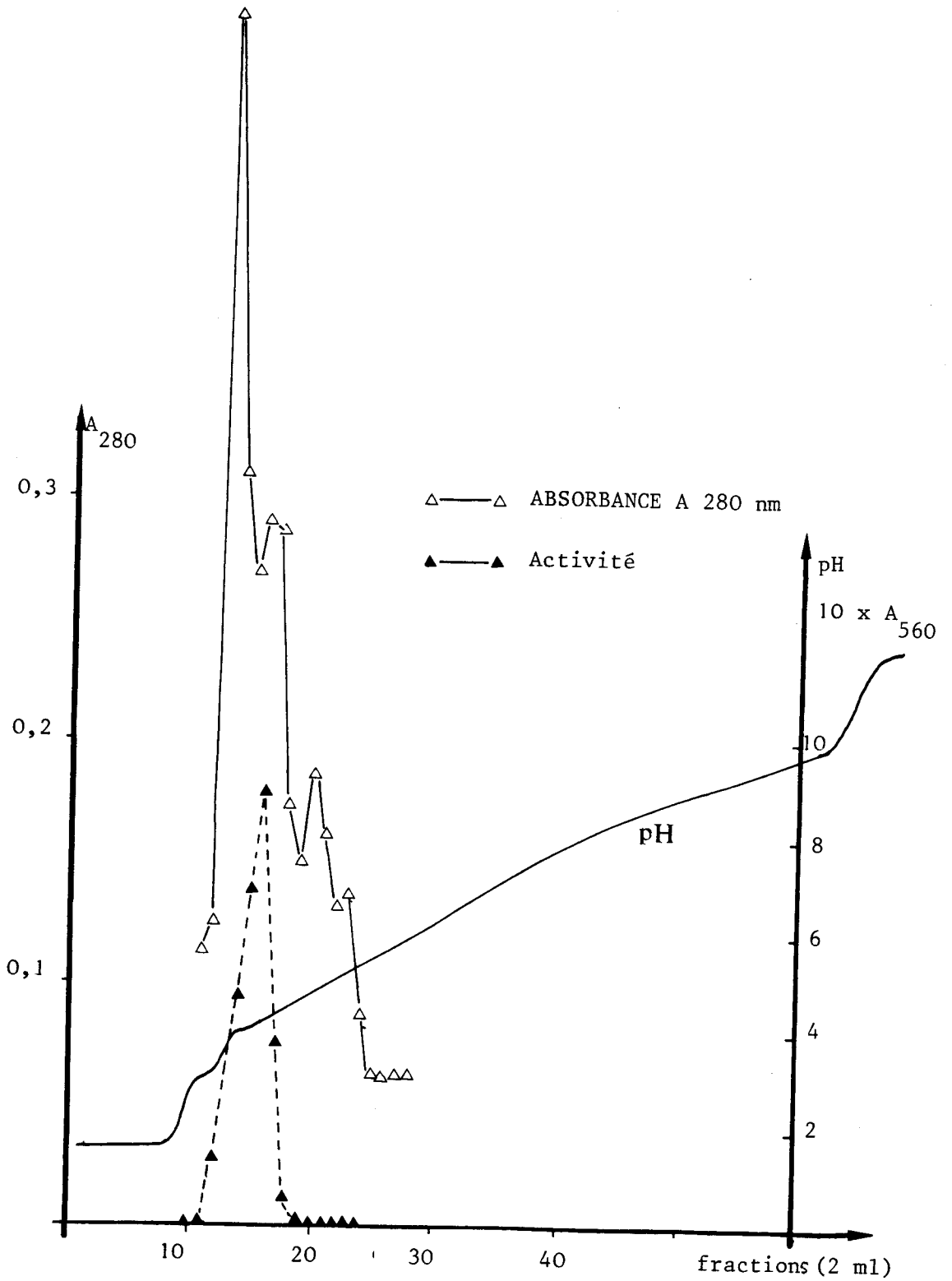
### II) COMPOSITION EN SUCRES DE LA GLUCOSE-ISOMÉRISE

La méthanolyse suivie d'une trifluoroacétylation de 3 mg de glucose-isomérase conduit à la libération des monosaccharides substitués. L'analyse du chromatogramme obtenu en chromatographie en phase gazeuse (figure 23 page 109) montre qu'il y a une très faible quantité de monosaccharides que nous avons déterminé comme étant : du mannose, du glucose, de la N-acétylgalactosamine et de la N-Acétyl glucosamine dans des rapports molaires respectivement de : 1- 1,5 - 1,1 - 1,2. En masse, ces sucres représentent environ 1 p.100 de la masse de protéine analysée.

La présence de glucose en quantité relative la plus importante n'est pas justifiable par la présence de complexe enzyme-substrat ni par un passage sur Sephadex ou autre type de gel contenant ce monosaccharide.

L'échantillon a été dessalé avant lyophilisation sur un gel d'AcA44. (Acrylamide-Agarose).

.../...



**FIGURE 22 :** ISOÉLECTROPHORÈSE EN VEINE LIQUIDE DE LA GLUCOSE  
 ISOMÉRISE - GRADIENT DE pH 3,5 - 10 -

.../...

La diversité de monosaccharides et les rapports molaires dans lesquels ils se trouvent ne permet pas pour le moment de se rattacher à telle ou telle structure conventionnelle. Les faibles quantités de monosaccharides font que nous sommes peut être en limite de détection artéfactuelle.

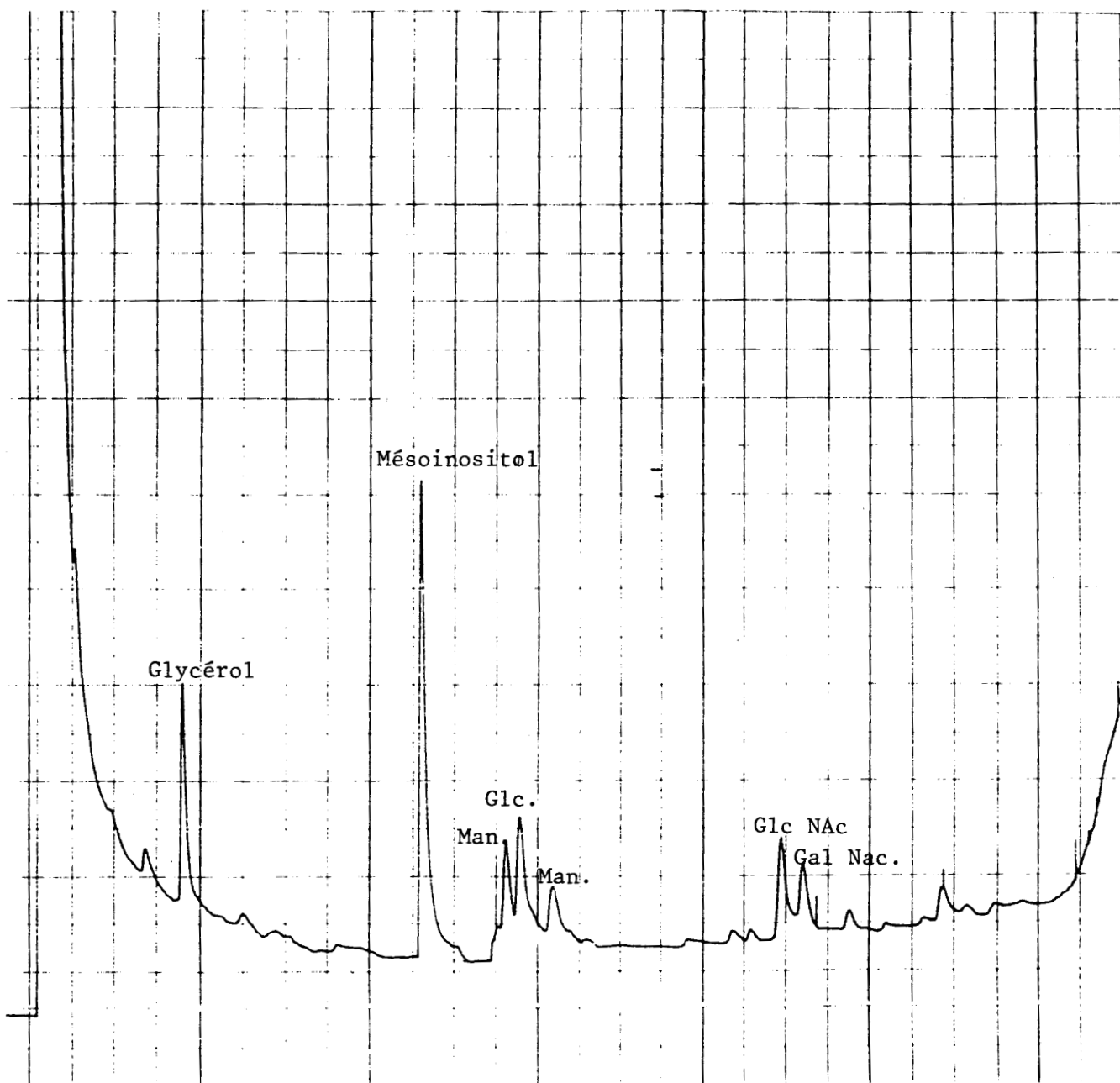


FIGURE 23 :

CHROMATOGRAMME EN PHASE GAZEUSE DES MONOSACCHARIDES  
 SUBSTITUÉS PRÉSENTS DANS LA SOLUTION DE GLUCOSE-  
 ISOMÉRISE DE ST. VIOLACEONIGER



#### IV) DÉTERMINATION DES GROUPEMENTS THIOLS

Le nombre de groupements sulphydryls a été déterminé pour différentes solutions d'enzyme :

- \* Enzyme native : sans traitement thermique, ni adjonction de dénaturant, l'enzyme ne réagit pas avec le réactif. Il n'y a donc pas de groupement thiol libre "apparent".
- \* Enzyme sous forme dimère : La forme dimère est obtenue en traitant l'enzyme par le SDS à température ambiante. Dans ce cas on dose de 0 à 0,3 mole de SH par mole de dimère.
- \* Enzyme totalement dissociée : L'enzyme traitée au SDS en présence d'EDTA est portée à ébullition pendant 4 minutes. L'enzyme présente alors 0,7 à 0,9 mole de thiol par mole de monomère. Le suivi de la densité optique en fonction du temps montre que la réaction est instantanée et complète dès la mise en contact de l'enzyme dénaturée avec le DTNB - comme le montre la figure 24 page 111.

La présence de groupements thiols dans la structure de glucose isomérases est variable : les isomérases bactériennes (B.coagulans, L. Brevis) sont décrites comme ne possédant pas de demi-cystines. L'isomérase de St. griseofuscus présente 2 thiols libres et deux ponts disulfures et celle de St. albus, 4 thiols totaux libres (page 37).

Les résultats obtenus indiquent donc que l'isomérase de St. violaceoniger contient 4 groupements thiols masqués par mole de tétramère.

Leur faible accessibilité est aussi démontrée par le fait que le pCMB n'est pas inhibiteur de l'enzyme alors que le chlorure méthyl mercureux l'est parce qu'il est de faible taille. En outre, l'enzyme native n'est pas retenue sur résine de Thiopropyl Sepharose, spécifique des groupements thiols libres apparents.

De même nous avons vu que ces fonctions thiols se situent au niveau du site de fixation du métal.

L'enzyme préalablement débarassée de métaux (par traitement à l'EDTA) n'est pas retenue par une résine de Chelating Sepharose, saturée en cobalt. Le fait que la totalité de l'activité soit éluee par le tampon de départ, alors que le cobalt présente une forte affinité pour l'enzyme, montre que le ou les- site de fixation du métal sont eux aussi très masqués.

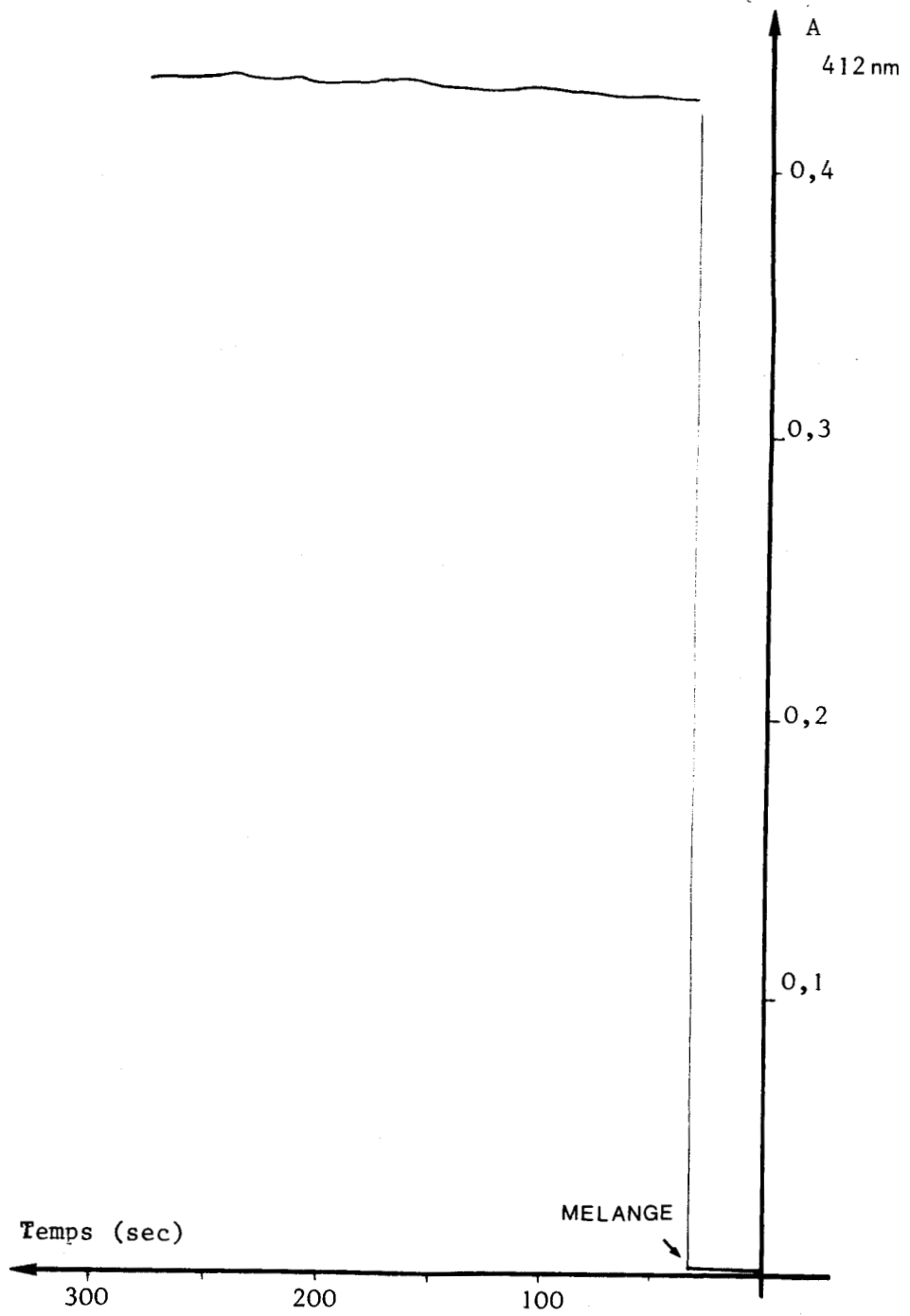


FIGURE 24 : DOSAGE DES THIOLS AU DTNB DE LA G.I. TRAITEE AU SDS  
 100°C, 4 mn ; - ENREGISTREMENT DE L'EVOLUTION DE A<sub>412</sub>  
 EN FONCTION DU TEMPS -

## V) MASSE MOLÉCULAIRE DE LA GLUCOSE ISOMÉRISE

### 6-1) DETERMINATION PAR GEL FILTRATION SUR SEPHAROSE CL6B

Le tamis moléculaire a été équilibré dans plusieurs tampons pour apprécier la masse moléculaire apparente de l'enzyme pré-incubée, avant injection dans ce même tampon.

Ainsi, l'enzyme  $-Mg^{2+}$  (en présence de  $MgCl_2$  10 mM), l'enzyme sans métal (en présence d'EDTA) et l'enzyme en présence de substrat (glucose 0,1 M ;  $Mg^{2+}$  10 mM) présentent la même masse apparente :  $125\ 000 \pm 5\ 000$  daltons comme le montre la figure 25a page 113.

L'injection d'une solution d'enzyme destabilisée ( $AS = 110\ U \cdot mg^{-1}$ ) dans les mêmes conditions donne une masse moléculaire identique. La chute d'activité n'est donc pas due à une dissociation apparente de l'enzyme.

### 6-2) MASSE MOLECULAIRE EN ELECTROPHORESE - SDS

La figure 25b page 113 montre la relation linéaire entre le logarithme de la masse moléculaire et la mobilité des échantillons. Certaines solutions enzymatiques dénaturées présentent différentes masses intermédiaires comme nous le verrons par la suite. La dénaturation complète par traitement au SDS en présence d'EDTA donne un composé unique d'une masse de 43 000 Daltons.

La même masse a déjà été annoncée pour la sous-unité des isomérases de St. albus (116), St. griseofuscus (52) et St. flavogriseus (13).

Les composés intermédiaires, en faibles quantités, présentent des masses respectives de 64, 107 et 132Kdaltons. Ils correspondent donc à des dimères, tri- et tétramères. Les deux derniers proviennent de réassociations par l'intermédiaire de ponts disulfures puisqu'ils disparaissent après traitement de l'échantillon au  $\beta$ mercaptoéthanol. La masse du monomère par calcul de la moyenne de ces valeurs est de 34 000 daltons.

KASUMI et coll. (52) annoncent une masse de 180.000 daltons pour l'isomérase de st. griseofuscus soit près de 1,5 fois plus importante que les valeurs obtenues ici. Leur enzyme présente 6 demi-cystines alors que nous, nous n'en obtenons que 4, comme dans le cas de l'isomérase de St. albus (42). Par ailleurs, toujours pour l'enzyme de St. griseofuscus, les auteurs annoncent que les 4 monomères sont identiques, ce qui est incompatible avec les 6 demi-cystines. A ce propos, il faut préciser que leur enzyme a été extraite par autolyse à 4°C pendant un mois, et qu'elle a subi des précipitations au sulfate d'am-

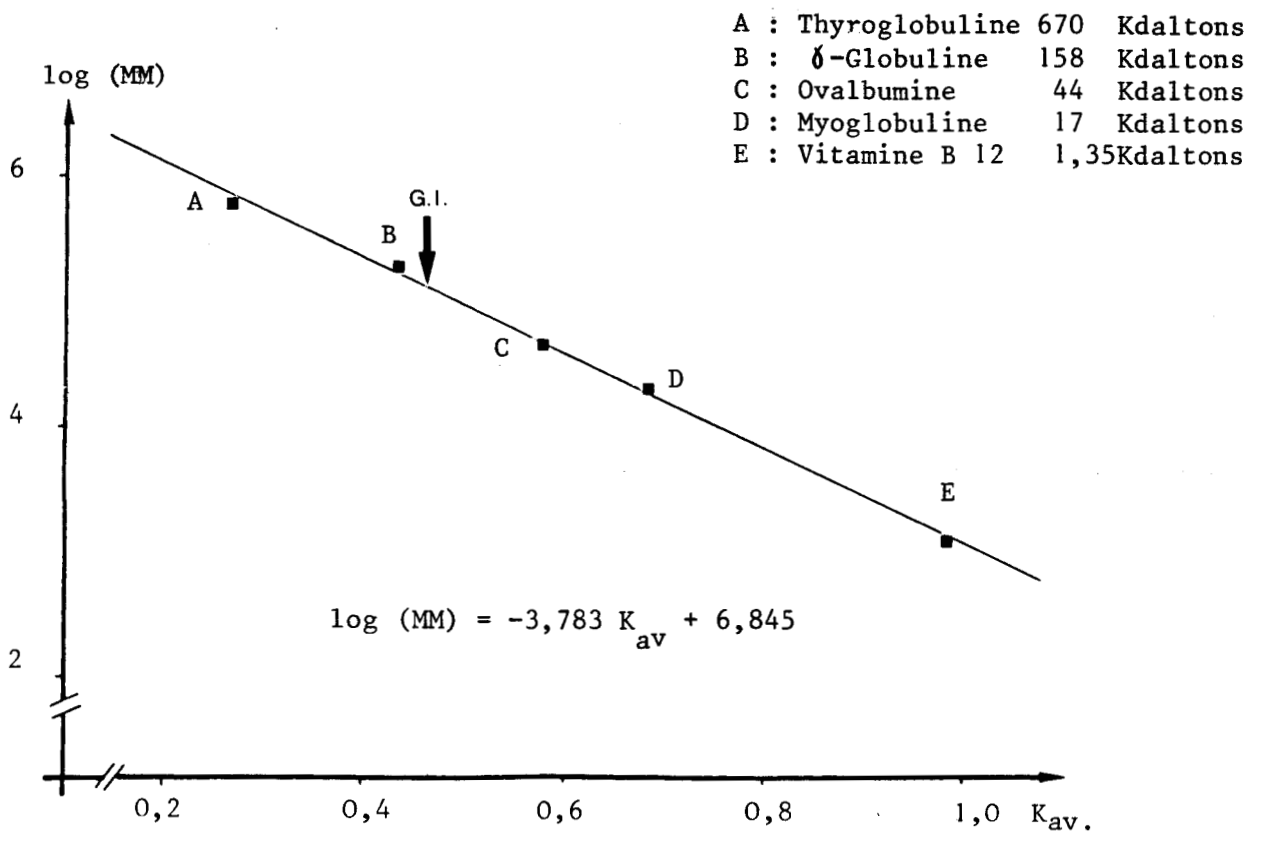


FIGURE 25 A : MASSE MOLÉCULAIRE DE LA GLUCOSE ISOMÉRISE  
 - DÉTERMINATION PAR GEL FILTRATION SUR SEPHAROSE CL6B -

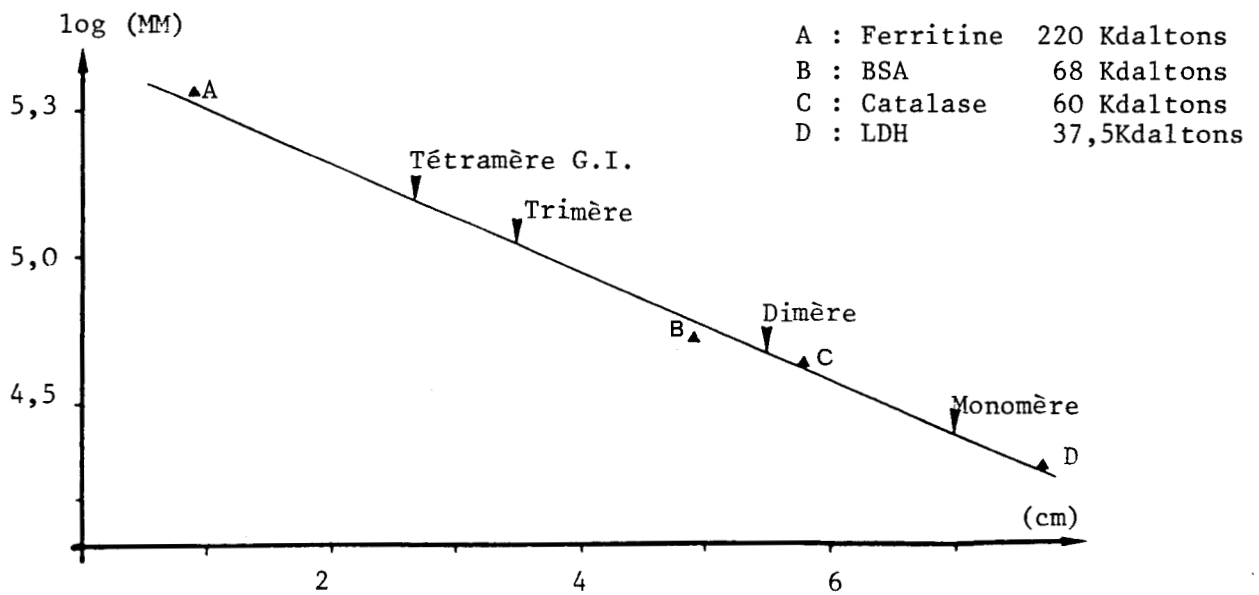


FIGURE 25 B : MASSE MOLÉCULAIRE DE LA GLUCOSE ISOMÉRISE  
 - DÉTERMINATION PAR ÉLECTROPHORÈSE PAG 7,5 P.100-SDS -

.../...

monium. Dans ces conditions, il est possible qu'ils ne travaillent plus sur l'enzyme native mais au contraire sur un matériel partiellement oxydé et associé en un composé correspondant à la masse d'un hexamère. Ce qui pourrait expliquer que, bien qu'une structure tétramérique soit annoncée, les auteurs sont en présence d'une enzyme contenant 6 monomères dont deux natifs contenant les deux thiols libres et les 4 autres reliés par leurs 4 thiols oxydés. Ils annoncent en effet, que l'enzyme contient 2 ponts disulfures.

Quoi qu'il en soit, l'isomérase de St. violaceoniger présente 4 sous-unités de masses identiques et 4 thiols par tétramère.

Par ailleurs, afin de connaître la nature des liaisons qui relient les quatre-sous-unités de l'enzyme de St. violaceoniger, l'effet du SDS a été approfondi.

## VI) EFFET DU SDS SUR LA STRUCTURE DE L'ENZYME NATIVE

L'action dissociante du SDS a été étudiée dans différentes conditions de température et de pH pour des solutions enzymatiques traitées à l'EDTA ou en présence de cations activateurs ou protecteurs (magnésium ou cobalt). Les résultats sont reportés dans la figure 26 page 115.

### 6-1) EFFET DU SDS :-A TEMPERATURE AMBIANTE

Dans ce cas, l'enzyme est dissociée en dimère, qu'elle soit en présence de cations ou en présence d'EDTA. Le SDS seul de la plaque dissocie aussi l'enzyme, non traitée au préalable, en dimères (échantillons n°A).

#### - à 100°C, 4 minutes :

Dans ces conditions, l'action dénaturante du SDS est plus prononcée : la dissociation en monomère est totale pour l'enzyme débarassée de métaux par l'EDTA partielle pour l'enzyme -Mg<sup>2+</sup> et faible pour l'enzyme Co<sup>2+</sup> (échantillons N°B). Il y a donc effet protecteur des métaux, surtout du cobalt, contre la dissociation totale. Néanmoins, toute l'enzyme est toujours dissociée au moins en dimère, quels que soient les cas. On assiste donc à une dissociation du tétramère en deux temps. La dissociation dimère est très aisée et immédiate.

### 6-2) EFFET DU $\beta$ -Mercaptoéthanol à 100°C, 4mn

Lorsqu'il y a dissociation par le SDS de l'enzyme pour donner le monomère, il y a parfois apparition de composés résiduels de masse moléculaire correspondant à un tétramère ou un trimère. L'adjonction de  $\beta$ -mercaptoéthanol

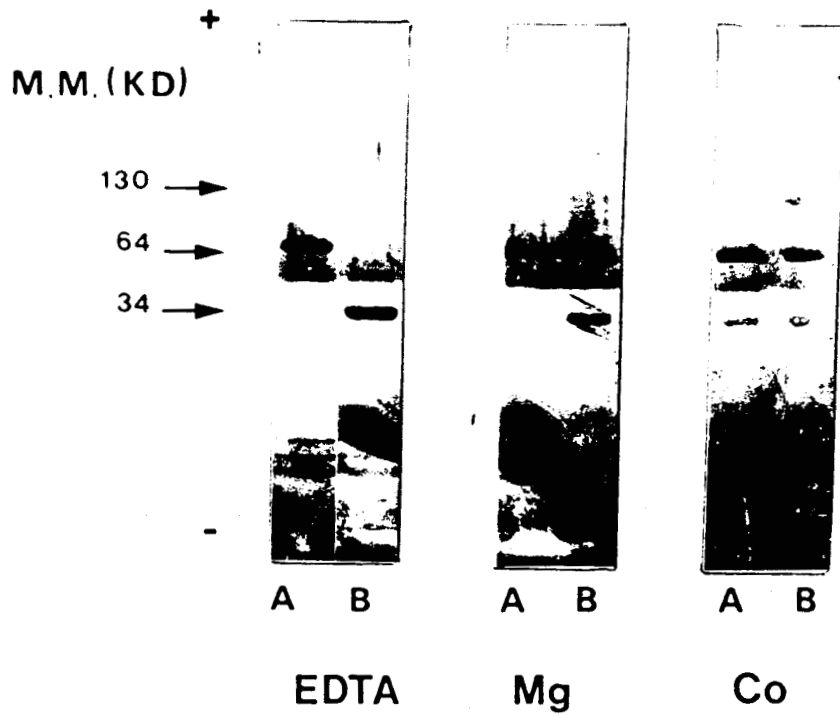


FIGURE 26 : ELECTROPHORÈSE PAG 5-25 p.100 EN SDS

Action dissociante du SDS  
Effet protecteur des cations

A: SDS sans bouillir  
B: SDS 100°C, 4 min.

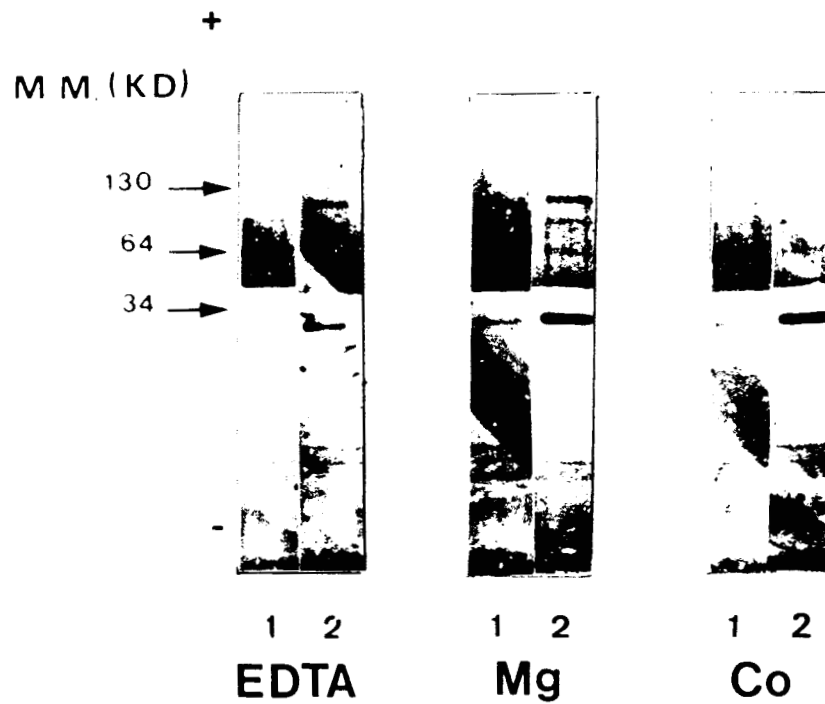


FIGURE 27 : ÉLECTROPHORÈSE PAG 5-25 p.100 EN SDS ET GLUCOSE 0,1 M

Action du glucose sur la dissociation par le SDS

1 : SDS sans bouillir  
2 : SDS 100°C, 4 min

.../...

dans le milieu fait disparaître ces composés.

Ainsi, ces composés sont en réalité le résultat de réassociation de résidus de l'édifice moléculaire par l'intermédiaire de ponts disulfures.

A noter que ces réassociations ne sont observées que lorsque l'enzyme est dissociée en monomères par le SDS, et qu'elles sont plus importantes lorsqu'il y a du cobalt dans le tampon échantillon. Celui-ci est en effet un catalyseur efficace de l'auto oxydation des thiols (47a).

Mais en aucun cas, il n'y a de ponts disulfures interchaines dans la structure du tétramère natif. En effet, l'association SDS + EDTA 5 mM permet d'obtenir la forme monomérique par ébullition pendant 4 minutes sans adjonction de réducteur.

#### 6-3) EFFET DU SUBSTRAT SUR L'ACTION DISSOCIANTE DU SDS

Nous venons de voir que le premier "substrat"-le métal- est protecteur contre la dissociation du dimère.

Les échantillons d'enzyme ont été pré-incubés en présence de glucose et métal de façon à former le complexe (EMS) (enzyme-métal-substrat) avant d'être traité par le SDS.

Les résultats sont rassemblés dans la figure 27 page 115.

A température ambiante les complexes EMS et ES sont aussi dissociés en dimère par le SDS. Le glucose ne préserve pas la structure tétramérique vis à vis du SDS.

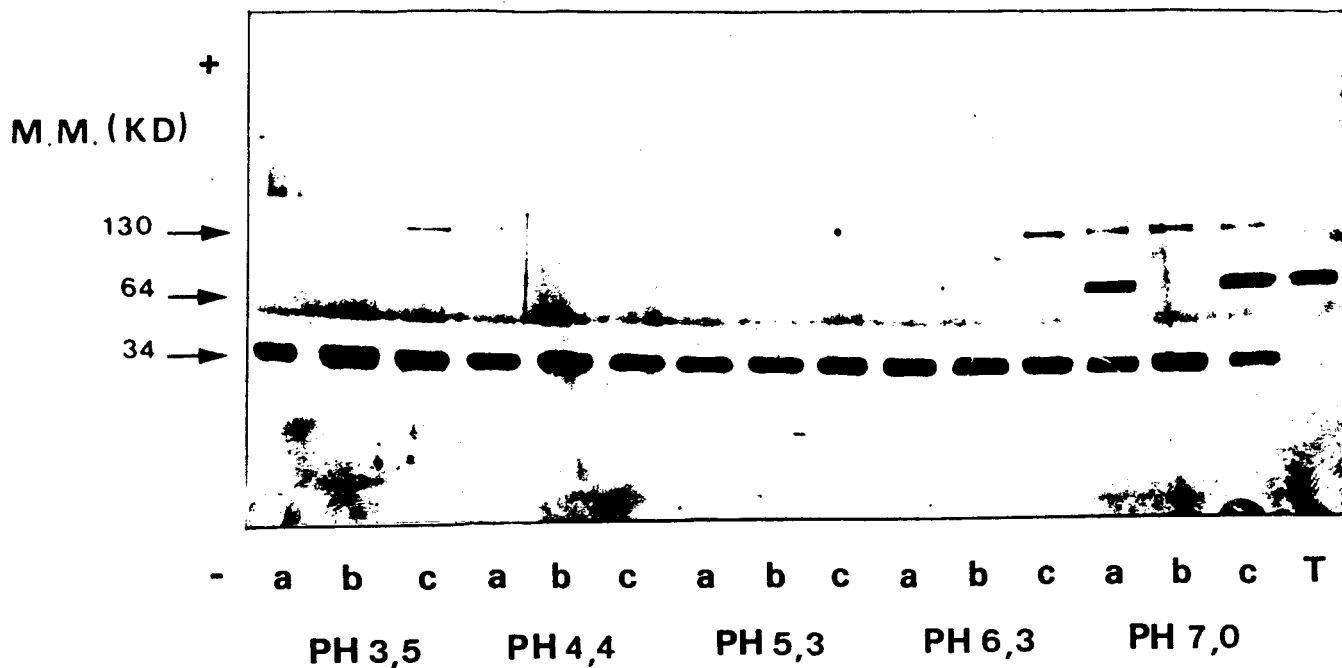
L'ébullition pendant 4 minutes en présence de SDS et de substrat entraîne dans tous les cas la dissociation totale de l'édifice. Ainsi, le glucose n'a pas un effet protecteur en présence de SDS mais au contraire accélère la dissociation totale du dimère.

Dans le cas de l'enzyme  $-Co^{2+}$ , le dimère résiste bien au traitement SDS -  $100^{\circ}C$  4 mn mais en présence de glucose, le complexe  $E-Co^{2+}$ - glucose est dissocié totalement.

#### 6-4 EFFET DU PH SUR L'ACTION DISSOCIANTE DU SDS

Les électrophorèses sont réalisées après traitement au SDS dans un milieu tamponné à pH 8,9 donc à pH voisin du pH optimum de l'enzyme.

Néanmoins, pour compléter l'étude de la stabilité de l'activité enzymatique à pH acides, un suivi en électrophorèse du comportement des échantillons a été conduit.



=====  
 FIGURE 28 : ELECTROPHORÈSE PAG 5-25 p.100 EN SDS  
 EFFET DU SDS À PH ACIDE  
 (pré-incubation 1 nuit à température ambiante)

a : enzyme + EDTA 5 mM

b : enzyme + Mg<sup>2+</sup> 10 mM

c : enzyme + Co<sup>2+</sup> 1 mM

T : Témoin enzyme dans l'EDTA



.../...

Après traitement à différents pH acides en présence de SDS, les échantillons ont été tamponnés par le tampon d'électrophorèse à pH 8,9 avant le dépôt. Le résultat est reporté dans la figure 28 page 117.

Ainsi, alors qu'à pH 8,9 à température ambiante l'enzyme est dissociée seulement en dimères, à pH acides, elle est totalement dissociée en monomères, que ce soit en présence ou non de métal protecteur. Rappelons que dans ce cas, lorsque l'enzyme est sous forme monomérique, l'activité résiduelle est de 9,6 p.100.

Une différence essentielle est à noter pour les échantillons traités à pH 7,0 en présence de SDS : l'enzyme en présence de cobalt ou d'EDTA présente une activité résiduelle de 96 p.100 alors que sous forme enzyme  $-Mg^{2+}$ , l'activité n'est plus que de 9 p.100. On constate bien la différence de comportement sur la figure 28 puisque l'enzyme  $-Mg^{2+}$  est totalement dissociée en monomères à pH 7,0.

Le réajustement à pH 8,9 des échantillons ainsi traités aux pH acides ne permet pas de réobtenir une forme dimérique. La dissociation par le SDS à PH acide est donc irréversible.

## VII) INFLUENCE DU SDS SUR L'ENZYME DESTABILISEE

Nous venons de voir que l'enzyme native 2 (AS = 220 U/mg) est dissociée immédiatement en dimère par le SDS à température ambiante, même en présence de métal protecteur.

La solution 1 (A.S = 110 U.mg<sup>-1</sup>), dont la masse moléculaire apparente est identique à la précédente, a été traitée dans les mêmes conditions par le SDS. L'électrophogramme comparé est reporté dans la figure 29 page 119.

On constate des différences importantes de comportement face au SDS :

✕ après traitement à l'EDTA, à température ambiante, le SDS dissocie totalement l'enzyme en monomère, alors que pour la solution 2 on n'obtient que la forme dimère.

\* le magnésium et le cobalt préservent une partie de l'enzyme puisque, toujours à température ambiante, la quantité de monomères diminue au profit de l'apparition de dimère. Mais ceci d'une façon moindre que pour la solution 2.

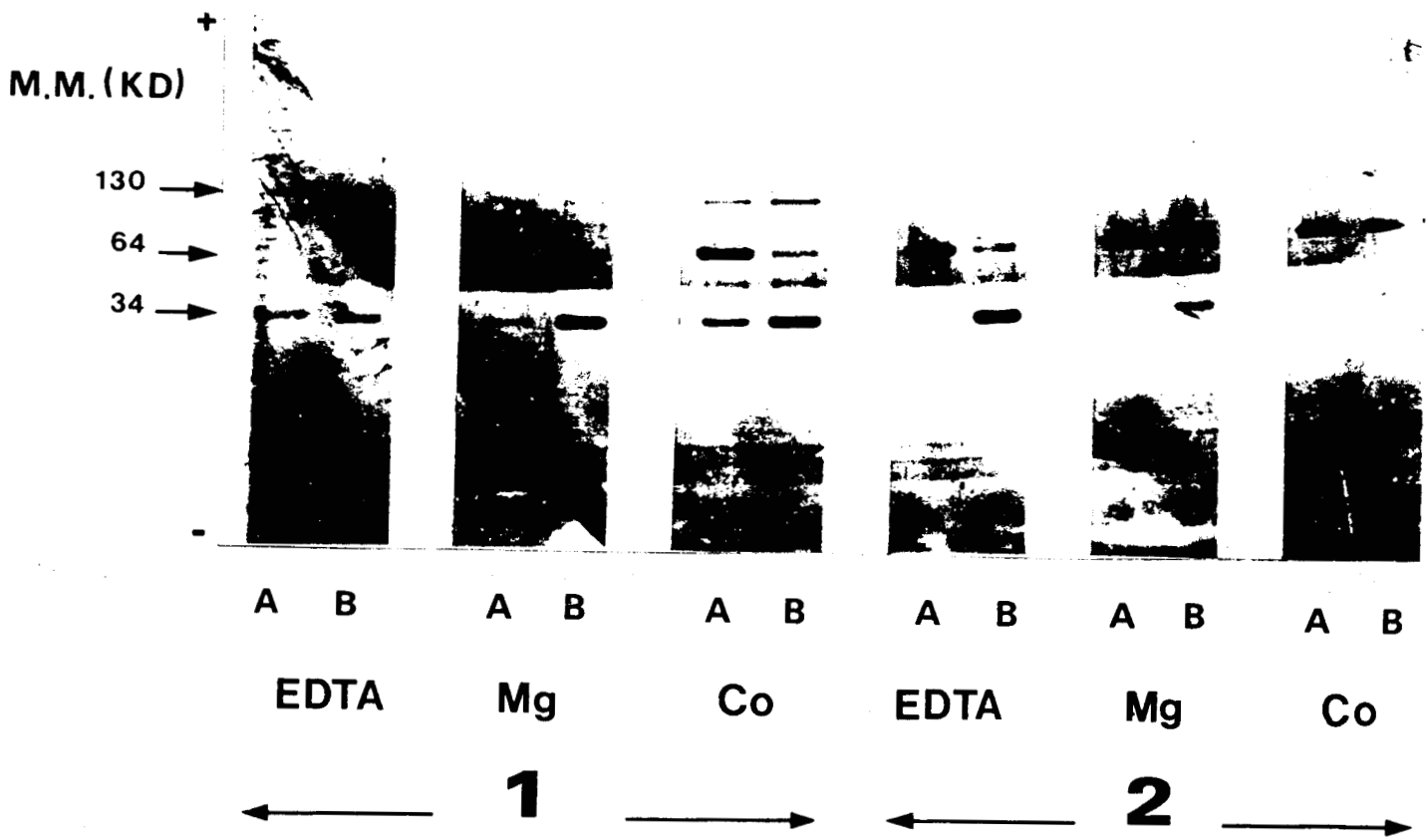
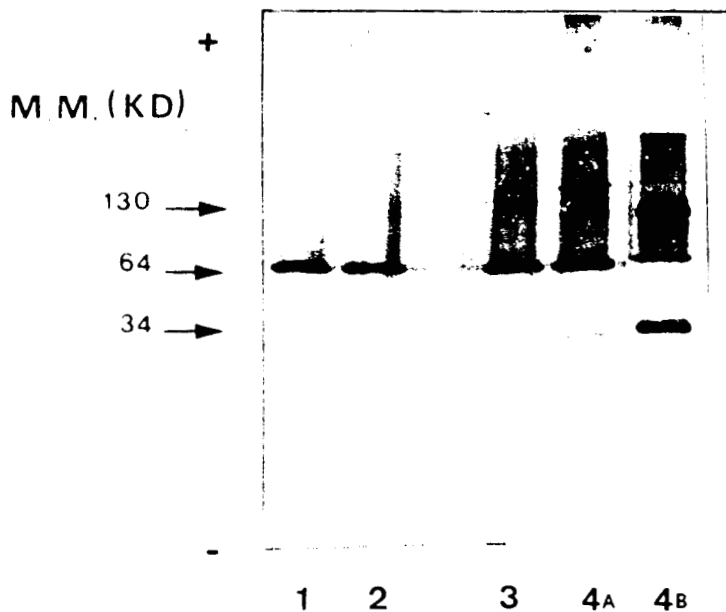


FIGURE 29 : ÉLECTROPHORÈSE PAG 5-25 p.100 EN SDS

DIFFÉRENCES DE COMPORTEMENT FACE AU SDS DES SOLUTIONS ENZYMATIQUES PURIFIÉES D'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DIFFÉRENTE

1 : Enzyme destabilisée (110 U.mg<sup>-1</sup>)  
 2 : Enzyme native (220 U.mg<sup>-1</sup>)  
 A : SDS sans bouillir  
 B : SDS 100°C, 4 mn.



1 : Echantillon témoin conservé à 4°C en EDTA  
 2 : Echantillon en EDTA congelé-décongelé  
 3 : Témoin en Magnésium conservé à 4°C  
 4 : Echantillon en magnésium congelé décongelé  
 4a : surnageant  
 4b : précipité

FIGURE 30 : ÉLECTROPHORÈSE PAG 5-25 p.100 EN SDS.

INFLUENCE DES CONDITIONS DE CONGÉLATION SUR LA STABILITÉ DE LA STRUCTURE

.../...

\* L'effet protecteur des métaux vis à vis de l'action du SDS à 100°C pendant 4 minutes est atténué puisque seules des traces de dimères résiduels sont observées.

La solution 2 témoin, après ce traitement présente dans les mêmes conditions une majorité de dimères et des traces de monomères comme nous l'avions vu précédemment.

## VIII) EFFET DE LA CONGÉLATION SUR LA STRUCTURE DE L'ENZY-

### ME NATIVE

L'électrophorèse d'un échantillon traité au SDS 1p.100 en présence d'EDTA 5 mM est un bon moyen de tester l'état de l'enzyme : si elle est "intacte", elle se dissocie seulement en dimères d'une masse de 64 Kdaltons.

L'électrophorèse en SDS des solutions congelées conduit aux résultats reportés dans la figure 30 page 119.

Les témoins conservés à 4°C sont stables. Il en est de même pour l'échantillon congelé en présence d'EDTA 5 mM pour lequel il n'y a pas de perte d'activité.

Par contre, la congélation de l'enzyme en présence de magnésium entraîne une floculation et une perte d'activité. Chacune des deux phases donne un profil hétérogène en électrophorèse.

\* le surnageant contient une solution d'enzyme destabilisée puisqu'il y a apparition de monomères en SDS.

\* le culot de centrifugation ne présente pas d'activité détectable. Solubilisé dans le SDS, il ne présente que des traces de dimères par rapport aux grandes quantités de monomères et de produits de réassociation (tri- et oligomères).

## IX) CONCLUSIONS

### 9-1) SOLUTION ENZYMATIQUE DESTABILISEE - Conclusions :

Ainsi, lorsque l'on se reporte à l'ancien protocole de purification de l'enzyme, parmi les étapes potentiellement destabilisantes, seule la congélation peut être mise en cause. En effet, les échantillons étaient congelés tels quels sans dialyse préalable contre l'EDTA.

Selon les résultats obtenus, la congélation entraîne donc une modification de la structure tertiaire du complexe enzyme-métal pour favoriser la dissociation du dimère par le SDS.

L'hypothèse que l'enzyme se soit oxydée ne peut être avancée. On obtiendrait dans ce cas en électrophorèse une proportion importante d'oligomères non dissociés par le SDS pour le surnageant de la solution destabilisée.

La chute d'activité spécifique aurait pu aussi s'expliquer par le fait que les solutions contiennent un mélange d'enzyme native et d'enzyme totalement désactivée. Mais désactivée, l'enzyme floccule donc n'est plus en solution. Par ailleurs dans ce cas, toute l'activité serait portée par l'enzyme native résiduelle. On n'observerait pas dans ce cas une chute de  $V_{max}$  lors des cinétiques en présence de SDS comme c'est le cas.

Ce ne peut donc être qu'une inactivation partielle de chaque molécule traitée à la congélation. La liaison entre les deux monomères pour former un dimère actif est donc fragilisée mais néanmoins existante pour l'enzyme qui reste dans le surnageant. Il y a donc perte d'activité et de protéine d'une part, et chute d'activité spécifique du surnageant d'autre part.

### 10-2) RELATION STRUCTURE - ACTIVITE - CONCLUSIONS.

L'étude de la dissociation du tétramère enzymatique par le SDS apporte donc plusieurs éléments :

#### a) l'enzyme est composée de deux dimères actifs :

Qu'elle soit sous forme de complexe enzyme-métal ou non, la forme dimérique apparaît immédiatement au contact du SDS à température ambiante. Le glucose ne préserve par la structure tétramérique de l'enzyme. De plus, les cinétiques d'activité en présence de SDS ont montré qu'il n'y avait pas de chute de  $V_{max}$  mais que l'affinité est deux fois moins importante.  $V_{max} = 2,1 \text{ mg.h}^{-1}$  et  $K_m = 0,22 \text{ M}$  sont donc les paramètres enzymatiques du dimère de la glucose isomérase de St. violaceoniger.

b) La structure quaternaire du dimère est fondamentale pour l'activité

La dissociation par le SDS à pH acide (alors que l'enzyme est stable), ou le traitement à 100°C pendant 4 minutes en présence de SDS font apparaître les monomères. Parallèlement, on observe une chute d'activité.

La dissociation du dimère est fortement atténuée lorsque l'enzyme est sous forme de complexe enzyme-métal.

Ainsi, bien que la présence de métal n'affecte pas la dissociation en dimères, les cations jouent un rôle de protection contre la seconde étape de dissociation. Leur effet protecteur n'est pas remarqué à pH acide probablement à cause du fait qu'il n'y a pas formation du complexe dans ces conditions d'ionisation.

Enfin, alors que le substrat joue souvent un rôle protecteur contre la dénaturation d'une enzyme, ici, le glucose favorise au contraire l'action dissociante du SDS.

De part les masses apparentes identiques des monomères et en relation avec les travaux réalisés sur d'autres glucose isomérases de Streptomyces, il est permis de raisonner sur un modèle moléculaire symétrique. Trois hypothèses sont donc possibles et sont schématisées dans le tableau 23 page 123.

Hypothèse 1A : L'enzyme est un tétramère symétrique par rapport à un axe séparant les deux dimères actifs. Le nombre de sites dans ce cas ne peut être que de deux, chaque dimère étant composé de deux monomères différents dont l'un est porteur du site actif. Les monomères différents deux par deux excluent l'hypothèse de quatre sites.

Par ailleurs toujours dans cette hypothèse de 2 types de monomères, on ne peut pas envisager un dimère actif contenant les deux mêmes monomères et l'autre inactif contenant les deux autres. En effet, selon les résultats obtenus avec l'enzyme destabilisée, nous avons vu que les dimères se dissocient tous deux de la même manière.

Hypothèse 2 : Les deux autres hypothèses concernent un modèle totalement symétrique. Le nombre de groupements thiols étant de quatre, on peut supposer que si les monomères sont rigoureusement identiques, chacun d'entre eux est porteur d'une cystéine. Par ailleurs le nombre de sites de fixation de métal a été déterminé pour d'autres isomérases : il est de 4 par tétramère.

De plus, nous avons vu qu'un groupement thiol au moins est au niveau du site et qu'il semble jouer un rôle au niveau de la formation du complexe E-M. Enfin les études de YOUNG et coll. (140) montrent que le métal et le substrat sont très voisins ( $9,1 \pm 0,7 \text{ \AA}$ )

.../...

TABLEAU 23 : HYPOTHESES SCHEMATISEES DE LA STRUCTURE  
 QUATERNAIRE DE LA GLUCOSE ISOMERASE DE  
Streptomyces violaceoniger

|   | MODELES A 2 SITES | MODELES A 4 SITES |
|---|-------------------|-------------------|
| MODELE<br>PARTIELLEMENT<br>SYMETRIQUE<br>(2 sortes de monomère) |                   |                   |
| MODELE<br>TOTALEMENT<br>SYMETRIQUE<br>(monomères identiques)    |                   |                   |

----- Première dissociation aisée par le SDS à température ambiante (dimères actifs)

----- Seconde dissociation par le SDS atténuée par la présence de métaux sur la molécule

.../...

Ainsi, dans les cas où il n'y aurait qu'un site catalytique par dimère, deux cations sont au niveau du site pour la mise en conformation pour le substrat et les deux autres interviennent dans la liaison pour la préservation de la structure quaternaire du dimère (hypothèse 2A).

La dernière hypothèse, hypothèse 2B, est que l'on peut être en présence d'un tétramère totalement symétrique par rapport à son point central. Chaque monomère présente un site actif contenant un thiòl pour recevoir le métal et le substrat. Dans ce cas les 9,6 p.100 d'activité résiduelle représente l'activité, certes faible mais existante, du monomère seul. Le métal présent au niveau du site confère alors au monomère une structure tertiaire telle que la liaison avec son homologue est plus ferme pour former le dimère actif.

Au cours de l'étude, on a obtenu des solutions enzymatiques qui présentent des activités spécifiques apparentes chutant par paliers (220, 150, 110, 50 U.mg<sup>-1</sup>) de façon réversible. En effet nous avons vu qu'un traitement à l'EDTA ou au DTT élimine ce phénomène causé par la présence de cations contaminants. Ce fait peut appuyer cette hypothèse 2B de 4 sites par tétramère. Auquel cas les monomères isomérisent indépendamment les uns des autres mais doivent néanmoins être associées au moins en dimères pour travailler à leur vitesse maximale.

Le métal joue donc un rôle de mise en conformation. Le rôle structural plutôt que catalytique a déjà été démontré pour plusieurs glucose-isomérases.

Ces trois hypothèses n'ont pu être avancées que grâce à l'obtention de solutions enzymatiques destabilisées par la congélation. En effet, elles ont permis de montrer que l'on a au moins une symétrie axiale de deux dimères qui travaillent à vitesse maximale en étant séparés.

Les résultats actuels ne permettent pas de faire le choix entre ces hypothèses de travail. La lumière reste à faire a) sur la détermination du nombre de sites (2 ou 4 par tétramère) en utilisant des méthodes physiques puisque les cinétiques enzymatiques sont de type michaelien.

- b) Sur la preuve d'identité totale des monomères. Rappelons à ce propos que le décodage du gène de la glucose isomérase chez E.coli donne la séquence primaire d'un polypeptide de 333 résidus, ce qui correspond à la masse approximative d'un monomère. (cf. page 36)

## - CONCLUSIONS GÉNÉRALES -

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude peuvent se résumer de la façon suivante :

1) La glucose isomérase que nous avons purifiée 10 fois à partir de moût de fermentation de Streptomyces violaceoniger est homogène en électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS et donne un arc de précipitation en immuno-électrophorèse. Le protocole que nous avons mis au point permet :

- a) de traiter des quantités importantes de matériel cellulaire de l'ordre du kilogramme de cellules fraîches.
- b) d'être réalisé rapidement : le schéma permet d'obtenir 500 mg d'enzyme homogène dans un délai de 5 jours avec un pourcentage de récupération d'activité de 78 p.100.
- c) de ne pas dénaturer la molécule enzymatique car elle ne subit aucune action de précipitation.
- d) d'éviter les interactions de l'enzyme avec des métaux contaminants comme c'est généralement le cas lors de la précipitation du matériel nucléaire.
- e) d'obtenir une solution enzymatique stable (minimum 5 mois à 4°C, même en solution diluée à 0,7 p.1000 en protéine), à condition de lui ajouter de l'EDTA 10 mM;
- f) d'être applicable, avec des résultats identiques à une autre souche de Streptomyces.

2) Les paramètres enzymatiques que nous avons étudiés nous permettent de définir les conditions optimales d'utilisation de la glucose isomérase de St. violaceoniger.

\* La réaction enzymatique est de type michaélien. L'enzyme est métal-dépendante, ce qui nous a permis de mettre en évidence un mécanisme réactionnel de type bi-bi aléatoire. Le  $K_m$  est de 0,105 M et la vitesse maximale théorique de  $1,8 \text{ mg.h}^{-1}$  quand l'enzyme est saturée en magnésium.



.../...

\* Nous avons remarqué que le magnésium est plus activateur que le cobalt. La vitesse de réaction et l'affinité sont deux et trois fois plus importantes respectivement. Cependant, le cobalt présente un effet plus protecteur que le magnésium vis à vis de la modification de conformation engendrée soit par un traitement thermique soit par un traitement chimique (au SDS).

\* l'enzyme est très sensible aux cations présents dans les solutions d'isomérisation ou dans les systèmes tampon lors de la purification. Cette interaction avec des métaux contaminants se traduit par une chute d'affinité (passage de  $K_m = 0,105 \text{ M}$  à  $K_m = 0,6 \text{ M}$ ). Cette mesure du  $K_m$  peut définir l'état dans lequel se trouve la molécule enzymatique (enzyme totalement liée au magnésium ou à un autre métal).

Un traitement à l'EDTA 10 mM ou par le DTT 2 mM permet de lever cette inhibition par les cations contaminants.

\* l'enzyme est stable pour des pH supérieurs à pH 4,0. Quand la force ionique est équivalente à  $\mu = 2$ , elle n'est stable qu'à partir de pH 5,0. Quand l'enzyme est traitée par le SDS (1 p.100), elle n'est stable qu'en milieu basique (à partir de pH 7,5).

Le protocole d'utilisation de la glucose isomérase que nous proposons est le suivant : l'enzyme sera pré-incubée 30 Minutes à 37°C en présence de DTT 2mM ou d'EDTA 0,5 mM avant d'effectuer l'isomérisation pendant une heure à 58°C, pH 7,5 en présence de magnésium 10 mM et de glucose 0,8 M.

3) L'étude des propriétés physico-chimiques nous a permis de montrer que :

- l'enzyme possède un point isoélectrique de  $pI = 4,2$
- l'enzyme renferme très peu de monosaccharides (1 p.100)
- la masse moléculaire est de 125 Kdaltons.
- l'édifice moléculaire est tétramérique, les sous-unités apparemment identiques possèdent des masses de 34 K daltons.
- l'enzyme native présente 4 fonctions thiol masquées. L'accessibilité n'est possible qu'au moment où l'édifice tétramérique est complètement dissocié. Nous n'avons pas caractérisé de pont disulfure inter-chaine.

.../...

.../...

4) l'étude de la dissociation du tétramère par le SDS a été réalisé dans différentes conditions. Nous avons remarqué que cette dissociation s'effectue en 2 temps :

- dans un premier temps, on obtient la formation immédiate de dimères possédant des paramètres cinétiques voisins de l'enzyme native (la vitesse maximale de réaction est inchangée, l'affinité pour le substrat est diminuée).
- dans un second temps, on obtient une dissociation totale en monomères et la perte d'activité est de l'ordre de 90 p.100. Cette deuxième phase de dissociation est fortement atténuée quand l'enzyme est sous forme enzyme-magnésium et davantage encore lorsqu'elle est sous forme de complexe enzyme-cobalt.

Le glucose d'une part, et les milieux acides d'autre part, favorisent la dissociation du complexe enzyme-métal en monomères.

Les résultats que nous avons obtenu concernent une enzyme solubilisée. Il faudra désormais envisager de comparer ses paramètres à ceux d'une enzyme immobilisée.

Par ailleurs, et dans la mesure où l'on envisage le clonage de la glucose isomérase, il est nécessaire de définir les relations existantes entre la structure et la réactivité enzymatique. Ce qui implique de mettre au point un modèle moléculaire de façon à savoir :

- Si tous les monomères sont identiques et, dans ce cas, si chacun d'entre eux est porteur de l'activité enzymatique.
- Si, au contraire, il y a des monomères différents impliquant le fonctionnement sous forme dimère .

A ce niveau, les méthodes d'exploration de la biophysique sont indispensables à la résolution de ce problème.

# BIBLIOGRAPHIE

# B I B L I O G R A P H I E

=:=:=:=:=:=:=:=:=:=:=:=:=:=:=:=:

- 1 ABBOT, B.J., *Ferment. Proc.*, Acad. Press, 1977, 1, p. 207 (p. 20)
- 2 ANDERSON, W.L., WETLAUFER, D.B., *Anal. Biochem.*, 1975, 67, P.493-502 (p 44)
- 3 ATTIA, R.M., GHALI, Y., ROUSHDI, M., ELDIN, M.A., *Z. Ernährungswissenschaft*, 1980, 19, P. 71-87 (p 20)
- 4 BERMAN, H.M., RUBIN, B.H., CARREL, H.L., GLUSKER, J.P., *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, P. 3983 (p 33)
- 5 BHATT, R.R., JOSHI, S., KOTHARI, R.M., *Enz . Microb. Technol.*, 1979, 1, P. 113-116 (p 22)
- 6 BOCK, K., MELDAL, M., MEYER, B., WIEBE, L., *Acta Chem. Scand.*, 1983, 37, P. 101-108 (p 30, 74)
- 7 BOERINGER, CF., *British Patent*, 1,085,696 (Oct. 4, 1967) (p 11)
- 8 BRADFORD, M., *Anal. Biochem.*, 1976, 72, P. 248 (p 42)
- 9 BRIGGS, K.A., LANCASHIRE, W.E., HARTLEY, B.S., *EMBO Journal*, 1984, 3, P. 611-616 (p17, 36)
- 10 CHEN, W.P., ANDERSON, A.W., HAN, Y.W., *Appl. Environ. Microb.*, 1979, 37, P. 324-331 (p 17)
- 11 CHEN, W.P.Ph D., ANDERSON, A.W., HAN, Y.W., *Appl . Environ. Microbiol.*, 1979, 37, P. 785-787 (p 57)
- 12 CHEN, W.P., ANDERSON, A.W., *Appl . Environ. Microbiol.*, 1979,-P.1111-1119 (p 24-27)
- 13 CHEN, W.P. Ph D., *Process Biochem.*, 1980, P.30-35 (p17, 32, 112)
- 15 CHEN, P.F., HSIEH, W.T., *J. Chinese Bioch. Soc.*, 1978, 7, P. 88-97 (p 22)
- 15 CHIBATA, I., et coll., *German Patent*, 2 420102 (1974) (p 21)
- 16 CHOU, C.C., LADISH, M.R., TSAO, G.T., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1976, 32, P. 489-493 (p 17, 25)
- 17 CLELAND, W.W., *Biochemistry*, 1964, 3, 480-482 (p. 92)
- 18 COTTER, W.P., LLOYD, N.E., HINMAN, C.W., *US Patent*, 3,623,953 (Nov.30,1971) (p21, 23)
- 19 CPC international. *German Patent* 2,245,402 (1973)
- 20 CUATRECASAS, P., ANFINSEN, C.B., *Methods in enzymology*, Vol. 22, Ed. Acad. Press, 1971, P. 345-378 (p 26)
- 21 DANNO, G., YOSHIMURA, S., NATAKE, M., *Agr. Biol. Chem.*, 1967, 31, P.284-292
- 22 DANNO, G., *Agr. Biol. Chem.*, 1970, 34, P. 1795-1804.( p19-35, 106)(p17, 30)
- 23 DANNO, G.I., *Agr. Biol. Chem.*, 1970, 34, P.1805 1814 (p 88)
- 24 DANNO, G.I., *A.B.C*, 1971, 35(7), P. 997-1006 (p 33)
- 25 DANNO, G.I., *Agr.Biol.Chem.*, 1973, 37, 1849~1855 (p 38)

- 26 DEMNEROVA, K., SAFARIK, I., KRALOVA, B., *Biotechnol. letters*, 1982, 4, P.431-435 (p 24)
- 27 DEVOS, F., *Dossier Roquette*, 1976 (p 20)
- 28 DIEZ, M.J.F., OSUGA, D.T., FEENEY, R.E., *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1964, 107, P. 449-458 (p 43)
- 29 DINELLI, D., *British Patent*, 1974, 1.361.963 (p 21)
- 30 DISCHE, Z., BORENFREUND, E., *J. Biol. Chem.*, 1951, 192, P. 583 (p 41)
- 31 DIXON, M., WEBB, E.C., Ed. Longmans, Ed II, 1964, P. 421-441 (p 46; 85)
- 32 DULLEY, J.R., GRIEVE, P.A., *Anal. Biochem.*, 1975, 64, P. 136-141 (p 42)
- 33 DWORSCHACK, R.G., CHEN, J.C., LAMM, W.R., DAVIS, L.G., *German Patent*, 2,251,855, (Avril 26, 1973) (p 21)
- 34 ELLMAN, G.L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 82, P. 70-77 (p 43)
- 35 FEATHER, M.S., DESPHANDE, V., LYBYER, M.J., *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, 1970, 38, P. 859 (p 28)
- 36 GAVRISTOY, A.V., KARPOVA, M.A., MOSICHEV, M.S., KUZNETSOV, V.D., *Mikrobiologiya*, 1981, 50, P. 626-630 (p 24, 26)
- 37 G. VENCO, S., MORISI, F., PANSOLLI, P., *FEBS letters*, 1973, 36, P.57 (p11, 21)
- 38 HAACK, E., *German Patent* 1,163,307 (Feb. 1964) (p 12)
- 39 HABEEB, A.F.S.A., *Method in Enzymology*, Ac. Press, 1972, 25, P.457-464 (p 43)
- 40 HAYASHI, K., SEINO, A., KASUMI, T., KUBO, N., TSUMURA, N., *J. Ferment. Technol.*, 1981, 59, P 83-89. (p 22, 28)
- 41 HO, N.W., ROSENFELD, S., STEVIS, P., TSAO, G.T., *Enzyme Microb. Technol.*, 1983, 5, P. 417-420 (p17, 25)
- 42 HOGHE-ANGELETTI, R.A., *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, P. 7814-7818 (p36, 112)
- 43 HOLSTEIN, A.G., HOLSING, G.C., *US Patent*, 3,050,444 (Aug. 21, 1962) (p 12)
- 44 HUCHETTE, M., *Dossier Roquette*, 1976 (p 20)
- 45 HUITRON, C., LIMON-LASON, J., *Biotechnol. Bioeng.*, 1978, 20, P. 1377 (p 21)
- 46 HYVÖNEN, L., KOIVISTOINEN, P. in *Nutritive Sweeteners*, Appl. Sci. Publishers, 1982, P. 133-144 (p 14)
- 47 ISHAQUE, M., KLUEPFEL, D., *Biotechnol. lett.*, 1981, 3, P 481-486 (p 18)
- 47 a JOCELYN, P.C., *Biochemistry of the SH groups.*, Academic Press, 1972 (p90, 116)
- 48 KALB, V.F., BERNLOHR, R.W., *Anal. Biochem.*, 1977, 82, P. 362-371 (p 60)
- 49 KASUMI, I., TSUMURA, N., *Resp National Food Re. Inst.*, 1975, 30, P.54 (p 21)
- 50 KASUMI, T., TSUJI, M., HAYASHI, K., TSUMURA, N., *A.B.C.*, 1977, 41(10), P. 1865-1872 (Rééd. 1978) (p21, 22)
- 51 KASUMI, T., HAYASHI, K., TSUMURA, N., *Agr. Biol. Chem.*, 45, (1981), P. 619 627 (p 17, 27, 32, 53, 88)
- 52 KASUMI, T., HAYASHI, K., TSUMURA, N., TAKAGI, T., *Agr. Biol. Chem.*, 1981, 45, P. 1087 1095 (p 35, 37, 106, 112)

.../...

- 53 KASUMI, T., HAYASHI, K., TSUMURA, N., *Agr. Biol. Chem.*, 1981, 45,  
P. 1097-1103 (p 36, 38, 76)
- 54 KASUMI, T., HAYASHI, K., TSUMURA, N., *Agr. Bio. Chem.*, 1982, 46, 21-30(p33)
- 55 KASUMI, T., HAYASHI, K., TSUMURA, N., *Agr. Biol. Chem.*, 1982, 46,  
P. 31-39 (p 33, 38)
- 56 KERCKAERT, J.P., *Anal. Biochem.*, 1978, 84, P. 354-360 (p 42)
- 57 KIEBOOM, A.P.G., VAN BEKKUM, H., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1984,  
103, P. 1-12 (p 74)
- 58 KIM, Y., HAH, Y.C., *Korean J. microbiol.*, 1978, 16 (2), P. 47-61  
(Rééd. 1979) (p 17, 30, 34)
- 59 KIMURA, K., et al., *Enzyme. Eng.*, 1975, 3, P. 531 (p21)
- 60 KLUEPFEL, D., BIRON, L., ISHAQUE, M., *Biotechnol. letters*, 1980, 2,  
P. 309-314 (p 18)
- 61 KONIGSBERG, X., *Methods in Enzymology*, 1972, 25, Ed. Academic Press,  
New York, P. 185-188 (p 92)
- 62 KORUS, R.A., OLSON A.C., *J. FOOD Sci.*, 1977, 42, P.258 (p 21)
- 63 KUMAKURA, M., YOSHIDA, M., KAETSU, I., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979,  
37, P. 310-315 (p 21)
- 64 LACKS, S.A., SPRINGHORN, S.S., ROSENTHAL, A.L., *Anal. Biochem.*, 1979, 100.  
P. 357-363 (p 42)
- 65 LEE, C.K., HAYES, L.E., LONG, M.E., US Patent, 3,645, 848, (Feb.29.1972)
- 66 LEE, C.K., LONG, M.E., US Patent, 3,821,086 (p 21) (p 17)
- 67 LEE, Y.Y., *Biotechnol. Bioeng.*, 1976, 18, P. 389 (p 21)
- 68 LEE, Y.H., WANKAT, P.C., EMERY, A.H., *Biotechnol. and bioeng.*  
18, 1976, P. 1639 (p 26)
- 69 LINEWEAVER, H., BURK, D., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1934, 56, P.658-666 (p 46)
- 70 LLOYD, N.E., LEWIS, L.T., LOGAN, R.M., PATEL, D.N., US Patent 3,694,314,  
(Sept 26, 1972) (p 19, 21)
- 71 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.L., *J. Biol. Chem.*,  
1951, P. 193,265 (p 42)
- 72 MALMSTROM, B.G., ROSENBERG, A., *Adv. in enzymology*, Vol. 21, Ed. Interscience,  
1959, P 131-167 (p 85)
- 73 MARSHALL, R.O., KOOI, E.R., *Science*, 1957, 125, P. 648 (p 16, 17)
- 74 MARSHALL, R.O., US Patent 2,950,228 (Aug. 23, 1960) (p 16)
- 75 MATSUDAITA, M., ISHIGE, Y., Japanese Patent 76,98,381 (1976) (p 21)
- 76 MATSUMOTO, A., et coll., Japanese Patent, 1976, 76 144.784. (p 21)
- 77 MEERS, J.L., *Biotechnol. letters*, 1981, 3, P. 136-141 (p 18)

.../...

.../...

- 78 MESSING, R.A., US. Patent, 1974, 3.850.751  
1975, 3.868.304 (p 21)
- 79 Miles Laboratories, British Patent, 1,376,983 (1974) (p 21)
- 80 MORISSEY, J.H., Anal. Biochem., 1981, 117, P.307-310 (p 42)
- 81 NATAKE, M., YOSHIMURA, S., Agr. Biol. Chem., 1963, 27, P.342 (p 17, 18)
- 82 NATAKE, M., YOSHIMURA, S., A.B.C., 28, 1964, P.505-509 (p 17)
- 83 NATAKE, M., YOSMIMURA, S., Agr. Biol. Chem., 1964, 28, P.510-516 (p 17, 25)
- 84 NATAKE, M., Agr. Biol. Chem., Vol. 30, N° 9, P.887-895, (1966) (p 26, 27)
- 85 NEWTON, J.M., WARDRIP, E.K., Paper presented at ACS Spring meeting  
Dallas (1974) (p 17)
- 86 NOLTMAN, E.A., The enzyme, 1972, 3è. èd., Ed. P.D. Boyer, 6, P.271 (p 16)
- 87 NORDMANN, Y., SHAPIRA, F., DREYFUS, J.C., Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 1968, 31, P 884-889 (p 9)
- 88 OLLIS, D.F., Biotech. Bioeng., 1972, 14, P.871 (p 22)
- 89 PARK, Y.K., TOMA, M., J. Food Sci., 1974, 20, P 1167 (p 18)
- 90 PARK, Y.K., TOMA, M., J. Gen. Appl. Microbiol, 1974, 20, P.67-69 (p 17)
- 91 PARK, Y.H., CHUNG, T.W., HAN, M.H., Enzyme Microb. Technol. 1980,  
2(3), P.227-233 (p 20)
- 92 PETERSON, G.L., Anal. Biochem., 1979, 100, P. 201-220 (p 42)
- 93 PIGMAN, W., HORTON, D., Acad. Press, 1972, 1A, P.165-191 (p 11)
- 94 RAMCHANDER, S., FEATHER, M.S., Arch. Biochem. Biophys., 1977, 178,  
P. 576-580 (p 31)
- 95 Research Corporation, British Patent, 1975, 1.385.585 (p 21)
- 96 REYNOLDS, R.J., British Patent, 1,368,650 (1974) (p 21)
- 97 RYU, D.Y., et al., Biotechnol. Bioeng., 1977, 19, P.159 (p 21)
- 98 SANCHEZ, S., SMILEY, K.L., Appl. Microbiol, 1975, 29, P 745-750 (p17, 39)
- 99 SATO, T., TSUMURA, S., Japanese Patent 17,460 (1966) (p 17)
- 99 a SCHEIDEGGER, J.J., Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1955,7, P.103 (p44)
- 100 SCHRAY, K.J., ROSE, I.A., Biochemistry, 1971, 10, p 1058 (p28).
- 101 SCHRAY, K.J., MILDVAN, A.S., J. Biol. Chem., 1972, 247, P.2034-2037 (p 28)
- 102 SCOTT, Meth. in Carbohydrate Chem., 1965, 5, P.38 (p 48)
- 103 SIBATANI, A., Anal. Biochem., 1970, 33, 279-285 (p 48)
- 104 SIPOS, T., US Patent 3,708,397 (Jan. 2,1973) (p 22)
- 105 SLEIN, M.W., Methods in enzym ., 1962, AP, P.347 (p 26, 88)
- 106 STOICHEV, M., DZHEZHEVA, G., OGMYANOV, I., Acta Microbiol. Bulg.,  
1981, 9, P. 29-34 (Rééd. 1982) (p 31)
- 107 STRANDBERG, G.W., SMILEY, K.L., App. Microbiol., 1971, 21, P.588-593  
(p 17, 21, 35)

.../...

.../...

- 108 STRANBERG, G.W., SMILEY, K.L., *Biotechnol. Bioeng.*, 1972, 14, P.509 (p 21)
- 109 STANLEY, W.L., *Biotechnol. Bioeng.*, 1976, 18, P.439 (p 21)
- 110 SUEKANE, M., TAMURA, M., TOMIMURA, C., *Agr. Biol. Chem.* 42, (1978)  
P.909-917. (p 25-37, 65)
- 111 SUEKANE, M., IIZUKA, M., *Z. Allg. Microbiol.*, 1982, 22, P.577-589 (p 17)
- 112 TAKASAKI, Y., TANABE, O., *Agr. Biol. Chem.*, 1966, 30, P.220 (p 25)
- 113 TAKASAKI, Y., *Agr. Biol. Chem.*, 1966, 30, P.1247-1253.(p 18)
- 114 TAKASAKI, Y., *Agr. Biol. Chem.*, 1967, 31, P.309~313 (p 31)
- 115 TAKASAKI, Y., KOSUGI, Y., KANBAYASHI, A., *Agr. Biol. Chem.*, 1969,33,  
P. 1527-1534 (p 17, 20, 22, 25, 27)
- 116 TAKASAKI, Y., KOSUGI, Y., KANBAYASHI, A., *Fermentation Advances*, 1969, P 561-589
- 117 TAKASAKI, Y., KANBAYASHI, A., *Rep. Ferment. Res. Inst.*, 1969, 37, P.23 (p 21)
- 118 TAKASAKI, Y., KANBAYASHI, A., *Japanese Patent* 19,086, (1972) (p 19)
- 119 TAKASAKI, Y., *Agr. Biol. Chem.*, 38, P667~668 (p 17)
- 120 TAKASAKI, Y., *US Patent* 3,950,222(1976) (p 20)
- 121 TASHEVA, B., DESSEV, G., *Anal. Biochem.*, 129, 1983, P.98-102 (p 43)
- 122 TSUMURA, N., SATO, T., *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 1960,24, P.326. (p 16)
- 123 TSUMURA, N., SATO, T., *Agr. Biol. Chem.*, 1961, 25, P.616 (p17, 19)
- 124 TSUMURA, N., SATO, T., *Agr. Biol. Chem.*, 1965, 29, P.1129-1134 (p 16-18, 25)
- 125 TSUMURA, N., HAGI, M., SATO, T., *Agr. Biol. Chem.*, 1967, 31, P.902-908 (p19)
- 126 TSUMURA, N., et al. *Shokuhin Sogo Kenkyusho*, 1976, 31, P.71 (p 21)
- 127 VAHERI, M., KAUPPINEN, V., *Process. Biochem.*, 1977, 6, P.5 (p 5)
- 128 VAN KEULEN, M.A., VELLENGA, K., Joosten G.E., *Biotechnol. Bioeng.*, 1981,  
23, P.1437-1448 (p 21)
- 129 VIETH, W.R., WANG, S.S., SAINI, R., *Biotechnol. Bioeng.*, 1973, 15,  
P. 565~569 (p 21)
- 130 WANG, S.S., VIETH, W.R., *Biotechnol. Bioeng.*, 1973, 15, P.93 (p 21)
- 131 WEBER, K., OSBORN, M., *J. Biol. Chem.*, 224, P.4406 (1969) (p 42)
- 132 WEETALL, H.H., *Food Product Dev.* 1973, 4, P.46 (p 20)
- 133 X, Dossier Roquette, *Bulletin technique*, NOV. 1976 (p 20)
- 134 YOUNG, J.M., SCHRAY, K.J., MILDVAN, A.S., *JBC*, 1975, 250, PP 9021-9027 (p 31)
- 135 YAMAGUCHI, R., ARAI, Y., KANEKO, T., ITOH, T., *Biotechnol. Bioeng.*,  
1982, 25, P.1081-1092 (p 21)
- 136 YAMANAKA, K., *Agr. Biol. Chem.* 27, 1963, P.265-270 (p 17, 26-30)
- 137 YAMANAKA, K., *Biochem. Biophys. Acta*, 151 (1968) 670-680 (p 18, 25, 32, 35)
- 138 YAMANAKA, K., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, 131, P.502 (p 33)
- 139 YAMANAKA, K., IZUMORI K., *Agr. Biol. Chem.*, 1973, 37, P.521~526 (p 30)
- 140 YOUNG, J.M., SCHRAY, K.J., MILDVAN, A.S., *J. Biol. Chem.*, 1975,250,  
P. 9021-9027 (p 33, 99, 122)
- 141 ZANETTA, J.P., BRENNENRIDGE, X.C., VINCENDON, G., *J. Chromatogr.*,  
1972, 69, P. 291-304 (p 45)



## RESUME

La D-glucose (ou D-Xylose) isomérase (E C. 5.3.1.5.) catalyse l'isomérisation réversible du glucose en fructose. Elle est utilisée industriellement sous forme immobilisée pour la production commerciale de sirops à haute teneur en fructose.

L'étude porte sur l'enzyme isolée de *Streptomyces violaceoniger*, souche brevetée par la Société Roquette Frères. L'enzyme étant intracellulaire, différentes méthodes d'extraction et de purification ont été testées. Le protocole retenu permet de récupérer 78 p. 100 de l'activité pour un facteur de purification de 9,7. La solution finale est homogène en électrophorèse et en immunoelectrophorèse. Elle est stable au moins 5 mois en solution à 4°C et ne peut être congelée sans perte d'activité que si elle est préalablement traitée à l'EDTA. Les optima de l'enzyme sont pH 8,5 - 8,3 et 75°C. L'activité ne peut être détectée qu'en présence de cobalt ou de  $\text{Mg}^{2+}$ .  $\text{Co}^{2+}$  est défini comme étant plus un protecteur de l'activité et  $\text{Mg}^{2+}$  un activateur. La fixation du métal sur l'enzyme favorise la fixation du substrat pour former un complexe ternaire enzyme-métal-substrat actif. L'activité est très sensible à la présence de cations contaminants. L'inhibition qu'ils provoquent est levée par traitement à l'EDTA ou au DTT 2mM.

L'enzyme de masse de 125 Kdaltons est composée de 4 sous-unités de masses apparentes identiques (34 Kdaltons). Le tétramère contient 4 groupements thiols masqués. Les dissociations par le SDS dans différentes conditions ont permis de montrer que l'enzyme est dissociée en deux temps. Les dimères obtenus en premier lieu sont actifs séparément. Par contre, il y a corrélation entre la chute d'activité et l'apparition de monomères en SDS.

Les différents résultats permettent de discuter trois hypothèses de structures quaternaires possibles de la glucose isomérase.

MOTS CLES : Streptomyces ; Xylose(Glucose)isomérase ; Isolement ; Propriétés ; Relation structure - Activité ; Métaux ; Magnésium ; Dissociation.