

Chapitre 4 : Immobilisation d'enzymes

L'immobilisation des enzymes permet de stabiliser celles-ci au cours de leur utilisation, de pouvoir les réutiliser et de séparer l'enzyme des produits de la réaction enzymatique.

L'immobilisation des enzymes est une technique utilisée pour fixer des enzymes sur un support solide ou dans une matrice afin d'améliorer leur stabilité et leur réutilisation. Cette technique est largement utilisée dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires et biotechnologiques.

L'immobilisation d'enzymes dans des matrices solides ou dans des gels permet la séparation de la protéine et du produit de réaction, dans deux phases différentes, empêchant la contamination avec le produit. Ce procédé permet alors la réutilisation de la biomolécule. Les matériaux d'immobilisation les plus utilisés sont des matériaux chimiquement inertes, insolubles et rendant insoluble l'enzyme. Ce sont plus particulièrement des matrices polymériques et inorganiques mono, bi, ou tridimensionnelles.

Une enzyme immobilisée est une enzyme, à mobilité restreinte, fixée sur un matériau inerte et insoluble, tel que l'alginate de calcium. Cela peut fournir une résistance accrue aux changements de conditions telles que le pH ou la température.

Enzyme immobilisée : Une enzyme immobilisée est une enzyme liée (attachée) par des liaisons physico-chimiques en surface ou à l'intérieur d'un support.

2. Méthodes d'immobilisation des enzymes

Il existe différentes techniques d'immobilisation pouvant être aussi bien chimiques que physiques. On peut notamment citer cinq méthodes, couramment utilisées, présentant chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Principales méthodes d'immobilisation des enzymes sont :

- L'adsorption sur support inerte
- Le piégeage physique dans des gels ou dans des microencapsulations
- La réticulation avec des réactifs bi ou multivalents
- La liaison covalente entre un porteur et des groupes fonctionnels de l'enzyme.

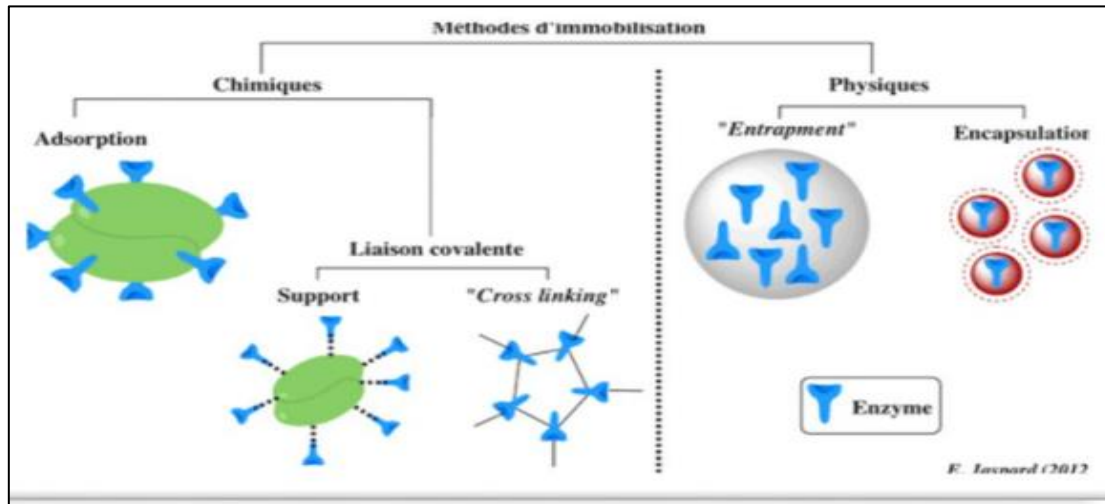


Figure 1 : Schéma représentatif les différentes méthodes d'immobilisation d'enzymes

Le choix de la technique dépend :

- Du type d'enzyme utilisée,
- Du transducteur et de l'environnement dans lequel le biocapteur fonctionne.
- Aussi des stabilités mécaniques et chimiques de la matrice et de son coût.
- De l'application finale donnée à l'enzyme

2.1. Immobilisation par adsorption :

L'adsorption repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface d'immobilisation. L'adsorption est due à des interactions de type ionique, hydrophobe ou encore aux liaisons hydrogène entre l'enzyme et la surface du support. L'adsorption constitue la méthode la plus économique d'immobilisation des enzymes, c'est la plus simple et la plus rentable.

Elle consiste à assurer la rétention de la molécule enzymatique à la surface d'un support insoluble, par interaction faible entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et du support. L'interaction enzyme-support pourra impliquer l'ensemble des liaisons non covalentes ou secondaires de bas niveau énergétique tel que les liaisons de Vander Waals et des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles).

Les supports adsorbants utilisés sont très variés, tant du point de vue de leur structure chimique que du point de vue de leurs propriétés physiques (densité, granulométrie, porosité, etc.):

- **Les supports organiques :** comprennent les polysides comme l'acétate de cellulose, nitrate de cellulose, dextrane, agarose, alginate et les polymères comme le polystyrène, le polyéthylène...

- **Les supports inorganiques (support minéraux) :** comme la kaolinite, le verre poreux, des oxydes et des sels minéraux. Ce sont généralement plus stables, résistent l'usure, aux agents chimiques et aux bactéries.



Les supports utilisés :

Les supports organiques : Comprennent les polysides comme l'acétate de cellulose, nitrate de cellulose, agarose et les polymères comme le polystyrène, le polypropylène.

Les supports inorganiques (support minéraux) : Sont généralement plus stables, résistent aux agents chimiques et aux bactéries. Les matériaux actifs peuvent être :
Les argiles.

Verre poreux et silice poreuse

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de l'inclusion dans un gel

Avantage	Inconvénient
<ul style="list-style-type: none"> • Elle permet en une seule étape d'immobiliser la totalité de l'enzyme • Elle ne présente aucun caractère de Spécificité et est applicable à n'importe quelle enzyme. • Elle ne met pas en jeu les groupement Actifs de l'enzyme. • Economique et facile 	<ul style="list-style-type: none"> • La localisation de l'enzyme à l'intérieur du polymère pose des problèmes stériques (efficacité limitée par accès délicat du substrat vers l'enzyme et du produit en dehors du polymère). • Les conditions de polymérisation (Exp. pH élevé) peuvent s'avérer dénaturantes pour l'enzyme. • Méthode applicable que pour des substrats de petites tailles.

2.2. Immobilisation par liaison covalentes

Il s'agit d'établir des liaisons covalentes entre l'enzyme et le support utilisé, tout en préservant l'activité catalytique de l'enzyme. Les principaux supports utilisés sont les suivants :

- Polyosides (dextrane, agarose, cellulose).
- Protéine (collagène).
- Polymères synthétiques (polyacrylamide).
- Silice et verre poreux.

Ces liaisons covalentes intermoléculaires donnent des composés de haut poids moléculaire qui sont insolubles dans l'eau. Il est également possible de co-réticuler une enzyme et une protéine inactive, par exemple, **l'albumine**.

L'utilisation de cette protéine permet, par une meilleure répartition des masses des différentes protéines, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues. La réticulation est également utilisée pour accroître la stabilité du complexe enzyme-support obtenus après adsorption ou inclusion.

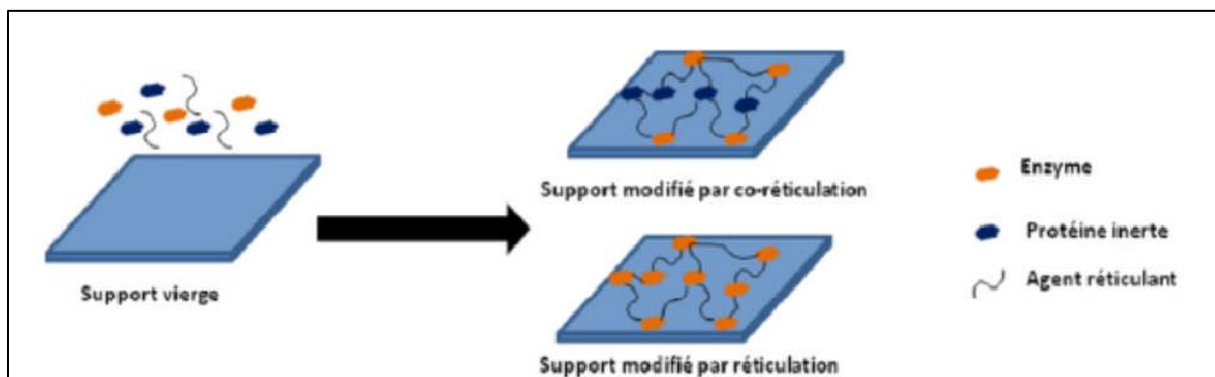


Figure 2 : Réticulation et co-réticulation des enzymes

On peut diviser les méthodes d'immobilisation d'enzymes par liaison covalente en deux groupes :

2.2.1. Réticulation ou glutaraldéhyde (sans support) :

La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dit réticulants qui vont permettre de lier les enzymes entre elles par des liaisons chimiques. Il existe deux méthodes de réticulation,

- Soit les enzymes sont reliées entre elles par des agents réticulant de façon directe,
- Soit en plus de l'agent réticulant une protéine inerte peut être utilisée afin de faciliter ou améliorer la réticulation.

C'est un procédé d'association des différentes unités biocatalytique de protéines à l'aide d'un agent réticulant.

2.2.2. Immobilisation par liaisons covalentes sur support :

Le principe de cette méthode d'immobilisation est de faire réagir un groupement fonctionnel libre de l'enzyme avec un groupement fonctionnel du réactif.

En général, les groupements fonctionnels du réactif sont des fonctions carboxyliques, thiols, hydroxyles ou encore amines. Ces groupements sont très peu réactifs et doivent de ce fait être activés afin de pouvoir réagir avec les groupements de l'enzyme, n'intervenant pas dans la catalyse enzymatique, dans des conditions dites douces afin de ne pas dénaturer la biomolécule.

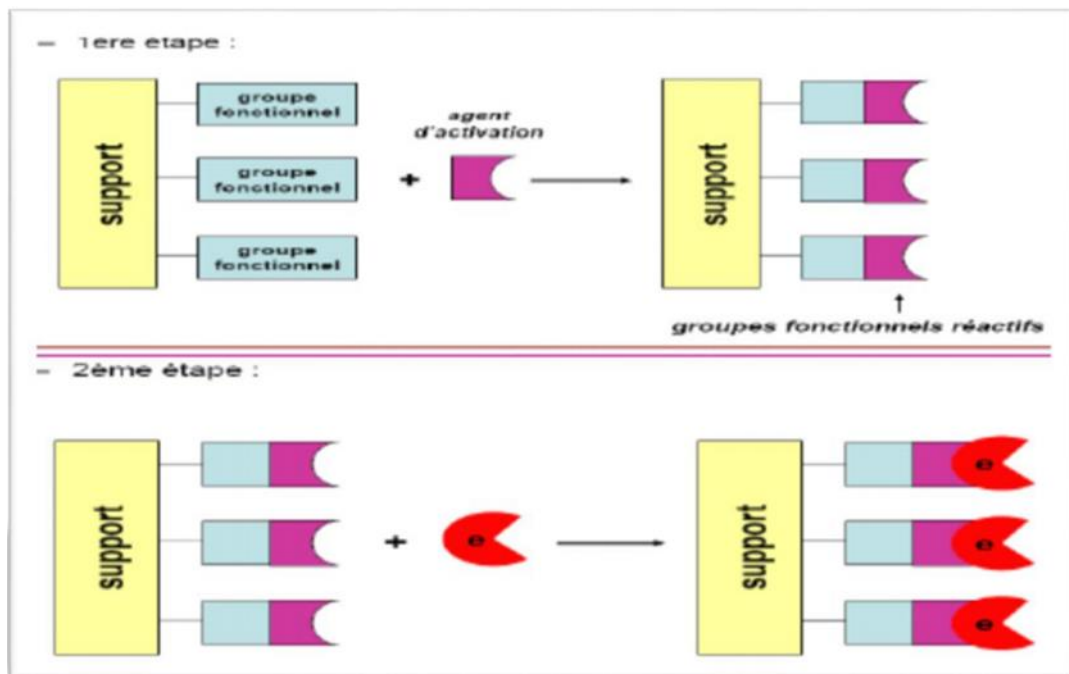
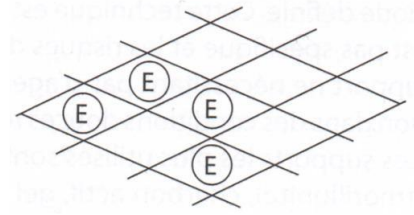


Figure 3. Immobilisation par liaisons covalentes sur support, étape 1 : activation du support, Étape 2 : fixation de l'enzyme.

2.3. Immobilisation d'enzyme par inclusion ou l'encapsulation :

Le principe de *l'encapsulation* est de fixer les enzymes dans une matrice (figure). L'immobilisation se fait de manière physique et pas de manière chimique.



La matrice doit permettre la diffusion des petites molécules seulement afin que les enzymes ne puissent pas s'en échapper. Ces matrices peuvent être inorganiques (gels de silice), organiques, polymères (polyacrylamide, polyuréthanes...) ou composites (pâte de carbone).

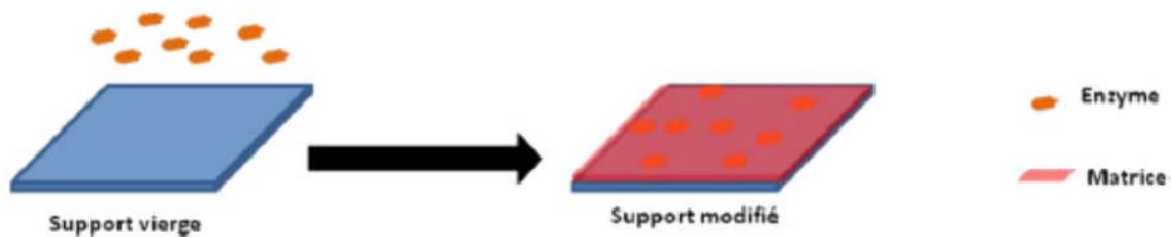


Figure 5. L'encapsulation les enzymes dans une matrice.

Par inclusion, Les molécules d'enzyme sont retenues dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau « réseau tridimensionnel d'une matrice », ou emprisonnées dans des microcapsules délimitées par une membrane semi perméable dont les pores sont suffisamment larges pour permettre le passage des molécules du substrat ou des produits de la réaction.

Les principaux avantages de ces méthodes d'immobilisation sont qu'elle est économique, facile à mettre en œuvre et peut s'appliquer à un nombre élevé d'enzymes. Cependant, l'enzyme peut diffuser à travers la matrice au cours de l'utilisation et de plus elle n'est applicable que pour des substrats de petite taille. Par ailleurs, les groupements actifs de l'enzyme peuvent réagir avec la matrice et donc entraîner une diminution de l'activité catalytique de celle-ci.

3. Propriétés des enzymes immobilisées

Propriétés physico-chimiques : Une des propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation est :

- L'amélioration de la stabilité dans le temps.
- La résistance vis-à-vis de la dénaturation.

Propriétés cinétiques : Les propriétés cinétiques d'une enzyme immobilisée ne sont pas parfaitement corrélées à celles de l'enzyme libre. La diminution du transfert de masse du substrat dans le support résultant de l'immobilisation, augmente la valeur du K_M de l'enzyme.

De plus, l'orientation stérique de l'enzyme fait que le site actif ne peut être que partiellement accessible, voire inaccessible au substrat : en d'autres termes, l'enzyme est maintenue dans une conformation telle que la fonction catalytique est partiellement ou totalement bloquée

4. Domaines d'applications des enzymes immobilisées :

Grâce à leur grande spécificité d'action (bio spécificité), les enzymes immobilisées constituent un outil de fabrication et d'analyse important dans de nombreux secteurs médical la recherche et contrôle et de la production industrielle de métabolites.

4.1. Analytique :

✓ **En médecine**, des papiers imprégnés des solutions enzymatiques sont utilisés dans certains tests cliniques (dosage du cholestérol, de l'acide urique, des hormones...).

✓ **Les techniques ELISA** utilisent également des enzymes fixées (liées à des anticorps eux-mêmes fixés par adsorption sur les parois de petites cuvettes en plastiques), destinées à des dosages cliniques.

4.2. Thérapeutique :

Le traitement de certains troubles pathologiques (dus à une déficience enzymatique) par l'administration d'enzymes se heurte à des difficultés : Destruction par les protéases ou hydrolyse par les macrophages. Dans ce cas l'enzyme est associée à une molécule protectrice (albumine, dextrine, polyéthylène glycol), ou alors incluse dans des microcapsules.

4.3. Agro-alimentaire :

✓ Amélioration des propriétés de boissons alimentaires : viscosité, clarification, digestibilité, goût, etc.

✓ Amélioration de la production des produits lactés