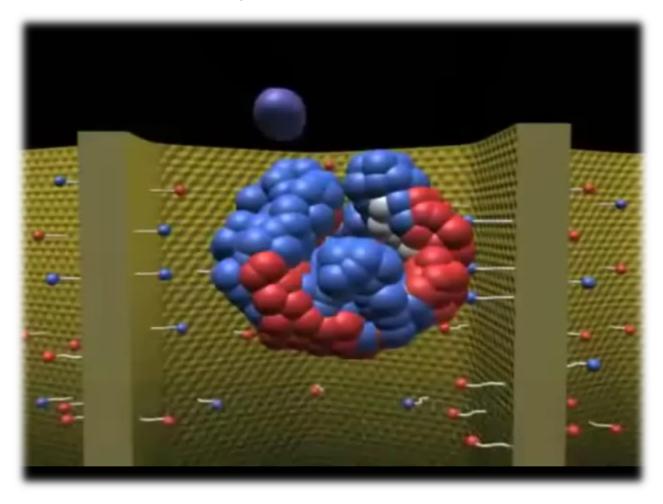
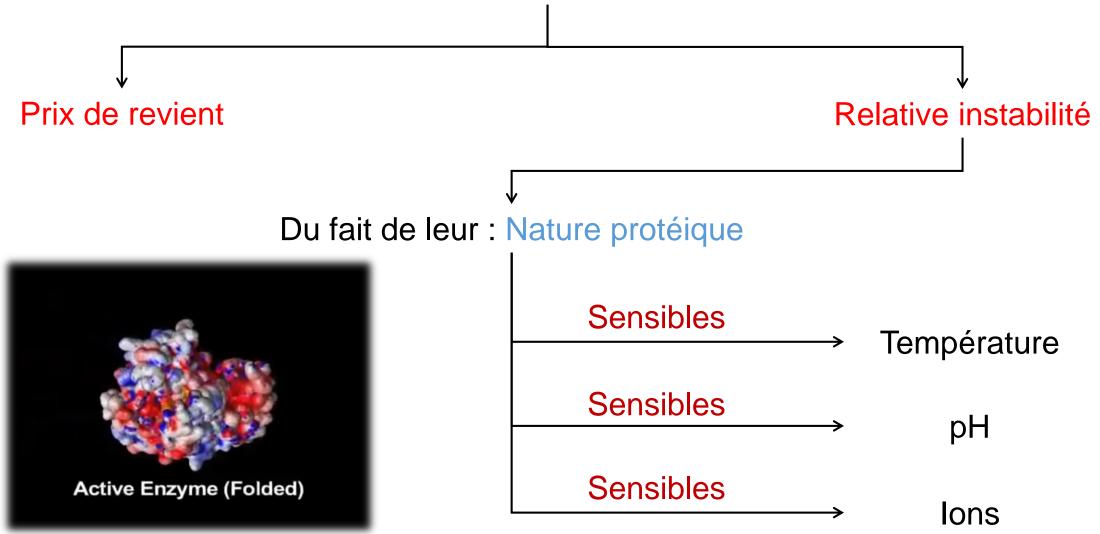
# Chapitre 1 : Eléments de biotechnologie

1.3. Enzymes immobilisés



### 1. Introduction

Dans la pratique, les applications industrielles des enzymes en solution se trouvent parfois considérablement limitées par deux choses :



En solution, même si l'activité de l'enzyme est suffisante, sa récupération après utilisation nécessite un processus :

Long

Coûteux de purification <

Par conséquent, ces enzymes sont perdues une fois la réaction effectuée : elles ne sont pas utilisables pour d'autres cycles de production.

L'immobilisation des enzymes sur des supports solides :

- En augmentant leur stabilité opérationnelle.
- Et en permettant l'utilisation de **réacteurs** en flux **continu**.
- Permet de contourner cette difficulté.



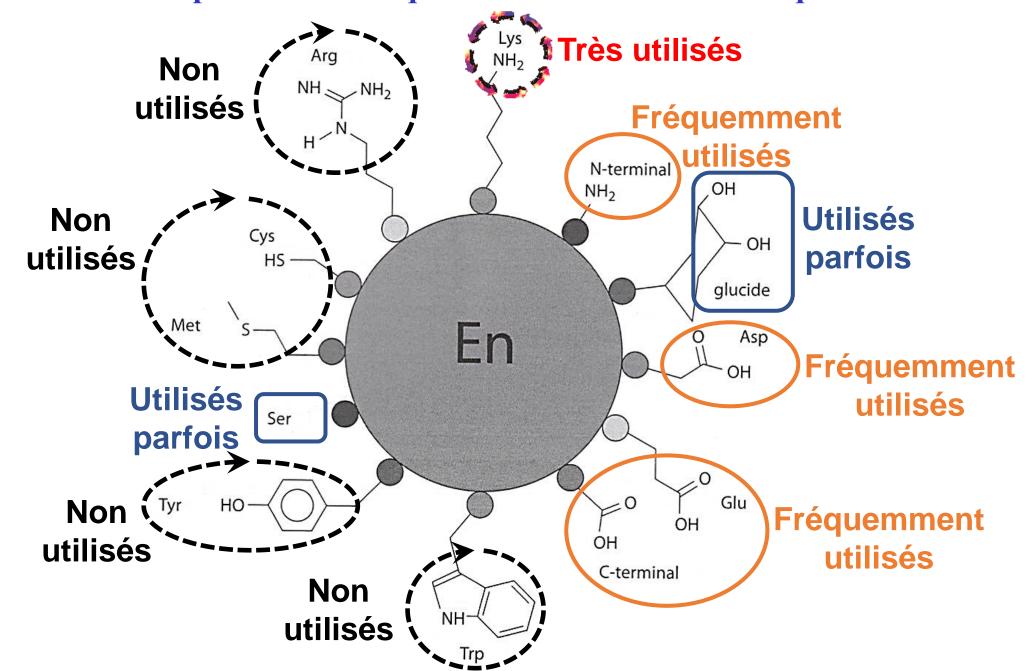
## 2. Procèdes d'immobilisation des enzymes

L'immobilisation des enzymes sur des **supports solides** est rendue possible grâce :

à la présence de certains **groupements chimiques réactifs** dans la structure primaire de l'enzyme.

Accessibles à la surface de la molécule : NH2 (Lys) (Ser,Thr,Tyr) HO -(Asp, Glu) COOF

### Classification des Groupements chimiques réactifs selon leurs fréquences d'utilisation

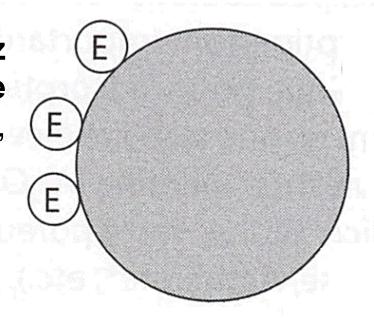


L'enzyme peut être retenue sur un support solide par différents procédés

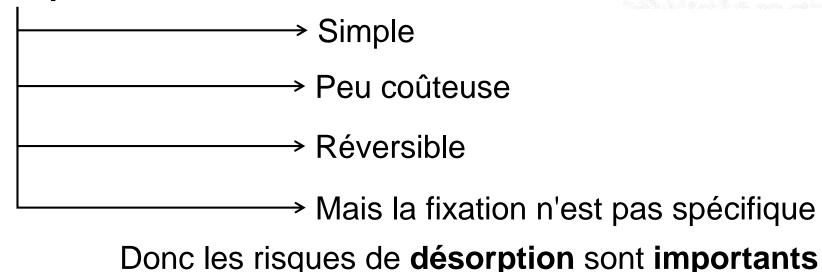
### 1. Immobilisation par adsorption

Certaines enzymes peuvent se fixer de façon assez stable, sans aucune modification chimique particulière, à la surface de certains supports solides, par adsorption.

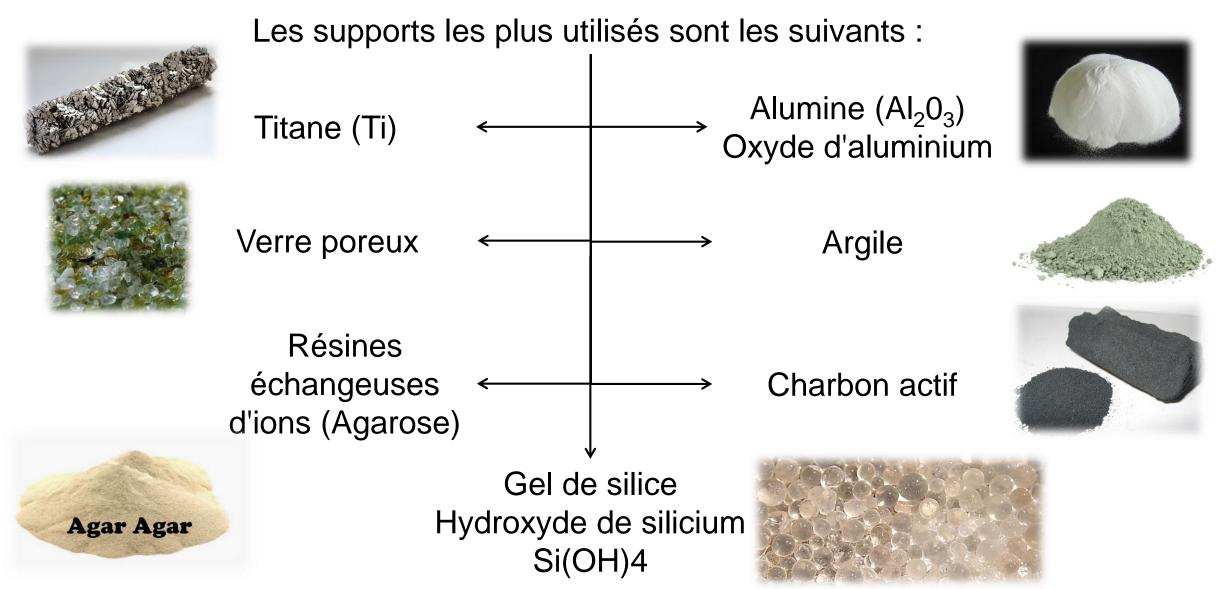
Celle-ci est obtenue par la mise en contact du support et des enzymes actives pendant une période définie.



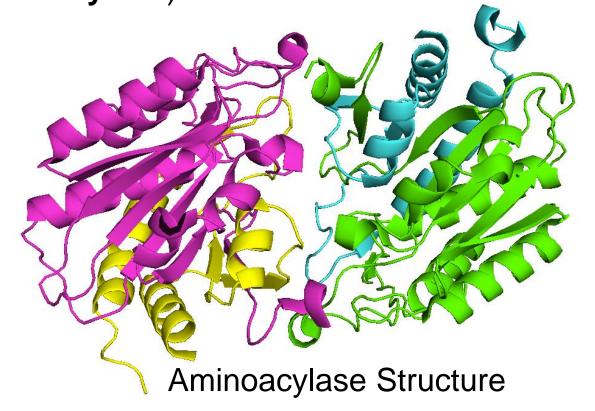
#### Cette technique est :



Un choix **judicieux** de support ne nécessitant pas **d'agent chimique** pour l'adsorption permet une immobilisation dans des conditions douces résultant en une **stabilité élevée** des enzymes retenues.



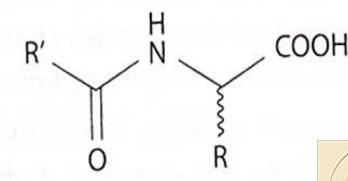
Cette technique a été la première application commerciale d'une enzyme immobilisée (L-aminoacylase)



Permettant l'isolement de la L-méthionine à partir d'un mélange racémique.

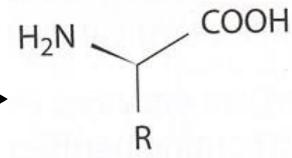
(Technique mise au point par la compagnie Tanabe Seiyaku, au Japon, en 1969).

## DL-aminoacides (mélange racémique)



# L-aminoacylase fongique immobilisée

 $(H_2O)$ 



L-aminoacide

**Isolement** 

#### Notation D, L

COOH
$$H-C-NH_{2}$$

$$R$$

$$H_{2}N-C-H$$

$$R$$

$$R$$

$$D-Acide aminé$$

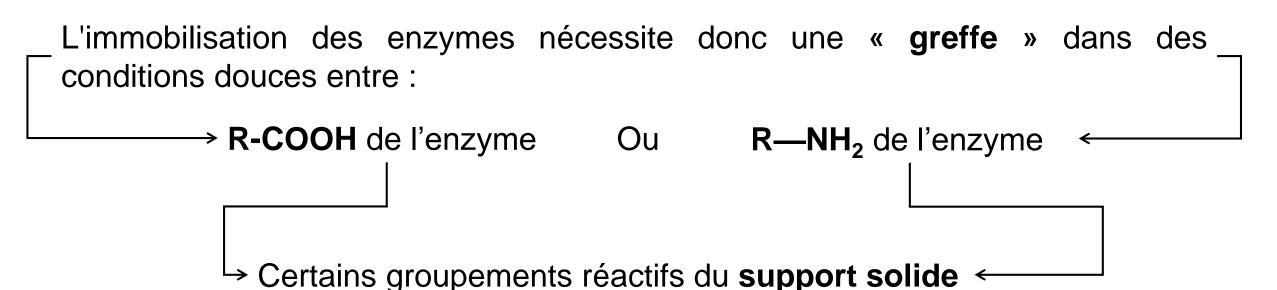
$$L-Acide aminé$$

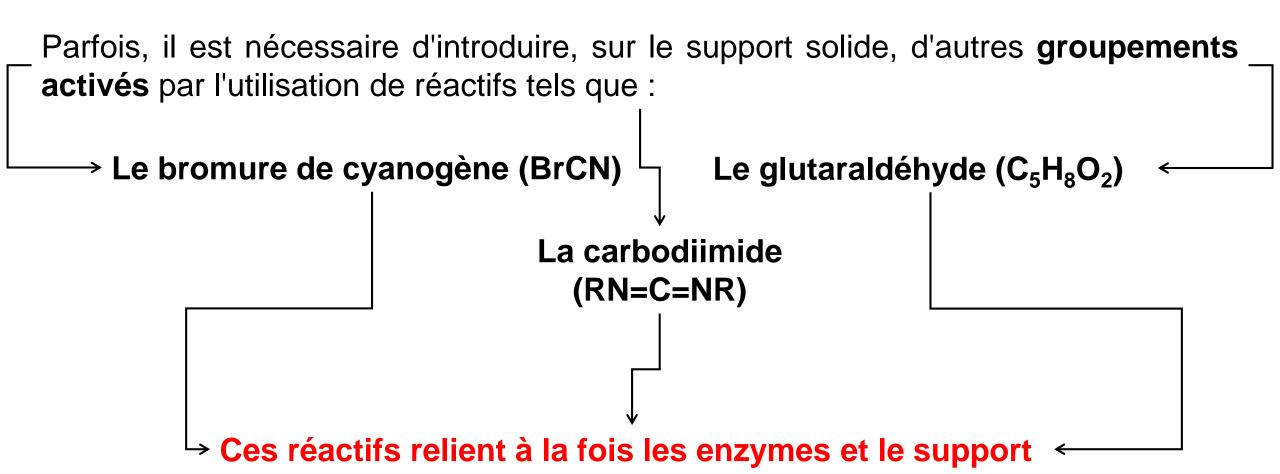
- En règle générale les acides aminés présents dans les protéines naturelles appartiennent à la série L.
- Mais on peut trouver des acides aminés de configuration D dans certains produits naturels (antibiotiques peptidiques...)

## 2. Immobilisation par fixation covalente

Comme il s'agit de protéines, les groupements réactifs disponibles sont de deux types principaux : des groupements acides carboxyliques et des groupements aminés primaires.

D'autres groupements existent (R -SH, R -OH), mais leur utilisation est plus délicate car leur modification se traduit en général par la perte de l'activité enzymatique.

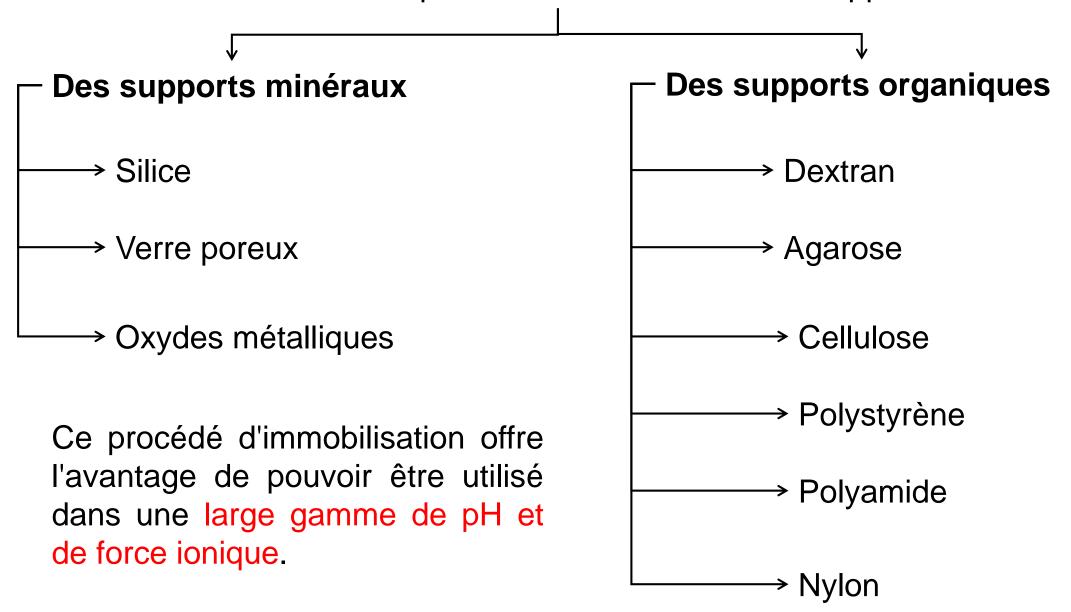




## Fixation d'une enzyme sur un support activé par le bromure de cyanogène

### Fixation d'une enzyme sur un support activé par un carbodiimide

Dans le cas de l'immobilisation par fixation covalente Les supports usuels sont :



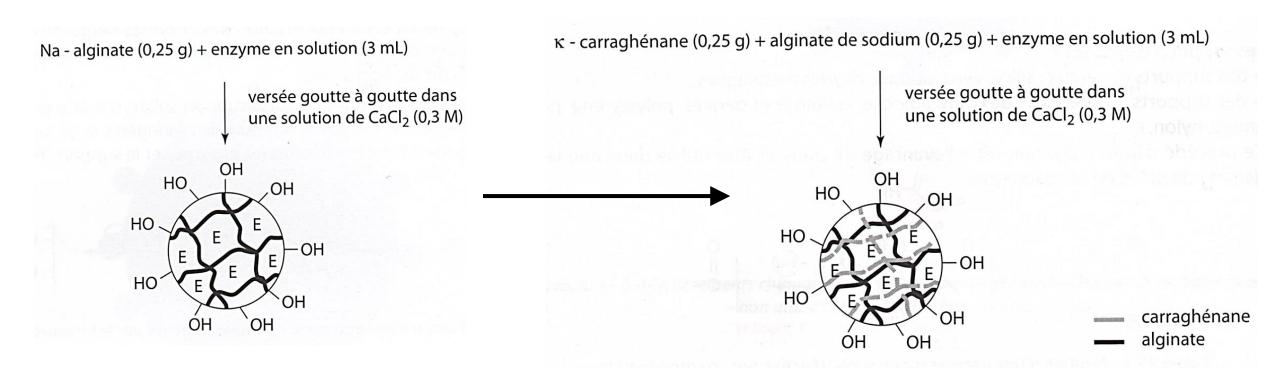
### 3. Immobilisation par Inclusion ou encapsulation

Le gel polymérise autour de l'enzyme et l'inclut, tout en permettant, dans une certaine mesure, la circulation des substrats et produits.

Cette technique est :
 → Peu coûteuse
 Mais les problèmes de diffusion constituent un facteur limitant

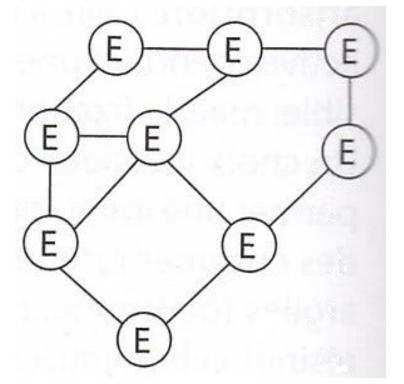
Dans les mailles d'un gel de polymères naturels ou synthétiques. Les supports utilisés sont très variés : → Cellulose ou ses dérivés → Dextrans → Carraghénanes → Polyacrylamide → Fibres de polyester → Mousse de polyuréthane → Nylon

# L'immobilisation de l'acétylcholinestérase par inclusion dans un gel mixte d'alginate/ carraghénanes

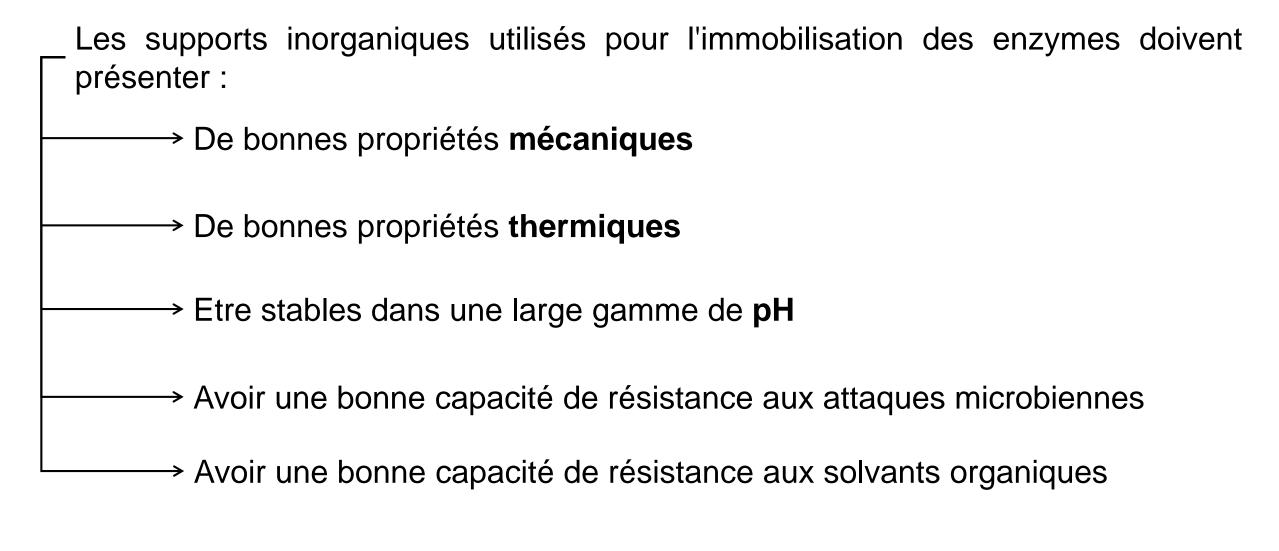


### 4. Immobilisation par réticulation

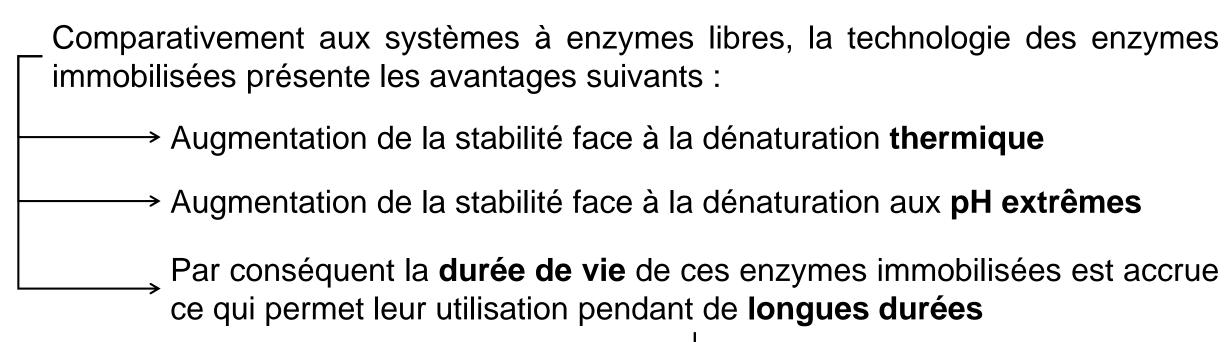
Les enzymes sont immobilisées par l'établissement de liaisons intermoléculaires entre les enzymes au moyen de réactifs bi- ou multifonctionnels, formant des agrégats insolubles.



Le glutaraldéhyde, par exemple, est utilisé comme agent de réticulation qui réagit avec les fonctions amines (-NH2) des protéines grâce a ses deux fonctions aldéhydes.

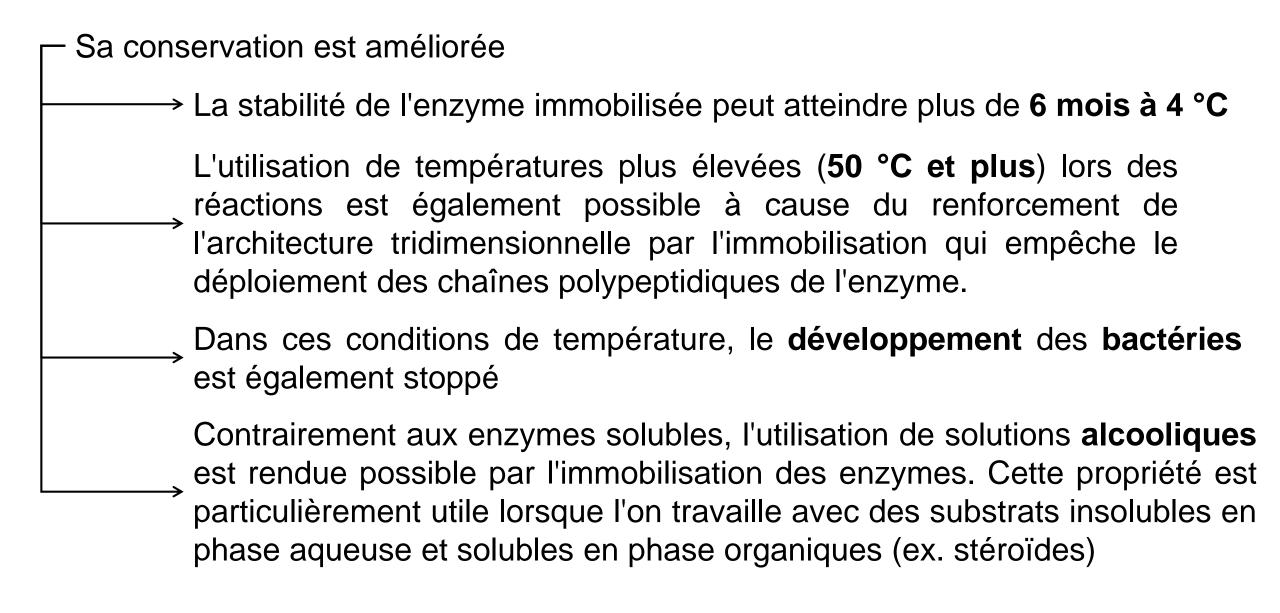


# 3. Avantages des enzymes immobilisées



À titre comparatif, chez une enzyme immobilisée, sa stabilité en fonctionnement à **30 °C** est de l'ordre d'une **semaine** à **quelques mois** 

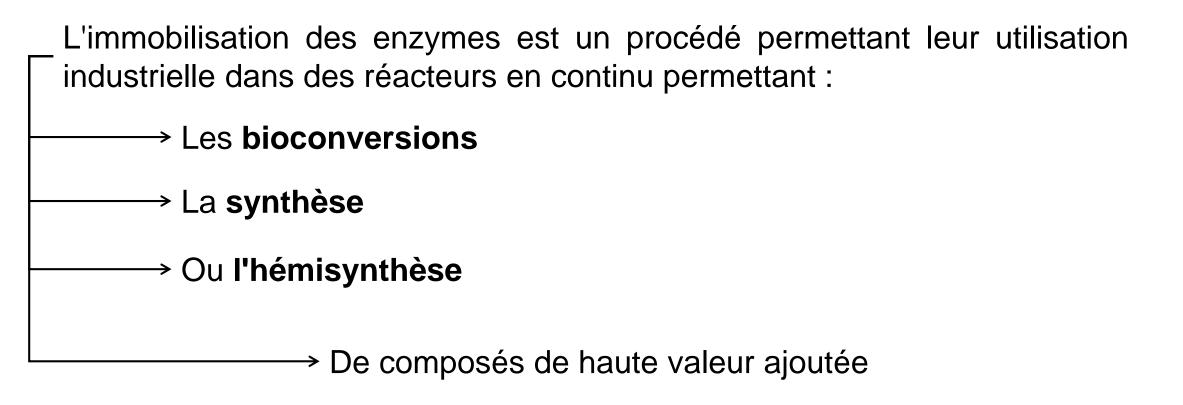
Alors que celle de l'enzyme en solution est souvent inférieure à 24 h ←



Entre autres avantages	
	Le <b>mécanisme réactionnel</b> de l'enzyme immobilisée n'est en généra pas modifié
	_e contrôle du pH d'action optimal est plus aisé
	Les produits obtenus sont d'une plus grande pureté et leur récupération est plus facile
	Les processus d'inhibition des enzymes sont réduits voire complètement éliminés
	La productivité est fortement augmentée grâce aux opérations en mode continu et à la possibilité de réutiliser les enzymes

## 4. REACTEURS ENZYMATIQUES

Un réacteur enzymatique est défini comme un dispositif dans lequel une réaction de conversion chimique est catalysée par une enzyme.



Plusieurs types de réacteurs enzymatiques ont été mis au point :

Ils ont pour fonction la production, en **continu**, du ou des produits de conversion du **substrat**.

Le principe de ces réacteurs repose sur le passage lent du substrat (vitesse déterminée par l'expérience) au travers d'une colonne d'enzyme immobilisée.

Le choix du réacteur dépend, et
 → Du type de réaction
 → Du support
 → De l'utilisation désirée

## Les types de réacteurs enzymatiques

### 1. Réacteurs à acides aminés

C'est l'un des premiers réacteurs industriels réalisé pour la fabrication de L-aminoacides

Les acides aminés synthétisés chimiquement à des fins alimentaires sont un **mélange racémique** de composés **D-** et **L-**. Seul le composé **L-** est utilisable en **nutrition humaine et animale** 

Le dédoublement du racémique, difficile par voie chimique, est facilité par l'utilisation d'une **aminoacylase** fixée

Le L-aminoacide libéré est aisément séparé du D-acylaminoacide. Ce dernier est chimiquement racémisé, avant de passer à nouveau sur la colonne.

Cette synthèse dite combinée (association de méthodes chimiques et enzymatiques) est très avantageuse pour un grand nombre d'acides aminés.

Ce type de bioréacteur permet de produire des quantités importantes (une dizaine de tonnes) de L-aminoacides par mois, par exemple : → L-alanine → L-glutamate → L-méthionine → L-phénylalanine → L-tryptophane

→ L-valine

## Les types de réacteurs enzymatiques

### 2. Réacteur à Lactose

Ce type de réacteur est utilisé pour fabriquer du lait sans lactose. L'hydrolyse de ce dernier en glucose et galactose est catalysée par la β-galactosidase.

Cette enzyme peut être co-polymérisée avec la sérum-albumine bovine qui sert alors de protéine support, grâce au glutaraldéhyde (agent pontant).

Le lait est déposé en continu sur la colonne remplie de l'enzyme immobilisée, le lactose est alors hydrolysé en glucose et galactose.

Ainsi, le lait se trouve débarrassé du lactose sans avoir perdu ses propriétés nutritives et en préservant l'ensemble de ses constituants.

## 5. Biocapteurs enzymatiques

La catalyse enzymatique est étudiée **traditionnellement** en **milieu aqueux** La grande variété et la spécificité des enzymes ont été très tôt exploitées dans le secteur de l'analyse et du contrôle.

Particulièrement lorsque l'hétérogénéité du milieu se prête mal à une mesure spécifique par voie chimique ou lorsque le milieu réactionnel est constitué d'une phase non aqueuse.

En effet, le développement de biocapteurs à enzymes permet aujourd'hui de travailler en phases organiques, rendant possible la détermination de composés qui sont peu ou pas solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques

Ce qui a élargit le champ des applications analytiques des biocapteurs enzymatiques aux substrats et échantillons hydrophobes

Le composant clé du **biocapteur enzymatique** est l'enzyme qui est responsable de la reconnaissance spécifique de **l'analyte** 

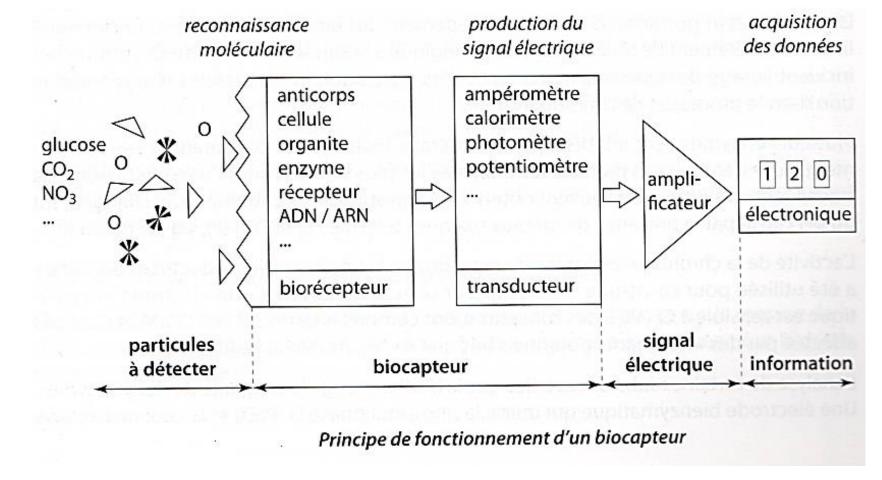
Lorsqu'on travaille dans des solvants non aqueux, la simple adsorption de l'enzyme sur un support solide au niveau de l'électrode est souvent une bonne méthode d'immobilisation en raison de l'insolubilité des enzymes dans les solvants organiques.

Néanmoins, une grande variété de méthodes d'immobilisation des enzymes est actuellement disponible, permettant une meilleure stabilisation de **l'activité** catalytique. Les durées de vies de ces électrodes enzymatiques sont alors de quelques jours à plusieurs semaines selon la nature de l'enzyme et son mode d'immobilisation.

## Définition d'un Biocapteurs enzymatiques

D'une manière générale, les biocapteurs associent un dispositif de reconnaissance biologiquement sélectif appelé biorécepteur à un semi-conducteur le transducteur.

Le biorécepteur représente le premier maillon du biocapteur, sa spécificité permet d'identifier la nature du produit recherché.



Le transducteur constitue l'autre partie du biocapteur. La grandeur à mesurer, en agissant sur le biorécepteur, génère une énergie (thermique, électronique, rayonnante, etc.) proportionnelle à l'intensité de la réaction. Cette énergie est convertie par le transducteur en un signal électrique aisément mesurable.

Plusieurs types de biorécepteurs et de transducteurs existent à l'heure actuelle ; différentes combinaisons sont alors possibles.

Exemple d'un biorécepteur cellulaire





# Biorécepteur

Ce sont les enzymes purifiées couramment commercialisées qui sont les plus utilisées. L'utilisation de ces enzymes présente de nombreux avantages comme leur grande spécificité par rapport au(x) substrat(s), la reproductibilité des analyses, des caractéristiques et des durées de vie connues, une disponibilité rapide.

Le développement d'électrodes biologiques, dites « électrodes à enzymes » est certainement une des plus importantes innovations dans le domaine des applications industrielles des enzymes. Ces électrodes sont recouvertes d'une couche constituée d'une enzyme immobilisée sur un support et couplée à un transducteur (généralement ampérométrique) qui traduit sous forme de signal électrique l'activité de cette enzyme.

L'enzyme peut être fixée directement à la surface de l'électrode ou incluse dans un gel polymérique et retenue par une membrane perméable au substrat à doser. Si celui-ci est présent dans l'échantillon, il diffuse à travers la membrane et la réaction catalytique est déclenchée. Le produit qui peut être un **ion** ou un **gaz** induit une différence de potentiel mesurée par l'électrode de platine et proportionnelle à la concentration du produit de la réaction.

Ainsi, dans le cas d'une électrode à urée, l'uréase adsorbée sur un gel convertit l'urée en **ions ammonium** et en **HCO**<sub>3</sub>- et l'électrode sensible aux **ions NH**<sub>4</sub>+ permet la mesure directe de la quantité d'urée présente dans l'échantillon. De telles électrodes permettent la mesure instantanée d'un certain nombre de substances dans des systèmes biologiques complexes, (le sang, par exemple) du fait de la spécificité des enzymes utilisées. De plus, ces électrodes peuvent être adaptées à des mesures en continu, ce qui facilite grandement le suivi de l'évolution de tel ou tel produit au cours d'une réaction.

Dans le domaine de la détermination des pesticides, un biocapteur basé sur l'acétylcholinestérase (AChE), obtenue par manipulation génétique chez Drosophila melanogaster, montre une constante d'inhibition pour le methamidophos (insecticide) avec un ordre de grandeur trois fois plus élevé qu'avec les préparations commerciales d'AChE d'Electrophorus electricus (anguille électrique). Ce même biocapteur est sensible à un autre insecticide, l'omethoate, avec une limite de détection de 10<sup>-17</sup> M.

Des avancées importantes dans le développement des biocapteurs portent sur l'immobilisation de l'élément de reconnaissance biologique à la surface de la sonde. Ces approches incluent l'usage de nouveaux matériaux et l'incorporation de médiateurs d'oxydo-réduc-tion dans le processus de l'immobilisation.

Plusieurs enzymes sont inhibées par des métaux toxiques qui contaminent l'environnement. Pour détecter ces métaux, les enzymes les plus utilisées sont l'uréase et I AChE. La transduction du signal est souvent obtenue en suivant par potentiométrie le changement du pH causé par la présence de métaux toxiques tels que Hg (II), Cu (II), Cd (II), ou Zn (II).

L'activité de la chromate reductase du cytochrome C3 de bactéries réductrices du sulfate a été utilisée pour construire un biocapteur sélectif du Cr (VI). Cette électrode enzymatique est sensible à Cr (VI) à des concentrations comprises entre 3,8 et 132 pM et n'est pas affectée par des interférants potentiels tels que As (V), As (III) ou Fe (III).

L'analyse de certaines substances telles que la lécithine exige le couplage de deux enzymes. Une électrode bienzymatique qui utilise la phospholiphase D (PLD) et la choline oxydase (ChOx) immobilisées sur un gel de K-carraghénane avec une électrode à oxygène comme transducteur a été utilisée pour l'analyse de la lécithine (phosphatidylcholine).

PLD
lécithine 
$$\rightarrow$$
 choline + acide phosphatidique

ChOx

choline +  $2O_2$  +  $H_2O$   $\rightarrow$  bétaine +  $2H_2O_2$ 

Le biocapteur, fonctionnant sur le principe de deux réactions enzymatiques couplées, établit une corrélation entre la concentration en substrat et l'oxygène consommé par la réaction catalysée par la choline oxydase et la diminution de l'intensité du courant mesuré par la sonde oxymétrique de l'appareil.

Les limites de détection obtenues à l'aide des biocapteurs mono- ou bi-enzymatiques sont relativement plus élevées que celles obtenues par les méthodes immunologiques ou chro-matographiques qui restent des méthodes de référence.

#### **Transducteur**

Le transducteur représente l'élément permettant de mettre en évidence la réaction assurée par le biorécepteur auquel il est intimement connecté ou de doser directement et rapidement un composé chimique ou biologique dans un milieu complexe en transformant le signal biologique ou biochimique (modification de charges, de pH, de température, de fluorescence, etc.) en un signal électrique enregistrable.

Le choix du transducteur dépendra donc du type de réaction et des substances libérées ou consommées. Il peut s'agir d'une cellule électrochimique, d'une thermistance, d'un photomètre, etc.

### **Transducteur**

### 1. Transducteurs électrochimiques

Dans le cas d'une détection chimique, il existe un grand nombre d'électrodes sensibles au pH, aux cations et aux anions. Ces transducteurs sont de plusieurs types, suivant la nature du signal enregistré :

Conductométriques qui permettent de suivre les modifications de conductivité d'une solution lorsque, au cours d'une réaction, des espèces ioniques sont générées.

Potentiométriques qui mesurent la différence de potentiel (ddp) entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence. Selon la loi de Nernst, la ddp est proportionnelle au logarithme de la concentration de l'élément chimique à doser.

**Ampérométriques** qui mesurent l'intensité du courant qui traverse une cellule électrochimique. Cette intensité dépend de la concentration des espèces chimiques pouvant être oxydées ou réduites.

#### **Transducteur**

### 2. Transducteurs thermiques ou calorimétriques

Certains transducteurs sont sensibles à la température. Ils sont basés sur la mesure de la chaleur générée par la catalyse enzymatique. Cette approche a été utilisée pour la détermination de l'activité de la lipase.

### 3. Transducteurs optiques

Il peut s'agir aussi d'une détection à l'aide de fibres optiques d'un changement des condi-tions optiques du milieu : émission de lumière, de fluorescence, absorption de la lumière, phosphorescence, luminescence.

## CARACTERISTIQUES DES BIOCAPTEURS

Un biocapteur va pouvoir être caractérisé en fonction de plusieurs critères :

Sa spécificité qui correspond à sa capacité à détecter un composé parmi d'autres. Elle dépend de la nature du biorécepteur.

Par exemple, un biocapteur basé sur le suivi de la conductimétrie sera sensible à toutes les espèces d'électrolytes qui pourraient être présentes dans un milieu. Par contre, les électrodes spécifiques d'un ionomètre ne sont sensibles qu'à des ions particuliers.

### CARACTERISTIQUES DES BIOCAPTEURS

Un biocapteur va pouvoir être caractérisé en fonction de plusieurs critères :

Sa sensibilité qui correspond à la plus petite concentration d'un polluant donné générant un signal. Elle dépend du biorécepteur, du transducteur et de l'interaction entre ceux-ci.

Le signal émis par le biorécepteur lors de la reconnaissance moléculaire doit être dans les limites de détection du transducteur.

Or, plus le signal est important, meilleure est la détection, compte tenu du rapport signal/bruit de fond. Il faut donc choisir d'étudier une fonction qui soit fortement perturbée par le(s) toxique(s) à détecter et à quantifier.

Sa capacité à donner une réponse en temps réel. Chaque essai doit être reproductible et facile à calibrer.

Un biocapteur **doit être robuste** et résister aux changements de température, de pH, de force ionique. De plus, son utilisation doit être simple, requérant un minimum d'entretien de technicité. Il devra donc être un outil compact, peu onéreux, fiable, facilement miniaturisable et automatisable (dans la majorité des cas).

La stabilité du biorécepteur dans les conditions de l'analyse est une caractéristique d'une importance primordiale.

Le choix du transducteur va aussi dépendre des possibles interférences qui peuvent perturber la détection (ex. milieux troubles dans le cas d'une détection optique) et de l'application du biocapteur.

Utilisé en milieu biologique, il doit répondre à des critères de biocompatibilité : dépôt à sa surface de protéines, de lipides ou de cellules. Utilisée in vivo, sa dimension doit être réduite et sa forme adaptée pour éviter un endommagement important du matériel biologique.

Pour une utilisation de longue durée, il faut tenir compte du relargage éventuel de composants toxiques, métalliques ou polymériques du transducteur.

### IMMOBILISATION DE L'ENZYME

L'un des principes fondamentaux des biocapteurs est la proximité du biorécepteur et du transducteur. Ce dernier doit être à même de capter et transmettre rapidement les changements biologiques ou biochimiques existant.

De ce fait, la technique d'immobilisation du biorécepteur, directement sur le transducteur ou à proximité, constitue un des points critiques de l'élaboration et du bon fonctionnement des biocapteurs.

Dans les biocapteurs à enzymes, les méthodes d'immobilisation sont :

- immobilisation sur des billes de verre poreuses,
- liaisons covalentes sur membranes de dialyse,
- réticulation avec du glutaraldéhyde,
- immobilisation sur gel d'agarose.

De nombreux exemples d'applications des enzymes en général et des enzymes immobilisées, en particulier en industrie et en médecine.

Les applications potentielles des biocapteurs enzymatiques concernent la mesure de substances antigéniques, de nombreux paramètres chimiques (glucose, urée) ou la détection de corps toxiques (dioxyde de carbone, métaux lourds, pesticides, etc.).

Ces mesures relèvent des domaines d'applications suivants : analyses médicales, industrie agro-alimentaire, environnement, etc.

Les premiers biocapteurs ont été développés à des fins médicales. Puis l'industrie agroalimentaire s'est intéressée aux biocapteurs comme outils analytiques rapides. Enfin, depuis quelques années,

les biocapteurs trouvent des applications dans le domaine de la surveillance de l'environnement. Très récemment, d'autres dispositifs, les puces à ADN (encart 12) sont de plus en plus développés et utilisés dans des buts similaires, en complément ou en concurrence avec les biocapteurs.

### 1. Domaine de la santé

Le premier biocapteur développé en 1967 permettait la détection du glucose dans le sang. En 1972, un biocapteur enzymatique sensible à l'urée a été mis au point. Une suspension d'uréase est maintenue à la surface d'une électrode munie d'une toile en nylon; l'ensemble est recouvert avec une membrane de dialyse. Ce biocapteur permet de détecter l'urée à des concentrations variant de 1,1 10<sup>-7</sup> M à 2,2.10<sup>-2</sup> M.

D'autres biocapteurs ont été développés pour les besoins de l'industrie pharmaceutique et le domaine médical, principalement pour la recherche de stéroïdes tels que le cholestérol l'androstendione, la testostérone, des antibiotiques tels que la nystatine et d autres composés comme des hormones, l'acide urique, la créatinine et le fer (II et III).

Les biocapteurs les plus utilisés sur le marché sont les biocapteurs à glucose, constitués de la glucose-oxydase comme biorécepteur et d'un transducteur électrochimique, pour leur utilisation dans le diagnostic du diabète.

## 2. Industrie agro-alimentaire

C'est notamment dans les procédés de fermentation où les applications sont les plus utilisées pour le suivi, en continu, de la concentration de sucres grâce à des biocapteurs à enzymes ou à microorganismes immobilisés.

Un biocapteur à base de tyrosinase est utilisé pour la détermination de polyphénols dans les huiles et aliments.

## 3. Industrie agro-alimentaire

Contrôler les contaminants dans l'air, l'eau et le sol est incontournable lors de la prévention des risques pour la santé humaine et l'environnement. Compte tenu du temps consacré et du coût des techniques analytiques traditionnelles

Il y a un besoin accru de méthodes plus simples, plus rapides, moins coûteuses et directement applicables sur le terrain.

L'utilisation des biocapteurs dans le domaine de l'environnement est récente. Ils permettent la détection rapide de polluants dans les écosystèmes et donc d'intervenir plus rapidement pour y remédier.

La détection peut se faire directement dans des systèmes complexes (eau douce, eau de mer, sol, etc.) prélevés dans le milieu naturel.

Un grand nombre de biocapteurs destinés à la détection des pesticides organophosphorés et des carbamates utilisent des capteurs électrochimiques comme transducteurs et des biorécepteurs à base d'enzymes purifiées et immobilisées (estérases, acétyle choline estérase).

Des biocapteurs basés sur l'utilisation de la tyrosinase ont été développés pour la détection des phénols, molécules polluantes dont l'usage est très répandu (pesticides, plastiques, surfactants, etc.).