

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI
BOUMEDIENE**

FACULTE DE CHIMIE



THESE

**Présentée pour l'obtention du grade de DOCTORAT D'ETAT
En CHIMIE**

Spécialité: CHIMIE MACROMOLECULAIRE

Sujet

**ELABORATION D'UN REACTEUR A
ENZYMES IMMOBILISEES (CATALASE)**

Présentée par : M^{elle} KADDOUR Samia

Soutenue publiquement le 28 décembre 2010, devant le jury composé de

M^{me} B. BOUTEMEUR	Professeur à l'USTHB	Président
M^r T. SADOON	Professeur à U A MIRA	Directeur de Thèse
M^{me} A. HASSANI	Professeur à l'ENS	Examineur
M^r M.M. BELLAL	Professeur à l'INA	Examineur
M^{me} C. RABIA	Professeur à l'USTHB	Examineur
M^r B. HAMDİ	Professeur à l'ISMAL	Examineur
M^{elle} S. BENNOUR	Maître de Conférences A, (USTHB)	Examineur

Dédicaces

A la mémoire de mon père

A ma mère

A mon frère et mes sœurs

A toute ma famille

A mes amis

REMERCIEMENTS.

Je tiens à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour la bourse qu'il m'a octroyée, car sans ce stage je n'aurais pas pu réaliser ce travail. Ainsi j'ai pu réaliser mon travail de recherche entre l'Espagne et l'Algérie.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à monsieur le Professeur Tahar Sadoun de l'Université Abderrahmane Mira, pour m'avoir inscrite sous sa direction en Thèse de Doctorat d'Etat et de m'avoir proposé ce sujet de recherche. Je lui exprime mes vifs remerciements et ma très profonde gratitude pour sa bienveillance et ses conseils judicieux.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Baya Boutemour, Professeur à la Faculté de Chimie de l'USTHB, d'avoir accepté de présider ce jury de cette thèse.

Mes vifs remerciement vont également : Madame Chérifa Rabia, Professeur à la Faculté de Chimie de l'USTHB ; Madame Aicha Hassani, Professeur à l'ENS de Kouba ; Monsieur Mohand Mouloud Bellal Professeur à l'ENA d'El Harrach ; Monsieur Boualem Hamdi, Professeur à l'ISMAL de Bousmail et à Mademoiselle Sadjia Bennour, Maitre de conférences Faculté de Chimie de l'USTHB, pour avoir consacré leur temps à examiner et juger ce travail. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à madame Chérifa Rabia pour son aide et ses conseils éclairés.

Mes sincères remerciements s'adressent à Messieurs les Professeurs Jean Manuel Guisan, Roberto Fernandez-Lafuente et Fernando Lopez-Galego, qui m'ont accueillie au sein de leur laboratoire et ont mis à ma disposition tous les moyens pour la réalisation de ce travail. Je les remercie pour leur aide, leurs suggestions durant tout mon stage. Mes vifs remerciements à toute l'équipe du laboratoire pour l'ambiance chaleureuse qu'ils ont su créer.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de Chimie Théorique et en particulier Messieurs les Professeurs Madjid Nait Achour et Hacène Meghezzi de m'avoir accueillie dans le laboratoire de Chimie Théorique.

Mes vifs reùerciements s'adressent également, à toute l'équipe du laboratoire de Chimie des Polymères, et en particulier à: Scheherazed Mimoune, Rafik et Adel, pour leur aide et leur réconfort. Mes chaleureux remerciements vont également, à Dalila Hammoutène, Zaia Kaddour Derrar, Ouardia Zekri, Mohamed Trari et Yassine Bessekhoud, pour leur aide.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	
SOMMAIRE	
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHYQUES	
I.1. STRUCTURE D'UNE ENZYME	3
I.2. ENZYME CATALASE	5
a) Structure et rôle de la catalase	5
b) Application de la catalase	5
I.3.. ENZYME GLUCOSE OXYDASE	6
a) Structure et rôle de la glucose oxydase	6
b) Application de la glucose oxydase	6
I.4. SYSTEME GLUCOSE OXYDASE/ CATALASE	7
a) Structure et rôle	7
b) Application du système glucose oxydase/ catalase	7
II. IMMOBILISATION DES ENZYMES	7
II.1. PROBLEMES DE LA STABILITE DES BIOCATALYSEURS	7
II.2.IMMOBILISATION DES ENZYMES	8
II.3. PRINCIPALES METHODES D'IMMOBILISATION	8
II.3. 1. Immobilisation par adsorption	9
a) Agarose polyéthylèneimine	9
b) agarose mono-amino-N-éthyl (agarose MANAE)	10
II.3.2. Immobilisation par liaison covalente	11
a) Support agarose glyoxyl	12
b) Support agarose CNBr	15
III. RETICULATION DES ENZYMES IMMOBILISEES	16
III.1. GLUTARALDEHYDE	16
III.2. DEXTRANE-ALDEHYDE	17
CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE	
I. MATERIELS ET METHODES	37

I.1 : MATERIELS	37
I-2 : METHODES	37
I-2-1: Détermination de l'activité enzymatique de la catalase	38
I-2-2: Détermination de l'activité enzymatique de la glucose oxydase	38
I-2-3 : Mesure de l'absorbance du glucose	39
I-2-4 : Détermination de la concentration en protéines	39
I-2-5: Technique électrophorèse SDS-PAGE	40
II. PREPARATION DES SUPPORTS	40
II.1. SUPPORT AGAROSE GLYOXYL	41
II.2.SUPPORT AGAROSE MONO-AMINO-N-ÉTHYL (AGAROSE MANAE)	42
II.3. PRÉPARATION DE L'AGAROSE POLYÉTHYLÈNEIMINE (PEI) AGAROSE	43
II.4. EQUILIBRATION DES SUPPORTS AGAROSE MANAE, AGAROSE PEI 25 000 ET AGAROSE PEI 750 000	43
II.5. PREPARATION DE L'AGAROSE CNBr	44
III. IMMOBILISATION DE LA CATALASE SUR LES DIFFERENTS SUPPORTS	44
III.1.IMMOBILISATION PAR LIAISON COVALENTE	44
III.1.1. Préparation du dérivé Ag glyoxyl	44
a) Dérivé à catalase <i>Aspergillus niger</i>	44
b) Catalase foie bovin	45
III.1.2. Préparation du dérivé Ag CNBr	45
a) Dérivé à catalase <i>Aspergillus niger</i>	45
b) Dérivé à catalase foie bovin	45
III.2. ADSORPTION IONIQUE DES ENZYMES	46
III.2.1. Préparation du dérivé Ag MANAE	46
III.2.2. Préparation du dérivé Ag PEI	46
III.2.3. Préparation du dérivé Ag MANAE/ GOX/ Glut	46
IV. RETICULATION DES DERIVES	47
IV.1.RETICULATION AVEC LE GLUTARALDEYDE	47

IV.2. RETICULATION AVEC LE DEXTRANE-ALDEHYDE	47
V. ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE IMMOBILISEE	48
VI. ETUDE D'UN REACTEUR A CATALASE/GLUCOSE OXYDASE	48
CHAPITRE III : ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE IMMOBILISEE	
I. ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE IMMOBILISEE	52
I.1. ADSORPTION DE LA CATALASE	53
I.1.1. Etude de l'activité de la catalase immobilisée	54
I.1.2. Etude de la désorption de la catalase	57
II. IMMOBILISATION DE LA CATALASE PAR LIAISON COVALENTE	60
II.1. RETICULATION AVEC LE GLUTARALDEHYDE	60
II.1.1 Réticulation de la catalase immobilisée par adsorption	60
II.1.2 Activation du support agarose MANAE avec le glutaraldéhyde	63
II.1.3 Effet du pH	65
II.2. IMMOBILISATION SUR L'AGAROSE CNBr ET L'AGAROSE GLYOXYL	66
II.2.1 Agarose glyoxyl	66
II.2.2 Agarose C NBr	66
II.3. ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE IMMOBILISEE PAR LIAISON COVALENTE	68
II.3.1 Etude de l'activité de la catalase immobilisée sur l'agarose glyoxyl et sur l'agarose CNBr	68
II.3.2. Réticulation de la catalase immobilisée sur l'agarose CNBr	69
II.4 RETICULATION AVEC LE DEXTRANE-ALDEHYDE	70
II.4.1 Préparation des dérivés	70
a) Dérivé Ag CNBr	70
b) Electrophorèse SDS-PAGE des dérivés	72

II.4.2 Effet du pH sur l'activité de la catalase immobilisée par liaison covalente	73
a) Dérivé Ag CNBr	73
b) Dérivé Ag glyoxyl	74
II.5 ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE IMMOBILISEE PAR LIAISON COVALENTE EN PRESENCE D'IONS DIVALENTS	75
II.5.1. Effet de la concentration en ion Ca^{2+}	75
II.5.2. Effet de l'EDTA et du dextrane-aldéhyde	76
a) Dérivé Ag CNBr	76
b) Dérivé Ag glyoxyl	78
II.5.3. Effet de l'ion Ca^{2+} sur le dérivé Ag CNBr/dext et l'Ag glyoxyl/dext	78
II.5.4. Effet des ions : Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} et Co^{2+}	80
II.5.5. Effet de dilution en présence de l'ion Zn^{2+}	81
a) Dérivé Ag CNBr/dext	81
b) Dérivé Ag glyoxyl/dext	82
c) Etude comparative des dérivés Ag glyoxyl et AgCNBr	83
II.5.6. Effet de la concentration de l'ion Zn^{2+}	84
CHAPITRE IV : REACTEUR A CATALASE/ GLUCOSE OXYDASE	
I. ETUDE DE L'OXYDATION DU GLUCOSE EN PRESENCE DE GLUCOSE OXYDASE ET DE CATALASE	92
II. ETUDE DE DIFFERENTS REACTEURS	93
II.1. OXYDATION DU GLUCOSE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS AVEC LE DERIVE Ag MANAE/GOX/ Glut : REACTEUR 1	93
II.2. OXYDATION DU GLUCOSE AVEC LES DERIVES Ag MANAE/ GOX/ Glut ET Ag GLYOXYL/ CAT FB : REACTEUR 2	94
II.3. OXYDATION DU GLUCOSE 500 mM AVEC LES DERIVES Ag MANAE/GOX/ GLUT ET Ag GLYOXYL/ CAT FB : REACTEUR 3	95
II.4. OXYDATION DU GLUCOSE 500 mM AVEC LES DERIVES Ag MANAE/GOX/ GLUT ET Ag GLYOXYL/ CAT FB : REACTEUR 4	96

II.5. OXYDATION DU GLUCOSE 500 mM A DERIVES Ag MANAE/GOX/ Glut ET Ag GLYOXYL/ CAT FB : REACTEUR 5	97
II.6. OXYDATION DU GLUCOSE 500 mM AVEC LES DERIVES Ag CNBr / GOX/ Glut ET Ag CNBR/ CAT An Ag CNBr/ CAT An : REACTEUR 6	99
II.6.1. II.6.1. Comparaison de l'activité de la glucose oxydase des dérivés : Ag MANAE/ GOX/ Glut et Ag CNBr/ GOX	100
II.6.2. Comparaison de l'action de la catalase (foie bovin et Asperg niger) sur l'activité de la glucose oxydase	101
III. ETUDE DE L'EFFET DU PEROXYDE D'HYDROGENE SUR LES DERIVES A GLUCOSE OXYDASE	102
CONCLUSION GENERALALE	107
ANNEXE	109
I. ELECTROPHORESE SUR GEL EN MILIEU SDS-PAGE	109
I.1. Technique d'électrophorèse	109
I.1.1. Gel d'électrophorèse dans les conditions dénaturantes	109
I.2. PREPARATION DES GELS DE CONCENTRATION ET DE SEPARATION	112
I.3. PREPARATION DES ECHANTILLONS	114
I.4. PROTOCOLE	114
I.5. PREPATION DES DIFFERENTES SOLUTIONS	114

ABREVIATIONS

A: activité enzymatique

An: *Aspergillus niger*

ABTS: 2,2'- azino-bis (3-éthylbenzathizoline-6-sulfonique)

Ag: agarose

Ag PEI: dérivé agarose PEI/ catalase

Ag MANAE: dérivé agarose MANAE/ catalase

Ag CNBr: dérivé agarose CNBr/ catalase

Ag glyoxyl: dérivé agarose glyoxyl/ cabalase

FB: foie de bovin

CAT: catalase

CNBr: bromure de cyanogène

Dext: dextrane-aldéhyde

Glut: glutaraldéhyde

GOX: glucose oxydase

HRP: horse radish peroxydase

MANAE: mono-amino-N-éthyl

PAGE: électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PEI: polyéthylèneimine

SDS: dodecylsulphate de sodium

TMED: N, N, N', N'- tétraméthyl-1-2- diaminométhane

Tris : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

UV: ultra violet

% activité : activité de l'enzyme après son immoilation

% activité résiduelle : activité conservée par l'enzyme quand elle est soumise à certaines conditions

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La catalase est une enzyme qui catalyse la réaction de transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène. Cette réaction est appliquée dans divers domaines tels que l'industrie alimentaire où le H_2O_2 est utilisé pour la stérilisation et doit être éliminé avant la commercialisation du produit [1-3]. Dans l'industrie textile, la catalase est la plus appropriée pour la dégradation du H_2O_2 après la décoloration des textiles dans le but d'éviter des problèmes survenant lors de la teinture [4]. L'élimination des pigments naturels des fibres textiles, est effectuée en présence de H_2O_2 . Cette opération est nécessaire pour faciliter l'étape de la teinture [5, 6].

Comme les enzymes sont chères et solubles dans le milieu réactionnel, généralement aqueux, leur récupération en fin de réaction n'est pas aisée ni économique. Afin de pouvoir la récupérer et la réutiliser, il est nécessaire de l'immobiliser. De nombreux travaux ont porté sur l'immobilisation [7- 10], par différentes méthodes et en particulier, par adsorption ou par liaison ionique sur des supports organiques. Malheureusement, l'adsorption étant réversible, il est judicieux de faire des études pour chaque couple enzyme/ support. De plus, la catalase étant une protéine multimérique constituée de quatre sous-unités, il a été souvent observé une perte d'activité due à la dissociation de ses sous-unités. Les paramètres température, force ionique, pH peuvent provoquer sa désactivation par dissociation de ses sous-unités.

Notre travail a porté sur l'immobilisation de la catalase par adsorption ionique sur différents supports agarose polyéthylèneimine (agarose PEI) et agarose mono-amino-N-éthyl (agarose MANAE) selon les méthodes décrites dans la littérature [11, 12] suivie d'une réticulation avec le glutaraldéhyde ($OHC-(CH_2)_3-CHO$).

De nombreux travaux ont porté sur la stabilisation des enzymes par réticulation de l'enzyme immobilisée. Le glutaraldéhyde qui est souvent utilisé pour la réticulation [12].

La catalase sera également immobilisée par liaison covalente sur les supports agarose bromure de cyanogène (agarose CNBr) et agarose glyoxyl (agarose glyoxyl). Ensuite, ces dérivés seront réticulés avec le dextrane-aldéhyde pour éviter la dissociation des sous-unités de la catalase, pour acquérir une plus grande stabilité [13, 14]. L'immobilisation sera étudiée dans différentes conditions opératoires.

Le chapitre I sera dédié à une mise au point bibliographique sur l'immobilisation des enzymes et l'étude de leur activité. Le chapitre II portera sur la partie expérimentale où les modes opératoires et techniques d'analyse sont détaillés. Le chapitre III sera consacré à l'étude de l'immobilisation et de celle de l'activité de la catalase immobilisée. Le chapitre IV décrira la l'étude de l'oxydation du glucose en présence de glucose oxydase et de catalase. La meilleure formulation sera utilisée pour la conception d'un réacteur à catalase/ glucose oxydase à l'échelle industrielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Vasudevan PT et Weiland R H: (Deactivation and reactor stability); *Biotechnol Bioeng*; 41: 231-236; (1992).
- 2) Tarhan L: (Enzymatic properties of immobilized catalase on protein coated supports); *Biomed Biochim Acta*; 49, 307-316; (1990).
- 3) Tarhan L: (Use of immobilizes catalase to remove H₂O₂ used in the sterilisation of milk); *Process Biochemistry*, *Process Biochemistry*vol. 30: 623-628; (1995).
- 4) Costa SA, Tzanov Paar A, Gudelj M, Gûbitz GM et Cavaco-Paulo A: (Immobilization of catalase from *Bacillus SF* on alumina or the treatment of textile bleaching effluents); *Enzyme and Microbial Technology*; 28: 815-819; (2001).
- 5) Chen JJ: (Research and application of biotechnology in textile industries in China); *Enzyme microb technol*; 40; 7: 1651-1655; (2007).
- 6) Stöhr R et Petry R: (Enzymes biocatalysts in textile finishing); *Melliand Textilberichte*, 11: 100-103; (1995).
- 7) Torres R, Pessela BCC, Fuentes M, Mateo C, Munilla R, Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Supports coated with PEI as a new tool in chromatography); *Enzyme and Microbial Technology*; 39: 711-716; (2006).
- 8) Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V, Santana C, Soler G, Bastida A et Guisán JM: (Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method); *Enzyme Microb Technol*; vol 15: 546-550; (1993).
- 9) Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Enzyme and protein engineering via immobilization and post immobilization techniques); *Recent Res Devel Biotech Bioeng*; 1: 299-309; (1998).
- 10) Guisán JM: (Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes); *Enzyme and Microbial Technology*; 10: 375-382; (1988).

- 11) Mateo C, Abian O, Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Reversible enzyme immobilization via very strong and non-distorting ionic adsorption on support-polyethyleneimine composites); *Biotechnol Bioeng*; 68: 98-105; (2000).

- 12) Fernández-Lafuente R, Rosell C M, Rodriguez V et Guisan JM: (Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents); *Enzyme Microb Technol*; 17: 517-523; (1995).

- 13) Guisán JM, Rodríguez V, Rosell CM, Soler G, Bastida A, Fernández-Lafuente R et Garcia Junceda E: (Stabilization of immobilized enzymes by chemical modification with polyfunctional macromolecules); In: Bickerstaff G. (Ed): (Immobilization of enzymes and cells); *Methods Biotechnology*; 289-298; The Humana Press Enc, Totowa, NJ; (1997).

- 14) Hidalgo A, Betancor L, Lopez-Gallego F, Moreno R, Berenguer J, Fernández-Lafuente R, et JM Guisán: (Preparation of a versatile biocatalyst of immobilized and stabilized catalase from *Thermus thermophilus* Structural stabilization of a multimeric enzyme); *Enzyme Microb Technol*; 33:278-285;(2003).

CHAPITRE I
RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

La nature constitue une source presque inépuisable de biocatalyseurs. Les enzymes sont extraites de cellules végétales, animales ou microbiennes. Les enzymes sont des macromolécules appartenant à la classe des protéines globulaires. Certaines sont des holoprotéines constituées uniquement d'un enchaînement d'acides aminés et d'autres, des hétéro-protéines possédant une particule non protéique. Le cofacteur, nécessaire à l'activité catalytique est lié plus ou moins fortement à la protéine. Le site actif ou centre actif d'une enzyme est une région où se fixe et se transforme le substrat. Il existe des enzymes multi-centres qui sont des oligomères, possédant autant de centres actifs que de sous-unités. La caractéristique commune aux enzymes est la présence de cavité dans la structure. Les réactions catalytiques sont engagées et localisées dans cette cavité.

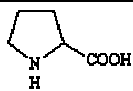
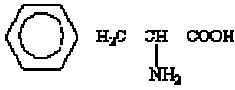
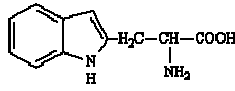
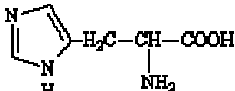
I.1. STRUCTURE D'UNE ENZYME

Les enzymes sont des protéines de structure très ordonnée. Ce sont des macromolécules formées d'un grand enchaînement d'acides aminés, liés entre eux par des liaisons peptidiques, résultant de la condensation entre un groupement amino et un groupement carboxyle. Parmi, les structures que peut posséder une protéine, on peut citer :

- structure en feuillets plissés
- structure hélicoïdale
- structure globulaire

La stabilité de la conformation d'une protéine native est assurée par un grand nombre et une grande variété d'interactions de faible énergie entre les différents groupes. Les structures des acides aminés usuels sont regroupées dans le tableau I.

Tableau I : Structures des acides aminés

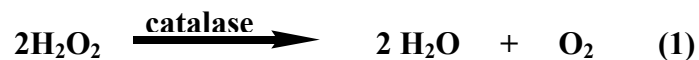
Nom	Formule	Symbole
glycine ou glycolle	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Gly
Alanine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Ala
Valine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{HC}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Val
Leucine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{HC} \quad \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH} \quad \text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Leu
Isoleucine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{HC}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Ile
Sérine	$\begin{array}{c} \text{HOH}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Ser
Thréonine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{HC} \quad \text{CH} \quad \text{COOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Thr
Méthionine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{H}_2\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Met
Cystéine	$\begin{array}{c} \text{HS}-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	CySH
Proline		Pro
Phénylalanine		Phe
Tryptophane		Try
acide Aspartique	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Asp
acide Glutamique	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{H}_2\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Glu
Lysine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-(\text{H}_2\text{C})_4-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Lys
Arginine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}-(\text{H}_2\text{C})_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Arg
Histidine		His
Asparagine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Asn
Glutamine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Gln

I.2. ENZYME CATALASE

a) Structure et rôle de la catalase

Les catalases sont parmi les premières enzymes à être étudiées [1-3]. Les catalases d'origine fongique et animale sont différentes, les premières présentent une stabilité opérationnelle supérieure à celle des catalases d'origine animale [4]. La catalase *Aspergillus niger* est la seule catalase fongique, actuellement, disponible sur le marché. Elle est beaucoup plus stable vis-à-vis de la température, des pH extrêmes et à la protéolyse que la catalase bovine [5].

La catalase *Aspergillus niger* est différente des autres catalases sous différents aspects [5, 3], en particulier, le poids moléculaire, compris entre 323 000 et 385 000Da, est considérablement plus élevé que celui de la majorité des catalases [3, 6, 7]. Le poids moléculaire de la catalase d'origine bovine est de 250 000Da. La présence de carbohydrates dans la catalase *Aspergillus niger*, lui confère une certaine stabilité thermique (thermostabilité), cependant, elle possède une activité relativement faible comparée aux autres catalases [4- 6]. La catalase *Aspergillus niger* et la catalase foie bovin ayant respectivement un poids moléculaire de 365 et 240 kDa, sont constituées de quatre sous-unités. La catalase permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène selon la réaction 1.



b) Application de la catalase

La catalase est utilisée dans divers domaines de l'industrie, parmi eux, on peut citer:

- **Industrie alimentaire**

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) utilisé pour éviter une contamination microbienne des produits alimentaires est toxique lorsqu'il est en excès, sa transformation en oxygène et eau par la catalase présente un grand intérêt pour les centres de pasteurisation du lait dans les régions chaudes et tropicales [7-10].

- **Industrie textile**

La catalase est la plus appropriée pour décomposer H₂O₂, après décoloration des textiles [11], opération nécessaire pour faciliter l'étape de la teinture du textile [12, 13].

- **Industrie pharmaceutique**

La catalase immobilisée trouve son application dans l'industrie pharmaceutique et en chirurgie dentaire [14].

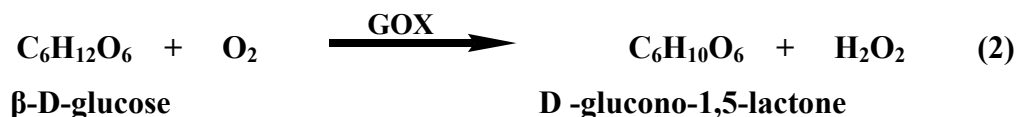
- **Industrie analytique**

L'électrode à catalase permet de déterminer la quantité de H₂O₂ contenue dans l'eau de pluie [15, 16]. Des électrodes à catalase, l'une pouvant analyser H₂O₂ en milieu organique, et l'autre capable de mesurer la teneur en hydro peroxydes durant le procédé de rancissement de l'huile d'olive extra vierge ont été développées [17, 18].

I.3. ENZYME GLUCOSE OXYDASE

a) Structure et rôle de la glucose oxydase

Le glucose oxydase (GOX) (EC 1.1.3.4) est une enzyme dimérique qui catalyse l'oxydation du β-D-glucose en gluconolactone. Ce dernier produit spontanément de l'acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène [19] selon la réaction (2):



b) Application de la glucose oxydase

- **Industrie alimentaire**

La glucose oxydase est ajoutée dans les produits alimentaires contenant du glucose, la consommation de l'oxygène évite la contamination des produits alimentaires.

- **Industrie pharmaceutique**

La glucose oxydase, enzyme commercialisée sous forme de kits, est utilisée pour le contrôle de la glycémie chez les diabétiques [20]. L'acide gluconique, qui résulte de l'oxydation du glucose, est utilisé dans le cas du traitement des carences en calcium et en fer [21]. La glucose oxydase est également utilisée dans les biocapteurs pour la détermination de la concentration en glucose [20- 23].

- **Matériaux de construction**

L'acide gluconique est utilisé dans les matériaux de construction, comme additif dans le ciment pour augmenter sa résistance et sa stabilité sous des conditions climatiques extrêmes [24].

I.4. SYSTEME GLUCOSE OXYDASE/ CATALASE

a) Structure et rôle

Le système glucose oxydase/ catalase a la capacité d'intervenir comme anti-oxydant et comme anti-bactérien. En effet, H₂O₂ est utilisé pour stériliser les produits alimentaires et l'excès est éliminé par la catalase. L'oxygène provenant de la décomposition de H₂O₂ est éliminé à son tour par la glucose oxydase, pour éviter l'oxydation.

b) Application du système glucose oxydase/ catalase

- **Industrie alimentaire**

Le système glucose oxydase/ catalase est utilisé pour le traitement des produits à base d'œufs [25, 26], les jus de fruits, le poisson, la mayonnaise et la salade de crevettes [27, 28], mais son utilisation industrielle reste limitée. Dans les boissons alcoolisées, le système glucose oxydase/ catalase réduit la croissance de micro-organismes qui abîment la production [29].

II. IMMOBILISATION DES ENZYMES

II.1. PROBLEMES DE LA STABILITE DES BIOCATALYSEURS

Les enzymes sont extrêmement versatiles et capables de catalyser une multitude de réactions chimiques, leur utilisation pratique est restreinte à cause de leur nature labile [30-33]. La faible stabilité des biocatalyseurs est le facteur limitant de n'importe quel processus enzymatique pour lesquels la stabilité constitue le critère le plus important dans la technologie enzymatique.

Les enzymes sont dénaturées selon un modèle basé sur une inactivation irréversible comprenant deux étapes qui incluent le déroulement préliminaire de la protéine suivie de l'étape irréversible [34].

Les enzymes sont des biomolécules assez complexes constituées de sous-unités protéiques et contenant des cofacteurs. La dissociation des sous-unités est souvent la première étape de leur inactivation, après cela le changement de conformation de la structure tridimensionnelle des monomères provoque l'inactivation irréversible [35-37].

La dissociation des sous-unités peut être accélérée dans certaines conditions expérimentales telles que le pH, la température, la force ionique, et les dilutions élevées [38].

Depuis la moitié du siècle dernier, de nombreux efforts ont été voués au développement d'enzymes immobilisées pour différentes applications. Les enzymes

immobilisées, comme catalyseurs, présentent beaucoup d'avantages tels que l'efficacité, la préservation de l'environnement, la spécificité, le coût...

II.2. IMMOBILISATION DES ENZYMES

Les enzymes étant solubles dans l'eau, leur purification après usage ne peut, généralement, être envisagée favorablement, particulièrement à l'échelle industrielle. Le prix élevé ou la rareté des enzymes a poussé les chercheurs à mettre au point des méthodes permettant leur réutilisation bien que la stabilisation des enzymes multimeriques demeure un travail fastidieux.

Bien que les enzymes présentent des avantages, il existe des problèmes pratiques dans leur utilisation. Ceci est dû au prix de revient de l'isolation et de la purification des enzymes, et l'instabilité de leur structure suite à leur isolement de leur environnement naturel. De plus, les enzymes sont très sensibles aux conditions d'utilisations (température, pH, substrat). Beaucoup de méthodes d'immobilisation ont été réalisées pour éviter ces inconvénients [39-45]. Les enzymes sont immobilisées soit par adsorption soit par formation de liaisons covalentes.

Les enzymes immobilisées sont plus résistantes aux changements du milieu environnemental. Les avantages de l'immobilisation sont:

- la récupération du produit et de l'enzyme
- plusieurs utilisations de l'enzyme
- procédés en continu de l'action enzymatique,
- une grande variété de conceptions de bio-réacteurs.

II.3. PRINCIPALES METHODES D'IMMOBILISATION

L'utilisation d'enzymes libres étant très onéreuse a donc conduit les chercheurs à trouver une solution. Les préparations d'enzymes immobilisées montrent souvent une très grande stabilité et réduisent les effets d'inhibition observés dans le cas d'enzymes solubles, néanmoins, les valeurs des pH optimaux peuvent, occasionnellement, être modifiés légèrement. Un grand nombre de techniques d'immobilisation d'enzymes ont été développées et une grande variété de supports a été utilisée, ils peuvent être naturels ou synthétiques.

La surface des supports sur laquelle l'enzyme est immobilisée joue un rôle important pour le maintien de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, qui influence la stabilité thermique et l'activité de l'enzyme immobilisée.

Il existe différentes techniques d'immobilisation qui sont: l'inclusion, la microencapsulation, l'adsorption, la liaison covalente et la réticulation. Nous décrivons les deux méthodes d'immobilisation utilisées pour la catalase et la glucose oxydase, qui sont l'adsorption et la liaison covalente.

II.3. 1. Immobilisation par adsorption

L'adsorption des enzymes est une méthode physique qui fait appel à des interactions ioniques entre le support et l'enzyme. C'est une méthode relativement simple, économique et rapide. Comparée à l'immobilisation par liaison covalente, l'immobilisation par liaison ionique permet la désorption de l'enzyme du support après sa désactivation ou quand le biocatalyseur n'est plus rentable et la réutilisation du support pour l'adsorption d'enzymes fraîches [46-48].

a) Agarose polyéthylèneimine

Différentes techniques ont été proposées pour l'immobilisation d'enzymes d'une manière réversible, forte et sans destruction de la structure tridimensionnelle de la protéine. Ces systèmes sont basés sur l'adsorption des protéines sur des supports poreux rigides tels que l'agarose recouverts de polymères ioniques flexibles contenant une densité élevée de groupes chargés pour l'échange ionique [49-52]. La force de la liaison sur ce type de support est plus élevée que celle des supports conventionnels d'échange d'ions. Effectivement, la désorption de l'enzyme vers le milieu réactionnel est évitée avec ce support contrairement aux supports classiques où le risque de désorption est très grand.

Le support polymérique est récupéré en soumettant le biocatalyseur à des conditions drastiques. L'immobilisation des protéines sur l'agarose polyéthylèneimine (agarose PEI) présente d'autres avantages tels que l'absence de dissociation des sous-unités des enzymes multimériques [50, 53, 54], et régénération des micro-environnements hydrophiles qui stabilisent la protéine dans les solvants organiques [55-57].

Le polyéthylèneimine (PEI), polymère aliphatique flexible, contient une quantité élevée de groupes chargés positivement [58] qui protège la structure tertiaire des protéines [59, 60]. Le PEI réagit par liaison covalente avec les supports de type agarose [50], donnant lieu à des interactions ioniques qui permettent d'immobiliser et de stabiliser différentes enzymes [50-54].

La structure du PEI est représentée par le schéma 1.

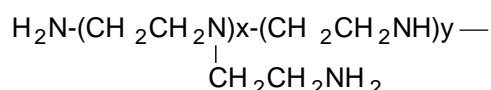


Schéma. 1 : Structure du polyéthylèneimine

Avec une structure tridimensionnelle, le PEI permet à la protéine, avec sa grande surface, d'être en contact avec le polymère ionique favorisant ainsi une interaction plus intense avec les groupes ionisables de l'enzyme. De plus, sa flexibilité lui permet de s'adapter à la structure de la protéine en lui évitant une déformation [49, 50, 56, 61, 62].

Cette caractéristique a été utilisée pour immobiliser différentes structures d'invertase sur le support sepabeads- polyéthylèneimine [63] ainsi que l'enzyme β -galactosidase [61]. En effet, l'immobilisation réversible des protéines ou des enzymes sur des supports recouverts de PEI est efficace pour la réalisation d'une adsorption intense et sans déformation de la structure de la protéine [50, 60, 61, 64]. Ainsi, une importante stabilisation a été obtenue pour les enzymes multimériques [49, 61, 65, 66-68]. Ce type de support est capable d'adsorber certaines protéines qui ne peuvent pas être adsorbées sur des supports usuels [50, 52, 71].

Les supports classiques sont habituellement activés avec une couche dense de groupes chargés positivement ou négativement. Ces matrices présentent une superficie d'interaction plane (adsorption bidimensionnelle) où seulement 15 à 20 % de la surface de la protéine sont engagées dans l'adsorption [61, 69, 70].

b) agarose mono-amino-N-éthyl (agarose MANAE)

Parmi les modes d'immobilisation réversibles habituelles, l'utilisation de supports d'échange d'ions tels que l'agarose MANAE ou l'agarose recouvert de PEI [50, 72, 78, 79] permettent à l'enzyme de garder toute son activité. L'agarose MANAE est obtenu par action de l'éthylène diamine sur le gel agarose aldéhyde (agarose glyoxyl), suivie d'une réduction avec le borohydrure de sodium (Schéma 2) [72, 73].

Cette méthode joue un rôle important dans le développement des procédés de biotransformation dans l'industrie. Ainsi les enzymes solubles seront remplacées par celles qui sont immobilisées présentant une stabilité plus élevée [74-76]. Néanmoins, il est difficile de réunir les conditions pour que l'enzyme reste fortement liée et en même temps totalement active.

Une charge enzymatique élevée peut conduire à un dépôt de produits sur les charges ioniques du support provoquant des problèmes de diffusion interne. Les propriétés cinétiques des enzymes tels que le pH optimal de l'activité ou de la stabilité peuvent être modifiées [77].

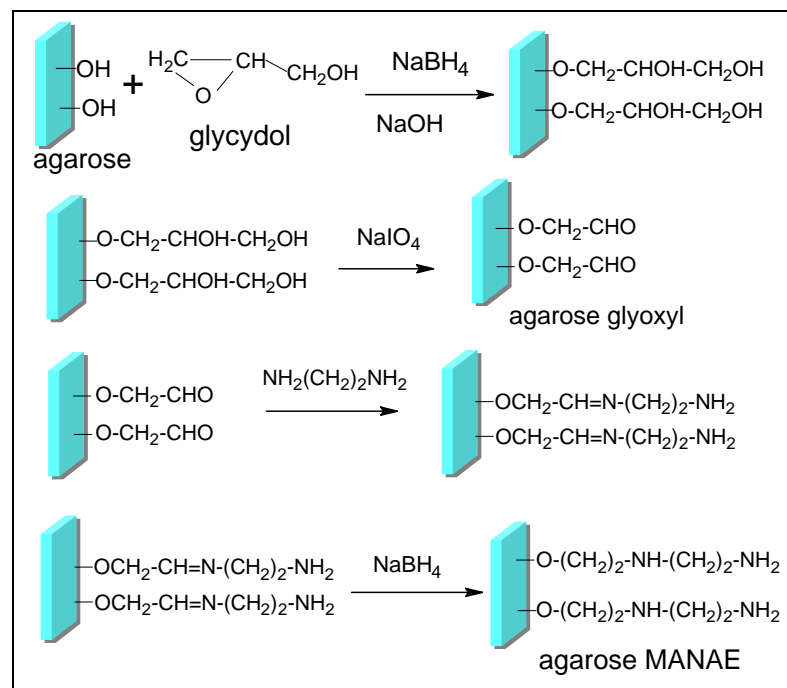


Schéma 2 : Préparation de l'agarose MANAE

II.3.2. Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente correspond à une réaction chimique entre les groupements fonctionnels libres d'une enzyme et les groupements situés aux extrémités des chaînes latérales d'un support. Le phénomène de désorption est évité même en présence des substrats, de solutions de forces ioniques élevées. La vitesse de désactivation spontanée de l'enzyme est réduite. Ce mode de liaison améliore la stabilité thermique de l'enzyme suite aux fortes interactions entre l'enzyme et le support rendant la structure tertiaire de la protéine rigide.

La méthode la plus utilisée est basée sur l'activation des supports aminés par action d'un réactif bifonctionnel tel que le glutaraldéhyde. La formation de la base de Schiff entre le groupe aldéhyde et le groupe ϵ -amine du résidu de la lysine est réalisée sous des conditions douces de température, pH, nécessaire à l'activité catalytique optimale et à la stabilité enzymatique, suivie d'une réduction par le borohydrure de sodium de la liaison imine et des groupes aldéhydes restants pour éviter l'hydrolyse de l'enzyme.

➤ **Importance de la stabilisation des enzymes multimériques**

La dissociation des sous-unités, généralement la cause de l'inactivation des enzymes, est plus marquée lorsque les enzymes sont utilisées dans des milieux très dilués ou dans des réacteurs industriels en continu. L'immobilisation multipoint offre une possibilité de fixer le plus grand nombre possible de sous-unités, stabilisant ainsi la structure quaternaire de l'enzyme multimerique. Les techniques qui utilisent les interactions covalentes multipoint entre l'enzyme et le support confèrent une stabilité à l'enzyme [80-82].

L'immobilisation par liaison covalente multipoint acquiert une attention remarquable dans le cas des enzymes multimériques [82]. Les molécules d'enzyme liées par liaison multipoint à un support sont plus rigides préservant ainsi les distances relatives entre les groupes engagés dans la liaison avec le support réduisant les mouvements moléculaires qui conduisent à des changements de conformation inactifs [49, 83, 84].

a) Support agarose glyoxyl

L'interaction multiple est un procédé nécessitant un système adéquat de l'immobilisation/ stabilisation de l'enzyme et qui doit éviter la déformations dans la structure de l'enzyme. L'agarose glyoxyl utilisé comme support répond à ces exigences. L'agarose aldéhyde (agarose glyoxyl) est préparé à partir du gel agarose selon la méthode décrite par Guisán (Schéma 3) [73].

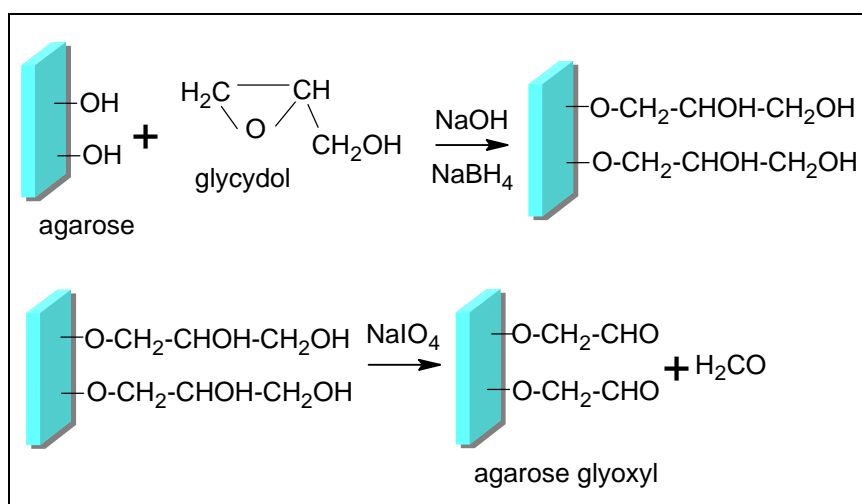


Schéma 3 : Préparation de l'agarose glyoxyl

Toutes les réactions d'activation avec le glycidol et l'oxydation avec le periodate de sodium sont effectuées à 25 °C sous douce agitation, pour obtenir des gels d'agarose intacts et contenant des monocouches de groupes aldéhydes identiques [73].

Les groupes amino ϵ -NH₂ et le -NH₂ terminal des résidus de la lysine (Tableau I) de l'enzyme interviennent dans la liaison multipoint avec les supports activés. La plupart des protéines présentent une grande quantité de résidus de la lysine qui ne sont pas engagés dans le site actif habituellement. De plus, les groupes amines sont polaires et sont exposés à la surface de la protéine.

Il se forme des liaisons de type base de Schiff entre les ϵ -NH₂ des lysines et des groupes aldéhydes du support. Les lysines sont en quantité abondante sur la surface de la protéine, et sont exposés au milieu. Une fois protonées, ils sont très réactifs comme nucléophiles vis-à-vis des atomes chargés positivement (+ δ) se trouvant à la surface du support. Donc, il est nécessaire de réaliser la réaction à un pH supérieur au pKa des groupes ϵ -NH₂ (pH 10.05). La première interaction entre l'enzyme et le support se produit, au moins, par l'intermédiaire de deux points pour que l'enzyme puisse s'auto-orienter vers la/les zone/s la/les plus riche/s en groupes amines réactifs [85].

Cette caractéristique du support est un avantage puisque l'immobilisation des protéines ou des enzymes s'effectue directement dans la zone de densité réactive élevée de groupes (groupes amines primaires) sur la surface de la protéine, enzyme par une immobilisation covalente multipoint qui se produit facilement.

C'est pour cette raison, que ce support a été utilisé avec succès, et dans beaucoup de cas pour la stabilisation des enzymes et des protéines par le biais de liaisons covalentes

multipoint avec un faible impact sur l'activité de l'enzyme immobilisée. Ainsi, beaucoup d'enzymes ont été fortement stabilisées par immobilisation sur ce support [80, 86-91], et l'activité résiduelle après immobilisation est comprise entre 60 et 100%, tandis que la stabilisation augmente en général dans le temps de demi-vie dans la majorité des cas.

Dans un second temps, les bases de Schiff sont réduites en liaisons amines. Cette étape est importante pour éviter des réactions indésirables ou non contrôlées qui déstabiliseront la protéine, la rendant ainsi inactive, suite à l'inaccessibilité des groupes réactifs [92].

Il faut noter qu'il n'y a que 20% approximativement de la surface de l'enzyme qui participe dans la réaction enzyme/ support. Une réelle stabilisation de la protéine peut être réalisée, uniquement si beaucoup de liaisons sont établies entre la surface de la protéine et le support [93, 94].

L'immobilisation rapide des protéines sur les supports glyoxyl se produit de préférence aux pH alcalins. Seules, les protéines ayant plusieurs groupes amines terminaux se trouvant dans le même plan, seront immobilisées même à pH neutre. Les enzymes multimeriques, portant de nombreux groupements amines, peuvent être immobilisées à pH 7. [95, 96]. La stabilité des groupes glyoxyls favorise la formation de nombreuses interactions enzymes/ support. Ce type de liaison augmente la stabilité et le temps de conservation. [97] (Schéma 4).

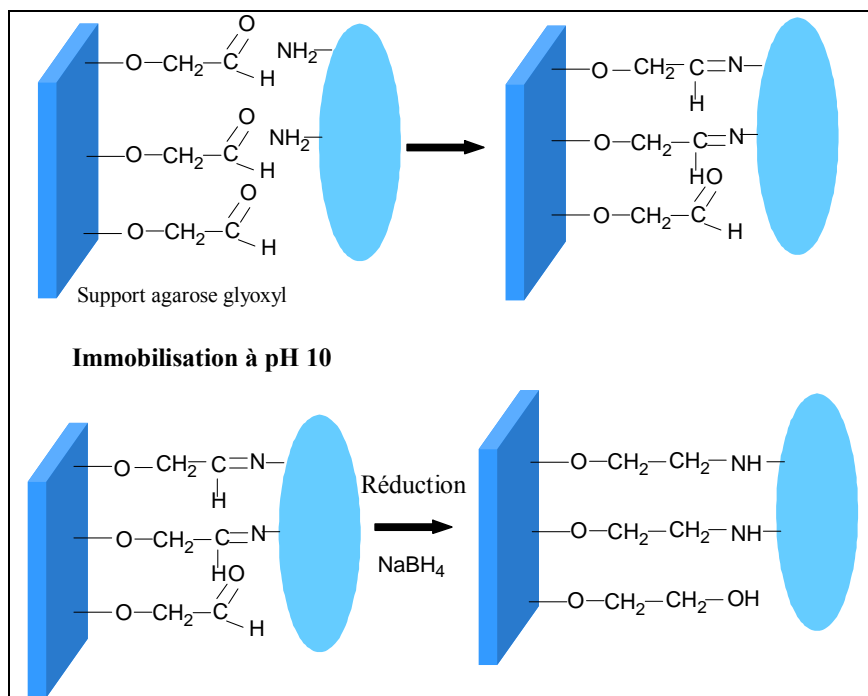


Schéma 4: Immobilisation d'une enzyme sur l'agarose glyoxyl

b) Support agarose CNBr

Les groupes les plus réactifs utilisés pour l'immobilisation des protéines sont le glutaraldéhyde, le bromure de cyanogène, ils produisent des liaisons enzyme/ support très stables dans des conditions d'immobilisation douces telle que la valeur du pH neutre [98]. Le Sepharose activé par le bromure de cyanogène est largement utilisé pour l'immobilisation des enzymes multimériques [99]. Cette méthode, développée par Axen [100], s'applique aux supports portant des groupes α -glycoll tels : les supports de nature polysique (dextrane, agarose, cellulose, amidon...), disponibles dans le commerce.

L'activation du support par le bromure de cyanogène conduit à l'obtention d'un iminocarbonate, qui réagit avec les groupes aminés des protéines pour donner une iso-urée N-substitué (Schéma 5).

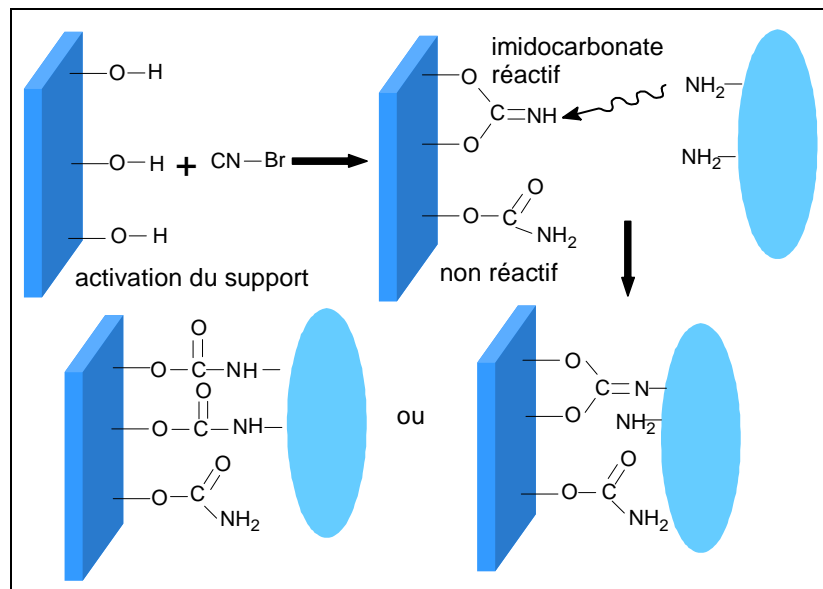


Schéma 5: Immobilisation sur le support activé par le bromure de cyanogène

L'immobilisation des protéines est effectuée à des valeurs de pH neutre en présence de bases de Schiff réduisant ou stabilisant tel que le bromure de cyanogène [101-104], il est possible d'obtenir une bonne immobilisation même à pH neutre. Le tableau II, résume les différentes méthodes d'immobilisation utilisées et les groupements intervenant dans les liaisons support/ enzyme des dérivés enzymatiques.

Tableau II: Groupements de l'enzyme intervenant dans la liaison support/ enzyme

Support	Groupes réactifs du support	Groupes de l'enzyme intervenants dans la liaison	Type de liaison
Agarose MANAE	Amine primaire	Groupes superficiels chargés négativement	Adsorption ionique
Agarose PEI	Amine primaire, secondaire et tertiaire	Groupes superficiels chargés négativement	Adsorption ionique
Agarose MANAE/ Glut	Aldéhyde cyclique	Amine terminale	Covalente
Agarose glyoxyl	Aldéhyde alyphatique	Amine de la lysine	Covalente
Agarose CNBr	Imidocarbonate	Amine de la lysine	Covalente

III. RETICULATION DES ENZYMES IMMOBILISEES

III.1.GLUTARALDEHYDE

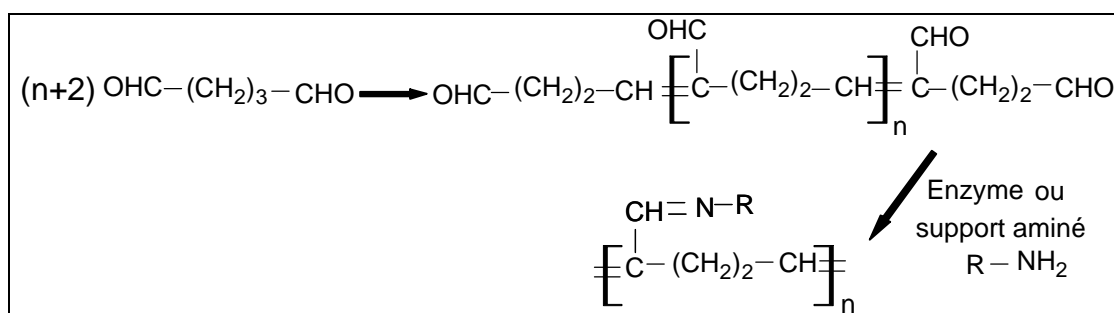
La nature cationique de la surface du support et l'utilisation de faibles forces ioniques favorisent l'immobilisation ionique rapide des protéines. Le glutaraldéhyde est utilisé soit pour activer le support aminé ensuite immobiliser l'enzyme sur le support pré-activé, soit par réticulation de l'enzyme après son immobilisation.

La réticulation avec le glutaraldéhyde est une méthode d'une grande simplicité et d'une grande efficacité et qui permet d'améliorer la stabilité des sous-unités de l'enzyme par immobilisation par multipoint [105, 106]. De plus, le glutaraldéhyde a été utilisé pour introduire une réaction de réticulation dans les protéines [88, 107-109].

La réticulation des enzymes se base, particulièrement, sur l'établissement de liaisons entre le glutaraldéhyde et les protéines adsorbées par le biais des groupes amines primaires [10, 112]. Les deux protocoles suivent le même mécanisme : une première adsorption rapide des protéines, qui sera suivie par l'établissement de la liaison covalente [10, 112- 114].

La réticulation de la glucose oxydase immobilisée sur l'agarose MANAE a été rapportée dans les travaux de López-Gallego qui montrent que les dérivés obtenus sont plus stables, comparés aux dérivés obtenus avec le glutaraldéhyde [110]. Les meilleurs résultats ont été obtenus par adsorption de l'enzyme sur l'agarose MANAE suivie d'une réticulation avec du glutaraldéhyde [88, 110]. Betancor [111] a montré que la glucose oxydase obtenue avec un support pré-activé avec le glutaraldéhyde est moins stable que les enzymes réticulées après leur adsorption.

Des travaux ont porté sur la structure du glutaraldéhyde lors de la réaction d'activation [115, 116]. La formation d'une chaîne cyclique paraît probable avec des liaisons amino-glutaraldéhyde [115]. Le phénomène de polymérisation est plus marqué pour des pH élevés, avec précipitation des polymères de glutaraldéhyde à pH >10,5. Les fonctions aldéhydes en position α et β -insaturées du polymère glutaraldéhyde réagissent avec les groupes aminés du support ou de l'enzyme pour produire une liaison imine, qui est stabilisée par résonance avec la liaison éthylénique (Schéma 6) [115]. La meilleure stabilité de l'enzyme immobilisée est obtenue pour une réticulation à 0,5 % en volume en glutaraldéhyde à pH 7 [117].



Shéma 6: Mécanisme d'action du glutaraldéhyde sur un support aminé ou une enzyme

En présence de fortes forces ioniques, la réticulation s'effectue, par formation d'une liaison entre une amine terminale, exposée à la surface de la protéine et la fonction du support. Par contre, pour de faibles forces ioniques, la première enzyme est adsorbée sur les groupes amines, la liaison covalente se produit ensuite entre l'enzyme et le support [115, 120, 122].

La réticulation se fait par action du glutaraldéhyde avec les groupes amines du support et de l'enzyme à des pH compris entre 7 et 8.5 et à 25 °C [88, 115, 119]. Le glutaraldéhyde peut, également, être utilisé pour activer des supports aminés. Dans le cas d'un support aminé, chaque molécule de glutaraldéhyde peut réagir avec un ou deux groupes amines; par exemple pour les supports époxy ou aldéhyde activés avec l'éthylènediamine [72, 88], cela leur confère partiellement des propriétés d'échange ionique.

III.2. DEXTRANE-ALDEHYDE

La réticulation avec le glutaraldéhyde ou le dextrane aldéhyde améliore les propriétés stabilité/ activité des enzymes [98, 122]. Le dextrane-aldéhyde de poids moléculaire moyen (20 000 Da) avec différents pourcentages de groupes aldéydes (20 et 100%) a été utilisé pour stabiliser la catalase *Thermus thermophilus*. Le problème de la dissociation des sous-unités

de la catalase est évité par la réticulation avec le dextrane-aldéhyde [123, 124] en utilisant l'agarose glyoxyl ou l'agarose CNBr comme support [123-125].

La majorité des enzymes dimériques peut être stabilisée par liaison covalente des sous-unités sur le support, mais la stabilisation d'enzymes complexes est difficile à réaliser. Il est impossible d'avoir toutes les sous-unités de l'enzyme liées à la surface du support. Pour contourner cet inconvénient, une réticulation avec des réactifs polyfonctionnels s'avère nécessaire [124]. Fernández-Lafuente a immobilisé les enzymes : D-amino acid oxydases, glutaryl acylase, et alpha amino ester hydrolase, en milieu tampon phosphate de sodium suivie d'une réticulation avec le dextrane-aldéhyde [124].

La stabilisation d'enzymes solubles telles que la glucose oxydase et la trypsine, avec des polymères polyfonctionnels a été étudiée également par certains auteurs [127, 128]. Cette stabilité résulte de la réticulation avec le dextrane-aldéhyde par formation d'une couche hydrophile formant un écran contre les interfaces hydrophobes avec une modification minimale de la surface de l'enzyme. Le système enzymes/ dextrane-aldéhyde reste totalement actif en présence d'interfaces air/ liquide pendant quelques h. Ce traitement paraît être aussi effectif pour améliorer la résistance contre les solvants organiques [124]. Ces dérivés réticulés avec le dextrane-aldéhyde ne contaminent pas le produit final.

➤ **Préparation du dextrane-aldéhyde**

Le dextrane est un polymère formé de monomères de glucose liés entre eux par des liaisons α 1-6 avec des ramifications sporadiques dans les positions 3 et 4. Il est facilement oxydable par le periodate de sodium qui conduit à la formation de polyaldéhyde (Schéma 7), avec deux groupes aldéhydes par molécule de glucose. Le degré de ramification dans le dextrane est de 5 %. Le poids moléculaire du dextrane est compris entre 10 000 et 20 000 Da. Le dextrane est un polymère assez flexible, biocompatible et son utilisation clinique au cours de ces 50 dernières années, prouve sa non toxicité. C'est sous sa forme aldéhyde que le dextrane peut réagir avec les groupes amines exposés à la surface de la protéine conférant à l'enzyme un milieu hydrophile qui la protège des solvants organiques [127], en réduisant les interactions déstabilisantes sur le support où elles sont immobilisées [128] et empêchant ainsi la dissociation des sous-unités protéiques [124].

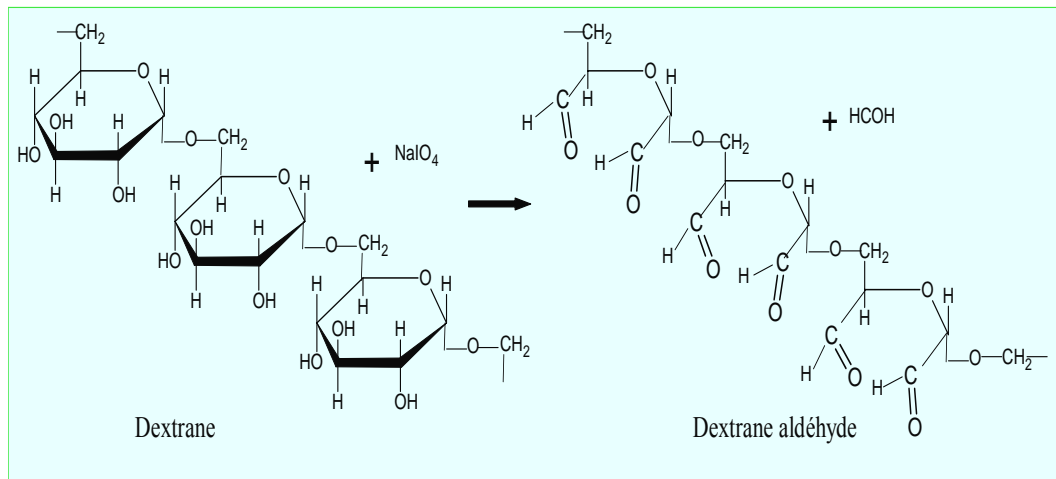


Schéma 7: Préparation du dextrane-aldéhyde par action du periodate de sodium sur le dextrane

Finalement, il n'existe pas de méthode universelle d'immobilisation des enzymes et il est pratiquement impossible de prévoir quel est le support le mieux adapté à la fixation d'une enzyme particulière. L'immobilisation d'une enzyme entraîne généralement une perte d'activité plus ou moins importante qui dépend de la méthode utilisée. L'idéal dans l'immobilisation des enzymes sur un support est combinaison des conditions telles que :

- le coût
- la non toxicité
- l'activité maximale
- la rétention de l'activité durant une longue période
- la stabilité enzymatique et la stabilité thermique

De nombreuses méthodes d'immobilisation ont été développées qui sont des combinaisons de celles citées mais chacune d'elles possède ses caractéristiques qui font son originalité. En conclusion, l'immobilisation des enzymes reste un sujet d'actualité et particulièrement plein d'attraits.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Zamocky M et Koller F: (Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis); *Progress in Biophysics & Molecular Biology*; 74: 19-66; (1999).
- 2) Switala J et Loewen PC: (Diversity of properties among catalases); *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 401: 145- 154; (2002).
- 3) Mosavi-Movahedi A.A, Wilkinson A. E, et Jones M. N: (Characterization of *Aspergillus niger* catalase); *Int. J. Biol. Macromol*, 9: 327-332 (1987).
- 4) Kikuchi-Torii K, Hayashi S, Nakamoto H et Nakamura SJ: (Complete nucleotide sequence of DNA and deduced amino acid sequence rat liver catalase); *Biochemistry*; 92: 1449-1456; (1982).
- 5) Wasserman B P, et Hultin HO: (Effect of deglycosylation on the stability of *Aspergillus niger*); *Arch Biochem Biophys*; 212: 385-392, (1981).
- 6) Gruft H, Ruck R et Traynor J: (Properties of a unique catalase isolated from *Aspergillus niger*); *Canad J Biochem* 56: 916- 919; (1978).
- 7) Tarhan. I., Some kinetic parameters and inactivation of catalase immobilized on modified polyvinylalcohol. *App. Biochem. Biotechnol*; 31: 109-117; (1991).
- 8) Vasudevan. PT et Weiland R H: (Deactivation of catalase by hydrogen peroxide); *Biotechnol. Bioeng*; 36: 783-789; (1990).
- 9) Tarhan L: (Use of immobilized catalase to remove H₂O₂ used in the sterilisation of milk); *Process Biochemistry*; Vol. 30; N° 7: 623-628; (1995).
- 10) D'Souza SF et Kubal BS: (A cloth strip bioreactor with immobilized glucoamylase); *J Bioche Biophys Meth*; 51: 151-159; (2002).

- 11) Costa SA, Tzanov Paar A, Gudelj M, Gûbitz GM, Cavaco-Paulo A: (Immobilization of catalase from *Bacillus SF* on alumina or the treatment of textile bleaching effluents); *Enzyme and Microbial Technology* 28, 815-819, (2001).
- 12) Weck M: (Hydrogene peroxide-an environmentally acceptable textile bleaching agent); *Text Praxis Int*; 2: 144-147; (1991).
- 13) Stöhr R et Petry R (Enzymes biocatalysts in textile finishing); *Melliand Textilberichte*, 11, 100-103, (1995).
- 14) Dziubla TD, Karim A et Muzykantov VR: (Polymer nanocarriers protecting active enzyme cargo against proteolysis); *Journal of Controlled Release*; 102: 427-439; (2005).
- 15) Meyer AS, Pedersen LH, et Isaken A: (The effect of various food parameters on the activity and stability of catalase from *Aspergillus niger* and catalase from bovine liver); *Food Chemistry*; Vol 60; No2: 137-142; (1997).
- 16) Matos RC et Pedrotti JJ: (Flow-injection system with enzyme reactor for differential amperometric determination of hydrogen peroxide in rainwater); *Analytica Chimica Acta* 441, 73-79 (2001).
- 17) Campanella L, Martini U, Sammartino M P et Tomassetti M: (A new catalase enzyme sensor able to determine the hydrogen peroxide directly in chloroform); *Analysis*, 24: 288-294; (1996).
- 18) Campanella L, Sammartino MP, Tomassetti M et Zannella S: (Hydroperoxide determination by a catalase OPEE: Application to the study of extra virgin olive oil rancidification process); *Sensors and actuators B* 76: 158-165; (2001).
- 19) Wilson R, Turner APF: (Glucose oxidase: an ideal enzyme); *Biosens. Bioelectron*; 7: 165-185; (1992).
- 20) Kopetzki E, Lehnert K, Buckel P: (Enzymes in diagnostics: achievements and possibilities of recombinant DNA technology); (1994).

- 21) Znad H.; Markos J. et Bales V: Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: growth and non-growth conditions; *Process Biochemistry*, vol. 39, no. 11: 1341-1345; (2004).
- 22) Malhotra BD, Singhal R, Chaubey A, Sharma SK et Kumar A: (Recent trends in biosensors); *Curr Appl Phys* 5: 92–97; (2005).
- 23) Sharma S, Sehgal N et Kumar A: (Biomolecules for development of biosensors and their applications); *Curr Appl Phys*; 3: 307-316; (2003).
- 24) Hustede H, Haberstroh HJ, Schinzig E Gluconic acid. In: (Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry); VCH, Weinheim, vol A 12: 449-456; (1989)
- 25) Scott. D: (Applications of glucose oxydase); In *enzymes in Food processing*, 2nd edn, ed. G. Reed. Academic Press, London; 519-547; (1975).
- 26) Szalkucki T: (Applications of oxidoreductases); In *enzymes in Food processing* , 3rd edn, eds. T Nagodawithana & G. Reed. Academic Press, San Diego, 279-291; (1993).
- 27) Sagi I et Mannheim CH: (The effect of enzymatic oxygen removal on quality of unpasteurized and pasteurized orange juice); *J Food Proc Pres*; 14: 253-266; (1990).
- 28) Mistry B et Min DB: (Reduction of dissolved oxygen in model salad dressing by glucose oxidase-catalase dependent on pH and temperature); *J Food Sci*; 57: 196-199; (1992).
- 29) Malherbe DF, du Toit M, Cordero Otero R.R , van Rensburg P, Pretorius IS : (Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production.); *Appl Microbiol Biotechnol*; 61:502–511; (2003).
- 30) Zaks A: (Industrial biocatalysis); *Curr Opin Chem Biol*; 5: 130-136; (2001).
- 31) Illanes A: (Stability of biocatalysts); *Electro J Biotech* 2: 1-9; (1999)

- 32) Illanes A, Wilson L: (Enzyme reactor design under thermal Inactivation); *Critical Rev Biotech.* 23: 61-93; (2003).
- 33) Ó'Fágáin C: (Enzyme stabilization recent experimental progress); *Enzyme Microb Tech*; 33: 137-149; (2003).
- 34) Mozahev VV, Klibanov AM, Goldmacher VS, Berezin IV: (Operational stability of copolymerized enzymes at elevated temperatures); *Biotechnol Bioeng*; 25:1937-1945; (1993).
- 35) Poltorak OM, Chukhary ES, Torshin I Y: (Dissociative thermal inactivation, stability and activity of oligomeric enzymes); *Biochemistry, Moscow*; 63: 360-369; (1998).
- 36) Poltorak OM, Chukhray ES, Torshin IY, Atyaksheva LF, Trevom MD et Chaplin, MF: (Catalytic properties, stability and the structure of the conformational lock in the alkaline phosphatase from *Escherichia coli*); *J Mol Catal. B Enzym*; 7: 165-172; (1999).
- 37) Attwood PV et Geeves MA: (Changes in catalytic activity and association state of pyruvate carboxylase wich are dependent on enzyme concentration); *Arch. Biochem. Biophys* 401: 63-72; (2002).
- 38) Fernández-Lafuente R, HernándezJústiz O, Mateo C, Terreni, M., Fernández-Lorente G, Moreno MA, Alonso J, García-López JL, Guisan JM: (Biotransformations catalyzed by multimeric enzymes: stabilization of tetrameric ampicillin acylase permits the optimization of ampicillin synthesis under dissociation conditions); *Biomacromolecules*; 2: 95-104; (2001).
- 39) Bullock C: (Immobilised enzymes); *Sci Progress*; 78:119–34; (1995).
- 40) Woodley JM: (Immobilized biocatalysts. Solid Supports); *Catal Org Synth*; 254–271; (1992).
- 41) Chaplin MF et Bucke C: (Enzyme technology); Cambridge University Press; (1990).
- 42) Kennedy JF et Cabral JMS: (Immobilized enzymes); In: Scouten WH, editor. *Solid phase*

Biochemistry Analytical and synthetic aspects: John Wiley & Sons New York; 253–391; (1983).

43) van de Velde F, Lourenço ND, Pinheiro HM et Bakker M: (Carrageenan: a food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques); *Adv Synth Catal*; 344: 815-835; (2002).

44) Scouten WH, Luong JHT et Brown RS: (Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design); *TIBTECH*; 13: 178-185; (1995).

45) Tischer W et Wedekind F: (Immobilized enzymes: methods and applications); *Topics in Current Chemistry*; 200: 95-126; (1999).

46) Katchalski- Katzir E: (Immobilized enzymes; learning from past success and failures); *Trends Biotechnol*; 11: 471- 478; (1993).

47) Gupta M N: (Thermostabilization of proteins); *Biotechnology and Applied Biochemistry* 14: 1-11; (1991).

48) Hartmeir W: (Immobilized biocatalyst-from simple to complex systems); *Trends Biotechnol*; 3: 149-153; (1985).

49) Fuentes M, Maquiese JV, Pessela BCC, Abián O, Fernández-Lafuente R, Mateo C et Guisán JM: (New cationic exchanger support for reversible immobilization of proteins); *Biotechnology Progress*; 20: 284-288; (2004a).

50) Mateo C, Abian O, Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Reversible enzyme immobilization via very strong and non-distorting ionic adsorption on support-polyethyleneimine composites); *Biotechnol Bioeng.*; 68: 98-105; (2000).

51) Torres R, Pessela BCC, Mateo C, Ortiz C, Fuentes M, Guisán JM et Fernández-Lafuente R: (Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on sepabeads coated with polyethyleneimine); *Biotechnology Progress*; 20: 1297-1300; (2004).

- 52) Torres R, Pessela BCC, Fuentes M, Mateo C, Munilla R, Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Supports coated with PEI as a new tool in chromatography); *Enzyme and Microbial Technology*; 39: 711-716; (2006).
- 53) Arica MY et Bayramoglu G: (Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine-grafted poly (GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis); *J. Mol. Catal. B*; 38:131-138; (2006).
- 54) González P, Batista-Viera F et Brena B M: (Polyethylenimine coated agarose supports, for the reversible immobilisation of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*); *International Journal of Biotechnology*; 6: 338-345; (2004).
- 55) Fernández-Lafuente R, Rodríguez V, Mateo C, Penzol G, Hernández-Justiz O, Irazoqui G, Villarino A, Ovsejevi K, Batista F et Guisán JM: (Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques); *J. Mol. Catal. B: Enzym*; 7: 181–189; (1999 a).
- 56) Fuentes M, Maquiese JV, Pessela BCC, Abián O, Fernández-Lafuente R, Mateo C et Guisán JM: (New cationic exchanger support for reversible immobilization of proteins); *Biotechnology Progress*; 20: 284-288; (2004 b).
- 57) Hwang S, Lee KT, Park JW, Min BR, Haam SJ, Ahn IS, et Jung JK: (Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels); *Biochemical Engineering Journal*; 17, 85-90; (2004).
- 58) Bahulekar R, Ayyangar NR et Ponrathnam S: (Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts); *Enzyme and Microbial Technology*; 13: 858-868; (1991).
- 59) Andersson MM et Hatti-Kaul R: (Protein stabilising effect of polyethyleneimine); *Journal of Biotechnology*; 72: 21-31; (1999).
- 60) Bryjak J: (Storage stabilization of enzyme activity by poly(ethyleneimine); *Bioprocess Engineering*; 13: 177-181; (1995a).

- 61) Pessela BCC, Fernández-Lafuente R, Fuentes M, Vian A, Garcia JL, Carrascosa AV, Mateo C et Guisan JM: (Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads); *Enzyme Microb Technol*; 32: 369-374; (2003).
- 62) Guisán JM, Penzol G, Armisen P, Bastida A, Blanco RM, Fernández-Lafuente R et Garcia-Junceda E: (Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrate : reducing of steric problems). In: *biotechnology Series 1*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 261-275; (1997).
- 63) Torres R, Mateo C, Fuentes M, Palomo JM, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Tam A et Daminati M: (Reversible immobilization of invertase on Sepabeads-polyethyleneimine: Stabilization of a multimeric enzyme); *Biotechnol Prog*; 1221-1226; (2002).
- 64) Bryjak J et Norworta A: (Kinetik behavior of penicilin acylase stabilized by poly (ethyleneimine); *Bioprocess Eng*; 13:183-187; (1995).
- 65) Blanco RM, Calvete JJ, Guisán JM: (Immobilization-stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multi-point covalent attachment); *Enzyme Microb Technol*; 11: 353–359; (1989).
- 66) Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Caanan-Haden L, Rodes L et Guisán J M: (Facile synthesis of artificial enzyme nano-enviroments via solid phase chemistry of immobilized derivatives. Dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents); *Enzyme and Microbial Technology*; 24: 96-103; (1999).
- 67) Blanco RM, Guisan JM.; (Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose–aldehyde gels; Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives); *Enzyme Microb Technol*; 11:360-366; (1989).
- 68) Torres R, Pessela BCC, Mateo C, Ortiz C, Fuentes M, Guisán JM et Fernández-Lafuente R: (Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on sepabeads coated with polyethyleneimine); *Biotechnology Progress*; 20: 1297-1300; (2004).

- 69) Baumeister A, Vogelmann S et Fisher L: (Concentration and purification of protic acid directly from whey with an expanded bed adsorption system); *Journal of Chromatography A*; 1006: 261-265; (2003).
- 70) Iberer G, Schwinn H, Josic D, Jungbauer A et Buchacher A: (Improved performance of protein separation by continuous annular chromatography in the size-exclusion mode); *Journal of Chromatography A*; 921: 15-24; (2001).
- 71) Fernández-Lafuente R, Rodríguez V, Mateo C, Fernández-Lorente G, Arminsen P, Sabuquillo P et Guisán JM: (Stabilization of enzymes (D amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and postimmobilization techniques); *J Mol. Catal B: Enzym*; 7: 173-179; (1999)
- 72) Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Rodríguez V, Santana C, Soler G, Bastida A et Guisán JM: (Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method); *Enzyme Microb Technol*; vol 15: 546-550; (1993).
- 73) Guisán JM: (Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes); *Enzyme and Microbial Technology* 10: 375-382; (1988).
- 74) Klibanov AM: (Approaches to enzyme stabilization); *Biochem Soc Trans*; 11: 19–20; (1983).
- 75) Hartmeir W: (Immobilized biocatalyst-from simple to complex systems); *Trends Biotechnol*; 3: 149-153; (1985).
- 76) van Beilen JB et Li Z: (Enzyme Technology: an overview). *Curr Opin Biotech*; 13, 338-344; (2002).
- 77) Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Enzyme and protein engineering via immobilization and post immobilization techniques); *Recent Res Devel Biotech Bioeng*; 1: 299-309; (1998).

78) Katchalski- Katzir E: (Immobilized enzymes; learning from past success and failures); Trends Biotechnol; 11: 471- 478; (1993).

79) Chibata I et Tosa T: (Industrial applications of immobilized enzymes and immobilized microbial cells); In: Wingard, Katchalski, Goldstein, editors; Applied biochemistry and bioengineering; Vol. 1. Immobilized enzyme principles. London: Academic Press; 239-260; (1976).

80) Blanco RM, Guisan JM.; (Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose–aldehyde gels; Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives); Enzyme Microb Technol;11:360-366; (1989).

81) Ichikawa S, Takano K, Kuroiwa T, Hiruta O, Sato S et Mukataka S: (Immobilization and stabilization of chitosanase by multipoint attachment to agar gel support); J Biosci Bioeng; 93:201-206; (2002).

82) Fernández-Lafuente R, Hernández-Ruiz O, Mateo C, Terreni M, Alonso J, García-López J, Moreno MA et Guisan JM: (Stabilization of a tetrameric enzyme amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans*, enables a very improved performance of ampicillin synthesis); J Mol Catal B Enzym; 11: 633-638; (2001).

83) Gianfreda L et Scarfi MR: (Enzyme stabilization, State of the art); Mol Cell Biochem; 109: 97-128; (1991).

84) Klibanov AM: (Stabilization of enzymes against thermal inactivation); Advances in Applied Microbiology 29: 1-28; (1982).

85) Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazú V, López-Gallego F, Pessela, BCC, Hidalgo A, Fernández-Lorente G, Fernández-Lafuente R. et Guisán JM: (Glyoxyl agarose: A fully inert y hydrophilic support for immobilization y high stabilization of proteins); Enzyme and Microbial Technology; 39: 274-280; (2006).

86) Betancor L, Hidalgo A, Fernández -Lorente G, Mateo C, Rodríguez V, Fuentes M, Lopez-Gallego F, Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Use of physicochemical tools to determine

the choice of optimal enzyme: stabilization of d-amino acid oxidase); *Biotechnol Prog*; 19: 784-788; (2003).

87) Guisán JM, Bastida A, Cuesta C, Fernández-Lafuente R et Rosell CM: (Immobilization–stabilization of chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde agarose gels); *Biotechnol Bioeng*; 39: 75-84; (1991).

88) Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V et Guisan JM: (Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents); *Enzyme Microb. Technol*; 17: 517-523; (1995).

89) Betancor L, Hidalgo A, Fernández-Lorente G, Mateo C, Rodríguez V, Fuentes M, et Guisan JM: (Preparation of an stable biocatalyst of bovine liver catalase using immobilization and postimmobilization techniques); *Biotechnol Prog*; 19: 763-767; (2003).

90) Guisán JM, Polo E, Agudo J, Romero MD, Alvaro G et Guerra MJ: (Immobilization–stabilization of thermolysin onto activated agarose gels); *Biocatal Biotrans*; 15: 159-173; (1997).

91) Hidalgo A, Betancor L, Lopez-Gallego F, Moreno R, Berenguer J, Fernández-Lafuente R, et Guisán JM: (Preparation of a versatile biocatalyst of immobilized and stabilized catalase from *Thermus thermophilus* Structural stabilization of a multimeric enzyme); *Enzyme Microb Technol*; 33: 278-285; (2003).

92) Mateo C, Abián O, Fernández-Lorente G, Pedroche J, Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Epoxy Sepabeads: A novel Epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment); *Biotechnology Progress*; 18: 629-634; (2002).

93) Klibanov AM: (Enzyme stabilization by immobilization); *Anal Biochem*; 93: 1-25; (1979).

94) Martinek K, Klibanov AM, Goldmacher VS et Berezin IV: (The principles of enzyme stabilization: I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary

surface of a polymer support in a multipoint fashion); *Biochimica et Biophysica Acta*; 485: 1-12; (1977).

95) Mateo C, Abián O, Bernedo M, Cuenca E, Fuentes M, Fernández-Lorente G, Palomo, JM, Grazú V, Pessela BCC et Giacomini C: (Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins); *Enzyme and Microbial Technology*; 37: 456- 462; (2005).

96) Grazu V, Betancor L, Montes T, Lopez-Gallego F, Guisán JM et Fernández-Lafuente R: (Glyoxyl agarose as a new chromatographic matrix); *Enzyme Microb Technol*; 38: 960-966; (2006).

97) Blanco RM, Calvete JJ, Guisán JM: (Immobilization-stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multi-point covalent attachment); *Enzyme Microb Technol*; 11: 353-359; (1989).

98) Guisan J M: (Immobilization of enzymes and cells); Humana Press, Totowa, NJ, Second Edition; 1-11; (2006).

99) Chan WC et Mawer HM: (Studies on protein subunits. Preparation and properties of active subunits of aldolase bound to a matrix); *Arch Biochem Biophys*, 149, 136-145; (1972).

100) Axen R, Porath J et Ernback S: (Chemical coupling of peptides and protéines to polysaccharides by means of cyanogen halides); *Nature* 2104, 1302-1304; (1967).

101) Bennett JS, Bell DW, Buchholz BA, Kwok ESC, Vogel JS, Hellman M: (Accelerator mass spectrometry for assaying irreversible covalent modification of an enzyme by acetoacetic ester); *Int J Mass Spectrom*; 179/180: 185-193; (1998).

102) Gray GR: (Antibodies to carbohydrates: preparation of antigens by coupling carbohydrates to proteins by reductive amination with cyanoborohydride); *Method Enzymol*; 50:155-160; (1978).

103) Dottavio-Martin D et Ravel JM: (Radiolabeling of proteins by reductive alkylation with formaldehyde and sodium cyanoborohydride); *Anal Biochem*; 87: 562-565; (1978).

104) Thiele GM, Tuma DJ, Miller JA, Wegter KM, McDonald TL et Klassen LW: (Monoclonal and polyclonal antibodies recognizing acetaldehydeprotein adducts); *Biochem Pharm*; 56: 1515-1523; (1998).

105) Lamas Estela M, Barros Rui M, Balcão VM et Malcata FX: (Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports); *Enzyme Microb Tech*; 28: 642-652; (2001).

106) Barros RM, Extremina CI, Gonçalves I C, Braga B O, Balcão-Victor M et Malcata FX: (Hydrolysis of β -lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports); *Enzyme Microb Tech*, 7: 908-916; (2003).

107) Visuri K, Pastinen O, Wu X, Mäkinen K, Leisola M: (Stability of native and cross-linked crystalline glucose isomerase); *Biotechnol Bioeng*; 377-380; (1999).

108) Govardhan CP: (Crosslinking of enzymes for improved stability and performance); *Curr Opin Biotech*; 10: 331-335; (1999).

109) Schoevaart R, Wolbers MW, Ottens M, Kieboom APG, Van Rantwijk: (Preparation, optimization, and structures of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs)); *Biotechnol Bioeng*; 87: 754-62; (2004).

110) López-Gallego F, Betancor L, Mateo C, Hidalgo A, Alonso-Morales N et Dellamora-Ortiz: (Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports); *J Biotechnol*; 119: 70-75; (2005).

111) Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora-Ortiz G, Guisán JM et Fernández-Lafuente R: (Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger*); *Journal of Biotechnology*; 121: 284-289; (2006 a).

112) Hwang S, Lee KT, Park JW, Min BR, Haam SJ, Ahn IS, et Jung JK: (Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels); *Biochemical Engineering Journal*; 17: 85-90; (2004).

- 113) Balcao VM, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Malcata FX et Guisán JM: (Structural and functional stabilization of L-asparaginase upon immobilization onto highly activated supports); *Biotechnol Prog*; 17: 537-542; (2001).
- 114) Mieglo I, Moreira MT, Palma C, Guisán JM, Fernández-Lafuente R, Feijoo G et Lema JM: (Catalytic properties of immobilized and stabilized manganese peroxidases); *Enzyme Microb Technol*; 32: 769-775; (2003).
- 115) Monsan P: (Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization); *J Mol Cat*; 3: 371-384; (1978).
- 116) Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ et Waldron KC: (Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking); *Biotechniques*; 37: 798-802; (2004).
- 117) Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora- Ortiz G, Mateo C, Fernandez-Lafuente R et Guisan Jose M; (Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions); *Enzyme Microb Technol*; 39: 877-882; (2006).
- 118) Walt DR. (Designing new sensors with old chemistry); *Chemtechnology*; 22: 658-663; (1992).
- 119) Guisán J M, Penzol G, Armisen P, Bastida A, Blanco R M, Fernández-Lafuente R. et García-Junceda E: (Immobilization of Enzymes Acting on Macromolecular Substrates: Reduction of Steric Problems); In: GF. Bickerstaff, Editor, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press, Clifton, USA, Chaptire 30; (1997).
- 120) Guisán JM, Alvaro G, Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Garcia JL et Tagliani A: (Stabilization of a heterodimeric enzyme by multi-point covalent immobilization: penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*); *Biotechnol Bioeng*; 42: 455-464; (1993).
- 121) Guisán, JM, Rodriguez V, Rossell CM, Soler G, Bastida A, Blanco RM, Fernández-Lafuente R, Garcia-Iunced E; (Stabilization of immobilized enzymes by chemical

modification with polyfunctional macromolecules); In *Methods in Biotechnology*. Vol 1. Immobilization of enzymes and cells; Bieckerstaff, GF, Eds.; Humana Press, Inc: Totowa, NJ, 289- 298; (1997).

122) Hidalgo A, Betancor L, Lopez-Gallego F, Moreno R, Berenguer J, Fernández-Lafuente R, et Guisán JM: (Preparation of a versatile biocatalyst of immobilized and stabilized catalase from *Thermus thermophilus* Structural stabilization of a multimeric enzyme); *Enzyme Microb Technol*; 33: 278-285; (2003).

123) Fernández-Lafuente R, Hernández Jústiz O, Mateo C, Terreni M, Fernández-Lorente G, Moreno MA, Alonso J, García-López JL, Guisan JM: (Biotransformations catalyzed by multimeric enzymes: stabilization of tetrameric ampicillin acylase permits the optimization of ampicillin synthesis under dissociation conditions; *Biomacromolecules*; 2: 95-104; (2001).

124) Fernández-Lafuente R, Rodríguez V, Mateo C, Penzol G, Hernández-Justiz O, Irazoqui G, Villarino A, Ovsejevi K, Batista F et Guisán JM: (Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques); *J Mol Catal B Enzym*; 7: 181-189; (1999).

125) Ó'Fágáin C: (Enzyme stabilization-recent experimental progress); *Enzyme Microb Tech*; 33: 137-149; (2003).

126) Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Fuentes M, Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextrane-aldehyde); *Journal of Biotechnology*; 110: 201-207; (2004).

127) Abian O, Wilson L, Mateo C, Fernández-Lorente G, Palomo JM, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Re D, Tam A et Daminatti M: (Preparation of artificial hyperhydrophilic microenvironments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules: New enzyme derivatives to be used in any reaction medium); *J Mol Catal B Enzym*; 19-20: 295-303; (2002).

128) Mateo C, Fernández-Lorente G, Pessela BCC, Vian A, Carrascosa AV, Garcia J L, Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Affinity chromatography of polyhistidine tagged

enzymes: New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions); J Chromatogr A; 915: 97-106; (2001).

CHAPITRE II
PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIELS ET METHODES

Dans cette partie nous avons détaillé le mode opératoire de la préparation des différents supports utilisés pour l'immobilisation de la catalase. L'agarose mono-amino-N-éthyl (MANAE) et l'agarose polyéthylèimine (PEI) ont été utilisés pour l'adsorption ionique de la catalase. La catalase est immobilisée par liaison covalente sur l'agarose glyoxyl et l'agarose CNBr.

Les techniques de mesure de l'activité de la catalase et de la glucose oxydase ont été développées, ainsi que la mesure de la quantité de protéines.

I.1. MATERIELS

Agarose (**sepharose TMCL -4B**) et (**sepharose TMCL-6B**) ont été offert par **Hispanagar (Burgos, Espagne)**. La catalase *Aspergillus niger* a été offerte par **Puleva Biotech S.A. (Grenade, Espagne)**. La catalase « foie bovin » est d'origine **Fluka (Buchs, Suisse)**. La glucose oxydase « *Aspergillus niger* » est d'origine **Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)**. Le glycidol (96%) de pureté, l'éthylène diamine et le peroxyde d'hydrogène sont de **Sigma-Aldrich Chemical (St Luis MO, USA)**. Le périodate de sodium, le polyéthylèneimine et le glutaraldéhyde (25%) sont de **Fluka (Buchs, Suisse)**. Le réactif de Bradford est d'origine **Pierce (Rockford, IL, USA)**. L'épichlorhydrine est d'origine **Fluka (Neu Ulm, Allemagne)**. Le glucose, la soude et le phosphate de sodium sont de **Panreac (Barcelone, Espagne)**. L'agarose CNBr est d'origine **Amershan Bioscience (Uppsala, Suède)**

I-2. METHODES

Les mesures des activités de la glucose oxydase et de la catalase ont été faites sur l'appareil *Visible recording spectrophotometer UV- 160* de marque *Shimadzu*.

La mesure de l'absorbance du glucose a été faite sur l'appareil *UV-Visible recording spectrophotometer UV-160* de marque *Shimadzu*) ou sur l'appareil *ELX 800 Microplate Reader BIO-TEK INSTRUMENTD INC*. La concentration en protéines est déterminée également sur l'appareil (*UV-Visible recording spectrophotometer UV- 160* de marque *Shimadzu*).

I.2.1. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité de la catalase est déterminée par spectroscopie UV par contrôle de la diminution de l'absorbance du peroxyde d'hydrogène à 240 nm. L'appareil UV- Visible est doté d'un agitateur qui permet l'agitation du mélange peroxyde d'hydrogène/ catalase; ainsi que d'un système de circulation d'eau qui maintient une température constante dans la cellule de réaction. Le H₂O₂ est préparé dans une solution tampon phosphate 25 mM pH 7.5, sa concentration doit être comprise entre 30 et 33 μM, cette concentration correspond à une absorbance de 2. Le volume du substrat (H₂O₂) peut être de 2,9 ou 2,5 mL il correspond respectivement à un volume de catalase (suspension ou de surnageant) de 100 et 300 ou 500 μL. Les volumes 300 et 500 μL sont prélevés si la solution en catalase est diluée. Toutes les mesures, durant ce travail ont été réalisées à 25 °C. Les mesures de l'absorbance ont été faites en mode cinétique sur l'appareil pour avoir la valeur de la pente de la droite et déterminer ensuite l'activité de la solution enzymatique, le coefficient d'extinction molaire vaut 39,6 M⁻¹cm⁻¹ [1].

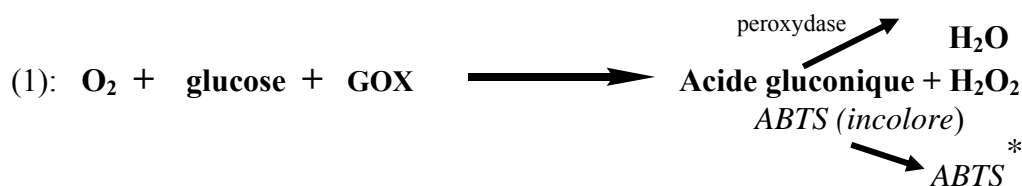
L'unité de l'activité est définie comme la quantité d'enzymes nécessaire à la décomposition d'une μmol de peroxyde d'hydrogène par minute à 25 °C dans les conditions citées.

I.2.2. Détermination de l'activité enzymatique de la glucose oxydase

L'activité de la glucose oxydase est déterminée par spectrophotométrie UV, par l'enregistrement de l'augmentation de l'absorbance à 414 nm résultant de l'oxydation de l'2,2'- azino-bis(3-éthylbenzathizoline-6-sulfonic (ABTS) par une réaction catalysée par la peroxydase [2].

Le mélange réactionnel est constitué de 1 mL de tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6.0, 0.5 mL de glucose, 0.1 mL de ABTS (1mg/mL) dans l'eau distillée et 0.1 mL (2 mg/mL) de horseradish peroxydase (HRP) préparé dans le tampon phosphate de sodium pH 6.0. Une unité de l'activité de la GOX était définie comme la quantité qui provoque l'oxydation d'une μmol de ABTS par minute dans les conditions mentionnées.

L'oxydation du glucose par l'enzyme la glucose oxydase est donnée par la réaction (1).



Oxydée (vert)

La valeur de l'activité enzymatique de la GOX est calculée en utilisant la relation 1 :

$$A(U/mL) = (\text{Absorbance} \times V_{\text{total}} / \epsilon \times V_{\text{échantillon}}) \times 1000 \quad (1)$$

- $\epsilon = 31100 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$, coefficient d'extinction de la glucose oxydase
- $V_{\text{(total)}} = (2+0,1+0,1+0,02) \text{ mL} = 2,22 \text{ mL}$
- $V_{\text{(échantillon)}} = 0,02 \text{ mL}$

Les mesures de l'absorbance de l'enzyme glucose oxydase ont été faites en mode cinétique sur l'appareil (UV-Visible) à 414 nm.

Les différents essais effectués nous ont permis de trouver les meilleures conditions de travail pour la détermination de l'activité enzymatique de la glucose oxydase qui sont :

- Longueur d'onde: 414 nm
- 2 mL de la solution de glucose 500 mM (tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7)
- 100 μL de peroxydase
- 100 μL de ABTS
- 20 μL d'échantillon

I.2.3. Mesure de l'absorbance du glucose

Les conditions de travail sur l'appareil *ELX 800 Microplate Reader BIO-TEK INSTRUMENTD INC* sont :

- Longueur d'onde 490 nm (l'appareil ne possède pas la longueur d'onde 500 nm)
- Temps d'incubation 15 min
- Température d'incubation 37 °C
- 200 μL de glucose « *GLUCOSE MONOLIQ REF GL 303 BEN srl (Italy)* »
- 5 μL d'échantillon

Il est indispensable de lire l'absorbance du tampon utilisé qui sera le « blanc », l'absorbance de la solution de glucose qui sera le « blanc glucose » et celle de l'échantillon avec 20 μL ou 5 μL selon les spectrophotomètres (*UV-Visible recording spectrophotometer UV-160 de marque Shimadzu*) ou *ELX 800 Microplate Reader Bio -Tek Instrumentd Inc* .

I.2.4. Détermination de la concentration en protéines

La teneur en protéines est déterminée en utilisant la méthode de Bradford [3]. A un mL de réactif de Bradford est ajouté 20 μL de solution protéique (enzymatique) au bout de 10

minutes nous mesurons l'absorbance sur l'appareil *UV-Visible* en mode photométrie à 595 nm. L'équation de la courbe d'étalonnage réalisée permet de calculer la quantité de protéines, elle est tracée régulièrement en moyenne une fois par mois.

I.2.5. Technique : électrophorèse SDS-PAGE

L'étude par électrophorèse SDS-PAGE (*sodium dodécylsulphate- électrophorèse sur gel de polyacrylamide*) de la catalase est faite selon la méthode décrite par Laemmli [4] Les solutions de catalase et des dérivés sont portés à ébullition durant 5 minutes en présence de tampon de rupture (tris HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS à 2%, β -mercaptoetanol 5%, glycérol 10% et le bleu de bromophénol 0,005%). Les échantillons sont préparés par dissolution dans le tampon de rupture. La technique électrophorèse SDS-PAGE a été développée dans la partie annexe.

◆ 0.1 g de dérivé dans 200 μ L de tampon de rupture

◆ 100 μ L de solution de catalase dans 200 μ L de tampon de rupture

18 μ L d'échantillon de protéines dénaturées sont déposés dans les puits (un échantillon par puits), le premier étant réservé pour le marqueur. Quand la migration des protéines (enzymes) est terminée le gel est démoulé délicatement.

Ce traitement n'est pas en mesure de rompre les liaisons amines secondaires formées entre les protéines et le support utilisé et le type de liaison enzyme/ support [5] mais il est capable de libérer quelques sous-unités de l'enzyme qui n'ont pas été liées par covalence au support [6]. Après ce traitement, ces solutions sont analysées sur le gel polyacrylamide SDS-PAGE. Le bleu brillant de Coomassie (R-250) joue le rôle de colorant [7] ou avec l'argent qui est plus sensible [8].

II. PREPARATION DES SUPPORTS

La préparation de ce type de support à base d'agarose a été développée par Guisán [9]. L'agarose 4BCL est traité dans un premier temps par le glycidol, ensuite il est soumis à une oxydation par le périodate de sodium. L'agarose est extrait d'une algue rouge marine nommée : agar, et sous sa forme purifiée il porte le nom d'agarose.

🚧 Pourquoi le choix du support agarose ?

Ce support «agarose» est intéressant sous plusieurs aspects :

- Il est très malléable et son activation est très aisée

- Sa structure chimique présente de bonnes possibilités pour l'obtention de fortes liaisons multipoints support/enzyme
- Il peut être testé et étudié par des méthodes spectroscopiques
- Il peut être utilisé dans un réacteur à batch parce qu'il est compressible et résistant

Remarque : Toutes les réactions d'activation (éthérification pour obtenir des groupes glycéryl à partir du glycidol, et l'oxydation avec le periodate de sodium pour la formation de groupes aldéhyde à partir des groupes glycéryl étaient effectuées dans des conditions douces pour obtenir les gels d'agarose intact et contenant des monocouches de groupes aldéhydes.

II.1. SUPPORT AGAROSE GLYOXYL

L'agarose 4BCL utilisé est le mieux adapté pour l'immobilisation de la catalase qui est une protéine de grande taille, ce support est réticulé à 4 %, il convient donc mieux à cette enzyme.

L'agarose 4BCL (*sepharose TMCL-4B*, *Hispanagar (Burgos, Espagne)*) se trouve dans l'éthanol, sa densité est de 0,7 g/mL. Avant de verser la quantité nécessaire en agarose dans le buchner il faut bien agiter la suspension. L'agarose est lavé plusieurs fois dans le buchner avec de l'eau distillée. L'agarose est d'aspect humide et blanc. 105g d'agarose sont mis dans un bûcher où 30 mL d'eau sont ajoutés, ce mélange sera placé ensuite dans un bain de glace, l'eau est ajoutée par petites quantités pour éviter la formation de grumeaux.

Une solution de soude est préparée à 1,7 N (3,4 g dans 50 mL d'eau distillée), la soude est à basse température, après dissolution totale à 25 °C, elle est remise dans le bain de glace. 4,425 g de NaBH₄ (75 µmol/mL de gel) contenu dans un bûcher sont également à basse température, quand les deux sont à basse température, le NaBH₄ solide est ajouté à la solution de soude le tout est mis sous agitation magnétique à 25 °C jusqu'à dissolution totale du NaBH₄. Le mélange NaBH₄/ NaOH est ajouté sur l'agarose en suspension se trouvant dans le bain de glace. Le tout est soumis à une agitation à palette, après quelques minutes d'agitation, (36 mL) de glycidol (*2,3-epoxy-1-propanol (Aldrich 96 %)*) sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule, il doit être ajouté très lentement, il est pris sous sa présentation commerciale. Après l'ajout de la quantité nécessaire en glycidol, la réaction se poursuit sous agitation à palettes (15 à 18 h) à 25 °C. Ensuite, le support est lavé avec de l'eau distillée sur buchner plusieurs fois (2 L d'eau distillée), il faut triturer pour éliminer le maximum d'eau. Le support est récupéré et placé dans un grand bûcher, 900 mL d'eau distillée sont ajoutés au support lentement. La solution de périodate de sodium, (NaIO₄) est préparée à 60 mM, il doit

être en excès (1,283 g dans 100 mL d'eau). Cette solution est ajoutée au mélange agarose/ 900 mL d'eau, le tout est soumis à une agitation à palettes durant 2 h à 25 °C, (même au-delà de 2 h le support ne sera pas affecté). L'aldéhyde (*agarose glyoxyl*) est lavé avec de l'eau distillée et récupéré sur buchner et stocké à 4 °C jusqu'à son utilisation.

L'agarose aldehyde est nommé « **agarose glyoxyl** », il est utilisé pour la préparation de l'agarose MANAE et de l'agarose PEI, et il a été utilisé également pour l'immobilisation de la catalase par liaison covalente.

Remarque : *L'agarose glyoxyl peu chargé est préparé de la même manière, il suffit de prendre 20 ou 5 μmol de NaIO_4 par mL de support.*

II.2. SUPPORT AGAROSE MONO-AMINO-N-ETHYL (AGAROSE MANAE)

La préparation de l'agarose MANAE se fait selon la méthode décrite par Fernández-Lafuente [10]. Dans un bêcher contenant 27,07 mL d'éthylène diamine (EDA) soit 75 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ de gel sont dans de la glace, 50 mL d'eau sont ajoutés. Le HCl à 37 % est ajouté sous sa présentation commerciale par l'intermédiaire d'une ampoule à brome très lentement (prendre entre 40 et 45 mL), le mélange EDA/ HCl est soumis à une agitation magnétique, la solution est prête quand elle présente un pH 10, l'EDA est ajouté jusqu'à obtention de ce pH. Le pH est testé avec le papier pH une fois qu'il est proche de 10 il est mesuré avec le pH mètre (électrode).

Pour obtenir un volume de 200 mL, de l'eau distillée est ajoutée au mélange EDA/ HCl, cette solution est ajoutée à 35 g d'agarose glyoxyl (préparé à 75 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ de gel) par petites quantités tout en remuant avec une spatule pour éviter la formation de grumeaux, le tout est laissé sous agitation à palettes durant 2 h (l'agarose glyoxyl utilisé était stocké à 4 °C, II-1).

Après une nuit d'agitation (entre 15 et 18 h), 2 g de NaBH_4 sont additionnés, et le mélange est soumis à une douce agitation durant 2 h ou plus à 25 °C, le support est récupéré par filtration et il est lavé avec de l'eau distillée. Ensuite il est traité d'abord par une solution d'acétate de sodium 100 mM (pH 4), deux fois pour éliminer le NaBH_4 , ensuite avec la solution borate de sodium 100 mM (pH 9), et finalement, il est lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée, et trituré pour le laver correctement et éliminer l'eau au moment de la filtration, cette opération se fait sur buchner. Le support est conservé à 4 °C.

➤ Activation de l'agarose MANAE avec le glutaraldéhyde

Nous avons utilisé l'agarose MANAE pré-activé avec du glutaraldéhyde afin de comparer la stabilité de la catalase immobilisée sur l' agarose MANAE ou l'agarose PEI réticulé avec le glutaraldéhyde.

Le support pré-activé avec du glutaraldehyde est préparé par activation des groupes amines primaires de l'agarose MANAE. Il est préparé par suspension de 1 g d'agarose MANAE dans 2 mL d'une solution de glutaraldehyde à 15 % (v/v) dans le tampon phosphate de sodium 200 mM (pH 7), la préparation est sous douce agitation durant 16 h à 25 °C. Ensuite, le support est lavé avec le tampon phosphate de sodium 25 mM (pH 7) et finalement avec de l'eau distillée, il est stocké à 4 °C jusqu'à son utilisation.

II.3. PREPARATION DE L'AGAROSE POLYETHYLENEIMINE (PEI)

Le polyéthylèneimine (PEI) est un polymère très visqueux, il est utilisé sous sa présentation commerciale, nous avons utilisé du PEI de masse: 25 000 et 750 000 Da. A 30 g de PEI 25 000 ou 750 000, 300 mL d'eau distillée sont ajoutés, la solution de PEI est à 10 %, le mélange est laissé sous agitation magnétique. La valeur du pH de la solution de PEI ne doit pas être supérieure à 11, si c'est le cas il suffit d'ajouter quelques gouttes de HCl. La quantité de PEI peut être légèrement supérieure à 30 g car il est difficile de peser la masse exacte étant donné sa viscosité.

A 30 g d'agarose glyoxyl contenus dans un bêcher est ajoutée lentement la solution de PEI, pour éviter la formation de grumeaux. Le mélange est laissé sous agitation à palette toute la nuit (16 à 18 h) à 25 °C. Le support est récupéré et lavé avec de l'eau distillée ensuite il est réduit avec 3 g de Na BH₄ sous douce agitation durant 2 h ou plus à 25 °C

Après filtration de la suspension sur buchner le support est récupéré et lavé en premier avec la solution d'acétate de sodium 100 mM (pH 4), ensuite avec le borate de sodium 100 mM pH 9, finalement le support est lavé à plusieurs reprises avec de l'eau distillée tout en le triturant pour le laver correctement et éliminer l'eau. Le support est conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

II.4. EQUILIBRATION DES SUPPORTS AGAROSE MANAE, AGAROSE PEI 25 000 ET AGAROSE 750 000

Les supports doivent être équilibrés avant leur utilisation. Ils sont mis en suspension en premier dans le tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7), ensuite dans le même tampon avec une concentration 25 mM. Il faut vérifier le pH de la solution support/ tampon et laisser sous douce agitation à température ambiante pendant 15 min pour chaque tampon. Le

support est récupéré et lavé avec de l'eau, ensuite il est conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

II.5. PREPARATION DE L'AGAROSE CNBr

Le support (*CNbr-activated sepharose*) est sec sous sa présentation commerciale, il est traité avant d'être utilisé comme support, il sera nommé *agarose CNBr*. A 1g d'agarose CNBr sec en suspension dans 100 mL d'eau distillée, il faut ajouter quelques gouttes de HCl concentré pour que le pH soit compris entre 2 et 3. Après 30 min de douce agitation à 25 °C, le support est récupéré sur buchner et lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée. Le support ainsi préparé doit être utilisé dans les 24 h, il ne peut pas être conservé contrairement aux autres supports même à 4 °C.

Remarque : *1 gramme de support sec donne approximativement 3 g de support humide.*

III. IMMOBILISATION DE LA CATALASE SUR LES DIFFERENTS SUPPORTS

Les méthodes d'immobilisation utilisées sont les mêmes pour la catalase *Aspergillus niger*, la catalase foie bovin et pour la glucose oxydase *Aspergillus niger*. La cinétique d'immobilisation d'une enzyme est suivie en effectuant des mesures de l'absorbance en UV sur le surnageant et la suspension à différents temps pour voir le degré d'avancement de l'immobilisation.

Dans le cas d'une réaction d'immobilisation lente même la solution d'enzyme (le blanc) doit être analysée, il se trouve dans les mêmes conditions de température et de pH. Pour l'immobilisation de la catalase, nous mesurons son activité par spectroscopie UV à 240 nm.

Remarque : *Le blanc correspond à la solution d'enzymes utilisée pour l'immobilisation, son absorbance est mesurée quand la cinétique de réaction est longue.*

III.1.IMMOBILISATION PAR LIAISON COVALENTE

III.1.1. Préparation du dérivé Ag glyoxyl

a) Dérivé à catalase *Aspergillus niger*

L'agarose glyoxyl 4BCL est très chargé, il contient 75 µmoles de groupes aldehydes par mL de support. 1 g d'agarose glyoxyl est mis en contact avec 10 mL de solution de catalase *Aspergillus niger* préparée dans le tampon carbonate de sodium 100 mM (pH 10). La

réaction d'immobilisation se fait à 25 °C sous douce agitation. Quand l'immobilisation est terminée, le dérivé est réduit par ajout de borohydrure de sodium (NaBH₄) à la suspension de façon à avoir une concentration de 1mg/ mL. La réduction se fait sous agitation magnétique durant 30 minutes à 25 °C. Le dérivé est lavé avec le tampon phosphate de sodium 25 mM (pH 7).

b) Catalase foie bovin

✚ 40 ou 20 mg de protéines par gramme de support

La catalase foie bovin, sous sa présentation commerciale contient 10 mg/mL de protéines selon le réactif de Bradford.

2 mL de catalase foie bovin, sous sa présentation commerciale, sont ajoutés à 8 mL de tampon carbonate de sodium 100 mM (pH 10). A cette solution est ajouté 1 g de support agarose glyoxyl (6 BCL). La réaction d'immobilisation se fait sous douce agitation à 25 °C. A la fin de la réaction d'immobilisation, la suspension est réduite par ajout de 10 mg de NaBH₄. La réduction se fait sous agitation magnétique durant 30 minute à 25 °C. Ensuite, le dérivé est récupéré sur buchner et lavé avec 20 mL de tampon phosphate de sodium 25 mM (pH 7). Si nous voulons préparer un dérivé à 40 mg de protéines/g, il suffit de prendre le double en catalase foie bovin.

III.1.2. Préparation du dérivé Ag CNBr

a) Dérivé à catalase *Aspergillus niger*

La catalase *Aspergillus niger* contient 14 mg/ mL. L'immobilisation de la catalase a été réalisée par suspension de 4 g d'agarose CNBr dans 48 mL de tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7) contenant 11,43 mL de catalase *Aspergillus niger*. La réaction d'immobilisation se fait sous douce agitation à 4 °C. Après ce temps d'immobilisation le support est filtré, ensuite il est incubé dans 10 mL de tris-HCl à pH 8 durant 2 h pour bloquer les groupes CNBr restants, finalement le dérivé obtenu est lavé avec de l'eau. Tous les supports et dérivés préparés sont conservés à basse température (4 °C) jusqu'à leur utilisation.

b) Dérivé à glucose oxydase *Aspergillus niger*

1 g de support agarose CNBr est en suspension dans 3 mL de tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7) contenant 8 mg de glucose oxydase (GOX). Le mélange est laissé sous douce agitation à 25 °C.

La réaction d'immobilisation de la GOX est terminée quand le surnageant présente une absorbance nulle ou très faible à 414 nm. Les mesures de l'absorbance ont été faites avec 20 ou 50 µL d'échantillon pour la suspension et pour le surnageant.

III.2. ADSORPTION IONIQUE DES ENZYMES

III.2.1. Préparation du dérivé Ag MANAE

La catalase *Aspergillus niger* est adsorbée par liaisons ioniques sur l'agarose MANAE. L'immobilisation se fait dans le tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), pour 1 g de support il faut prendre 4 mL de solution d'enzymes, la réaction d'immobilisation se fait sous douce agitation à 25 °C. Le dérivé est lavé avec un peu de tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), le dérivé est stocké à 4 °C jusqu'à son utilisation.

III.2.2. Préparation du dérivé Ag PEI

L'immobilisation, de la catalase *Aspergillus niger* sur l'agarose PEI, est réalisée avec le même mode opératoire que pour le dérivé Ag MANAE (**Préparation du dérivé Ag MANAE**).

III.2.3. Préparation du dérivé Ag MANAE/ GOX/ Glut

La préparation du dérivé Ag MANAE/GOX très chargé (8 mg ou 0,4 de GOX par gramme de support) s'effectue par suspension de 1 g d'agarose MANAE 4BCL dans une solution constituée de 8 mg ou 0,4 mg de GOX en poudre dans 3 mL de tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7).

La réticulation du dérivé Ag MANAE/ GOX avec le glutaraldéhyde se fait comme décrit par Guisán [11]. La solution de glutaraldéhyde à 0,5 % est préparée à partir d'une solution commerciale à 25 %. L'activation du dérivé est effectuée par suspension de 1 g de dérivé Ag MANAE/GOX dans 4 mL de tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7) contenant 40 µL de glutaraldéhyde, le pH est vérifié pour cette préparation et également pour la suspension Ag MANAE/GOX. La suspension est laissée sous douce agitation à 25 °C durant 2 h. Le dérivé Ag MANAE/ GOX /Glut est lavé avec un volume compris entre 7 et 10 mL de tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), et il est laissé sous incubation toute la nuit (16 à 18 h) à 25 °C, ensuite il est conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

IV. RETICULATION DES DERIVES

La stabilité de l'enzyme peut être améliorée après son immobilisation soit par action du glutaraldéhyde pour les dérivés Ag MANAE, Ag PEI et Ag CNBr soit avec le dextrane-aldéhyde pour les dérivés Ag glyoxyl et Ag CNBr.

IV.1. RETICULATION AVEC LE GLUTARALDEYDE

La réticulation avec le glutaraldéhyde est réalisée avec 1 g de dérivé (Ag MANAE, Ag PEI, Ag CNBr) dans 4 mL de solution de glutaraldéhyde à 0,5 % en volume (v/v) dans le tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7). Le mélange est soumis à une douce agitation à 25 °C durant 1 h, ensuite le dérivé/ Glut est lavé avec le tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7) pour éliminer l'excès de glutaraldéhyde, et il est incubé à 25 °C pendant 16 à 18 h (toute la nuit) et finalement il est stocké à 4°C.

IV.2. RETICULATION AVEC LE DEXTRANE-ALDEHYDE

La réticulation des dérivés Ag glyoxyl et Ag CNBr avec le dextrane-aldéhyde permet d'éviter la dissociation des sous-unités d'une enzyme. 1 g de dérivé Ag CNBr ou Ag glyoxyl, est en suspension dans un mélange de 7,5 mL de dextrane-aldéhyde et 7.5 mL de tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7), le mélange est soumis à une douce agitation à 25°C durant 16 h. Ensuite, à 10 mL de la suspension précédente sont ajoutés 90 mL de tampon carbonate de sodium 100 mM (pH 10), le volume total est de 100 mL. Pour la réduction il faudra ajouter une masse de NaBH₄ (1 mg/ mL). Le mélange est laissé sous agitation magnétique durant 30 minutes, le dérivé réticulé avec le dextrane-aldéhyde est récupéré et lavé avec le tampon carbonate de sodium et stocké à 4 °C. Lors de l'agitation magnétique le flacon reste sans couvercle pour permettre le dégagement d'hydrogène.

➤ Préparation du dextrane-aldéhyde

Le dextrane-aldéhyde est préparé par oxydation du dextrane par le périodate de sodium (NaIO₄) comme décrit par Guisán [12].

Le dextrane utilisé a un poids 40 000 Da. Pour une mole de dextrane (M= 180g pour un monomère) il est nécessaire d'ajouter 2 mol de NaIO₄ pour une oxydation totale. La solution de dextrane est à 33 mg/ mL (16,5 g de dextrane dans 500 mL d'eau distillée). Après la dissolution totale du dextrane sous agitation magnétique, 39,213 g de NaIO₄ sont alors ajoutés pour l'oxydation du dextrane. La réaction d'oxydation se fait sous douce agitation durant 2 à 3 h à 25 °C. La solution de dextrane oxydé est ensuite dialysée. A cette fin, il faut

utiliser un grand erlenmeyer de 2 L et plus, la solution de dextrane-aldéhyde est dialysée selon 50 volumes d'eau distillée (1/50) pour éliminer le formaldéhyde produit durant l'oxydation. La dialyse se fait sous agitation magnétique à 25 °C, la solution de dextrane oxydée (dextrane-aldéhyde) est dans des membranes à dialyse nouées aux deux extrémités. L'eau est changée plusieurs fois à des intervalles de temps de 1, 2, 3; 5, 14 à 16 h (toute la nuit). Le dextrane -aldéhyde est récupéré et conservé à basse température dans le congélateur jusqu'à son utilisation.

V. ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE IMMOBILISEE

L'étude de la dénaturation thermique est faite avec des suspensions constituées de 1 g de dérivé dans 4 mL de tampon approprié, cette suspension est à l'état concentré. La suspension diluée est obtenue par dilution de la solution concentrée à 1/10 ou en mettant 1 g de dérivé dans 9 mL de solution tampon.

La dénaturation thermique est suivie à 55 °C et 60 °C dans les tampons phosphate de sodium 10 mM (pH 7), acétate de sodium 25 mM (pH 5) et carbonate de sodium 25 mM (pH 9). La dénaturation thermique des dérivés est étudiée en présence d'ions divalents Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} . Les suspensions sont préparées dans le tampon acétate de sodium 25 mM pH 5 contenant 100 mM de sel des ions Mg^{2+} , Ca^{2+} et Mn^{2+} . Le H_2O_2 est préparé dans le tampon tris HCl 25 mM (pH 7.5) pour éviter la formation de précipité dû à la présence des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} .

Nous avons étudié l'effet des ions Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Co^{2+} (1 mM) dans le tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5) à 55 °C. Nous avons également étudié l'effet de la concentration 5 et 10, 30 mM en ions Zn^{2+} sur l'activité de la catalase. Les solutions des ions sont préparées dans le tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5).

VI. ETUDE DU REACTEUR A CATALASE ET GLUCOSE OXYDASE

Le réacteur est constitué d'une seringue doté d'un filtre dans lequel nous mettons en suspension un dérivé à catalase *Aspergillus niger* ou à catalase foie bovin et un dérivé à glucose oxydase dans 3 mL de solution de glucose. Nous avons fait varier la masse des dérivés ainsi que la concentration en glucose, ces valeurs seront précisées dans : « la **partie résultats et discussion** ». La réaction d'oxydation du glucose se fait à 25 °C sous agitation magnétique. La concentration du glucose restant est déterminé en mesurant la concentration

en glucose du surnageant, ce dernier est prélevé grâce à une micropipette dotée d'un cône portant à son extrémité un filtre.

➤ **Etude de l'effet du peroxyde d'hydrogène sur les dérivés GOX**

Nous avons étudié l'effet de H_2O_2 sur l'activité de la glucose oxydase des dérivés Ag CNBr/ GOX et Ag MANAE/ GOX/ Glut. La suspension est préparée avec 0.2 g de dérivé à glucose oxydase dans 5 mL de solution de 20 ou 500 mM de peroxyde d'hydrogène. La suspension est sous douce agitation à 25°C durant 24 et 96h.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Nelson DP, Kiesow LA: (Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV); *Anal. Biochem*; 49: 474-478; (1972).
- 2) Bateman Jr, RC, Evans JA: (Using the glucose oxidase/oxidase system in enzyme kinetics); *J Chem Educ*; 72: A240; (1995).
- 3) Bradford MM: (A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding); *Anal Biochem*; 72: 248-254; (1976).
- 4) Laemmli UK: (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4); *Nature*; 227: 680-685; (1970).
- 5) Blanco RM, Guisan JM: (Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels; Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives); *Enzyme Microb Technol*; 11: 360-366; (1989).
- 6) Fernández-Lafuente R, Rodríguez V, Mateo C, Penzol G, Hernández-Justiz O, Irazoqui G, Villarino A, Ovsejevi K, Batista F et Guisán JM: (Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques); *J Mol Catal B Enzym*; 7: 181-189; (1999).
- 7) Swank RJ, Munkres KD: (Molecular weight analysis of polypeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulphate); *Anal Biochem*; 39: 462-477. ; (1971).
- 8) Marshall T: (Detection of protein in polyacrylamide gels using improved silver stain); *Anal Biochem*; 136: 340-346; (1984).
- 9) Guisán JM: (Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes); *Enzyme and Microbial Technology* 10: 375-382; (1988).

- 10) Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V, Santana C, Soler G, Bastida A et Guisán JM: (Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method); *Enzyme Microb Technol*; vol 15: 546-550; (1993).
- 11) Guisán JM, Polo E, Agudo J, Romero MD, Alvaro G et Guerra MJ: (Immobilization–stabilization of thermolysin onto activated agarose gels); *Biocatal Biotrans*; 15: 159–173; (1997).
- 12) Guisán, JM, Rodriguez V, Rosell CM, Soler G, Bastida A, Blanco RM, Fernández-Lafuente R, Garcia-Iunced E.; Stabilization of immobilized enzymes by chemical modification with polyfunctional macromolecules; In *Methods in Biotechnology*. Vol 1 *Immobilization of enzymes and cells*; Bieckerstaff, G F, Eds.; Humana Press, Inc: Totowa, NJ, 289- 298; (1997 b).

CHAPITRE III
ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA
CATALASE IMMOBILISEE

I. ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE IMMOBILISEE

La catalase *Aspergillus niger* (CAT) a été adsorbée sur les supports: agarose PEI 750 000, agarose PEI 25 000 et agarose MANAE. L'enzyme est mise en contact avec une solution de peroxyde d'hydrogène contenue dans une cellule et l'absorbance est mesurée par UV à 240 nm. L'étude de l'activité de la catalase consiste à faire des prélèvements de la suspension incubée à une température donnée et à mesurer l'absorbance à différents temps d'incubation jusqu'à l'obtention d'une faible absorbance de la catalase, ce qui traduit l'inactivité

Les relations suivantes permettent de calculer le taux d'immobilisation (Ψ %), et l'activité A en U/mL et en U/g.

- Taux d'immobilisation Ψ %:

$$\psi \% = 100 - \frac{\text{Absorbance finale (surnageant)}}{\text{Absorbance (initiale)}}$$

A (initiale) correspond à la solution d'enzymes utilisée pour l'immobilisation.

- Activité enzymatique : A (U/mL) : $A (U/mL) = \frac{A}{\varepsilon} \times \frac{V \text{ total}}{V \text{ échantillon}} \times 5 \times 10^3$

Avec $\varepsilon = 39,6 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, coefficient d'extinction de la catalase

V(échantillon) : volume prélevé du surnageant ou de la suspension

V(substrat) : volume de H_2O_2 contenu dans la cellule

Volume total : $V (\text{total}) = V (\text{échantillon}) + V (\text{substrat})$

Volume de l'échantillon :

V (échantillon) = 100 μL pour V (substrat) = 2,9 mL

V (échantillon) = 300 μL pour V (substrat) = 2,5 mL

V (échantillon) = 500 μL pour V (substrat) = 2,5 mL

Le volume d'échantillon doit être plus élevé pour une suspension diluée

Activité enzymatique A (U/g) : $A (U/g) = A (U/mL) \times V$

avec : V = volume de tampon utilisé pour préparer la suspension, soit 1 g de dérivé dans 4 mL de tampon.

- Activité de l'enzyme immobilisée: **Activité résiduelle** = $\frac{A (\text{dérivé})}{A (\text{initiale})} \times 100$

* Le dérivé correspond au système : enzyme immobilisée sur le support

* L'activité de la solution d'enzyme qui sera immobilisée sur le support

I.1. ADSORPTION DE LA CATALASE

L'agarose étant un polysaccharide portant de nombreux groupes OH, les enzymes ne peuvent pas se fixer sur ce type de support, il est donc nécessaire de l'activer. L'agarose est activé avec du glycidol suivi d'une oxydation avec du periodate de sodium. L'éthylène diamine est ajouté sur le support oxydé pour former des fonctions imines qui seront réduites avec du borohydrure de sodium, ce support est nommé agarose MANAE. La fonction amine de l'agarose MANAE se trouve sur un bras espaceur assez long [1]. Le polyéthylèneimine (PEI) est un polymère flexibler qui éagit par liaison covalente avec l'agarose [2] et l'enzyme se fixe dans un volume et non dans un plan.

Les dérivés agarose PEI 25 000 (**Ag PEI 25 000**), agarose PEI 750 000 (**Ag PEI 750 000**), et agarose MANAE (**Ag MANAE**), sont préparés comme suit : 1 g de support en suspension dans 4 mL d'une solution contenant 36 µL de solution catalase. Les 36 µL de solution catalase sont dans une solution tampon de phosphate de sodium (10 mM pH 7). L'immobilisation se fait sous douce agitation à 25°C selon la méthode décrite [1-3].

Les valeurs du taux d'immobilisation (Ψ %), de l'activité (A(U/ml), de l'activité A(U/g)) et de % activité des dérivés Ag PEI 25 000, Ag PEI 750 000 et Ag MANAE sont regroupées dans le tableau III. L'immobilisation sur l'agarose MANAE, l'agarose PEI 25 000 et l'agarose PEI 750 000 a montré que la catalase est immobilisée à 100%.

Tableau III: Valeurs de Ψ %, A(U/ ml), A(U/ g) et % activité des dérivés : Ag PEI 25 000, Ag PEI 750 000 et Ag MANAE

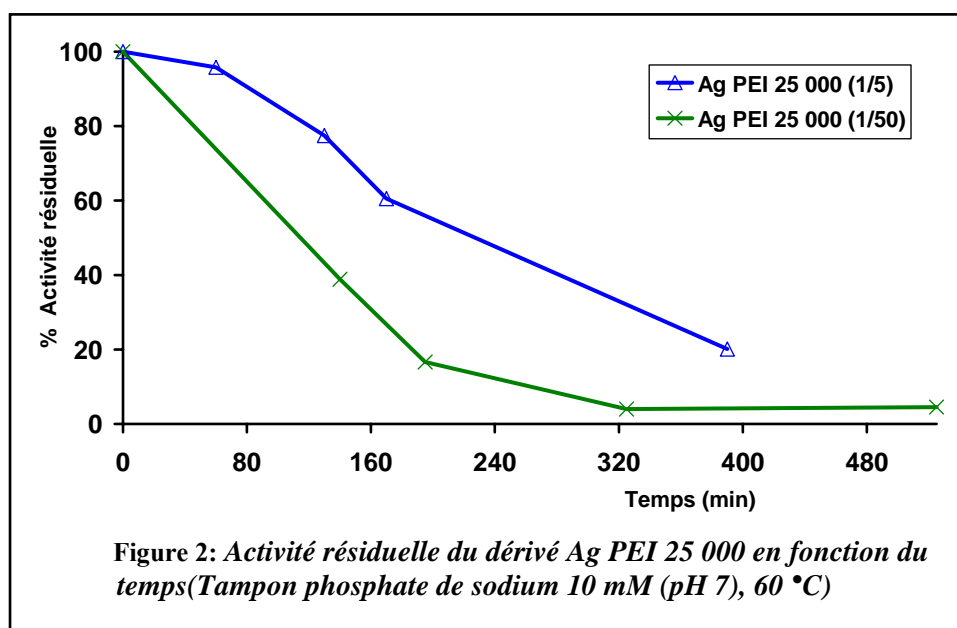
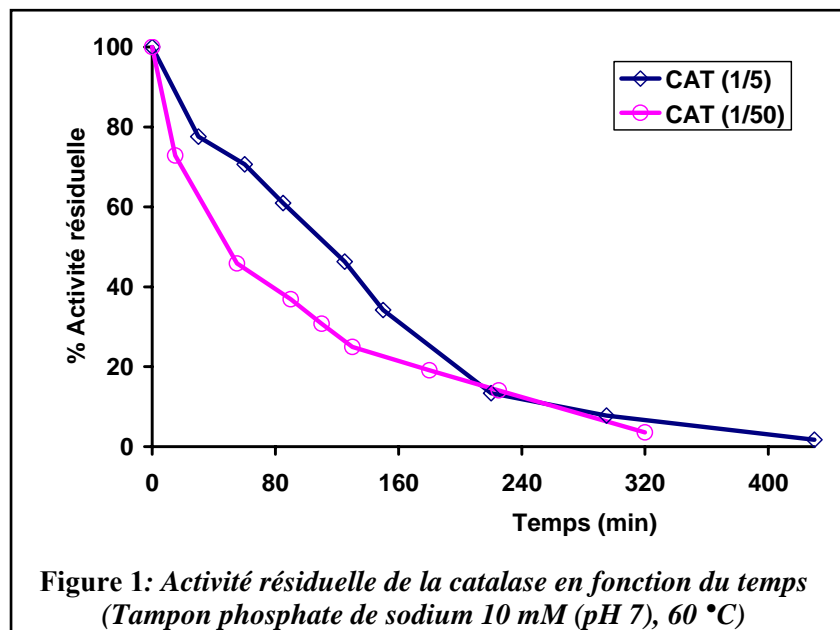
Dérivés	Ψ %	A(U/ ml)	A(U/ g)	% activité
Ag PEI 25 000	100	8647,55	34 600	82
Ag PEI 750 000	100	8070,05	32 300	73
Ag MANAE	100	2420,40	9700	62

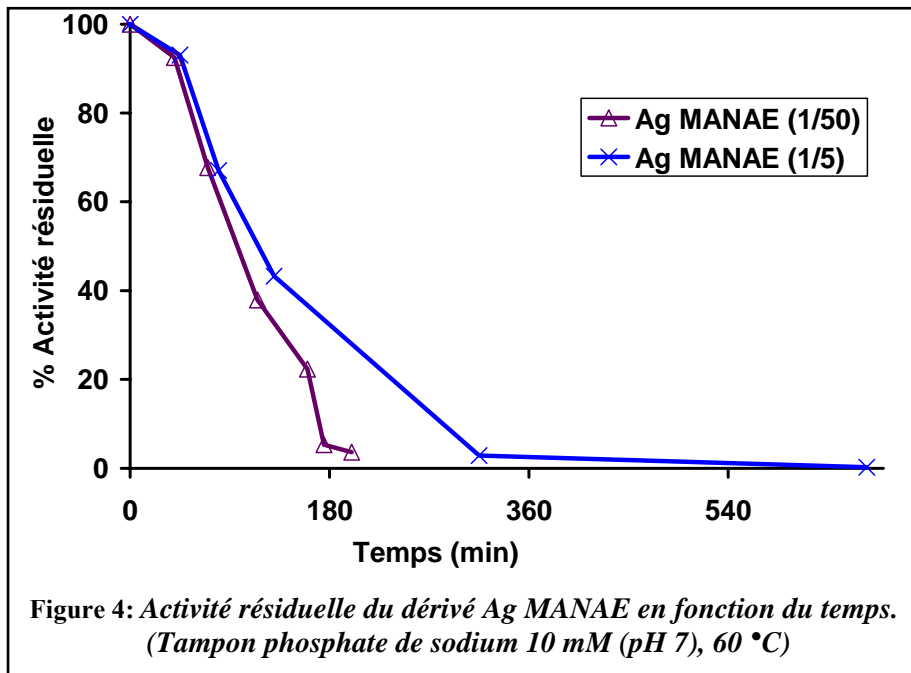
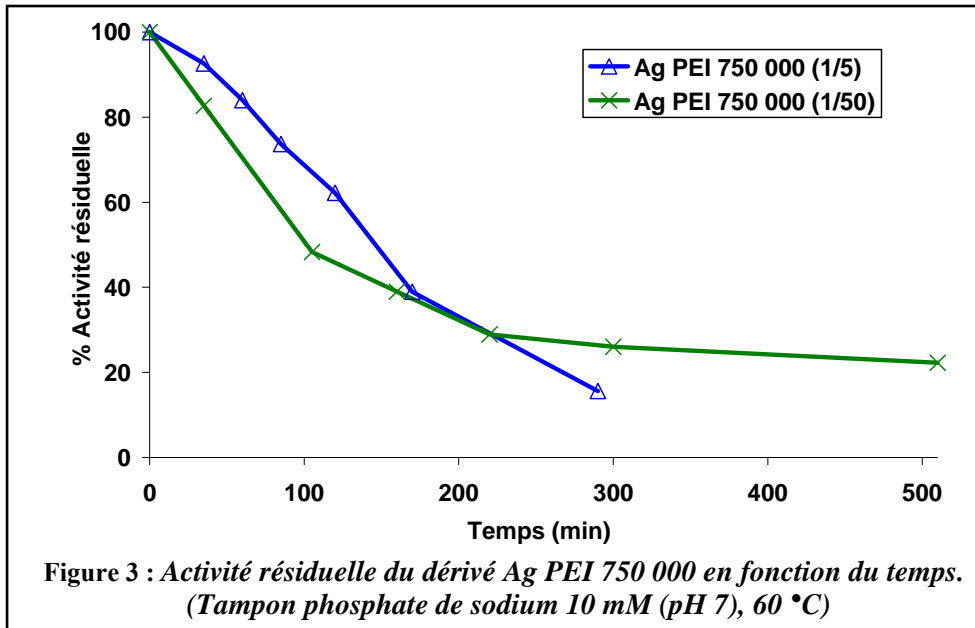
La catalase a été immobilisée à 100 % et l'activité résiduelle vaut respectivement, 82 %, 73 % et 62 % pour les dérivés Ag PEI 750 000, Ag PEI 25 000 et Ag MANAE. La diminution de l'activité de l'enzyme immobilisée est attribuée à une désorption de la catalase. Nos résultats sont en accord avec ceux des autres auteurs [2- 4], où les enzymes sont immobilisées avec un taux d'immobilisation supérieur à 90%. L'activité de la catalase immobilisée est inférieure à celle de l'enzyme initiale (offerte).

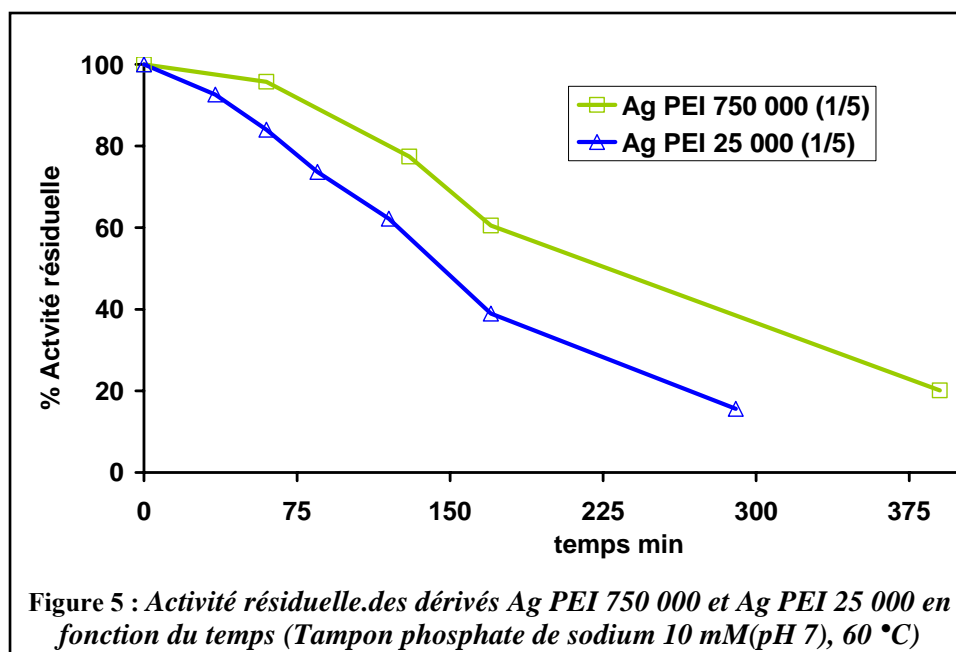
I.1.1. Etude de l'activité de la catalase immobilisée

La perte d'activité de la catalase immobilisée est attribuée à différents paramètres tels que le pH, la température et la dilution. Ces facteurs influencent la conformation du site actif de l'enzyme et la désorption ou la dissociation des sous-unités dans le cas des enzymes multimériques.

L'activité de la catalase a été suivie pour deux concentrations différentes. La suspension concentrée correspond à 1 g de dérivé dans 4 mL de solution tampon, notée (1/5) et la suspension diluée 10 fois notée (1/50). Les suspensions sont incubées à 55 ou 60 °C et des prélèvements sont effectués à des temps réguliers. La quantité prélevée est mise dans le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'activité résiduelle est mesurée en UV à 240 nm. Les résultats sont représentés par les figures 1- 4.







L'activité de la catalase libre et immobilisée diminue quel que soit le support. Néanmoins, l'activité diminue plus rapidement pour la catalase libre avec la dilution (Fig 1-4). Ceci laisse penser à une dissociation des sous-unités de l'enzyme [5]. La catalase peut être également désorbée du support provoquant ainsi une perte d'activité des dérivés Ag PEI 25 000, Ag PEI 750 000 et Ag MANAE [2, 6, 7], bien que les liaisons soient plus fortes que celle de l'adsorption physique.

La perte de l'activité de la catalase peut être attribuée à un changement de conformation, ou à une désorption de l'enzyme comme rapportée dans la littérature [8-10]. La taille du PEI intervient dans la thermostabilité de la catalase (Fig: 5). La catalase est mieux protégée du milieu extérieur avec le PEI 750 000 plutôt qu'avec le PEI 25 000. Les fonctions amines de la lysine sont moins exposées au milieu, vu que l'adsorption se fait dans un volume et non dans un plan.

La catalase est riche en groupements amines de la lysine qui peuvent réagir avec ceux de l'agarose MANAE en formant des liaisons hydrogène qui conduisent à un changement de conformation du site actif. Les résultats rapportés par Bétancor [11] ont montré que la GOX immobilisée sur l'agarose MANAE garde une activité résiduelle de 50 % pour 75 h d'incubation dans un tampon pH 7 à 45 °C. Ces résultats montrent que le support agarose MANAE n'est pas le plus approprié dans nos conditions de travail.

L'immobilisation de la catalase sur ces supports n'ayant pas amélioré sa stabilité, nous avons pensé à sa réticulation avec le glutaraldéhyde pour réduire la désorption et la

dissociation des sous-unités de l'enzyme. Dans ce but, nous avons vérifié en premier lieu si la catalase se désorbe facilement de ces supports.

I.1.2. Etude de la désorption de la catalase

Comme la perte d'activité peut être une conséquence de la désorption, nous avons procédé à l'étude de la désorption de l'enzyme en milieu NaCl.

A 1 g de dérivé mis dans 4 mL de tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 7 sont ajoutées des quantités de solutions de NaCl de 25, 50, 100, 200, 400 et 800 mM. Après chaque ajout de NaCl; la suspension est soumise à une agitation douce à 25 °C durant 30 minutes [2]. Le rendement de l'activité désorbée dans le surnageant est donnée par la relation 1. Le tableau IV regroupe les valeurs du rendement d'activité désorbée. du surnageant.

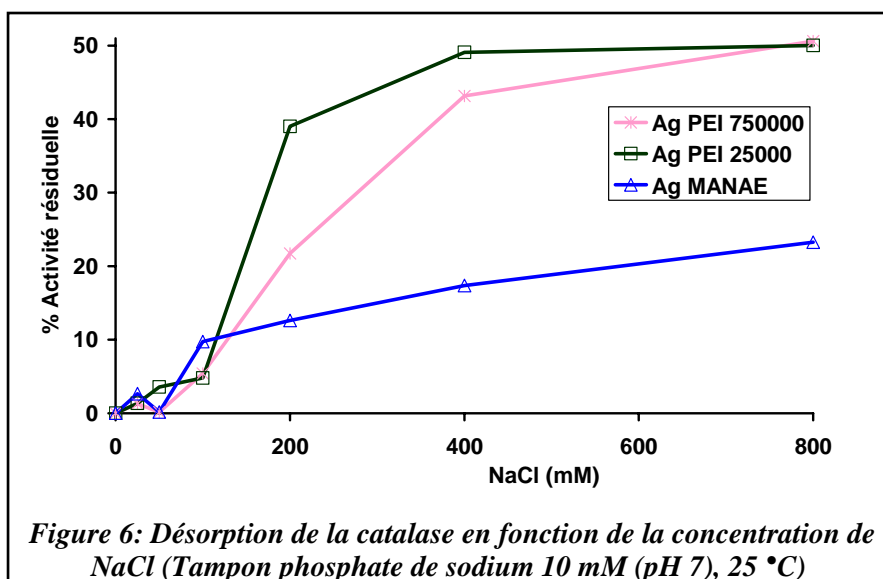
$$\% \text{Activité désorbée} = 100 \times \frac{\text{Absorbance}(\text{surnageant})}{\text{Absorbance}(\text{suspension})} \quad (1)$$

Tableau IV : Valeurs de l'absorbance du surnageant

NaCl (mM) \ Dérivés	25	50	100	200	400	800
Ag PEI 25 000	1,337	3,575	4,800	39,020	49,083	50,03
Ag PEI 750 000	1,300	0,142	5,412	21,731	43,162	50,620
Ag MANAE	2,651	0,171	9,742	12,617	17,362	32,254

Parmi les trois supports, seul l'agarose MANAE présente une faible désorption (2,651-32,54 contre 1,3- 50,62 ou 1,3- 50,03. La désorption atteint 17,362 et 32,254 pour des concentrations en NaCl de 400 et 800 mM de NaCl (Tableau IV). La figure 6 représente la désorption de la catalase des supports agarose PEI et agarose MANAE.

L'enzyme adsorbée sur l'agarose MANAE exige des concentrations de NaCl supérieures à 400 mM pour être désorbée libérant 17,362 % et 32,254 % aux concentrations respectives: 400 et 800 mM de NaCl. La désorption la plus élevée est observée au support agarose PEI, (50 % pour la concentration de 800 mM en NaCl) (Fig. 6).



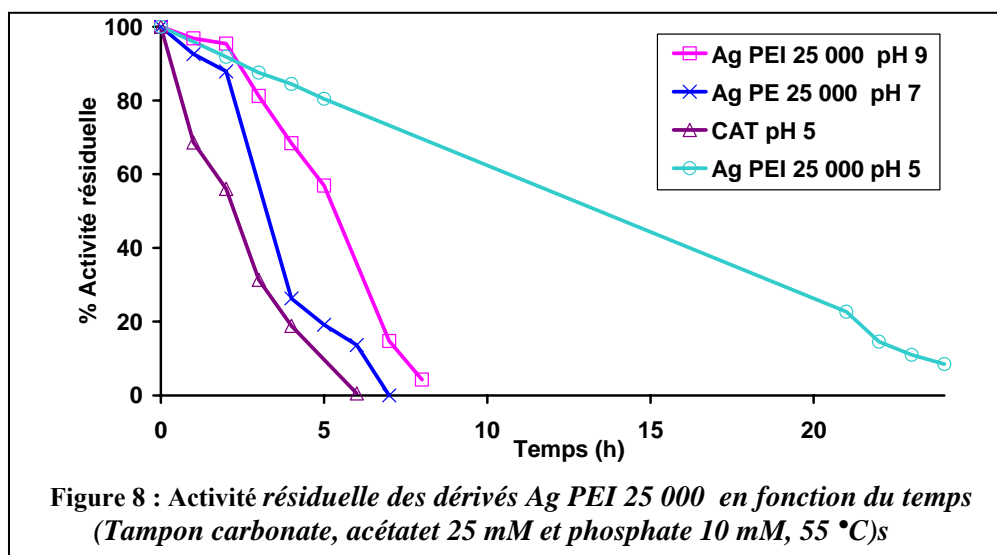
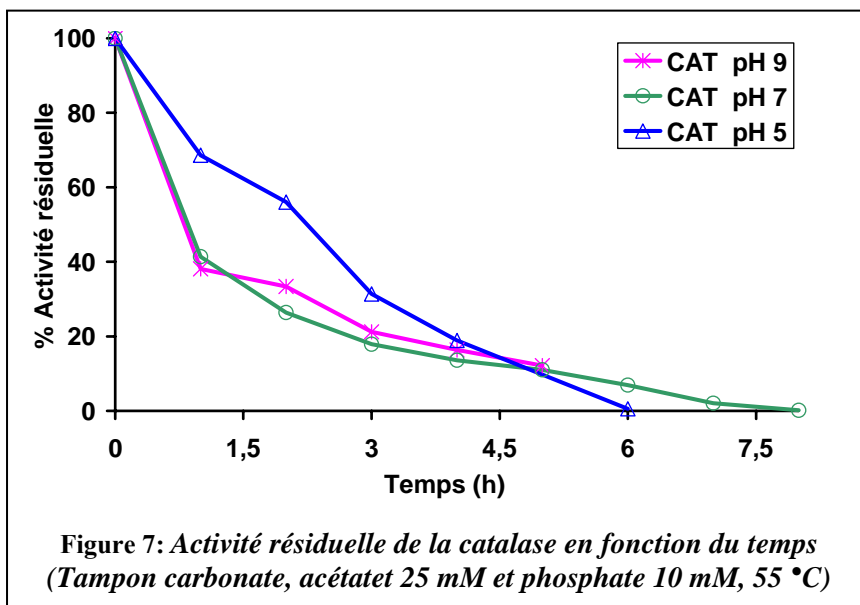
La catalase est retenue plus fortement sur l'agarose MANAE contrairement aux travaux de Pessela [12] où l'agarose MANAE peu activé est utilisé pour la purification d'enzymes car elles sont facilement désorbées. Comme rapporté dans la littérature [13], il est possible de récupérer ce type de support en utilisant des conditions drastiques en pH, les enzymes seront désorbées du support.

Pour les supports agarose PEI et agarose MANAE, en présence de NaCl, l'enzyme est désorbée à des concentrations élevées en NaCl. Ce qui nous permet de dire que la perte d'activité observée n'était pas due à une désorption de la catalase, mais à une dissociation des sous-unités de l'enzyme [5].

➤ Etude de la stabilité du dérivé Ag PEI 25 000 en fonction du pH

Le pH est un paramètre qui influe sur l'activité d'une enzyme. Un pH optimal correspond à une activité maximale. Pour déterminer le pH optimal de la catalase immobilisée sur l'agarose PEI 25 000, son activité a été suivie à pH 5, 7 et 9.

1 g de dérivé est mis en suspension dans 4 mL de tampon adéquat avec les pH 5, 7 ou 9. La suspension est incubée à 55 °C et des prélèvements sont effectués à des temps réguliers pour mesurer l'activité de la catalase à 240 nm en UV. L'évolution de l'activité résiduelle aux pH 5, 7 et 9 est représentée dans les figures 7 et 8 pour la catalase libre et la catalase immobilisée sur l'agarose PEI 25 000.



Les résultats montrent qu'à pH 5, la catalase libre et celle immobilisée conservent leur activité, liée à la protonation des fonctions amines évitant ainsi que les sites actifs ne soient inhibés. Une nette diminution de l'activité de la catalase sous forme libre et immobilisée est observée aux pH 7 et 9. Au pH basique (9), les fonctions carboxyliques s'ionisent traduisant ainsi un changement de conformation du site actif.

L'immobilisation de la catalase sur l'agarose PEI 25 000, l'agarose PEI 750 000 et l'agarose MANAE, n'ayant pas évité sa désactivation, nous a conduit à le soumettre à une réticulation avec le glutaraldéhyde.

II. IMMOBILISATION DE LA CATALASE PAR LIAISON COVALENTE

II.1. RETICULATION AVEC LE GLUTARALDEHYDE

II.1.1. Réticulation de la catalase immobilisée par adsorption

La perte d'activité est due à la dissociation des sous-unités, qui peut être évitée par réticulation avec le glutaraldéhyde. Ce dernier ($\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$) est un dialdéhyde qui peut établir une liaison avec sa fonction aldéhyde et la fonction amine de l'enzyme (Schéma. 8).

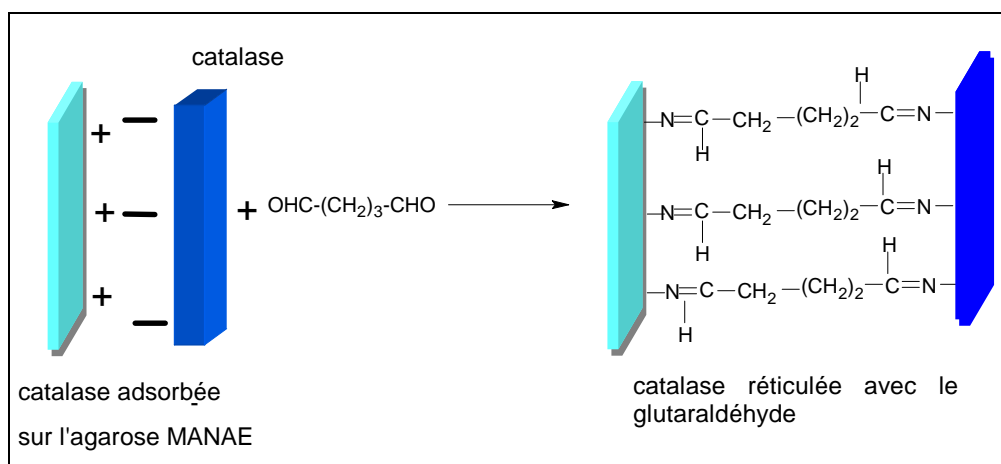


Schéma 8 : Réticulation de la catalase adsorbée sur l'agarose MANAE

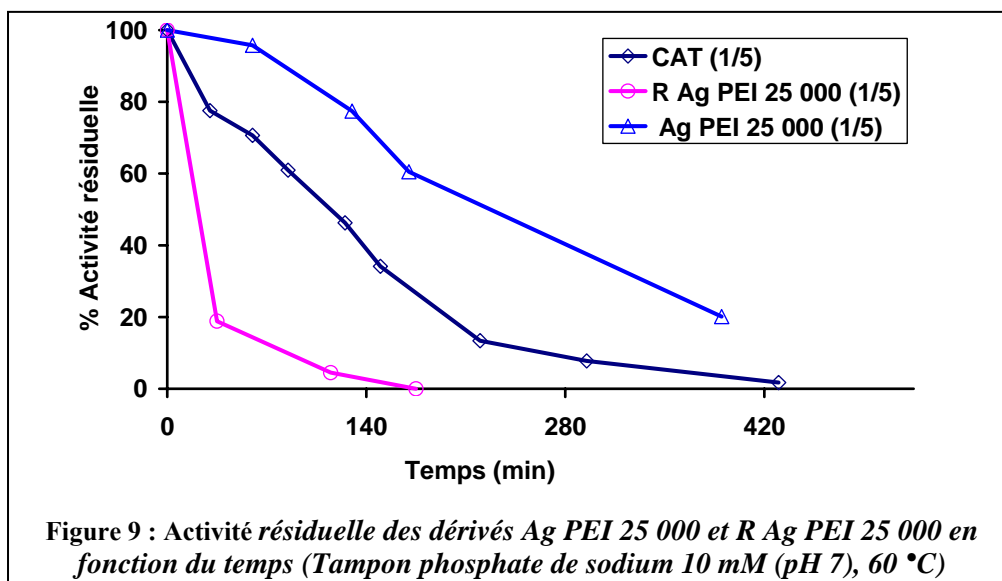
La catalase immobilisée sur l'agarose PEI et l'agarose MANAE a été réticulée avec le glutaraldéhyde à 0.5% dans le tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7) à 25 °C sous douce agitation durant 1 heure. Le tableau V regroupe les valeurs des activités des trois dérivés après leur réticulation avec le glutaraldéhyde, ils sont notés : R Ag PEI 25 000, R Ag PEI 750 000 et R Ag MANAE.

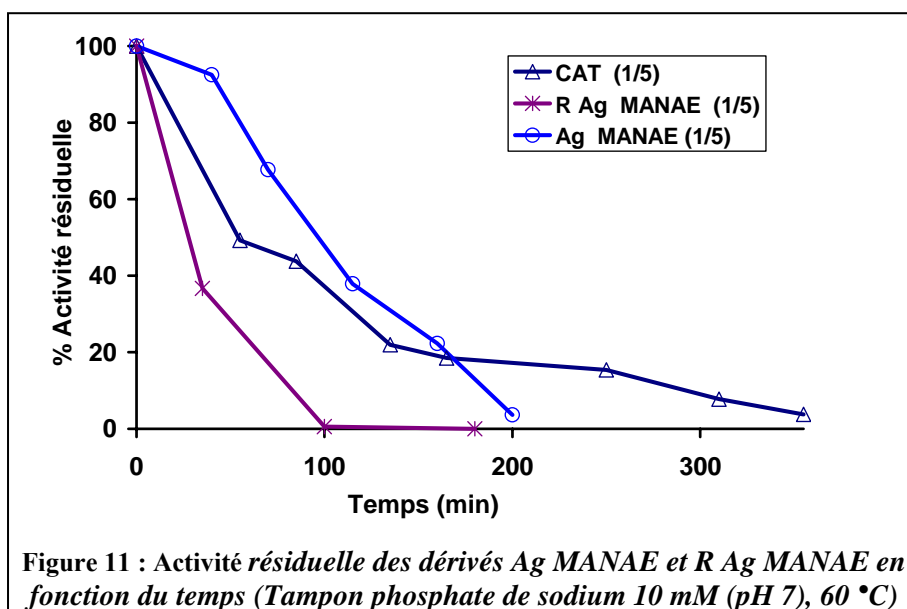
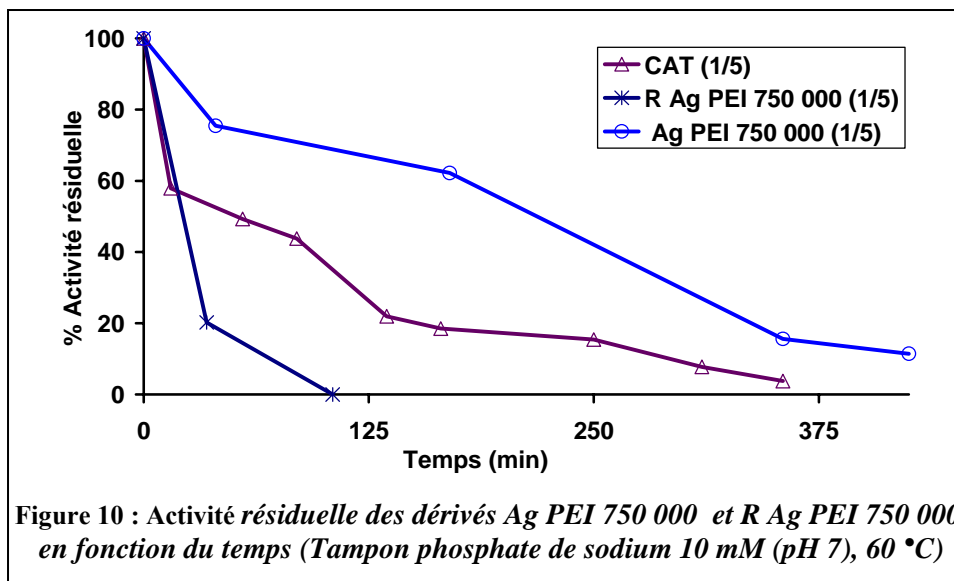
Les trois dérivés réticulés présentent une perte de l'activité enzymatique, particulièrement pour le dérivé Ag MANAE, qui ne garde que 34 % de l'activité. Les valeurs des activités obtenues (Tableau V) sont en accord avec les travaux de Fernández-Lafuente [14] où l'activité de l'enzyme *penicillin G acylase* immobilisée diminuait jusqu'à 50% une fois réticulée. Le dérivé agarose MANAE/ *penicillin G acylase* a été réticulé dans le tampon acétate pH 5 à 22°C et acquiert une plus grande stabilité.

Tableau V: Valeurs de A(U/ml), A(U/g) et % activité des trois dérivés réticulés

Dérivés	A(U/ ml)	A(U/ g)	% activité
Ag PEI 25 000	8647,55	34590,20	
R Ag PEI 25 000	3981,00	16749,60	42,00
Ag PEI 750 000	8070,05	32280,20	
R Ag PEI 750 000	4187,40	16749,60	52,00
Ag MANAE	2420,40	9681,60	
R Ag MANAE	814,40	3257,60*	34,00

Les dérivés R Ag PEI 25 000, R Ag PEI 750 000 et R Ag MANAE ont été incubés à 60 °C dans le tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7). Leur activité vis-à-vis de H₂O₂ a été mesurée à 240 nm et les figures (9-11) illustrent l'évolution de l'activité résiduelle des dérivés réticulés en fonction du temps.





Les dérivés Ag PEI 25 000, Ag PEI 750 000 et Ag MANAE présentent une meilleure thermostabilité que leurs homologues réticulés. La réticulation accélère la perte d'activité de la catalase, et s'annule avant 120 minutes d'incubation à 60°C. Le glutaraldéhyde étant un polymère trifonctionnel [15] continue de réagir par ses nombreux groupements aldéhydes avec les nombreux groupements amines de la catalase induisant un blocage des sites actifs (Schéma.9). Les résultats concernant l'activité de la catalase après réticulation avec le glutaraldéhyde ne sont pas en accord avec les résultats de López-Gallego et Betancor [16, 17] qui montrent que les enzymes les enzymes immobilisées restent actives et qu'elles acquièrent une bonne stabilité thermique même après une longue période d'incubation.

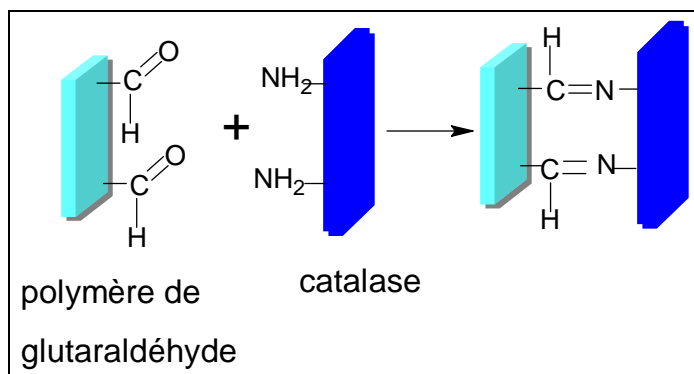


Schéma 9 : Réticulation de la catalase avec le polymère glutaraldéhyde

II.1.2. Activation du support agarose MANAE avec le glutaraldéhyde

L'activation du support agarose MANAE conduit en général à la stabilisation des enzymes immobilisées comme rapportés dans la littérature [18]. 1g d'agarose MANAE est en suspension dans 2 mL de solution de glutaraldéhyde à 0,5 % (v/v) dans le tampon phosphate de sodium 200 mM (pH 7). Le support activé par le glutaraldéhyde est nommé Ag MANAE/ Glut. (Schéma. 10)

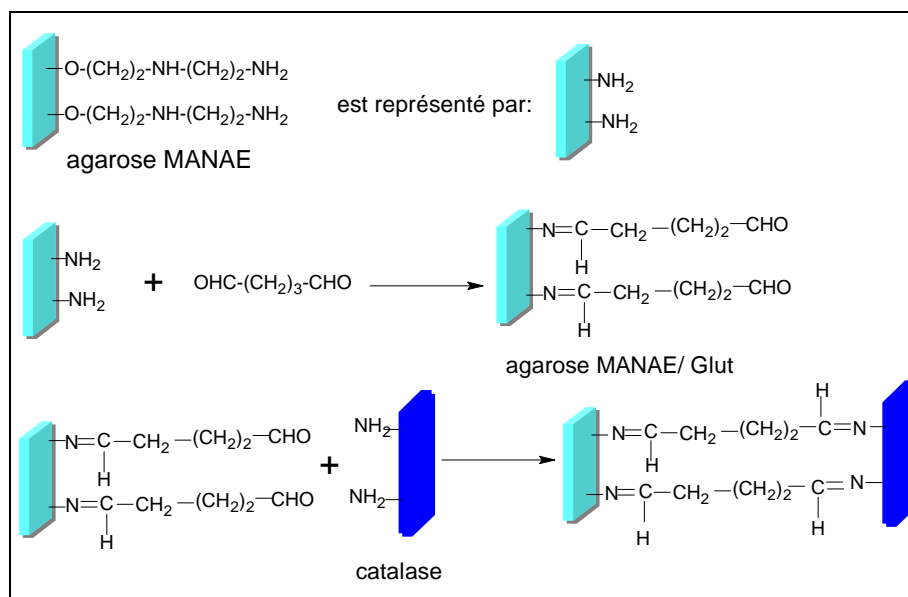


Schéma 10: Immobilisation de la catalase sur l'agarose MANAE activé avec le glutaraldéhyde

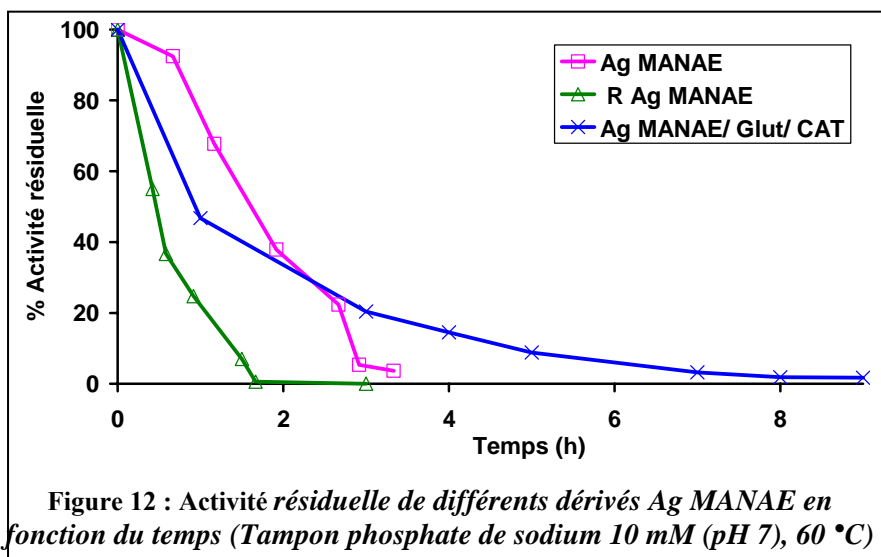
La méthode d'immobilisation de la catalase sur l'agarose MANAE/ Glut est identique à celle correspondant à l'agarose MANAE, et le dérivé obtenu est noté agarose MANAE/ Glut/ CAT. Le tableau VI regroupe les valeurs des activités, A (U/ ml), A (U/ g) et % activité des dérivés Ag MANAE.

Tableau VI: Valeurs des activités des dérivés: A(U/ml) et A(U/g)

Dérivés	A(U/ ml)	A(U/ g)	% activité
Agarose MANAE/ Glut/catalase	1872,00	7488,00	70,00
Ag MANAE	2420,40	9681,60	
R Ag MANAE	<u>814,40*</u>	<u>3257,60*</u>	63,00

Une perte d'activité de l'enzyme immobilisée est observée, comparée à celle de l'enzyme libre. Le glutaraldéhyde peut réagir avec les fonctions amines de l'enzyme qui est traduit par une perte d'activité. Nos résultats sont conformes à ceux rapportés dans littérature [19].

Ces dérivés sont mis dans un tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7) à 60 °C et l'activité résiduelle en fonction du temps est mesurée à 240 nm en UV (Fig. 12).



La figure (12) montre que la catalase perd son activité dans le cas des dérivés. Agarose MANAE/ Glut/catalase Ag MANAE et R Ag MANAE. Néanmoins, le dérivé agarose/ Glut/ CAT est relativement plus stable. Le glutaraldéhyde réagit facilement avec les amines de l'enzyme modifiant ainsi la conformation de la catalase.

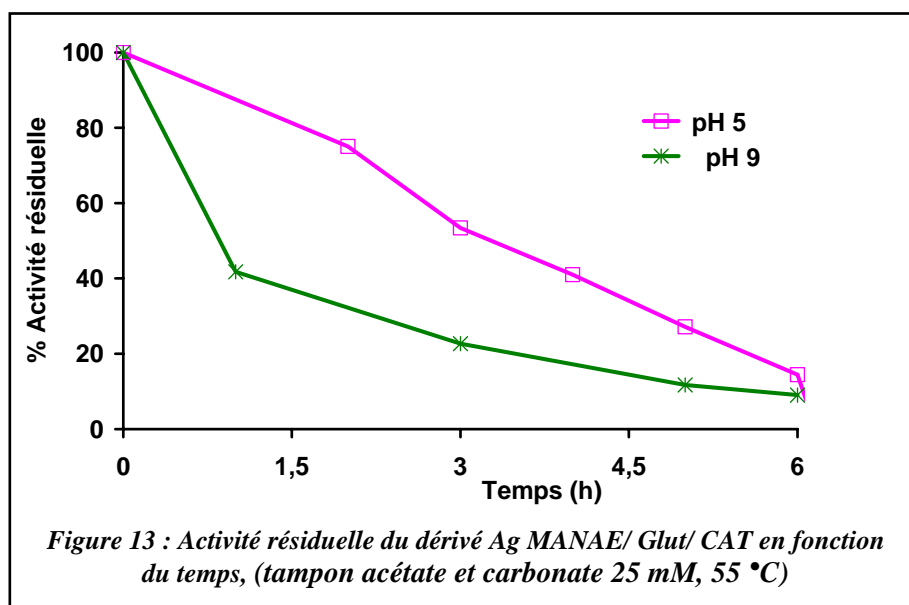
D'après les travaux de Betancor [18], la forme dimère ou monomère du glutaraldéhyde stabilise la glucose oxydase qui garde une activité de 80 % pour 20 h d'incubation à 55 °C (pH 7) quand elle est immobilisée sur agarose MANAE activé avec un dimère du glutaraldéhyde. Alors que pour une activation avec un monomère du glutaraldéhyde, la GOX garde 60 % d'activité dans les mêmes conditions. D'après les travaux de Betancor [18], le glutaraldéhyde est versatile et le choix des conditions de travail est important.

Il a été rapporté par Betancor [17], que le dérivé agarose MANAE/ GOX/ Glut gardait 70 % d'activité après 140 h d'incubation à 55 °C dans le tampon phosphate de sodium 25 mM (pH 7). Tandis que pour le dérivé agarose MANAE/ Glut / GOX, l'activité résiduelle est de 40 % dans les mêmes conditions. Donc la réticulation de l'enzyme une fois immobilisée conduit à une meilleure stabilité.

La catalase avec ses nombreux groupements amine réagit facilement avec les fonctions aldéhydes du polymère glutaraldéhyde conduisant à un changement de conformation.

II.1.3. Effet du pH

Le pH peut changer d'une façon remarquable la stabilité d'une enzyme. Nous avons choisi de suivre l'activité de la catalase aux pH 5 et 9. Nous avons suivi l'évolution de l'activité résiduelle en fonction du temps a été examinée à différents pH. Le dérivé est mis dans le tampon carbonate pH 9 et dans le tampon acétate pH 5, l'évolution de l'activité résiduelle est suivie à 55 °C. Des prélèvements sont effectués pour mesurer l'activité de la catalase. La variation de l'activité résiduelle en fonction du temps est représentée dans la figure 13.



La figure 13 montre que la catalase immobilisée garde son activité à pH 5, alors qu'à pH 9, elle décroît rapidement. Le pH 9 favorise la perte d'activité par ionisation des groupes carboxyliques. A pH 5, les fonctions amines sont protonées favorisant ainsi la fixation du substrat au site actif. Une légère amélioration de l'activité est observée à pH 5 après 2 h d'incubation. Le phénomène de réticulation observé ci-dessous n'est pas éliminé à ces pH. Ce

mode d'immobilisation par liaison covalente résultant de la réticulation avec le glutaraldéhyde n'a pas amélioré la stabilité de la catalase, nous a conduit à travailler avec les supports agarose glyoxyl et agarose CNBr.

II.2. IMMOBILISATION SUR L'AGAROSE CNBr ET L'AGAROSE GLYOXYL

II.2.1. Agarose glyoxyl

L'agarose est un polysaccharide portant de nombreux groupements OH. Toutefois, ces groupements OH, pour des raisons d'encombrements stériques, ne peuvent pas réagir facilement avec la catalase qui est également un polymère. Pour fixer l'enzyme, il est nécessaire de traiter l'agarose avec le glycidol pour former un composé comportant des groupements glyoxyl (-OCH₂-CHO), le support sera notmé agarose glyoxyl. L'encombrement stérique est réduit grâce au groupement (-OCH₂-CHO), ainsi l'enzyme pourra se fixer avec sa fonction amine -NH₂ sur le -CHO pour former une liaison covalente (Schéma 11). L'agarose glyoxyl est mis en contact avec une solution de catalase (tampon carbonate de sodium 100 mM (pH 10)) à 25 °C. Le dérivé est réduit par ajout de borohydrure de sodium (NaBH₄) 1mg/mL.

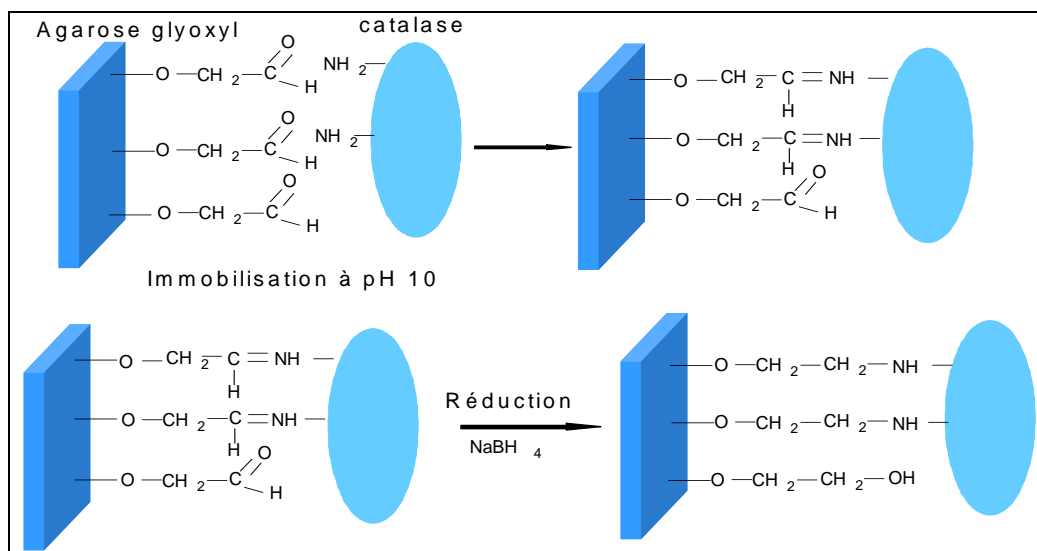


Schéma 11 : Immobilisation de la catalase sur l'agarose glyoxyl

II.2.2. Agarose CNBr

Le sépharose est un polysaccharide constitué d'agarose, noté agarose. Il est utile de l'activer avec du bromure de cyanogène, CNBr, qui conduira à la formation

d'imidocarbonate. C'est l'imidocarbonate qui peut former une liaison covalente avec la fonction $-NH_2$ de l'enzyme selon le (Schéma 12).

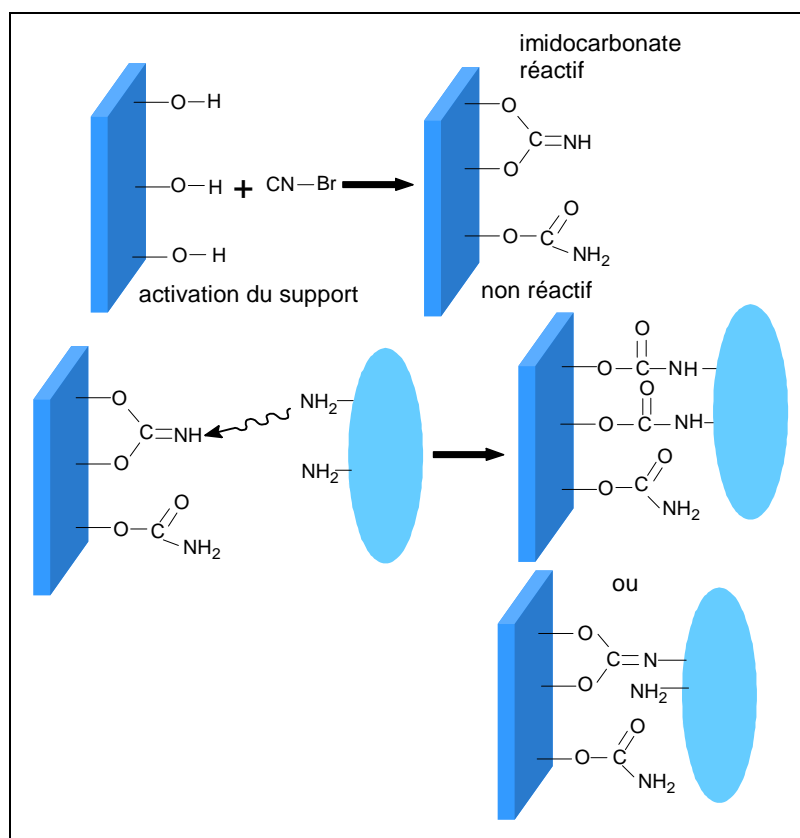


Schéma 12 : Immobilisation de la catalase sur l'agarose CNBr

L'agarose CNBr est en suspension dans une solution de catalase (tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7)), l'immobilisation est réalisée à 4 °C. Les valeurs du taux d'immobilisation Ψ %, et de l'activité A(U/ml) et A(U/g) des dérivés Ag glyoxyl et Ag CNBr sont résumées dans le tableau V, la catalase libre a une activité de 1971,23 U/ mL et 7883,00 U/ g.

Tableau V: Valeurs de Ψ %, A(U/ mL), A(U/ g) et % activité des dérivés Ag CNBr et Ag glyoxyl

Dérivés	Ψ %	A(U/ mL)	A(U/ g)	% activité
Agarose glyoxyl	80.00	1439,00	5754,60	73,00
Agarose CNBr	96	2450,00	9800,00	97,00

➤ L'activité de la catalase immobilisé sur l'agarose CNBr est supérieure à celle immobilisée sur l'agarose glyoxyl. L'agarose glyoxyl possède une très grande stabilité des groupes glyoxyl, qui permettent une très longue multi-interaction enzyme/support et un long

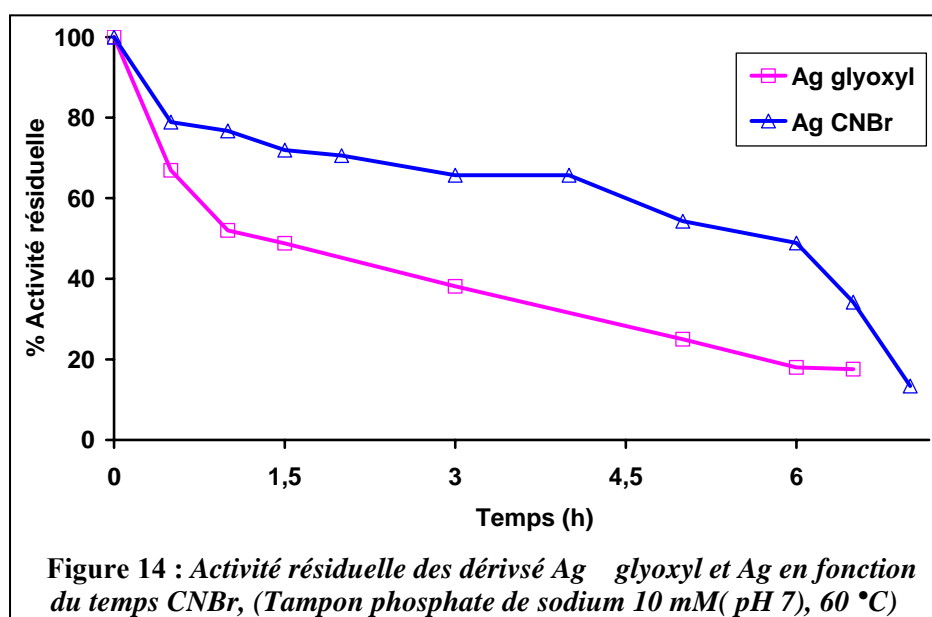
temps de conservation [19] c'est un support idéal. La catalase ne se fixe pas facilement sur ce support. En effet, le temps d'immobilisation est de 9 h et plus. Bien que l'agarose glyoxyl porte un court espaceur, il permet d'atteindre de bons taux d'immobilisation. Selon la littérature [20, 21], l'alcool déshydrogénase se fixe avec un taux d'immobilisation de 100 % et présente une activité résiduelle élevée (91 %). L'immobilisation de l'alcool déshydrogénase ou Penicilin G acilase s'est déroulée à 25 °C et à pH 10. Le lavage du dérivé Ag glyoxyl réduit avec le NaBH₄ peut entraîner la catalase par dissociation des sous-unités comme rapporté par Betancor [18]. La glucose oxydase est immobilisée à 80 % avec une activité résiduelle de 45 % [11]. Le taux d'immobilisation de la catalase foie de bovin sur l'agarose CNBr est de 96 %, proche des valeurs trouvées dans la littérature [18], l'activité résiduelle est de 97 %. Le taux d'immobilisation aussi bien l'activité résiduelle dépendent du type d'enzyme à immobiliser sur le support agarose glyoxyl.

II.3. ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE IMMOBILISEE PAR LIAISON COVALENTE

II.3.1. Etude de l'activité de la catalase immobilisée sur l'agarose glyoxyl et sur l'agarose CNBr

1 g de dérivé est mis en suspension dans le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7 à 60 °C. Des prélèvements sont effectués à différents temps pour mesurer l'activité de la catalase vis-à-vis de H₂O₂ par UV à 240 nm

La figure (14) représente la variation de l'activité résiduelle en fonction du temps de la catalase immobilisée par liaison covalente sur l'agarose glyoxyl et l'agarose CNBr.



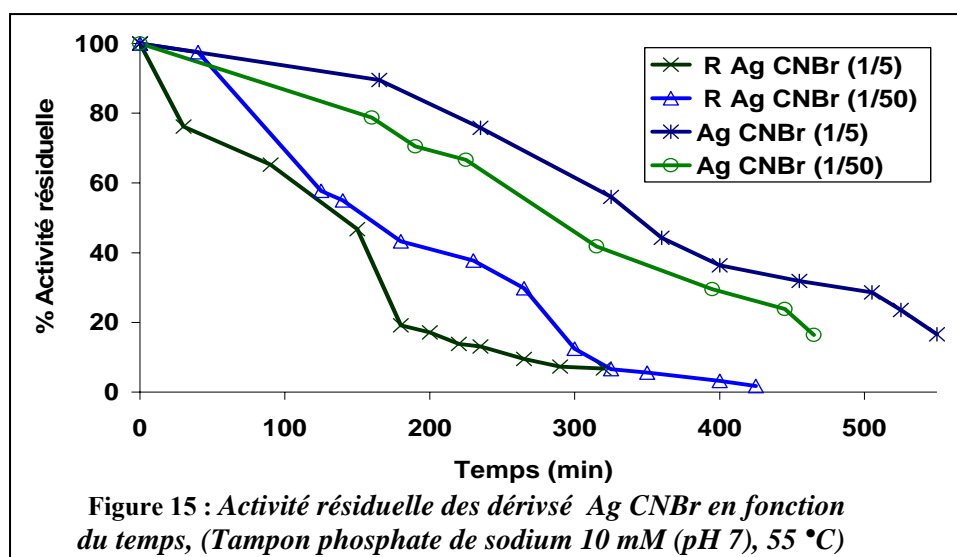
L'activité résiduelle diminue pour les deux supports, et atteint 50 % après 1,5 h de contact d'incubation pour le dérivé Ag glyoxyl et 6 h pour le dérivé Ag CNBr. Ces résultats montrent que la catalase immobilisée sur l'agarose CNBr garde une meilleure stabilité que celle immobilisée sur l'agarose glyoxyl.

II.3.2. Réticulation de la catalase immobilisée sur l'agarose CNBr

La perte d'activité de la catalase immobilisée sur l'agarose CNBr due à la perte des sous-unités qui n'ont pas été liées au support, nous a conduit à la réticulation avec le glutaraldéhyde. Le dérivé AgCNBr est mis en présence d'une solution de glutaraldéhyde de 0,5 % à 25 °C, dans le tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7). Le mélange est filtré, lavé, le dérivé réticulé est nommé R Ag CNBr et stocké à 4 °C.

L'activité résiduelle des dérivés Ag CNBr et R Ag CNBr a été suivie en fonction du temps à 55 °C. Les dérivés sont mis en contact avec un tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5) et l'activité est déterminée en mesurant l'absorbance en UV à 240 nm.

La catalase libre a une activité de 2088,66 U/ mL, 8354,64 U/ g et les dérivés Ag CNBr et R Ag CNBr présentent la même activité $A(U/ mL) = 2025,75$; $A(U/ g) = 8103,00$ et $A(U/ mL) = 1977,25$; $A(U/g) = 7909,00$, la réticulation avec le glutaraldéhyde n'a pas provoqué de perte d'activité. La figure 15 regroupe la variation de l'activité résiduelle pour les dérivés Ag CNBr et R Ag CNBr aussi bien concentré (1/5) que dilué (1/50) en fonction du temps.



La catalase immobilisée est plus stable que la catalase libre. Les suspensions (1/5) et (1/50) du dérivé Ag CNBr gardent respectivement 56 % et 40 % d'activité pour 325 minutes

d'incubation. Pour les suspensions (1/5) et (1/50), le dérivé Ag CNBr/ Glut, a une activité résiduelle de 8 % pour le même temps d'incubation. Une grande la différence d'activité entre les dérivés réticulés et non réticulés est observée.

Le glutaraldéhyde n'a pas amélioré la stabilité de la catalase immobilisée sur l'agarose CNBr, mais elle a acquis une certaine stabilité comparée à l'enzyme des dérivés Ag PEI 25 000, Ag PEI 750 000, Ag MANAE et leurs homologues réticulés avec le glutaraldéhyde. En conclusion, le glutaraldéhyde réagit aisément avec les amines de la catalase ou encore par formation d'un polymère de glutaraldéhyde. La forte réactivité du glutaraldéhyde vis-à-vis des fonctions amines conduit à un changement de conformation d'où la perte d'activité observée. Nos résultats sont en contradictions avec ceux rapportés par la littérature [18], le glutaraldéhyde est utilisé pour éviter le largage de sous-unités qui n'ont pas été fixées sur le support. Le même résultat est observé pour la catalase immobilisée par adsorption sur les supports agarose PEI (Fig. 9, 10) et agarose MANAE (Fig. 11), les dérivés réticulés perdent rapidement leur activité. Donc, ce n'est pas un problème du au type d'immobilisation par adsorption ou par liaison covalente. Par conséquent, la perte d'activité est attribuée à la formation d'un réseau rendant inaccessible le site actif.

II.4 Réticulation avec le dextrane-aldéhyde

Le dextrane est un polysaccharide constitué de molécules de dextrose. Il ne peut pas réagir par ses groupements (-OH), il est oxydé par le périodate de sodium pour produire du dextrane-aldéhyde. C'est sous sa forme aldéhyde qu'il réagit avec les fonctions amines de l'enzyme.

Le problème de stabilité présente un intérêt particulier dans l'utilisation d'enzymes complexes. Ces dernières sont essentiellement inactivées par la dissociation des sous-unités, ce phénomène peut être accéléré dans certaines conditions expérimentales telles que: le pH, faibles ou fortes forces ioniques, température. Pour éviter la dissociation des sous-unités, plusieurs stratégies ont été développées par Poltorack [9]. Les dérivés Ag CNBr et Ag glyoxyl réticulés avec le dextrane-aldéhyde seront étudiés par électrophorèse SDS-PAGE pour mettre en évidence que les sous-unités ne se sont pas dissociées.

II.4.1. Préparation des dérivés

a) Dérivé Ag CNBr et dérivé Ag glyoxyl

1 g de support agarose CNBr ou agarose glyoxyl est mis en contact avec une solution contenant 720 µL de solution dans le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7. La quantité

de catalase est en excès. Les absorbances sont mesurées en UV à 240 nm, les solutions sont diluées pour pouvoir mesurer l'absorbance. La quantité de protéines est mesurée selon la méthode de Bradford.

Le dérivé Ag CNBr ou Ag glyoxyl est mis en contact avec une solution de dextrane-aldéhyde dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7 à 25 °C. Les groupements aldéhydes du dextrane-aldéhyde réagissent avec les groupements amines de la catalase selon le schéma (13), ces liaisons éviteront la dissociation des sous-unités.

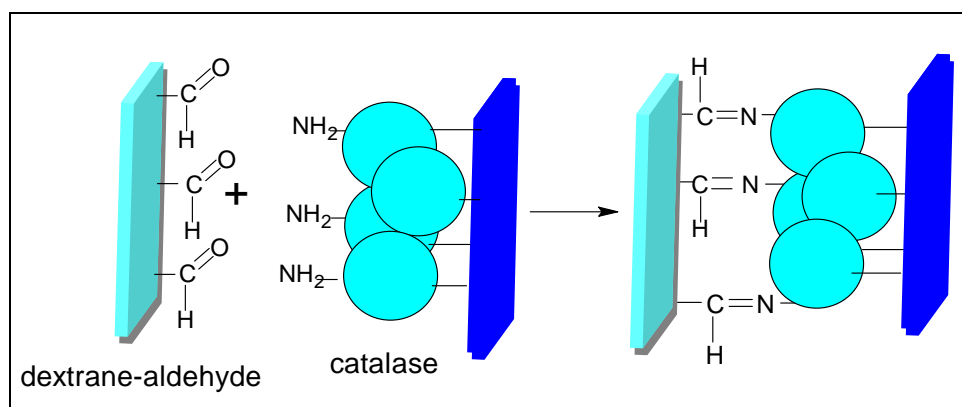


Schéma 13 : Réticulation de la catalase immobilisée avec le dextrane-aldéhyde

Les dérivés réticulés avec le dextrane-aldéhyde sont nommés Ag CNBr/ dext et Ag glyoxyl/ dext. Les valeurs du taux d'immobilisation et des activités des dérivés Ag CNBr, Ag glyoxyl, Ag CNBr/ dext et Ag glyoxyl/ dext sont regroupés dans le tableau VI.

Tableau VI: Valeurs de Ψ , A (U/ ml), A (U/ g) et % activité des dérivés Ag CNBr, Ag CNBr/ dext, Ag glyoxyl et Ag glyoxyl / dext

Dérivés	Ψ %	A(U/ ml)	A(U/ g)	% activité
Ag CNBr	77,394	3994,10	15976,40	
Ag CNBr/ dext	77,394	1142,80	4571,20	28,612
Ag glyoxyl	76,523	3780,70	15122,80	
Ag glyoxyl / dext	76,253	665,55	2662,20	17,603

Nous remarquons une perte d'activité de la catalase suite à la réticulation avec le dextrane-aldéhyde. Cette perte d'activité n'est pas attribuée à une dissociation des sous-unités de la catalase comme le montre l'électrophorèse SDS- PAGE (Schéma 14).

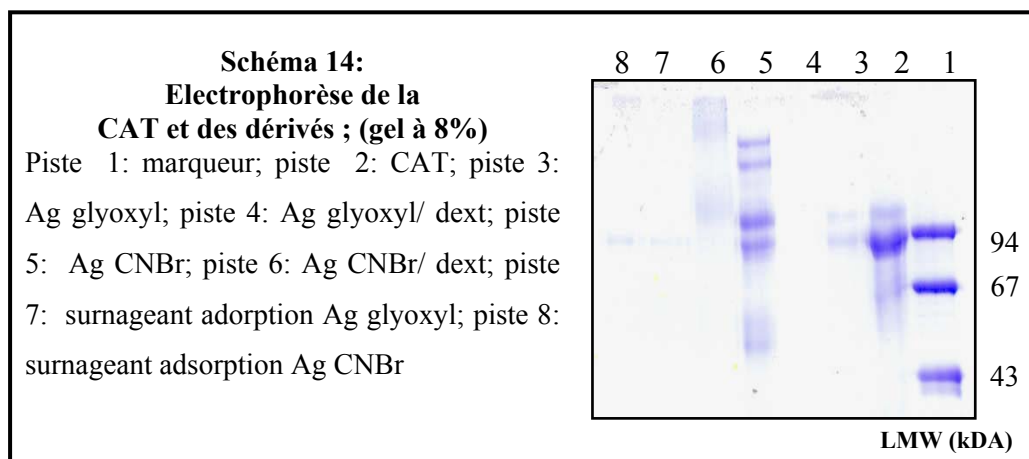
b) Electrophorèse SDS-PAGE des dérivés

Nous avons étudié la dissociation de la structure quaternaire de la catalase des dérivés Ag glyoxyl et Ag CNBr et des dérivés réticulés avec le dextrane-aldéhyde. L'électrophorèse sur gel polyacrylamide « *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* » SDS-PAGE, dans les conditions dénaturantes a été décrite par Laemmli [22]. Les échantillons sont portés à ébullition durant 5 minutes. Le surnageant des échantillons préparés est analysé par électrophorèse SDS-PAGE. L'électrophorèse est détaillée dans la partie annexe.

Les conditions dans lesquelles se fait l'électrophorèse (solution dénaturante et ébullition) ne sont pas en mesure de briser les liaisons formées entre l'amine secondaire et le support [23], mais il est possible de libérer n'importe quelle sous-unité de l'enzyme qui n'est pas liée par covalence au support [24].

Nous remarquons que les dérivés Ag CNBr et Ag glyoxyl ont une grande activité, néanmoins, après la réticulation avec le dextrane-aldéhyde, les deux dérivés présentent une perte d'activité. Le % activité, après réticulation, est de 28,612 % pour le dérivé Ag CNBr et de 17,603 % pour le dérivé Ag glyoxyl. Cette valeur de l'activité après réticulation est due à la grande quantité d'enzymes utilisée pour l'immobilisation, qui provoque un problème de diffusion, réduisant ainsi l'activité.

Les solutions à analyser ont été préparées par dissolution de 0,1 g de dérivé dans 200 µL de tampon de rupture, l'enzyme catalase est préparée avec 100 µL de tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7) et 200 µL de tampon de rupture. Les échantillons dissous dans le tampon de rupture sont portés à ébullition dans un bain marie durant quelques minutes (5 à 10 minutes). L'électrophorèse SDS-PAGE de la catalase immobilisée sur l'agarose CNBr et l'agarose glyoxyl et de leurs homologues réticulés avec dextrane-aldéhyde est représentée dans le Schéma 14.



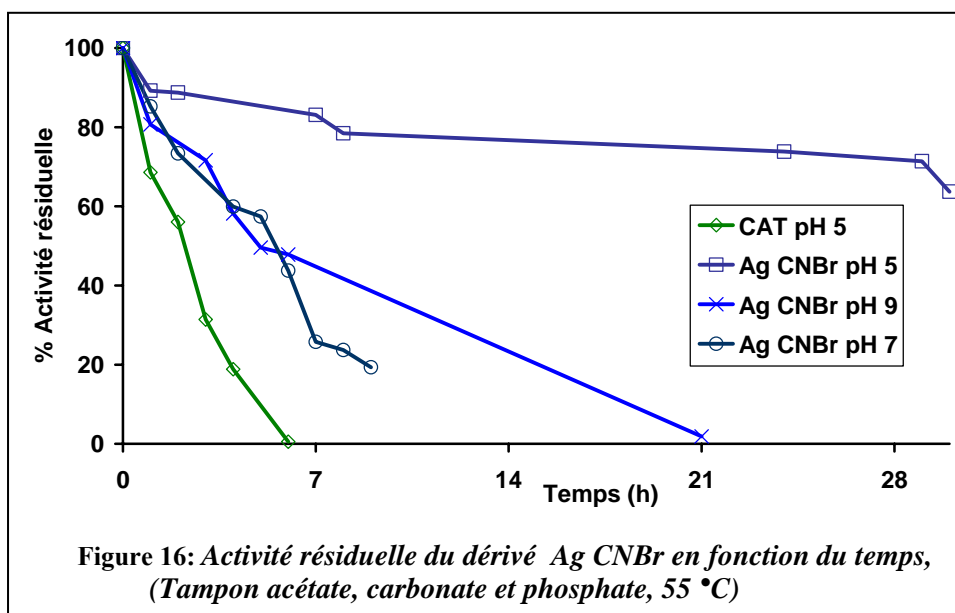
La catalase est légèrement dissociée en sous-unités, pour le dérivé Ag CNBr (Schéma.5, piste 3) et d'une manière plus marquée pour le dérivé Ag glyoxyl (Schéma.14, piste 5), par contre pour les mêmes dérivés réticulés avec le dextrane-aldéhyde, la dissociation de la catalase n'est pas observée (Schema 14, pistes 4 et 6). La réticulation des dérivés avec le dextrane-aldéhyde évite la dissociation de l'enzyme catalase, qui conserve sa structure tétramérique. Nos résultats sont conformes aux travaux de certains auteurs [24-28].

L'électrophorèse SDS-PAGE montre que le dextrane-aldéhyde utilisé pour la réticulation de la catalase, sur l'agarose CNBr et l'agarose glyoxyl [29], évite la dissociation de ses sous-unités. Suite à cette étude, la stabilité des dérivés réticulés avec le dextrane-aldéhyde a été suivie en présence d'ions bivalents. Ces dérivés réticulés avec le dextrane-aldéhyde sont d'un grand intérêt. En effet, ils pourraient être employés dans n'importe quelle application sans contaminer le produit final.

II.4.2. Effet du pH sur l'activité de la catalase immobilisée par liaison covalente

a) Dérivé Ag CNBr

Le dérivé Ag CNBr a une activité de $A(U/ml) = 2513,65$, $A(U/g) = 10\,054,60$ et un % activité = 94,65 %. La mesure de l'absorbance se fait à 240 nm en UV. L'activité résiduelle de la catalase immobilisée a été déterminée à différents pH 5, 7 et 9. La variation de l'activité résiduelle du dérivé Ag CNBr en fonction du temps est suivie à 55 °C (Fig. 16).

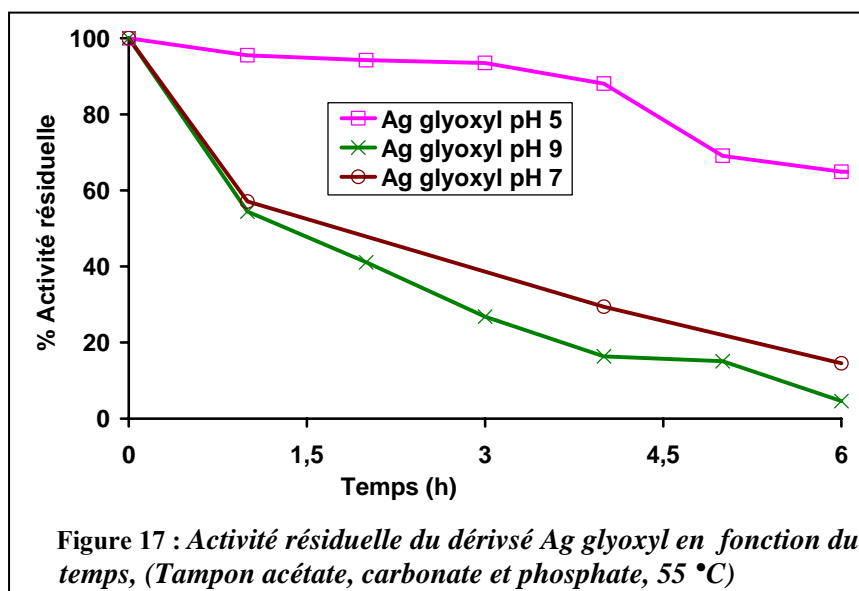


La figure 16 montre une diminution de l'activité en fonction du temps pour tous les pH avec une rétention plus marquée d'activité à pH 5. Pour les pH 7 et 9, la catalase

immobilisée présente une activité nettement inférieure à celle correspondant au pH 5. L'immobilisation de la catalase par liaison covalente sur l'agarose CNBr, ou l'agarose stabilise l'enzyme comme rapporté dans la littérature [21], où le taux d'immobilisation est de 100 % et l'enzyme « alcool dshydrogénase » garde une activité de 91 %. Nous pouvons conclure que le pH 5 est le plus approprié pour minimiser la désactivation de la catalase (Fig. 16).

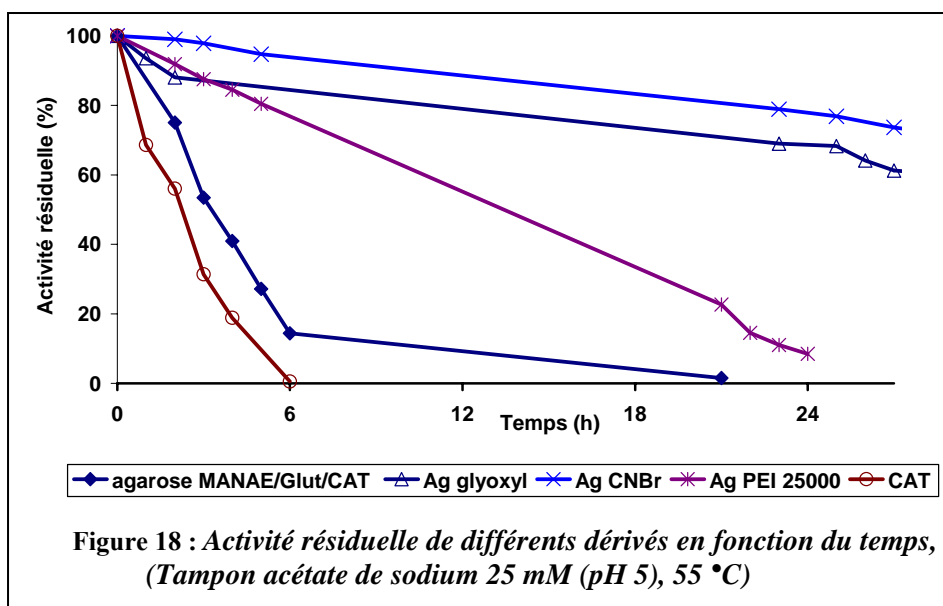
b) Dérivé Ag glyoxyl

Le dérivé Ag glyoxyl possède une activité de $A \text{ (U/ ml)} = 750,00$, $A \text{ (U/ g)} = 3\ 000,40$ et % activité = 68 %. La figure 17 représente l'évolution de l'activité résiduelle en fonction du temps aux pH 5, 7 et 9.



Nous avons comparé l'activité de la catalase immobilisée par adsorption (Ag PEI) et par liaison covalente : Ag CNBr, Ag Glyoxyl, et agarose/ Glut/ catalase (Fig. 18).

La catalase immobilisée sur l'agarose PEI et sur l'agarose MANAE perd rapidement son activité. L'immobilisation de la catalase par liaison covalente sur l'agarose glyoxyl ou sur l'agarose CNBr, lui confère une plus grande stabilité vis-à-vis du pH. Elle présente une activité de 65 % pour 6 h d'incubation.

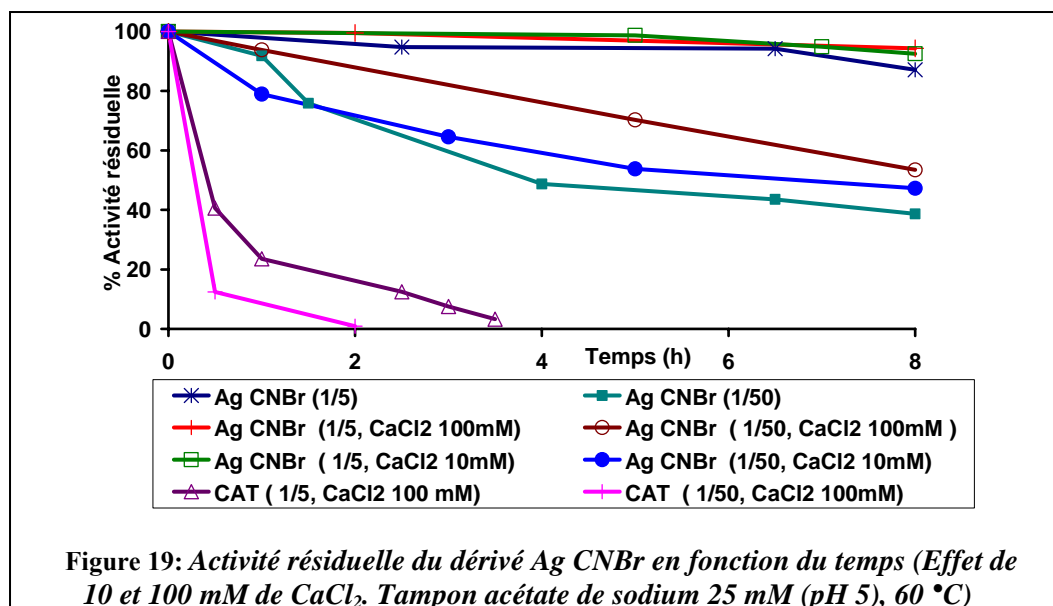


II.5 ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA CATALASE IMMOBILISEE PAR LIAISON COVALENTE EN PRESENCE D'IONS DIVALENTS

Dans le but d'augmenter l'activité de la catalase immobilisée sur les supports agarose CNBr et agarose glyoxyl, nous avons procédé à l'ajout d'ions divalents. Le dérivé Ag CNBr ou Ag glyoxyl est mis en suspension dans une solution contenant des ions à une certaine concentration. L'ion divalent peut chélater les amines de la catalase et les fonctions libres du support. L'activité de la catalase a été suivie en présence des ions bivalents : Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} et Ni^{2+} .

II.5.1. Effet de la concentration en ion Ca^{2+}

Le dérivé Ag CNBr a une activité de $A \text{ (U/ ml)} = 2183,00$ et $A \text{ (U/ g)} = 8732,00$ et une % activité de 96 %. Le dérivé Ag CNBr est mis en contact avec une solution de 10 ou 100 mM en ions Ca^{2+} , dans le tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5) à 60 °C. Des prélèvements sont effectués pour mesurer l'activité de la catalase à 240 nm en spectroscopie UV. La variation de l'activité résiduelle de la catalase est représentée dans la figure 19.



La concentration 100 mM en Ca²⁺ accélère l'inactivation de la catalase libre concentrée et diluée, son activité s'annule avant 4 h d'incubation. L'activité résiduelle du dérivé Ag CNBr (1/5) varie dans le même sens, en présence de Ca²⁺ (10 et 100 mM) ou en son absence

Pour la suspension diluée, nous remarquons que les ions Ca²⁺ augmentent la stabilité de l'enzyme pour des concentrations de 10 et 100 mM. La catalase libre est désactivée rapidement, et la présence des ions Ca²⁺ (10 ou 100 mM) n'empêche pas la dissociation de ses sous-unités qui se traduit par une perte d'activité. Mais une amélioration est observée pour la catalase du dérivé AgCNBr (1/50), le Ca²⁺ joue un rôle de stabilisateur en se chélatant avec les fonctions amine de l'enzyme. Les études suivantes ont porté sur la dénaturation thermique des dérivés Ag CNBr et Ag glyoxyl réticulés avec le dextrane-aldéhyde.

II.5.2. Effet de l'EDTA et du dextrane-aldéhyde.

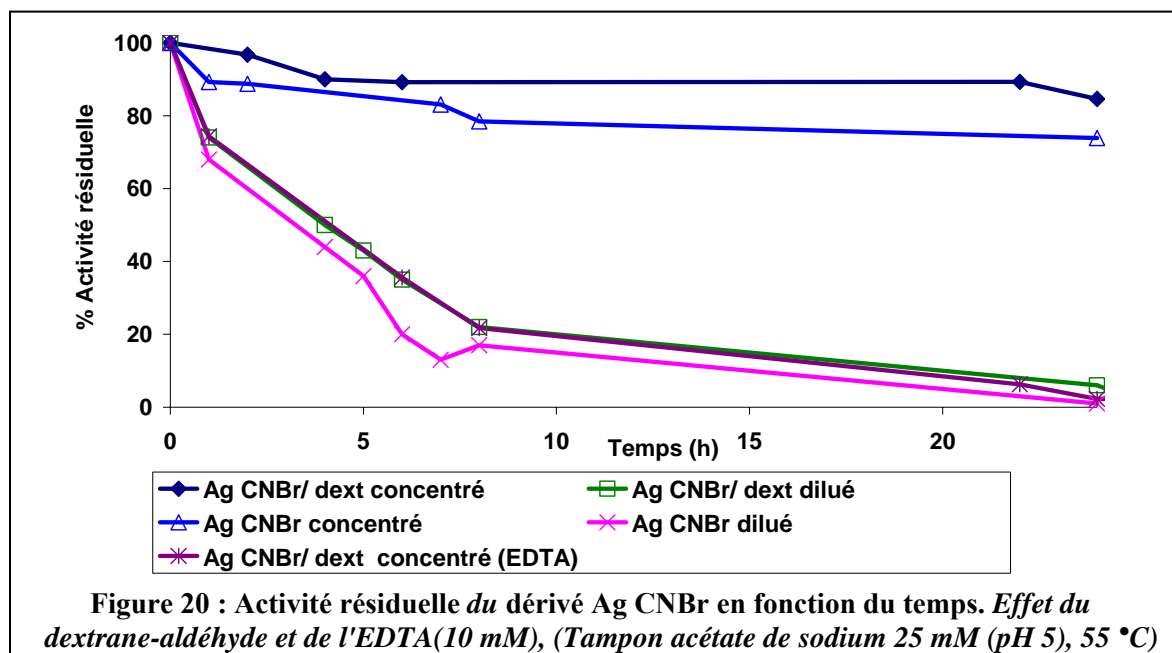
a) Dérivé Ag CNBr

Le dérivé Ag CNBr est en suspension dans une solution d'EDTA dans un tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5) à 55 °C. L'activité est déterminée par la mesure de l'absorbance à 240 nm en UV. Les valeurs de Ψ %, A(U/ ml) et A(U/ g) des dérivés Ag CNBr, Ag CNBr/ dext sont regroupées dans le tableau VII.

Tableau VII : Valeurs de Ψ %, A(U/ mL), A(U/ g) et % activité des dérivés Ag CNBr et Ag CNBr/ dext

Dérivés	Ψ %	A(U/ mL)	A(U/ g)	% activité
Ag CNBr	87,41	2563,78	10255,10	
Ag CNBr/dext	87,41	2183,00	8732,00	85,15

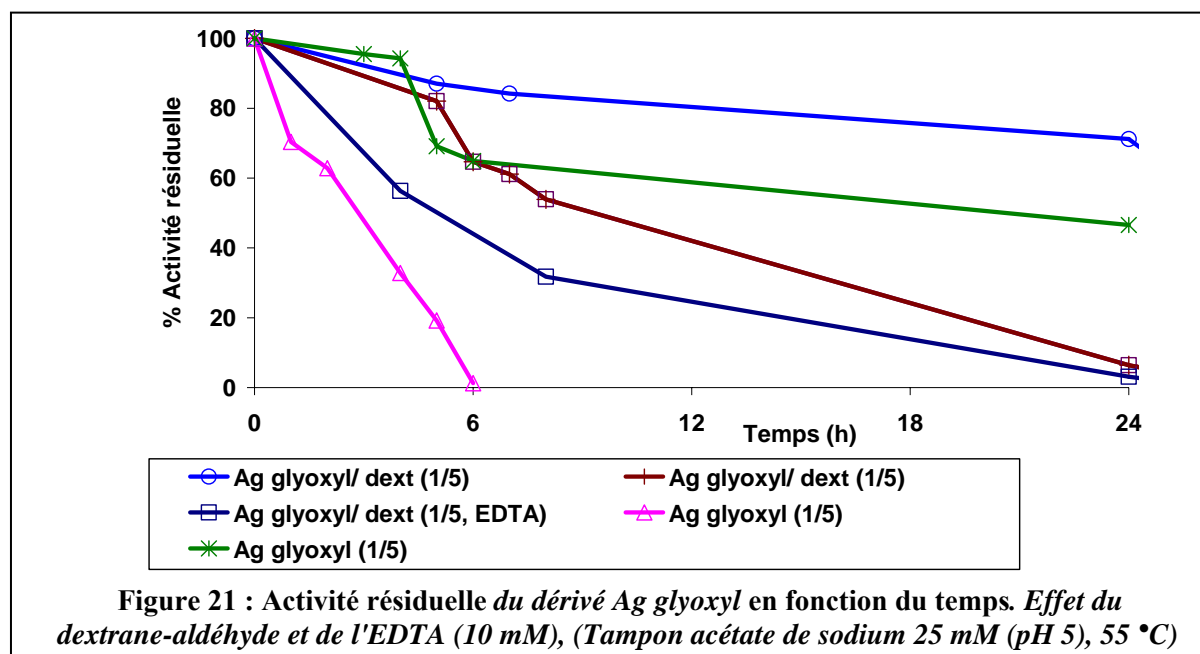
La figure 20 représente la variation de l'activité résiduelle de la catalase du dérivé Ag CNBr en présence du dextrane-aldéhyde et de l'EDTA.



Le dérivé Ag CNBr/dext (1/5) garde une activité plus marquée, comparé à celles des autres dérivés. Le dérivé Ag CNBr réticulé avec le dextrane-aldéhyde acquiert une plus grande stabilité. L'enzyme est plus exposée au milieu, le dextrane-aldéhyde qui est un polymère flexible s'adapte à la forme de l'enzyme. Le dérivé Ag CNBr (1/5) est moins stable que le dérivé Ag CNBr/dext, toutefois, il reste plus stable que les dérivés Ag CNBr/dext (1/50). La présence de l'EDTA accélère la perte d'activité de AgCNBr/dext (1/5). L'EDTA a chélaté un métal indispensable pour l'activité enzymatique d'où la valeur de l'activité résiduelle. Les deux dérivés Ag CNBr/dext (1/5) et Ag CNBr (1/5) présentent une bonne activité résiduelle, avec respectivement 84,61 %, et 78,86 %. Les suspensions diluées Ag CNBr/dext et Ag CNBr présentent une activité résiduelle de 6 % et 1% respectivement. Cette perte d'activité n'est pas attribuée à une dissociation des sous-unités pour le dérivé Ag CNBr/dext ni à une désorption, mais probablement que les fonctions aldéhydes réagissent avec les groupes amines des acides aminés conduisant à une inhibition du site actif.

b) Dérivé Ag glyoxyl

La figure 21 illustre l'effet de l'EDTA et du dextrane-aldéhyde sur la variation de l'activité résiduelle de la catalase immobilisée sur l'Ag glyoxyl. Nous remarquons que le dérivé Ag glyoxyl/dext présente une activité supérieure à celle du dérivé Ag glyoxyl, leur activité respective est de 71,17 % et 46,59 %, donc le dextrane-aldéhyde évite la dissociation des sous-unités de l'enzyme. La présence de l'EDTA conduit à une perte de l'activité enzymatique. Elle est de 3,11% pour le même temps d'incubation (24 h). Pour le dérivé Ag glyoxyl (1/50), nous observons le même phénomène, le dérivé réticulé avec le dextrane-aldéhyde est légèrement plus stable (6,43 %), alors que sans la réticulation, l'activité est de 1,31 %. La présence de l'EDTA accélère la désactivation en chélatant un ion important pour l'activité, le même phénomène est observé pour les 2 supports (Fig. 23) [29].



Ce résultat laisse supposer que la présence d'un ion est nécessaire pour l'activité enzymatique [29]. Le dextrane-aldéhyde a augmenté la stabilité de l'enzyme en évitant la dissociation des sous-unités de la catalase (Fig.20 et Fig. 21).

II.5.3. Effet de l'ion Ca^{2+} sur le dérivé Ag CNBr/dext et l'Ag glyoxyl/ dext

Le dérivé réticulé est mis dans une solution de CaCl_2 préparée à 100 mM dans le tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5). Le peroxyde d'hydrogène est préparé dans le tampon tris HCl 25 mM (pH 7,5) pour éviter la formation de précipités dû à la présence de

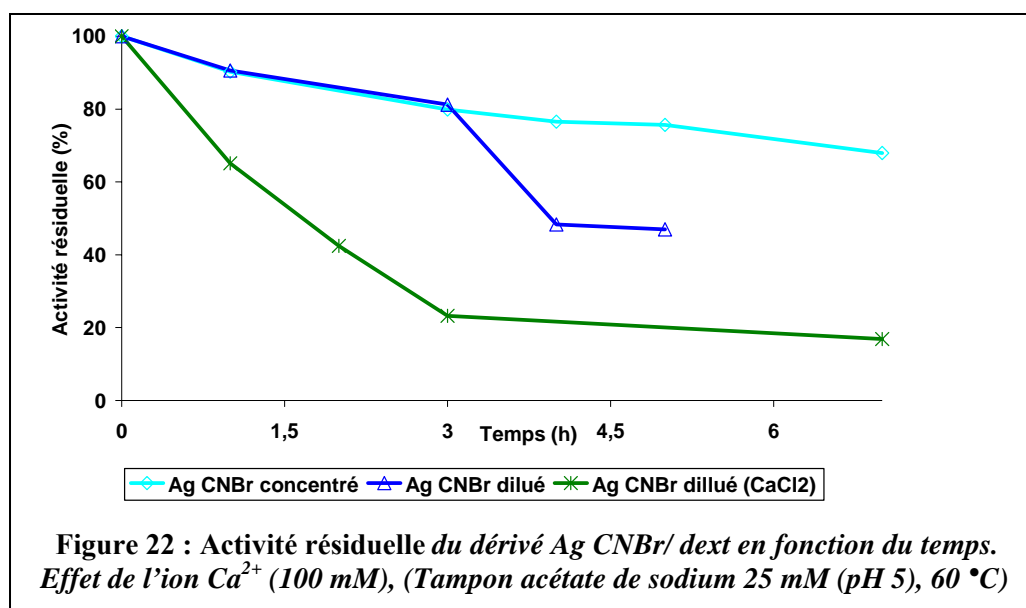
l'ion Ca^{2+} . Le tableau VIII regroupe les valeurs de $\Psi\%$, A(U/ml), A(U/g) et % activité des dérivés Ag CNBr et Ag glyoxyl.

Tableau VIII: Valeurs de $\Psi\%$, A(U/ mL), A(U/ g) et % activité des dérivés Ag CNBr, Ag CNBr/ dext, Ag glyoxyl et Ag glyoxyl/dext

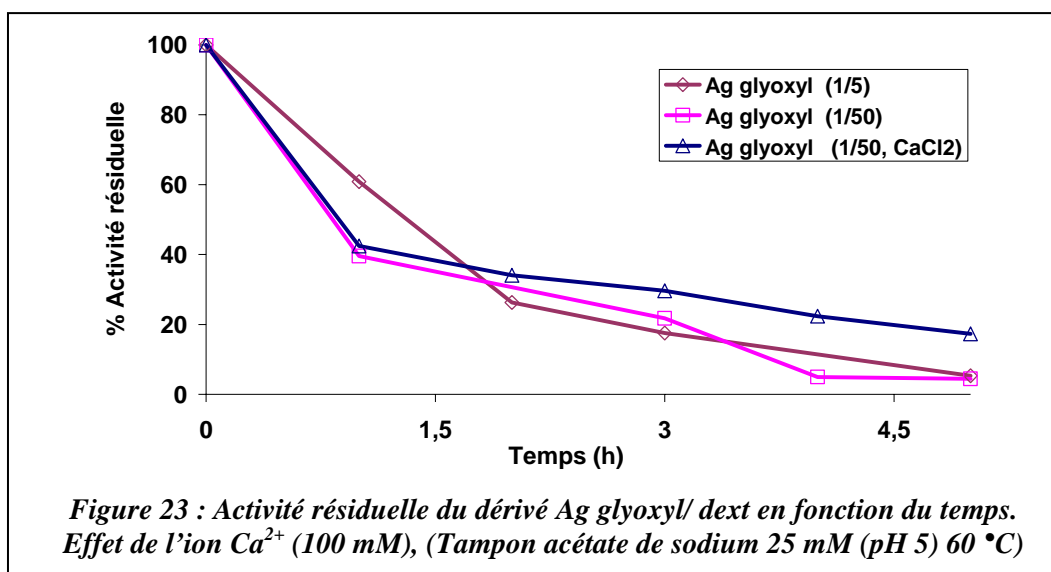
Dérivés	$\Psi\%$	A(U/ mL)	A(U/ g)	% activité
Ag CNBr	92,00	4328,80	17315,20	
Ag CNBr/dext	92,00	3060,83	12243,31	71,00
Ag glyoxyl	90,00	2165,78	8663,12	
Ag glyoxyl/dext	90,00	519,68	2078,72	24,00

Le tableau VIII montre que la catalase présente une perte d'activité pour les dérivés réticulés, et le dérivé Ag glyoxyl/ dext a une activité résiduelle nettement inférieure à celle de l'Ag CNBr/ dext. Les groupements aldéhydes du support agarose réagissent avec avec ceux du dextrane aldéhyde en formant un réseau polymérique qui rend le site actif inaccessible au substrat. L'évolution de l'activité résiduelle en présence et en absence de l'ion Ca^{2+} pour les dérivés Ag CNBr/ dext et Ag glyoxyl/ dext sont représentées respectivement dans les figures 22 et 23.

La figure 22 montre que Ca^{2+} a un effet inhibiteur sur la catalase. La présence de l'ion favorise la dénaturation de la catalase plus rapidement par rapport au dérivé Ag CNBr/dext (1/50). En son absence, l'activité de la catalase décroît moins rapidement. L'ion Ca^{2+} en grande concentration, peut établir un grand nombre de chélation avec les amines de l'enzyme, qui serait à l'origine d'une modification de la conformation de l'enzyme.



Le dérivé glyoxyl/ dext est mis dans une solution de CaCl₂ préparée à 100 mM dans le tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5). L'ion Ca²⁺ ne joue pas le rôle d'activateur pour la catalase immobilisée sur l'agarose glyoxyl après sa dénaturation comme escompté (Fig. 23).



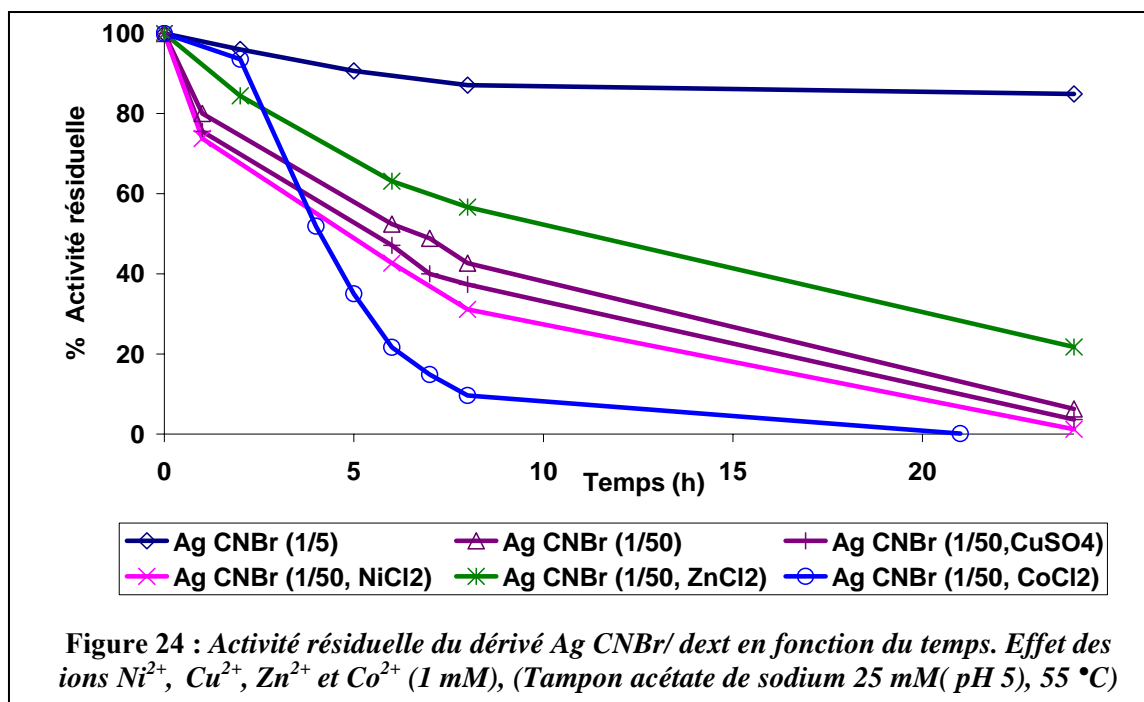
Nous pouvons conclure que le meilleur dérivé est l'Ag CNBr. Après l'étude de l'effet des ions Ca²⁺, Mg²⁺ et Mn²⁺ sur l'activité des dérivés Ag glyoxyl et Ag CNBr nous avons effectué une étude similaire avec les ions Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ et Co²⁺ pour le dérivé Ag CNBr, qui a présenté une meilleure stabilité thermique. L'étude de l'activité de la catalase en présence des ions Mn²⁺ et Mg²⁺ n'a pas été représentée.

II.5.4. Effet des ions : Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ et Co²⁺

➤ **Effet des ions Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ et Co²⁺ : 1 mM**

Les ions divalents jouent un rôle très important dans l'activité enzymatique, et peuvent rendre l'enzyme plus stable. Le dérivé est mis en contact avec une solution d'ions divalents (Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ ou Co²⁺) à 1 mM en milieu acétate de sodium 25 mM pH 5 et à 55 °C. Les valeurs de Ψ %, A (U/ mL), A(U/ g) et % activité des dérivés Ag CNBr et Ag CNBr/dext sont données dans le tableau VIII.

La figure 24 représente l'activité résiduelle en fonction du temps, en présence des ions Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ et Co²⁺ (1 mM). Le meilleur ion pouvant jouer le rôle d'activateur est l'ion Zn²⁺.



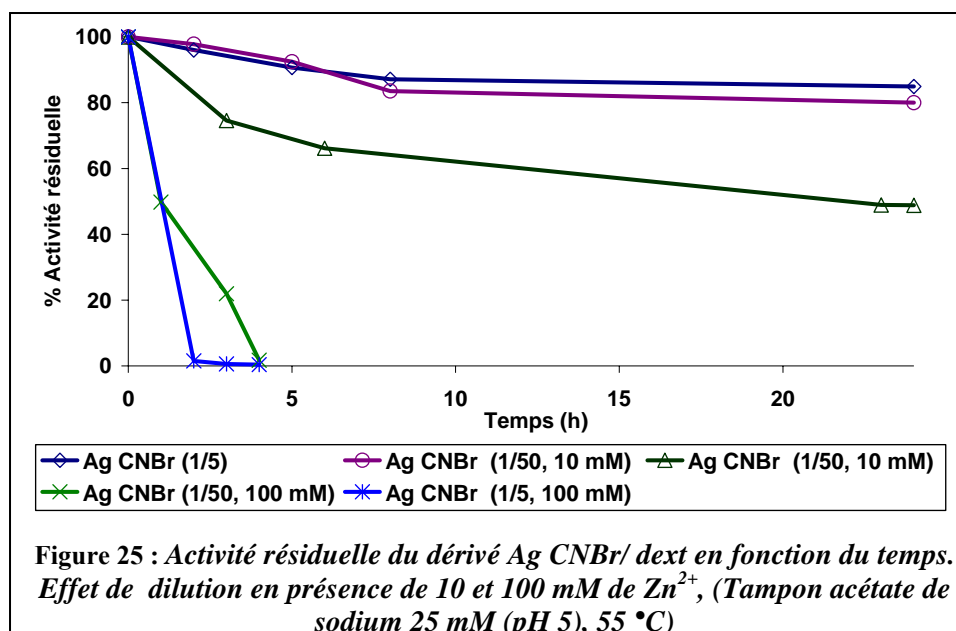
En effet, en présence de Zn^{2+} , le dérivé Ag CNBr (1/50) est plus stable qu'en présence des ions Ni^{2+} , Co^{2+} et Cu^{2+} (Fig. 24). L'ion Zn^{2+} évite l'inhibition du site actif de l'enzyme. Par conséquent, nous avons étudié l'effet de sa concentration sur l'activité enzymatique pour déterminer la meilleure concentration en ions Zn^{2+} .

II.5.5. Effet de la dilution en présence de l'ion Zn^{2+}

a) Dérivé Ag CNBr/dext

Le dérivé réticulé avec le dextrane-aldéhyde (Ag CNBr/dext ou Ag glyoxyl/dext) est mis en présence 10 ou 100 mM en Zn^{2+} dans le tampon 25 mM (pH 5) à 55 °C. Les prélèvements sont effectués pour déterminer l'activité de l'enzyme à 240 nm. Les figures 25 et 26 représentent la variation de l'activité résiduelle de la catalase en présence de l'ion Zn^{2+} .

Nous, remarquons dans la figure 25 que la catalase du dérivé Ag CNBr/dext (1/5) ou (1/50) est désactivée en présence de 100 mM de Zn^{2+} . En effet, la concentration élevée en Zn^{2+} conduit à une chélation avec un grand nombre de groupements amines de l'enzyme rendant le site actif inhibé. Par contre, pour une concentration de 10 mM en Zn^{2+} , la catalase présente une activité respective de 80 % et 48.84 % pour l'état dilué et concentré, après 24 h d'incubation à 55 °C. A cette concentration en Zn^{2+} , la chélation consolide la structure des sous-unités et évite leur dissociation.

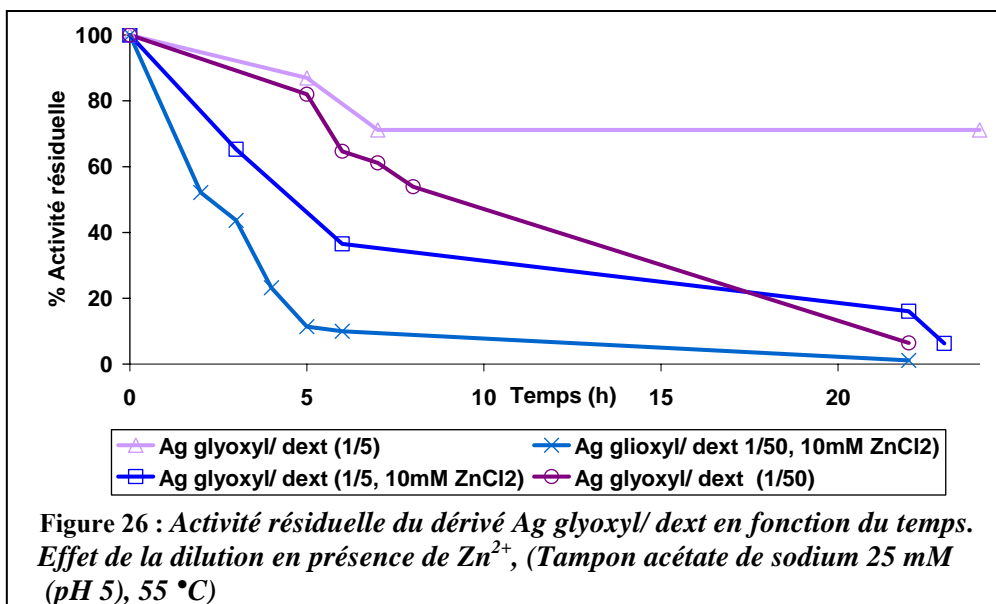


Une concentration élevée en ions Zn²⁺ (100 mM) peut provoquer un changement de conformation du site actif, du à une grande chélation du métal avec les fonctions amines de l'enzyme (Fig. 25).

La meilleure concentration en Zn²⁺ est 10 mM, la catalase reste active pour la suspension (1/5) et (1/50). Pour la concentration 100 mM en ions Zn²⁺, une plus forte chélation est observée, de nombreuses fonctions amines de la catalase sont impliquées, ce qui explique la faible activité. Le site actif a changé de conformation suite à cette chélation.

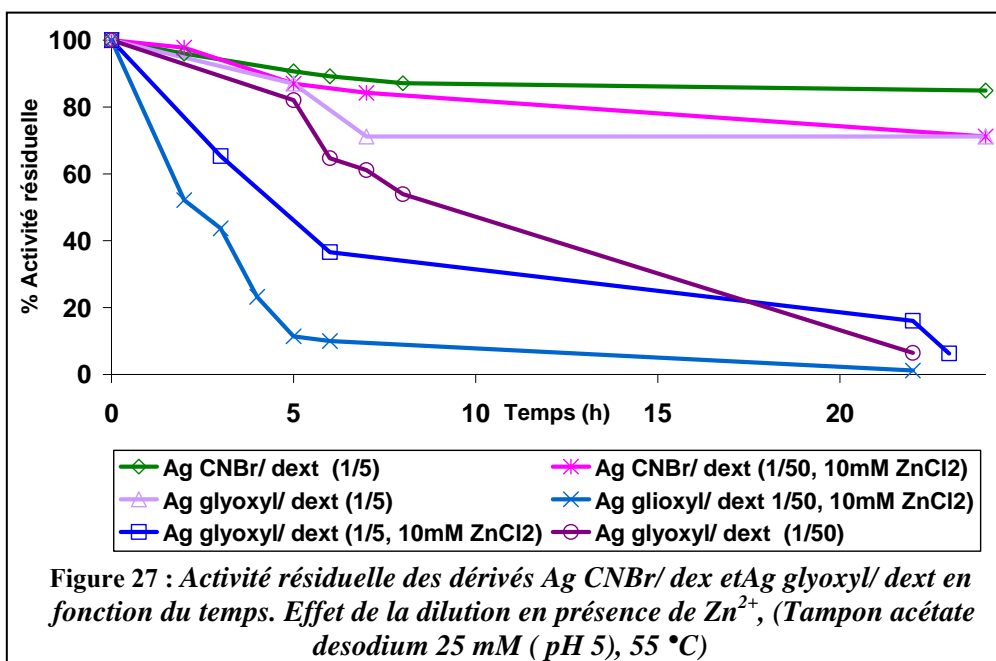
b) Dérivé Ag glyoxyl/dext

Dans le cas de l'agarose glyoxyl, la présence de 10 mM de ZnCl₂ accélère la dénaturation thermique de la catalase pour une suspension (1/50). Tandis que la présence de Zn²⁺ 10 mM améliore la stabilité thermique de la catalase du dérivé Ag CNBr/dext (1/50), alors que l'absence de cet ion montre que la catalase est dénaturée rapidement (Fig. 25). Le dérivé Ag CNBr/ dext (1/5) en présence et en absence de ZnCl₂ (10 mM) garde pratiquement la même activité résiduelle au bout de 24 h, c'est un bon résultat. L'ion Zn²⁺ joue le rôle de stabilisateur pour la catalase du dérivé Ag CNBr/dext. La même observation est faite pour le dérivé Ag glyoxyl (Fig. 26). Toutefois, la catalase est dénaturée rapidement pour 22 h d'incubation pour le dérivé Ag glyoxyl. Le dérivé Ag CNBr (1/5) en présence ou en absence de ZnCl₂ présente le même sens de variation [29].



c) Etude comparative des dérivés Ag glyoxyl et AgCNBr

L'effet de dilution de l'ion Zn²⁺ a également porté sur le dérivé Ag glyoxyl (Fig.27). Le dérivé Ag glyoxyl ne présente pas le même comportement que le dérivé Ag CNBr en présence de 10 mM de Zn²⁺, la catalase perd rapidement son activité pour une suspension (1/50) ou (1/5), elle vaut respectivement 1,13 % et 6,2 % pour 22 et 23 h d'incubation. L'ion Zn²⁺ chelate les acides aminés et cette chélation conduit à une inhibition du site actif. L'ion Zn²⁺ n'a pas empêché la perte d'activité de la catalase immobilisée sur l'agarose glyoxyl contrairement à l'agarose CNBr (Fig.27).

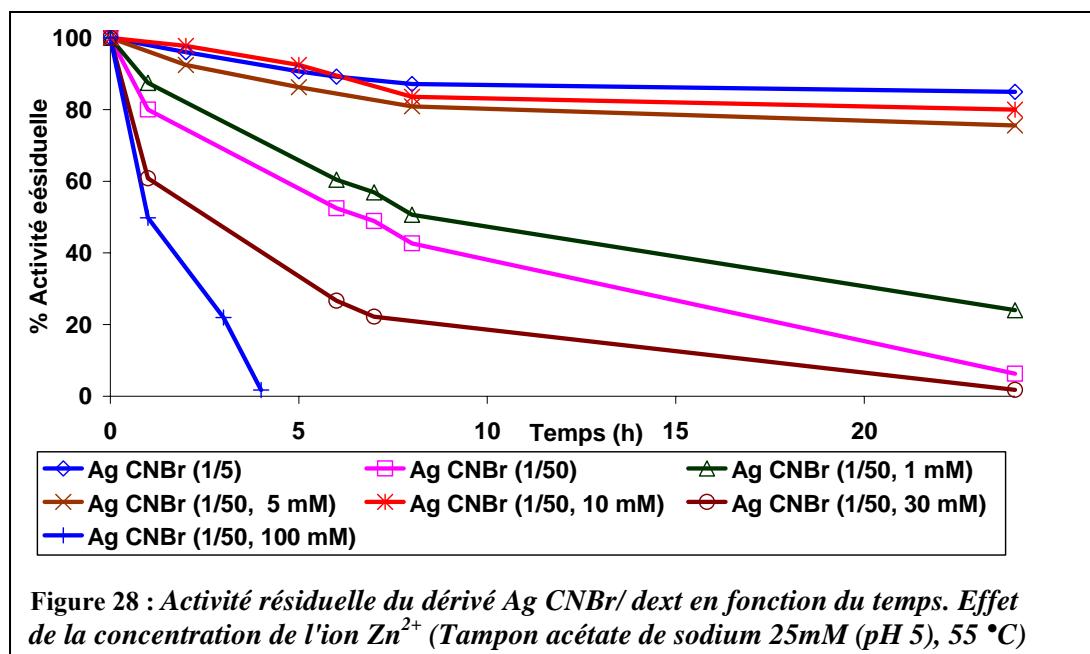


II.5.6. Effet de la concentration de l'ion Zn^{2+}

L'effet de la concentration de Zn^{2+} est étudié dans le tampon acétate de sodium 25 mM pH 5 à 55 °C (Fig. 28). Les meilleures concentrations en ions Zn^{2+} sont 5 et 10 mM. En effet, pour une concentration de 100 mM en Zn^{2+} l'activité de l'enzyme s'annule pour un temps d'incubation de 4 h. La concentration de 1 mM en Zn^{2+} accélère également la désactivation de l'enzyme (24 % pour 24 h d'incubation).

Dans le cas du dérivé Ag glyoxyl, la présence de 10 mM de $ZnCl_2$ accélère la dénaturation thermique de la catalase diluée. Tandis que la présence du cation Zn^{2+} (10 mM) améliore la stabilité thermique de la catalase du dérivé Ag CNBr/ dext pour une suspension diluée, alors que son absence provoque une rapide dénaturation de la catalase.

Cette étude montre que les meilleures concentrations en ions Zn^{2+} sont 5 et 10 mM où l'activité résiduelle est respectivement 75,55 et 80 %. Alors que les concentrations 30 et 100 mM accélèrent la désactivation de l'enzyme (Fig.28). La présence des ions Zn^{2+} permet à l'enzyme catalase de rester active même dans le cas d'une dilution (1/50).



L'ion Zn^{2+} joue le rôle d'activateur pour la catalase immobilisée sur l'agarose CNBr/ dext. La même observation est faite pour l'agarose glyoxyl, néanmoins, la catalase est dénaturée rapidement pour 22 h d'incubation pour le dérivé Ag glyoxyl (Fig.27). Le dérivé Ag CNBr à l'état concentré en absence de Zn^{2+} présente le même sens de variation que la catalase à l'état dilué en présence de 5 et 10 mM $ZnCl_2$ (Fig.28) [29].

Conclusion

L'étude de la dénaturation thermique de la catalase immobilisée sur les supports les plus importants: agarose PEI 750 000, agarose PEI 25 000, agarose MANAE, agarose glyoxyl et agarose CNBr, a montré que le meilleur support pour la stabilité de la catalase est l'agarose CNBr. En effet, l'immobilisation de la catalase sur ce support lui permet de garder 75 % de son activité, et lui assure ainsi une stabilisation 30 fois supérieure à l'enzyme soluble.

De plus, l'électrophorèse SDS-PAGE a montré que peu de sous-unités de la catalase ont été dissociées pour les dérivés Ag CNBr et Ag glyoxyl. Cependant, ce problème peut être évité par une réticulation avec le dextrane-aldéhyde.

La structure multimérique de l'enzyme a été stabilisée en effectuant une réticulation avec le dextrane-aldéhyde après son immobilisation sur l'agarose CNBr. Néanmoins, il faut noter que ce traitement réduit l'activité de la catalase de 70 à 80 % approximativement et l'électrophorèse SDS-PAGE montre que les sous-unités de la catalase ne se sont pas dissociées. Le dérivé Ag CNBr/dext peut être utilisé dans n'importe quelle application sans contaminer le produit final. Néanmoins, il faut noter que l'enzyme à l'état dilué reste moins stable que l'enzyme à l'état concentré, suggérant qu'il existe un phénomène de dissociation des sous-unités.

La structure quaternaire de l'enzyme stabilisée est inactive en présence de 10 mM d'EDTA, alors qu'à 25 °C cet agent de chélation n'a pas un effet important sur la stabilité de l'enzyme. Cependant, à 55 °C une réduction de la stabilité enzymatique est observée ce qui nous permet de supposer que la stabilité enzymatique dépend d'un cation.

L'incubation de l'enzyme immobilisée à 55 °C en présence de différents ions (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+}), a montré que les ions Cu^{2+} et Ni^{2+} réduisent l'activité enzymatique de la CAT alors que l'ion Zn^{2+} augmente sa stabilité et celle-ci croît dans le même sens que la concentration de l'ion Zn^{2+} .

L'immobilisation de l'enzyme catalase, suivie de la réticulation avec le dextrane-aldéhyde évite la dissociation des sous-unités d'une part, et d'autre part la stabilité enzymatique est favorisée. Néanmoins, l'effet de dilution n'est pas annulé même suite à la réticulation avec le dextrane-aldéhyde.

L'ajout de l'ion Zn^{2+} dans le milieu réactionnel permet d'éliminer totalement la dissociation des sous-unités et d'augmenter sa stabilité. Ces résultats suggèrent que l'ion Zn^{2+} joue un rôle important sur la stabilité enzymatique, rendant cet ion indispensable pour éliminer les effets indésirables dus à la dilution qui réduisent ainsi la stabilité de l'enzyme. Le

rôle du dextrane-aldéhyde permet d'éviter la dissociation des sous-unités favorisant ainsi sa stabilité. De plus, elle peut être augmentée par addition de Zn^{2+} dans le milieu réactionnel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Guisán J M: (Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes); *Enzyme and Microbial Technology* 10: 375-382; (1988).
- 2) Mateo C, Abian O, Fernández-Lafuente R et Guisán JM: (Reversible enzyme immobilization via very strong and non-distorting ionic adsorption on support-polyethyleneimine composites); *Biotechnol Bioeng.*; 68: 98-105; (2000).
- 3) Fernández-Lafuente R, Rosell CM, Rodríguez V, Santana C, Soler G, Bastida A et Guisán JM: (Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method); *Enzyme Microb Technol*; vol 15: 546-550; (1993).
- 4) Pessela BCC, Betancor L, Lopez-Callego F, Tores R, Dellamo-Ortiz GM, Alonso-Morales N, Fuentes M, Fernández-Lafuente R, Guisán JM et Mateo C: (Increasing the binding strength of proteins PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength); *Enzyme Microb Tech*; 37: 295-299; (2005).
- 5) Fernández-Lafuente R, Hernández-Jústiz O, Mateo C, Terreni M, Fernández-Lorente G, Moreno MA, Alonso J, García-López JL, Guisán JM: (Biotransformations catalyzed by multimeric enzymes: stabilization of tetrameric ampicillin acylase permits the optimization of ampicillin synthesis under dissociation conditions); *Biomacromolecules* , 2, 95-104; (2001).
- 6) Arica MY et Bayramoglu G: (Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine-grafted poly (GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis); *J Mol Catal. B*; 38:131-138; (2006).
- 7) González P, Batista-Viera F et Brena B M: (Polyethylenimine coated agarose supports, for the reversible immobilisation of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*); *International Journal of Biotechnology*; 6: 338-345; (2004).
- 8) Poltorak OM, Chukhary ES, Torshin IY: (Dissociative thermal inactivation, stability and activity of oligomeric enzymes); *Biochemistry, Moscow*; 63: 360-369; (1998).

- 9) Poltorak OM, Chukhray ES, Torshin IY, Atyaksheva LF, Trevom MD et Chaplin, MF: (Catalytic properties, stability and the structure of the conformational lock in the alkaline phosphatase from *Escherichia coli*); *J Mol Catal B Enzym*; 7: 165-172; (1999).
- 10) Attwood PV et Geeves MA: (Changes in catalytic activity and association state of pyruvate carboxylase which are dependent on enzyme concentration); *Arch Biochem. Biophys.* 401: 63-72; (2002).
- 11) Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora-Ortiz G, Guisán JM et Fernández-Lafuente R: (Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger*); *Journal of Biotechnology*; 121: 284–289; (2006).
- 12) Pessela B C.C, Munilla R, Betancor L, Fuentes M, Carrasco A V, Vian A, Fernández-Lafuente R, Guisán J M: (Ion exchange using poorly activated supports, an easy way for purification of large proteins); *Journal of Chromatography A*, 1034; 155-159; (2004).
- 13) Katchalski- Katzir E: (Immobilized enzymes; learning from past success and failures); *Trends Biotechnol*; 11: 471- 478; (1993).
- 14) Fernández-Lafuente R, Rosell C M, Rodríguez V et Guisán J M: (Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents); *Enzyme Microb Technol*; 17: 517–523; (1995).
- 15) Monsan P: (Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization); *J. Mol. Cat*; 3: 371-384; (1978).
- 16) López-Gallego F, Betancor L, Mateo C, Hidalgo A, Alonso-Morales N et Dellamora-Ortiz: (Enzyme stabilization by glutaraldehyde cross-linking of adsorbed proteins on aminated supports); *J Biotechnol*; 119:70–75; (2005).
- 17) Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora- Ortiz G, Mateo C, Fernández-Lafuente R et Guisán Jose M: (Different mechanisms of protein immobilization

on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions); *Enzyme Microb Technol*; 39: 877-882; (2006).

18) Betancor L, Hidalgo A, Fernández-Lorente G, Mateo C, Rodríguez V, Fuentes M, et Guisan JM: (Preparation of a stable biocatalyst of bovine liver catalase using immobilization and post immobilization techniques); *Biotechnol Prog*; 19: 763–767; (2003).

19) Blanco RM, Calvete JJ, Guisán JM: (Immobilization–stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multi-point covalent attachment); *Enzyme Microb Technol*; 11: 353–359; (1988).

20) Mateo C, Abián O, Bernedo M, Cuenca E, Fuentes M, Fernández-Lorente G, Palomo, JM, Grazú V, Pessela BCC et Giacomini C: (Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins); *Enzyme and Microbial Technology*; 37: 456-462; (2005).

21) Bolivar JM, Wilson L, Ferrarotti SA, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R, Mateo C: (Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalent immobilization on glyoxyl-agarose);. *J Biotechnol*; 125: 85-94; (2006).

22) Laemmli UK: (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4); *Nature*, 227: 680-685; (1970).

23) Blanco RM, Guisan JM.; (Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose–aldehyde gels; Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives.); *Enzyme Microb Technol*;11: 360–366; (1989).

24) Fernández-Lafuente R, Rodríguez V, Mateo C, Penzol G, Hernández-Justiz O, Irazoqui G, Villarino A, Ovsejevi K, Batista F et Guisán JM: (Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques); *J Mol Catal B: Enzym*; 7: 181–189; (1999).

25) Guisán JM, Penzol G, Armisen P, Bastida A, Blanco RM, Fernández-Lafuente R et Garcia-Junceda E: (Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrate: reducing

of steric problems). In: biotechnology Series 1. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 261-275; (1997).

26) Hidalgo A, Betancor L, Lopez-Gallego F, Moreno R, Berenguer J, Fernández-Lafuente R, et JM Guisán: (Preparation of a versatile biocatalyst of immobilized and stabilized catalase from *Thermus thermophilus* Structural stabilization of a multimeric enzyme); Enzyme Microb Technol; 33: 278–285; (2003).

27) Fernández-Lafuente R, HernándezJústiz O, Mateo C, Terreni, M., Fernández-Lorente, G., Moreno, M. A., Alonso, J., García-López, J. L., Guisan, J. M: Biotransformations catalyzed by multimeric enzymes: stabilization of tetrameric ampicillin acylase permits the optimization of ampicillin synthesis under dissociation conditions ; Biomacromolecules , 2, 95-104; (2001)

28) Fernández-Lafuente R, Hernández-Ruiz O, Mateo C, Terreni M, Alonso J, García-López J, Moreno M A et Guisan J M: (Stabilization of a tetrameric enzyme amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans*, enables a very improved performance of ampicillin synthesis); J Mol Catal B Enzym; 11: 633-638; (2001).

29) Kaddour S, López-Gallego F, Sadoun T, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM: (Preparation of an immobilized–stabilized catalase derivative from *Aspergillus niger* having its multimeric structure stabilized: The effect of Zn^{2+} on enzyme stability); J Mol Catal B Enzymatic; 55: 142–145; (2008).

CHAPITRE IV
**REACTEURS A CATALASE/
GLUCOSE OXYDASE**

I. ETUDE DE L'OXYDATION DU GLUCOSE EN PRESENCE DE GLUCOSE OXYDASE ET DE CATALASE

Les enzymes solubles n'étant pas récupérables après leur utilisation dans l'industrie, ont été immobilisées. Cette immobilisation sur un support organique ou minéral permet aux systèmes enzyme/ support d'être utilisés durant plusieurs cycles dans un réacteur à l'échelle industrielle.

L'acide gluconique et les sels de gluconate trouvent leur application dans l'industrie alimentaire, textile, pharmaceutique... Nous avons procédé à la recherche des meilleures conditions pour produire de l'acide gluconique. Les paramètres suivants ont été examinés :

- Rapport dérivé à catalase/ dérivé à glucose
- Concentration en glucose
- Différents dérivés à catalase et dérivés à glucose oxydase

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'oxydation du glucose dans quelques réacteurs à glucose oxydase *Aspergillus niger* (GOX) de Sigma et de réacteurs contenant les deux enzymes GOX et la catalase de foie de bovin (CAT FB) de Fluka ou la catalase *Aspergillus niger* (CAT An) qui est un don de Puleva Biotech S.A.

L'oxydation du glucose dans les différents réacteurs a été effectuée à 25°C. Le dérivé à GOX et le dérivé à CAT FB ou An sont en suspension dans 3 mL de solution de glucose de concentration connue. Le dérivé Ag MANAE/ GOX /Glut est obtenu par immobilisation de la glucose oxydase, suivie d'une réticulation avec le glutaraldéhyde. La cinétique d'oxydation du glucose a été suivie en mesurant la concentration de glucose qui n'a pas été oxydé. La solution de glucose est prélevée avec une micropipette dotée d'un filtre.

La concentration en glucose est déterminée par l'absorbance du glucose à 490 nm dans l'appareil (*UV-Visible Elx 800 Microplate Reader Bio-Tek Instrumentd Inc Elx 800 Microplate Reader Bio-Tek Instrumend-Inc*). Le glucose est mis en contact avec le réactif (*Glucose Monoliq Ref GL 303 BEN srl*), le mélange est incubé à 37 °C durant 15 min. Les mesures sont faites aussi bien pour la solution initiale en glucose que pour celle prélevée du réacteur. Les dérivés à glucose oxydase et à catalase sont lavés après chaque cycle, et stockés à 4 °C.

II. ETUDE DE DIFFERENTS REACTEURS

II.1. OXYDATION DU GLUCOSE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS

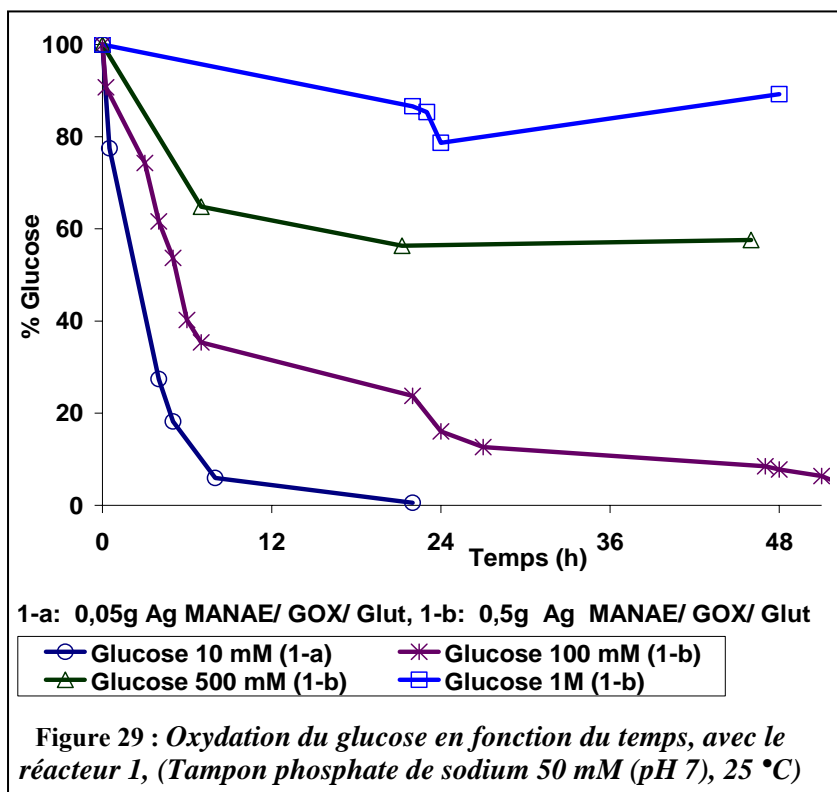
AVEC LE DERIVE Ag MANAE/GOX / Glut : REACTEUR 1

Le réacteur est constitué d'une seringue dotée d'un filtre. Ce type de seringue facilité la récupération des dérivés par simple pression sur le piston. Nous avons étudié différentes formulations en dérivés glucose oxydase et dérivés à catalase. La notation réacteur correspond au système seringue/ dérivés.

Le réacteur 1 contient uniquement le dérivé Ag MANAE/ GOX/ Glut d'activité 11 U/g. dans 3 mL de glucose. Les résultats sont représentés dans la figure (I-1). Les surnageants de glucose prélevés sont dilués de manière à avoir une concentration de 2 mM.

- ✓ **Réacteur 1-a** : 0,05 g de dérivé Ag MANAE/GOX /Glut: solution de glucose 10 mM
- ✓ **Réacteur 1-b** : 0,5 g de dérivé Ag MANAE/GOX /Glut: solution de glucose 100 mM; 500 mM et 1 M

L'oxydation du glucose en fonction du temps et en présence du dérivé Ag MANAE/GOX /Glut est représenté dans la figure (29).



Pour le réacteur 1-b (0,5 g de Ag MANAE/ GOX/ Glut), nous remarquons que la quantité de glucose restant dépend de la concentration initiale en glucose. Pour un temps d'incubation de 22 h, il se forme 99,5 % et 76,26 % d'acide gluconique Pour la concentration 10 mM et 100

mM de glucose respectivement. La conversion en acide gluconique est de 42,44 % pour 500 mM et de 11 % pour 1 M respectivement pour des temps d'incubation de 46 et 48 h.

La désactivation de la glucose oxydase peut être attribuée à la concentration élevée en glucose (100 mM et 500 mM et 1 M) ou par le produit de l'oxydation du glucose qui est le peroxyde d'hydrogène.

II.2. OXYDATION DU GLUCOSE AVEC LES DERIVES Ag MANAE/ GOX An/ GLUT ET Ag GLYOXYL/ CAT FB : REACTEUR 2

L'oxydation du glucose conduit à la formation de l'acide gluconique et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier est à l'origine de la désactivation de l'enzyme, qui peut être évitée en présence de la catalase. Cette dernière décompose l'eau oxygénée en oxygène et eau. Dans le réacteur 2, l'oxydation du glucose a été faite en présence des dérivés Ag MANAE/GOX An/ Glut (11 U/ g) et Ag glyoxyl/CAT FB (très chargé 40 mg/ g, 482 U/ g). L'oxydation du glucose a été faite avec les combinaisons suivantes.

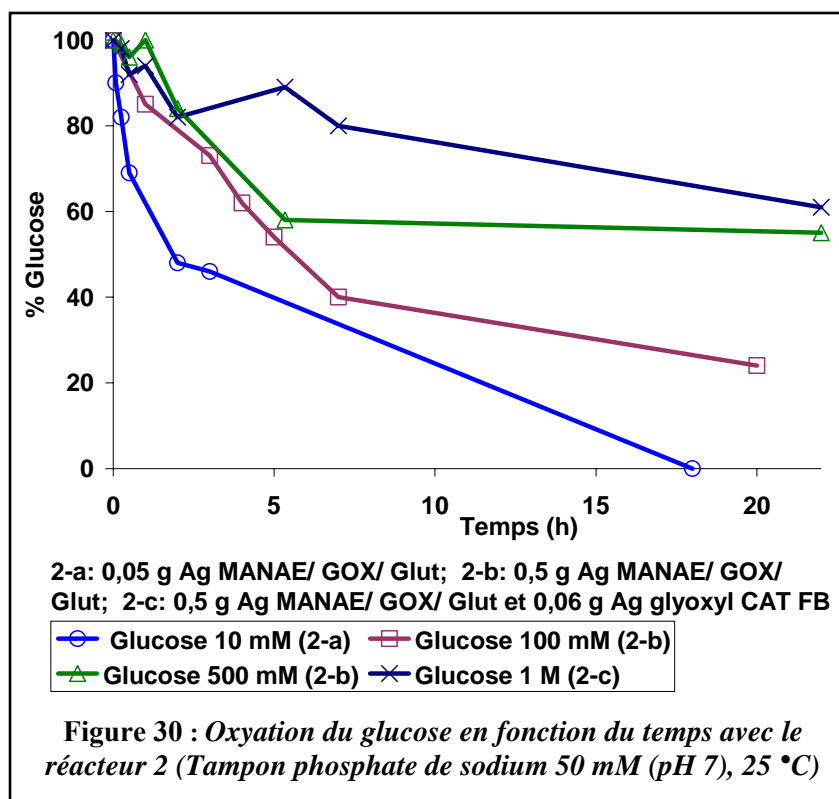
Réacteur 2-a: 0,05 g Ag MANAE/ GOX /Glut et (10 mM de glucose)

Réacteur 2-b: 0,5 g Ag MANAE/ GOX /Glut et (100 et 500 mM de glucose)

Réacteur 2-c: 0,5 g Ag MANAE/GOX/ Glut et 0,06g Ag glyoxyl CAT FB (120,50 U/ml, 482,00 U/ g) et (1 M de glucose).

La solution de glucose est préparée à différentes concentrations (10, 100, 500 mM et 1M) dans le tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 7). La catalase présente une activité de 120,5 U/mL et 482 U/g, soit approximativement 50 fois celle de l'activité de la GOX (11 U/g). La figure 30 représente l'oxydation du glucose en fonction du temps, en présence des dérivés : Ag MANAE/GOX/ Glut et Ag glyoxyl CAT FB.

Le réacteur 2-a montre que le glucose (10 mM) a été totalement oxydé après un temps d'incubation de 18 h. Dans le réacteur 2-b, le taux d'oxydation de 100 mM de glucose après 20 h d'incubation est supérieur à celui de 500 mM de glucose près 22 h d'incubation (76 % contre 45 %). Dans le réacteur 2-c, l'oxydation glucose (1 M) est lente. L'ajout de 0,06 g de dérivé à catalase n'a pas amélioré l'activation de la glucose oxydase.



Cette étude a mis en évidence la perte d'activité enzymatique provoquée par la concentration élevée en glucose d'une part et d'autre part, la glucose oxydase n'a pas été préservée en présence de dérivé à catalase. Au vu de ces résultats, quantité du la dérivé à catalase a été augmentée.

II.3. OXYDATION DU GLUCOSE 500 mM AVEC LES DERIVES Ag MANAE/GOX/ GLUT ET Ag GLYOXYL/ CAT FB : REACTEUR 3

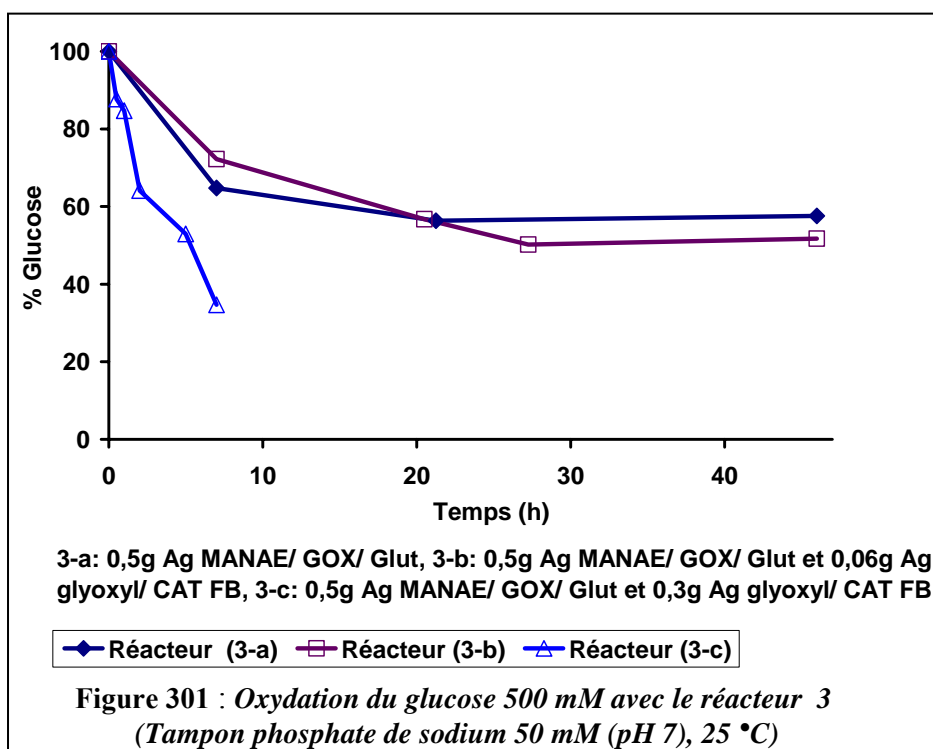
Dans le but de réduire la perte d'activité de la glucose oxydase, qui résulte de la concentration élevée en glucose (1 M) (Fig 29), nous avons travaillé avec une concentration de 500 mM, et de réduire la désactivation de l'enzyme glucose oxydase, l'effet de la quantité en dérivé Ag glyoxyl/ CAT FB pour les 2 réacteurs 3-b et 3-c, ils contenant respectivement 0,06 et 0,3 g de dérivé à Ag glyoxyl/ CAT FB a été examiné.

Réacteur 3-a: 0,5 g Ag MANAE/ GOX/ Glut

Réacteur 3-b: 0,5 g Ag MANAE/GOX /Glut et 0,06 g Ag glyoxyl/CAT FB

Réacteur 3-c: 0,5 g Ag MANAE/GOX /Glut et 0,3 g Ag glyoxyl/CAT FB

La figure 31 représente l'évolution de l'oxydation du glucose en fonction du temps, en présence des dérivés Ag MANAE/GOX/ Glut et Ag glyoxyl CAT FB.



La réaction d'oxydation du glucose est lente pour les réacteurs (3-a) et (3-b). La présence de Ag glyoxyl CAT FB (0,06 g) n'est pas suffisante pour éviter l'inhibition de la glucose oxydase et la cinétique d'oxydation présente la même variation. Dans le réacteur 3-c, le glucose est converti à 65 % en acide gluconique après 7 h d'incubation. Le taux de conversion (65 %) montre que la glucose oxydase n'a pas été inhibée ni par son substrat ni par H₂O₂. La quantité en Ag glyoxyl CAT FB joue un rôle important pour la glucose oxydase, avec 0,3g de dérivé à catalase, une nette amélioration est observée pour l'activité de la glucose oxydase.

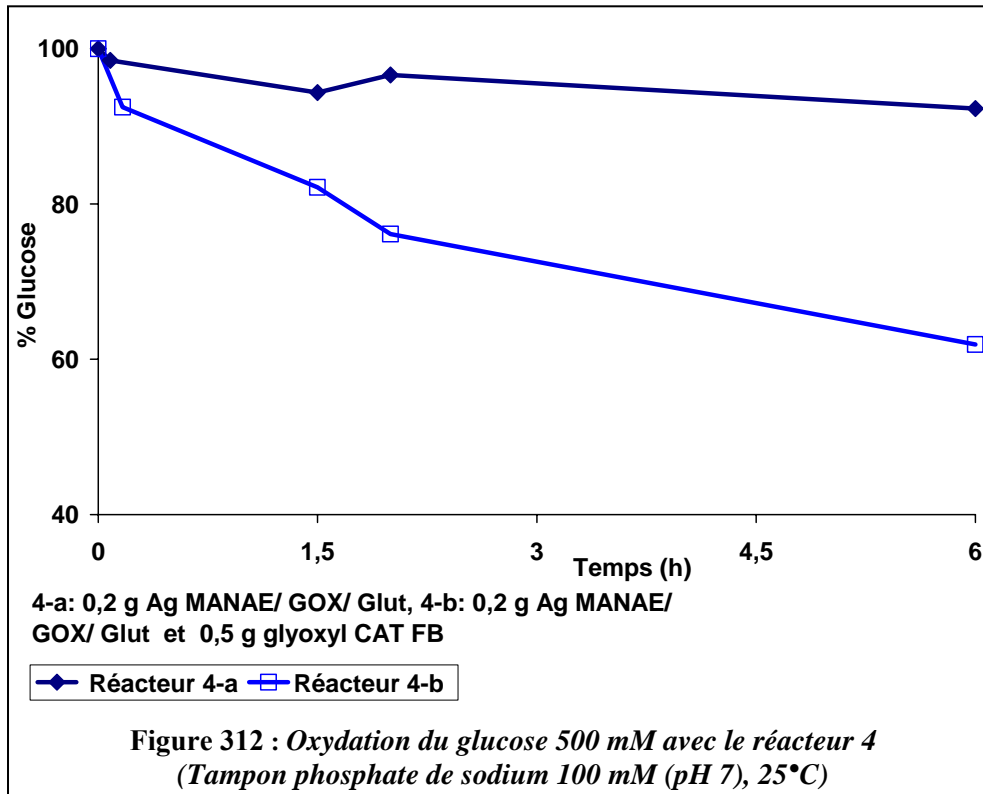
II.4. OXYDATION DU GLUCOSE 500 mM AVEC LES DERIVES Ag MANAE/GOX/ GLUT ET Ag GLYOXYL/ CAT FB : REACTEUR 4

Les dérivés à glucose oxydase et catalase sont dans une solution de glucose 500 mM (tampon phosphate 100 mM pH 7), à 25 °C. Des prélèvements sont effectués à des temps réguliers et la concentration en glucose est déterminée en mesurant l'absorbance à 490 nm. Pour le réacteur 4, les quantité des dérivé Ag MANAE/ GOX An/ Glut et Ag glyoxyl/ CAT FB sont respectivement 0,2 et 0,5 g

Réacteur 4-a: 0,2 g de dérivé Ag MANAE/ GOX / Glut (13,15 U/ g et 5,05 U/ mL)

Réacteur 4-b: 0,2 g de dérivé Ag MANAE/ GOX / Glut et 0,5 g de dérivé Ag glyoxyl/ CAT FB très chargé (815,64 U/ mL, 3262,60 U/ g).

La variation de l'oxydation du glucose en fonction du temps est représentée dans la figure 32.



Le taux d'oxydation du glucose est de 7,71 % pour le réacteur 4-a, alors que pour le réacteur 4-b, une amélioration dans le taux est observée 38,1 % pour le même temps d'incubation 6 h.

II.5. OXYDATION DU GLUCOSE 500 mM A DERIVES Ag MANAE/GOX/ Glut ET Ag GLYOXYL/ CAT FB : REACTEUR 5

Les différents résultats obtenus, nous ont permis de choisir les conditions de travail suivantes:

- ✓ Concentration en glucose 500 mM
- ✓ 0,5 g de dérivé agarose MANAE/GOX /Glut
- ✓ 1,2 g de dérivé Ag glyoxyl/CAT FB

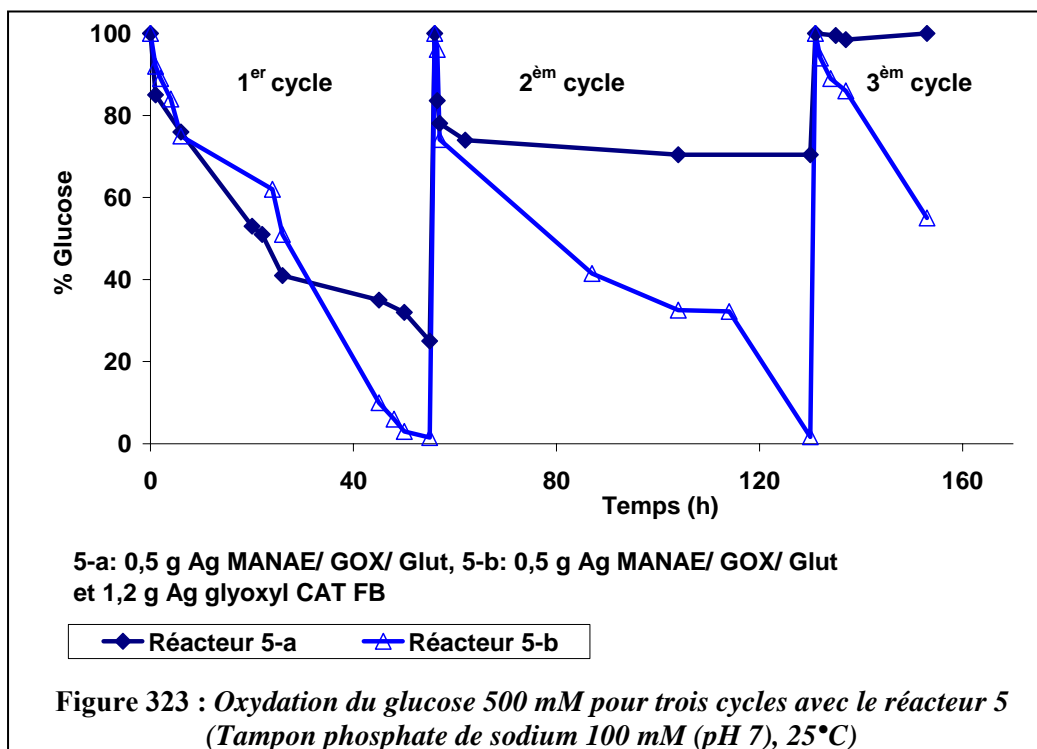
Les dérivés MANAE/GOX /Glut et Ag glyoxyl/CAT FB sont mis en contact avec la solution de glucose (500 mM) dérivés (tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7)). Ces

préparations sont soumises à une agitation magnétique, contrairement aux études précédentes où l'agitation était douce.

Réacteur 5-a: 0,5 g de dérivé Ag MANAE/ GOX/ Glut (13,15 U/ g, 5,05 U/ mL)

Réacteur 5-b: 0,5 g de dérivé Ag MANAE/ GOX /Glut et 1,2 g de dérivé Ag glyoxyl/ CAT FB (20 mg/ g en protéines, $25,35 \cdot 10^3$ U/ mL, $10,14 \cdot 10^4$ U/ g).

La figure 33 représente la variation de l'oxydation du glucose (500 mM) en fonction du temps, pour 2 cycles de travail.



Dans le premier cycle d'oxydation du glucose, il s'est formé respectivement 75 % et 98,5 % d'acide gluconique pour les réacteurs 5-a et 5-b après 55 h d'incubation. Nous remarquons une diminution l'activité de la glucose oxydase dans le deuxième cycle et elle est plus marquée pour le réacteur où la catalase est absente. Le réacteur 5-b contenant de la catalase, permet une conversion de 98.32 %, alors que le réacteur 5-a ne produit que 29,50 % d'acide gluconique. Dans le troisième cycle après 153 h, la GOX An est encore active avec un taux de 45 % pour le réacteur 5-b, alors que la glucose oxydase perd totalement son activité dans le réacteur 5-a.

La formulation (0,5 g Ag MANAE/ GOX /Glut 5,05 U/ mL, 13,15 U/ g) et 1,2 g Ag glyoxyl/CAT FB, $25,35 \cdot 10^3$ U/ mL, $10,14 \cdot 10^4$ U/ g) du réacteur 5 permet de préserver à la glucose oxydase de garder son activité durant trois cycles correspondant à 153 h de temps d'incubation. Cette formulation est très intéressante pour la réalisation d'un réacteur.

II.6. OXYDATION DU GLUCOSE 500 MM AVEC LES DERIVES Ag CNBr/ GOX/ Glut ET Ag CNBR/ CAT An Ag CNBr/ CAT An : REACTEUR 6

Dans le réacteur 5, la présence de la catalase (foie bovin) a évité la désactivation de la glucose oxydase. Ce résultat concluant nous a mené à étudier l'effet de la catalase *Aspergillus niger* sur l'activité de la glucose oxydase.

Pour le réacteur 6, nous avons choisi de travailler avec le dérivé Ag CNBr/ CAT An, en effet, la catalase *Aspergillus niger* immobilisée sur l'agarose CNBr est plus stable. La glucose oxydase a été également immobilisée sur le l'agarose CNBr. Les dérivés Ag CNBr/CAT An et Ag CNBr/ GOX présentent les activités respectives suivantes : $26,13 \cdot 10^3$ U/mL et 12,42 U/ mL.

Nous avons fait, au préalable, une étude préliminaire avec les formulations suivantes en couple de réacteurs: **a/b ; a/c et a/d**

Formulation a: 0,5 g de dérivé Ag CNBr/GOX (12,42 U/ mL) 500 mM de glucose

Formulation b: 0,5g de dérivé Ag CNBr/GOX (12,42 U/ g, 4,14 U/ mL) et 1 g Ag glyoxyl CAT FB (20 mg/g , $26,13 \cdot 10^3$ U/mL, $10,45 \cdot 10^4$ U/g)

Formulation c: 0,1g Ag CNBr GOX (12,42 U/mL, 4,41U/ g) et 0,36g Ag CNBr CAT An (40 mg/ g en protéines, $26,13 \cdot 10^3$ U/ mL, $10,45 \cdot 10^4$ U/ g)

Formulation d: 0,5 g Ag CNBr /GOX An (8mg/g en GOX, 12,42 U/mL, 4,41U/g) et 0,77 g Ag CNBr/ CAT An (40mg/g, $26,13 \cdot 10^3$ U/ mL, $10,45 \cdot 10^4$ U/ g)

Suite à cette étude préliminaire, nous avons opté pour les formulations : a et d, qui correspondent aux réacteurs : 6-a et 6-b.

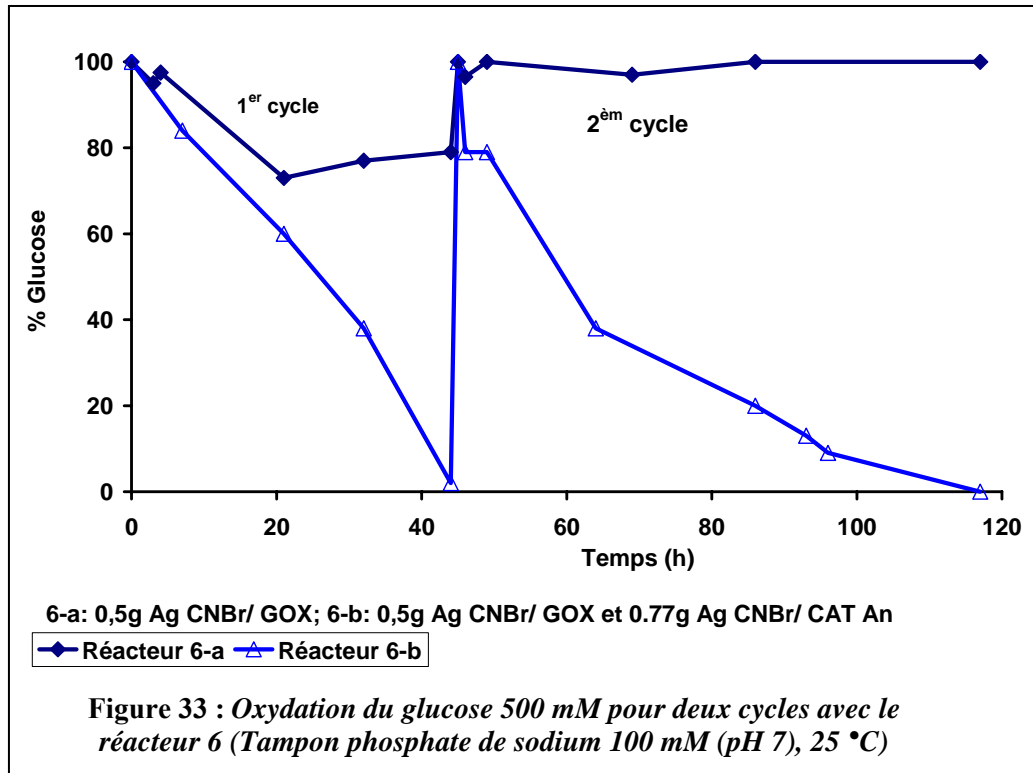
Réacteur 6-a : 0,5g Agarose CNBr / GOX (12,424 U/mL)

Réacteur 6-b : 0,5g Ag CNBr /GOX et 0,77g Ag CNBr/ CAT An ($26,13 \cdot 10^3$ U/mL, $10,45 \cdot 10^4$ U/ g)

Réacteur 5-a: 0,5 g de dérivé Ag MANAE/GOX / Glut (13,15 U/ g, 5,05 U/ mL)

Réacteur 5-b: 0,5 g de dérivé Ag MANAE/GOX /Glut et 1,2 g de dérivé Ag glyoxyl/

Les dérivés Agarose CNBr / GOX et Ag CNBr/ CAT An sont mis dans une solution de glucose (500 mM), sous agitation magnétique à 25 °C. Des prélèvements sont effectués à des temps réguliers et la concentration de glucose est déterminée par UV-Visible à 490 nm. L'évolution de l'oxydation du glucose en fonction du temps est représentée dans la figure (33).

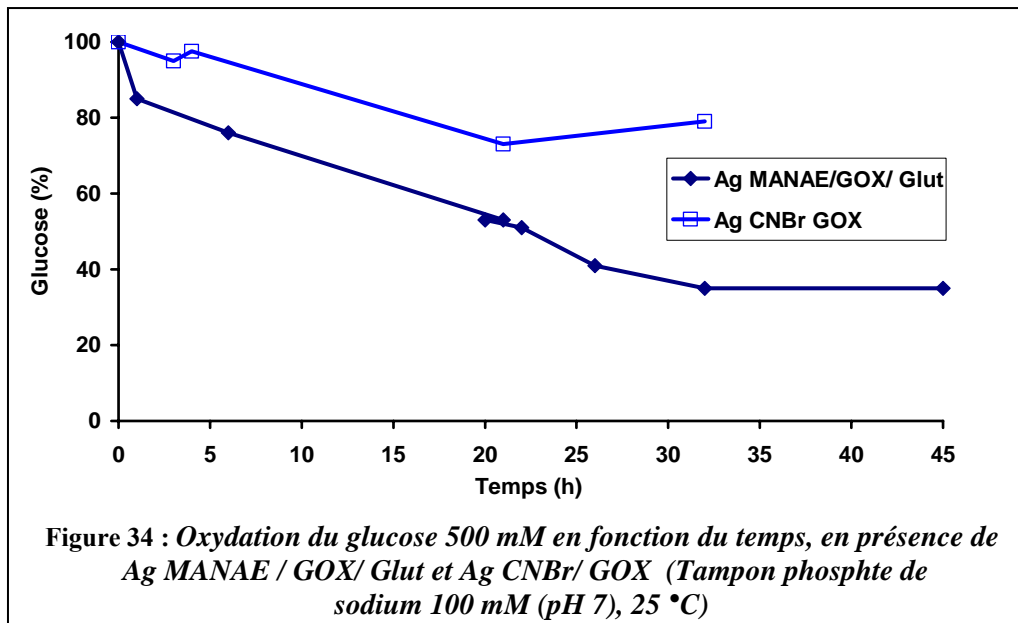


La figure 33 montre le rôle protecteur de la catalase An dans le réacteur 6-b. La figure 33. Le réacteur 6-b permet à la glucose oxydase de garder son activité pour les deux cycles et pour des temps d'incubation respectifs de 44 et 117 h. Dans le réacteur 6-a, une perte d'activité de la GOX An est observée pour le premier cycle, il reste 79 % de glucose et 100 % pour le second cycle.

II.6.1. Comparaison de l'activité de la glucose oxydase des dérivés : Ag MANAE/ GOX/ Glut et Ag CNBr/ GOX

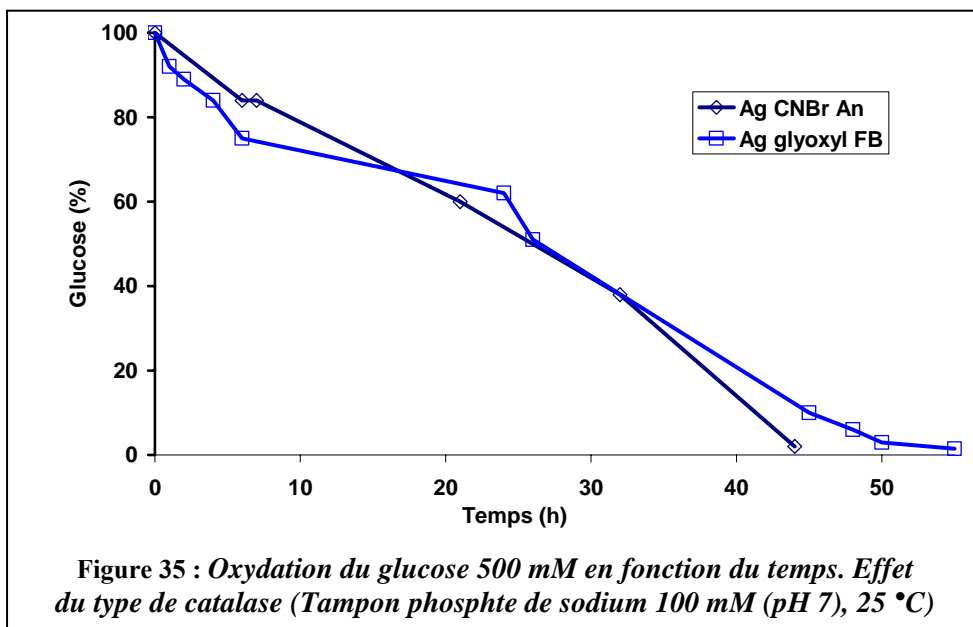
La figure 34 représente la variation de l'oxydation du glucose en présence du dérivés : Ag MANAE/ GOX/ Glut et Ag CNBr/ GOX.

Nous remarquons que la glucose oxydase, dans le dérivé Ag MANAE/ GOX/ Glut, possède une activité plus élevée que celle du dérivé Ag CNBr/ GOX. Nos résultats [2] sont en accord avec ceux de Betancor [1]. Le glutaraldéhyde protège la glucose oxydase et évite son inhibition par H₂O₂. La glucose oxydase du dérivé Ag CNBr plus exposée au milieu et est inhibée facilement par le H₂O₂, d'où la perte d'activité de l'enzyme.



II.6.2. Comparaison de l'action de la catalase (foie bovin et *Aspergillus niger*) sur l'activité de la glucose oxydase

La figure 35 représente la variation de l'oxydation du glucose en présence de la catalase (foie bovin et *Aspergillus niger*).



Nous remarquons que l'oxydation du glucose suit la même évolution en présence des deux catalases. Néanmoins, au-delà de 32 h d'incubation, la catalase (foie bovin) devient moins active comparée à la catalase (*Aspergillus niger*).

Nous pouvons conclure que le but de notre travail a été atteint par la réalisation d'un réacteur avec les formulations: 0,5 g de Ag MANAE/ GOX/ Glut (13,154 U/ g) et 1,2g de dérivé Ag glyoxyl/ CAT FB (10,45.10⁴U/ g) et 0,5 g de Ag CNBr/ GOX An (12,42 U/ g) et 0,77g de Ag CNBr/ CAT An (10,45.10⁴ U/ g). Elles peuvent être utilisées à l'échelle industrielle durant quelques cycles de travail [2]. Les supports et les enzymes étant d'origine naturelle ne risquent pas de polluer l'atmosphère après la désactivation des enzymes.

III. ETUDE DE L'EFFET DU PEROXYDE D'HYDROGENE SUR LES DERIVES A GLUCOSE OXYDASE

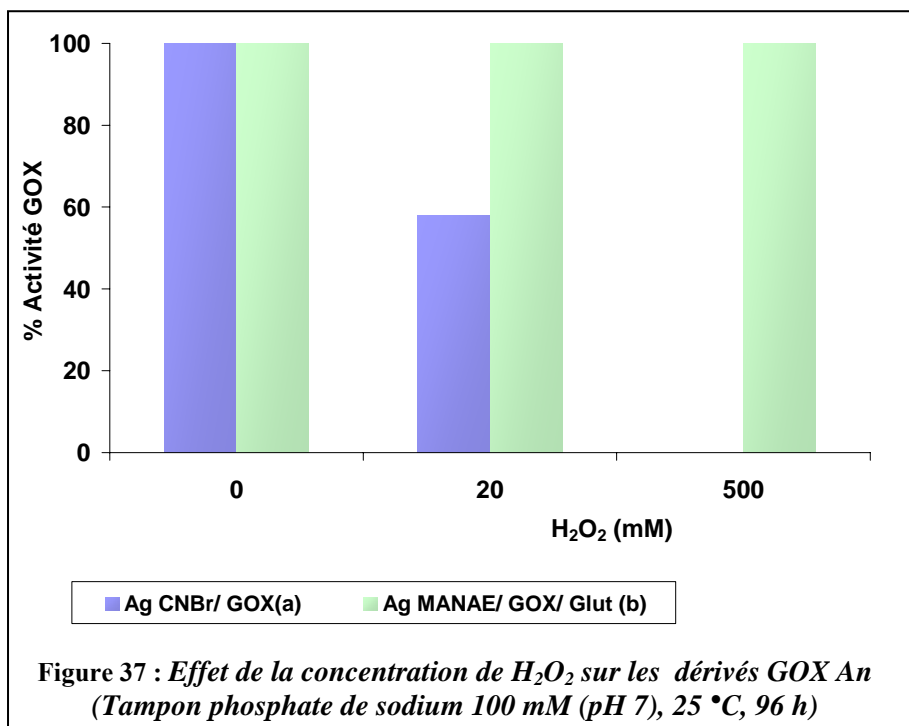
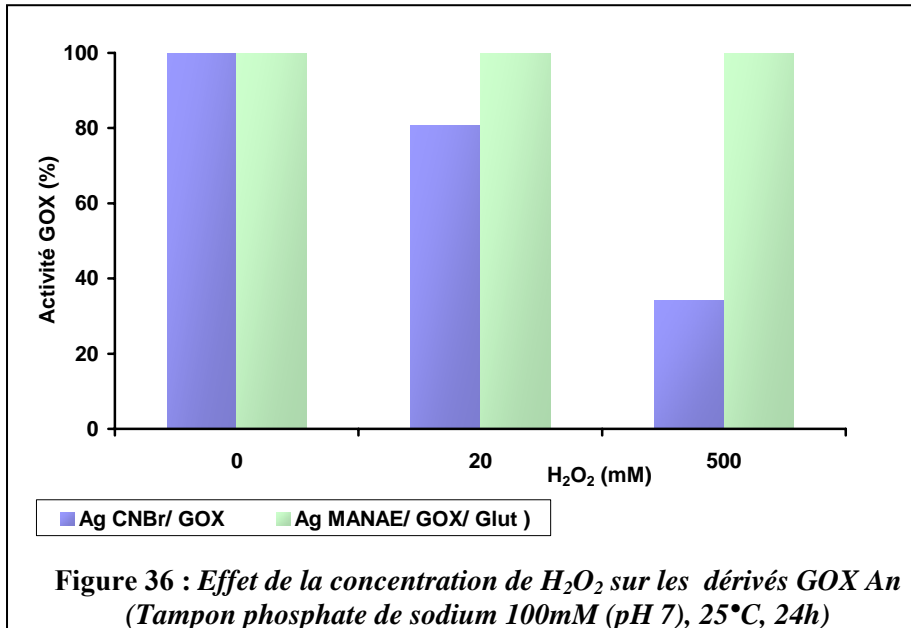
L'oxydation du glucose par la glucose oxydase produit de l'acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène.

L'effet du H₂O₂ a été étudié pour les dérivés Ag CNBr/GOX (12,42 U/mL) et An MANAE/GOX An/Glut (13,154 U/ mL) avec des concentrations du H₂O₂ de 20 et 500 mM préparées dans le tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7). 0,2 g de chaque dérivé est en suspension dans 5 mL de solution et chaque suspension est soumise à une douce agitation à 25 °C durant 24 h. Les suspensions sont les suivantes :

- ✓ **Préparation a:** dérivé Ag CNBr/GOX, tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7)
- ✓ **Préparation b:** dérivé Ag CNBr/GOX, H₂O₂ (20 mM)
- ✓ **Préparation c:** dérivé Ag CNBr/GOX, H₂O₂ (500 mM)
- ✓ **Préparation d:** dérivé Ag MANAE/GOX /Glut, tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7)
- ✓ **Préparation e:** 0.2g de dérivé Ag MANAE/ GOX /Glut, H₂O₂ (20 mM)
- ✓ **Préparation f:** 0.2g de dérivé Ag MANAE/ GOX/ Glut, H₂O₂ (500 mM)

L'effet du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sur les deux dérivés Ag CNBr/ GOX (12,424 U/mL) et Ag MANAE/ GOX/ Glut (13,154 U/ mL) est illustrée par les figures 36 et 37. Le dérivé Ag CNBr/ GOX est affecté par H₂O₂, avec une perte d'activité de 19,4% et 65,82% en présence de 20 et 500 mM de H₂O₂, alors que le dérivé Ag MANAE/GOX An/Glut garde 100 % de son activité pour les deux concentrations (Fig. 36).

Pour 96 h d'agitation en présence de H₂O₂, la perte de l'activité est plus prononcée pour le dérivé Ag CNBr/ GOX An, avec 42 % et 100 % pour les concentrations respectives de 20 et 500 mM en H₂O₂. Le dérivé Ag MANAE/ GOX /Glut ne présente aucune perte d'activité enzymatique. En présence du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7, la perte d'activité enzymatique de la GOX n'est pas observée pour les deux dérivés quel que soit le temps d'incubation 24 et 96 h à 25°C (Fig. 36 et 37).



Cette étude a mis en évidence la résistance du dérivé Ag MANAE/GOX An/Glut vis-à-vis du H₂O₂, puisque la perte de l'activité enzymatique n'est pas observée même pour un temps d'incubation de 96 h [2] Il est rapporté dans la littérature que [1], ce type de dérivé gardait 100 % de son activité en présence 20 mM de H₂O₂ pour 20 h d'incubation à 25 °C. Notre dérivé Ag MANAE/ GOX/ Clut a acquis une plus grande stabilité. La réticulation avec le glutaraldéhyde, rend la glucose oxydase moins exposée au milieu, contrairement à la

glucose oxydase immobilisée sur l'agarose CNBr. L'enzyme étant plus exposée au milieu (H_2O_2), celui-ci réagira avec le site actif.

Conclusion

L'immobilisation de la glucose oxydase, suivie d'une réticulation avec le glutaraldéhyde, a montré qu'elle acquies une grande stabilité. Ce résultat est d'une grande importance, dans la mesure où ce dérivé à glucose oxydase couplé à un dérivé à catalase pourrait être utilisé pour l'oxydation du glucose dans un réacteur durant quelques cycles sans être altéré.

La glucose oxydase sera utilisée pour la production d'acide gluconique à l'échelle industrielle. Mais l'inconvénient de l'utilisation de la glucose oxydase est sa désactivation par le H_2O_2 qui est produit lors de l'oxydation du glucose. Néanmoins, ce problème peut être résolu par ajout d'un dérivé à catalase (foie bovin ou *Aspergillus niger*). En effet, la catalase dismute H_2O_2 en eau et oxygène. Outre, l'élimination de H_2O_2 , l'oxygène formé est utilisé pour l'oxydation du glucose.

Le meilleur réacteur pour la catalase foie bovin est constitué de 0,5 g de dérivé Ag MANAE/ GOX/ Glut (13,154 U/ mL) et 1,2 g de dérivé Ag glyoxyl/ CAT FB (12 673.86 U/ mL). Alors que pour la catalase *Aspergillus niger*, le réacteur est constitué de 0,5 g de dérivé Ag CNBr/ GOX (12,424 U/ mL) et 0,77 g de dérivé Ag CNBr/ CAT An (128 855,74 U/ mL).

Par conséquent, la présence de la catalase est cruciale pour la conception d'un réacteur avec l'enzyme glucose oxydase. La transformation du H_2O_2 en eau et oxygène par la catalase, et l'oxygène produit permet à la glucose oxydase de convertir le glucose en acide gluconique.

L'étude de l'évolution de l'inactivation de différentes préparations par le peroxyde d'hydrogène de concentration 20 et 500 mM a montré que le dérivé Ag MANAE/GOX /Glut (13,154 U/ mL) a gardé son activité enzymatique pour un temps d'incubation de 96 h à 25°C, alors que le dérivé Ag CNBr/GOX (12,424 U/g) a perdu complètement son activité enzymatique pour le même temps d'incubation.

Par conséquent, l'immobilisation de la glucose oxydase suivie d'une réticulation avec le glutaraldéhyde, a montré qu'elle avait acquis une plus grande stabilité et n'était pas désactivé par le peroxyde d'hydrogène. Ce résultat est considéré comme un résultat d'une grande importance. Effectivement, les dérivés Ag MANAE/GOX/ Glut pourraient être utilisés dans un réacteur durant quelques cycles d'utilisation.

H₂O₂ a un effet négatif sur la glucose oxydase du dérivé Ag CNBr/ GOX, qui perd son activité enzymatique. Alors que dans le cas du dérivé Ag MANAE/GOX An/Glut, elle reste active.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1) Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora- Ortiz G, Mateo C, Fernandez-Lafuente R et Guisan Jose M: (Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions); *Enzyme Microb Technol*; 39: 877-882; (2006).

2) Kaddour S, Lopez-Gallego F, Guisan JM, Sadoun T: (Glucose oxidase and catalase derivatives for use in enzymatic reactors), *J.SAC*, (2010).

**CONCLUSION
GENERALE**

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail, nous avons entrepris l'étude de l'adsorption de la catalase *Aspergillus niger*, sur l'agarose PEI 750 000, agarose PEI 25 000 et agarose MANAE. L'étude de la stabilité de la catalase a montré qu'elle perdait son activité. La réticulation de la catalase avec le glutaraldéhyde, n'a pas amélioré sa stabilité, comme escompté.

La catalase a été également immobilisée par liaison covalente sur les supports agarose glyoxyl et l'agarose CNBr. L'immobilisation de l'enzyme par liaison covalente n'a pas amélioré sa stabilité. .

L'immobilisation de la catalase sur l'agarose CNBr, lui permettait de garder 75% de son activité, et lui assure ainsi, une stabilisation 30 fois plus élevée que celle de l'enzyme soluble.

L'électrophorèse SDS-PAGE effectuée sur les dérivés Ag CNBr/ dext et Ag glyoxyl/ dext, a montré que les sous-unités de l'enzyme ne se sont pas dissociées.

L'enzyme est inactive en présence de 10 mM d'EDTA à 55°C, une réduction de la stabilité enzymatique est observée, ce qui nous permet de supposer que la stabilité enzymatique dépend d'un cation.

L'incubation de l'enzyme immobilisée à 55°C en présence d'ions divalents (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+}) a montré que les ions Cu^{2+} et Ni^{2+} réduisent l'activité enzymatique de la catalase, alors que l'ion Zn^{2+} augmente sa stabilité. La stabilité augmente dans le même sens que la concentration de l'ion Zn^{2+} . La catalase a été stabilisée par immobilisation suivie de la réticulation avec le dextrane-aldéhyde.

L'addition de l'ion Zn^{2+} dans le milieu, augmente la stabilité de la catalase. Ces résultats suggèrent que l'ion Zn^{2+} joue un rôle important sur la stabilité enzymatique. Sa présence est indispensable pour éliminer les effets indésirables dus à la dilution qui réduisent ainsi la stabilité de l'enzyme. Le rôle du dextrane-aldéhyde permet d'éviter la dissociation des sous-unités favorisant ainsi sa stabilité. De plus, la stabilité de l'enzyme peut être augmentée par addition de Zn^{2+} dans le milieu réactionnel.

Les meilleures formulations pour avoir 100 % d'acide gluconique, par oxydation du glucose en présence de glucose oxydase, sont

- 0,5g de dérivé Ag MANAE/GOX An/Glut (13,14U/g) et 1,2g de dérivé Ag glyoxyl/CAT FB ($10,14 \cdot 10^4$ U/g).
- 0,5 g de dérivé Ag CNBr/GOX An (12,42 U/g) et 0,77 g de dérivé Ag CNBr/CAT An ($10,45 \cdot 10^4$ U/g).

Le dérivé Ag MANAE/ GOX/ Glut a acquis une grande stabilité. Il garde 100 % d'activité en présence du peroxyde d'hydrogène après 96 h d'incubation à 25 °C.

ANNEXE

I. ELECTROPHORESE SUR GEL EN MILIEU SDS-PAGE

Dans la partie consacrée à la purification de la catalase *Aspergillus niger*, nous avons utilisé l'électrophorèse SDS-PAGE pour contrôler la pureté de la catalase d'origine *Aspergillus niger*, cette technique est détaillée dans ce chapitre.

I.1. Technique d'électrophorèse

Le procédé le plus employé pour contrôler la pureté des protéines est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Au cours de l'électrophorèse les molécules se déplacent dans un champ électrique, les protéines et les enzymes à séparer sont chargées. En général, la vitesse de migration des protéines est basée sur trois facteurs : la taille, la forme et la charge électrique. Dans le milieu SDS la migration d'une protéine ne dépend plus que de sa masse. Le sodium dodecyl sulfate, en anglais, (SDS) ($C_{11}H_{25}-O-SO_3-Na$) et en français le laurylsulfate de sodium est un détergent avec des propriétés amphiphatiques fortes. Il sépare les protéines oligomériques en sous-unités et les dénature. Les molécules de SDS se lient aux protéines repliées (environ 0.4g SDS/g de protéine) et leur confère une charge négative importante.

L'électrophorèse permet de séparer des molécules chargées grâce à un gel polymérique sous l'effet d'un champ électrique. Les molécules de protéines étant chargées, elles se déplacent vers le pôle de charge opposée à leur charge.

La technique de l'électrophorèse permet, entre autre, de:

- Déterminer le nombre de sous unités d'une protéine
- Déterminer leur masse molaire respective
- Evaluer le degré de purification d'une protéine

I.1.1. Gel d'électrophorèse dans les conditions dénaturantes

La technique du gel d'électrophorèse dans les conditions dénaturantes « sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis » a été décrite par Laemmli [1]

Un mélange de protéines est porté à ébullition en présence :

- D'un agent réducteur : le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures
- D'un détergent anionique fort : le sodium dodecyl sulfate (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives.

Ces charges en se repoussant permettent aux chaînes polypeptidiques de se déplier. Par conséquence, les protéines sont dénaturées, et ont perdu leur structure tridimensionnelle native.

Les protéines, n'ayant plus de pont disulfure, sont sous une forme monomérique (Schéma 15).

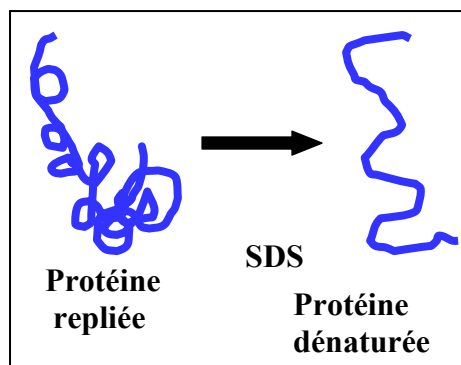


Schéma 15: Dénaturation d'une protéine en présence de SDS

Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS. C'est un gel réticulé, obtenu par polymérisation d'acrylamide qui forme des chaînes et de bis-acrylamide qui pontent les chaînes d'acrylamide. La réaction de polymérisation est initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium et catalysée par le TMED. Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. Le TMED est le N, N, N', N'- tétraméthyl-1-2- diaminométhane, c'est un composé très toxique. Il faut noter que plus le pourcentage d'acrylamide est élevé et moins les molécules volumineuses peuvent migrer. Une protéine globulaire migre d'autant moins vite que sa masse molaire est élevée. Le tableau XI regroupe la gamme de séparation en fonction du pourcentage d'acrylamide.

Tableau XI :
Gamme de séparation en kDa en fonction du pourcentage d'acrylamide

<i>Pourcentage d'acrylamide</i>	<i>Gamme de séparation en kDa</i>
7,5	45 - 400
10	22 - 300
12	13 - 200
15	2.5 - 100

Le gel est coulé entre des plaques de verre fixées sur un support et un peigne est enchâssé entre ces plaques. Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant ainsi des puits (Schéma 16). La taille et le nombre des dents des peignes sont variables ce qui permet de déposer des volumes allant de 10 à 200 μL d'échantillon de protéines à séparer. Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse. Le tampon ou solution d'électrolytes est placé dans la cuve et la migration s'effectue sous l'action

d'un champ électrique. Le tampon d'électrophorèse est constitué de : Tris 50 mM, Glycine 0,2 M, SDS 0,1%, son pH est compris entre 8,3 et 8,8

- Tris : nom commun du 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
- Glycine : acide faible (forme zwitterion non chargé ou anion)
- Voltage: 100 V - 150 V. Les échantillons de protéines dénaturées sont déposés dans les puits (un échantillon par puits). Quand la migration des protéines (enzymes) est terminée le gel est démoulé très délicatement.

Différentes bandes sont obtenues pour chaque piste (Schéma 16). Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique qui dénaturent de manière irréversible les protéines dans les mailles du gel.

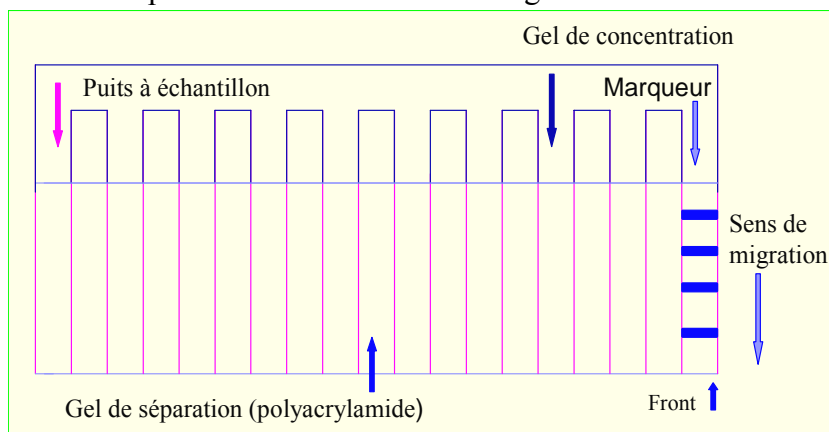


Schéma 16: Représentation du gel d'électrophorèse.

Les protéines sont révélées par une coloration : par exemple avec le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent (plus sensible). Les deux plaques contenant le gel sont placées dans l'appareil d'électrophorèse, où est ajoutée la solution d'électrolytes. Entre temps les échantillons sont préparés dans le tampon de rupture et portés à ébullition 5min, les couvercles des cônes en plastiques sont percés lors de l'ébullition. Entre 10 et 15 μ L d'échantillon sont introduits dans les puits du gel (Schéma 16). La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standard de masse molaire connue (piste de droite du Schéma 16).

Exemple de marqueurs :

- Myosine (205 kDa)
- β -galactosidase (116 kDa)
- Albumine (66 kDa)
- Ovalbumine (45 kDa)

- Anhydrase carbonique (29 kDa)

Toute la verrerie utilisée et la cuve d'électrophorèse doivent être d'une très grande propreté (Schéma 17). Quand chaque échantillon est introduit dans un puits, les électrodes sont placées selon la polarité et elles sont soumises à une tension de 150mV, la migration des protéines est arrêtée quand elles arrivent au front du gel. Le courant est éteint pour retirer la/les plaque/s, ensuite le gel est démoulé délicatement.

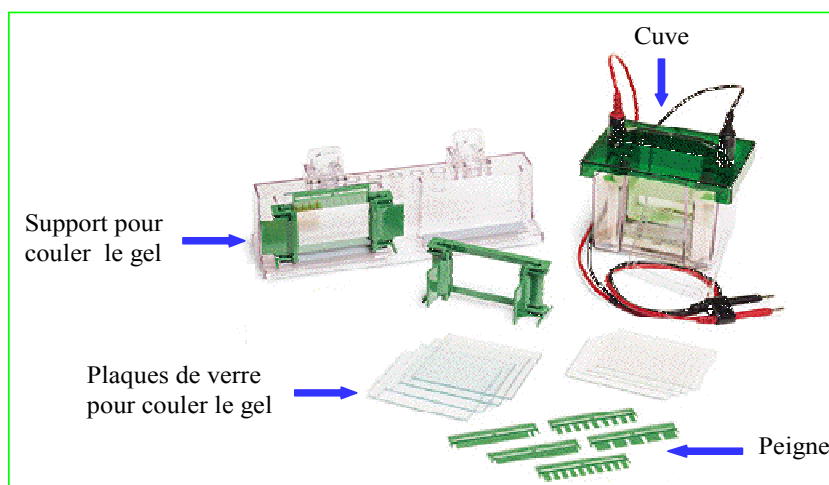


Schéma 17: Matériel utilisé pour l'électrophorèse

La technique universellement répandue de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est la plus utilisée pour compter les sous unités dans une protéine. Après dissociation par un détergent (ou urée), puis réduction éventuelle (à cause des ponts S-S), les sous unités sont séparées par électrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS).

Deux gels sont nécessaires pour réaliser l'électrophorèse :

- Gel de concentration
- Gel de séparation

Il faut noter que les deux gels sont à pH légèrement alcalin et contiennent du SDS.

I.2. PREPARATION DES GELS DE CONCENTRATION ET DE SEPARATION

Les tableaux XII et XIII regroupent les quantités utilisées pour préparer respectivement le gel de séparation et le gel de concentration. Les gels de concentration et de séparation sont préparés dans de petits flacons en verre de 10 à 20 mL.

Tableau XII: Quantités pour la préparation d'un gel de séparation

%	Tampon S mL	Acril bis mL	H ₂ O mL	* PSA 10% μ L	TMED μ L
5	1.25	0.834	2.88	25	7
7	1.25	1.17	2.55	25	7
10	1.25	1.67	2.05	25	7
12	1.25	2.00	1.72	25	7
15	1.25	2.50	1.22	25	7
16.5	1.25	2.75	0.97	25	7
18	1.25	3.00	0.72	25	7
20	1.25	3.34	0.38	25	7

* Le PSA peut être conservé au maximum 3 à 4 jours même à basse température.

Tableau XIII: Quantités pour la préparation d'un gel de concentration

Tampon C (μ L)	Acril bis (μ L)	H ₂ O (mL)	* PSA 10% (μ L)	TMED (μ L)
750	300	1.5	15	5

Le gel de concentration est coulé en premier entre les deux plaques de verre à l'aide d'une pipette de Pasteur (temps de formation du gel est de 1 h), il faut ajouter du butanol sur le gel de séparation pour le niveau, le butanol est absorbé avec du papier filtre avant d'ajouter le gel de concentration. Ce dernier est ajouté de la même manière (temps de formation du gel est de 1 h). Les gels sont préparés juste avant leur utilisation.

Les deux plaques contenant le gel sont placées dans l'appareil d'électrophorèse, où est ajoutée la solution d'électrolytes. Entre temps les échantillons sont préparés dans le tampon de rupture et portés à ébullition 5 min (percer les couvercles des hopendoffs) en plastiques lors de l'ébullition). Entre 10 et 15 μ L d'échantillon sont introduits dans le gel (Schéma 2)

Toute la verrerie utilisée doit être très propre et également la cuve d'électrophorèse. Quand tous les échantillons sont introduits, les électrodes sont placées selon la polarité et elles sont sous une tension de 150V, la migration des protéines est arrêtée quand elles sont presque à la limite du gel. Le courant est arrêté pour retirer la plaque, ensuite le gel est démoulé délicatement.

I.3. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons sont préparés par dissolution des échantillons dans le tampon de rupture.

- ◆ 0.1 g de dérivé dans 200 µL
- ◆ 100 µL de solution de catalase dans 200 µL.

Le procédé le plus employé pour contrôler la pureté des protéines est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Au cours de l'électrophorèse les molécules se déplacent dans un champ électrique, les protéines et les enzymes à séparer sont chargées. En général, la vitesse de migration des protéines est basée sur trois facteurs : la taille, la forme et la charge électrique. Dans le milieu SDS la migration d'une protéine ne dépend plus que de sa masse. Le dodecylsulphate de sodium en anglais (SDS) ($C_{11}H_{25}-O-SO_3-Na$) et en français le laurylsulphate de sodium est un détergent avec des propriétés amphiphatiques fortes. Il sépare les protéines oligomériques en sous-unités et les dénature. Les molécules de SDS se lient aux protéines repliées (environ 0,4 g SDS/g de protéine) et leur confère une charge négative importante.

I.4. PROTOCOLE

- Ajouter la solution de bleu de Coomassie jusqu'à couvrir entièrement le gel démoulé qui se trouve dans une petite cuve.
- Laisser dans la solution de bleue de Coomassie 45 à 60 min
- Remettre la solution d'électrolytes dans le flacon parce qu'elle peut être réutilisée tant qu'elle est propre.
- Ajouter le révélateur sur le gel, changer le révélateur au bout de 15min ensuite il faut espacer 30min à 45min.

Le gel est prêt quand les bandes des protéines sur les pistes sont bien évidentes, le gel ainsi obtenu est placé entre deux transparents et le gel est scanné ensuite.

I.5. PREPATION DES DIFFERENTES SOLUTIONS

➤ **-a- Préparation de 100 mL de tampon de séparation (TRIS 1,5 m SDS 0,4% pH 8.8)**

- 18,17gr de TRIS-BASE
- Dissoudre dans l'eau distillée et ajuster à pH 8,8
- Ajouter 0,4 g de SDS
- Ajuster le pH

➤ **-b- Préparation du persulfate ammoniacal 10% (PSA)**

Préparer une petite quantité, approximativement 0,05 g dans 0,5 mL d'eau distillée.

Remarque : Le PSA ne peut pas être conservée pendant une longue période (3 à 4 jours à basse température).

➤ **-c- Préparation de 100 mL de tampon de concentration (TRIS 0,5 M, SDS 0,4 %, pH 6,8)**

- 6,06g de TRIS- base
- Dissoudre dans l'eau distillée et ajuster à pH 6,8
- Ajouter 0,4 g de SDS
- Ajuster à pH 6,8

➤ **-d- Préparation de 25mL de tampon de rupture (stock)**

- 0,378 g de TRIS base (0,125 M)
- Dissoudre dans 15mL d'eau distillée
- Ajuster le pH à 6.8
- 0,5%: ajouter 2,5 mL Mercaptoetanol
- Ajouter 1 g SDS (dodécyl sulfate de sodium)
- 10%: Ajouter 5 mL de glicérine
- Ajouter 0,003 g (la pointe de la spatule) de bleu de bromophénol
- Compléter à 25 mL et contrôler le pH. Le tampon de rupture est conservé à 4 °C.

➤ **-e- Préparation d'un litre de solution d'électrolytes (stock)**

- 0,39 g de TRIS BASE à dissoudre dans 800 mL d'eau distillée
- 144,4 g de glycine
- 10 g de SDS mesurer le pH, sa valeur doit être comprise entre 8,6 et 8,8
- Cette solution doit être diluée 10 fois (20 mL dans 180 mL d'eau distillée)

➤ **-f- Préparation de 500 mL de solution de bleu de Coomassie**

- 1,25 g de bleu brillant de Coomassie (0.25%)
- 227 mL de méthanol
- 227 mL d'eau distillée

- Dissoudre le bleu brillant de Coomassie
- Filtrer la solution en utilisant un papier filtre

➤ **-g- Préparation d'un litre de solution de révélateur**

- 500 mL d'eau distillée
- 430 mL de méthanol technique
- 75 mL d'acide acétique

Toutes les solutions préparées sont conservées à l'abri de la lumière.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1) Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" Nature 227, 680 – 685

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Structures des acides amines usuels

Tableau II: Groupements de l'enzyme intervenant dans la liaison support/ enzyme

Tableau III: Valeurs de $\Psi\%$, A(U/ml), A(U/g) et % Activité des dérivés : Ag PEI 25 000, Ag PEI 750 000 et Ag MANAE

Tableau IV: Valeurs de l'absorbance du surnageant

Tableau V: Valeurs de : A (U/ml) et A (U/g) des trois dérivés réticulés

Tableau VI: Valeurs des activités des dérivés: A (U/ml) et A(U/g)

Tableau VII: Valeurs Ψ , A (U/mL) et A (U/g) des dérivés Ag CNBr et Ag glyoxyl

Tableau VIII: Valeurs de Ψ , A (U/ml), A (U/g) et activité résiduelle des dérivés Ag CNBr, Ag CNBr/ dext, Ag glyoxyl et Ag glyoxyl / dext

Tableau IX : Valeurs de Ψ , A (U/ml) et A (U/g) des dérivés Ag CNBr et Ag CNBr/ dext

Tableau X: Valeurs de $\Psi\%$, A (U/ml) et A (U/g) des dérivés Ag CNBr, Ag CNBr/ dext, Ag glyoxyl et Ag glyoxyl/dex

Tableau XI : Gamme de séparation en kDa en fonction du pourcentage d'acrylamide.

Tableau XII: Quantités pour la préparation d'un gel de séparation

Tableau XIII: Quantités pour la préparation d'un gel de concentration

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1: Structure du polyéthylèneimine

Schema 2: Préparation de l'agarose MANAE

Schéma 3: Préparation de l'agarose glyoxyl

Schéma 4: Immobilisation d'une enzyme sur le support agarose glyoxyl

Schéma 5: Immobilisation sur le support activé par le bromure de cyanogène

Shéma 6: Mécanisme d'action du glutaraldéhyde sur un support aminé ou une enzyme

Schéma 7: Préparation du dextrane-aldéhyde par action du periodate de sodium sur le dextrane

Schéma 8: Réticulation de la catalase adsorbée sur l'agarose MANAE

Schéma 9: Réticulation de la catalase avec le polymère glutaraldéhyde

Schéma 10: Immobilisation de la catalase sur l'agarose MANAE activé avec le lutaraldéhyde

Schéma 11: Immobilisation de la catalase sur l'agarose glyoxyl

Schéma 12: Immobilisation de la catalase sur l'agarose CNBr

Schéma 13: Réticulation de la catalase immobilisée avec le dextrane-aldéhyde

Schéma 14: Electrophorèse de la CAT et des dérivés ; (gel à 8%)

Schéma 15: Dénaturation d'une protéine en présence de SDS

Schéma 16: Représentation du gel d'électrophorèse.

Schéma 17: Matériel utilisé pour l'électrophorèse

LISTE DES FIGURES

Figure 38: *Activité résiduelle de la catalase en fonction du temps. (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 60°C)*

Figure 39: *Activité résiduelle du dérivé Ag PEI 25 000. (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 60°C) en fonction du temps*

Figure 40 : *Activité résiduelle du dérivé Ag PEI 70 000 en fonction du temps. (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 60°C)*

Figure 41: *Activité résiduelle du dérivé Ag MANAE en fonction du temps. (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 60°C)*

Figure 42 : *Activité résiduelle en fonction du temps des dérivés Ag PEI 750 000 et Ag PEI 25 000. (Tampon phosphatede sodium 10 mM (pH 7), 60°C)*

Figure 43: *Désorption de la catalase en fonction de la concentration de NaCl (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 25 °C)*

Figure 44: *Activité résiduelle de la catalase en fonction du temps (Tampon carbonate, acétatet 25 mM et phosphate 10 mM, 55 °C)*

Figure 45 : *Activité résiduelle des dérivés Ag PEI 25 000 en fonction du temps (Tampon carbonate, acétatet 25 mM et phosphate 10 mM, 55 °C)*

Figure 46 : *Activité résiduelle des dérivés Ag PEI 25 000 et R Ag PEI 25 000 en fonction du temps (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 60 °C)*

Figure 47 : *Activité résiduelle des dérivés Ag PEI 750 000 et R Ag PEI 750 000 en fonction du temps (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 60 °C)*

Figure 48 : *Activité résiduelle des dérivés Ag MANAE et R Ag MANAE en fonction du temps (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 60 °C)*

Figure 49 : *Activité résiduelle de différents dérivés Ag MANAE en fonction du temps (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 60 °C)*

Figure 50 : *Activité résiduelle du dérivé Ag MANAE/ Glut/ CAT en fonction du temps, (tampon acétate et carbonate 25 mM, 55 °C)*

Figure 51 : *Activité résiduelle des dérivés Ag glyoxyl et Ag CNBr en fonction du temps, (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 60 °C)*

Figure 52 : *Activité résiduelle des dérivés Ag CNBr en fonction du temps, (Tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 7), 55 °C)*

Figure 536: *Activité résiduelle du dérivé Ag CNBr en fonction du temps, (Tampon acétate, carbonate et phosphate, 55 °C)*

Figure 54 : *Activité résiduelle du dérivé Ag glyoxyl en fonction du temps, (Tampon acétate, carbonate et phosphate, 55 °C)*

Figure 558 : *Activité résiduelle de différents dérivés en fonction du temps, (Tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5), 55 °C)*

Figure 56: *Activité résiduelle du dérivé Ag CNBr en fonction du temps en présence de 10 et 100 mM de CaCl₂, (Tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5), 60 °C)*

Figure 57 : *Activité résiduelle en fonction du temps du dérivé Ag CNBr. Effet du dextrane-aldéhyde et de l'EDTA (10 mM), (Tampon acétate de sodium 25 mM pH 5, 55 °C)*

Figure 58 : *Activité résiduelle du dérivé Ag glyoxyl en fonction du temps. Effet du dextrane-aldéhyde et de l'EDTA (10 mM), (Tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5), 55 °C)*

Figure 59 : *Activité résiduelle du dérivé Ag CNBr/ dext en fonction du temps. Effet de l'ion Ca²⁺ (100 mM), (Tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5), 60 °C)*

Figure 60 : *Activité résiduelle du dérivé Ag glyoxyl/ dext en fonction du temps. Effet de l'ion Ca²⁺ (100 mM), (Tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5), 60 °C)*

Figure 61 : *Activité résiduelle du dérivé Ag CNBr/ dext en fonction du temps. Effet des ions Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ et Co²⁺ (1 mM), (Tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5), 55 °C)*

Figure 62 : *Activité résiduelle du dérivé Ag CNBr/ dext en fonction du temps. Effet de dilution en présence de 10 et 100 mM de Zn²⁺, (Tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5), 55 °C)*

Figure 63 : *Activité résiduelle du dérivé Ag glyoxyl/ dext en fonction du temps. Effet de la dilution en présence de Zn²⁺, (Tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5), 55 °C)*

Figure 64 : *Activité résiduelle des dérivés Ag CNBr/ dex et Ag glyoxyl/ dext en fonction du temps. Effet de la dilution en présence de Zn^{2+} , (Tampon acétate de sodium 25 mM (pH 5), 55 °C)*

Figure 65 : *Activité résiduelle du dérivé Ag CNBr/ dext en fonction du temps Effet de la concentration de l'ion Zn^{2+} (Tampon acétate de sodium 25mM (pH 5), 55 °C*

Figure 66 : *Oxydation du glucose en fonction du temps, avec le réacteur 1, (Tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 7), 25 °C)*

Figure 30 : *Oxyation du glucose en fonction du temps avec le réacteur 2 (Tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 7), 25 °C)*

Figure 67 : *Oxydation du glucose 500 mM avec le réacteur ((Tampon phosphate de sodium 50 mM (pH 7), 25 °C)*

Figure 68 : *Oxydation du glucose 500 mM avec le réacteur 4 (Tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7), 25°C)*

Figure 692 : *Oxydation du glucose 500 mM pour trois cycles avec le réacteur 5 (Tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7), 25°C)*

Figure 70 : *Oxydation du glucose 500 mM pour deux cycles avec le réacteur 6 (Tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7), 25 °C)*

Figure 71 : *Oxydation du glucose 500 mM en fonction du temps, en présence de Ag MANAE / GOX/ Glut et Ag CNBr/ GOX (Tampon phosphte de sodium 100 mM (pH 7), 25 °C)*

Figure 72 : *Oxydation du glucose 500 mM en fonction du temps. Effet du type de catalase (Tampon phosphte de sodium 100 mM (pH 7), 25 °C)*

Figure 36 : *Effet de la concentration de H_2O_2 sur les dérivés GOX An (Tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7), 25 °C, 24 h)*

Figure 73 : *Effet de la concentration de H_2O_2 sur les dérivés GOX An (Tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 7), 25 °C, 96 h)*