

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	I
LISTE DES FIGURES	II
GLOSSAIRE	III
INTRODUCTION	1
RESUME BIBLIOGRAPHIE	2
I- La papaïne.....	2
I- 1. <i>Généralités sur la papaïne</i>	2
I- 2. <i>Origine de la papaïne</i>	3
II- Structure moléculaire de la papaïne	4
III- Mécanisme de la catalyse enzymatique	5
III- 1. <i>Mécanisme catalytique.....</i>	6
III- 2. <i>Activité catalytique au niveau du site actif</i>	7
III- 3. <i>Facteurs influençant l'activité catalytique</i>	8
IV- Les utilisations de la papaïne	8
MATERIELS ET METHODES	9
I- Récolte d'échantillons de feuilles de papayer	9
II- Purification de la papaïne	9
II-1. <i>Extraction à froid</i>	9
II-2. <i>Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium</i>	10
II-3. <i>Dialyse</i>	11
III- Test d'activité	11
IV- Dosage	12
IV-1. <i>Méthode par évaporation à sec</i>	12
IV-2. <i>Méthode de dosage de FOLIN-LOWRY</i>	13
IV-3. <i>Activité enzymatique et activité spécifique</i>	14
IV-4. <i>Rendement d'activité et taux de purification</i>	15
IV-5. <i>Procédé de purification</i>	15
V- Etude de la cinétique enzymatique	16
V-1. <i>Paramètres influençant la cinétique enzymatique</i>	16
V-2. <i>Détermination des constantes cinétiques.....</i>	18

RESULTATS ET DISCUSSION	21
I- Caractères des échantillons des feuilles de papayer	21
II- Purification.....	22
II-1. <i>Saturation en sulfate d'ammonium.....</i>	22
II-2. <i>Tableau de purification</i>	23
III- Courbe d'étalonnage du dosage de FOLIN-LOWRY.....	24
IV- Effets des différents paramètres physico-chimiques	25
IV-1. <i>Cinétique enzymatique en fonction du temps.....</i>	25
IV-2. <i>Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en papaïne.....</i>	26
IV-3. <i>Cinétique enzymatique en fonction de la température</i>	28
IV-4. <i>Cinétique enzymatique en fonction du pH.....</i>	31
IV-5. <i>Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en caséine</i>	34
V- Les constantes cinétiques	36
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	40
ANNEXE I	44
ANNEXE II	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Composition en acides aminés de la papaïne.....	4
Tableau II	: Etalonnage du dosage de FOLIN-LOWRY.....	13
Tableau III	: Paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction du temps.....	15
Tableau IV	: Paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction de la concentration en papaïne.....	16
Tableau V	: Paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction de la température.....	16
Tableau VI	: Paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction du pH.....	17
Tableau VII	: Paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction de la concentration en caséine.....	17
Tableau VIII	: Conditions de collecte des feuilles de Papaye.....	20
Tableau IX	: Résultats de la réaction de saturation en sulfate d'ammonium.....	21
Tableau X	: Récapitulatif du suivi de la purification.....	22
Tableau XI	: Valeurs des constantes cinétiques.....	37

LISTE DES FIGURES

Fig. 1 : Structure tridimensionnelle de la papaïne.....	2
Fig. 2 : Jeune arbuste de papayer femelle à fruits verts.....	3
Fig. 3 : Mécanisme de catalyse enzymatique par la papaïne.....	5
Fig. 4 : Structure tridimensionnelle du site actif de la papaïne.....	7
Fig. 5 : Courbe d'étalonnage du dosage de FOLIN-LOWRY.....	23
Fig. 6 : Cinétique enzymatique en fonction du temps.....	24
Fig. 7 : Cinétique enzymatique en fonction de $[E_1]$	25
Fig. 8 : Cinétique enzymatique en fonction de $[E_2]$	25
Fig. 9 : Cinétique enzymatique en fonction de $[E_3]$	26
Fig. 10 : Evolution de la vitesse v_i en fonction de $[E]$	26
Fig. 11 : Cinétique enzymatique en fonction de T_1	27
Fig. 12 : Cinétique enzymatique en fonction de T_2	28
Fig. 13 : Cinétique enzymatique en fonction de T_3	28
Fig. 14 : Cinétique enzymatique en fonction de T_4	29
Fig. 15 : Evolution de la vitesse v_i en fonction de T	29
Fig. 16 : Cinétique enzymatique en fonction de pH_2	30
Fig. 17 : Cinétique enzymatique en fonction de pH_3	31
Fig. 18 : Cinétique enzymatique en fonction de pH_4	31
Fig. 19 : Evolution de la vitesse v_i en fonction de pH	32
Fig. 20 : Cinétique enzymatique en fonction de $[S_1]$	33
Fig. 21 : Cinétique enzymatique en fonction de $[S_2]$	34
Fig. 22 : Cinétique enzymatique en fonction de $[S_3]$	34
Fig. 23 : Cinétique enzymatique en fonction de $[S_4]$	35
Fig. 24 : Représentation hyperbolique de MICHAËLIS – MENTEN: Courbe de saturation de la papaïne par la caséine.....	36

LISTE DES FIGURES

Fig. 25 : Représentation de LINEWEAVER et BURK..... 36

LISTE DES ABREVIATIONS

Asn. : Asparagine

Asp. : Acide aspartique

Cys. : Cystéine

E.C : Enzyme Commission

E.D : Eau distillée

FOFIFA : FOibe FIkarohana ampiarina amin'ny Fandrosoana ny eny Ambanivohitra

Gln. : Glutamine

His. : Histidine

SAB : Sérum Albumine Bovine

s.d : sans date

TCA : Acide trichloracétique

UA : unité d'absorbance

GLOSSAIRE

Catalyseur : substance qui augmente la vitesse d'une réaction chimique

Déprotonation : réaction chimique au cours de laquelle un proton H^+ est retiré d'une molécule pour former sa base conjuguée.

Enzyme : catalyseur biologique permettant d'accélérer jusqu'à des milliers de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire.

Hydrolyse enzymatique : décomposition par l'eau grâce aux ions H^+ et OH^- provenant de la dissociation de l'eau catalysée par des enzymes de type hydrolase.

Nucléophile : composé chimique attiré par les espèces chargées positivement

Poche oxyanionique : chez les protéases, site de liaison sur l'enzyme de l'oxygène anionique de l'intermédiaire tétraédrique de la réaction catalytique.

Protéase / peptidase : enzyme qui brise les liaisons peptidiques des protéines

Protonation : réaction chimique au cours de laquelle un proton H^+ est ajouté à un atome, une molécule ou un ion.

Zwitterion : espèce chimique possédant des charges électriques formelles d'une unité et de signes opposés, elle possède en même temps des charges positives et négatives.

INTRODUCTION

Les enzymes constituent à la fois la classe des protéines la plus vaste mais également la plus spécialisée. Elles représentent l'instrument primaire direct de l'expression de l'action du gène [45].

Les enzymes sont utilisées comme catalyseurs de nombreuses réactions chimiques de transformation de produits alimentaires [23] mais aussi dans d'autres applications comme le traitement du textile [5], la production d'éthanol cellulosique [43] ou la restauration de la mémoire et des fonctions synaptiques chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer [34].

La connaissance des mécanismes biochimiques d'activité des enzymes est donc très importante pour le développement de ces secteurs.

Ce travail porte sur l'étude de la cinétique d'activité d'une enzyme protéolytique, la papaïne, contenue dans les feuilles de *Carica papaya linn.*, et de l'optimisation des paramètres physico-chimiques de réactions catalytiques de l'enzyme.

Le présent travail comporte 2 parties : la première partie concerne l'extraction et la purification partielle de la papaïne, la deuxième partie évoque l'optimisation des paramètres physico-chimiques de réactions catalytiques et l'étude de la cinétique enzymatique.

RESUME BIBLIOGRAPHIQUE**I- La papaïne****I-1. Généralités sur la papaïne**

La papaïne est une protéase à cystéine qui catalyse l'hydrolyse des esters, des amides des peptides, des protéines en polysaccharides et acides aminés [19].

La papaïne est une endopeptidase de la famille des peptidases C1. Elle est la mieux connue dans la classe des protéases à cystéine et la plus étudiée [31,41].

La papaïne a comme nomenclature EC 3.4.22.2, classification numérique basée sur la réaction chimique que l'enzyme catalyse, établit par « l'Enzyme Commission ». [31]

La figure 1 montre la modélisation de la structure tridimensionnelle de la papaïne. Elle indique les modes d'enroulement de la protéine dans l'espace.



Fig. 1: Structure tridimensionnelle de la papaïne [49]

I-2. Origine et rôles de la papaïne

La papaïne provient du papayer ou *Carica papaya linn.* aussi appelée *mapaza, paza, papay et voapaza* dans les différentes régions de Madagascar [3].

Le papayer, illustré par la figure 2, est une plante à latex originaire d'Amérique tropicale (Mexique) à l'allure de jeune palmier portant un bouquet de grandes feuilles lobées et de gros fruits allongés verts ou jaune orangé [11,15,33] . Elle pousse de préférence dans les régions chaudes et humides.

La papaïne aurait pour rôle physiologique de catalyser l'hydrolyse des enzymes digestives des insectes qui mangent les feuilles et les fruits du papayer [4, 23].

Toutes les parties de la plante (tige, feuilles, fruits) produisent du latex contenant de la papaïne brute, c'est-à-dire en réalité un mélange d'enzymes protéolytiques [11, 37].



Fig. 2: Jeune arbuste de papayer femelle à fruits verts [27]

II- Structure moléculaire de la papaïne

La papaïne brute est un mélange de papaïne, de chymopapaïne, de papayoprotéinase Ω. La chymopapaïne pure est une protéine dont la structure et les propriétés sont très voisines de la papaïne [40]

La papaïne est une protéine qui contient :

- 212 acides aminés pour un poids moléculaire de 23406 Daltons [3]
- Une triade catalytique de Cys, His et Asx (Asn et Asp.) dans son site actif [19]
- Une poche oxyanionique formée principalement d'hydrogène polarisé (Gln 19) [29].

Le tableau I montre la composition en acides aminés de la papaïne.

Tableau I : Composition en acides aminés de la papaïne [22]

Acides aminés	en g pour 100g de papaïne sèche
Arginine	7,6
Histidine	0,7
Lysine	5,7
Acide aspartique	12,1
Acide glutamique	13,1
Glycine	9
Alanine	5,5
Sérine	4,8
Thrénanine	3,6
Valine	8,4
Leucine	6,2
Isoleucine	5,8
Phénylalanine	3,1
Tyrosine	14
Proline	5
Tryptophane	4,7
Cystéine	5

III- Mécanisme de la catalyse enzymatique

La papaïne coupe les molécules protéiques au niveau des liaisons peptidiques (-CO — NH-) à l'intérieur des chaînes en libérant des molécules plus simples (peptides, acides aminés) [43].

III-1. Mécanisme catalytique

La figure 3 ci-dessous décrit le mécanisme de catalyse enzymatique par la papaïne et le rôle des 2 résidus Cys 25 et His 159 présents sous forme thiolate et imidazolium dans le site actif de l'enzyme dans le processus de dégradation.

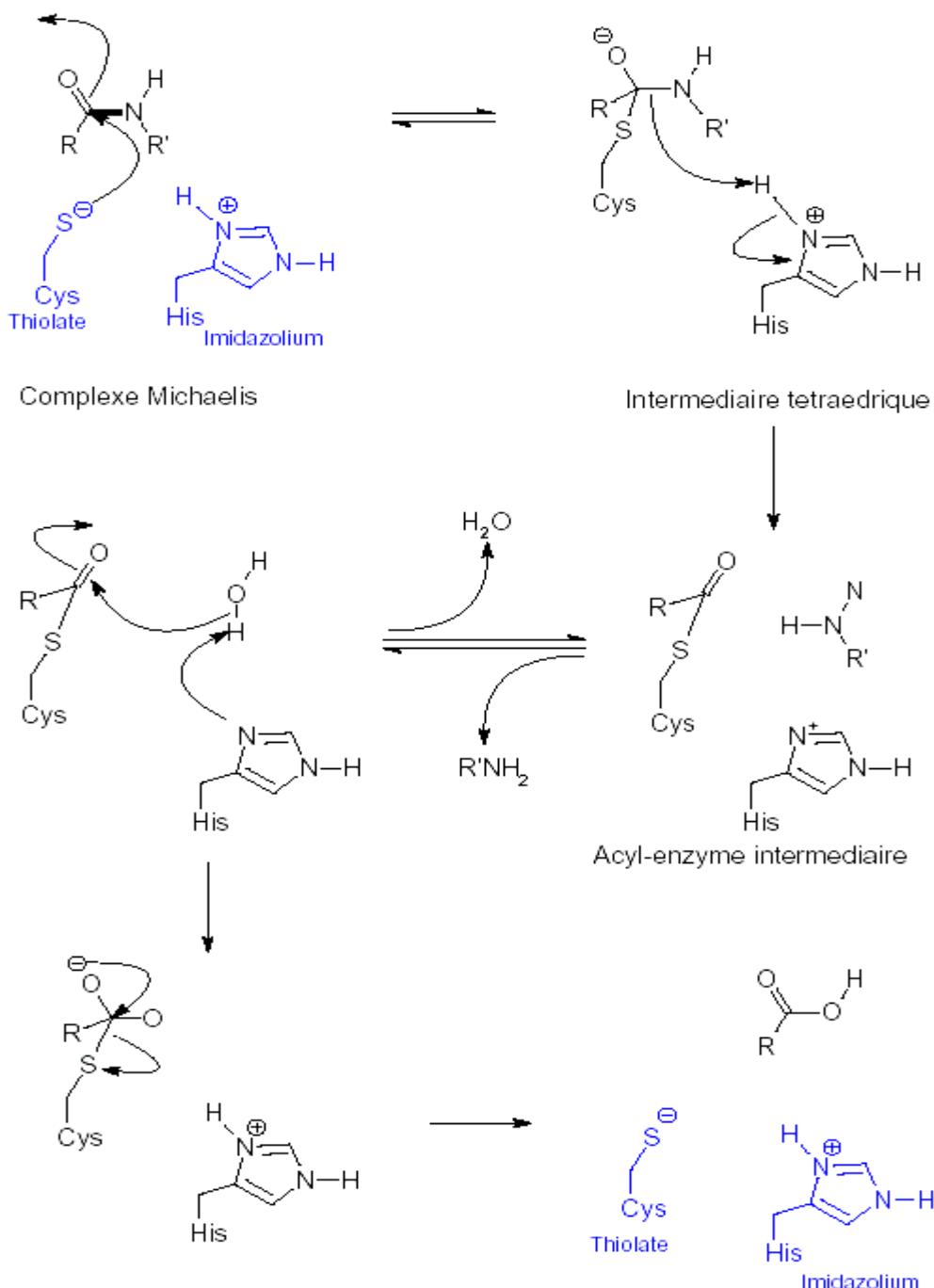


Fig. 3: mécanisme de catalyse enzymatique par la papaïne [19]

III-2. Activité catalytique au niveau du site actif [14, 19, 29, 30, 47]

RESUME BIBLIOGRAPHIQUE

La papaïne catalyse l'hydrolyse des protéines à l'aide d'une paire d'ions présente dans son site actif.

Cette paire d'ions comprend un groupe thiol de cystéine et un imidazole d'histidine. Elle existe sous forme thiolate et imidazolium, l'anion thiolate réagit en tant que nucléophile et l'ion imidazolium en tant que acide.

La paire d'ions doit être l'une sous forme acide et l'autre sous forme basique dans le site actif pour piéger l'intermédiaire tétraédrique formé au cours de l'étape d'acylation (étape de formation de l'acyl-enzyme décrit dans la figure 3) Cet intermédiaire tétraédrique est stabilisé par la poche anionique (présentant le Gln 19) et par le résidu Asp. 158 qui aide à l'orientation de la boucle imidazole de His 159 lors de la déprotonation. La charge et les liaisons hydrogènes de l'Asp 158 contribuent à l'activité intrinsèque de la papaïne.

La figure 4 ci-dessous montre la modélisation moléculaire de ces résidus Histidine et Cystéine présents au niveau du site actif de la papaïne.

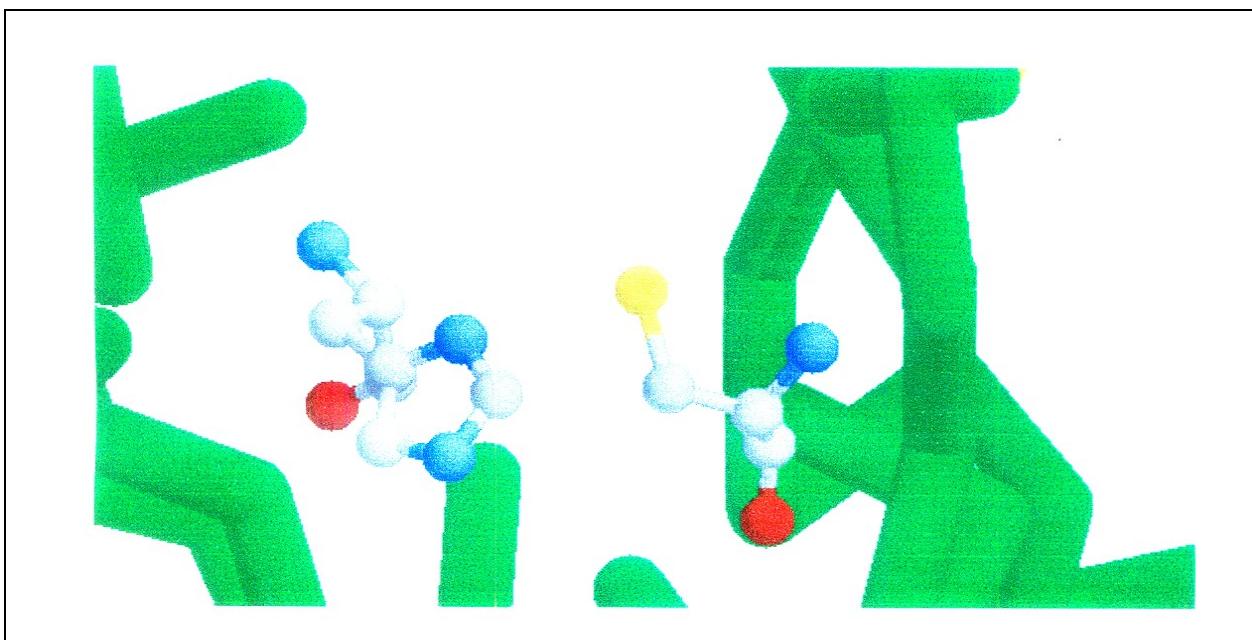


Fig. 4: Structure tridimensionnelle du site actif de la Papaïne : His 159 et Cys 25 [19]

III- 3. Facteurs influençant l'activité catalytique [20, 24, 35]

L'efficacité catalytique de la papaïne est influencée par plusieurs facteurs physico-chimiques:

- La température : l'optimum d'activité catalytique de la papaïne est à T=65°C, l'enzyme purifié perd son activité à des températures élevées (> 70°C), en solution son activité est détruite après 30 min à 82,5°C.
- La variation du pH : à bas pH, la protonation de l'anion thiolate diminue sa nucléophilie ; à pH élevé, la déprotonation de l'imidazolium diminue la concentration de l'enzyme sous forme active. L'enzyme est efficace à pH 6-7.
- Les agents oxydants inactivent les groupements thiols de la protéine et dénaturent l'enzyme.

IV- Utilisations de la papaïne

La papaïne est utilisée en pharmaceutique pour ses propriétés anti-inflammatoires, dans l'industrie textile comme agent nettoyant ou comme détergent, dans l'industrie alimentaire notamment pour l'attendrissement de la viande [15, 23, 34, 38,39]

La papaïne est aussi utilisée :

- dans la production de concentrés solubles de protéines de poisson [13]
- dans la réduction des hernies discales [12]
- comme produit à potentiel antusalissure [27].
- pour l'amélioration de la stabilité colloïdale de la bière [23].

MATERIELS ET METHODES

I- Récolte d'échantillons de feuilles de papayer.

La récolte des échantillons de feuilles de papayer a été effectuée au sein du FOFIFA à Ambatobe Antananarivo.

La collecte se fait tôt le matin pour avoir des feuilles fraîches avec plus de pourcentage d'activité enzymatique donc d'enzymes protéolytiques.

Les échantillons récoltés sont conservés dans une glacière, dans de la glace fondante, pour les maintenir à 0°C pendant le transport.

Les feuilles de papayer ont été conservées au congélateur à une température de -18°C immédiatement après la collecte.

La qualité morphologique des feuilles est déterminée pour chaque prélèvement.

II- Purification de la papaïne [25]

La purification de la papaïne est un processus qui se déroule en plusieurs étapes :

- l'extraction initiale
- la précipitation différentielle
- la dialyse
- la chromatographie
- le tamisage moléculaire

Nous avons effectué notre purification jusqu'au niveau de la dialyse pour avoir une purification partielle de la papaïne.

II-1. Extraction à froid

La technique d'extraction utilisant l'action mécanique est utilisée pour briser les cellules de feuilles de papayer et extraire l'enzyme recherché.

Principe :

Les complexes enzymatiques perdent leur activité par oxydation [21]. Par conséquent, la température d'extraction doit être aussi basse que possible pour limiter l'oxydation des groupements sulfhydryles des enzymes [26].

Méthode :

Le broyage des échantillons de feuille de papayer se déroule à température de 0°C dans un bac de glace fondante

Les matériels de broyage utilisés sont le mortier et le pilon qui sont préalablement refroidis au congélateur avant leur utilisation.

Le tampon d'extraction utilisé est le tampon phosphate - citrate pour maintenir le pH à un niveau adéquat [8]

La macération du mélange tampon - broyat dure 2 heures à 4°C.

L'homogénat est ensuite filtré par passage sur 4 épaisseurs de gaze, les débris de feuilles non broyées sont alors éliminés.

Le filtrat obtenu est clarifié par centrifugation pendant 30 minutes à 16000G pour éliminer les grosses particules à l'aide d'une centrifugeuse de marque BECKMAN J 21 B.

Le surnageant est recueilli et conservé au congélateur à -18°C par fractions de 5ml pour éviter les cycles de congélations décongélations répétées [8].

II-2. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

C'est une des premières étapes de purification proprement dite. Elle est généralement employée pour séparer une protéine d'intérêt d'autres protéines contaminantes dans une solution contenant un mélange complexe de protéines.

Principe :

Les conditions ioniques ou de pH qui rendent les protéines insolubles varient pour chaque espèce de protéines. A un taux donné de saturation en électrolyte (sulfate d'ammonium dans notre cas), la protéine d'intérêt précipite. Remise dans un tampon adéquat la protéine reprend sa forme native [9]

Méthode :

La solution de protéines est placée dans un bain de glace fondante sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique, le sulfate d'ammonium est ajouté par petite quantité jusqu'à 25% de saturation en sel

La quantité de sel à ajouter à un certain volume de solution protéique à une température définie (0°C dans notre cas) est établie à l'aide du tableau de saturation en sulfate d'ammonium [9]

L'agitation est maintenue 30 minutes après addition du sulfate d'ammonium.

La solution est centrifugée à 5000 G pendant 30 minutes

Le surnageant obtenu est remis en solution et la concentration en sulfate d'ammonium de la solution est ajusté à 50%. La manipulation est recommandée au début

La même opération est effectuée à 75% de saturation en sulfate d'ammonium.

Le culot contenant les protéines est récupéré et son absorbance est lue à 280 nm avec un spectrophotomètre de marque SECOMAM. En effet, les protéines sont analysées par spectrophotométrie d'absorption UV-visible, elles ont des bandes d'absorption dans la région de l'UV proche c'est-à-dire de 200 à 400 nm. L'absorbance à la longueur d'onde caractéristique de 280 nm est communément utilisée pour estimer la concentration totale de protéines dans un échantillon. L'absorbance est proportionnelle à la concentration en protéines [1].

II-3. Dialyse

La dialyse est utilisée pour débarrasser les protéines des sels utilisés lors de la précipitation.

Principe :

La membrane de dialyse est une membrane poreuse ne laissant passer que les ions et les petites molécules (<13000 Da). Les sels équilibrent leur concentration de part et d'autre de la membrane. En utilisant un volume de tampon de dialyse beaucoup plus grand que celui de la solution protéique, on changera rapidement la teneur en sels de celle-ci.

Méthode :

Le boudin de dialyse est préalablement bouilli pendant 15min dans de l'E.D avant utilisation. L'opération est répétée 3 fois. Le boudin est ensuite macéré à 4°C pendant 2 heures

$$\text{Volume du tampon} = \text{Volume de l'extrait à dialyser} \times 100$$

Les dialysats obtenus sont concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif de type ROTAVAPOR BÜCHI sous vide partiel à 40°C pour retrouver leur volume initial.

III- Test d'activité [37]

La mesure de l'activité catalytique de la fraction purifiée des feuilles de papayer s'effectue à l'aide du test de JENTSH et NAKAYAMA – AMAGASE modifié.

Principe :

Les enzymes protéolytiques catalysent la réaction de dégradation des protéines dans des conditions optimum de réaction. Cette catalyse des protéines provoque une variation de l'unité d'absorbance *UA*.

Méthode :

Après avoir préincubé 1,8 ml de caséine 0,3% (Substrat) dans un tampon phosphate citrate dans un bain thermostaté agité de type GYROTORY WATER BATH BRUNSWICK Model G76 à 40°C pendant 30 minutes, on ajoute 0,2 ml de la fraction enzymatique.

L'incubation dure 4 heures à 40°C et pH = 6.

La réaction est arrêtée par addition de 2 ml TCA 5%.

30 minutes après addition du TCA, les précipités dus à son action sont séparés par centrifugation pendant 15 minutes à 5000 G.

La lecture de l'absorbance du surnageant contenant les acides aminés et les peptides issus de la protéolyse est ensuite effectué à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de marque SECOMAM.

IV- Le dosage [26]

Les protéines et les enzymes protéolytiques sont dosés après chaque étape de la purification par 2 méthodes :

- Méthode par évaporation à sec
- Méthode colorimétrique de FOLIN-LOWRY

La mesure de l'activité enzymatique est également nécessaire pour le suivi du bon déroulement de la purification.

IV-1. Méthode par évaporation à sec

Le poids sec de l'extrait purifié est obtenu après évaporation du tampon d'extraction de la solution. La concentration en enzyme est ensuite tirée à partir du poids sec obtenu en le rapportant au volume initial de l'extrait.

$$\text{Concentration en enzyme} = \frac{\text{Poids sec} \times \text{Volume de l'extrait enzymatique}}{\text{Volume initial de l'extrait enzymatique}}$$

Concentration en enzyme en g/l

Poids sec en g.

Volume de l'extrait enzymatique en l.

Volume initial de l'extrait enzymatique en l.

Méthode :

L'évaporation est obtenue à l'aide d'un évaporateur rotatif de type ROTAVAPOR BUCHI sous vide partiel à 40°C pour ne pas dénaturer les protéines.

La solution à évaporer est mise dans un ballon préalablement pesé à l'aide d'une balance de précision SARTORIUS avant manipulation.

L'opération s'effectue jusqu'à évaporation totale du tampon.

Le poids sec est obtenu par :

$$\text{Poids sec (g)} = \text{Poids du ballon après évaporation (g)} - \text{Poids du ballon (g)}$$

IV-2. Méthode de dosage de FOLIN LOWRY [26]

La concentration en protéines est déterminée par la méthode colorimétrique de FOLIN-LOWRY.

Principe :

La méthode est basée sur l'association de 2 colorations :

- La coloration due au réactif de FOLIN - CIOCALTEU met en évidence les phénols, caractéristiques des acides aminés aromatiques.
- Coloration violette de la solution de protéines en milieu alcalin en présence de sulfate de cuivre (CuSO_4) mettant en évidence les liaisons peptidiques.

L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

Mode opératoire :

X ml de solution protéique est introduite dans des tubes à essai contenant:

- Solution de NaCl à 9 g/l (1 - X) ml
- Réactif cuproalcalin 5 ml.
- Après 5 minutes, 0,5 ml de réactif de FOLIN – CIOLALTEU dilué au $\frac{1}{2}$ est ajouté à la solution.

MATERIELS ET METHODES

- Après attente de 30 minutes, l'absorbance de la solution est lue à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de marque SECOMAN
- La valeur de l'absorbance obtenu est ensuite projetée sur la courbe étalon pour déterminer la concentration en protéines.
- La courbe étalon est tracée à partir d'une gamme étalon de sérum albumine bovine (SAB) à 0,2 mg/ml à des concentrations de 0 à 100 µg/ml

Le tableau II établit la gamme étalon de Sérum Albumine Bovine

Tableau II : Etalonnage de SAB

N° tube	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[SAB] µ/ml	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Volume de E.D	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0
Volume de SAB (µl)	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Solution C (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Agitation et attente de 10 minutes											
Réactif E (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Agitation et repos de 10 minutes à l'obscurité											

La lecture de l'absorbance est faite à 700 nm dans une cuve en verre de 1 cm de trajet optique dans un spectrophotomètre de marque SECOMAM

IV-3. Activité enzymatique et activité spécifique [44,45].

L'activité enzymatique est mesurée pour estimer la quantité de l'activité catalytique d'une préparation ou d'un échantillon d'enzyme.

L'activité spécifique est une mesure quantitative de la pureté de la préparation.

Méthode :

MATERIELS ET METHODES

L'unité d'activité enzymatique est définie ici comme la quantité d'enzyme qui provoque une variation d'absorbance de 0,001 par minute dans les conditions standard de réaction. L'activité enzymatique est exprimée en Unités.ml⁻¹.

L'activité spécifique est définie comme étant le nombre d'unité enzymatique, rapporté au poids de protéines exprimé en mg. L'activité spécifique est exprimée en U.mg⁻¹

L'activité enzymatique et l'activité spécifique sont calculées à partir des formules suivantes :

$$\text{Activité enzymatique (ml.min}^{-1}\text{)} = \frac{\text{volume d'enzyme (ml)}}{\Delta uA \times \Delta t (\text{min})} \times 0,001$$

Avec : Δt = temps d'incubation

ΔuA = variation d'absorbance

$$\text{Activité spécifique (U.mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{activité enzymatique (U.ml}^{-1}\text{)}}{\text{poids de protéines (mg)}}$$

IV-4. Rendement d'activité et taux de purification

Le rendement d'activité et le taux de purification mesurent la pureté de l'extrait obtenu.

Méthode :

Le rendement d'activité et le taux de purification sont calculés à partir des formules suivantes :

$$R = \frac{\text{activité enzymatique totale}}{\text{activité enzymatique avant la première étape de purification}} \times 100$$

R = Rendement d'activité en %

$$T = \frac{\text{activité spécifique}}{\text{activité spécifique avant la première étape de purification}}$$

T = Taux de purification

IV-5. Procédés de purification

MATERIELS ET METHODES

Le procédé de purification est suivi à l'aide de l'établissement d'un tableau de purification.

Méthode :

A chaque étape de la purification, l'activité catalytique de l'extrait enzymatique est mesurée et notée dans un tableau.

V- Etude de la cinétique enzymatique [2, 7, 17, 22, 41, 44,45]

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biologiques en étudiant leur vitesse et les flux métaboliques. En partant des enzymes isolés et en allant vers les systèmes métaboliques organisés et intégrés, la cinétique enzymatique permet de décrire quantitativement les propriétés catalytiques des enzymes et les mécanismes de leur régulation [6,47]

V-1 Paramètres physico-chimiques influençant la cinétique enzymatique

L'étude de la cinétique enzymatique de la papaïne s'effectue par l'identification et l'optimisation des paramètres physico-chimiques influençant la vitesse de réaction et la détermination des constantes cinétiques.

Les paramètres influençant la vitesse de la réaction sont :

- La concentration en enzyme
- La concentration en substrat initial
- La température
- Le pH
- Le temps d'incubation

Principe :

Le procédé consiste à faire varier le paramètre étudié tout en maintenant constante les valeurs des autres paramètres.

Méthode

Les réactions se déroulent dans un bain thermostaté agité de marque GYROTORY WATER BATH BRUNSWICK à une vitesse d'agitation de 150 rpm. Des tubes témoins sont établis pour chaque paramètre étudié.

MATERIELS ET METHODES

Les paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction du temps sont résumés dans le tableau III.

Tableau III : Paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction du temps

Temps d'incubation (h)	0,16	0,5	1	2	4	6
Concentration en papaïne purifiée (mg.ml ⁻¹)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Concentration en caséine (%)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Température (°C)	40	40	40	40	40	40
pH	7	7	7	7	7	7

La réaction catalytique dure 6 heures. Des prélèvements sont effectués à des intervalles de temps réguliers (0,16 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 et 6 heures). Leur absorbance est mesuré à une longueur d'onde de 280 nm avec un spectrophotomètre de marque SECOMAN. La courbe A=f(t) est ensuite tracée

Le tableau IV résume les paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction des concentrations en papaïne [E₁], [E₂] et [E₃].

Tableau IV : Paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction de la concentration en papaïne

	[E ₁]	[E ₂]	[E ₃]
Concentration en papaïne purifiée (mg.ml ⁻¹)	0,8	1,6	2,4
Temps d'incubation (h)	6	6	6
Concentration en caséine (%)	0,3	0,3	0,3
Température (°C)	40	40	40
pH	7	7	7

La réaction catalytique est suivie par la lecture de l'absorbance à 280 nm. La courbe A=f(t) et la courbe de la vitesse en fonction de la concentration en papaïne sont ensuite tracées.

MATERIELS ET METHODES

Les paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction des températures T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , et T_6 sont résumés dans le tableau V.

Tableau V : Paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction de la température

	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6
Température ($^{\circ}\text{C}$)	10	20	30	40	50	60
Concentration en caséine %	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Concentration en papaïne purifiée (mg.ml^{-1})	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Temps d'incubation (h)	6	6	6	6	6	6
pH	7	7	7	7	7	7

La réaction est arrêtée après 6 h d'incubation. La lecture de l'absorbance se fait à 280 nm. La courbe $A=f(t)$ est tracée pour les valeurs de température T_2 , T_3 , T_4 , T_5 . La courbe de vitesse en fonction de la température est ensuite tracée.

Le tableau VI résume les paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction de pH_1 , pH_2 , pH_3 , pH_4 , et pH_5 .

Tableau IV: Paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction du pH

	pH_1	pH_2	pH_3	pH_4	pH_5
pH	5	6	7	8	9
Concentration en papaïne purifiée (mg.ml^{-1})	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Temps d'incubation (h)	6	6	6	6	6
Concentration en caséine (%)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Température ($^{\circ}\text{C}$)	40	40	40	40	40

L'absorbance des prélèvements est lue à 280 nm par un spectrophotomètre, la réaction catalytique dure 6 heures. La courbe $A=f(t)$ est tracée pour les valeurs de pH_2 , pH_3 , pH_4 . La courbe de la vitesse initiale de la réaction en fonction du pH est ensuite tracée.

Le tableau VII résume les paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction des concentrations en caséine $[S_1]$, $[S_2]$, $[S_3]$, $[S_4]$.

Tableau VII : Résumé des paramètres de réaction de catalyse enzymatique en fonction de la concentration en caséine

[S_1]	[S_2]	[S_3]	[S_4]
-----------	-----------	-----------	-----------

MATERIELS ET METHODES

Concentration en caséine (%)	0,1	0,3	0,9	3
Temps d'incubation (h)	6	6	6	6
Concentration en papaïne purifiée (mg.ml^{-1})	1,6	1,6	1,6	1,6
Température ($^{\circ}\text{C}$)	40	40	40	40
pH	7	7	7	7

La lecture de l'absorbance se fait à la longueur d'onde de 280 nm avec un spectrophotomètre. La réaction catalytique dure 6 heures. La courbe $A=f(t)$ est ensuite tracée pour chaque valeur de concentration initiale en caséine. La courbe de saturation de la papaïne par la caséine ou représentation hyperbolique de MICHAËLIS - MENTEN est également tracée.

V-2 Détermination des constantes cinétiques [44]

La connaissance des valeurs des différents paramètres permet de déterminer les constantes cinétiques

Les constantes cinétiques mesurées sont :

- V_M : vitesse maximale initiale atteinte pour $[E_0]$
- K_M : constante de MICHAËLIS mesure l'affinité de l'enzyme pour le substrat
- K_{cat} : constante catalytique mesure l'efficacité de la catalyse du substrat par l'enzyme, K_{cat} représente le turn-over, c'est à dire le nombre de réaction catalysées par l'enzyme par unité de temps.
- r_{sp} : constante de spécificité pour le substrat reflète la spécificité globale d'une enzyme vis-à-vis d'un substrat, montre à quel point elle lie efficacement le substrat et à quelle vitesse elle en catalyse la conversion.

Principe :

Les constantes cinétiques sont déterminées à partir de :

- la mesure de la vitesse initiale
- la représentation hyperbolique de MICHAËLIS – MENTEN
- la représentation de LINEWEAVER-BURK

La détermination des constantes catalytiques se fait dans des conditions particulières :

- Concentration en produit $[P] = 0$
- Concentration en substrat initial $[S_0]$ largement supérieure à la concentration en enzyme $[E_0]$ ($[S_0] \gg [E_0]$)

MATERIELS ET METHODES

Nous supposerons que les paramètres (température, pH, force ionique,...) sont identiques pour un ensemble de mesure concernant une enzyme et un substrat particulier.

Méthode :

- La vitesse initiale est obtenue en traçant la courbe de concentration en produit formé [P] en fonction du temps (courbe $[P] = f(t)$). La vitesse initiale est la tangente $\frac{d[P]}{dt}$ à la courbe $[P] = f(t)$ au point $t = 0$. La vitesse initiale s'exprime en concentration par unité de temps (ici en $\text{mg.ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
- V_M et K_M sont obtenues à partir de la représentation hyperbolique de MICHAËLIS et MENTEN. La représentation de LINEWEAVER et BURK donne une estimation plus précise des valeurs de V_M et K_M
- K_M est la valeur $[S_0]$ pour $v_i = \frac{V_M}{2}$
- K_M est obtenue par projection de la valeur de $v = \frac{V_M}{2}$ sur l'axe abscisse
- V_M est l'asymptote horizontale de l'hyperbole pour les grandes valeurs de $[S_0]$.
- V_M et K_M sont déterminés à partir de la représentation de LINEWEAVER et

BURK $\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{[E_0]}$ par l'équation inverse de l'équation de MICHAËLIS :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_M} x \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V_M}$$

C'est une équation de type $y = ax + b$. En portant les valeurs de $\frac{1}{v_0}$ on obtient une droite

qui coupe l'axe des ordonnées à la valeur $\frac{1}{V_M}$ et l'axe des abscisses à la valeur $-\frac{1}{K_M}$.

- K_{cat} est obtenue par $K_{cat} = \frac{K_M}{[S_0]}$
- La constante de spécificité est obtenue par $r_{SP} = \frac{K_{cat}}{k_M}$

RESULTATS ET DISCUSSIONS**I- Les caractères des échantillons de feuilles de Papayer**

Les conditions de récoltes des feuilles de papayer sont résumées dans le tableau VIII. Les caractères morphologiques des feuilles ainsi que le rendement de production en enzymes y sont également précisés.

Tableau VIII : Conditions de collecte des feuilles de papayer

Date	11-08-06
Lieu	FOFIFA Ambatobe
Heure	06 : 10
Nombre de feuilles	3
Poids des feuilles (g)	369
Quantité d'enzyme obtenue (g)	0,59
Rendement de production en papaïne (%)	0,15
Qualités morphologiques	++
Observations	Plante mâle Pas de maladies Feuilles jeunes et vertes

- : Mauvaise qualité

+ : Qualité moyenne

++ : Bonne qualité

Discussion :

Les feuilles de papayer contiennent 0,15% en poids de papaïne. En comparaison, le latex frais obtenu à partir de l'incision de fruits verts de papayer contient 12% en poids de papaïne [39]. Ces résultats montrent que la papaïne est présente en quantité infime dans les feuilles de papayer.

II- Purification

II-1 Traitement au sulfate d'ammonium

Les résultats du traitement au sulfate d'ammonium de l'extrait brut de feuilles de papayer sont récapitulés dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats de la réaction de saturation en sulfate d'ammonium

Tube N°	Concentration en sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)	% de saturation en sulfate d'ammonium	UA (280nm)	Précipitation
1	0	0	0,123	-
2	136	25	0,168	+
3	295	50	0,232	++
4	483	75	0,035	-

- : pas de précipitation

+ : précipitation

++ : beaucoup de précipitation

Discussion :

Le tableau IX montre une apparition de précipité à 25% de saturation en sulfate d'ammonium. La précipitation augmente progressivement avec le pourcentage de saturation en $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, elle est évidente à partir de 50% de saturation (295g.l^{-1}) en $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ et diminue à 75% de saturation en sulfate d'ammonium. Ces résultats montrent que la plupart des protéines présentes sont précipitées à 50% de saturation en sulfate d'ammonium et à 75% il n'y a plus de protéines précipitables. Après mesure de l'absorbance des solutions à 280 nm, la solution à 50% de saturation en sulfate d'ammonium présente la valeur de UA la plus élevée. Ce qui permet de dire que la probabilité de trouver la papaïne dans la solution N°3 est la plus élevée. La solution N°3 est donc choisie pour la suite des étapes de purification de la papaïne.

Le phénomène de précipitation apparu est appelé phénomène de Salting-out, la concentration en sulfate d'ammonium est élevée et prive les protéines des molécules d'eau qui l'hydratent ce qui a pour effet leur précipitation [26].

Le sulfate d'ammonium est le sel qui nous avons utilisé pour précipiter les protéines car :

- il ne dénature pas les protéines

RESULTATS ET DISCUSSIONS

- sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution
- il ne coûte pas cher

II-2 Tableau de purification

Le tableau X récapitule le suivi du processus de purification de la papaïne.

Tableau X : Récapitulatif du suivi de la purification

Etape de purification	Concentration en Protéines (mg.ml ⁻¹)	Activité enzymatique (ml.min ⁻¹)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)	Rendement d'activité %	Taux de purification
Extrait brut	8	0,41	0,051	100	1
Extrait partiellement purifié	1,6	0,29	0,18	69	3,5

Discussion :

Les calculs sont faits sur la base des résultats de dosage des protéines par la méthode colorimétrique de FOLIN-LOWRY.

Le tableau X ci-dessus rend compte des rendements obtenus au cours du procédé de purification et montre que l'extrait enzymatique est partiellement débarrassé de protéines contaminantes car :

- Il y a augmentation de l'activité spécifique de 28% au cours du processus de purification
- Il y a augmentation du taux de purification

La méthode de purification est peu spécifique mais permet de se débarrasser des différentes grosses molécules contaminantes et permet de traiter de gros volume.

Le tableau X montre qu'il n'y a pas eu disparition de l'activité enzymatique grâce à :

- L'utilisation de solution tampon phosphate-citrate ralentissant le processus de dénaturation de la papaïne [8] et maintenant le pH du milieu élevé (pH 6-8) pour le protéger des enzymes lysosomiques qui sont actifs à pH acide.
- La concentration et manipulation à basse température (0° C) et en petite fraction protégeant la papaïne de la dégradation et évitant la répétition de cycle de congélation et décongélation diminuent le risque de dénaturation.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Le tableau X montre une baisse de 31% du rendement catalytique, ceci peut s'expliquer par des réactions d'autolyse de l'enzyme et des réactions d'oxydation survenues lors des étapes de purification et de conservation de l'extrait enzymatique [24].

III- Courbe étalon

La courbe d'étalonnage du dosage de FOLIN-LOWRY que nous avons obtenu est rectiligne, elle est représentée sur la figure 5.

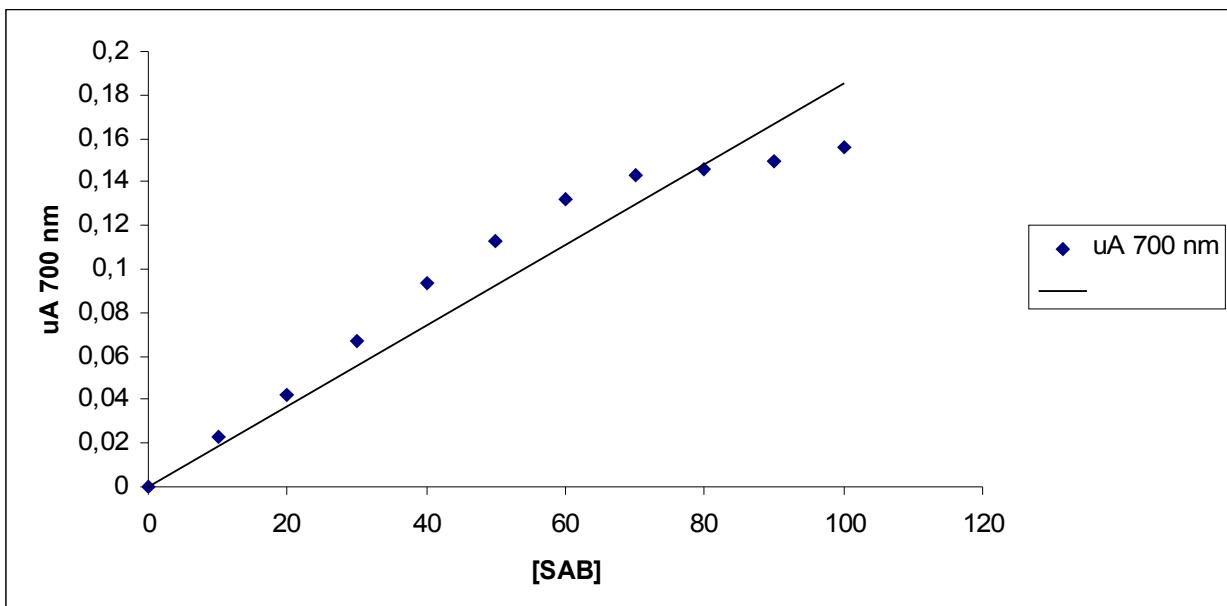


Fig. 5 : Courbe d'étalonnage du dosage de FOLIN – LOWRY

IV- Effets des différents paramètres physico-chimiques sur la cinétique de la réaction enzymatique

IV.-1. Cinétique enzymatique en fonction du temps

RESULTATS ET DISCUSSIONS

La courbe de la cinétique enzymatique de la papaïne en fonction du temps d'incubation est représenté sur la figure 6.

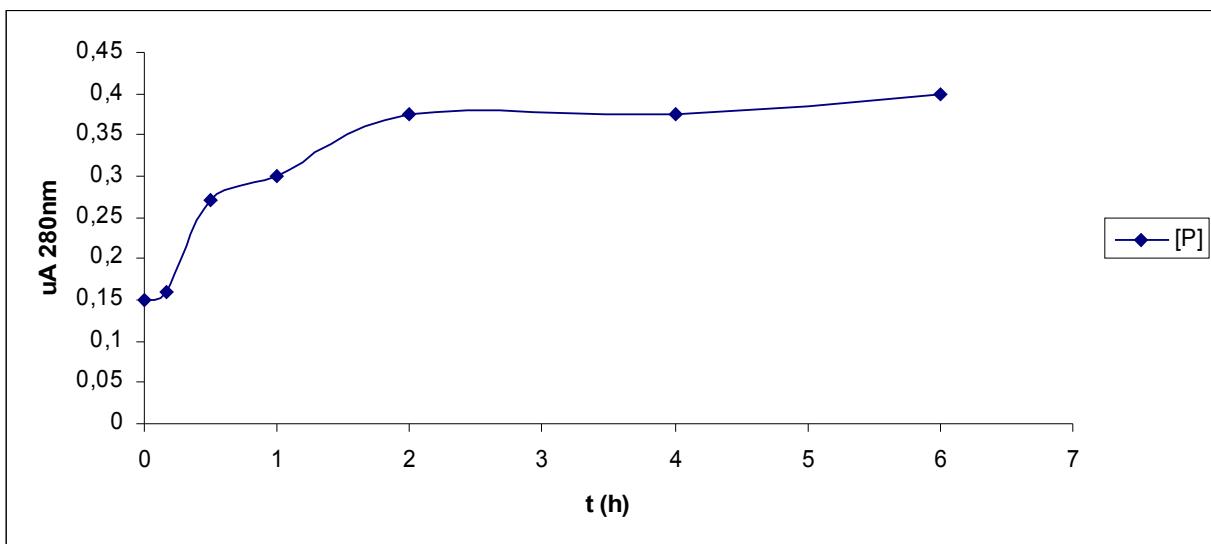


Fig. 6 : Cinétique enzymatique en fonction du temps à température T=40°C, pH =7 et vitesse d'agitation 150 rpm.

Discussion :

- La phase exponentielle dure 30 minutes
- La concentration en produits formés devient stable à partir de 2 heures de temps d'incubation.

La tangente $\frac{d[P]}{dt}$ à la courbe $[P] = f(t)$ donne une vitesse initiale de la réaction enzymatique $v_i = 0,12 \text{ UA.h}^{-1}$ ou $0,057 \text{ mg.ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

IV-2. Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en papaïne

Les figures 7, 8 et 9 représentent respectivement les courbes des cinétiques enzymatiques en fonction des concentrations en papaïne $[E_1]$, $[E_2]$, $[E_3]$ tandis que la figure 10

RESULTATS ET DISCUSSIONS

rend compte de l'évolution de la vitesse initiale v_i de la réaction catalytique en fonction de la concentration en papaïne [E].

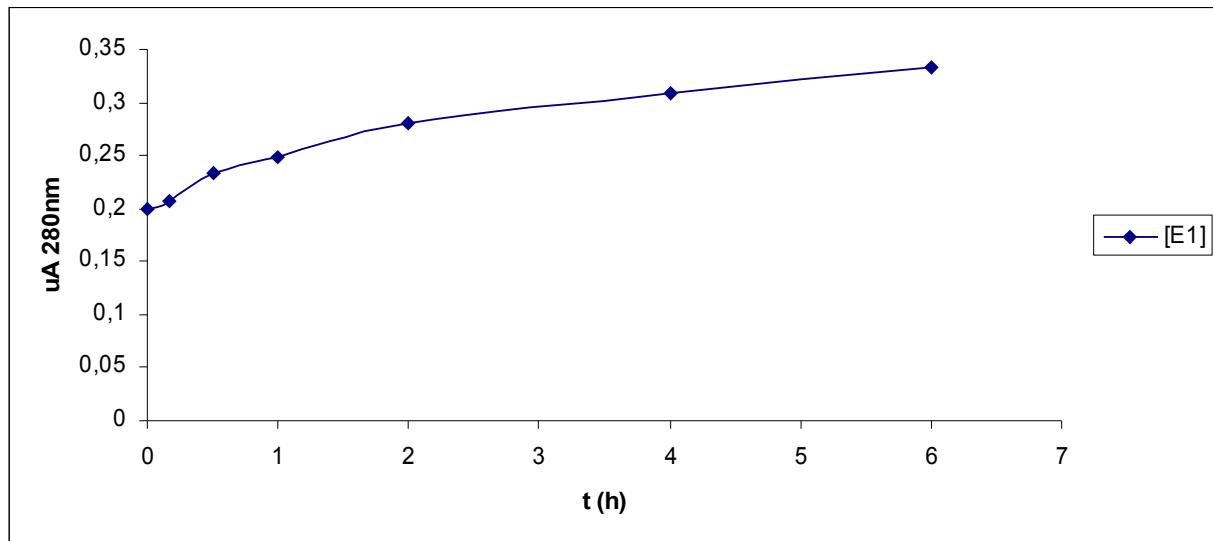


Fig.7 : Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en papaïne $[E_1] = 0,8 \text{ mg.ml}^{-1}$
température $T=40^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d'agitation de 150rpm

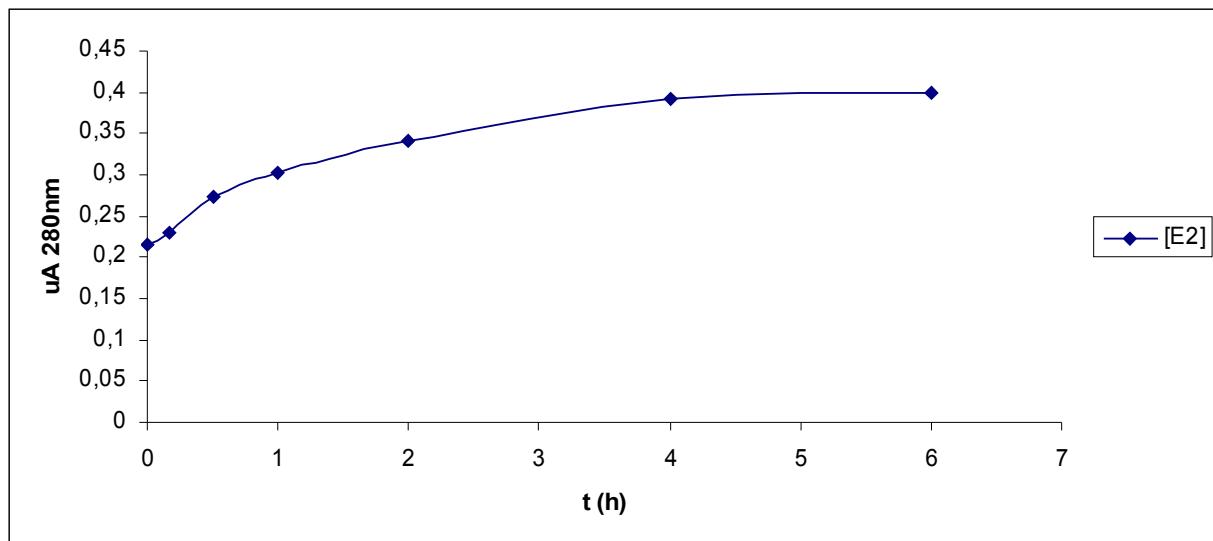


Fig. 8: Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en papaïne $[E_2] = 1,6 \text{ mg. ml}^{-1}$
température $T=40^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d'agitation de 150rpm

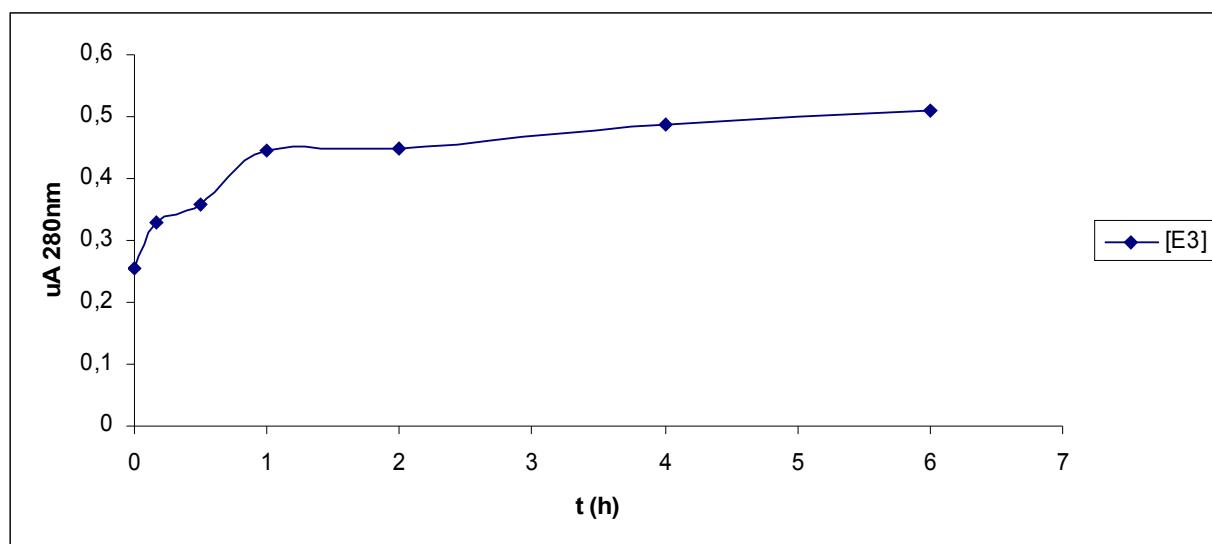


Fig. 9 : Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en papaïne $[E_3] = 2,4 \text{ mg. ml}^{-1}$ température $T=40^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d’agitation de 150rpm

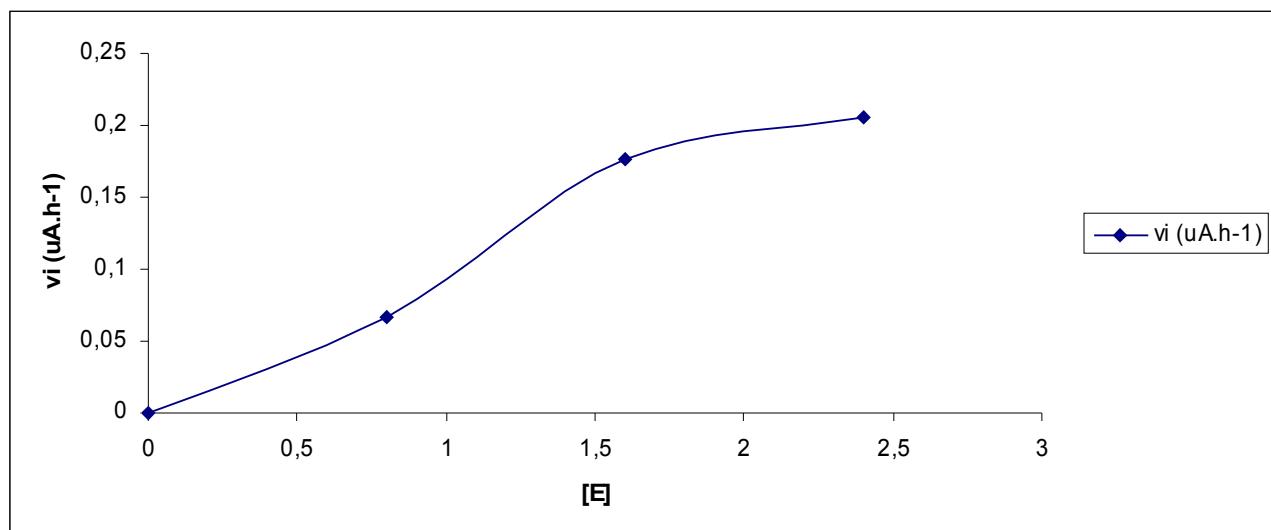


Fig. 10 : Evolution de la vitesse initiale v_i de la réaction catalytique en fonction de la concentration en papaïne $[E]$, à la température $T=40^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7$, $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d’agitation de 150rpm

Discussion

Pour chaque concentration en enzyme on note les faits suivants :

- la production en $[P]$ est exponentielle durant les 30 premières minutes d’incubation
- après 1 heure, la concentration en produits formés $[P]$ tend à devenir stable jusqu’à rester constante après 4 heures d’incubation.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

- La vitesse initiale de la réaction est proportionnelle à la concentration en enzymes
- La phase de latence est absente

Les résultats montrent que :

- La concentration en enzyme n'est pas un facteur limitant de la réaction et sa concentration n'affecte pas la cinétique enzymatique.
- Il y a affinité entre l'enzyme et le substrat (Papaïne- caséine) par l'absence de phase de latence

IV-3. Cinétique enzymatique en fonction de la température

Les figures 11, 12, 13 et 14 représentent respectivement les courbes des cinétiques enzymatiques en fonction des températures T_1 , T_2 , T_3 , T_4 . L'évolution de la vitesse initiale v_i en fonction de la température est ensuite représentée sur la figure 15.

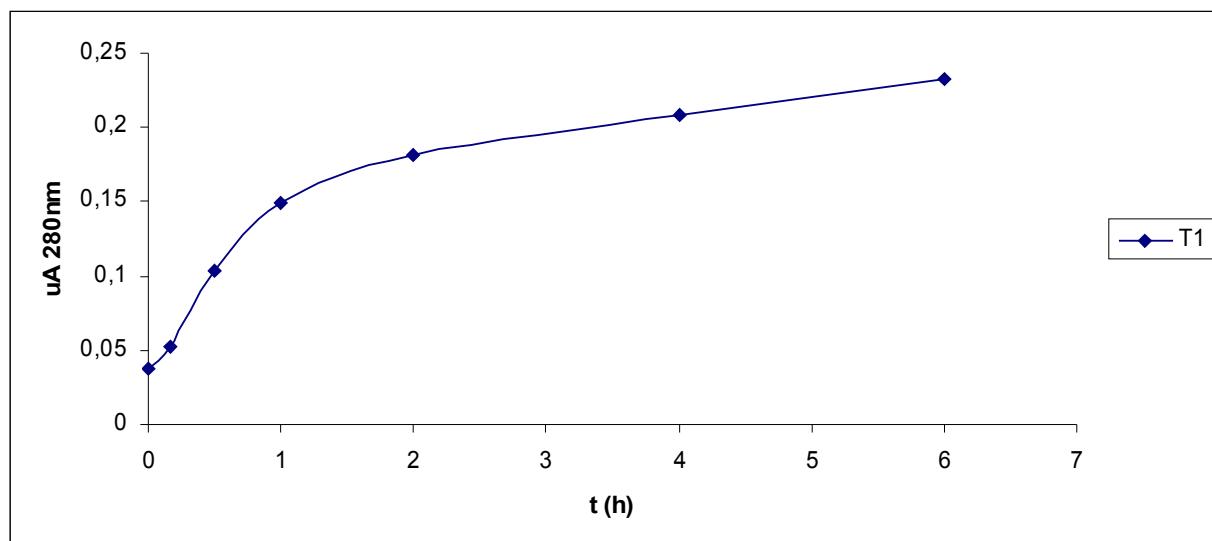


Fig. 11 : Cinétique enzymatique en fonction de la température $T_1 = 20^\circ\text{C}$ à $\text{pH} = 7$ $[\text{E}] = 1,6 \text{ mg.ml}^{-1}$, $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d'agitation de 150rpm.

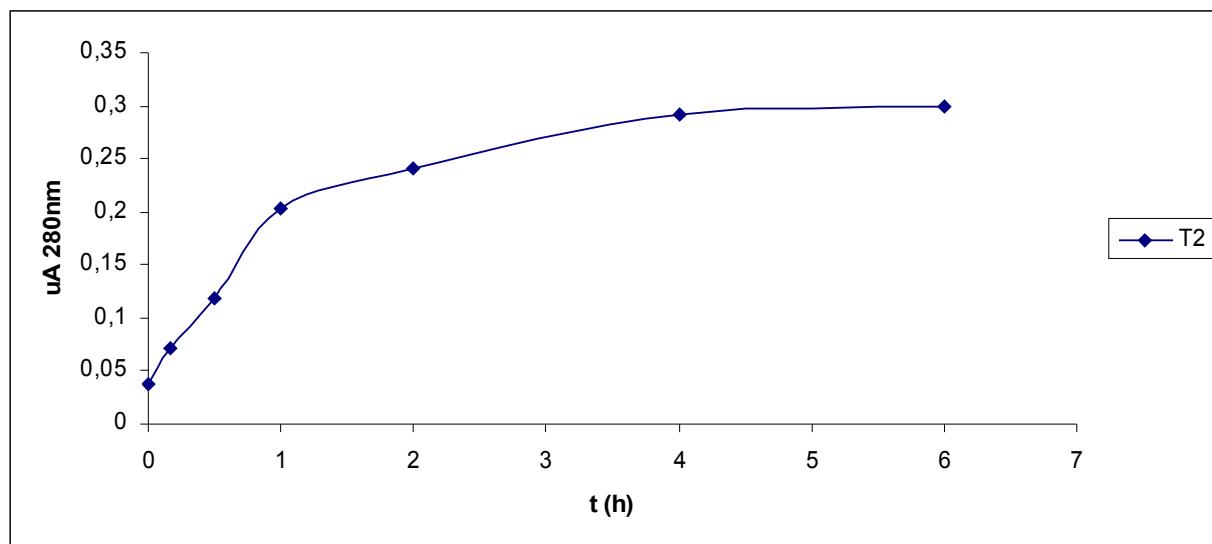


Fig. 12 : Cinétique enzymatique en fonction de la température $T_2 = 30^\circ\text{C}$ à $\text{pH} = 7$ $[\text{E}] = 1,6 \text{ mg.ml}^{-1}$, $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d’agitation de 150 rpm.

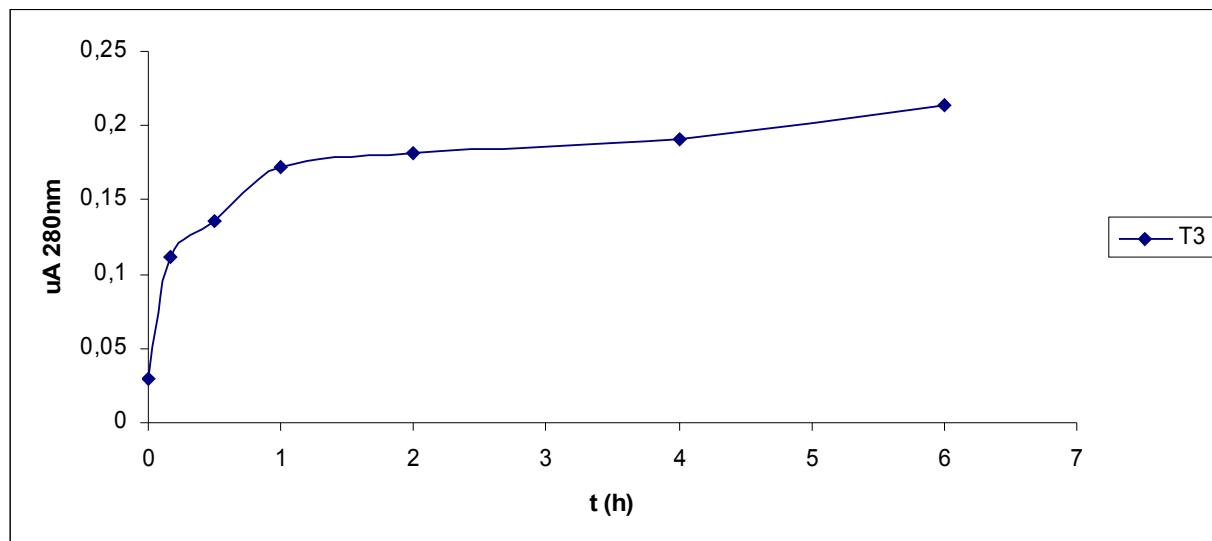


Fig. 13 : Cinétique enzymatique en fonction de la température $T_3 = 40^\circ\text{C}$ à $\text{pH} = 7$ $[\text{E}] = 1,6 \text{ mg.ml}^{-1}$, $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d’agitation de 150 rpm.

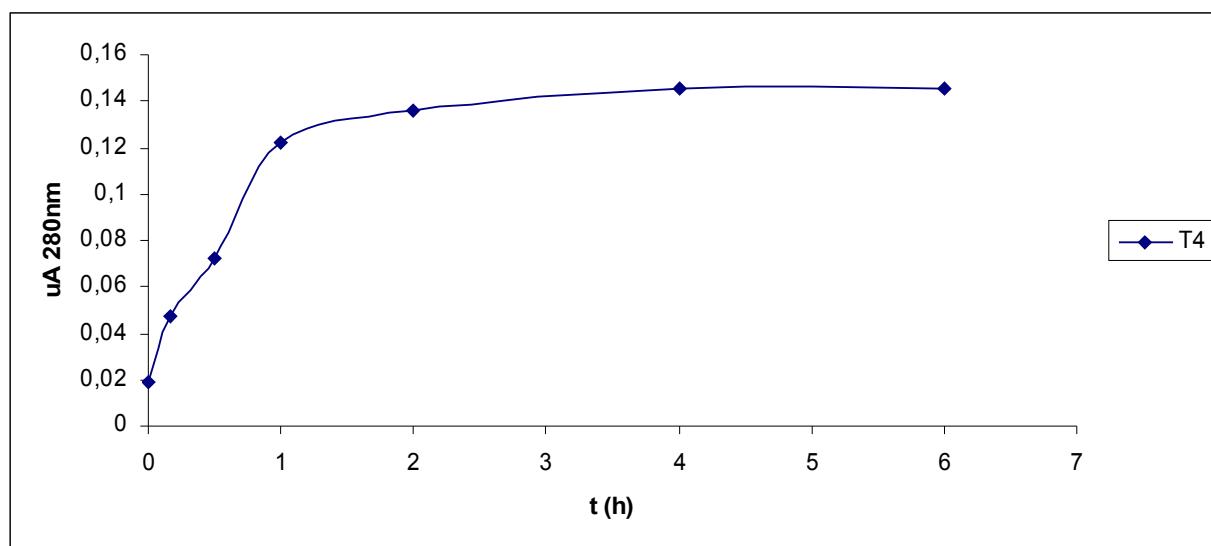


Fig. 14: Cinétique enzymatique en fonction de la température $T_4 = 50^\circ\text{C}$ à $\text{pH} = 7$ $[\text{E}] = 1,6 \text{ mg.ml}^{-1}$, $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d'agitation de 150rpm.

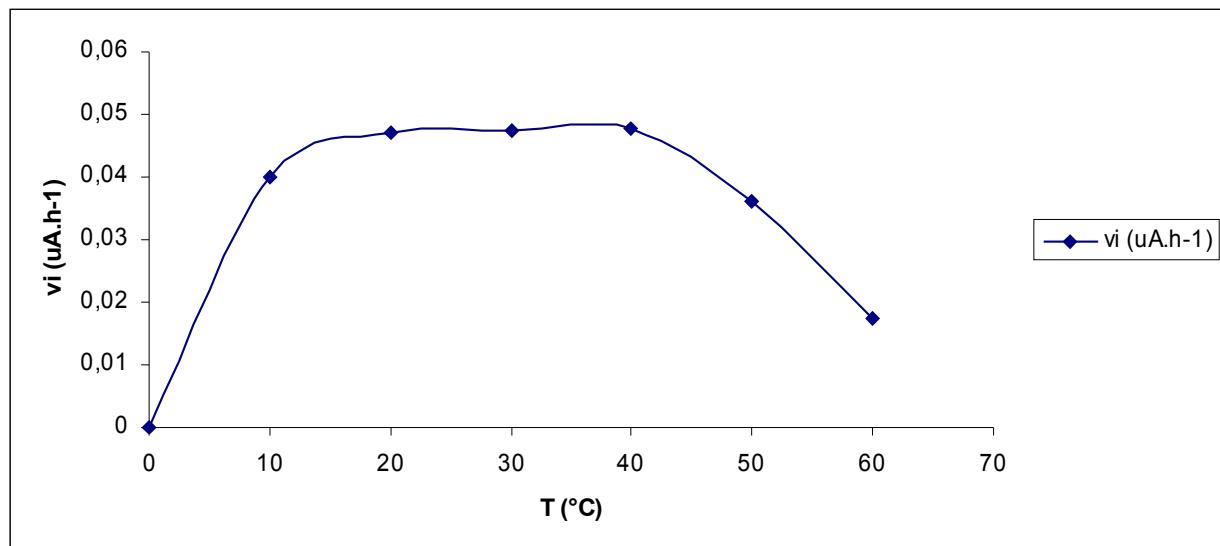


Fig. 15 : Evolution de la vitesse v_i en fonction de la température T à $\text{pH}=7$, $[\text{E}] = 1,6 \text{ mg.ml}^{-1}$, $[\text{S}]=0,3\%$, et vitesse d'agitation de 150rpm

Discussion :

Pour chaque température on note les faits suivants :

- la phase exponentielle dure entre 0,16 et 1 heure.
- Après 1 heures la concentration en produit formé [P] devient stable

RESULTATS ET DISCUSSIONS

- La vitesse de la réaction est maximale à $T = 40^{\circ}\text{C}$ et s'abaisse quand la température augmente.

Les résultats obtenus montrent que :

- La température influe sur la cinétique de la réaction :
 - Par une action activante sur la cinétique enzymatique comme le confirme la loi d'Arrhenius de 1889 qui veut que toute constante de vitesse de la réaction chimique augmente avec la température [10].
 - Par une action dénaturante sur l'enzyme.
- La température optimum d'incubation est de 40°C , résultat qui rejoint ceux obtenus par LASSOUDIERE (1969) pour la digestion de la caséine.

A cette température correspond une vitesse maximale de dégradation $V=4,77 \cdot 10^{-2} \text{ UA.h}^{-1}$

Des études utilisant d'autres substrats comme le poisson [23] ou la fibrine [24] ont montré de températures optimales respectives de 65°C et 70°C . Ces différences peuvent s'expliquer par la nature des liaisons enzyme - substrat qui sont plus ou moins thérmorestables selon le substrat utilisé [24]

IV-4. Cinétique enzymatique en fonction du pH

La figure 16, 17, 18 représentent respectivement les cinétiques enzymatiques pour chaque valeur de $\text{pH}=6,7$ et 8 . La figure 19 rend compte de l'évolution de la vitesse initiale en fonction du pH

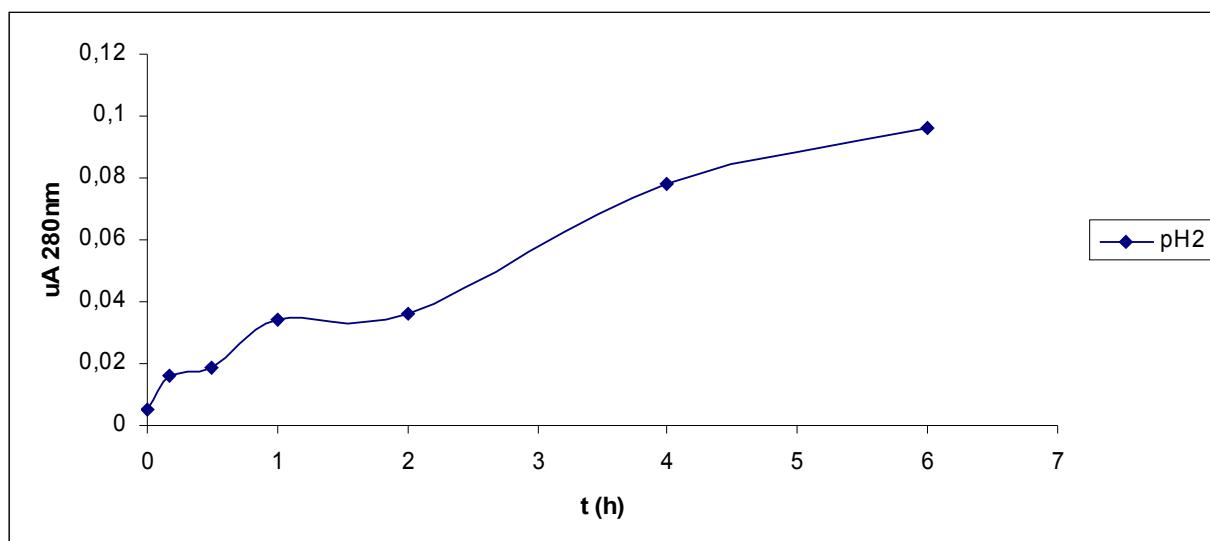


Fig. 16 : Cinétique enzymatique en fonction $\text{pH}_2 = 6$ à température $T = 40^{\circ}\text{C}$, $[E] = 1,6\text{mg.ml}^{-1}$; $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d'agitation de 150rpm.

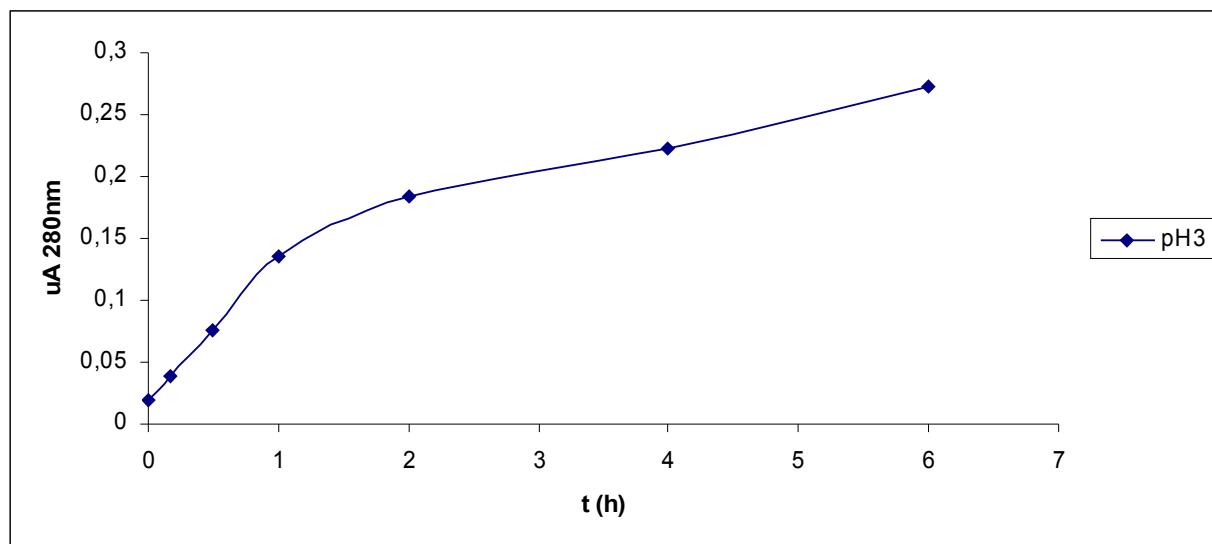


Fig. 17 : Cinétique enzymatique en fonction du $\text{pH}_3 = 7$ à température $T= 40^\circ\text{C}$, $[E]= 1,6 \text{ mg.ml}^{-1}$, $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d'agitation de 150rpm

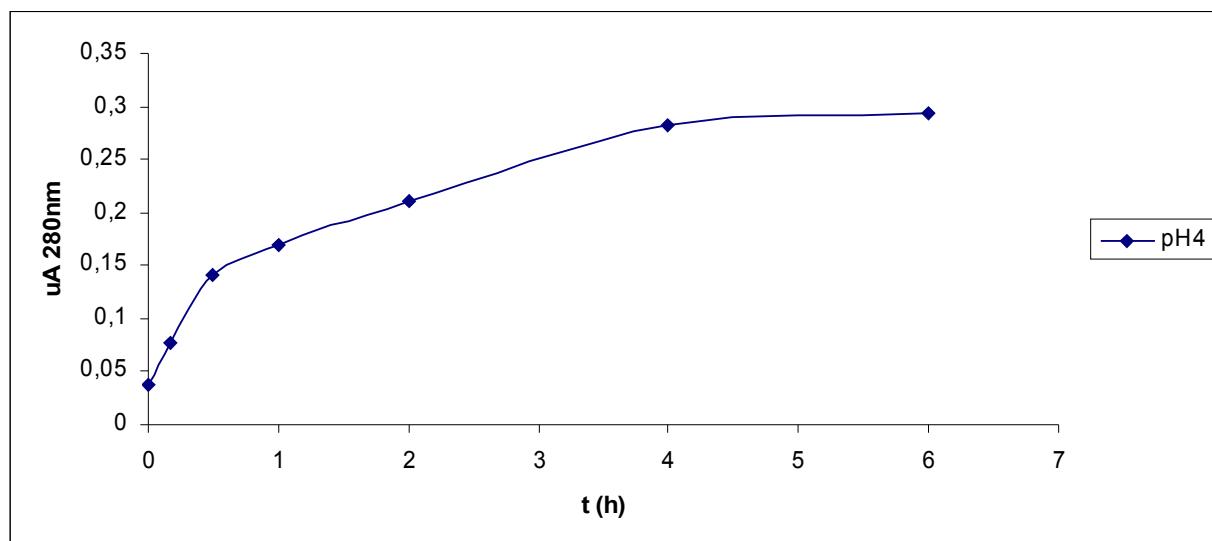


Fig. 18 : Cinétique enzymatique en fonction du $\text{pH}_4 = 8$ à température $T= 40^\circ\text{C}$, $[E]= 1,6 \text{ mg.ml}^{-1}$, $[\text{S}] = 0,3\%$ et vitesse d'agitation de 150rpm

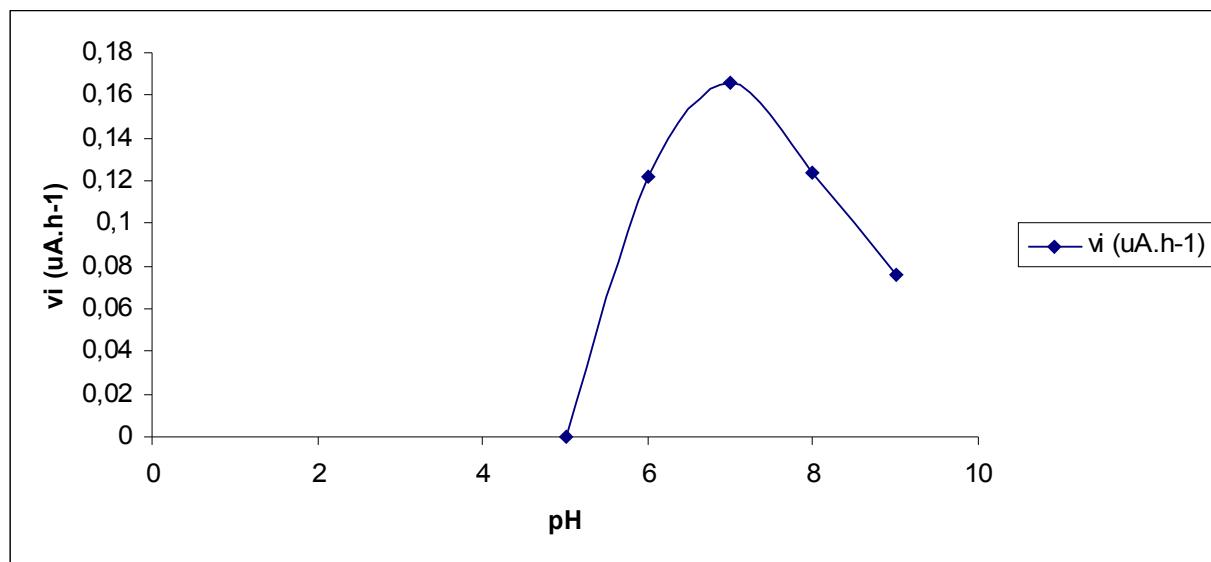


Fig. 19 : Evolution de la vitesse initiale en fonction du pH à température T=40°C, [E]=1,6mg.ml⁻¹, [S] = 0,3% et vitesse d'agitation de 150rpm

Discussion :

Pour chaque pH, on a pu constater les faits suivants :

- La phase exponentielle dure jusqu'à 1 heure d'incubation
- Après 3 heures d'incubation la concentration en produits formés [P] tend à devenir stable.
- Une augmentation progressive de la concentration en produits formés [P] jusqu'à 2 heures d'incubation.
- La vitesse initiale de la réaction augmente avec le pH jusqu'à atteindre une valeur maximale à pH = 7 puis diminue progressivement quand le pH devient plus basique.
- L'activité catalytique de la papaïne est absente à pH₁= 5.

Ces résultats permettent de montrer que :

- Le pH optimum de réaction catalytique pour la papaïne est de environ 7 auquel correspond une vitesse maximale V de 0,166 UA.h^{-1}
- L'efficacité cinétique de l'enzyme se situe à pH entre 6 et 8 d'où la forme de cloche de la courbe pH vitesse. Des études de LASSOUDIERE (1969) et de POULTER et al. (1985) ont montré des résultats similaires.
- le pH influe sur la cinétique enzymatique de 3 manières :
- A bas pH, la protéine est chargée positivement par protonation des anions thiolates du site actif de la papaïne qui diminue son affinité pour la caséine et limite la vitesse de réactions catalytiques.

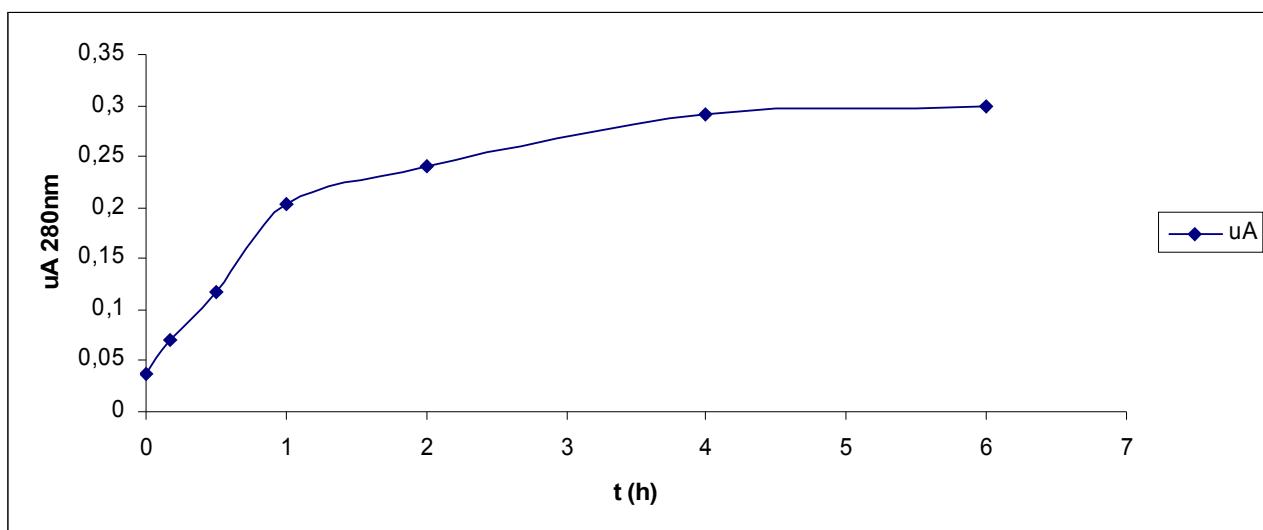
RESULTATS ET DISCUSSIONS

- A pH au voisinage de 7, la protéine se trouve sous sa forme d'ionisation active, la forme zwitterionique permettant la formation du complexe enzyme–substrat et favorisant la catalyse.
- A pH élevé, la protéine est chargée négativement par déprotonation de l'ion imidazolium du site actif de la papaïne et réduit son affinité pour la caséine.

IV-5. Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en caséine

Les figures 20, 21, 22 et 23 représentent respectivement les cinétiques enzymatiques en fonction des concentrations en caséine $[S_1]$, $[S_2]$, $[S_3]$ et $[S_4]$.

Fig. 20 : Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en caséine $[S_1] = 0,1\%$ à



température $T = 40^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7$, $[E]= 1,6\text{mg.ml}^{-1}$ en vitesse d'agitation d 150rpm

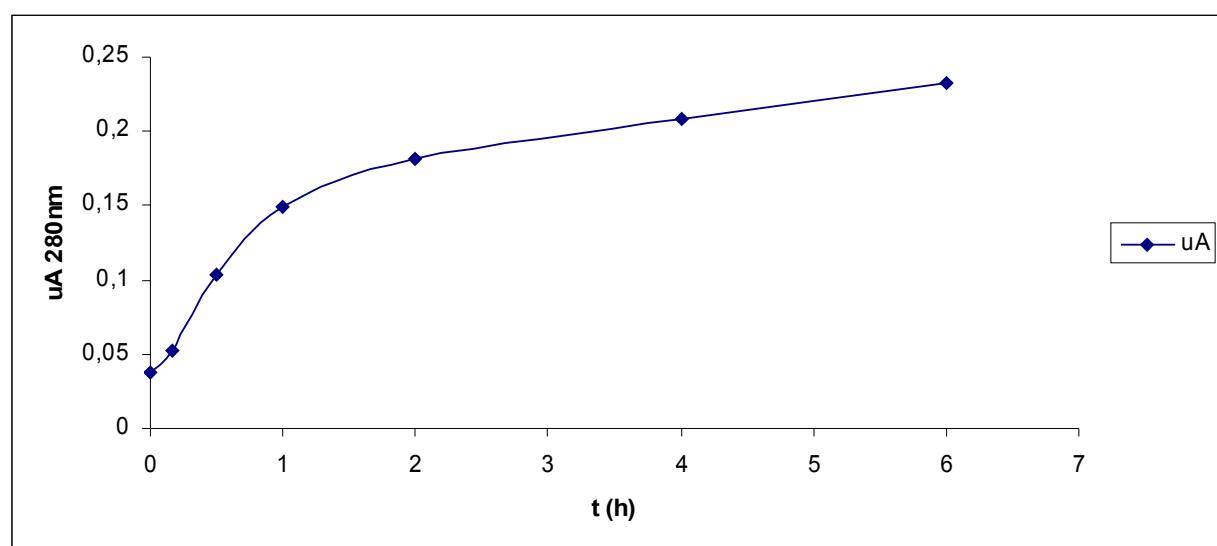


Fig.21 : Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en caséine $[S_2] = 0,3\%$ à température $T = 40^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7$, $[E]= 1,6\text{mg.ml}^{-1}$ en vitesse d'agitation de 150 rpm

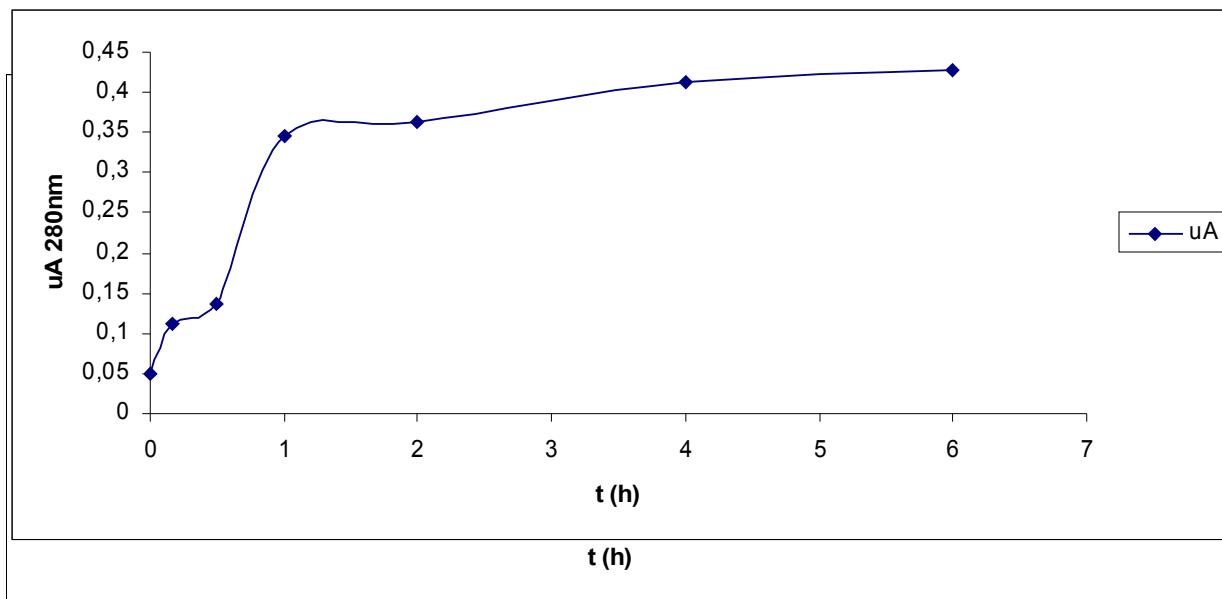


Fig.22 : Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en caséine $[S_3]= 0,9\%$ à température $T= 40^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7$, $[\text{E}]= 1,6\text{mg.ml}^{-1}$ en vitesse d'agitation de 150 rpm

Fig.23 : Cinétique enzymatique en fonction de la concentration en caséine $[S_4]= 3\%$ à température $T= 40^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7$, $[\text{E}]= 1,6\text{mg.ml}^{-1}$ en vitesse d'agitation de 150 rpm.

Discussion :

Pour chaque concentration en caséine on a constaté que :

- La phase exponentielle dure 1heure après incubation
- Après 4 heures d'incubation, la concentration en produits formés reste stable pour chaque concentration en caséine
- La vitesse initiale de la réaction atteint une valeur maximale V_M à la concentration en caséine $[S_0] = 9\text{mg.ml}^{-1}$.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

- La vitesse initiale est maximale à une concentration en caséine $[S_0] = 9\text{mg.ml}^{-1}$ et reste constant au fur et à mesure de l'élévation de la concentration.

Ces résultats nous permettent de déduire que :

- La concentration optimum en caséine est de 9mg.ml^{-1}
- A concentration $[S_0] = 9\text{mg.ml}^{-1}$, il y a saturation de la papaïne par la caséine, la vitesse de catalyse est à ce moment maximale

V- Les constantes cinétiques

Les constantes cinétiques sont déterminées à partir de la courbe de saturation de la papaïne par la caséine ou représentation hyperbolique de MICHAËLIS et MENTEN et de la représentation de LINEWEAVER et BURK. Les figures 24 et 25 représentent respectivement ces courbes. Le tableau XI résume les valeurs des constantes cinétiques obtenues.

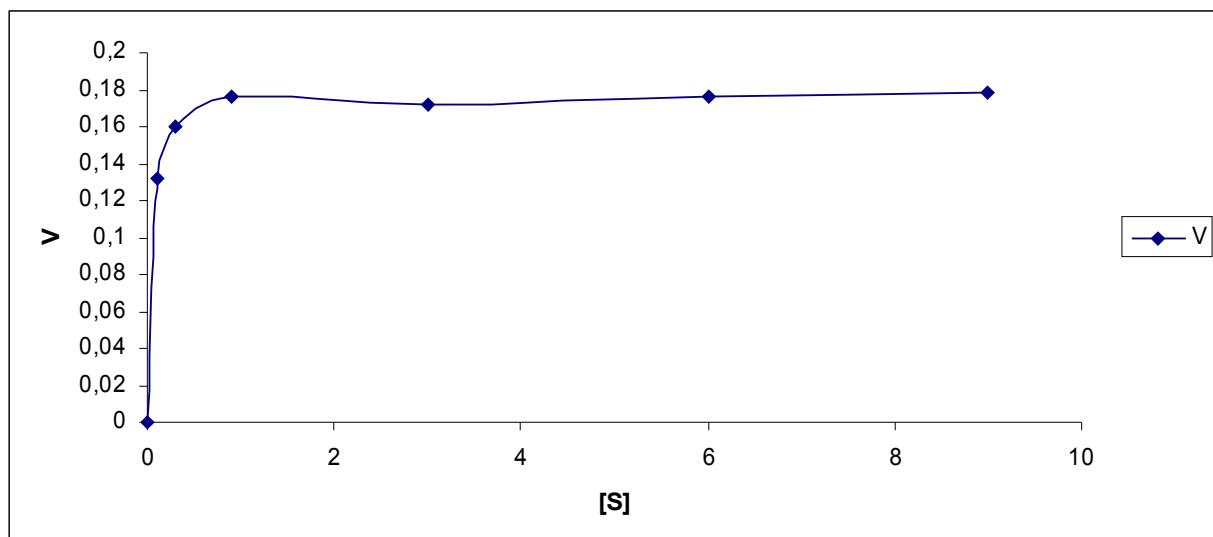
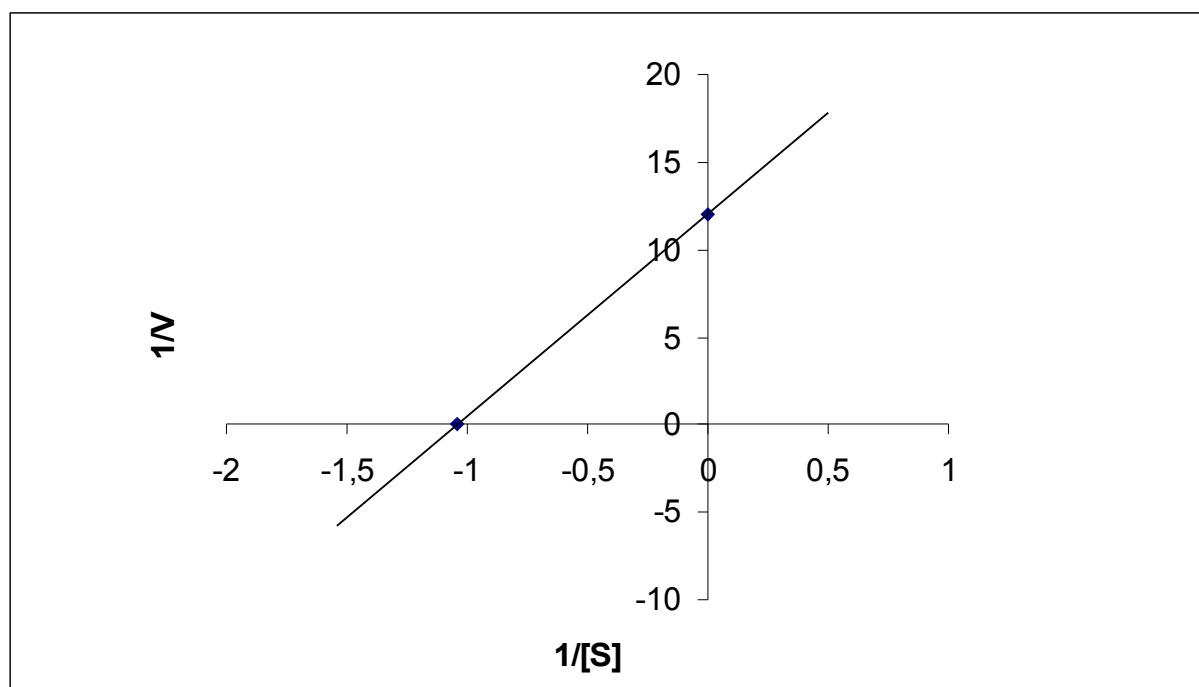


Fig. 24 : Représentation hyperbolique de MICHAËLIS ET MENTEN : courbe de saturation de la papaïne par la caséine

**Fig. 25 :** Représentation de LINEWEAVER ET BURK**Discussion :**

Ces résultats nous permettent de déduire :

- La vitesse maximale $V_M = 0,176 \text{ UA.h}^{-1}$ ou $0,083 \text{ mg. ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$.
- La constante de MICHAËLIS $K_M = 0,96 \text{ mg.ml}^{-1}$.
- La constante catalytique $K_{\text{cat}} = 0,6 \text{ h}^{-1}$
- La constante de spécificité $r_{sp} = 0,625$

Tableau XI : Valeurs des constantes cinétiques

Vitesse initiale v_i ($\text{mg.ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Vitesse maximale $V_M (\text{mg.ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	Constante de MICHAËLIS $K_M (\text{mg.ml}^{-1})$	Constante catalytique $K_{\text{cat}} (\text{h}^{-1})$	Constante de spécificité r_{sp}
0,075	0,083	0,96	0,6	0,625

Les valeurs des constantes cinétiques obtenues montrent:

- Une affinité de la caséine pour l'extrait papaïnique exprimée par une valeur de $K_M = 0,96 \text{ mg.ml}^{-1}$ petite par rapport à $[S] = 3 \text{ mg.ml}^{-1}$ ($K_M \ll [S]$)

RESULTATS ET DISCUSSIONS

- Une efficacité de la catalyse par l'extrait papaïnique sur la caséine exprimé par une valeur de $K_{cat} = 0,6 \text{ h}^{-1}$ ou 216 s^{-1} élevée, les enzymes ayant un K_{cat} habituel de $1 \text{ à } 10^3 \text{ s}^{-1}$ [17].
- Une spécificité de la papaïne pour la caséine exprimé par une valeur de $r_{sp}=0,625$ élevée.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude nous a permis de nous familiariser aux diverses techniques d'étude des enzymes. Les résultats obtenus montrent que l'extraction de la papaïne à partir des feuilles de papayer est réalisable.

Au cours de cette étude 3 paramètres ont été optimisé : la concentration initiale en substrat, le pH et la température. Les valeurs optimales obtenues sont respectivement de 0,9%, 7 et 40°C.

Notre étude a montré que l'utilisation de la papaïne comme catalyseur présente de nombreux avantages comme :

- la résistance de l'enzyme
- l'efficacité de l'enzyme
- la disponibilité en matières premières

Dans nos perspectives d'avenir, nous nous proposons :

- d'affiner la purification de la papaïne par :
 - Utilisation de la chromatographie d'échange d'ions
 - Utilisation du tamisage moléculaire
- d'étudier les différents types d'inhibiteurs de la papaïne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BADIA A, THIBAULT P. Spectrophotométrie moléculaire (UV-vis, fluorescence, infrarouge) appliquée à la quantification et caractérisation des protéines et acides nucléiques 1, 16 septembre 2004, [<http://www.esi.umontreal.ca/~badiaa/spectro-moleculaire-1.pdf>], (07 mai 2008)
2. BERGMEYER H U. Principes de l'analyse enzymatique. Paris : Techniques et documentation, 1979 ; 303 p.
3. BRUNETON J. Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales, 2^{ème} édition. Paris : Tec. & doc. , 1993 ; 915 p.
4. CABANIS Y, CHABOIS F, CHABOIS L. Végétaux et groupements végétaux de Madagascar et des Mascareignes. Antananarivo : Bureau pour le développement de la production agricole, 1970 ; Tome 3 : 1132 p.
5. CIRAD - GRET. Mémento de l'agronome. Versailles : Edition Quae, 2002 ; 1692 p.
6. CORNISH - BOWDEN A, JAMIN M, SAKS V. Cinétique enzymatique. Grenoble : EDP Sciences, 2005 ; 462 p. (Collection Grenoble sciences)
7. GARRETT R H, GRISHAM C M. Biochimie. Bruxelles: De Boek Université, 2000; 1292 p.
8. GAUTHIER D. Isolement et purification des protéines, 15 juin 2007, [<http://www.chimie-biochimie.umoncton.ca/bch.dg/Siitub/Propurif.html>], (11 janvier 2003)
9. GAUTHIER D. Précipitation des protéines, 21 juin 2007, [<http://www.chimie-biochimie.umoncton.ca/bch.dg/Siitub/Proprecip.html>], (05 février 2008)
10. GERMAIN G, MARI R, BURNEL D. Chimie générale avec exercices et tests, 3^{ème} édition. Paris : Masson, 1985 ; 287 p. (Collection Abrégé)
11. GUIGNARD J L. Botanique, 11^{ème} édition. Paris : Masson, 1998 ; 278. (Collection Abrégé de Pharmacie)
12. GUIGNARD J L. Botanique systématique moléculaire, 14^{ème} édition. Paris : Masson, 2007 ; 267 p. (Collection Abrégé de Pharmacie)
13. GUILLAUME J. Nutrition et alimentation des poisson et crustacées. Versailles : Editions Quae, 1999 ; 490 p.
14. GUL S, HUSSAIN S, THOMAS M P, RESMINI M, VERMA C S, THOMAS E W, BROCKLEHURST K. <<Generation of nucleophilic character in the Cys25 / His159 ion pair of papain involves Trp. 177 but not Asn. 158>> dans *Biochemistry*, 29 janvier 2008, [http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18225918?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed_Pubmed_ResultPanelRVDocSum], (07 février 2008)
15. HURTEL J M. Le Papayer, 2003, [<http://www.phytomania/papaya.html>], (24 janvier 2008)

16. JOHNSON A W. Invitation à la chimie organique. Bruxelles : De Boek Université, 2003 ; 784 p.
17. KAMOUN P, LEROUX J P, DEMAUGRE F. Aide mémoire de biochimie, 4^{ème} édition. Paris : Flammarion Médecine Sciences, 1990 ; 174 p.
18. KARP G, BOUHARMONT J, WISSOCQ J C. biologie cellulaire et moléculaire, 2^{ème} édition. Bruxelles : De Boek Université, 2004; 852 p.
19. KEILLOR J. Enzymologie résumé de cours, mars 2004,
[<http://www.esi.umontreal.ca/~Keillor/PDF/CHM6330/Reactivite.pdf>], (03 mars 2008)
20. KILARA A, SHAHANI K M, WAGNER F W. (1977). Preparation and properties of immobilized papain and lipase. *Biotechnol. and bioeng.*, 19 (11): 1703-1714.
21. KIMBALL J. Enzyme Kinetics, 11 juillet 2003,
[<http://users.rcn.com/jKimball.ma.ultranet/biology.pages/E/EnzymesKinetics.htm#summary>], (31 janvier 2008)
22. KUBY S A. A study of Enzymes. Boston: CRC Press, 1991; 608 p.
23. LARRETA – GARDE V. Enzymes en agro-alimentaire. Paris : Technique et documentation, 1997 ; 322 p. (Collection Sciences et techniques agro-alimentaires)
24. LASSOUDIERE A. La papaïne. Fruits 1969 ; 24 (11-12) : 503 – 517.
25. LAVILLE E. La protection des fruits tropicaux après récolte. Versailles : Editions Quae, 1994 ; 190 p.
26. LEBLANC B. Biochimie des protéines, 07 janvier 2008, [<http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/4.html>], (31 janvier 2008)
27. LEROY C. Lutte contre les salissures marines approche par procédé enzymatique, 2 février 2006, [<http://www.ifremer.fr/docelec/dec/2006/thèse-1099.pdf>], (22 février 2008)
28. MANOYE. Mes belles fleurs, 27 avril 2008,[<http://www.rendezvousjardin.com/blog/manoye/2574/galerie>],(29 avril 2008)
29. MENARD R, CARRIERE J, LAFLAMME P, PLOUFFE C, KHOURRI H E, VERNET T, TESSIER D C, THOMAS D Y, STORER A C, <<Contribution of the glutamine 19 side chain to transition state stabilization in the oxyanion hole of papain>> dans *Biochemistry*, vol. 30, n°37, 17 septembre 1991,
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1892809?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez_Pubmed_Pubmed_RVAbstractPlugsDrugs1], (07 février 2008)
30. MENARD R, KHOURRI H E, PLOUFFE C, LAFLAMME P, DUPRAS R, VERNET T, TESSIER D C, THOMAS D Y, STORER A C. <<Importance of hydrogen bonding interactions involving the side chain of Asp. 158 in the catalytic mechanism of papain>> dans *Biochemistry*, vol. 30, n°22, 4 juin 1991,
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2036422?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.Pubmed_Pubmed_Panel_Pubmed_RVAbstractPlusDrugs1], (07 février 2008)

31. MEROPS. Summary for family C1, 14 février 2008, [<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/merops.cgi?id=c1>], (28 février 2008)
32. NOMENCLATURE COMITEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. Enzyme nomenclature, 16 mars 2006, [<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>], (03 février 2008)
33. NULTSH W. Botanique générale. Bruxelles : De Boek Université, 1998 ; 624 p.
34. OLRY C. Alzheimer : des injections d'enzymes pour recouvrer la mémoire, 05 janvier 2008, [http://www.futura-sciences.com/fr/s/informer/actualite/news/t/vie-1/d/alzheimer-desinjections-denzymes-pourrecouvrerlamemoire_9522/], (17 janvier 2008)
35. POULTER N H, CAYGILL J C. (1985). Production and utilisation of papain a proteolytic enzyme from *Carica papaya L.* *Tropical science*, 25 (2): 123-137.
36. QUEVAUVILLIERS J. Dictionnaire médical, 4^{ème} édition. Paris : Masson, 2004 ; 1240 p.
37. RAMAMONJISOA D J. Contribution à l'étude de 2 protéases d'une plante carnivore *Népenthes madagascariensis poiret*. [Mémoire de Diplôme d'Etude Approfondies des sciences biologiques appliquées option biochimie]. Antananarivo : Université de Madagascar Etablissement d'enseignement supérieur des sciences, 1983.
38. RASEHENONJATOVO J J. Etudes technico-économiques pour le lancement de la culture de papayer. [Mémoire de fin d'études]. Antananarivo : Etablissement d'Enseignement Supérieur en Sciences Agronomiques, 1996.
39. SEN D C, SRIPATHY N V, LAHIRY N L, SREENIVASAN A, SUBRAHMANYAN V. (1962). Rate hydrolysis of fish flesh with papain. *Journal of food science*, 28 (3): 365-369 Food Tech.
40. SCRIBAN R. Biotechnologie. Paris: Tec. & Doc. Lavoisier, 1993; 2634 p.
41. SIGMAALDRICH. Papain, 2008,
[http://www.sigmaaldrich.com/area_of_internet/Biochemical/Enzyme_Explorer/Analytical_enzymes/papain], (06 février 2008)
42. SZABELSKI M, STACKOWIAK K, WICZK W. <<Influence of organic solvents on papain kinetics>> dans *Act. Biochem. Pol.* , vol 48, n°4, 27 novembre 2001, [http://www.actabp.pl/pdf/4_2001/1197-1201s.pdf], (06 février 2008)
43. THOMAS M. Genencor lance le premier enzyme commercial pour la production d'éthanol cellulosique, 16 octobre 2007, [<http://www.vehiculespropres.net/Actualité/Genencor-Lance-Le-Premier-Enzyme-Commercial-Pour-La-Production-Dethanol-Cellulosique.html>], (15 janvier 2008)
44. TOITOU Y. Pharmacologie, 10^{ème} édition. Paris : Masson, 2003 ; 270 p.
45. UNIVERSITE DE PROVENCE. Introduction à la cinétique enzymatique, (s.d)
[http://sites.univ-provence.fr/wabin/d_agora/d_biochimie/cinetique.pdf], (11 janvier 2008)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

46. UNIVERSITE DE RENNES. Enzymes, (s.d), [http://www.med.univ-rennes1.fr/wkf/stock/RENNES20061023020127mdenisEnzymes_2006.pdf], (05 février 2008)
47. WANG J, XIANG Y F, LIM C. <<The double catalytic triad, Cys25-His159-Asp158 and Cys25-His159-Asn175 in papain catalysis: role of Asp158 and Asn175>> dans *Prot. Engin. Oxf. Jour.* , vol. 7, n°1, janvier 1994,
[http://www.ncbi.nih.gov/pubmed/8140097?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultPanel.Pubmed_RVDocSum], (07 février 2008)
48. WIKIPEDIA. Cinétique enzymatique, 23 janvier 2008,
[http://fr.wikipedia.org/wiki/cin%C3%A9tique_enzymatique], (05 février 2008)
49. WIKIPEDIA. Papain cartoon. png, 13 mars 2007,
[http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Papain_cartoon.png], (15 mars 2008)

ANNEXE I

- Tampon phosphate-citrate :
- Mono phosphate de Na/de K
- Acide citrique
- pH = 7

pH 6-8 : Na H₂PO₄ + Na₂ HPO₄

Solution A : Dissoudre 27,8g de NaH₂ PO₄

Dans 1 l de E.D

Solution B : Dissoudre 53,65g de Na₂ HPO₄

7H₂O dans 1l de E.D

On ajoute X ml de A à Y ml de B

pH	X	y
5,7	93,5	6,5
5,9	90	10
6,1	85	15
6,3	77,5	22,5
6,5	68,5	31,5
6,7	56,5	43,5
6,9	45	55
7,1	33	67
7,3	23	77
7,5	16	84
7,7	10,5	89
7,9	7	93

- Test de JENTSH et NAKAYMA-AMAGASSE modifié
- Réactif :
 - Substrat : caséine 0,3%
 - Tampon : Tampon phosphate 0,2M
 - pH 6
 - Acide trichloracétique TCA 5%

ANNEXE II

- Matériel :
 - Bain-thermostaté agité de type GYROTORY WATER BATH
BRUN SWICK modèle G 76
 - Centrifugeuse – type BECKMAN J 21 B
 - Spectrophotomètre de marque SECOMAN

- Etalonnage du dosage de FOLIN-LOWRY

A: Na_2CO_3 2% dans NaOH 0,1N

B1: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dans de l'E.D

B2 : Tartrate double de sodium et de potassium 2,4% dans de l'E.D

C : 0,5 l de B1+ 0,5 ml de B2 + 49ml de A

E : Réactif de FOLIN-CIocalteu dilué de moitié

Solution de SAB 100 $\mu\text{l.ml}^{-1}$

- Tableau de saturation en sulfate d'ammonium simplifié

Concentration initiale en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% de la saturation à 0°C pH = 7)	Concentration finale en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% de la saturation à 0°C, pH = 7)				
	0%	25%	50%	75%	100%
	g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à ajouter par 100 ml de solution				
0%	0	13,6	29,5	48,3	70,7

NAME : TATAJOHASY

FIRST NAME: Prince Zafindrebiby
Department of fundamental Biochemistry and applied
Memory of DEA in Sciences of life
Option: BIOTECHNOLOGY-MICROBIOLOGY

TITLE : Contribution to the study of a proteolytic enzyme
extracted from *Carica papaya linn.* 'leaves
(*Caricaceae*): papain

Summary:

The knowledge of the properties of enzymes allows to understand their work and thereby to develop applications in several sectors such as pharmaceuticals, agro-food, energy...

The aim of our study is to optimize the physical and chemical parameters of papain's enzymatic reactions and to define the kinetic constants which will enhance its catalytic activity

The papain is purified from *Carica papaya linn.*'s leaves by grinding, filtration and differential precipitation with ammonium sulphate.

Three physico-chemical parameters were studied: the initial substrate concentration whose optimal value was 0,9%, the pH environment in which the optimal value was 7 and incubation temperature whose best value was 40 ° C. Under these conditions, we achieved a return of activity of 69%.

Values obtained of kinetic constants are the following: the constant of Michaëlis $K_M = 0,96 \text{ mg.ml}^{-1}$ reflecting an affinity of papain for its substrate, the catalytic constant $K_{cat} = 0,6 \text{ h}^{-1}$ reflecting efficiency of the papain catalysis and the specificity constant $r_{sp} = 0,625$ showing a specificity of papain for its substrate.

Our work enables us to purify papain from *Carica papaya linn.*'s leaves, to define the optimals condition of reactions of papain and to identify kinetic constants determining the catalytic effectiveness, the affinity and the specificity of the enzyme for its substrate

Keywords: *Carica papaya linn.*, cysteine protease, Differential precipitation, Enzymatic kinetics, papain, proteolytic enzyme.

Teacher: Dr RAMAMONJISOA Daniel J., Maître de Conférences to the Faculty of the Sciences of Antananarivo

NOM : TATAJOHASY

PRENOMS: Prince Zafindrebiby
Département de Biochimie fondamentale et appliquée
Mémoire de DEA en Sciences de la vie
Option: BIOTECHNOLOGIE-MICROBIOLOGIE

TITRE : Contribution à l'étude d'une enzyme protéolytique extraite de feuilles de *Carica papaya linn.* (*Caricaceae*): la papaïne

Résumé:

La connaissance des propriétés des enzymes permet de comprendre leur fonctionnement et ainsi de développer des applications dans de nombreux secteurs tels que le secteur pharmaceutique, agro-alimentaire, énergétique,...

L'objectif de notre étude est d'optimiser les paramètres physico-chimiques de réactions enzymatiques de la papaïne et de définir les constantes cinétiques qui permettront d'améliorer son activité catalytique

La papaïne est purifiée à partir de feuilles de *Carica papaya linn* par broyage, filtration et précipitation différentielle au sulfate d'ammonium.

Trois paramètres physico-chimiques ont été étudiés: la concentration initiale en substrat du milieu réactionnel dont la valeur optimale est de 0,9%, le pH du milieu dont la valeur optimale est de 7 et la température d'incubation dont la valeur optimale est de 40°C. Dans ces conditions, nous avons obtenu un rendement d'activité de 69%.

Les valeurs des constantes cinétiques obtenues sont les suivantes: la constante de Michaëlis $K_M=0,96\text{mg.ml}^{-1}$ traduisant une affinité de la papaïne pour son substrat, la constante catalytique $K_{cat}=0,6\text{h}^{-1}$ traduisant une efficacité de catalyse de la papaïne et la constante de spécificité $r_{sp}=0,625$ montrant une spécificité de la papaïne pour son substrat.

Notre travail nous a permis de purifier la papaïne à partir de feuilles de *Carica papaya linn*, de définir les conditions optimales de réactions de la papaïne et d'identifier les constantes cinétiques déterminant l'efficacité catalytique, l'affinité et la spécificité de l'enzyme pour son substrat

Mots clés: *Carica papaya linn.*, cinétique enzymatique, enzyme protéolytique, papaïne, précipitation différentielle, protéase à cystéine.

Encadreur: Dr RAMAMONJISOA Daniel, Maître de Conférences à la Faculté des sciences d'Antananarivo