

### Enzymes immobilisées en structure : étude et applications

par G. Broun

(Professeur à la Faculté de Médecine de Rouen, Département de génie biologique, Université de technologie, 60206 Compiègne)

L'unité fonctionnelle en biologie est la cellule. Chaque cellule animale, végétale ou bactérienne est un être organisé et très finement structuré.

Dans cette organisation, les enzymes jouent un rôle essentiel, en catalysant pratiquement toutes les réactions biochimiques de la cellule.

Seule une petite minorité d'enzymes est sécrétée par la cellule pour fonctionner dans l'espace extra-cellulaire. La plus grande part d'entre elles fonctionne dans la cellule, c'est-à-dire au sein d'une structure et d'une organisation. Parmi ces dernières, beaucoup sont liées en permanence à des particules ou des membranes intra-cellulaires.

La biochimie, et plus particulièrement l'enzymologie, a progressé du jour où les moyens ont été mis au point pour dégrader la cellule et la ramener à des éléments moléculaires simples sans altérer leurs propriétés spécifiques. D'où l'importance des techniques développées depuis l'ère pasteurienne par Buchner, Meyerhof, Warburg, Krebs et par tous les autres pionniers de la biochimie moderne. Cette désorganisation préalable de la cellule s'explique par un souci de simplification et de systématisation qui a seul permis l'expansion récente des connaissances biochimiques. Mais la vision des mécanismes cellulaires qui en est résultée, en particulier dans le domaine de la cinétique enzymatique, s'est trouvée biaisée du fait que les molécules structurelles et fonctionnelles n'étaient plus étudiées dans leur contexte naturel.

Au stade où nous sommes de la connaissance biologique, il est encore trop tôt pour appréhender *directement* les mécanismes physicochimiques qui régissent le fonctionnement des structures cellulaires, en raison de l'extrême complexité de ces systèmes sub microscopiques que nos moyens d'étude les plus perfectionnés ne nous permettent de représenter encore que bien imparfaitement. De plus, la connaissance de la composition et de la disposition des molécules constitutives de ces structures, dont la complexité moléculaire est extrême, est encore à peine défrichée. En raison de l'importance théorique et pratique des enzymes et de leur cinétique, il ne paraît pas possible d'attendre la maturité de la connaissance

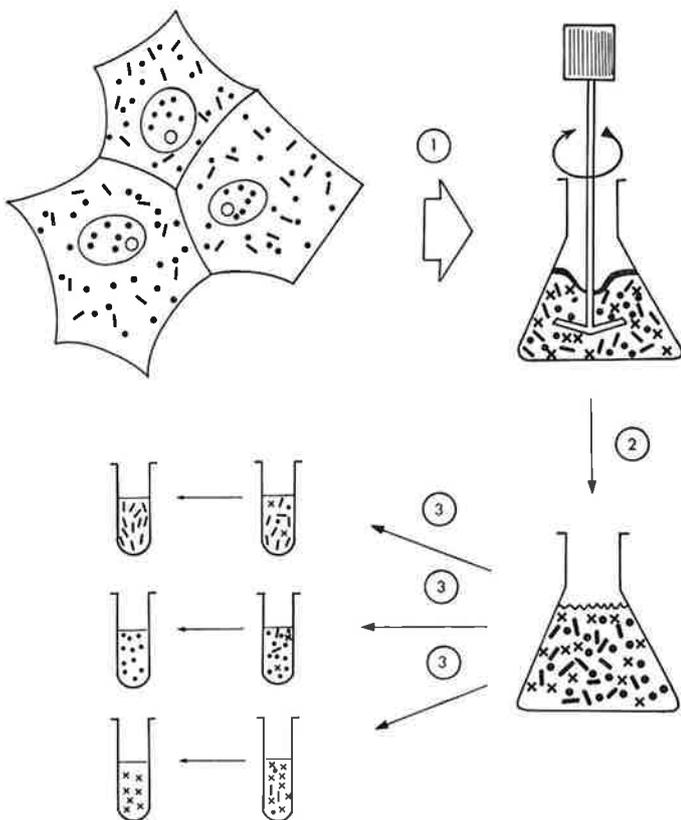


Figure 1. Extraction et isolement des enzymes.

Les enzymes sont naturellement réparties dans les structures cellulaires. Pour les extraire, on rompt les structures (1), puis on solubilise les enzymes en phase aqueuse (2), puis on les purifie par divers procédés physiques et chromatographiques (3).

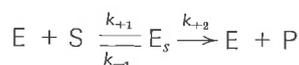
approfondie des structures sub-cellulaires pour aborder l'étude des mécanismes enzymatiques dans des systèmes organisés. Si l'on se contente de reconstituer les systèmes métaboliques par des combinaisons artificielles d'enzymes et de facteurs réactionnels en solution, on peut craindre que notre conception des équilibres métaboliques, de leur régulation, de leur rôle dans la morphogénèse ne se trouve durablement déformée. Il est donc essentiel d'introduire dans notre système le concept de la structure. De plus, l'emploi des enzymes en solution limite singulièrement le champ des applications potentielles de ces puissants outils que ce soit en analyse, en médecine ou dans l'industrie. Depuis une dizaine d'années, les progrès de la chimie macromoléculaire ont permis à un certain nombre d'équipes de mettre au point des techniques en vue de fixer artificiellement, sans trop les altérer, des molécules enzymatiques dans des ensembles structurés. On peut citer ici les efforts des groupes de Katchalski en Israël, de Porath et de Mosbach en Suède, de Lilly en Grande-Bretagne, de Weetall aux États-Unis, ainsi que de plusieurs groupes français. La lenteur de la progression de cette nouvelle recherche, malgré l'intérêt théorique et pratique de cette entreprise, s'explique par la difficulté d'obtenir des produits fonctionnels du fait de la fragilité de la molécule enzymatique, mais aussi en partie du fait du scepticisme de nombre de biochimistes en face de l'application de techniques chimiques à ces molécules naturelles dont on connaissait la susceptibilité. C'est ainsi qu'une firme allemande, dont le dynamisme d'innovation s'est pourtant rarement trouvé en défaut, a refusé de prendre des brevets pour couvrir un procédé de fixation d'enzymes sur support insoluble à une époque où le caractère novateur de l'invention laissait espérer de larges profits d'exploitation sans concurrence. Depuis cinq ans, ce chapitre de l'enzymologie a pris un développement rapide, entraînant une multiplication

des équipes intéressées, des techniques employées, des résultats publiés. La diversité des objectifs, des méthodes et des descriptions techniques de ces équipes rendait difficile le choix d'un terme commun décrivant des procédés dont on percevait pourtant la parenté. Celui d'*immobilisation* a été proposé en 1971 en raison de sa généralité.

## I. Enzymes immobilisées : supports, techniques, effets de l'environnement

Les caractéristiques des enzymes immobilisées sont toujours étudiées par comparaison avec celles des enzymes en solutions après extraction et isolement à partir des homogénats cellulaires ou bactériens. Dans leur étude, on rencontre donc les paramètres habituellement analysés en enzymologie. L'enzyme est mesurée par son activité, c'est-à-dire par le résultat de son action catalytique. Les facteurs influant sur l'activité sont essentiellement le pH, la température, l'ionisation et la concentration de cofacteurs ainsi que d'activateurs ou d'inhibiteurs regroupés sous le nom d'*effecteurs*. Pratiquement, toutes les données sont quantitatives; elles se réfèrent à l'activité de l'enzyme dans les différentes conditions, c'est-à-dire essentiellement à la quantité de substrat transformé par unité de temps. L'unité de mesure le plus couramment utilisé est la millimole de substrat transformé par minute et par millilitre de solution active (unités internationales). On appelle  $V_m$  de l'enzyme la vitesse de transformation de substrat présent en large excès pour une concentration donnée d'enzyme. On appelle  $K_m$  une valeur dénommée constante de Michaelis caractéristique d'un couple enzyme-substrat. Le  $K_m$  a la dimension d'une concentration; il donne une première notion de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

### (1) Cinétique enzymatique traditionnelle :



$$V_m = k_2 E_s \quad \text{unité} = t^{-1} \text{ (vitesse)}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad \text{unité} = \rho \cdot l^{-3} \text{ (concentration)}$$

$$\text{Si } k_{+2} \ll k_{-1}; K_m \simeq \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

### (2) Facteurs influant sur la réaction :

Température, pH, ionisation, concentrations en cofacteurs, effecteurs: activateurs, inhibiteurs.

Figure 2. Rappel des symboles couramment utilisés en cinétique enzymatique.

L'enzyme forme avec le substrat un complexe  $E_s$  qui est ensuite transformé en un complexe avec le produit  $E_p$ , puis dissocié en enzyme et produit. La vitesse de formation de ce complexe est considérée comme le facteur limitant de la vitesse de réaction enzymatique.

$V_m$  est la vitesse maximale en présence d'un excès de substrat.  $K_m$  est la constante de formation-dissociation du complexe  $E_s$ ; lorsque  $k_2$  est faible,  $K_m$  représente la constante d'affinité de l'enzyme pour le substrat.

### a. Le support

Les enzymes immobilisées ne sont pas forcément fixées ou reliées à un support. Elles peuvent être reliées entre elles par des liens moléculaires ou encore se trouver enfermées dans une trame macromoléculaire sans y être directement liées. Dans la mesure où existent des facteurs spécifiques d'immobilisation et l'existence d'un

environnement structuré, les modalités ont relativement peu d'importance. En pratique, elles en ont certainement, puisque l'immobilisation irréversible des enzymes sans perte de l'activité est un problème technique difficile qui n'a encore été résolu que pour une faible part des enzymes connues. La fixation donne lieu à des solutions techniques nombreuses dont les avantages respectifs n'ont pas toujours été comparés objectivement. Les premiers supports utilisés ont été les dérivés de la cellulose. Les fonctions fixées sur cette macromoléculaire naturelle insoluble se prêtent en effet à des modifications telles que des protéines puissent ensuite y être fixées par des réactions douces, de réalisation facile et peu dénaturantes. Les fonctions utilisables dépendent à la fois des possibilités chimiques du support et des fonctions disponibles sur la molécule fixée.

L'amino-cellulose diazotée a ouvert la voie à la création d'un grand nombre de celluloses dérivées permettant la fixation de protéines. Celles-ci disposent d'un nombre restreint de fonctions susceptibles de réagir qui sont : les carboxyles terminaux libres ou les carboxyles latéraux des acides aspartiques et glutamiques, les amines de la lysine, l'arginine et de l'histidine, les hydroxyles de la tyrosine, les thiols de la cystéine, la fonction alcool primaire de la sérine. Chacune de ces fonctions peut donner lieu à des réactions spécifiques et l'expérience montre que certaines d'entre elles seulement peuvent être effectivement utilisées sans altérer complètement l'activité enzymatique. La deuxième contrainte impérative est de ne pas léser le site actif de la réaction catalytique. Or, les fonctions citées plus haut interviennent couramment dans le site actif. Leur ionisation variable en fonction du pH explique pour une grande part la dépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis de la concentration en ions  $H^+$ .

Les essais sur les dérivés de la cellulose ont été suivis de multiples autres tentatives de fixation sur divers supports, tels que des dérivés de polystyrène, des peptides artificiels, des polymères mixtes de polylysine et d'anhydride maléique, des polyacrylamides, des polymères de l'alcool polyvinylique, des silicones, des polymères mixtes de métacrylate et de dérivés de métacrylate, des dérivés du nylon, des polymères de protéines, des dextrans plus ou moins modifiés, des alginates (plus particulièrement le « sépharose ») des amidons modifiés, des verres modifiés, des argiles, etc...

Le caractère commun de ces supports est de présenter des fonctions modifiables, carboxyles, hydroxyles ou amines susceptibles d'être activées en vue de la fixation de la protéine enzymatique. Des variantes ont aussi permis de fixer ou d'immobiliser les enzymes sans avoir recours à des fonctions spécifiques préalables du support.

### b. Le mode de fixation

Le procédé qui vient immédiatement à l'esprit du chimiste est aussi celui qui a été le plus largement répandu avec de très nombreuses modalités : c'est la création de fonctions spécifiques sur le support et l'adjonction de l'enzyme dans un deuxième temps. Dans de rares cas, l'enzyme elle-même est d'abord modifiée et le polymère soluble ou le support est ajouté dans un deuxième temps. Une variante importante est l'utilisation d'agents bi-fonctionnels se fixant à la fois sur le support et sur l'enzyme. Des réactifs symétriques et non symétriques ont été largement utilisés. Parmi les premiers il faut citer la bis-diazobenzidine, le chlorure de phénol-2,4 disulfoné, le NN' (1,2-phénylène-bis-maléimide), etc... Le glutaraldéhyde est de plus en plus largement utilisé. En fait, son mode d'action est complexe : il réagit avec les amines libres de la lysine sans former de bases de Schiff ;

son action implique la présence d'oligomères. Parmi les agents asymétriques citons les épichlorhydrines, le paranitrophényl chloro-acétate et le chlorure de triazine. De plus en plus, on voit combiner la modification du support avec une fixation par l'intermédiaire d'un agent bi-fonctionnel.

Une autre variante important est l'inclusion de l'enzyme dans un réseau, enveloppe qui permet l'accès du substrat et le départ du produit, mais non la mobilité de l'enzyme ou des cofacteurs. C'est le cas des enzymes enfermées dans un film de collodion polymérisé, dans un gel<sup>F</sup> de polyacrylamide, de dextran ponté ou encore dans des globules (microcells) de nylon formant une émulsion à l'intérieur de laquelle l'enzyme se trouve enfermée.

D'autres techniques font appel à la fixation ionique ou à l'adsorption. L'avantage de ces dernières techniques sont leur simplicité, ce qui explique qu'elles sont apparues précocement dans la technologie des enzymes immobilisées. Leur inconvénient est que cette fixation n'est généralement pas définitive, que les relargages sont inévitables et peuvent être gênants.

Une forme d'inclusion tend à se répandre : l'inclusion dans des fibres, soit par simple mélange avec un textile artificiel poreux qui est ensuite passé par une filière, soit par incorporation dans la matière de fibres creuses.

L'introduction dans des matériaux poreux présente l'avantage d'une grande commodité technique qui se prête à la production à grande échelle ; mais elle se heurte au problème de la limitation diffusionnelle à l'intérieur du support laquelle intervient aussi bien avant la réaction enzymatique qu'après elle.

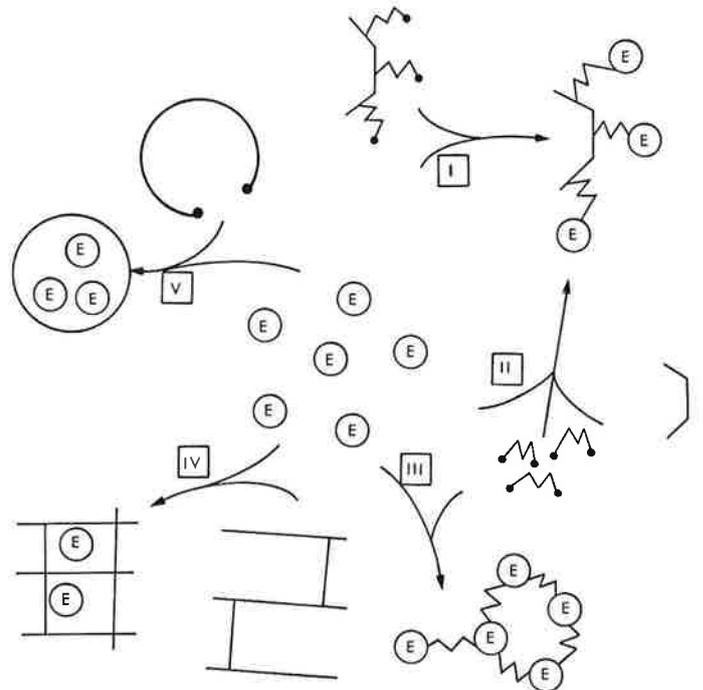


Figure 3. Modalités d'immobilisation des enzymes.

I : Préparation préalable du support par fixation de fonctions chimiquement actives, puis fixation des enzymes.

II : Pontage entre support et molécules d'enzymes par des molécules bi-fonctionnelles.

III : Réticulation entre molécules d'enzymes ou co-réticulation entre enzymes et autres protéines, en utilisant des agents bi-fonctionnels.

IV : Inclusion dans un support poreux réticulé par pontage du support après introduction des enzymes.

V : Inclusion dans des sphères de matériaux inertes semi-perméables.

### c. Les enzymes fixées

L'effort a d'abord porté sur les enzymes dont la dénaturation est spontanément la moins rapide. Ce furent les hydrolases et surtout les enzymes protéolytiques qui ont permis les premiers résultats positifs. En particulier trypsine, chymotrypsine et papaïne ont donné lieu à de nombreux

travaux de fixation. D'autres hydrolases ont été ensuite abondamment étudiées. Depuis peu, de nombreuses enzymes nouvelles autres que des hydrolases sont immobilisées, en particulier parmi des oxydoréductases qui nécessitent la présence d'un cofacteur mobile au cours de la réaction.

Aujourd'hui, les enzymes qui ont été immobilisées en conservant leur activité enzymatique se comptent dans toutes les catégories de la classification systématique des enzymes, à l'exception des ligases (enzymes de synthèse). La liste des enzymes dont la fixation efficace a été publiée s'allonge de jour en jour. Elle serait peut être plus courte si les critères d'efficacité de la fixation étaient plus sévèrement définis.

**Tableau I.**

Quelques enzymes immobilisées.

Enzyme	Méthode	Support
<i>Oxydo-réductases</i>		
alcool déshydrogénase	réticulation	albumine
lactate déshydrogénase	fix. covalente	verre, dextran
malate déshydrogénase	fix. covalente	dextran
glucose-6 phosphate	fix. covalente	dextran
	réticulation	albumine
polyphénol oxydase	inclusion	surfactant
glucose oxydase	réticulation	albumine
galactose oxydase	réticulation	albumine
xanthine oxydase	réticulation	albumine
lipoxydase	fix. covalente	agarose
L-aminoacide oxydase	inclusion	polyacrylamide
3-céto stéroïde $\Delta$ -déshydrogénase	inclusion	agarose
glutamate déshydrogénase	fix. covalente	collagène
11 $\beta$ -stéroïde hydroxylase	inclusion	agarose
catalase	réticulation	cellophane
peroxydase	réticulation	collagène
<i>Transférases</i>		
hexokinase	réticulation	albumine
ribonucléase	réticulation	verre modifié
<i>Hydrolases</i>		
cholinestérase	réticulation	albumine, silastic
	fix. covalente	cellulose
pectinestérase	fix. covalente	verre modifié
phosphatases alcalines	fix. covalente	cellulose modifiée
glucoamylase	fix. covalente	résines
$\beta$ -galactosidase	fix. covalente	verre modifié
		cellulose modifiée
$\beta$ -glucosidase	réticulation	albumine
carboxypeptidase	réticulation	crystal d'enzyme
pepsine	fix. covalente	verre modifié
lysozyme	inclusion	collagène
trypsine	fix. covalente	divers
chymotrypsine	fix. covalente	divers
papaïne	fix. covalente	divers
	inclusion	
invertase	fix. covalente	bentonite
L-asparaginase	fix. covalente	divers
	réticulation	
uréase	divers	divers
pénicilline amidase	fix. covalente	cellulose modifiée
		verre modifié
		cellulose modifiée
arginase	fix. covalente	polyacrylamide
aspartase	inclusion	
<i>Lyases</i>		
lysine décarboxylase	réticulation	albumine
phénylalanine décarboxylase	réticulation	albumine
tyrosine décarboxylase	réticulation	albumine
phénylalanine-ammonium lyase	fix. covalente	tubes
<i>Isomérase</i>		
glucose isomérase	fix. covalente	verre modifié
glucose-6 phosphate isomérase	réticulation	albumine
fructose-6 phosphate isomérase	réticulation	albumine
<i>Ligases</i>		
	néant	

Les enzymes qui interviennent dans des réactions complexes où plusieurs substrats et cofacteurs doivent être simultanément présents se prêtent moins à la fixation que celles catalysant les réactions les plus simples. Il en est de même des enzymes de synthèse (ligases) dont l'action nécessite un couplage énergétique.

#### *d. Propriété des enzymes immobilisées*

Qu'il s'agisse d'enzymes liées par liaison covalente à leur support ou d'enzymes simplement enfermées dans une trame macromoléculaire, les propriétés de l'enzyme se trouvent modifiées dans une certaine mesure par l'immobilisation : certaines propriétés varient toujours dans le même sens quelle que soit l'enzyme concernée, d'autres varient différemment selon les enzymes ; d'autres enfin ne subissent aucune modification du fait de l'immobilisation. Dans chaque cas, il existe des exceptions qui peuvent parfois s'expliquer à la lumière des interprétations physicochimiques qui se dégagent peu à peu. Cette décantation est facilitée par les nombreuses expériences réalisées par diverses équipes avec des enzymes différentes dans des conditions expérimentales suffisamment éloignées les unes des autres pour permettre d'esquisser des généralisations.

A part quelques rares exceptions signalées dans la littérature, la fixation ou l'inclusion des enzymes favorise leur stabilité dans le milieu réactionnel. Dans certains cas, cette stabilisation s'explique par le simple empêchement stérique d'une autolyse, comme c'est le cas par exemple pour la trypsine immobilisée sur un support. Dans le cas général, ce phénomène n'a pas encore été correctement expliqué bien qu'il ait été observé dans un nombre de cas assez grand pour que sa généralité ne puisse plus être mise en doute.

Bien qu'on ne puisse encore le prouver, il semble que les enzymes fixées par les liens covalents bénéficient d'une stabilisation plus grande que celles qui sont simplement incluses. Lorsque l'enzyme est fixée en environnement fortement ionisé, la stabilisation paraît meilleure que lorsque la fixation se fait dans un support non ionique et relativement hydrophobe.

L'inactivation d'enzymes solubilisées est un phénomène général qui apparaît en quelques heures ou quelques jours suivant le type d'enzymes, les conditions de température d'ionisation et de pH. Certaines conditions favorables, telle que par exemple une concentration élevée en sels d'ammonium, permettent de conserver l'activité plusieurs mois à + 4°. La conservation à l'état sec après lyophilisation est souvent plus longue et contraste avec la labilité des mêmes enzymes en solution.

Ce phénomène de dénaturation progressive contraste avec la stabilité de certaines activités enzymatiques au sein de la cellule. Toutefois la démonstration de cette stabilité est difficile puisqu'on sait que le stock protéique d'une cellule se renouvelle à des vitesses qui varient selon les lignées cellulaires et selon les protéines concernées.

On peut supposer que l'enzyme immobilisée en structure a une probabilité plus faible de passer par des conformations extrêmes aboutissant à une destruction irréversible au cours des fluctuations moléculaires que l'enzyme libre en solution. L'accroissement de la durée de vie de l'activité de l'enzyme est la règle générale. Par exemple, dans le cas de la glucose oxydase (1) une solution enzymatique perd 95 % de son activité en 2 heures à 55°. Elle peut demeurer active pendant des semaines à l'état sec. Fixée sur un support insoluble, elle perd en suspension 10 % de son activité en 2 heures à la même température. Ce phénomène a été observé avec des techniques de fixation très différentes par de nombreux auteurs, et seules quelques exceptions ont été publiées.

(1) Enzyme qui oxyde le glucose en acide gluconique.

Ce phénomène s'observe dans toute la zone de température où l'enzyme peut fonctionner sans dénaturation. Lorsqu'on élève la température d'une solution enzymatique, l'activité catalytique s'accroît en raison de l'énergie d'activation de la réaction. Simultanément, la durée de vie de l'enzyme diminue suivant un phénomène de dénaturation statistique, réduisant progressivement le nombre de molécules actives dans le milieu. Ainsi, lorsqu'on observe l'activité catalytique d'une enzyme en solution pendant un temps déterminé, la courbe d'activité en fonction de la température s'accroît exponentiellement puis atteint un maximum et diminue ensuite rapidement. Ce maximum dépend de la durée de l'essai d'activité : il est d'autant plus élevé que le temps est plus court. L'accroissement de la résistance à la thermo-dénaturation par fixation de l'enzyme sur un support entraîne une élévation de cette température maximale d'action pour chaque durée d'essai. Ainsi, par exemple, dans le cas de l'asparaginase, la thermo-dénaturation est nettement plus lente à 56° après réticulation en milieu protéique qu'en solution. En 24 heures, cette enzyme réticulée dégrade trois fois plus de substrat à cette température que la même asparaginase libre en solution.

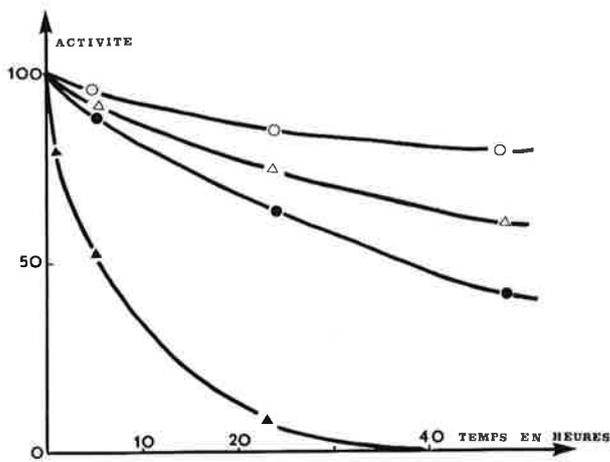


Figure 4. Stabilité de l'enzyme en solution avant et après immobilisation (glucose oxydase).

- ▲ en solution non protéique.
- après réticulation par le glutaraldéhyde.
- △ en solution en présence de protéine (albumine).
- après co-réticulation entre glucose oxydase et albumine par le glutaraldéhyde.

Le caractère déterminant de l'ionisation du site actif dans l'activité enzymatique entraîne une dépendance marquée de cette activité par rapport au pH de la solution. Normalement, la courbe d'activité en fonction du pH présente une forme en cloche caractéristique avec un pH optimal dans la zone intermédiaire. Dans de nombreux cas, et plus particulièrement avec les protéases, un déplacement du pH optimal a pu être observé après fixation sur support. Ce phénomène n'est pas général puisqu'il est influencé par la nature du support, la longueur du bras de fixation et le caractère de l'activité enzymatique concernée. Ce fait important sera repris dans la suite de l'exposé. Une autre constatation concerne la décroissance de l'activité de part et d'autre de ce pH optimal. Dans un certain nombre de cas, on constate que la décroissance de part et d'autre de cet optimum se trouve nettement plus rapide après fixation sur support qu'en solution. Ce phénomène qui n'est pas général ; lorsqu'il existe, il crée une sensibilité particulière à la variation de pH de l'enzyme fixée à une structure.

Il faut rappeler que chaque enzyme est spécialisée dans une réaction ou dans un nombre réduit de réactions semblables. La *spécificité* de l'enzyme est *étroite* dans le premier cas, plus ou moins *large* dans le deuxième.

La fixation sur un support ne paraît pas modifier nettement la spécificité de l'enzyme. Les réactions catalysées demeurent les mêmes ; aucune expérience n'a pu montrer jusqu'ici de

diminution de spécificité. Par contre, la présence de la structure crée des contraintes nouvelles qui modifient les rapports d'activités entre substrats de tailles différentes ou d'encombrements différents. Il a été montré par exemple que les enzymes protéolytiques fixées ont un rapport d'activité entre substrats de faibles poids moléculaires et substrats macromoléculaires plus favorables qu'avant fixation. Ceci peut s'expliquer par l'encombrement stérique causé par la structure avoisinante. De même, si l'inhibition de la trypsine par un inhibiteur spécifique est totalement efficace vis-à-vis des substrats macromoléculaires après fixation, son efficacité vis-à-vis des petits substrats est imparfaite. L'inhibiteur s'adapte sur le site actif. Si l'enzyme est fixée, l'adaptation est moins bonne du fait de l'encombrement stérique et les petits substrats parviennent à pénétrer dans le site actif.

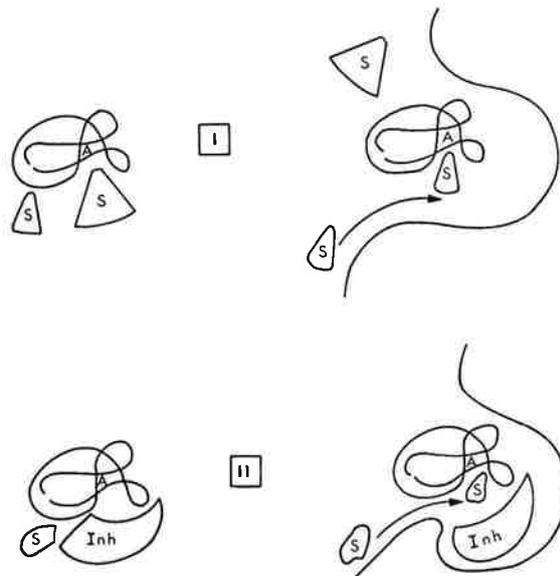


Figure 5. Effet de la structure sur l'activité et l'inhibition des enzymes.

I : La structure arrête le substrat macromoléculaire (S) mais non le substrat de petite taille moléculaire (1).

II : La structure gêne l'adaptation de l'inhibiteur (Inh) sur l'enzyme et permet paradoxalement l'activité de cette dernière en structure.

A position du site actif de l'enzyme.

Avec des enzymes d'étroite spécificité, telle que la glucose oxydase, il a pu être montré que ces spécificités n'étaient pas élargies à de nouveaux substrats voisins. Par contre lorsqu'il s'agit d'enzymes de spécificité plus large, telle que L-aminoacide oxydase (1) des rapports d'activité entre substrats se trouvent modifiés par la fixation de l'enzyme. Ce phénomène ne doit pas exclusivement être interprété en terme de taille moléculaire. En effet, l'environnement ionique et l'encombrement stérique peuvent avoir des

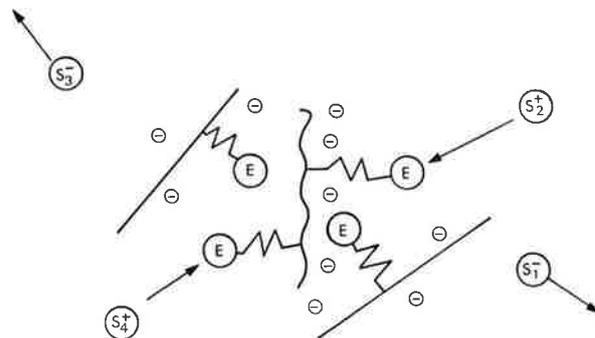


Figure 6. Effet des charges portées par le support sur l'activité des enzymes fixées.

Un support chargé négativement (par exemple protéine en milieu de pH supérieur au  $pH_i$ ) repousse le substrat chargé négativement et attire vers l'enzyme le substrat chargé positivement.

(1) Enzyme qui oxyde les acides L-aminés en acides cétoniques.

influences différentes sur des substrats d'apparence pourtant voisins comme le sont les acides L-aminés entre eux. De même une  $\beta$ -glucosidase a des rapports d'activités sur différents  $\beta$ -diglucosides modifiés après insolubilisation en un réseau protéique.

## II. Propriétés spécifiques de l'enzyme immobilisée

Du fait de son immobilisation dans une structure, l'enzyme et la réaction catalysée subissent des contraintes nouvelles. Celles-ci modifient à leur tour la cinétique enzymatique. D'où la possibilité d'effets et de contrôles réciproques.

### A. Influence de la perméabilité et de la diffusion

La structure se distingue du milieu ambiant par la présence d'une phase nouvelle dans laquelle la solubilité de chaque espèce est souvent différente de ce qu'elle est dans la phase initiale. Généralement, ce partage entre phases se traduit par une diminution de concentration du substrat dans la phase structurée. En réalité cette influence peut jouer dans les deux sens : une phase chargée en lipides peut dissoudre préférentiellement certains substrats faiblement ionisés. Certains gaz peuvent s'accumuler dans cette phase. De même une phase hydrophile présentant une ionisation fixe peut accumuler ou échanger des ions de signe contraire. Ainsi, la composition de la phase exercera un effet sélectif sur les espèces qui viendront au voisinage de l'enzyme. C'est dans cette composition modifiée que les gradients de concentration entraîneront une diffusion des molécules qui approcheront de l'enzyme avant réaction ou s'en éloigneront après celle-ci.

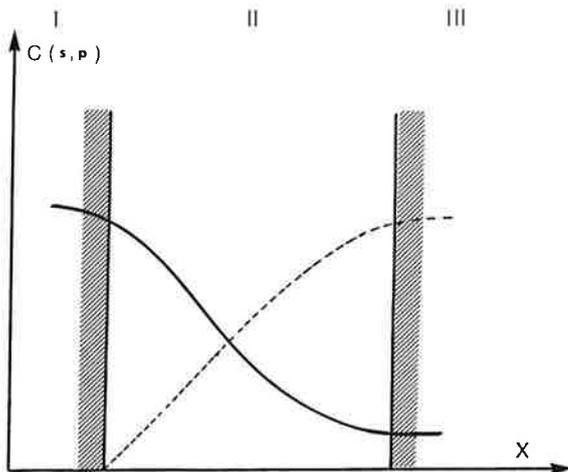


Figure 7. Profils de concentration de substrat et produit dans la coupe d'une membrane poreuse d'enzyme fixée entre deux compartiments de solution.

- I : Compartiment donneur de substrat.
- II : Coupe de la membrane.
- III : Compartiment receveur de produit.
- /// Couche limite de diffusion de part et d'autre de la membrane.
- Profil de concentration de substrat.
- Profil de concentration de produit.

Contrairement au becher des biochimistes, la phase structurée ne permet pas d'agitation, c'est-à-dire de déplacement des espèces par convection. De ce fait, seule la diffusion simple ou modifiée par les phénomènes ioniques crée le déplacement dans la phase. Le gradient de concentration, soit artificiellement introduit au sein de la structure lors de la mise en place du système, soit créé par les réactions qui s'y déroulent, favorise seul le déplacement des espèces à transformer et des facteurs de régulation. Dans certaines circonstances, cette diffusion n'a que peu d'influence sur le déroulement des réactions. Dans un grand nombre de cas, la diffusion est le facteur contraignant qui détermine la cinétique. Il faut rappeler que l'effet déterminant de la diffusion se manifeste non seulement au sein de la

structure mais aussi à son voisinage immédiat, dans la couche limite de diffusion et qu'une enzyme placée en surface par rapport à une particule ou à une membrane est déjà gouvernée par ce phénomène, sauf si elle est séparée de la structure par un bras d'une longueur suffisante. Ce facteur intervient aussi le long des parois du becher du chimiste, mais il est statistiquement négligeable en raison de la mince pellicule quasi-moléculaire de diffusion contrastant avec l'important volume de convection. L'énergie d'activation de la réaction ne paraît pas modifiée que l'enzyme soit immobilisée ou libre. Un seul auteur a montré un accroissement, dans les limites de l'erreur expérimentale, de l'énergie d'activation après fixation. Il ne faut pas oublier dans l'interprétation des courbes d'activité en fonction de la température que, lorsque l'enzyme est en structure, l'accroissement de son activité ne dépend pas seulement de l'enzyme elle-même mais aussi de l'effet thermique au niveau de la structure environnante.

L'interdépendance de la diffusion et de la réaction dans le cas des enzymes fixées a donné lieu à plusieurs études approfondies. Elles partent soit de la cinétique de l'enzymatique classique (cinétique michaelienne) en s'efforçant de calculer l'effet de la diffusion, soit des méthodes de calcul valables en cinétique hétérogène. Dans le premier cas, des équations de Michaelis-Menten modifiées montrent l'interdépendance entre la cinétique enzymatique et les lois contrôlant la diffusion. Dans le deuxième cas, la zone de concentration est choisie de telle manière que soient applicables les équations de la cinétique de premier ordre.

Dans l'un comme dans l'autre cas, l'analyse cinétique admet par hypothèse qu'une certaine continuité peut être reconnue dans la structure et que des unités de volume très petites peuvent y être distinguées, où les conditions cinétiques obéissent soit à la loi de Michaelis soit à l'équation cinétique des réactions de premier ordre. Si l'on fait la sommation de ces unités élémentaires, on constate que diffusion et réaction s'y contrôlent réciproquement, puisque la diffusion limite l'accès du substrat et des cofacteurs ainsi que le départ du produit, donc l'ensemble de la réaction ; à son tour celle-ci modifie le gradient de concentration ou de potentiel électrochimique des espèces en cause et exerce de ce fait une influence en retour sur la diffusion (1).

Cette dépendance réciproque entraîne un ensemble de conséquences qui éloignent la cinétique en structure des règles habituelles en cinétique homogène. Ainsi par exemple, la constante de Michaelis apparente ( $K_m$ ), qui est l'opérateur de base des enzymologistes et donne souvent une idée de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, devient un paramètre phénoménologique dont on ne peut donner une interprétation moléculaire. Si l'on étudie la cinétique d'une enzyme immobilisée dans un film, ce qui a l'avantage de simplifier l'interprétation et les calculs, on constate que la concentration du substrat diminue progressivement au fur et à mesure qu'il pénètre dans le film ; d'où un glissement sur la courbe de Michaelis qui montre l'activité de l'enzyme en fonction de la concentration de son substrat. Dès que l'activité enzymatique est suffisante, le niveau de saturation en molécules de substrat des sites enzymatiques situés près de « l'entrée » du film est très différente de celle des sites situés au voisinage de l'autre face de ce film. Il y a un gradient de concentration abrupt du substrat dans la membrane : les premiers sites rencontrés sont saturés et se situent de ce fait sur le plateau de la courbe Michaelis,

(1) Cette interdépendance peut être symbolisée, dans le cas d'une membrane poreuse d'enzyme par le facteur  $\sigma$  qui regroupe les paramètres de diffusion et de réaction enzymatique affectant la réaction :  $\sigma = \frac{e^2 V_m}{D K_m}$  ou  $e$  est l'épaisseur de la membrane,  $D$  le coefficient de diffusion du substrat,  $V_m$  l'activité maximale de l'enzyme enfermée dans la membrane et  $K_m$  sa constante de Michaelis pour l'espèce considérée (Thomas et coll.)

tandis que les derniers sont loin de la saturation et se situent dans la partie inférieure de la courbe. Les premiers sites obéissent à une cinétique d'ordre zéro, les derniers à une cinétique d'ordre un. Entre les deux se trouvent des sites catalysant une réaction d'un ordre intermédiaire entre zéro et un. Il en résulte une forme particulière de la courbe d'activité d'une membrane enzymatique en fonction de la concentration de substrat. Celle-ci présente en effet une forme en « S » bien qu'il ne s'agisse pas rigoureusement d'une sigmoïde.

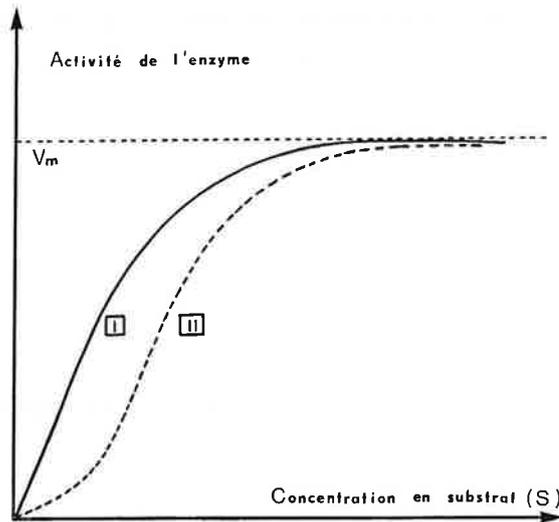


Figure 8. Courbes d'activité d'une enzyme en fonction de la concentration de substrat. (Selegny et coll.)

La courbe classique est modifiée par l'immobilisation en structure du fait de la limitation diffusionnelle (glucose-oxydase).

- Enzyme libre en solution.
- Enzyme fixée dans une membrane.

Le gradient de concentration du produit présente lui aussi une forme caractéristique, symétrique de celui du substrat. Lors du vieillissement de la membrane enzymatique, une partie de l'activité se trouve perdue; de ce fait, le substrat pénètre de plus en plus profondément dans la membrane avant d'être entièrement transformé; de nouveaux sites enzymatiques se trouvent à leur tour en contact avec une plus grande concentration de substrat; de ce fait, leur activité s'accroît. Apparemment, la membrane ne change pas ou à peine d'activité au cours du temps puisque l'activité mesurée est la somme de l'activité de tous les sites actifs du film, qu'ils soient saturés ou non. Il en est de même pour les particules chargées d'enzymes fixées. L'une des caractéristiques importante de ces structures est donc leur résistance apparente au vieillissement, qui résulte en même temps de l'accroissement de la stabilité moléculaire et des considérations de cinétique qui viennent d'être décrites.

### B. Influence des conditions locales

Une autre caractéristique d'une enzyme en structure est d'être fortement tributaire des conditions d'environnement dans lequel elle se situe. Certes, les enzymes en solution subissent elles aussi l'effet de la concentration en ions, activateurs ou inhibiteurs, en ions  $H^+$  en particulier. Les enzymes fixées ont en plus la particularité de baigner dans une ambiance locale particulière qui peut être très différente des conditions extérieures, et qui ne peut facilement être mesurée de l'extérieur. L'écart entre les conditions locales et les conditions extérieures expliquent certaines anomalies apparentes du comportement enzymatique après immobilisation.

Un ensemble de travaux a porté sur le pH optimal de l'enzyme en structure. Il a été montré que le pH optimal de certaines enzymes, protéolytiques en particulier, se déplace vers la zone alcaline lorsque ces enzymes sont greffées. Ce phénomène s'observe quel que soit le support, mais il

paraît plus marqué lorsque les supports sont chargés positivement.

Si les enzymes sont fixées dans un support très aéré, à la surface d'un support non chargé, surtout lorsqu'un bras assez long sépare l'enzyme du support, ce phénomène n'est plus observé. Avec certaines enzymes, ce déplacement du pH optimal n'a pu être montré. L'ensemble de ces phénomènes peut s'expliquer de deux manières différentes. L'une fait intervenir les charges retenues ou libérées par le support. Un support porteur de charges négatives s'ionisant faiblement libère en pH alcalin des ions positifs qui créent au voisinage de l'enzyme un pH local plus acide que celui que l'on mesure à l'extérieur de la structure. De ce fait le pH apparent se trouve déplacé dans l'autre sens par rapport au pH réel, et l'on constate alors un glissement apparent de la courbe d'activité en fonction du pH. Dans l'autre cas, c'est le changement d'ionisation de la phase dissoute qui provoque la modification de pH local. Ainsi, par exemple, dans le cas des enzymes protéolytiques, la fraction carboxylique libérée s'ionise davantage que la fonction amine au voisinage des pH optimaux de la protéolyse. De ce fait, le pH local s'acidifie; à l'état stationnaire, il peut différer d'une unité par rapport au pH extérieur. Cette réalité a été montrée par Goldman et coll. à l'aide de colorants spécifiques du pH dans des membranes porteuses de papaïne. Un effet analogue est observé en présence d'uréase.

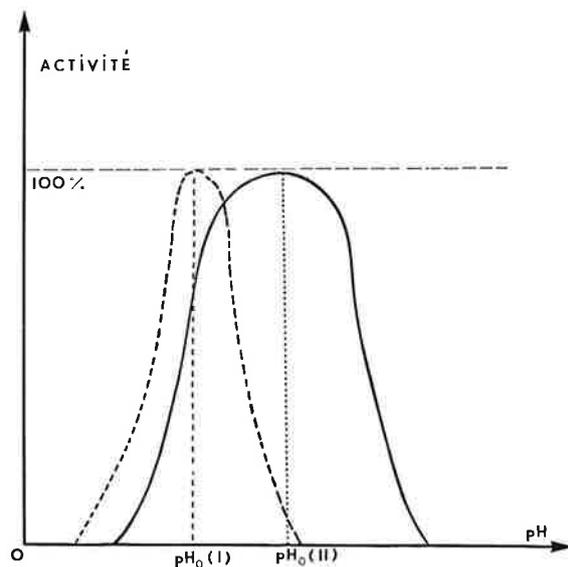


Figure 9. Dépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis du pH.

La courbe en cloche de l'activité enzymatique en fonction du pH présente un maximum au pH optimal ( $pH_0$ ). Cet optimum est déplacé lorsque la concentration en ion  $H^+$  locale est différente de celle que l'on mesure à l'extérieur de la structure.

- Courbe de l'enzyme libre en solution.
- Courbe de l'enzyme immobilisée en membrane (uréase).

Les charges fixes de la membrane exercent aussi une influence sur le mouvement des ions qui interfère avec la réaction. C'est ainsi par exemple qu'une membrane ionisée négativement favorise le mouvement des ions positifs et subsidiairement de leurs co-ions. Dans une membrane non chargée, les ions ne se déplaceront que dans les canaux liquides laissés libres par la membrane. Dans la mesure où la réaction provoque la création d'ions nouveaux, comme c'est par exemple le cas si l'on fait agir l'uréase sur de l'urée (en formant des ions carbonates et des ions ammonium), le déplacement des autres ions à l'intérieur de la membrane s'en trouve modifié. Cet effet peut avoir des conséquences aussi bien sur les mouvements d'accompagnement et d'échanges ioniques, si importants dans le métabolisme de certaines cellules spécialisées (par exemple la cellule rénale), que dans les applications des enzymes fixées, puisque cet effet ionique peut avoir aussi bien une action favorable que défavorable sur la réaction enzymatique

elle-même. Il sera en particulier important de le prendre en compte lorsque seront étudiés les systèmes multi-enzymatiques à enzymes fixées où l'action de chaque enzyme sera fortement tributaire des résultats et des effets créés par celle qui la précède ou qui la suit.

L'enzymologie est encore loin d'être arrivée à sa maturité, mais on connaît déjà un grand nombre d'interactions entre métabolites et réactions enzymatiques. Le plus souvent, ces effets sont négatifs en ce sens qu'on observe l'inhibition d'une enzyme. Dans certains cas, il s'agit au contraire d'un effet positif ou d'activation; parfois les effets sont plus complexes, potentialisateurs ou coopératifs. Le comportement des inhibiteurs et des activateurs a toutes chances d'être fortement influencé par la structure. Par exemple, certains inhibiteurs entrent en compétition avec le substrat pour l'enzyme. Comme pour le substrat, la répartition de l'inhibiteur se fera suivant un gradient, les premiers sites se chargeant en inhibiteurs et les derniers se trouvant moins pourvus. Comme dans le cas de la dénaturation progressive, les sites les moins affectés compensent la décroissance d'activité des sites les plus inhibés. Il en résulte un effet anti-compétitif de la structure.

Dans une réaction dont l'équilibre est relativement peu favorable, donc rapidement atteint dès qu'apparaît une certaine accumulation de produit, cette dernière apparaît beaucoup plus vite localement sous l'effet de la limitation diffusionnelle. Ainsi, après un temps d'établissement relativement court, ce type de réactions se trouve très rapidement freiné par l'accumulation de produit.

Réciproquement, la situation en structure favorise l'action des enzymes inhibées par excès de substrat, puisque la même limitation diffusionnelle gradue l'arrivée de substrat. Ainsi, les sites les plus éloignés de la surface située au contact du substrat peuvent atteindre de ce fait des niveaux d'activité supérieurs à celui des sites enzymatiques dispersés en solution.

Toutes ces particularités de l'activité de l'enzyme fixée laissent envisager dans l'avenir toute un ensemble de formes de régulations et de contrôles de l'activité enzymatique que la désorganisation de la structure cellulaire a jusqu'ici caché aux yeux des observateurs. Un fait particulièrement simple peut être signalé à ce sujet : dans la mesure où une enzyme modifie le pH du milieu par ses produits, elle modifie le pH local et peut exercer en structure une autorégulation de la concentration locale de substrat parce que l'enzyme qui le dégrade cesse de fonctionner lorsque le pH local devient défavorable; cet effet n'apparaît pas dans un milieu homogène où les produits se trouvent dilués au fur et à mesure ou emportés par convection. Cette autorégulation peut entraîner en amont le maintien quasi stationnaire d'une concentration ou d'un gradient de concentration de substrat à l'intérieur du compartiment sus-jacent. Ainsi, sans l'intervention d'aucun mécanisme moléculaire complexe, l'enzyme intervient en tant que chemostat. Si au lieu d'une enzyme, on fait intervenir un système bi-enzymatique, les possibilités de contrôle s'accroissent considérablement et peuvent s'exercer par l'effet réciproque des deux enzymes séquentielles, par la concentration en substrat intermédiaire, etc...

### C. Influence de la forme

Depuis le développement des études morphologiques sur les structures cellulaires, les auteurs ont insisté sur le rôle favorable de la contiguïté dans les cellules des enzymes intervenant dans des réactions successives du métabolisme. La réalité de cet avantage n'avait guère pu être démontrée en terme physico-chimique. Récemment Mosbach et coll. ont montré que des enzymes séquentielles fixées au hasard sur la surface de particules permettaient des réactions plus rapides lorsque les sites enzymatiques étaient disposés

sur une même particule que lorsqu'ils étaient dispersés en solution. Lecoq et coll. ont montré de même que des enzymes séquentielles associées sur une même membrane agissaient plus efficacement et donnaient lieu à un contrôle plus rapide que lorsque ces mêmes enzymes se trouvaient en solution ou plus encore dans des membranes différentes en suspension dans une même solution.

Cette influence de la position des enzymes sur leur activité demande des études plus approfondies. En particulier, on peut se demander dans quelle mesure la disposition des sites enzymatiques sur une structure peut entraîner un mouvement spécifique des espèces de site à site. Le mouvement des métabolites dans les mitochondries paraît obéir à ce mécanisme. La stricte application des lois de la diffusion n'est pas en faveur de cette vision finaliste. Mais il n'est pas exclu que la présence des enzymes fixées au niveau des membranes mitochondriales exerce un mouvement d'ions et d'eau lié aux réactions chimiques au niveau de chaque site de la membrane mitochondriale, lequel provoque à son tour un mouvement de convection avec déplacement de métabolites dans le sens voulu. Ce mouvement a toutes chances d'être canalisé par la nature hydrophobe de certaines parois mitochondriales riches en lipides. Sans ce mécanisme, il faudrait imaginer un gradient de diffusion préférentiel spontané que seule une anisotropie structurelle formée de barrières semi-perméables permettrait alors d'expliquer.

En élargissant le débat, on peut se demander dans quelle mesure l'anisotropie structurelle dans les membranes ou les particules naturelles porteuses d'enzymes ne serait pas une forme d'accumulation de l'information et de l'énergie en vue des phénomènes vectoriels tributaires du principe de Curie. Par exemple, il a été montré que si l'on réalise artificiellement une membrane anisotrope par l'association de deux enzymes (1) situées dans deux feuillettes accolés et entourés de part et d'autre de deux membranes semi-perméables, un *transport actif* de glucose pouvait être effectué. Ce transport contre le gradient de concentration s'explique par la consommation d'une énergie chimique (ATP) (2) dont une liaison riche en énergie est dégradée dans membrane par l'association de barrières ioniques et de

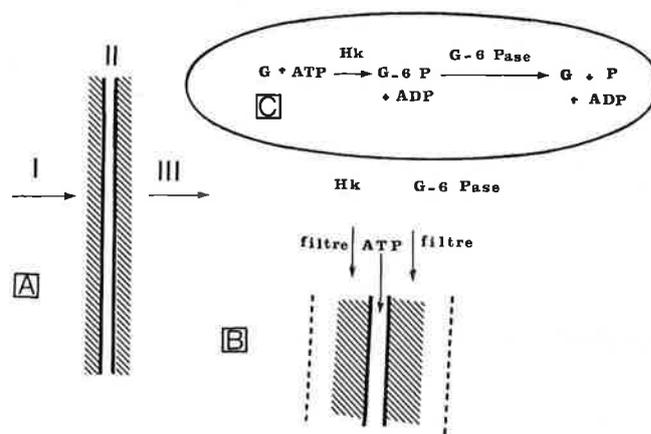


Figure 10. Membrane composite créant un transport actif du glucose à travers elle. (Thomas et coll.)

A : Le système est constitué de deux feuillettes accolées (II) entreposés entre deux compartiments liquidiens (I et III) contenant du glucose à égale concentration.

B : La membrane composite est formée d'un feuillet semi-perméable ionisé portant intérieurement de l'hexokinase fixée et d'un autre feuillet analogue porteur de glucose-6 phosphatase. De l'ATP (adénosine triphosphate) imprègne les deux feuillettes.

C : Deux réactions successives se déroulent dans la membrane. Le glucose-6 phosphate intermédiaire est emprisonné dans la membrane, tandis que le glucose diffuse librement. L'ATP est consommé par le système. Le glucose s'accumule dans le compartiment III.

(1) Hexokinase et glucose-6 phosphatase.

(2) Adénosine triphosphate.

filtres moléculaires avec les réactions enzymatiques de phosphorylation et de déphosphorylation. Ainsi une anisotropie de la structure transforme dans ce système des réactions enzymatiques scalaires par nature en un processus vectoriel (Broun et coll.).

L'association de la morphologie et de la réaction enzymatique de même que la réaction de la texture avec la réaction biochimique permettent d'entrevoir un nombre considérable d'effets naturels possibles dont l'éventualité ne fait qu'apparaître à l'étude des enzymes fixées artificiellement sur support.

### III. Application des enzymes insolubilisées

L'intérêt que portent aujourd'hui les organismes de recherche, certains industriels et des équipes médicales aux enzymes fixées sur supports insolubles tient à leur stabilité et à la facilité de leur isolement à partir des mélanges réactionnels, d'où la possibilité de répéter facilement plusieurs cycles de traitement avec une même préparation. Actuellement, les applications en sont relativement peu nombreuses, mais des perspectives importantes apparaissent à l'évidence. Bien des industriels observent l'évolution de la situation pour se rendre compte à partir de quel moment la technologie sera suffisamment sûre pour que les importants investissements nécessaires soient entrepris. Il faudra en effet adapter à des systèmes enzymatiques actifs en flux continu de multiples processus réalisés actuellement par voie chimique ou encore avec des enzymes en solution, ce qui interdit le recyclage de l'enzyme et souvent le flux continu.

#### A. Le traitement industriel en flux

Le domaine d'applications industrielles des enzymes est assez mal connu du grand public et même du public scientifique averti. Il touche en effet des industries de fermentation traditionnelles telles que la brasserie ou la fromagerie par exemple, mais aussi tout un ensemble de domaines nouveaux qui évoluent sans cesse, où l'utilisation des enzymes est parfois en concurrence avec celle des produits chimiques. Dans ces cas, l'une ou l'autre solution prévaut selon les conditions locales ou la qualité de produit recherché. Une liste des applications industrielles des enzymes figure sur le tableau II.

Tableau II.

Enzymes industrielles courantes.

Nature	Applications
amylases	industrie textile brasserie pharmacie boulangerie, pâtisserie, biscuiterie diététique papeterie
protéases	blanchisserie boucherie brasserie fromagerie boulangerie, pâtisserie alimentation animale pharmacie
lipases	fromagerie chocolaterie pharmacie
invertases	glucoserie, confiserie
amyloglucosidases	glucoserie
pectinases	jus de fruits
lactase maltase	pharmacie diététique
cellulases	alimentation animale
catalase	laiterie (stérilisation)
lysozyme	laiterie (stérilisation)
pénicilline amidase	pharmacie

Dans la grande majorité des applications industrielles, le prix de revient est un facteur très contraignant. Les préparations enzymatiques sont d'une faible pureté. Ce sont généralement des extraits bruts de sucres digestifs ou de tissus animaux, végétaux et surtout de microorganismes. Les techniques d'immobilisation doivent donc être simples et d'un faible prix de revient. Elles doivent faire appel à une technologie permettant le recours à une main d'œuvre peu qualifiée. Les conditions doivent permettre des traitements de volumes importants, ne pas être trop sensibles à de faibles variations des conditions de fabrication, se prêter à une conservation durable du produit obtenu aussi bien au stockage qu'en cours d'opération et présenter une résistance mécanique suffisante pour fonctionner dans des réacteurs de grande taille et sous d'assez fortes pressions. L'ensemble de ces contraintes fait qu'un grand nombre de procédés applicables à l'échelle du laboratoire cessent d'avoir tout intérêt dès que l'on passe à l'échelle pilote. Lorsqu'on ajoute aux contraintes précédentes la nécessité de se protéger contre l'agression microbienne, celle de pouvoir permettre un nettoyage périodique des installations, on imagine la sévérité de la sélection qui s'impose aux procédés de fixation des enzymes dans le domaine industriel.

Il faut pourtant signaler que certains secteurs se prêtent mieux que d'autres à l'application de ces techniques, soit parce que le prix de revient est un facteur moins contraignant, soit parce que les exigences particulières concernant le produit rendent spécialement attrayante l'idée d'y employer des enzymes fixées.

C'est le cas par exemple du domaine pharmaceutique où certaines réactions exigent une spécificité telle que seules les enzymes pures ou très bien purifiées peuvent y être employées. C'est par exemple le cas dans la fabrication de certains stéroïdes ou de certains antibiotiques. La fixation d'une enzyme purifiée peut alors permettre de réduire fortement les prix de revient par la récupération de la préparation enzymatique ou encore par la transformation d'une fabrication discontinuée en une fabrication continue. Dans le domaine alimentaire, certains produits sont traditionnellement traités par des enzymes, soit pour les fluidifier soit pour éviter leur précipitation au froid. Certaines législations interdisent l'introduction définitive des enzymes dans le produit fini. L'utilisation des enzymes fixées permet dans ce cas d'appliquer le traitement enzymatique sans altérer le produit fini. C'est le cas de la bière et des jus de pomme.

Le traitement continu de ces produits alimentaires représente généralement un progrès important sur les techniques traditionnelles. Mais il ne faut pas oublier que ces techniques créent des contraintes nouvelles. En effet, les traitements enzymatiques en cuves immobilisent des récipients de grandes tailles; mais ils ne bloquent pas des installations très élaborées. De ce fait, les temps d'action enzymatiques peuvent être prolongés sans inconvénient majeur lorsque les conditions défavorables de réaction obligent à des temps d'action très longs en vue d'obtenir les derniers pour cent nécessaires aux producteurs. Dans une installation en flux, ces temps additionnels représentent des volumes excédentaires d'installations souvent très élaborées, donc très coûteuses, et posent de nombreux problèmes nouveaux de transfert, d'équilibrage et de lutte contre la contamination bactérienne.

La fixation d'enzymes implique un support. Celui-ci crée un encombrement dans les réacteurs; donc un volume mort. Le rapport surface active sur volume mort est optimal lorsque l'enzyme est sous la forme de monomère. Par contre, sa durée de vie augmente lorsque les sites actifs sont dispersés avec une charge inactive sur un support. Il y a donc un rapport optimal de dispersion qui demande à être calculé dans chaque cas particulier. Comme il a été dit plus haut, le support peut avoir un effet

positif ou négatif sur l'activité enzymatique. Il peut aussi avoir une influence sur les substances transformées. De ce fait, ses caractéristiques physico-chimiques doivent être soigneusement étudiées. Les considérations de prix de revient font rechercher des produits faiblement coûteux et de bonne résistance mécanique. Il faut toujours se préoccuper du risque de solubilisation de ces supports, donc de voir les fragments solubilisés altérer la qualité du produit à obtenir.

L'application potentielle des enzymes fixées découle naturellement des utilisations actuelles des enzymes dans les processus industriels. Elles sont largement répandues au delà de l'application aux lessives bien connue du grand public. La stabilisation des enzymes et leur utilisation durable pendant plusieurs mois va permettre d'en étendre l'application à des molécules plus chères, plus pures et susceptibles de ce fait de multiples interventions spécifiques inédites.

Si l'on s'en tient aux enzymes utilisées traditionnellement il faut citer

### Les amylases

Leurs premières applications dans l'industrie textile datent du début de ce siècle. Elles ont pour but de détruire l'apprêt du fil après tissage et avant teinture ou blanchiment. Ce traitement se fait actuellement en continu à l'aide d'enzymes d'origine bactérienne.

La dégradation de l'amidon intervient aussi dans de nombreuses industries alimentaires : en brasserie pour la liquéfaction de l'amidon des grains d'orge crus ; en pharmacie comme aides digestives ; en boulangerie pour retarder le racissement du pain et aider à sa conservation ; en pâtisserie et en biscuiterie dans le même but ; en diététique pour faciliter la digestibilité des farines.

Leur emploi comme accessoire dans les mélanges lessiviels doit aussi être cité ici.

En papeterie, elles sont utilisées dans l'encollage et la reliure.

### Les protéases

Elles sont largement utilisées dans divers secteurs industriels, en particulier dans le domaine alimentaire. Dans certains pays et dans certains secteurs, on les emploie comme attendrisseurs de la viande ; en brasserie, pour prévenir le trouble de la bière au refroidissement ; en boulangerie et pâtisserie, pour favoriser la levée régulière de la pâte ; en fromagerie, pour coaguler le lait (prisure, pepsine) ; dans l'alimentation animale, pour favoriser la digestibilité.

En pharmacie on les utilise comme aides digestives. En tannerie pour confir les peaux en conjonction avec les élastases ou encore pour les épiler grâce à l'attaque du bulbe du poil.

Il y a quelques années, les protéases alcalines agissant en présence de détergents eurent un grand succès en blanchisserie. Leur efficacité réelle compensait leur prix de revient assez élevé. Deux facteurs ont réduit la croissance de cet important secteur d'application des enzymes : l'emploi des machines à laver dont la température s'élève rapidement au delà de 60°, détruisant du même coup l'activité enzymatique ; les réactions allergiques observées dans les usines de fabrication chez certains membres du personnel manipulant de larges quantités de ces protéases.

### Les lipases

Elles sont employées comme aides digestives, en fromagerie, en chocolaterie.

De nombreuses autres enzymes sont utilisées dans des

applications plus restreintes. Citons le cas des invertases en gluconerie et en confiserie ; des pectinases dans l'industrie des jus de fruit : leur rôle est de réduire la viscosité, de faciliter la clarification, et de préparer éventuellement la gélification ; des cellulases dans les aliments du bétail ; des lactases et des maltases pour réduire les intolérances à certains sucres ; de la L-asparaginase dont il est beaucoup question aujourd'hui en raison de son efficacité dans la thérapeutique de certaines leucoses (voir plus loin les applications thérapeutiques).

L'intérêt de la fixation s'accroît lorsque le prix de revient de l'enzyme s'élève ou lorsque le procédé technique ou la réglementation exige que l'enzyme soit séparée du produit après traitement. La fixation en phase insoluble se justifie en particulier lorsque le matériau traité est en solution. La stabilisation peut aussi se faire en phase soluble (polymérisation sans insolubilisation), variante intéressante lorsque le matériel à traiter est insoluble. Le passage du traitement statique en cuve par une enzyme soluble au traitement en flux par enzyme insoluble pose un ensemble de problèmes bien connu des spécialistes du génie chimique qui transforment sur catalyseur des substances en flux. Le calcul des flux, celui des volumes et des températures est analogue dans ce cas à ceux qui sont faits couramment dans les industries concernées. Les particularités résident dans la spécificité de la réaction catalysée par les enzymes, mais aussi dans leur relative lenteur d'action et leur grande sensibilité à la température. D'où la nécessité d'un calcul précis des paramètres et d'un contrôle continu des conditions locales en cours de fonctionnement.

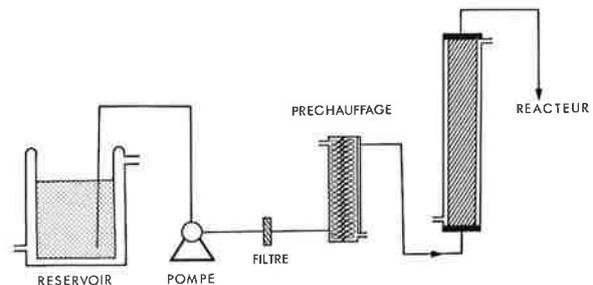


Figure 11. Schéma de montage d'une réaction en flux continu sur réacteur-colonne fixe porteur d'enzyme immobilisée sur support.

Le substrat est pompé à partir d'un réservoir de stockage. Après filtration et préchauffage, il est passé à travers le réacteur lui-même thermostaté.

Volume du réacteur, flux et températures sont calculés sur modélisation après expérimentations préalables.

Dans les cas les plus favorables, la fixation enzymatique entraîne un tel gain sur le coût du catalyseur que ce facteur devient pratiquement négligeable par rapport aux autres éléments du prix de revient. Par exemple, une amylo-glucosidase fixée sur particules et fonctionnant en colonne de traitement continu peut dégrader pendant plusieurs mois sans perte notable d'activité des solutions industrielles de 400 g d'amidon soluble par litre en libérant un produit qui contient plus de 95 % de glucose. Les difficultés pratiques sont de deux ordres : le calcul des conditions optimales, et la prévention de la contamination bactérienne des préparations. Des calculs d'optimisation ont été faits par Lilly et coll. puis repris par les équipes du M.I.T. sur divers systèmes, en particulier la chymotrypsine et appliqués à des conditions évolutives par Gelff et coll.

La prévention de la contamination bactérienne se fait avec les antiseptiques habituels en tenant compte de la sensibilité éventuelle des enzymes, ou encore en maintenant la température à des niveaux suffisamment élevés. La résistance thermique relative des enzymes fixées favorise cette solution, mais des contrôles répétés sont nécessaires pour estimer la durée de vie réelle de la préparation à chaque température.

## B. Les applications analytiques

L'emploi des enzymes en analyse et métrologie s'est largement répandu ces dernières années, en particulier dans le secteur biologique et médical. L'extension de l'application des enzymes est limitée par leur prix de revient élevé, et surtout par leur labilité pendant le transport et la conservation. La stabilisation des enzymes en phase insoluble permet d'espérer pour l'avenir un gain dans ce domaine, donc une extension marquée de ces procédés.

Deux méthodes appliquant les procédés traditionnels de mesure enzymatique sont actuellement essayées : d'une part, la fixation d'enzymes sous forme de poudre, et sur bandelettes ou tubes de matière plastique a été tentée pour permettre des examens répétés avec la même préparation enzymatique; d'autre part, des colonnes contenant de la poudre enzymatique et se prêtant à l'analyse en flux continu ont été préparées. Les bandelettes de ce type ont déjà été essayées par des firmes spécialisées. Les colonnes font l'objet d'études de plusieurs équipes parmi lesquelles il faut citer celle de Hornby.

Dans ce même domaine, des pellets enzymatiques insolubles ont été agglomérés en présence de cofacteurs et des réactifs nécessaires à un dosage donné. Placés dans un spectrofluomètre, ces pellets permettent un nombre assez important de mesures répétées dans les domaines analytiques où la préparation préalable d'un mélange préfabriqué permet une réaction rapide et spécifique de fluorescence. Il va de soi que ces applications sont particulièrement intéressantes en biologie médicale (Guilbault).

L'emploi des membranes et gels à enzymes a conduit à des solutions nouvelles qui font intervenir le couplage de la transformation enzymatique et de la mesure électrique. L'application la plus séduisante en est l'*électrode à enzyme* inventée par Clark et dont plusieurs équipes recherchent aujourd'hui des applications aussi bien en biologie médicale qu'en recherche biologique. Les électrodes à enzyme consistent en une électrode de verre, à membrane ou polarographique recouverte d'un gel ou d'un film porteur de l'enzyme transformant la substance à doser. Plongée dans la solution inconnue, l'électrode coiffée de son film transforme de faibles quantités du produit à doser à l'intérieur du film. De ce fait, un gradient de concentration du produit de la réaction apparaît dans la membrane et peut être mesuré par la surface sensible de l'électrode. Cet instrument de mesure est particulièrement adapté aux situations dans lesquelles la substance à doser ne permet pas une mesure électrique directe, mais où l'un des produits de la réaction enzymatique permet cette mesure.

Les électrodes à enzymes ont d'abord été développées pour la mesure du glucose et de l'urée en solution artificielle. Le glucose est transformé par la glucose oxydase en acide gluconique avec consommation d'oxygène. La concentration résultante d'oxygène dans la membrane est mesurée à l'aide d'une électrode polarographique (Updike et Hicks). L'urée traitée par l'uréase libère des ions ammonium mesurables par une électrode à cations (Guilbault). D'autres substrats peuvent être mesurés par des électrodes à enzyme, en particulier tous ceux qui peuvent être spécifiquement décarboxylés en donnant naissance à du gaz carbonique. C'est ainsi que les acides aminés ont pu être dosés spécifiquement par des décarboxylases spécifiques d'un acide aminé (Berjonneau et coll.).

La mesure spécifique par électrode de substances biochimiques a toutes chances d'avoir des implications analytiques non seulement dans le domaine industriel et médical, mais aussi dans celui de la recherche biologique, surtout lorsque les électrodes auront été

suffisamment miniaturisées. D'une part, les électrodes à enzyme pourront servir de capteurs permanents de certaines grandeurs chimiques; d'autre part, elles permettront de doser d'une manière continue des substances jusqu'ici presque inaccessibles à la mesure répétée en raison de la complexité des procédés analytiques (Dopa, histidine, sérotonine, etc..).

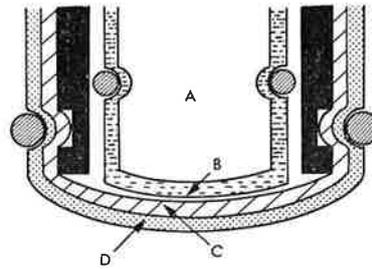


Figure 12. Coupe de la tête d'une électrode à enzyme (électrode à acide aminé). (Tran et coll.)

A : Corps de l'électrode de verre.

B : Surface sensible de verre.

C : Membrane de téflon perméable au CO<sub>2</sub>.

D : Membrane de cellophane porteuse de décarboxylase (enzyme libérant du CO<sub>2</sub>).

La membrane enzymatique libère le CO<sub>2</sub> à partir du substrat. Ce dernier traverse la membrane (C) et modifie le pH de la solution comprise entre (B) et (C). Le pH est mesuré par l'électrode de verre.

L'ouverture créée dans le domaine analytique pour les enzymes en phase insoluble ne doit pas faire oublier les contraintes propres à leur application. C'est ainsi que la spécificité de l'enzyme limite la spécificité du système. Par exemple, l'utilisation d'une L-aminoacide oxydase, enzyme peu spécifique d'oxydation des acides aminés de la série L, ne permet pas de mesurer spécifiquement tel ou tel acide aminé. Dans un mélange, son action se fait à des vitesses différentes selon l'acide aminé dégradé.

La mesure ne peut se faire que dans des domaines de pH où l'enzyme est active. Si l'on travaille dans des milieux industriels à des pH acides, de nombreuses enzymes ne seront pas applicables. L'emploi des enzymes insolubilisées demande que la mesure soit faite en milieu liquide et si possible homogène. Or, il est rare que les milieux biologiques étudiés soient entièrement homogènes. De plus, ils comportent généralement des lipides ou des macromolécules qui se déposent volontiers sur les surfaces et entraînent un encrassement qui réduit d'autant l'efficacité de l'instrument de mesure. Enfin, bien que l'enzyme fixée soit stabilisée, sa durée de vie n'est pas infinie et il est nécessaire de bien reconnaître avec quelle fréquence l'instrument de mesure, c'est-à-dire la particule ou la membrane enzymatique, doit être contrôlé et éventuellement remplacé.

## C. Les applications médicales

L'application des enzymes en thérapeutique est assez peu développée. En dehors des rares enzymes dont le mode d'action est bien connu, quelques autres sont utilisées empiriquement parce que l'on a constaté qu'elles avaient un effet bénéfique dans certaines situations pathologiques.

De longue date, on emploie des enzymes digestives pour suppléer des insuffisances de sécrétion spontanée. Des extraits bruts d'organes sont encore utilisés. Ce sont des préparations d'enzymes purifiées qui leur ont succédé, seules ou en association. Les enzymes les plus couramment utilisées dans ce but sont les amylases, les protéases, les lipases, les nucléases et les cellulases.

Certaines enzymes se sont avérées actives dans des processus inflammatoires. Certaines préparations enzymatiques sont employées pour exercer un effet local.

C'est le cas de l'alphachymotrypsine, du lysozyme et des amylases.

La L-asparaginase est d'apparition récente. Son action favorable dans le traitement des leucoses lymphoïdes semble s'expliquer aujourd'hui par un mécanisme immunologique.

L'urate-oxydase qui dégrade l'acide urique en allantoiné s'est avérée efficace dans le traitement des hyperuricémies et dans la goutte.

Un assez grand nombre d'autres enzymes ont été et sont actuellement utilisées en thérapeutique, avec des objectifs divers.

**Tableau III.**

Enzymes utilisables en thérapeutique.

Enzymes	Voie d'administration	Indications
		thérapeutiques envisagées
<i>A. Enzymes digestives</i>		
pepsine, papaïne	per os	insuffisances digestives
pancréatine		
ficases, broméliases		insuffisances digestives
amylases	per os	
cellulases, hemi-cellulases	per os	
<i>B. Enzymes spécifiques de dégradation des sucres</i>		
lactases	per os	intolérance aux lactose, maltose, saccharose
maltases		
invertases		
<i>C. Enzymes de diffusion</i>		
hyaluronidase	locale et injections	diffusion d'antibiotiques substances radio-opaques anesthésiques, etc...
thiomucase	(sous-cutanée et I.M.)	
trypsine et -chymotrypsine	I.M. et percutanée	réduction d'inflammations
<i>D. Enzymes diverses</i>		
lysozyme	locale	antiinfectieux
catalase	sous-cutanée et I.M.	hypercholestérolémie
urate-oxydase	intra-veineuse	hyperuricémie, goutte
L-asparaginase	intra-veineuse	leucoses
	extra-corporelle	lymphoblastiques
urokinase	extra-corporelle	thrombose sur appareil extra-corporel
<i>E. Enzymes de détoxication et de substitution</i>		
uréase	extra-corporelle	néphrites avec azotémie
phénylalanine	extra-corporelle	phénylcétonuries
catalase	extra-corporelle	oxygénation

L'immobilisation des enzymes a un double but en vue des applications thérapeutiques : prolonger la vie de l'enzyme et réduire les réactions immunologiques lors de son introduction dans l'organisme.

L'insolubilisation permet sans doute la meilleure protection de l'enzyme contre la protéolyse mais n'autorise pas son introduction dans la circulation. Les polymères solubles se prêtent à l'injection par fixation de l'enzyme sur support protéique soluble; on accroît ainsi la stabilité de l'enzyme bien que dans une moindre mesure que par insolubilisation (Paillot et coll.). Dans les conditions actuelles on ne réduit pas des réactions immunologiques. L'utilisation d'enzymes fixées sur des tubes ou des membranes et le passage du sang à leur contact dans un circuit extra-corporel permet en principe de répondre à la fois aux deux objectifs de stabilité et d'inertie immunologique; elle a pour double inconvénient la complexité de l'installation d'un appareil de circulation extra-corporelle et les risques de coagulation ou d'altération des globules du sang qu'elle entraîne.

Dans certaines circonstances, l'application d'un

circuit extra-corporel est de toute manière nécessaire au stade actuel de la thérapeutique. C'est le cas de la dialyse rénale et celui des appareils cœur-poumon inévitables dans la chirurgie cardiaque ou des gros vaisseaux. Dans ces circonstances exceptionnelles, l'utilisation d'enzymes fixées peut apporter une contribution intéressante. C'est ainsi que Chang a inclus de l'uréase dans une émulsion de nylon en vue d'accélérer l'épuration de l'urée de l'organisme grâce à sa destruction par l'enzyme. De même, des membranes d'oxygénation porteuses de catalase et d'anhydrase carbonique ont été réalisées. La catalase permet d'oxygéner le sang à partir de solutions d'eau oxygénée. L'anhydrase carbonique facilite le transport du CO<sub>2</sub> à travers la membrane et accélère de ce fait son transfert (Tran et coll.). L'emploi d'urokinase greffée, enzyme de dégradation de la fibrine est aussi à l'étude pour créer des parois artificielles non coagulantes (Sampson et coll.). Récemment, des tubes greffés d'asparaginase et de phénylalanine-ammonium lyase ont été réalisés dans le but de traiter respectivement des leucoses et des phényl-cétonuries.

A terme, la recherche sur les enzymes fixées en thérapeutique s'efforce d'aboutir à des *prothèses internes*, c'est-à-dire à l'implantation permanente d'enzymes étrangères qui complèteraient les insuffisances ou corrigeraient les désordres créés par la défaillance de l'organisme malade. Par exemple, dans le cas des anomalies congénitales donnant lieu à l'absence ou à l'insuffisance d'une enzyme, l'emploi de *prothèses enzymatiques* paraît la solution logique. Au stade actuel, la technologie ne permet pas encore de résoudre les difficiles problèmes liés à ces traitements au long cours : ceux de l'activité *in situ*, la conservation de l'enzyme et la compatibilité avec l'organisme du malade.

La fixation des enzymes ne permet pas seulement la transformation de certains substrats mais aussi la fixation spécifique de certaines molécules qui ont une affinité biologique pour cette enzyme (substrat, produit, coenzyme, etc.). Ce principe, qui permet la *purification* de certaines substances *par affinité*, serait aussi applicable à l'épuration spécifique de certains produits nocifs. Ainsi, par exemple, des drogues ou des molécules biologiques pathogènes pourraient être fixées par des enzymes ou autres protéines insolubilisées dans des circuits extra-corporels. L'application possible à des intoxications par somnifères ou par tranquillisants est actuellement étudiée par plusieurs équipes.

#### D. Applications en recherche biologique

Les possibilités ouvertes par l'insolubilisation des enzymes en phase structurée ne sont pas encore perçues dans toute leur ampleur. Déjà, des travaux explorent plusieurs dimensions des applications possibles en recherche biologique. Les possibilités analytiques des enzymes fixées sont apparues récemment et ont donné lieu à des travaux, sur les acides nucléiques en particulier. La fixation de sites enzymatiques sur une structure membranaire ou particulière permet aussi de simuler le fonctionnement d'une structure biologique par des modèles très simples dont les lois permettraient de guider la recherche effectuée directement sur des matériaux expérimentaux naturels.

##### 1. Les enzymes immobilisées en tant qu'instrument analytique

Dès les premières réalisations d'enzymes fixées, elles ont été appliquées pour étudier la structure d'acides nucléiques et de protéines.

En outre, on s'est efforcé d'utiliser ces systèmes comme moyen de purification spécifique par affinité biologique,

selon la procédure déjà largement répandue pour la purification des antigènes et des anticorps. En particulier, la séparation d'activateurs, d'inhibiteurs et de substrats a été réalisée. Une procédure de séparation de certains cofacteurs en l'absence de substrat a aussi été envisagée.

A ce propos, il faut rappeler que s'est développé récemment, en particulier dans le laboratoire d'Anfinsen un ensemble de techniques de séparation et de purification d'enzymes appliquant la *chromatographie d'affinité*. La procédure, largement perfectionnée par Cuatrecasas, consiste en la fixation d'un substrat modifié, d'un inhibiteur ou d'un cofacteur sur un support macromoléculaire et en vue de retenir par affinité biologique les enzymes qui réagissent normalement avec ces facteurs. Cette procédure permet, soit de fixer l'enzyme puis de la détacher dans un deuxième temps par voie chimique ou physique à partir d'un mélange, soit encore de retarder l'enzyme en profitant d'une faible affinité. On réalise ainsi un véritable partage entre phases dans un système de chromatographie classique avec l'avantage considérable d'une rétention spécifique.

## 2. Étude du comportement des enzymes en structure

Comme il a été décrit plus haut, la fixation dans les structures modifie le comportement enzymatique. Le but de ce type de recherches est de placer les enzymes fixées dans un contexte proche de celui que l'on suppose exister dans la cellule biologique. Un certain nombre de faits nouveaux est déjà ressorti de cette prospection, qui ne fait qu'ouvrir l'important chapitre de l'enzymologie en structure, dont le développement demandera sûrement de nombreuses années. En particulier, l'analyse des effets de la structure sur la cinétique et sur la réponse aux différents effecteurs a montré l'importance du champ à prospecter et la nécessité de mener une étude systématique où tous les possibles sont passés au crible de la simulation sur ordinateur (Kernevez et coll.).

## 3. Étude de l'interdépendance entre structure et fonction

De nombreux effets de molécules enzymatiques ne se conçoivent pas sans structure. Tel est le cas, par exemple, pour les enzymes de perméation et de transport. Jusqu'ici, l'intervention catalytique d'un facteur de transfert est resté assez mystérieuse; des modèles descriptifs se sont efforcés de proposer des hypothèses explicatives. Certaines tiennent très étroitement compte de la structure biologique telle qu'elle nous est connue aujourd'hui; d'autres font intervenir les concepts fonctionnels tenant compte de considérations thermodynamiques, électriques, ioniques, etc... La réalité moléculaire des facteurs de transport est encore peu éclaircie; celle des mécanismes intervenant dans le transport de sucre ou d'acide aminé à travers la membrane péricellulaire ont montré l'évidence de processus métaboliques, donc enzymatiques, accompagnant ces transports.

En fait, la simple localisation respective des activités enzymatiques dans un système structuré peut expliquer les accumulations d'un métabolite ou d'un ion comme le montre le modèle à hexokinase et phosphatase décrit plus haut.

De la même manière, la simple réaction enzymatique dans une membrane créant une ionisation nouvelle comme résultat de la réaction ou réduisant au contraire cette ionisation, peut avoir un effet sur le transport des ions à travers la membrane, c'est-à-dire sur la perméation de ces ions (David et coll.).

D'importants travaux récents ont montré comment certains petits peptides ayant une activité antibiotique peuvent changer localement la structure d'une membrane lipidique et faciliter ainsi un passage d'ions à travers elle. L'intérêt de cette expérience tenait dans le fait qu'elle fournit une hypothèse explicative intéressante de l'activité de ces antibiotiques *in vivo*.

De la même manière, une réaction enzymatique qui change l'ionisation au sein de la membrane peut créer des situations où le mouvement d'ions à travers elle peut se modifier rapidement et d'une manière réversible. C'est ce que l'on observe lors de la dépolarisation de la plaque motrice des cellules nerveuses. Un relais métabolique simple pourrait intervenir entre la stimulation nerveuse et la réponse ionique ou électrique au niveau d'une cellule sensible. Des simulations faites avec de l'acétylcholinestérase fixée en membranes artificielles viennent à l'appui de cette hypothèse.

## Perspectives

Comme on a pu le constater, les perspectives offertes par les enzymes immobilisées dans les domaines biologique, médical, industriel sont loin d'être négligeables. Aujourd'hui, elles dépendent largement du développement de la fabrication des enzymes elles-mêmes.

La fabrication industrielle des enzymes couvre en fait deux secteurs dont l'un est déjà bien développé, mais concerne presque exclusivement les préparations à usage industriel, mélanges à peine purifiés dont la fixation n'est intéressante que dans la mesure où les procédés deviendront simples, peu coûteux et adaptés à la fabrication à grande échelle.

L'autre secteur concerne les préparations destinées à la recherche biologique et médicale et à l'analyse clinique ou pharmaceutique. Le nombre des enzymes de divers degrés de pureté commercialisées dans ce secteur s'accroît rapidement. Mais les prix de revient sont très élevés et la fabrication est limitée par les problèmes de transport et de stockage. Les prix de revient de ces enzymes pourraient sans doute rapidement diminuer pour toutes celles dont les conditions d'utilisation permettraient une fabrication répétitive en quantité suffisante, répondant à une demande stable. Dans ce but, l'immobilisation et la stabilisation peuvent jouer un rôle important en ajustant l'offre à la demande et en permettant une conservation plus longue des préparations, pour s'adapter à l'extrême diversité et à l'extrême morcellement de la demande d'enzymes pures. Dans la mesure où les procédés de chromatographie d'affinité se développeront rapidement, un nouveau facteur apparaîtra en faveur de la diversification des enzymes fabriquées et commercialisées : c'est l'élégance et la simplicité des procédés de purification qui vont en résulter. Plus nombreuses et plus coûteuses seront les préparations, plus la stabilisation par fixation deviendra intéressante et rentable. En fait, l'intérêt que susciteront les enzymes immobilisées croîtra le jour où les biologistes auront appris à s'en servir à bon escient, donc à ne plus attribuer aux préparations enzymatiques elles-mêmes les résultats apparemment discordants qui proviennent souvent de la connaissance imparfaite d'un outil nouveau dont les caractéristiques n'ont pas encore été bien assimilées.

Pour que cette évolution se fasse dans le sens souhaité, il est nécessaire que les chimistes développent des techniques de fixation telles que l'activité enzymatique résiduelle après traitement demeure très élevée (et toujours supérieure à 25%); que la porosité des supports soit contrôlée; que le mode de fixation soit si possible connu de manière à ce que l'on puisse prévoir le point d'insertion de l'agent de fixation sur la

molécule enzymatique. Actuellement, la chimie des protéines et des acides aminés est suffisamment bien connue pour qu'un grand nombre d'agents d'immobilisation dérivant directement ou indirectement de la chimie des protéines soit mis dans les prochaines années à la disposition des chercheurs. Celui-ci doit seulement se rappeler qu'il doit éviter toutes les conditions qui dénaturent la protéine : la chaleur, les pH extrêmes, les sels de métaux lourds, les solvants organiques sauf à très basse température. Si le chimiste réussit à fixer l'enzyme sans dégrader son activité, il constatera avec plaisir que cette activité reste stable ensuite pour des variations de pH bien plus grandes, et même souvent en présence de solvants organiques non miscibles à l'eau. Ces nouvelles propriétés de l'enzyme et la possibilité de varier largement les supports et la longueur des bras de fixation permet un nombre pratiquement infini de combinaisons de formes physiques et de propriétés mécaniques.

L'une des voies d'avenir vers laquelle tendent de nombreux chercheurs est le développement à grande échelle des enzymes industrielles fixées. Déjà la fabrication des L-acides aminés à partir du racémique est effectuée industriellement au Japon. Déjà des tentatives de franchir une ou plusieurs étapes de synthèse de la pénicilline et de certains stéroïdes à l'échelle industrielle grâce à des enzymes fixées ont été développées dans plusieurs pays. D'autres études sont actuellement en cours pour fabriquer sur enzymes immobilisées des mélanges d'acides aminés à partir de protéines, ou encore de glucose à partir de l'amidon. Il n'est pas impossible qu'à l'heure actuelle soient déjà commercialisées dans certains pays des lessives porteuses d'enzymes fixées.

D'autres applications prévisibles à brève échéance concernent l'analyse médicale. Des bandelettes de diagnostic rapide, des appareils de mesure continue ou répétitive de certains paramètres, tels que le glucose et l'urée sont actuellement en cours de mise au point accéléré. Demain, la multiplication de ces appareils se fera rapidement, aussitôt que les premiers auront fait la preuve de leur efficacité.

Dans le domaine de la recherche biologique, de multiples tentatives sont en cours actuellement en ordre dispersé ; les enzymes fixées deviendront un outil normal pour certaines études de structure le jour où la technologie de fixation deviendra suffisamment sûre pour ne pas créer de phénomènes parasites, et où les biologistes auront appris à s'en servir dans de bonnes conditions. En particulier, la fixation devrait permettre de nouvelles approches de l'étude de la structure des sites actifs des enzymes elles-mêmes, puisque leur fixation laisse espérer une orientation spatiale dans une seule direction, donc l'application de procédés

d'étude qui ne peuvent convenir pour des molécules orientées au hasard.

L'immobilisation des enzymes ramène l'enzymologiste aux sources de sa connaissance, c'est-à-dire à l'étude de la structure et des mécanismes cellulaires. Elle permet d'établir progressivement un pont entre les lignes de recherche moléculaire dont on sait le succès et les lignes de recherches morphologiques lesquelles donnent souvent une vision totalement différente du même objet d'étude. Cette double vision aurait pu faire penser qu'un « principe d'incertitude » serait applicable à la cellule, et qu'on ne peut connaître en même temps la structure et les mécanismes moléculaires qui sous-tendent son fonctionnement. Le biologiste doit tendre à réduire cette dangereuse diplopie intellectuelle. La fixation enzymatique rapproche aussi chimistes et biochimistes en laissant entrevoir des possibilités de modifier par voie chimique des molécules considérées comme intangibles dans le passé. Elle rapproche de même les spécialistes de la biochimie appliquée de ceux du génie chimique en laissant apparaître que les principes bien connus des spécialistes du génie chimique seront un jour ou l'autre applicables, bien qu'avec quelques amodations, au génie biochimique, lequel a de bonnes chances de tirer profit des enzymes stabilisées pour faire un bond en avant au cours des toutes prochaines années.

### Bibliographie

- Silman I. H. et Katchalski E., *Water Insoluble Derivatives of Enzymes, Antigens and Antibodies* dans « *Annual Review of Biochemistry* », Boyer P. D. Editor Acad. Press New York, 1966, **35**, 873-904.
- Enzyme Engineering, Wingard L. B. Editor, *Biotechnology and Bioengineering Symposium n° 3*, Interscience Publishers, New York, 1972.
- Goldman R., Goldstein L. et Katchalski E., *Enzyme Derivatives and Artificial Enzyme Membranes* dans « *Biochemical aspects of reactions on solid supports* », Stark J. R. Editor Acad. Press New York, 1972, p. 1 à 78.
- Mosbach K., *Enzymes bound to Artificial Matrixes*, *Scientific American*, 1971, **26**, 224.
- Weetall H. H. et Messing R. A., *Insolubilized Enzymes on Inorganic Material* dans « *The Chemistry of Biosurfaces* », Hair M. L. Editor, Marcel Dekker New York, 1972, **2**, 522.
- Zaborsky O. R., *Immobilized Enzymes*, Chemical Rubber Cy Press, Cleveland Ohio, 1973.
- Broun G., Thomas D., Gellf G., Domurado D., Berjonneau A. M. et Guillon C., *New methods for binding Enzymes Molecules into Water-insoluble Matrix-Properties after Insolubilization*, *Biotechnol. Bioeng.*, 1973, **15**, 359.