

2m 11.3174. 4

Université de Montréal

Études des méthodes d'immobilisation d'enzyme (trypsine) sur un support solide pour la
cartographie peptidique par microréacteur

Par

11511050

Hussein Hamad

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc. en chimie)

Novembre 2003

© Hussein Hamad, 2003



QD

3

U54

2004

V. 013

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Études des méthodes d'immobilisations d'enzyme (trypsine) sur un support solide pour
la cartographie peptidique par microréacteur

Présenté par

Hussein Hamad

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Michel J. Bertrand président – rapporteur

Dr. Karen C. Waldron directrice de recherche

Dr. Joelle Pelletier membre du jury

Mémoire accepté le: _____

À la mémoire de mon père

SOMMAIRE

L'hydrolyse des protéines par les enzymes protéolytiques, telle que la trypsine, constitue une étape importante pour caractériser les protéines à l'aide de leurs cartes peptidiques. Traditionnellement, l'hydrolyse protéolytique (la digestion) est effectuée en phase liquide, ce qui possède des inconvénients : le temps de digestion est long, il y a consommation d'enzyme, ce qui est important dans le cas d'une enzyme précieuse, et les peptides provenant de l'autodigestion de la trypsine interfèrent dans la carte peptidique.

La digestion protéolytique par les enzymes immobilisées est une façon assez bien documentée de contourner les inconvénients de la trypsine soluble. Cependant, les fournisseurs de la trypsine immobilisée sont peu nombreux, ce produit coûte relativement cher et d'autres enzymes intéressantes ne sont pas facilement disponibles sur le marché. Donc, premièrement, notre projet avait pour but de développer un protocole fiable et optimal pour immobiliser la trypsine sur des billes de verre (CPG : Controlled Pore Glass), un support robuste et groupements chimiques greffés. Dans ce projet, trois techniques de fixation ont été étudiées pour immobiliser la trypsine sur les billes : (i) par le glutaraldehyde, (ii) par le 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC), et (iii) par le diisothiocyanate (DITC). La quantité de trypsine immobilisée a été estimée par spectroscopie d'absorption UV/Vis donnant les valeurs de 12.6 à 30.0 mg trypsine/g de billes CPG pour les 3 techniques. Ensuite, l'activité enzymatique et les paramètres cinétiques (constantes apparentes de Michaelis, $K_{M,app}$ et $V_{max,app}$, pH optimal, comportement Michaeléin) ont été déterminé avec le substrat synthétique TAME (ester méthylique de tosylarginine).

Deuxièmement, on a pu construire un microréacteur enzymatique dans lequel les

billes de CPG portant la trypsine sont empaquetés pour effectuer la digestion de protéines lors de leur passage à travers le microréacteur. Les fragments peptidiques récoltés ont été séparés par électrophorèse capillaire où l'électrophérogramme émis constitue une carte peptidique de l'échantillon protéique analysé. Une évaluation initiale de la performance du microréacteur a été effectuée en le comparant avec la CPG-DITC-trypsine du fournisseur Sigma. À long terme, le but est d'immobiliser d'autres enzymes telles que la chymotrypsine, pepsine, des glycosidases et les glycopeptidases pour fabriquer les microréacteurs enzymatiques spécialisés.

Mots clés : Enzyme immobilisée, trypsine, billes de verre poreuses, cartographie peptidique, caractérisation de protéines, microréacteur enzymatique, électrophorèse capillaire, β -caséine.

ABSTRACT

Protein hydrolysis using immobilized proteolytic enzymes like trypsin constitutes an important step in the characterization of proteins by peptide mapping. Typically, proteolytic hydrolysis (digestion) is carried in liquid-phase, a method which has several disadvantages: long digestion times, autoproteolysis of the enzyme leading to interfering peaks in the peptide map, significant enzyme consumption, which is important when precious little enzyme is available.

Immobilizing enzymes for protein digestion is a fairly well documented way to circumvent the disadvantages of soluble trypsin. However, there are few suppliers of immobilized trypsin, it is relatively expensive and many interesting enzymes other than trypsin are rarely commercially available in an immobilized form. Therefore, the first part of this project consisted in developing a viable, optimized procedure for immobilizing trypsin onto glass beads (CPG: Controlled Pore Glass), a robust support available in several formats (e.g., variable pore size, bead diameter and chemical derivatisation). We investigated three chemical techniques for immobilizing trypsin on CPG beads: (i) via glutaraldehyde linkage, (ii) via 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) linkage and (iii) via diisothiocyanate (DITC) linkage.

The quantity of trypsin immobilized per gram of CPG was estimated by UV/Vis absorption spectroscopy, giving values ranging from 12.6 to 30.0 mg trypsin/g CPG for the three techniques. Next, the enzymatic activity and kinetic parameters (apparent Michaelis constants $K_{M,app}$ and $V_{max,app}$ optimal pH, Michaelian behavior) of the immobilized enzyme were determined using the synthetic substrate tosylarginine methyl ester (TAME).

In the second part of the project we constructed an immobilized enzyme microreactor for the digestion of a protein standard, which was flowed through the microreactor. Peptide fragments collected at the microreactor outlet were separated by capillary electrophoresis such that the resulting electropherogram constituted the peptide map of the protein sample of interest. An initial evaluation of the microreactor's performance was carried out by comparison with peptide maps obtained from Sigma Inc. CPG-DITC-trypsin. In the long term, we intend to immobilize other interesting enzymes like chymotrypsin, pepsin, glycosidases and glycopeptidases to create specialized enzyme microreactors.

Key Words: Immobilized enzyme, trypsin, controlled pore glass, peptide mapping, protein characterization, enzyme microreactor, capillary electrophoresis, β -casein.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	IV
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES ABREVIATIONS	XVI
REMERCIEMENTS	1
1. INTRODUCTION.....	2
1.1 Notions d'enzymologies	3
1.1.1 Vitesse d'une réaction.....	5
1.1.2 Loi de Michaelis-Menten.....	6
1.1.3 Activité enzymatique (spécifique) de la trypsine immobilisée.....	10
1. 2 Immobilisation des enzymes.....	10
1.2.1 Azide de Carboxyméthylcellulose.....	13
1.2.2 Lien azote- azote.....	13
1.2.3 Bromure de cyanogène	14
1.2.4 Glutaraldéhyde.....	14
1.2.5 Isocyanate et isothiocyanate	15
1.2.6 Carbodiimide soluble dans l'eau (EDC).....	16

1.2.7 Immobilisation par DITC	17
1.3 Trypsine	17
1.3.1 L'activité catalytique de l'enzyme libre	18
1.3.2 Quantité d'enzyme immobilisée.....	21
1.3.3 Effet du pH sur l'activité enzymatique.....	22
1.4 Types de microréacteurs enzymatiques et enzymes immobilisées.....	23
1.5 Électrophorèse capillaire pour la cartographie peptidique	25
2. PARTIE EXPÉRIMENTALE	27
2.1 Produits et Matériels.....	27
2.2 Appareillages	28
2.3 Techniques d'immobilisation de la trypsine.....	28
2.3.1 Immobilisation de la trypsine sur les billes de verre avec le glutaraldéhyde	29
2.3.2 Immobilisation de la trypsine sur les billes de verre via le carbodiimide soluble dans l'eau	30
2.3.3 Immobilisation de la trypsine sur les billes de verre via DITC	32
2.4 Estimation de la quantité d'enzyme immobilisée.....	33
2.5 Étude de l'activité spécifique de l'enzyme immobilisée.....	34
2.6 Étude de la variation du pH sur l'activité de l'enzyme immobilisée.....	35

2.7 Détermination de la gamme de concentration en substrat dans laquelle l'enzyme immobilisée présente un comportement Michaelien (gamme de linéarité)	35
2.8 Étude de la digestion du β-caséine avec et sans microréacteur enzymatique....	36
2.9 Étude de l'autodigestion de la trypsine soluble.....	36
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	37
3.1 Immobilisation.....	37
3.2 Lavage des billes CPG-enzyme immobilisée.....	43
3.3 Détermination de la quantité d'enzyme immobilisée et le temps d'immobilisation.....	44
3.4 Quantité d'enzyme nécessaire pour une activité optimale	48
3.5 Effet de l'immobilisation de l'enzyme sur l'activité.....	52
3.6 Activité spécifique apparente.....	57
3.7 Gamme de linéarité de la trypsine après immobilisation sur les billes de verre (CPG).....	61
3.8 Dépendance de l'enzyme avec le pH du milieu d'hydrolyse	65
3.9 Digestion de la β-caséine.....	69

4. CONCLUSION.....	80
RÉFÉRENCES.....	85
ANNEXE.....	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Action catalytique des enzymes et énergie d'activation.....	4
Figure 2: Schéma représentatif de la formation du produit de la réaction en fonction du temps.....	6
Figure 3: Détermination des constantes de cinétique enzymatique selon la méthode de Lineweaver-Burk.....	9
Figure 4: Préparation de l'azide de carboxyméthylcellulose et attachement avec l'enzyme.....	13
Figure 5: Préparation de la chlorure de diazonium et attachement avec l'enzyme via un lien azote-azote.....	14
Figure 6: Préparation du dérivé de bromure de cyanogène activé et attachement avec l'enzyme.....	14
Figure 7: Préparation d'un dérivé actif d'une aldéhyde et son attachement avec l'enzyme.....	15
Figure 8: Préparation des dérivés isocyanate et isothiocyanate et attachement avec l'enzyme concernée.....	15
Figure 9: Préparation d'un dérivé actif carbodiimide et son attachement avec l'enzyme	16
Figure 10: Immobilisation de l'enzyme par les diisothiocyanate dérivés sur le support solide.....	17
Figure 11: Spectre d'absorption (UV/Vis) de la trypsine (1.4×10^{-6} M) dans un tampon phosphate (Na_2HPO_4 , 0.05 M, pH 7)	21

Figure 12: Effet du pH sur l'activité enzymatique.....	22
Figure 13: Variation de la quantité d'enzyme immobilisée en fonction du temps d'immobilisation à 25 ⁰ C pour les trois méthodes.....	44
Figure 14 : Formation du produit Tosyl-Arginine (TA) par la trypsine immobilisée sur les billes par la méthode de glutaraldéhyde en fonction du temps	50
Figure 15: Variation de l'activité enzymatique en fonction de nombre d'unité d'enzyme utilisé durant l'immobilisation pour 10 mg de billes.....	51
Figure 16: Variation de la vitesse de digestion en fonction de la concentration du substrat (TAME) : droite Lineweaver-Burk.....	54
Figure 17: Comparaison entre l'activité spécifique par mg de la trypsine immobilisée sur les billes de verre poreuses par EDC, DITC et glutaraldehyde avec celle de la trypsine libre.....	60
Figure 18: Détermination de la gamme de linéarité de réponse de la trypsine immobilisée.....	63
Figure 19: Effet du pH du tampon sur la vitesse de formation du produit TA par la trypsine immobilisée sur les billes de verre suivant la technique d'immobilisation.....	66
Figure 20 : Électrophérogrammes montrant les cartes peptidiques de la β -caséine avec la trypsine immobilisée sur les billes (CPG) via DITC	71
Figure 21: Étude de la reproductibilité du microréacteur	73
Figure 22: Électrophérogrammes de digestion de la β -caséine (5.2 mg/ml) par la trypsine immobilisée sur les billes de verre (CPG) via glutaraldéhyde, EDC et DITC.....	76

Figure 23 : Autodigestion de la trypsine soluble.....	77
Figure 24 : Digestion de la β -caséine avec la trypsine soluble.....	78
Figure A1 : Procédure d’emballage du microréacteur.....	89
Figure A2 : Procédure de digestion de la protéine.....	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Données typiques obtenues durant l'immobilisation de 1.55 mg (masse initiale) de trypsine sur 77.68 mg de billes CPG-aminopropyl par la méthode de glutaraldehyde.....	45
Tableau 2: Quantité d'enzyme immobilisée obtenue sur CPG et d'autre type de support (polymère) par d'autres chercheurs.....	47
Tableau 3: Absorbances obtenues durant de la digestion du TAME par la trypsine immobilisée sur les billes par la méthode de glutaraldéhyde.....	49
Tableau 4: Sommaire des résultats comparant les trois techniques d'immobilisation de la trypsine.....	55
Tableau 5: Valeurs utilisées pour le calcul de l'activité spécifique de la trypsine immobilisé par EDC.....	57
Tableau 6: Comparaison de l'activité spécifique de la trypsine immobilisée avec celle de la trypsine libre	59
Tableau 7: Comparaison de la gamme de linéarité des concentrations des substrats suivant la technique d'immobilisation de la trypsine	64

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Absorbance
BAEE	Ester éthylique de benzoylarginine
BAPNA	N-benzoyl-D-arginine p-nitroanilide
CPG	Controlled Pore Glass (Billes de verre poreuses)
CDI	1,1-Carbonyldi-imidazole
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
d i	Diamètre interne
d e	Diamètre externe
DITC	Diisothiocyanate
EC	Électrophorèse Capillaire
EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
ITC	Isothiocyanate
$K_{M,app}$	Constante apparente de Michaelis-Menten (obtenue dans les conditions non saturantes entre la trypsine immobilisée et le substrat TAME)
Lt	Longueur totale (du capillaire)
Ld	longueur (du capillaire) jusqu'au détecteur
MeOH	Méthanol
N/A	N'est pas applicable dans la liste
PS	Billes de polystyrène non poreux
PS/PnaSS	Billes de polystyrène non poreux / poly (sodium styrène sulfonate)
PVA	Polyvinylalcool
PVA-FEP	Polyvinylalcool traité avec le tétrafluoroéthylène-hexafluoropropylène

SESA	β -Sulfate-(éthylène sulfonide)-aniline
TA	Tosylarginine
TAME	Ester méthylique de tosylarginine
TEA	Triéthylamine
TNBS	Trinitrobenzènesulfonate
Triazine	2,4,6-Tricholoro-1,3,5 triazine
Tris-HCl	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane, HCl
U	Unités d'enzyme
UV/Vis	Spectrophotométrie UV/visible
$V_{\max,app}$	Vitesse maximale apparente (obtenue dans les conditions non saturantes entre la trypsine immobilisée et le substrat TAME)

REMERCIEMENTS

Je tiens sincèrement à remercier ma directrice de recherche, Dr. Karen Waldron, pour son appui scientifique et moral et de l'ambiance du travail qu'elle nous a fourni, tout au long de mes études à l'Université de Montréal.

Je profite de cette occasion de remercier tous mes collègues de travail, Carl, Jean-François et surtout Dr. Catherine Dartiguenave pour les discussions scientifiques.

J'adresse également ma reconnaissance aux professeurs Jeffrey Keillor et Joelle Pelletier pour leurs conseils scientifiques.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis qui m'ont soutenu et encouragé à accomplir ce travail.

1. INTRODUCTION

Les enzymes jouent un rôle très important dans la vie des êtres humains ; elles sont les catalyseurs de la cellule vivante, accélérant les nombreuses réactions métaboliques des matières végétales et animales et rendant aussi possible dans les industries d'alimentations, comme les industries des boissons [1]. Elles sont aussi présentes dans les matières premières dont elles influencent la saveur, la texture, la couleur, ainsi que les propriétés de conservation. D'autre part, les enzymes sont utilisées comme des auxiliaires techniques pour accroître la qualité des produits, telles les propriétés nutritives, ainsi que les propriétés physico-chimiques comme la viscosité. Les enzymes sont également utilisées pour l'analyse des aliments et des fluides biologiques, notamment sous la forme de capteur biologique (mesure de glucose). De plus en plus, les enzymes sont impliquées dans la synthèse de molécules bio-organiques et, ironiquement, dans la digestion (ex. décomposition) de biopolymères tels que l'ADN et les protéines pour faciliter leur analyse structurale. Tout d'abord, l'analyse structurale est l'application enzymatique qui nous intéresse : la digestion enzymatique des protéines pour leurs caractérisation par cartographie peptidique.

En particulier, notre groupe de recherche est intéressé à développer un système de digestion simple, petit, efficace et pouvant être couplé à l'EC. *Le but des études élaborées dans ce mémoire* est d'immobiliser de manière covalente la trypsine, une enzyme protéolytique, sur les billes de verre par plusieurs techniques chimiques comme le glutaraldéhyde, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyle) carbodiimide (EDC) et le diisothiocyanate (DITC). L'efficacité de l'immobilisation (enzyme active ou non) et les paramètres cinétiques apparents ($K_{M,app}$ et $V_{max,app}$) de l'enzyme immobilisée ont été

déterminés puis les résultats de digestion d'une protéine, la β -caséine, réalisée dans un microréacteur déjà développé par notre groupe de recherche [2] ont été comparés avec les données de la littérature.

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous présentons les notions d'enzymologie nécessaires pour comprendre les études d'activité et de cinétiques enzymatiques, le principe de l'immobilisation des enzymes par liaison covalente, la présentation de la trypsine et finalement des travaux effectués sur les microréacteurs empaquetés avec les enzymes immobilisées. Dans le deuxième chapitre, les protocoles d'immobilisation de la trypsine, de caractérisation de la trypsine immobilisée (paramètres cinétiques), de l'empaquetage de la trypsine immobilisée, et de la cartographie peptidique sont présentés. Finalement, dans le troisième chapitre, les résultats obtenus sont présentés, discutés et comparés avec ceux de la littérature.

1.1 Notions d'enzymologie

Pour comprendre les propriétés des enzymes, il faut étudier leurs caractéristiques spécifiques, comme le pH optimum, l'activité enzymatique spécifique (unité d'activité par gramme de billes), l'affinité envers les substrats, la vitesse d'une réaction enzymatique et la cinétique de Michaelis (K_M , V_{max}). La cinétique enzymatique se caractérise par les constantes K_M et V_{max} . Dans notre étude on a pu caractériser la trypsine immobilisée sur les billes de CPG dans les conditions saturantes, ceci pourrait être dû à l'enzyme, ou aux conditions expérimentales utilisées. Cependant, on ne peut pas déterminer la valeur exacte de ces constantes, nous devons les approximer en $K_{M,app}$ et $V_{max,app}$.

Toutes les enzymes sont des protéines qui possèdent des propriétés catalytiques très spécifiques. L'activité catalytique des enzymes (donc l'activité enzymatique) s'explique par leur faculté à abaisser l'énergie d'activation des réactions biochimiques (fig. 1). Par exemple, l'énergie libre d'activation ΔG^\ddagger nécessaire à la réaction enzymatique diminue, alors que l'énergie libre réactionnelle ΔG reste inchangée en présence du catalyseur. Ces réactions biochimiques voient leur vitesse de réaction ainsi multipliée par un facteur de l'ordre de plusieurs milliers.

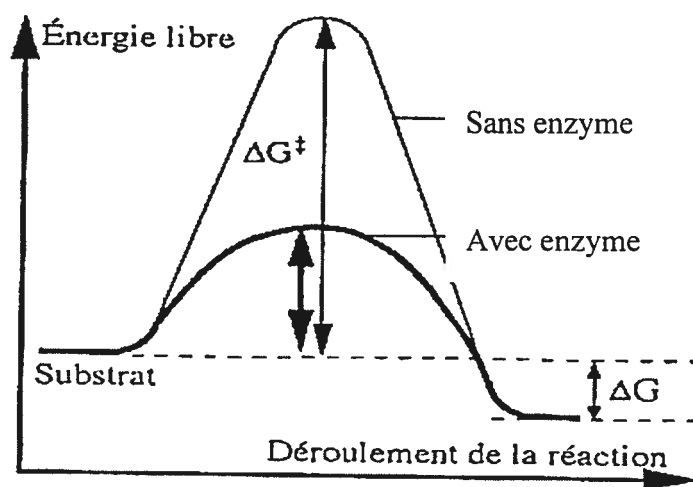


Figure 1: Action catalytique des enzymes et énergie d'activation [3].

La cinétique enzymatique relie mathématiquement la vitesse des réactions enzymatiques avec les paramètres dont celle-ci dépend, tels que les concentrations d'enzyme et de substrat(s), la température, le pH et la force ionique. La présence ou l'absence d'inhibiteurs, d'activateurs ou de co-facteurs jouent également un rôle important.

1.1.1 Vitesse d'une réaction

La vitesse d'une réaction chimique (catalysée ou non) est définie comme une variation de concentration, C, par unité de temps, t:

$$V_{\text{moy}} = \frac{\Delta C}{\Delta t} \quad \text{et} \quad V_t = \frac{dC}{dt} \quad (1)$$

où V_{moy} est la vitesse moyenne et V_t est la dérivée par rapport au temps de la fonction $C = f(t)$. Donc la vitesse initiale, V_i , sera la limite de V_t quand $t \rightarrow 0$.

Pour la réaction chimique générale :



l'équation de la vitesse de réaction sera :

$$V = -\frac{1}{a} \times \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \times \frac{d[B]}{dt} = \frac{1}{c} \times \frac{d[L]}{dt} = \frac{1}{d} \times \frac{d[M]}{dt} \quad (2)$$

$V = k [A]^a [B]^b$ est la loi de Van't Hoff où k est la constante de vitesse, a et b sont les ordres partiels de la réaction par rapport à A et à B. La relation d'Arrhenius exprime la constante k en fonction de la température et de l'énergie d'activation de la réaction.

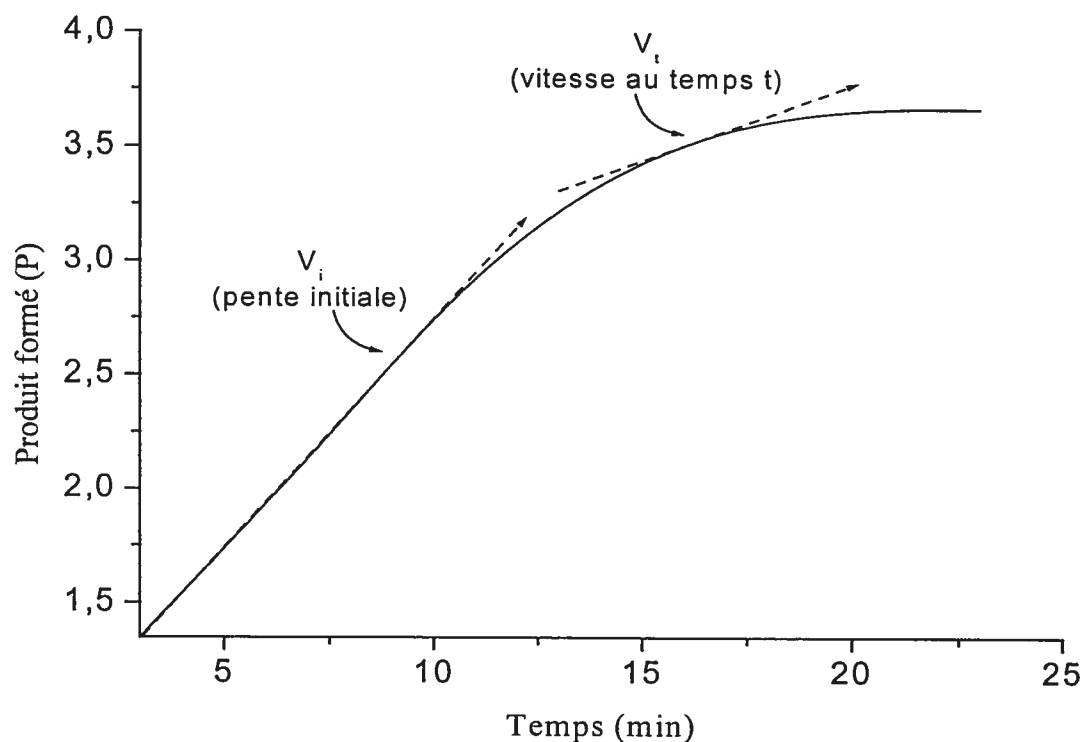
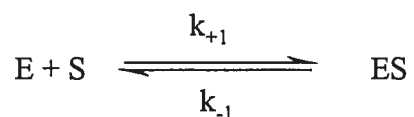


Figure 2: Schéma représentatif de la formation du produit de la réaction en fonction du temps. La vitesse initiale, V_i , est mesurée par la pente.

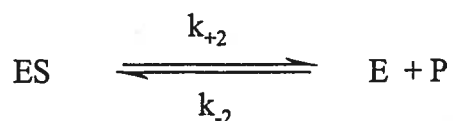
1.1.2 Loi de Michaelis-Menten

La théorie de la cinétique enzymatique fût développée par Michaelis et Menten, puis complétée par Briggs et Haldane [4]. Elle postule que:

1. L'enzyme, E, forme avec le substrat, S, un complexe ES au cours d'une réaction réversible:



2. Le complexe ES libère le produit, P, ainsi que l'enzyme:



La relation mathématique entre la vitesse initiale de réaction, V_i , la concentration en substrat, $[S]$, et les constantes de vitesse est donnée par les équations ci bas. La vitesse initiale de réaction est égale à la vitesse de disparition du complexe ES:

$$V_i = k_{+2} [ES] \quad (3)$$

La formation du complexe ES correspond à une loi de deuxième ordre:

$$d[ES]/dt = k_{+1}([E]_t - [ES]) [S] \quad (4)$$

avec $[E] = [E]_t - [ES]$ où $[E]_t$ est la concentration totale en enzyme et $[E]$ représente la concentration en enzyme sous forme libre (et $[E]$ est négligeable par rapport à $[S]$).

Au début de la réaction, la concentration en produit, $[P]$, est encore faible et la concentration en substrat $[S]$ très élevée, si bien que la réaction réversible de formation de ES à partir de E et de P peut être négligée. La vitesse de disparition du complexe ES devient:

$$-d[ES]/dt = k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \quad (5)$$

A l'état stationnaire, la vitesse de formation de ES égale sa vitesse de disparition:

$$k_{+1}([E]_t - [ES]) [S] = k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \quad (6)$$

On obtient la relation suivante:

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{(k_{+1})} = \frac{([E]_t - [ES])[S]}{[ES]} \quad (7)$$

où $K_{M,app}$ est la constante apparente de Michaelis-Menten. Elle représente le rapport des vitesses de disparition et de formation du complexe ES et reflète ainsi l'affinité de l'enzyme pour le substrat (plus K_M est grande plus l'affinité de l'enzyme est petite).

En transformant l'équation 7 pour exprimer $[ES]$, on obtient:

$$[ES] = \frac{[E]_t [S]}{(K_M + [S])} \quad (8)$$

et la vitesse initiale de réaction, V_i , est:

$$V_i = k_{+2} \frac{[E]_t [S]}{(K_M + [S])} \quad (9)$$

Si la concentration en substrat est suffisamment élevée pour saturer l'enzyme, la vitesse maximale de réaction, V_{\max} , est atteinte:

$$V_{\max} = k_{+2} [E]_t \quad (10)$$

Ainsi:

$$V_i = \frac{V_{\max} [S]}{(K_M + [S])} \quad (11)$$

Cette relation est connue sous le nom de loi de Michaelis-Menten. La concentration totale en enzyme est comprise dans le terme V_{\max} . Dans le cas particulier où $V_i = V_{\max}/2$ alors $K_M = [S]$. Ainsi, la valeur de K_M correspond à la concentration en substrat nécessaire pour obtenir la moitié de la vitesse maximale de la réaction. K_M s'exprime en mol/L et est donc indépendante de la concentration d'enzyme.

Pour des valeurs basses de la teneur en substrat, la vitesse de la réaction est linéairement dépendante de $[S]$, et la réaction est de premier ordre. Pour des valeurs élevées de $[S]$, la vitesse de la réaction devient constante (l'enzyme est saturée en substrat), et l'ordre de la réaction par rapport à $[S]$ tend vers zéro.

Les valeurs de K_M et V_{\max} s'obtiennent par la mesure de la vitesse de réaction initiale pour différentes concentrations en substrat. Différentes méthodes de linéarisation de l'équation 9 existent [5]. Parmi elles, la méthode classique de Lineweaver-Burk est donnée par :

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (12)$$

En reportant graphiquement $1/V_i$ en fonction de $1/[S]$ (ou en linéarisant mathématiquement), on obtient une droite de pente K_M / V_{\max} , et d'ordonnée à l'origine $1/V_{\max}$ (fig. 3).

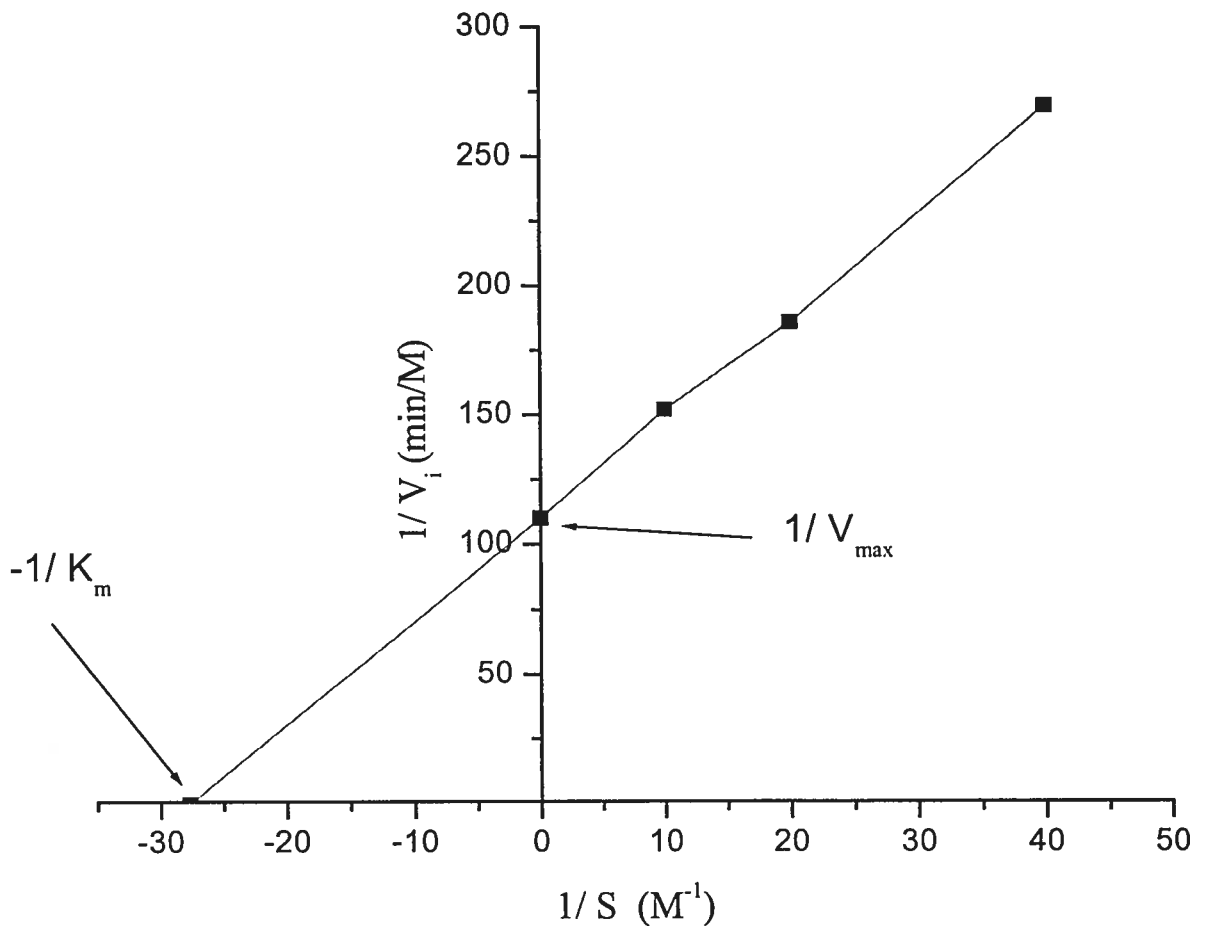


Figure 3: Détermination des constantes de cinétique enzymatique selon la méthode de Lineweaver-Burk.

La plupart des réactions enzymatiques mettent en oeuvre plusieurs substrats. Si l'un des substrats n'est pas en excès, les lois cinétiques deviennent rapidement plus complexes [6].

1.1.3 Activité enzymatique et spécifique de la trypsine immobilisée

Les concentrations très faibles auxquelles les enzymes agissent et le fait qu'elles soient mélangées à d'autres protéines, empêchent, en général, de les doser au sens courant du terme (mesure de leur concentration). En revanche, il est possible de "doser" une enzyme en mesurant son action ou son activité spécifique.

On distingue entre l'activité enzymatique, donnant la quantité d'enzyme, qui à 25°C et à la valeur optimale de pH, convertit une micromole de substrat en produit par minute. L'activité spécifique est égale à l'activité enzymatique divisée par la masse de l'enzyme ou la masse de la matière dans laquelle se trouve l'enzyme. Elle est une mesure de la pureté de l'enzyme, puisque indépendante de la quantité mise en jeu. Dans notre cas, l'activité spécifique est égale à l'activité enzymatique par gramme de solide parce que l'enzyme est fixée sur le support CPG. Par exemple, la trypsine immobilisée sur les particules CPG fournies par la compagnie Sigma possède une activité spécifique de 8 300 unités (U) BAEE par gramme de CPG (BAEE : ester éthylique de benzoylarginine; et 1 U est équivalent à 1 μmol BAEE transformé/min).

1. 2 Immobilisation des enzymes

L'immobilisation des enzymes a trouvé plusieurs applications industrielles, en chimie analytique [2], clinique [7], en environnement [8] et surtout dans les industries chimiques (digestion protéolytique. L'immobilisation des enzymes a été utilisée en

électrochimie, dans le bioréacteur à deux phases liquides, en chromatographie d'affinité et dans les biocapteurs.

La question qui se pose toujours lors de l'immobilisation des enzymes, est de savoir si l'enzyme conserve ses caractéristiques enzymatiques (activité et stabilité) après immobilisation. Plusieurs études [9] ont été réalisées dans ce domaine, celles-ci démontrent que généralement la stabilité de l'enzyme immobilisée augmente (stabilité thermique), mais que l'activité diminue. La stabilité thermique permet la flexibilité de manipulation dans le domaine de la digestion protéolytique. Par exemple, la diminution de l'activité dépend de la technique d'immobilisation utilisée, du changement conformationnel de la protéine et/ou de l'interaction entre l'enzyme et le support.

Dans la littérature, on trouve plusieurs techniques démontrant comment une enzyme peut être immobilisée sur un support insoluble dans l'eau. En général, l'immobilisation aide les chercheurs à modifier une surface, à diminuer la perte d'enzyme en la fixant sur le support selon le besoin analytique, et ceci est un avantage dans le domaine industriel.

L'immobilisation des enzymes se réalise soit par voie physique (adsorption), soit par voie chimique. L'immobilisation par voie physique est due à l'attachement de l'enzyme sur la surface du support par plusieurs types d'interactions : électrostatique, hydrophobe/hydrophile, et par les forces de Van der Waals. L'inconvénient de l'adsorption physique est généralement de créer un changement dans l'environnement de l'enzyme [9]. De plus, elle nécessite un contrôle précis du pH et de la force ionique durant l'application industrielle de l'enzyme adsorbée. Les interactions ioniques avec les composants du tampon peuvent entraîner un changement de la protéine. Un deuxième facteur influence l'immobilisation par adsorption : la température. La température joue

un rôle très important dans l'adsorption, celle-ci s'accomplit facilement à une température élevée, cependant l'augmentation de la température dénature l'enzyme.

L'attachement de l'enzyme par voie chimique nécessite un lien covalent ou de coordination entre l'enzyme et le support. L'immobilisation chimique diffère de l'attachement par adsorption, on remarque généralement qu'il y a diminution de l'activité de l'enzyme [10]. De plus, le lien covalent ou coordonnant formé entre l'enzyme et le support crée un changement structural de l'enzyme immobilisée, qui peut aussi affecter son site actif et ainsi diminuer l'activité de l'enzyme.

Généralement, certains acides aminés possédant des groupements thiols (SH), alcools (OH), et amines (NH₂) sont impliqués dans la réaction d'immobilisation [9,10]. Plusieurs supports pouvant réagir sélectivement avec un site particulier d'un acide aminé ont été décrits dans la littérature [10] ; la lysine est l'acide aminé le plus impliqué dans l'immobilisation, parce qu'elle possède un bon groupement nucléophile. L'attachement de l'enzyme sur le support entraîne une diminution de sa flexibilité. Le changement tridimensionnel de l'enzyme devient plus alors difficile, ce qui pourrait entraîner une diminution de l'activité enzymatique [5].

Dans notre étude, on se concentre sur l'immobilisation chimique, sur un support insoluble dans l'eau préalablement activé par des groupes chimiques (amine, etc..) en procédant par attachement par un lien covalent. Cette technique est la plus utilisée dans le domaine de l'immobilisation des enzymes. Théoriquement, l'attachement par le lien covalent est plus stable et plus versatile. Les méthodes d'attachement par un lien covalent les plus utilisées sont: l'azide de carboxyméthylcellulose, le lien azote-azote, le bromure de cyanogène, le glutaraldéhyde, l'isocyanate, l'isothiocyanate (ITC) et le carbodiimide (EDC). Ces sept méthodes sont brièvement décrites dans les pages

suivantes. Celles que nous avons utilisées: glutaraldéhyde, DITC et EDC sont détaillées dans le chapitre 2.

1.2.1 Azide de Carboxyméthylcellulose

Dans l'immobilisation de l'enzyme sur le support de cellulose, la carboxyméthylcellulose est convertie selon la réaction de la fig.4. Cette méthode est relativement simple, l'étape finale se réalise à un pH légèrement alcalin. Le produit final obtenu, est l'enzyme immobilisée par une liaison amide. Cette réaction peut être réalisée facilement avec la cystéine, la sérine et la tyrosine qui font partie de l'enzyme immobilisée.

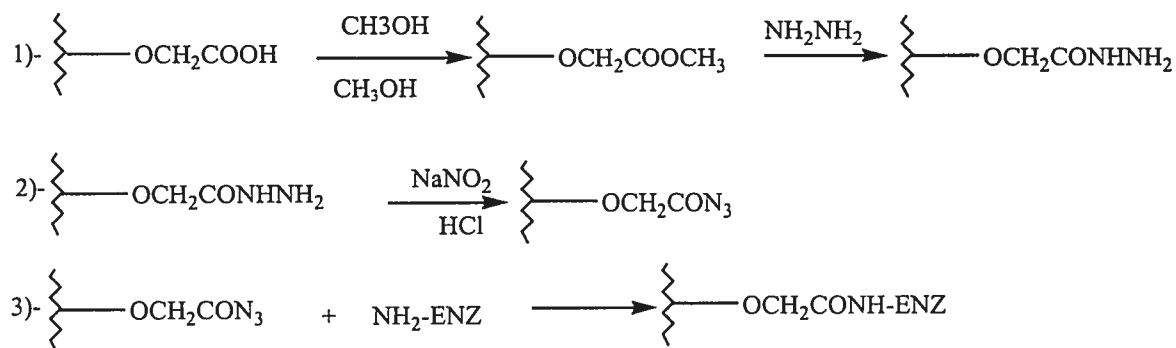


Figure 4 : Préparation de l'azide de carboxyméthylcellulose et attachement avec l'enzyme [9].

1.2.2 Lien azote- azote

Les arylamines sont facilement diazotées et couplées avec la protéine via un lien azote-azote avec les résidus tyrosine, et bien que, avec la lysine, arginine et la sérine de l'enzyme. La réaction d'immobilisation de l'enzyme se fait à un pH légèrement alcalin. Le polyaminopolystyrène réagit avec la protéine selon les réactions suivantes:

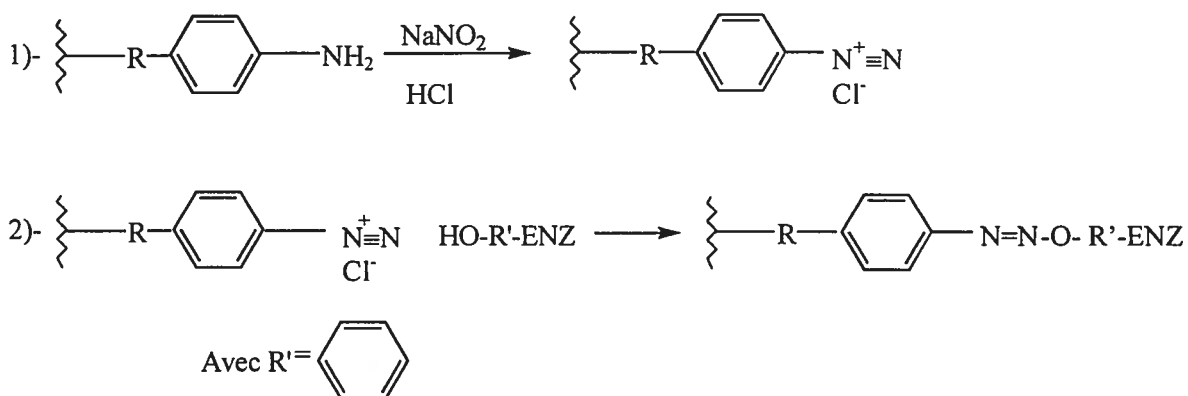


Figure 5 : Préparation de la chlorure de diazonium et attachement avec l'enzyme via un lien azote-azote [9].

1.2.3 Bromure de cyanogène

Avec cette méthode, l'enzyme est facilement attachée par un lien covalent sur un support insoluble comme l'agarose ou la cellulose, à un pH neutre ou alcalin (pH 9), selon les réactions de la fig. 6:

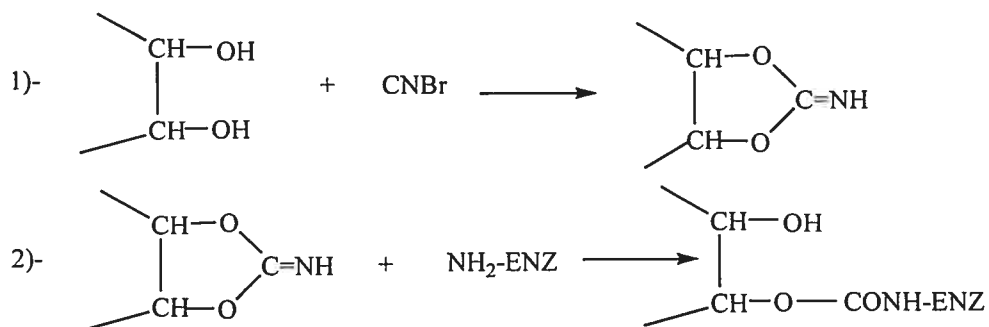


Figure 6 : Préparation du dérivé de bromure de cyanogène activé et attachement avec l'enzyme [9].

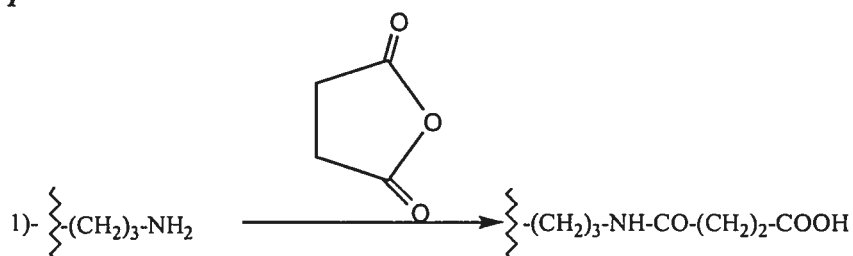
1.2.4 Glutaraldéhyde

L'attachement de l'enzyme dans cette méthode se fait par un lien covalent sur un support insoluble dans l'eau via un groupement glutaraldéhyde. Les meilleures conditions pour réaliser cette réaction sont un milieu neutre. L'attachement se fait entre le groupe

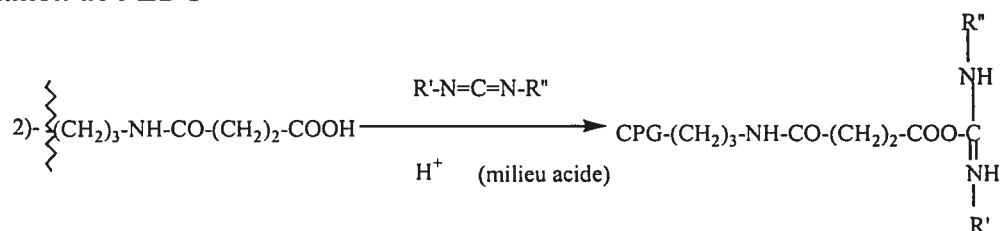
1.2.6 Carbodiimide soluble dans l'eau (EDC)

Les procédures générales d'immobilisation des enzymes avec le 1,1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) ont été décrites en détail par Mosbach en 1976 [11]. Brièvement, cette technique nécessite trois étapes:

Réaction du groupe amine présent sur le support aminopropylé avec l'anhydride succinique



Fixation de l'EDC



Immobilisation de l'enzyme

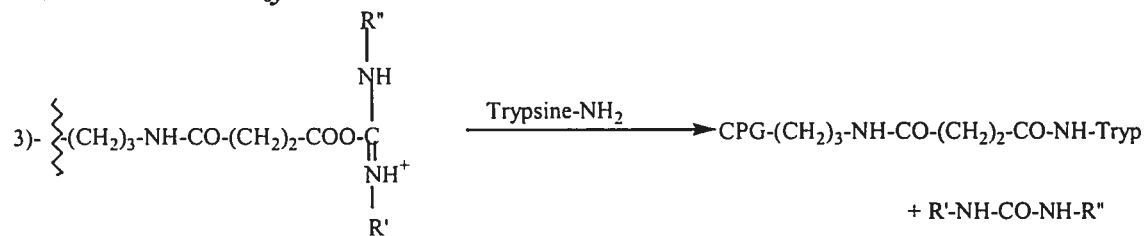


Figure 9: Préparation d'un dérivé actif carbodiimide et son attachement avec l'enzyme [1].

1.2.7 Immobilisation par DITC

Les supports solides (CPG) dérivés activés avec les diisothiocyanates (DITC), peuvent réagir avec les amines primaires de l'enzyme comme le montre la fig. 10. Ce genre de fixation se fait à un pH relativement alcalin tel que pH 8 à 9.5.

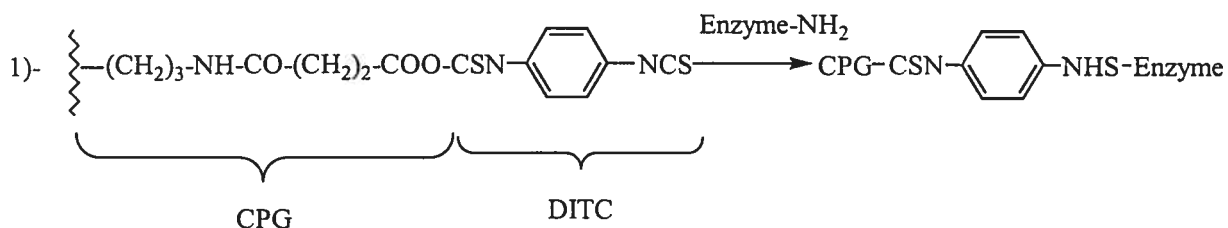


Figure 10 : Immobilisation de l'enzyme par les DITC dérivés sur le support solide.

Les trois techniques utilisées dans cette recherche incluent les méthodes d'immobilisation de l'enzyme par glutaraldéhyde, EDC et DITC afin de créer une liaison covalente entre le support solide et l'enzyme. Les détails sur les trois techniques d'immobilisation sont présentés dans le chapitre 2. Nous allons maintenant décrire brièvement l'enzyme que nous avons utilisée (la trypsine).

1.3 Trypsine

La trypsine est l'une des enzymes de la famille des protéases, sa structure ressemble à celle des autres enzymes protéolytiques, comme la chymotrypsine et l'élastase [12]. Ces enzymes coupent (hydrolysent) les liens peptidiques des protéines qu'on appelle substrat. Par exemple la chymotrypsine coupe le lien peptidique entre des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane et tyrosine) et leur voisin du côté C-terminal, tandis que l'élastase préfère les résidus neutres comme alanine, glycine,

sérine et valine [12]. Ces enzymes contiennent dans leur site actif la même séquence d'acides aminés appelée triade catalytique (His, Ser, Asp). Cette triade est responsable de l'action catalytique du substrat [12]. Le reste de la protéine assure la spécificité de la liaison du substrat.

La trypsine est une enzyme protéolytique qui contient 223 à 245 acides aminés selon l'organisme source (ex. Trypsine bovine 223 acides amines). Normalement, elle coupe les liens peptidiques du côté C-terminal de la lysine et de l'arginine. La conformation de la trypsine dépend fortement du pH utilisé, en effet il existe trois conformations de l'enzyme entre le pH 0.5 et 7 [12]. La forme inactive (le zymogène) de l'enzyme s'appelle le trypsinogène.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la triade catalytique, qui est le site actif, est responsable du mécanisme de digestion du substrat. Cette réaction est une hydrolyse de l'ester catalysée par la sérine (Ser195) [12].

1.3.1 L'activité enzymatique de l'enzyme libre

La technique de spectrophotométrie est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible qui correspondent aux transitions électroniques. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer-Lambert qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration de l'analyte. Cette technique a été utilisée durant ce projet pour déterminer la quantité d'enzyme immobilisée, l'activité spécifique de l'enzyme immobilisée, ainsi que les paramètres cinétiques de Michaelis.

Activité enzymatique

Tout d'abord, il faut mentionner que l'enzyme libre possède une certaine activité enzymatique. L'activité enzymatique, pour l'enzyme en solution (ex. libre ou soluble), peut être déterminée selon que le volume auquel on se rapporte est le volume du système contenant l'enzyme (sérum, érythrocytes, surnageant) et non celui du système d'essai où se fait la mesure (mélange réactionnel). La mesure se réduit souvent à une mesure de variation d'absorbance en fonction du temps (produit formé à partir d'un substrat donné) [13]. On aura donc selon la loi de Beer-Lambert: $A = \epsilon \lambda C$, alors $\Delta A/\Delta t(\text{min}) = \epsilon \lambda \Delta C/\Delta t(\text{min})$. Il faut donc : $\Delta A/t_{\text{réact}} = \epsilon \lambda \Delta C/t_{\text{réact}}$. La vitesse initiale, V_i , sera :

$$V_i = \Delta C/t_{\text{réact}} = \frac{\Delta A/t_{\text{réact}}}{\epsilon \lambda} \quad (13)$$

L'activité molaire (en U/L) sera : $\text{Activité molaire} = \frac{\Delta A/t_{\text{réact}}}{\epsilon \lambda} \times \frac{V_{\text{réact}}}{V_{\text{enz}}} \times 10^6$

où ϵ est l'absorptivité molaire ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) du produit formé, λ est le parcours optique (cm), $t_{\text{réact}}$ est le temps de réaction (min), C correspond à la concentration du produit formé en solution ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $V_{\text{réact}}$ est le volume du mélange réactionnel total où se fait la mesure (mL) et V_{enz} est le volume du milieu contenant l'enzyme à doser (mL).

L'activité spécifique

L'activité spécifique et les paramètres cinétiques apparentes ($K_{m,\text{app}}$, $V_{\text{max},\text{app}}$) ont été déterminés pour la trypsine immobilisée en suivant la variation de l'absorbance à 247 nm en fonction du temps due à la formation de Tosyl-arginine (TA) issue de l'hydrolyse du ester méthylique de tosylarginine (TAME) selon la réaction :



L'activité spécifique est donnée en unité (U) par gramme d'enzyme (soit dans sa forme libre soit dans sa forme immobilisée). C'est la capacité d'une enzyme à transformer une micromole de substrat par minute dans les conditions optimales de la réaction. Elle est donnée par l'équation suivante où le temps mesuré ($t_{\text{réact}}$) est en minutes et la masse de la CPG-trypsine est en milligrammes :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\Delta A_{247} \times 1000}{0.01 \times t_{\text{réact}} \times (\text{masse de CPG - trypsine})} \quad (15)$$

où ΔA_{247} est la variation de l'absorbance à 247 nm donnée par le spectrophotomètre, 1000 est le facteur de conversion de mg en g et 0.01 est le changement de l'absorbance à 247 nm par minute par unité de trypsine à un pH de 8.1 à 25°C pour un volume de solution de 3 mL.

Remarque : Il est bien de noter que 1 unité de TAME est égale à 57.5 unités de BAEE [14] ce qui permet la comparaison de l'activité spécifique de la trypsine libre par rapport à celle immobilisée en unité du substrat BAEE pour la comparaison avec le produit du Sigma Co. L'absorptivité molaire du TA est de $540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [14], ce qui a été utilisé pour calculer la concentration du produit formé (TA). En effet, les mesures présentées dans ce mémoire n'ont pas été effectués aux conditions saturantes (où $[\text{substrat}] > 10 \cdot K_M$) dans tous les cas donc il faut désormais rapporter les paramètres cinétiques *apparents* : $K_{M,\text{app}}$, $V_{\text{max},\text{app}}$ et l'activité spécifique apparente.

1.3.2 Quantité d'enzyme immobilisée

Durant ce projet, on a quantifié l'immobilisation de la trypsine sur les billes de verre par absorption en UV, en suivant le changement de l'absorbance à 280 nm du surnageant pendant la réaction d'immobilisation. La trypsine possède deux bandes d'absorption en UV, à 210 et à 280 nm (fig. 11). Celle à 280 nm est caractéristique de deux acides aminés : la tyrosine et le tryptophane, tandis que le lien peptidique absorbe généralement à 200 nm, une longueur d'onde moins utilisée (pour déterminer la quantité d'enzyme immobilisée) à cause de l'absorbance de plusieurs composés parasites dans cette région.

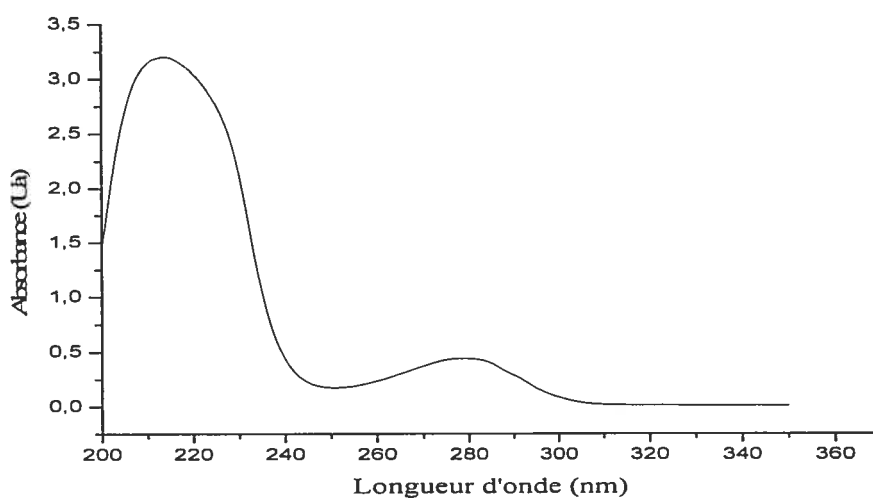


Figure 11: Spectre d'absorption (UV/Vis) de la trypsine (1.4×10^{-6} M) dans un tampon phosphate (Na_2HPO_4 , 0.05 M, pH 7)

Étant donné que les autres réactifs utilisés pendant le processus d'immobilisation n'absorbent pas à 280 nm, cette longueur d'onde est idéale pour quantifier la trypsine durant la processus d'immobilisation. La procédure était la suivante : on a mesuré

l'absorbance d'un mL de la solution réactionnelle, au début et à la fin de la réaction d'immobilisation (aliquot sans billes), et à partir des valeurs obtenues on a pu déterminer le pourcentage d'enzyme immobilisée d'après la concentration de la trypsine non immobilisée (ex., encore soluble). Le temps d'immobilisation optimal a été obtenu lorsque la variation d'absorbance maximale de la solution réactionnelle devient constante.

1.3.3 Effet du pH sur l'activité enzymatique

L'activité maximale des enzymes est liée à la conformation de l'enzyme, qui est elle-même une fonction du pH. Les domaines optimaux de pH sont caractéristiques des différentes enzymes comme il est démontré à la fig. 12 :

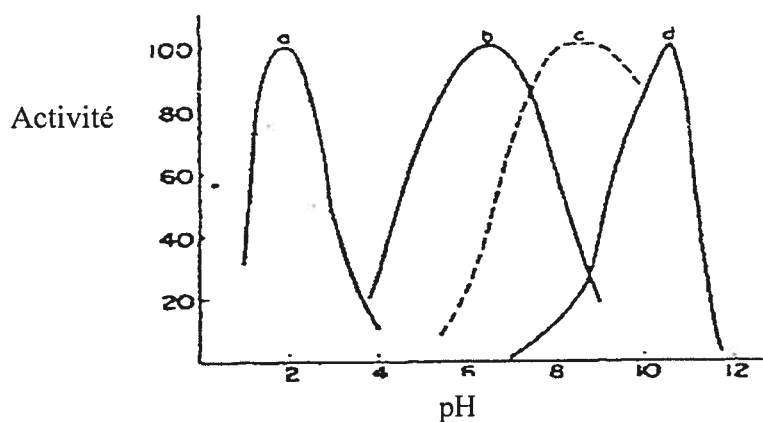


Figure 12: Effet du pH sur l'activité enzymatique. Les enzymes a, b, c et d sont décrits dans le texte [15].

Par exemple, l'activité optimale de la pepsine, sur le substrat l'acetyl-L-phenylalanyl-L-diiodotyrosine à 36.7°C est obtenue à pH 2 (fig. 12, a), mais l'activité optimale de la peroxidase de *Ficus glabatra* sur le guaiacol (0.03 M) et le H₂O₂ (0.005 M) à 30°C est à

pH 6 (fig. 12, b). L'activité optimale de la trypsine soluble avec la β -caséine, se situe à un pH compris entre 8 et 9 comme le montre la figure (12, c), par contre, l'hydrolyse de 5 % de phosphate de p-nitrophenyl 10^{-4} M avec la phosphatase alcaline à 35°C dans un tampon de glycinate sodium 0.1 M, a montré une activité maximale à pH 11 (fig. 12, d). Cependant, lorsque l'enzyme est immobilisée, cette gamme peut être déplacée selon la nature du support s'il est chargé positivement ou négativement, s'il est polaire ou non. La dépendance au pH de l'enzyme s'explique par le rôle de la distribution des charges des acides aminés du site actif de l'enzyme lors de l'interaction avec le substrat et lors du mécanisme catalytique, et aux extrêmes de pH par la dénaturation de l'enzyme.

Dans les prochains paragraphes on va citer les recherches effectuées par d'autres chercheurs sur les microréacteurs enzymatiques ainsi que sur l'électrophorèse capillaire et la séparation des protéines digérées.

1.4 Types de microréacteurs enzymatiques et enzymes immobilisées

Généralement, les enzymes immobilisées sur un support solide sont plus résistantes à la dénaturation de leur structure native, causée par l'effet de la chaleur et/ou du pH, car l'environnement de l'enzyme est similaire à celui où elle existe naturellement [16]. Les enzymes immobilisées sont plus résistantes aux inhibiteurs et aux activateurs. Elles sont considérées comme étant plus résistantes à l'autoprotéolyse. Ces enzymes conservent donc leur activité sur une période de temps prolongée. Donc l'immobilisation d'une enzyme possède beaucoup d'avantages au niveau analytique par rapport à l'enzyme libre en phase liquide. En effet, l'immobilisation d'une enzyme permet sa réutilisation plusieurs fois ce qui donne une gamme d'avantages incluant une réduction du coût des enzymes qui sont relativement chères et elles peuvent être empaquetées dans

un microréacteur pour les digestions des protéines [2]. Toutefois, des études élaborées dans ce mémoire montrent que le pH optimal, l'activité spécifique ainsi que les paramètres cinétiques ($K_{M,app}$, $V_{max,app}$) peuvent être affectés par l'immobilisation. Généralement, l'activité spécifique et l'affinité de l'enzyme envers le substrat diminuent d'une façon générale selon plusieurs études [17].

De nombreuses équipes travaillent aussi sur l'immobilisation d'enzymes et sur l'élaboration de microréacteurs, en particulier sur la construction d'un microréacteur analytique compacté avec des enzymes immobilisées sur un support solide, soit des polymères, soit les billes de verre, soit les parois même du réacteur. Cobb et Novotny [18] ont utilisé de la trypsine immobilisée sur gel d'agarose placée dans une colonne de 30 cm de longueur pour la digestion de quelques nanogrammes (80 fmol) de β -caséine. L'élution du substrat à travers le microréacteur se faisait à pression atmosphérique en ajoutant du tampon de digestion à l'entrée de microréacteur et une séparation des fragments peptidiques recueillis a été effectuée par EC après lyophilisation. L'inconvénient de leur microréacteur est le temps de digestion, qui est long puisque seule une faible pression peut être appliquée pour éviter le cassage du gel d'agarose.

Voyksner *et al* [19] ont tenté l'immobilisation de différentes enzymes, comme les carboxypeptidases A, B et Y, la chymotrypsine, la thermolysine, la trypsine et la protéase V_8 sur des billes de verre, ce qui sont plus robustes que le gel d'agarose, par la technique de carbodiimide soluble dans l'eau à un pH neutre. Les billes subissent au préalable une silanisation et une succinilation. Ensuite la réaction d'immobilisation se fait en présence de la carbodiimide soluble dans l'eau à pH neutre. Les billes sont ensuite empaquetées dans une colonne en acier inoxydable.

Amankwa et Khur [20] ont décrit un microréacteur enzymatique très intéressant. Durant leur étude, l'enzyme était immobilisée sur la surface interne d'un capillaire de silice fondue de 50 cm de longueur et de 50 μm de diamètre interne, via une immobilisation basée sur le couplage avidine-biotine-trypsine. L'avantage de cette technique était un temps de digestion relativement court. L'utilisation d'un système microréacteur-EC en ligne offrait l'avantage d'avoir moins de perte de produit et moins de contamination. L'inconvénient de cette méthode était que le temps d'immobilisation de l'enzyme sur la paroi du capillaire est relativement long. D'une façon similaire, Nashabeh *et al.* [21] ont fabriqué des microréacteurs avec différentes enzymes (ribonucléase T₁, hexokinase) immobilisées sur la paroi d'un capillaire de silice fondue de 15 à 25 cm de longueur par réticulation à la glutaraldéhyde.

Bonneil *et al.* [2] ont utilisé la trypsine immobilisée sur les billes de verre via la méthode de couplage DITC fournie commercialement par Sigma Inc. (8300 unités de BAEE/g de bille). Ils ont construit un microréacteur de 30 cm de longueur pour la digestion de la β -caséine (voir les figures en annexe). Le temps de préparation du microréacteur était de quelques minutes, parce que l'enzyme a été déjà fournie immobilisée. Leur microréacteur a montré une bonne reproductibilité et une longévité remarquable. Cependant, le volume du microréacteur était plus grand que celui construit en immobilisant l'enzyme sur le parois du capillaire [21].

1.5 Électrophorèse capillaire pour la cartographie peptidique

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique de séparation de très bonne résolution qui s'est développée grâce aux acquis de l'électrophorèse classique. Cette technique joue un rôle très important dans le domaine de chimie analytique, surtout dans

l'application biomédicale, biotechnologie, ainsi que dans la génétique. De plus, le couplage de l'EC à la spectrométrie de masse (SM) a résolu beaucoup de mystères dans le domaine de l'analyse médicale. Dans notre équipe on utilise l'EC pour la séparation des fragments tryptiques après digestion d'une protéine, donc dans la détermination des cartes peptidiques. La première carte peptidique en EC fut obtenue par Jorgensen et Lukacs en 1981 [22] avec un clivage tryptique de la lysozyme provenant de blancs d'œufs.

Les applications des cartes peptidiques vont de la détection de modifications post-traductionnelles d'acides aminés, à l'identification et la localisation de variantes génétiques [23]. La cartographie peptidique joue un rôle très important dans le séquençage des protéines pour créer des polypeptides (fragments) plus facile à analyser, soit par les méthodes classiques de dégradation chimique, soit par spectrométrie de masse.

2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les différentes sections qui composent la partie expérimentale sont : la description des produits et des instruments utilisés, les protocoles d'immobilisation de la trypsine, l'étude des paramètres cinétiques de l'enzyme fixée, le protocole de digestion de la β -caséine, ainsi que l'instrumentation utilisée durant la digestion et la séparation du digestat (ex. microréacteur, EC).

2.1 Produits et Matériels

Les billes de verre CPG-aminopropylées (80-120 mesh, grosseur du pore de 700 Å), CPG-DITC (80-120 mesh, grosseur du pore de 700 Å), ester méthylique de tosylarginine (TAME), tryptophane (W), β -Caséine (bovine, phosphorylé), l'azidure de sodium, le bicarbonate de sodium, trypsine du pancréas de bovine traité avec TPCK (13 600 unités/mg), glycérol, 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), trinitrobenzènesulfonate (TNBS), l'anhydride succinique, chlorure de calcium (CaCl_2) et la glycine sont fournies par Sigma Inc. (St-Louis, MO). Le glutaraldéhyde, l'éthanolamine, l'éthanol, l'acétone, la solution de triéthylamine et le cyanoborohydrure de sodium (NaCNBH_3) ont été achetés chez Aldrich Inc. (Milwaukee, WI). L'hydroxyde de sodium (97%), l'acide chlorhydrique sont fournis par la compagnie BDH (Toronto, ON). Le phosphate de sodium monobasique et dibasique, et l'acide phosphorique ont été obtenus chez Anachemia (Montréal, QC). Le tétraborate de sodium a été fourni par A&C Produit Chimiques (Montréal, QC). Le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (tris-HCl) a été acheté chez Fluka (Oakville, ON). Les gaz utilisés, l'azote (N_2) et l'argon (Ar) ont été fournis par Liquid Carbonic (Scarborough, ON).

2.2 Appareillages

La réaction d'immobilisation, ainsi que la cinétique (activité) de la trypsine immobilisée ont été suivies par spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV/Vis (Varian, modèle Cary 100 Bio) relié à un système pour thermostatier les cellules à la température voulue durant le travail (Thermo ISOTEMP 1016P, Varian).

Afin de sécher les billes CPG-aminopropylées après la réaction de succinilisation, on a utilisé une étuve de modèle 349 Isotemp de Fisher Scientifique (St-Laurent, QC)

La séparation des fragments peptidiques de la β -caséine a été effectuée sur le P/ACE-MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter, Inc) avec détection à 200 nm. Les détails sur les dimensions du capillaire et tampon sont donnés dans la section 2.8.

Le microréacteur enzymatique a été fabriqué avec une capillaire ayant la dimension de 30 cm de longueur et de 520 μm d.i., 800 μm d.e (Mandel Scientific, Guelph, ON). Il a été compacté avec les billes de trypsine comme décrit par Bonneil [2]. Finalement, un réfrigérant de 25 cm de longueur, fabriqué par le souffleur de verre du département de chimie, Université de Montréal a été employé pour contrôler la température du microréacteur durant la digestion.

2.3 Techniques d'immobilisation de la trypsine

Les trois méthodes utilisées pour immobiliser la trypsine sur les billes de verres sont décrites en détail dans cette section.

2.3.1 Immobilisation de la trypsine sur les billes de verre avec le glutaraldéhyde

La trypsine a été immobilisée via le glutaraldéhyde sur le support CPG-aminopropylées selon les procédures suivantes:

Étape 1 Fixation du groupement aldéhyde sur le support CPG-aminopropylé [24]

La fixation du groupement aldéhyde sur les billes a été effectuée selon la réaction 1 (fig. 7) en agitant, sous le flux d'azote (1-3 psi), 100 mg de billes CPG-aminopropylée dans 3.5 mL du tampon Tris-HCl, 0.05 M, pH 8.4, 1% (v/v) glutaraldéhyde pendant 3h à 25°C (une faible couleur rouge-brun apparaît). Ensuite les billes ont été lavées avec 6 fois 1 mL de la même solution tampon pour enlever l'excès de glutaraldéhyde.

Étape 2 Immobilisation de la trypsine sur les billes CPG-aminopropylée-glutaraldéhyde [25]

L'immobilisation de la trypsine sur les billes CPG-aminopropylées glutaraldéhyde a été réalisée selon les réactions 2 et 3 (fig.7) en ajoutant 77.68 mg du CPG-aminopropylée-glutaraldéhyde dans 3 mL du tampon Tris-HCl (0.05 M, pH 8.4), contenant 1.9 mg de NaCNBH_3 , (ce qui fait une concentration finale de 10 mM dans la solution) avec 1.55 mg de trypsine cristalline pendant 3- 4 h à 25 °C. La solution a été dégazée avec l'azote (N_2) pendant 5-10 min avant l'ajout de la trypsine cristalline. La réaction d'immobilisation a été effectuée dans un vial de polyéthylène afin d'éviter l'adsorption de la trypsine sur la paroi du contenant. Ensuite les billes-trypsine ont été lavées avec 3 fois 1 mL de la même solution tampon Tris-HCl, suivie par 3 fois 3 mL de NaCl 2 M. Les fractions de lavage ont été recueillies et dernière fraction et la dernière a été vérifiée par spectrophotométrie d'absorption pour s'assurer qu'il ne restait plus

d'enzyme non liée sur les billes, et pour calculer le pourcentage d'enzyme immobilisée (voir sections 2.4 et 3.3).

Étape 3 Désactivation des groupements aldéhydes n'ayant pas réagit avec la trypsine [24,26]

La désactivation des groupements aldéhyde restant après l'immobilisation de la trypsine (étape 2) a été réalisée par addition de glycine (16 mg/mL dans une solution de Tris-HCl, 0.05M, pH 8.4) pendant 2 h à 25°C. Ensuite les billes ont été lavées avec 6 fois 1 mL de la même solution tampon pour éliminer l'excès de glycine, puis les billes ont été séchées avec un courant d'azote et conservées à -20°C.

2.3.2 Immobilisation de la trypsine sur les billes de verre via le carbodiimide soluble dans l'eau

La fixation de la trypsine sur la matrice du CPG-aminopropylée via le carbodiimide soluble dans l'eau (EDC) a été réalisée comme suit [11,19].

Étape 1 Fixation de l'anhydride succinique sur la matrice CPG-aminopropylée [19]

La fixation de l'anhydride succinique sur le support CPG-aminopropylée a été effectuée selon la réaction 1 (fig. 8). Une solution d'acétone (3 mL) contenant 10% (p/v) anhydride succinique et 1% (v/v) triéthylamine (TEA) a été ajoutée à 100 mg de CPG-aminopropylée. La solution a été agitée sous un flux d'azote (1-3 psi) pendant 3h à 25°C (attention au débit du gaz; il fait évaporer l'acétone rapidement). Ensuite, les billes ont été lavées avec 7 fois 2 mL d'acétone pour éliminer l'excès d'anhydride succinique, puis ont été séchées dans l'étuve à 70°C pendant 20 min environ. Le test avec le

trinitrobenzènesulfonate (TNBS), décrit ci-dessous, a été effectué pour vérifier si la réaction de succinilisation a été terminée [11].

Test TNBS: Afin de vérifier la fin de la réaction de succinilisation, on a utilisé le test TNBS. Il consiste à ajouter 1 mL d'une solution saturée de tétraborate de sodium sur 1 mg de billes obtenues dans l'étape 1 et 3 gouttes d'une solution de trinitrobenzènesulfonate (3% v/v). La solution est agitée à la main pendant 1 min, puis laissée reposer pendant 2h à 25 °C. Ensuite les billes sont lavées avec de l'eau pure. Si une couleur orange apparaît sur les billes, ceci signifie que la réaction de succinilisation est incomplète; si les billes sont incolores, alors, la réaction est terminée.

Étape 2 Fixation de l'EDC soluble dans l'eau sur les CPG-aminopropylées-succinilées

La fixation de l'EDC sur les billes via les groupements carboxyliques a été effectuée selon la réaction 2 (fig. 8) [11]. Dans un tube Eppendorf de 2 mL, on a fait réagir les billes obtenues dans l'étape 1, pendant 40 – 60 min à 25°C, sous un flux d'azote, avec une solution de 1.5 mL de NaH_2PO_4 , 0.2 M, pH 4.75, contenant 0.1 M d'EDC cristalline. Ensuite les billes ont été lavées avec 3 fois 1 mL de la solution tampon Na_2HPO_4 , 0.05 M, pH 7 à 0°C. Il fallait absolument que la solution tampon de lavage soit à une température égale à 0°C et que le lavage soit rapide.

Étape 3 Immobilisation de la trypsine sur les CPG- aminopropylées-succinylées-EDC

La fixation de la trypsine sur les CPG- aminopropylées-succinylées-EDC a été réalisée selon la réaction 3 (section 1.1.6) en faisant réagir les billes obtenues dans l'étape 2, avec 2 mg de trypsine cristalline pendant 2-3 h à 25°C, dans 3.5 mL de la

solution tampon Na_2HPO_4 , 0.05 M, pH 7 dégazé avec l'azote à l'avance pendant 5-10 minutes. L'enzyme immobilisée sur les billes de verre a été lavée avec 3 fois 3 mL d'eau désionisée suivit par 3 fois 3 mL urée 2M, suivie par 3 fois 3 mL de NaCl 2 M, et ensuite par 3 fois 3 mL de Tris-HCl, 0.05 M, pH 7.5, qui contient 0.2% (p/v) d'azidure de sodium et CaCl_2 0.2 M. La dernière fraction de lavage a été vérifiée avec le spectrophotomètre UV/Vis pour s'assurer qu'il ne reste plus d'enzyme non liée sur les billes et pour calculer le pourcentage d'enzyme immobilisée. Les billes ont été séchées et conservées à -20°C .

2.3.3 Immobilisation de la trypsine sur les billes de verre via DITC

La fixation de la trypsine sur les billes CPG-DITC, une technique rapide et facile à réaliser, consiste à faire réagir les billes avec une solution de trypsine selon les étapes suivantes:

Étape 1 Fixation de la trypsine sur les billes CPG-DITC

La fixation de la trypsine sur les CPG-DITC a été réalisée selon la réaction 1 (fig. 10). Une masse de 6 mg de billes (CPG-DITC) a été agitée avec 0.28 mg de trypsine cristalline, dans 1.5 mL de la solution tampon carbonate de sodium 0.1 M, pH 9.5, pendant 75 min à 25°C (concentration finale en trypsine de 10^{-4} M). À la fin de la réaction, l'enzyme immobilisée sur les billes a été lavée avec 3 fois 3 mL de carbonate de sodium 0.1 M, pH 7 contenant NaCl 0.5 M, puis 3 fois 3 mL de carbonate de sodium 0.1 M, pH 7. Le surnageant du tube de réaction et les lavages ont été prélevés afin de déterminer par spectrophotométrie UV/Vis le pourcentage de fixation de l'enzyme.

Étape 2 Blocage des sites DITC n'ayant pas réagit [27]

Le blocage des sites DITC n'ayant pas réagit avec la trypsine a été réalisé avec 1 mL d'éthanolamine 2 M, pH 8.0, sous agitation pendant une heure. Ensuite, les billes ont été lavées avec 3 fois 3 mL d'une solution contenant du NaCl 0.5 M et de l'acide acétique 0.05M, puis par 3 fois 3 mL d'HCl 0.001 M et finalement par 3 fois 3 mL d'éthanol anhydre. Les billes ont été séchées sous flux d'azote à 25°C et conservées à – 20°C.

2.4 Estimation de la quantité d'enzyme immobilisée

La quantité d'enzyme immobilisée a été déterminée en mesurant l'absorbance de la solution réactionnelle (à $\lambda = 280$ nm) contenant la trypsine au début (A_0) et pendant la réaction d'immobilisation jusqu'au moment où l'absorbance ne change plus. Un mL de la solution trypsine (dissous dans le tampon d'immobilisation) a été pipeté dans la cuvette de quartz de 1 mL de volume, l'autre cuvette ne contenant que la solution tampon qui a servi comme la référence (le blanc). On remet l'aliquot utilisé dans la solution réactionnelle d'immobilisation de la trypsine, où se trouve les billes de CPG activées, et on continue de cette façon jusqu'à l'obtention des données nécessaires pour la figure 13 (au chapitre 3). La différence en absorbance, ΔA , de la solution trypsine entre le début (A_0) et à la fin de la réaction (A_{fin}), où A_{fin} tient compte de l'absorbance de tous les solutions de rinçage, est proportionnelle à la concentration de la trypsine immobilisée durant la réaction d'immobilisation. Le rapport de la variation de l'absorbance, ΔA , divisé par l'absorbance de la solution initiale, A_0 , représente la

variation (en pourcentage) de la quantité de la trypsine immobilisée par lien covalent.

Alors le pourcentage d'enzyme immobilisée sera :

$$\% \text{ d'enzyme immobilisée} = (\Delta A / A_0) \times 100$$

De plus, l'absorbance A_0 est proportionnelle aussi à la quantité initiale de trypsine (C_{initiale}), tandis que la variation de l'absorbance, ΔA , est proportionnelle à la quantité d'enzyme immobilisée ($C_{\text{immobilisée}}$). Donc, la quantité d'enzyme immobilisée sera :

$$C_{\text{immobilisée}} = (\Delta A / A_0) (A_0) C_{\text{initiale}}$$

Les mesures d'absorbance des lavages de la trypsine immobilisée (ex., CPG-glutaraldehyde-trypsine) avec la même solution tampon utilisée durant l'immobilisation et avec le NaCl ont montré que la quantité d'enzyme immobilisée par adsorption ou par effet électrostatique ne dépassait pas 1% de la quantité totale immobilisée. Par exemple, le pourcentage d'enzyme immobilisée par lien non covalent était $A_{\text{lavages}}/A_0 \times 100 = 1\%$. En conséquence, on peut dire que la valeur obtenue de la quantité d'enzyme immobilisée n'est pas vraiment loin de la valeur obtenue par lien covalent et donc que son écart relatif est : $1\% \div (64+1)\% = 1.5\%$.

2.5 Étude de l'activité spécifique de l'enzyme immobilisée

L'étude de l'activité spécifique de l'enzyme immobilisée a été effectuée selon la procédure suivante [28]. Dans une cuvette de quartz contenant 2.6 mL de la solution tampon Tris-HCl, 47 mM et CaCl_2 11.5 mM, de pH 8.1 ont été ajoutés successivement 0.4 mL de la solution TAME, et 3-4 mg du CPG-Enzyme. Le mélange a été agité avec un vortex à vitesse moyenne durant 1 à 1.5 minutes. Puis la formation du produit

tosylarginine (TA) a été mesurée par UV/vis à 247 nm. L'activité spécifique a été calculée par l'équation 15, dans la section 1.1.3.

2.6 Étude de la variation du pH sur l'activité de l'enzyme immobilisée

Afin de trouver les conditions optimales de digestion, l'étude de la variation du pH de la solution contenant l'enzyme immobilisée et son substrat a été effectuée en mesurant l'hydrolyse d'un substrat spécifique (TAME). En effet, c'est l'activité estérase de la trypsine en fonction du temps sous les différentes conditions du pH qui est suivie. Les mesures ont été fait par spectrométrie UV/Vis dans une cellule standard de quartz selon la procédure suivante. Une solution de 2.6 mL de Tris-HCl, 47 mM, et de CaCl₂, 11.5 mM, à pH 7 a été ajoutée à 0.4 mL d'une solution TAME (1.9 mM concentration finale dans la cellule) et 10 mg de billes avec l'enzyme immobilisée. La réaction de formation du produit tosylarginine (TA) qui absorbe à 247 nm, a été suivie pendant 18 min afin de construire le graphique [TA] en fonction du temps et ensuite d'extrapoler la vitesse initiale en fonction du pH. L'expérience a été répétée pour différents pH (7.5, 7.8, 8, 8.1, 8.2, et 8.5) (fig 20), et la vitesse initiale en fonction du pH a été portée en graphique.

2.7 Détermination de la gamme de concentration en substrat dans laquelle l'enzyme immobilisée présente un comportement Michaelien (gamme de linéarité)

L'étude de la gamme de linéarité de l'activité de l'enzyme immobilisée [13] se fait de la même façon que la section 2.6 précédente, mais en travaillant au pH optimal de l'enzyme immobilisée (dans notre cas, le pH optimum est 8.1) et avec une concentration du substrat TAME variant de 2.4×10^{-5} à 80×10^{-5} M. Le graphique de l'inverse de la

vitesse initiale ($1/V_i$) en fonction de l'inverse de la concentration du substrat ($1/[TAME]$) nous fournissent les renseignements nécessaires sur la gamme de linéarité de l'enzyme immobilisée, comme démontré à la fig. 19.

2.8 Étude de la digestion du β -caséine avec et sans microréacteur enzymatique

La digestion de la β -caséine dans le microréacteur fabriqué à partir des billes que nous avons préparées a été faite selon les procédures mentionnées par Bonneil *et al.* [2] (voir les figures en annexe). La concentration de la solution β -caséine était de 2.4×10^{-4} M (5.8 mg/mL) dans une solution tampon de Na_2HPO_4 , 0.05 M, pH 8.1. Le tryptophane (W), à une concentration finale de 0.2 mM, a été ajouté à la solution comme étalon interne pour la cartographie peptidique par électrophorèse capillaire.

La digestion de la β -caséine (2.9×10^{-4} M) avec la trypsine soluble a été réalisée dans une solution tampon de Na_2HPO_4 , 0.05 M, pH 8.1. Le substrat a été incubé (sans agitation) à 37 °C pendant 2 h, avec un ratio enzyme : substrat = 1 : 100. Les conditions de séparation par EC sont : Na_2HPO_4 25mM, pH 2.5, séparation de 15 kV, injection de 5 sec à 0.5 psi, $\lambda = 200$ nm, $L_t = 59$ cm, $L_d = 49$ cm.

2.9 Étude de l'autodigestion de la trypsine soluble

L'autodigestion de la trypsine soluble (1.5×10^{-5} M) a été effectuée dans une solution de Na_2HPO_4 , 0.05 M, pH 8, avec 0.2 mM tryptophane (W) comme étalon interne, pendant 24 h. Les conditions de séparation par EC sont : Na_2HPO_4 50mM, pH 2.5, séparation de 15 kV, injection de 0.5 sec à 0.5 psi, $\lambda = 200$ nm, $L_t = 74$ cm, $L_d = 43.5$ cm.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Immobilisation

Chaque processus basé sur l'utilisation des enzymes immobilisées implique le choix du type de support, de la méthode d'immobilisation et l'optimisation de nombreux paramètres spécifiques à chaque expérience. L'immobilisation des enzymes présente une gamme d'applications dans les industries alimentaires, chimiques et pharmaceutiques en plus de notre application pour la cartographie peptidique.

La caractérisation des protéines par la cartographie peptidique se fait depuis plusieurs années déjà par l'emploi d'enzymes immobilisées [2,18]. De telles enzymes pourraient être obtenues commercialement pour cette application spécifique mais généralement à une plus grande échelle que celle qui nous intéresse, c'est à dire à l'échelle des microlitres pour être compatibles avec la cartographie peptidique par électrophorèse capillaire. Bonneil *et al* [2] ont démontré qu'un microréacteur pouvait être fabriqué à partir des enzymes immobilisées sur des billes de verre poreuses (CPG-DITC-Enzyme) pour atteindre ce but. Cependant, les enzymes immobilisées utilisées dans ces études [2] étaient fournies par Sigma Inc., mais ne sont plus disponibles chez Sigma. De plus, elles sont très coûteuses chez d'autres fournisseurs et sont difficiles à obtenir pour des enzymes autres que la trypsine. Le travail présenté dans ce mémoire est une étude approfondie de la chimie de l'immobilisation des enzymes. Notre but était de développer une méthode rapide et efficace pour l'immobilisation de la trypsine sur des billes de verre poreuses (CPG) et de les utiliser sous forme de microréacteur pour faire la protéolyse de petits volumes de protéines suivis par l'analyse par électrophorèse capillaire.

Nous avons choisi les billes de verre (CPG) comme support d'enzyme, parce qu'elles possèdent une grande stabilité mécanique vis à vis du pH, des solvants et de la pression contrairement aux polymères. De plus, elles ne sont pas dégradées par les micro-organismes. De plus, la chimie de greffages des molécules organiques sur la silice est connue depuis longtemps. Toutes ces raisons font qu'elles représentent un choix intéressant pour une immobilisation d'enzyme en vue de digestion et pour l'utilisation du microréacteur "en ligne" avec des appareils analytiques tels que l'électrophorèse capillaire. Comme décrit dans l'introduction, l'immobilisation des enzymes peut se faire soit par voie physique soit par voie chimique. Le voie chimique a été choisie durant cette étude.

L'attachement de l'enzyme par voie chimique nécessite un lien covalent entre l'enzyme et le support. L'enzyme est liée de manière forte au support : elle est stable mais perd souvent une partie de son activité suite à un changement structural causé par les processus de greffage. On comprend que selon la nature du support et de l'enzyme utilisée, différentes réactions peuvent se produire et qu'il convient de déterminer quels sont les groupements, comme l'amine (NH_2), le thiol (SH) ou l'alcool (OH) de la protéine qui vont réagir avec les groupements électrophiles (DITC, EDC ou aldéhyde) présents sur le support.

Dans cette optique, nous avons étudié plusieurs aspects de l'immobilisation de la trypsine sur des billes de verre poreuses, par trois méthodes mettant en jeu trois groupements électrophiles différents, comme intermédiaire de fixation ("linker arm") à savoir le glutaraldéhyde, l'EDC et le DITC. L'optimisation de ces trois méthodes est présentée dans les sections suivantes. Brièvement, ces groupements pourront réagir avec les groupements nucléophiles de l'enzyme (groupements amines, alcools, thiols).

Comme nous voulons conserver, après fixation, une enzyme active, nous devons empêcher l'enzyme de se lier par les groupements OH, car le site actif de la trypsine contient une sérine (OH). Nous avons choisi de faire une fixation par les groupements amines primaire de l'enzyme

Pour immobiliser la trypsine par les trois techniques choisies, il a fallu prendre en considération la spécificité de chaque technique comme le choix du tampon d'immobilisation, du pH, ainsi que de la force ionique du tampon d'immobilisation, la stabilité du groupement intermédiaire (glutaraldéhyde, EDC et DITC) entre l'enzyme et le support utilisé, l'élimination des phénomènes d'adsorption non-spécifique de l'enzyme libre après immobilisation (lavage rigoureux), et la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir une activité optimale. Dans les prochains paragraphes, nous allons expliquer les paramètres choisis pour chaque technique d'immobilisation.

Avant d'aborder les caractéristiques de chaque technique, il y a plusieurs paramètres utilisés en commun aux trois techniques, comme le choix du tampon d'immobilisation, la force ionique du tampon d'immobilisation et la concentration de l'enzyme au début de l'immobilisation. Le choix du tampon de fixation est un paramètre fondamental dans l'immobilisation de la trypsine. Il ne doit, en effet, pas contenir de groupements nucléophiles qui pourraient réagir avec le glutaraldéhyde, l'EDC ou le DITC. D'autre part, le tampon doit présenter une gamme tampon maximale comprise entre pH 7 et pH 9.5 où les liens du groupements électrophiles-billes et les amines primaires de l'enzyme sont déprotonés, par exemple, le tampon Tris-HCl pour glutaraldéhyde, le tampon phosphate pour EDC et le tampon carbonate pour DITC. La force ionique du tampon, si elle est comprise entre 0.5 et 0.05 M n'affecte pas ou peu (3% environ) la quantité d'enzyme immobilisée selon Hall et *al.* [29]. Il apparaît d'après

ces études [29] que la réaction d'immobilisation des enzymes est plus efficace à faible concentration d'enzyme (0.5 mg/mL) qu'à forte concentration (2 mg/mL).

Dans les prochains paragraphes, les paramètres utilisés dans la technique de glutaraldéhyde, EDC et DITC durant l'immobilisation seront discutés.

Immobilisation par glutaraldéhyde

L'immobilisation de l'enzyme sur les billes de verre poreuses via la glutaraldéhyde, est une technique facile à réaliser. Le choix du pH dans les deux étapes de la réaction (section 2.3.1 étape 1 et étape 2) est conforme aux références utilisées. Cette valeur du pH est raisonnable parce que le groupe nucléophile NH_2 du CPG-aminopropylé (étape1) peut réagir facilement avec le groupement carbonyle (CO) de l'aldéhyde. De plus, cette valeur du pH est convenable pour une réaction d'immobilisation. Durant l'immobilisation de la trypsine via le glutaraldéhyde, on aura formation d'une double liaison ($\text{R-N}=\text{CH-R}'$), ce qu'on appelle la base de Schiff, et génération d'eau (section 2.3.1 étape 2). Cette réaction peut être réversible dans certains cas, surtout à un pH élevé. De plus, quand une enzyme est immobilisée sur les billes de verre via glutaraldéhyde, la formation de la liaison $\text{N}=\text{C}$ produit un changement de couleur des billes, du blanc (billes incolore) vers le rouge-brun. Ce changement montre que la réaction d'immobilisation de la trypsine via les groupements carbonyles ($\text{C}=\text{O}$) sur les billes a bien réussi. Cependant, l'utilisation du NaCNBH_3 (l'agent de réduction choisi dans notre étude) ou du NaBH_4 , recommandé dans quelques références [9], fait disparaître cette couleur, ce qui signifie que les doubles liaisons ont bien été réduites. Mais, lequel de ces deux agents de réduction est plus utile dans notre étude?

Etant donné qu'il est bien nécessaire de réduire cette double liaison, deux agents de réduction sont généralement utilisés : le borohydrure de sodium (NaBH_4 , agent de réduction fort) et le cyanoborohydrure de sodium (NaCNBH_3 , agent de réduction doux). Le choix de l'agent de réduction NaCNBH_3 et les conditions expérimentales employées (section 2.3.1 étape 2) ont été utilisées suivant le protocole de Lee et Lee [30]. L'emploi de NaBH_4 (agent le plus fort), permet de réduire les ponts disulfures présents dans les protéines et les enzymes, et de couper les liens peptidiques [31], donc de dénaturer les protéines. Jentoft et Dearbon [32] ont montré que le NaCNBH_3 est 3 fois plus sélectif envers les doubles liaisons que NaBH_4 . De plus, le NaCNBH_3 est moins sensible aux variations de pH puis qu'il présente une bonne stabilité en milieu acide (pH 6), alors que NaBH_4 qui dépend fortement du pH, oblige à travailler à un pH supérieur ou égal à 9. De plus, l'avantage du NaCNBH_3 est qu'il ne provoque pas une diminution de l'activité de l'enzyme [33].

Une étape importante de l'immobilisation de la trypsine est l'étape de désactivation des groupements aldéhyde n'ayant pas réagit avec l'enzyme pour éliminer toute réaction parasite. Une réaction de désactivation (section 2.3.1 étape 3) était nécessaire pour éviter la fixation de protéines (les substrats pour la cartographie peptidique) lors de l'utilisation des billes. La désactivation des groupements aldéhyde restants se fait après l'étape d'immobilisation d'enzyme avec la glycine, à une concentration de 16 mg/mL [24].

Immobilisation par EDC

Quant à la technique d'immobilisation par carbodiimide soluble dans l'eau (EDC), il est possible de faire réagir l'anhydride succinique soit en milieu aqueux (tampon

phosphate), soit dans un milieu non aqueux (acétone) [19]. La réaction dans un milieu non aqueux est plus avantageuse, car elle est moins longue et moins compliquée (section 2.3.2 étape 1). Dans l'étape de succinylation (étape 1), l'agitation des billes se fait avec un courant d'azote ou d'argon. Le débit d'agitation ne doit pas être fort, parce qu'à fort débit, il entraîne une évaporation rapide de l'acétone. De ce fait, il y aura précipitation de l'anhydride succinique. Le test TNBS (section 2.3.2 étape 2) est alors réalisé pour déterminer si les amines primaires du CPG-propyl-NH₂ ont complètement réagi avec l'anhydride succinique, donc pour vérifier si la réaction de succinylation est complète. Si une couleur orange apparaît sur la surface des billes, cela signifie que la succinylation n'est pas complète, tandis que si les billes sont incolores, alors la succinylation totale des billes a eu lieu. La réaction de fixation d'EDC sur les billes se fait à un pH acide de 4.75 parce que les carbodiimides ne réagissent qu'en milieu acide. De plus l'EDC est ajouté en excès dans la solution.

Dans notre étude, on a choisi de fixer l'EDC sur les billes de verre avant d'immobiliser la trypsine pour les raisons suivantes. Selon Janolino *et al.* [11], les études ont été menées sur la fixation de la trypsine en utilisant EDC. L'ajout simultané de l'EDC et de la trypsine permet la fixation de l'enzyme quel que soit le rapport EDC/enzyme. Cependant une grande quantité de l'EDC cause une réticulation créée par les liens entre les groupements carboxyliques dus à la succinylisation et les groupements amines de la trypsine et les réactifs d'EDC présents dans la solution. De plus, selon Janolino *et al.*, lorsque la quantité de EDC augmente dans la solution, l'activité spécifique de l'enzyme diminue.

Immobilisation par DITC

La fixation de la trypsine par la technique de DITC est plus rapide que les autres techniques, parce que les groupements DITC sont déjà liés avec les CPG, mais ces groupements sont très sensibles à une valeur de pH plus élevée que 9.5 [34]. Cependant, à cette valeur de pH, il était vraiment possible d'immobiliser la trypsine, car le lien CPG-DITC présente une bonne stabilité pendant au moins 12 heures [34]. Pourtant, il est possible de travailler dans une marge de valeurs de pH comprises entre 8 et 9.5. Le pH de 9.5 a été choisi pour des raisons de stabilité (CPG-DITC), de nucléophilie et point isoélectrique (pI).

La désactivation des groupements $-N=C=S-$ du DITC qui n'ont pas réagit (pour éviter l'adsorption du substrat utilisé durant la digestion) avec la trypsine (section 2.3.3 étape 3), a été réalisée par l'ajout de l'éthanolamine 2 M, à pH 8.0 pendant 1 h.

3.2 Lavage des billes CPG-enzyme immobilisée

Une fois que l'enzyme est immobilisée, un lavage des billes est nécessaire pour éliminer les enzymes libres ou fixées par adsorption, les impuretés de toutes sortes et/ou les traces de bactéries qui pourraient causer la diminution de l'activité de notre trypsine immobilisée. Ce lavage est d'abord effectué avec le tampon d'immobilisation pour éliminer l'excès d'enzyme puis avec le tampon contenant du NaCl ou de l'urée pour éliminer les enzymes immobilisées par adsorption ou par interaction électrostatique et finalement l'alcool servira à sécher l'enzyme immobilisée sur CPG. Les solutions de lavage contenant l'azidure de sodium (NaN_3) ont été employées pour éliminer les bactéries, ainsi que les solutions de lavage contenant de la chlorure de calcium pour stabiliser l'enzyme ($CaCl_2$) [35].

Dans les prochains paragraphes, on discute de la quantité d'enzyme immobilisée (avec un exemple de calcul), de la durée de la réaction d'immobilisation, et de la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir l'activité optimale de la trypsine durant l'immobilisation.

3.3 Détermination de la quantité d'enzyme immobilisée et le temps d'immobilisation

La figure 13 démontre comment le pourcentage d'enzyme immobilisée varie selon la durée de la réaction d'immobilisation pour les trois méthodes d'immobilisation.

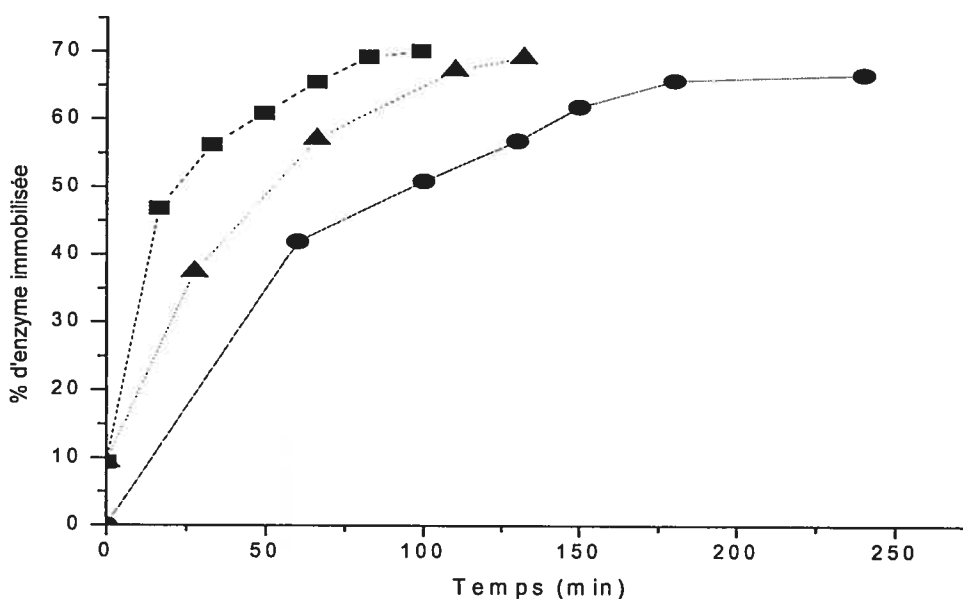


Figure 13 : Variation de la quantité d'enzyme immobilisée en fonction du temps d'immobilisation à 25°C pour les trois méthodes. où : (▲) EDC, (■) DITC, (●) glutaraldéhyde. Les conditions d'immobilisations sont décrites dans la partie expérimentale.

Le pourcentage d'enzyme immobilisée atteint son maximum (69 %) avec le DITC à 85 min tandis qu'avec l'EDC, on a obtenu 64 % d'enzyme immobilisée après 150 min.

Quant à la technique de glutaraldéhyde, le pourcentage d'enzyme immobilisée atteint 64 % après 180 min, comme le montre la fig. 13.

La quantité d'enzyme immobilisé par gramme de bille a été calculée à partir du pourcentage d'enzyme immobilisée. Le pourcentage a été estimé selon la différence de l'absorbance de la solution réactionnelle mesurée à 280 nm entre le début et la fin de la réaction d'immobilisation comme décrit à la section 2.4. La durée de la réaction d'immobilisation de l'enzyme, à partir du moment où la trypsine est ajoutée, varie d'une technique à l'autre. De plus, il dépend fortement de la température de la réaction, le type du tampon, le pH et la concentration initiale d'enzyme par rapport aux grammes de billes activés. Pour les trois méthodes d'immobilisation, la valeur de l'absorbance à 280 nm varie peu après 180 min de réaction, donc ce temps était considéré comme la fin de la réaction. Le tableau 1 donne un exemple de données typiques pour la méthode d'immobilisation par glutaraldéhyde. Après 180 min de réaction, on atteint une quantité de 13.0 ± 0.2 mg de trypsine immobilisée par gramme de bille.

Tableau 1 : Données typiques obtenues durant l'immobilisation de 1.55 mg (masse initiale) de trypsine sur 77.68 mg de billes CPG-aminopropylées par la méthode de glutaraldéhyde.^a

Temps de réaction	Absorbance à $\lambda=280$ nm	Pourcentage d'immobilisation	Quantité absolue de trypsine immobilisée	Quantité relative de trypsine immobilisée
0 min	0.7099	0 %	0 mg	0 mg/g de bille
180 min	0.2568	63.84 ± 1.5 %	0.990 mg	12.6 ± 0.2 mg/g de bille

^a Volume = 1 mL.

La valeur de l'absorbance $A_0 = 0.7099$ correspond à la quantité d'enzyme libre (ex., soluble) dans la solution au début de la réaction d'immobilisation, tandis que la

valeur de l'absorbance de la trypsine restante dans la solution après immobilisation $A_{fin} = 0.2568$. Donc l'absorbance de la quantité d'enzyme immobilisée sera :

$$\Delta A = A_0 - A_{fin} = 0.7099 - 0.2568 = 0.4531$$

Alors le pourcentage d'enzyme immobilisée sera :

$$\% \text{ d'enzyme immobilisée} = (\Delta A / A_0) \times 100 = (0.4531 / 0.7099) \times 100 = 63.84\%$$

$$\begin{aligned} \text{Masse immobilisée} &= (63.84\% \times 1.55 \text{ mg}) \div [(63.84\% \times 1.55 \text{ mg}) + 77.68 \text{ mg}] \\ &= 12.6 \text{ mg/g solide} \end{aligned}$$

Le lavage de la trypsine immobilisée (CPG-Trypsine) avec la même solution tampon utilisée durant l'immobilisation a montré que le degré d'adsorption non spécifique de l'enzyme sur les billes (immobilisations autres que le greffage covalent) sont minimales et inférieures à l'écart relatif de 1.5 % du pourcentage de l'immobilisation. Donc, durant notre étude, on n'a pu immobiliser plus que 12.6 ± 0.2 mg de trypsine par gramme de bille par la technique de glutaraldéhyde et de 12.8 ± 0.2 mg par la technique d'EDC, tandis que la quantité maximale avec la technique de DITC était de 30.0 ± 0.4 mg/g de bille.

On constate d'après la fig. 13 que la réaction d'immobilisation est rapide, au début puis après 50 à 150 min selon la technique utilisée, elle se ralentit pour atteindre un plateau. Pour le glutaraldéhyde, on trouve que le plateau est atteint en environ 180 min, alors qu'avec les deux autres techniques (EDC et DITC) il l'est en seulement en 90 min. Ce phénomène peut être dû à la présence des nombreux sites électrophiles libres. Ainsi, les groupements nucléophiles de la protéine (NH_2 , OH et SH) seront facilement accessibles aux groupes DITC ou EDC, qui peuvent être plus électrophiles qu'aux groupes carbonyles du glutaraldéhyde, présents en grands nombres sur les billes. D'autre part la masse d'enzyme immobilisée obtenue à la fin de la réaction, comme le montre le

tableau 2 varie d'une technique à une autre. La masse la plus élevée de trypsine est obtenue par la technique de DITC (30 mg/g de billes), tandis que les techniques de EDC et du glutaraldéhyde ont démontré une valeur d'environ 13 mg/g de billes. Ces résultats concordent plus ou moins bien avec les valeurs trouvées par d'autres chercheurs qui ont travaillé sur l'immobilisation de la trypsine sur les billes de verre comme le montre le tableau 2.

Tableau 2 : Quantité d'enzyme immobilisée obtenue sur CPG et d'autre type de support (polymère) par d'autres chercheurs.

Technique d'immobilisation	Enzyme immobilisé (mg)	Quantité d'enzyme immobilisée (mg/g de support)	Réf.
CPG-DITC	Trypsine	25	[36]
CPG-DITC	Trypsine	30.0 ± 0.4	Ce travail
CPG-EDC	Trypsine	20	[19]
CPG-EDC	Acides aminés	9.8-10.3	[37]
CPG-EDC	Trypsine	12.8 ± 0.2	Ce travail
CPG-ITC	Subtilisine	180	[38]
Bille de polyacrylamide-EDC	Carboxypeptidase B	100	[39]
Membrane de métacrylate-glutaraldéhyde	Trypsine	3.6	[24]
CPG-glutaraldéhyde	Trypsine	12.6 ± 0.2	Ce travail

Weetall *et al.* [36] ont immobilisé la trypsine sur les billes de CPG via DITC et leurs résultats ont montré que 25 mg d'enzyme/g de billes ont été fixés par lien covalent, tandis que Voyksner *et al* [19] ont travaillé avec la trypsine et le carbodiimide soluble dans l'eau. Ils ont immobilisé 20 mg de trypsine/g de billes. Davis *et al* [37] avec la même méthode que Voyksner mais en utilisant la technique d'analyse des acides aminés

en fin de réaction ont montré que seulement 9.8 à 10.3 mg d'enzyme/g de billes ont été immobilisés.

L'immobilisation d'autres d'enzymes (subtilisine, carboxypeptidase) sur différents supports a aussi été étudiée. Chapman *et al.* [38] ont immobilisé de la subtilisine sur les billes de verre avec l'isothiocyanate (ITC). Ils ont ensuite hydrolysé un gramme des billes obtenues (CPG-Enzyme), et titré les acides aminés présents dans la solution pour trouver que 180 mg d'enzyme ont été immobilisés. Südi *et al.* [39] ont immobilisé de la carboxypeptidase B sur les billes de type polyacrylamide avec carbodiimide soluble dans l'eau. Leurs résultats montrent que 100 mg d'enzyme ont été fixés par gramme de bille.

D'autres chercheurs comme Jiang *et al.* [24] ont immobilisé la trypsine sur une membrane de cellulose modifiée (méthacrylate de glycidyle modifié) par le glutaraldéhyde. La quantité d'enzyme immobilisée par gramme de polymère sec obtenue est de 3.6 mg.

Les études des autres chercheurs et dans ce travail montrent que le rendement d'immobilisation varie beaucoup. Cependant, ces écarts ne sont pas uniquement une fonction du type d'enzyme ou de la méthode de fixation utilisée, mais aussi de la concentration initiale de l'enzyme en solution. En effet si la quantité d'enzyme immobilisée est moins importante, en effet, l'activité enzymatique et la vitesse de protéolyse après immobilisation d'une telle enzyme sont plus importantes.

3.4 Quantité d'enzyme nécessaire pour une activité optimale

Il apparaît d'après l'étude de Hall *et al.* [29] que la réaction d'immobilisation des enzymes est plus efficace à faible concentration initiale (0.5 mg/mL). C'est pour cela que nous avons cherché quelle est la quantité d'enzyme nécessaire pour l'obtention de

l'activité maximale. En effet, doubler la quantité d'enzyme immobilisée n'augmente pas nécessairement l'activité enzymatique. Nous avons donc fait varier la quantité d'enzyme à immobiliser sur une quantité fixe de billes (10 mg du CPG) puis nous avons déterminé l'activité d'une masse donnée de bille après immobilisation.

Avant de discuter de l'activité obtenue après cette étude, il faut définir l'activité. L'activité est le nombre de micromoles de substrat, par exemple le TAME, digéré par minute dans les conditions optimales de la réaction, ou en d'autres termes, la vitesse initiale de digestion du substrat TAME en micromole par minute sous conditions saturantes en substrat (éq. 14). Cette réaction a été suivie par l'absorption UV/Vis en mesurant l'absorbance à 247 nm où le produit formé, TA, absorbe (section 2.5). Par exemple, le calcul de la vitesse initiale, pour une concentration de TAME de 5×10^{-5} M, peut être fait à partir des valeurs des absorbances données dans le tableau 3.

Tableau 3: Absorbances obtenues durant de la digestion du TAME par la trypsine immobilisée sur les billes par la méthode de glutaraldéhyde.

Temps (min)	A (à 247 nm)	[TA] x (10^{-5} M) ^a
3	0.0037	1.35
7	0.0114	2.12
11	0.0161	2.98
15	0.0188	3.48
19	0.0198	3.67

^a La concentration du TA est obtenue à partir de la loi de Beer-Lambert, avec $\epsilon = 540$ ($M \text{ cm}$)⁻¹. [35].

En construisant le graphique du TA en fonction du temps à partir des données du tableau 3, on peut déduire la vitesse initiale (activité) comme le montre la figure 14. La vitesse initiale calculée à partir de ce graphique est de 2.0×10^{-6} M/min.

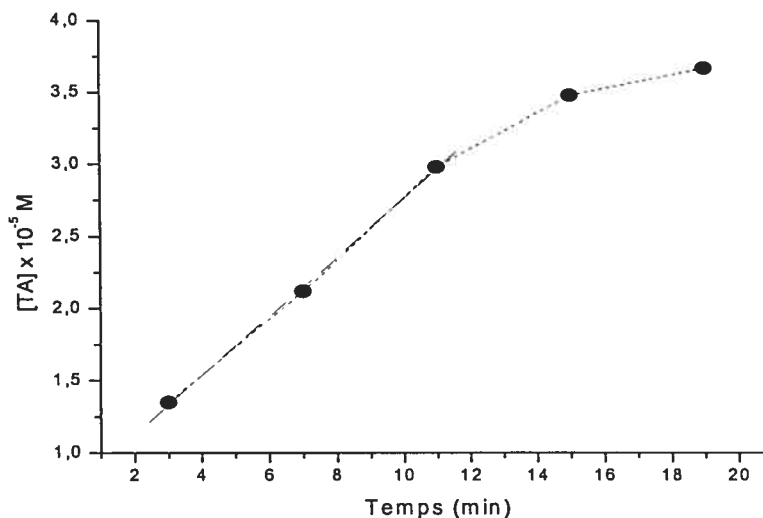


Figure 14 : Formation du produit Tosyl-Arginine (TA) par la trypsine immobilisée sur les billes par la méthode de glutaraldéhyde en fonction du temps (vitesse initiale, ou activité). $Y = 7.24 \times 10^{-6} + 2.04 \times 10^{-6} X$, $R = 0.999$

Selon l'information fournie par Sigma, par définition, 1 mg de trypsine cristalline correspond à 13 600 unités BAEE. Pour déterminer le nombre d'unités d'enzyme nécessaires à l'obtention de l'activité maximale, les graphiques ont été construits (fig. 15). Dans un premier temps, 8 aliquots de 10.0 mg de billes de CPG ont été prélevés. Ensuite, huit quantités croissantes d'enzyme allant de 490 à 1000 unités (activité de la trypsine cristalline, avant fixation) ont été immobilisées chacune sur un aliquot différent de billes de CPG, et cela pour chacune des trois méthodes : l'EDC, le DITC et la glutaraldehyde. Puis la vitesse initiale de digestion d'un échantillon de TAME de 5×10^{-5} M a été déterminée pour chaque aliquot de bille-enzyme. Les résultats obtenus dans la figure 15 montrent que l'activité maximale est effectivement atteinte avec environ 1000 unités d'enzyme pour les trois techniques, ce qui correspond à 0.0735 mg de la trypsine cristalline.

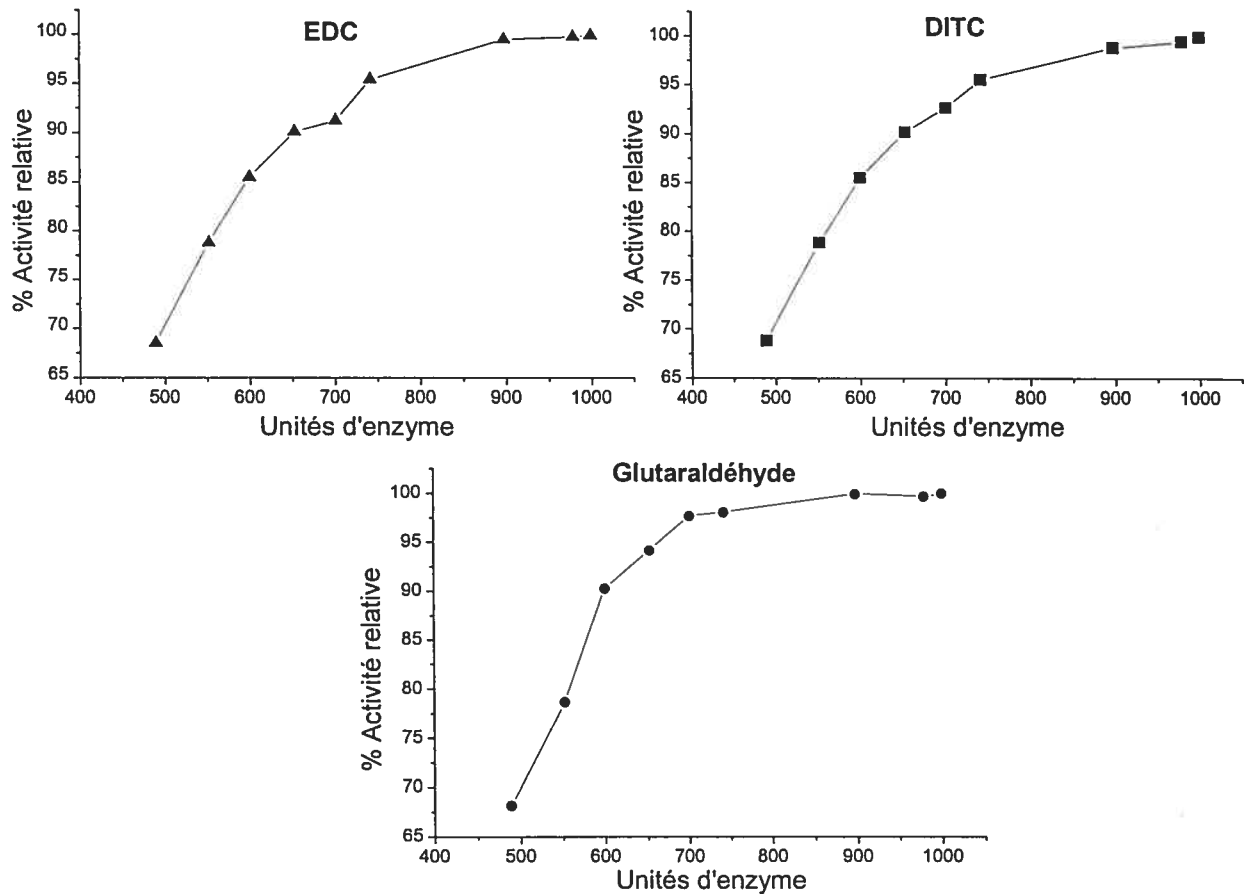


Figure 15: Variation de l'activité enzymatique en fonction de nombre d'unités d'enzyme utilisé durant l'immobilisation pour 10 mg de billes : (▲) EDC, (■) DITC, (●) glutaraldéhyde. La concentration du substrat TAME est de 5×10^{-5} M.

La quantité d'enzyme nécessaire pour atteindre l'activité maximale peut être différente d'une enzyme à l'autre et selon la nature du support utilisé. Ainsi, Yamato *et al.* [25] qui ont immobilisé la phosphatase acide sur les billes de verre avec le glutaraldéhyde, ont obtenu une activité maximale pour 500 unités d'enzyme cristalline immobilisée. Südi *et al.* [39] ont eu lors de l'immobilisation de la carboxypeptidase B

sur les billes de type polyacrylamide par le carbodiimide soluble dans l'eau, une activité maximale pour seulement 200 unités d'enzyme immobilisée. Nos résultats montrent qu'il est fortement possible que la valeur obtenue soit précise parce que les trois techniques ont donné presque le même nombre d'unités pour atteindre l'activité maximale. Ces résultats pour les trois méthodes d'immobilisation sont résumés dans la prochaine section avec les paramètres cinétiques (tableau 4).

3.5 Effet de l'immobilisation de l'enzyme sur l'activité

Il est bien connu que l'immobilisation des enzymes affecte leur activité. Plusieurs raisons peuvent causer la diminution de l'activité et en particulier le support ou l'environnement. L'environnement de l'enzyme varie selon la nature du support utilisé. Ainsi le support peut gêner ou affecter l'activité de l'enzyme, par exemple, l'accumulation du produit sur le support solide rend la digestion enzymatique plus difficile. Alors, l'enzyme ne peut plus exercer son activité normalement. Cette diminution est constatée lors de l'étude des paramètres cinétiques de l'enzyme. Dans cette partie, on discute les raisons qui peuvent affecter les valeurs cinétiques obtenues ($K_{M,app}$ et $V_{max,app}$), comme le microenvironnement (c'est à dire le support), ensuite, on compare les valeurs obtenues avec celles obtenues par d'autres chercheurs, ainsi que l'activité spécifique de l'enzyme immobilisée.

Détermination du $K_{M,app}$ et $V_{max,app}$

D'après l'étude de la variation de la quantité d'enzyme ou du nombre d'unités d'enzyme nécessaires pour l'obtention de l'activité maximale, on peut dire que la quantité d'enzyme immobilisée n'a pas d'influence sur les paramètres cinétiques

apparentes ($K_{M,app}$, $V_{max,app}$) lorsqu'une certaine masse d'enzyme fixée. Pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme immobilisée, on fait l'étude de la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat (TAME) sous la forme d'un graphique de Lineweaver-Burk¹ (fig. 16). Les valeurs du $K_{M,app}$ et $V_{max,app}$ obtenues pour chaque méthode d'immobilisation utilisée sont très différentes de celles de la trypsine libre. Les valeurs obtenues montrent que $K_{M,app}$ a augmenté 2 fois (passant de 21 μM à 40 μM) dans le cas de DITC et le glutaraldéhyde, de 9 fois (passant de 21 μM à 190 μM) dans le cas de l'EDC.

¹ La droite de Lineweaver-Burk est utilisée en routine en enzymologie, c'est une représentation linéaire mettant en jeu l'inverse de la vitesse initiale de la digestion enzymatique en fonction de l'inverse de la concentration du substrat. Cette droite permet l'obtention du K_M , V_{max} comme le montre la figure 16 où $-1/K_m$ et $1/V_m$ sont respectivement les intersections de la droite avec l'axe des abscisses (x) et l'axe des ordonnées (y).

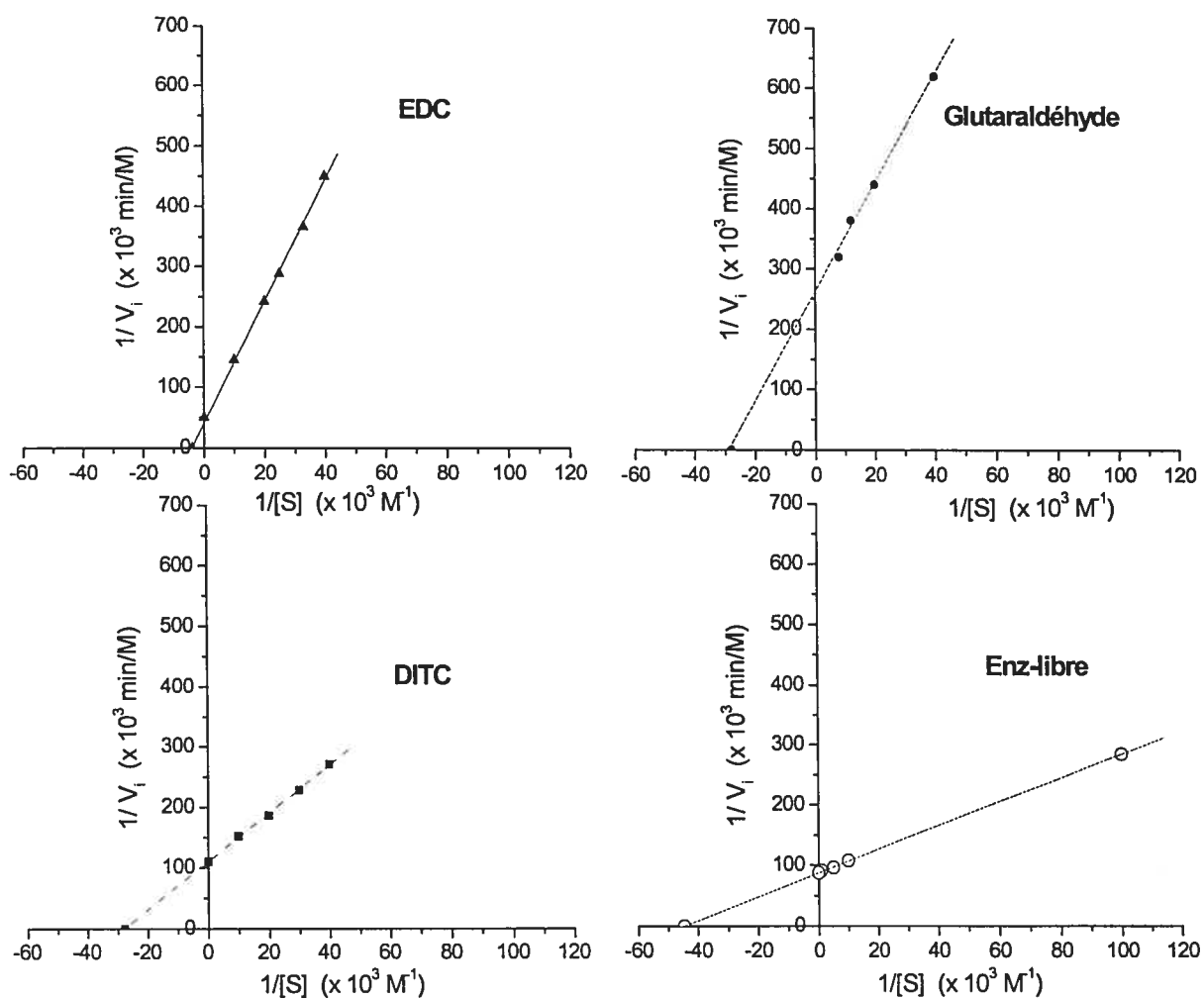


Figure 16 : Variation de la vitesse de digestion en fonction de la concentration du substrat (TAME): droite Lineweaver-Burk. où: (\blacktriangle) EDC, (\blacksquare) DITC, (\bullet) glutaraldéhyde, (\circ) l'enzyme libre.

Il est connu que $K_{M,app}$ est une mesure de l'affinité de l'enzyme envers le substrat, où elle est inversement proportionnelle à l'affinité; plus $K_{M,app}$ est petit plus l'enzyme a une grande affinité pour le substrat. L'enzyme subit un changement (diminution) de son l'affinité après immobilisation selon les valeurs du tableau 4. La

diminution de l'affinité (augmentation du $K_{M,app}$) de l'enzyme vers le substrat est relié directement au microenvironnement de l'enzyme.

Pour les trois méthodes d'immobilisation, les résultats sur la quantité d'enzyme qu'on peut immobilisée, la durée de la réaction d'immobilisation à 4°C et à 25°C, et les unités d'enzyme requises pour une activité optimale, et les paramètres cinétiques apparents sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 4: Sommaire des résultats comparant les trois techniques d'immobilisation de la trypsine.

Technique utilisée	Masse de la trypsine immobilisée (mg/g de CPG) ^a	No. d'unités d'enzyme nécessaire pour l'activité optimale	Temps ^b (min) à 25 °C	Temps ^b (min) à 4 °C	$K_{M,app}$ (μM)	$V_{max,app}$ (μM/min)
CPG-DITC	30.0 ± 0.4	1000	85 (1.25 h)	2160 (36 h)	40	8.5
CPG-EDC	12.8 ± 0.2	1000	150 (2.5 h)	2400 (40 h)	190	20
CPG-Glutaraldéhyde	12.6 ± 0.2	970	240 (4 h)	2400 (40 h)	40	4.2
Trypsine libre	N/A	N/A	N/A	N/A	21	11

^a valeurs estimées à partir du pourcentage d'immobilisation

^b Temps d'immobilisation

Microenvironnement

Le microenvironnement affecte les paramètres catalytiques intrinsèques de l'enzyme; ceci est dû grâce à des interactions différentes entre l'enzyme immobilisée et le substrat. Ce phénomène est relié, par exemple à des interactions électrostatiques ou hydrophobes entre le support et le substrat. De plus, l'activité spécifique de l'enzyme peut être perturbée grâce aux changements du microenvironnement. Par exemple, le

support d'immobilisation peut affecter l'enzyme, par effet de gradient d'ions autour du support. Selon Goldstein [40], si on considère le cas de la trypsine, une enzyme qui attaque les résidus chargés positivement tel qu'une lysine ou arginine ou d'autres substrats avec des groupements cationiques tel que le TAME, le substrat qui est chargé positivement sera présent en grandes proportions près du support qui est chargé négativement. Cet effet dépend de la nature chimique du support, et donc de sa charge positive ou négative. Par exemple, les billes de CGP portent une charge légèrement négative en solution aqueuse, le support peut attirer ou repousser le substrat ou d'autres molécules vers sa surface selon la nature de la charge du substrat, ce qui augmente ou diminue la concentration du substrat autour de l'enzyme fixée.

D'une façon générale, l'enzyme perd de son affinité pour le substrat après immobilisation. Les valeurs de K_M et V_{max} obtenues par Jiang *et al* [24] pour l'immobilisation de la trypsine sur le méthacrylate de cellulose modifié sont respectivement de 0.2 mM et 0.079 mM/min avec le substrat BAPNA. La valeur du K_M de la trypsine immobilisée sur les CPG est de 0.24 mM avec le substrat BAPNA [41], ce qui est une valeur légèrement plus élevée que celle de l'enzyme libre (0.12 mM). La différence entre cette dernière valeur et la valeur obtenue dans notre étude (0.021 mM) pourrait être dû à la façon (la technique) utilisée pour déterminer K_M de la trypsine libre ainsi que la nature du substrat utilisée (TAME au lieu du BAPNA). L'immobilisation de la phosphatase acide sur les billes de verre [25] a provoqué une augmentation de la valeur du K_M de l'enzyme fixée (0.71 mM) d'un facteur de 6 par rapport à l'enzyme libre (0.14 mM). Royer *et al.* [42] ont immobilisé la pronase sur les billes de verre, et les valeurs obtenues du V_{max} et K_M de l'enzyme fixée versus l'enzyme libre sont respectivement : 5.2 $\mu\text{M}/\text{min}$ et 55.3 μM , versus 19.4 $\mu\text{M}/\text{min}$ et 16 μM . Sudi *et al.* [39]

qui ont immobilisé la carboxypeptidase B sur les billes de polyacrylamide via carbodiimide, ont remarqué que la valeur du K_M (28 mM) a augmenté 10 fois par rapport à celle de l'enzyme libre (2.8 mM) avec la L-hippuryl L-arginine comme substrat. Les valeurs catalytiques obtenues du K_M et V_{max} avec la subtilisine immobilisée sur les billes de verre versus l'enzyme libre sont respectivement 55 mM et 1.35 $\mu\text{M}/\text{min}$, comparer à 24 mM et 4.40 $\mu\text{M}/\text{min}$ avec le TAME comme substrat [38].

3.6 Activité spécifique apparente

On définit l'activité enzymatique comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse une micromole de substrat par minute, à 25°C et à la valeur pH optimale. D'autre part, l'activité spécifique de l'enzyme est égale à l'activité enzymatique divisée par la masse de protéine (ex., enzyme) ou de matérielle protéique, peu importe sa pureté, et si elle est greffée sur un support solide ou non. Par conséquent, l'activité spécifique de la trypsine immobilisée par EDC est calculée par l'équation (15) donnée dans la section 1.3.1.

La valeur de l'absorbance obtenue par la digestion du TAME, et donc la formation du produit TA à 247 nm, après 2 minutes de contact entre l'enzyme immobilisée et le substrat est utilisé pour les calculs d'après l'équation 15. Un exemple des valeurs utilisées pour calculer l'activité enzymatique et spécifique de la trypsine immobilisée par l'EDC est présenté dans le tableau 5.

Tableau 5: Exemple des valeurs utilisées pour le calcul de l'activité spécifique apparente de la trypsine immobilisée par EDC.

Masse utilisée (mg CPG-EDC-Trypsine)	Temps (min)	ΔA_{247} (nm)	Activité spécifique apparente (U TAME/g CPG EDC-Trypsine)
5.27	2	0.1928	1830

Activité spécifique apparente par mg d'enzyme immobilisée

Pour sa comparaison à l'activité spécifique de la trypsine libre, une *normalisation* de l'activité spécifique apparente par mg d'enzyme immobilisée pourra être écrite comme :

$$\text{Activité spécifique normalisée} = \frac{\text{activité spécifique apparente}}{\text{masse d'enzyme immobilisée par g de support}}$$

Donc, l'activité spécifique normalisée pour le CPG-EDC-Trypsine sera 143 U TAME/mg de trypsine immobilisée (basé sur 12.8 mg de trypsine par g de bille de CPG; données tirées du tableau 4). La valeur obtenue en unités de TAME est ensuite convertie en unités de BAEE (où 1 U TAME = 57.5 U BAEE [14]), ce qui vaut à 8 222 U BAEE/mg trypsine pour fin de comparaison avec la valeur de l'activité de l'enzyme libre fournie par la compagnie Sigma, soit 13 600 U BAEE/mg protéine pour la trypsine du pancréas de bovine.

Activité spécifique conservée (%) après l'immobilisation

Une fois immobilisée, on voit que l'activité de la trypsine diminue à 8 222 U BAEE/mg protéine. En effet, on peut dire que la trypsine immobilisée par voie EDC ne conserve que 60% de son activité à l'état libre ($8\,222\text{ U} \div 13\,600\text{ U} = 60\%$). Les valeurs obtenues de l'activité spécifique apparente par mg de trypsine (activité spécifique normalisée) ainsi que le pourcentage d'activité conservé pour chaque technique d'immobilisation sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Comparaison de l'activité spécifique normalisée de la trypsine immobilisée avec celle de la trypsine libre.

Technique d'immobilisation	activité spécifique apparente (U TAME/g CPG-trypsine)	activité spécifique normalisée (U TAME/mg trypsine)	activité spécifique normalisée (U BAEE/mg trypsine)	Activité spécifique relative (%)
CPG-DITC	1 030	34	1 840	14
CPG-EDC	1 830	143	8 220	60
CPG-Glutaraldéhyde	432	33	1 900	14
Trypsine libre	N/A	N/A	13 600 ^a	100

^a activité spécifique selon Sigma Inc.

On remarque que la trypsine immobilisée par EDC est 4.3 fois plus active que celle immobilisée par DITC et par le glutaraldéhyde en fonction de la quantité totale de protéine fixée sur les billes de CPG, comme le montre la figure 17. D'autre part, l'activité spécifique apparente par gramme de solide pour le trypsine immobilisée par EDC n'est que 1,8 fois plus élevée que celle immobilisée par DITC.

D'autre part, la différence entre les valeurs de l'activité spécifique normalisée (en U BAEE/mg trypsine ou en unité de TAME, tableau 6) et celle des valeurs du $V_{\max,app}$ (tableau 4) pourrait être due à plusieurs raisons : le protocole utilisé n'est pas le même que celui utilisé chez Sigma, non seulement du fait que le substrat a été BAEE, mais, par exemple, la vitesse d'agitation et les autres paramètres cinétiques ne sont pas connus pour le protocole de Sigma. De plus, la méthode utilisée pour calculer la vitesse

maximale ($V_{\max,app}$) est différente de celle utilisée pour la détermination de l'activité spécifique normalisée. Les conditions n'étaient pas toujours saturantes en substrat. Un troisième facteur qui pourrait être la cause de cette variation est le facteur 57.5 pour convertir les U TAME en U BAEE, ce qui pourrait ne pas être tout à fait exact dans les conditions expérimentales utilisées.

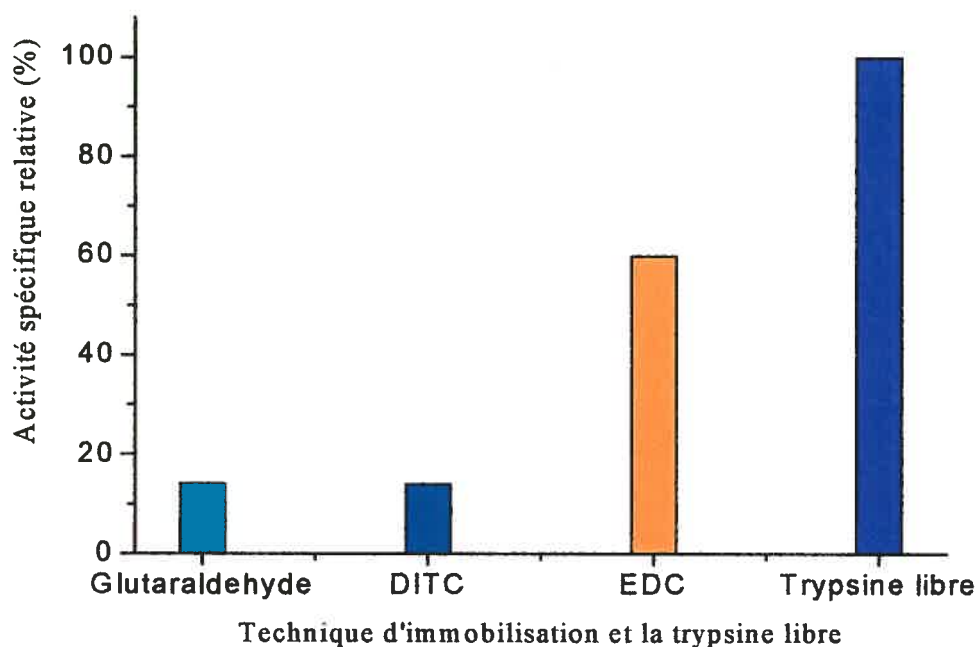


Figure 17: Comparaison entre l'activité spécifique par mg de la trypsine immobilisée sur les billes de verre poreuses par EDC, DITC et glutaraldéhyde avec celle de la trypsine libre.

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'affinité apparente (indiquée par $K_{M,app}$) et l'activité spécifique apparente de l'enzyme fixée varient selon la nature du support utilisé, c'est-à-dire de la nature de l'agent d'immobilisation utilisée. Cependant, la vitesse initiale de digestion dépend directement des comportements de Michaelis et de la concentration du substrat utilisé. Dans le prochain paragraphe on discute de l'effet de l'immobilisation sur la gamme de linéarité, où l'enzyme possède des comportements

Michaelis, ce changement (dans les comportements Michaelis) est dû à l'influence du support sur la molécule d'enzyme.

3.7 Gamme de linéarité de la trypsine après immobilisation sur les billes de verre (CPG)

On a déjà vu que l'immobilisation d'enzyme affecte les paramètres cinétiques apparents de l'enzyme. On mentionne ici quelques effets directs sur les enzymes. Les processus d'immobilisation dépendent de la nature de la technique d'immobilisation utilisée, tels que la présence d'agents doux, fort, etc., des propriétés intrinsèques de l'enzyme et des réactifs nécessaires à la fixation. [40]

Les facteurs qui peuvent affecter les caractéristiques intrinsèques de l'enzyme immobilisée sont le changement conformationnel et l'inactivation de l'enzyme.

Changement conformationnel de l'enzyme

Il est vraiment clair que l'immobilisation des enzymes par lien covalent change leur conformation tertiaire, quelle que soit la nature du support utilisé, qu'il s'agisse de CPG ou de polymère. Cette fixation diminue l'habilité de l'enzyme à changer sa structure durant l'attaque du substrat. L'habilité conformationnelle de l'enzyme nécessite que l'enzyme soit dans une conformation précise vis-à-vis du substrat, ce qui est directement dépendant de la façon dont l'enzyme se lie au substrat. De plus, elle doit avoir la possibilité de changer sa conformation durant la digestion du substrat comme on l'a montré dans le chapitre 1.

La manière dont l'immobilisation s'est déroulée, a un effet important sur les paramètres cinétiques de l'enzyme. En effet, l'enzyme peut être immobilisée

complètement sur le support, c'est à dire par plusieurs points d'attache. Cette fixation affecte directement l'activité catalytique, produisant alors des perturbations indésirables visibles dans les valeurs du $K_{M,app}$, de $V_{max,app}$, et de la gamme de linéarité des concentrations en substrat. Ces perturbations diffèrent en intensité suivant la technique d'immobilisation utilisée.

Inactivation

La trypsine peut être désactivée par la présence d'agents d'inactivation (pH élevé, radicaux libres, agents d'oxydation) dans la solution durant l'immobilisation. L'enzyme peut aussi devenir inactive si elle est attachée par l'un des groupements du site actif (triade catalytique). L'activité spécifique de l'enzyme immobilisée varie par rapport à celle de l'enzyme libre selon nos études et celles dans la littérature. De plus, la fixation d'une molécule d'inhibiteur par la triade catalytique provoque une désactivation de l'enzyme. Ce phénomène peut être utilisé comme agent de protection de la triade catalytique de l'enzyme lors de la fixation, comme avec la benzamidine [43].

De plus, le support joue un rôle important dans le comportement de Michaelis de l'enzyme. En effet, le support (CPG) attire les substrats chargés positivement et d'autres cations ou protons, ce qui augmente leur concentration autour du support, c'est à dire autour de l'enzyme fixée et de la gamme de libération du produit formé. Ces deux effets créent un changement du milieu (congestion) autour de l'enzyme fixée. Donc, l'utilisation aussi bien d'une solution à faible concentration ou forte concentration en substrat (figure 18, gamme B), produit des changements dans la cinétique Michaelis (figure 18).

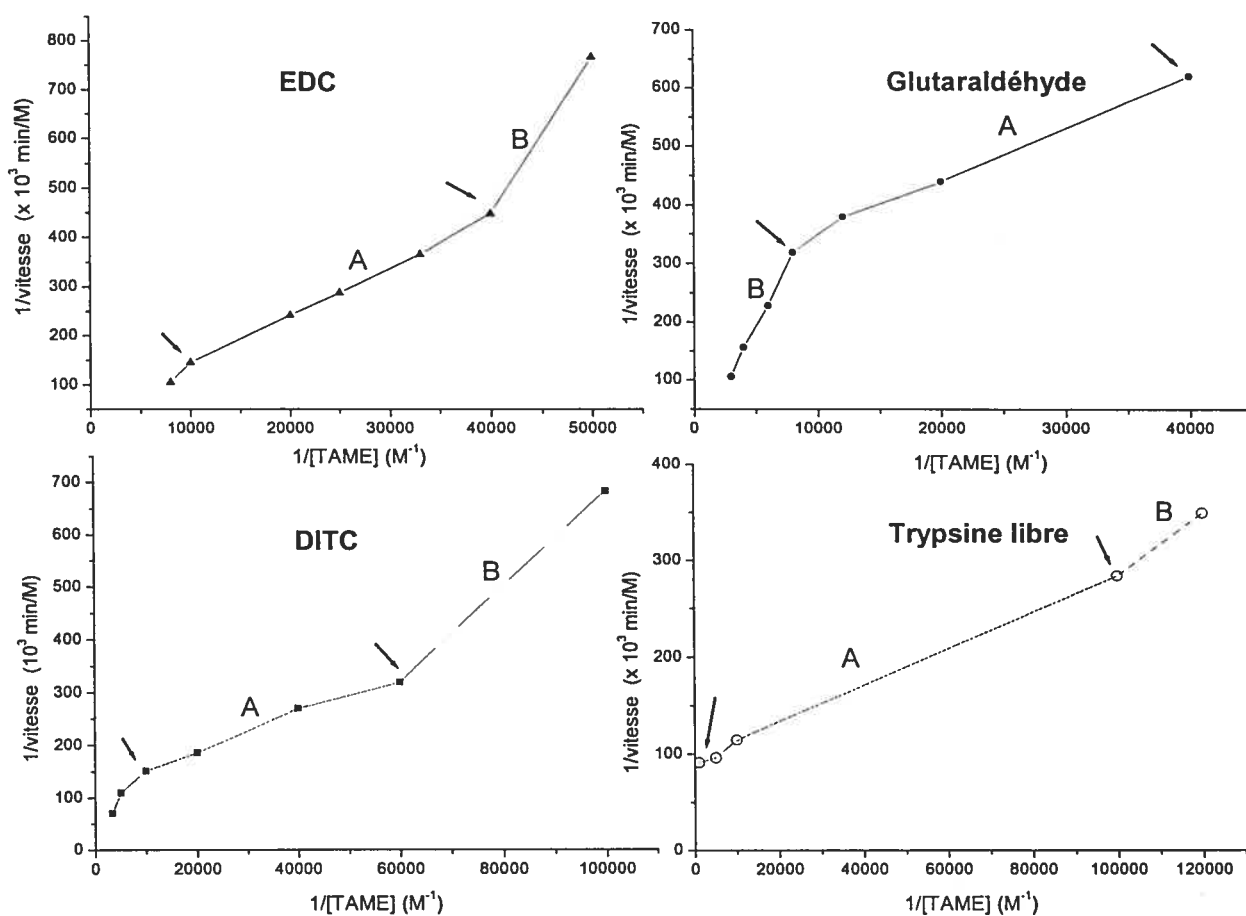


Figure 18: Détermination de la gamme de linéarité de réponse de la trypsine selon la technique utilisée où : (\blacktriangle) EDC, (\blacksquare) DITC, (\bullet) glutaraldéhyde, (\circ) trypsine libre, où A est la gamme de concentration michaelienne et B est la gamme de concentration non-michaelienne

La figure 18 montre que la gamme de linéarité de la trypsine dépend de la technique d'immobilisation utilisée. Pour chaque technique, on a obtenu deux zones de linéarité : A et B. D'après les graphiques, les zones B ont été rejetées, parce que la vitesse $V_{\max,app}$ est nulle (ou négative) parce la courbe coupe l'axe des ordonnées ($1/V_i$) à une valeur négative ce qui n'est pas représentatif d'une vitesse de digestion. Les zones A

représentent les plages de concentration où l'enzyme possède un comportement Michaelis, la largeur de cette zone varie selon la technique d'immobilisation utilisée comme le montre le tableau 7.

Tableau 7 : Comparaison de la gamme de linéarité des concentrations en substrats suivant la technique d'immobilisation de la trypsine.

Technique	Domaine de concentration donnant une réponse linéaire (μM)
CPG-EDC	25-100
CPG-DITC	16-100
CPG-glutaraldéhyde	25-125
Enzyme libre	10-1000

D'après les valeurs de $K_{M,app}$, de $V_{max,app}$ et de la gamme de linéarité des concentrations pour chaque technique utilisée, on remarque que les gammes de linéarité de l'enzyme immobilisée par DITC et par glutaraldéhyde sont plus ou moins similaires, alors que l'enzyme immobilisée par EDC possède une gamme de linéarité pour une concentration plus élevée allant jusqu'à 100 μM . De plus, on trouve que la vitesse d'hydrolyse du TAME varie selon la technique d'immobilisation (tableau 4). Normalement, le K_M (inverse de l'affinité) augmente après l'immobilisation, ce qui signifie que l'affinité de l'enzyme vers le substrat diminue. Par conséquent, la vitesse de digestion diminue. On remarque que la vitesse de digestion de la trypsine soluble est de 11 $\mu\text{M}/\text{min}$ tandis que celle de la trypsine immobilisée par DITC et par glutaraldéhyde a diminué jusqu'à 8.4 et 4.2 $\mu\text{M}/\text{min}$ respectivement. Pour l'EDC, la vitesse de digestion a augmenté malgré l'augmentation du K_M , c'est à dire l'accessibilité du substrat à l'enzyme est difficile, mais la vitesse de digestion peut être élevée à cause de la façon dont l'enzyme est fixée [44]. Les valeurs obtenues avec les trois techniques pour la

gamme de linéarité peuvent être fiable et précise, parce qu'elles possèdent une plage de concentration variant de 16 à 125 μM pour les trois techniques étudiés (tableau7).

Dans les prochains paragraphes on discute de la dépendance de l'enzyme avec le pH du milieu d'hydrolyse (après immobilisation), l'effet du gradient de proton (H^+) (effet de partition) sur le pH optimal, ainsi qu'une comparaison du pH optimal obtenu avec les valeurs de la littérature.

3.8 Dépendance de l'enzyme avec le pH du milieu d'hydrolyse

Les études montrent que l'activité enzymatique dépend du pH de la solution tampon utilisée. La solution tampon représente une situation idéale pour l'enzyme en général. Quand on fixe l'enzyme sur un support solide, des changements se produisent dans son environnement, ce qui influence d'une façon indirecte le pH optimal pour une activité maximale de l'enzyme fixée. L'étude de ces changements et des facteurs qui les influencent est fondamentale pour maîtriser et optimiser la technique d'immobilisation, et pour déterminer les changements responsables de la diminution de l'activité enzymatique. La figure 19 nous montre l'effet du pH sur l'activité optimale de la trypsine immobilisée sur les billes de verre par trois moyens différents pour l'hydrolyse du TAME.

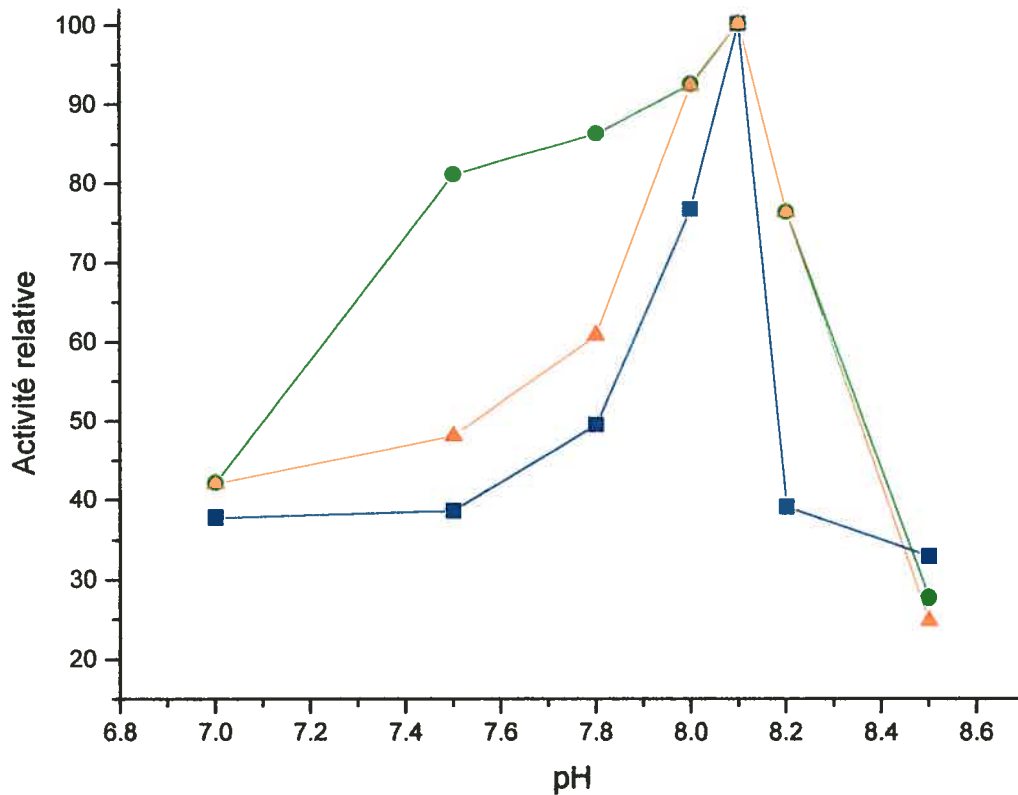


Figure 19: Effet du pH du tampon sur la vitesse de formation du produit TA par la trypsine immobilisée sur les billes de verre suivant la technique d'immobilisation par DITC (■), EDC (▲) et glutaraldéhyde (●).

D'après ce graphique, on remarque que le pH optimal du tampon pour l'hydrolyse du TAME par la trypsine immobilisée est de 8.1, alors que le pH optimal du tampon d'hydrolyse de l'enzyme soluble est de 9 [15]. L'immobilisation de la trypsine a entraîné le déplacement du pH d'une unité vers le milieu acide. L'effet le plus important de la variation du pH optimal d'hydrolyse pour une enzyme immobilisée peut être expliqué par la distribution des protons (H^+) dans la solution tampon utilisée. Cette distribution varie selon la nature de la charge du support solide. Par exemple, l'enzyme peut être encombrée par les protons si le support est chargé négativement. Le facteur qui peut

expliquer la diminution du pH optimal dans la solution d'hydrolyse est la distribution hétérogène des protons dans cette dernière, la concentration en protons étant plus élevée à la surface du bille que dans la solution, lorsque la bille est légèrement chargée négativement (du aux groupements silanols présentés sur les billes).

Gradient de proton à la surface du support solide

Le support d'immobilisation, qui est typiquement faiblement chargé, positivement ou négativement, crée un effet de gradient de proton à la surface du support, ce qui produit un environnement de l'enzyme différent, soit riche soit pauvre en proton, par rapport au reste de la solution. Par exemple, une matrice chargée négativement attire les protons vers l'environnement de l'enzyme fixée, ce qui augmente la concentration en ions H^+ autour de l'enzyme, et provoque une diminution des ions H^+ dans le reste de la solution, tandis qu'une matrice chargée positivement rejette ou éloigne les protons et on aura le phénomène inverse. Le pH autour de l'enzyme immobilisée sur les billes de verre poreuses diffère de celui du reste de la solution. Donc, le pH, lu par le pH-mètre (pH apparent), n'est pas identique au pH autour de l'enzyme immobilisée sur les billes, celui-ci pouvant être moins élevé que celui de l'ensemble de la solution.

Le déplacement du pH optimum de l'enzyme immobilisée a été observé par plusieurs chercheurs; Goldstein [40] a remarqué que, si la chymotrypsine est immobilisée sur un support polycationique, le pH optimum de l'enzyme est déplacé d'une unité du côté alcalin; et d'une unité de pH du côté acide, quand elle est immobilisée sur un support anionique. Ce genre de déplacement du pH optimum ou, en d'autres termes, la diminution de l'activité dépend de l'effet de gradient de proton.

Le profil de pH a été étudié dans le cas de la trypsine immobilisée sur les billes de verre (fig 19). Il apparaît que l'enzyme reste active de pH 7 jusqu'à pH 8.5. Pour les 3 méthodes d'immobilisation utilisées, le pH optimal mesuré est de 8.1, avec un déplacement d'une unité environ du côté acide par rapport à celui de l'enzyme soluble, cette valeur concorde avec les résultats obtenus par Voyksner *et al.* [19] où le pH optimal de la trypsine immobilisée sur les billes de verre par l'EDC était de 8. L'immobilisation de l' α -amylase sur un support de polyvinylalcool traité avec le poly(tetrafluoroéthylène-hexafluoropropylène) (PVA-FEP) par quatre techniques différentes [27]: le β -sulfate-(éthylène sulfonide)-aniline (SESA), 2,4,6-trichloro-1,3,5 triazine (Triazine), 1,1-carbonyldiimidazole (CDI) et chlorure de 2,2,2-trifluoroéthanol-sulphonyl (chlorure de tosyl), a donné un pH optimal qui a été déplacé d'une unité pour les deux premières techniques, et qui est resté inchangé pour les autres. L'étude de la subtilisine immobilisée sur les billes de verre par l'isothiocyanate (ITC) [38], a montré que le pH optimal de l'enzyme fixée envers TAME reste inchangé à pH 9, tandis qu'avec le lactate d'éthyle, il a été déplacé d'une unité du côté basique. Après fixation de l'amyloglucosidase sur les billes de polystyrène non poreuses/poly(sodium styrène sulfonate) (PS/PNaSS) [45] le pH optimal d'activité de l'enzyme fixée a changé de 0.5 unité de pH du côté acide. Tandis qu'après immobilisation de la trypsine sur le polyéthylène téréphtalate via un lien amide [17] le pH optimal obtenu pour l'hydrolyse du TAME est de 8.1.

Donc, le changement du pH optimal dépend de plusieurs facteurs qui interviennent dans les caractéristiques intrinsèques de l'enzyme, mais l'effet le plus considérable est le changement conformationnel, parce que, après fixation, l'enzyme devient dépendante du

support. Par exemple, si l'enzyme est fixée par la sérine, ou si elle est immobilisée par plusieurs points d'attache, alors les changements conformationnels de l'enzyme durant la digestion du substrat seront limités. Cet effet a été remarqué par la diminution de l'activité spécifique, de l'affinité et de la vitesse de digestion après fixation.

Dans les prochains paragraphes, on parlera du montage du microréacteur tryptique et du compactage des billes de trypsine, ensuite on discutera de la digestion de la β -caséine, comme substrat dans le microréacteur et des avantages et des inconvénients observés durant la digestion, ainsi que de la perspective proposée pour augmenter l'efficacité du microréacteur. La β -caséine a été choisie car elle est bien caractérisée et est facilement hydrolysée.

3.9 Digestion de la β -caséine

La β -caséine est une protéine du lait, qui est très utilisée en chimie des aliments pour l'étude des émulsions [46]. C'est une protéine phosphorylée fortement hydrophobe avec une structure désordonnée (random coil) [1,47]. Elle a une masse moléculaire de 24 kDa et contient 209 acides aminés [48,49]. Les 50 premiers acides aminés à partir de l'extrémité N terminale sont de manière prépondérante hydrophiles, alors que les 159 acides aminés restant sont plutôt hydrophobes [47,49]. La digestion de la β -caséine par les endoprotéinases fournit des hydrolysats qui ont un fort goût amer [50]. Ce goût amer a été attribué à la présence de peptides de longueur intermédiaire dont la plupart contiennent des prolines [51,52].

La caséine bovine contient une grande quantité de prolines : 34 sur 209 acides aminés totale [53]. De plus, la β -caséine possède une forte affinité pour les ions divalents et pour le calcium en particulier [54]. Cette affinité pour le calcium est reliée au rôle des

caséines qui sont des transporteurs naturels du calcium dans le lait. Les principaux sites de fixation du calcium sont les 5 sérines phosphorylées de la chaîne de β -caséine mais d'autres acides aminés chargés négativement peuvent être considérés [55]. Une autre propriété importante de la structure primaire de la β -caséine est qu'elle forme des agrégats en solution. C'est son état naturel dans le lait où la β -caséine est représentée sous forme d'agrégats de 130 à 160 nm de diamètre. La taille des agrégats dépend de la température, et de la concentration en calcium des solutions de caséines [56].

Une fois les billes portant la trypsine immobilisée préparées, elles sont caractérisées « en batch », puis empaquetées dans le microréacteur (voir annexe A1). La digestion de la β -caséine est alors effectuée (voir annexe A2) dans un microréacteur de 28 cm de longueur et de 530 μm de diamètre interne fait de silice fondue. Le but de la digestion de la β -caséine dans le microréacteur est de vérifier l'efficacité des billes-trypsine et de comparer les résultats obtenus avec les billes préparées par les trois procédures dans notre laboratoire avec celles distribuées commercialement chez Sigma Inc. et empaquetées dans le même type de microréacteur [2].

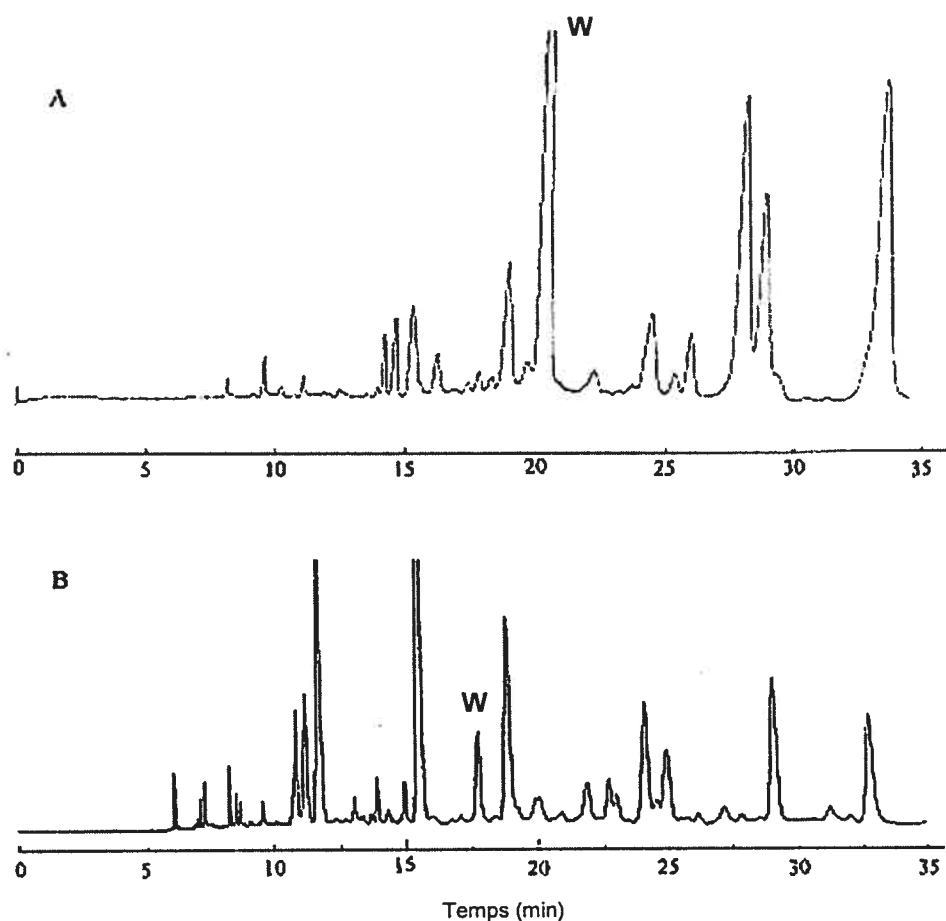


Figure 20 : Électrophérogrammes montrant les cartes peptidiques de la β -caséine (2.4×10^{-4} M). **(A)** Injection d'environ 10 nl des 120 μ l récoltés du microréacteur (ex., 40 μ l du digestat + 80 μ l de la solution de lavage) après la digestion de la β -caséine dissous dans une solution tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 8.1 par un microréacteur contenant la trypsine-DITC-CPG préparée pour ce travail. Le passage de la protéine à travers le microréacteur se fait à une vitesse initiale de $0,22 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. La séparation a été effectuée dans un capillaire de 75 μm d.i. (43,5 cm de longueur effective) à 203 V/cm après une injection sous vide de 0,5s. **(B)** Carte peptidique d'environ 10 nl des 40 μ l de β -caséine récoltés après la digestion de la β -caséine dissous dans du tampon carbonate d'ammonium 70 mM, pH 8,2 par un microréacteur contenant la trypsine-DITC-CPG commerciale. La séparation est effectuée dans un capillaire de 50 μm d.i. (40 cm de longueur effective) à 309 V/cm avec une injection de 50 mbar pendant 5 s [20,57]. Dans les deux cas, la séparation des peptides se fait dans le tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 2,5 et la détection se fait à 200 nm. Le pic marqué W est le tryptophane, ajouté comme étalon interne pour comparer les temps de migration entre deux électrophérogrammes.

Les deux électrophérogrammes obtenus ne sont pas identiques, mais il y a quelques ressemblances. L'électrophérogramme dans la figure 20A a été obtenu avec notre trypsine immobilisée par rapport à celle de Sigma (figure 20B), qui a une activité spécifique différente. De plus, les conditions de digestion et de séparation ont été assez différentes. Dans un premier temps, l'appareil d'Agilent Technologies (figure 20B) est beaucoup plus performant que celui de Thermo Separations (figure 20A). Deuxièmement, le capillaire ayant le diamètre interne de 50 μm donne une meilleure résolution des pics que celui ayant 75 μm d.i.. Egalement, le plus haut le voltage de séparation, la meilleure sera l'efficacité des pics et aussi, donc, leur résolution, comme le montre la figure 20B.

Les études de la reproductibilité du microréacteur sont en cours et seulement quelques résultats préliminaires sont présentés dans la figure 21. Pour évaluer la reproductibilité, nous avons comparé les électrophérogrammes de trois digestions faites dans le même microréacteur. Chaque essai de digestion est constitué de 40 μl de β -caséine (5mg ml⁻¹) digérés dans le microréacteur et de 80 μl de lavage pour récupérer les fragments peptidiques adsorbés dans le microréacteur. Les trois digestions ont été effectuées pendant plusieurs jours et les digestats ont été conservés à une température de -20 °C jusqu'à analyse par EC. Les électrophérogrammes présentés dans la figure 21 ont été obtenus dans la même journée pour réduire au minimum la variabilité de temps. La reproductibilité du temps de migration a été bonne avec une déviation standard relative (RDS) variant entre 0.4% et 1.53% [20,57]. Ces résultats suggèrent que les variations obtenues dans la cartographie peptidique de la β -caséine sont probablement dues plus aux conditions de séparation qu'à la digestion. En fait, le microréacteur et les conditions

de digestion ont été reproductibles et permettent d'obtenir une bonne cartographie peptidique.

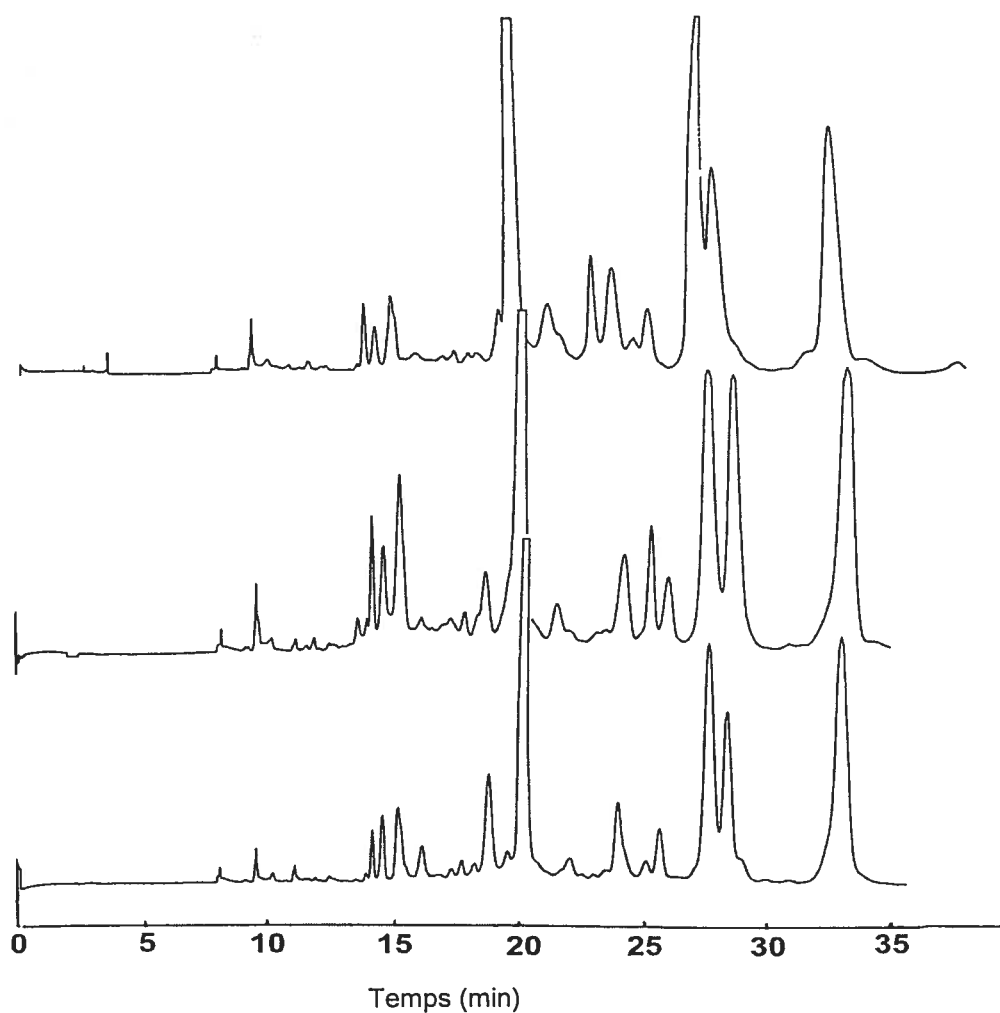


Figure 21 : Étude de la reproductibilité du microréacteur : électrophérogrammes des digestions de trois aliquots différents de la β -caséine ($40 \mu\text{l}$ à 5mg ml^{-1}) dans le même microréacteur contenant la trypsine immobilisée sur des billes de verre (CPG) via le DITC préparées pour cette étude. La séparation a été effectuée sous les mêmes conditions de la figure 20A.

Le compactage du microréacteur a été réalisé assez facilement. On a pu observer que l'exposition des billes aux vapeurs d'éthanol pendant deux heures est vraiment nécessaire pour éliminer les interactions électrostatiques entre les billes afin de faciliter leur entrée dans le capillaire du microréacteur.

Le temps nécessaire pour préparer les billes-trypsine, et pour que le microréacteur soit prêt pour la digestion ne dépasse pas 10 heures, quelle que soit la technique utilisée: la préparation des billes-trypsine avec EDC nécessitant 9 h environ, et seulement 3 h avec le DITC. L'avantage de nos techniques d'immobilisation est de mettre en jeu un intermédiaire, par rapport à celle biotin-avidine [20,57] pour immobiliser la trypsine à l'intérieur d'un capillaire de silice. Cette technique nécessite plus de 24 h pour que le microréacteur soit prêt à être utilisé. La quantité de billes nécessaire pour compacter un microréacteur de 28 cm de longueur varie d'une technique d'immobilisation à l'autre. Ceci peut être dû à la nature de l'agent intermédiaire utilisé durant la fixation (EDC, DITC et glutaraldéhyde). Cette quantité était d'environ 50 mg pour l'EDC, ou le DITC et de 55 mg pour le glutaraldéhyde. Le microréacteur a été conditionné avec le tampon de digestion (Na_2HPO_4) à la température optimale de digestion, 37°C en faisant circuler de l'eau dans un réfrigérant comme déjà mentionné [2].

Pour digérer la β -caséine dans le microréacteur, une pression d'argon a été appliquée sur un vial d'échantillon afin de faire rentrer la protéine dans le microréacteur comme le montre la fig. A2. Au début, on a appliqué une pression de 5 psi pendant 2 min environ afin de pousser la solution protéique (40 μL) dans le microréacteur. Ensuite on a baissé la pression jusqu'à 1 psi pour permettre un contact suffisant entre le substrat et l'enzyme, pour une digestion complète du substrat. Le temps nécessaire pour la

digestion de la β -caséine était 3 h environ. L'analyse du digestat récupéré à l'autre bout du microréacteur qui a été effectué par électrophorèse capillaire (EC) a montré qu'une forte adsorption des fragments tryptiques se produisait à l'intérieur du microréacteur. Donc, le digestat a été récupéré par un simple lavage avec 80 μ L d'eau ou avec le tampon de digestion phosphate 0.05 M, pH 8.1. L'adsorption pourrait être due à la présence de groupements actifs (aldéhyde, carboxylique) qui n'ont pas été traités avec la glycine ou avec la triéthanolamine pendant les processus d'immobilisation et aussi sur le paroi du capillaire du microréacteur.

Si l'on considère la structure primaire de la β -caséine, sa digestion par la trypsine devrait donner 15 fragments peptidiques et deux acides aminés:

R / ELEELLNVPGEIVESLSSEESITR / INK / K / IEK / FOSEEQQQTEDELODK /
IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPLTOTPVVPPFLOPEVMGVSK / VK /
EAMAPK / HK / EMPFPK / YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLOSWMHOPH
QPLPPTVMFPPOSVLSLSQSK / VLPVPOK / AVPYPOR / DMPIQAFLLYOEPVL
GPVR / GPFPIIV

Or la β -caséine est une protéine n'est pas difficile à digérer parce qu'elle ne contient pas des ponts disulfures, mais comme elle possède plusieurs isoformes, et qu'elle réagit avec le calcium [47,58] la caractérisation sera difficile. La figure 22 montre les électrophérogrammes de la β -caséine (5.2 mg/mL) digérée par la trypsine immobilisée sur les billes via EDC, DITC et glutaraldéhyde. Ces électrophérogrammes montrent qu'il y en a plus de 16 pics, pouvant être regroupés en 4 catégories de mobilité. La présence des pics supplémentaires peut être due à plusieurs facteurs qui vont être discutés dans les prochains paragraphes.

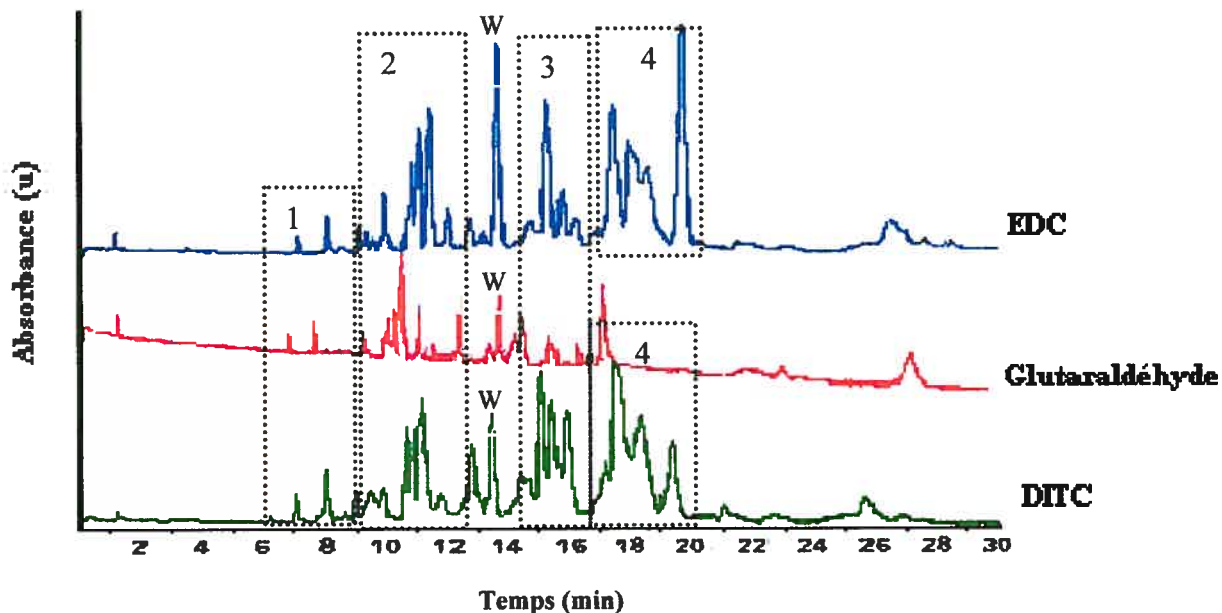


Figure 22: Électrophérogrammes du digestat de la β -caséine (5.2 mg/ml) par la trypsine immobilisée sur les billes de verre (CPG) via glutaraldéhyde, EDC et DITC. Le W représente le tryptophane, ajouté comme étalon interne. Les conditions de séparation sont les mêmes que la figure 20A.

La trypsine est une enzyme qui est stabilisée par le calcium [35]. Le calcium, souvent présent dans le tampon de digestion, peut se lier à la β -caséine en même temps [58], ce qui rend la digestion de la β -caséine difficile. Pour éviter ce problème, nous avons choisi de travailler dans un milieu sans calcium et nous avons utilisé le tampon phosphate. De plus, l'hydrolyse enzymatique de la β -caséine durant la digestion fournit plusieurs caséines phosphopeptidiques [57], et il existe aussi en solution plusieurs isoformes de la β -caséine [59].

L'électrophérogramme obtenu de l'autodigestion de la trypsine soluble ne montre pas beaucoup des pics supplémentaires (figure 23). Cependant, on peut dire que l'autodigestion de la trypsine ne devrait pas ou peu fournir de pics supplémentaires car elle est empêchée par l'immobilisation de l'enzyme. En effet, la trypsine est, par les

techniques employées, attachée au support par son groupement α -amine de l'extrémité N terminal et par les groupements ε -amine des lysines accessibles. Cependant des coupures des liaisons peptidiques après les arginines pourraient se produire et donner des fragments supplémentaires [2], comme le montre la figure 23 qui ne présente pas beaucoup de pics dus à l'autodigestion de la trypsine soluble.

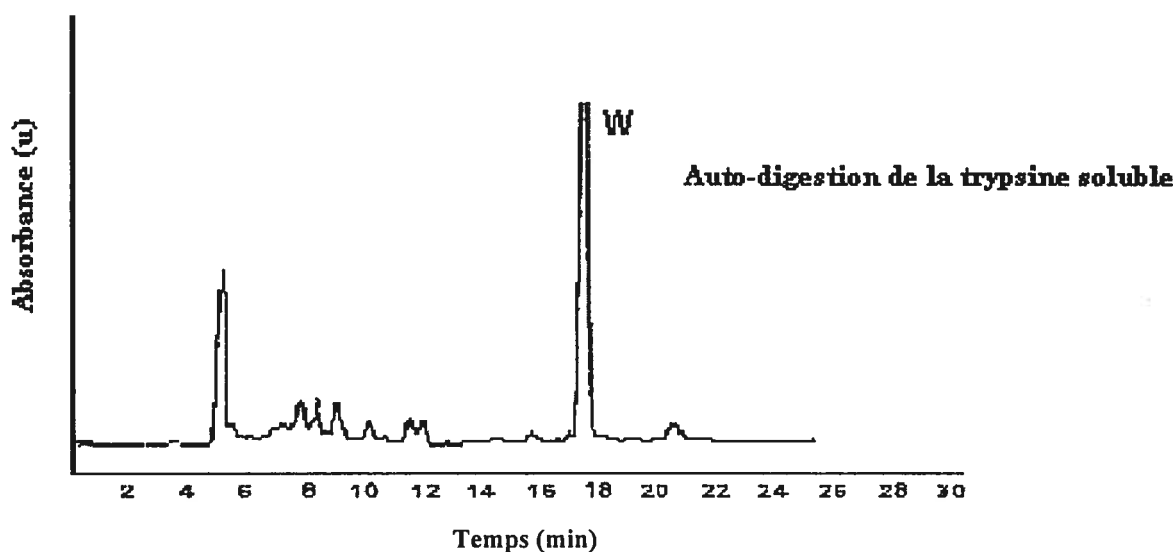


Figure 23 : Autodigestion de la trypsine soluble. Les conditions de séparation sont les mêmes que la figure 20A.

D'autre part, la digestion incomplète de la β -caséine peut contribuer à la présence de pics supplémentaires dans l'électrophérogramme, ce qui probablement le cas dans les électrophérogrammes obtenus avec les billes préparées par DITC et EDC et qui n'est pas présent dans l'électrophérogramme obtenu par les billes préparées par glutaraldéhyde (figure 22). De plus, par exemple, la présence d'un résidu acide (Asp, Glu) suivie d'une Lys ou Arg, diminue la vitesse de la digestion [60], ceci peut affecter la digestion complète de la β -caséine, ce qui favorise la présence d'autres pics dans

l'électrophérogramme. De plus, le 7^{ème} fragment peptidique obtenu par la digestion contient un lien peptidique Asp-Ser. Cette liaison peut être hydrolysée dans certaines conditions, ce qui augmente le nombre des pics attendus.

L'électrophérogramme obtenu de la digestion de la β -caséine avec la trypsine soluble (figure 24) montre plus que 30 pics. En effet, comme l'autodigestion de la trypsine libre n'a pas montré trop des pics, il est fortement possible que les pics supplémentaires obtenus soient dus à la présence de plusieurs isoformes de la β -caséine [59]. Par conséquent, l'identification des pics obtenus avec la trypsine libre et immobilisée nécessite une technique plus avancée, comme la spectrométrie de masse (SM).

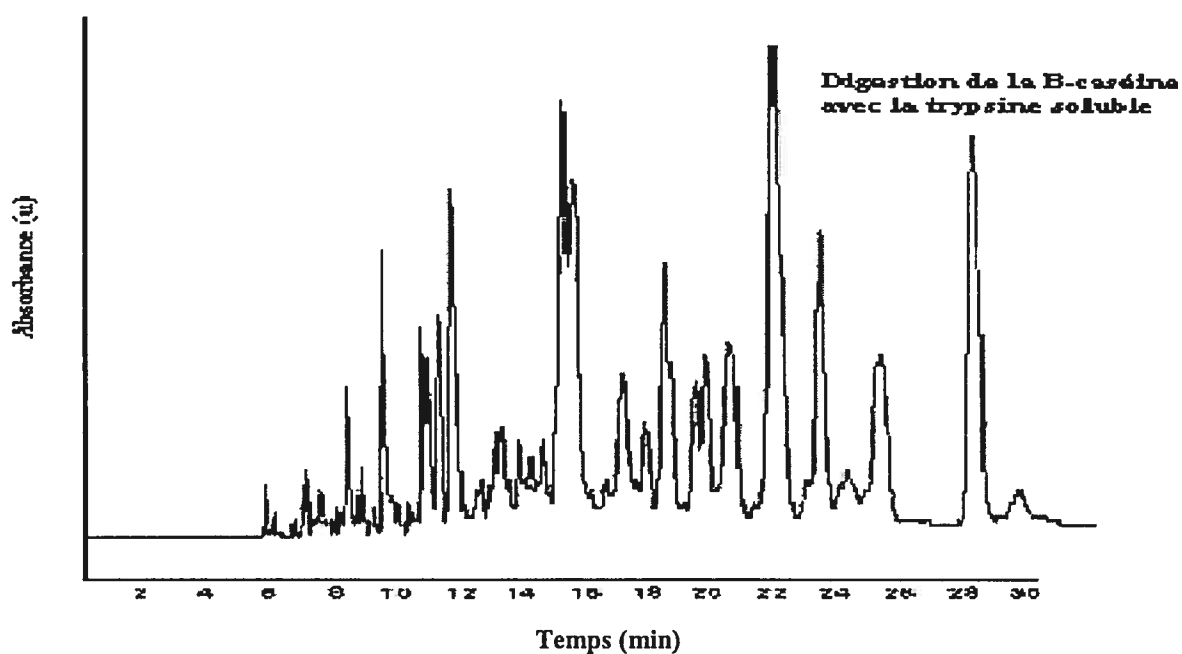


Figure 24 : Digestion de la β -caséine avec la trypsine soluble. Les conditions de séparation sont les mêmes que la figure 20A.

Le temps de séparation est relativement long, 25 à 30 min, avec un voltage de 15 kV. Ce temps varie selon la nature de la solution d'électrolyte utilisée. Par exemple, avec un électrolyte NaH_2PO_4 0.05 M, pH 2.5 ajusté avec HCl, le temps de rétention était de 45 min environ, tandis qu'avec le même électrolyte ajusté avec l'acide phosphorique, le temps de rétention était de 28 min environ.

4. CONCLUSION

L'immobilisation de la trypsine sur les billes de verre est réalisable par différentes techniques. Chaque technique d'immobilisation possède des caractéristiques spécifiques : la quantité d'enzyme immobilisée, les paramètres cinétiques de l'enzyme immobilisée. La quantité d'enzyme immobilisée par DITC était de 30.0 ± 0.4 mg/g de billes et de 12.8 ± 0.2 mg/g de billes pour l'EDC et finalement 12.6 ± 0.2 mg/g de billes pour le glutaraldéhyde. Les paramètres cinétiques apparentes, $K_{M,app}$ et $V_{max,app}$ sont de l'ordre de 40 μ M et 8.4 μ M/min, 190 μ M et 20 μ M/min, 40 μ M et 4.2 μ M/min pour la trypsine immobilisée sur les billes par le DITC, EDC et le glutaraldéhyde respectivement.

L'immobilisation de l'enzyme affecte l'activité spécifique de l'enzyme, qui diminue de façon générale quelle soit la nature de l'intermédiaire utilisé pour l'immobilisation. Comme cette activité dépend fortement de la triade catalytique, si une molécule d'enzyme est immobilisée par l'un des acides aminés de la triade catalytique, cette molécule est inactive.

La détermination de la quantité d'enzyme immobilisée, effectuée à 280 nm par spectrophotométrie moléculaire, est précise parce que, seuls le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine absorbent à cette longueur d'onde. Alors on peut dire que l'absorbance est représentative de la quantité d'enzyme immobilisée. L'inconvénient de cette technique est que, la protéine s'adsorbe sur la surface de la cellule de quartz, ce qui signifie la perte d'une faible quantité d'enzyme à chaque utilisation.

La quantité d'enzyme nécessaire pour atteindre une activité maximale a été déterminée. On trouve que l'activité maximale est atteinte à 1000 unités d'enzymes (0.07₃₅ mg de la trypsine soluble) pour les trois techniques utilisées : elle ne diffère

presque pas d'une technique à l'autre. Mais elle diffère d'une enzyme à l'autre selon la nature du support utilisé. Les résultats obtenus par Yamato *et al.* [25] qui ont immobilisé la phosphatase acide sur les billes de verre avec le glutaraldéhyde, ont obtenu une activité maximale pour 500 unités d'enzyme immobilisée, tandis que Südi *et al.* [39] ont eu lors de l'immobilisation de la carboxypeptidase B sur les billes de type polyacrylamide par le carbodiimide soluble dans l'eau, une activité maximale pour seulement 200 unités d'enzyme immobilisée.

Le traitement des billes après immobilisation est nécessaire afin de neutraliser les groupements aldéhyde et DITC qui n'ont pas réagi, et de minimiser l'adsorption de la protéine sur les billes ou d'éviter une réaction secondaire avec la protéine durant la digestion.

L'immobilisation de la trypsine n'affecte pas juste les paramètres cinétiques de l'enzyme, mais aussi, son pH optimal, (où l'activité enzymatique est maximale). Le pH optimal a été déplacé d'une unité environ vers le côté acide passant de 9 à 8.1. Ceci dépend de la nature du support utilisé, sa charge (positive ou négative) faisant varier le pH optimal du côté basique ou du côté acide respectivement.

La trypsine immobilisée sur les billes de verre (CPG) possède une cinétique michaelienne (réponse linéaire à une concentration en substrat croissante) pour une gamme de concentrations en substrat qui varie suivant la technique d'immobilisation utilisée. La trypsine immobilisée sur les CPG par l'EDC et DITC possède une plage de concentration de 25-100 μM et 16-100 μM respectivement, tandis que la trypsine immobilisée sur les CPG par la glutaraldéhyde a une gamme de concentration de 25-125 μM . Par contre, la trypsine libre possède une gamme de concentration linéaire varie entre 10 et 1000 μM .

Durant l'étude de la gamme de concentration on a pu remarquer qu'à faible ou à forte concentration, on observe une cinétique Michaelis étrange. Ceci est dû aux changements provoqués sur la molécule d'enzyme après immobilisation, comme l'environnement (support) et l'effet de partition du substrat.

Le microréacteur enzymatique représente une nécessité dans la cartographie peptidique, parce que le temps de digestion est moins long, l'autodigestion de l'enzyme est négligeable. Il représente la potentialité d'une nouvelle vague de développement d'un système de digestion rapide en ligne avec l'électrophorèse capillaire.

Le microréacteur enzymatique améliore beaucoup la digestion des protéines [60] surtout, il accélère le temps de digestion (3h) comparé à celui de la digestion en solution libre (24 h). Le microréacteur que nous avons construit est le même que celui de Bonneil *et al.* [2] et repose sur la migration de la protéine par jet d'argon. Ce principe de digestion est avantageux par rapport à d'autres microréacteurs enzymatiques [56] surtout au niveau du temps de digestion.

Des difficultés ont été observées durant l'emballage du microréacteur : l'agrégation des billes au bout du capillaire et la conservation du microréacteur enzymatique à -20°C (congélateur). L'agrégation des billes au bout du capillaire a été éliminée en traitant les billes aux vapeurs d'éthanol pendant deux heures. Ce traitement élimine les interactions électrostatiques entre les billes. La conservation du capillaire enzymatique à -20°C été plus efficace pour préserver l'activité enzymatique plus longtemps, mais, on a remarque que le capillaire du microréacteur devient de plus en plus fragile après chaque utilisation.

La digestion de la β -caséine dans un microréacteur de 28 cm de longueur a été réalisée pendant 3 h à 37 °C, température optimale pour la trypsine. Cette digestion est similaire à celle obtenue en 24 h avec la trypsine en solution homogène [2,60].

La séparation du digestat obtenu a été effectuée par électrophorèse capillaire. Les électrophérogrammes de la β -caséine révèlent un nombre de pics plus élevé que le nombre attendu (16 pics). La β -caséine est une protéine qui possède plusieurs isoformes [2,43], par exemple, la β -caséine provenant du lait de vache est présente sous la forme de plusieurs variants génétiques (A1, A2, A3, B, C, D, E) à des concentrations variables d'un échantillon à une autre, ce qui favorise la présence de pics supplémentaires dans les électrophérogrammes obtenus. De plus, une digestion incomplète mène à un nombre de pics plus élevé que le nombre attendu. Ces résultats ont été observés dans différentes autres publications où le nombre de pics de la β -caséine plus élevé que 16 pics [2,61].

Recherche futures

Le but de cette étude était d'immobiliser la trypsine sur un support solide, comme les billes de verre. Cette étude a été réussie avec succès avec trois techniques.

L'immobilisation de la trypsine, ou de n'importe quelle autre enzyme, provoque une diminution de son activité enzymatique spécifique et affecte les paramètres cinétiques de l'enzyme (K_M , V_{max}). Cette diminution est due à plusieurs facteurs déjà mentionnés dans la discussion, mais le point le plus critique durant l'immobilisation, est que l'enzyme peut être attachée par la triade catalytique, ce qui paralyse alors cette molécule. Ainsi la benzamidine peut être utilisée comme protecteur de la triade catalytique, lors de l'immobilisation [43].

Cependant, les paramètres cinétiques obtenus en batch ne représentent pas les caractéristiques réelles de l'enzyme immobilisée sur les billes dans le microréacteur. Les chercheurs ne présentent pas une méthode de détermination des paramètres cinétiques pour un microréacteur. La difficulté réside dans la réalisation de digestion pendant des intervalles de temps constants pour un substrat donné. De plus, il faut trouver les conditions optimales de séparation du produit TA du substrat TAME par électrophorèse capillaire, l'essai de séparation a montré que le TAME et TA présentent un pic maximum d'absorption à 247 nm.

L'optimisation du microréacteur est une nécessité afin de réaliser une cartographie peptidique fiable. Pour le faire, il faut étudier le débit du jet d'argon utilisé pour pousser la protéine dans le microréacteur pendant un temps optimal pour obtenir une digestion complète de la protéine désirée.

La digestion d'une protéine dans un microréacteur plus court est une priorité pour faire un système de digestion en ligne avec l'électrophorèse capillaire.

RÉFÉRENCES

- [1] H.E. Swaisgood, in P.F. Fox (Editor), *Developments in Dairy Chemistry*, 1, Elsevier Applied Science, London, 1982.
- [2] E. Bonneil, M. Mercier, K.C. Waldron, *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 29-45.
- [3] A. Raisonnier, *Enzymologie élémentaire Révisions Biochimie métabolique* (<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/EEbioch/>), 2000.
- [4] G.A. Tucker, L.F. Woods, *Enzymes in Food Processing*, Blackie Ltd., Glasgow, 1991.
- [5] K. Laider, P. Bunting, *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Claredon Press, London, 1973.
- [6] P. Engel, *Enzyme Kinetics: The Steady-state Approach. Outline studies in Biology*, Chapman and Hall, London, 1981.
- [7] F.L. Jun, T.L. Yong, C.Y. Victor, *J. Pharmaceut. Sci.* 89 (2000) 979-990.
- [8] A. Weiseman, *Chem. Technol. Biotechnol.* 56 (1993) 3-10.
- [9] H.H. Weetall, *Anal. Chem.* 46 (1974) 602A-615A.
- [10] S.V. Rso, K.W. Anderson, L.G. Bachas, *Mikrochim. Acta* 182 (1998) 127-143.
- [11] V.G. Janolino, H.E. Swaisgood, *Biotech. Bioeng.* 24 (1982) 1069-1080.
- [12] D. Voet, J.G. Voet, *Biochimie*, 2ième éd., De Boeck Université s.a., Paris, 1998.
- [13] H.U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press Inc., New York, 1974.
- [14] J. Ford, R. Chambers, W. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* 309 (1973) 175-182.
- [15] E. Raetz, W. Bauer, *Fermentations et technologie enzymatique*, Université de Lausanne, 2001.
- [16] K. Martinek, A.M. Klibanov, V.S. Goldmacher, I.V. Berezin, *Biochem. Biophys. Acta* 485 (1989) 2226-2232.
- [17] E.A. Kulik, K. Kato, M.I. Ivanchenko, Y. Ikada, *Biomat.* 14 (1993) 763-769.
- [18] K.A. Cobb, M. Novotny, *Anal. Chem.* 61 (1989) 2226-2231.
- [19] R.D. Voyksner, D.C. Chen, H.E. Swaisgood, *Anal. Biochem.* 188 (1990) 72-81.

- [20] L.N. Amankwa, W.G. Kuhr, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2693-2697.
- [21] M.W. Nashabeh, Z. El Rassi, *J. Chromatogr.* 596 (1992) 251-264.
- [22] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *High Resolut. Chromatog.; Chromatogr. Commun.* 4 (1981) 230-237.
- [23] G. Phol, M. Kallstrom, N. Bergsdrof, P. Wallen, H. Joenvall, *Biochem.* 23 (1984) 3701-3711.
- [24] H. Jiang, H. Zou, H. Waang, J. Ni, Q. Zhang, Z. Yukui, *J. Chromatogr. A* 903 (2000) 77-84.
- [25] S. Yamato, N. Kawakami, K. Shimada, M. Ono, N. Idei, I. Yuji, *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 191-199.
- [26] K. Matsumoto, J.J.B. Baeza, H.A. Mottola, *Anal. Chem.* 65 (1993) 636- 639.
- [27] H. Yang, H.A. Chase, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28 (1998) 145-154.
- [28] Master Manufacturing Procedure (Technical Svc.), Sigma, Missouri 63103, USA, 2000.
- [29] C.E. Hall, D. Datta, E.A.H. Hall, *Anal. Chim. Acta* 323 (1996) 87-96.
- [30] R.T. Lee, Y.C. Lee, *Biochem.* 19 (1980) 156-163.
- [31] A.M. Crestfield, S. Moore, W.H. Stein, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 622.
- [32] N. Jentoft, D.G. Dearbon, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 4359-4370.
- [33] E.H. Hansen, H.S. Mikkelsen, *Anal. Lett.* 24 (1991) 1419-1430.
- [34] H. Hamad, *Projet de recherche dans le cadre du cours CHM3550, Département de chimie, Université de Montréal*, 1999,
- [35] Worthington-Biochem, (www.worthington-biochem.com/manual/T/TRY.html), 2002.
- [36] H.H. Weetall, *Science* 166 (1969) 615-617.
- [37] M.T. Davis, T.D. Lee, M.H. Ronk, A. Stanley, *Anal. Biochem.* 244 (1995) 235-244.
- [38] J.D. Chapman, H.O. Hultin, *Biotech. Bioeng.* 17 (1975) 1783-1795.
- [39] P. Sudi, E. Dala, B. Szajáni, *Appl. Biochem. Biotech.* 22 (1989) 31-43.
- [40] L. Goldstein, *Biochem.* 1 (1972) 4072-4085.

- [41] D. Bharadwaj, A. Mukherjee, S.M. Roy, R.N. Hati, R.N. Mukherjee, *Ind. J. of Biochem. Bioph.* 29 (1992) 375-377.
- [42] G.P. Royer, G.M. Green, *Biochem. Bioph. Res. Commun.* 44 (1971) 426-432.
- [43] W. Bode, P. Schwager, *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 693-670.
- [44] J. Pelletier, Personal Communication, 2001.
- [45] J.-T. Oh, J.-H. Kim, *Enz. Microb. Techn.* 27 (2000) 356- 361.
- [46] T.H. McHugh, K.J. M., *Food Technol.* 48 (1994) 97-103.
- [47] E. Dickinson, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 88 (1992) 2973-2983.
- [48] C. Carles, J.C. Muet, B. Ribadeau- Dumas, *FEBS Lett.* 229 (1988) 265-272.
- [49] D.G. Dalgleish, J. Leaver, *J. Colloid Interface Science* 141 (1991) 288-294.
- [50] B. Matoba, R. Hayashi, L. Limieux, R.E. Simard, *Lait* 17 (1991) 599-636.
- [51] L. Limieux, R.E. Simard, *Lait* 72 (1992) 335-382.
- [52] T. Matoba, T. Mata, *Agric. Biol. Chem.* 33 (1972) 1662-1663.
- [53] B. Ribadeau-Dumas, F. Brignon, F. Grosclaude, J.C. Mercier, *Eur. J. Biochem.* 25 (1972) 505-514.
- [54] E. Dickinson, *Colloid Surface* 42 (1989) 191-204.
- [55] K.F. Ng-Kwai-Hang, F. Grosclaude, in P.F. Fox (Editor), *Advanced Dairy Chemistry 1: Proteins*, Elsevier Applied Science, London, 1992, p. 405-455.
- [56] L.N. Amankwa, W.G. Khur, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1610-1613.
- [57] O. Park, H.E. Swaisgood, J.C. Allen, *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 2850-2857.
- [58] E. Bonneil, Personal Communication, 1999.
- [59] W.J. Boyle, P. van der Geer, T. Hunter, in *Methods in Enzymology*, 201, 1991, p. 110-149.
- [60] M. Mercier, M.Sc. Thesis, Détermination des cartes peptidiques des protéines par électrophorèse capillaire et détection par absorbance thermooptique, Département de chimie, Université de Montréal, 1997, pp. 110.
- [61] P. Matsudaria, in *Methods in Enzymology*, 182, 1990, p. 630- 613.

ANNEXE

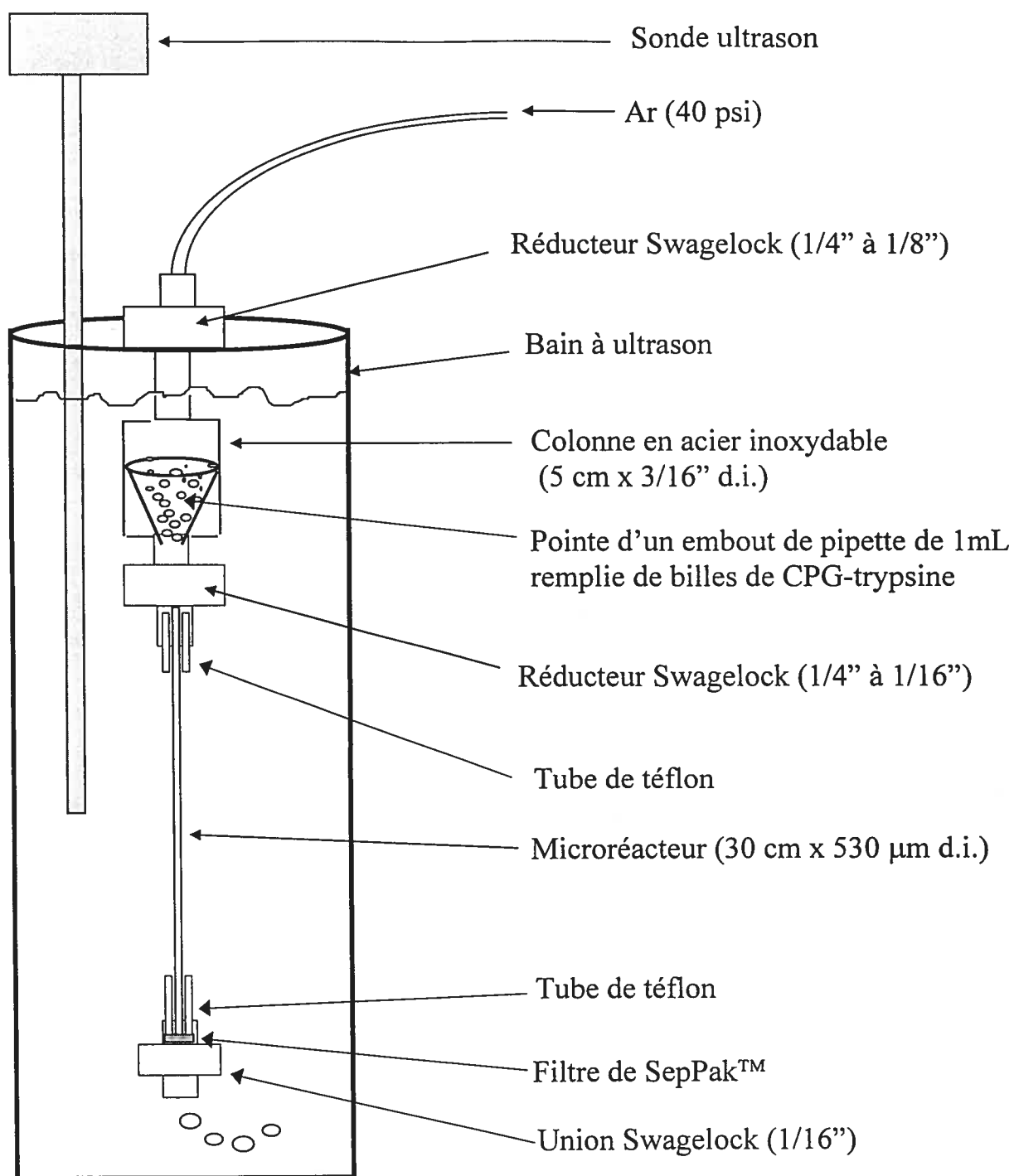


Figure A1 : Procédure d'emballage du microréacteur (adapté de la référence [2]).

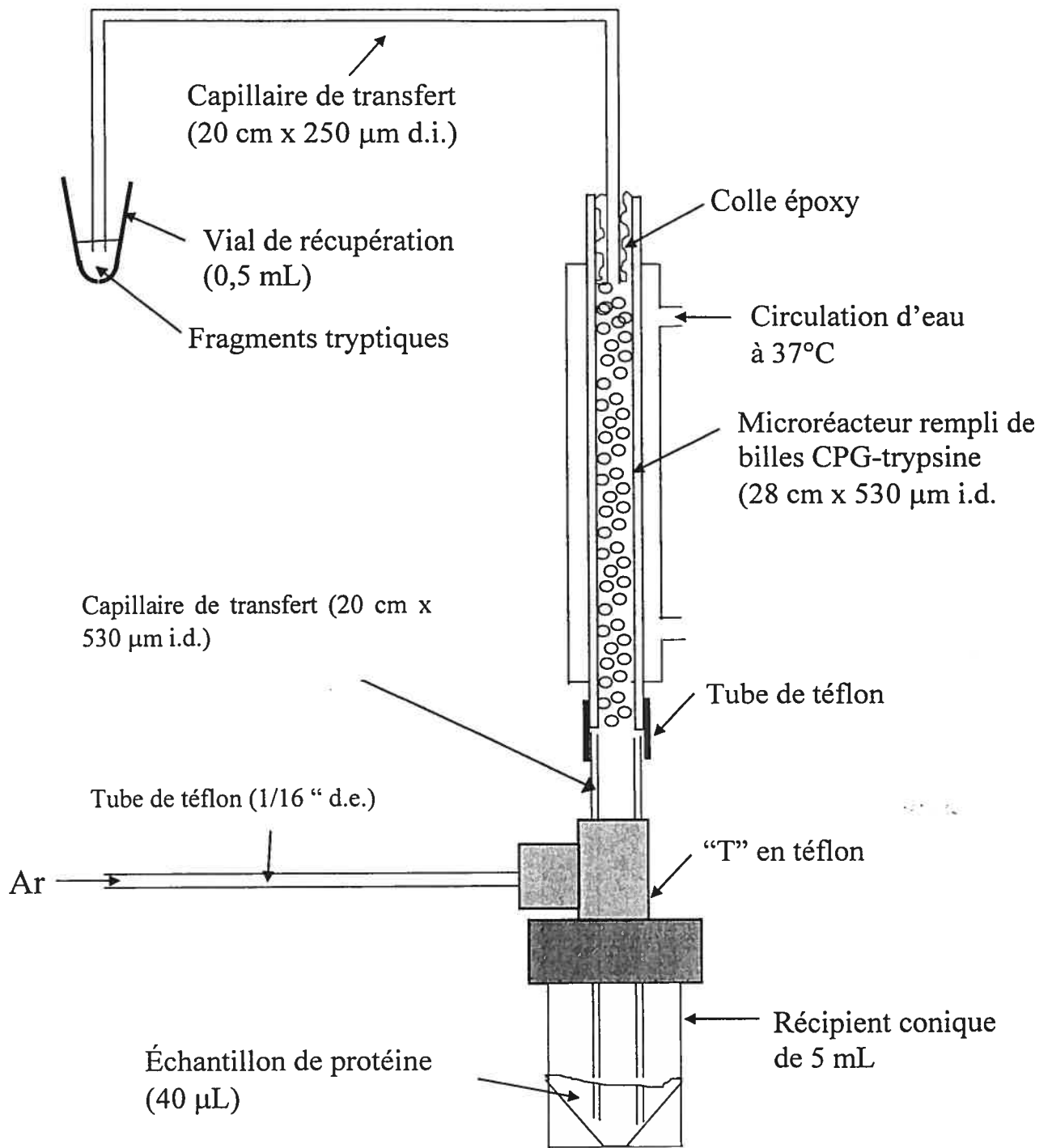


Figure A2 : Procédure de digestion de la protéine (adapté de la référence [2]).

