

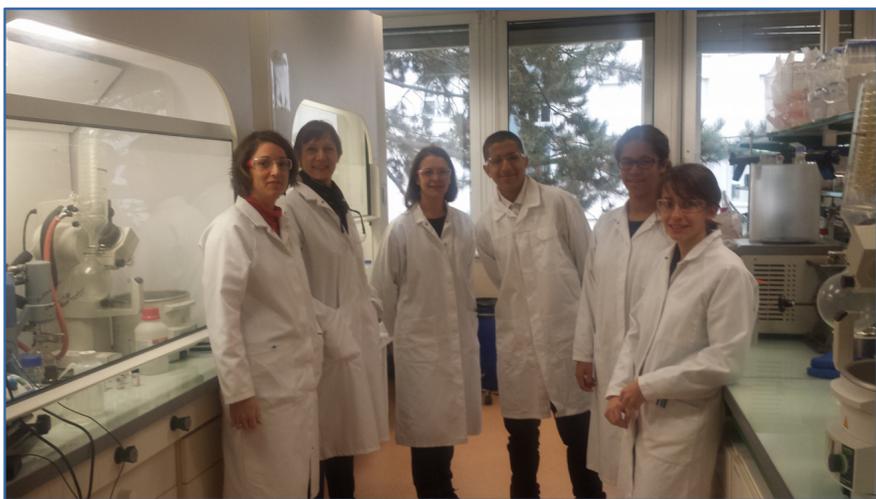


Photo de la façade du laboratoire

Présentation du Génoscope

Le Génoscope est une unité mixte de recherche composée du CNRS, de l'université d'Evry et du CEA (commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives). Ses domaines de recherche sont la génomique (étude du génome ou ADN), la génomique fonctionnelle et la biocatalyse (catalyse du vivant par le vivant). Le bâtiment a été inauguré le 23 octobre 1998 pour la participation de la France au projet mondial du séquençage du génome humain, et ensuite pour d'autres projets développés autour de la génomique. Il a été intégré au CEA depuis 2007.

Le principal sujet de recherches du Génoscope à l'heure actuelle est d'une part de fabriquer des enzymes servant pour la biocatalyse (réactions chimiques provoquées par des enzymes ou protéines), d'autre part d'étudier la capacité de ces enzymes à transformer un substrat en produit. Le but de ces recherches est de trouver les enzymes les plus performantes pour transformer le substrat le plus rapidement possible en ayant peu de déchets. Ainsi, les découvertes permettront de faire une chimie plus verte et écologique en s'appliquant aux industries, notamment agroalimentaires.



De gauche à droite : Carine Vaxelaire, Anne Zaparucha, Aurélie Jouenne, Ilyas, Iscia, Ombeline Mayol

Carine Vaxelaire, ingénieure chercheuse au CEA

Spécialité : chimie organique et biocatalyse

Recherches : utilisation d'enzymes pour faire des réactions chimiques, proposer aux chimistes de alternatives pour la synthèse (chaque personne étudie une activité enzymatique donnée)

Études : bac S, 2 ans classe prépa physique-chimie à Clermont-Ferrand, 3 ans d'école d'ingénieur de chimie de Lyon (CPE Lyon) dont un an dans une entreprise pharmaceutique en Angleterre, en parallèle de la dernière année DEA de chimie organique à Lyon, thèse en chimie organique à l'ICSN (institut de chimie des substances naturelles ; extraction des produits naturels dans l'éponge et synthèse organique), 1 an chez Servier dans un laboratoire de recherche en synthèse pharmaceutique, arrivée au Génoscope en 2007 pour monter le laboratoire avec Anne

Qualités : curiosité, persévérance, rigueur, enthousiasme/sociabilité, esprit d'équipe

Travail quotidien : gestion de l'HPLC (pannes), travaux, gestion des interventions dans le laboratoire

Comment les fraises se retrouvent-elles dans votre yaourt ? Sont-elles naturelles ou non ?

Tout d'abord, il faut savoir que la vie fonctionne grâce à un système complexe de métabolismes interdépendants. Ces métabolismes sont actionnés par des enzymes : des protéines, aussi appelées catalyseurs, présentes en faibles quantités, qui vont permettre des réactions dans les êtres vivants comme la respiration ou la digestion.

Il faut également savoir que plus de 80% des réactions chimiques industrielles sont réalisées à l'aide de catalyseurs car en effet, ils réduisent les coûts de production et donc augmentent les bénéfices. En fait, les enzymes permettent de réduire considérablement l'usage de produits chimiques extérieurs, d'accélérer les réactions et de diminuer les déchets de production, faisant des économies. Une enzyme n'est pas vivante mais elle fabrique par le vivant.

Prenons l'exemple de la fraise. Premièrement, on va chercher la molécule naturelle qui est responsable du goût dans une fraise ; on va ensuite réaliser une extraction de la molécule et de l'enzyme qui produit cette molécule "in vivo" c'est-à-dire dans l'organisme vivant, pour pouvoir l'étudier et par la suite la transformer, et la modifier mais cette fois-ci "in vitro" c'est-à-dire hors de l'organisme, donc par l'Homme pour qu'en la faisant réagir avec une molécule commune elle la transforme en la molécule responsable du goût de la fraise. Il ne manque plus qu'à lui rajouter du colorant et vous avez votre arôme de fraise ! Mais de ce point de vue, cela paraît un jeu d'enfant mais ce n'est pas si simple étant donné qu'il faut faire accepter à une enzyme non naturelle de transformer une molécule non naturelle en une deuxième molécule ayant les propriétés de la molécule naturelle. Et ça c'est tout le travail des biologistes moléculaires.

Cette technique de production des arômes, outre ses enjeux financiers importants, permet de proposer un produit peu cher et au prix constant.

Prenons l'exemple de la vanille qui contient plus de 150 molécules responsables de son goût et de son parfum. Les industriels n'en usent que d'une seule et unique qui participe à la majorité de l'arôme. Cela leur permet de proposer des yaourts à la vanille indépendamment du cours de la vanille qui est très fluctuant selon les années, et ainsi de ne pas vendre des yaourts dont le prix peut varier entre vingt et soixante euros. Cependant, la vanille du yaourt ne constitue pas le goût et le parfum entiers de la véritable vanille, perceptibles aux connaisseurs, et ne possède aucun bienfait pour la santé.



Fraise photo L'Express



Yaourt à la fraise photo blog Les petits plats de Gwendoline

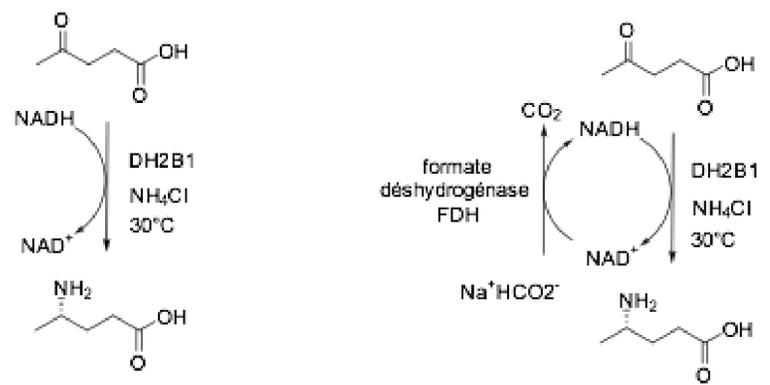


Vanille photo blog Le Jardin des Gourmands

L'expérience

Le but de l'expérience est de mesurer la capacité d'une enzyme à transformer une molécule, appelée substrat, en la molécule voulue, appelée produit. Dans l'exemple de la fraise, le substrat est la molécule commune que l'on doit synthétiser pour produire une copie de la molécule naturelle responsable du goût de la fraise, le produit est donc la molécule du goût de fraise synthétisée, et l'enzyme utilisée est une enzyme synthétisée, identique à l'enzyme naturelle dont les propriétés ont pu être modifiées pour augmenter l'efficacité de celle-ci.

Mais cette transformation n'est pas faite en une seule étape. On utilise tout d'abord une solution tampon qui sert de base pour les réactions. Ensuite, il y a deux substrats : un qui va réagir avec l'enzyme DH2B1 et dont le produit sera un réactif NAD^+ , appelé cofacteur, qui va réagir avec un autre substrat, le formiate de sodium et le FDH, pour former un autre produit, le NH_4Cl . Ce NH_4Cl a aussi un cofacteur, le NADH , et sera transformé en NAD^+ sous l'action de l'enzyme.



Balance de précision au millième de gramme

Centrifugeuse de paillasse



Schéma présentant l'expérience



Photo du laboratoire (intérieur)

Dispositifs mis en place pour l'expérience

Calculs pour trouver la masse molaire (M), la masse (m), le nombre de moles (n), le volume à prélever pour une dilution (Vm)

Solution mère NH_4Cl (Chlorure d'Ammonium), 5 mL, 1 mol.L-1

$n = C_{\text{mol}} \times V = 1 \times 0,005 = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$

$M = 1 \times N + 4 \times H + 1 \times Cl = 53,49 \text{ g. mol}^{-1}$

$m = M \times n = 53,49 \times 5 \cdot 10^{-3} = 0,26745 \text{ g}$ soit 267mg

Solution fille HCOONa (Formate de sodium) 15mL d'une solution à 100mmol.L-1 ;

$M = 68,01 \text{ g.mol}^{-1}$

$n = C_{\text{mol}} \times V = 100 \times 0,015 = 1,5 \text{ mmol}$

$m = M \times n = 68,01 \times 0,015 = 1,02015 \text{ g}$

On cherche le volume à prélever dans la solution mère pour faire la solution fille :

$C_{\text{mère}} \times V_{\text{mère}} = C_{\text{fille}} \times V_{\text{fille}}$

$V_{\text{mère}} = (C_{\text{fille}} \times V_{\text{fille}}) / C_{\text{mère}} = (10 \times 0,0001) / 100 = 0,001 / 100 = 0,00001 \text{ L}$ soit $10 \mu\text{L}$

Protocole



Frigidaire à 4°C où sont stockés les substances chimiques et certaines enzymes

Nous avons fait 3 expériences dont une expérience témoin.

Nous avons pesé 0.102 g de formate de sodium dans une balance de précision au $g \cdot 10^{-4}$, et 0.267 g de chlorure d'ammonium.

Nous avons préparé les solutions de formiate de sodium et de chlorure d'ammonium dans des flacons gradués en rajoutant de l'eau mesurée à l'aide d'éprouvettes graduées. Puis, Ombeline a sorti les solutions de cétone et le FDH (= substrats), le NAD^+ et le NADH (= cofacteurs), le DH2B1 (= l'enzyme), le $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (= la solution tampon, pH 9.54).

Nous avons préparé des mélanges réactionnels 024A, 024B, 024C (expérience témoin= sans enzyme) dans des eppendorfs (500 μL) avec des micropipettes. Ensuite, nous avons agité les solutions avec le Vortex puis nous les avons agitées dans le thermomixeur à 50°C avec 400 rotations par minute.

Pour terminer, nous avons lavé les spatules et les éprouvettes graduées avec de l'eau et de l'acétone. Après notre départ Ombeline a prélevé 10 μL de chaque milieu réactionnel et les a stockés à 4°C.

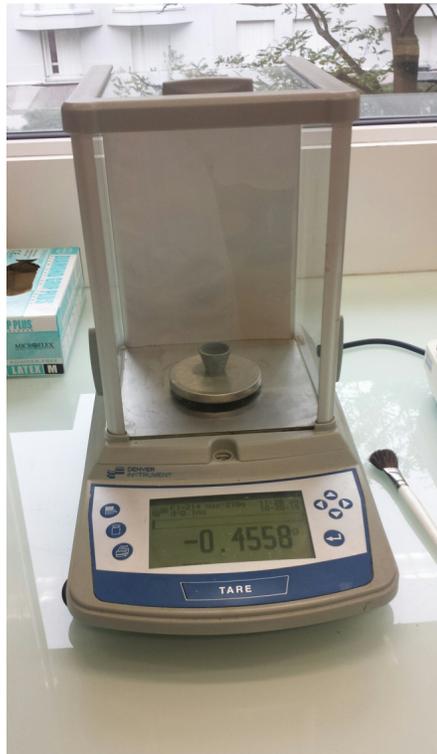
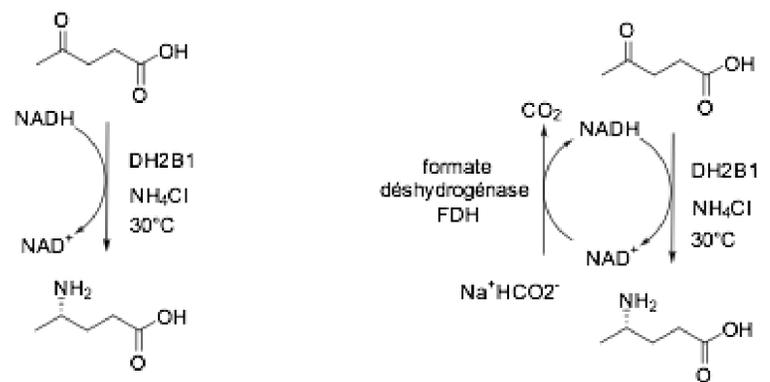
Tableau DH2B1 avec système de recyclage

	Concentration solution mère (mmol/L)	Concentration voulue (mmol/L)	024A	024B	024C
			Volume (μL)		
Cétone	100	10	10,0	10,0	10,0
Tampon $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, 1 M, pH 9,54	1000	100	10,0	10,0	10,0
NADH	10	0,4	4,0	4,0	4,0
NH4Cl	1000	200	20,0	20,0	20,0
HCOONa	100	20	20,0	20,0	20,0
FDH	56	10	17,9	17,9	17,9
DH2B1	3,6	0,3	8,3	8,3	/
Eau			9,8	9,8	18,1
V total (μL)			100,0	100,0	100,0
T (°C)			50	50	50

L'expérience

Le but de l'expérience est de mesurer la capacité d'une enzyme à transformer une molécule, appelée substrat, en la molécule voulue, appelée produit. Dans l'exemple de la fraise, le substrat est la molécule commune que l'on doit synthétiser pour produire une copie de la molécule naturelle responsable du goût de la fraise, le produit est donc la molécule du goût de fraise synthétisée, et l'enzyme utilisée est une enzyme synthétisée, identique à l'enzyme naturelle dont les propriétés ont pu être modifiées pour augmenter l'efficacité de celle-ci.

Mais cette transformation n'est pas faite en une seule étape. On utilise tout d'abord une solution tampon qui sert de base pour les réactions. Ensuite, il y a deux substrats : un qui va réagir avec l'enzyme DH2B1 et dont le produit sera un réactif NAD^+ , appelé cofacteur, qui va réagir avec un autre substrat, le formiate de sodium et le FDH, pour former un autre produit, le NH_4Cl . Ce NH_4Cl a aussi un cofacteur, le NADH, et sera transformé en NAD^+ sous l'action de l'enzyme.



Balance de précision au millième de gramme

Centrifugeuse de pailasse

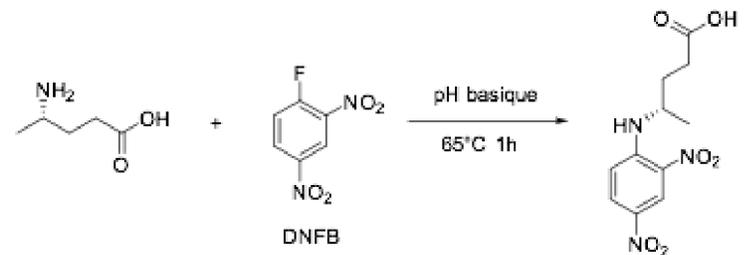


Schéma présentant l'expérience

Dispositifs mis en place pour l'expérience

Calculs pour trouver la masse molaire (M), la masse (m), le nombre de moles (n), le volume à prélever pour une dilution (Vm)

Solution mère NH_4Cl (Chlorure d'Ammonium), 5 mL, 1 mol.L-1

$n = C_{\text{mol}} \times V = 1 \times 0,005 = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$

$M = 1 \times N + 4 \times H + 1 \times Cl = 53,49 \text{ g. mol}^{-1}$

$m = M \times n = 53,49 \times 5 \cdot 10^{-3} = 0,26745 \text{ g}$ soit 267mg

Solution fille HCOONa (Formate de sodium) 15mL d'une solution à 100mmol.L-1 ;

$M = 68,01 \text{ g.mol}^{-1}$

$n = C_{\text{mol}} \times V = 100 \times 0,015 = 1,5 \text{ mmol}$

$m = M \times n = 68,01 \times 0,015 = 1,02015 \text{ g}$

On cherche le volume à prélever dans la solution mère pour faire la solution fille :

$C_{\text{mère}} \times V_{\text{mère}} = C_{\text{fille}} \times V_{\text{fille}}$

$V_{\text{mère}} = (C_{\text{fille}} \times V_{\text{fille}}) / C_{\text{mère}} = (10 \times 0,0001) / 100 = 0,001 / 100 = 0,00001 \text{ L}$ soit $10 \mu\text{L}$

Protocole



Frigidaire à 4°C où sont stockés les substances chimiques et certaines enzymes

Nous avons fait 3 expériences dont une expérience témoin.

Nous avons pesé 0.102 g de formate de sodium dans une balance de précision au $g \cdot 10^{-4}$, et 0.267 g de chlorure d'ammonium.

Nous avons préparé les solutions de formiate de sodium et de chlorure d'ammonium dans des flacons gradués en rajoutant de l'eau mesurée à l'aide d'éprouvettes graduées. Puis, Ombeline a sorti les solutions de cétone et le FDH (= substrats), le NAD^+ et le NADH (= cofacteurs), le DH2B1 (= l'enzyme), le $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (= la solution tampon, pH 9.54).

Nous avons préparé des mélanges réactionnels 024A, 024B, 024C (expérience témoin= sans enzyme) dans des eppendorfs (500 μL) avec des micropipettes. Ensuite, nous avons agité les solutions avec le Vortex puis nous les avons agitées dans le thermomixeur à 50°C avec 400 rotations par minute.

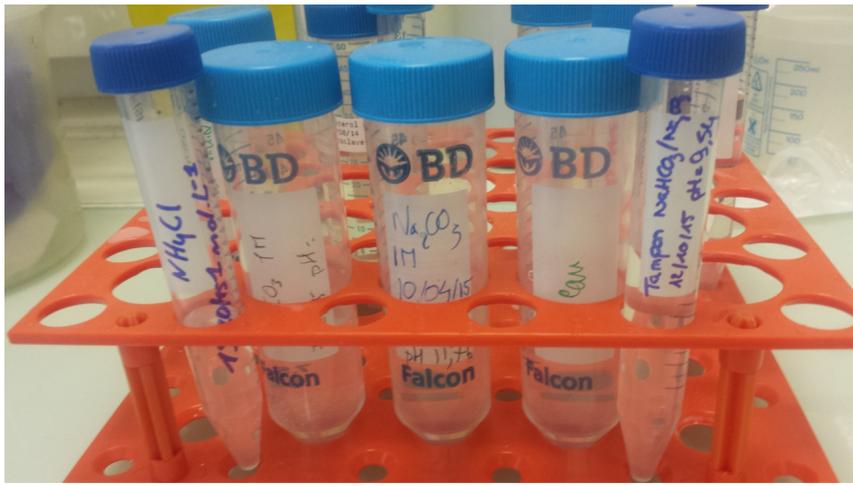
Pour terminer, nous avons lavé les spatules et les éprouvettes graduées avec de l'eau et de l'acétone. Après notre départ Ombeline a prélevé 10 μL de chaque milieu réactionnel et les a stockés à 4°C.



Photo du laboratoire (intérieur)

Tableau DH2B1 avec système de recyclage

	Concentration solution mère (mmol/L)	Concentration voulue (mmol/L)	024A	024B	024C
			Volume (μL)		
Cétone	100	10	10,0	10,0	10,0
Tampon $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, 1 M, pH 9,54	1000	100	10,0	10,0	10,0
NADH	10	0,4	4,0	4,0	4,0
NH_4Cl	1000	200	20,0	20,0	20,0
HCOONa	100	20	20,0	20,0	20,0
FDH	56	10	17,9	17,9	17,9
DH2B1	3,6	0,3	8,3	8,3	/
Eau			9,8	9,8	18,1
V total (μL)			100,0	100,0	100,0
T (°C)			50	50	50



Tubes contenant les solutions à mélanger

Suite de l'expérience

Nous avons effectué le second prélèvement (10µL de chaque solution) que nous avons mis dans d'autres eppendorfs (étiquetés). Nous avons rajouté dans chacun des eppendorfs 10µL de Na₂CO₃ à 1M, 50µL de NaHCO₃ à 1M, 40µL de DNFB à 5mM pour que la solution soit plus basique ce qui permet que la dérivation se passe mieux. Nous avons donc 110µL de volume final de solution.

Nous avons agité les trois eppendorfs dans le Thermomixeur à 65°C pour 1h pour faire la réaction de dérivation (double réaction en chaîne et cyclique, une des réactions va utiliser le produit de l'autre pour continuer à se faire).

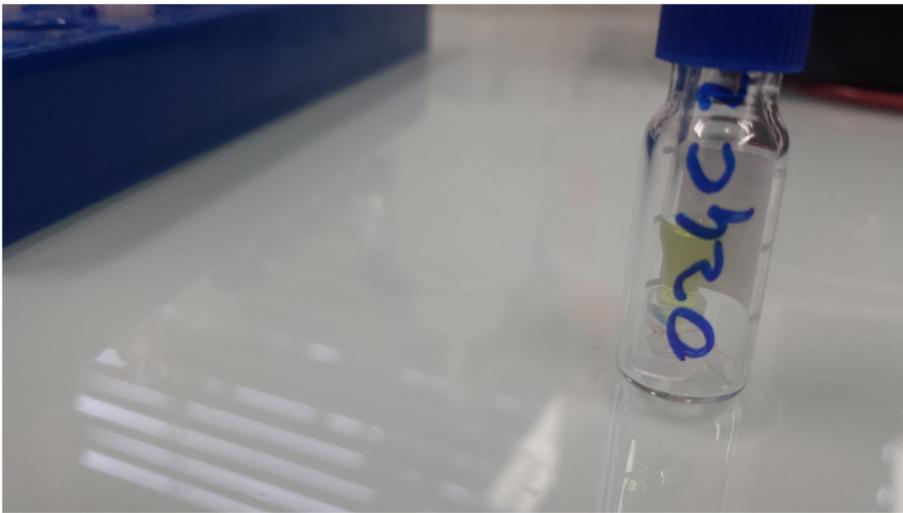
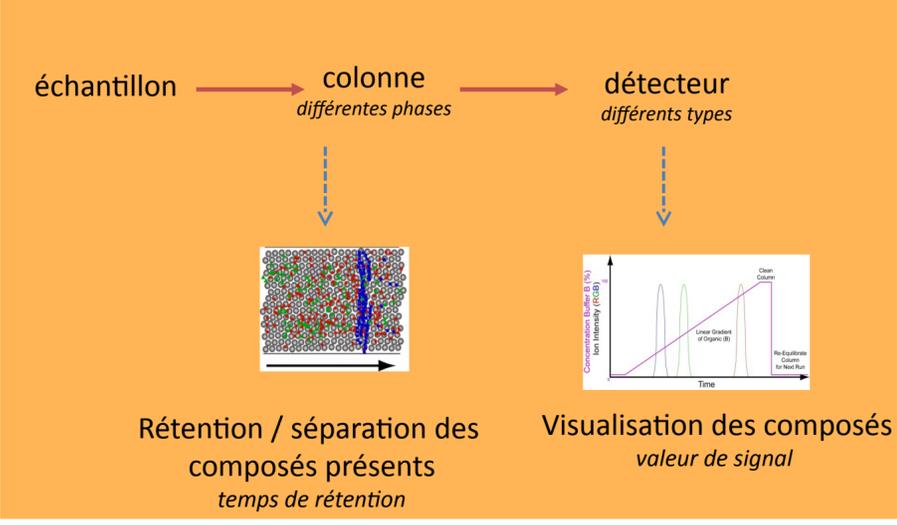
Puis, au bout d'une heure, nous avons rajouté 50µL d'acide chlorhydrique (HCl) à 1M pour stopper la réaction de dérivation car le pH est devenu acide.

Ensuite, nous avons centrifugé les solutions afin d'éliminer toute les particules solides qui restent au fond de l'eppendorf.

Nous avons prélevé 80µL du surnageant (partie liquide au-dessus) que nous avons mis dans Vial HPLC, pour faire une chromatographie, équipé d'un réducteur de volume que l'on a bouché avec un bouchon fendu permettant à l'aiguille de traverser plus facilement.

Nous avons ensuite disposé les vials dans la partie échantillonneur de l'HPLC puis les injections ont été programmées et gérées automatiquement par un logiciel communicant avec l'HPLC.

Fonctionnement de l'HPLC



Vial HPLC

Analyse

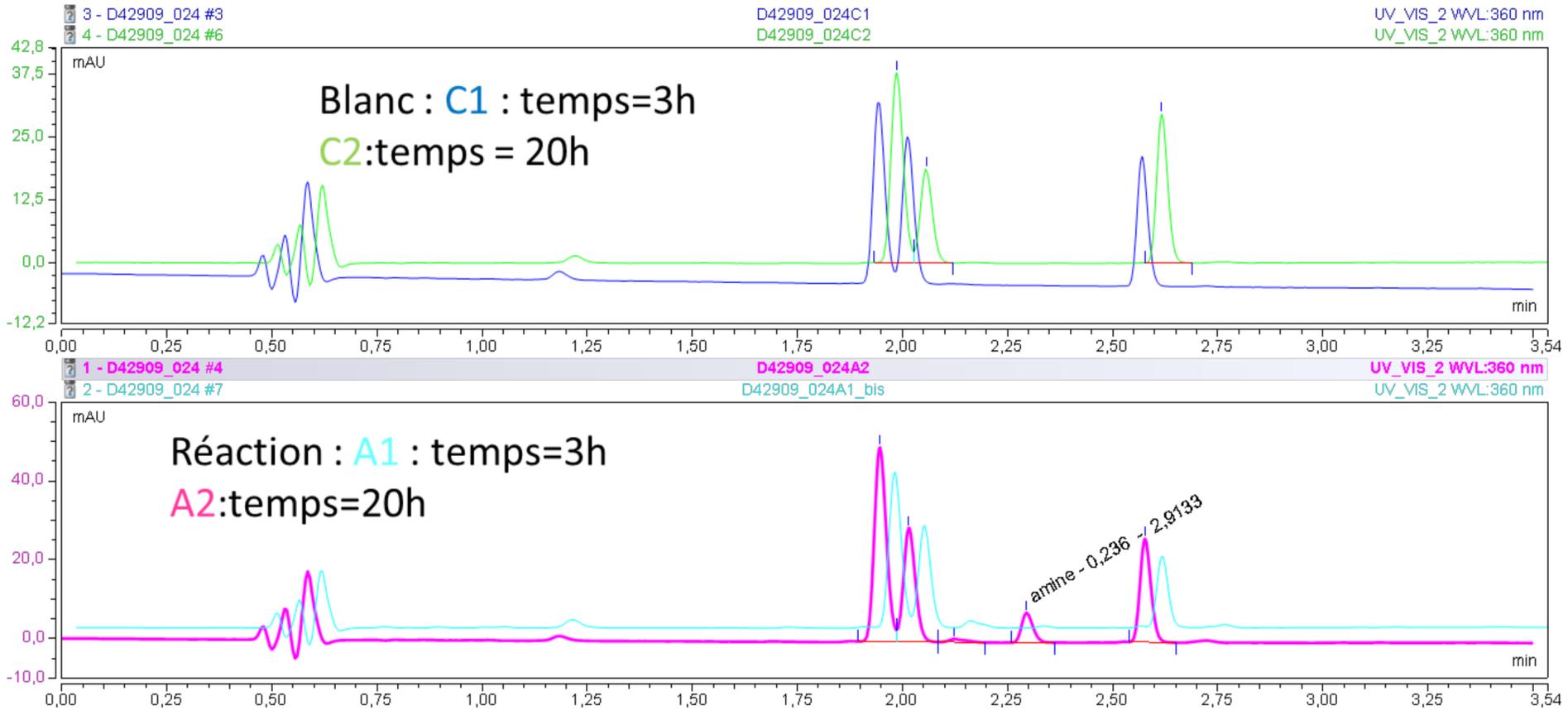
Nous avons observé que sur les chromatogrammes des expériences témoin, il n'y avait pas de pic correspondant à l'amine. Donc c'est l'enzyme qui est responsable de la transformation du substrat.

Nous avons observé que sur les chromatogrammes des expériences A et B qu'il y avait une évolution des aires de l'amine entre 3h et 20h. Ces aires ont été reportées sur une courbe de calibration de l'amine dérivée établie préalablement au laboratoire afin de déduire la quantité d'amine présente. On constate qu'à 3h il y a moins de 5% de conversion et qu'à 20h, la conversion est de 29%. La réaction n'est donc pas terminée mais a bien évolué pendant 20h. Il aurait fallu attendre 24h de plus pour que la réaction soit quasi-totale.

Par la suite, il va falloir améliorer les capacités de l'enzyme pour que la réaction soit plus courte et utilisable dans l'industrie.



Poubelles de tri des déchets toxiques et contaminés



Chromatogramme des résultats de l'expérience après vingt-quatre heures (moitié du temps)

Un grand merci à Ombeline Mayol pour sa patience, entre autres.