

Méthodes d'immobilisation des enzymes

Introduction :

Dans les cellules vivantes, les enzymes sont immobilisées dans des compartiments bien définis (membrane plasmique, noyau, mitochondrie, cytosol, lysosomes, réticulum endoplasmique,...), soit associées à des membranes, soit fixées aux parois cellulaires, chez les végétaux.

Leur comportement diffère de celui des enzymes en solution. Il ne s'agit plus d'une catalyse homogène, mais d'une catalyse hétérogène.

Depuis plus de 30 années (à partir des années 1980), diverses enzymes ont été immobilisées artificiellement sur un support solide afin de les utiliser en biotechnologie et pour servir de modèles aux enzymes immobilisées *in vivo* afin de déterminer les lois cinétiques qui régissent leur fonctionnement.

Historique :

En 1916, Nelson et Griffon ont découvert que l'invertase « a montré la même activité une fois observée sur un solide (charbon de bois ou hydroxyde d'aluminium) ». Cette découverte était la première de diverses techniques d'immobilisation d'enzyme actuellement disponibles. Jusqu'ici, plus de 5000 publications et brevets ont été édités sur des techniques d'immobilisation d'enzymes.

1. Définitions :

Catalyse homogène :

La catalyse est dite homogène lorsque le catalyseur est dans la même phase que les réactifs ; donc le mélange réactionnel est homogène.

Catalyse hétérogène :

La catalyse est dite hétérogène lorsque le catalyseur, les réactifs et les produits ne sont pas dans la même phase. Ces réactions interviennent à l'interface et font appel à des notions de chimie de surface.

Catalyse supportée :

Dans les processus de catalyse supportée, des catalyseurs homogènes sont liés à des supports solides insolubles de façon à profiter de la sélectivité, l'efficacité, la simplicité de traitement en fin de réaction et de la recyclabilité des catalyseurs homogènes.

Enzyme immobilisée :

Est une enzyme attachée à un matériel inerte et insoluble par des moyens physico-chimiques. Dans ce cas, les enzymes sont tenues en place dans toute la réaction, suivant qu'elles sont facilement séparées des produits et peuvent être employées encore.

Immobilisation des enzymes :

Est un ensemble de méthodes chimiques ou physiques par les quelles on fixe certaines enzymes à des supports afin d'augmenter la stabilité de ces enzymes et d'en prolonger l'existence en les immobilisant, pour en conserver l'activité.

2. Intérêt de l'immobilisation des enzymes :*Pourquoi immobiliser les enzymes ?*

- L'obtention des enzymes libres (extraction et purification) est coûteuse ;
- Instabilité des enzymes en solution ;
- Recyclage difficile des enzymes libres après catalyse (séparation du produit de réaction)
- Catalyse discontinuée.

Donc l'immobilisation permet :

- Récupération et réutilisation des enzymes ;
- Stabilisation (face à la dénaturation thermique, pH extrêmes, amélioration de conservation) ;
- Mécanisme réactionnel de l'enzyme n'est pas modifié ;
- Les produits obtenus sont d'une plus grande pureté et faciles à récupérer ;
- Réduction voir élimination des processus d'inhibition ;
- Parfois, l'enzyme est peu ou pas purifiée ;
- Catalyse continue dans le temps donc la productivité est fortement augmentée.

3. Différences entre enzyme libre et enzyme immobilisée :

Enzyme libre	Enzyme immobilisée
~ Isolée de l'environnement cellulaire ;	~ Fixée ou confinée ;
~ Toutes les molécules sont identiques ;	~ Toutes les molécules ne sont pas identiques ;
~ L'environnement est continu ;	~ L'environnement est discontinu ;
~ Catalyse homogène (cinétique Michaélienne différente de <i>in situ</i>)	~ Catalyse hétérogène (proche de <i>in situ</i>)

4. Méthodes d'immobilisation des enzymes :

Les enzymes peuvent être immobilisées par rétention physique ou par liaison chimique. Ces deux méthodes peuvent être combinées pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme :

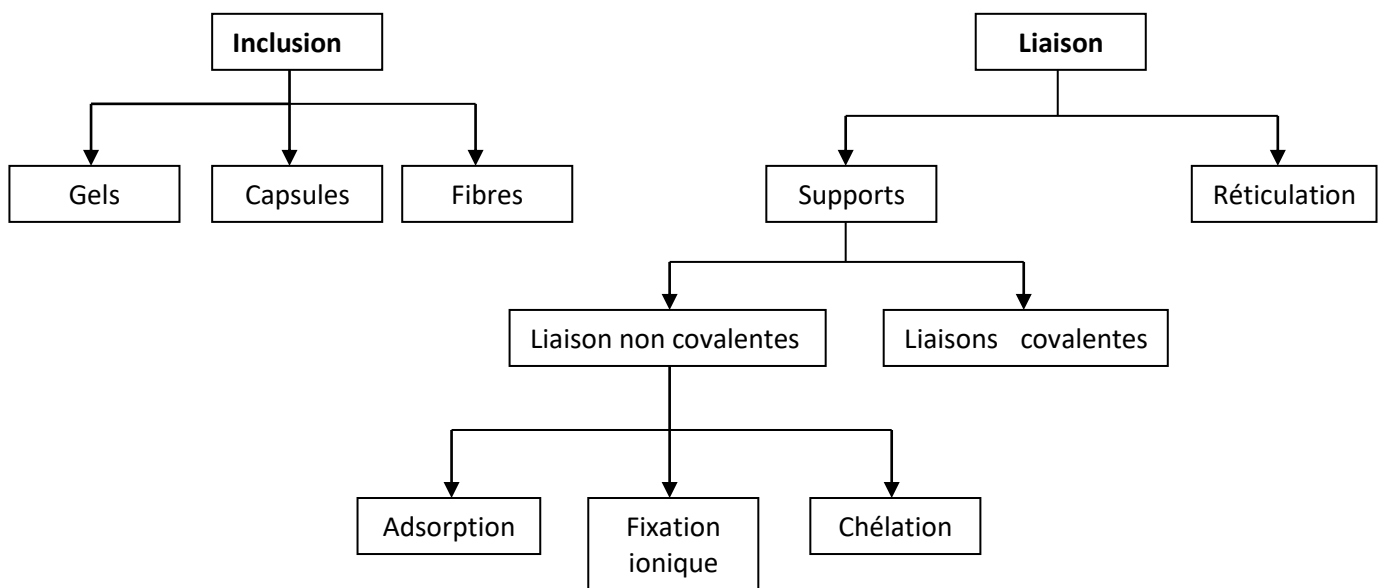
➤ La liaison chimique :

Cette liaison s'établit entre l'enzyme et le support. L'immobilisation chimique présente souvent l'avantage de stabiliser la protéine et de permettre une utilisation prolongée.

➤ La rétention physique :

Elle exploite la grande différence de taille entre l'enzyme et le substrat ; d'où l'idée de créer une barrière semi-perméable pour retenir l'enzyme. Elle peut être un réseau, une capsule ou une membrane.

En fait, les méthodes citées dans la littérature sont très nombreuses. Cependant, il existe quatre grandes méthodes couramment utilisées pour immobiliser des enzymes :



4.1. Inclusion (confinement) :

Dans cette méthode, les enzymes sont retenues dans une matrice poreuse. L'enzyme est dispersée dans une solution homogène de monomères ou d'émulsion. La polymérisation du monomère conduit à la formation d'un réseau au sein duquel l'enzyme est emprisonnée d'une manière purement physique. La réaction de polymérisation doit être réalisée dans des conditions les moins dénaturantes possibles.

Le polymère peut être : polyacrylamide, polyéthylène glycol, polyvinyl pyrrolidone, amidon. La matrice peut être inorganique tel que l'argile.

4.1.1. Inclusion dans une matrice :

- Gels de polyacrylamide : l'acrylamide est le monomère de départ et le N,N-méthylène bis acrylamide l'agent de réticulation.
- Gels d'amidon.
- Gels de dextran (Sephadex).
- Gels de polyalcool vinylique : l'alcool vinylique est polymérisé, en présence d'enzymes, par exposition à des rayonnements gamma ou à des faisceaux d'électrons accélérés.
- Autres gels : gels de silice, des résines siliciées ou le polyvinylpyrrolidone, alginates, carraghénanes.

4.1.2. Inclusion dans une microcapsule :

Cette technique s'applique aussi bien à la préparation de membrane de collodion que de nylon (polystyrène, dérivés de silicone et d'éthylcellulose, polyurée). La taille des capsules obtenues varie de quelques microns à quelques centaines de microns.

4.1.3. Avantages et inconvénients de l'inclusion :

- ✓ Cette technique est peu coûteuse ;
- ✓ La totalité de la masse d'enzyme est immobilisée ;
- ✓ Les réactions de polymérisation sont, en général, bien connues, leur mise en œuvre peut être bien contrôlée et se déroulent en une seule étape ;
- ✓ L'intégrité moléculaire de l'enzyme est préservée au cours de l'immobilisation ;
- ✓ La technique permet d'immobiliser n'importe quelle enzyme ;
- ✓ L'inclusion semble favorable pour l'immobilisation des enzymes oligomériques et des systèmes multienzymatiques ;

Inconvénients :

- ✓ Les conditions d'obtention du polymère peuvent être plus ou moins dénaturantes (solvants, pH);
- ✓ La distribution des diamètres des pores est difficilement contrôlable (perte continue d'enzyme) ;
- ✓ La localisation de l'enzyme à l'intérieur du polymère implique une limitation de diffusion et des problèmes d'encombrement stérique ;
- ✓ Les propriétés mécaniques des gels ne permettent pas la mise en œuvre dans des grands réacteurs.

4.2. Adsorption :

Dans cette méthode, les enzymes sont retenues à la surface d'un support insoluble minéral ou organique par établissement d'interactions non covalentes entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et du support. Elle est obtenue par la mise en contact du support et des enzymes pendant une période définie.

Les groupements chimiques réactifs sur la surface de l'enzyme utilisés pour l'immobilisation :

très utilisés (++) pour l'immobilisation	NH ₂ (Lys)
Fréquemment utilisés (+)	NH ₂ (N terminal) COOH (Asp, Glu, C terminal)
Utilisés parfois (±)	OH (Ser, glucide)
Non utilisés (-)	Trp, Tyr, Mrt, Cys, Arg

4.2.1. Les types de liaisons intervenant dans l'adsorption :

- Interactions de Van der Waals : il s'agit d'une interaction électrostatique entre atomes ou molécules qui résultent des variations de distribution électronique sur les orbitales conduisant à l'apparition d'un dipôle. Sont des interactions faibles qui dépendent de la distance intermoléculaire.
- Interactions hydrophobes : c'est la tendance de deux ou plusieurs groupes apolaires à s'agréger en expulsant des molécules d'eau dans de leur environnement immédiat.
- Liaison hydrogène : c'est une liaison électrostatique qui résulte de la polarisation des liaisons établies entre un atome d'hydrogène et un autre atome plus électronégatif.
- Transfert de charges : ces interactions se font par transfert plus ou moins marqué de doublets d'électrons d'une molécule à une autre (entre substances nucléophiles et d'autres électrophiles).
- Echange de ligands : ce mécanisme se traduit par la substitution par la molécule adsorbée à une ou plusieurs molécules de ligands de l'adsorbant. La molécule adsorbée (enzyme) doit être un agent chélatant plus puissant que le ligand déplacé.
- Echanges d'ions : sont dus aux charges ioniques des résidus acides aminés acides et basiques portés par les enzymes. Ces interactions sont très dépendantes du pH du milieu à cause du caractère amphotère des acides aminés.
- Chimiosorption : il s'agit de la formation d'une liaison chimique adsorbat-adsorbant. C'est un processus exothermique.

4.2.2. Les paramètres influant sur l'adsorption :

- Concentration en protéines : d'une façon générale, la masse liée au support augmente avec la concentration de l'espèce à adsorbé jusqu'à ce que l'adsorbant soit saturé.
- Temps de contact : la vitesse d'adsorption est déterminée par les caractéristiques physico-chimiques de l'adsorbant et de la protéine adsorbée (dimensions de la molécule et des particules du support, présence et nature des charges électriques,...). Dans les conditions habituelles d'adsorption, les temps nécessaires pour l'immobilisation d'une préparation enzymatique sont courts et n'excèdent pas quelques heures.

- pH : les modifications du pH interagissent essentiellement avec des liaisons ioniques. Elles provoquent un changement de la nature des charges portées par le support et par l'enzyme suivant la valeur du pK des groupes ionisables. Il est constaté que l'adsorption est maximale au voisinage du point isoélectrique de la protéine adsorbée.
- Composition du milieu : joue un rôle favorable ou non à l'adsorption. Il s'agit principalement de l'influence des solvants organiques et des sels.
- Température : en général, la masse de protéines adsorbées sur un support augmente avec la température (il faut éviter toute dénaturation irréversible).
- Quantité d'adsorbant : l'augmentation de la quantité d'adsorbant permet d'immobiliser la totalité de la masse d'enzyme contenue dans une solution.

4.2.3. Les supports :

- Supports minéraux argileux (alumino-silicate) : il s'agit d'une matière première très abondante et peu coûteuse. Parmi les mécanismes qui interviennent dans l'adsorption des enzymes sur ces supports figurent les liaisons ioniques et des liaisons plus faibles.
- Verre poreux, quartz (dioxyde de silicium) : dans ce cas, il existe un optimum dépendant de la taille de la molécule d'enzyme et du diamètre des pores ; la masse d'enzyme adsorbée augmente avec l'aire spécifique jusqu'à une limite correspondant à des diamètres de pore trop faibles pour permettre l'entrée de l'enzyme. Les liaisons qui interviennent dans la rétention des protéines sont principalement des liaisons ioniques. Les liaisons hydrogènes peuvent intervenir. Il existe également du verre poreux portant des groupes échangeurs d'ions.
- Echangeurs d'ions : il s'agit essentiellement de résines, de dérivés de la cellulose et des dextrans, agarose, amberlite.
- Collagène.
- Autres supports : il s'agit de la gluténine, collodion, le charbon actif, l'hydroxyde d'aluminium, des oxydes de titane poreux, un complexe sepharose-concavoline A, la concavoline A, un gel de polyacrylamide (biogel), les gels de silice, du polyuréthane, l'amidon, gel du phosphate de calcium (l'hydroxyapatite), un complexe chitine-cellulose.

4.2.4. Avantages et inconvénients de l'adsorption :

- ✓ La préparation des complexes est des plus faciles ;
- ✓ Malgré leur nature, les liaisons établies entre les molécules d'enzyme et le support sont suffisamment solides pour que les modifications de conditions (pH, force ionique) ne provoquent le lessivage de l'enzyme ;
- ✓ Il est facile de régénérer le support (réversible) ;

Inconvénients :

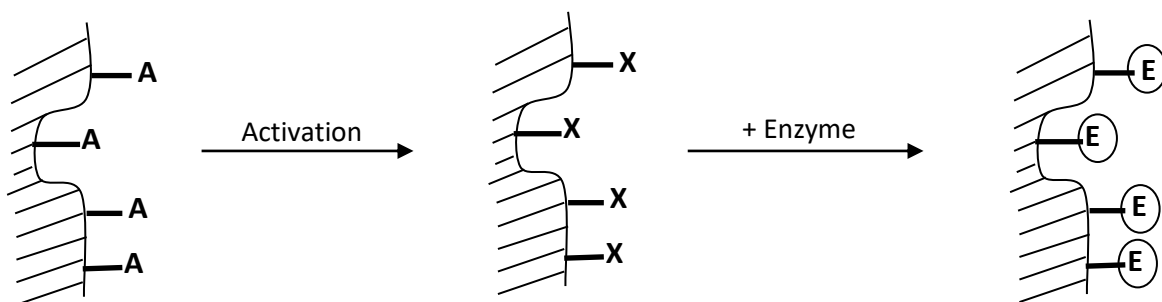
- ✓ La désorption de l'enzyme est relativement facile en modifiant les conditions de pH et de force ionique ;

- ✓ Certains adsorbants posent des problèmes de colmatage (dans les réacteurs) ;
- ✓ Problèmes d'encombrement stérique ;
- ✓ Mauvaise orientation de l'enzyme ce qui entraîne une perte d'activité.

4.3. Liaison covalente :

Cette immobilisation est réalisée par l'intermédiaire de liaisons irréversibles et covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupements réactifs du support (de type carboxylique COOH, amine NH₂ primaire, moins fréquemment hydroxyle OH ou thiol SH).

Dans cette méthode, il est nécessaire d'activer soit les groupements de l'enzyme, soit ceux du support. Comme l'activation de l'enzyme engendre une perte d'activité il faut donc activer le support :

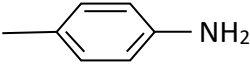


Les groupes fonctionnels des enzymes	
Fonctions α et ϵ -aminées (-NH ₂)	Acides aminés terminaux, lysine
Fonctions α , β et γ -carboxyliques (-COOH)	Acide aspartique et acide glutamique
Fonctions thiols (-SH)	Cystéine
Noyaux phénoliques	Tyrosine
Fonctions hydroxyles (-OH)	Serine, thréonine
Noyau imidazole	Histidine

Afin de lier l'enzyme au support par liaisons covalentes, on fait apparaître sur le support des fonctions chimiques réactives.

Ces dernières peuvent être créées par réaction directe (cellulose + bromure de cyanogène) ou par greffage de composé bifonctionnel (bras espaceur) permettant de fixer l'enzyme à une certaine distance du support et d'avoir une meilleure accessibilité de l'enzyme à son substrat.

4.3.1. Les principales méthodes d'activation :

Groupe fonctionnel au niveau du support	Méthodes d'activation	Groupe fonctionnel au niveau de l'enzyme
-COOH	Carbodiimide / Chlorure d'acide / azoture	-NH ₂
-OH	Chlorotriazine / Halogénures de cyanogène / halogénéation / silanes	-NH ₂
-NH ₂	Glutaraldéhyde / autres réactifs plurifonctionnels	-NH ₂
-NH ₂	Carbodiimide / Isothiocyanate	-COOH
	Isocyanate / Isothiocyanate / Sels de diazonium	-tyrosine
-SH	Ponts disulfures	-SH
-SH	Acide 3,maleimidopropionique / N, hydroxysuccinimide	-NH ₂

4.3.2. Les supports :

Les supports généralement utilisés pour l'immobilisation peuvent être classés en deux grands groupes :

1. **Les supports organiques** : Ce type de supports est chimiquement activé par différentes techniques, ce qui constitue l'un de leurs principaux avantages car ils permettent la fixation d'enzyme par différentes voies.
2. **Les supports inorganiques** : Ils sont généralement plus stables (résistance à l'usure, aux agents chimiques et aux bactéries). Mais la fixation covalente sur ces supports est difficile à cause de leur faible réactivité.

Types de support		Groupes réactifs	
Substances organiques	Polyosides	Cellulose	OH
		Carboxyméthylcellulose	COOH
		Diéthylaminocellulose	OH
		Para-aminobenzylcellulose	φ-NH ₂
		Autres dérivés de la cellulose	φ-NH ₂ , OH, CHO
		Dextrans et agarose	OH
		Amidon dialdéhyde	CHO
		Amidon	OH
		Acide polygalacturonique	COOH
	protéines	Collagène	NH ₂ , COOH

	Polymères synthétiques	Polyaminoacides		COOH, φ -NH ₂	
		Polyvinyliques (éthylène/anhydride maléique)		Anhydride	
		Polyacryliques	Polyacrylamide		NH ₂
			Copolymère d'acrylamide		Variable
			Polyacrylates		COOH
			Polymère et copolymère d'acide méthacrylique		COOH
			Polystyrène et dérivés		φ -X
Polyamide (nylon)		NH ₂			
Substances minérales	Verre poreux			OH	
	Alumino-silicates			OH	
	Oxydes métalliques			OH	
Supports mixtes	Supports magnétiques			Variable	
	Supports organo-minéraux			Variable	

4.3.3. Avantages et inconvénients des méthodes de fixation par covalence :

- ✓ L'immobilisation par covalence se caractérise par la solidité du lien enzyme-support (enzymes chères ou enzymes à libération exclue).
- ✓ Acquisition de nouvelles propriétés quant à la résistance des enzymes.
- ✓ Les quantités d'enzymes immobilisées sont plus faibles, ce qui n'implique pas nécessairement une activité spécifique plus faible.
- ✓ Il y a une grande variété de supports.
- ✓ La rigidification de la structure tridimensionnelle des supports permet une meilleure stabilité.

Inconvénients :

- ✓ Complexité des méthodes (introduction des groupes réactifs) ;
- ✓ Les possibilités de régénération *in situ* sont très limitées ;
- ✓ Modification de la structure de l'enzyme ; d'où perte d'activité ;
- ✓ Impossible de prévoir le rendement de greffage ;
- ✓ Les supports organiques sont susceptibles d'être attaqués par les microorganismes et leurs propriétés mécaniques sont peu satisfaisantes.

4.4. Réticulation :

C'est un procédé chimique qui permet d'immobiliser les enzymes en absence de support, par la mise en jeu de liaisons intermoléculaires de type covalent entre l'enzyme et un agent bi- ou multifonctionnel (agent réticulant).

Ce couplage est basé sur la réaction des groupements fonctionnels de l'agent réticulant avec les groupements amines des enzymes pour former des pontages covalents, afin d'obtenir des structures de haut poids moléculaire qui peuvent être insolubles. Il existe deux modes de réticulation :

- **Réticulation directe :**

Aboutit à des enzymes immobilisées stables mais la perte d'une partie de leur activité du fait de la rigidification de leur structure tridimensionnelle.

- **Réticulation indirecte (co-réticulation) :**

Pour éviter la perte d'activité, l'enzyme est co-réticulée avec une protéine inactive telle que l'albumine du sérum bovin (BSA).

Caractéristiques :

- ✓ Il existe plusieurs réactifs (agents réticulants) pour cette méthode d'immobilisation : glutaraldéhyde, diazobenzidine, hexaméthylène, diisocyanate et toluène diisothiocyanate.
- ✓ Glutaraldéhyde est l'agent réticulant le plus utilisé.
- ✓ L'immobilisation par réticulation est une technique simple et couteuse.
- ✓ L'inconvénient de cette méthode est le risque de dénaturation de l'enzyme par des réactifs polyfonctionnels.

5. Comparaison entre les méthodes :

Caractéristiques	Adsorption	Liaison covalente	Réticulation	Inclusion
<i>Préparation</i>	Simple	Difficile	Difficile	Simple
<i>Coût</i>	Faible	Elevé	Elevé	Modéré
<i>Force de liaison</i>	Variable	Forte	Forte	Faible
<i>Fuite d'enzyme</i>	Oui	Non	Non	oui
<i>Applicabilité</i>	Large	Sélective	Large	Très large
<i>Problèmes connus</i>	Elevé	Faible	Elevé	Elevé
<i>Effet de matrice</i>	Oui	Oui	Oui	Non
<i>Barrières de large diffusion</i>	Non	Non	Oui	Oui
<i>Protection microbienne</i>	Non	Non	Oui	Oui

6. Choix d'une technique :

- Le choix d'une technique d'immobilisation dépend de l'application finale donnée à l'enzyme ;
- La liaison covalente de l'enzyme à une matrice est généralement la technique d'immobilisation la plus stable ;
- La capacité de la matrice ainsi que sa stabilité mécanique et chimique, son coût, la difficulté de l'activation du support sont aussi importants dans le développement d'un système d'enzyme immobilisée ;
- Il faut remarquer qu'il n'existe pas « la meilleure » technique.