

## ASPECTS RECENTS DE LA TECHNOLOGIE ENZYMATIQUE

Par D. DOMURADO et D. THOMAS

Laboratoire de Technologie Enzymatique

U.A. N° 523 du CNRS  
Université de Compiègne  
60206 Compiègne FRANCE

### INTRODUCTION

Au cours de la dernière période, nous avons pu constater un certain regain d'intérêt pour la technologie enzymatique, ce qui peut s'expliquer pour deux raisons.

Tout d'abord, les enzymes sont des catalyseurs. A ce titre, ils ne sont pas principalement des produits, mais des parties de procédés. Or, il est plus facile de modifier, d'améliorer un procédé que de créer un nouveau produit.

Ensuite, les enzymes sont des protéïnes et on peut donc utiliser les techniques du génie génétique pour les améliorer et les produire. Génie enzymatique et génie génétique ne sont pas contradictoires, mais complémentaires.

### INTERET DE L'IMMOBILISATION

Si le génie enzymatique fait appel aux enzymes, c'est sous forme immobilisée. L'immobilisation, qu'elle soit d'enzymes, d'organelles ou de cellules, n'est pas un but en soi. C'est un outil qui peut être utilisé à des fins fondamentales ou appliquées parce qu'il procure certains avantages. Quels sont ces avantages (3) ?

### 1. Stabilisation des activités

En réduisant la mobilité de la chaîne polypeptique, on stabilise l'activité vis-à-vis de la chaleur, on la protège des enzymes protéolytiques (4). Associée à un milieu contenant peu d'eau, l'immobilisation donne en général de bons résultats. La modification des protéines par génie génétique demandera beaucoup de temps avant de produire, de manière aussi générale, des résultats équivalents.

### 2. Travail en réacteur

L'immobilisation d'un enzyme permet son chargement dans un réacteur quelqu'en soit le type: lit fixe, lit fluidisé, continuellement agité. Ceci autorise le passage d'une production discontinue à une production continue, permet le contrôle par des moyens automatiques (5).

### 3. Absence de contamination

Les enzymes immobilisés ne se retrouvent plus dans le produit final, ce qui est important pour les industries pharmaceutique et agro-alimentaire où le contrôle de la qualité des produits est important.

### 4. Microenvironnement

A l'inverse de la solution où le transport du(es) substrat(s) et du(es) produit(s) est assuré essentiellement par l'agitation, le milieu qui entoure l'enzyme immobilisé régit le transport des solutés uniquement par diffusion. Ceci entraîne la formation de gradients de concentration entre le coeur du support et la solution. Le microenvironnement qui baigne l'enzyme peut ainsi être notablement différent de la solution (pH, concentration en inhibiteur, etc...) et moduler en conséquence l'activité enzymatique (3, 6, 7).

## 5. Systèmes multienzymatiques

En rapprochant les sites actifs enzymatiques, en augmentant la concentration locale du produit d'un enzyme, substrat de l'enzyme suivant, l'immobilisation augmente considérablement l'efficacité des systèmes multienzymatiques (8, 9).

## 6. Analyse quantitative

Immobilisés à la surface d'électrodes, les enzymes confèrent à celles-ci la spécificité qui leur manque. Sur ce principe, a été conçu dans notre laboratoire un appareil pouvant mesurer une douzaine de paramètres (glucose, saccharose, éthanol, cholestérol, etc...) dans différents milieux (sang total, milieux de culture) (10-13). Il est ainsi possible de suivre en continu la concentration d'un produit intéressant dans un fermenteur par exemple.

## 7. Conditions asymétriques

Quand il est immobilisé en membrane, l'enzyme peut être soumis à des conditions asymétriques (3, 14, 15). On peut ainsi voir apparaître des phénomènes nouveaux. Une différence de potentiel se forme aux bornes d'une membrane contenant de l'acétylcholinestérase dont une seule face est au contact d'une solution d'acétylcholine. On a alors transformation d'une information chimique en une information électrique (16, 17). Un gradient de pH de part et d'autre d'une membrane peut s'amplifier quand certaines activités sont immobilisées. Une membrane asymétrique peut effectuer un transport actif même si les conditions sur chacune de ses faces sont identiques (3).

## 8. Propriétés qualitativement nouvelles

Dans des conditions convenables, on peut faire apparaître des boucles d'hystérésis, des oscillations, ou provoquer une structuration (3, 16 - 20).

## TECHNOLOGIE ENZYMATIQUE DE SECONDE GENERATION

Après la première génération qui faisait appel à des activités simples (hydrolases, isomérases) donnant des produits à faible valeur ajoutée, la seconde génération met en oeuvre des activités plus complexes et aboutit à des produits de haute valeur ajoutée.

Nous développerons six points pour mieux la caractériser.

### 1. Régénération des cofacteurs

De nombreux enzymes nécessitent des cosubstrats pour transformer leur substrat principal. Les cofacteurs pyridiniques (NAD, NADP) sont les plus répandus. Etant donné le prix de ces substances, il est absolument hors de question de les utiliser de manière stoechiométrique lors d'une fabrication industrielle. Il faut donc les régénérer. Trois méthodes sont possibles:

#### a. Régénération enzymatique

Elle fait appel à un deuxième enzyme qui effectue la transformation inverse du premier enzyme en ce qui concerne le NAD (P) (21,22). La production du produit principal est accompagnée de la transformation d'un deuxième substrat en produit secondaire.

L'enzyme utilisé peut être une NAD oxydase qui transfère les électrons à l'oxygène. Ici, le bilan global de la réaction est l'oxydation du substrat par l'oxygène, ce qui est économiquement beaucoup plus rentable.

#### b. Régénération chimique

Le cofacteur réduit transmet cette fois ses électrons à l'oxygène par l'intermédiaire d'un transporteur, le PMS (ou phénazine méthosulfate). Comme précédemment, cela revient à utiliser

l'oxygène au lieu du NAD comme cofacteur de la réaction (23).

Malheureusement, si on sait jusqu'à présent oxyder de la sorte un substrat, on ne connaît pas de technique simple de recyclage du cofacteur aboutissant à une réduction du substrat.

### c. Régénération électrochimique

Elle présente plusieurs avantages (24):

- pouvoir effectuer au choix oxydation ou réduction du cofacteur, sans introduire de molécules contaminantes (PMS par exemple),
- le coût de l'électricité est très faible comparé à celui des cofacteurs,
- enfin, cette technique permet d'ouvrir au sens thermodynamique un réacteur sans créer de problème de transfert de masse.

## 2. Milieux peu hydratés

Ils sont d'abord importants parce que répandus dans le domaine agro-alimentaire (biscuits, pâtes, sirops, etc... où des enzymes peuvent continuer à agir).

Ensuite, le solvant aqueux peut être remplacé par un solvant organique ou un mélange solvant-eau, car l'immobilisation stabilise les enzymes dans ces milieux. Ceci permet de transformer des substrats peu solubles dans l'eau, stéroïdes par exemple (25). L'utilisation d'enzymes lors de synthèses organiques pourrait aussi être envisagée.

Enfin, le remplacement de l'eau par un solvant organique permet de faire travailler des hydrolases en sens inverse. Il faut en effet se souvenir que le sens d'une réaction ne dépend pas du catalyseur, l'enzyme par exemple, mais des produits de la réaction et de leurs concentrations respectives, en vertu de la loi d'action de masse. Dans une solution aqueuse, la concentration en eau est supérieure à 55 M, ce qui est considérable. Cette forte

concentration fait travailler les hydrolases dans le sens de l'hydrolyse. Si on diminue la concentration en eau, on peut faire travailler les hydrolases dans le sens de la synthèse, synthèse de peptides par les protéases et peptidases, synthèse d'esters ou transestérification par les estérases. Si les produits de la réaction d'hydrolyse possèdent une faible valeur ajoutée, les produits de la réaction inverse contiennent une forte valeur ajoutée.

### 3. Stabilité fonctionnelle

Alors que la stabilité thermique des enzymes est étudiée depuis longtemps, nous avons pu mettre en évidence au laboratoire un nouveau type de stabilité (26). En effet, il est apparu dans de nombreux cas que la perte d'activité de l'enzyme était liée à la qualité de substrat déjà transformé.

Spécifiquement, chaque molécule de glucose-oxydase peut en moyenne transformer  $10^7$  molécules de glucose. Dans ce cas comme dans d'autres, l'inactivation de l'enzyme est liée à la formation d'espèces activées de l'oxygène au cours du cycle catalytique (27). La co-immobilisation d'enzymes détruisant ces molécules (catalase, superoxyde dismutase) peut contribuer à prolonger la durée de vie de l'activité enzymatique.

Au point de vue économique, ce qui compte n'est pas l'activité intrinsèque immobilisée mais la quantité de produit qu'on pourra obtenir à partir d'une quantité d'enzyme, c'est-à-dire d'un investissement.

### 4. Nouvelles sources d'énergie

De nombreuses réactions enzymatiques nécessitent de l'énergie, le plus souvent sous forme d'ATP, pour leur déroulement. Comme il est économiquement hors de question d'utiliser stoechiométriquement l'ATP, il faut trouver une source d'énergie et un moyen pour recycler l'ADP.

Nous avons essayé au laboratoire divers systèmes photosynthétiques dans ce but. Les chloroplastes extraits de laitues et les thylakoïdes isolés de ceux-là n'ont pas répondu à notre attente, quoique tous deux soient stabilisés après immobilisation (26).

Nous nous sommes alors tournés vers les bactéries photosynthétiques. L'isolement de membranes photosynthétiques de *Rhodospseudomonas capsulata* permet de transformer la lumière électrique en énergie biochimiquement utilisable (28). Cette utilisation de l'énergie électrique, qui permet de remplacer des molécules très coûteuses, est extrêmement rentable.

##### 5. Nouvelles activités catalytiques

Le développement de l'utilisation de la technologie enzymatique passe aussi par la découverte de nouvelles activités enzymatiques.

La première voie est le criblage à partir de nouvelles souches de microorganismes. Les Japonais ont beaucoup développé ce domaine.

La deuxième voie est la modification des propriétés apparentes de l'enzyme: utilisation d'un milieu peu hydraté pour faire travailler les hydrolases dans le sens de la synthèse par exemple.

On peut enfin utiliser les propriétés enzymatiques de protéines qui ne fonctionnent pas dans la nature comme des enzymes. L'hémoglobine, bovine en particulier, possède, grâce à ces noyaux hèmes, des propriétés hydroxylantes comme cela a été démontré dans notre laboratoire (29 , 30).

A l'avenir, le génie génétique pourra créer de nouvelles enzymes à partir de celles qui sont connues. Cependant, il faudra auparavant faire de grands progrès dans les domaines de la

structure protéique tridimensionnelle, de la prédiction de cette structure à partir de l'enchaînement des acides aminés, du fonctionnement précis du site actif des enzymes.

## 6. Immobilisation de cellules entières

Les cellules entières, quoique plus fragiles que les enzymes individuelles vis-à-vis des réactifs chimiques, peuvent être immobilisées très facilement par inclusion grâce à leur taille (31).

Nous avons ainsi constaté que les cellules immobilisées ont un comportement différent de celui des cellules libres.

- Des bactéries *E. coli* ne perdent pas leur plasmide alors que c'est le cas dans un fermenteur classique (32).
- Des algues *Euglena gracilis* ne perdent pas, immobilisées, leurs capacités photosynthétiques quand elles sont stockées dans l'obscurité (33).

C'est ici qu'il faut se rappeler que les "cellules libres" sont une invention de laboratoire qui n'existe pas dans la nature. Les microorganismes sont toujours liés à un support minéral, animal ou végétal. Les cellules animales et végétales sont groupées en tissus très organisés. En particulier, la matrice extracellulaire régule les fonctions des cellules animales. Au cours de l'embryogénèse, certaines cellules perdent leur adhésion à cette matrice pour pouvoir migrer et contribuer à la formation de certains organes. Les cellules sanguines perdent aussi leur adhérence à cette matrice, au cours de leur maturation, pour passer dans le sang. Enfin, les cellules cancéreuses forment par ce moyen des métastases.



## APPLICATIONS MEDICALES

Le traitement des déficiences enzymatiques avec surcharge lysosomale implique l'utilisation d'un vecteur pour guider l'enzyme jusqu'à la cellule cible et l'y faire pénétrer.

En utilisant un enzyme facile à modifier chimiquement, à repérer histologiquement et à doser dans le sang, nous avons étudié deux vecteurs différents, le mannose et le galactose (34).

Le mannose permet de diriger l'enzyme vers les phagocytes mononucléés (cellules de Küpffer du foie, macrophages spléniques, pulmonaires, etc...). En dehors des maladies héréditaires, ce vecteur pourrait également servir au traitement des maladies infectieuses ou parasitaires où l'agent pathogène survit ou se multiplie après phagocytose.

Le galactose entraîne une capture très rapide de l'enzyme par les hépatocytes.

## C O N C L U S I O N

La technologie enzymatique est riche en potentialités dont trop peu sont exploitées jusqu'à présent. Du temps sera nécessaire pour faire passer jusqu'à l'industrie les techniques mises au point dans les laboratoires de recherche.

## R E F E R E N C E S

- K. MOSBACH  
Immobilized enzymes  
Methods in Enzymology Vol. 44 (1977)

D. THOMAS

Future of enzyme technology  
Trends Biochem. Sci. 4, 207 (1979)

D. THOMAS et G. BROUN

Artificial enzyme membranes  
Ch. 63 p. 901 in 1

G.B. BROUN

Chemically aggregated enzymes  
Ch. 20 p. 263 in 1

G. GELLF, J.-P. KERNEVEZ, G. BROUN et D. THOMAS

Water-insoluble enzymes columns: comprehensive analysis of the  
parameters allowing their control  
Biotechnol. Bioeng. 16, 315 (1974)

D. THOMAS, C. BOURDILLON, G. BROUN et J.P. KERNEVEZ

Kinetic behavior of enzymes immobilized in artificial membranes:  
inhibition and reversibility effects  
Biochemistry 13, 2995 (1974)

J.-M. LE MOULLEC et D. THOMAS

Kinetic studies dealing with an immobilized reversible enzyme  
system. Experimental evidence for shift of the apparent equi-  
librium constant within a bienzyme system  
J. Biol. Chem. 252, 2611 (1977)

D. LECOQ, J.-F. HERVAGULT, G. JOLY, J.P. KERNEVEZ et D. THOMAS

The kinetic behaviour of an artificial bienzyme membrane  
J. Biol. Chem. 250, 5496 (1975)

J.-F. HERVAGULT, G. JOLY et D. THOMAS

Kinetic studies dealing with an immobilized bienzyme system  
Eur. J. Biochem. 51, 19 (1975)

J.-L. BOITIEUX, G. DESMET et D. THOMAS

An "antibody electrode": preliminary report on a new approach  
in enzyme immunoassay  
Clin. Chem. 25, 318 (1979).

J.-P. KERVEZ , L. KONATE et J.-L. ROMETTE

Computerized enzyme electrode  
Biotechnol. Bioeng. 25 , 845 (1983)

J.-L. ROMETTE, J.S. YANG, H. KUSAKABE et D. THOMAS

Enzyme electrode for specific determination of L-lysine  
Biotechnol. Bioeng, 2557 (1983)

P. DURAND, J.MALLEVIALLE et J.-M. NICAUD

Detection of organophosphorous pesticides with an immobilized  
cholinesterase electrode  
Anal. Toxicol. 8, 112 (1984)

J.-F. HERVAGULT, M.-C. DUBAN, J.-P. KERNEVEZ et D. THOMAS

Vectorial behavior of enzyme membranes  
J. Solid Phase Biochem. 1, 81 (1976)

D. THOMAS

Artificial enzyme membranes, kinetic and transport phenomena  
Phys. Veg. 14, 843 (1976)

A. FRIBOULET, A. DAVID et D. THOMAS

Excitability, memory and oscillations in artificial acetyl-  
cholinesterase membranes  
J. Membrane Sci. 8, 33 (1981)

A. FRIBOULET et D. THOMAS

Electrical excitability of artificial membranes.  
Hysteresis and oscillations observed with immobilized  
Acetylcholinesterase membranes  
Biophys. Chem. 16, 153 (1982)

A. NAPARSTEK, J.-L. ROMETTE, J.-P. KERNEVEZ et D. THOMAS

Memory in enzyme membranes

Hysteresis in reaction rates due to chemodiffusional coupling  
Nature 249, 490 (1974)

J.-P. KERNEVEZ, B. BUNOW, M.-C. DUBAN, G. JOLY et D. THOMAS

Structuration en espace spontanée à l'intérieur d'une membrane  
monoenzymatique

C. R. Acad. Sci. (Paris) 284, 195 (1977)

D. THOMAS, J.-N. BARBOTIN, A. DAVID, J.F. HERVAGAULT et

J.-L. ROMETTE

Experimental evidences for a kinetic and electrochemical memory  
in artificial enzyme membranes

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5314 (1977)

P. MINARD, M.-D. LEGOY et D. THOMAS

Study and use of a spontaneous cofactor regeneration in an  
immobilized enzyme-coenzyme system

Ann. N. Y. Acad. Sci. 434, 259 (1984)

C. BURSTEIN, H. OUNISSI, M.-D. LEGOY, G. GELF et D. THOMAS

Recycling of  $\text{NAD}^+$  using coimmobilized alcohol dehydrogenase  
and E. Coli

Appl. Biochem. Biotech. 6, 329 (1981)

M.-D. LEGOY, J.-M. LE MOULLEC et D. THOMAS

Chemical grafting of functional NAD in the active site of a  
dehydrogenase: regeneration in situ

FEBS Letters 94, 335 (1978)

J.-M. LAVAL, C. BOURDILLON et J. MOIROUX

Enzymatic electrocatalysis: electrochemical regeneration of  
 $\text{NAD}^+$  with immobilized lactate dehydrogenase modified electrode

J. Am. Chem. Soc. 106, 4701 (1984)

M.-D. LEGOY, V. LARRETA-GARDE, F. ERGAN et D. THOMAS

Study of immobilized steroid dehydrogenase in water-ethanol media

J. Solid Phase Biochem. 4, 143 (1979)

M.-F. COCQUEPOT, B. THOMASSET, J.-N. BARBOTIN, G. GELLF et D. THOMAS

Storage and functional stability of immobilized thylakoïds

Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol, 11, 193 (1981)

C. BOURDILLON, V. THOMAS et D. THOMAS

Electrochemical study of glucose-oxidase autoinactivation

Enzyme Microbiol. Technol. 4, 175 (1982)

V. LARRETA GARDE, G. GELLF et D. THOMAS

Immobilized chromatophores

ATP regeneration in batch and open reactors

Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14, 232 (1982)

D. GUILLOCHON, J.-M. LUDOT, L. ESCLADE, B. CAMBOU et D. THOMAS

Une nouvelle possibilité en technologie enzymatique: l'activité hydroxylase de l'hémoglobine immobilisée

C.R. Acad. Sci. (Paris) 292, 365 (1981)

D. GUILLOCHON, L. ESCLADE, B. CAMBOU et D. THOMAS

Hydroxylation by hemoglobin-containing systems: activities and regioselectivities

Ann. N. Y. Acad. Sci. 434, 259 (1984)

J.-N. BARBOTIN et B. THOMASSET

Immobilized organelles and whole cells into protein foam structures: scamping and transmission electron microscopic observations

Biochimie 62, 359 (1980)

F. DE TAXIS DU POET, P. DHULSTER et D. THOMAS

Stabilité, sans pression de sélection, du plasmide pTG 201 en fermentation continue d' *Escherichia coli* BZ 18 immobilisé dans un gel de carraghénane

C. R. Acad. Sci. (Paris) 299, 481 (1984)

C. TAMPONNET, F. COSTANTINO, J.-N. BARBOTIN et R. CALVAYRAC

Cytological and physiological behaviour of *Euglena gracilis* cells entrapped in a calcium alginate gel

Physiol. Plant. 63, 277 (1985)

S. DEMIGNOT, D. DOMURADO, P. MARINCOL et D. THOMAS

Pharmacoguidage d'une enzyme: modification des propriétés pharmacocinétiques de la glucose-oxydase par différents vecteurs

C.R. Acad. Sc. 301 (série III), 413 (1985)