Danièle C. Gautheron

Pierre R. Coulet

# Enzymes immobilisés sur membranes de collagène : perspectives biotechnologiques *

**par P. R. Coulet et D. C. Gautheron**

*(Laboratoire de biologie et technologie des membranes du CNRS, Université Claude Bernard - Lyon I, 43, Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex)*

*La technologie enzymatique faisant appel aux enzymes « immobilisés » est actuellement en plein développement. Le principe général consiste à fixer, sur un support insoluble, un enzyme ou un système multi-enzymatique en lui conservant ses propriétés catalytiques, son extraordinaire spécificité et son aptitude à travailler dans des conditions douces. Le biocatalyseur ainsi préparé est réutilisable sur de longues périodes, contrairement aux enzymes en solution qui ne sont pas récupérés en fin de réaction.*

*Au Laboratoire de biologie et technologie des membranes du CNRS (Lyon-Villeurbanne), un axe de recherche fondamentale concernant la fixation d'enzymes sur membranes de collagène a été développé pour l'étude de la catalyse enzymatique hétérogène. La mise en œuvre de cette technique pour la réalisation de bioréacteurs et de capteurs enzymatiques a également été abordée et est décrite dans le présent article.*

## Résumé

Des membranes de collagène, obtenues dans des conditions industrielles au Centre Technique du Cuir à Lyon, ont été utilisées pour le greffage covalent d'enzymes. L'activation préalable du support de collagène par la réaction aux acyl-azotures de Curtius est suivie du couplage de l'enzyme qui s'effectue par simple immersion du support activé dans une solution enzymatique tamponnée. Tous les réactifs d'activation sont éliminés par lavage avant l'étape de couplage évitant à l'enzyme tout contact avec des agents dénaturants. Cette méthode de fixation sur collagène insoluble s'est révélée générale et facile d'emploi, assurant une très bonne stabilité de l'activité fixée. Ces membranes enzymatiques possèdent d'excellentes propriétés mécaniques et une très bonne résistance aux attaques bactériennes. Outre leur très grand intérêt dans l'étude fondamentale de l'enzymologie hétérogène et des phénomènes de diffusion aux interfaces, elles sont utilisées dans des bioréacteurs polymembranaires continus et comme éléments sensibles d'électrodes spécifiques à enzymes.

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques protéiques extrêmement efficaces, présentant une grande spécificité vis-à-vis de leur substrat, travaillant en solution aqueuse dans des conditions douces de température et de pH.

** 1. Version complétée et actualisée de la conférence présentée à Lyon, en mai 1979, à la « Journée de filtration en génie biologique et médical » organisée par le Professeur C. Eyraud.*
*2. Dans certaines publications, le genre féminin est attribué au mot enzyme. Les auteurs de cet article préfèrent utiliser le genre masculin adopté par l'Académie française et par des revues spécialisées de biochimie.*

Pendant de nombreuses années, l'étude des propriétés d'un enzyme s'est faite en solution, en phase homogène. L'enzyme extrait d'organismes vivants était purifié, puis étudié dans différentes conditions proches de celles du milieu dans lequel il agit habituellement.

Depuis une vingtaine d'années, l'étude conjointe des ultrastructures cellulaires en microscopie électronique et des réactions biochimiques de fragments isolés par ultracentrifugation différentielle a montré que de nombreux enzymes travaillaient *in vivo* soit fixés à des membranes, soit inclus à l'intérieur de ces membranes. A la suite de ces travaux, le greffage d'enzymes sur des supports variés s'est très fortement développé et l'enzymologie hétérogène connaît un grand essor tant sur le plan fondamental qu'appliqué, grâce à la récupération possible du biocatalyseur en fin de réaction (1). Des supports très variés (cellulose, collodion, verre poreux, nylon, etc...) ont été utilisés sous différentes formes : suspension de grains finement divisés, billes de tailles variables, mousses, copeaux, membranes. Quel que soit le type de support choisi, celui-ci doit présenter une bonne stabilité chimique et thermique, ne pas se déformer et résister aux contaminations bactériennes. Les supports membranaires, bien que présentant de nombreux avantages, sont encore peu employés à ce jour (2).

Dans une première phase du travail, des films ultrafins de collagène, préparés de façon artisanale (3), ont été utilisés pour greffer de la déshydrogénase glutamique (4). Puis une méthode générale de fixation d'enzymes sur des membranes de collagène, fabriquées dans des conditions industrielles au Centre Technique du Cuir à Lyon, a été mise au point au Laboratoire (5, 6). Cette méthode consiste en une activation des groupements carboxyles du collagène en acyl-azotures réactifs et après élimination des réactifs, un couplage covalent a lieu en présence d'une solution enzymatique tamponnée. Cette technique extrêmement douce s'est révélée générale d'emploi et a permis l'étude fondamentale des phénomènes de diffusion qui, en enzymologie hétérogène, accompagnent la réaction catalytique.

La forme membranaire de notre support catalytique s'est révélée extrêmement intéressante pour réaliser différents types de réacteurs enzymatiques et pour servir d'éléments de détection extrêmement sensibles dans les « électrodes à enzymes » spécifiques d'espèces organiques non ionisées.

# Préparation des membranes enzymatiques

## Le support de collagène

Le support qui a été utilisé au cours de cette étude est un film de collagène produit dans des conditions industrielles par le Centre Technique du Cuir à Lyon. Sa fabrication a nécessité la mise au point préalable de dispersions collagéniques où la structure moléculaire du collagène était préservée, c'est-à-dire en évitant l'hydrolyse des liaisons transversales et la destruction de la structure en triple hélice de la macromolécule (7). Le film obtenu a une épaisseur de 0,08 à 0,1 mm et une largeur de 20 cm. On peut le stocker sous forme de feuilles de surfaces définies ou en rouleaux de plusieurs centaines de mètres (8, 9). Ces films sont plastifiés avec du glycérol (33 %).

## Activation et couplage

Ces films ont été choisis pour le greffage d'enzymes pour plusieurs raisons :
- pour leur insolubilité et leur maniabilité ;
- pour leur hydrophilie, essentielle au maintien de la stabilité des enzymes greffés et de leur activité catalytique ;
- à cause de leur nature protéique bénéfique au maintien de l'activité enzymatique ;
- à cause de leur excellente résistance mécanique ;
- enfin pour leur richesse en groupements activables.

En effet, les acides aminés intéressants pour le greffage par la méthode aux azotures sont ceux qui possèdent des groupements carboxyliques disponibles non engagés dans la chaîne peptidique, c'est-à-dire essentiellement les acides glutamique et aspartique. La valeur moyenne de leur fréquence dans le collagène est de 1/8,5 résidus. Tous ne sont sans doute pas susceptibles d'être utilisés pour la liaison puisqu'ils doivent être placés en position externe accessible, cependant cette abondance en groupements activables est en faveur du choix de ce matériau.

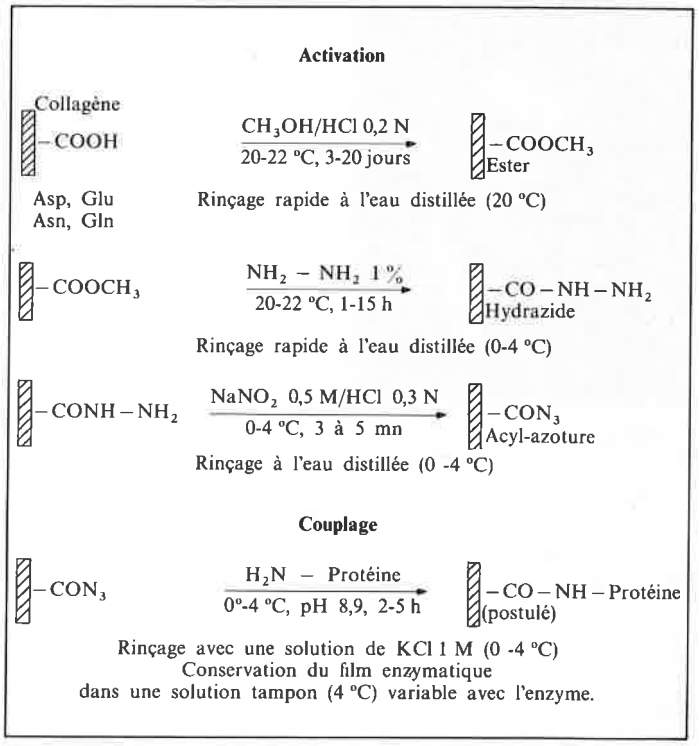
**Activation** (tableau 1)

Des morceaux de films ayant la forme et la dimension désirées sont découpés dans le support brut. Nous les désignons habituellement sous le terme « membrane ».

- *Estérification*

Sans tannage préalable, les membranes sont placées dans une solution de méthanol chlorhydrique (HCl 0,2 M final) à 20°-22 °C. Les groupements carboxyles sont estérifiés au cours du traitement et les membranes sont utilisables pendant 3 à 20 jours pour subir les étapes suivantes.

**Tableau 1. Fixation covalente d'enzymes sur films de collagène activés par la technique des acyl-azotures (conditions standard).**




- *Action de l'hydrazine*

Après un rinçage rapide à l'eau distillée, les membranes estérifiées sont placées dans une solution aqueuse d'hydrazine à 1 % pendant 1 à 15 heures.

- *Action de l'acide nitreux*

Après un nouveau rinçage suivant le bain d'hydrazine, les membranes sont plongées rapidement dans une solution de nitrite de sodium 0,5 M dans l'acide chlorhydrique 0,3 N à 0-4 °C préparée extemporanément. Après cette troisième étape, les groupements activés $CON_3$ permettront le couplage de l'enzyme.

**Couplage**

Un rinçage à l'eau distillée ou avec une solution tampon permet d'éliminer tous les réactifs d'activation évitant à l'enzyme tout contact dénaturant. Les membranes activées sont alors immergées dans la solution enzymatique choisie tamponnée à pH alcalin pendant une durée de 2 à 24 heures. La réaction de couplage entre l'enzyme et le support intervient alors. Les membranes enzymatiques sont ensuite abondamment rincées avec une solution de KCl 1 M et conservées à 4 °C dans une solution tampon dont la composition et le pH sont choisis en fonction de l'enzyme fixé. Le tableau 1 résume toutes les opérations décrites ci-dessus.

Comme le montre le tableau 2, plus de vingt enzymes appartenant à différentes classes ont été greffés par notre technique. Des enzymes protéolytiques comme la trypsine ou l'α-chymotrypsine ont été fixés, bien que le support soit lui-même de nature protéique. Ces membranes à activité protéolytique présentent une très bonne stabilité au stockage pendant des mois et le phénomène d'autolyse des molécules enzymatiques très net en solution n'est pas apparent. Pour tous les autres enzymes greffés, la stabilité est également remarquable puisque plus de 500 dosages peuvent être réalisés avec la même membrane active, échelonnés sur plusieurs mois d'utilisation. A noter également que ces membranes présentent une très bonne résistance aux attaques bactériennes.

Une technique histochimique, permettant la localisation de l'enzyme sur collagène, a été employée pour la mise en évidence de l'aspartate aminotransférase après fixation (10). Cette étude a montré que l'enzyme était localisé en surface ou près de la surface de la membrane. Ceci est important pour la bonne accessibilité des sites actifs aux gros substrats.

**Tableau 2. Enzymes fixés au laboratoire sur membrane de collagène après activation du support par formation d'acyl-azotures.**

| Classes | Enzymes | Activité en nmoles $mn^{-1}.cm^{-2}$ substrat ou coenzyme transformé ou produit apparu neq $H^+$ $mn^{-1}.cm^{-2}$ (pH-stat) |
|---|---|---|
| Oxydo-réductases | Alcool déshydrogénase | 100 (NADH) |
| | Sorbitol déshydrogénase | 15 (NADH) |
| | Malate déshydrogénase | 7 (NADH) |
| | Lactate déshydrogénase | 19 (NADH) |
| | Glucose oxydase | 60 (glucose) |
| | Galactose oxydase | 20 (galactose) |
| | Cholestérol oxydase | 3 (cholestérol) |
| | Glutamate déshydrogénase | 2,8 (NADH) |
| Transférases | Aspartate aminotransférase | 44 (oxaloacétate) |
| | Analine aminotransférase | 4,5 (LDH/NADH) |
| | Hexokinase | 74 (pH-stat) |
| | Créatine kinase | 20 (pH-stat) |
| Hydrolases | Lipase | 8,5 (pH-stat) |
| | Phosphatase alcaline | 3,5 (*p*-nitrophénol) |
| | α et β-Amylases | 100-150 (maltose) |
| | β-Galactosidase | 80 (lactose) |
| | Invertase | 3 (saccharose) |
| | Glucoamylase | 120 (glucose) |
| | Trypsine | 80 (BAEE) |
| | α-Chymotrypsine | 76,5 (ATEE/pH-stat) |
| | Papaïne | 40 (BAEE/pH-stat) |
| | Uréase | 7 (GLDH/NADH) |
| | Aminoacylase | 225 (N-acétyl-méthionine) |
| Lyases | Aldolase | 6,5 (TIM/GDH/NADH) |

# Utilisation des membranes enzymatiques

Les conséquences de la fixation sont très importantes : il y a d'abord la possibilité de réutiliser aisément la préparation enzymatique. Pour cela, la forme « membrane » présente beaucoup d'avantages sur d'autres supports comme les particules solides lorsque ces dernières ne sont pas utilisées en colonnes car, si le catalyseur est finement divisé, sa récupération n'est pas immédiate et nécessite soit une décantation, soit une centrifugation. Dans la plupart des essais courants effectués en batch, il est possible d'initier ou d'arrêter la réaction simplement en immergeant ou en retirant la membrane enzymatique du milieu réactionnel avec une grande facilité.

Tous les avantages précités ont été mis à profit pour réaliser en collaboration avec d'autres chercheurs des systèmes nouveaux : les réacteurs enzymatiques hétérogènes et les électrodes à enzymes *.

* *Depuis 1975, une collaboration avec J. M. Engasser (ENSIC, Nancy) concerne les problèmes de diffusion et la mise au point des bioréacteurs et un travail commun avec D. R. Thévenot (Laboratoire d'énergétique biochimique, Paris XII) a été entrepris pour la mise au point d'électrodes spécifiques à glucose et à urée. Plus récemment, un groupe de travail comprenant une équipe de la Société CERAC-Tacussel et du Centre Technique du Cuir a été formé dans le but de mettre au point une électrode à enzyme commercialisable.*

## Réacteurs enzymatiques

L'intérêt d'un réacteur biochimique hétérogène est de produire en continu une substance difficile à obtenir par voie chimique classique et éviter les réactions secondaires en mettant à profit la haute spécificité des biocatalyseurs (11, 12). Ce système présente un intérêt économique certain lorsque l'enzyme est difficile à obtenir purifié ou lorsqu'il est peu stable en solution ; il permet également d'éviter une contamination des produits de la réaction par l'enzyme en fin de réaction. Un taux de conversion élevé permet de minimiser l'étape de séparation substrat/produit en sortie de réacteur.

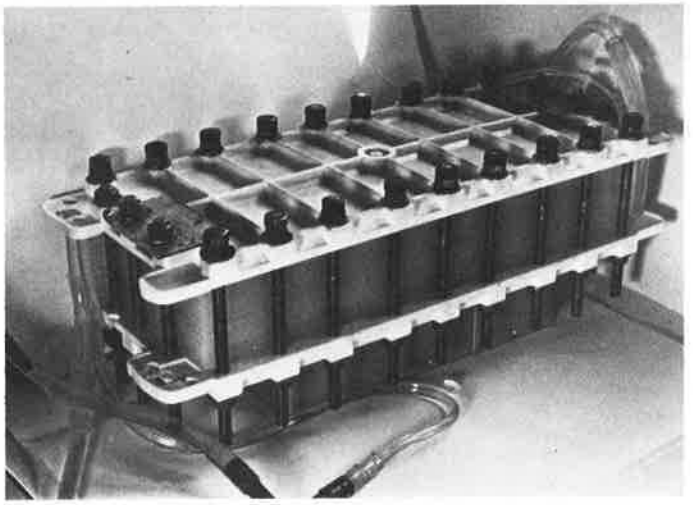


**Figure 1. Réacteur enzymatique, conçu à partir d'un hémodialyseur Rhône-Poulenc RP5, en substituant aux membranes de dialyse des membranes de collagène ayant subi une activation des groupements carboxyles pour la fixation covalente d'enzymes (ici glucoamylase et α-amylase).**
*(Photo E. Frey.)*

Après optimisation des performances du conjugué enzyme-support, deux types de réacteurs aux régimes hydrodynamiques très différents, avec glucoamylase fixée sur collagène, ont été mis au point au laboratoire. Le premier ou « réacteur continu parfaitement mélangé » comprenait un double enroulement hélicoïdal de membranes enzymatiques produisant du glucose à partir de maltose ou d'amidon soluble. Les contraintes diffusionnelles pour le dernier substrat étaient importantes. Le deuxième modèle de réacteur du type « lit fixe » (13) mettait en jeu une série de membranes planes le long desquelles circulait la solution de substrat en nappes minces, donnant une valeur élevée au rapport activité enzymatique/volume réactionnel. Nous envisageons maintenant le développement de systèmes polymembranaires modulaires où il serait possible d'ajouter en série des éléments contenant chacun un enzyme différent. Une première approche a déjà été réalisée en utilisant un hémodialyseur Rhône-Poulenc RP5 modifié. Les membranes de dialyse ont été remplacées par des membranes de collagène (32,5 cm × 11,8 cm) porteuses de glucoamylase et d'α-amylase immobilisées. 11 compartiments du module ont été utilisés, chacun contenant deux membranes enzymatiques avec séparateurs intercalés. L'activité des membranes testée avec la réaction standard d'hydrolyse du maltose par la glucoamylase était de 150 $mU.cm^{-2}$ (40 °C, pH 4,8, maltose 25 mM). L'hémodialyseur à plaques permettait une distribution excellente de la solution de substrat sur une surface enzymatique utile de 1,6 $m^2$ pour un volume de liquide réactionnel au contact de 115 ml. L'avantage d'un rapport élevé surface enzymatique/volume liquide intérieur ainsi que la possibilité d'utiliser de forts débits en fonctionnement en recyclage sont en faveur de ce système (14, 15). Ce dispositif est envisageable, par exemple, pour intercaler une étape de bioconversion enzymatique très spécifique au cours d'une synthèse chimique complexe. L'immobilisation de ligands d'affinité sur les membranes du réacteur et l'utilisation d'un tel système à des fins préparatives ou d'épuration sont également à l'étude. Un troisième type de réacteur spécialement conçu pour l'étude des contraintes diffusionnelles a été mis au point : le réacteur à membrane tournante (16). Il a été possible, avec ce dernier type de réacteur, de préciser l'importance des contraintes de diffusion sur le comportement apparent après fixation des enzymes à deux substrats.

## Électrodes à enzymes

Depuis plusieurs années des électrodes spécifiques de certains gaz ($NH_3$, $CO_2$, $O_2$) ou d'ions libres, autres que les protons, sont commercialisées, mais la détection d'espèces organiques reste à développer. L'association d'un enzyme sous forme soluble et d'un capteur électrochimique a été décrite pour la première fois en 1962 (17). Depuis cette date, l'obtention d'enzymes immobilisés notamment par les techniques d'inclusion dans les gels ont permis le développement de divers types d'électrodes à enzymes (18, 19, 20). La figure 2 montre qu'une électrode à enzyme se compose essentiellement d'un capteur électrochimique sur lequel est maintenu par un moyen mécanique la préparation enzymatique. Certains procédés utilisent l'enzyme en solution maintenu dans une microcavité par une membrane à dialyse (21). Dans notre cas, les molécules enzymatiques ont été fixées sur membranes de collagène selon le procédé décrit plus haut et associées à différents capteurs du commerce ou à des prototypes fabriqués par la société CERAC-Tacussel.

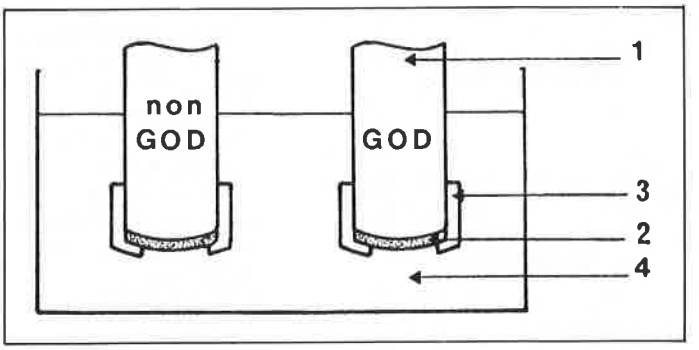



**Figure 2. Électrode à enzyme.**
**(1) Capteur électrochimique. (2) Membrane de collagène ; avec GOD : électrode $E_1$ ; sans GOD : électrode compensatrice $E_2$. (3) Embout vissant. (4) Milieu tamponné recevant l'échantillon à doser.**

En résumé, il faut donc une réaction enzymatique spécifique du substrat à doser et un capteur électrochimique donnant une réponse amplifiable sous forme de variation de potentiel ou variation de courant. La présence d'un enzyme confère à ce système de dosage une grande spécificité mais n'exclut pas les interférences parasites dues au capteur électrochimique.

En prenant l'exemple de la glucose oxydase (GOD) qui catalyse la réaction :

$$\beta\text{-D-glucose} + O_2 \xrightarrow{GOD} \text{D-glucono-}\delta\text{ lactone} + H_2O_2$$

trois types de détection sont possibles :
- la mesure par une électrode à $pO_2$ de la disparition de $O_2$ (électrode de Clark),
- la mesure de l'apparition des ions $H^+$ par une électrode de verre (potentiométrie),
- l'oxydation anodique de $H_2O_2$ sur une électrode de platine à potentiel imposé de + 650 mV/Ag-AgCl-KCl, 0,1 M, avec mesure du courant (ampérométrie).

Les problèmes que pose la mise au point de telles électrodes concernent le temps de réponse, la gamme de concentration couverte, le temps de lavage entre deux mesures, la stabilité dans le

temps, la quantité d'enzyme nécessaire, le type de fixation et les interférences inhérentes au système de détection employé.

Nous avons choisi pour cette étude la détection de l'eau oxygénée sur anode de platine à + 650 mV/Ag-AgCl. Le système permettant le dosage du glucose est formé de deux électrodes comprenant principalement un disque de platine et une membrane de collagène maintenue par un embout vissant. L'électrode $E_1$ est équipée d'une membrane enzymatique à GOD greffée et l'électrode $E_2$ d'une membrane neutre ne portant pas d'enzyme. Une différence de potentiel de + 650 mV est maintenue entre les anodes de platine et une référence Ag-AgCl, KCl (22, 23). Lorsque l'ensemble est immergé dans un milieu contenant le glucose à doser, l'oxydation du glucose au niveau de la membrane enzymatique libère de l'eau oxygénée qui s'oxyde sur l'électrode de platine :

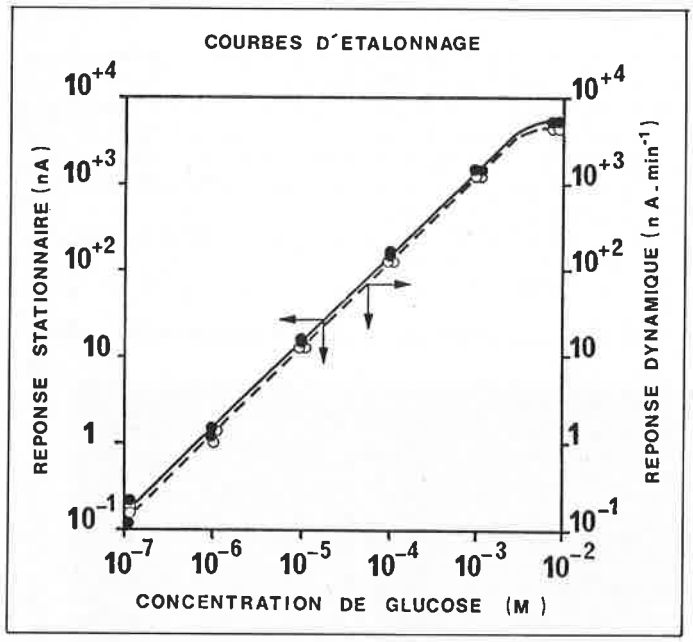



**Figure 3. Courbes d'étalonnage. Effets de la concentration de glucose sur les réponses stationnaire (●) et dynamique (○).**

$$H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\,H^+ + 2e^-$$

Un appareillage électronique adapté permet d'obtenir le courant $I_1$ venant de l'électrode $E_1$ et dû à la génération enzymatique de $H_2O_2$, le courant $I_2$ provenant de l'électrode $E_2$ et correspondant aux interférences possibles dues à des espèces présentes dans les fluides biologiques. Dans le cas d'une expérience typique, les électrodes sont immergées dans 20 ml de solution tampon acétate de sodium-acide acétique 0,1 M, pH 5,5. Un aliquote du milieu à doser (10-100 µl) est ajouté et les courants $I_1$ et $I_2$, définis plus haut, enregistrés. Lorsque le milieu contient du glucose et une espèce interférente, cette dernière est oxydée sur l'électrode de compensation et un courant $I_2$ est enregistré. Le courant $I_1$ obtenu sur l'électrode enzymatique croît pour atteindre un plateau. Généralement on soustrait directement les 2 courants et seul $I_1 - I_2$ est enregistré (« réponse stationnaire »). La « réponse dynamique » est obtenue par mesure de la hauteur du pic correspondant à la dérivée première $d(I_1 - I_2)/dt$. Le temps de réponse est de l'ordre de 2-3 mn pour la réponse stationnaire et 45 sec-1 mn pour la réponse dynamique. Les caractéristiques principales de cette électrode sont données dans le tableau 3. Il faut noter l'extrême sensibilité de cette électrode puisque la linéarité s'étend de $10^{-7}$ M à $10^{-3}$ M (Figure 3) et le seuil de détection est de l'ordre de $10^{-8}$ M. La stabilité est remarquable puisqu'avec la même membrane enzymatique conservée sur l'électrode à température ambiante il a été possible de faire plus de 500 essais répartis sur plusieurs mois avec une simple calibration au glucose en début d'expériences. Cette électrode a été utilisée également pour le dosage du glucose dans de nombreux fluides biologiques où la présence de fortes interférences rend indispensable l'utilisation de l'électrode compensatrice $E_2$ (24). Des essais de corrélation avec un autre type de mesure utilisant le système peroxydase-réactif chromogène ABTS (25) ont montré une bonne concordance dans le dosage des effluents de nos réacteurs à glucoamylase fixée pour l'hydrolyse des malto-dextrines en glucose (15).

**Tableau 3. Électrode spécifique du glucose avec membrane de collagène à glucose oxydase greffée.**

| Caractéristiques | |
|---|---|
| Activité des membranes | 60-80 mU/cm² |
| Temps de réponse | |
| • stationnaire | 2-3mn |
| • dynamique | 45 sec-1 mn |
| Temps de lavage | 2-3 mn |
| Courbe de calibration | |
| • seuil de détection | $10^{-8}$ M |
| • linéarité | $10^{-7}$ M – $10^{-3}$ M |
| • pente | 2-4 mA/M (dépend de l'activité de la membrane) |
| Reproductibilité | Variation possible de 4-8 % |
| Stabilité | Excellente pendant plusieurs mois à température ambiante |
| Interférences | Détectées et mesurées par l'électrode compensatrice $E_2$ |
| Corrélations avec d'autres méthodes | Très bonne avec le système de dosage enzymatique GOD-POD-ABTS |

## Perspectives et conclusions

La possibilité de remplacer la membrane de collagène à glucose oxydase par une membrane porteuse d'une autre oxydase conduisant à la production d'$H_2O_2$ détectable par le même capteur électrochimique rend très souple l'utilisation de cette électrode. Ceci a été réalisé récemment avec une membrane porteuse de cholestérol oxydase pour l'étude d'une électrode à cholestérol (26). De nouvelles membranes à systèmes multienzymatiques greffés ont été obtenues récemment dans notre laboratoire. La technique mise au point permet la fixation d'enzymes différents de part et d'autre de la membrane, réalisant ainsi un système multienzymatique asymétrique (27). On obtient ainsi, avec des enzymes travaillant de façon séquencée, un système enzymatique orienté : lorsque la première face enzymatique est en contact avec le milieu réactionnel, le produit de la réaction traverse la membrane et devient substrat de la seconde face catalytique, les réactions enzymatiques se produisant ainsi dans deux compartiments différents. Cette possibilité nouvelle a été mise à profit pour réaliser une électrode à maltose. Le premier enzyme (glucoamylase) hydrolyse le maltose en glucose. Ce dernier, après avoir traversé la membrane, est oxydé par la glucose oxydase, libérant, au contact de la membrane, l'eau oxygénée détectable sur l'électrode de platine. Des systèmes comportant plus de deux enzymes sont réalisables et plusieurs séquences enzymatiques ainsi fixées sont en cours d'étude.

## Conclusions

La méthode de greffage d'enzymes sur films de collagène développée dans notre laboratoire permet d'obtenir des conjugués enzymes-supports extrêmement stables, utilisables pendant des durées très longues (de plusieurs mois à plusieurs années) tant avec des réacteurs enzymatiques que des électrodes spécifiques à enzymes. Le développement très prometteur de la biotechnologie permet de penser que de tels systèmes seront couramment utilisés dans un avenir proche.

**Remerciements**

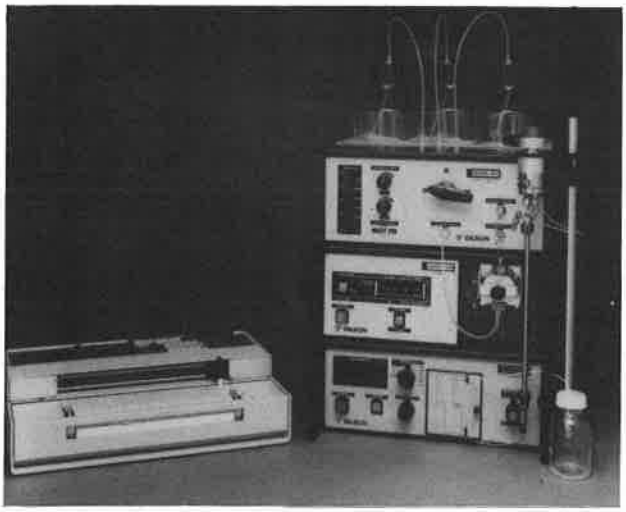
Nous remercions le Centre Technique du Cuir (Lyon), en la personne de MM. G. Vallet, Ph. Comte, A. Huc et leurs équipes pour l'aide apportée au cours de ce travail ainsi que M. J. Verrier, Directeur du Département des recherches biologiques de la Société Rhône-Poulenc qui a mis à notre disposition les modules d'hémodialyse RP 5.

## Bibliographie

(1) I. H. Silman et E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.*, 1966, **35**, 873.
(2) L. Goldstein et G. Manecke, in « Applied Biochemistry and Bioengineering » (L. B. Wingard, Jr., E. Katchelski et L. Goldstein, Eds), Vol. 1, pp. 1-126, Academic Press, New-York, 1976.
(3) A. Huc, et J. Sanejouand, *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **154**, 408.
(4) J. H. Julliard, C. Godinot et D. C. Gautheron, *FEBS Letters*, 1971, **14**, 185.
(5) P. R. Coulet, J. H. Julliard et D. C. Gautheron, Inventeurs-déposants, Brev. Invention Français, 1973, 2.235.133.
(6) P. R. Coulet, J. H. Julliard et D. C. Gautheron, *Biotechnol. Bioeng.*, 1974, **16**, 1055.
(7) Ph. P. Comte, Brev. Invention Français, 1967, 1.568.829.
(8) G. J. Pichon et B. A. Piat, Brev. Invention Français, 1968, 1.596.789.
(9) G. J. Pichon et B. A. Piat, Brev. Invention Français, 1968, 1.596.790.
(10) P. R. Coulet et D. C. Gautheron, in « Analysis and control of immobilized systems », pp. 165-177 (D. Thomas et J. P. Kernevez Eds) North Holland, Amsterdam, 1976.
(11) G. Durand et P. Monsan, Les enzymes immobilisés. (C.D.I.U.P.A. Éd. Paris), pp. 1-332 (986 réf.), 1974.
(12) W. R. Vieth, K. Venkatasubramanian, A. Constantinides and B. Davidson, in « Applied Biochemistry and Bioengineering » (L. B. Wingard, Jr., E. Katchalski-Katzir et L. Goldstein, Éds.), Vol. 1, pp. 221-327, Academic Press, New-York, 1976.
(13) J. M. Brillouet, P. R. Coulet et D. C. Gautheron, *Biotechnol. Bioeng*, 1976, **18**, 1821.
(14) F. Paul, thèse de Doctorat de spécialité en biochimie, Lyon 1978.
(15) P. R. Coulet, F. Paul, D. Dupret et D. C. Gautheron, in « Enzyme Engineering », Vol. 5 (H. H. Weetall et G. P. Royer, Éds), Plenum Press, New-York, sous presse.
(16) F. Paul, P. R. Coulet, D. C. Gautheron et J. M. Engasser, *Biotechnol. Bioeng.*, 1978, **20**, 1785.
(17) L. C. Clark, Jr. et C. Lyons, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1962, **102**, 29.
(18) S. J. Updike et G. P. Hicks, *Nature*, 1967, **214**, 986.
(19) G. G. Guilbault et M. H. Sadar, *Accounts Chem. Res.*, 1979, **12**, 344.
(20) M. M. Fishman, *Anal. Chem.*, 1980, **52**, 185R.
(21) H. Durliat, M. Comtat, J. Mahenc et A. Baudras, *J. Electroanal. Chem*, 1975, **66**, 73.
(22) P. R. Coulet, J. J. Fombon, D. C. Gautheron, J. Laurent, C. Millet, R. Sternberg, J. Tacussel et D. R. Thevenot, Rapport final Action Concertée Chimie Analytique DGRST n$^{os}$ 76-7-0919 et 76-7-0920, 1977.
(23) D. R. Thevenot, R. Sternberg, P. R. Coulet, J. Laurent et D. C. Gautheron, *Anal. Chem.*, 1979, **51**, 96.
(24) R. Sternberg, A. Apoteker et D. R. Thevenot, Proceedings of « Electroanalysis in Hygiene Environmental, clinical and pharmaceutical chemistry », London, 1979, April 17-20.
(25) H. U. Bergmeyer, in « Methods of enzymatic analysis », Vol. 3, Verlag Chemie, p. 1212, 1974.
(26) C. Bertrand, P. R. Coulet et D. C. Gautheron, *Anal. Lett.*, 1979, **12**, 1477.
(27) P. R. Coulet et C. Bertrand, *Anal. Lett.*, 1979, **12**, 581.

GILSON

CHROMATOGRAPHIE ANALYTIQUE OU PRÉPARATIVE ?



Ensemble isocratique de CLHP analytique

• **Module de pompage 302**
à microprocesseur 0-100 ml/mn
0-420 bars pilotable par tous types d'ordinateurs (gradients)

• **Détecteur UV modèle 111**
254/280 nm différentiel

• **Module de service 801**
(manomètre électronique -amortisseur hydraulique de pulsations- programmation des limites de pression mini-maxi souhaitées etc...)

**GILSON** France un constructeur français à votre service
72, rue Gambetta 95400 VILLIERS LE BEL Tél: (3) 990-54-41