

ENZYMES IMMOBILISEES—IV

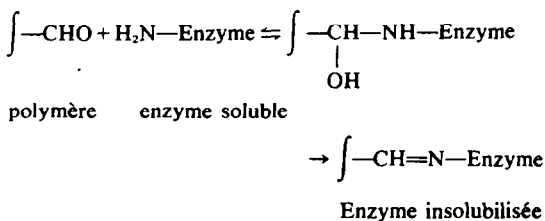
LES VANACRYLS ET LEUR EMPLOI DANS LA PREPARATION DE NOUVEAUX DERIVES INSOLUBLES DE LA TRYPSINE^a

E. BROWN* et A. RACOIS
Laboratoire de Synthèse Organique, Faculté des Sciences,
B.P. 535, 72017 Le Mans Cedex, France

(Received in France 4 May 1973; Received in the UK for publication 8 October 1973)

Abstract—Treatment of methacrylyl chloride with vanillin gave the corresponding ester **1** which was polymerized (or co-polymerized with allylic alcohol), to give various polyaldehydes, called vanacryls. These polymers were successfully used for immobilizing trypsin according to the probable scheme:
 $\text{Pol}-\text{CHO} + \text{H}_2\text{N}-\text{Enz} \rightarrow \text{Pol}-\text{CH}=\text{N}-\text{Enz}$.

Dans le but de préparer de nouveaux types d'enzymes immobilisées, nous nous sommes proposé de synthétiser des supports macromoléculaires différents de ceux utilisés jusqu'à présent. Ces polymères sont, d'une manière générale, des "polyméthacrylates de vanilline" qui possèdent par conséquent des groupements terminaux aldéhydes susceptibles de réagir sur les $-\text{NH}_2$ libres des enzymes selon le schéma probable:

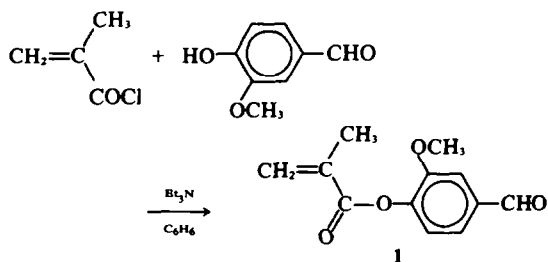


Il est à noter que deux types de polyaldéhydes aliphatiques ont été employés récemment pour l'immobilisation d'enzymes: un copolymère styrène-acroléine¹ et un polyacétal réticulé commercial donnant, par hydrolyse ménagée, des fonctions aldéhydes.² Le premier donne des résultats satisfaisants; le second nécessite une activation avant emploi, mais permet de moduler le pourcentage d'acétal transformé, donc de conserver un caractère hydrophile important; les résultats décrits dans ce cas sont proches de ceux que nous avons obtenus avec la trypsine.

Synthèse des polymères

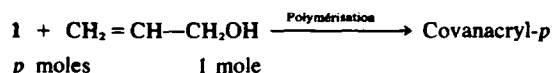
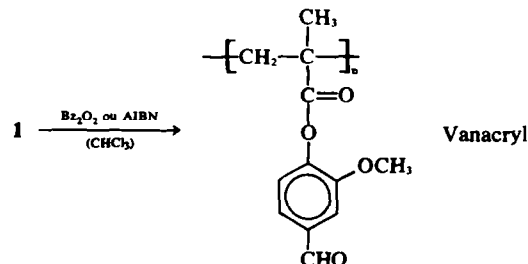
En traitant le chlorure de méthacrylyle par la vanilline du commerce, en présence de

triéthylamine dans le benzène ou l'éther, on obtient le monomère **1** (Rdt 70%) qui présente l'avantage d'être un solide blanc (F = 56–58°), recrystallisable dans l'éther de pétrole.



Nous avons également préparé l'ester **1** en faisant réagir le chlorure de méthacrylyle sur le sel de potassium de la vanilline dans l'éther mais le rendement observé est nettement moindre (40%).

L'ester **1** a été soit polymérisé seul, soit copolymérisé avec l'alcool allylique,^{3,4} au moyen de peroxyde de benzoyle ou d'azobisisobutyronitrile (AIBN), dans le chloroforme au reflux pendant 24 h:



^aNote préliminaire: E. Brown et A. Racois, *Tetrahedron Letters* 5077 (1972); 3ème mémoire: E. Brown et A. Racois, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 4357 (1971).

Nous avons ainsi obtenu des solides blancs, l'homopolymère, appelé Vanacryl (Rdt 90%) et les copolymères (ou Covanacryls-p, le chiffre p indiquant le nombre de moles de monomère 1 utilisées par mole d'alcool allylique dans la copolymérisation), ces copolymères étant obtenus avec des rendements variant de 40 à 70%.

Nous avons d'autre part entrepris une polymérisation en suspension dans l'eau, en utilisant une solution concentrée de l'ester 1 dans le benzène. Nous avons ainsi obtenu des perles dures de Vanacryl dont le diamètre était de l'ordre de quelques centaines de microns. La polymérisation était pratiquement quantitative. Des perles des divers Covanacryls-p ont été préparées de la même façon et avec un rendement pratiquement quantitatif.

Il nous a paru intéressant d'étudier la physisorption des enzymes protéolytiques sur des supports méthacryliques, structurellement semblables aux Vanacryls, mais dépourvus de groupements fonctionnels réactifs. Dans ce but, nous avons préparé le polyméthacrylate de gaïacol de la même façon que le Vanacryl, afin d'obtenir un polymère de tacticité et de degré de polymérisation comparables.⁵

Masse moléculaire moyenne et degré de polymérisation. Nous avons mesuré la masse moléculaire moyenne en nombre des divers polymères en solution dans le chloroforme à 25° au moyen d'un osmomètre à membrane Hewlett-Packard. Les masses moléculaires moyennes M_n observées varient de 24,500 à 54,000 et sont une fonction croissante de p. Les degrés de polymérisation varient de 148 à 279 et sont également une fonction croissante de p sauf pour le Covanacryl-2.

Distribution de masses des polymères. La répartition des masses des chaînes macromoléculaires, dans les différents échantillons synthétisés, a été étudiée au moyen d'un chromatographe de GPC Waters Associates. Les divers polymères (qui ont été étudiés en solution dans le tétrahydrofurane) présentent tous une distribution presque statistique des masses. Les diagrammes de distribution sont des courbes en cloche plus ou moins aplaties selon les échantillons et qui présentent un léger épaulement vers les petites masses. L'examen de ces courbes montre que les masses moléculaires extrêmes sont voisines de 1000 et 100,000.

Malgré la présence de molécules de faible masse, nous n'avons pas observé la formation de combinaisons enzyme-polymère hydrosolubles ou colloïdales, même avec l'uréase qui a une masse moléculaire voisine de 480,000.⁶

Tacticité des polymères. Les spectres de RMN de divers polyméthacrylates ont été étudiés en détail.⁷ Un examen détaillé des spectres obtenus au moyen d'un spectrographe Thomson opérant à

250 MHz montre que les divers Vanacryls ont des tacticités sensiblement identiques, avec prédominance syndiotactique, un fort pourcentage d'enchaînements hétérotactiques et très peu d'enchaînements isotactiques. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature^{8,9} et sont analogues à ceux observés avec les poliiodals que nous avons décrits récemment.⁷

Préparation de trypsine immobilisée

De nombreuses combinaisons insolubles trypsine/support macromoléculaire ont été décrites.^{12,10} Les dérivés insolubles sont généralement plus stables que l'enzyme soluble originelle mais les taux de fixation peuvent être faibles et l'activité enzymatique spécifique résiduelle (AER) varie généralement de 0 à 43% de celle de l'enzyme originelle. Par contre, on a décrit un dérivé¹¹ qui s'est montré plus actif que l'enzyme de départ. Sur le plan pratique, une trypsine insolubilisée pourrait être utilisée pour purifier un inhibiteur en solution par chromatographie d'affinité.^{12,13}

Nous avons décrit récemment^{10,14} la préparation de dérivés insolubles de la trypsine par fixation, au moyen de liaisons covalentes, de l'enzyme sur un polyméthacrylate d' ω -iodo-n-alcoyle (Poliiodal). Ces dérivés présentaient une AER d'environ 30% pour des taux de fixation variant de 26 à 36 mg d'enzyme par gramme de polymère.

Immobilisation de la trypsine sur les vanacryls. Les greffage de trypsine lyophilisée sur le Vanacryl et sur les Covanacryls-1,2,3 et 5 a été réalisé en solution tampon phosphate à pH = 7.5 pendant 24 h à 2°, en utilisant 10 mg d'enzyme pour 100 mg de polymère.^{15,16} Nous avons obtenu dans chaque cas un dérivé insoluble facilement récupérable par filtration. Ce solide a été lavé avec une solution de NaCl M, puis avec de l'eau distillée, jusqu'à ce que la dernière eau de lavage ne présente plus d'activité enzymatique appréciable.

L'activité trypsique des dérivés insolubles a été mesurée avec un pH-stat (Radiometer) à pH 8 par titrage à la soude 0.1 N de l'acide carboxylique libéré par hydrolyse enzymatique d'un substrat de la trypsine, le chlorhydrate de N-benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE).^{17,18} Une courbe-étalon a permis de calculer la masse d'enzyme non fixée sur le polymère par mesure de l'activité trypsique du filtrat, dans les mêmes conditions que pour la trypsine originelle. Nous avons calculé la quantité d'enzyme fixée par différence entre la masse totale mise en oeuvre (soit 10 mg) et la masse non fixée présente dans les filtrats. L'activité enzymatique du dérivé insoluble a été évaluée par rapport à celle de la trypsine originelle, et dans les mêmes conditions que pour la trypsine originelle.

Un dosage par spectroscopie UV, avec la méthode de Folin,¹⁹ de la trypsine non fixée et

présente dans les filtrats a fourni des résultats proches de ceux obtenus par la méthode ci-dessus.

Résultats obtenus. La masse de trypsine fixée varie de 1.9 à 2.6 mg pour 100 mg de polymère et croît comme le nombre de groupements réactifs -CHO présents dans le mélange de monomères soumis à la polymérisation.

L'activité résiduelle des différents dérivés insolubles obtenus (et conservés en suspension dans une solution de tampon phosphate 0.01 M, pH 7.2) varie de 10 à 14% de celle de la trypsine de départ. Les dérivés étant conservés en suspension dans 20 cm³ de la solution tampon phosphate à 2°, nous avons tracé des courbes d'activité qui indiquent qu'après 3 mois de stockage, ces mêmes dérivés présentaient encore de 45 à 73% de leur activité initiale (Fig 1).

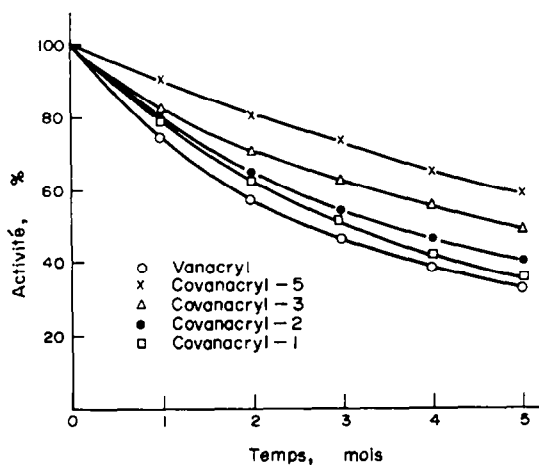


Fig 1.

Il convient de noter ici que Katchalski avait observé que ses dérivés insolubles de la trypsine, après conservation dans l'acide chlorhydrique 0.0025 N, gardaient encore 65% de leur activité originale au bout de 3 mois.¹⁷

Dans certains cas observés, les enzymes immobilisées sont plus stables à l'état lyophilisé qu'en suspension,²⁰⁻²² mais la lyophilisation ou le séchage sous vide peuvent parfois les désactiver partiellement ou totalement.²³ Ainsi nos dérivés séchés sous vide et conservés secs se montraient moins actifs une fois remis en suspension que les mêmes dérivés conservés en suspension.

L'étude des spectres UV à pH 7.5 indique la présence, dans les filtrats provenant de la réaction de fixation, d'une très faible quantité (moins de 0.2 mg) de vanilline.

La vanilline serait passée en solution vraisemblablement par hydrolyse de la fonction ester du polymère. Il ne peut s'agir de monomère resté occlus dans le polymère car le spectre UV du méthacrylate de vanilline est nettement différent de celui observé.

Il semble que l'hydrolyse des fonctions ester des dérivés soit facilitée quand ces derniers sont conservés dans une solution M de KCl dans l'eau permutée (pH < 7). En effet, les spectres UV d'une solution de vanilline à pH 5 et du filtrat des dérivés maintenus en suspension pendant 48 h sont pratiquement identiques.

Les mesures d'activité montrent que la trypsine native est fortement désactivée par incubation à 55°. Dans des conditions analogues, la trypsine "solubilisée", présente dans le filtrat provenant d'une suspension de dérivé insoluble conservée pendant 48 h à pH 5-6, est aussi peu désactivée par la chaleur que le dérivé lui-même. Ce filtrat contient sensiblement les deux tiers de l'enzyme initialement fixée. Mis à part le fait déjà constaté²⁴ que la trypsine voit sa stabilité thermique augmenter par insolubilisation, nous observons donc également que la trypsine solubilisée en cours du stockage est thermiquement plus stable que la trypsine originelle (Fig 2).

Afin d'étudier l'influence de la vanilline sur la stabilité thermique de la trypsine en solution, nous avons mis en présence 10 mg de trypsine (de Sochi-bo) et 100 mg de vanilline dans les conditions

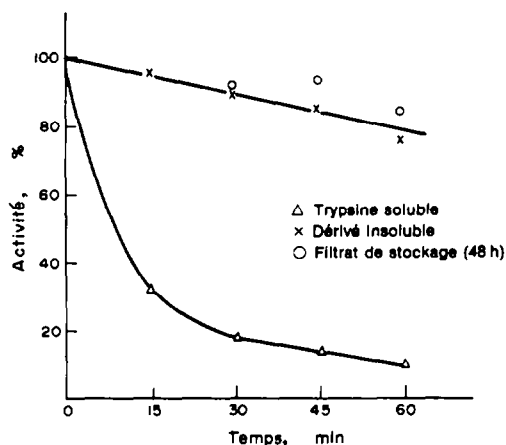


Fig 2. Incubation à 55° (trypsine de Worthington).

utilisées habituellement pour les insolubilisations (5 cm³ de solution tampon phosphate 0.2 M à pH 7.5). Puis, après addition d'une solution de chlorure de sodium M et d'eau, nous avons incubé cette solution à 55° de la même manière que ci-dessus. Les résultats obtenus semblent indiquer que le peu de vanilline éventuellement fixée désactive la trypsine lors de sa fixation, mais que cette trypsine est alors un peu plus stable thermiquement que l'originelle.

Néanmoins la différence d'activité notée ici est si faible que l'on ne peut pas affirmer en toute certitude que la stabilité thermique, anormalement élevée, observée pour la trypsine des filtrats de stockage est seulement due à la formation d'une combinaison chimique entre cette enzyme et la vanilline.

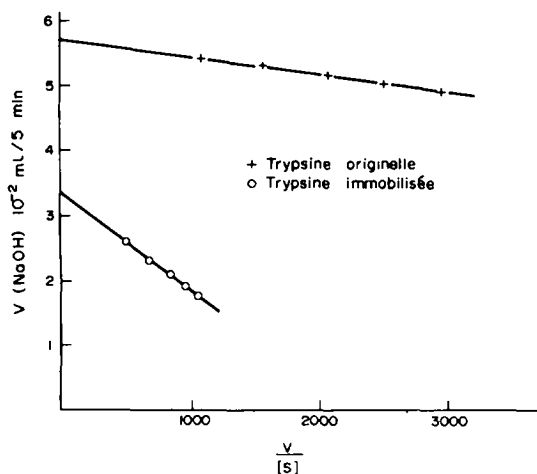


Fig 3.

Des études cinétiques ont montré que la fixation de la trypsine sur les Vanacryls entraîne une augmentation notable de la constante de Michaelis apparente (K_m) app qui passe de $2.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ à $1.60 \times 10^{-3} \text{ M}$ (soit environ 6 fois plus) pour le Covanacryl-1 (Fig 3).

Conclusion. La fixation sur les Vanacryls, de la trypsine par ses groupements basiques réactifs peut être effectuée comme sur les Poliodals (10 et 14) mais avec de moins bons résultats. Les dérivés obtenus doivent être conservés en solution tampon basique car, en milieu acide, on observe une solubilisation de l'enzyme.

Les dérivés obtenus gardent leur activité après incubation à 55° et peuvent être conservés longtemps en suspension à 2° mais leur affinité apparente pour le substrat (BAEE) est environ 6 fois moindre que celle de la trypsine de départ.

Si on mesure l'activité trypsique d'un dérivé trypsine/Covanacryl-2 maintenu en suspension pendant 48 h en solution acide, puis les activités trypsiques du filtrat correspondant et du dérivé remis en suspension, on remarque que les deux tiers environ de la trypsine fixée sont passés en solution. Cette "dissolution" pourrait bien être due à l'hydrolyse des fonctions esters du polymère. D'autre part on retrouve dans le filtrat de stockage et la nouvelle suspension l'activité totale de la première suspension.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de la littérature² indiquant une fixation de la trypsine de 10 à 50 mg par gramme d'Enzacryl polyacétal (transformé par hydrolyse en polyaldéhyde). L'AER des dérivés n'est que de 16 à 25% et là aussi il y a passage en solution d'une partie de l'enzyme fixée.

PARTIE EXPERIMENTALE

Dans la suite du texte, la pression réduite est désignée par l'abréviation PR, la température ambiante par TA,

l'azobisisobutyronitrile par AIBN et le tétrahydrofurane par THF.

Le spectrographe de RMN utilisé pour l'étude de la tacticité des polymères était un appareil Thomson opérant à 250 MHz.

Les courbes de GPC ont été obtenues avec un chromatographe de gel (GPC) Waters-Associates en utilisant le THF comme solvant.

Préparation des Vanacryls (avec la collaboration de Monsieur A. Bonté).

Méthacrylate de vanilline (1). Dans un réacteur d'un litre disposé dans un bain d'eau froide et muni de deux ampoules à rétablissement de pression, d'un réfrigérant et d'un agitateur mécanique, on introduit 45 g de vanilline dans 200 cm^3 de benzène. Au mélange agité, on ajoute simultanément et goutte à goutte (2 h) une solution de 30 g de chlorure de méthacrylyle^{25,26} dans 100 cm^3 de benzène et une solution de 30 g de triéthylamine dans 100 cm^3 de benzène.²⁷ On laisse réagir une nuit à température ambiante, on filtre pour éliminer le précipité blanc de chlorhydrate de Et_3N et on lave le filtrat avec une solution saturée de NaHCO_3 , puis avec de l'eau alternativement (deux fois). La phase benzénique est séparée, séchée (Na_2SO_4 ou MgSO_4), évaporée sous PR à TA et le solide blanc obtenu est séché puis recristallisé dans l'éther de pétrole. On obtient ainsi 46.5 g (Rdt 71%) de méthacrylate de vanilline (solide blanc), $F = 56-58^\circ$. Analysé pour $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$; IR (KBr) (cm^{-1}): $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$ 1730 et 1685 (FF); $\nu_{(\text{C}-\text{O})}$ 1635 (FF); RMN (CDCl_3) (ppm): δ 7.15 à 7.55 (m) (aire 3) (protons aromatiques); δ 6.35 (m) (aire 1) (H vinylique); δ 5.75 (m) (aire 1) (H vinylique); δ 3.9 (s) (aire 3) ($-\text{O}-\text{CH}_3$); δ 2 (s) (aire 3) ($-\text{CH}_3$); δ 10 (s) (aire 1) ($-\text{CHO}$).

Avec les mêmes conditions opératoires, mais en utilisant l'éther comme solvant, on obtient l'ester 1 avec un rendement légèrement supérieur (80%).

Polymérisation du méthacrylate de vanilline. Dans un ballon de 100 cm^3 , on introduit 40 cm^3 de CHCl_3 pur, 6 g de méthacrylate de vanilline et 60 mg (1%) d'AIBN (ou de peroxyde de benzoyle). On laisse 24 h au reflux du CHCl_3 . Le mélange est versé dans 200 cm^3 de méthanol pour précipiter le polymère. Après filtration, mise en solution, reprécipitation puis séchage sous PR au dessiccateur, on obtient 5.4 g (90%) de polyméthacrylate de vanilline (solide blanc), appelé Vanacryl. Analyse de ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$), pour C, H, O. IR (cm^{-1}) (KBr) $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$ 1760 et 1705; (on n'observe rien aux environs de 1635 cm^{-1}); RMN (CDCl_3) (ppm) δ 10 (s) (aire 1) ($-\text{CHO}$); δ 7.35 (massif) (aire 3) (protons aromatiques); δ 3.75 (massif) (aire 3) ($-\text{OCH}_3$); δ 2.35 (massif) (aire 2) ($-\text{CH}_2-$ de la chaîne macromoléculaire); δ 1.5 (massif) (aire 3) ($-\text{CH}_3$).

Copolymères de "méthacrylate de vanilline" et d'alcool allylique (Covanacryls). Dans un ballon de 100 cm^3 , on introduit 40 cm^3 de chloroforme pur, 5.5 g (0.025 mole) de méthacrylate de vanilline, 0.29 g (0.005 mole) d'alcool allylique et 60 mg (1%) d'AIBN (ou de peroxyde de benzoyle). On laisse 24 h au reflux du benzène. Le mélange est ensuite versé dans 200 cm^3 de méthanol pour précipiter le copolymère. Après filtration, mise en solution, reprécipitation puis séchage sous PR au dessiccateur, on obtient 3 g (52%) de copolymère (solide blanc), appelé Covanacryl-5. Calc: C, 65.28; H, 5.74; O, 28.99; Tr: C, 65.09; H, 5.59; O, 29.04%. IR (cm^{-1}) (KBr): $\nu_{(\text{OH})}$ 3500 (F); $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$ 1755 et 1695 (on n'observe pas de $\nu_{(\text{C}=\text{C})}$ aux environs de 1640 cm^{-1}). On obtient de la même façon les Covanacryls-1,2 et 3. Covanacryl-3 Calc: C, 65.17; H, 5.89; O, 28.94; Tr: C, 65.08; H, 5.77; O, 28.97%. Covanacryl-2 Calc: C, 65.05; H, 6.07; O, 28.88; Tr: C,

64-89; H, 5-89; O, 28-88%. Covanacryl-1 Calc: C, 64-73; H, 6-52; O, 28-75; Tr: C, 64-76; H, 6-71; O, 28-51%. RMN du Covanacryl-1 (CDCl_3) (ppm): δ 10 (s) (-CHO); δ 7-3 (massif) (aire 3) (protons aromatiques); δ 3-75 (massif) (aire 4) (-OCH₃ et -OH allylique déplacé par l'acide trifluoracétique); δ 2-25 (massif) (aire 5) (-CH₂-de la chaîne macromoléculaire); δ 1-7 (massif) (aire 3) (-CH₃).

Polyméthacrylate de gaïacol. Dans un réacteur d'un litre disposé dans un bain d'eau froide, et muni de deux ampoules à rétablissement de pression et d'un agitateur mécanique, on introduit 35 g de gaïacol dans 200 cm³ d'éther. Au mélange agité, on ajoute simultanément et goutte à goutte (2 h), une solution de 27 g de chlorure de méthacrylyle dans 100 cm³ d'éther et une solution de 27 g de triéthylamine dans 100 cm³ d'éther.²⁷ On laisse réagir une nuit à TA, on filtre pour éliminer le précipité blanc de chlorhydrate de triéthylamine et on lave le filtrat avec une solution saturée de NaHCO₃, puis avec de l'eau alternativement (deux fois). La phase étherée est séparée, séchée (Na₂SO₄ ou MgSO₄), évaporée au rotavapor et le liquide incolore obtenu est distillé sous PR (Eb_{0.4} = 104-6°). On obtient ainsi 40 g (74%) de méthacrylate de gaïacol qui a donné les spectres et analyses attendus. La littérature indique Eb_{0.4} = 109-10°.³

Dans un ballon de 100 cm³, on introduit 40 cm³ de CHCl₃ pur, 6 g de méthacrylate de gaïacol et 60 mg (1%) d'AIBN. On laisse 24 h au reflux du CHCl₃. Le mélange est versé dans 200 cm³ de MeOH pour précipiter le polymère. Après séchage, mise en solution, reprécipitation puis séchage sous PR au dessiccateur, on obtient 4 g (66%) de polyméthacrylate de gaïacol (solide blanc) qui a donné les spectres et analyses attendus.³

Polymérisation en suspension du méthacrylate de vanilline. Dans un réacteur d'un litre disposé dans un bain d'huile et muni d'une ampoule à rétablissement de pression, d'un agitateur mécanique, d'un réfrigérant et d'un courant d'azote, on introduit sous agitation 187 cm³ d'eau distillée, 3 ml d'ammoniaque (densité 0-90) et 0-54 g de phosphate disodique. On ajoute lentement (1/2 h) une solution de 2-25 g de CaCl₂ dans 105 cm³ d'eau distillée. L'addition terminée, et tout en maintenant l'agitation, on chauffe à 70° puis on ajoute en 15 mm une solution de 40 g de méthacrylate de vanilline et 0-2 g d'AIBN dans 50 cm³ de benzène. Après 2 h d'agitation à 70°, on verse la suspension dans 500 cm³ d'eau. On neutralise avec HCl dilué, filtre, agit dans 400 cm³ de CCl₄ et 200 cm³ de méthanol pendant 3 h, filtre à nouveau, lave 3 h dans 500 cm³ d'eau, filtre et lave sur le filtre avec de l'eau en plusieurs fois. On obtient 39 g (97-5%) de polymère sous forme de perles dures de plusieurs centaines de microns de diamètre. Ces billes sont conservées à sec ou en suspension dans l'eau.

On obtient de la même façon des perles dures des divers Covanacryls-p avec un rendement voisin de 100%.

Tacticité comparées du Vanacryl, des Covanacryls et du polyméthacrylate de gaïacol. La tacticité des polymères a été déterminée par étude en RMN des signaux correspondant aux -CH₃ en α des groupements carboxyliques et situés dans des enchaînements syndiotactiques S, isotactiques I ou hétérotactiques H. Les aires des différents pics n'ont pu être mesurées en raison d'un trop grand recouvrement mutuel, mais on peut néanmoins préciser—tous les échantillons étudiés présentent des spectres très semblables à celui indiqué ci-dessous—que les divers polymères ont des tacticités sensiblement identiques, avec prédominance syndiotactique, un fort pourcentage d'enchaînements hétérotactiques et très peu

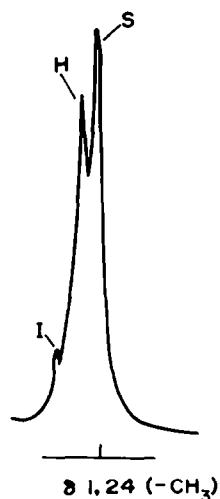


Fig 4. Vanacryl dans DMSO-d₆.

d'enchaînements isotactiques. Ces résultats sont en accord avec la littérature.^{9,9} Les différents pics correspondant aux -CH₂- en position β des groupements carboxyliques ou hydroxyles montrent également l'existence des trois types d'enchaînements, mais sont perturbés par la présence de DMSO-d₆ non complètement deutérié (Fig 4).

Courbes de distribution des masses. Ces courbes ont été obtenues en utilisant des solutions à 0-30% de polymère dans le THF; la colonne utilisée avait été étalonnée avec du polystyrène pour des molécules de masses comprises entre 1000 et 200,000.

On observe des courbes en cloche pratiquement symétriques pour tous les polymères étudiés, avec toutefois un léger épaulement (Fig 5).

Les mesures ont été faites sur des extraits séchés sous vide avant la mise en solution dans le CHCl₃.

Résultats obtenus:

Polymère	Mn	Degré de polymérisation moyen
Vanacryl	32,600	148
Covanacryl-1	24,550	176
Covanacryl-2	24,700	148
Covanacryl-3	31,700	176
Polyméthacrylate de gaïacol	36,100	188

Immobilisation de la trypsine

Fixation de la trypsine sur les Vanacryls. On utilise le mode opératoire général suivant: dans une fiole conique de 25 cm³, on agit pendant 24 h à 2° une suspension de 100 mg de polymère dans 5 cm³ de solution tampon phosphate 0-2 M à pH 7-5. Puis on ajoute 10 mg de trypsine en maintenant l'agitation pendant encore 24 h, on filtre la suspension sur verre fritté (n° 3 de Prolabo). On lave plusieurs fois avec une solution de NaCl, M (total 50 cm³) puis avec de l'eau distillée (total 45 cm³) et les filtrats sont rassemblés (total 100 cm³).

Après mesure de l'activité trypsique du dérivé insoluble obtenu, ce dernier est conservé en suspension dans 20 cm³

de tampon phosphate 0.01 M à pH 7.2 ou dans 20 cm³ de solution de KCl, M.

Mesure de l'activité de la trypsine originelle. Courbe d'étalonnage. La trypsine originelle (de Worthington) est dosée dans les mêmes conditions que la trypsine présente dans les filtrats après fixation. On prépare une solution de trypsine à partir de 10 mg d'enzyme et de 100 cm³ d'une

est donné par la relation $r = 100 m_1 [10 - m_2]$. m_1 et m_2 sont déterminés à partir de la courbe d'étalonnage, connaissant le volume V de soude 0.1 N ajoutée en 10 min à 25°. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous dans lequel V (dérivé) et V (solution) représentent respectivement les volumes de soude ajoutés en 10 min lors des mesures des activités du dérivé

Polymère	V (solution) (cm ³)	V (dérivé) (cm ³)	m ₁ (mg)	m ₂ (mg)	m ₃ (mg)	r = 100 $\frac{m_1}{m_3}$ (%)
Vanacryl	0.0811	0.0261	0.26	8.1	1.9	13.7
Covanacryl-5	0.0740	0.0272	0.27	7.4	2.6	10.4
Covanacryl-3	0.0782	0.0256	0.25	7.8	2.2	11.4
Covanacryl-2	0.0790	0.0261	0.26	7.9	2.1	12.4
Covanacryl-1	0.0781	0.0266	0.26	7.8	2.2	12.1

(Pour la courbe $m_3 = f \left[\frac{-OH}{-CHO} \right]$, voir partie théorique).

solution A obtenue en mélangeant 5 cm³ de tampon phosphate 0.2 M à pH 7.5, 50 cm³ de NaCl M et 45 cm³ d'eau distillée. Dans une fiole thermostatée à 25°, on mélange 0.5 cm³ (soit $\frac{1}{200}$) de la solution d'enzyme précédente et 0.5 cm³ de solution A. On amène le pH à 8 puis on ajoute 2 cm³ de solution 0.15 M de chlorhydrate de *N*-benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE) et on note le volume de soude 0.1 N qu'il faut ajouter en 10 min pour maintenir le pH constant et égal à 8 (on utilise pour cela un pH-stat Radiometer). On recommence en prenant des volumes différents de la solution d'enzyme et de solution A (de façon que le volume total soit toujours de 1 cm³), et on vérifie que le volume de soude ajouté est toujours proportionnel à la quantité d'enzyme mise en jeu (Fig 6).

Ainsi il faut 0.1 cm³ de soude pour 1 cm³ d'une solution de 10 mg de trypsine dans 100 cm³ de solution A.

Mesure de l'activité de la trypsine non fixée et des combinaisons trypsine/support. On opère comme pour les solutions étalons ci-dessus, avec soit $\frac{1}{200}$ de la solution d'enzyme non fixée, soit $\frac{1}{20}$ de la suspension de dérivé insoluble.

On appelle m_1 (mg) la masse de trypsine ayant la même activité que le dérivé insoluble, m_2 (mg) la masse de trypsine non fixée présente dans les filtrats et m_3 (mg) la masse de trypsine contenue dans le dérivé insoluble et obtenue par la différence $m_3 = (10 - m_2)$ mg. Dans ces conditions, le pourcentage d'activité résiduelle r du dérivé insoluble

insoluble et de la solution correspondante de trypsine résiduelle non fixée.

Dosage de la trypsine par la réactif de Folin. Dans un tube à hémolyse, on place 0.4 cm³ de solution-étalon (10 mg de trypsine dans 100 cm³ de solution A), puis 2 cm³ de réactif C de Folin.¹⁶ Après 10 min, on ajoute le plus rapidement possible 0.2 cm³ de réactif de Folin-Ciocalteu;²⁹ après 30 min on dose l'absorbance UV sur un spectrographe Beckmann à 540 nm. On trace une courbe-étalon en prenant diverses quantités de la solution-étalon d'enzyme (Fig 7).

Pour les solutions de trypsine non fixée, on opère comme ci-dessus en prenant 0.4 cm³ de solution et les masses d'enzyme en solution sont déterminées à partir de la courbe précédente:

Polymère	Absorbance	Masse d'enzyme non fixée (mg)
Vanacryl	0.30	8.1
Covanacryl-5	0.28	7.5
Covanacryl-3	0.2825	7.7
Covanacryl-2	0.2875	8
Covanacryl-1	0.2850	7.8

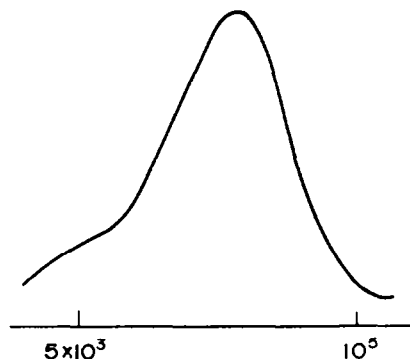


Fig 5. Détermination de la masse moléculaire moyenne en nombre (\overline{M}_n) des différents échantillons par osmométrie dans le CHCl₃ à 25°.

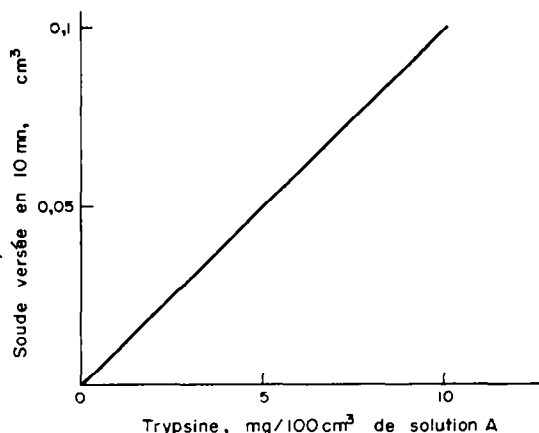


Fig 6.

Ces résultats sont pratiquement identiques à ceux obtenus par mesure de l'activité trypsique des filtrats (voir ci-dessus).

Mesure de l'activité des dérivés insolubles conservés à pH 7.2. Les dérivés insolubles obtenus sont mis en suspension dans 20 cm³ de tampon phosphate 0.01 M à pH 7.2 et 2°. Tous les mois, on agite les suspensions 1 h à 25° puis on en dose l'activité trypsique comme ci-dessus en utilisant 1 cm³ (soit $\frac{1}{20}$) de la suspension dans le pH-stat.

Dans le tableau ci-dessous, on donne pour chaque dérivé insoluble le pourcentage d'activité (en fonction du temps de stockage) par rapport à l'activité du même dérivé au temps initial.

Polymère	1 mois	2 mois	Activité (%)		
			3 mois	4 mois	5 mois
Vanacryl	75	58	46	38	33
Covanacryl-5	92	80	73	65	58
Covanacryl-3	81	70	62	56	48
Covanacryl-2	75	62	54	46	40
Covanacryl-1	75	65	51	42	35

(Pour la courbe activité = f (t), voir partie théorique).

Ces dérivés n'ont pas été filtrés; on ne peut pas savoir si la trypsine fixée est passée en solution, les mesures portant sur l'ensemble dérivé insoluble + solution.

Activité après incubation à 55°. (a) *Trypsine de Worthington*: On filtre une suspension de dérivé de Covanacryl-2 conservé 48 h à 2° dans 20 cm³ de solution de KCl, M. On récupère le filtrat et le dérivé est remis aussitôt en suspension dans 20 cm³ d'une solution identique à la précédente. On dose, comme précédemment, à 25° avec le pH-stat, l'activité d'une solution-étalon de trypsine (10 mg dans 100 cm³ de solution A), du filtrat précédent et de la nouvelle suspension. Puis on incube séparément ces trois mélanges à 55° pendant 1 h. Toutes les 15 min, on effectue des prélèvements à la pipette et on

en mesure l'activité trypsique par la méthode habituelle. Les résultats obtenus ont permis de tracer une courbe de l'activité en fonction du temps (voir en partie théorique).

(b) *Trypsine de Sochibo*: Dans une fiole conique de 25 cm³ on place 10 mg de trypsine et 100 mg de vanilline en solution dans 5 cm³ de tampon phosphate 0.2 M à pH 7.5. Après 24 h d'agitation à 2° on ajoute 50 cm³ de solution de NaCl, M et 45 cm³ d'eau. On prépare de la même façon une solution-étalon de 10 mg de trypsine dans 100 cm³ de solution A puis on dose l'activité trypsique de ces deux solutions comme ci-dessus pour l'incubation à 55°. La courbe de l'activité en fonction du temps a été donnée en partie théorique.

Mesures de Km et (Km) app. On prépare des solutions diluées de BAEE (substrat), tamponnées à pH 8, et on mesure l'activité trypsique de la solution-étalon de trypsine et d'un dérivé de Covanacryl-1 vis-à-vis de ces solutions de substrat, dans les conditions habituelles.

On trace ensuite les courbes $V = f(V/[S])$, pour lesquelles $V =$ volume (cm³) de soude ajouté et $[S] =$ concentration (moles/l) en substrat. Ces courbes ont été données en partie théorique. Leur pente donne la valeur de la constante de Michaelis Km, pour l'enzyme soluble et le (Km) app pour le dérivé insoluble.

On obtient les résultats suivants: (a) pour la solution-étalon: Km = 0.27 mM; (b) pour le dérivé insoluble: (Km)_{app} = 1.6 mM.

Remerciements—Nous remercions l'Institut Français du Caoutchouc pour les mesures de masses, la Société Rhône-Progil pour les courbes de GPC et la Société Thomson pour les spectres de RMN. Nous remercions A. Bonté pour sa collaboration dans la synthèse des vanacryls (voir partie expérimentale).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. S. Forgione, *Brevet allemand* No. 2, 104, 810, 19 août 1971; *Chem. Abstr.* 76, 11, 590 n (1972)
- 2 R. Epton, J. V. McLaren et T. H. Thomas, *Biochem. J.* 123, 21 p. (1971)
- 3 E. C. Chapin et R. F. Smith, *Brevet américain* No. 2, 817, 651, 24 déc. 1957; *Chem. Abstr.* 52, 5888a (1958)
- 4 P. K. Sengupta, A. R. Mukherjee et P. Ghosh, *J. Macromol. Chem.* 3, 481 (1966)
- 5 M. M. Koton, T. A. Sokolova, M. N. Savitskaya et T. M. Kiseleva, *Zhur. Obshchei Khim.* 28, 417 (1958)
- 6 E. J. Devellez et D. R. Johnson, *Comp. Biochem. Physiol.* 24, 661 (1968)
- 7 E. Brown, A. Racois et H. Gueniffey, *Bull. Soc. Chim.* 4341 (1971) et références citées
- 8 F. A. Bovey et G. V. D. Tiers, *J. Polymer Sci.* 44, 173 (1960)
- 9 K. Matsuzaki, T. Uryu et K. Ito, *Makromol. Chem.* 126, 292 (1969)

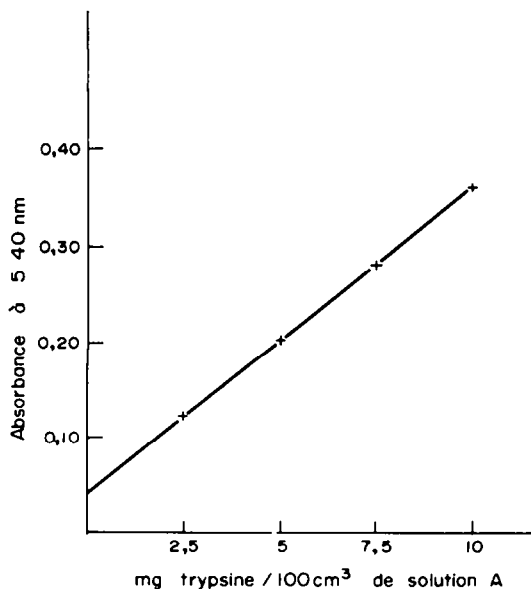


Fig. 7.

- ¹⁰E. Brown et A. Racois, *Bull. Soc. Chim.* **12**, 4351 (1971)
(et références citées)
- ¹¹E. B. Ong, Y. Tsang et G. E. Perlmann, *J. Biol. Chem.* **241**, 5661 (1966)
- ¹²N. Fornstedt, L. Sondberg, G. Eklund, R. Axen et J. O. Porath, *Brevet allemand* No. 2,102,514, 29 Juillet 1971; *Chem. Abstr.* **75**, 105, 551 g (1971)
- ¹³G. W. Jameson et D. T. Elmore, *Biochem. J.* **124**, 66 (1971)
- ¹⁴E. Brown et A. Racois, *Tetrahedron Letters* 1047 (1971)
- ¹⁵I. H. Silman et E. Katchalski, *Ann. Rev. Biochem.* **35**, part II, 873 (1966)
- ¹⁶H. R. Manler et E. H. Cordes, *Biological Chemistry*, p. 12, Harper et Row, London (1967)
- ¹⁷A. Bar-Eli et E. Katchalski, *J. Biol. Chem.* **238**, 1689 (1963)
- ¹⁸C. E. McDonald et A. K. Balls, *J. Biol. Chem.* **229**, 69 (1957)
- ¹⁹O. W. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
- ²⁰M. A. Mitz et L. J. Summaria, *Nature* **189**, 576 (1961)
- ²¹R. Axen et J. Porath, *Nature* **210**, 367 (1966)
- ²²J. Gryszkiewicz, *Folia Biologica* **19**, 119 (1971)
- ²³L. Goldstein, M. Pecht, S. Blumberg, D. Atlas et Y. Levin, *Biochemistry* **9**, 2322 (1970)
- ²⁴W. Brummer, N. Hennrich, M. Klockow, H. Lang et H. D. Orth, *Europ. J. Biochem.* **25**, 129 (1972)
- ²⁵I. A. Arbuzova, L. J. Medvedeva et S. A. Plotkina, *Zhur. Obshcheikhim.* **26**, 1127 (1956)
- ²⁶J. Heyboer et A. J. Staverman, *Rec. Trav. Chim.* **69**, 791 (1950)
- ²⁷E. L. Martin, *Brevet américain* No. 2,929,710, 22 mars 1960; *Chem. Abstr.* **54**, 12,850 (1960)
- ²⁸M. Ringsdorf et G. Greber, *Makromol. Chem.* **31**, 27 (1959)
- ²⁹O. Folin et V. Ciocalteu, *J. Biol. Chem.* **73**, 627 (1927)