

Inserit sous le n° *1141*
Date le *2007-05-11*
Cote

THESE DE DOCTEUR INGENIEUR

présentée

à l'Université Paris VII

UER DE Biochimie

par

Kebir BOUCHERIT

pour obtenir le grade de Docteur Ingénieur

Titre :

ENZYMES IMMOBILISES D' *ESCHERICHIA COLI*

- Dénaturation et renaturation de la

β -galactosidase immobilisée.

- Electrode à enzyme utilisant la chaîne

respiratoire immobilisée pour la

mesure du L-malate.

Eolibacille : enzyme immobilisée

Soutenue le 13 Décembre 1985 devant le jury composé de :

Mr. Pierre LABBE

Président

Mr. Claude BURSTEIN

Directeur de Thèse

Mr. Bernard ALPERT

Rapporteur

Mr. Barbu VLADESCU

Examineur

0463

À Ma Femme

À la Mémoire de mon Ami

Kheirat Saâdane Mourad

Ce travail a été effectué au laboratoire des Biomembranes de l'Université Paris VII sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Claude BURSTEIN.

Je veux exprimer toute ma gratitude à Monsieur Claude BURSTEIN, Professeur à l'Université Paris VII, je n'oublie pas ses encouragements et ses conseils qui m'ont beaucoup aidés depuis mes premiers pas dans le domaine de la recherche scientifique jusqu'à la réalisation de ce travail.

Je désire exprimer ma vive reconnaissance à Monsieur Pierre LABBE, Professeur à l'Université Paris VII, qui a bien voulu présider ce jury.

Je tiens à remercier Monsieur Bernard ALPERT, Professeur à l'Université Paris VII, qui a bien voulu prendre le temps de juger ce travail.

Je remercie très respectueusement Monsieur BARBU VLADESCU, Ingénieur Recherche au Centre de Recherche PERNOD-RICARD, d'avoir accepté de faire parti de ce jury.

Ma reconnaissance s'adresse également à mes amis de laboratoire : Elisabeth ADAMOWICZ, Françoise EGELS, Monique MARQUET, Fathi MAZOUZ et Catherine RABOUILLE pour le climat de bonne entente et de fructueuses discussions.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Martine ROBIN pour son amitié et son importante contribution à la présentation graphique de ce travail.

Je ne saurais remercier individuellement tout le groupe de Monsieur
KEPES qui par ses conseils et son amitié m'a permis de réaliser ce travail.
Je lui exprime toute ma sympathie.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
INTRODUCTION	3
A/ Présentation du contexte.	3
B/ Revue bibliographique.	4
MATERIEL ET METHODES	18
A/ Croissance des bactéries.	18
B/ Préparation des vésicules membranaires inversées.	19
C/ Immobilisation : préparation des polymères porteurs d'activité β -galactosidase.	19
D/ Renaturation de la β -galactosidase.	23
E/ Dosage de l'activité de la β -galactosidase.	24
F/ Mesure de la teneur en protéines.	24
G/ Préparation des films porteurs d'activité enzymatique L-malate.	26
H/ Dosage des activités enzymatiques de la chaîne respiratoire.	28
RESULTATS ET DISCUSSION	37
A/ Etude de la réactivation de la β -galactosidase en solution.	37
1. <i>Traitement à l'urée.</i>	37
2. <i>Inactivation thermique de la β-galactosidase.</i>	39

3. Réactivation, par traitement à l'urée de la <i>B-galactosidase inactivée par la chaleur.</i>	39
B/ Etude de la réactivation de la <i>B-galactosidase</i> immobilisée.	41
1. <i>Inclusion dans le carraghénane de potassium.</i>	43
2. <i>Immobilisation par liaisons covalentes.</i>	44
3. <i>Concentration en glutaraldéhyde.</i>	46
4. <i>Cinétique d'inactivation à l'urée.</i>	47
C/ Etude de la réactivation de la <i>B-galactosidase</i> immobilisée et inactivée par la température.	49
1. <i>Cinétique de réactivation de la B-galactosidase</i> <i>immobilisée.</i>	51
CONCLUSION	51
D/ Etude préliminaire.	53
1. <i>Etude de la croissance bactérienne sur différentes</i> <i>sources de carbone.</i>	53
E/ Optimisation de la méthode d'immobilisation.	57
1. <i>Concentration de la gélatine.</i>	58
2. <i>Concentration en protéines bactériennes.</i>	60
3. <i>Concentration en agent pontant.</i>	60
4. <i>Rendement de l'immobilisation.</i>	64
F/ Réponse et caractéristiques de l'électrode enzymatique à L-malate.	66
1. <i>Réponse de l'électrode à enzyme.</i>	66
2. <i>Constantes cinétiques.</i>	68
3. <i>Influence de l'environnement sur la respiration du</i> <i>L-malate.</i>	72

<i>4. Inhibition de la respiration du L-malate.</i>	74
<i>5. Sensibilité de l'électrode et domaine de dosage du L-malate.</i>	77
<i>6. Stabilité.</i>	77
<i>7. Avantages de l'électrode à L-malate.</i>	80
<i>8. Place de la respiration du L-malate par rapport aux autres substrats de la chaîne respiratoire.</i>	80
DISCUSSION GENERALE	82
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	86

RESUME

La première partie de notre travail porte sur la réactivation, par traitement à l'urée, de la β -galactosidase de l'extrait brut d'*Escherichia coli* inactivée par la température avant et après immobilisation.

L'inactivation par la température entraîne une perte d'activité de la β -galactosidase soluble et après passage dans l'urée 8M et dialyse de 18 heures avec du tampon, l'activité est régénérée à 75% par rapport à l'extrait brut initial.

La β -galactosidase immobilisée en présence de gélatine par le glutaraldéhyde (0,25%) et inactivée par la température peut être réactivée dans une colonne après traitement à l'urée et lavage du polymère avec du tampon.

La cinétique de réactivation de la β -galactosidase immobilisée est complète au bout de 100 minutes environ.

Le rendement de l'immobilisation est constant à 0,25 - 0,50 et 0,75% de glutaraldéhyde par contre le pourcentage de réactivation diminue quand la concentration de l'agent pontant augmente.

La deuxième partie consiste à mettre au point une électrode enzymatique pour le dosage du L-malate.

La flavoprotéine spécifique de l'oxydation du L-malate, élément de la chaîne respiratoire d'*Escherichia coli* est induite par la culture des bactéries en milieu minimum en présence de D-L-malate 1% comme seule source de carbone.

Les bactéries entières D-L-malate sont immobilisées sur film par inclusion dans de la gélatine et coréticulation avec du glutaraldéhyde.

Les conditions optimales d'immobilisation sont établies, elles concernent la quantité de matériel biologique et les concentrations de gélatine et de glutaraldéhyde.

Après immobilisation, la chaîne respiratoire est active et est capable d'oxyder le L-malate en absence de cofacteurs (NAD^+ , $\text{NADP}\dots$).

Le film enzymatique est mis en contact étroit avec la partie sensible d'une électrode à oxygène (type électrode de Clark).

L'addition du L-malate provoque une diminution de la concentration d'oxygène dans le film et donne un signal qui est enregistré.

Après avoir analysé le signal émis par l'électrode à L-malate, les constantes cinétiques (V_M , K_{50}) ont été déterminées, une courbe de pH a été effectuée, le pH optimum est situé entre 6 et 7, à pH 4 l'activité du film enzymatique n'est réduite que de 50% et permet l'utilisation de l'électrode à L-malate directement dans les milieux biologiques (exemple le vin).

L'oxaloacétate (produit de la réaction) et le D-malate inhibent de façon réversible la respiration du L-malate.

Le malate peut être dosé dans la gamme de concentration de 0,1mM à 30mM.

INTRODUCTION

A/ Présentation du contexte.

La biotechnologie est une discipline qui utilise les fonctions biologiques comme outil technologique et elle peut être divisée en deux grands domaines. D'une part, l'obtention des fonctions biologiques et d'autre part, la mise en œuvre de ces fonctions.

L'immobilisation des enzymes a pris ces dernières années un important essor à la fois dans les domaines théoriques et appliqués.

Dans le domaine théorique, l'immobilisation d'un enzyme sur un support de structure déterminée permet de mesurer l'influence du microenvironnement sur l'activité enzymatique et d'élaborer des hypothèses sur son fonctionnement *in vivo*.

Sur le plan pratique, l'immobilisation des enzymes offre la possibilité d'une mise en œuvre continue, ou de l'utilisation répétée, de catalyseurs extrêmement spécifiques et efficaces.

Si les enzymes immobilisés sont déjà utilisés largement, en particulier dans les industries alimentaires, leur emploi est cependant limité et ceci pour plusieurs raisons; en particulier :

- Inactivation des enzymes immobilisés au cours du fonctionnement des réacteurs enzymatiques.
- Contaminations microbiennes des enzymes immobilisés.
- Mise au point de méthodes analytiques fines permettant la détermination rapide et précise des concentrations en substrats dans les milieux biologiques.

A l'heure actuelle, deux axes de recherche sont particulièrement prometteurs en biotechnologie : celui des réacteurs enzymatiques et celui des électrodes à enzyme.

Le travail présenté ici porte essentiellement sur la réactivation de la β -galactosidase de l'extrait brut d'*Escherichia coli* avant et après immobilisation et la mise au point d'une électrode enzymatique utilisant la chaîne respiratoire d'*Escherichia coli* immobilisée pour le dosage du L-malate.

B/ Revue bibliographique.

1. Renaturation des enzymes.

Le chauffage des enzymes provoque leur inactivation par modification de leur structure. L'activité peut être restaurée par traitement à l'urée suivi d'une dialyse en tampon approprié.

L'inactivation des enzymes en solution et leur réactivation ont fait l'objet de nombreuses publications.

La β -galactosidase d'*Escherichia coli*, purifiée, en solution, et inactivée par la température est régénérée à 99% après passage dans l'urée 8M et dialyse longue (ULLMANN, A. *et al.*, 1969).

Des études cinétiques de la réactivation de déshydrogénases en solution par traitement à la guanidine 6M suivi d'une dilution en tampon donne une réactivation de l'ordre de 40% (JHON, W. *et al.*, 1971). Des expériences conduites par WHITE, F., ANFINSEN, C.B. (1960) sur la renaturation de la ribonucléase ont montré l'importance de la séquence des aminoacides dans la détermination de la conformation native.

Si les résultats ayant trait à la réactivation des enzymes en solution ont été souvent satisfaisants, il n'en est pas de même avec les enzymes immobilisés.

Les travaux de KLIBANOV *et al.* (1975) ont montré que la chymotrypsine immobilisée par liaison covalente et chauffée en présence d'urée pouvait être protégée contre la dénaturation thermique.

Il semble que la réactivation par dilution de la chymotrypsine inactivée par la température en présence d'urée, est effectuée avant que le dosage commence. L'urée n'est vraisemblablement pas un protecteur de l'inactivation thermique, mais un agent indispensable pour la renaturation.

Des études sur la réactivation de la trypsine purifiée et immobilisée sur sépharose ont été effectuées. ALEXANDER, M. *et al* (1978) ont montré que la réactivation totale de la trypsine immobilisée et inactivée par la température est obtenue après plusieurs heures de lavage.

L'étude de la réactivation des enzymes immobilisés apparait comme une nécessité afin de permettre une utilisation de ces enzymes pendant des temps relativement longs.

Le choix de la β -galactosidase d'*Escherichia coli* résulte de considérations pratiques et d'applications industrielles potentielles. En effet le lactose est un sucre qui pose des problèmes de digestibilité chez les personnes déficientes en lactase intestinale. Il faut remarquer, que le pourcentage d'individus dépourvus de lactase est très variable suivant les ethnies (10% chez les européens, 90% chez certaines tribus africaines et 98% chez les orientaux) (DAHLQVIST, 1971).

2. Méthodes d'immobilisation de la β -galactosidase.

De nombreuses revues bibliographiques ont été consacrées aux techniques d'immobilisation des enzymes (CHANG, 1976; MOSBACH, 1976 a et b; MESSING, 1975; WINGARD, 1976; PYE, 1973; ZABORSKY, 1973). Nous allons nous intéresser dans ce chapitre aux méthodes d'immobilisation de la β -galactosidase. Bien que le mode de classement varie selon les auteurs, on peut retenir quatre grands groupes de techniques :

- l'inclusion.
- l'adsorption.
- la fixation par coréticulation avec une protéine inactive.

- l'adsorption suivie d'une réticulation.

- Immobilisation par inclusion.

La β -galactosidase est ajoutée à la solution de monomère. Lors de la polymérisation, l'enzyme se trouve réparti statistiquement dans le réseau tridimensionnel du gel. Ce gel peut être obtenu par polymérisation d'un monomère et d'un agent pontant, ou d'un monomère seul.

Dans le premier type de gel, l'agent pontant est le N,N'-méthylène bisacrylamide et le monomère l'acrylamide (BUNTING & LAIDLER, 1973; DAHLQVIST *et al.*, 1973).

Dans le second type de gel, les monomères utilisés sont la N vinylpyrrolidone, l'acrylamide, le diméthyl acrylamide, l'acrylate de sodium (MAEDA & SUZUKI, 1977).

Cette méthode peut être mise en œuvre rapidement, mais les fuites enzymatiques et la diversité des espaces du polymère en limitent l'application pratique.

- Immobilisation par adsorption.

L'adsorption de la β -galactosidase a été effectuée sur différents types de supports:

- le diéthylaminoéthyl cellulose (SHARP *et al.*, 1969).
- l'alumine, l'acier inoxydable recouvert d'oxyde de titane (CHARLES *et al.*, 1975).

Cette méthode d'immobilisation réalisée en conditions très douces, n'altère pas l'activité enzymatique mais présente, en raison de sa totale réversibilité, l'inconvénient majeur de relacher l'enzyme aux moindres variations de pH, de température et surtout de force ionique.

- Immobilisation par adsorption suivie d'une réticulation.

Les méthodes d'adsorption ont le désavantage de libérer l'enzyme au cours du temps. La réversibilité de l'adsorption est supprimée par le pontage des protéines enzymatiques au sein du support, au moyen d'un agent bifonctionnel, le glutaraldéhyde. Les supports utilisés sont une résine phénolique (OLSON & STANLEY, 1973; HYRKÄS *et al*, 1976), le nickel oxydé (CHARLES *et al*, 1976).

L'emploi du glutaraldéhyde, bien que supprimant la libération de la β -galactosidase, diminue l'activité de la protéine enzymatique.

- Immobilisation par coréticulation entre une protéine inactive et les molécules enzymatiques.

On crée un réseau tridimensionnel purement protéique en coréticulant une protéine inactive (albumine ou gélatine) avec la β -galactosidase grâce à un agent bifonctionnel le glutaraldéhyde. L'environnement protéique et le faible taux d'agent pontant ont un effet stabilisateur et permettent à la β -galactosidase de mieux résister aux agents dénaturants (BROUN *et al*, 1973).

3. Les électrodes à enzymes.

3.1. Introduction

L'étude des processus biologiques nécessite de connaître de manière quantitative les concentrations en métabolites. Une détermination possible de ces métabolites consiste à transformer les valeurs des concentrations en signaux électriques, cette conversion est effectuée au moyen de capteurs : les électrodes à enzymes.

La transformation directe des concentrations de métabolites biologiques en signaux électriques par l'intermédiaire d'enzymes immobilisés ouvre de vastes possibilités de dosage pour grand nombre de

métabolites.

Ces électrodes possèdent les caractéristiques enzymatiques que sont la spécificité et la sensibilité. De plus, il est très facile de les adapter à des mesures en continu.

L'utilisation des enzymes comme élément actif d'un système électrochimique a été exposée pour la première fois par CLARK et LYONS (1962). Ces auteurs avaient eu l'idée d'associer l'oxydation enzymatique du glucose par la glucose-oxydase en solution et la détection ampérométrique de l'oxygène consommé.

La première électrode incorporant une membrane enzymatique était décrite par UPDIKE et HICK (1967). Ils réalisaient une électrode enzymatique à glucose en associant la glucose-oxydase incluse dans un gel de polyacrylamide et une électrode à oxygène.

Actuellement de nombreux laboratoires travaillent à la réalisation d'électrodes à enzymes, notamment le groupe de G.G. GUILBAULT aux Etats-Unis (1982). Nous allons d'abord passer en revue les différents types de capteurs et de détections utilisables pour la mise au point de telles électrodes.

3.2. Détections potentiométrique et ampérométrique.

Ces deux types de détection sont utilisés pour la réalisation d'électrodes à enzymes. En potentiométrie, le capteur utilisé permet de suivre une variation de potentiel que l'on peut relier à la variation de concentration de l'espèce détectée, l'intensité du courant étant maintenue constante ou nulle. Dans le cas de l'ampérométrie, on travaille à potentiel constant et on suit la variation de l'intensité du courant qui est dépendante de la concentration de l'espèce réactive.

3.3. Les types d'électrodes utilisés.

Il existe plusieurs types d'électrodes spécifiques utilisables comme capteurs pour réaliser une électrode à enzyme : principalement les électrodes à conduction ionique et les électrodes à membranes perméables aux gaz, auxquelles on peut ajouter certaines électrodes métalliques.

a) Electrodes à conduction ionique.

Le terme de membrane est également employé dans ce cas pour caractériser la surface de séparation de l'électrode et du milieu à doser. On peut grouper ces électrodes sélectives en plusieurs catégories selon les caractéristiques de la membrane sensible.

- les électrodes à membranes de verre sensibles aux ions H^+ et à d'autres cations, Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ... selon la composition du verre.
- les électrodes à membrane cristalline qui permettent la détection des ions comme : Cl^- , Br^- , F^- , CN^- , SCN^- , Ag^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} etc...

b) Electrodes à membrane perméable aux gaz.

Ces électrodes comprennent une membrane perméable à un gaz déterminé qui est détectée par un procédé potentiométrique ou ampérométrique.

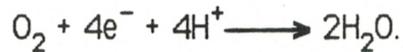
- Détection potentiométrique de NH_3 , CO_2 , SO_2 .

Une membrane solide sélective permet la diffusion du gaz vers un compartiment contenant la base ou l'acide conjugué où se fait sa détection grâce à ses propriétés acide base par une électrode de verre. La différence de potentiel enregistrée est proportionnelle au logarithme de la concentration de l'espèce étudiée. La détection de HCN, H_2S , NO et NO_2 est également possible avec cette technique.

- Détection ampérométrique de O_2 (électrode de CLARK).

La membrane sélective est en téflon et la détection se fait par

ampérométrie réductrice à potentiel imposé selon l'équation :



Le courant cathodique obtenu dépend de la concentration en oxygène du milieu où est immergée l'électrode.

c) Electrodes métalliques.

Ces électrodes qui utilisent le platine, l'or, l'argent, le nickel, etc... servent en général d'électrodes indicatrices.

L'électrode à enzymes résulte donc de l'association d'un enzyme ou d'un système multienzymatique sous forme immobilisé et d'un capteur électrochimique détectant spécifiquement une espèce. L'intérêt suscité par les enzymes immobilisés a crû parallèlement au développement de méthodes variées d'immobilisation qui ont été mises au point et décrites précédemment.

Deux principaux types d'immobilisation ont été utilisés pour la confection d'électrodes à enzymes : les techniques d'inclusion et les techniques impliquant une liaison covalente directe entre l'enzyme et le support.

Depuis ces dernières années, de nombreux travaux ont été entrepris dans le domaine des électrodes à enzymes (GOUGH, D.A. & ANDRADE, J.D. 1973; GUILBAULT, G.G. & COULET, P.R. 1983; AIZAWA, M. 1983; ADACHI, S., TANABE, S. & HASHIMOTO, H.A. 1984), et on peut les classer en quatre catégories :

- les électrodes à oxydoréductases.
- les électrodes à oxydases.
- les électrodes à déaminases.
- les électrodes à décarboxylases.

Les électrodes à oxydoréductases et les électrodes à oxydases sont

les plus utilisées. Elles utilisent comme capteur les électrodes ampérométriques à potentiel imposé à pO_2 , H_2O_2 ou des électrodes potentiométriques à iodures, sulfures.

Les électrodes à déaminases utilisent comme capteurs des électrodes potentiométriques sensibles aux cations NH_4^+ .

Les électrodes à décarboxylases utilisent comme capteurs des électrodes potentiométriques de pCO_2 . Ces électrodes sont surtout utilisées pour le dosage des acides aminés.

Le tableau 1 illustre ces différents types d'électrodes.

3.4. Différents types d'électrodes à enzymes.

Tableau 1 :

Enzyme et substrat	Méthode utilisée et produit analysé	Références
<u>Glucose oxydase</u> Glucose dans le sang	méthode polarographique pO_2	HAYNES R. et SIEGELMAN F.L. 1971.
Glucose dans le sang	méthode polarographique pO_2	ROMETTE J.L. <i>et al.</i> 1979.
Glucose	méthode polarographique H_2O_2	GUILBAULT G.G. et LUBRANO G.L.J. 1972.
<u>Glucose oxydase et galactosidase</u>	méthode polarographique pO_2	CORDONNIER M. <i>et al.</i> 1975.
<u>Lactate oxydase</u> L-lactate	méthode ampérométrique	MASCINI <i>et al.</i> 1983.
<u>Lactate déshydrogénase</u> L-lactate	méthode spectrophotométrique $NAD^+ / NADPH$	ADACHI <i>et al.</i> 1984.
L-lysine	méthode potentiométrique	TRAN <i>et al.</i> 1983 ROMETTE <i>et al.</i> 1983.

<u>Peroxydase</u>	électrode potentiométrique sensible aux I ⁻	BOITIEUX J.L. <i>et al.</i> 1978.
<u>Malate déshydrogénase</u>	méthode ampérométrique NAD ⁺ /NADH	BLAEDEL W.J. et ENGSTROM R.C. 1980.
<u>Uréase</u> urée dans le sang et l'urine	électrode potentiométrique sensible aux cations NH ₄ ⁺	GUILBAULT G.G. et HRABANKOVA E. 1970
Urée	électrode sensible à NH ₃	JOHANSON et OGREN L. 1976
Urée	électrode potentiométrique sensible aux cations NH ₄ ⁺	MASCINI et PALLESCHI 1983; KUBO et OSAWA 1983
<u>Glutamate déshydrogénase</u> Glutamate	électrode potentiométrique sensible aux cations NH ₄ ⁺	DAVIES et MOSBACH 1974
<u>AMP déaminase</u> AMP	électrode sensible à NH ₃	PAPASTATHOPOULOS D.S. et RECHNITZ G.A. 1976
<u>Tyrosine décarboxylase</u> tyrosine	électrode potentiométrique à CO ₂	HAYAS et GUILBAULT 1982
tyrosine	électrode potentiométrique à CO ₂	BERJONNEAU A.M. <i>et al.</i> 1974
<u>Phénylalanine décarboxylase</u> phénylalanine	électrode potentiométrique à CO ₂	KARUB <i>et al.</i> 1980; MATSUNAGA <i>et al.</i> 1981
<u>Lysine décarboxylase</u> lysine	électrode potentiométrique à CO ₂	BERJONNEAU A.M. <i>et al.</i> 1974

Ce tableau n'est pas exhaustif, des références beaucoup plus complètes et détaillées se trouvent dans la bibliographie en particulier SCHUBERT *et al.* (1982); ENFORS, S.O., CLELLAND, N. (1983) et WATANABE, E. *et al.* (1984).

Actuellement, de nouvelles perspectives sont ouvertes par l'utilisation de nouveaux types d'association telles que les électrodes bactériennes. En effet, les bactéries entières et les vésicules membranaires sont immobilisées et utilisées pour le revêtement des électrodes (HIKUMA, M. *et al.*, 1980; KARUBE, I. *et al.*, 1981; BURSTEIN, C. *et al.*, 1985).

4. Chaîne respiratoire d'*Escherichia coli*.

La chaîne respiratoire de la bactérie *Escherichia coli* fait partie de la membrane plasmique et se compose de différents éléments (figure 1) analogues à ceux de la membrane mitochondriale (HINKLE, P.C. & CARTY, M.C. E, 1978) (BRAGG, P.D., 1978) (INGLEDEW, W.J. & POOLE, R.K., 1984).

Au cours de la respiration, les électrons et les protons provenant du L-malate, du NADH ou d'autres substrats sont cédés à une flavoprotéine appelée "déshydrogénase". Cette flavoprotéine possède un groupement prosthétique le FAD (flavine adénine dinucléotide) (exemple la flavoprotéine à L-malate) ou le FMN (flavine adénine mononucléotide) (cas de la respiration du L-lactate).

La flavoprotéine fait sortir les deux protons à l'extérieur de la cellule tandis que les électrons sont renvoyés à la surface interne via une protéine fer-soufre (FeS). Ensuite les électrons et deux autres protons, venant du milieu intérieur réduisent une seule molécule d'ubiquinone en hydroquinone (QH₂). La forme réduite d'ubiquinone diffuse à travers la membrane plasmique et libère deux protons à l'extérieur de la cellule.

Les électrons s'écoulent le long des cytochromes b et o jusqu'à ce qu'ils réduisent l'oxygène moléculaire, accepteur final des électrons. En définitif le transfert d'une paire d'électrons s'accompagne de l'expulsion de quatre protons.

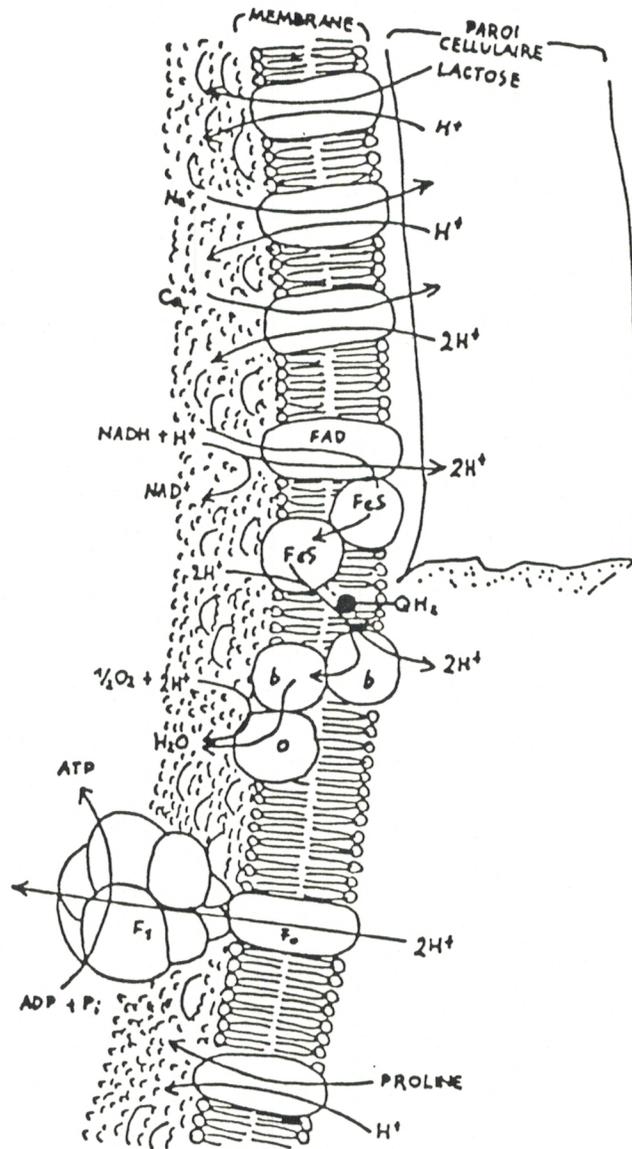


Figure 1: Schéma de la membrane bactérienne d'E. coli.

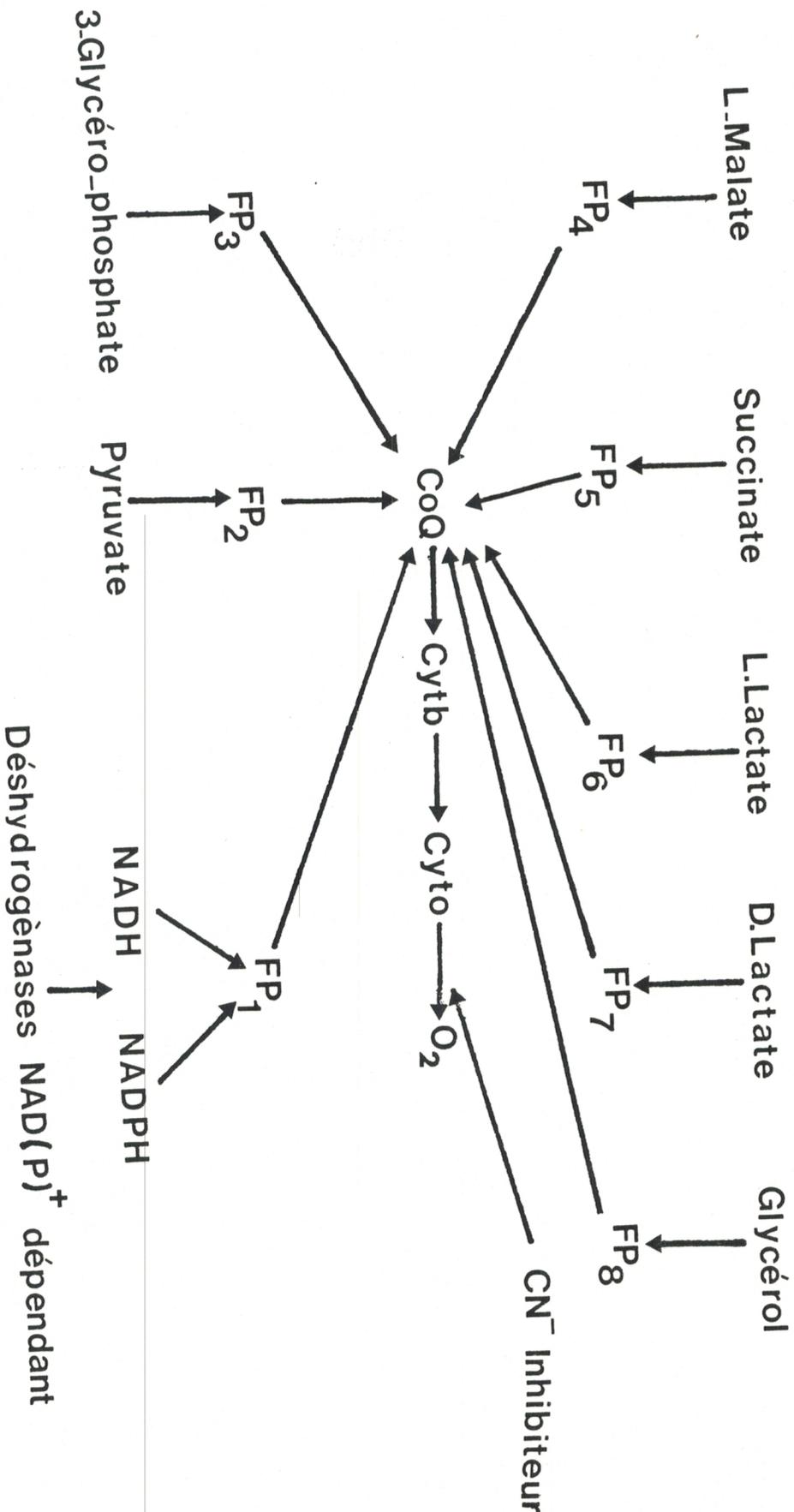


Figure 2: Schéma de la chaîne respiratoire d'E. coli.

(Laboratoire des Biomembranes Paris VII).

C. BURSTEIN et al. 1985.

glucides, se trouve impliqué dans de nombreux processus physiologiques, de plus la mesure du L-malate a des applications potentielles multiples.

Sur le plan agro-alimentaire, le dosage du L-malate intéresse particulièrement l'industrie de la fermentation, en effet la transformation du L-malate peut améliorer la qualité des vins rouges et des vins blancs. En ce qui concerne le domaine médical, le L-malate est utilisé pour le traitement de certaines maladies hépatiques et particulièrement contre la production abondante d'ammoniaque (KOZO YAMAMOTO, *et al*, 1976).

Dans notre travail, nous nous sommes proposés d'étudier dans un premier temps :

- Les conditions de réactivation de la β -galactosidase soluble de l'extrait brut d'*Escherichia coli*, préalablement chauffé puis traité à l'urée et dialysé.
- Les conditions expérimentales de la réactivation maximale de la β -galactosidase immobilisée et dénaturée par la chaleur, cette réactivation a été effectuée dans une "colonne" par lavages successifs, de l'enzyme immobilisé par l'urée 8M puis par le tampon. Ces conditions sont compatibles avec l'utilisation des enzymes en technologie enzymatique.
- Des paramètres de la réactivation de la β -galactosidase immobilisée ont été étudiés (concentration en glutaraldéhyde, cinétique de la réactivation, cinétique d'inactivation à l'urée).

Dans un deuxième temps notre travail a consisté à immobiliser la chaîne respiratoire d'*Escherichia coli* dans des conditions telles que l'activité enzymatique puisse être conservée au sein d'un support sous forme de film facilement manipulable, l'étude concerne particulièrement la flavoprotéine responsable de l'oxydation du L-malate et l'électrode enzymatique à L-malate utilisée à des fins analytiques.

MATERIEL ET METHODES

A/ Croissance des bactéries.

La souche bactérienne utilisée est *Escherichia coli* 3300 constitutive pour l'opéron lactose. La culture est effectuée à 37°C en aérobiose dans un milieu minimum liquide appelé milieu 63 B1 de composition suivante (dans l'eau distillée) :

- H_2KPO_4 6 g/l
- HK_2PO_4 18 g/l
- $(NH_4)_2SO_4$ 4 g/l
- $MgSO_4$ 0,2 g/l
- $FeSO_4$ 1 mg/l

On ajuste le pH de cette solution à 7 avec de la potasse avant l'addition de la thiamine (1mg/l). La source de carbone est constituée par du glycérol (10g/l) ou D-L-malate de sodium (10g/l) ou du glucose (10g/l).

Les bactéries sont récoltées en phase exponentielle par une centrifugation de 10 minutes à 30.000 g puis elles sont épuisées par aération pendant 50 minutes dans le milieu minimum dépourvu de source de carbone. Cette opération est effectuée afin d'éliminer la respiration due aux substrats endogènes qui est très gênante quand on mesure l'oxydation d'un substrat sur des bactéries en suspension.

Les bactéries sont lavées deux fois avec du tampon phosphate de potassium 50mM pH 7, puis elles sont remises en suspension dans le même tampon et stockées au congélateur à -80°C, à la concentration d'environ 50 mg de protéines totales par millilitre. Dans ces conditions les bactéries gardent leurs activités enzymatiques pendant au moins un an.

B/ Préparation des vésicules membranaires inversées.

Les vésicules membranaires inversées sont obtenues à partir de bactéries "cassées" aux ultra-sons ou à la presse de French.

a) Cassage aux ultra-sons (fraction de 1 ml).

Un sonicateur MSE équipé d'une sonde de 7 millimètres de diamètre émet des ultra-sons dans une suspension bactérienne maintenue dans la glace fondante à 0°C, trois fois pendant 15 secondes. La sonde est plongée dans la suspension à 0,5 cm environ de la surface. La paroi bactérienne se casse ainsi que la membrane cytoplasmique et les fragments de cette dernière se referment spontanément avec une polarité inversée (FUTAI, M., 1974).

b) Cassage à la presse de French (fraction de 50 à 200 ml).

Les bactéries sont cassées par extrusion à 20.000 psi (environ 1600 bars) dans un fractionnateur Ribi à 10°C. Les bactéries ainsi comprimées et décomprimées brusquement éclatent et la membrane interne se referme en vésicules inversées. On obtient ainsi un extrait brut contenant des vésicules membranaires. Le schéma d'obtention des vésicules membranaires inversées est représenté sur la figure 3.

C/ Immobilisation : Préparation des polymères porteurs d'activité B-galactosidase.

***1. Immobilisation par liaison covalente* (THOMAS, D. *et al.*, 1974).**

L'extrait brut d'*Escherichia coli* est immobilisé par réticulation en présence de gélatine ou de sérum albumine et de glutaraldéhyde. Ce mode de fixation permet une répartition homogène des sites enzymatiques au sein du polymère.

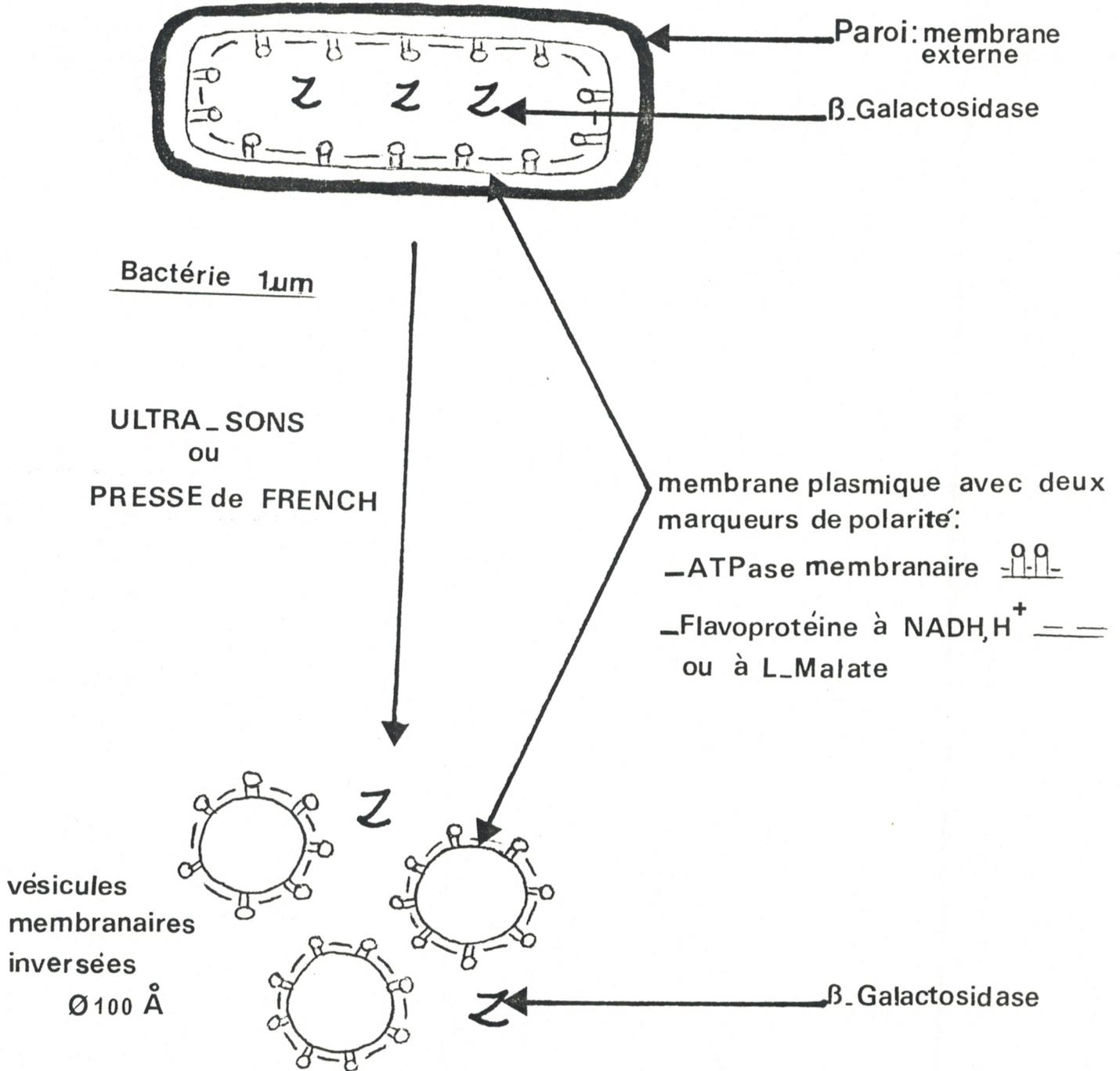


Figure 3: Schéma d'obtention des vésicules membranaires inversées.

Nous exposons ici la composition du mélange de réticulation que nous avons le plus souvent réalisé :

- Sérum albumine

Solutions mères	Concentrations finales
Suspension bactérienne à 0,5 g/ml de poids humide dans un tampon phosphate de potassium 0,05M pH 6,8	100 mg/ml
Tampon phosphate 0,1M pH 6,8	0,05M
Glutaraldéhyde 2,5%	0,4%
Sérum albumine 30%	4,5%

Le mélange est congelé à -20°C pendant une nuit et décongelé à la température du laboratoire. Le polymère obtenu a un aspect spongieux.

- Gélatine

Solutions mères	Concentrations finales
Gélatine 10%	4%
Suspension bactérienne à 0,5 g/ml de poids humide dans du tampon phosphate de potassium 0,05M pH 6,8	200 mg/ml
Tampon phosphate 0,1M pH 6,8	0,05M
Glutaraldéhyde 2,5%	0,25%

Le mélange est congelé à -20°C pendant 30 minutes et décongelé à la température du laboratoire.

Les polymères obtenus sont essuyés entre deux papiers filtres et repris dans 10 ml de tampon, triéthanolamine $2 \cdot 10^{-2}M$, EDTA $10^{-3}M$ et β -mercaptoéthanol $10^{-1}M$ (TEM) pH 7, puis broyés (à l'ultra turrax, puissance 6) pendant 30 secondes et filtrés sur toile à blutter (le diamètre des pores est de 50 μm).

2. Immobilisation par inclusion (TAKATA *et al.*, 1979).

Le carraghénane est un polysaccharide polysulfoné qui forme un

40°C environ 5 minutes. la composition du mélange est la suivante :

Solutions initiales	Concentrations finales mg/ml
Extrait brut à 0,35 g/ml de poids humide	60
Carraghénane 0,94 g pour 21,2 ml eau	36

Le mélange prend en masse à 4°C pendant 30 minutes. Puis le bloc obtenu est immergé dans du KCl 0,3M et laissé une nuit à 4°C. Le bloc est découpé en petits cubes de 5 mm de côté environ puis conservés dans du KCl 0,3M pendant au maximum 1 mois.

D/ Renaturation de la β -galactosidase.

- En solution

Une préparation de 2 ml de l'extrait brut d'*Escherichia coli*, inactivée par la température est dialysée contre l'urée 8M en présence de β -mercaptoéthanol 0,1M pendant deux heures à 20°C, ensuite contre le tampon phosphate de sodium 0,05M pH 6,8 pendant 18 heures à 4°C. Le tampon de dialyse contient du β -mercaptoéthanol 0.1M et de l'EDTA 10^{-3} M.

La réactivation de la β -galactosidase est suivie par la mesure de son activité.

- Immobilisée

Nous avons mis au point une méthode de réactivation de la β -galactosidase immobilisée.

Après broyage et lavage, le polymère inactivé par la température est placé dans une colonne (figure 4), munie d'un filtre en verre fritté, en présence d'urée 8M pendant 90 minutes, ensuite l'urée est éliminée par écoulement et le polymère est lavé trois fois pendant une minute avec le tampon TEM pH 7. (triéthanolamine $2 \cdot 10^{-2}M$, EDTA $10^{-3}M$ et le β -mercaptoéthanol $10^{-1}M$).

Des échantillons sont prélevés au cours du temps pour doser la réactivation de la β -galactosidase.

E/ Dosage de l'activité de la β -galactosidase (ULLMANN, A. *et al.*, 1968).

L'activité dans l'extrait brut d'*Escherichia coli* est mesurée par l'hydrolyse de l'ortho-nitrophényl- β -D-galactoside (ONPG) qui est hydrolysé en ortho-nitrophénol (ONP) et galactose.

L'ortho-nitrophénol formé au cours de la réaction catalysée par la β -galactosidase est dosé par spectrophotométrie à 420 nm.

L'activité de la β -galactosidase est dosée dans le tampon PM₂.

- tampon phosphate de sodium 0,1M pH 7
- β -mercaptoéthanol 0,1M
- Mg⁺⁺ $10^{-3}M$
- Mn⁺⁺ $10^{-3}M$
- Mg⁺⁺ Titriplex $10^{-3}M$

F/ Mesure de la teneur en protéines des suspensions bactériennes et des vésicules inversées.

La concentration des suspensions bactériennes est évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm. Il a été déterminé dans notre

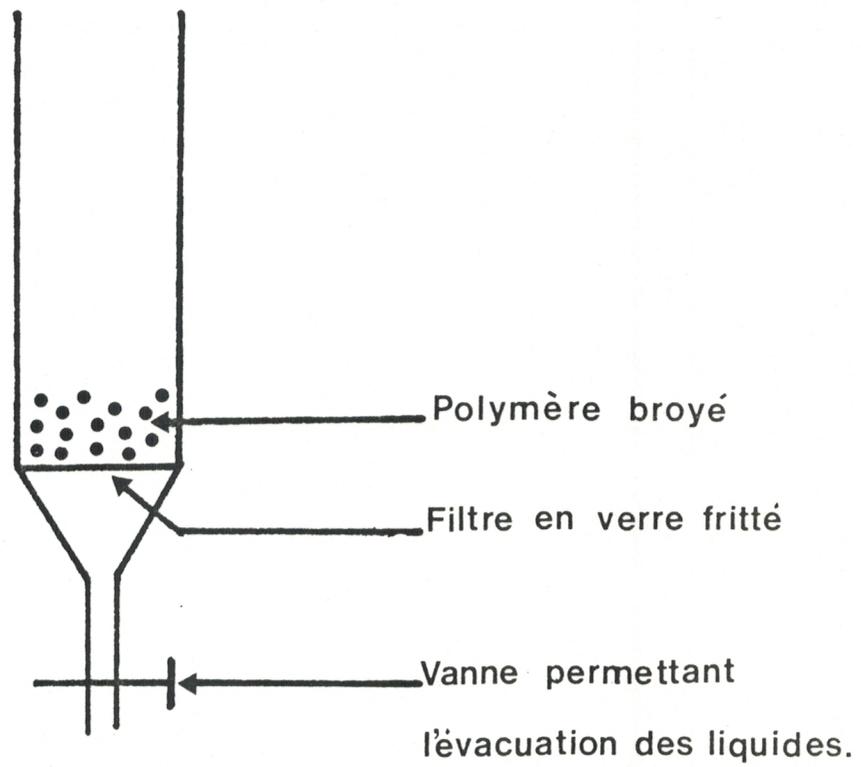


Figure 4: Schéma de la colonne utilisée pour les expériences de renaturation de la β -galactosidase immobilisée.

laboratoire qu'une D.O à 600 nm égale à 1 correspond à :

- 0,275 mg/ml de poids sec bactérien
- 1,1 mg/ml de poids humide bactérien (4 fois le poids sec)
- 0,138 mg/ml de protéines totales bactériennes (50% du poids sec)

Cette dernière valeur a été établie grâce au dosage spécifique des protéines selon la méthode de Lowry en utilisant la sérum albumine bovine comme protéine de référence (LOWRY, O.H. *et al*, 1951).

Pour les suspensions de vésicules membranaires on estime que leur concentration est égale à celle de la suspension bactérienne dont elles sont issues puisqu'on ne centrifuge pas pour séparer les vésicules des débris des parois.

Il apparait que ces concentrations sont moins précises que si on effectuait à chaque fois un dosage de protéines mais elles sont suffisantes pour notre travail.

En général, on utilise des suspensions bactériennes à la concentration de 50 mg de protéines totales par millilitre.

G/ Préparation des films porteurs d'activité enzymatique L-malate.

L'immobilisation est réalisée par l'inclusion des bactéries dans de la gélatine suivie d'une réticulation ("tannage") avec du glutaraldéhyde.

La suspension bactérienne ou la suspension de vésicules membranaires est mélangée avec une solution aqueuse de gélatine 10% de peau de porc 250 Bloom* ou d'osseiné chaulée 250 Bloom (Compagnie chimique - Rousselot-France).

* Bloom : chiffre qui indique la dureté de la gélatine; la force en gelée.

On mélange à 45°C 0,5 ml du matériel biologique (50 mg/ml) et 0,5 ml de la solution de gélatine et on étale ce mélange homogénéisé sur une

plaque de verre préalablement recouverte d'un film hydrophobe de polypropylène de 6 µm d'épaisseur (BOLLORE INC. Paris, France) en respectant les données suivantes : 1 ml de mélange sur 40 cm² de surface.
Cette plaque est ensuite refroidie à 4°C pendant cinq minutes afin de permettre la gélification de la gélatine.

Le film ainsi préparé est séché à 4°C pendant environ 20 heures; une fois sec, il est recouvert d'une solution aqueuse de glutaraldéhyde 2% (Sigma), préparée extemporanément à 0°C. Le "tannage" est effectué pendant trois minutes.

Après l'opération de réticulation, le film enzymatique est rincé plusieurs fois avec une solution de lysine 50mM pH 7 pour arrêter l'action du glutaraldéhyde, puis stocké à 4°C à l'abri de l'air dans un mélange : lysine 50mM, tampon phosphate de potassium 50mM pH 7 et l'azide de sodium 0,5mM (ce qui évite les contaminations bactériennes).

Nous présentons ici la préparation du film biologique que nous avons le plus souvent réalisé.

- Matériel biologique : bactéries entières cultivées sur D-L-malate à 1%.
- Concentration en protéines bactériennes : 25 mg par millilitre de polymère.
- Support : gélatine à 5% concentration finale dans le polymère.
- Temps de séchage : 20 heures à +4°C.
- Temps de tannage : trois minutes à 2% de glutaraldéhyde.

H/ Dosage des activités enzymatiques de la chaîne respiratoire.

1. Mesure de la consommation d'oxygène par la méthode ampérométrique à potentiel imposé.

La quantité d'oxygène ou sa concentration dans une solution peut s'exprimer par un volume d'oxygène dissous dans des conditions de température et de pression définies. Dans une solution, étant en équilibre avec un mélange gazeux contenant de l'oxygène, la concentration d'oxygène dissous sera fonction de sa pression partielle (pO_2 , exprimée en mmHg). Lorsque l'oxygène se trouve en solution, sa pO_2 est directement proportionnelle à la concentration de O_2 . $pO_2 = K[O_2]$ loi de Henry.

Cette méthode est utilisée pour doser les activités respiratoires des suspensions bactériennes ou de vésicules membranaires inversées en présence soit de L-malate soit de NADH, H^+ .

On place une quantité connue de matériel biologique dans la cellule de mesure d'un oxygraphe (Gilson) contenant du tampon phosphate de potassium 100mM pH 7 saturé d'air à 30°C et sous agitation continue. L'addition de substrats de la chaîne respiratoire entraîne une consommation d'oxygène que l'on peut suivre grâce à une électrode à oxygène de type électrode de CLARK (figure 5).

Le système électrochimique de base est constitué par une électrode (Platine dans la plupart des cas) immergée dans une solution électrolytique contenant de l'oxygène dissous. Cette électrode est polarisée négativement par rapport à une électrode de référence (Ag/AgCl). Les réactions chimiques qui se produisent au niveau des électrodes seraient les suivantes :

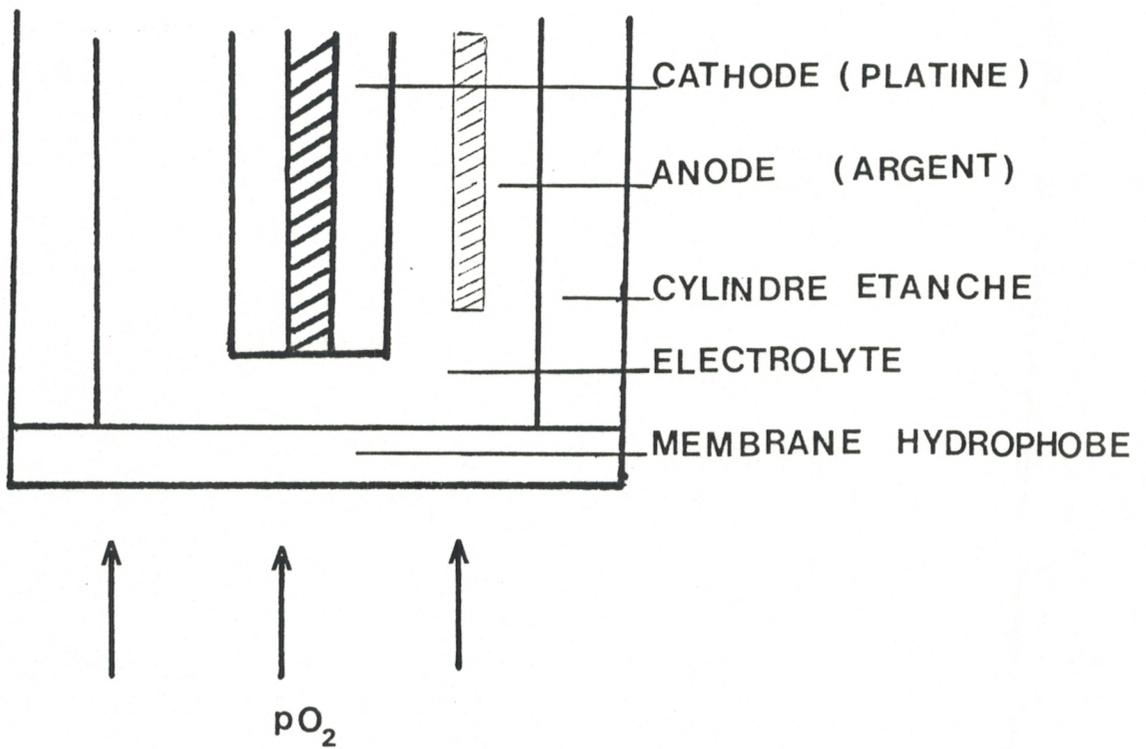
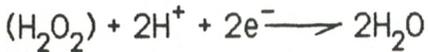


Figure 5: Schéma de l'électrode de Clark.



H_2O_2 considérée comme intermédiaire au cours de ces réactions.



Quand une tension de polarisation E est appliquée aux bornes d'une électrode Platine-Argent, l'électrode d'Argent réagit avec les anions Cl^- pour former AgCl , et ce processus libère les électrons. Ces électrons libérés réduisent l'oxygène au niveau de l'électrode de Platine.

Le signal électrique produit est le résultat de deux réactions :

- la réaction de diffusion de l'oxygène dans le milieu pour atteindre la cathode.
- la réaction électrochimique elle-même.

Lorsque le potentiel de polarisation est plus négatif (la cathode est rendue plus négative), l'électrolyse devient plus rapide et le courant électrique de réduction augmente (LESSIER, M.A. & BRIERLEY, G.P., 1969).

Pour des valeurs faibles négatives du potentiel, l'intensité du courant produit est faible et dépend essentiellement de la réaction de réduction de l'oxygène (non pas de la diffusion).

Lorsque le potentiel imposé augmente dans des valeurs négatives la vitesse de la réaction de réduction d'oxygène augmente aussi et quand la réaction de diffusion devient limitante la courbe intensité du courant = f(potentiel) se présente sous forme d'un plateau. La valeur de l'intensité du courant produit au niveau du plateau dépend alors essentiellement de la concentration de l'oxygène dissous (figure 6a).

Si l'on continue encore à augmenter le potentiel vers les valeurs négatives une réaction de réduction de l'eau s'ajoute à la réaction de réduction d'oxygène et rend les résultats inexploitable.

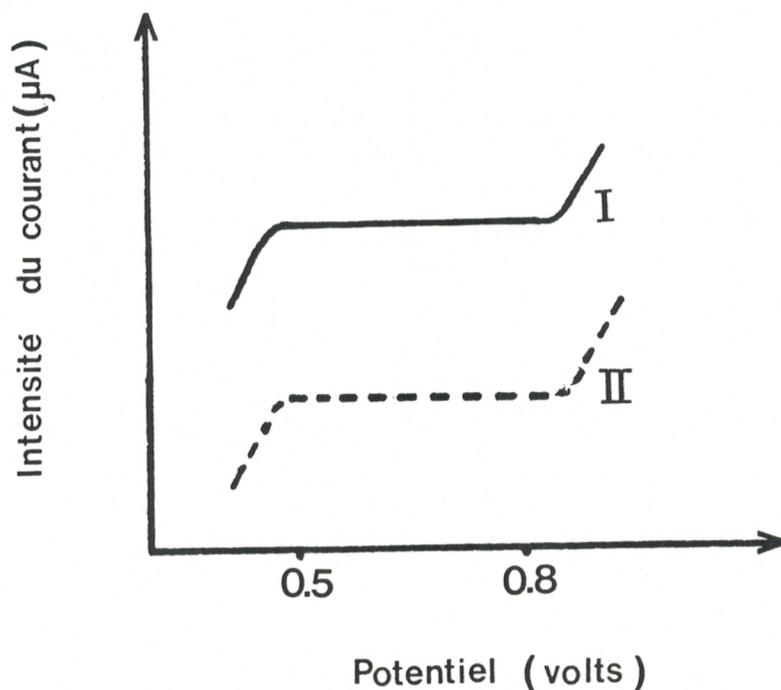


Figure 6a : Intensité du courant en fonction du potentiel.

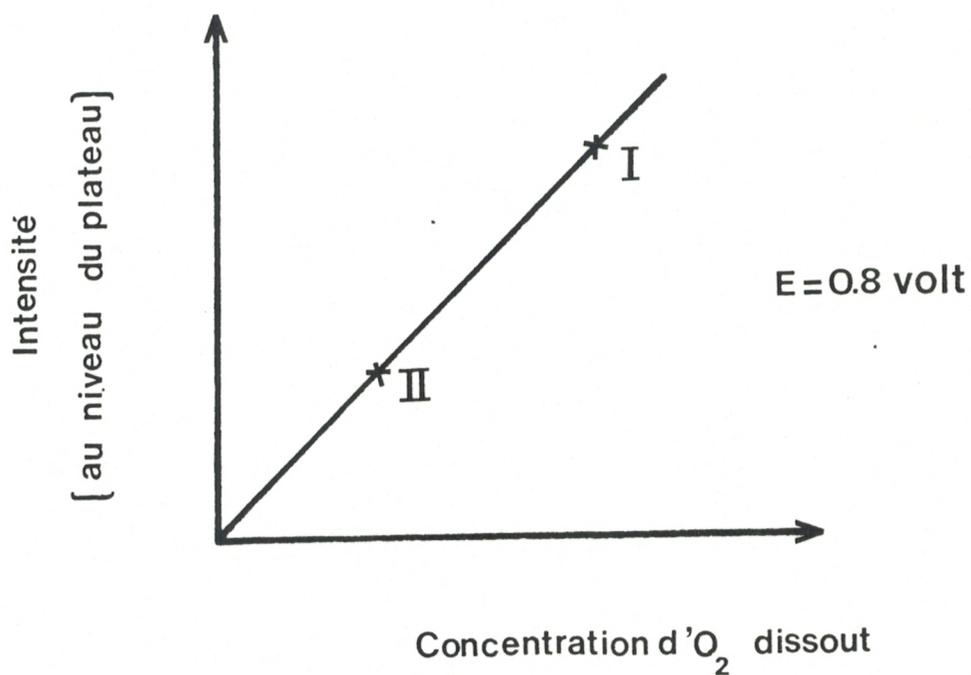


Figure 6b : Intensité du courant au niveau du "plateau" en fonction de la concentration d'oxygène dissou.

Lorsque la diffusion et la répartition de l'oxygène dans le milieu réactionnel sont bien déterminées et bien contrôlées on peut conclure qu'au niveau du plateau le courant de réduction devient indépendant du potentiel imposé. Il dépend essentiellement de la pO_2 et donc de la concentration d' O_2 dissous dans le milieu. La hauteur de chaque plateau permet donc d'établir une relation linéaire entre l'intensité du courant produit et la concentration d'oxygène dissous (figure 6b) et donc d'étalonner le système.

La valeur du courant à l'état stationnaire est régie par l'équation :

$$i = \frac{nFAD \alpha}{x} pO_2$$

n : nombre d'électrons produits dans le système. F constante de Faraday.

A : surface de la cathode. D : coefficient de diffusion de l' O_2 dans le milieu.

α : coefficient de solubilité de l'oxygène dans le milieu. pO_2 pression partielle d' O_2 dissous dans le milieu. x : épaisseur de la couche de diffusion.

Cette équation montre que l'intensité du courant dépend de la pO_2 mais varie aussi avec les constantes de solubilité et de diffusion de l' O_2 .

L'utilisation de la membrane perméable aux gaz évite toutes réactions secondaires au niveau de l'électrode et permet à l' O_2 d'être la seule espèce réductible. La membrane sélectivement perméable à l'oxygène est une membrane hydrophobe et de coefficient de perméabilité très faible vis-à-vis de l'oxygène.

La réalisation de ce système de deux électrodes séparées du milieu extérieur par une membrane sélective permet donc d'obtenir un plateau de la courbe intensité-potentiel qui dépend presque, uniquement de la pO_2 à la surface externe de la membrane sélective aux gaz. La diffusion de l'oxygène est "contrôlée" essentiellement par la membrane sélective et pour une part

infime par l'électrolyte. Un modèle de diffusion est présenté sur la figure 7.

Il est nécessaire de préciser que dans un tel système de mesure il existe un certain nombre d'autres paramètres qui interviennent dans la valeur finale de l'intensité du courant produit (ROMETTE, J.L., 1980).

- épaisseur de la couche d'électrolyte (plus elle est mince, moins la diffusion est limitée).
- utilisation de membranes hydrophobes rendant les valeurs des coefficients de solubilité et de diffusion plus petites que dans l'eau.
- diamètre de la cathode; le courant mesuré est directement proportionnel à la surface de la cathode (plus la cathode est petite, plus vite l'état stationnaire est atteint).
- agitation du milieu réactionnel (nécessaire dans le cas d'une macrocathode - Ø 200µ).
- température (influence sur la solubilité de l'oxygène).

Caractéristiques techniques de l'électrode utilisée :

- membrane de polypropylène : épaisseur 20µm
- diamètre de la cathode : 2mm
- surface de la cathode : 3,14mm²
- électrolyte : KCl, pH 7,0 0,5M
- température de dosage : 30°C.

Cette électrode couplée à un enregistreur, permet donc de déterminer la vitesse de consommation de l'oxygène, elle-même proportionnelle à la vitesse d'oxydation du L-malate ou d'autres substrats de la chaîne respiratoire.

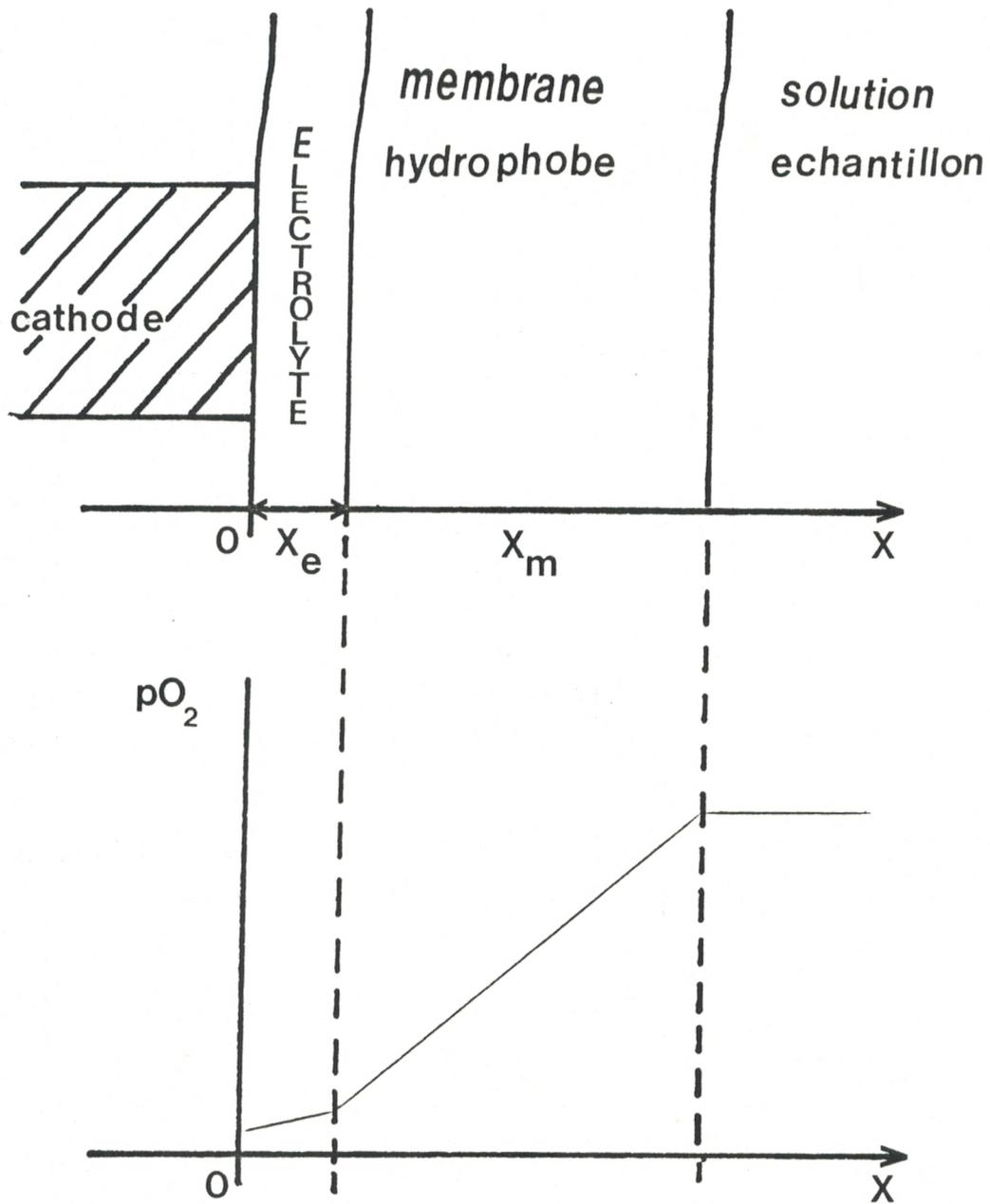


Figure 7: *Modèle de diffusion dans le plan.*

On étalonne l'appareil en réglant à 18 cm sur le papier enregistreur, la dénivellation entre le 100% de saturation d'oxygène (tampon saturé d'air) et le 0% (tampon dépourvu d'oxygène par addition de dithionite de sodium).

Sachant qu'un millilitre d'eau saturé d'oxygène, à 30°C et sous pression atmosphérique, contient 260 nmoles d'oxygène, on peut calculer la quantité d'oxygène dissous dans la cellule de l'oxygraphe, et connaissant la vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur on peut alors déterminer la consommation d'oxygène en nmoles d'oxygène consommé par minute et par mg de protéines totales bactériennes.

2/ Mesure de la consommation d'oxygène à l'aide d'une électrode enzymatique.

Le dispositif de mesure utilisé dans cette méthode est identique à celui décrit précédemment mais dans ce cas, l'électrode de Clark avec son revêtement de polypropylène, est recouverte d'un film porteur de l'activité enzymatique (Romette, J.L. *et al*, 1977). Ainsi le matériel biologique immobilisé se trouve en contact étroit avec la cathode de l'électrode de Clark mais aussi avec la solution à doser (figure 8).

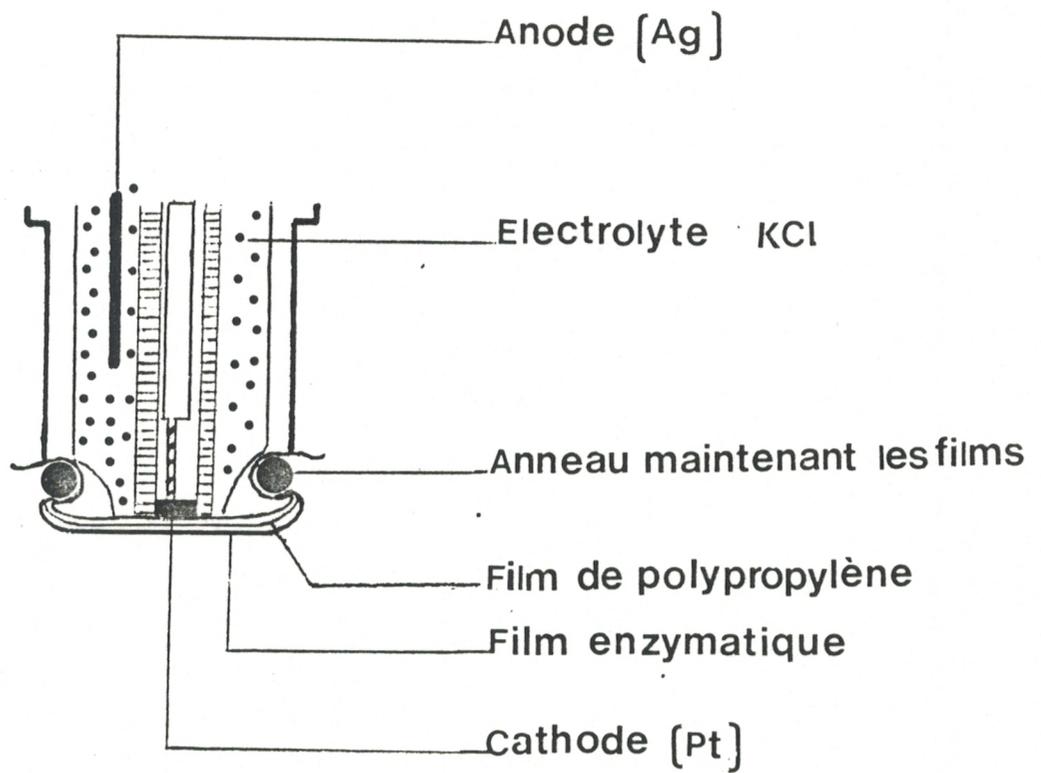


Figure 8 : Electrode Pt/Ag recouverte du film enzymatique.

RESULTATS ET DISCUSSION

A/ Etude de la réactivation de la β -galactosidase en solution.

Il est connu que la β -galactosidase purifiée et en solution perd son activité après traitement par la chaleur.

On peut se demander s'il est possible de régénérer l'activité de la β -galactosidase dans l'extrait brut d'*Escherichia coli* en solution et immobilisée en vue de l'utilisation de cet enzyme en technologie enzymatique.

Nous nous sommes intéressés à la possibilité d'une réactivation de la β -galactosidase, après traitement à l'urée et à la chaleur, avant et après immobilisation.

L'activité mesurée dans l'extrait brut d'*Escherichia coli* 3300 est celle de l'hydrolyse de l'ONPG selon la méthode décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes.

1. Traitement à l'urée.

Dans le but de trouver les conditions expérimentales de réactivation de la β -galactosidase, l'extrait brut d'*Escherichia coli* est traité à l'urée ensuite dialysé contre le tampon.

Les résultats expérimentaux sont rassemblés dans le tableau 2. Nous constatons que le traitement de la β -galactosidase à l'urée 8M en présence d'un agent réducteur le β -mercaptoéthanol, s'accompagne d'une perte de l'activité enzymatique de la β -galactosidase, mais quand l'urée est éliminée lentement de la solution par dialyse, l'activité de la β -galactosidase réapparaît lentement.

La réactivation de la β -galactosidase atteint presque 100% de l'activité de l'extrait brut témoin. Cette régénération est obtenue après 18 heures de dialyse.

Dans le but de diminuer le temps de réactivation, nous avons effectué une expérience qui consiste à diluer l'extrait brut d'*Escherichia coli*, dialysé contre l'urée pendant deux heures, dans le même tampon et nous n'avons pas observé de réactivation de la β -galactosidase au bout de 24 heures.

Tableau 2 : Réactivation de la β -galactosidase en solution après traitement à l'urée.

	activité (%)
Extrait brut	100
Dialyse avec l'urée	2
Dialyse avec le tampon	97

Une préparation d'extrait brut d'Escherichia coli 3300 est dialysée contre l'urée 8M en présence de β -mercaptoéthanol 0,1M pendant deux heures à 20°C, suivie d'une deuxième dialyse pendant 18 heures à 4°C contre le tampon : phosphate de sodium 0,05M pH 6,8, EDTA 10^{-2} M et β -mercaptoéthanol 10^{-1} M.

L'activité de la β -galactosidase est mesurée par hydrolyse de l'ONPG à 420 nm.

Le traitement de l'extrait brut d'*Escherichia coli* à l'urée nous a permis de récupérer l'activité de la β -galactosidase en solution après dialyse, nous allons maintenant étudier la possibilité de réactivation de la β -galactosidase dénaturée par la chaleur et traitée à l'urée.

Pour cela des expériences d'inactivation thermique de la β -galactosidase ont été effectuées.

2 - Inactivation thermique de la β -galactosidase.

L'étude de l'inactivation thermique de la β -galactosidase va nous permettre de déterminer la durée et l'intensité du traitement thermique qui donnent une inactivation totale de l'enzyme.

Nous avons effectué la cinétique de la dénaturation thermique de la β -galactosidase à différentes températures. Figure 9.

Nous constatons que la représentation semi-logarithmique de la vitesse d'hydrolyse de l'ONPG en fonction du temps d'incubation aux diverses températures donne des droites. Ceci montre que la cinétique d'inactivation thermique est d'ordre 1.

Nous avons choisi pour l'expérience suivante la température de 65°C et un temps de chauffage de trois minutes parce qu'on obtient en un temps court et mesurable plus de 99% d'inactivation de l'enzyme.

3. Réactivation, par traitement à l'urée de la β -galactosidase inactivée par la chaleur.

Après avoir étudié l'inactivation thermique de la β -galactosidase, nous allons tenter de restaurer l'activité enzymatique de cet enzyme inactivé par la chaleur et traité à l'urée 8M.

Pour cela, une préparation d'extrait brut d'*E. coli* est placée dans un bain thermostaté à 65°C pendant trois minutes, il se forme un léger

VITESSE D'HYDROLYSE DE L'ONPG
 ($\mu\text{moles min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)

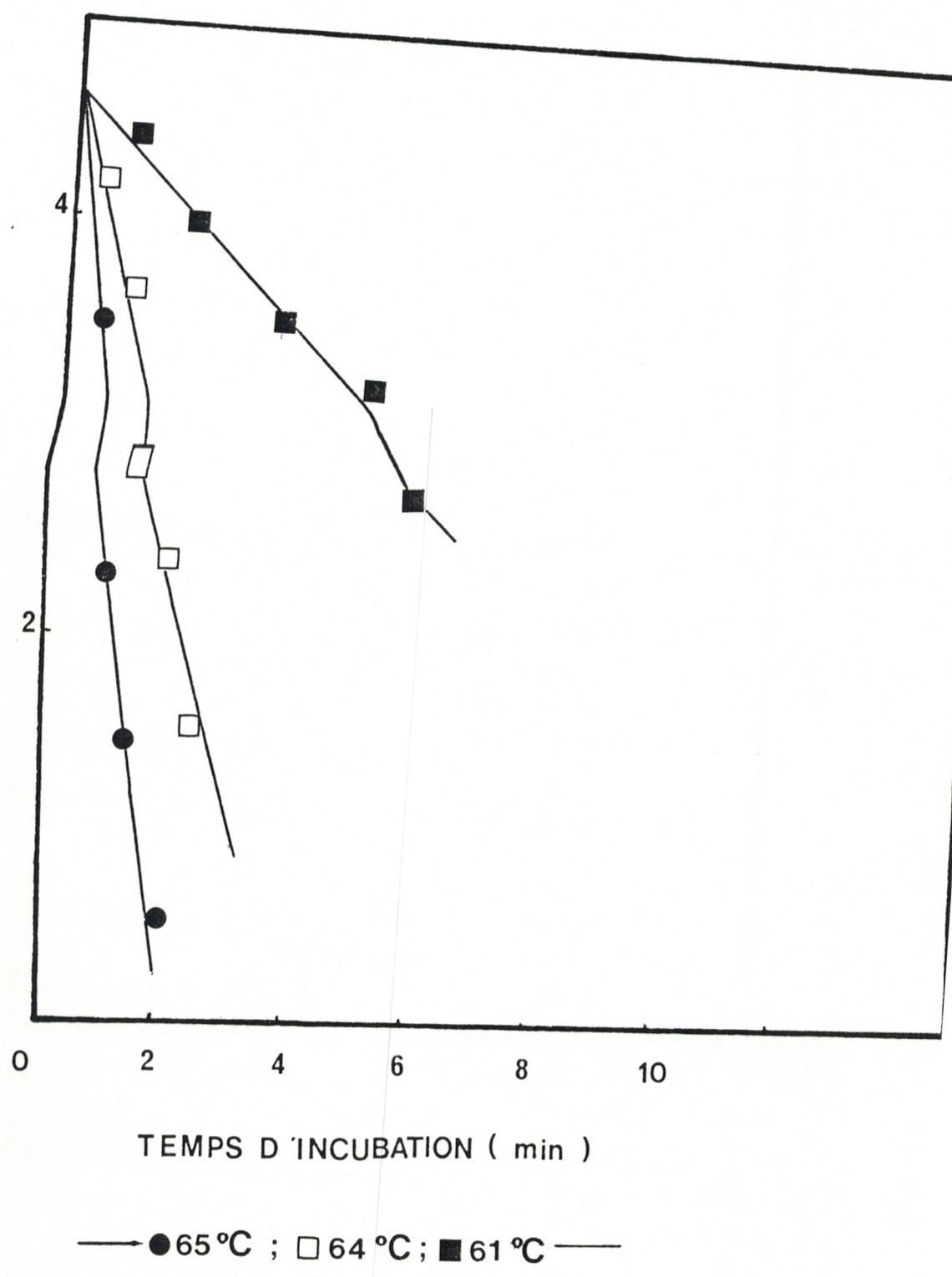


Figure 9: Inactivation thermique de la β -galactosidase.

L'extrait brut d'E. coli en présence de tampon phosphate 0,1M pH 6,8 est placé dans un bain thermostaté à des températures ($\geq 61^\circ\text{C}$). Divers échantillons sont prélevés au long de l'incubation et introduits dans

Tableau 3 : Réactivation de la β -galactosidase chauffée et traitée à l'urée 8M.

Traitement subi	Activité (%)
Néant	100
Température	7
Urée 8M	7
Dialyse avec le tampon	75
Néant	100
Température	7
Dialyse avec le tampon	7
Néant	100
Urée	2
Dialyse avec le tampon	95

Une préparation d'extrait brut d'Escherichia coli est chauffée à 65°C pendant trois minutes, ensuite dialysée contre l'urée 8M pendant deux heures à 20°C puis contre le tampon (phosphate de potassium 0,05M pH 6,8, β -mercaptoéthanol 0,1M et EDTA 10^{-2} M) pendant 18 heures à 4°C.

L'activité de la β -galactosidase est dosée selon la technique décrite dans Matériel et Méthodes.

permettrait la réutilisation des enzymes immobilisés après inactivation.

L'inactivation et la réactivation de la β -galactosidase immobilisée par traitement à l'urée seront effectuées dans la "colonne" décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes.

1. Inclusion dans le carraghénane de potassium.

Nous nous sommes proposés d'étudier la réactivation de la β -galactosidase dans l'extrait brut d'*Escherichia coli* immobilisé dans le carraghénane de potassium.

Le polymère, découpé en petits cubes de 0,2 cm environ de côté, est déposé dans la colonne en présence d'urée 8M pendant une heure. Après élimination de l'urée par écoulement, le polymère est lavé trois fois en une minute avec du tampon et la réactivation de la β -galactosidase est suivie par la mesure de l'hydrolyse de l'ONPG à 420 nm. Les résultats de cette expérience sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Réactivation de la β -galactosidase immobilisée par inclusion après traitement à l'urée.

	Activité (%)
Extrait brut	100
Extrait brut immobilisé	6
Urée 8M	1
Lavage avec du tampon	5,8

Le lavage est effectué avec du tampon TEMK pH 7. Triéthanolamine $2.10^{-2}M$, EDTA $10^{-3}M$, β -mercaptoéthanol $10^{-1}M$ et du KCl $0,3M$.

Nous remarquons dans le tableau 4 que le traitement à l'urée entraîne une perte d'activité de la β -galactosidase immobilisée, après lavage du polymère avec du tampon cette activité est récupérée à 100%.

Nous constatons également que l'activité de la β -galactosidase immobilisée par inclusion ne présente que 6% de celle de l'enzyme natif, il s'agit d'un problème de fuite de l'enzyme du polymère, en effet le dosage de l'activité de la β -galactosidase dans la solution de KCl baignant le polymère permet de retrouver plus de 80% de l'activité de la β -galactosidase de l'extrait initial.

Au cours de la réaction de fixation, il y a fuite spontanée de la β -galactosidase du polymère de carraghénane.

2. Immobilisation par liaisons covalentes.

Nous avons démontré que la β -galactosidase immobilisée dans le carraghénane de potassium fuit le polymère, pour résoudre ce problème et dans le but d'améliorer le rendement de la réactivation, nous avons utilisé une autre technique d'immobilisation qui consiste à la réticulation des molécules d'enzymes par le glutaraldéhyde en présence de sérum albumine bovine d'une part et de la gélatine d'autre part.

Les polymères obtenus sont découpés puis broyés (à l'ultra turrax) pendant 30 secondes dans le tampon. Après filtration (sur toile à blutter 50 μ m) les polymères sont séchés et mis dans la colonne en contact avec l'urée 8M pendant une heure 30 minutes ensuite lavés avec le même tampon trois fois en une minute.

Les résultats (tableau 5) montrent que la réactivation de la β -galactosidase, immobilisée en sérum albumine par le glutaraldéhyde, n'atteint que 24% du rendement de l'immobilisation.

En revanche la réactivation de la β -galactosidase immobilisée en

présence de gélatine par le glutaraldéhyde (0,25%) est beaucoup plus importante que celle obtenue avec le polymère de sérum albumine, elle atteint le pourcentage du rendement de l'immobilisation (tableau 6).

Nous constatons que la gélatine constitue un meilleur support pour la réactivation de la β -galactosidase.

Le faible rendement de réactivation de la β -galactosidase immobilisée en présence de sérum albumine par le glutaraldéhyde (0,40%) peut être dû à l'augmentation des liaisons glutaraldéhyde-enzyme qui en diminuent la réactivation.

En résumé, si l'on se base sur les différents rendements de réactivation de la β -galactosidase d'*Escherichia coli* immobilisée et traitée à l'urée, il est clair que c'est la technique d'immobilisation par la gélatine-glutaraldéhyde (0,25%) qui nous a permis de récupérer 100% de l'activité enzymatique après immobilisation.

Tableau 5 : Réactivation de la β -galactosidase immobilisée en présence de sérum albumine par le glutaraldéhyde.

	Activité (%)
Extrait brut immobilisé	100
Urée 8M	0
Lavage avec du tampon	24

Tableau 6 : Réactivation de la β -galactosidase immobilisée en présence de gélatine par le glutaraldéhyde.

	Activité (%)
Extrait brut immobilisé	100
Urée 8M	0
Lavage avec du tampon	105

Une fraction du polymère est broyée dans le tampon TEM pH 7 (triéthanolamine $2 \cdot 10^{-2}M$, EDTA $10^{-3}M$ et β -mercaptoéthanol $10^{-1}M$) ensuite filtrée et placée dans la colonne en contact avec l'urée 8M pendant 1 heure et demi.

L'urée est éliminée par écoulement et le polymère est lavé trois fois en une minute avec le même tampon.

La réactivation de la β -galactosidase est mesurée par l'hydrolyse de l'ONPG à 420 nm.

3. Concentration en glutaraldéhyde

Il a été démontré dans notre laboratoire C. BURSTEIN et H. OUNISSI (1980) que le rendement d'immobilisation, de la chaîne respiratoire d'*Escherichia coli* immobilisée en présence de sérum albumine, reste constant quand la concentration en glutaraldéhyde varie de 0,40 à 0,55%.

Dans le but d'augmenter le rendement d'immobilisation et par conséquent le pourcentage de réactivation de la β -galactosidase nous avons immobilisé l'extrait brut d'*Escherichia coli* en présence de gélatine à différentes concentrations de glutaraldéhyde.

Les mesures des activités (tableau 7) de la β -galactosidase après immobilisation ne montrent pas de différences significatives en fonction

des différentes concentrations de glutaraldéhyde.

En revanche quand la concentration de l'agent pontant augmente le pourcentage de réactivation diminue, c'est ainsi qu'à 0,25% de glutaraldéhyde la réactivation est maximale et à 0,50% et 0,75% elle est inférieure à 50% du rendement de l'immobilisation.

Tableau 7 : Activité de la β -galactosidase immobilisée en fonction du taux de glutaraldéhyde utilisé pour la réticulation.

Concentration de glutaraldéhyde %	0,25	0,50	0,75
Activité par mg de polymère %	70	91	80
% de réactivation	100	<50	<10

4. Cinétique d'inactivation à l'urée 5M.

Nous avons vu que l'activité de la β -galactosidase de l'extrait brut d'*Escherichia coli* immobilisé en présence de gélatine ne change pas quand la concentration en glutaraldéhyde varie de 0,25 à 0,75%.

Afin d'avoir une idée du mode de rétention de l'enzyme dans le polymère à différentes concentrations de glutaraldéhyde, nous avons effectué des expériences d'inactivation à l'urée 5M.

Nous présentons les résultats obtenus sur la figure 10 :

La cinétique d'inactivation à l'urée 5M est d'ordre 1.

La β -galactosidase, de l'extrait brut d'*Escherichia coli* immobilisée en présence de gélatine s'inactive beaucoup plus vite à 0,75% de glutaraldéhyde ($t^{1/2}$ 4mn) qu'à 0,25% ($t^{1/2}$ 22mn), alors que le rendement de l'immobilisation ne change pas avec le taux d'agent pontant. Au cours de la réaction de fixation de l'extrait brut, il y a formation d'un réseau tridimensionnel qui est le résultat de la condensation des fonctions amines de la gélatine et l'extrait brut avec les fonctions du polyglutaraldéhyde.

VITESSE D'HYDROLYSE DE L'ONPG

($\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)

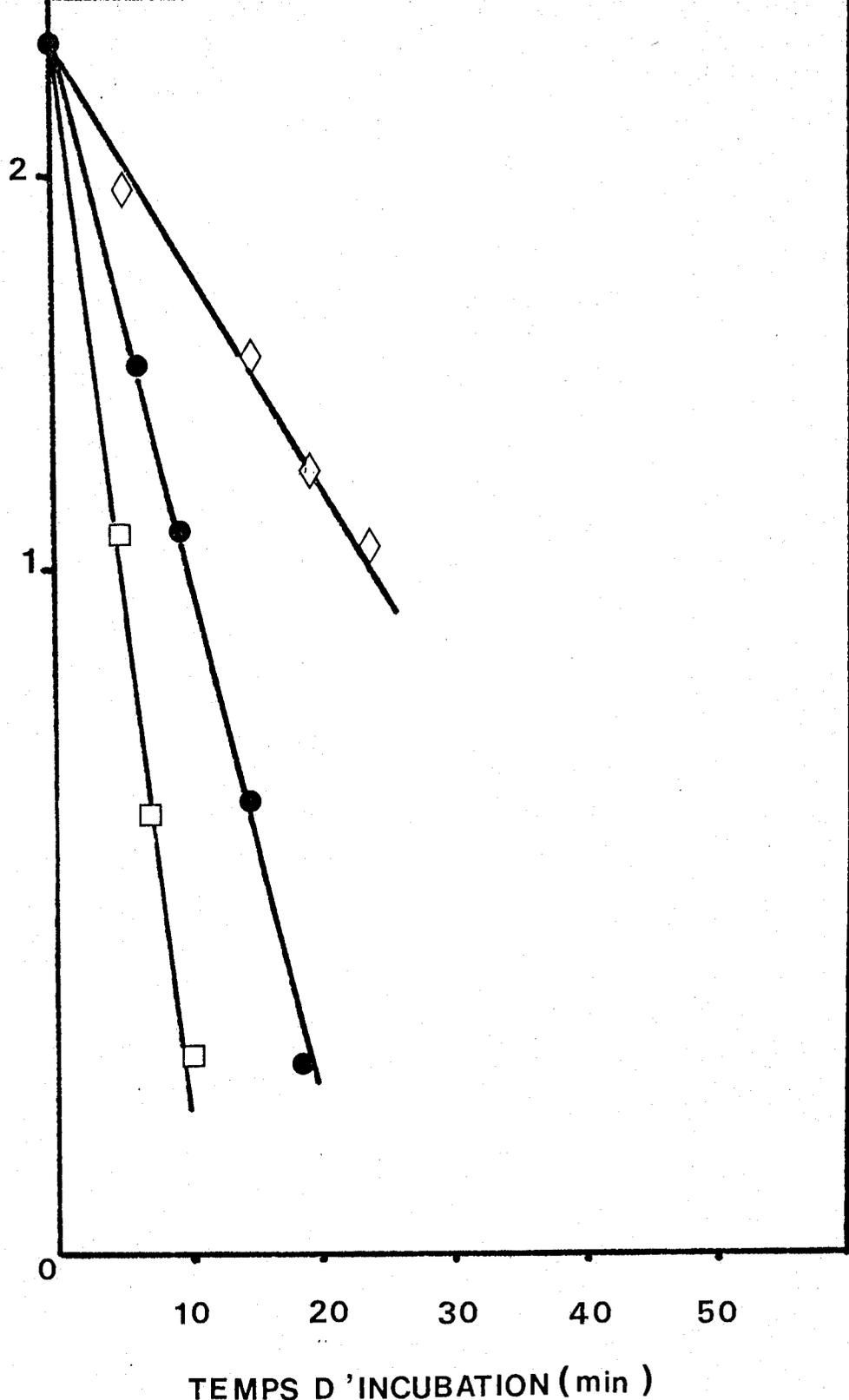


Figure 10: Inactivation à l'urée 5M de la β -galactosidase immobilisée à différentes concentrations de glutaraldéhyde.

□ 0.25% ● 0.5% ◇ 0.75%

Une fraction de polymère est broyée dans le tampon TEM pH 7 (triéthanolamine $2 \cdot 10^{-2}M$, EDTA $10^{-3}M$ et β -mercaptoéthanol $10^{-1}M$) ensuite filtrée et placée dans la colonne en contact avec l'urée 5M. Divers prélèvements sont effectués tout au long de l'incubation.

Les échantillons sont séchés, pesés et l'activité restante de la β -galactosidase est dosée en suivant l'hydrolyse de l'ONPG à 420 nm.

Nous pouvons supposer que :

- la réticulation est augmentée quand la concentration de glutaraldéhyde devient importante.
- plus les enzymes sont réticulés plus ils sont sensibles à l'inactivation à l'urée.

C/ Etude de la réactivation de la β -galactosidase immobilisée et inactivée par la température.

Un des facteurs limitant l'application des enzymes immobilisés dans des réacteurs industriels est l'inactivation des enzymes en cours d'utilisation. La réactivation de ces réacteurs enzymatiques permettrait leur utilisation sur de plus longues périodes.

Nous avons choisi l'inactivation thermique pour simuler la perte d'activité dans un réacteur au cours du fonctionnement.

A l'aide des expériences présentées dans ce chapitre, nous avons démontré que la β -galactosidase d'*Escherichia coli* immobilisée en présence de gélatine par le glutaraldéhyde et inactivée par la température peut être réactivée après traitement à l'urée.

Les particules porteuses d'activité sont broyées (à l'ultra turrax) et récupérées par filtration (sur une toile à blutter, \varnothing 50 μ m) ensuite elles sont chauffées dans le tampon TEM pH 7 à 70°C pendant cinq minutes. Les morceaux de polymère sont placés dans la colonne en présence d'urée 8M pendant une heure et demi. L'urée est éliminée et le polymère est lavé trois fois pendant une minute avec le même tampon.

La réactivation de la β -galactosidase de l'extrait brut d'*Escherichia coli* immobilisé en présence de gélatine par le glutaraldéhyde est suivie par la mesure de l'hydrolyse de l'ONPG à 420nm.

Les résultats présentés sur le tableau 8 montrent que le traitement

thermique du polymère s'accompagne d'une perte quasi-totale de l'activité de la β -galactosidase immobilisée. Aucun changement n'est intervenu sur l'activité quand le polymère inactivé par la température est mis en présence d'urée 8M.

Après élimination de l'urée et lavage du polymère avec le même tampon, l'activité de la β -galactosidase réapparaît complètement. L'urée qui est un agent tensioactif est indispensable à la renaturation de la β -galactosidase immobilisée.

Tableau 8 : Réactivation de la β -galactosidase immobilisée et inactivée par la température.

	Traitement subi	Activité (%)
Extrait brut libre	néant	100*
Extrait brut immobilisé	néant	10
	chauffage	0,1
	chauffage + urée	0,1
	chauffage + urée + lavage	9%

Une fraction de polymère est broyée dans le tampon TEM (triéthanolamine $2 \cdot 10^{-2}M$, EDTA $10^{-3}M$, β -mercaptoéthanol $10^{-1}M$) ensuite filtrée et placée dans un bain thermostaté à $70^{\circ}C$ pendant cinq minutes en présence du même tampon.

Le polymère inactivé par la chaleur est mis dans la colonne en présence d'urée 8M pendant 90 minutes.

L'urée est éliminée et le polymère est lavé trois fois pendant une minute avec le même tampon.

La réactivation de la β -galactosidase est mesurée par l'hydrolyse de l'ONPG à 420nm.

**100% correspond à $2,18 \mu\text{moles d'ONPG mn}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protéines totales.*

1. Cinétique de réactivation de la β -galactosidase immobilisée.

Nous avons montré que la β -galactosidase d'*Escherichia coli* immobilisée en présence de gélatine par le glutaraldéhyde (0,25%) et inactivée par traitement thermique peut être régénérée après passage dans l'urée et lavage avec du tampon TEM pH 7.

Dans le but d'optimiser la renaturation de la β -galactosidase immobilisée, nous avons effectué la cinétique de réactivation de cet enzyme immobilisé.

Nous remarquons dans la figure 11 que la réactivation de la β -galactosidase immobilisée augmente avec le temps, puis atteint une valeur maximale vers 100 minutes. Cette activité maximale qui est sous la forme d'un plateau correspond en activité au rendement de l'immobilisation.

La réactivation de la β -galactosidase immobilisée ne dépasse pas le rendement de l'immobilisation. Cela pourrait s'expliquer soit par :

- 90% de l'activité est définitivement inactivée par la technique d'immobilisation.
- des contraintes diffusionnelles ne permettent l'accessibilité que de 10% des sites de l'enzyme.

Conclusion

Nous avons montré que la β -galactosidase soluble de l'extrait brut d'*Escherichia coli*, inactivée par la chaleur pouvait être réactivée à 75% après traitement à l'urée 8M suivi d'une dialyse avec du tampon.

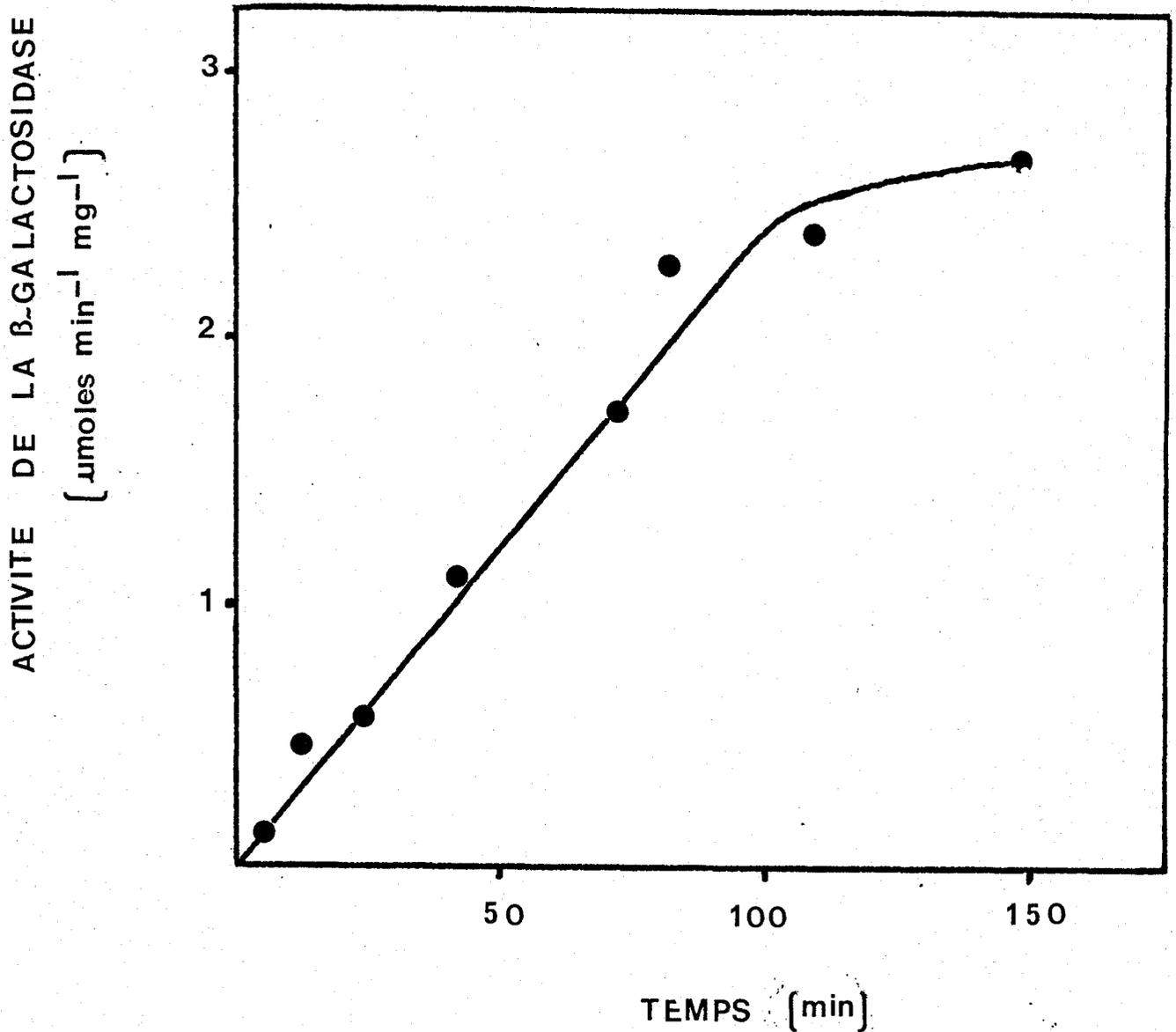


Figure 11 : Cinétique de réactivation de la β -galactosidase immobilisée.

Une fraction de polymère de gélatine est broyée dans le tampon TEM pH 7 (triéthanolamine $2.10^{-2}M$, EDTA $10^{-3}M$, β -mercaptoéthanol $10^{-1}M$) ensuite filtrée et placée dans la colonne en présence d'urée $8M$ pendant 90 minutes.

Après élimination de l'urée et lavage du polymère avec le même tampon, des échantillons sont prélevés au cours du temps pour doser la réactivation de la β -galactosidase.

Nous avons montré également que la β -galactosidase immobilisée en présence de gélatine par le glutaraldéhyde (0,25%) perd son activité par chauffage et la régénération est maximale après traitement à l'urée et lavage avec du tampon.

Alors que la réactivation de la β -galactosidase soluble est obtenue au bout de 20 heures de dialyse, celle de l'enzyme immobilisé est réalisée en moins de deux heures.

La deuxième partie de notre travail consiste à la mise au point d'une électrode enzymatique utilisant la chaîne respiratoire d'*Escherichia coli* immobilisée pour le dosage du L-malate, pour cela nous avons essayé tout d'abord de trouver le matériel biologique le meilleur au point de vue quantité d'enzyme. Ensuite nous avons déterminé les conditions optimales d'immobilisation de ce matériel. Enfin, nous avons étudié la réponse et les caractéristiques analytiques de l'électrode à L-malate.

D/ Etude préliminaire.

Pour mettre au point une électrode à enzyme permettant le dosage du L-malate dans les milieux biologiques, nous avons cherché dans un premier temps à améliorer les propriétés du matériel biologique par augmentation de l'activité spécifique concernant la synthèse de la flavoprotéine à L-malate puis à établir les conditions optimales de l'immobilisation de la chaîne respiratoire d'*Escherichia coli*.

1. Etude de la croissance bactérienne sur différentes sources de carbone.

Nous avons effectué plusieurs cultures d'*Escherichia coli* en milieu minimum avec différentes sources de carbones, ceci dans le but

d'augmenter l'activité de la flavoprotéine spécifique de l'oxydation du L-malate. Les résultats obtenus figurent sur le tableau 9.

On constate que les bactéries entières cultivées sur D-L-malate possèdent une activité respiratoire du L-malate plus importante (environ 5 fois) que dans les bactéries cultivées sur d'autres sources de carbone. L'oxydation du L-malate est également plus forte dans les vésicules membranaires issues de bactéries cultivées sur D-L-malate, par contre l'activité des vésicules est moins élevée que celle des bactéries entières.

Le L-malate semble traverser la membrane bactérienne, la préparation des vésicules membranaires n'est donc pas nécessaire. Il a été démontré que l'oxydation d'autres substrats tel que le NADH (tableau 9) nécessite auparavant une perméabilisation ou un cassage mécanique des bactéries.

Cette différence de perméabilité de la membrane bactérienne aux substrats est probablement due à la différence de leurs poids moléculaires, en effet le NADH a un poids moléculaire de 660, alors que le L-malate a un poids moléculaire de 160. De plus le L-malate est une molécule hydrophobe ce qui facilite son passage spontanément à travers la membrane plasmique bactérienne.

D'autre part le premier enzyme de la chaîne respiratoire, spécifique de l'oxydation du L-malate est situé sur la face interne de la membrane interne de la bactérie. Le cassage des bactéries aux ultra-sons ou à la presse de French donne des vésicules membranaires qui présentent une activité respiratoire du L-malate inférieure à celle des bactéries entières. Or il a été montré que la flavoprotéine spécifique du L-malate des bactéries *Escherichia coli* peut être solubilisée par sonication ou à la presse de French (SUREE, N. *et al.*, 1979). Il est donc normal que l'activité respiratoire du L-malate diminue si l'enzyme se trouve dissocié de la

chaîne respiratoire des vésicules membranaires.

On remarque que la respiration du NADH, H^+ n'a pas le même comportement que celle du L-malate. Le passage des bactéries n'entraîne pas de solubilisation de la flavoprotéine à NADH, H^+ qui est une protéine intrinsèque, et son site est également du côté interne de la membrane plasmique.

On remarque également (tableau 9) que les bactéries cultivées avec différentes sources de carbone autre que le D-L-malate possèdent une activité respiratoire du L-malate appréciable.

L'existence d'une induction de la flavoprotéine spécifique pour l'oxydation du L-malate est très probable, en effet l'activité respiratoire des bactéries cultivées sur D-L-lactate, succinate, glycérol ou glucose avec le L-malate comme substrat se trouve réduite à sa valeur minimale.

Il faut noter qu'en présence simultanée de glucose et de D-L-malate, à concentrations égales dans le milieu de culture, les bactéries utilisent d'abord le glucose, et après une période de latence dépassant 4 heures, les bactéries utilisent le D-L-malate, ceci suggère que le glucose exerce une répression catabolique sur la synthèse de la flavoprotéine responsable de l'oxydation du L-malate.

L'existence d'un tel phénomène a déjà été signalée par quelques auteurs dont les conclusions sont en accord avec nos résultats (SANWAL, B.D. and SMANDO, 1969).

D'autre part, nous avons effectué des cultures d'*Escherichia coli* sur milieu minimum avec le D- et le L-malate séparément comme seule source de carbone. Les résultats obtenus montrent que les bactéries peuvent utiliser l'un ou l'autre pour leur croissance. En revanche la mesure des activités respiratoires a révélé que seul le L-malate est oxydé par la chaîne respiratoire des deux cultures. On peut penser donc que les bactéries cultivées sur D-malate possèdent une racémase qui leur permet

Tableau 9 : Respiration en présence de L-malate et de NADH, H⁺ des bactéries cultivées en milieu minimum avec différentes sources de carbone.

Source de carbone dans le milieu de culture (1%)		Respiration en présence de L-malate	Respiration en présence de NADH, H ⁺
D-L-lactate	bact. entières	5	0
	bact. cassées	1	250
Succinate	bact. entières	5	0
	bact. cassées	2	200
Glycérol	bact. entières	8	0
	bact. cassées	3	305
Glucose	bact. entières	10	0
	bact. cassées	4	230
D-L-malate	bact. entières	45	0
	bact. cassées	15	200

Les bactéries sont récoltées en phase exponentielle, lavées avec le tampon phosphate 0,1M pH 7 et resuspendues dans le milieu minimum sans source de carbone à 37°C pendant 1 heure. La respiration en présence de L-malate (50mM) et de NADH, H⁺ (5mM) est effectuée avec des bactéries entières et avec des bactéries cassées aux ultra-sons.

Les résultats sont exprimés en nmoles d'oxygènes par minute et par mg de protéines bactériennes.

de transformer le D en L-malate qui est ensuite utilisé par les bactéries

pour leur métabolisme énergétique.

Certains auteurs ont montré l'existence chez *Escherichia coli* d'une malate déshydrogénase. Cet enzyme NAD dépendant est localisé dans le cytoplasme de la bactérie (SANWAL, B.D *et al*, 1969).

Nos bactéries cultivées sur D-L-malate et cassées (à la presse de French ou aux ultra-sons) ne présentent pas d'activité malate déshydrogénase mesurable dans nos conditions expérimentales. Ces observations montrent que l'oxydation du L-malate peut être effectuée soit par la flavoprotéine (enzyme membranaire) soit par la malate déshydrogénase à NAD (enzyme soluble). Or il semble que la flavoprotéine responsable de l'oxydation du L-malate est induite chez les bactéries qui ne possèdent pas d'activité malate déshydrogénase, alors que chez les mutants la synthèse de la malate déshydrogénase à NAD⁺ inhibe la synthèse de la flavoprotéine à L-malate (HUGUES, A. *et al*, 1978).

L'ensemble de ces résultats nous ont amené à utiliser pour la suite de ce travail des bactéries entières cultivées sur D-L-malate comme seule source de carbone. Ces bactéries possèdent une forte activité respiratoire du L-malate et constituent donc un bon matériel biologique pour la réalisation des films enzymatiques qui seront utilisés pour le revêtement de l'électrode.

E/ Optimisation de la méthode d'immobilisation.

Nous avons choisi la gélatine comme support pour la réalisation des enzymatiques qui permettent le revêtement de l'électrode à oxygène

gamme possible d'épaisseurs de revêtement, des rendements d'immobilisation acceptables.

La gélatine possède également d'autres avantages, en effet à 40°C elle est à l'état liquide et en dessous de cette température elle devient solide. Cette polymérisation est irréversible ce qui facilite le revêtement de l'électrode à oxygène, de plus la quantité d'oxygène dissoute dans la gélatine réticulée par le glutaraldéhyde est 10 fois plus élevée que dans l'eau pour la même pression partielle (QUENESSON, J.C. et Thomas, D., 1977). Cette propriété rend la réaction enzymatique partiellement indépendante des variations de la concentration en oxygène dans le milieu extérieur au début de la mesure des activités respiratoires.

1. Concentration de la gélatine.

Nous avons effectué des inclusions de bactéries entières cultivées sur D-L-malate à différents pourcentages de gélatine. Ces inclusions sont suivies d'une coréticulation entre les molécules protéiques (protéines bactériennes et gélatine) par l'intermédiaire d'un agent pontant : le glutaraldéhyde à 2% pendant trois minutes.

Les résultats obtenus (figure 12) montrent que la vitesse de consommation d'oxygène augmente avec le pourcentage de gélatine et devient constante entre 4% et 5%. Pour des concentrations supérieures à 5%, la vitesse de la réaction diminue. En fait quand la concentration en gélatine est élevée, les films enzymatiques sont compacts, le substrat et le produit diffusent mal ce qui se traduit par une diminution de la vitesse de consommation de l'oxygène.

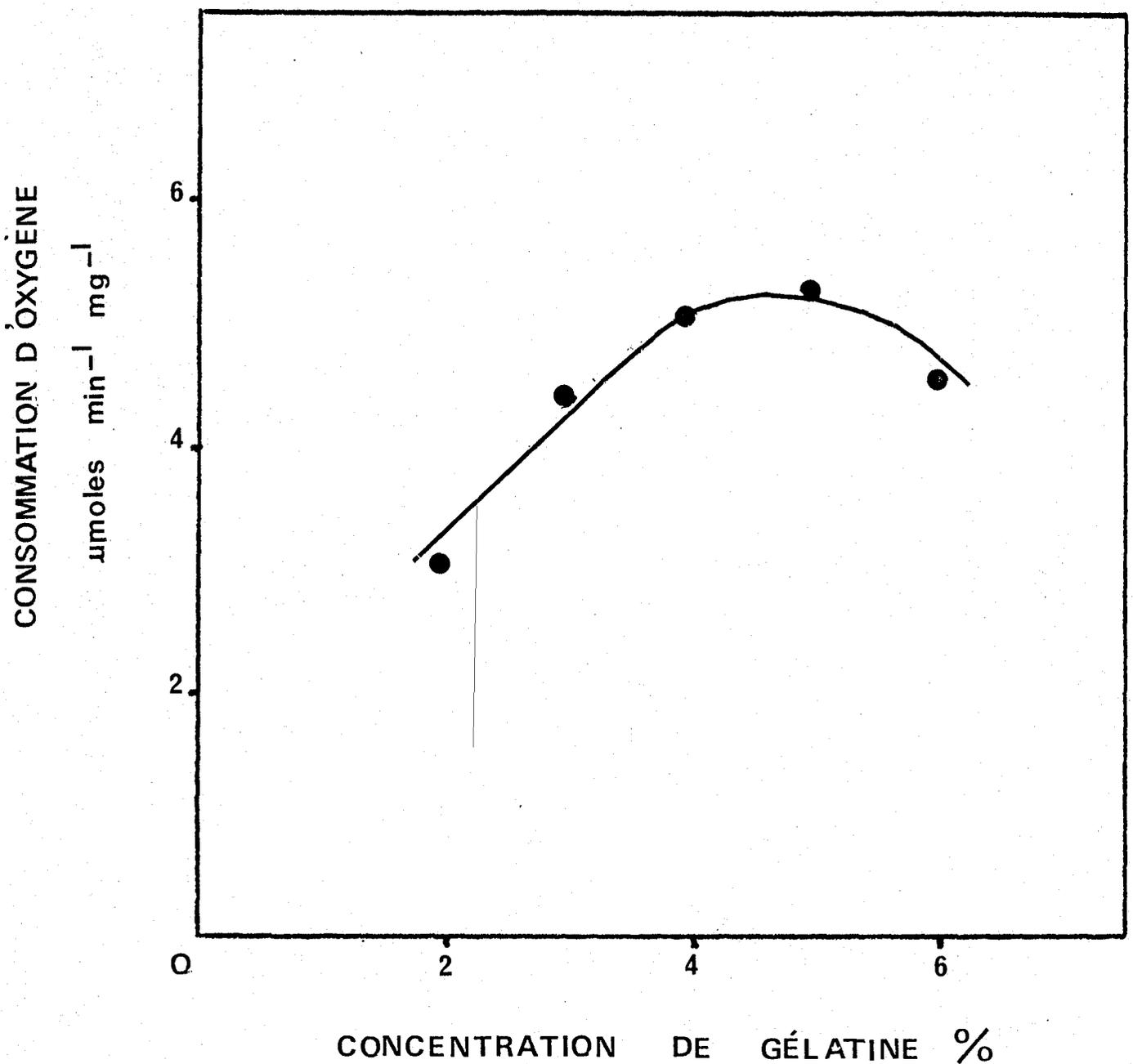


Figure 12 : Effet de la concentration de gélatine contenue dans le polymère sur l'activité respiratoire du L-malate

La respiration en présence du L-malate est mesurée par l'électrode enzymatique en tampon phosphate 100mM pH 7 saturé d'air à 30°C. La concentration de L-malate est 50mM.

Les bactéries (*E. coli* à 25mg de protéines bactériennes par ml de polymère) sont immobilisées sous forme de film avec des concentrations variables en gélatine. Le tannage est effectué pendant trois minutes avec du glutaraldéhyde 2%.

2. Concentration en protéines bactériennes

Nous avons réalisé des films porteurs d'activité avec des concentrations croissantes en protéines bactériennes et étudié l'influence de ce facteur sur la vitesse de consommation d'oxygène et sur les propriétés mécaniques du polymère (figure 13).

On remarque que la vitesse de consommation d'oxygène augmente de façon linéaire avec la concentration en protéines bactériennes jusqu'à 30mg de protéines par ml de polymère, cette valeur correspond à la concentration maximale de protéines qu'on peut utiliser pour la réalisation des polymères. Il faut noter également que pour des concentrations élevées de protéines bactériennes, les films enzymatiques obtenus sont de mauvaises qualités mécaniques.

Pour réaliser les films enzymatiques nous avons utilisé pour la suite de nos expériences une concentration en protéines bactériennes de 25mg par ml de polymère. Cette concentration permet d'avoir une activité enzymatique appréciable et des films bactériens de bonne tenue mécanique.

3. Concentration en agent pontant.

Nous avons réalisé une série d'inclusions et effectué le tannage de ces préparations avec des concentrations croissantes en glutaraldéhyde.

La figure 14 montre l'évolution de la vitesse de consommation d'oxygène en fonction de la concentration en glutaraldéhyde. On constate que l'activité respiratoire du L-malate augmente quand le pourcentage en agent pontant diminue. Il faut noter qu'en dessous de 0,5% en glutaraldéhyde, les films enzymatiques sont de mauvaises qualités mécaniques ce qui limite leur utilisation en technologie enzymatique. Par contre pour des concentrations supérieures ou égales à 3% en agent pontant, la réaction de pontage entraîne une inactivation, des sites actifs et donc une activité enzymatique décroissante.

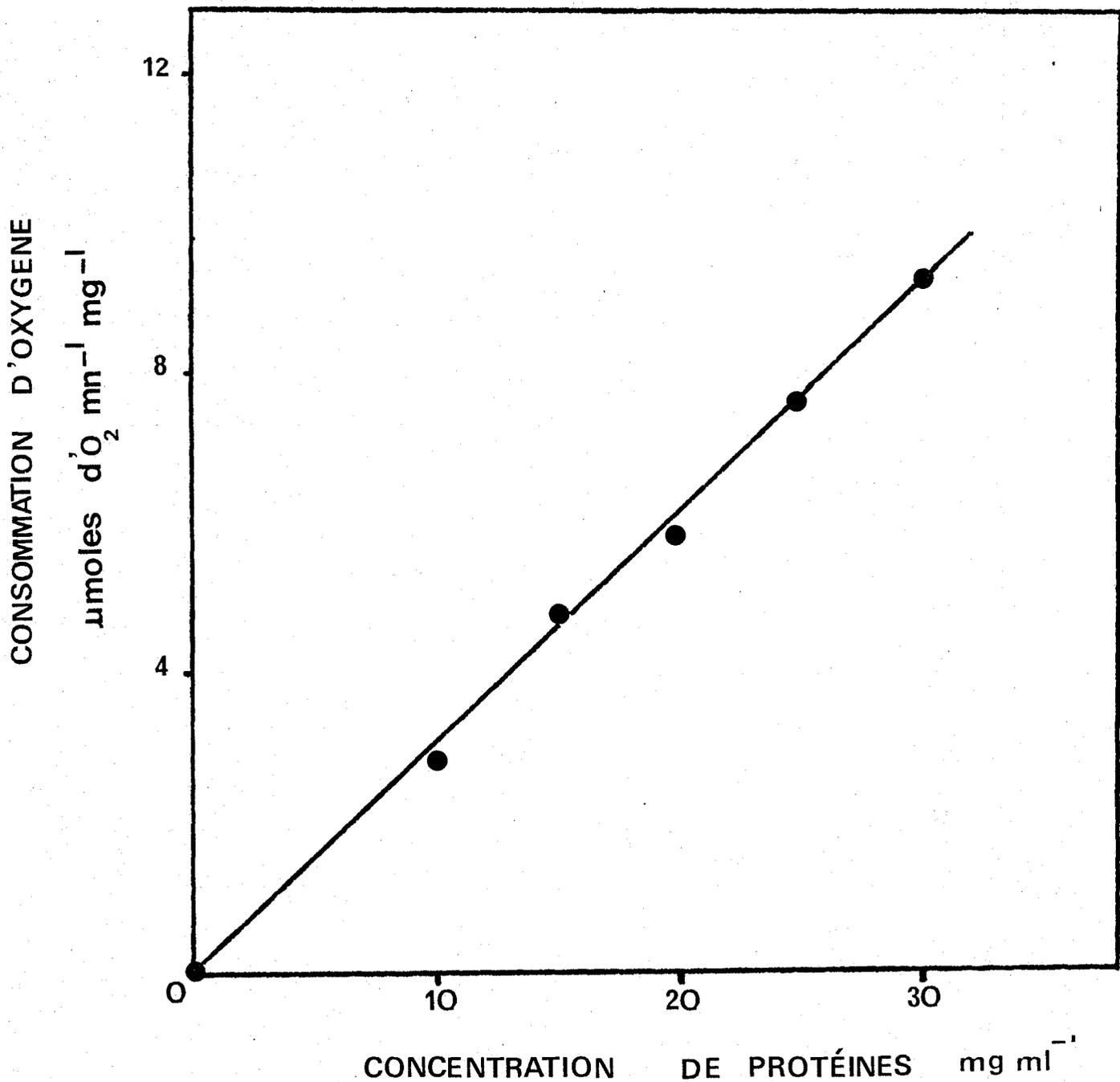


Figure 13: Effet de la concentration en protéines bactériennes sur la respiration en présence de L-malate.

La respiration en présence de L-malate est mesurée par l'électrode à enzyme en tampon phosphate 100mM pH 7 saturé d'air à 30°C. Le L-malate est à la concentration de 50mM.

Les bactéries sont immobilisées à des concentrations variables en présence de gélatine 5% et tannées au glutaraldéhyde 2% pendant trois minutes. Les résultats sont exprimés en mg de protéines bactériennes totales par ml de polymère.

Par ailleurs, la respiration en présence de L-malate disparaît complètement au bout de 15 minutes après tannage si celui-ci n'est pas suivi d'un rinçage abondant avec la lysine 0,1M.

Cette sensibilité au glutaraldéhyde caractérise particulièrement la flavoprotéine à L-malate, certaines activités telles que la respiration en présence de NADH ou de L-lactate résistent mieux au glutaraldéhyde et le lavage avec la lysine n'est donc pas nécessaire.

Ce lavage avec la lysine est indispensable pour la flavoprotéine à L-malate car il bloque les fonctions réactives du glutaraldéhyde résiduel et empêche l'inactivation de la respiration en présence de L-malate.

Les tampons de rinçage du film ne présentent pas d'activité enzymatique ceci montre bien que les enzymes responsables de l'oxydation du L-malate sont retenus dans le film enzymatique.

Le mécanisme d'action du glutaraldéhyde a fait l'objet d'une étude (MONSAN *et al.*, 1975). On pense que pendant le tannage des films enzymatiques, le glutaraldéhyde agirait sous la forme de polymères dont le motif réactionnel serait constitué par une fonction aldéhyde conjuguée avec une fonction éthylénique. Ces composés, par réaction avec des amines primaires de la gélatine et des protéines bactériennes donneraient des liaisons fortement stabilisées par résonance avec les liaisons éthyléniques.

Les liaisons chimiques ainsi formées sont irréversibles et entraînent une perte d'activité partielle des enzymes.

Dans toutes les expériences qui vont être rapportées les films enzymatiques sont tannés avec du glutaraldéhyde à 2% pendant trois minutes. Ces conditions expérimentales permettent de faire un compromis entre une grande activité enzymatique et une bonne tenue mécanique du film.

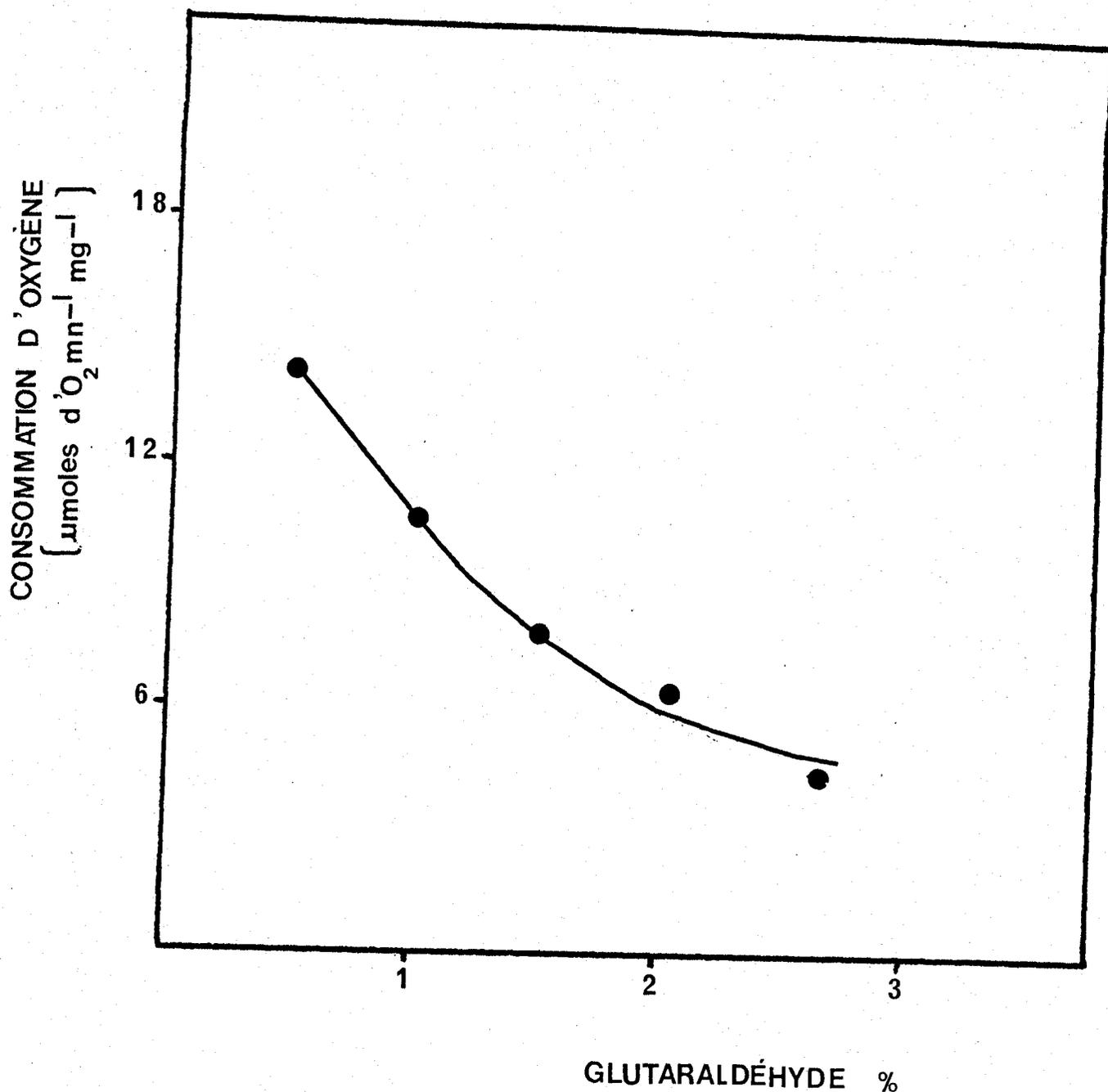


Figure 14: Effet de la concentration du glutaraldéhyde sur l'activité respiratoire du L-malate.

Les bactéries à 25mg par ml sont immobilisées en présence de gélatine à 5%. les films enzymatiques sont tannés pendant trois minutes avec des concentrations variables en glutaraldéhyde. L'effet du glutaraldéhyde est arrêté par lavage avec la lysine 0,1M pH 7. La respiration en présence de L-malate est mesurée à l'électrode enzymatique en tampon phosphate 100mM pH 7 saturé d'air à 30°C. Le L-malate est à 50mM.

Par ailleurs, nous avons constaté que le séchage des films enzymatiques, après étalement, influe sur l'activité respiratoire en présence de L-malate. Pour cela nous avons préparé des films à partir du mélange bactéries-gélatine qu'on a laissé sécher à 4°C à différents temps.

Nous avons constaté après tannage au glutaraldéhyde que la respiration optimale en présence de L-malate est obtenue pour des films séchés pendant 20 heures.

Le mélange matériel biologique-gélatine est étalé sur une plaque de verre recouverte d'un film de polypropylène. Après séchage, le film enzymatique demeure en contact étroit avec le film de polypropylène, ceci facilite le recouvrement de l'électrode.

4. Rendement de l'immobilisation.

Cette étude des différents paramètres influençant l'activité respiratoire du L-malate nous a permis de calculer le rendement d'immobilisation. On exprime habituellement le rendement en activité enzymatique de l'immobilisation par le rapport entre, l'activité respiratoire en présence du L-malate contenue dans le film placé dans la cellule de mesure, et l'activité respiratoire de la même quantité de matériel biologique en solution avec la même concentration de L-malate, exprimé en pourcentage.

Il est possible de calculer ainsi le rendement en activité après immobilisation : il est de 10% environ. Ce rendement est intéressant si l'on considère que la chaîne respiratoire est un système multienzymatique

Tableau 10 : Activités respiratoires des bactéries entières D-L-malate avant et après immobilisation.

Matériel biologique	Oxydation du L-malate en $\mu\text{moles d'O}_2/\text{min.}/\text{mg}$ de protéines
Avant immobilisation	0,04
Après immobilisation	0,7
Immobilisé sur film et mis sur l'électrode	6,1

F/ Réponse et caractéristiques de l'électrode enzymatique à L-malate.

L'optimisation de l'immobilisation des bactéries entières D-L-malate nous permet d'étudier la réponse émise par l'électrode et l'influence de l'environnement sur cette réponse.

1. Réponse de l'électrode à enzyme

Sur la figure 15 est représentée la réponse obtenue par l'électrode enzymatique pour une concentration saturante de substrat (L-malate 50mM). La consommation d'oxygène enregistrée en fonction du temps de déroulement de la réaction peut être décomposée en trois phases :

a) la ligne de base est horizontale, le film enzymatique est saturé en oxygène avec du tampon phosphate 100mM pH 7 à 30°C (volume total : 2ml).

b) On introduit dans le compartiment de l'électrode le L-malate (50mM), après une dizaine de secondes (temps de réponse de l'appareil) on observe une réponse qui se traduit par une consommation d'oxygène dissous. On trace la tangente au point d'inflexion de la courbe, connaissant

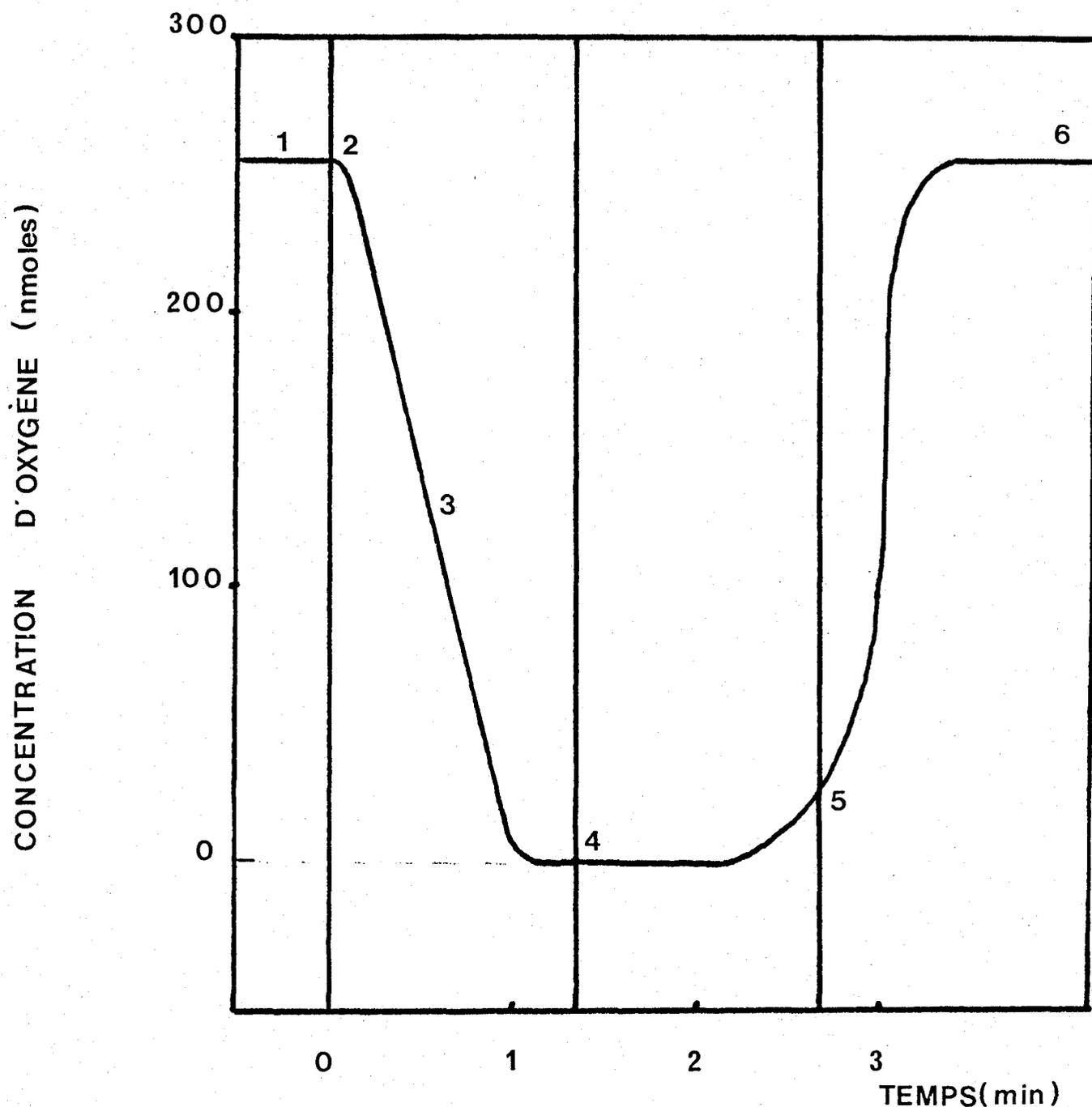


Figure 15: Enregistrement de la réponse de l'électrode enzymatique à L-malate.

- 1 - L'électrode enzymatique est saturée en oxygène avec du tampon phosphate 0,1M pH 7 (100%) à 30°C.*
- 2 - Addition du substrat (L-malate 50mM).*
- 3 - Consommation d'oxygène (cinétique).*
- 4 - Rinçage de l'électrode avec le même tampon.*
- 5 - Saturation du film enzymatique en oxygène.*
- 6 - Retour à la ligne de base et addition du substrat pour une autre mesure.*

la vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur, on détermine la pente qui correspond à la vitesse initiale de consommation d'oxygène.

c) Le film enzymatique est rincé plusieurs fois avec le même tampon les liquides de rinçage sont éliminés par aspiration. La membrane enzymatique est ensuite saturée en oxygène et un nouveau cycle peut recommencer.

Pour une concentration de substrat donnée, l'arrêt de la consommation d'oxygène est obtenu au bout de quelques minutes, par contre le retour à la ligne de base est relativement long. Ceci s'explique bien en tenant compte d'une part du fait que la diffusion a lieu d'un seul côté (l'électrode à oxygène est en effet considérée comme imperméable), et d'autre part que l'épaisseur du film de gélatine est importante. Cette épaisseur de la couche de diffusion est liée aux propriétés de gonflement de la gélatine (FRIBOULET, A., 1980).

2. Constantes cinétiques.

Nous avons effectué dans les mêmes conditions expérimentales que pour la figure 15, le même type de mesure avec des concentrations croissantes de L-malate. Les réponses obtenues sont présentées sur la figure 16.

On peut noter que l'intensité de la réponse de l'électrode et les temps d'établissement d'un palier (arrêt de la consommation d'oxygène) sont liés à la concentration en substrat, ceci nous a conduit à tracer une courbe d'étalonnage qui nous permet de déterminer les paramètres cinétiques.

L'activité respiratoire en présence de L-malate en fonction de la concentration en substrat (L-malate) est présentée sur la figure 17. Cette courbe a une allure hyperbolique, la saturation est obtenue pour une concentration de 30mM environ.

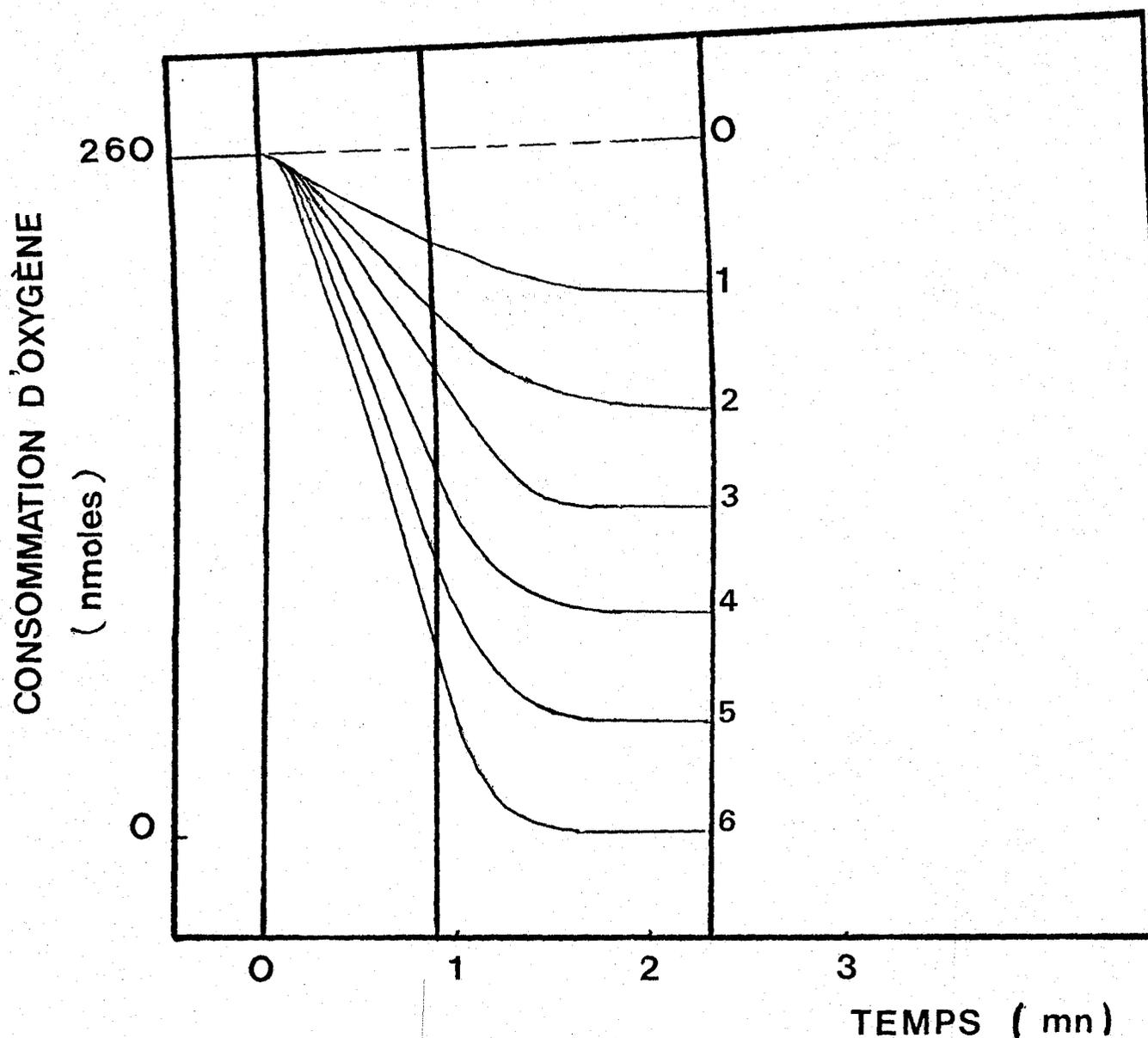


Figure 16: Réponses de l'électrode enzymatique à L-malate pour différentes concentrations en substrats.

L'oxydation du L-malate est effectuée en tampon phosphate 100mM

l'électrode enzymatique est placée avec

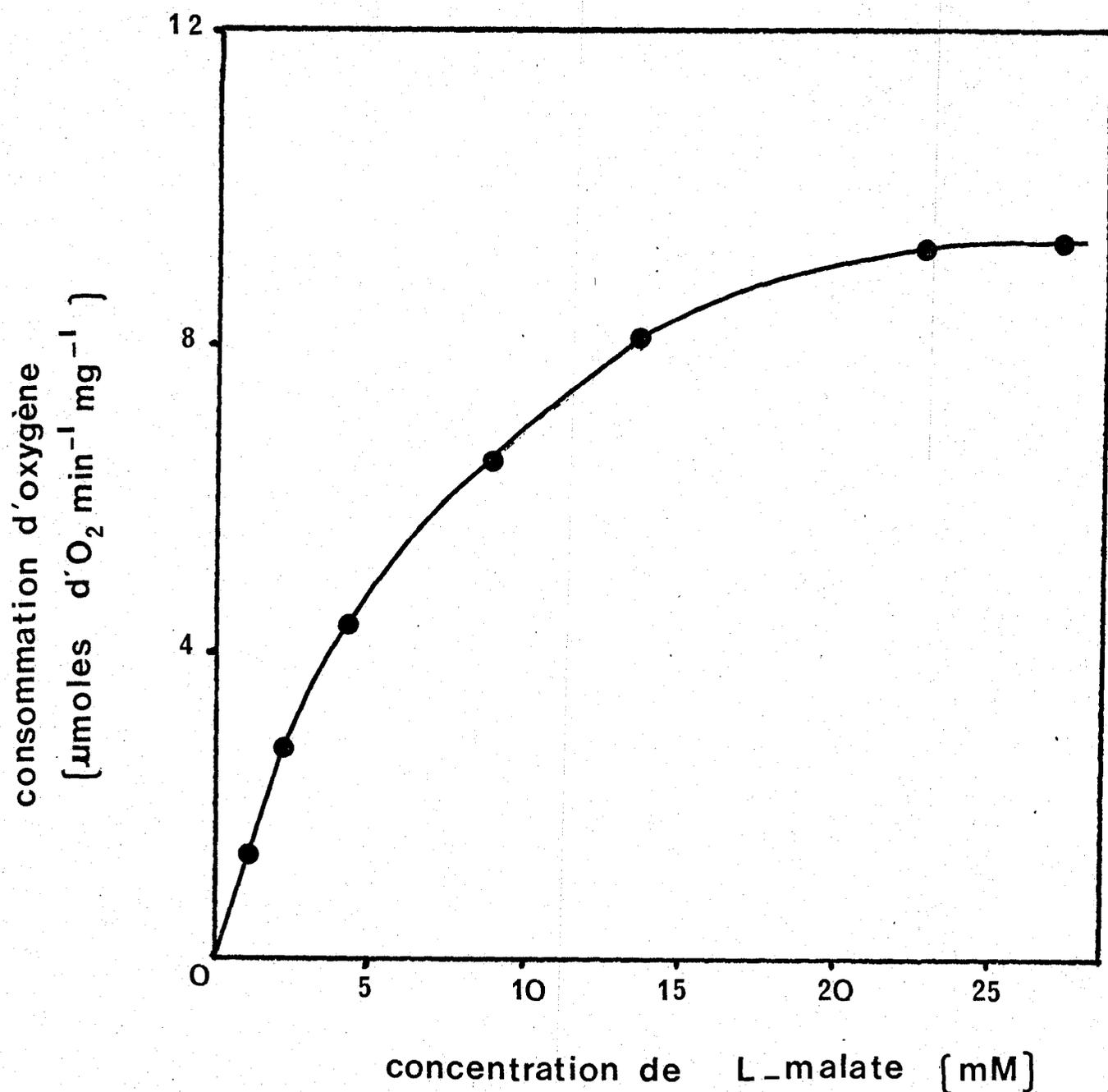


Figure 17: Courbe d'étalonnage pour différentes concentrations de L-malate.

L'activité respiratoire du L-malate est effectuée en tampon phosphate 100mM, pH 7 à 30°C.

La concentration du L-malate utilisé varie de 1mM à 30mM.

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{moles d'O}_2/\text{min./mg}$ de protéines.

On observe un comportement cinétique de type pseudo Michaélien, c'est à dire une réaction de pseudo-premier ordre aux faibles concentrations de substrat et d'ordre tendant vers zéro (par rapport au substrat) aux concentrations élevées.

Cependant, dans un film enzymatique, la cinétique se passe en milieu hétérogène et anisotrope et son interprétation fait appel aux principes régissant la catalyse hétérogène qui tiennent compte du double phénomène de la diffusion et de la réaction.

L'évolution de la concentration du substrat en fonction du temps résulte du couplage entre la diffusion du L-malate et de l'oxygène et de la réaction enzymatique (THOMAS, D., 1971).

$$\frac{\partial s}{\partial t} = \left[\frac{\partial s}{\partial t} \right]_{\text{diffusion}} - \left[\frac{\partial s}{\partial t} \right]_{\text{réaction}}$$

La composante de diffusion peut s'écrire en utilisant le 2^e loi de Fick, avec D_s coefficient de diffusion de s et x l'épaisseur de la membrane.

$$\left[\frac{\partial s}{\partial t} \right]_{\text{diffusion}} = D_s \frac{\partial^2 s}{\partial x^2}$$

La composante de la réaction est dans le cas d'un enzyme ayant un terme de réaction Michaélien.

$$\left[\frac{\partial s}{\partial t} \right]_{\text{réaction}} = V_M f(s)$$

On peut écrire :

$$\frac{\partial s}{\partial t} - D_s \frac{\partial^2 s}{\partial x^2} + V_M f(s) = 0$$

La diffusion du deuxième substrat, l'oxygène, est régie par le même type d'équation. Cette dernière équation définit le système enzymatique en phase hétérogène et caractérise donc la catalyse à l'intérieur du support.

Dans notre cas le terme de diffusion n'est pas observable et pour déterminer les pseudo-constantes cinétiques de Michaélis, nous avons transformé la relation hyperbolique reliant l'activité et la concentration en substrat en une relation linéaire (figure 18). La linéarité est bonne et permet d'obtenir une valeur de demi-saturation $K_{50} = 6\text{mM}$ et $V_M = 11\mu\text{moles d'O}_2/\text{min./mg}$.

Pour chaque nouveau film enzymatique servant de revêtement à l'électrode, il est nécessaire d'effectuer une courbe de calibration qui permettra d'établir les caractéristiques du film enzymatique.

3. Influence de l'environnement sur la respiration du L-malate

Les travaux ayant trait à l'influence de l'environnement sur l'activité des enzymes ont connu un nouvel essor avec les techniques d'immobilisation (KATCHALSKI, E., 1971).

L'étude de l'environnement (pH, pouvoir tampon...) de l'électrode enzymatique ouvre la possibilité d'utiliser cette électrode dans le domaine agro-alimentaire.

- Effet du pH :

L'activité respiratoire du L-malate a été déterminée à différents pH entre les valeurs 4 et 10. Différents tampons ont été utilisés pour couvrir cette zone. Le recouvrement de cette zone de pH est nécessaire pour éviter l'influence sur l'activité due à la composition du tampon et non à la valeur du pH. Les résultats expérimentaux sont présentés sur la figure 19.

On constate que pour la respiration du L-malate, le maximum d'activité (100%) est obtenu avec le tampon phosphate entre pH 6 et 7, on remarque également que 30% de l'activité initiale est maintenue aux pH 4 et 9.

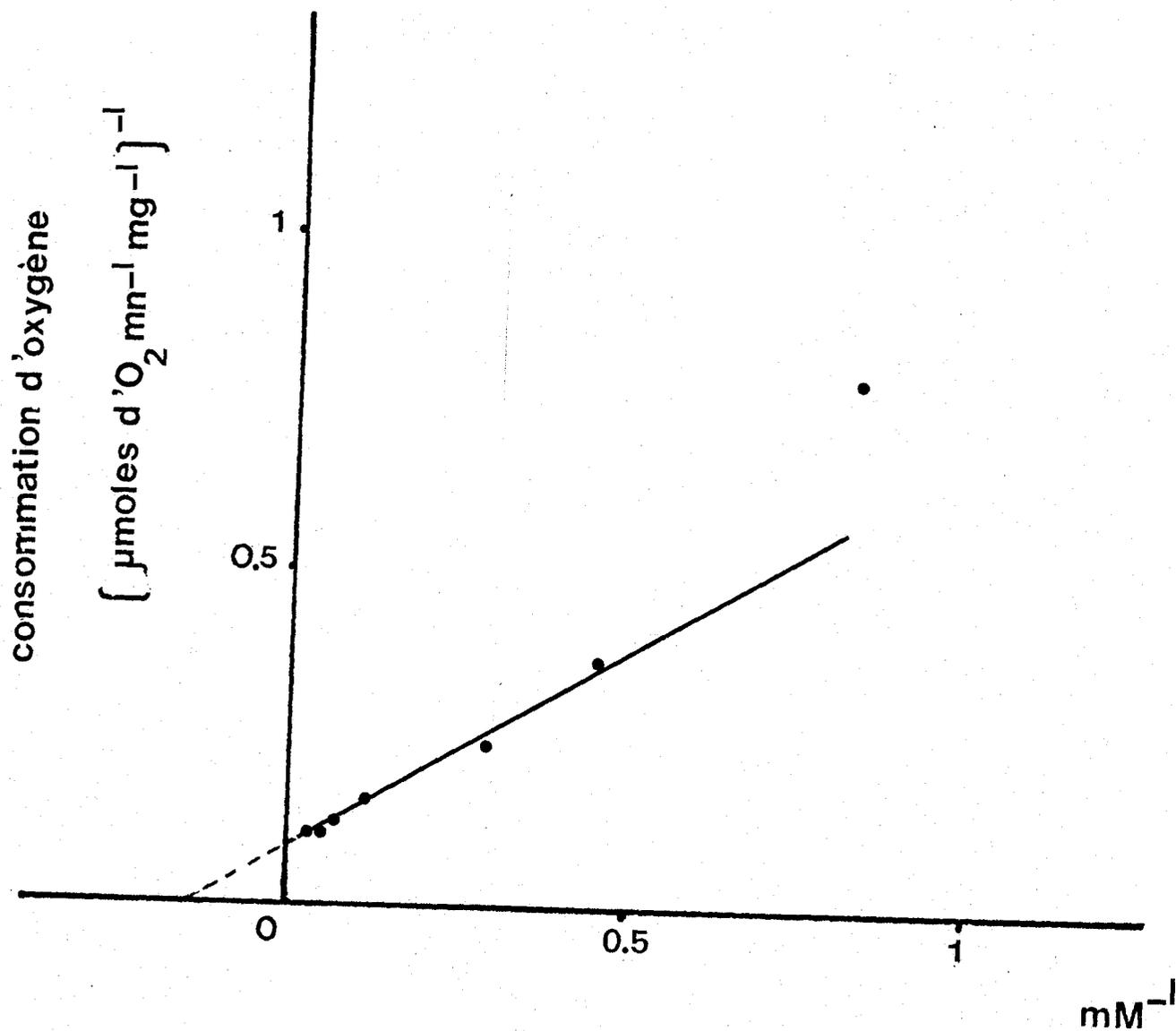


Figure 18: Représentation de Lineweaver-Burk (en double inverse) de la courbe d'étalonnage.

La mesure de la respiration du L-malate à différents pH est effectuée sur un même film enzymatique. Après chaque expérience le film est rincé trois fois avec le tampon phosphate 0,1M pH 7. Le dosage de l'activité respiratoire en présence de L-malate dans le même tampon permet de retrouver l'activité de départ, ceci montre que l'effet du pH est réversible.

- Nature du tampon :

La figure 19 permet également de mettre en évidence l'influence de la nature du tampon sur la réponse de l'électrode. On constate qu'avec le tampon phosphate les valeurs obtenues sont nettement meilleures qu'avec les autres tampons.

4. Inhibition de la respiration du L-malate.

Outre le dosage du L-malate, l'électrode enzymatique permet également de doser les substances ayant un effet inhibiteur sur la flavoprotéine spécifique du L-malate.

L'oxaloacétate est le produit de la réaction de l'oxydation du L-malate, inhibe de façon réversible l'oxydation du L-malate.

Pour évaluer expérimentalement la valeur de K'_{50} apparent (constante d'inhibition), on incube le film enzymatique à différentes concentrations d'oxaloacétate, ensuite on procède à la mesure de l'activité enzymatique restante en présence de 12mM de L-malate.

La courbe d'inhibition de l'oxydation du L-malate par l'oxaloacétate est représentée sur la figure 20.

Cette courbe permet de déterminer la valeur approximative du K'_{50} apparent pour l'oxaloacétate, cette valeur est de l'ordre de 3mM.

Nous avons également effectué l'inhibition de l'oxydation du L-malate par le D-malate. Les résultats sont représentés sur la figure 20. Le D-malate inhibe l'oxydation du L-malate, cette inhibition est moins

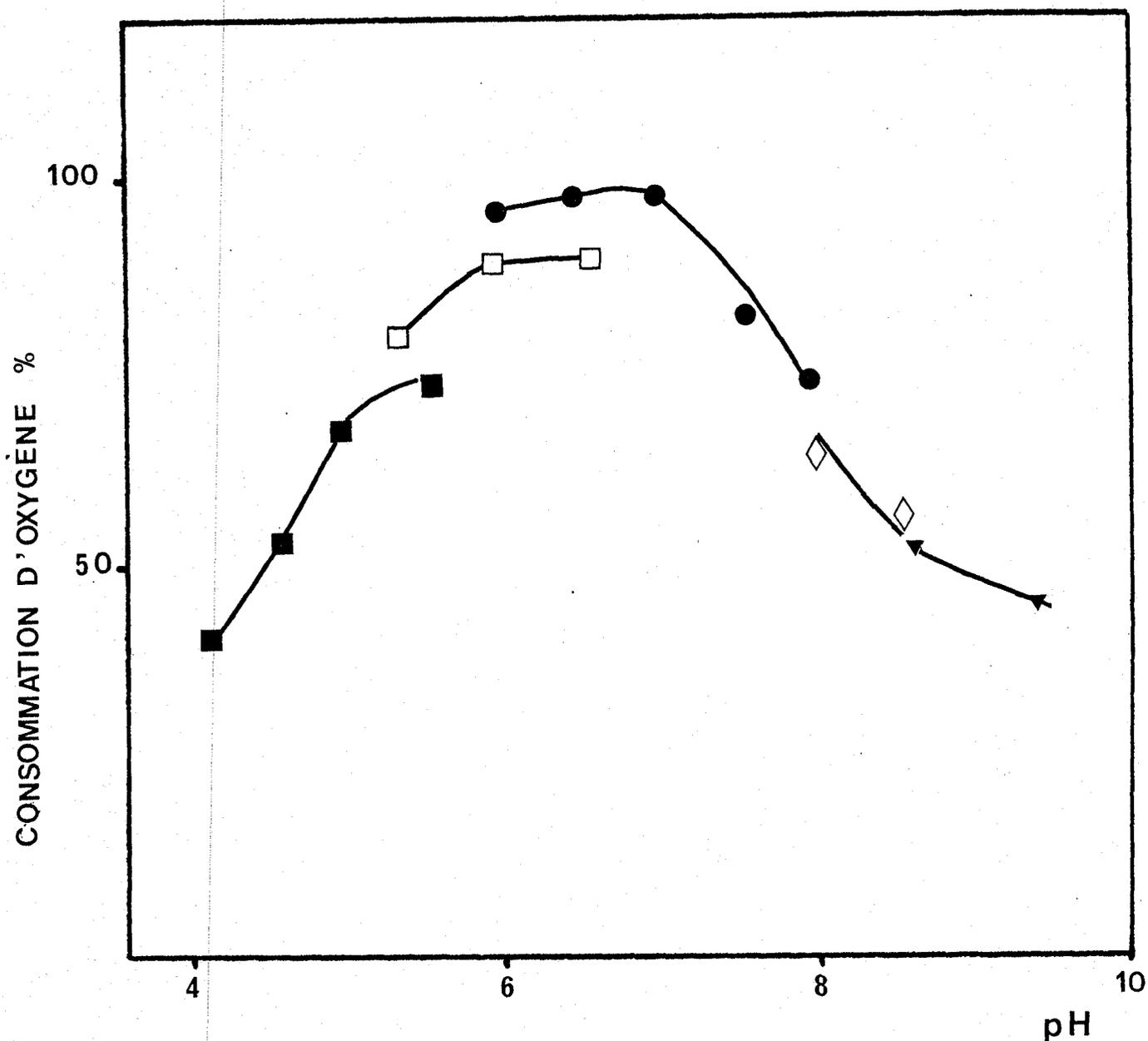


Figure 19 : Effet du pH sur la respiration du L-malate.

Les différents tampons sont utilisés à la concentration de 100mM :
Acétate de sodium ■—■ Maléate (maléate de sodium + anhydride maléique) □—□ Phosphate de potassium ●—● tris (tris hydroxyméthyl) aminométhane ◇—◇ glycine NaOH ▼—▼

La respiration du L-malate est mesurée par l'électrode enzymatique (L-malate 50mM). Avant chaque mesure l'électrode est équilibrée pendant 5mn avec le tampon de mesure. Les résultats sont exprimés en pourcentage (le 100% correspond à la valeur obtenue avec le tampon phosphate 0,1M pH 7).

efficace que celle de l'oxaloacétate puisque la valeur du K'_{50} apparent est de 30mM.

5. Sensibilité de l'électrode et domaine de dosage du L-malate.

La sensibilité de l'électrode à L-malate est fonction de la quantité d'enzymes au sein du polymère ainsi que du taux de glutaraldéhyde employé lors de la réalisation des films enzymatiques. La teneur en agent pontant change les propriétés physiques du revêtement, et surtout s'ajoute l'effet dénaturant du glutaraldéhyde sur l'activité enzymatique par modification chimique de l'enzyme ou atteinte des sites actifs.

Le domaine du dosage du L-malate est donné par la courbe de calibration figure 17 qui montre la réponse de l'électrode à différentes concentrations de substrats. On remarque que le dosage du L-malate peut s'effectuer dans un domaine de concentration variant de 1mM à 30mM. Pour des concentrations supérieures à 30mM, il est nécessaire de diluer l'échantillon.

La courbe d'étalonnage permet également de déterminer la sensibilité de l'électrode à L-malate. En effet la concentration de substrat minimale et mesurable est de 1mM.

6. Stabilité.

Le problème de la stabilité est important dans la réalisation des électrodes à enzymes. L'immobilisation entraîne généralement une augmentation de la stabilité des enzymes (KLIBANOVA, M., 1979). Il faut distinguer entre la stabilité des films enzymatiques en fonctionnement et la stabilité en stockage.

- Stabilité en fonctionnement :

Nous avons effectué une série de mesures au cours du temps sur un seul film enzymatique, l'activité respiratoire du malate est réalisée dans le tampon phosphate 0,2M pH 7 (figure 21). La réponse de l'électrode est stable pendant environ 8 heures. On peut estimer l'erreur relative faite sur les mesures à moins de 5%. Au delà de huit heures, l'activité respiratoire du L-malate diminue légèrement et de façon progressive. Cette inactivation est de nature complexe. On peut penser que l'une des causes primordiales de cette inactivation est l'accumulation au cours du temps de l'oxaloacétate (produit de la réaction d'oxydation du L-malate) et ceci malgré plusieurs lavages du film enzymatique après chaque mesure.

L'inactivation en fonctionnement peut être dûe également à la production de substances toxiques pendant la réaction enzymatique d'oxydation. On pourrait penser aux dérivés toxiques de l'oxygène, les ions superoxydes. La nature de ces dérivés ainsi que leur mode d'action sur l'enzyme sont encore mal connus.

- Stabilité en stockage :

Les films enzymatiques sont conservés dans le tampon phosphate 50mM, de la lysine 50mM et de l'azide 0,5mM à 4°C. L'activité respiratoire du L-malate est testée à intervalles réguliers. Nous avons observé tout d'abord que les films enzymatiques ne se désagrègent pas. Nous avons constaté également que l'enzyme en stockage s'inactive moins vite que l'enzyme en fonctionnement. Le temps de demi-vie est de 40 heures environ.

Les expériences de stabilité ont été réalisées sans recherches particulières d'optimisation.

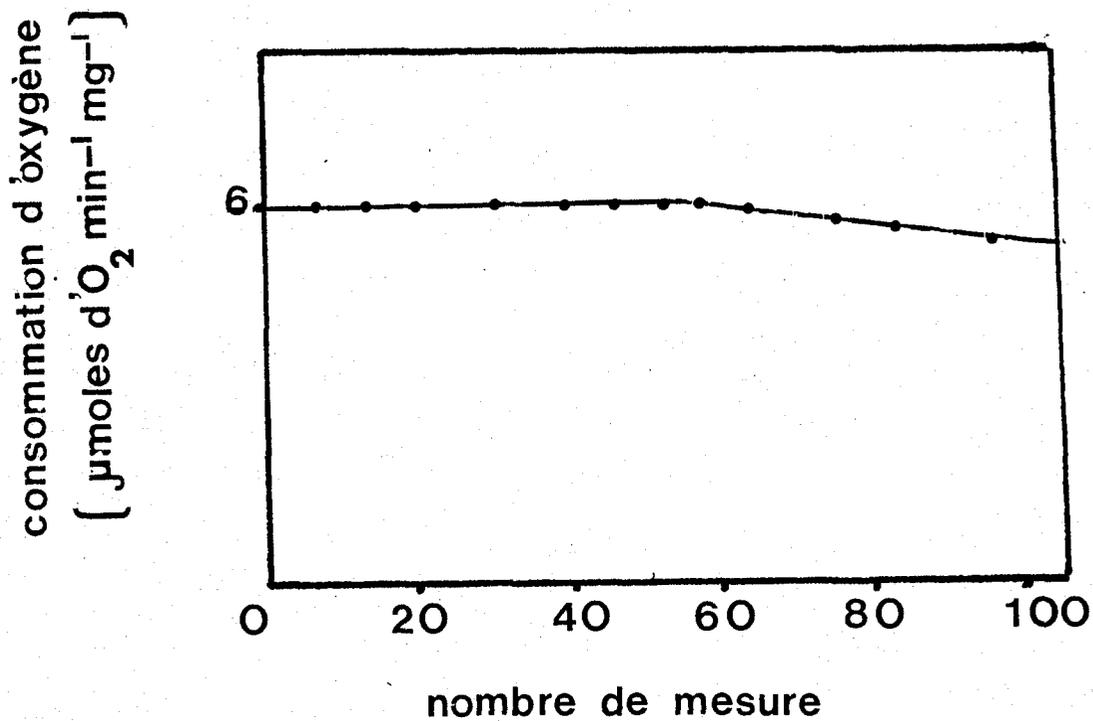


Figure 21 : Stabilité en fonctionnement du film enzymatique des bactéries entières D-L-malate.

Les mesures sont effectuées en tampon phosphate de potassium 200mM pH 7, à 30°C.

Le L-malate est présent à la concentration de 30mM.

7. Avantages de l'électrode à L-malate.

L'utilisation de la chaîne respiratoire d'*Escherichia coli* pour le dosage du L-malate présente de nombreux avantages :

- la réaction d'oxydation du L-malate ne nécessite pas de cofacteurs.
- l'étape de purification de l'enzyme n'est pas nécessaire grâce au développement des méthodes d'immobilisation des bactéries entières.
- l'échantillon à doser peut être brut. La turbidité ne perturbe pas la diffusion de l'oxygène mesuré.
- la gamme des concentrations de L-malate pour laquelle l'électrode peut être utilisée est le plus souvent compatible avec les échantillons biologiques.
- le dosage de L-malate peut s'effectuer en ligne.

8. Place de la respiration du L-malate par rapport aux autres substrats de la chaîne respiratoire.

La chaîne respiratoire d'*Escherichia coli* est un système multienzymatique capable de catalyser la transformation de familles de composés (figure 2).

Une première sélection est réalisée par la culture des bactéries sur différentes sources de carbone, elle permet d'obtenir une activité respiratoire du L-malate cinq fois plus grande dans des bactéries cultivées sur D-L-malate que les autres cultures.

D'autre part l'utilisation des bactéries entières permet d'éliminer certaines réactions contaminantes telles que la respiration du NADH et du NADPH. En effet la membrane plasmique des bactéries entières est imperméable à ces substrats.

Par ailleurs nous n'avons pas observé de réponse de l'électrode enzymatique en présence de pyruvate, d'oxaloacétate et de glycérol, néanmoins les bactéries entières cultivées sur D-L-malate et

immobilisées en gélatine présentent certaines activités respiratoires supplémentaires (tableau 11), la plus importante est celle de l'oxydation du D- et du L-lactate, ceci présente un avantage dans la mesure où cette électrode permet le dosage du D-L-lactate dans le yaourt.

Le vin contient du L-malate et du L-lactate, et les activités respiratoires de ces deux substrats sont additives. Pour le dosage du L-malate dans le vin, il est nécessaire d'utiliser en plus de l'électrode à L-malate, l'électrode enzymatique à L-lactate (mise au point dans notre laboratoire par Elisabeth Adamowicz, 1985).

Tableau 11 : Place de la respiration du L-malate par rapport aux autres substrats de la chaîne respiratoire.

Substrats	Activité respiratoire des bactéries D-L-malate %
L-Malate	100
Pyruvate	0
Glycérol	0
D-lactate	40
L-Lactate	40
NADH	2

DISCUSSION GENERALE

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que la β -galactosidase de l'extrait brut d'*Escherichia coli*, inactivée par la chaleur pouvait être réactivée à 75% après traitement à l'urée 8M suivi d'une dialyse avec du tampon. Ce rendement de réactivation est intéressant:

- il s'agit d'un extrait brut qui, en plus de la β -galactosidase, contient toutes les protéines membranaires et solubles de la bactérie et pendant le traitement thermique toutes les protéines se déroulent et s'agrègent de façon hétérologue. A cause de cela on peut s'attendre à ce que ces protéines complètement dénaturées par la chaleur soient plus difficiles à réactiver, par l'urée suivi d'une dialyse avec du tampon, que les protéines purifiées. La présence de l'urée permet aux chaînes peptidiques de se désagréger ce qui est favorable à leur réarrangement homologue et même dans un extrait brut, après dialyse dans le tampon la β -galactosidase récupère son activité.

L'utilisation d'un extrait brut est préférable en technologie enzymatique. Elle évite les étapes coûteuses de purification des enzymes.

Des études antérieures au travail présenté ont montré que la β -galactosidase d'*Escherichia coli* purifiée est régénérée à 100% après inactivation thermique et passage dans l'urée et dialyse (ULLMANN, A. *et al.*, 1969). Si les enzymes purifiés ont permis d'améliorer la connaissance des constituants et des mécanismes moléculaires, la faible stabilité et le coût élevé de ces préparations purifiées limitent leurs applications.

Nous avons montré également que la β -galactosidase immobilisée en présence de gélatine par le glutaraldéhyde (0,25%) perd son activité par chauffage et la régénération est maximale après traitement à l'urée et

lavage avec du tampon. Cette réactivation est obtenue en moins de deux heures.

L'utilisation de la β -galactosidase à l'état immobilisé présente plusieurs avantages :

- elle est stable à la température, son inactivation nécessite un chauffage plus important.
- elle est possible à réaliser.
- la réactivation est rapide après lavages successifs avec l'urée et le tampon.

ALEXANDER, M. *et al.* 1978 ont montré que la trypsine immobilisée et inactivée par la température peut être réactivée totalement après plusieurs heures de lavage.

Ces résultats sur la trypsine ne sont pas très différents de ceux que nous avons obtenus sur la β -galactosidase, nous constatons qu'il est aussi facile de réactiver un enzyme oligomérique qu'un enzyme monomérique.

Dans la seconde partie nous avons pu augmenter l'activité de la flavoprotéine spécifique de l'oxydation du L-malate, par la culture des bactéries *Escherichia coli* sur milieu minimum en présence de D-L-malate comme seule source de carbone.

La mesure de la consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire ne nécessite, à part le L-malate, aucune addition de cofacteurs (NAD^+ , NADP^+), de coenzyme (FAD, FMN) ni même d'accepteur de protons exogènes tel que le ferricyanure.

La flavoprotéine spécifique au L-malate fait partie d'un système multienzymatique : la chaîne respiratoire. Le cassage mécanique des bactéries D-L-malate entraîne la solubilisation de cette flavoprotéine et donc une perte d'activité enzymatique.

D'autre part, nous avons utilisé l'immobilisation comme un moyen,

par couplage avec un capteur électrochimique, de créer un outil d'analyse : une électrode à enzyme. Le film enzymatique préparé est utilisé pour le recouvrement de l'électrode à oxygène (électrode de Clark). L'utilisation de film de polypropylène perméable à l'oxygène rend les mesures sélectives et l'électrode se trouve ainsi protégée des ions et des protéines. La gélatine présente une forte affinité pour l'oxygène, son utilisation rend les mesures partiellement indépendantes de la concentration d'oxygène dans le milieu extérieur.

La flavoprotéine à L-malate est très sensible au glutaraldéhyde. Ceci peut constituer un moyen de s'en débarrasser dans un système enzymatique possédant l'activité malate comme réaction contaminante. Nous avons établi les conditions optimales d'obtention d'un film enzymatique actif et possédant en même temps des qualités physiques acceptables, ceci nous a permis de déterminer le K_{50} apparent ($K_{50}=6\text{mM}$) pour le système L-malate, cette valeur n'est qu'approximative, elle dépend particulièrement de la façon avec laquelle les films enzymatiques sont préparés. Il est nécessaire d'établir une courbe de calibration pour chaque nouveau film enzymatique avant de commencer les dosages dans les milieux biologiques.

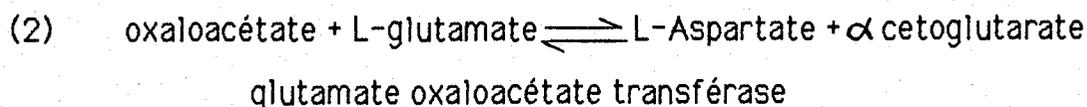
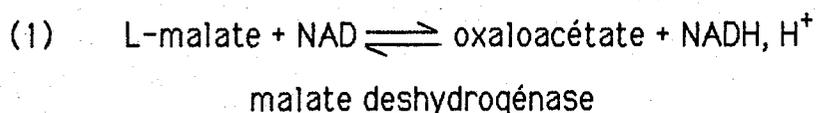
Le D-malate et l'oxaloacétate inhibent de façon réversible l'oxydation du L-malate, ainsi l'utilisation classique d'une électrode enzymatique à L-malate se trouve élargie avec la possibilité de mesurer l'activité inhibitrice de ces molécules.

L'utilisation d'un capteur associé à un enzyme offre plusieurs avantages pratiques :

- Pas de consommation d'enzyme; l'enzyme est réutilisé.
- faible consommation de substrat pendant la mesure.
- possibilité d'utilisation dans les milieux troubles, la clarification de l'échantillon à doser n'est pas nécessaire.

L'électrode enzymatique à L-malate que nous avons développé pour la première fois pourrait s'ajouter aux nombreuses méthodes analytiques déjà existantes.

Une malate déshydrogénase à NAD, actuellement commercialisée, est utilisée pour le dosage du L-malate dans certains milieux biologiques (jus de fruits et vin) selon la réaction :



On constate que cette réaction nécessite le NAD et un autre enzyme: la glutamate oxaloacétate transférase qui, en présence de L-glutamate et d'oxaloacétate tire la réaction vers la formation de l'aspartate et le NADH, H⁺. Ce dernier est dosé par spectrophotométrie et sa concentration est proportionnelle à celle du L-malate dans le milieu réactionnel.

Il serait intéressant de coimmobiliser ces enzymes et les comparer avec notre système.

La poursuite de ce travail devra porter sur l'utilisation pratique de l'électrode enzymatique à L-malate, notamment dans l'industrie de la fermentation.

En effet la concentration de L-malate doit être suivie pendant la fabrication du vin, puis pendant son vieillissement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADACHI, S., TANABE, S. and HASHIMOTO, K. 1984.
Biotechnol. Bioeng., 26, 635-639.

- ADAMOWICZ, E. 1985.
Thèse d'Ingénieur C.N.A.M.

- AIZAWA, M. 1983.
In Proceedings of the International Meeting on Chemical Sensors.
(Seiyama, T., Fueki, K., Shiokawa, J. and Suzuki, S.) 683-692.

- ALEXANDER, M., KLIBANOV, M. 1978.
Biochem. Biophys. Res. Com. Vol. 83, N°3, 1012.

- BERJONNEAU, A.M., THOMAS, D. and BROUN, G. 1974.
Path. Biol., 22, 497-502.

- BOITIEUX, J.L., DESMET, G. and THOMAS, D. 1978.
Clin. Chim. Acta., 88, 329-336.

- BLAEDEL, W.J. and ENGSTROM, R.C. 1980.
Anal. Chem., 52 1691-1697.

- BRAGG, P.D. 1980.
In Diversity of bacterial respiratory systems (Konwels, C.J. ed.) Vol. 1
CRC Press, Inc. Boca Katon, Florida 115-136.

- BROUN, G., THOMAS, D., GELF, G., DOMURADO, D., BERJONNEAU, A.M. and GUILLON, C. 1973.
Biotechnol. Bioeng., 15, 359-375.
- BUNTING, P.S. and LAIDER, K.J. 1973.
Can. J. Biochem., 51, 1598-1603.
- BURSTEIN, C., ADAMOWICZ, E., BOUCHERIT, K., RABOUILLE, C. and ROMETTE, J.L. 1985.
Appl. Biochem. and Biotechnol. Vol. 11, N°5.
- CHANG, T.M.S. 1976.
Biomedical applications of immobilized enzymes and proteins Vol. I,
Edit. Chang T.M.S. Plenum Press, New-York.
- CHARLES, M., COUGHLIN, R.W., ALLEN, B.R., PARUCHURI, E.K. and HASSELBERGER, F.X. 1976.
Adv. Exp. Med. Biol., 42, 213-234.
- CHARLES, M., COUGHLIN, R.W., PARUCHURI, E.K., ALLEN, B.R. and HASSELBERGER, F.X. 1975.
Biotechnol. Bioeng., 17, 203-210.
- CORDONNIER, M., LAWNY, F., CHAPOT, D. and THOMAS, D. 1975.
FEBS Letters, 59, 263-267.
- CLARK, L.C. and LYONS, C. 1962.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 102, 29-45.

- DAHLQVIST, A. and LINDQUIST, B. 1971.
Acta Paediat. Scand., 60, 488-494.

- DAHLQVIST, A., MATTIASSON, B. and MOSBACH, K. 1973.
Biotechnol., Bioeng., 15, 395-402.

- ENFORS, S.O. and CLELAND, N. 1982.
Proceedings of the International Meeting on Chemical Sensors
(Seiyama, T., Fueki, K., Shiokawa, J. and Suzuki, S.) 672-676.

- FRANCIS, M.J.O. and PHIZACKERLEY, P.J.R. 1963.
Proceedings of the Biochemical Society. 25p.

- FRIBOULET, A. 1980.
Thèse de 3^{ème} cycle, Compiègne.

- FUTAI, M. 1974.
J. Membrane Biol., 15, 15-28.

- FUTAI, M. and KIMURA, H. 1977.
J. Biol. Chem., 252, 5820-5827.

- GOUGH, D.A. and ANDRADE, J.D. 1973.
Science, 180, 380-384.

- GUILBAULT, G.G. and HRABANKOVA, E. 1970.
Anal. Chem., 42, 1779.

- GUILBAULT, G.G. and SHU, F. 1972.
Anal. Chem., 44, 2161.
- GUILBAULT, G.G. 1982.
Appl. Biochem. Biotechnol., 7, 85-98.
- GUILBAULT, G.G. and COULET, P.R. 1983.
Anal. Chim. Acta., 152, 223-228.
- HAVAS, J. and GUILBAULT, G.G. 1982.
Anal. Chem., 54, 1991-1997.
- HAYNES, R. and SIEGELMAN, F.L. 1971.
Clin. Chem., 17, 62-67.
- HIKUMA, M., OBANA, H., YASUDA, T., KARUBE, I. and SUZUKI, S. 1980.
Anal. Chim. Acta., 116, 61-67.
- HINKLE, P.C. and McCARTY, R.E. 1978.
Scientific american, 238, 104-123.
- HUGHES, A., SUREE, N. and SANWAL, B.D. 1978.
Biochem., Biophys. Res. Com., Vol. 83, N°2, 421-426.
- HYRKAS, K., VISKARI, R., LINKO, Y.Y. and LINKO, M. 1976.
Milchwissenschaft, 31, 3, 129-134.
- INGLEDEW, W.J. and POOLE, R.K. 1984.
Microbial. Reviews, 48, 222-271.

- IWAI, K. and BRODIE, A.F. 1973.
J. Biol. Chem., 248, 7487-7494.
- JOHANSON, G. and OGREN, L. 1976.
Anal. Chim. Acta., 84, 23-29.
- JOHN, W. TEIPEL and KOSHLAND, Jr.D.E. 1971.
Biochemistry, Vol. 10, 792.
- KARUBE, I., MATSUNAGA, T. and TERAOKA, N. 1980.
Anal. Chim. Acta. 119, 271-276.
- KARUBE, I., MATSUNAGA, T., NAKAHARA, T. and SUZUKI, S. 1981.
Anal. Chem., 53, 1924-1026.
- KATCHALSKI, E., SILMAN, I. and GOLDMAN, R. 1971.
Adv. Enzymology, 34, 445-536.
- KLIBANOV, M., MATINEK, K., GOLMACHER, V.S. and BEREZIN, I.V. 1975.
FEBS Letters, 51, 152.
- KOZO YAMAMOTO, TETSUYA, T., KIYOKZU, Y. 1976.
European J. Appl. Microbiol., 3, 169-183.
- LESSIER, M.A. and BRIERLY, G.P. 1969.
In Methods of Biochemical Analysis, 17, 1-29.
Ed. Glik, D. Interscience Publishers.

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. 1951.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

- MAEDA, H. and SUZUKI, H. 1977.
Process. Biochem., 12, 6, 9-12.

- MASCINI, M. and PALLESCHI, G. 1983.
Anal. Chim. Acta., 145, 213-217.

- MATSUNAGA, T., KARUBE, I., TERAOKA, N. and SUZUKI, S. 1981.
Anal. Chim. Acta, 127, 245-249.

- MESSING, R.A. 1975.
"Immobilized enzymes for industrial reactors" Edit. Messing R.A.
Academic Press, New-York.

- MONSAN, P., PUZO, G. and MAZARGUIL, H. 1975.
Biochimie, 57, 1281-1292.

- MOSBACH, K., 1976a.
FEBS Letters, 62, Supplement E 80 - E 95.

- MOSBACH, K. 1976b.
"Immobilized enzymes, Vol. 44, Edit. Mosbach K., Academic Press,
New-York.

- OLSON, A.C. and STANLEY, W. 1973.
J. Agr. Food. Chem., 21, 3, 440-445.

- PAPASTATHOPOULOS, D.S. and RECHNITZ, G.A. 1976.
Anal. Chem., 48, 862-864.

- PYE, E.K. and WINGARD, B.L. 1973.
"Enzyme Engineering" Vol. 2, Edit. Pye E.K. and Wingard B.L., Plenum Press, New-York.

- QUENNESSON, J.C. and THOMAS, D. 1977.
French Patent N°7715, 616.

- ROMETTE, J.L., GELF, G. and THOMAS, D. 1977.
French Patent N°7715, 615.

- ROMETTE, J.L., FROMENT, B. and THOMAS, D. 1979.
Clin. Chim. Acta., 95, 249-253.

- ROMETTE, J.L. 1980.
Thèse de 3^{ème} cycle, Université de Technologie de Compiègne.

- SANWAL, B.D. and SMANDO, R. 1969.
J. Biol., Chem., Vol. 244, N°7, 1824-1830.

- SCHUBERT, F., SCHELLER, F. and KIRSTEIN, D. 1982.
Anal. Chim. Acta., 141, 15-21.

- SHARP, A.K., KAY, G. AND LILLY, M.D. 1969.
Biotechnol. Bioeng., 11, 363-380.

- SUREE, N.A., HUGUES, G. and BISHNU, D.S. 1979.
J. Biol. Chem., Vol. 254, N°5, 1540-1545.

- TAKATA, J., YAMAMOTO, K., TOSA, T. and CHIBATA, I. 1979.
European J. Appl. Microbiol., 7, 161-172.

- THOMAS, D. 1972.
Biochimie. Extrait du tome 54, N°2, p. 229.

- THOMAS, D., BROUN, G., BOURDILLON, C. and KERNEVEZ, J.P. 1974.
Biochemistry, 13, 2995.

- TOBARI, J. 1964.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 50-54.

- TRAN, N.D., ROMETTE, J.L. and THOMAS, D. 1983.
Biotechnol. Bioeng., 15, 329-340.

- ULLMANN, A., JACOB, F. and MONOD, J. 1968.
J. Mol. Biol., 32, 1.

- ULLMANN, A. and MONOD, J. 1969.
Biochem., Biophys. Res. Com., Vol. 35, N° 1, 35.

- UPDIKE, J. and HICKS, G.D. 1967.
Nature, 214, 986-988.

- WATANEBE, E., TOYAMA, K., KARUBE, I., MATSUOKA, H. and SUZUKI, S.
1984.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 18-22.

- WINGARD, L.B., KATCHALSKI-KATZIR, E. and GOLDSTEIN, L. 1976.
"Applied Biochemistry and Bioengineering"
Vol. I, Immobilized enzyme principles. Academic Press, New York.

- ZABORSKY, O.R. 1973.
"Immobilized enzymes" Edit. Zarosky O.R., CRS Press, Cleveland-Ohio.