

PREPARATION ET PROPRIETES DE DERIVES DE L'UREASE INSOLUBLES DANS L'EAU.

Eric BROWN, André RACOIS et Henri GUENIFFEY

Laboratoire de Chimie Macromoléculaire (Pr. PINAZZI)  
Centre Universitaire - Route de Laval - 72. LE MANS.

(Received in France 13 April 1970; received in UK for publication 30 April 1970)

Un certain nombre d'enzymes actuellement utilisées pour catalyser in vitro des réactions particulières sont solubles dans l'eau, ce qui rend leur récupération impossible en fin de réaction (1,2). Par contre, la fixation au moyen d'une liaison covalente d'une enzyme soluble sur une macromolécule convenable peut fournir une combinaison solide et insoluble enzyme/support, utilisable pour catalyser (en milieu hétérogène) les réactions in vitro susceptibles de l'être par l'enzyme seule. En fin de réaction, on récupère la combinaison enzyme/support par simple filtration : cette combinaison peut alors resservir (1,3).

Un certain nombre de combinaisons chimiques solides enzyme-support de ce type sont actuellement connues (1,3 à 6), ainsi que des combinaisons antigène-support insolubles et biologiquement actives (7 à 9). Dans la majorité des cas, l'enzyme greffée sur le polymère est une diastase protéolytique (pepsine, papaïne, trypsine, chymotrypsine) (1,3,10) et le support macromoléculaire est souvent un polymère possédant des cycles aromatiques aminés. Après diazotation, ce polymère est amené à réagir sur les cycles phénoliques de la tyrosine (11) contenue dans les enzymes. Ainsi, on a préparé des dérivés insolubles de la pepsine et de la carboxypeptidase en greffant ces enzymes sur du paraaminopolystyrène diazoté (12) ; des dérivés de la trypsine et de la chymotrypsine par combinaison avec la diazobenzylcellulose (4) ; des dérivés de l'uréase par greffage sur des copolymères de para-diazophénylalanine et d'acides aminés simples (5).

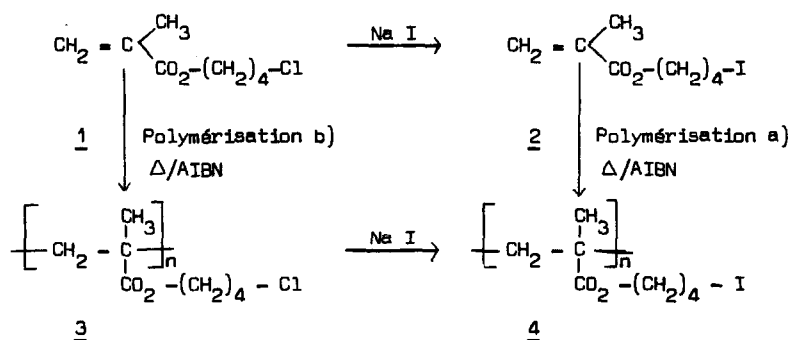
Le groupement diazoïque n'est d'ailleurs pas le seul groupement fonctionnel qui ait été utilisé pour lier de façon covalente un polymère à une enzyme ou une protéine. Ainsi, notamment, on a pu fixer des enzymes ou des protéines sur des polymères possédant des groupements azide d'acyle  $-CON_3$ , chlorure d'acide  $-COCl$  et isocyanate  $-NCO$  (1,3), ces groupements réagissant sur les groupements  $NH_2$  libres des molécules biologiques pour donner lieu à la formation de groupements amides.

Dans le but de préparer d'autres types d'enzymes insolubles, nous avons synthétisé de nouveaux supports macromoléculaires hydrophiles qui ne sont ni des polyamides, ni des dérivés de la cellulose ou du polystyrène. Nous avons pensé en outre que le groupement fonctionnel iodure d'alcyle, facile à mettre en place sur un polymère, pourrait aisément réagir sur les groupements  $NH_2$  libres d'une enzyme  $Enz-NH_2$  telle que l'uréase pour donner un dérivé insoluble du type Polymère- $CH_2-NH-Enz$ . Nous indiquons ci-après les résultats obtenus dans ce domaine.

Synthèse du polymère.

En traitant le chlorure de méthacrylyle (13) par le chloro-4 n-butanol (14) en présence de triéthylamine, on obtient l'ester 1 (Rdt 80 %). Le polyméthacrylate de iodo-4 n-butyle (4)

cherché a été obtenu à partir du monomère 1 selon les deux méthodes exposées ci-dessous :



La substitution de Cl par I sur le polymère chloré 3 ne dépasse pas 85 %, en accord avec la règle de FLORY. La polymérisation des esters 1 et 2 a été effectuée à l'abri de l'air et de la lumière dans le benzène au reflux pendant 24 h au moyen de peroxyde de benzoyle ou d'azobis-isobutyronitrile (AIBN). Les masses moléculaires moyennes obtenues sont d'environ 40.000 pour la polymérisation a) (2 → 4) et 100.000 pour la polymérisation b) (1 → 3) ; cette dernière, donnant les masses les plus élevées, constitue la méthode la plus avantageuse de préparer 4. Les composés 1, 2, 3 et 4 ont donné les analyses et les spectres IR et RMN attendus.

#### Fixation de l'uréase.

L'uréase de Merck utilisée avait une activité de 250.000 U/g (15). On agite une suspension de 1 g de polymère iodé 4 et d'uréase (50 mg) dans le dioxanne purifié ou dans une solution tampon de  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  à 18 p. 1000. A la fin de la réaction, on substitue l'iode et le chlore restants par la benzylamine ou mieux par l'éthylènediamine, ce qui permet en outre de réticuler le polymère et d'en augmenter l'insolubilité. Les dérivés insolubles obtenus sont centrifugés puis lavés plusieurs fois sur verre fritté avec une solution tampon de  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  à 18 p. 1000 (pH 8,8), jusqu'à ce que le dernier filtrat ne présente plus d'activité enzymatique.

#### Mesure de l'activité des combinaisons uréase/support.

On agite magnétiquement pendant 5 minutes une suspension de 1 g du dérivé uréase/support dans une solution d'urée tamponnée ( $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  à 6 p. 1000). Après filtration de la solution, on dose le carbonate d'ammonium formé au moyen du réactif de NESSLER (6). Une droite d'étalonnage de l'activité enzymatique en fonction de la masse a été tracée pour l'uréase initiale dans des conditions opératoires identiques et a permis de calculer la masse  $m_1$  d'uréase pure ayant la même activité que le dérivé insoluble. La masse  $m_2$  d'uréase non fixée sur le polymère et présente dans les filtrats a été déterminée dans les mêmes conditions que l'uréase initiale, en admettant que l'uréase des filtrats avait conservé son activité originelle de 250.000 U/g. La masse  $m_3$  d'uréase fixée sur le polymère est donnée par la différence  $m_3 = (50 - m_2)$  mg. L'activité relative  $r$  du dérivé uréase/support par rapport à l'uréase de départ est donnée par le rapport  $r = \frac{m_1}{50 - m_2}$ .

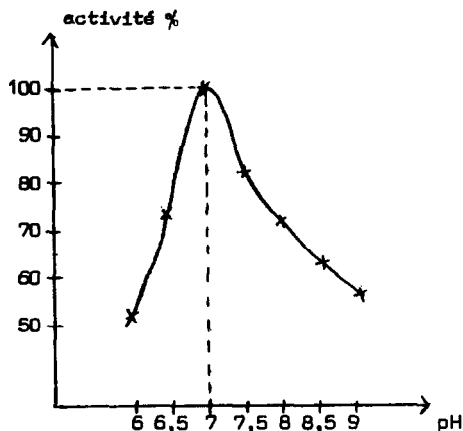
Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-après :

PREPARATION DES DERIVES UREASE/SUPPORT				CARACTERISTIQUES DES DERIVES UREASE/SUPPORT			
Dérivé uréase/ support	Temps de réaction (et tempé- rature)	milieu réactionnel	agent réticulant	$m_1$ (mg)	uréase non fixée $m_2$ (mg)	uréase fixée $m_3$ (mg)	activité relative $r = \frac{m_1}{50-m_2} \times 100$ (%)
I	24 h (20°)	$\text{HNa}_2\text{PO}_4$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$	5	40	10	50
II	24 h (20°)	$\text{HNa}_2\text{PO}_4$	$(\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$	9	36	14	66
III	48 h (20°)	$\text{HNa}_2\text{PO}_4$	$(\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$	6	42	8	75
IV	72 h (20°)	$\text{HNa}_2\text{PO}_4$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$	5	32	18	27
V	72 h (20°)	dioxanne	$(\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$	3	38	12	25
VI	72 h (30°)	$\text{HNa}_2\text{PO}_4$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$	5	34	16	30
VII	72 h (40°)	$\text{HNa}_2\text{PO}_4$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$	2,5	40	10	25
VIII	48 h (20°)	dioxanne	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$	9	37	13	70
IX	24 h (20°)	dioxanne	$(\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$	4	44	6	66

En conclusion, la fixation sur un polymère de l'uréase par ses groupements aminés libres peut être effectuée de façon acceptable, que le milieu réactionnel soit aqueux (tamponné) ou organique (dioxanne), avec un temps optimal de réaction de 24 à 48 h. La fixation de l'uréase entraîne une dénaturation variable de cette enzyme. Cependant l'activité résiduelle semble assez stable : pour les dérivés I, II et IV, elle n'avait pas varié 2 mois après leur préparation.

La courbe ci-contre donne l'activité du dérivé II en fonction du pH. L'activité maximale est observée à pH 7, de même donc que pour l'uréase pure (17).

Nous remercions MM. S. DAVID et Y. TIFFON pour leurs aimables et précieux conseils.



#### BIBLIOGRAPHIE

- (1) I.H. SILMAN et E. KATCHALSKI, Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, part II, 873.
- (2) A. PARISOT, Communication personnelle.
- (3) G. MANECKE, Pure Appl. Chem., 1962, 4, 507.
- (4) M.A. MITZ et L.J. SUMMARI, Nature, 1961, 189, 576.
- (5) E. RIESEL et E. KATCHALSKI, J. Biol. Chem., 1964, 239, 1521.
- (6) G. MANECKE et H.J. FOERSTER, Ger. I. 282.579  
ou Chem. Abs., 1969, 70, 74670 K.
- (7) L. GYENES, B. ROSE et A.H. SEHON, Nature, 1958, 181, 1465.
- (8) L.H. KENT et J.H. SLADE, Nature, 1959, 183, 325.
- (9) A. WALLEY et D.H. CAMPBELL, J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, 487.
- (10) H.R. MANLER et E.H. CORDES, Biological Chemistry, Harper & Row, London, 1967, p. 278.
- (11) Référence (10), p. 12.
- (12) N. GRUBHOFFER et L. SCHLEITH, Z. Physiol. Chem., 1954, 297, 108.
- (13) I.A. ARBUZOVA, L.I. MEDVEDEVA et S.A. PLOTKINA, Zhur. obshchei Khim., 1956, 26, 1127.
- (14) D. STARR et R.M. HIXON, J. Amer. Chem. Soc., 1934, 56, 1595.
- (15) J.B. SUMNER, J. Biol. Chem., 1926, 69, 435.
- (16) Y. TIFFON, Communication personnelle.