



Université de RELIZANE
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département: Sciences biologiques



Immobilisation des enzymes



Dr Berzou

Année universitaire : 2022/2023

Introduction

- Pour une meilleur extraction et purification des enzymes il est nécessairement de **les immobilisées artificiellement.**
- Ainsi **immobilisé** sur **des supports solubles** ou **insolubles (enzyme lié a un support)**, ces catalyseurs offrent la possibilité d'une utilisation répétée dans des domaines très variés.
- Un des buts majeurs de **l'immobilisation enzymatique**, particulièrement pour **des applications analytiques**, est un **accroissement de la durée de vie de l'enzyme**

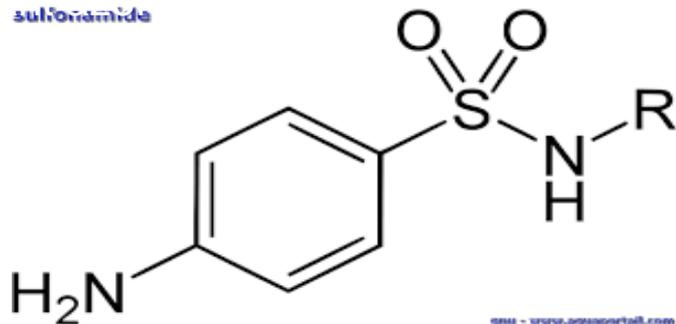
1. Immobilisation des enzymes

- L'immobilisation des enzymes peut alors induire une modification de leur activité et généralement une augmentation de leur stabilité.
- L'immobilisation des enzymes conduit souvent à un changement de leurs propriétés physiques, chimiques et cinétiques

1.1. Propriétés physico-chimiques

- Une des propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis de la dénaturation.
- La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support.
- Ainsi, les enzymes fixées par la liaison sulfonamide sont moins stables que celles fixées par liaison azo.

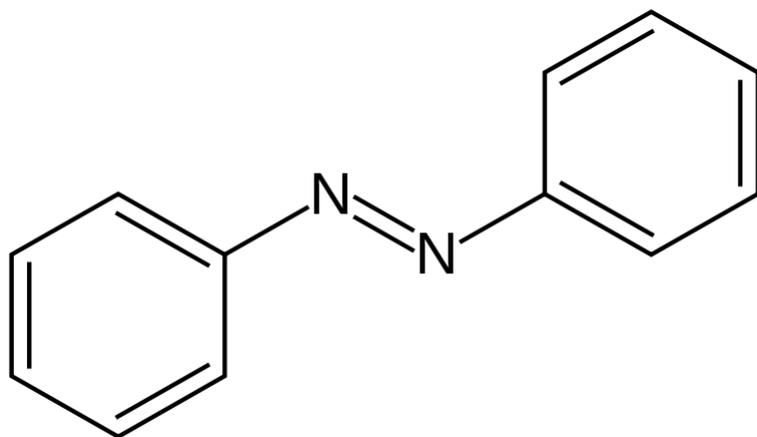
sulfonamide



Sulfamethoxazole

Est un sulfamide antibactérien

➤ Nom générique des amides des acides sulfoniques, de formule générale $RSO_2-NR'R''$. En médecine et en pharmacologie désigne des médicament en général des antibiotique.



Colorant azoïque

➤ Les composés azo (azotique) aromatiques sont très appréciés dans l'industrie des colorants pour leurs couleurs vivaces,

1.2. Propriétés cinétiques

- L'immobilisation des enzymes **affecte** leurs propriétés cinétiques. En effet, à la vitesse de la réaction enzymatique proprement dite, il faut ajouter **l'effet du microenvironnement** qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les phénomènes de diffusion l'accès du substrat au niveau du site actif.
- Ceci a pour conséquence **une variation** de la vitesse maximale V_M et de la constante de Michaelis K_M de l'enzyme.
- De même, le pH de l'enzyme peut être modifié, en particulier lorsque la réaction enzymatique met en jeu une libération ou une consommation de protons.

2. Méthodes d'immobilisation des enzymes

- Une enzyme immobilisée est une enzyme liée par des moyens physico-chimiques en surface ou à l'intérieur d'un support solide.
- On cherche généralement à conserver son activité enzymatique, qui a tendance:
 - À diminuer après immobilisation du fait de possibles gênes stériques et **de limitations** dans **l'accessibilité au site actif**.
 - Également , à augmenter sa stabilité dans le temps.

3. Différentes méthodes d'immobilisation des enzymes

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

1- Adsorption

2- Réticulation

3- Greffage covalent

4- Encapsulation

5- Reconnaissance par affinité et bioaffinité
(reconnaissance antigène/ anticorps ou encore récepteurs/protéines.)

3.1. Adsorption

- L'adsorption repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface.
- L'immobilisation est alors due à des interactions faibles de type **Van der Waals**, **liaisons hydrogène**, transfert de charges (**liaisons ioniques**), échanges d'ions ou encore à des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles).



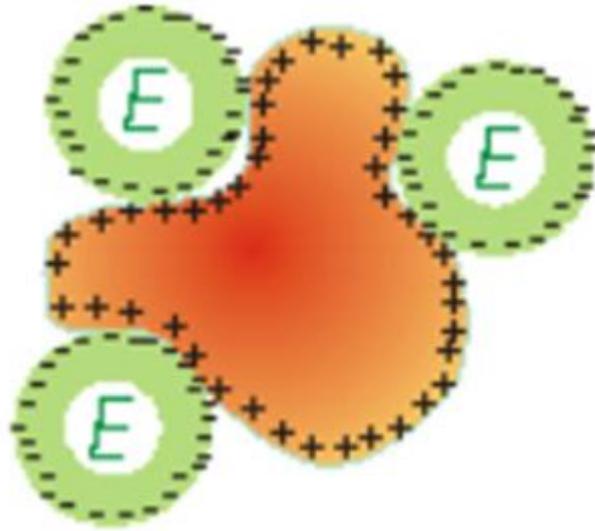


Fig.2 Adsorption des enzymes sur un support.

3.1.1. Avantages de l'adsorption

- C'est une méthode très simple à mettre en œuvre nécessitant seulement de mettre en contact l'enzyme et le support dans des conditions de pH, température et de force ionique données.
- Possibilité de régénérer les complexes enzyme-support (si l'enzyme perd son activité en cours de son fonctionnement, il est possible de la remplacer par une préparation active).
- Méthode économique et ne requiert aucun réactif chimique pouvant dénaturer l'enzyme.

3.1.2. Inconvénient de l'adsorption

- La fragilité de la fixation (les enzymes peuvent facilement se désorber sous l'action de variation de pH, température...)
- L'orientation de l'enzyme est mauvaise accessibilité au site actif.
- De plus, il peut être nécessaire de procéder à des modifications de la surface du support afin de permettre l'adsorption du biorécepteur.

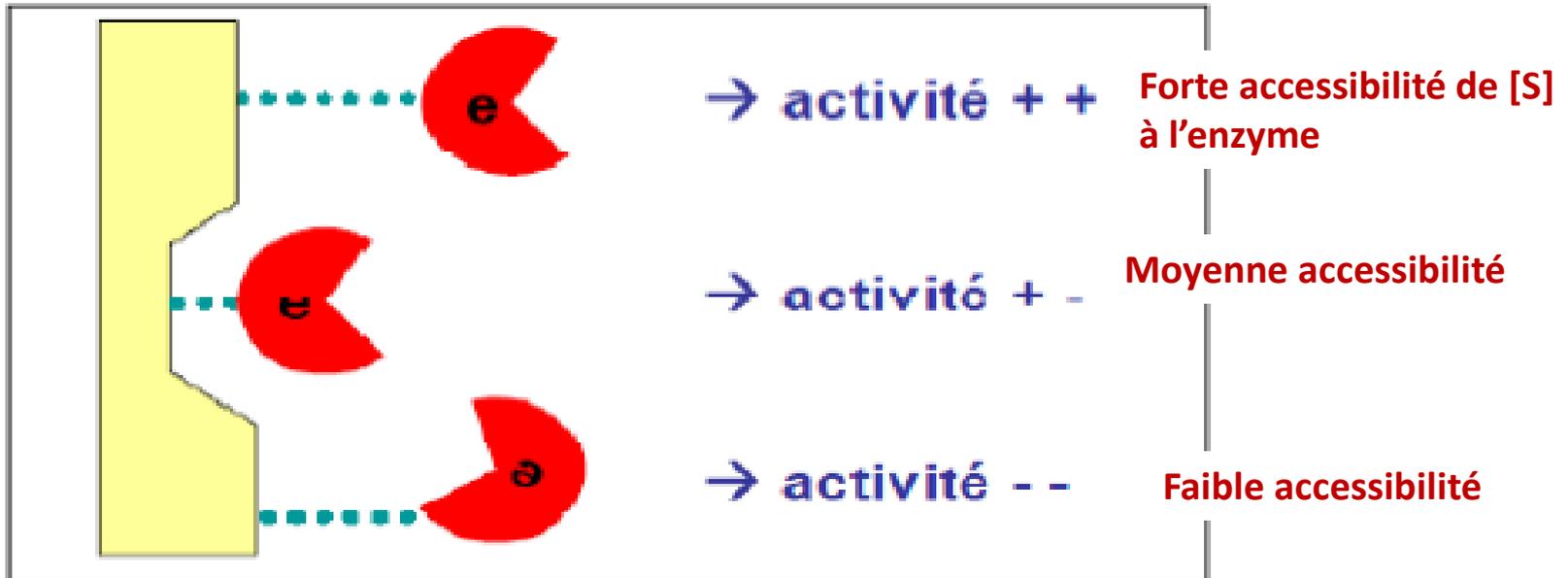


Fig.3 Possibilités d'orientation de l'enzyme

3-2.Réticulation (تشابك)

➤ La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dit **réticulant** qui vont permettre **de lier les enzymes entre elles** par **des liaisons chimiques**. Il existe deux méthodes de réticulation, soit les enzymes sont reliées entre elles par des agents réticulant de façon directe, soit en plus de l'agent réticulant une protéine inerte peut être utilisée afin de faciliter ou améliorer la réticulation, on parle alors de **Co-réticulation**.

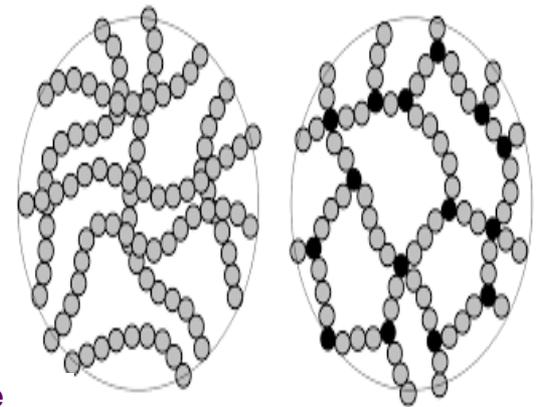
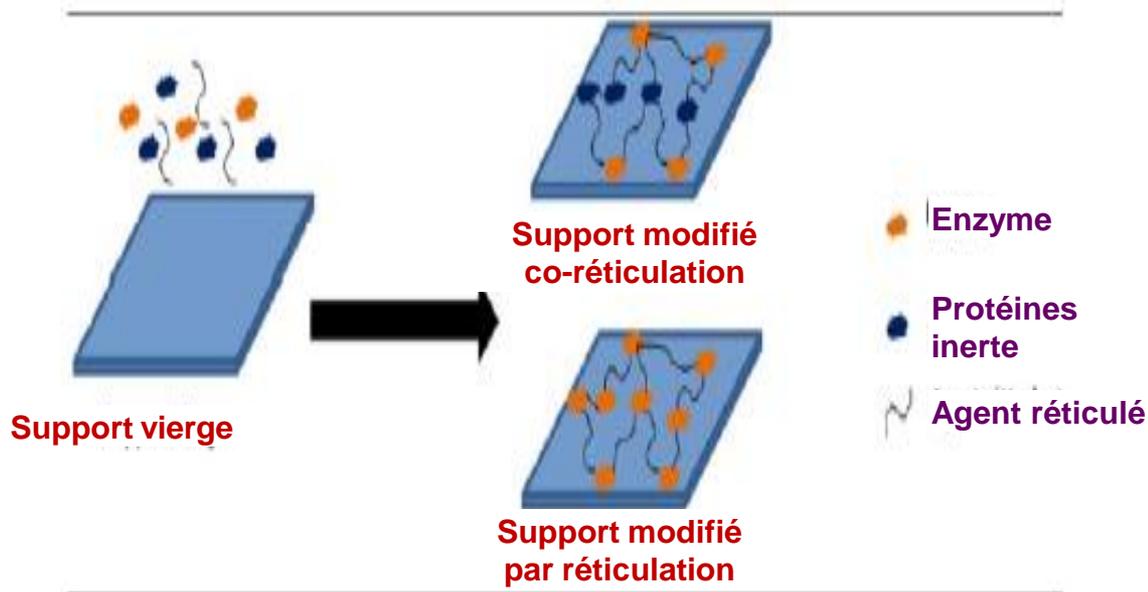


Fig.4 Réticulation

3.2.1. Avantages de la réticulation

- 1. Stabilité accrue à cause de la liaison covalente.**
- 2. Grande variété de supports minéraux (verre, silice, céramique...) et organiques (cellulose, polymères synthétiques...).**
- 3. Grande variété de support minéraux (verre, silice, céramique...) et organiques (cellulose, polymères synthétiques...).**
- 4. Possibilité d'effectuer l'immobilisation en présence de substrat pour éviter l'inactivation (protection du site actif).**
- 5. Solidité de la liaison enzyme-substrat.**
- 6. Les quantités d'enzymes immobilisées sont inférieures par rapport aux deux précédentes méthodes. Rendements de fixation inférieurs à 100%.**

3.2.2. Inconvénient de la réticulation

➤ En effet, outre l'utilisation de réactifs potentiellement non **biocompatibles** et pouvant **altérer l'activité** de l'enzyme, **les propriétés physiques** du système sont **modifiées**, leur donnant des propriétés mécaniques médiocres.

3.3. Immobilisation par liaison covalente ou Greffage covalent

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

➤ En général, les groupements fonctionnels du réactif sont des fonctions **carboxyliques**, **thiols**, **hydroxyles** ou encore **amines**.

➤ Ces groupements sont très peu réactifs et doivent de ce fait être activés afin de pouvoir réagir avec les groupements de l'enzyme, n'intervenant pas dans la catalyse enzymatique, dans des conditions dites douces afin de ne pas dénaturer la biomolécule.

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

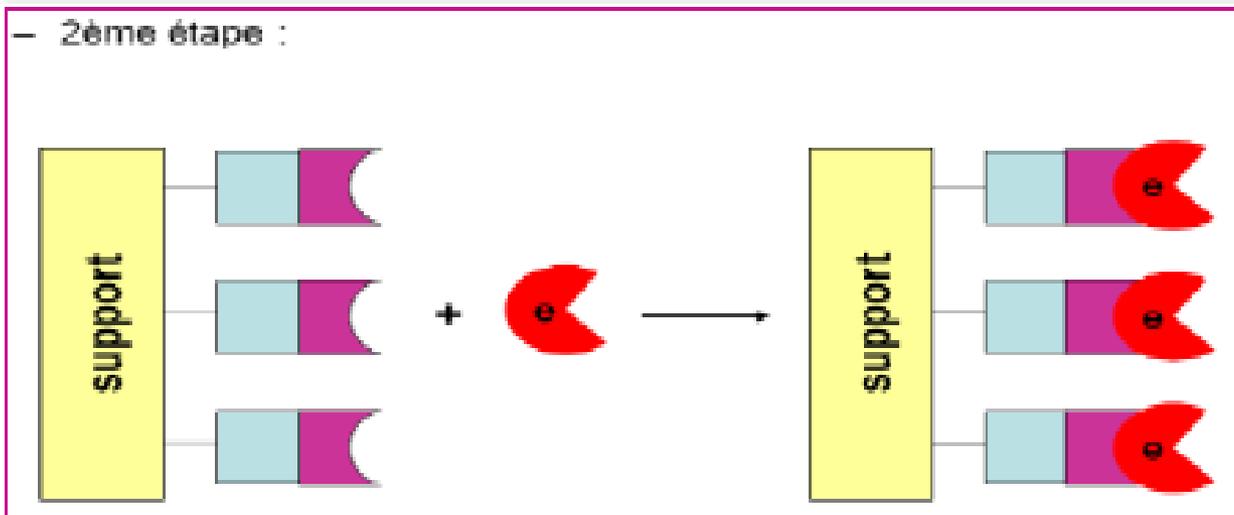
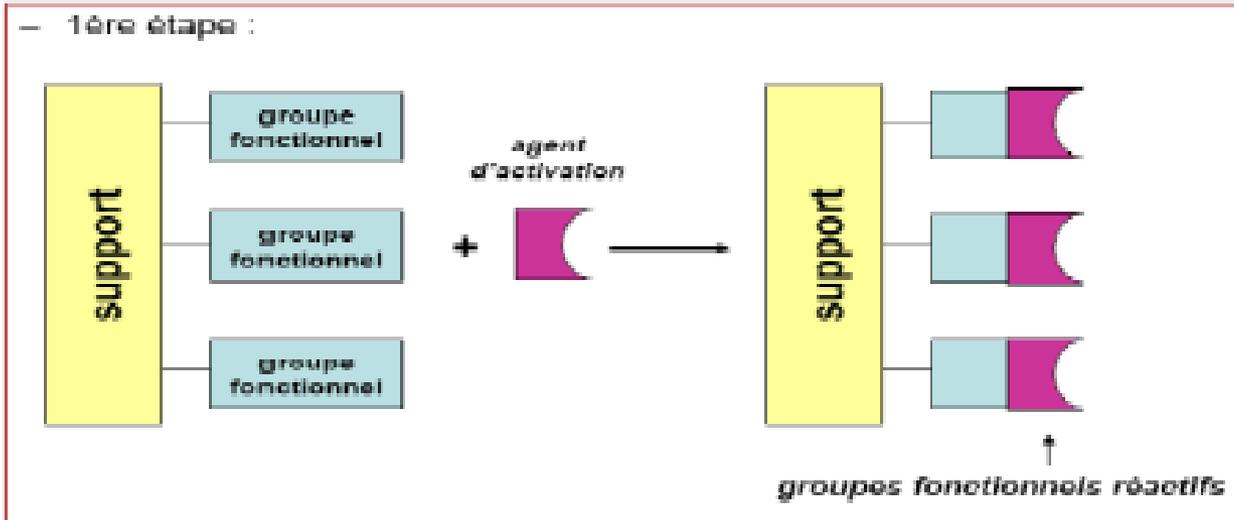


Fig. 7. Immobilisation par liaison covalente sur support.

1^{ère} étape: Activation du support

2^{ème} étape: fixation de l'enzyme.

Fig.8. Représente un exemple d'immobilisation au bromure de cyanogène

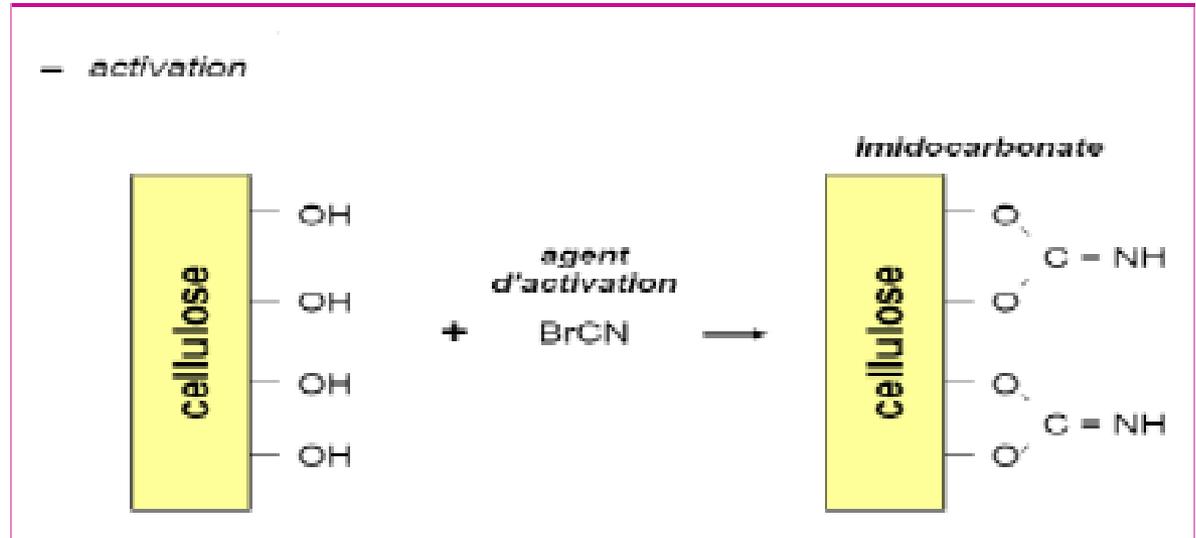
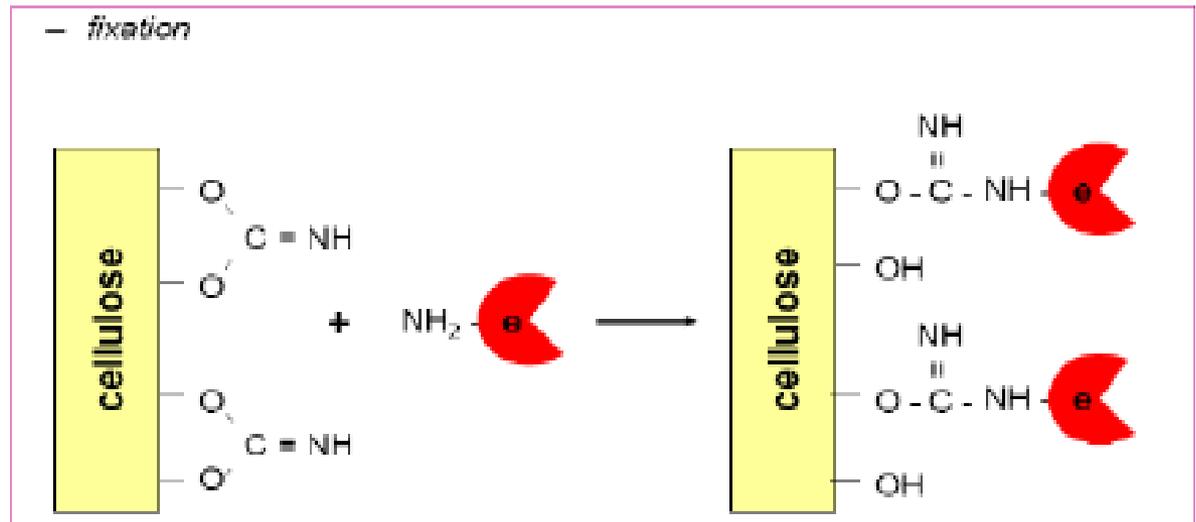


Fig. 9. Immobilisation au bromure de cyanogène BrCN.



1^{ère} étape: Activation du support

2^{ème} étape : Fixation de l'enzyme

3.3.1. Avantage de greffage

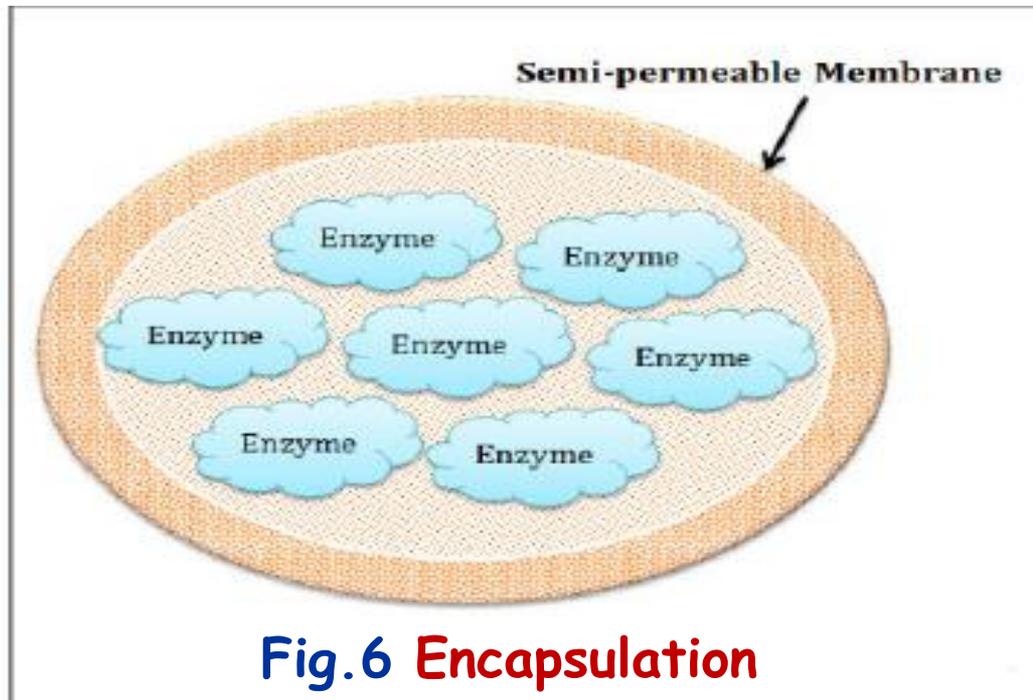
➤ Cette méthode d'immobilisation présente principalement comme avantage de fixer l'enzyme de façon permanente et augmente la stabilité de celle-ci, lui conférant une durée de vie plus importante.

3.3.2. Inconvénient de greffage

➤ Cependant, les réactifs indispensables au greffage risque de dénaturer l'enzyme et donc de provoquer une perte d'activité.

3.4.Encapsulation

- La méthode consiste à **inclure l'enzyme** à l'**intérieur** de la **membrane semi-perméable**. Le diamètre des micro-capsules peut varier de quelques microns à une centaine de microns (fig. 6).
- Les membranes semi-perméables assurent la **rétection** des **molécules d'enzyme** dans un volume déterminé en vue d'une utilisation continue (les hydrolase).



- L'immobilisation dans ce cas se fait de manière physique et pas de manière chimique contrairement au greffage covalent.
- La membrane doit permettre la diffusion des petites molécules seulement afin que les enzymes ne puissent pas s'en échapper.
- Ces membranes peuvent être inorganiques (**gels de silice**), organiques (nafion), polymères (**polyacrylamide**, **polyuréthanes**) ou composites (pâte de carbone).

3.4.1. Avantage de l'encapsulation

- Réaction chimiques avec l'enzyme limitée (inclusion dans des gels naturels).

3.4.1. Avantage de l'encapsulation

- Cependant, l'enzyme peut diffuser à travers la matrice au cours de l'utilisation et de plus elle n'est applicable que pour des substrats de petite taille. Par ailleurs, les groupements actifs de l'enzyme peuvent réagir avec la matrice et donc entraîner une diminution de l'activité catalytique de celle-ci.

4. Application médicales et pharmaceutiques

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

4.1. Analytique

- En médecine, des papiers imprégnés de solutions enzymatiques sont utilisés dans certains tests cliniques (dosage du glucose, cholestérol, de l'acide urique, des hormones...).
- Les techniques ELISA utilisent également des enzymes fixées (liées à des anticorps eux-mêmes fixés par adsorption sur les parois de petites cuvettes en plastiques), destinées à des dosages cliniques.

4.2. Thérapeutique

➤ Le traitement de certains troubles pathologiques dus à une déficiences enzymatiques par l'administration d'enzymes, se heurte à des difficultés : destruction par les protéases ou hydrolyse par macrophages.

➤ Dans ce cas l'enzyme est associée à une molécule protectrice (albumine, dextrine, polyéthylène glycol), ou alors inclus dans la microcapsules.

4.3. Industriel

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

➤ Amélioration de la production de produits lactés (laitier)