

IMMOBILISATION DE LA CHYMOTRYPSINE PREALABLEMENT PROTEGEE
PAR UN INHIBITEUR MACROMOLECULAIRE SYNTHETIQUE

Eric BROWN et Michel LORIOT

(Laboratoire de Synthèse Totale de Produits Naturels, ERA 394,
Faculté des Sciences, Route de Laval, B.P. 535, 72017 LE MANS Cedex)

(Received in France 3 January 1977; received in UK for publication 16 March 1977)

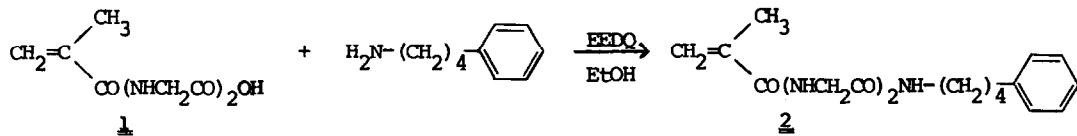
Dans un précédent travail (1), nous avions montré que la trypsine immobilisée sur un support insoluble polyaldehydique était considérablement plus active quand la réaction d'immobilisation était effectuée en présence d'un polyol hydrosoluble porteur de groupements *p*-alkyl benzamidine. Etant donné que les benzamidines sont des inhibiteurs réversibles bien classiques de la trypsine, nous en avions déduit que le polyol précédent se comportait comme un inhibiteur macromoléculaire qui protégeait toute la zone voisine du centre actif de la trypsine au cours de la fixation de cette dernière sur son support insoluble. En quelque sorte, nous avions étendu à l'enzymologie la notion de groupement protecteur bien connue des chimistes organiciens.

Dans un but de généralisation, nous avons cherché à appliquer à la chymotrypsine cette méthode originale, croyons-nous, de protection/immobilisation des enzymes. Nous décrivons ci-après les résultats que nous avons obtenus.

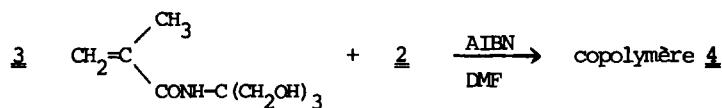
1°) Préparation d'un inhibiteur macromoléculaire hydrosoluble de l'α-chymotrypsine.

Parmi les différents composés décrits comme étant des inhibiteurs compétitifs réversibles de la chymotrypsine, notre choix s'est porté sur la phényl-4 *n*-butylamine, dont le cycle aromatique est susceptible de se lier au centre actif de l'enzyme (2). Cet inhibiteur, de $K_i = 2,8 \text{ mM}$, a été utilisé avec succès en chromatographie d'affinité de la chymotrypsine (2).

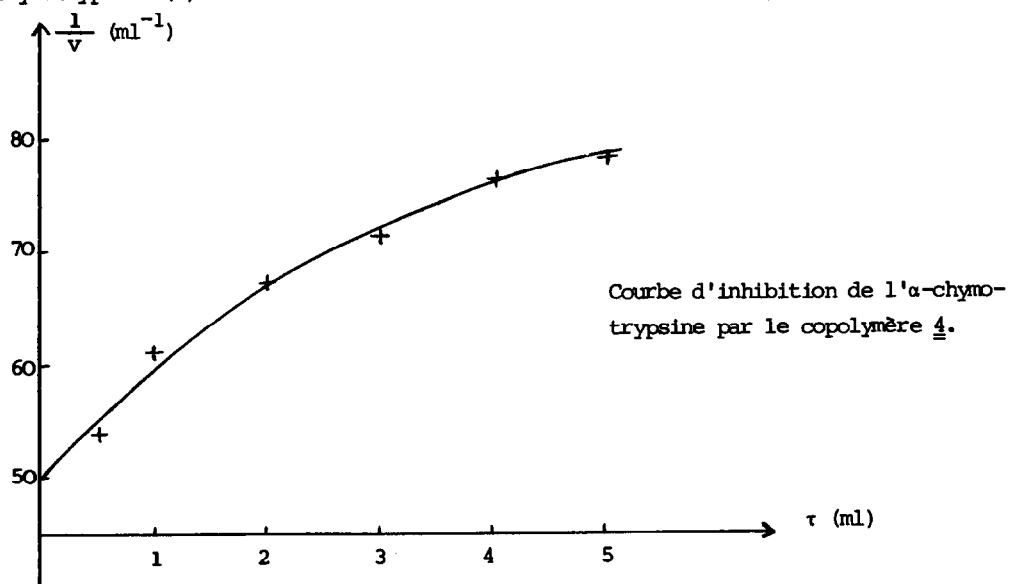
Le monomère acrylique 2 a été obtenu avec un rendement de 70 % en faisant réagir dans l'éthanol la phényl-4 *n*-butylamine sur la *N*-méthacryloylglycylglycine 1 (3), et en utilisant l'EEDQ (4) comme agent de condensation.



Ensuite, le composé 2, $F = 128-132^\circ$ (acetonitrile), a été copolymérisé avec quatre équivalents du monomère tris-hydroxyle 3 (5) en utilisant l'AlEN comme agent d'amorçage, ce qui a fourni un copolymère 4 soluble dans l'eau, avec un taux de conversion élevé.



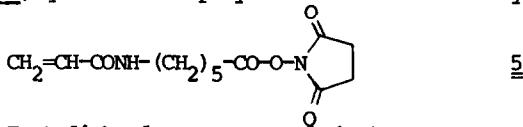
Nous avons effectué des mesures d'activité chymotrypsique vis-à-vis de l'ester éthylique de la N-acétyl tyrosine (ATEE) (5), en présence de quantités croissantes de copolymère 4 (la chymotrypsine utilisée avait une activité de 1000-1200 unités ATEE), et en utilisant le mode opératoire ci-après. Dans une cuve thermostatée à 25°, on introduit 1 ml d'ATEE 0,15 M, τ ml d'une solution de copolymère 4 (1,92 g dans 50 ml d'eau), on complète à 5 ml avec du tampon borax 0,1 M et de la soude diluée (pH final : 8), puis on ajoute 0,05 ml d'une solution d' α -chymotrypsine (10 mg dans 100 ml de tampon borax 0,01 M, pH 8). L'activité chymotrypsique est proportionnelle au volume v de NaOH 0,1 N nécessaire à la neutralisation de l'acide carboxylique libéré en 3 mn à pH 8 par hydrolyse chymotrypsique de l'ATEE. La courbe $\frac{1}{v} = f(\tau)$ présentée ci-dessous est croissante, ce qui montre que le copolymère 4 est bien un inhibiteur de l' α -chymotrypsine (6).



Ce qui revient à dire que la partie effecteur du copolymère 4 est susceptible de se fixer sur le site actif, pour fournir un complexe par affinité plus ou moins stable enzyme/copolymère. L'écart à la linéarité observé pour la courbe précédente indique que le copolymère 4 n'est pas un inhibiteur compétitif réversible, au sens strict où on l'entend dans les équations cinétiques élémentaires (6). Toutefois, les résultats décrits ci-après montrent clairement que cette inhibition par le copolymère 4 est réversible.

2°) Immobilisation de l'α-chymotrypsine en présence de l'inhibiteur macromoléculaire 4.

Pour immobiliser la chymotrypsine, nous avons utilisé comme support insoluble l'ACAPROSUC, qui est un copolymère réticulé de l'acrylamide avec le monomère acylant 5 (7).



Tout d'abord, nous avons fixé directement 10 mg d'enzyme sur 100 mg d'ACAPROSUC en solution tampon borax 0,1 M pH 8 à 4°C pendant 24 h. Le dérivé insoluble obtenu est isolé par centrifugation et conservé à titre de témoin. Dans une autre expérience, nous avons opéré comme précédemment, mais en mettant 5 mg de copolymère 4 en présence de chymotrypsine (10 mg), au cours de la réaction d'immobilisation de cette dernière. Le dérivé insoluble obtenu a été débarrassé de l'inhibiteur macromoléculaire 4 par des lavages répétés (NaCl, M) et il a été comparé au dérivé insoluble témoin ci-dessus. Nous avons ainsi constaté que la protection par le copolymère 4 permet d'obtenir des dérivés insolubles 2 à 4 fois plus actifs vis-à-vis de l'ATEE. Notamment, le pourcentage d'activité chymotrypsique totale "fixée" sur l'ACAPROSUC, qui était généralement de l'ordre de 9 % après fixation sans protection préalable, pouvait atteindre dans certains cas la valeur de 36,5 % après fixation de l'enzyme en présence de copolymère 4.

Nous avons refait les essais ci-dessus dans les mêmes conditions, mais en remplaçant toutefois l'ATEE par l'hémoglobine (M = 67000), qui est un substrat macromoléculaire de la chymotrypsine. Dans le cas présent, les mesures d'activité enzymatique se font par dosage colorimétrique (à 650 nm) des polypeptides libérés par hydrolyse chymotrypsique de l'hémoglobine (1). Nous avons observé, vis-à-vis de ce substrat, une activité spécifique résiduelle "fixée" qui était égale à 16,7 % après fixation sans protection, mais qui pouvait atteindre la valeur de 37,7 % après fixation en présence du copolymère 4.

Dans le tableau suivant, se trouvent rassemblés les résultats obtenus au cours de deux essais caractéristiques. Nous appelons m_1 (mg) la masse d'enzyme native ayant même activité que le dérivé insoluble obtenu ; m_2 (mg) la masse d'enzyme réellement fixée sur le support insoluble ; AT (%) = $100 m_1/10$, le pourcentage d'activité enzymatique "fixée", par rapport à l'activité mise en jeu au départ ; et AER (%) = $100 m_1/m_2$, le pourcentage d'activité enzymatique résiduelle spécifique de l'enzyme fixée.

(a) : essais réalisés avec un lot d'Acaprosuc vieux de plusieurs semaines ;

(b) : essais réalisés avec de l'Acaprosuc fraîchement préparé.

immobilisation	substrat	m_1 (mg)	m_2 (mg)	AT (%)	AER (%)
sans protection	ATEE	0,86	6,9 ^(a)	8,6	12,5
avec protection	ATEE	3,65	6,74 ^(a)	36,5	54,2
sans protection	hémoglobine	1,53	9,15 ^(b)	15,3	16,7
avec protection	hémoglobine	3,35	8,88 ^(b)	33,5	37,72

3°) Conclusion.

Le copolymère 4 est un inhibiteur réversible de l' α -chymotrypsine qu'il est susceptible de protéger avantageusement au cours d'une immobilisation ultérieure (8). A titre de comparaison, nous dirons que quelques rares travaux décrivent des immobilisations d'enzymes en présence de substrats ou d'inhibiteurs de faible masse moléculaire, mais les résultats obtenus ne paraissent guère encourageants (9,10). Dans le même ordre d'idées, nous avions autrefois immobilisé le chymotrypsinogène-A, mais nous ne sommes pas parvenus à l'activer en le traitant par la trypsine selon les méthodes habituelles (9). Par conséquent, notre méthode de protection/immobilisation/déprotection constitue probablement la première tentative réussie d'optimiser la préparation des enzymes immobilisées. Cette méthode, si elle se révélait générale, devrait intéresser tous ceux qui cherchent à immobiliser des enzymes avec des rendements élevés.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) E. BROWN et A. RACOIS, Tetrahedron Letters, 1976, p. 3317.
- (2) C.R. LOWE et P.D.G. DEAN, Affinity Chromatography, Wiley Interscience, New-York, 1974, p. 144.
- (3) E. BROWN et A. RACOIS, travaux non publiés.
- (4) B. BELLEAU et G. MALEK, J. Amer. Chem. Soc., 1968, 90, 1651.
- (5) E. BROWN, M. LORIOT et J. TOUET, Tetrahedron Letters, 1975, p. 357.
- (6) H. GUTFREUND, An introduction to the study of enzymes, Blackwell, Oxford, 1965.
- (7) E. BROWN, R. JOYEAU et M. PATERNE, Informations Chimie, sous presse.
- (8) Parallèlement à cette étude, nous avons réalisé la copolymérisation du triol 3 avec la N-(méthacryloylglycylglycyl)benzylamine ($F = 160-162^\circ$). Nous avons constaté que le copolymère hydrosoluble ainsi obtenu était inhibiteur de l' α -chymotrypsine, mais qu'il ne lui offrait aucune protection notable au cours d'une immobilisation ultérieure.
- (9) E. BROWN et A. RACOIS, Bull. Soc. Chim. Fr., 1971, p. 4357.
- (10) G.P. ROYER, Brevet américain 3.930.950 du 6-1-1976 ; ou Chem. Abstr., 1976, 84, 71023 E.