



HAL
open science

Catalyse enzymatique en phase hétérogène. Transfert de chaleur et de matière sous champ électrique. Application aux capteurs et à l'optimisation des réacteurs

Didier Vallin

► To cite this version:

Didier Vallin. Catalyse enzymatique en phase hétérogène. Transfert de chaleur et de matière sous champ électrique. Application aux capteurs et à l'optimisation des réacteurs. Biophysique [physics.bioph]. Institut National Polytechnique de Grenoble - INPG, 1984. Français. NNT: . tel-01044852

HAL Id: tel-01044852

<https://theses.hal.science/tel-01044852>

Submitted on 24 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE
SCIENTIFIQUE ET MEDICALE

L'INSTITUT
NATIONAL POLYTECHNIQUE

DE GRENOBLE

pour obtenir

Le Grade De DOCTEUR D'ETAT ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Didier VALLIN

CATALYSE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE.

**TRANSFERT DE CHALEUR ET DE MATIERE SOUS
CHAMP ELECTRIQUE.**

**APPLICATION AUX CAPTEURS ET A L'OPTIMISATION
DES REACTEURS.**

Soutenue le 14 Décembre 1984 devant la Commission d'Examen

JURY

Monsieur

M. CHEMLA

Président

Messieurs

L. BONNETAIN
J.P. GABANO
C. GAVACH
J.C. HEALY
E. SELEGVY
C. TRAN-MINH

Examineurs

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE
SCIENTIFIQUE ET MEDICALE

L'INSTITUT
NATIONAL POLYTECHNIQUE

DE GRENOBLE

pour obtenir

Le Grade De DOCTEUR D'ETAT ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Didier VALLIN

CATALYSE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE.

**TRANSFERT DE CHALEUR ET DE MATIERE SOUS
CHAMP ELECTRIQUE.**

**APPLICATION AUX CAPTEURS ET A L'OPTIMISATION
DES REACTEURS.**

Soutenu le 14 Décembre 1984 devant la Commission d'Examen

JURY

Monsieur

M. CHEMLA

Président

Messieurs

L. BONNETAIN
J.P. GABANO
C. GAVACH
J.C. HEALY
E. SELEGNY
C. TRAN-MINH

Examineurs



INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE

Présidents: Daniel BLOCH

Année universitaire 1983-1984

Vice-Présidents: René CARRE
Hervé CHERADAME
Jean-Pierre LONGQUEUE

Professeur des Universités

ANCEAU	François	E.N.S.I.M.A.G	JOUBERT	Jean-Claude	E.N.S.I.E.G
BARIBAUD	Michel	E.N.S.E.R.G	JOURDAIN	Geneviève	E.N.S.I.E.G
BARRAUD	Alain	E.N.S.I.E.G	LACOUME	Jean-Louis	E.N.S.I.E.G
BAUDELET	Bernard	E.N.S.I.E.G	LATOMBE	Jean-Claude	E.N.S.I.M.A.G
BESSON	Jean	E.N.S.E.E.G	LESIEUR	Marcel	E.N.S.H.G
BLIMAN	Samuel	E.N.S.E.R.G	LESPINARD	Georges	E.N.S.H.G
BLOCH	Daniel	E.N.S.I.E.G	LONGQUEUE	Jean-Pierre	E.N.S.I.E.G
BOIS	Philippe	E.N.S.H.G	LOUCHET	François	E.N.S.E.E.G
BONNETAIN	Lucien	E.N.S.E.E.G	MASSELOT	Christian	E.N.S.I.E.G
BONNIER	Etienne	E.N.S.E.E.G	MAZARE	Guy	E.N.S.I.M.A.G
BOUVARD	Maurice	E.N.S.H.G	MOREAU	René	E.N.S.H.G
BRISSONNEAU	Pierre	E.N.S.I.E.G	MORET	Roger	E.N.S.I.E.G
BUYLE BODIN	Maurice	E.N.S.E.R.G	MOSSIÈRE	Jacques	E.N.S.I.M.A.G
CAVAIGNAC	Jean-François	E.N.S.I.E.G	PARIAUD	Jean-Charles	E.N.S.E.E.G
CHARTIER	Germain	E.N.S.I.E.G	PAUTHENET	René	E.N.S.I.E.G
CHENEVIER	Pierre	E.N.S.E.R.G	PERRET	René	E.N.S.I.E.G
CHERADAME	Hervé	U.E.R.M.C.P.P	PERRET	Robert	E.N.S.I.E.G
CHERUY	Arlette	E.N.S.I.E.G	PIAU	Jean-Michel	E.N.S.H.G
CHIAVERINA	Jean	U.E.R.M.C.P.P	POLOUJADOFF	Michel	E.N.S.I.E.G
COHEN	Joseph	E.N.S.E.R.G	POUPOT	Christian	E.N.S.E.R.G
COUMES	André	E.N.S.E.R.G	RAMEAU	Jean-Jacques	E.N.S.E.E.G
DURAND	Francis	E.N.S.E.E.G	RENAUD	Maurice	U.E.R.M.C.P.P
DURAND	Jean-louis	E.N.S.I.E.G	ROBERT	André	U.E.R.M.C.P.P
FELICI	Noël	E.N.S.I.E.G	ROBERT	François	E.N.S.I.M.A.G
FONLUPT	Jean	E.N.S.I.M.A.G	SABONNADIÈRE	Jean-Claude	E.N.S.I.E.G
FOULARD	Claude	E.N.S.I.E.G	SAUCIER	Gabrielle	E.N.S.I.M.A.G
GANDINI	Alessandro	U.E.R.M.C.P.P	SCHLENKER	Claire	E.N.S.I.E.G
GAUBERT	Claude	E.N.S.I.E.G	SCHLENKER	Michel	E.N.S.I.E.G
GENTIL	Pierre	E.N.S.E.R.G	SERMET	Pierre	E.N.S.E.R.G
GUERIN	Bernard	E.N.S.E.R.G	SILVY	Jacques	U.E.R.M.C.P.P
GUYOT	Pierre	E.N.S.E.E.G	SOHM	Jean-Claude	E.N.S.E.E.G
IVANES	Marcel	E.N.S.I.E.G	SOUQUET	Jean-Louis	E.N.S.E.E.G
JALINIER	Jean-Michel	E.N.S.I.E.G	VEILLON	Gérard	E.N.S.I.M.A.G
JAUSSAUD	Pierre	E.N.S.I.E.G	ZADWORNÝ	François	E.N.S.E.R.G

Professeurs Associés

BLACKWELDER	Ronald	E.N.S.H.G	PURDY	Gary	E.N.S.E.E.G
HAYASHI	Hirashi	E.N.S.I.E.G			

Professeurs Université des Sciences Sociales (Grenoble II)

BOLLIET	Louis		CHATELIN	Françoise	
---------	-------	--	----------	-----------	--

Chercheurs du C.N.R.S

CARRE	René	Directeur de recherche	GUELIN	Pierre	Maître de recherche
FRUCHART	Robert	Directeur de recherche	HOPFINGER	Emil	Maître de recherche
JORRAND	Philippe	Directeur de recherche	JOD	Jean-Charles	Maître de recherche
VACHAUD	Georges	Directeur de recherche	KAMARINOS	Georges	Maître de recherche
ALLIBERT	Michel	Maître de recherche	KLEITZ	Michel	Maître de recherche
ANSARA	Ibrahim	Maître de recherche	LANDAU	Ioan-Dore	Maître de recherche
ARMAND	Michel	Maître de recherche	LASJAUNIAS	Jean-Claude	Maître de recherche
BINDER	Gilbert	Maître de recherche	MERMET	Jean	Maître de recherche
BORNARD	Guy	Maître de recherche	MUNIER	Jacques	Maître de recherche
DAVID	René	Maître de recherche	PIAU	Monique	Maître de recherche
DEPORTES	Jacques	Maître de recherche	PORTESEIL	Jean-Louis	Maître de recherche
DRIOLE	Jean	Maître de recherche	THOLENCE	Jean-Louis	Maître de recherche
GIGNOUX	Damien	Maître de recherche	VERDILLON	André	Maître de recherche
GIVORD	Dominique	Maître de recherche	SUERY	Michel	Maître de recherche

Personnalités habilitées à diriger des travaux de recherche
(Decision du Conseil Scientifique)

E.N.S.E.E.G.

ALLIBERT BERNARD BONNET CAILLET CHATILLON CHATILLON COULON	Colette Claude Roland Marcel Catherine Christian Michel	DIARD EUSTATHOPOULOS FOSTER GALERIE HAMMOU MALMEJAC MARTIN GARIN	Jean Paul Nicolas Panayotis Alain Abdelkader Yves (CENG) Régina	NGUYEN TRUONG RAVAINE SAINFORT SARRAZIN SIMON TOUZAIN URBAIN	Bernadette Denis (CENG) Pierre Jean Paul Philippe Georges (Laboratoire des ultra-réfractaires ODEILLO).
--	---	--	---	--	---

E.N.S.E.R.G.

BARIBAUD BOREL CHOVET	Michel Joseph Alain	CHEHIKIAN DOLMAZON	Alain Jean Marc	HERAULT MONLLOR	Jeanny Christian
-----------------------------	---------------------------	-----------------------	--------------------	--------------------	---------------------

E.N.S.I.E.G.

BORNARD DESCHIZEAUX GLANGEAUD	Guy Pierre François	KOFMAN LEJEUNE	Walter Gérard	MAZUER PERARD REINISCH	Jean Jacques Raymond
-------------------------------------	---------------------------	-------------------	------------------	------------------------------	----------------------------

E.N.S.H.G.

ALEMANY BOIS DARVE	Antoine Daniel Félix	MICHEL OBLED	Jean Marie Charles	ROWE VAUCLIN WACK	Alain Michel Bernard
--------------------------	----------------------------	-----------------	-----------------------	-------------------------	----------------------------

E.N.S.I.M.A.G.

BERT CALMET COURTIN	Didier Jacques Jacques	COURTOIS DELLA DORA	Bernard Jean	FONLUPT SIFAKIS	Jean Joseph
---------------------------	------------------------------	------------------------	-----------------	--------------------	----------------

U.E.R.M.C.P.P.

CHARUEL Robert

C.E.N.G.

CADET COEURE DELHAYE DUPUY	Jean Philippe (LETI) Jean Marc (STT) Michel (LETI)	JOUVE NICOLAU NIFENECKER	Hubert (LETI) Yvan (LETI) Hervé	PERROUD PEUZIN TAIEB VINCENDON	Paul Jean Claude (LETI) Maurice Marc
-------------------------------------	---	--------------------------------	---------------------------------------	---	---

Laboratoires extérieurs :

C.N.E.T.

DEMOULIN DEVINE	Eric R.A.B.	GERBER	Roland	MERCKEL PAULEAU	Gérard Yves
--------------------	----------------	--------	--------	--------------------	----------------

I.N.S.A. Lyon

GAUBERT C.

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE

Directeur : Monsieur M. MERMET
Directeur des Etudes et de la formation : Monsieur J. LEVASSEUR
Directeur des recherches : Monsieur J. LEVY
Secrétaire Général : Mademoiselle M. CLERGUE

Professeurs de 1ère Catégorie

COINDE	Alexandre	Gestion
GOUX	Claude	Métallurgie
LEVY	Jacques	Métallurgie
LOWYS	Jean-Pierre	Physique
MATHON	Albert	Gestion
RIEU	Jean	Mécanique - Résistance des matériaux
SOUSTELLE	Michel	Chimie
FORMERY	Philippe	Mathématiques Appliquées

Professeurs de 2ème catégorie

HABIB	Michel	Informatique
PERRIN	Michel	Géologie
VERCHERY	Georges	Matériaux
TOUCHARD	Bernard	Physique Industrielle

Directeur de recherche

LESBATS	Pierre	Métallurgie
---------	--------	-------------

Maîtres de recherche

BISCONDI	Michel	Métallurgie
DAVOINE	Philippe	Géologie
FOURDEUX	Angeline	Métallurgie
KOBYLANSKI	André	Métallurgie
LALAUZE	René	Chimie
LANCELOT	Francis	Chimie
LE COZE	Jean	Métallurgie
THEVENOT	François	Chimie
TRAN MINH	Canh	Chimie

Personnalités habilitées à diriger des travaux de recherche

DRIVER	Julian	Métallurgie
GUILHOT	Bernard	Chimie
THOMAS	Gérard	Chimie

Professeur à l'UER de Sciences de Saint-Etienne

VERGNAUD	Jean-Maurice	Chimie des Matériaux & chimie industrielle
----------	--------------	--



A ma femme

A mes enfants

A mes parents.

Ce travail a été effectué à l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, sous la Direction de Monsieur TRAN-MINH Canh, que je remercie pour avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire.

Que Monsieur CHEMLA, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie et Président de ce jury, ainsi que :

Monsieur Lucien BONNETAIN, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Electrochimie et d'Electrometallurgie de Grenoble

Monsieur Jean Claude HEALY, Professeur à l'U.E.R. de Médecine de Saint-Etienne

Monsieur Eric SELEGNY, Professeur à l'Université de Rouen

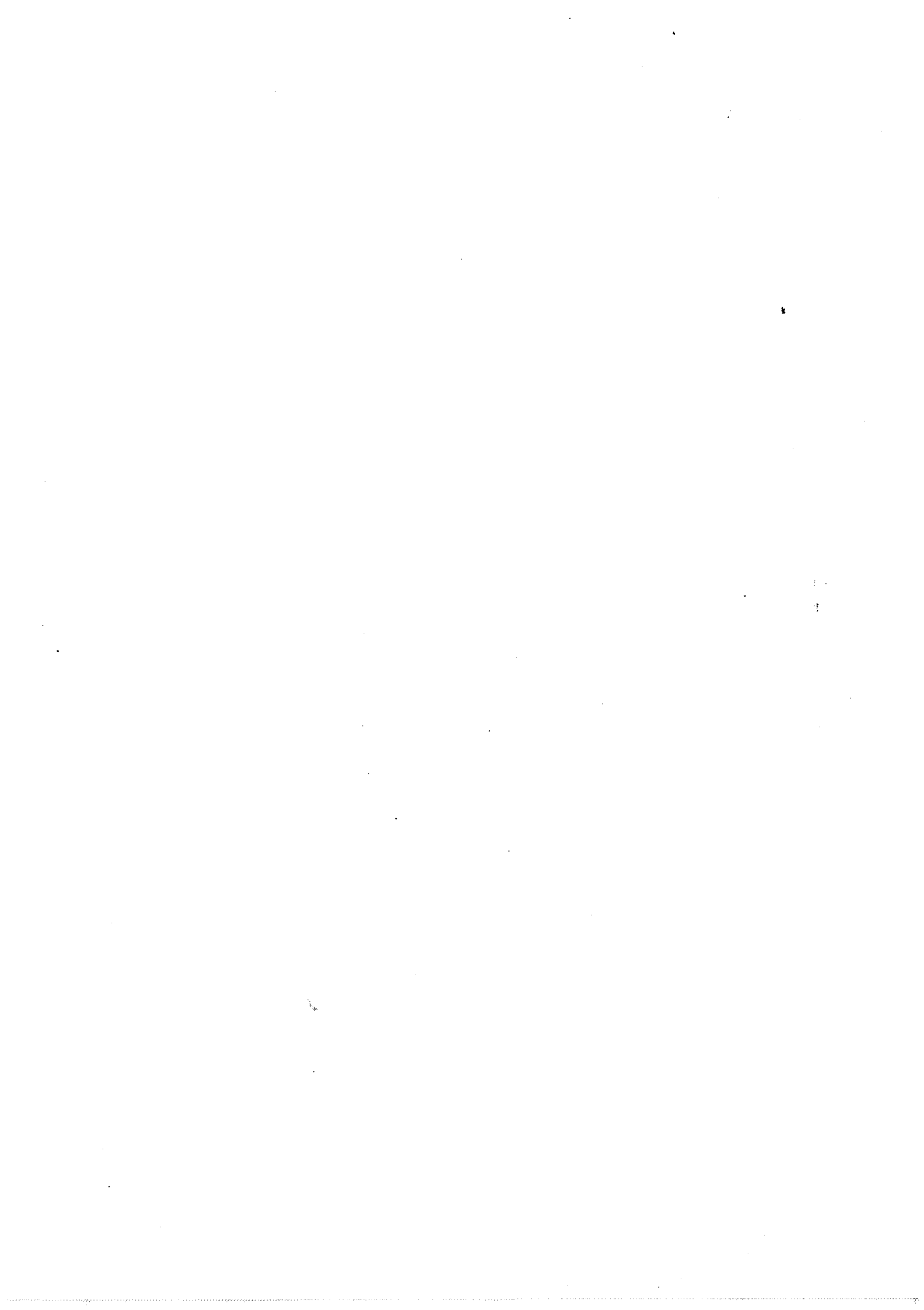
Monsieur Claude GAVACH, Maître de recherches au C.N.R.S.

Monsieur Jean Paul GABANO, Directeur Scientifique de la Société "SAFT Département Piles".

trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements pour avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à mes collègues du laboratoire pour l'ambiance qu'ils ont su créer, ainsi qu'à Mesdames CHAVANNE et MATHAIS pour la réalisation pratique de ce manuscrit.

PLAN DE L' ETUDE



Chapitre I : METHODOLOGIE D'ETUDE DES SYSTEMES ENZYMATIQUES

I- INTRODUCTION

II- CINETIQUE ENZYMATIQUE EN MILIEU HOMOGENE

- 1) EN ABSENCE DE REGULATION DU pH
- 2) REGULATION DU pH PAR ADJONCTION DE TITRANT

III- CINETIQUE ENZYMATIQUE EN MILIEU HETEROGENE EN PRESENCE D'UN CHAMP ELECTRIQUE

- 1) PARAMETRES REGISSANT LES PROFILS DE CONCENTRATION INTRAMEMBRANAIRE :
EQUATION DE DIFFUSION-REACTION-ELECTROMIGRATION
- 2) METHODE DE RESOLUTION ET HYPOTHESES
- 3) DIFFERENTES EXPRESSIONS DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE
 - a) *Vitesse de consommation de substrat*
 - b) *Vitesse d'apparition de produit*
 - c) *Vitesse d'adjonction de titrant*
- 4) METHODE GENERALE DE CALCUL
- 5) APPLICATIONS AUX SYSTEMES ENZYMATIQUES UTILISES
 - a) *Méthode d'immobilisation*
 - b) *Système urée/uréase*
 - c) *Système acétylcholine/acétylcholinestérase*
- 6) REMARQUES

IV- CINETIQUE ENZYMATIQUE EN MILIEU HETEROGENE ASSOCIEE A LA VARIATION D'ENTHALPIE DE LA REACTION ENZYMATIQUE

- 1) DESCRIPTION DES EQUATIONS
- 2) RESOLUTION ANALYTIQUE
- 3) REMARQUES



Chapitre II : UTILISATION DE LA VARIATION D'ENTHALPIE DES REACTIONS ENZYMATIQUES
POUR LA REALISATION DE CAPTEURS ENTHALPIMETRIQUES

I - INTRODUCTION

II - REALISATION D'UN CAPTEUR ENTHALPIMETRIQUE UTILISANT UNE THERMISTANCE
ASSOCIEE A UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE

- 1) DOSAGE DE L'EAU OXYGENEE
- 2) DOSAGE DU GLUCOSE
- 3) DOSAGE DE L'UREE
- 4) CONCLUSION

III - ETUDE DES PHENOMENES D'INHIBITION A L'AIDE DU CAPTEUR ENTHALPIMETRIQUE

- 1) INTRODUCTION
- 2) RESULTATS

IV - CONCLUSIONS

Chapitre III : TRANSFERT DE MATIERE DANS UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE :
INFLUENCE D'UN CHAMP ELECTRIQUE EXTERNE CONTINU

I - INTRODUCTION

II - ETUDE DU SYSTEME UREE/UREASE

1) ETUDE EXPERIMENTALE

- a) *Matériel et méthode*
- b) *Résultats*

- α) Influence de la concentration en sel de fond K_2SO_4
- β) Influence de la concentration en substrat
- γ) Influence du pH de la solution de substrat pH(0)
- δ) Etude cinétique comparée des compartiments anodique et cathodique

2) ETUDE MATHEMATIQUE

a) *Hypothèses*

b) *Résultats*

α) Densité de courant imposée nulle

α1) Influence du pH de la solution de substrat $\text{pH}(o)$

α2) Influence de la concentration en substrat $C_s(o)$

β) Densité de courant imposée non nulle

3) CONCLUSIONS

III - ETUDE DU SYSTEME ACETYLCHOLINE/ACETYLCHOLINESTERASE

1) ETUDE MATHEMATIQUE

a) *Hypothèses*

b) *Résultats*

α) Influence de la concentration en substrat $C_s(o)$

β) Influence de la concentration en sel de fond

γ) Influence de la concentration d'enzyme immobilisé

δ) Influence du pH de la solution de substrat $\text{pH}(o)$

2) ETUDE EXPERIMENTALE

a) *Matériel et méthodes*

α) Electrode enzymatique

β) Etude de l'influence d'une densité de courant

b) *Résultats*

3) CONCLUSIONS

IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS



Chapitre IV : ETUDES PROSPECTIVES

I - INTRODUCTION

II - INFLUENCE D'UNE DENSITE DE COURANT SUR LA LACTASE

- 1) INTRODUCTION
- 2) HYDROLYSE DU LACTOSE PAR LA SPHEROLACTASE
- 3) HYDROLYSE DU LACTOSE PAR LA LACTASE EN SOLUTION
- 4) REACTION D'IMMOBILISATION DE LA LACTASE SUR GRAINS DE SILICE ACTIVEE AU GLUTARALDEHYDE

III - INFLUENCE D'UNE DENSITE DE COURANT SUR LA REACTION D'IMMOBILISATION DE L'AMINOACYLASE SUR SUPPORT ECHANGEUR D'IONS

- 1) INTRODUCTION
- 2) ETUDE EXPERIMENTALE

IV - INFLUENCE DE LA CO-IMMOBILISATION DE GLUCOSE OXYDASE SUR LA CINETIQUE D'HYDROLYSE DU LACTOSE PAR UNE LACTASE IMMOBILISEE

- 1) INTRODUCTION
- 2) ETUDE EXPERIMENTALE

V - CONCLUSIONS

ANNEXES

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, la biotechnologie a connu un essor important en raison de la découverte d'un grand nombre d'enzymes. D'origine végétale, animale, ou microbienne, ces enzymes répondent aux besoins de différentes industries : agro-alimentaire, pharmaceutique, chimique ...

Les progrès récents de la microbiologie ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la synthèse des enzymes par les organismes vivants. Cette compréhension a débouché sur la production d'enzymes par fermentation, voie industriellement plus avantageuse que les processus extractifs.

Initialement, les propriétés catalytiques des enzymes en solution ont été utilisées dans des procédés discontinus où l'enzyme n'était pas récupéré. Compte tenu de leur prix de revient élevé, il est apparu intéressant d'immobiliser ces enzymes sur des supports insolubles, utilisables de façon répétée, dans des procédés continus donc plus économiques.

La pérennité de l'activité catalytique d'un enzyme immobilisé est liée au maintien de l'intégrité de sa conformation spatiale, en particulier au niveau de son "site actif". Les procédés d'immobilisation doivent dès lors, faire appel à des méthodes douces et contrôlées, les liaisons chimiques créées excluant les acides aminés impliqués directement dans la structure du site actif.

De nombreuses études concernant la nature des supports et les méthodes d'immobilisation [GUTCHO - 1974 ; WEETALL - 1975] ainsi que les propriétés des biocatalyseurs obtenus [LAIDLER et BUNTING - 1973] ont suivi les premiers travaux de KATCHALSKI dans ce domaine.

Le laboratoire dans lequel a été réalisé ce travail est spécialisé dans l'étude des capteurs enzymatiques, tant du point de vue théorique qu'expérimental. J. BEAUX [BEAUX et TRAN-MINH - 1979 ; TRAN-MINH et BEAUX - 1979 ; BEAUX - 1983] a mis en évidence les différents facteurs qui conditionnent la réponse de capteurs enzymatiques utilisés pour le dosage de substrats ou d'inhibiteurs. R. GUYONNET [1978] a mis au point des électrodes à acétylcholinestérase immobilisée pour le dosage d'inhibiteurs tels que pesticides, insecticides et métaux lourds. Ces différents travaux ont fait suite à ceux de C. TRAN-MINH

v. h. 28.29
x

x

[TRAN-MINH et col. - 1972 a,b ; TRAN-MINH et BROUN - 1973 ; TRAN-MINH et BROUN - 1975 ; BROUN et TRAN-MINH - 1977].

Afin de répondre aux applications potentielles des enzymes immobilisés, un effort décisif doit être porté sur les réacteurs biologiques. Deux des composantes principales de cet effort sont :

- la régulation des réacteurs. Ceci suppose des capteurs fiables, peu coûteux, permettant de suivre l'évolution de la concentration des différentes espèces présentes.

- l'optimisation de l'activité des enzymes immobilisés.

Le développement de l'énergie d'origine nucléaire devrait déboucher dans les prochaines années sur une utilisation croissante de l'électricité dans les processus chimiques. Il est par conséquent intéressant de connaître les conditions dans lesquelles un champ électrique peut interagir avec l'activité catalytique des enzymes immobilisés.

La première partie de ce travail concerne la réalisation et l'étude d'un capteur enzymatique qui utilise la variation d'enthalpie de la réaction enzymatique comme grandeur mesurable.

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence d'un champ électrique externe sur les propriétés catalytiques d'une membrane artificielle contenant un enzyme immobilisé.

L'étude expérimentale de l'influence d'une densité de courant imposée sur le comportement cinétique de deux enzymes (l'uréase et l'acétylcholinestérase) a été complétée par une étude théorique qui prend en compte les phénomènes de diffusion-réaction-électromigration des différentes espèces présentes au sein de la membrane, ainsi que le caractère acide ou basique des produits de réaction.

Enfin, la dernière partie de ce travail est consacrée à quelques essais d'application pratique, susceptibles de présenter un intérêt industriel.

CHAPITRE I

METHODOLOGIE D' ETUDE

DES SYSTEMES ENZYMATIQUES

CHAPITRE I

METHODOLOGIE D'ETUDE DES SYSTEMES ENZYMATIQUES

I - INTRODUCTION

Ce chapitre introduit l'ensemble des paramètres, notations et équations utilisés au cours de ce travail.

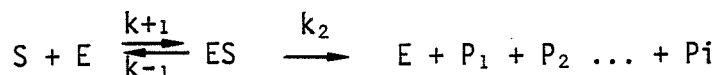
Dans un premier temps, nous présentons les lois de la cinétique enzymatique en milieu homogène, dans l'hypothèse d'un système mono-enzymatique michaelien. Dans un deuxième temps, nous développons les lois de la cinétique enzymatique en milieu hétérogène, associées à :

a) un terme d'électromigration des espèces ioniques sous l'action d'un gradient de potentiel électrique. La présence de produits de réaction acides ou basiques impose la prise en compte de l'influence du profil de pH intramembranaire sur les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique.

b) la variation d'enthalpie de la réaction chimique catalysée.

II - CINETIQUE ENZYMATIQUE EN MILIEU HOMOGENE

Considérons le schéma réactionnel classique d'un enzyme en solution en présence de son substrat :



Dans l'hypothèse d'une cinétique michaelienne, la vitesse de réaction (v) s'exprime par :

$$v = - \frac{dC_s}{dt} = + \frac{V_m C_s}{K_m + C_s} = + \frac{dC_{p_i}}{dt} \quad (1)$$

- C_s et C_{p_i} expriment respectivement la concentration de substrat et du produit P_i (en mole.dm⁻³ ou M).
- V_m la vitesse maximale de la réaction enzymatique (en mole.dm⁻³.s⁻¹) ;
- K_m la constante de Michaelis, c'est-à-dire la valeur de C_s pour laquelle $v = V_m/2$.

Les variations de V_m et K_m avec le pH, spécifiques de chaque enzyme, sont attribuables au caractère polyélectrolytique des poly α aminoacides constitutifs de la protéine [DIXON et WEBB - 1958].

Un nombre considérable d'études concernant les effets du pH sur les cinétiques de réaction enzymatique a été réalisé [TIPTON et DIXON - 1979]. Les expressions mathématiques qui décrivent les variations de V_m et K_m avec le pH sont en fait, une approche de la pH-dépendance effective de l'enzyme. La formulation de type diacide [GREGORY et KINDERLERER - 1980] prend en compte le caractère acide et basique faible des fonctions chimiques intervenant dans la nature du site actif de l'enzyme. Cette formulation est la suivante :

$$V_m^{pH} = V_m^{\circ} \cdot f \quad (2)$$

$$K_m^{pH} = K_m^{\circ} \cdot f' / f \quad (3)$$

où V_m° et K_m° correspondent respectivement à la vitesse et à la constante de Michaelis au pH de fonctionnement optimum de l'enzyme.

Les fonctions f et f' sont données par les relations suivantes :

$$f = 1 + K'a/C_H + C_H/K'b \quad (4)$$

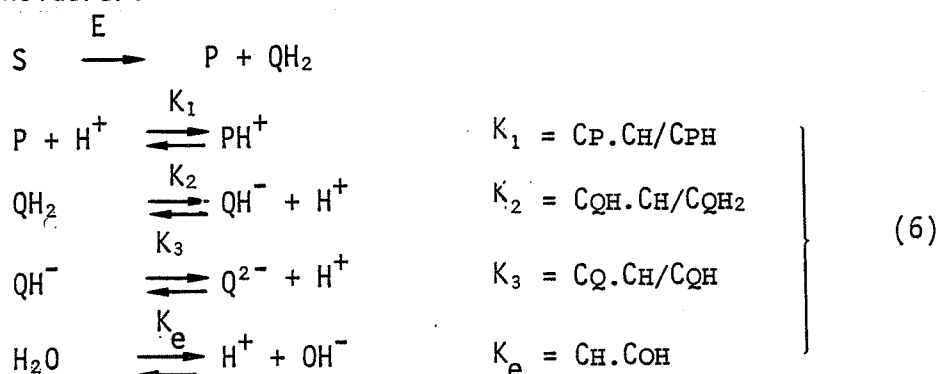
$$f' = 1 + K_a/C_H + C_H/K_b \quad (5)$$

où C_H représente la concentration en protons.

K_a , K_b , $K'a$ et $K'b$ sont des constantes spécifiques de chaque couple enzyme/substrat.

Dans le cadre de ce travail, une étude expérimentale des variations des constantes cinétiques V_m et K_m avec le pH pour l'uréase et l'acétylcholinestérase a été réalisée (annexe 1). Les fonctions mathématiques de pH-dépendance ont été déterminées pour donner une représentation purement phénoménologique des variations de V_m et K_m avec le pH.

Dans l'hypothèse où les produits de réaction sont constitués par une base faible P et un diacide faible QH₂, les équilibres et réactions suivants sont à considérer.



où C_P, C_{PH}, C_{QH}, C_{QH₂} et C_Q représentent les concentrations des différentes espèces produites par la réaction.

La réaction enzymatique a tendance à modifier le pH de la solution de substrat. Deux cas sont à considérer :

1°) En absence de régulation du pH

Le pH de la solution de substrat n'étant pas régulé, il y a rétroaction du pH sur la vitesse de réaction enzymatique [équations (2) et (3)]. Le pH de la solution est fonction du degré d'avancement de la réaction et des valeurs de K₁, K₂ et K₃.

La solution étant supposée homogène, il est possible, à tout moment d'écrire l'équation d'électroneutralité :

$$C_H + C_{PH} + C_B = C_{OH} + C_{QH} + 2 C_Q + 2 C_A \quad (7)$$

où C_A et C_B représentent les concentrations des ions A²⁻ et B⁺ correspondant à la présence d'un sel de fond B₂A entièrement dissocié.

En supposant que les espèces QH₂ et P n'apparaissent pas sous forme gazeuse nous écrivons :

$$C_{QH_2} + C_{QH} + C_Q = C_2 \quad (8)$$

$$C_P + C_{PH} = C_1 \quad (9)$$

En combinant ces deux équations avec les équations (6) et (7) nous obtenons :

$$C_H = \frac{2 + K_e/C_2 C_H + 2 C_A/C_2}{1/C_2 + C_1/C_2(C_H + K_1) + 2/(C_H + K_2 + K_2 K_3/C_H) + 1/(C_H + K_3 + C_H^2/K_2) + C_B/C_2 C_H} \quad (10)$$

En supposant C_1 et C_2 connus, il est possible de déterminer, par itération la valeur de C_H .

2°) Régulation du pH par adjonction de titrant

Le pH de la solution de substrat est maintenu constant, et la vitesse de réaction ne dépend que de la concentration en substrat.

Dans le cas où le pH est maintenu constant par adjonction d'une solution d'acide ou de base (technique du pH-stat) il est nécessaire de disposer d'une relation qui relie la vitesse d'adjonction de titrant à la vitesse de consommation de substrat.

Le pH de la solution étant constant, les produits de réaction P et QH_2 se mettent en équilibre avec la solution de substrat, conformément aux équations (6). Les vitesses de production des espèces PH^+ , QH^- et Q^{2-} s'expriment à partir des équations (6), (8), et (9) :

$$dC_{PH}/dt = dC_1/dt. (1 + K_1/C_H)^{-1} \quad (11)$$

$$dC_{QH}/dt = dC_2/dt. (1 + C_H/K_2 + K_3/C_H)^{-1} \quad (12)$$

$$dC_Q/dt = dC_2/dt. (1 + C_H/K_3 + C_H^2/K_2K_3)^{-1} \quad (13)$$

Le pH initial de la solution ($C_1 = C_2 = 0$) est fixé par les espèces A^{2-} et B^+ de concentrations respectives C_A et C_B constantes :

$$C_H = \left\{ -\Delta + (\Delta^2 + 4 Ke)^{1/2} \right\} / 2 \quad (14)$$

avec $\Delta = C_B - 2 C_A$

Le pH de la solution est maintenu constant, par conséquent :

$$dC_H/dt = dC_{OH}/dt = 0 \quad (15)$$

Dans l'hypothèse où le titrant est une solution aqueuse d'acide HX, l'équation d'électroneutralité (7) devient :

$$dC_{PH}/dt = dC_{QH}/dt + 2 dC_Q/dt + dC_X/dt \quad (16)$$

où C_X représente la concentration du contre-ion X^- de l'acide HX.

L'expression de la vitesse d'adjonction de l'acide HX par le pH-stat obtenue à partir de l'équation précédente :

$$dC_X/dt = dC_{PH}/dt - dC_{QH}/dt - 2 dC_Q/dt \quad (17)$$

permet, par l'intermédiaire des équations (11), (12) et (13) d'obtenir la relation suivante :

$$- dC_s/dt = dC_x/dt \cdot B$$

$$\text{avec } B = \left\{ \frac{1}{1 + \frac{K_1}{C_H}} - \frac{1}{1 + \frac{C_H}{K_2} + \frac{K_3}{C_H}} - \frac{2}{1 + \frac{C_H}{K_3} + \frac{C_H^2}{K_2 K_3}} \right\}^{-1} \quad (18)$$

Dans le cas où la réaction enzymatique produit globalement des ions H^+ (terme B négatif) le titrant ajouté par le pH-stat pour maintenir le pH constant est une solution aqueuse de base YOH . L'équation 18 devient :

$$- dC_s/dt = - dC_y/dt \cdot B \quad (18 \text{ bis})$$

Ces deux équations expriment la vitesse de consommation de substrat par la réaction enzymatique en fonction de la vitesse d'adjonction de titrant par le dispositif de pH-stat (HX Equation (18) ou YOH Equation (18 bis)) pour une concentration C_H de protons dans la solution.

III - CINÉTIQUE ENZYMATIQUE EN MILIEU HÉTÉROGÈNE EN PRÉSENCE D'UN CHAMP ÉLECTRIQUE

1°) Paramètres régissant les profils de concentration intramembranaire : Équation de diffusion-réaction-électromigration.

L'enzyme est immobilisé dans une membrane artificielle plongeant de part et d'autre dans une solution de substrat de volume suffisamment grand pour que la concentration de substrat soit supposée constante et que la concentration des produits de réaction soit nulle. La structure schématique du modèle membranaire utilisé est présentée sur la figure (1).

La membrane est assimilable à un milieu liquide non agité dans lequel les particules migrent par diffusion sous l'action d'un gradient de concentration et/ou sous l'action d'un gradient de potentiel électrique.

Dans l'hypothèse d'un modèle unidimensionnel (x) la densité de flux J_i d'une espèce i peut être exprimée par l'équation de Nernst-Planck :

$$J_i = - D_i \frac{dC_i}{dx} + \mu_i C_i E \quad (19)$$

où - μ_i est la mobilité électrique de l'espèce i ($\mu_i = 0$ pour une molécule non chargée)

- E est la valeur du champ électrique local
- C_i la concentration de l'espèce i
- D_i son coefficient de diffusion.

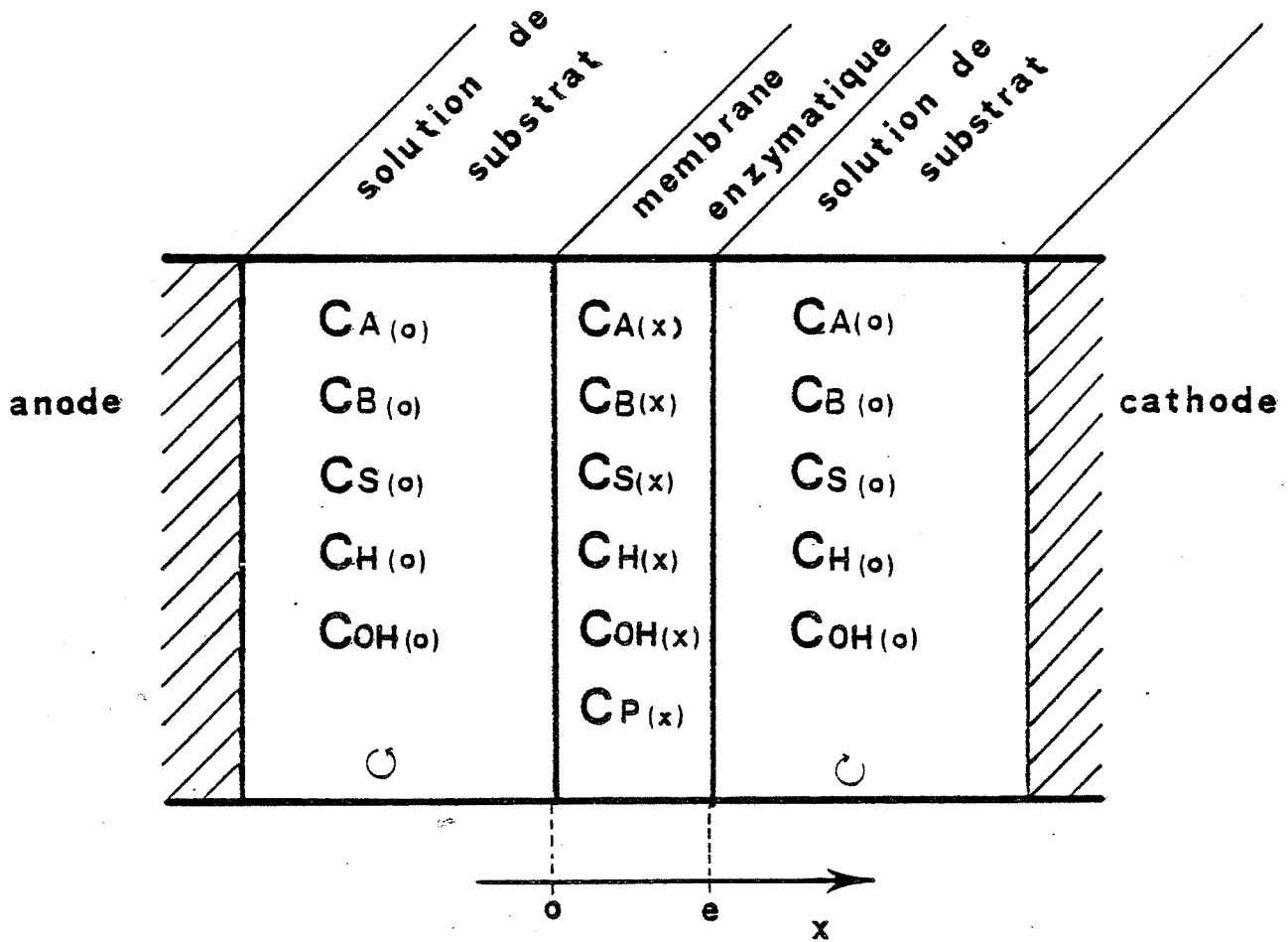


FIGURE 1 - Représentation schématique du modèle utilisé pour l'étude de l'influence d'une densité de courant sur l'activité catalytique d'une membrane enzymatique.

Dans le cas où l'espèce i participe à une réaction chimique, l'évolution de sa concentration en tout point de la membrane est décrite par :

$$\frac{dC_i}{dt} = - \frac{dJ_i}{dx} + R \quad (20)$$

où R représente la vitesse de production ou consommation de l'espèce i . Dans l'hypothèse d'une réaction enzymatique de cinétique michaelienne :

$$R = \pm \frac{V_m C_s}{K_m + C_s} \quad (21)$$

avec $R > 0$ si l'espèce i est le produit de réaction et $R < 0$ si l'espèce i est le substrat. Dans le cas où l'espèce i est un produit de réaction acide ou basique faible, R est multiplié par un terme γ ($0 < \gamma \leq 1$) pour tenir compte de l'équilibre de dissociation de l'espèce i au pH considéré conformément aux équations (11), (12) et (13).

L'équation de base pour toutes les espèces chimiques présentes est par conséquent :

$$\frac{dC_i}{dt} = \underbrace{D_i \frac{d^2 C_i}{dx^2}}_{\text{terme de diffusion}} - \underbrace{\mu_i E \frac{dC_i}{dx} - \mu_i C_i \frac{dE}{dx}}_{\text{terme d'électromigration}} \pm \underbrace{\frac{V_m C_s}{K_m + C_s}}_{\text{terme de réaction}} \quad (22)$$

Les résultats présentés dans ce travail sont obtenus à l'état stationnaire où l'on a :

$$\frac{dC_i}{dt} = 0 \quad (23)$$

Le modèle proposé prend en compte l'existence d'un champ électrique intramembranaire non uniforme ($dE/dx \neq 0 \forall x \in [0, e]$).

Le courant électrique est transporté par toutes les espèces ioniques présentes. La densité de courant (\mathcal{J}) s'exprime par :

$$\mathcal{J} = F \sum_i Z_i J_i \quad (24)$$

où F est le faraday et Z_i la charge de l'espèce i .

En combinant les équations (24) et (19), le champ électrique s'exprime par la relation suivante :

$$E = \frac{\mathcal{J}/F + \sum_i Z_i D_i \frac{dC_i}{dx}}{\sum_i Z_i \mu_i C_i} \quad (25)$$

L'ensemble de ces équations permet d'accéder aux profils de concentration des différentes espèces au sein de la membrane, en présence d'une densité de courant imposée.

2°) Méthode de résolution et hypothèses

La description mathématique du système suppose un certain nombre d'hypothèses :

- les phénomènes vectoriels sont décrits par un modèle unidimensionnel ;
- l'enzyme est immobilisé dans un support membranaire électriquement neutre ;
- l'influence des couches limites de diffusion sur les phénomènes intramembranaires est négligeable ;
- les réactions correspondant aux équilibres de dissociation des espèces acides ou basiques faibles sont rapides devant les vitesses de réaction enzymatique.

L'épaisseur de la membrane (e) est découpée en n intervalles, ce qui détermine le pas Δx .

$$\Delta x = e/n \quad (26)$$

Chaque tranche membranaire d'épaisseur Δx est assimilable à un milieu homogène isotrope où les espèces sont en équilibre.

Par conséquent, les différentes équations traitant de la cinétique enzymatique en milieu homogène en absence de régulation du pH (Equation (2) à (13)) sont utilisables pour décrire le comportement de ces sous-unités membranaires.

Les différentes dérivées partielles pour une fonction Y quelconque sont approximées de la manière suivante :

$$\frac{dY}{dx} = \frac{Y(x + \Delta x) - Y(x - \Delta x)}{2\Delta x} \quad (27)$$

$$\frac{d^2Y}{dx^2} = \frac{Y(x - \Delta x) - 2Y(x) + Y(x + \Delta x)}{\Delta x^2} \quad (28)$$

3°) Différentes expressions de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique de la membrane peut s'exprimer de différentes manières :

a) par la vitesse de consommation de substrat. Deux possibilités sont envisageables pour déterminer cette vitesse théorique.

1) Calcul du flux de substrat aux deux interfaces membrane/solution par l'intermédiaire de l'équation (19) appliquée au substrat. Pour une surface membranaire (\mathcal{A}), la vitesse théorique de consommation de substrat (v_t^S en mole.s^{-1}) s'exprime par :

$$v_t^S = \mathcal{A} (J_s(x=0) - J_s(x=e)) \quad (29)$$

2) Chaque sous-unité membranaire de surface \mathcal{A} et d'épaisseur Δx contribue à la consommation globale de substrat par la membrane. Il est possible de définir l'activité enzymatique locale de la manière suivante :

$$A(x) = V_m \frac{C_s(x)}{K_m + C_s(x)} \quad (30)$$

La sommation sur l'ensemble de la membrane permet d'accéder à la vitesse théorique de consommation de substrat :

$$v_t^S = \sum_n A(x) \cdot \mathcal{A} \Delta x \quad (31)$$

b) En vitesse d'apparition de produit

De la même manière que pour le substrat, l'équation (19) appliquée aux produits de réaction permet de déterminer les flux interfaciaux de produits :

$$J_p = - D_p \frac{dC_p}{dx} + \mu_p C_p E \quad \begin{matrix} \text{pour } x = e \\ x = 0 \end{matrix} \quad (32)$$

c) En vitesse d'adjonction de titrant YOH ou HX dans le cas de produits de réaction acides ou basiques et une régulation du pH de la solution par pH-stat.

Par l'intermédiaire des flux interfaciaux de produits, il est possible de calculer la vitesse d'adjonction de titrant (Equation 17) puis de la transcrire en vitesse de consommation de substrat (Equations 18).

L'opportunité de l'utilisation de l'une ou l'autre de ces méthodes sera discutée ultérieurement.

4°) Méthode générale de calcul

Le déroulement du programme est le suivant :

1) Lecture des données numériques :

$C_s(o)$, $C_A(o)$, $C_B(o)$, μ_i , D_i , V_m^o , K_m^o , e , n , K_1 , K_2 , $K_3 \dots K_i$;
 K_a , K_b , $K'a$, $K'b$.

2) Calcul de $pH(o)$ à partir de l'équation (14)

calcul de V_m^{pH} et K_m^{pH} : équations (2), (3)

$$\Rightarrow V_m^{pH}(x) = V_m^{pH} \forall x ; K_m^{pH}(x) = K_m^{pH} \forall x$$

3) Conditions initiales ($IA = 1$) de remplissage de la membrane :

$$Cs^{IA}(x) = Cs(o) \quad \text{pour } x = 0 \text{ et } x = e$$

$$Cs^{IA}(x) = 0 \quad \forall x \in] \sigma, e [$$

$$pH^{IA}(x) = pH(o) \quad \forall x \in [0, e]$$

$$CA^{IA}(x) = CA(o) ; CB^{IA}(x) = CB(o) \quad \forall x \in [0, e]$$

$$E^{IA}(x) = 0 \quad \forall x \quad (\mathcal{I} = 0)$$

4) Calcul du profil de substrat intramembranaire

$Cs^{IA+1}(x)$ pour $x \in] 0, e [$ à partir de l'équation (22), le terme de réaction étant :

$$R = - V_m^{pH}(x) \frac{Cs^{IA+1}(x)}{K_m^{pH}(x)} + Cs^{IA}(x)$$

5) Calcul des profils de concentration des différents produits de réaction à partir de l'équation (22). Dans le cas d'un produit acide ou basique faible le terme $\gamma(x)$ tient compte de la valeur $pH^{IA}(x)$.

6) Calcul des profils de concentration des espèces A^{2-} et B^+ ($CA(x)$ et $CB(x)$) à partir de l'équation (22) avec un terme de production nul.

- 7) Calcul du profil de pH $\text{pH}^{IA+1}(x)$ pour $x \in]0, e[$ à partir de l'équation (10) dans laquelle les valeurs C_1 et C_2 s'entendent $C_1(x)$ et $C_2(x)$;
calcul de $V_m^{IA+1}(x)$ et $K_m^{IA+1}(x)$ à partir de $\text{pH}^{IA+1}(x)$, de V_m^0 et K_m^0 (Equations (2) et (3)).
- 8) Dans le cas d'espèces acides ou basiques faibles, calcul des nouveaux profils de concentration tenant compte des équilibres de dissociation (Equation (6)).
- 9) Test portant sur les profils de pH entre deux itérations :

$$\left| \text{pH}^{IA+1}(x) - \text{pH}^{IA}(x) \right| \leq 0,1 \quad \forall x \in]0, e[$$
 non \rightarrow 10
 oui \rightarrow 12
- 10) Calcul des profils de champ électrique à partir de l'équation (25)
 $E^{IA+1}(x)$
- 11) Calcul du profil de concentration du substrat (équation 22) tenant compte de $E^{IA+1}(x)$ (substrat ionique) et des valeurs $V_m^{IA+1}(x)$ et $K_m^{IA+1}(x)$ calculées en (7) puis retour en (4).
- 12) Calcul de la vitesse de consommation de substrat à partir des équations (29), (30), (31), (17) et (18).
- 13) Ecriture des résultats.
- 14) Incrémentation de la densité de courant $\mathcal{I} = \mathcal{I} + \Delta \mathcal{I}$ puis retour en (10)

En ce qui concerne les équations de diffusion réaction-électromigration, nous n'avons pas procédé à l'analyse mathématique de stabilité.

Nous avons vérifié que lorsque la condition $|\text{pH}^{IA+1}(x) - \text{pH}^{IA}(x)| \leq 0,1 \quad \forall x \in]0, e[$ est remplie, les profils de concentration des différentes espèces sont parvenus à un état stable qui n'évolue plus entre deux itérations.

Au cours de l'analyse numérique, diverses difficultés sont apparues :

a) l'examen des profils de concentration montre la présence de forts gradients de concentration aux interfaces membrane/solution et par conséquent, la présence de gradients de champ électrique et de pH élevés. La détermination des flux interfaciaux des espèces ioniques par l'équation (32) lorsque l'on a :

$$\left| \mu_i C_i E \right|_{x=0} \gg \left| - D_i \frac{dC_i}{dx} \right|_{x=0}$$
$$x=e \qquad \qquad \qquad x=e$$

est de ce fait malaisée et imprécise. En ce qui concerne un substrat ionique, la vitesse de consommation de substrat déterminée à partir de l'équation (29) est égale à celle déterminée à partir de l'équation (31) lorsque la valeur du champ électrique aux bornes de la membrane est faible ($|\mu_s C_s E| \ll \left| - D_s \frac{dC_s}{dx} \right|$).

Pour des densités de courant plus élevées, les résultats obtenus par ces deux méthodes divergent, quelle que soit l'approximation faite sur le choix des valeurs $C_s(x)$ et $E(x)$ aux interfaces ($x = 0$ et $x = e$). En conséquence, la vitesse de consommation de substrat est déterminée par l'équation (31) dans le cas d'un substrat ionique et par l'équation (29) dans le cas d'un substrat non ionique.

b) L'augmentation de la valeur de la densité de courant se traduit par des temps de calcul élevés nécessaires à l'obtention de la solution stable. Nous avons par ailleurs vérifié que la valeur d'incrément de \mathcal{J} n'influait pas les profils obtenus pour une même valeur de la densité de courant.

MATERIEL

Les calculs numériques ont été effectués au centre de calcul du Département Informatique de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne sur ordinateur MINI 6 CII. Le langage utilisé est une version étendue du FORTRAN IV .

5°) Application aux systèmes enzymatiques utilisés

Dans le cadre de l'étude de l'influence d'une densité de courant sur le comportement cinétique d'une membrane contenant un enzyme immobilisé, deux systèmes ont été étudiés :

- le système urée/uréase qui fait intervenir un substrat non ionique.
- le système acétylcholine/acétylcholinestérase qui fait intervenir un substrat ionique.

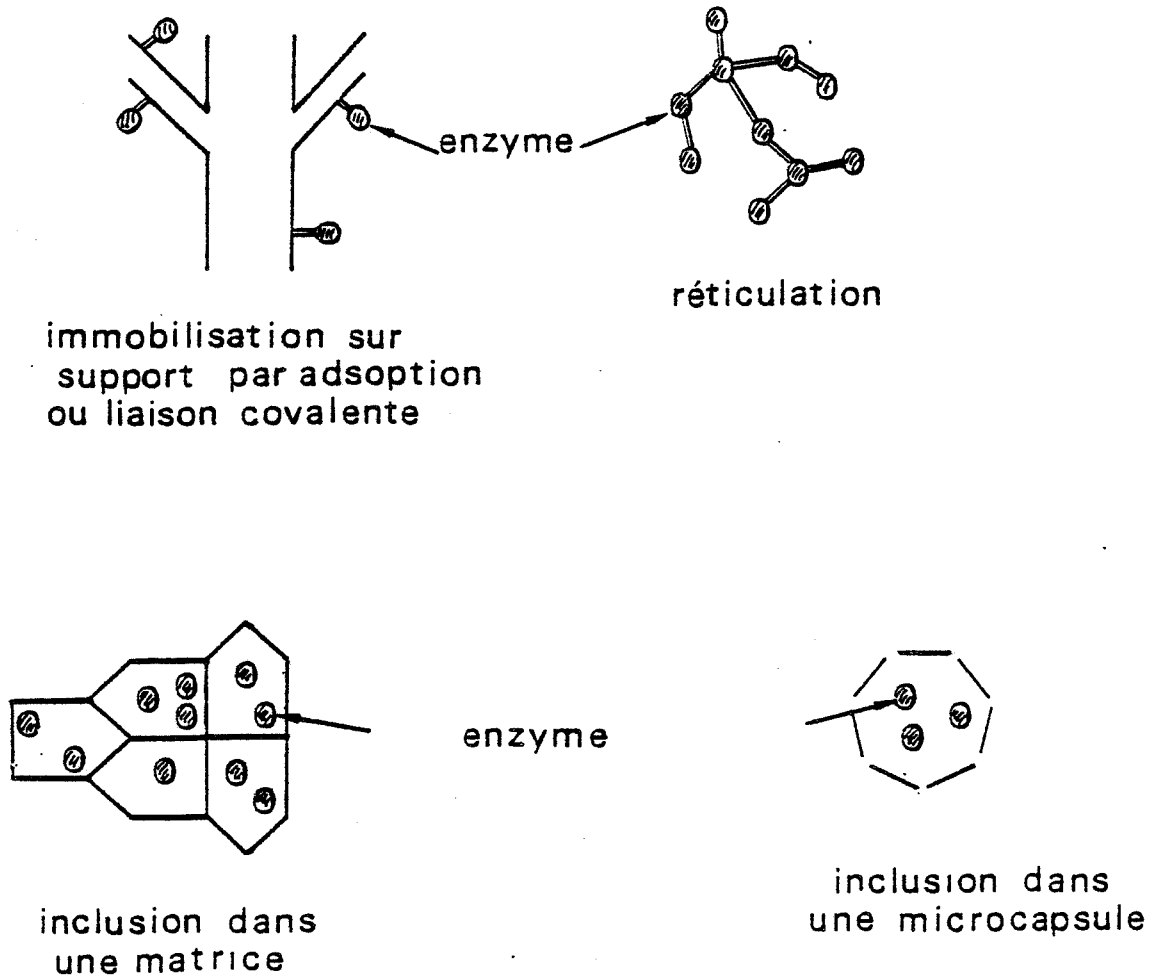


FIGURE 2 - Représentation schématique des différentes méthodes d'obtention d'enzymes immobilisés.

Ces deux systèmes ont fait l'objet d'une étude préalable pour déterminer les variations des paramètres cinétiques V_m et K_m des deux enzymes en solution en fonction du pH (annexe 1).

a) Méthode d'immobilisation

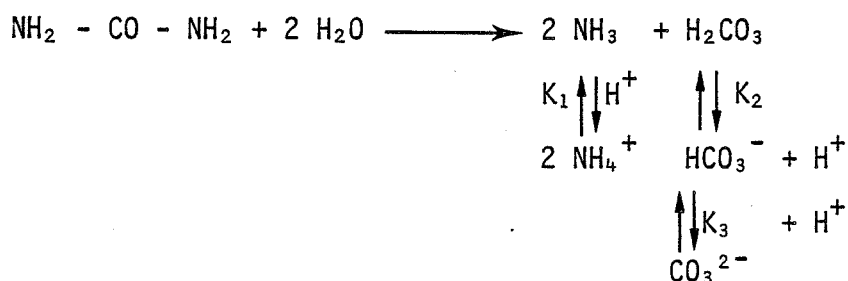
Historiquement, l'idée d'immobiliser des enzymes sur support insoluble remonte à 1906[HENRI - 1906], mais c'est à partir de 1960 que cette technique prend un essor déterminant.

Les différentes méthodes d'immobilisation sont présentées sur la figure 2.

Les membranes utilisées tout au long de nos travaux sont obtenues par coréticulation d'enzyme avec une protéine de charge (l'albumine) par l'intermédiaire d'un agent bi-fonctionnel (aldéhyde glutarique). La méthode d'immobilisation ainsi que les réactifs utilisés sont présentés dans l'annexe (2).

b) Système urée/uréase

L'uréase tirée de fève JACK (*Canavalia Ensiformis*) a été le premier enzyme isolé à l'état cristallisé par J.B. SUMMER en 1926. Il catalyse spécifiquement la décomposition de l'urée selon la réaction :



A 25°C, les valeurs des constantes d'équilibre sont :

$$K_1 = \frac{C_{\text{H}} \cdot C_{\text{NH}_3}}{C_{\text{NH}_4^+}} = 5,64 \cdot 10^{-10} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$K_2 = \frac{C_{\text{H}} \cdot C_{\text{HCO}_3^-}}{C_{\text{H}_2\text{CO}_3}} = 4,30 \cdot 10^{-7} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$K_3 = \frac{C_{\text{H}} \cdot C_{\text{CO}_3^{2-}}}{C_{\text{HCO}_3^-}} = 5,61 \cdot 10^{-11} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3}$$

La répartition de ces différents produits de réaction en fonction du pH, calculée à partir des constantes K_1 , K_2 et K_3 est présentée sur la figure (3).

La figure (4) représente l'évolution de $V_m / V_m^{\text{pH}_0}$ (Fig. 4a) et $K_m / K_m^{\text{pH}_0}$ (Fig. 4b) en fonction du pH pour l'uréase en solution. A partir de ces données expérimentales, les fonctions mathématiques de pH-dépendance ont été déterminées pour donner une représentation purement phénoménologique des variations de V_m et K_m de l'uréase en fonction du pH.

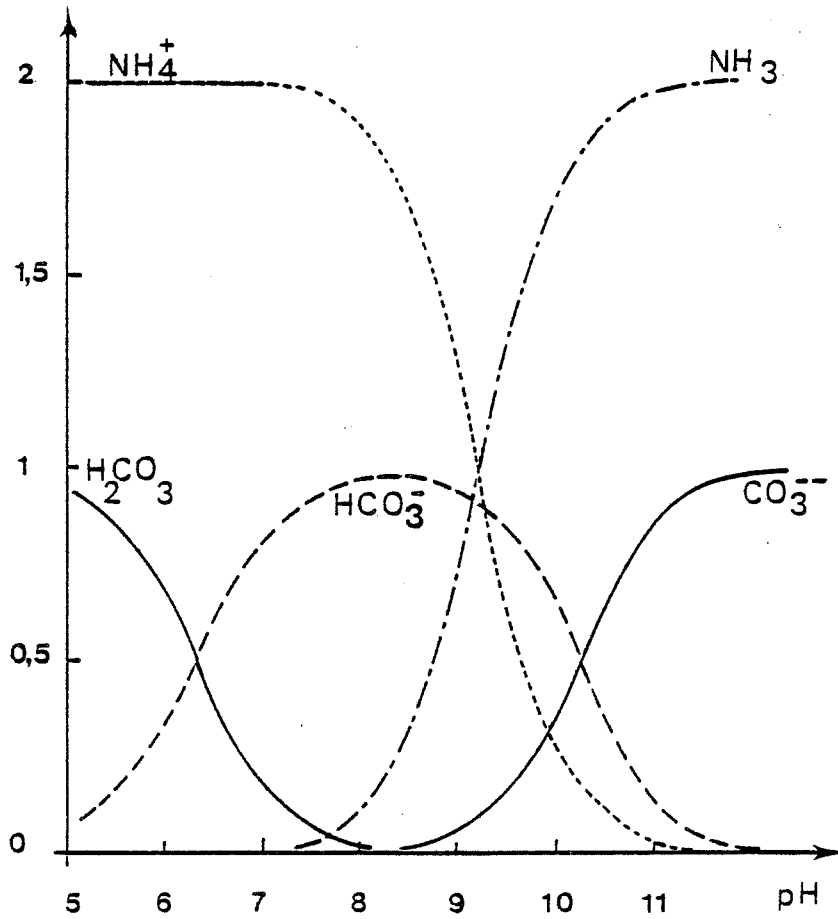


FIGURE 3 - Répartition des différents produits d'hydrolyse enzymatique de l'urée en fonction du pH. Les courbes sont obtenues avec : $C_1 = C_{\text{NH}_3} + C_{\text{NH}_4^+}$; $C_2 = C_{\text{H}_2\text{CO}_3} + C_{\text{HCO}_3^-} + C_{\text{CO}_3^{2-}}$; $C_1 = 2C_2$.

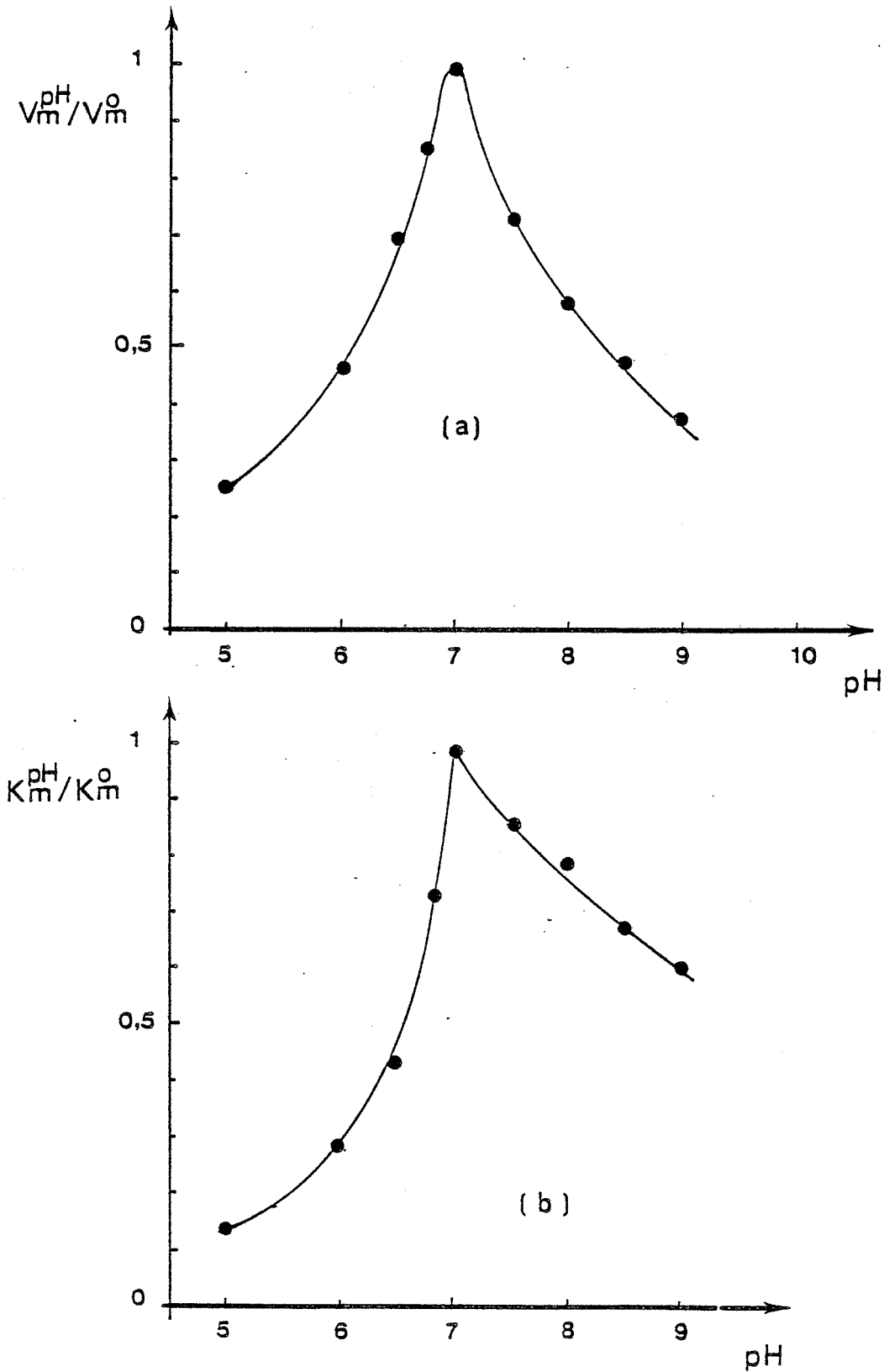


FIGURE 4 - Variation des paramètres cinétiques V_m et K_m de l'uréase en solution, en fonction du pH : V_m^{pH}/V_m^0 (Fig. 4a) et K_m^{pH}/K_m^0 (Fig. 4b) où V_m et K_m sont les constantes cinétiques obtenues au pH de fonctionnement optimum de l'enzyme (7,0).

$$\frac{V_m^{\text{pH}}}{V_m^{\circ}} = 1,15 / (1 + 10^{-3,2} / C_H^{0,4} + C_H / 10^{-6}) = f \quad (33)$$

$$\frac{V_m^{\text{pH}}}{K_m} / \frac{V_m^{\circ}}{K_m} = \left\{ 1 / (1 + 10^{-4,8} / C_H^{0,6} + C_H / 10^{-6,5}) \right\} \cdot 1/f \quad (34)$$

Au sein de la membrane, les différentes espèces en présence sont :

- l'urée : substrat de la réaction
- H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , NH_3 , NH_4^+ produits de la réaction enzymatique
- H^+ et OH^-
- A^{2-} et B^+ composants du sel de fond.

Pour chaque tranche membranaire d'épaisseur Δx l'équation (10) appliquée au système urée/uréase n'est pas modifiée. Elle permet de déterminer la valeur du pH intramembranaire $pH(x)$ à partir de $C_1(x)$ et $C_2(x)$

avec : $C_1(x) = C_{NH_3}(x) + C_{NH_4^+}(x)$

$$C_2(x) = C_{H_2CO_3}(x) + C_{HCO_3^-}(x) + C_{CO_3^{2-}}(x)$$

et d'accéder ainsi au profil de pH intramembranaire.

La correspondance entre la vitesse d'adjonction de titrant par le pH-stat et la vitesse de consommation de substrat se fait par les équations (18) appliquées au système urée/uréase avec :

$$B = \left\{ \frac{2/}{1 + \frac{K_1}{C_H(o)}} - \frac{1/}{1 + \frac{C_H(o)}{K_2} + \frac{K_3}{C_H(o)}} - \frac{2/}{1 + \frac{C_H(o)}{K_3} + \frac{C_H^2(o)}{K_2 K_3}} \right\}^{-1} \quad (35)$$

où $C_H(o)$ est la concentration de protons dans la solution de substrat.

La fonction $B = f(pH)$ est présentée sur la figure (5). Il apparaît deux zones de pH correspondant à l'ionisation des produits de réaction [ATKINSON et col. - 1977] :

- $pH(o) < 9,2$, la réaction enzymatique produit des ions OH^- , le titrant est une solution d'acide HX . Le terme B est positif et la vitesse de consommation de substrat s'écrit :

$$- dC_s/dt = dC_x/dt \cdot B \quad (35bis)$$

- $pH(o) > 9,2$, la réaction enzymatique produit des ions H^+ , le titrant est une solution de base YOH . Le terme B est négatif et la vitesse de consommation de substrat s'écrit :

$$- dC_s/dt = - dC_y/dt \cdot B \quad (35ter)$$

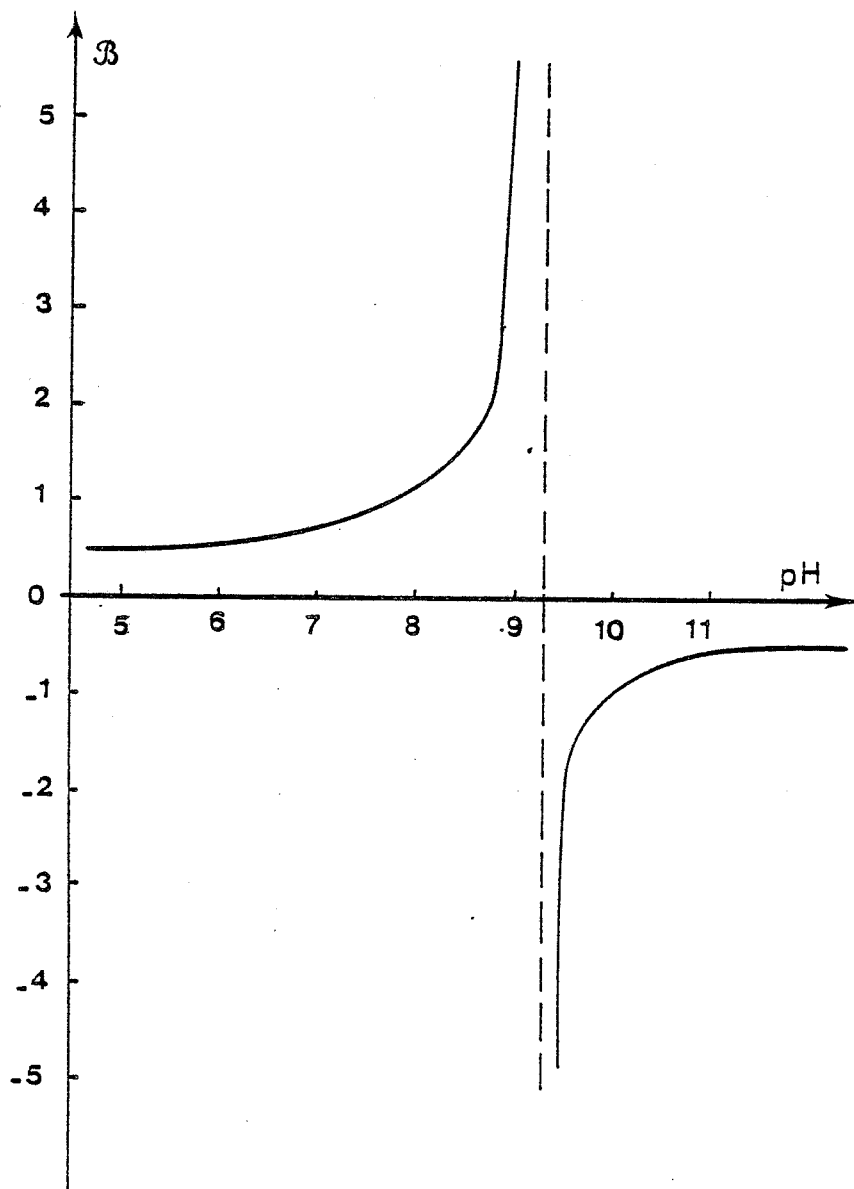


FIGURE 5 - Variation, en fonction du pH, du coefficient B permettant de calculer la vitesse de consommation de substrat à partir de la vitesse d'adjonction de titrant (technique du pH-stat) dans le cas du système urée/uréase.

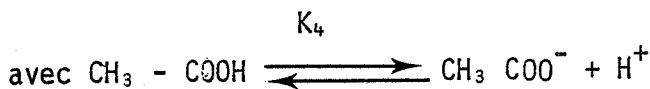
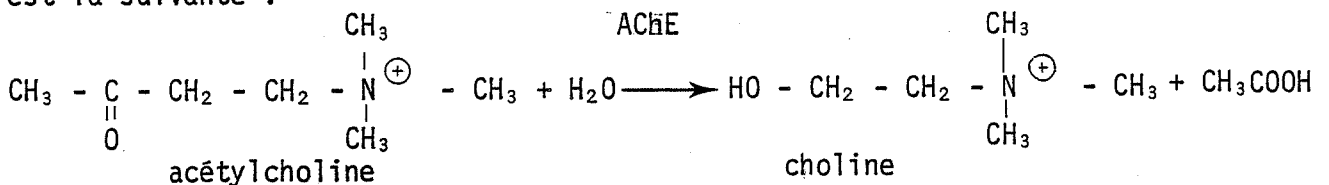
- pH(0) = 9,2, la réaction ne modifie pas le pH de la solution de substrat, le milieu est auto-tamponné.

c) Système acétylcholine/acétylcholinestérase

L'acétylcholine est le neurotransmetteur responsable de la dépolarisation de la membrane synaptique qui propage électriquement l'influx nerveux. L'acétylcholinestérase (AChE) a pour rôle d'hydrolyser l'acétylcholine afin de repolariser cette membrane après le stimulus.

L'acétylcholinestérase a été purifiée et cristallisée récemment à partir de l'organe électrique d'un poison : la gymnote.

La réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique est la suivante :



$$K_4 = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} = 10^{-4,76} \text{ mole.dm}^{-3}$$

La répartition des espèces CH_3COOH et CH_3COO^- en fonction du pH est représentée sur la figure (6). La Figure (7) représente l'évolution de V_m^{pH} en fonction du pH pour l'acétylcholinestérase en solution. La précision des mesures réalisées ne nous a pas permis de déterminer les variations de K_m^{pH} en fonction du pH. En conséquence le rapport K_m^{pH}/K_m est supposé constant et égal à 1.

La fonction de pH-dépendance de V_m est :

$$\frac{V_m^{\text{pH}}}{V_m} = \frac{1}{1 + 10^{-3,75}/C_H + C_H^{0,5}/10^{-3,12}} \quad (36)$$

Les espèces présentes dans la membrane sont si l'on suppose que le contre-ion du substrat est A^{2-} :

- l'acétylcholine substrat chargé positivement
- la choline produit chargé positivement
- le couple acide acétique/acétate produits de la réaction
- H^+ et OH^-
- A^{2-} et B^+ composants du sel de fond. A^{2-} est le contre-ion commun à B^+ , à la choline et à l'acétylcholine.

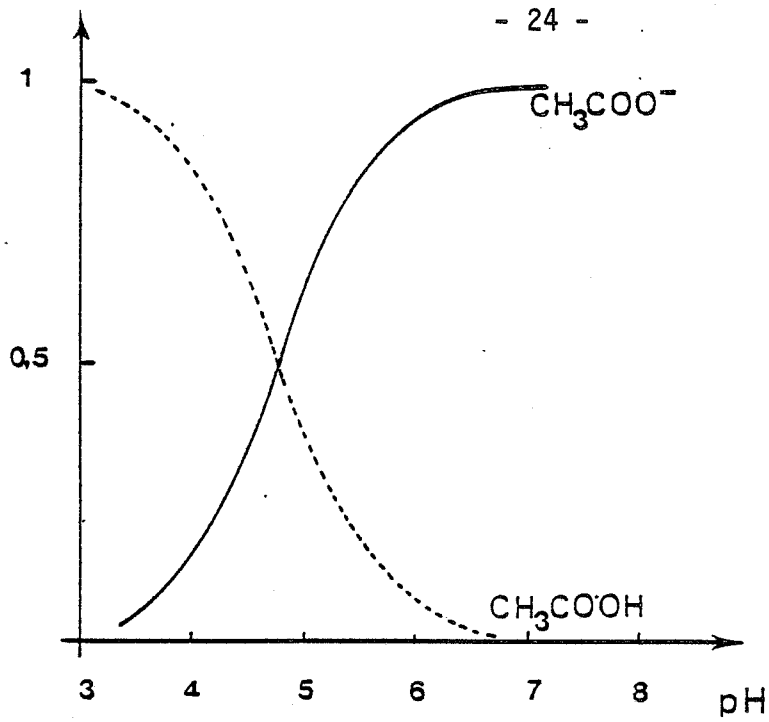


FIGURE 6 - Répartition des espèces CH_3COO^- et CH_3COOH en fonction du pH. Les courbes sont obtenues avec : $C_1 = C_{\text{CH}_3\text{COOH}} + C_{\text{CH}_3\text{COO}^-}$.

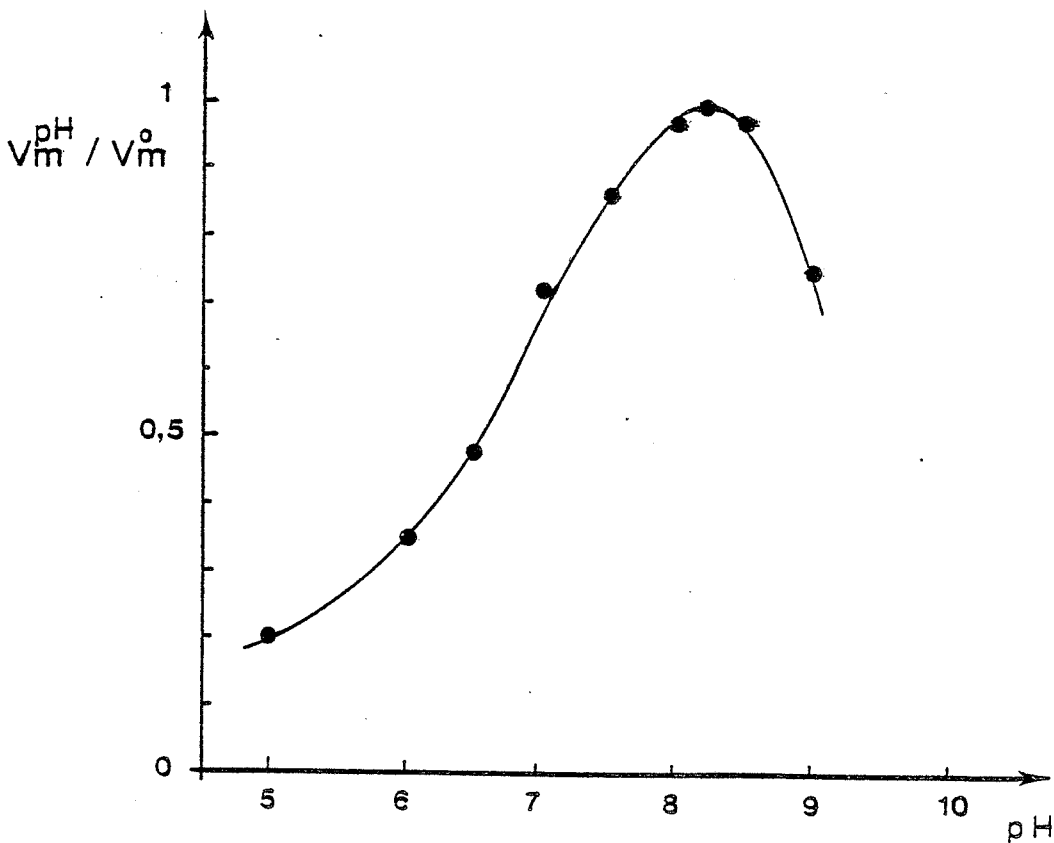


FIGURE 7 - Variation du paramètre cinétique V_m^0 de l'acétylcholinestérase en solution, en fonction du pH : V_m^{pH} / V_m^0 où V_m représente la vitesse de la réaction enzymatique au pH de fonctionnement optimum de l'enzyme.

Pour chaque sous unité membranaire, d'épaisseur Δx , l'équation (10) appliquée au système acétylcholine/AChE permet de calculer la valeur du pH :

$$C_H = \frac{C_S (C_S + C_{Cho} + C_B + C_H)}{2C_A + K_e/C_H + C_1 K_4/K_4 + C_H} \quad (37)$$

avec $C_1 = C_{CH_3 COOH} + C_{CH_3 COO^-}$
et C_{Cho} la concentration en choline.

L'hydrolyse de l'acétylcholine par l'enzyme immobilisé se traduit dans la solution de substrat par l'adjonction d'une solution de titrant Y^+ , OH^- par le pH-stat. La correspondance entre la vitesse de consommation de substrat et la vitesse d'adjonction de titrant dCY/dt se fait par l'intermédiaire de l'équation :

$$- dC_S/dt = dCY/dt \cdot B \quad (38)$$

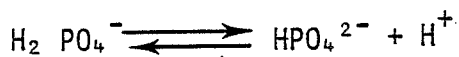
avec $B = (1 + C_H/K_4)$

La fonction $B = f(pH)$ est présentée sur la figure (8).

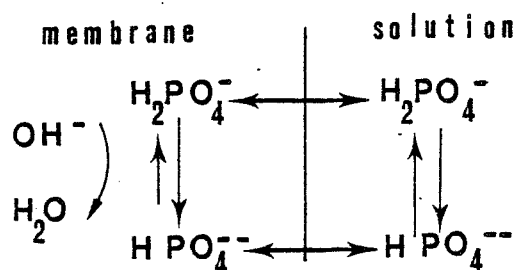
6°) Remarques

Les études théoriques et expérimentales de systèmes enzymatiques immobilisés, relevées dans la littérature, sont souvent réalisées en prenant comme hypothèse simplificatrice un pH intramembranaire constant, conséquence de la présence d'un tampon pH en concentration élevée. Dans le cas de systèmes enzymatiques à produits de réaction acides ou basiques cette hypothèse doit être précisée.

A titre d'exemple, la présence de tampon phosphate au sein d'une membrane enzymatique contenant de l'uréase immobilisée suppose la présence de l'équilibre suivant :



La réaction enzymatique produisant globalement des espèces basiques, le pH intramembranaire tend à évoluer vers 9,2. Cet effet est en partie compensé par un phénomène antagoniste de diffusion-réaction du tampon au sein de la membrane, qui tend à ramener le pH intramembranaire vers le pH de la solution.



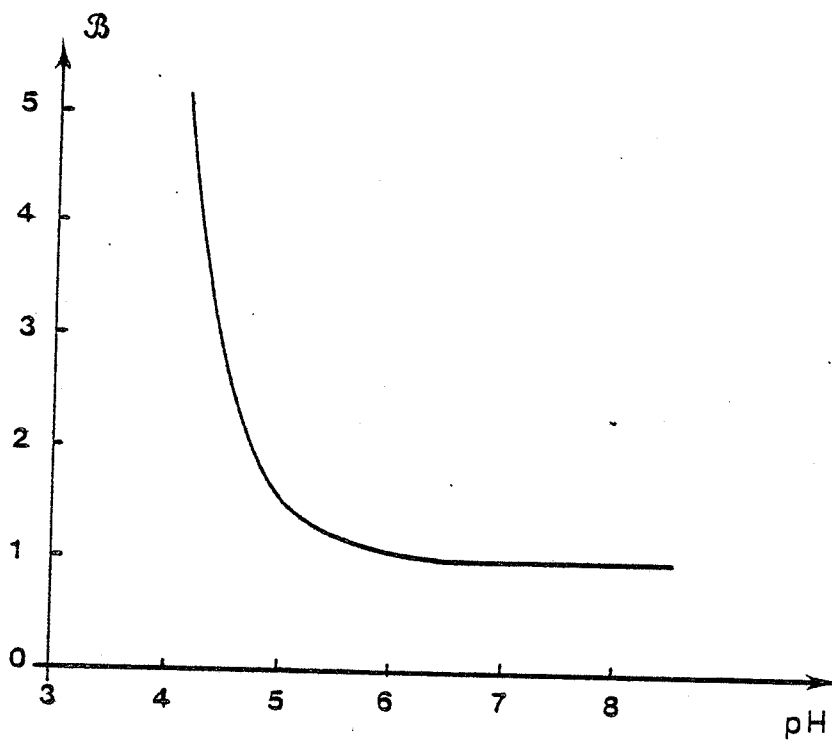


FIGURE 8 - Variation, en fonction du pH, du coefficient B permettant de calculer la vitesse de consommation de substrat à partir de la vitesse d'adjonction de titrant (technique du pH-stat) dans le cas du système acétylcholine/AChE.

Il existe par conséquent des profils de concentration intramembranaire pour les espèces H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} modifiant le rapport $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ dans la membrane. Pour des membranes enzymatiques très actives, cet effet se traduit par une évolution de ce rapport qui fait que l'on ne se trouve plus en présence de l'effet tampon dans la membrane. Cette propriété est utilisée dans certains cas pour la réalisation de capteurs enzymatiques (enzyme greffé sur électrode de mesure du pH). L'établissement d'un gradient de pH important entre le milieu réactionnel (membrane) et le milieu environnant (solution) à cause des contraintes diffusionnelles sur les espèces réagissantes, modifie profondément le comportement cinétique de l'ensemble.

- Le modèle mathématique réalisé permet de décrire le comportement cinétique des systèmes urée/uréase et acétylcholine/acétylcholinestérase en absence de tampon pH et pour une densité de courant nulle. Ces deux systèmes étant caractérisés par des produits de réaction acides ou basiques, l'influence du pH intramembranaire sur ce comportement est prépondérante.

- Bien que l'écriture adimensionnelle, largement répandue dans la littérature, soit plus favorable pour le traitement numérique, nous nous sommes attachés dans ce travail à utiliser les grandeurs physiques directement appréhendables (concentrations, vitesses de réactions, etc ...).

- Dans tous les cas, le profil de concentration des espèces H^+ et OH^- a été déterminé à partir de l'équation d'électroneutralité. En conséquence, l'équation de diffusion/réaction/électromigration (22) n'a pas été appliquée aux espèces H^+ et OH^- , dont les profils de concentration intramembranaire ne sont pris que comme la conséquence des profils de concentration des autres espèces ioniques présentes.

IV - CINETIQUE ENZYMATIQUE EN MILIEU HETEROGENE ASSOCIEE A LA VARIATION D'ENTHALPIE DE LA REACTION ENZYMATIQUE

A toute réaction enzymatique est rattachée une variation d'enthalpie (ΔH) négative si la réaction est exothermique, positive si la réaction est endothermique.

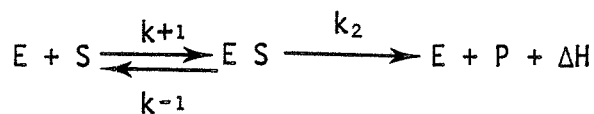
L'idée de base, antérieurement proposée par COONEY et col [1974] puis utilisée au laboratoire par TRAN-MINH et col. [1976], est de greffer une membrane enzymatique sur l'élément sensible d'une thermistance de manière à corrélérer les paramètres de la réaction enzymatique à la réponse du capteur enthalpimétrique ainsi obtenu.

La mise au point du capteur a été réalisée dans le cadre de ce travail [TRAN-MINH et VALLIN - 1978] et appliquée aux systèmes urée/uréase, glucose/glucose oxydase, H₂O₂/catalase.

L'utilisation de ce capteur pour l'étude des inhibiteurs de réaction enzymatique ainsi que l'étude théorique de tels systèmes ont été réalisées au laboratoire par J. BEAUX [1983]. Nous en présenterons les principaux résultats et conclusions.

1°) Description des équations

L'hypothèse de base dans l'étude du transfert de chaleur dans une membrane enzymatique est d'assimiler la variation d'enthalpie du système à un produit de réaction :



En absence de densité de courant imposée, et en négligeant l'influence du potentiel de diffusion résultant de la différence de mobilité des espèces ioniques dans la membrane, les variations de concentration du substrat et des produits au sein de la membrane sont régies par le système d'équations suivant :

$$\frac{dC_s}{dt} - D_s \frac{d^2 C_s}{dx^2} + \frac{V_m C_s}{K_m + C_s} = 0 \quad \text{pour le substrat} \quad (39)$$

$$\frac{dC_p}{dt} - D_p \frac{d^2 C_p}{dx^2} - \frac{V_m C_s}{K_m + C_s} = 0 \quad \text{pour le produit} \quad (40)$$

Afin de limiter l'influence des variations du pH intramembranaire sur les paramètres V_m et K_m, les manipulations sont réalisées en présence d'un tampon phosphate 0,1M.

La variation d'enthalpie de la réaction enzymatique entraîne une variation de température (T) régie par l'équation :

$$\frac{dT}{dt} = \frac{\Delta H}{\rho \mathcal{C}} \frac{V_m C_s}{K_m + C_s} \quad (41)$$

[BOUGNOL - 1976]

où \mathcal{C} est la capacité thermique de la membrane et ρ sa masse volumique. Le gradient de température au sein de la membrane induit un transfert de chaleur :

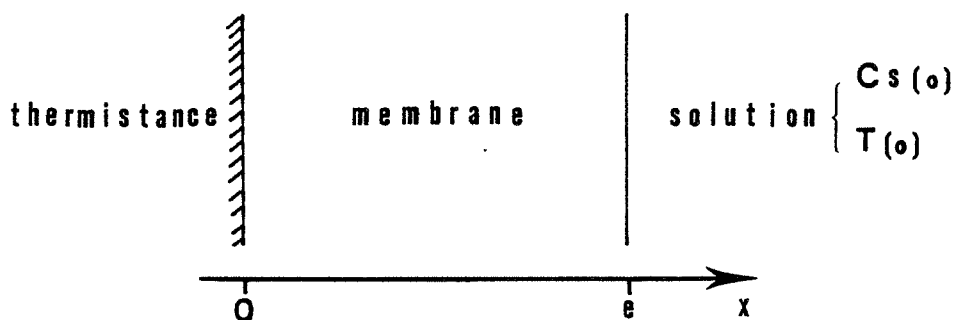
$$\frac{dT}{dt} = \frac{\lambda}{\rho \mathcal{C}} \frac{d^2 T}{dx^2} \quad (42)$$

où λ est la conductivité thermique spécifique.

A l'état stationnaire, le système est par conséquent régi par les équations (39,40) associées à l'équation :

$$\frac{dT}{dt} = 0 = \frac{\lambda}{\rho \mathcal{C}} \frac{d^2 T}{dx^2} + \frac{\Delta H}{\rho \mathcal{C}} \frac{V_m C_s}{K_m + C_s} \quad (43)$$

Ce système d'équations est complété par les hypothèses suivantes, conformément au schéma ci-dessous :



$$\forall x > e \quad \left. \begin{array}{l} C_s(x) = C_s(0) \\ C_p(x) = 0 \\ T(x) = T(0) \end{array} \right\} \quad (44)$$

$$\text{pour } x = 0 \quad \left(\frac{dC_s}{dx} \right) = \left(\frac{dC_p}{dx} \right) = \left(\frac{dT}{dx} \right) = 0 \quad (45)$$

L'étude mathématique réalisée par J. BEAUX considère une membrane d'épaisseur $2e$ ($-e \leq x \leq e$) plongeant de part et d'autre dans une solution de substrat ($C_s(0)$; $T(0)$; $pH(0)$). Les profils obtenus, symétriques par rapport au plan $x = 0$, admettent en ce point une tangente de pente nulle vérifiant ainsi les conditions de l'équation (45).

A l'état stationnaire, la combinaison des équations (39) et (40) permet d'écrire (en supposant $D_s = D_p$) :

$$\frac{d^2 C_s}{dx^2} + \frac{d^2 C_p}{dx^2} = 0 \quad (46)$$

d'où :

$$C_s(x) + C_p(x) = C_s(0) \implies C_p(x) = C_s(0) - C_s(x) \quad (47)$$
$$\forall x \in [0, e]$$

La combinaison des équations (39) et (43) donne :

$$\frac{d^2 T}{dx^2} + \frac{D_s \Delta H}{\lambda} \frac{d^2 C_s}{dx^2} = 0 \quad (48)$$

soit :

$$T(x) - T(0) = - \frac{D_s \Delta H}{\lambda} (C_s(0) - C_s(x)) \quad (49)$$

A l'état stationnaire, la connaissance du profil de concentration du substrat est suffisante pour déterminer les profils de concentration de produit et de température.

2°) Résolution analytique

Les équations (47) et (49) appliquées à l'interface membrane/thermistance ($x = 0$) donnent :

$$T(x=0) - T(0) = - \frac{D_s \Delta H}{\lambda} C_p(x=0) \quad (50)$$

Dans le cas d'une réaction exothermique,

$$\Delta H < 0 \implies T(x=0) > T(0)$$

Dans le cas d'une réaction endothermique,

$$\Delta H > 0 \implies T(x=0) < T(0)$$

Dans le cas d'une réaction exothermique l'équation (50) devient :

$$\text{Log}(\Delta T) = \text{Log} C_p(x=0) + \text{Log} \left(\frac{-D_s \Delta H}{\lambda} \right) \quad (51)$$

D'autre part, lors de l'approximation d'une cinétique du premier ordre, nous avons à l'interface capteur/membrane :

$$\text{Log } C_p(x=0) = \text{Log } C_s(0) + K \quad (52)$$

$$\text{avec } K = \text{Cte} = \text{Log} \left[1 - \frac{1}{\text{ch}(\delta e)} \right]$$

$$\text{et } \delta = (V_m/D \cdot K_m)^{1/2}$$

Soit, à partir des deux équations précédentes :

$$\begin{aligned} \text{Log } (\Delta T) &= \text{Log } C_s(0) + K + \text{Log} \left(-\frac{D\Delta H}{\lambda} \right) \\ &= \text{Log } C_s(0) + \text{constante} \end{aligned} \quad (53)$$

La Figure (9) représente la variation de ΔT en fonction de $C_s(0)$. La courbe obtenue admet, dans un diagramme bi-logarithmique, une partie linéaire de pente égale à 1. Elle tend vers un palier lorsque la concentration en substrat augmente (approximation d'une cinétique d'ordre zéro).

En traçant ΔT en fonction de $C_s(0)$ dans un diagramme bi-logarithmique, pour différentes valeurs de l'activité enzymatique (terme V_m dans l'équation (39)) des courbes ayant toutes une partie linéaire de même pente sont obtenues. Les parties linéaires de ces courbes sont parallèles et admettent une position limite (appelée droite limite) lorsque la membrane devient très active. Cette droite limite a pour équation :

$$\text{Log}(\Delta T) = \text{Log } C_s(0) + \text{Log} \left(-\frac{D\Delta H}{\lambda} \right) \quad (54)$$

Deux cas extrêmes sont à distinguer :

a) membrane peu active : la courbe de réponse est située en dessous de la droite limite. A l'interface capteur/membrane, nous avons :

$$C_s(x=0) > 0 \text{ et } C_p(x=0) < C_s(0)$$

b) membrane très active : la courbe de réponse est la droite limite, et nous avons

$$C_s(x=0) = 0 \text{ et } C_p(x=0) = C_s(0)$$

3°) Remarques

Si les conditions décrites par l'équation (45) au niveau du substrat et du produit sont généralement admises, il n'en n'est pas de même au niveau de la condition :

$$\left(\frac{dT}{dx} \right)_{x=0} = 0$$

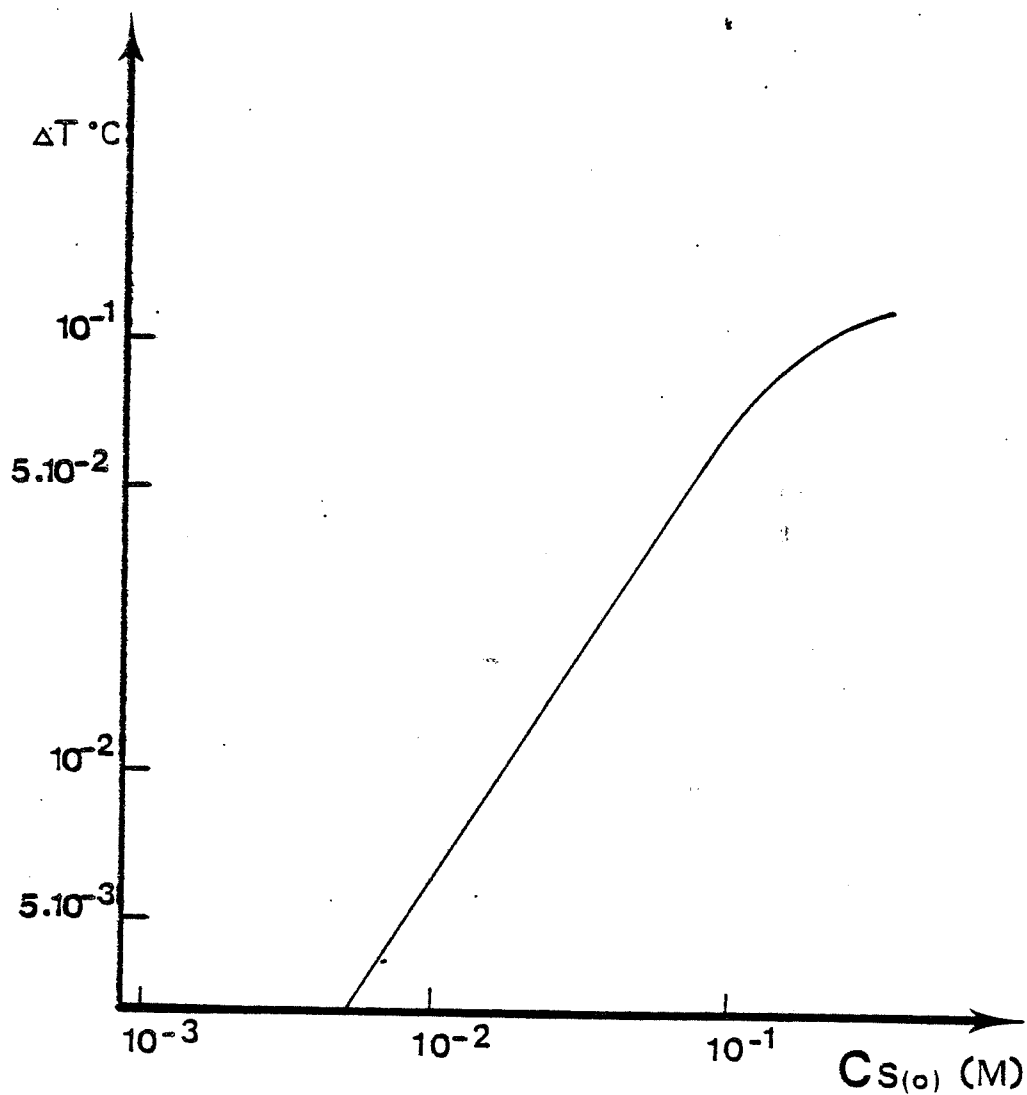


FIGURE 9 - Etude mathématique de la variation de température à l'interface thermistance/membrane enzymatique, en fonction de la concentration en substrat, dans le cas d'une réaction exothermique.

En effet, il existe au niveau de l'interface capteur/membrane un flux thermique susceptible de modifier le gradient de température.

La modélisation ne prend en compte que la variation d'enthalpie de la réaction enzymatique. Il faudrait faire intervenir la variation d'enthalpie de (dé)protonation du mélange tampon. Pour les systèmes tampons Tris et phosphate, les variations d'enthalpies de protonation sont respectivement égales à $- 11,36 \text{ Kcal.mole}^{-1}$ et $- 1,13 \text{ Kcal.mole}^{-1}$.

A titre d'exemple, la variation d'enthalpie de protonation du tampon Tris a permis l'étude de système enzymatique à variation d'enthalpie faible (acétylcholine/acétylcholinestérase ; $\Delta H = + 280 \text{ cal.mole}^{-1}$) [BEEZER et STUBBS - 1973 ; JOHANSSON et col. - 1976].



CHAPITRE II

UTILISATION DE LA VARIATION D' ENTHALPIE

DES REACTIONS ENZYMATIQUES POUR

LA RÉALISATION DE CAPTEURS ENTHALPIMÉTRIQUES



CHAPITRE II

UTILISATION DE LA VARIATION D'ENTHALPIE DES REACTIONS ENZYMATIQUES POUR LA REALISATION DE CAPTEURS ENTHALPIMETRIQUES

I - INTRODUCTION

L'un des problèmes importants de l'industrie est la mise au point de méthodes de contrôle non destructif à l'aide de capteurs fiables, précis, sélectifs et peu coûteux. La remarquable spécificité des enzymes ainsi que le développement des techniques d'immobilisation en font un outil de choix pour la réalisation de tels capteurs.

Un nombre considérable d'études concernant la réalisation d'électrodes enzymatiques sont parues ces dernières années [GUILBAULT - 1975 ; CARR et BOWERS, 1980]. Dans ce type de capteur, une membrane artificielle contenant un enzyme immobilisé est greffée sur l'élément sensible d'une électrode spécifique :

- électrode spécifique pO_2 , pCO_2 [HICKS et UPDIKE - 1966 ; UPDIKE et HICKS - 1967 a, b ; TRAN-MINH et BROUN - 1975] ;

- électrode spécifique aux cations (H^+ , NH_4^+ , etc ...) [GUILBAULT et col. - 1969 ; GUILBAULT et MONTALVO - 1970 a-b ; GUILBAULT et HRABANKOVA - 1970 ; TRAN-MINH et BROUN - 1975].

L'électrode est sensible soit au co-substrat (eg. O_2) soit à l'un des produits de la réaction enzymatique. Bien que ce type de capteur offre un certain nombre d'avantages, il dépend essentiellement de l'électrode de base, dont la détection est souvent limitée à une seule espèce chimique quel que soit le système enzymatique utilisé. La spécificité de l'électrode de base implique le choix d'une réaction enzymatique faisant intervenir l'espèce chimique détectable par l'électrode.

Sur le modèle des capteurs enzymatiques utilisant une électrode spécifique, nous nous sommes attachés à mettre au point un capteur utilisant la variation d'enthalpie de la réaction enzymatique, cette grandeur offrant l'intérêt d'être commune à toutes les réactions enzymatiques.

L'utilisation de la microcalorimétrie pour déterminer les différents paramètres de réactions utilisant des systèmes enzymatiques immobilisés ou en solution nécessite un appareillage lourd et coûteux [MONK et WADSO - 1969 ; BEEZER - 1973 ; BEEZER et STUBBS - 1973 ; BEEZER et col. - 1974 ; PENNINGTON - 1975 ; YOURTEE et col. - 1975 ; REHAK et col. - 1976 ; JOHANSSON et col. - 1976].

Un procédé utilisant des thermistances a été développé notamment par MOSBACH et son équipe pour le dosage de substrats ou d'inhibiteurs. Ce système schématisé sur la figure (10) peut utiliser une thermistance de référence et fournir ainsi une mesure différentielle de la température. Ce dispositif a été appliqué aux domaines suivants :

- analyse clinique : dosage de cholestérol, de l'acide urique et du lactose [MATTIASSON et col., 1977 a] de l'urée [DANIELSSON et col., 1976] du glucose [DANIELSSON et col., 1977] pour ne citer que les principaux.
- détection de polluants basée sur leurs propriétés d'inhibiteurs de réactions enzymatiques [MATTIASSON et col., 1978 ; MATTIASSON et col., 1977 b].
- contrôle de processus industriel : suivi de la production de glucose lors de l'hydrolyse du lactose par la lactase [DANIELSSON et col. - 1979] et dosage du cellobiose lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose [DANIELSSON et col. - 1981].

L'enrobage de l'élément sensible d'une thermistance par une membrane enzymatique a été proposé par COONEY en 1974 [COONEY et col. - 1974] puis repris ultérieurement par d'autres auteurs [WEAVER et col. - 1976 ; FULTON et col. - 1980]. Le principe de fonctionnement du capteur ainsi obtenu est identique à celui des capteurs associant une électrode spécifique et une membrane enzymatique.

Le faible coût de revient des thermistances ainsi que la possibilité de les miniaturiser (utilisation in vivo) en font un outil de choix pour la réalisation de capteurs enzymatiques.

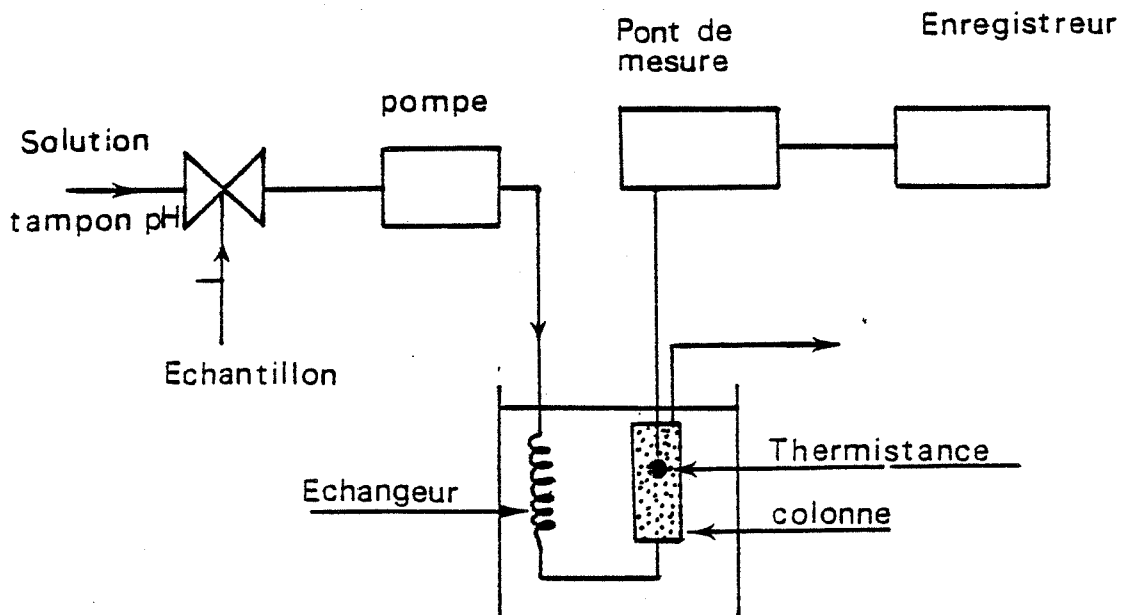


FIGURE 10- Représentation schématique du dispositif expérimental associant une thermistance et une microcolonne contenant l'enzyme immobilisé. [MOSBACH et col. - 1979].

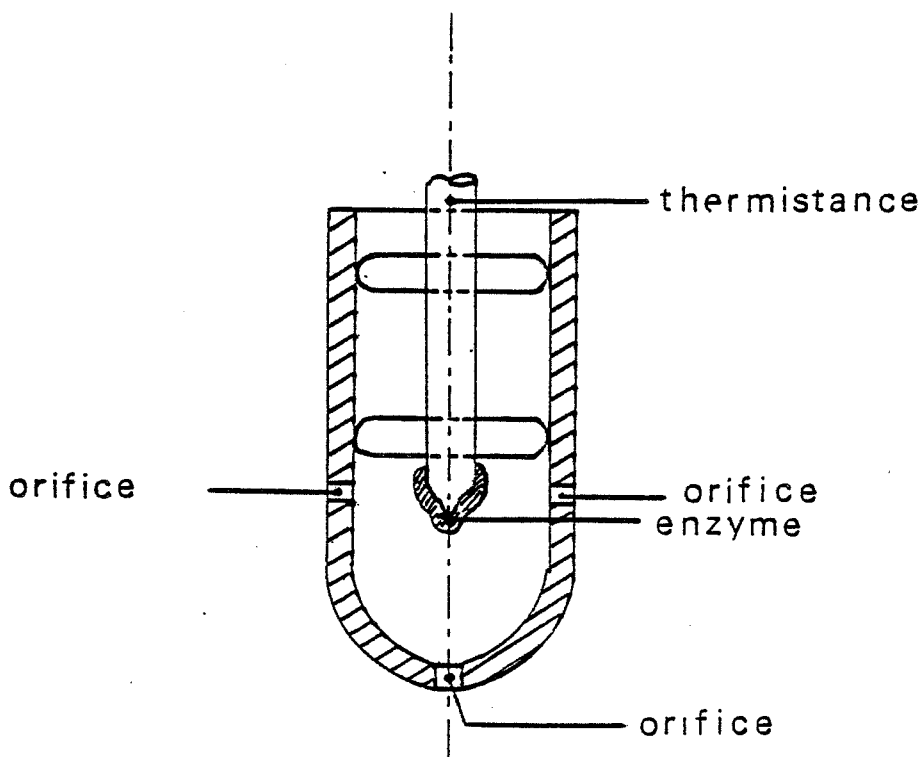


FIGURE 11- Schéma de principe du capteur réalisé dans le cadre de cette étude, associant une thermistance et une membrane enzymatique.

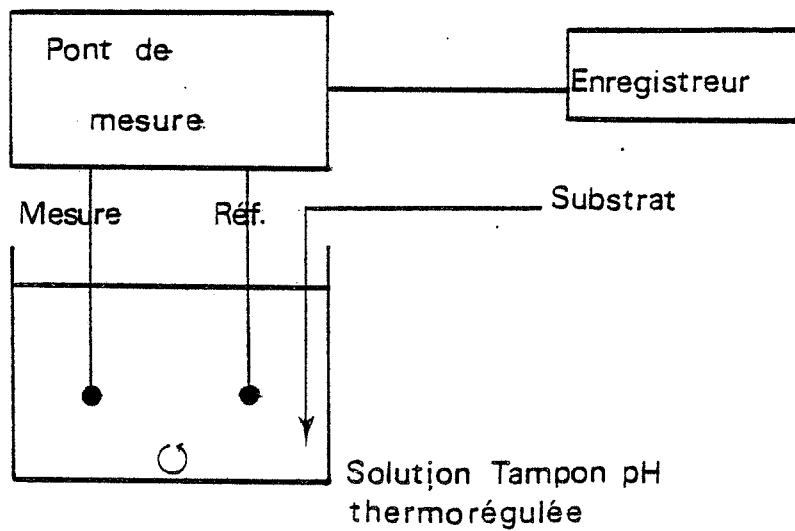


FIGURE 12- Schéma de principe du dispositif expérimental utilisé pour l'étude du capteur associant une thermistance et une membrane enzymatique.

II - REALISATION D'UN CAPTEUR ENTHALPIMETRIQUE UTILISANT UNE THERMISTANCE ASSOCIEE A UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE

L'importance de la variation de température (ΔT) (Equation 54) dépend, pour une membrane très active, de plusieurs variables :

- la somme des variations d'enthalpie de toutes les réactions qui se déroulent dans la membrane enzymatique.
- la concentration en substrat $C_s(o)$.
- le coefficient de diffusion du substrat et la conductivité thermique spécifique de la membrane.

Lors de la mesure une thermistance est traversée par un courant électrique auquel est associée une puissance dissipée (effet Joule) susceptible de modifier sa température et par conséquent sa résistance. A chaque type de thermistance est attribuée une constante de dissipation (puissance dissipée augmentant sa température de 1°C en $\text{mW}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$). Lorsque cet effet n'est pas négligeable, une thermistance est sensible aux variations de vitesse d'écoulement du fluide qui l'entoure.

Les calories ($\Delta H < 0$) ou frigories ($\Delta H > 0$) produites au niveau de la membrane enzymatique diffusent, à l'état stationnaire, vers la solution de substrat qui les élimine d'autant plus rapidement que la vitesse de circulation du fluide est importante. Dans le but de minimiser cette perte de calories (ou frigories), tout en permettant un apport suffisant de substrat à la réaction enzymatique, l'élément sensible de la thermistance est entouré d'un manchon de verre percé de quatre orifices ($\varnothing \approx 1 \text{ mm}$) (figure (11)).

Le dispositif expérimental utilisé permet une mesure différentielle de la température d'une thermistance de mesure par rapport à une thermistance de référence, atténuant ainsi le bruit de fond attribuable aux fluctuations de température de la solution de substrat. L'élément sensible de chaque thermistance est enrobé d'un film protéique obtenu par coréticulation d'albumine et d'enzyme (mesure) ou d'albumine seule (référence). Ces deux thermistances sont reliées à un pont de Wheastone. Le zéro électrique est obtenu dans une solution ne contenant pas de substrat. La représentation schématique de l'ensemble est présentée sur la figure (12).

Les thermistances utilisées (Fenwal Electronics Ref. GB32P4) ont les caractéristiques suivantes :

- résistance à 25°C $R_0 = 2000\Omega$
- constante de dissipation DC = $1,7\text{mW}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$
- pourcentage de variation de résistance par °C à 25°C $\alpha = - 3,9$

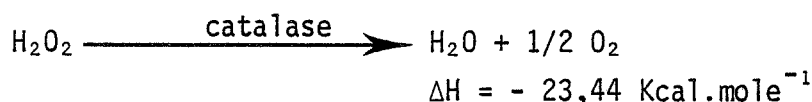
Elles sont connectées à un pont de mesure de haute précision (Température - Messgerat de KNAUER).

Toutes les mesures sont réalisées dans des solutions de substrat contenant un tampon pH (tampon phosphate "Pi" 0,1M). Les solutions sont thermostatées (Thermostat Lauda avec régulation PID, $\pm 0,01^\circ\text{C}$ à 70°C).

Dans les conditions de l'expérience, une variation différentielle de température de $0,02^\circ\text{C}$ correspond à un signal de 100 mV.

1°) Dosage de H_2O_2

La catalase catalyse la réaction de décomposition de l'eau oxygénée selon le schéma suivant :



Cette réaction, très exothermique se prête par conséquent très bien à l'utilisation d'une méthode enthalpimétrique [BOUGNOL - 1976 ; MATTIASSON - 1977 ; MATTIASSON et BORREBAECK- 1978].

La membrane déposée sur la thermistance est obtenue par coréticulation d'albumine et d'enzyme (SIGMA* (Bovine Liver) - 1500 Unités/mg) d'après le mode opératoire décrit dans l'annexe 2. La forte variation d'enthalpie de la réaction de décomposition de H_2O_2 ainsi que l'activité enzymatique élevée ont permis d'utiliser les thermistances sans capuchon de verre. Ceci favorise par ailleurs l'évacuation des bulles d'oxygène qui se forment au niveau de la membrane.

La réponse du capteur en fonction de la concentration en eau oxygénée est présentée sur la figure (13). La limite supérieure de détection (0,7M) provient de la présence de bulles d'oxygène qui perturbent la stabilité du signal.

*Les différentes caractéristiques des enzymes utilisés ainsi que les définitions relatives aux activités sont données dans l'annexe 2.

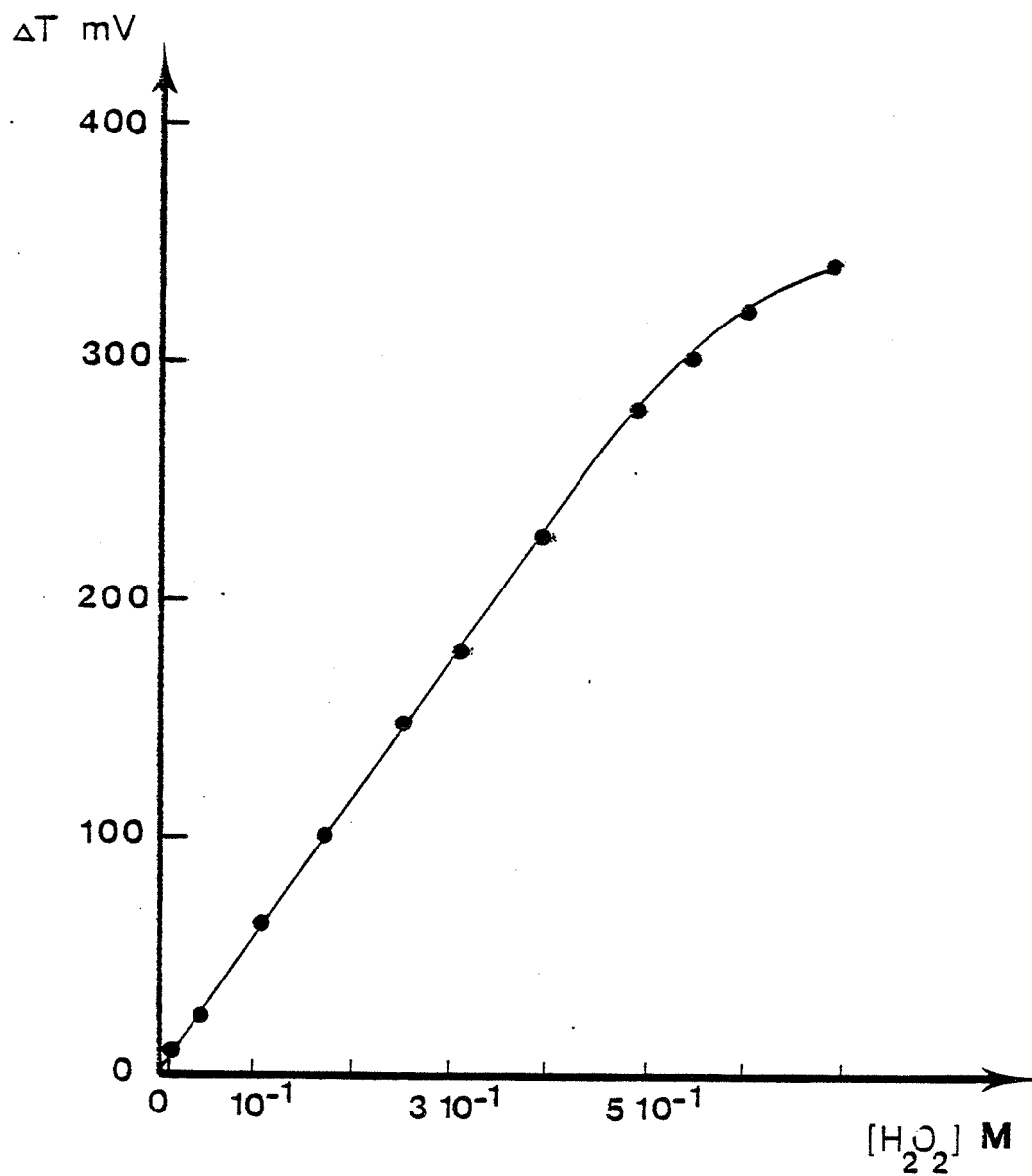
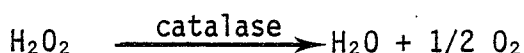
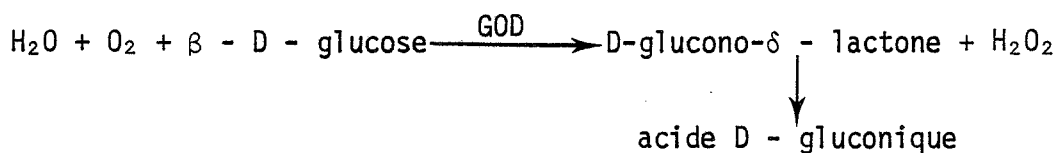


FIGURE 13- Réponse de la thermistance à catalase immobilisée en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène. Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,1M ; pH = 7,0 ; 25,0°C.

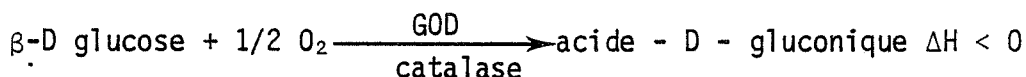
La limite inférieure ($10^{-2}M$) correspond à la limite de détection du capteur due essentiellement au rapport signal/bruit.

2°) Dosage du glucose

Le schéma de la réaction est le suivant :



Le bilan global de cette réaction est :



L'enzyme utilisé, glucose oxydase (SIGMA, type IX) contient 2 % en poids de catalase (800 unités/mg). L'oxygène nécessaire à la réaction enzymatique est apporté au système par ajout d'une solution d'eau oxygénée. La membrane déposée sur la thermistance contient approximativement 60 unités de GOD et 2000 unités de catalase.

La réponse du capteur en fonction de la concentration en glucose pour différentes concentrations en H_2O_2 est portée sur la figure 14. En absence de glucose, l'introduction d'eau oxygénée dans la solution de tampon phosphate se traduit par une faible réponse du capteur attribuable à la variation d'enthalpie de la réaction de décomposition de H_2O_2 (5 mV pour $[\text{H}_2\text{O}_2] = 6.10^{-3}M$).

Les courbes obtenues pour une concentration de H_2O_2 variant entre $10^{-3}M$ et $4.10^{-3}M$ font apparaître un plateau où la réponse de la thermistance est indépendante de la concentration en glucose. La vitesse d'oxydation du glucose est dans ce cas limitée par la vitesse de production d'oxygène elle-même proportionnelle à la concentration de H_2O_2 . Lorsque cette dernière augmente, la limite supérieure de détection du glucose augmente. Pour $[\text{H}_2\text{O}_2] = 6.10^{-3}M$, le palier n'apparaît pas dans la gamme de concentration de glucose étudiée. La limite inférieure de dosage du glucose est alors de $10^{-3}M$, la limite supérieure de l'ordre de $1.5 \cdot 10^{-2}M$.

Les électrodes enzymatiques à détection potentiométrique ou ampérométrique utilisées pour le dosage du glucose font apparaître une limite inférieure de détection variant de $10^{-3}M$ à $10^{-6}M$ suivant les auteurs et un temps de réponse

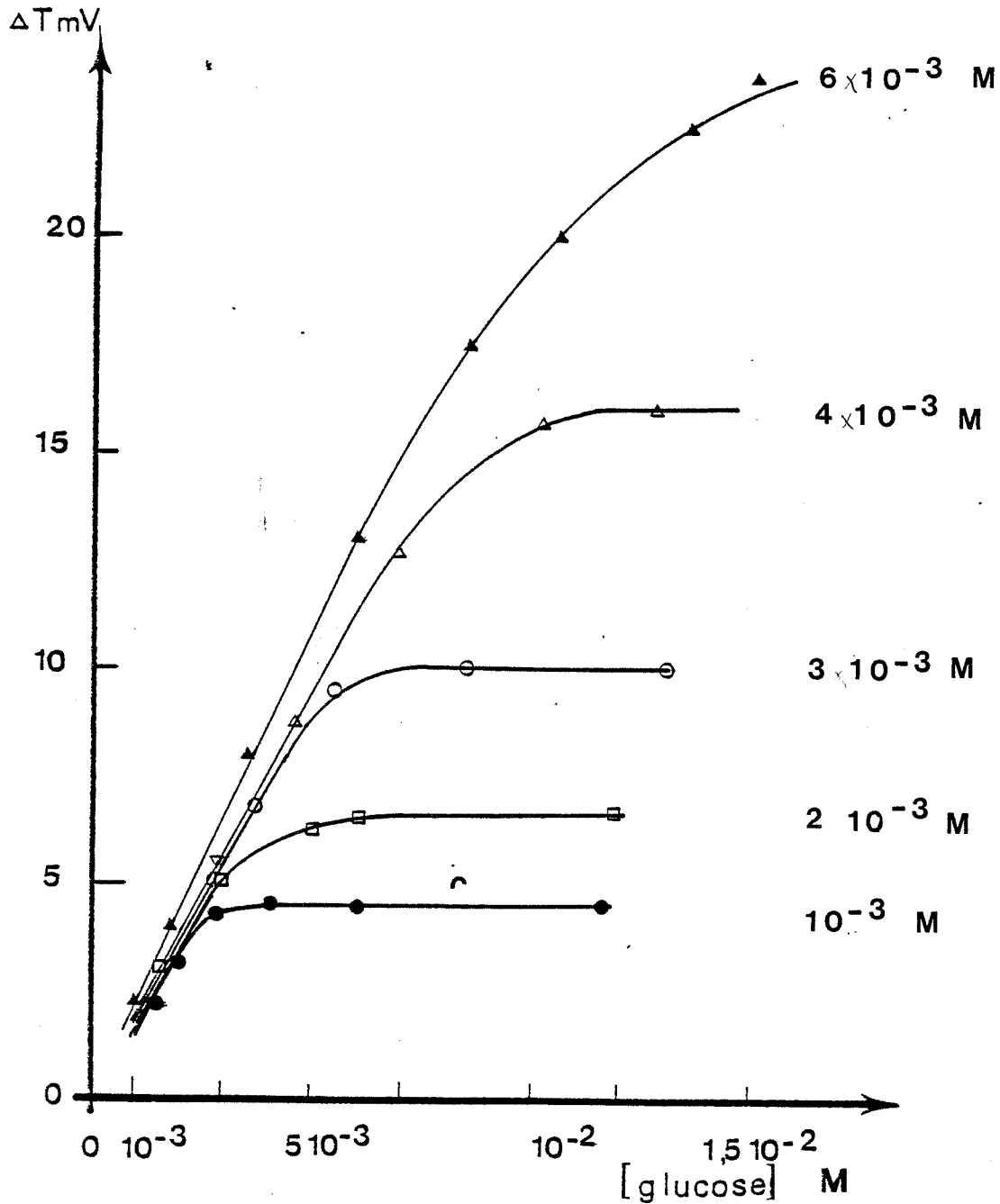


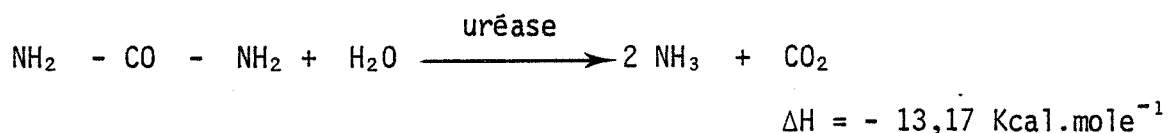
FIGURE 14- Réponse de la thermistance à glucose-oxydase immobilisée en fonction de la concentration en glucose pour différentes valeurs de la concentration en H₂O₂.
Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,1M ; pH = 5,50 ; 25,0°C.

de l'ordre de la minute [CARR et BOWERS - 1980]. En ce qui concerne les systèmes utilisant des thermistances, les seuils de détection obtenus varient entre $10^{-5}M$ et $10^{-4}M$ [COONEY et col. 1974 ; DANIELSSON et col. 1979]

3°) Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée dans des échantillons de plasma est l'une des analyses les plus fréquemment réalisées en analyse clinique de routine. De nombreuses études ont été consacrées à la détermination de l'urée en milieu biologique (urine, sang, plasma). La première électrode enzymatique à urée réalisée par GUILBAULT et MONTALVO [1970a] utilisait de l'uréase immobilisée dans un gel de polyacrylamide en contact avec une électrode spécifique aux ions ammonium. La sélectivité de l'électrode de base a été améliorée en utilisant, par la suite, des électrodes à gaz type pNH_3 [ANFALT et col. 1973] ou pCO_2 [GUILBAULT et SHU 1972].

L'uréase catalyse la réaction de décomposition de l'urée selon le schéma suivant :



Les paramètres suivants ont été étudiés :

- quantité d'uréase (SIGMA, type IX) immobilisée sur la thermistance (figures 16a-b)
- pH de la solution de substrat (figures 17 et 18)
- température (figures 19 et 20).

La figure 15 représente la réponse du capteur en fonction du temps, lors de différents ajouts d'urée. La réponse du capteur à une variation de concentration de substrat est très rapide (3-5 secondes). Les fluctuations du signal sont attribuables à l'agitation de la solution.

La figure 16a représente la réponse de la thermistance en fonction de la concentration en urée avec deux quantités d'uréase immobilisée (10 et 20 unités Sigma théoriques). La limite inférieure de détection est de $2.10^{-3}M$ en substrat. Les courbes ont une partie linéaire entre $2.10^{-3}M$ et $4.10^{-2}M$ dont la pente dans le cas de la membrane la plus active est égale à $0,22^\circ C.mole^{-1}$.

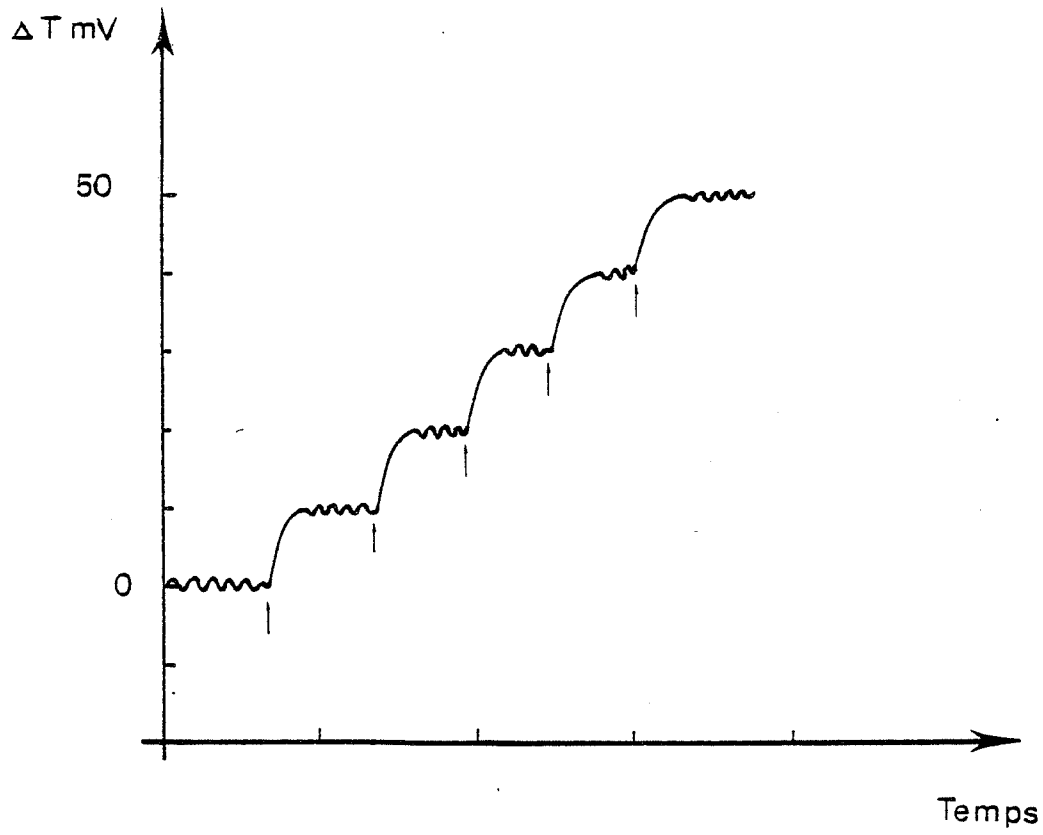


FIGURE 15- Réponse de la thermistance à enzyme immobilisé en fonction du temps pour différentes concentrations de substrat.

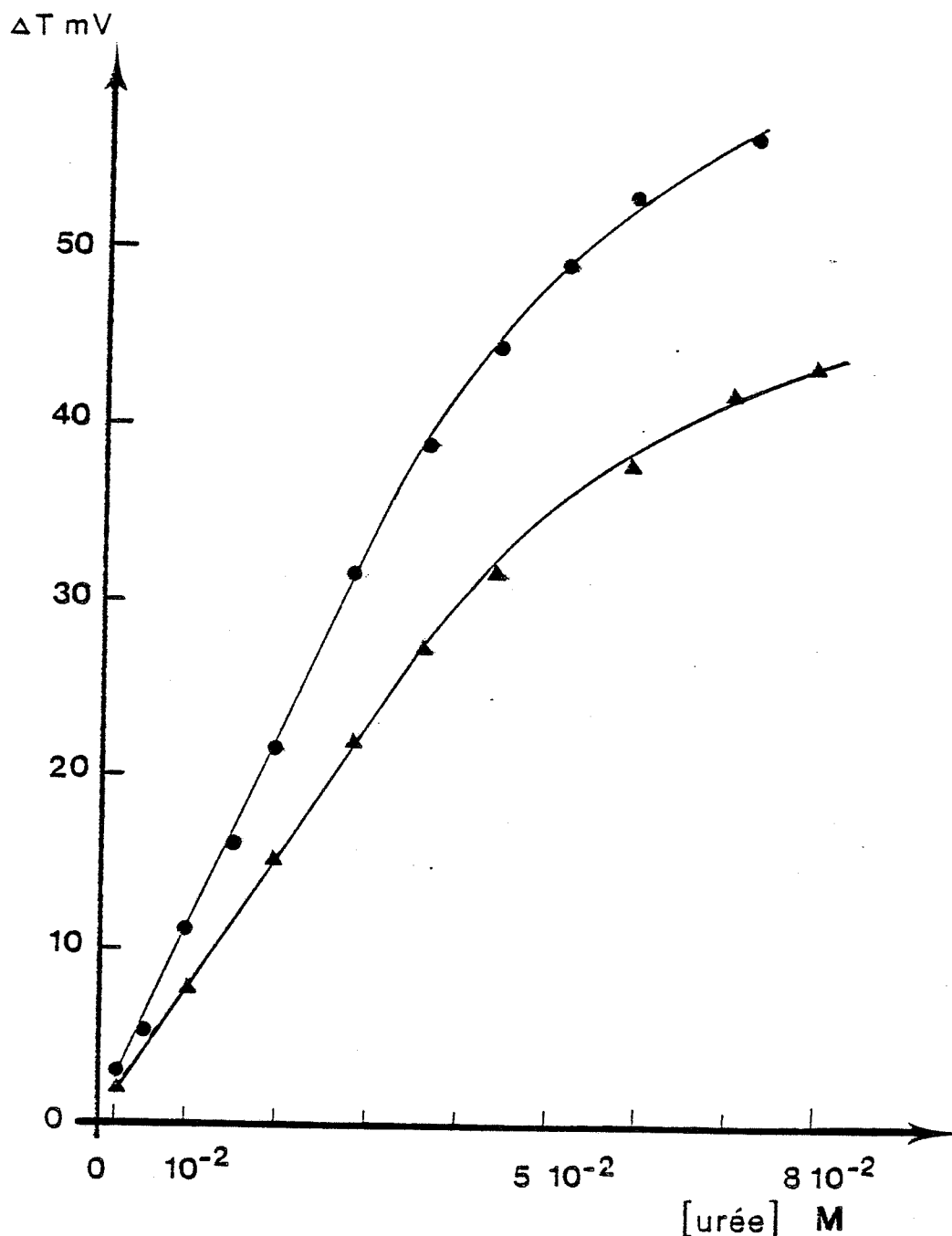


FIGURE 16a-Réponse de la thermistance à uréase immobilisée en fonction de la concentration en urée pour deux quantités d'enzyme immobilisé sur la thermistance : \bullet —20 Unités SIGMA ; \blacktriangle —10 Unités SIGMA. Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,1M ; pH = 7,0 ; 25,0°C.

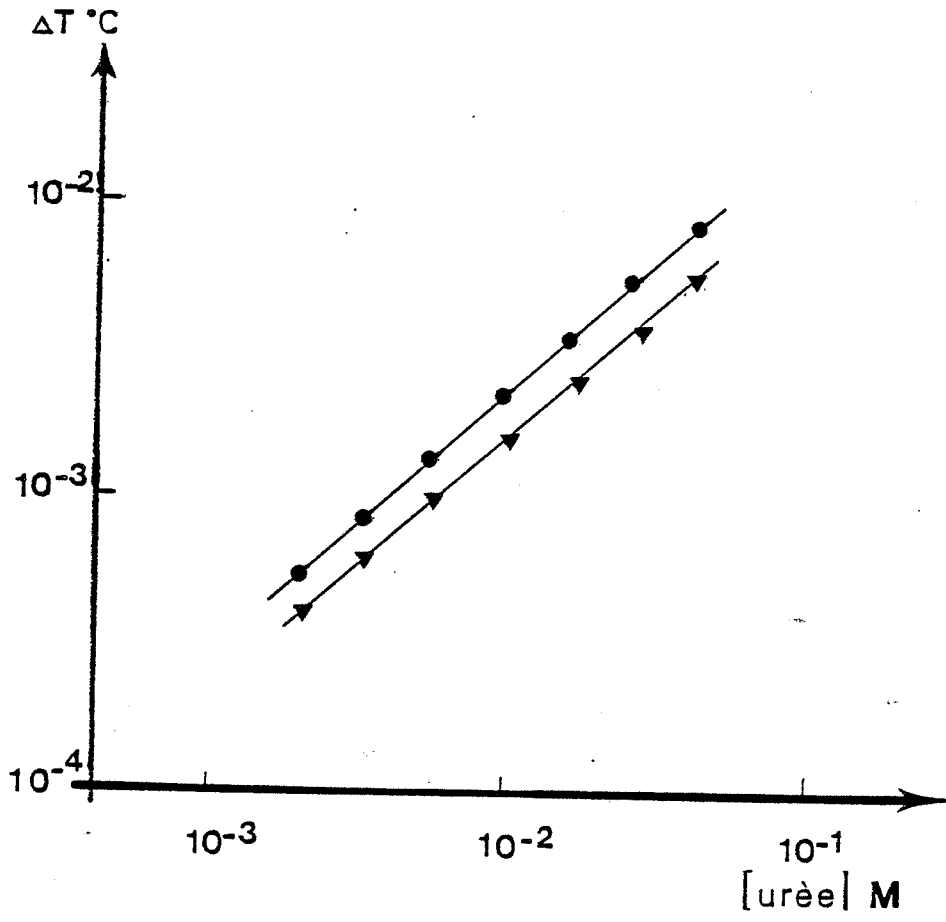


FIGURE 16b - Représentation de la figure 16a dans un diagramme bi-logarithmique.

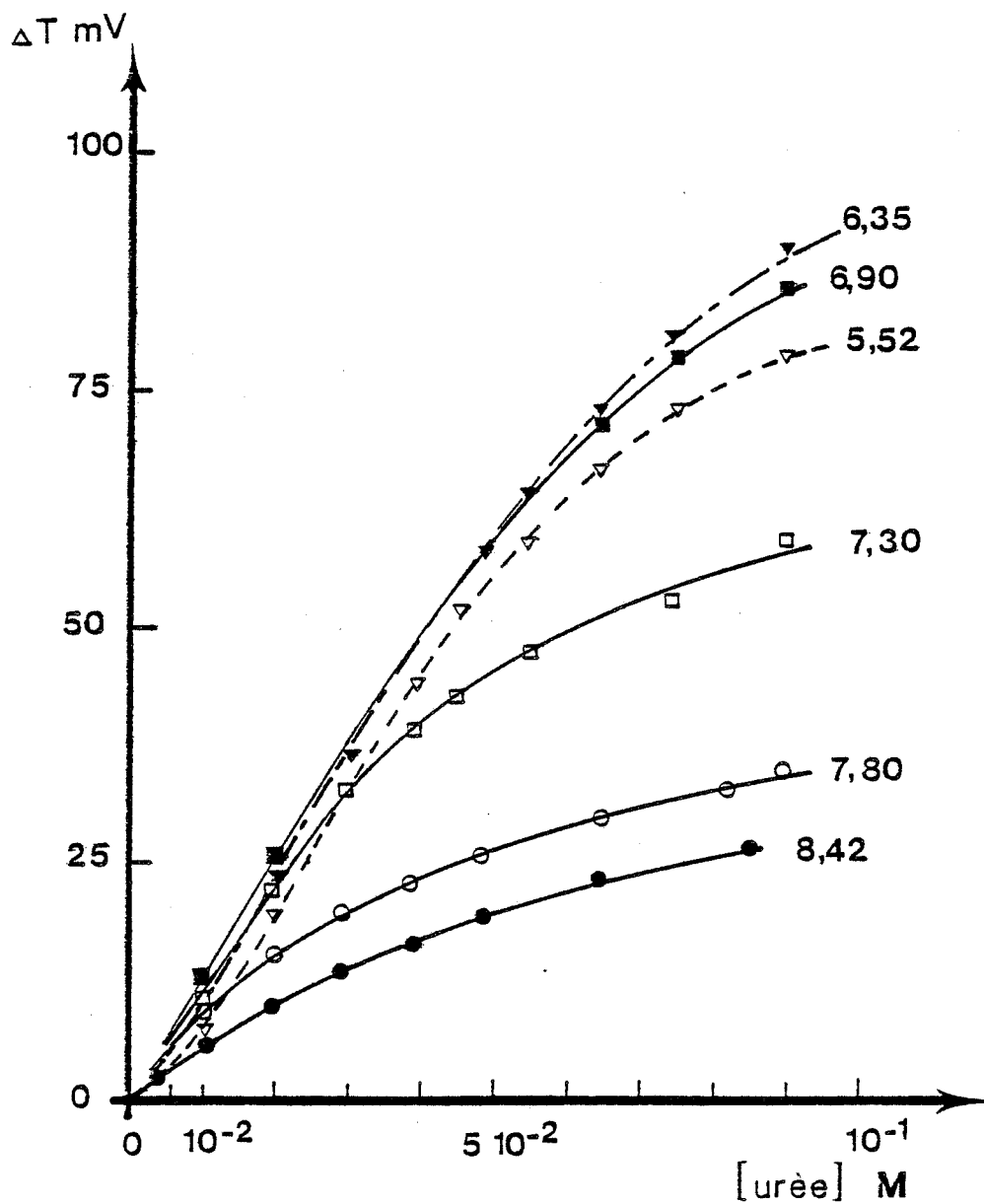


FIGURE 17 - Réponse de la thermistance à uréase immobilisée en fonction de la concentration en urée pour différentes valeurs du pH de la solution de substrat.
Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,1M ; 25,0°C.

La représentation de ces parties linéaires dans un diagramme bi-logarithmique (Fig. 16b) fait apparaître deux droites parallèles comme le laissait prévoir l'analyse mathématique (chapitre I ; équation 54). La pente des droites obtenues égale à 0,9 est légèrement inférieure à la valeur théorique prévue (1).

La figure 17 est obtenue pour des valeurs de pH de la solution de substrat comprises entre 5,52 et 8,42. Dans cette gamme de pH, l'enzyme ne subit pas de dénaturation irréversible sensible. Les courbes obtenues pour pH = 6,35 et pH = 5,52 ont une forme sigmoïde attribuable à un effet autocatalytique par rétroaction du pH sur la cinétique enzymatique. Le pH intramembranaire est par conséquent différent du pH de la solution de substrat du fait des contraintes diffusionnelles. Ce phénomène apparaît plus nettement sur la figure 18. Bien que la solution de substrat contienne un tampon phosphate 0,1M, le caractère basique faible des produits de réaction se traduit par une augmentation du pH intramembranaire (pH \rightarrow 9,2). Deux cas se présentent :

- le pH de la solution de substrat est inférieur au pH optimum de l'uréase (\approx 7). La réaction enzymatique tend à déplacer le pH intramembranaire vers le pH optimum (phase autocatalytique).

- le pH de la solution de substrat est supérieur à 7. L'évolution du pH intramembranaire tend à diminuer l'activité enzymatique.

Cet effet est d'autant plus sensible que la concentration en substrat est importante (fig. 18).

Ces différentes observations sont en accord avec les règles classiques de la cinétique enzymatique en milieu hétérogène. Les figures 19 et 20 montrent l'influence de la température sur la réponse du capteur. Ces courbes traduisent deux effets distincts :

- augmentation de l'activité enzymatique avec la température conformément aux variations des paramètres cinétiques [LAIDLER et PETERMAN - 1979]

- diminution de l'activité enzymatique par suite de la dénaturation irréversible de l'enzyme, les paramètres cinétiques de cette dénaturation obéissant eux aussi à la loi d'Arrhenius [LAIDLER et BUNTING - 1973]. Ces deux effets antagonistes se traduisent par l'apparition d'une température de fonctionnement

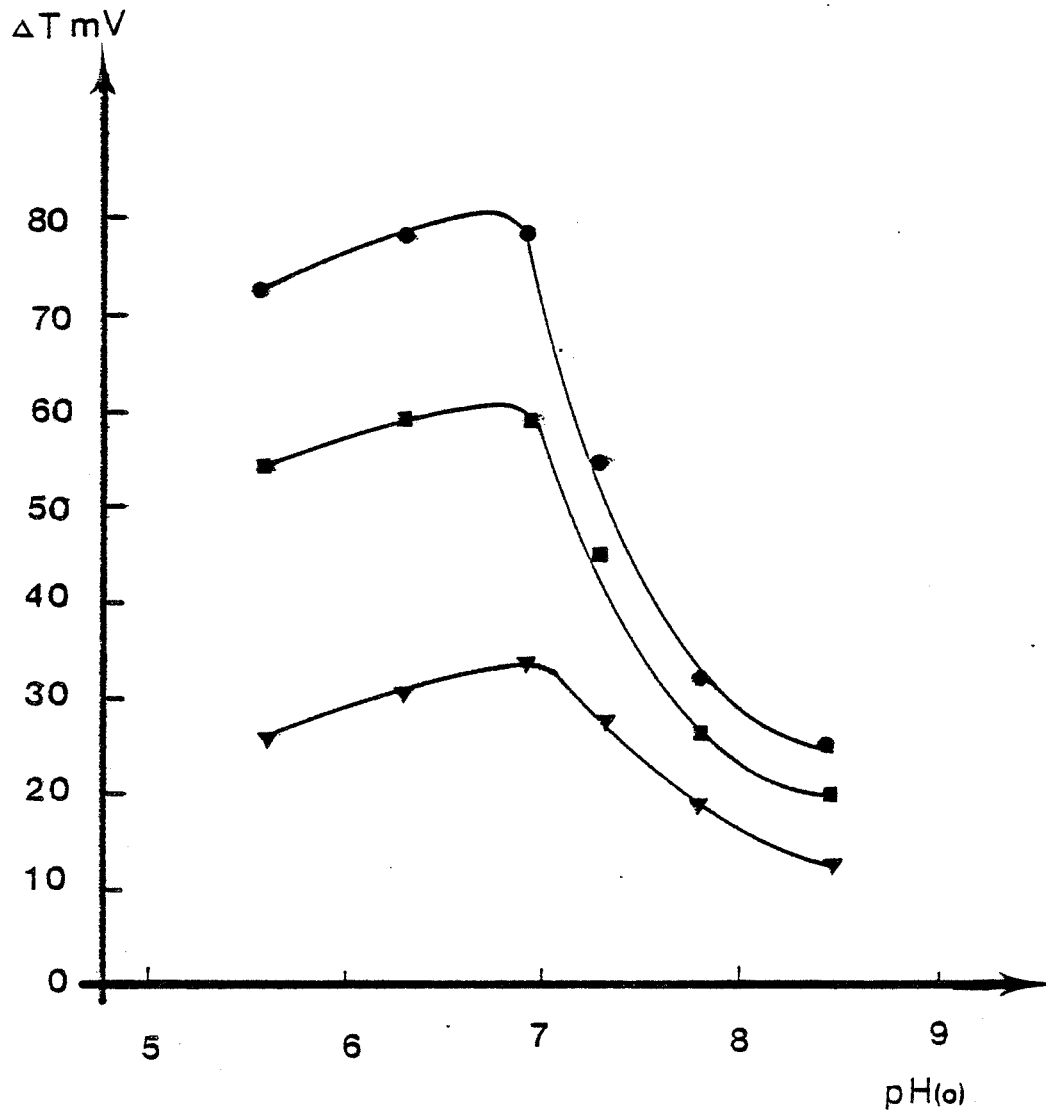


FIGURE 18 - Réponse de la thermistance à uréase immobilisée en fonction du pH de la solution de substrat pour différentes valeurs de la concentration en urée :

—●— $7,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$; —■— $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$; —▼— $2,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$

Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,1M ; 25,0°C.

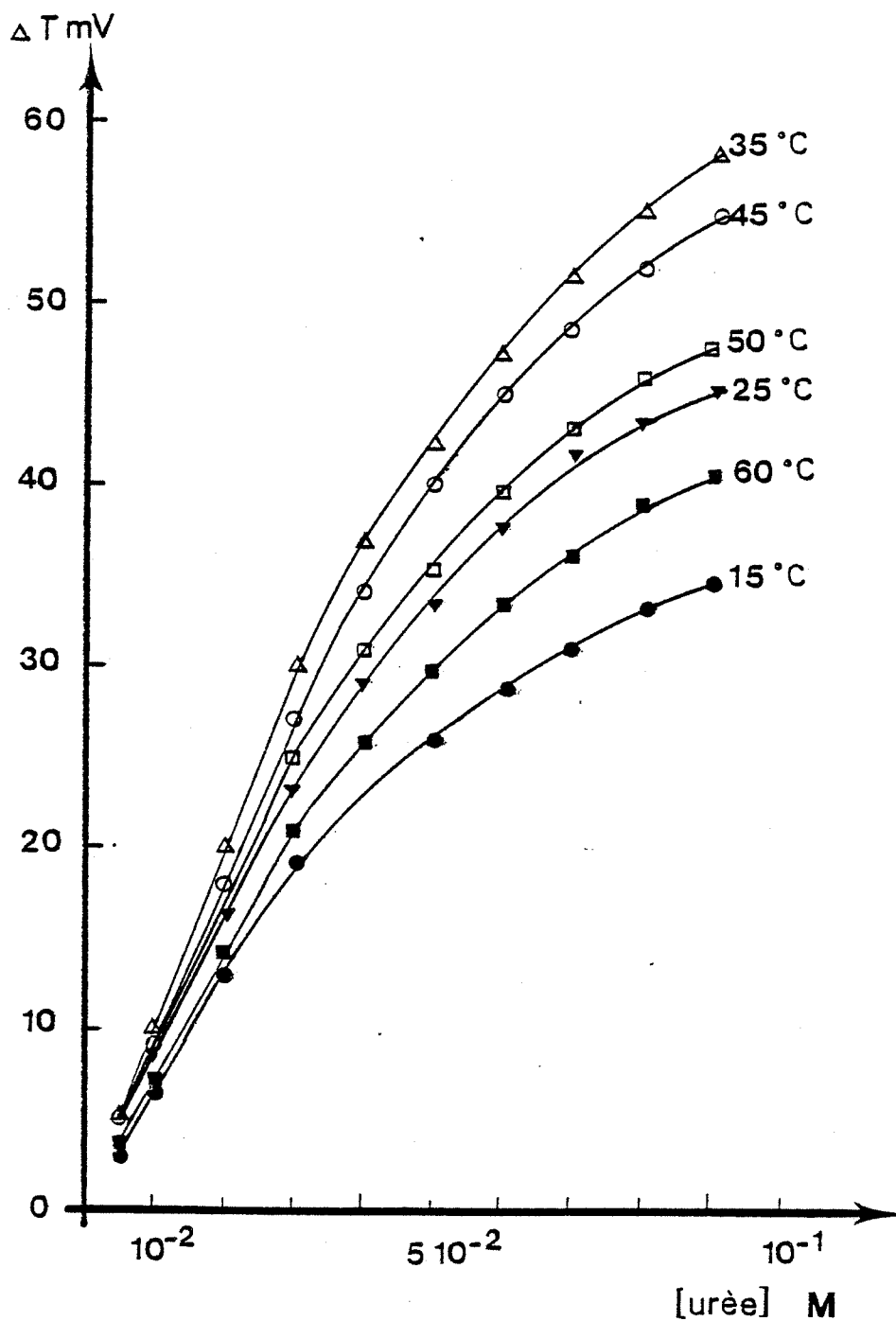


FIGURE 19 - Réponse de la thermistance à uréase immobilisée en fonction de la concentration en urée pour différentes valeurs de la température de la solution de substrat.

Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,1M ; pH = 6,8.

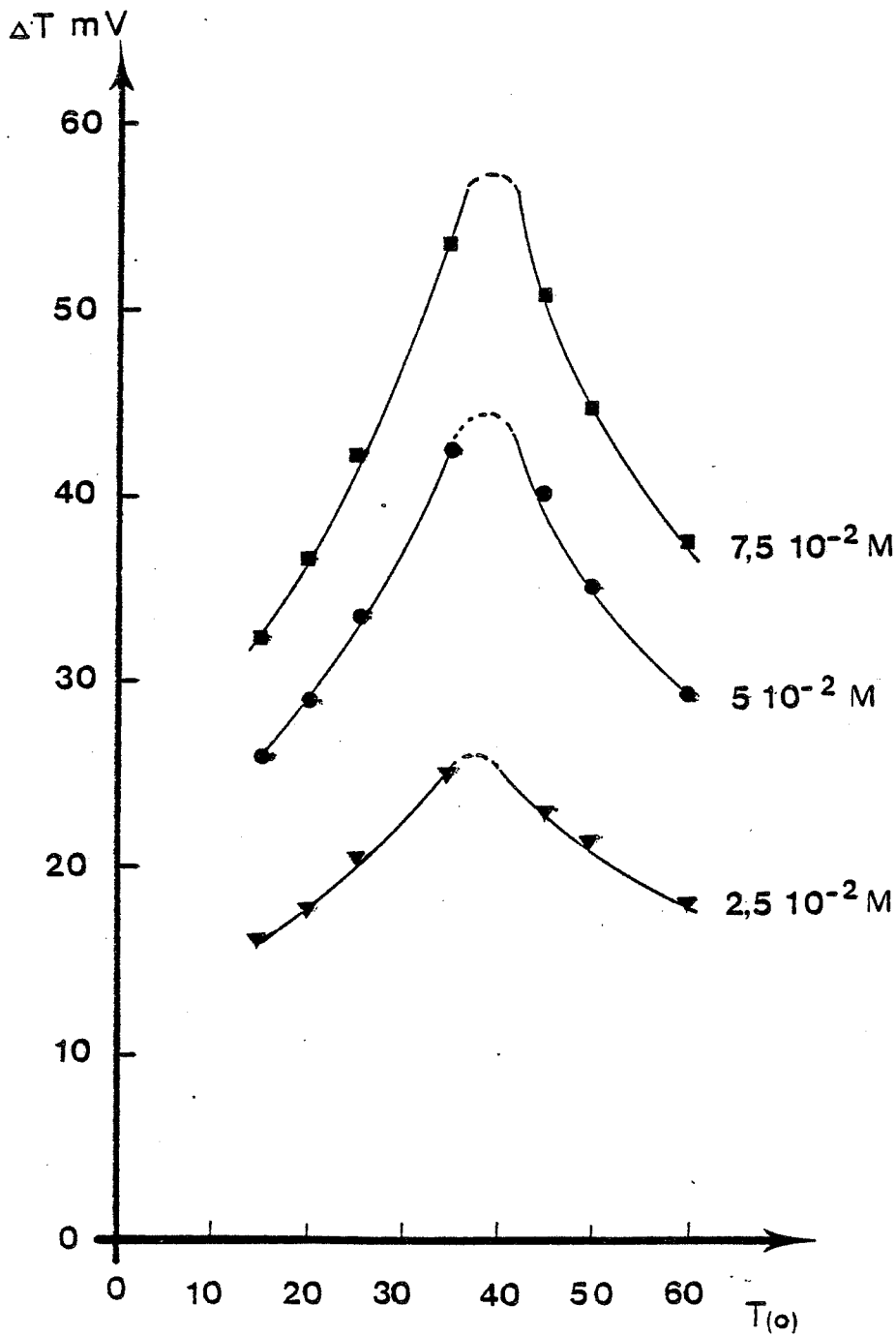


FIGURE 20 - Réponse de la thermistance à uréase immobilisée en fonction de la température pour différentes valeurs de la concentration en substrat :
—■— $7,5 \cdot 10^{-2} M$; —●— $5 \cdot 10^{-2} M$; —▼— $2,5 \cdot 10^{-2} M$.
Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,1M ; pH = 6,8.

où l'activité enzymatique est optimale. Dans le cas de notre capteur, cette température se situe aux environs de 38°C.

4°) Conclusions

Cette étude a mis en évidence la possibilité d'utiliser la variation d'enthalpie d'une réaction enzymatique à des fins analytiques en mettant en oeuvre une technologie simple. Le capteur enzymatique réalisé consiste en une thermistance sur laquelle est déposée une membrane contenant l'enzyme immobilisé. Un capuchon de verre permet d'augmenter le niveau du signal obtenu en limitant la vitesse de circulation du fluide au niveau de la membrane enzymatique.

L'utilisation d'un montage différentiel permet d'augmenter la sensibilité du capteur en améliorant le rapport signal/bruit.

Ce dispositif a permis de mesurer une variation de température de l'ordre de 5.10^{-4} °C.

Les substrats suivants ont été dosés :

- H₂O₂ 10^{-2} M à 7.10^{-1} M
- glucose 10^{-3} M à $1,5.10^{-2}$ M
- urée 2.10^{-3} M à 10^{-1} M

L'un des principaux avantages de ce type de capteur par rapport aux autres systèmes de dosage est un temps de réponse inférieur à 5 secondes.

Le temps de réponse de la thermistance étant de 2 secondes, il est probable que c'est la diffusion du substrat au sein de la membrane qui est le phénomène limitant et non la diffusion thermique qui est un processus rapide. En contrepartie, cette propriété limite le niveau du signal obtenu étant donné que l'on mesure l'accumulation de chaleur.

De nombreux essais réalisés dans le but de diminuer la limite inférieure de détection tout en conservant la simplicité de la méthode n'ont pas permis d'obtenir d'améliorations notables. L'extension des résultats obtenus à d'autres systèmes enzymatiques à variation d'enthalpie plus faible nécessiterait l'utilisation d'une technologie plus complexe.

Néanmoins, le capteur réalisé offre l'avantage d'avoir un faible prix de revient (30 F) et d'être utilisable pendant plusieurs semaines sans perte apparente d'activité.

III - ETUDE DES PHENOMENES D'INHIBITION A L'AIDE DU CAPTEUR ENZYMATIQUE

1°) Introduction

Un certain nombre de substances sont susceptibles de modifier l'activité enzymatique. Ces espèces chimiques sont appelées "effecteurs" et sont classées en inhibiteurs ou activateurs selon qu'elles diminuent ou augmentent la vitesse de réaction enzymatique en milieu homogène. Ces effecteurs sont dits réversibles ou irréversibles, selon que l'enzyme retrouve ou non son activité initiale spontanément en absence de l'effecteur.

La faculté d'inhibition d'une substance chimique est souvent responsable de sa toxicité vis-à-vis des systèmes vivants (métaux lourds, insecticides et pesticides). Il est par conséquent utile de disposer de techniques permettant de détecter ces toxiques aux concentrations usuellement rencontrées dans l'environnement. Dans ce but, l'utilisation de capteurs enzymatiques se révèle d'une excellente efficacité [GUYONNET - 1978] .

Le capteur précédemment mis au point a été utilisé pour l'étude des phénomènes d'inhibition de systèmes enzymatiques immobilisés et notamment dans le cas du système urée/uréase [BEAUX - 1983]. Les inhibiteurs suivants ont fait l'objet d'une étude :

- l'hydroxyurée
- les ions fluorures F^-
- les ions mercuriques Hg^{2+}

2°) Résultats

Le mode de préparation des thermistances ainsi que le dispositif expérimental utilisé sont les mêmes que précédemment.

Les inhibiteurs hydroxyurée et ions fluorures (inhibiteurs réversibles immédiatement) [BEAUX - 1983] ne sont introduits dans la solution de substrat que lorsque, pour une concentration de substrat donnée, la réponse du capteur est stationnaire.

Dans le cas des ions mercuriques (inhibiteurs non réversibles immédiatement) la thermistance est plongée dans une solution contenant l'inhibiteur (concentration C_I) pendant un temps d'incubation t (≈ 10 mn). Après rinçage, la réponse du capteur

est étudiée en fonction de la concentration en substrat. La membrane est ensuite régénérée par immersion dans une solution KCN 10^{-1} M puis utilisée pour une nouvelle étude.

Les figures 21, 22 et 23 représentent l'influence de la concentration en inhibiteur sur la réponse de la thermistance à uréase immobilisée. Dans tous les cas, les parties linéaires des courbes sont parallèles à la courbe "témoin" obtenue en absence d'inhibiteurs.

Les concentrations d'inhibiteurs nécessaires à l'obtention d'une inhibition significative de la membrane enzymatique ne favorisent pas l'utilisation de ce capteur enthalpimétrique pour des applications analytiques dans l'environnement.

De par son principe de fonctionnement, le capteur réalisé utilise une concentration d'enzyme immobilisé aussi élevée que possible. De ce fait, nous ne nous trouvons plus dans les conditions optimales de détection de l'inhibition [BEAUX - 1983].

IV - CONCLUSIONS

L'association d'une thermistance et d'une membrane enzymatique constitue une solution quasi-universelle pour la réalisation de capteurs enzymatiques, toute réaction chimique s'accompagnant d'une variation d'enthalpie.

Cependant, avec le rapport signal/bruit observé au niveau de tels capteurs, seules quelques substances peuvent donner lieu à un dosage significatif.

Un prix de revient faible ainsi que un temps de réponse inférieur à 5 secondes sont les principaux avantages du capteur enthalpimétrique.

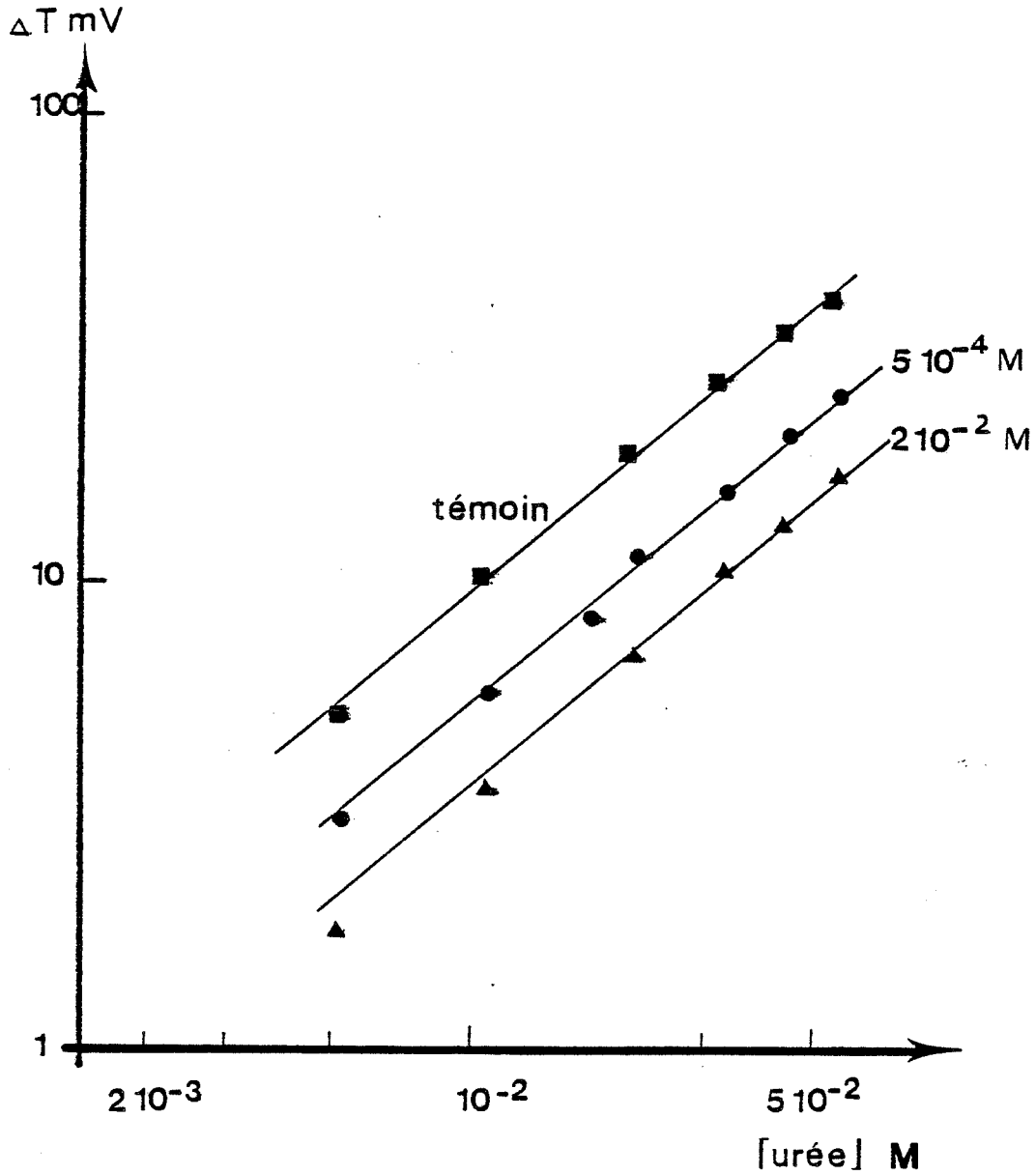


FIGURE 21 - Influence de la concentration en hydroxyurée sur la réponse de la thermistance à uréase immobilisée :

—■— 0 ; —●— $5 \cdot 10^{-4}$ M ; —▲— $2 \cdot 10^{-2}$ M.

Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,25M ; pH = 7,0 ; 25,0°C.

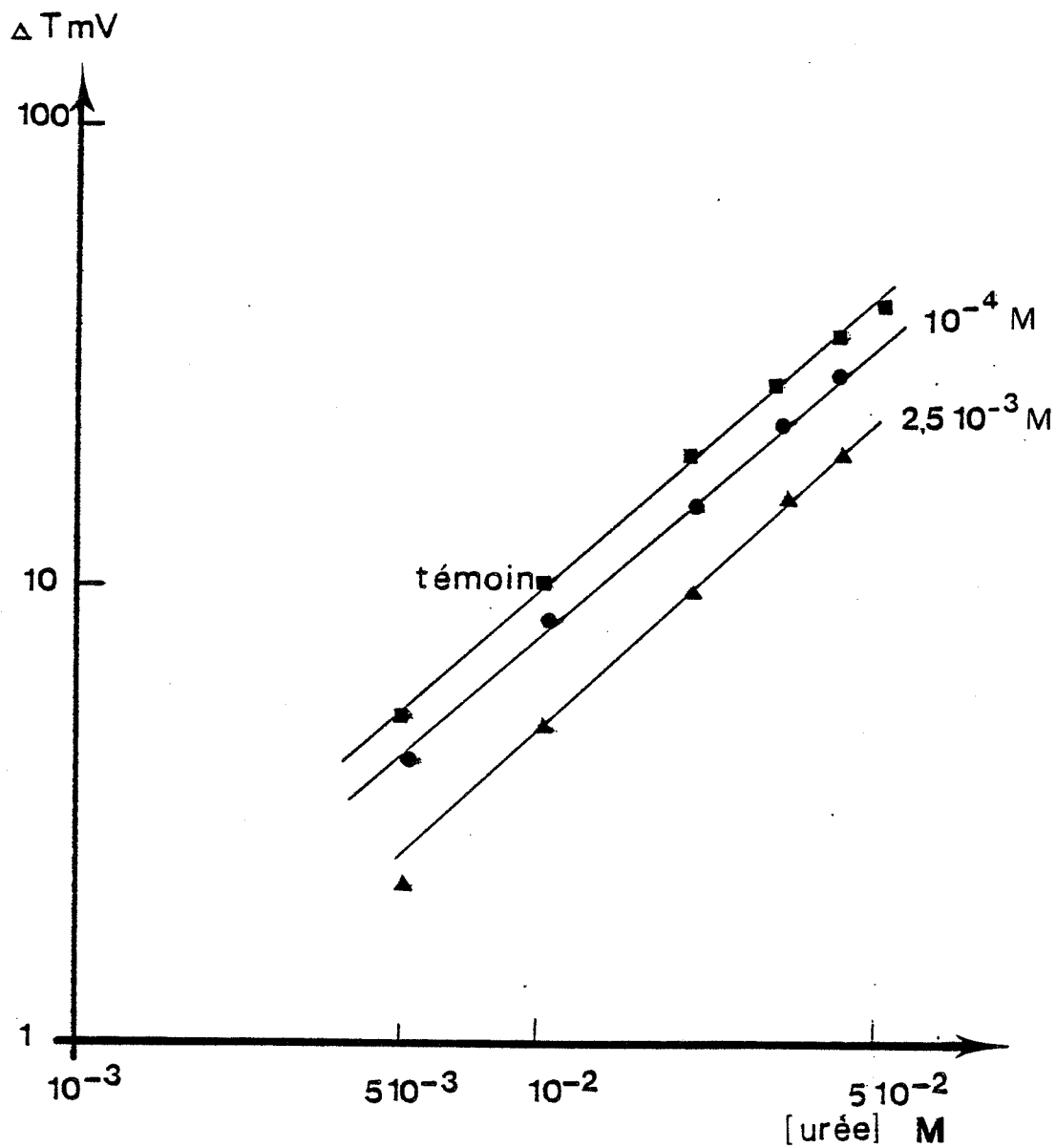


FIGURE 22 - Influence de la concentration en fluorure de sodium sur la réponse de la thermistance à uréase immobilisée :
—■— 0 ; —●— 10^{-3} M ; —▲— $2,5 \cdot 10^{-3}$ M.
Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,25M ; pH = 7,0 ; 25,0°C.

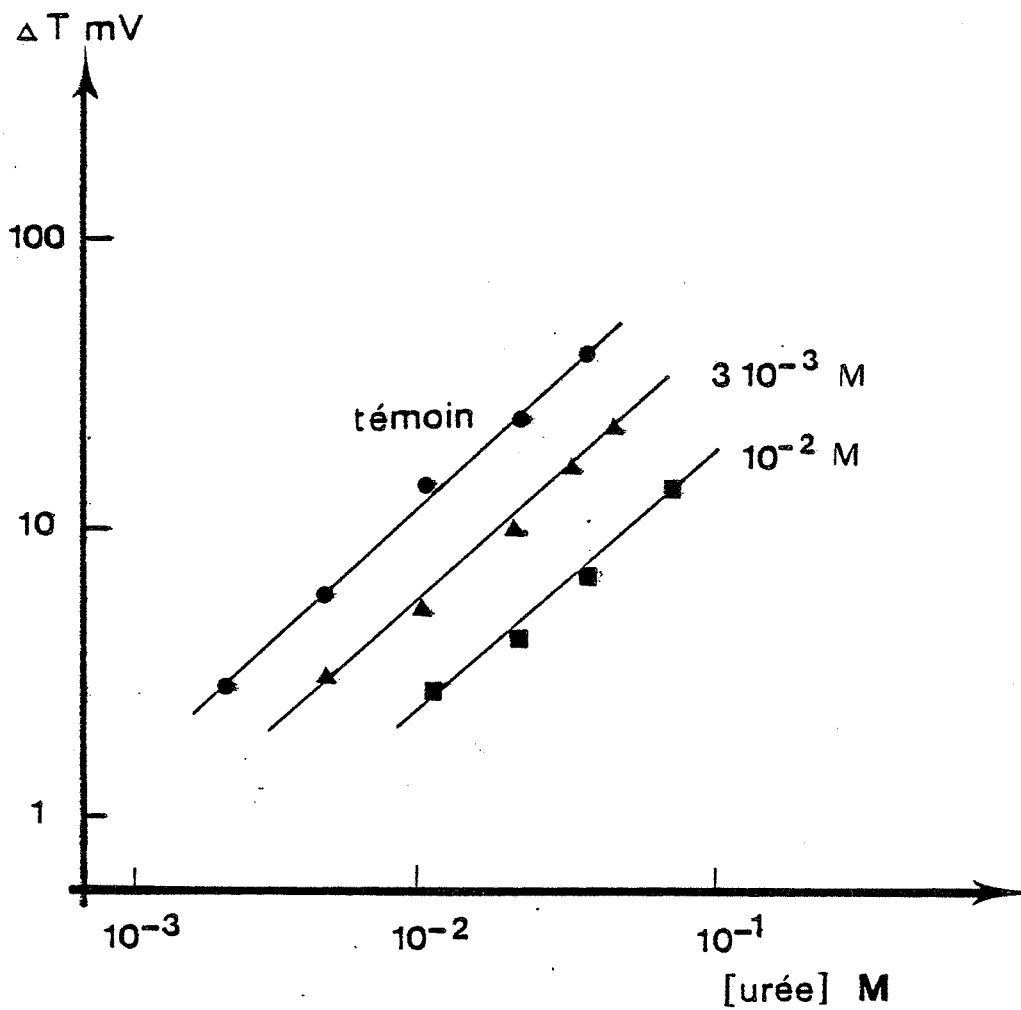


FIGURE 23 - Influence de la concentration en ions mercuriques sur la réponse de la thermistance à uréase immobilisée :

—●— 0 ; —▲— $3 \cdot 10^{-3}$ M ; —■— 10^{-2} M.

Conditions expérimentales : tampon phosphate 0,25M ; pH = 7,0 ; 25,0°C.
temps d'incubation 10 minutes.

CHAPITRE III

TRANSFERT DE MATIERE

DANS UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE :

INFLUENCE D' UN CHAMP ELECTRIQUE

EXTERNE CONTINU

CHAPITRE III

TRANSFERT DE MATIERE DANS UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE : INFLUENCE D'UN CHAMP ELECTRIQUE EXTERNE CONTINU

I - INTRODUCTION

L'influence d'un champ électrique sur les systèmes enzymatiques peut être abordée de diverses manières, selon son origine et son intensité.

- Champ électrique interne au système

- Lorsque l'enzyme est immobilisé à la surface ou à l'intérieur d'un support chargé, les charges fixes créent localement un champ électrique susceptible d'interférer avec les espèces ioniques (substrat, effecteurs, protons) participant à la réaction enzymatique [GOLDSTEN - 1964 ; HORNBLY et col. - 1968 ; SHULER et col. - 1972 ; HAMILTON et col. - 1973 ; KOBAYASHI et LAIDLER - 1974 ; CHAY - 1980 ; KALTHOD et RUCKENSTEIN - 1982 a-b].

- La différence de mobilité entre les diverses espèces ioniques qui participent à une réaction enzymatique en milieu hétérogène crée un potentiel de diffusion susceptible de modifier la répartition de ces espèces [De SIMONE - 1977 ; PENNLIN et col. - 1977 ; KALTHOD et RUCKENSTEIN - 1982 a-b].

- Champ électrique externe au système

L'application d'un champ électrique élevé peut modifier la conformation des protéines [YOSHIOKA et col. - 1979] et donc, induire une perturbation de l'activité catalytique des enzymes [FRINGELI et HOFER - 1980].

- Un certain nombre de travaux récents font état de la possibilité de coupler une réaction électrochimique à un système enzymatique immobilisé, par transfert électronique direct ou indirect entre l'électrode et le site actif de l'enzyme. [VARFOLOMEEV et BEREZIN - 1978 ; OSIPOV et VARFOLOMEEV - 1980 ; BEREZIN et col. 1980].

- Sous l'effet d'un champ électrique, les espèces ioniques directement ou indirectement impliquées dans la réaction enzymatique ne sont plus uniquement

transportées par simple diffusion. Un certain nombre d'études ont été réalisées pour mettre en évidence la possibilité de modifier l'activité catalytique d'enzymes immobilisés à l'aide d'un champ électrique externe [KUBO et col. - 1976 ; SELEGNY et col. - 1977 ; KARUBE et col. - 1977 ; BOURDILLON et THOMAS - 1978 ; VALLIN et TRAN-MINH - 1979]. Parallèlement à ces études expérimentales, des analyses théoriques ont été développées [SETO et HSIEH - 1976 ; SETO et HSIEH - 1978] et notamment par VALLETON et col. - [1982 ; 1983, 1984] ainsi que SELEGNY et col. [1983].

Le développement probable des réacteurs utilisant des enzymes immobilisés, dans les prochaines années, ainsi que l'augmentation de l'électricité d'origine nucléaire ont contribué au choix de cette étude. La connaissance des paramètres et des mécanismes contribuant à la modification de l'activité catalytique par application d'une densité de courant constitue un apport à l'utilisation potentielle de ces bioréacteurs.

La démarche adoptée pour notre étude a été de mettre en évidence, expérimentalement, la possibilité de moduler l'activité catalytique d'une membrane artificielle contenant un enzyme immobilisé, à l'aide d'un champ électrique continu. Deux enzymes ont été utilisés à titre d'exemple :

- l'uréase qui fait intervenir un substrat ionique et des produits de réaction acides et basiques faibles ;

- l'acétylcholinestérase qui fait intervenir un substrat ionique et des produits de réaction ioniques dont une espèce acide faible.

La modélisation de ces deux systèmes enzymatiques a permis de mettre en évidence l'origine des modifications d'activité observées expérimentalement.

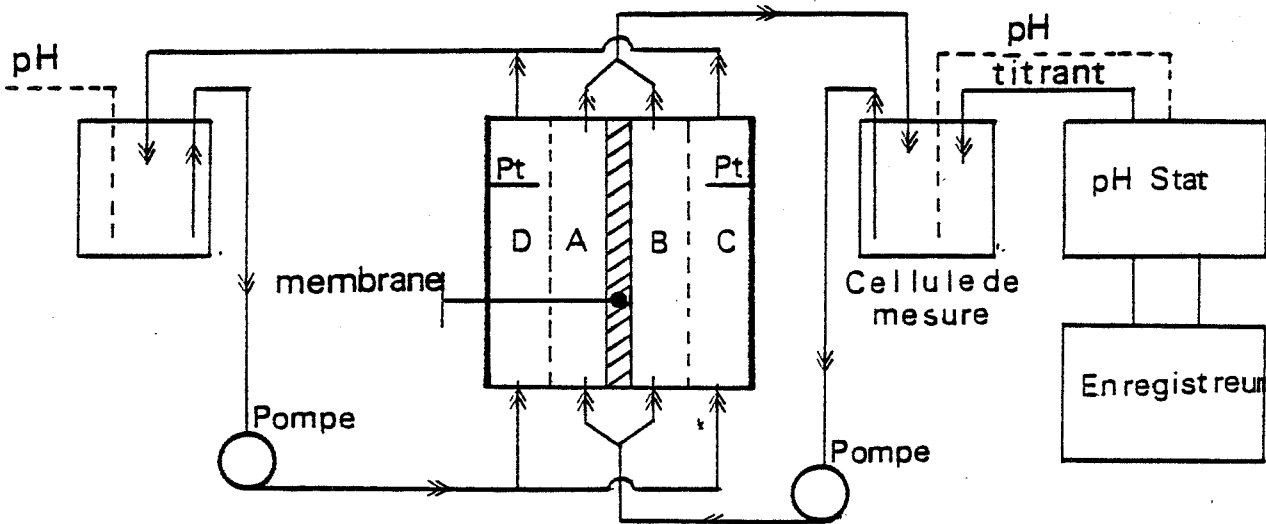
II - ETUDE DU SYSTEME UREE/UREASE

Les caractéristiques de ce système ont été décrites dans le chapitre I .

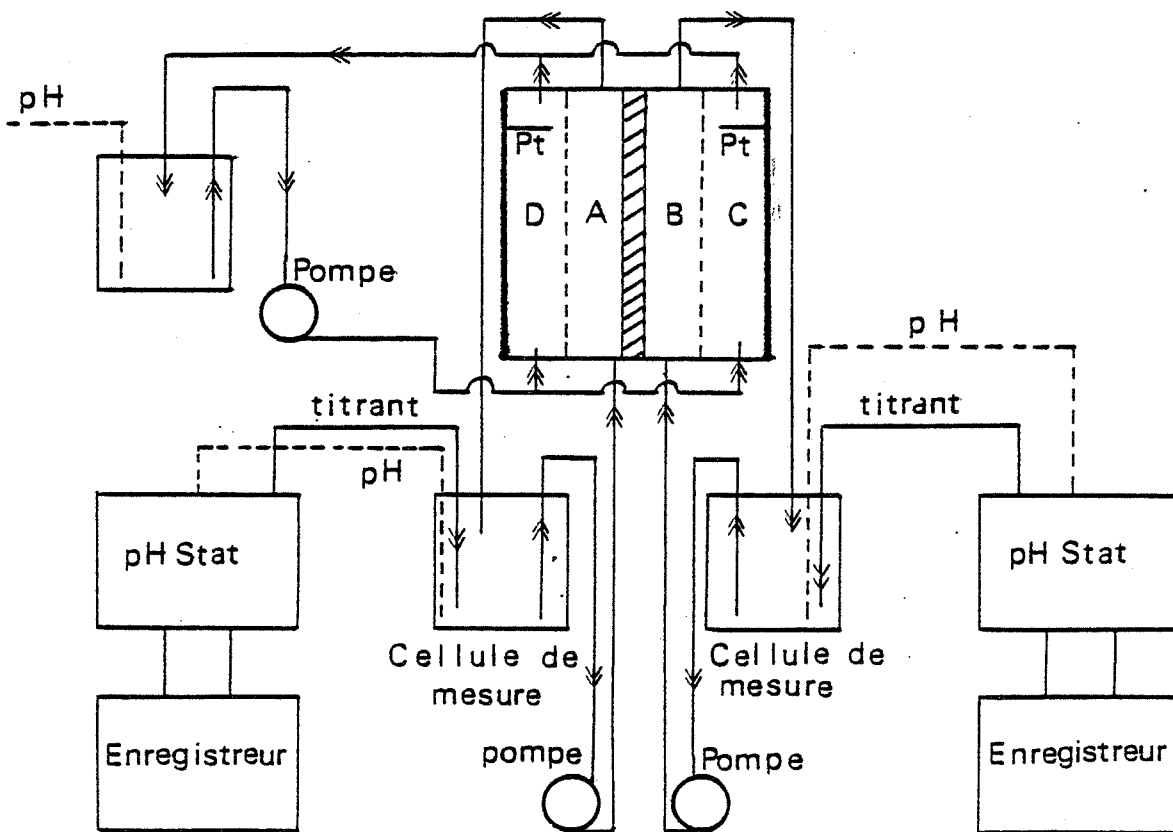
1°) Etude expérimentale

a) Matériel et méthode

Les deux dispositifs expérimentaux utilisés sont présentés sur la figure 24. Une cellule permettant d'appliquer un champ électrique perpendiculaire à la membrane



(a)



(b)

FIGURE 24 - Représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour l'étude de l'influence d'une densité de courant sur l'activité catalytique d'une membrane enzymatique.

Fig. 24a - Un dispositif pH-stat régule le pH de la solution de substrat circulant dans les deux compartiments A et B.

Fig. 24b - Deux dispositifs pH-stat régulent le pH des deux solutions de substrat circulant de manière indépendante dans les compartiments A et B.

enzymatique a été réalisée. Elle est divisée en quatre compartiments A, B, C et D ayant chacun un volume de 5 cm^3 . La membrane enzymatique est obtenue par coréticulation d'albumine et d'uréase d'après le mode opératoire décrit dans l'annexe 2. La résistance mécanique de cette membrane est améliorée grâce à une toile en nylon noyée dans la masse de la membrane. L'épaisseur de la membrane ainsi obtenue est de 2 mm. Elle sépare les compartiments A et B dans lesquels circule la solution de substrat. Deux membranes hydrophiles (Sartorius Membrane filter - Réf. SM 121-36) séparent les compartiments D et A ainsi que B et C. Ce montage à quatre compartiments permet d'éviter d'une part une dégradation électrochimique du substrat sur les électrodes de platine et d'autre part l'interférence des réactions de production/consommation de protons aux électrodes avec la méthode de détermination de l'activité enzymatique (pH-stat). Les différentes solutions contiennent un sel de fond (K_2SO_4) en concentrations égales. Ce sel de fond est introduit pour "stabiliser" la conductivité électrique des solutions et éviter ainsi que les produits ioniques de réaction et le titrant ne fassent trop varier la densité de courant en fonction du temps pour une d.d.p. appliquée aux bornes de la cellule constante. La détermination des vitesses de consommation de substrat est obtenue par la technique du pH-stat, à partir de la vitesse d'adjonction d'acide (H_2SO_4 10^{-1}N).

La surface active des électrodes de platine et de la membrane enzymatique est de 10 cm^2 . Les vitesses de circulation des différentes solutions sont égales ($150 \text{ cm}^3.\text{mn}^{-1}$) et aussi élevées que possible pour limiter l'épaisseur des couches limites de diffusion aux interfaces membrane/solution. La cellule est connectée à une alimentation stabilisée (Nobatron DCR 60-13 de SORENSEN). Toutes les solutions sont thermorégulées ($25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) et ne contiennent pas de tampon pH. L'introduction de substrat se fait à l'aide d'une microburette (GILMONT - $2,5 \text{ cm}^3$) contenant une solution d'urée molaire.

Les dispositifs expérimentaux permettent :

- de déterminer la vitesse de consommation d'urée correspondant à l'ensemble de la membrane (Fig. 24a). La solution de substrat circule dans les compartiments A et B ;

- de déterminer les vitesses de consommation de substrat correspondant à chaque compartiment A et B (Fig. 24b). Les mesures sont réalisées de manière indépendante sur les deux solutions de substrat correspondant aux compartiments A et B.

Cette étude expérimentale a pour but de déterminer les valeurs des paramètres suivants :

- concentration en sel de fond
- concentration en substrat
- pH de la solution de substrat

pour lesquels les modifications d'activité enzymatique observées par application d'une densité de courant, sont optimales.

b) Résultats

α) Influence de la concentration en sel de fond K_2SO_4

En présence d'une densité de courant imposée, le paramètre susceptible de modifier l'activité enzymatique de la membrane est la valeur du champ électrique intramembranaire. Conformément à l'équation (25) cette valeur est inversement proportionnelle au terme : $\sum_i z_i \mu_i C_i$.

Les vitesses de réaction présentées sur les figures 25 à 29 sont rapportées à une membrane ayant une surface de 1 dm².

La vitesse expérimentale de consommation de substrat (V_e)^s est présentée en fonction de l'intensité (mA) sur la figure 25 et en fonction de la différence de potentiel appliquée aux bornes de la cellule sur la figure 26, pour différentes valeurs de la concentration en sel de fond. Le montage expérimental utilisé est présenté sur la figure 24a.

Pour une intensité nulle, la vitesse de consommation de substrat est peu sensible aux variations de la force ionique de la solution.

Pour une intensité non nulle, la vitesse de réaction est d'autant plus élevée que la concentration du sel de fond est faible.

La vitesse de réaction ne varie pas entre 0 et 2,2 volts (fig. 26), ce qui correspond à l'absence de courant dans le circuit.

Les études suivantes ont été réalisées avec $[K_2SO_4] = 5,75 \cdot 10^{-4} M$. Pour cette valeur, les espèces ioniques produites par la réaction enzymatique ainsi que les ions introduits par le titrant (pH-stat) ne modifient pas de façon notable la conductivité de la solution de substrat pendant la durée d'une expérience. Par ailleurs, l'augmentation d'activité observée pour cette valeur de la concentration en sel de fond reste importante (fig. 25).

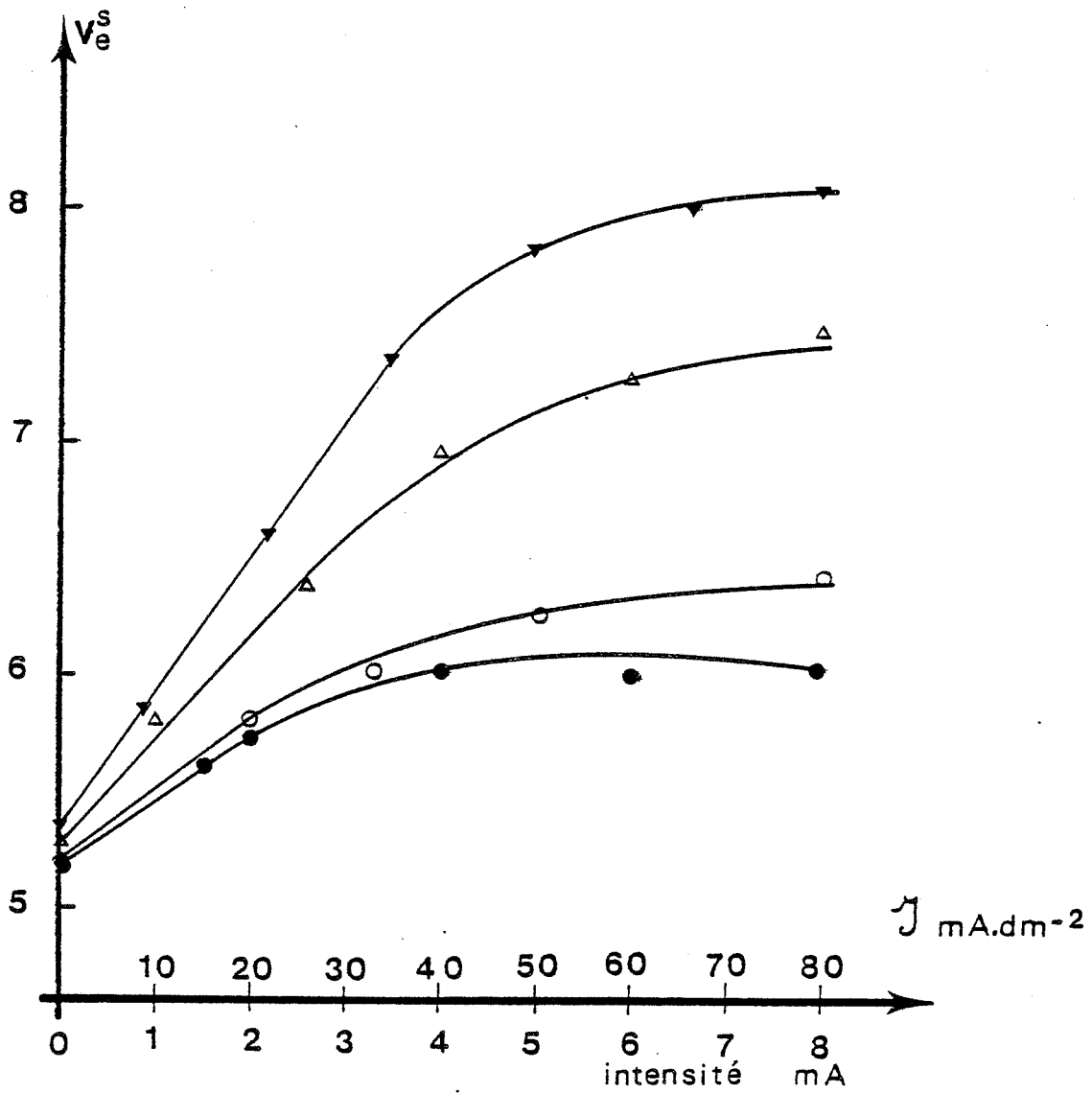


FIGURE 25 - Influence de la concentration en sel de fond (K_2SO_4) sur la vitesse de consommation de substrat (v_e^S en micromole.mn⁻¹) en fonction de la densité de courant (mA.dm⁻²).

—▼— $4,31.10^{-4}M$; —△— $5,75.10^{-4}M$; —○— $1,72.10^{-3}M$;
—●— $3,45.10^{-3}M$.

Conditions expérimentales : [urée] = $10^{-3}M$; pH(o) = 5,02 ; 25,0°C.

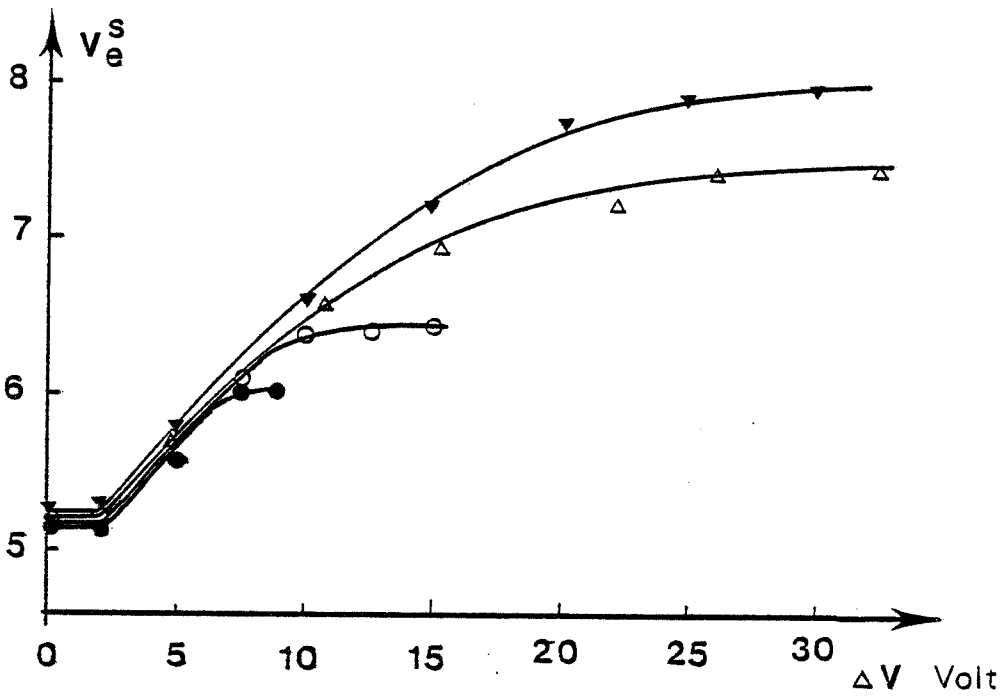


FIGURE 26 - Influence de la concentration en sel de fond ($K_2 SO_4$) sur la vitesse de consommation de substrat (v_e^s en micromole. mn^{-1}) en fonction de la différence de potentiel appliquée aux bornes de la cellule. Légende et conditions expérimentales décrites Fig. 25.

β) Influence de la concentration en substrat

La concentration en substrat détermine la vitesse de la réaction enzymatique et par conséquent, la concentration des produits de réaction au sein de la membrane. Le champ électrique intramembranaire étant inversement proportionnel à la concentration des espèces ioniques, nous avons étudié l'influence de la concentration en substrat sur la vitesse de réaction, en fonction de la densité de courant. Les résultats sont présentés sur la figure 27a.

La figure 27b obtenue à partir de la figure 27a représente l'augmentation relative de la vitesse de réaction (\mathcal{R}) en fonction de l'intensité.

$$\mathcal{R} = \text{vitesse de réaction pour } i \neq 0 / \text{vitesse de réaction pour } i = 0$$

Pour une intensité non nulle, cette augmentation est d'autant plus importante que la concentration en substrat est faible. Ce résultat confirme l'influence de la conductivité et donc du champ électrique intramembranaire sur les résultats observés.

Les mesures suivantes ont été obtenues avec les paramètres expérimentaux suivants :

$$[K_2SO_4] = 5,75 \cdot 10^{-4} M \text{ et } [urée] = 5 \cdot 10^{-4} M$$

γ) Influence du pH de la solution de substrat pH(o)

La figure 28 montre l'influence du pH de la solution de substrat sur les résultats obtenus (montage expérimental décrit fig. 24a).

Pour une intensité nulle, la vitesse de réaction est pratiquement indépendante de la valeur du pH de la solution de substrat. Celle-ci ne contenant pas de tampon pH, le pH intramembranaire résulte des contraintes diffusionnelles sur les produits de réaction et ne dépend par conséquent que des paramètres cinétiques et diffusionnels.

Les courbes obtenues ont une forme sigmoïde. Le gain maximum d'activité est observé à $pH(o) = 6,0$.

δ) Etude cinétique comparée des compartiments anodique et cathodique

Il nous a semblé intéressant d'étudier la répartition de la vitesse d'adjonction de titrant par le pH-stat, entre le compartiment anodique et le compartiment cathodique.

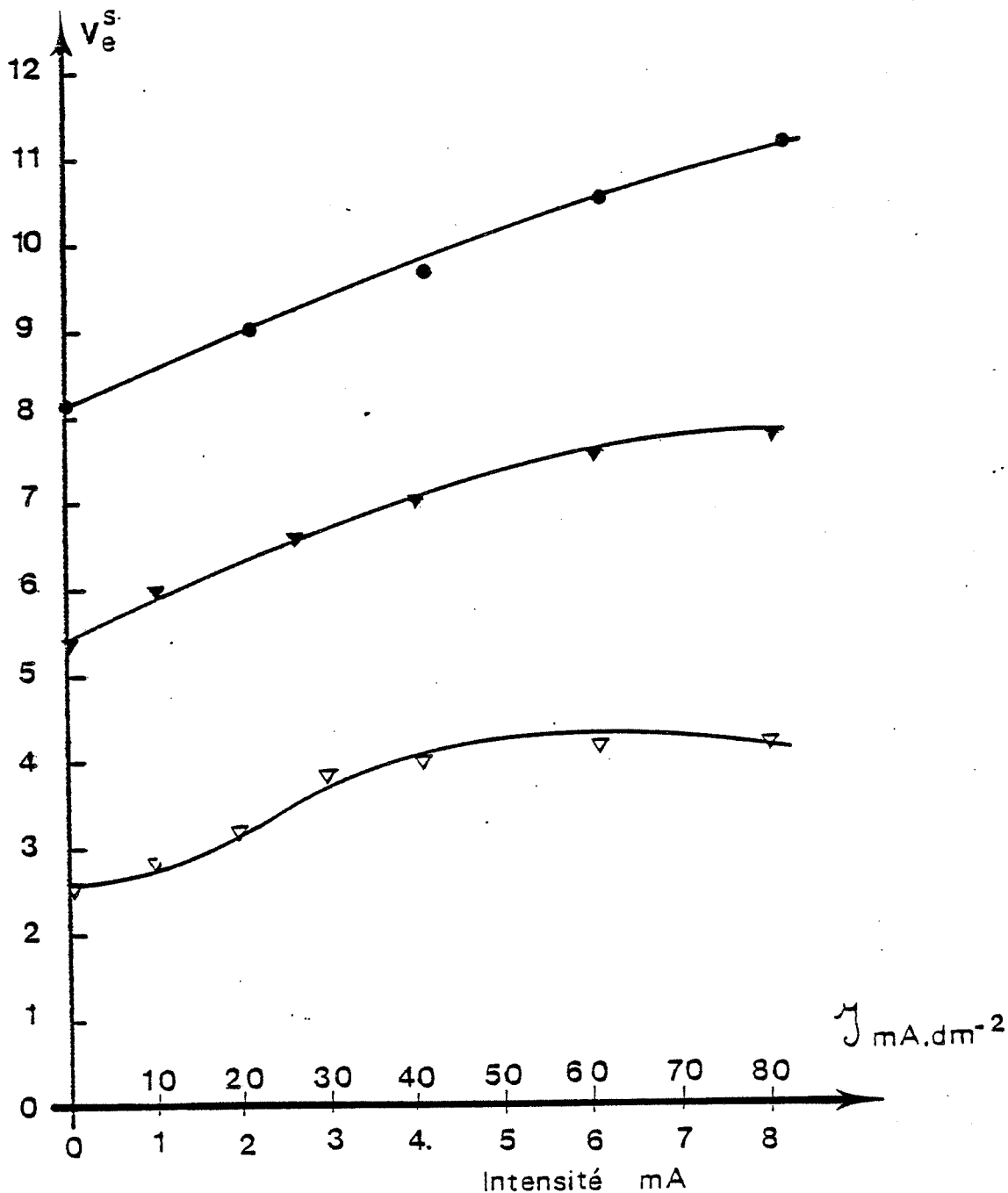


FIGURE 27a - Influence de la concentration en substrat $C_s(o)$ sur la vitesse de consommation d'urée en fonction de la densité de courant.

V_e^S ($\mu\text{mole} \cdot \text{mn}^{-1}$) en fonction de j ($\text{mA} \cdot \text{dm}^2$)

\bullet $C_s(o) = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; \blacktriangleright $C_s(o) = 10^{-3} \text{ M}$; ∇ $C_s(o) = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Conditions expérimentales : $\text{pH}(o) = 5,02$; $[\text{K}_2\text{SO}_4] = 5,75 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $25,0^\circ\text{C}$.

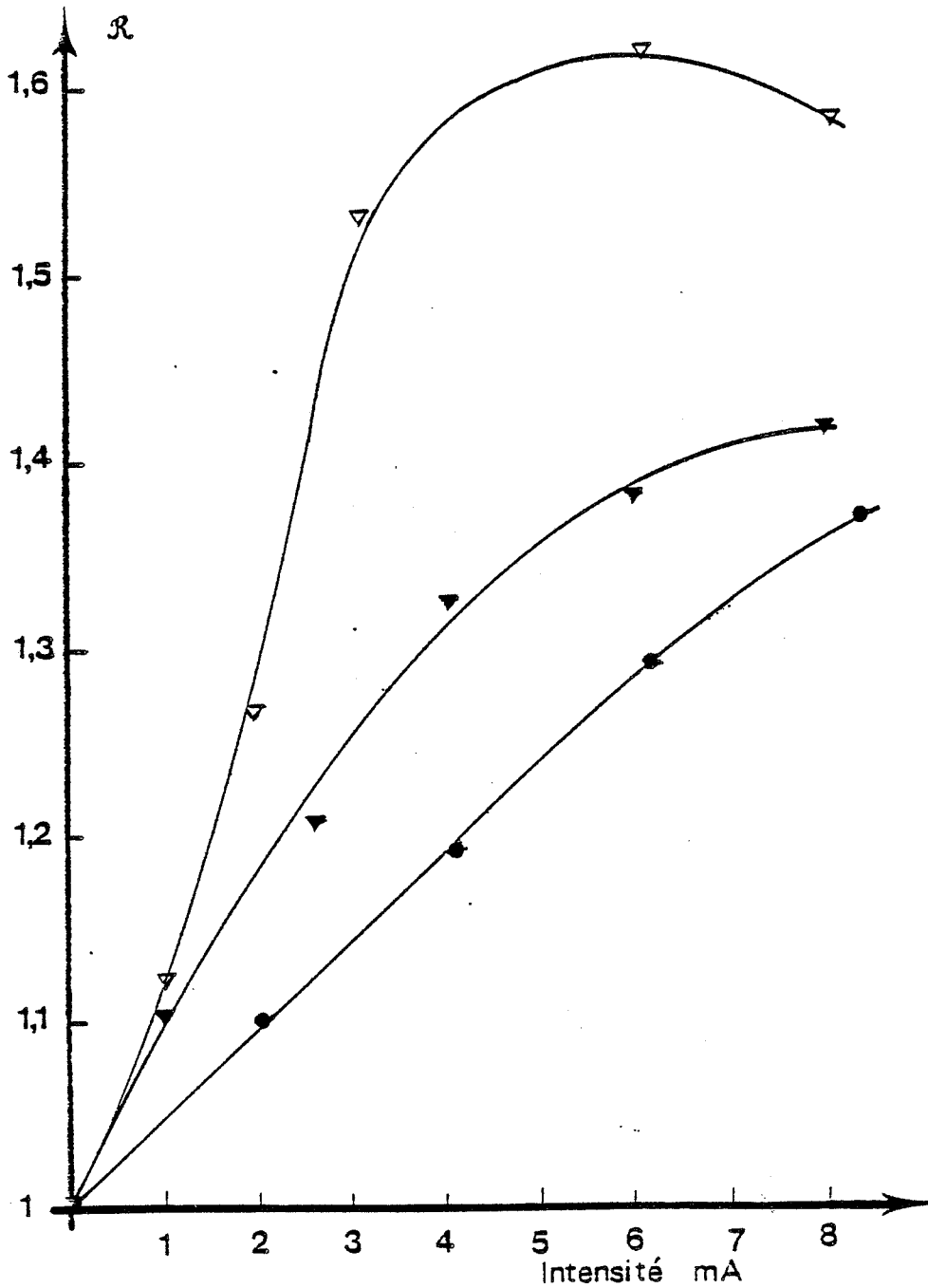


FIGURE 27b - Influence de la concentration en substrat $C_s(o)$ sur la vitesse de consommation d'urée en fonction de la densité de courant.

R (défini dans le texte) en fonction de \mathcal{I} ($\text{mA} \cdot \text{dm}^2$)

● $C_s(o) = 1,5 \cdot 10^{-3} M$; \triangleleft $C_s(o) = 10^{-3} M$; ∇ $C_s(o) = 5 \cdot 10^{-4} M$

Conditions expérimentales : $\text{pH}(o) = 5,02$; $[\text{K}_2\text{SO}_4] = 5,75 \cdot 10^{-4} M$; $25,0^\circ\text{C}$.

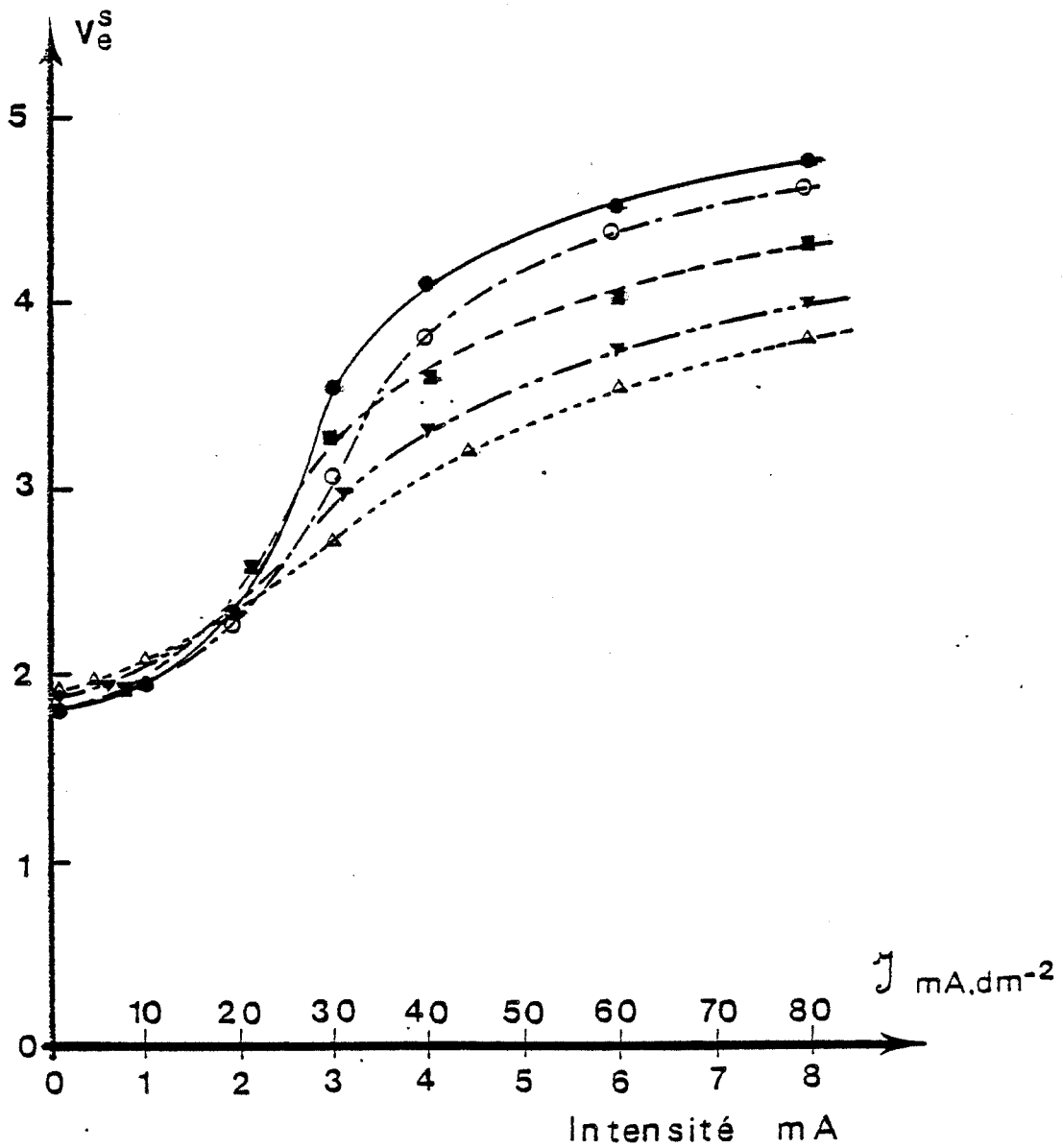


FIGURE 28 - Vitesse de consommation de substrat v_e^s (micromole.min⁻¹) en fonction de la densité de courant pour différentes valeurs du pH de la solution de substrat pH(o).

—○— pH(o) = 6,45 ; —●— pH(o) = 6,00 ; —■— pH(o) = 5,40 ;
—▼— pH(o) = 4,70 ; —△— pH(o) = 4,48.

Conditions expérimentales : $C_s(o) = 5 \cdot 10^{-4} M$; $[K_2SO_4] = 5,75 \cdot 10^{-4} M$;
25,0°C.

Le dispositif expérimental utilisé est décrit sur la figure 24b. Les vitesses d'adjonction de titrant correspondant aux deux compartiments sont traduites en vitesse de consommation de substrat (équation 35).

Les résultats obtenus pour deux séries de mesure correspondant à deux valeurs imposées du pH de la solution de substrat sont présentés sur la figure 29.

Pour une intensité nulle, les conditions aux bornes de la membrane étant symétriques, les vitesses de réaction correspondant aux deux compartiments sont égales ($1,70 \cdot 10^{-6}$ mole.mn⁻¹).

Pour une intensité non nulle, les résultats obtenus font apparaître une asymétrie de la vitesse de réaction.

Les résultats de l'analyse mathématique du système montreront qu'il ne faut pas identifier les réponses des deux pH-stats aux vitesses de consommation de substrat. Seule la somme des deux vitesses d'adjonction de titrant (compartiment anodique + compartiment cathodique) peut être transformée en vitesse de consommation de substrat.

2°) Etude mathématique

a) Hypothèses

La modification de la vitesse de consommation d'urée par application d'une densité de courant peut avoir différentes origines :

- une variation des caractéristiques structurales de la membrane uréase/albumine ;
- une modification de l'enzyme ;
- une modification du profil de pH au sein de la membrane qui induit une modification des paramètres V_m^{pH} et K_m^{pH} de l'uréase.

Dans la gamme de densité de courant utilisée (0 - 100 mA.dm⁻²) l'un de ces phénomènes aura un effet prépondérant.

Pour rendre compte des phénomènes observés, un modèle est élaboré. Celui-ci utilise les équations de diffusion-réaction-électromigration décrites précédemment (I-III-1-) avec rétroaction du pH sur les paramètres V_m et K_m . En conséquence, nous faisons l'hypothèse que les variations d'activité observées résultent effectivement d'une modification du profil de pH intramembranaire par application d'un champ électrique.

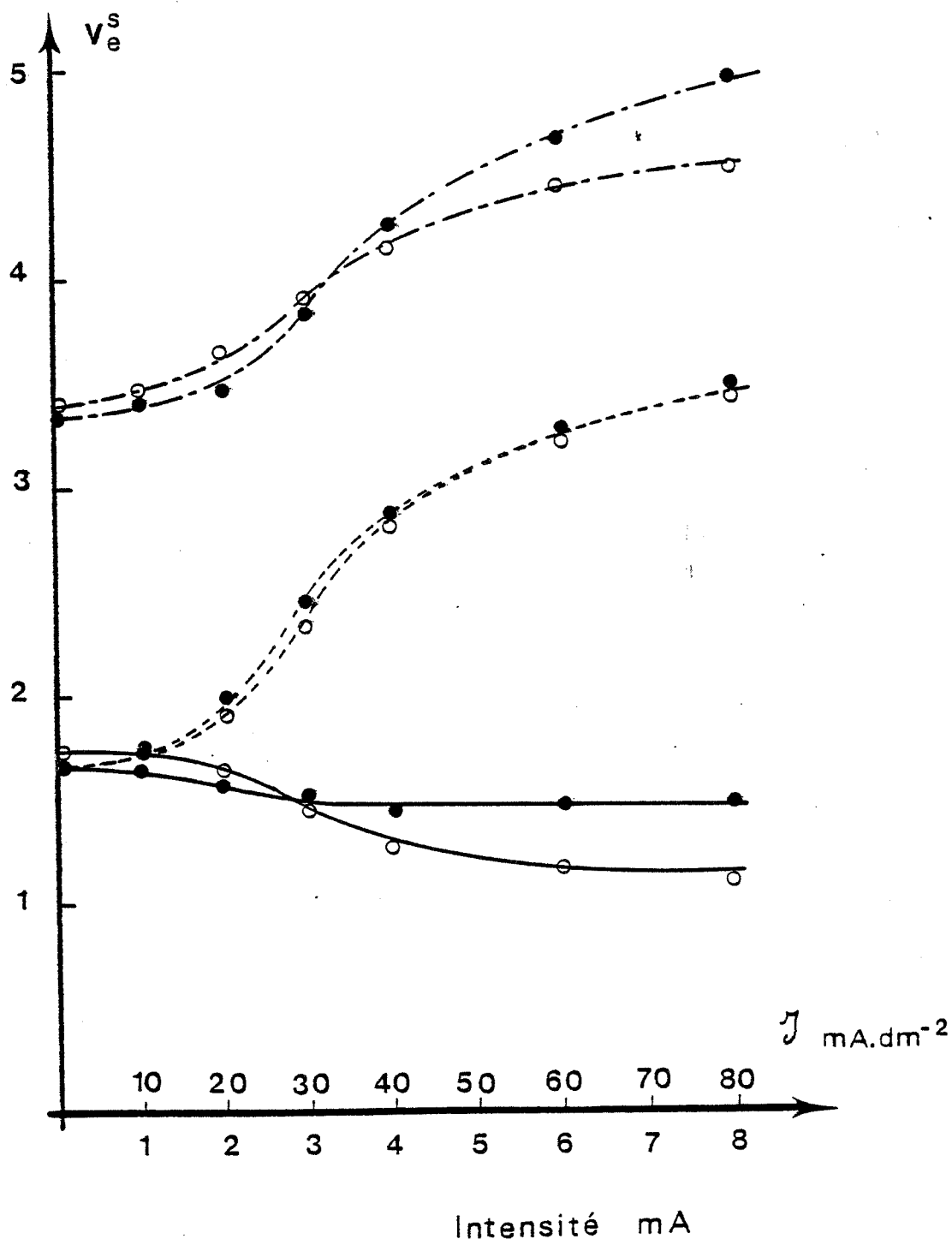


FIGURE 29 - Vitesse de consommation de substrat v_e^S ($\text{micromole}\cdot\text{min}^{-1}$) correspondant au compartiment anodique (—), au compartiment cathodique (-----) ainsi qu'à la somme de ces deux vitesses de réaction (— · —) pour deux valeurs du pH de la solution de substrat —●— $\text{pH}(o) = 5,80$; —○— $\text{pH}(o) = 4,49$.
 Conditions expérimentales : $C_s(o) = 5\cdot 10^{-4}\text{M}$; $[\text{K}_2\text{SO}_4] = 5,75\cdot 10^{-4}\text{M}$; $25,0^\circ\text{C}$.

Constantes physiques utilisées dans la modélisation du système urée/uréase :

Espèce chimique	mobilité électrique $\text{dm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	coefficient de diffusion $\text{dm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
H^+	$+ 3,65 \cdot 10^{-5}$	$9,31 \cdot 10^{-7}$
NH_4^+	$+ 7,62 \cdot 10^{-6}$	$1,96 \cdot 10^{-7}$
B^+	$+ 5,2 \cdot 10^{-6}$	$1,96 \cdot 10^{-7}$
OH^-	$- 2,06 \cdot 10^{-5}$	$5,28 \cdot 10^{-7}$
HCO_3^-	$- 4,61 \cdot 10^{-6}$	$1,20 \cdot 10^{-7}$
A^{2-}	$- 8,29 \cdot 10^{-6}$	$1,06 \cdot 10^{-7}$
CO_3^{2-}	$- 7,12 \cdot 10^{-6}$	$0,92 \cdot 10^{-7}$
urée	—	$1,2 \cdot 10^{-7}$
NH_3	—	$1,2 \cdot 10^{-7}$
H_2CO_3	—	$1,2 \cdot 10^{-7}$

TABLEAU 1

Le tableau (1) donne les différentes constantes utilisées dans l'analyse mathématique.

Le modèle permet d'accéder au comportement de la membrane pour des valeurs croissantes de la densité de courant ($0 \leq \mathcal{J} \leq 100 \text{ mA.dm}^{-2}$).

Dans un premier temps, nous présentons les résultats théoriques obtenus en absence de densité de courant imposée. Cette première partie de l'étude mathématique décrit le comportement en milieu non tamponné de la membrane contenant l'uréase immobilisée. Elle met en évidence l'influence prépondérante des contraintes diffusionnelles sur la cinétique enzymatique au sein de la membrane.

Dans un deuxième temps, nous examinons l'influence d'une densité de courant sur le comportement cinétique de la membrane enzymatique. Les profils de pH intramembranaire ainsi que les profils de concentration des différentes espèces chimiques présentes sont décrits pour différentes valeurs de la densité de courant.

b) Résultats

α) Densité de courant imposée nulle

Le modèle permet d'accéder aux profils de concentration intramembranaire des différentes espèces impliquées dans la réaction enzymatique, ainsi qu'aux profils de pH et de champ électrique.

La figure 30 représente à l'état stationnaire :

- le profil de pH ainsi que les profils de concentration des produits de réaction NH_3 , NH_4^+ et HCO_3^- (Fig. 30a) ;
- les profils de concentration de l'anion du sel de fond A^{2-} ainsi que du substrat (Fig. 30b) ;
- le profil du gradient de potentiel de diffusion (Fig. 30c).

En absence de courant imposé ($\mathcal{J} = 0$, eqn. 25) la différence de mobilité des différentes espèces ioniques se traduit par l'apparition d'un potentiel de diffusion [KALTHOD et RUCKENSTEIN - 1982 a,b] (Fig. 30c).

Ce potentiel de diffusion se traduit par une légère modification des profils de concentration des différentes espèces ioniques. Cet effet est mis en évidence sur la figure 30b où l'on a représenté le profil de concentration de l'espèce A^{2-} .

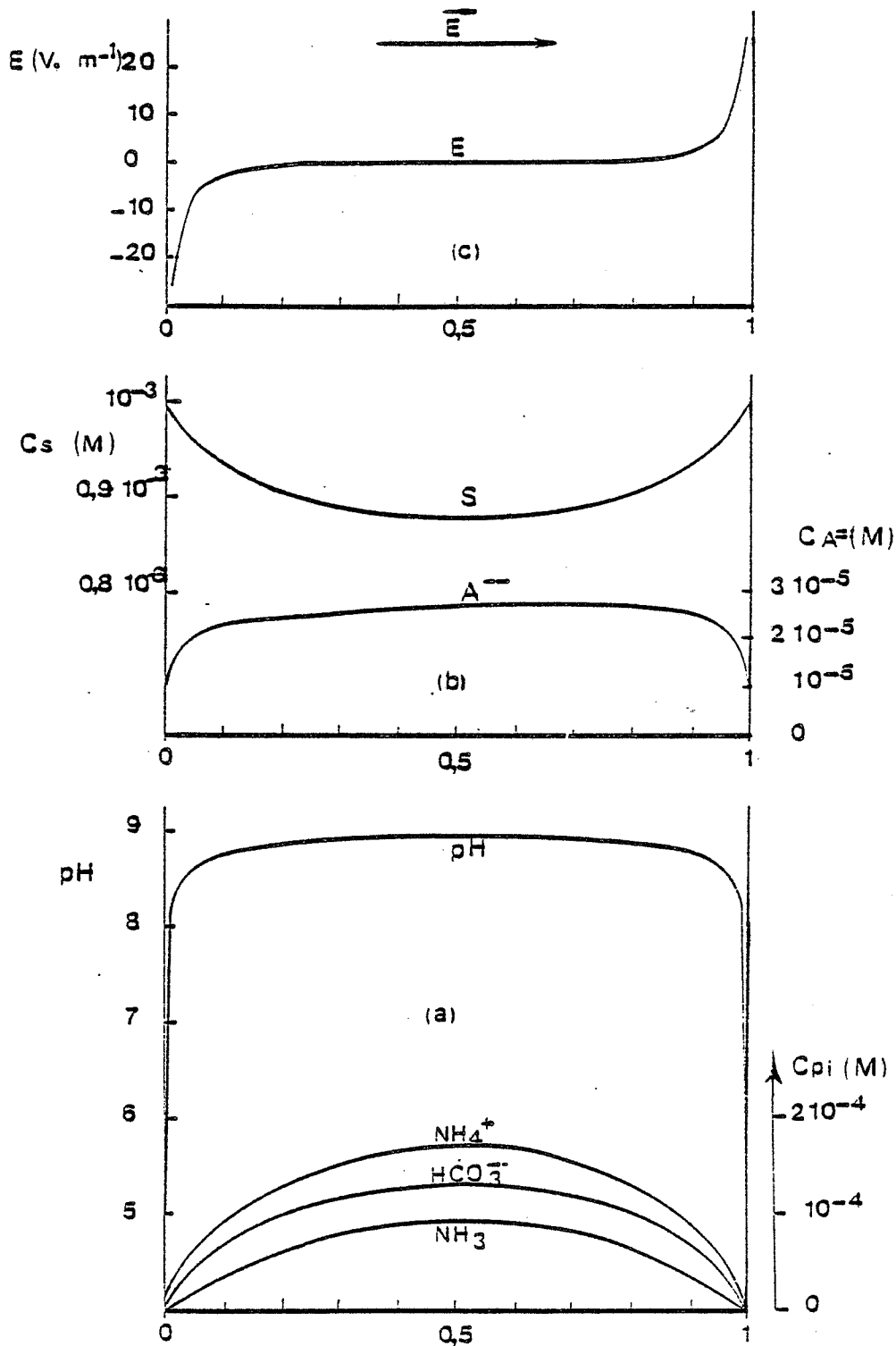


FIGURE 30 - Présentation de différents profils intramembranaires accessibles à partir du modèle, en absence de densité de courant imposée :

Fig. 30a - profil de pH et profil de concentration des produits de réaction HCO_3^- ; NH_3 ; NH_4^+ .

Fig. 30b - profil de concentration du substrat et de l'anion du sel de fond A^{2-} .

Fig. 30c - profil du gradient de potentiel de diffusion

Données numériques introduites dans le modèle :

$C_A(o) = 10^{-5} \text{ M}$; $C_B(o) = 10^{-7} \text{ M}$; $C_s(o) = 10^{-3} \text{ M}$; $V_m^o = 10^{-4} \text{ mole.dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$;
 $\text{pH}(o) = 5$; $e = 2,5 \text{ mm}$.

Toutefois, ce champ électrique ne modifie pas notablement le comportement cinétique de la membrane, et son influence peut par conséquent être négligée.

Le caractère acide et basique faible des produits de réaction provoque l'apparition d'un profil de pH (fig. 30a). En accord avec l'équation (10) appliquée au système urée/uréase, le pH intramembranaire tend vers une limite supérieure ($\text{pH} \rightarrow 9,2$) lorsque la concentration en produits de réaction augmente.

Les conditions aux bornes de la membrane étant symétriques ($\text{pH}(0)$ et $C_s(0)$) les profils de concentration sont symétriques par rapport au plan médian ($x = e/2$) de la membrane.

Les résultats expérimentaux présentés sur la figure 28 font apparaître, pour une densité de courant nulle l'absence d'influence du pH de la solution de substrat ($\text{pH}(0)$) sur la vitesse de consommation de substrat. Ce phénomène, contraire aux lois classiques de la cinétique enzymatique, peut être expliqué grâce aux résultats de l'analyse mathématique.

$\alpha 1$) Influence du pH de la solution de substrat $\text{pH}(0)$

La figure 31a représente l'évolution du profil de pH intramembranaire pour différentes valeurs du pH de la solution de substrat $\text{pH}(0)$.

Lorsque le pH de la solution de substrat varie entre 7 et 5, les profils de pH intramembranaire sont peu modifiés et ne dépendent que des contraintes diffusionnelles sur les produits de réaction. Par conséquent, la vitesse de consommation de substrat est relativement indépendante du pH aux bornes de la membrane, pour $5 \leq \text{pH}_0 \leq 8$ (Fig. 32a, paragraphe suivant).

La figure 31b montre l'évolution du pH au plan médian de la membrane ($\text{pH } e/2$) en fonction du pH aux bornes de la membrane pour trois valeurs de V_m . Rappelons que le terme V_m représente, à une constante près, la concentration d'enzyme immobilisé dans la membrane. L'augmentation du terme V_m se traduit par une augmentation de la concentration intramembranaire en produits de réaction et par conséquent, par une diminution de l'influence de $\text{pH}(0)$ sur le pH intramembranaire. Ce résultat est en accord avec les résultats expérimentaux de ATKINSON et col. [1977] concernant l'étude de particules d'uréase immobilisée dans un gel, en absence de tampon pH.

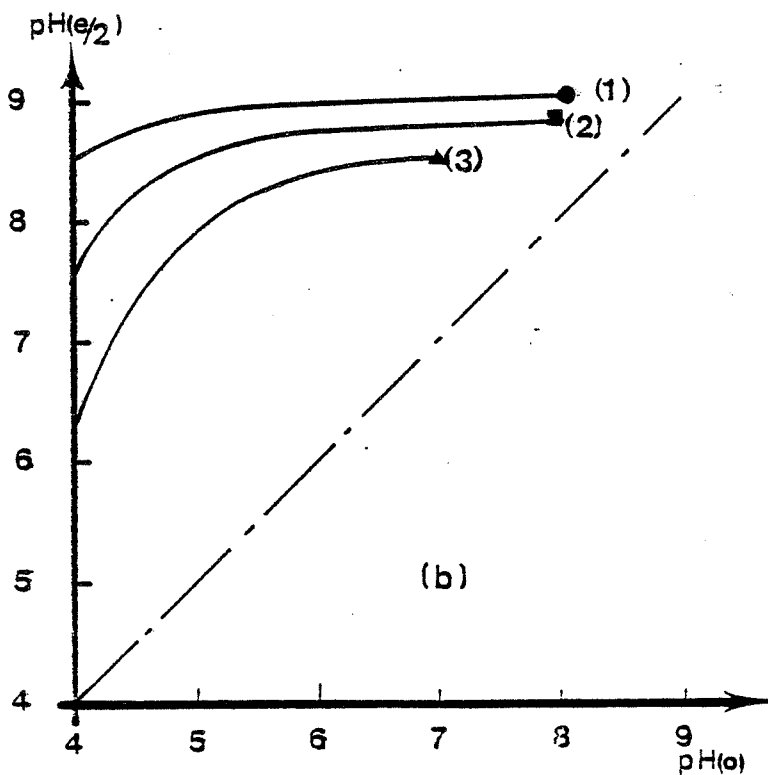
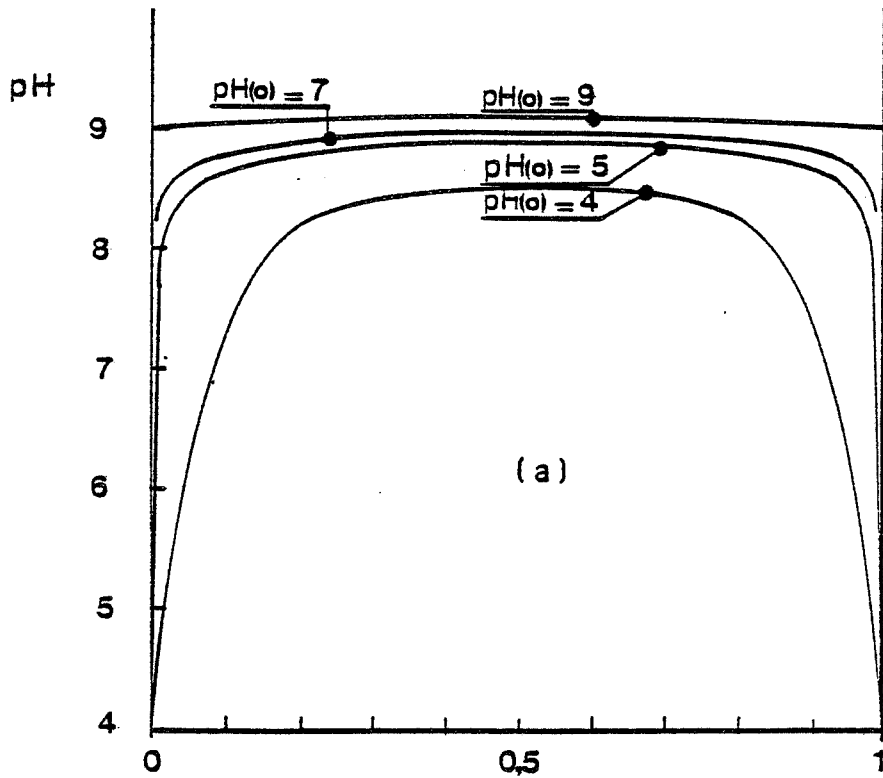


FIGURE 31 - Influence du pH aux bornes de la membrane ($\text{pH}(o)$) sur le pH intramembranaire en absence de densité de courant

Fig. 31a - profil de pH obtenu pour $V_m = 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$

Fig. 31b - pH au plan médian de la membrane ($\text{pH } e/2$) en fonction de $\text{pH}(o)$ pour trois valeurs de V_m : (1) $V_m = 10^{-4}$;
 (2) $V_m = 10^{-5}$; (3) $V_m = 10^{-6} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$.

Données numériques introduites dans le modèle : $C_s(o) = 10^{-3} \text{ M}$;
 $e = 2,5 \text{ mm}$.

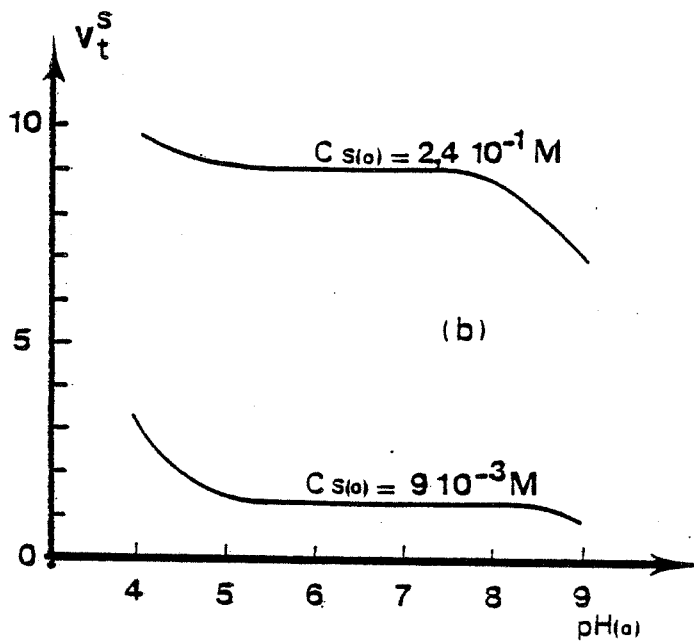
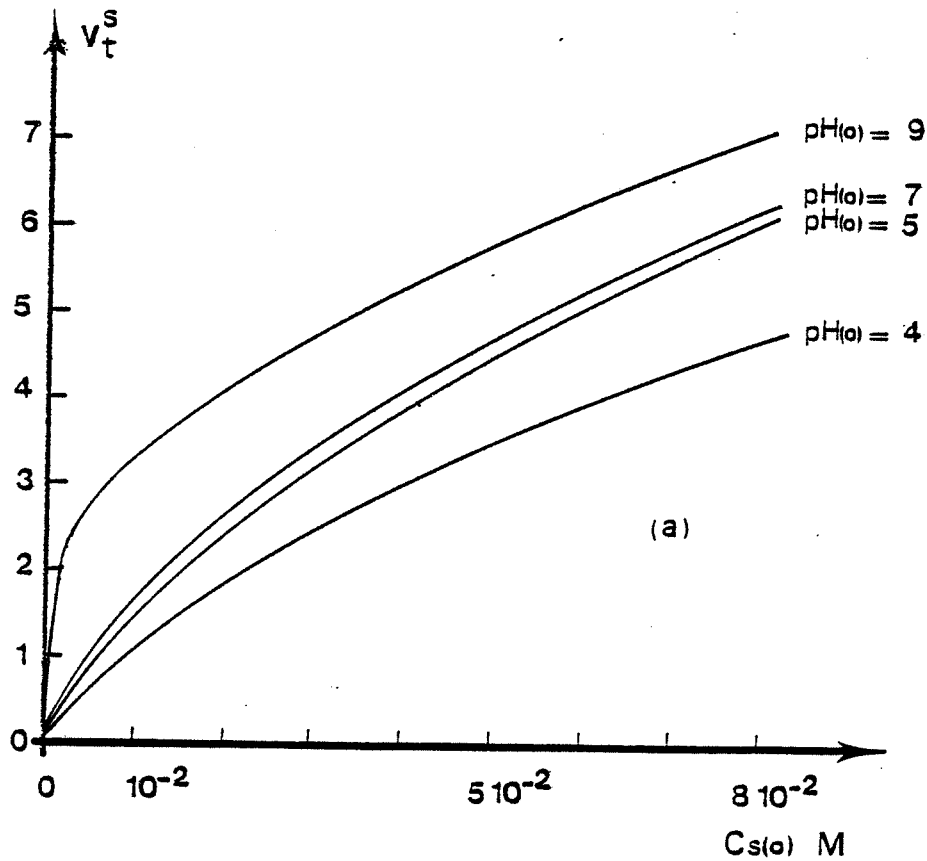


FIGURE 32 - Influence de la concentration en substrat aux bornes de la membrane ($C_{s(o)}$) sur la vitesse théorique de consommation de substrat (v_t^S en micromole. mm^{-1}) en absence de densité de courant imposée.

Fig. 32a - v_t^S en fonction de $C_{s(o)}$ pour différentes valeurs du pH aux bornes de la membrane ($\text{pH}(o)$).

Fig. 32b - v_t^S en fonction de $\text{pH}(o)$ pour deux valeurs de $C_{s(o)}$: $2,4 \cdot 10^{-1}$ M et $9 \cdot 10^{-3}$ M.

Données numériques introduites dans le modèle : $V_m = 10^{-4}$ mole. $\text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$;
 $e = 2,5$ mm.

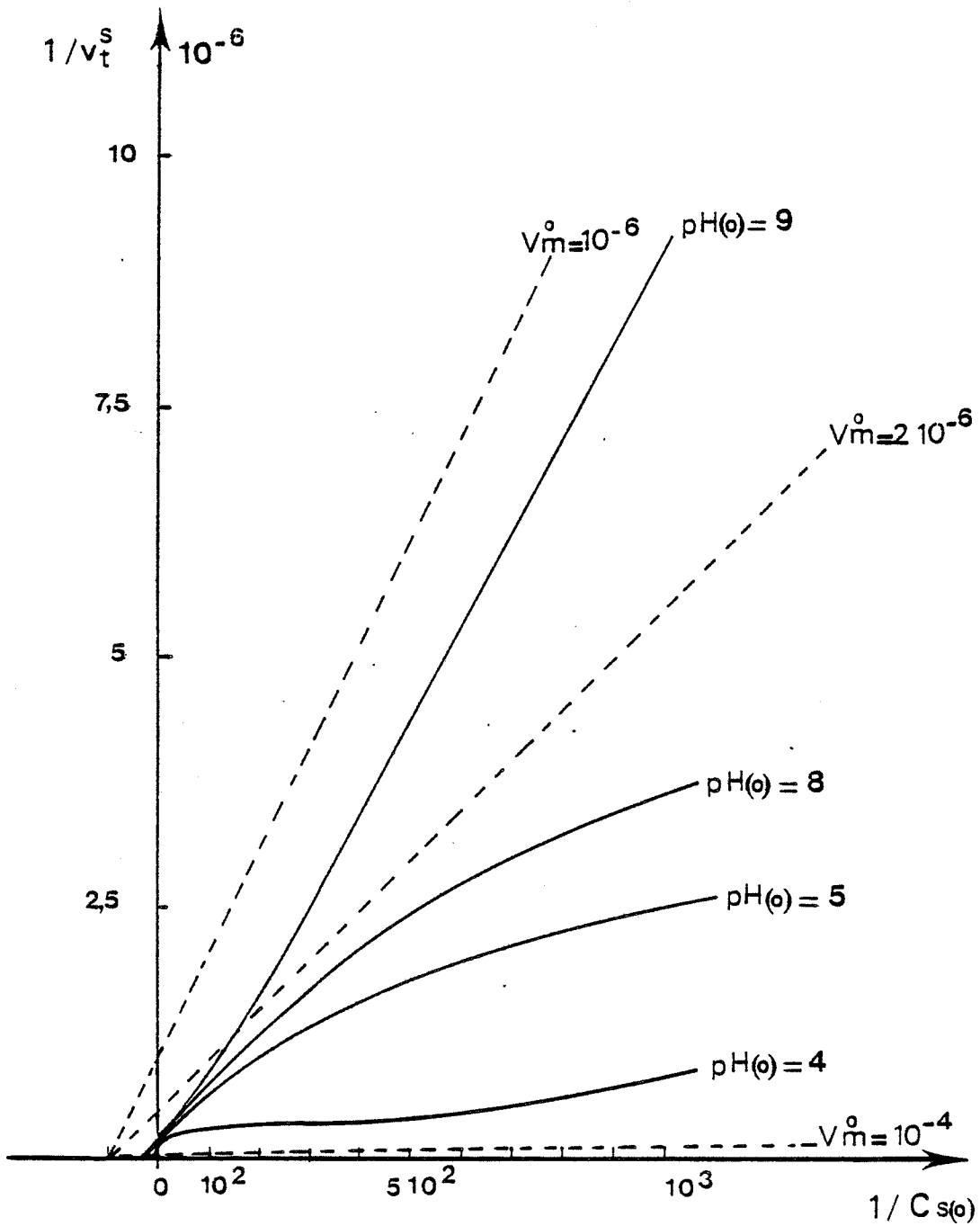


FIGURE 33 - Transformée de Lineweaver-Burk : $1/v_t^s$ en fonction de $1/C_s(o)$ obtenue :
 - à partir de la Fig. 32a (trait plein)
 - dans l'hypothèse d'une cinétique michaelienne pour l'enzyme en solution avec : $K_m^o = 10^{-2}M$ et $V_m^o = 10^{-6}$; $2 \cdot 10^{-6}$ et 10^{-4} mole.dm⁻³.s⁻¹ (trait pointillé).

L'augmentation du terme de réaction dans l'équation (22) par l'intermédiaire de la concentration en substrat fait apparaître le même type d'effet.

α2) Influence de la concentration de substrat $C_s(o)$

L'évolution de la vitesse théorique de consommation de substrat (V_t^S en micromole.mn⁻¹) en fonction de la concentration de substrat aux bornes de la membrane ($C_s(o)$) pour différentes valeurs de $pH(o)$ est présentée sur la figure 32a. Conformément aux conclusions du paragraphe précédent (α1) les courbes obtenues pour $8 \leq pH_0 \leq 5$ sont peu différentes. La figure 33 représente le faisceau de courbes obtenues à partir de la figure 32a par la transformée de Lineweaver-Burk : $1/V_t^S = f(1/C_s(o))$ (courbes en trait plein). Les droites (trait pointillé) sont obtenues dans l'hypothèse d'une cinétique michaelienne classique (enzyme en solution) et représentées à titre de comparaison. Il apparaît nettement que le comportement cinétique de la membrane ne peut être décrit simplement à partir des hypothèses michaeliennes du fait des contraintes diffusionnelles sur les espèces réagissantes [ENGASSER et HORVATH - 1973 ; THOMAS - 1976 ; HAMILTON et col. - 1974]. Dans notre cas (milieu non tamponné), les contraintes diffusionnelles sur les produits de réaction induisent l'établissement d'un profil de pH intramembranaire et par conséquent une variation des paramètres cinétiques $V_m(x)$ et $K_m(x)$ au sein de la membrane, le profil de pH étant lui-même dépendant de la concentration en substrat $C_s(o)$ (Fig. 31a).

La figure 32b représente la vitesse théorique de consommation de substrat (V_t^S en micromole.mn⁻¹) en fonction du pH de la solution de substrat. Elle donne une image de la pH-dépendance de la membrane enzymatique en milieu non tamponné.

La vitesse théorique de consommation d'urée a été déterminée à partir des flux interfaciaux de substrat (Equation 29 avec $\mu_s = 0$; chapitre I). Pour une densité de courant imposée nulle, les différentes méthodes de calcul de V_t^S donnent le même résultat (chapitre I ; Equations 29 et 30).

L'influence de la concentration en substrat $C_s(o)$ sur les profils de pH intramembranaire est présentée sur la figure 34a. Lorsque la concentration en substrat augmente, le pH au sein de la membrane tend vers une limite supérieure (9, 2).

A partir de la figure précédente, il est possible de tracer les variations du pH au plan médian de la membrane ($pH_{e/2}$) en fonction de $C_s(o)$ (Figure 34b). La courbe théorique obtenue est en accord avec les résultats expérimentaux de ATKINSON et col. [1977].

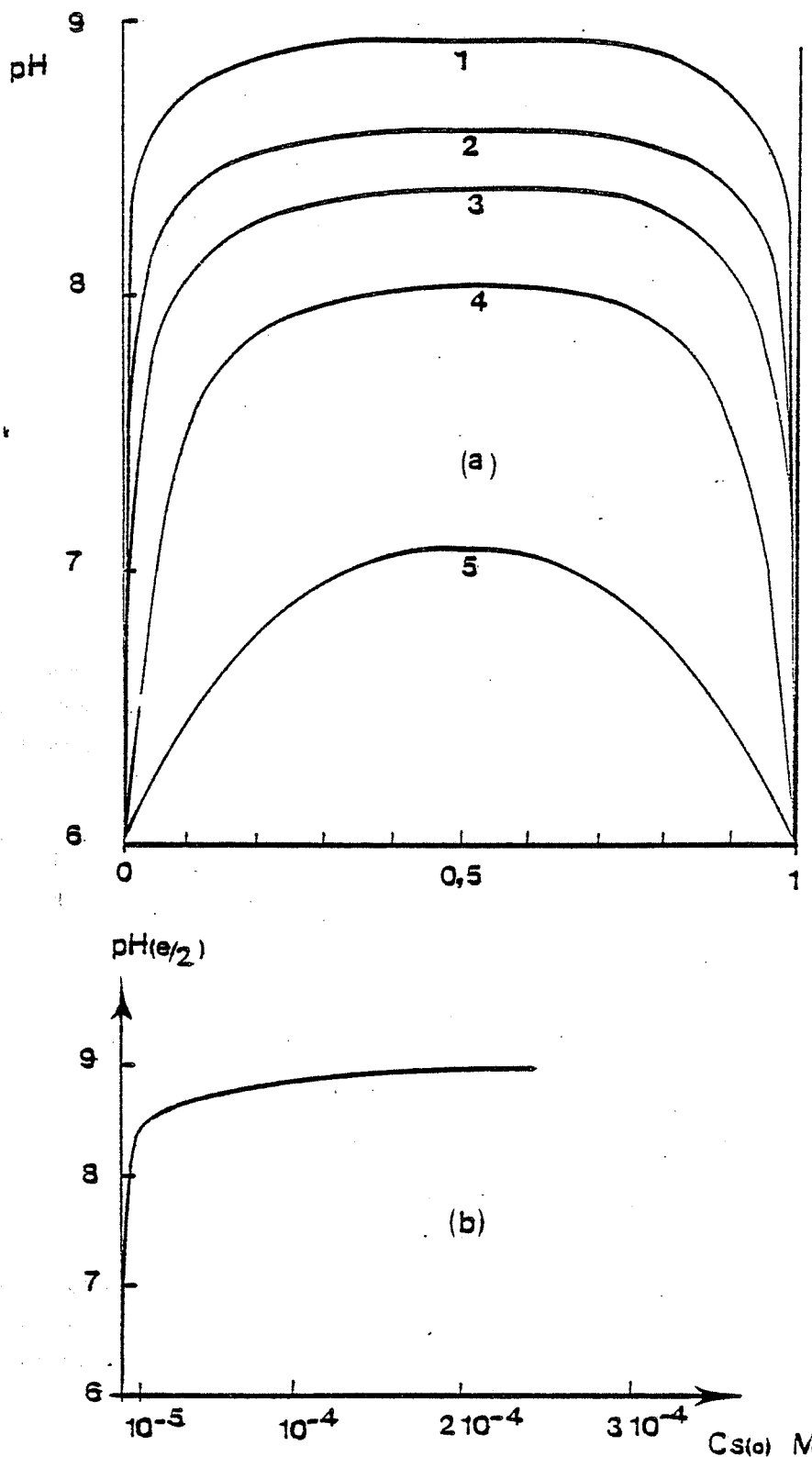


FIGURE 34 - Influence de la concentration en substrat aux bornes de la membrane ($Cs(o)$) sur le pH intramembranaire, en absence de densité de courant imposée.

Fig. 34a - profil de pH pour différentes valeurs de $Cs(o)$
 (1), $2,43 \cdot 10^{-4}$ M ; (2) $2,70 \cdot 10^{-5}$ M ; (3) $9 \cdot 10^{-6}$ M ; (4) $3 \cdot 10^{-6}$ M ; (5) 10^{-6} M

Fig. 34b - pH au plan médian de la membrane ($pH e/2$) en fonction de $Cs(o)$

Données numériques introduites dans le modèle :

$CA(o) = 10^{-6}$ M ; $CB(o) = 10^{-7}$ M ; $Vm = 10^{-4}$ M ; $pH(o) = 6$.

En pratique, le pH au plan médian de la membrane est accessible expérimentalement en utilisant une électrode de verre enrobée d'uréase [TRAN-MINH et BROUN - 1975]. Dans un tel montage, la membrane active a l'une de ses faces en contact avec la solution de substrat, l'autre étant au contact de l'électrode. Cette interface membrane électrode correspond au plan médian ($x = e/2$) dans la description théorique de la membrane.

Une électrode de pH sur laquelle nous avons déposé une membrane obtenue par co-réticulation d'uréase et d'albumine a été réalisée. La réponse de l'électrode en fonction de la concentration en substrat a été étudiée en milieu non tamponné. Les résultats sont présentés sur la figure 35.

A partir du modèle, une courbe théorique a été obtenue (trait fin) avec les données numériques suivantes :

- $e = 0,25 \text{ mm}$
- $V_m^0 = 5.10^{-6} \text{ mole.dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$
- $\text{pH}(0) = 6,0.$

La correspondance entre les résultats expérimentaux et l'analyse mathématique du système est excellente.

B) Densité de courant imposée non nulle

Cette étude est réalisée pour proposer une explication aux modifications de la vitesse expérimentale de consommation de substrat résultant de l'application d'une densité de courant (Figures 25 à 29).

Expérimentalement, la vitesse de consommation de substrat a été déterminée à partir de la vitesse d'adjonction d'une solution d'acide HX par le dispositif de pH-stat. En conséquence, nous avons déterminé à partir du modèle mathématique la vitesse théorique d'adjonction de titrant V_t^X (en micromole.mn^{-1}) correspondant à l'hydrolyse, par la membrane enzymatique, de l'urée.

Les flux interfaciaux des produits de réaction ont été déterminés par l'équation (32) conformément au schéma ci-après :

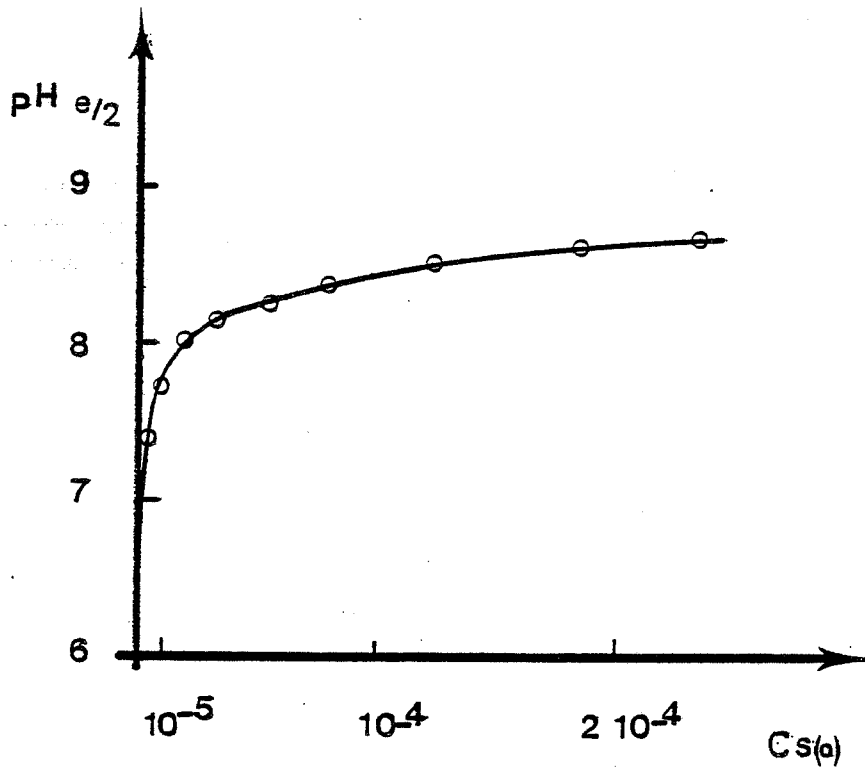
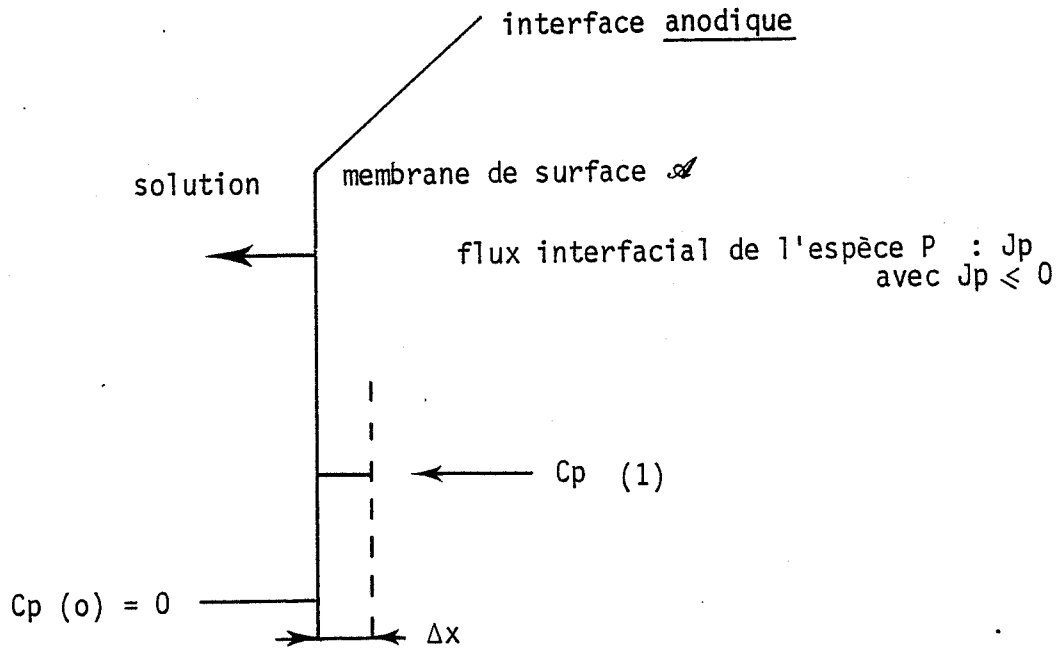


FIGURE 35 - Variations théorique (—) et expérimentale (o), en fonction de la concentration en substrat, du pH à l'interface membrane/électrode ($\text{pH } e/2$) obtenues en milieu non tamponné pour une électrode pH enrobée d'uréase immobilisée.
La courbe théorique (trait fin) est obtenue avec les données numériques suivantes : $V_m = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $e = 0,25 \text{ mm}$; $\text{pH}(o) = 6$.



$$J_p = -\frac{D_p}{\Delta x} C_p(1) + \mu_p * C_p(1)/2 * (E(0) + E(1))/2$$

avec $C_p(1)/2$ concentration de P à l'interface

$(E(0) + E(1))/2$ valeur du champ électrique à l'interface

A titre d'exemple, la vitesse d'apparition de l'espèce HCO_3^- dans la solution de substrat est obtenue à partir de la somme des flux interfaciaux des espèces HCO_3^- , CO_3^{2-} et H_2CO_3 corrigée par la fonction de répartition de l'espèce HCO_3^- au pH de la solution de substrat considéré (fig. 3).

$$d \text{HCO}_3^- / dt = \{ |J_{\text{HCO}_3^-}| + |J_{\text{CO}_3^{2-}}| + |J_{\text{H}_2\text{CO}_3}| \} \times \left(1 + \frac{C_{\text{H}}(0)}{K_2} + \frac{K_3}{C_{\text{H}}(0)} \right)^{-1}$$

Les grandeurs $d \text{CO}_3^{2-} / dt$ et $d \text{NH}_4^+ / dt$ sont obtenues selon le même principe. Ces trois valeurs introduites dans l'équation (17) appliquée au système urée/uréase permettent de calculer V_t^X pour chaque compartiment de la cellule.

$$V_t^X = d \text{NH}_4^+ / dt - d \text{HCO}_3^- / dt - 2d \text{CO}_3^{2-} / dt$$

La figure 36 représente la vitesse d'adjonction de titrant V_t^X (micromole. mn^{-1}) dans les compartiments anodique et cathodique, ainsi que la somme de ces deux vitesses, en fonction de la densité de courant. Ces résultats théoriques sont

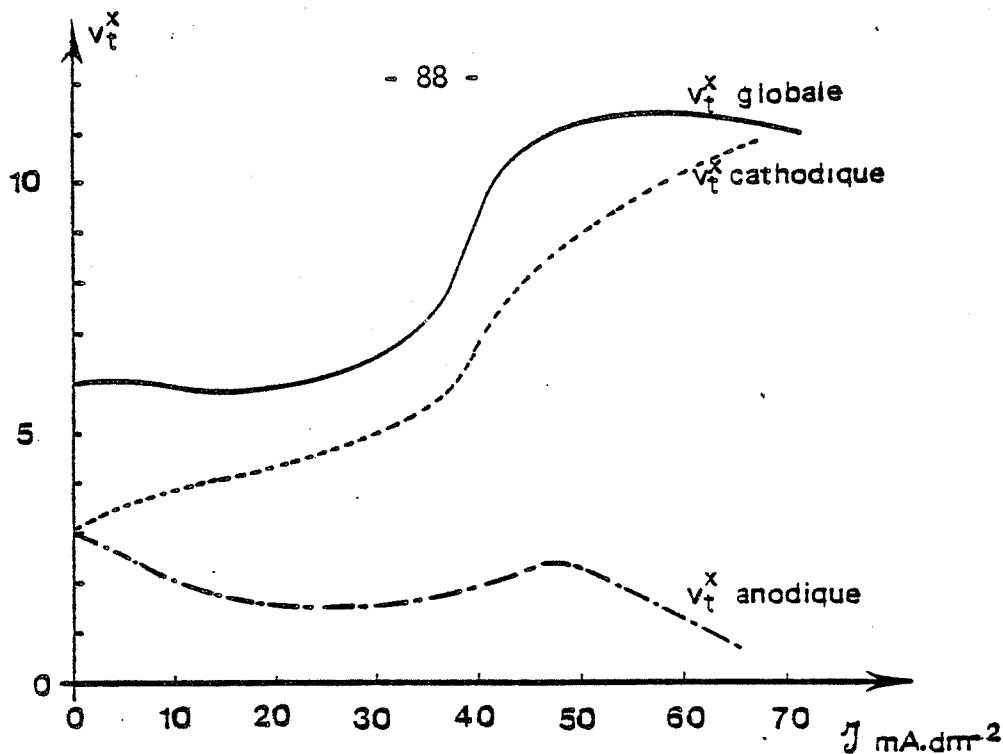


FIGURE 36 - Vitesse théorique d'adjonction de titrant HX par le dispositif pH-stat (v_t^x en micromole.mn⁻¹) correspondant au compartiment anodique, au compartiment cathodique, ainsi qu'à la somme de ces deux vitesses, en fonction de la densité de courant.

Données numériques introduites dans le modèle :

$$C_A(o) = 5,015 \cdot 10^{-3} \text{ M} ; C_B(o) = 10^{-3} \text{ M} ; C_S(o) = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M} ;$$

$$V_m^o = 2 \cdot 10^{-2} \text{ mole.dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1} ; \text{pH}(o) = 5,80 ; e = 2,5 \text{ mm.}$$

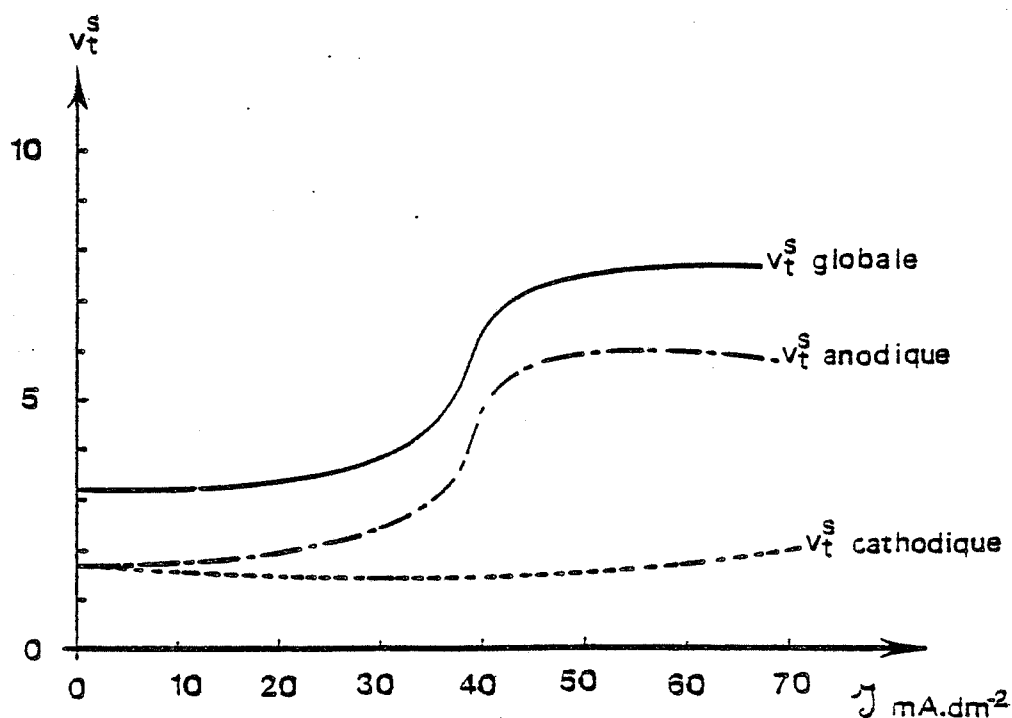


FIGURE 37 - Vitesse théorique de consommation de substrat (v_t^s en micromole.mn⁻¹) correspondant au compartiment anodique, au compartiment cathodique ainsi qu'à la somme de ces deux vitesses, en fonction de la densité de courant.

Données numériques introduites dans le modèle : idem figure 36 .

à rapprocher des résultats expérimentaux présentés sur la figure 29. Nous constatons :

- que la vitesse d'adjonction de titrant augmente dans le compartiment cathodique et diminue dans le compartiment anodique.
- que le saut d'activité observé expérimentalement pour $\mathcal{J} = 30 \text{ mA.dm}^{-2}$ (Fig. 29) est observé sur la courbe théorique (Fig. 36) pour $\mathcal{J} = 40 \text{ mA.dm}^{-2}$.
- une allure générale des courbes sensiblement identique.

Les divergences entre le modèle et les résultats expérimentaux proviennent probablement de l'utilisation de l'équation (32) pour la détermination des flux interfaciaux.

$$J_p = \left| -D_p \frac{dC_p}{dx} + \mu_p C_p E \right|_{x=0}^{x=e}$$

En présence d'une densité de courant, le terme diffusif tend à devenir négligeable devant le terme d'électromigration. La présence de forts gradients de concentration et de champ électrique aux interfaces ($x = e$ et $x = 0$) introduit une incertitude importante sur les valeurs de C_i et E utilisées.

Le modèle mathématique réalisé permet d'obtenir des résultats théoriques (Fig. 36) dont la comparaison avec les résultats expérimentaux (Fig. 29) reste globalement très satisfaisante.

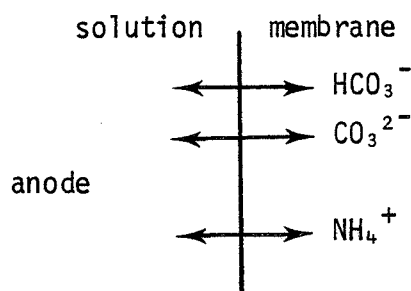
La vitesse d'adjonction de titrant par le dispositif pH-stat (V_t^x) correspond à l'apparition dans la solution de substrat des produits de la réaction enzymatique. La présence d'un champ électrique est susceptible de modifier la répartition des flux des espèces ioniques HCO_3^- , CO_3^{2-} et NH_4^+ entre le compartiment anodique et le compartiment cathodique. Il est par conséquent nécessaire de comparer la vitesse théorique de consommation de substrat et la vitesse théorique d'adjonction de titrant pour chaque compartiment.

La figure 37 représente les vitesses théoriques de consommation de substrat V_t^s (en micromole.mn⁻¹) correspondant au compartiment anodique, au compartiment cathodique et la somme de ces deux vitesses correspondant au comportement global de la membrane. Ces vitesses de réaction sont déterminées à l'aide de l'équation (29) et de l'équation (31).

La comparaison avec les résultats théoriques présentés sur la figure 36 fait apparaître une inversion de la polarité des phénomènes observés. Lorsque la vitesse de consommation de substrat augmente dans le compartiment anodique, (Fig. 37) la vitesse d'adjonction de titrant par le pH-stat (V_t^X , Fig. 36) augmente dans le compartiment cathodique.

Cette inversion est attribuable à l'influence du champ électrique sur les flux des espèces HCO_3^- , CO_3^{2-} et NH_4^+ .

Considérons l'interface anodique de la membrane.



Lorsque la valeur du champ électrique à l'interface augmente :

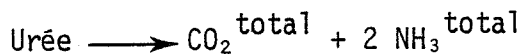
- le flux sortant des espèces HCO_3^- et CO_3^{2-} tend à augmenter ;
- le flux sortant de l'espèce NH_4^+ tend à diminuer.

La vitesse d'adjonction de titrant étant déterminée à partir de l'équation:

$$V_t^X = d \text{NH}_4^+ / dt - d \text{HCO}_3^- / dt - 2d \text{CO}_3^{2-} / dt$$

il apparaît nettement que v_t^X tend à diminuer dans le compartiment anodique et à augmenter dans le compartiment cathodique.

Par ailleurs, le calcul de la vitesse de consommation expérimentale de substrat (v_e^S) à partir de la vitesse d'adjonction de titrant (Equation 35 et Fig. 5 - chapitre I) suppose que la réaction enzymatique est stoechiométrique.



En présence d'un champ électrique, la stoechiométrie n'est plus respectée si l'on considère chaque compartiment individuellement, du fait de l'électromigration des produits de réaction ioniques. La stoechiométrie n'est vérifiée que si l'on considère l'ensemble de la membrane, c'est-à-dire la somme des réponses des deux pH-stats.

La modification de la vitesse de consommation de substrat par application d'une densité de courant (Fig. 37) résulte d'une perturbation des différents profils de concentration au sein de la membrane. En conséquence, nous avons représenté sur la figure 38, les profils de pH (Fig. 38a) ainsi que les profils de concentration du substrat (Fig. 38b) pour différentes valeurs de la densité de courant.

Les profils correspondants de champ électrique sont présentés sur la figure 39.

Les profils de pH et de concentration de substrat symétriques pour $\mathcal{J} = 0$ sont déformés lorsque la densité de courant imposée augmente.

- Pour $0 < \mathcal{J} < 24 \text{ mA.dm}^{-2}$, le profil de pH et le profil de concentration de substrat sont peu modifiés. Ceci correspond sur la figure 37 à une faible variation de la vitesse théorique de consommation de substrat.

- Pour $\mathcal{J} = 60 \text{ mA.dm}^{-2}$ le pH intramembranaire diminue et tend vers le pH optimum de l'uréase. L'augmentation correspondante de l'activité enzymatique locale se traduit par une modification du profil de concentration du substrat (Fig. 38b) et par une augmentation de la vitesse théorique de consommation de substrat, (Fig. 37) notamment au niveau du compartiment anodique, du fait de l'asymétrie du pH intramembranaire.

- Pour $\mathcal{J} = 78 \text{ mA.dm}^{-2}$, le profil de pH est fortement modifié. Cet effet ne s'accompagne pas d'une augmentation de la vitesse de consommation d'urée (Fig. 37), celle-ci devenant limitée par la vitesse de diffusion du substrat aux interfaces.

Il apparaît par conséquent, que l'augmentation de la vitesse de réaction par application d'une densité de courant a pour origine une modification du profil de pH intramembranaire. Celle-ci résulte d'une perturbation sous l'influence du champ électrique intramembranaire, des profils de concentration des différentes espèces participant directement ou indirectement à la réaction enzymatique. Par conséquent, nous avons représenté sur les figures 40, 41 et 42, les profils de concentration du sel de fond A^{2-} et B^+ , de HCO_3^- , de NH_3 et de NH_4^+ pour différentes valeurs de la densité de courant.

Les modifications observées peuvent avoir plusieurs causes :

- un effet direct du champ électrique par l'intermédiaire du terme d'électromigration (équation (22)) ;

- un effet indirect attribuable à une modification de l'activité enzymatique locale induite par la perturbation du profil de pH (terme de réaction dans

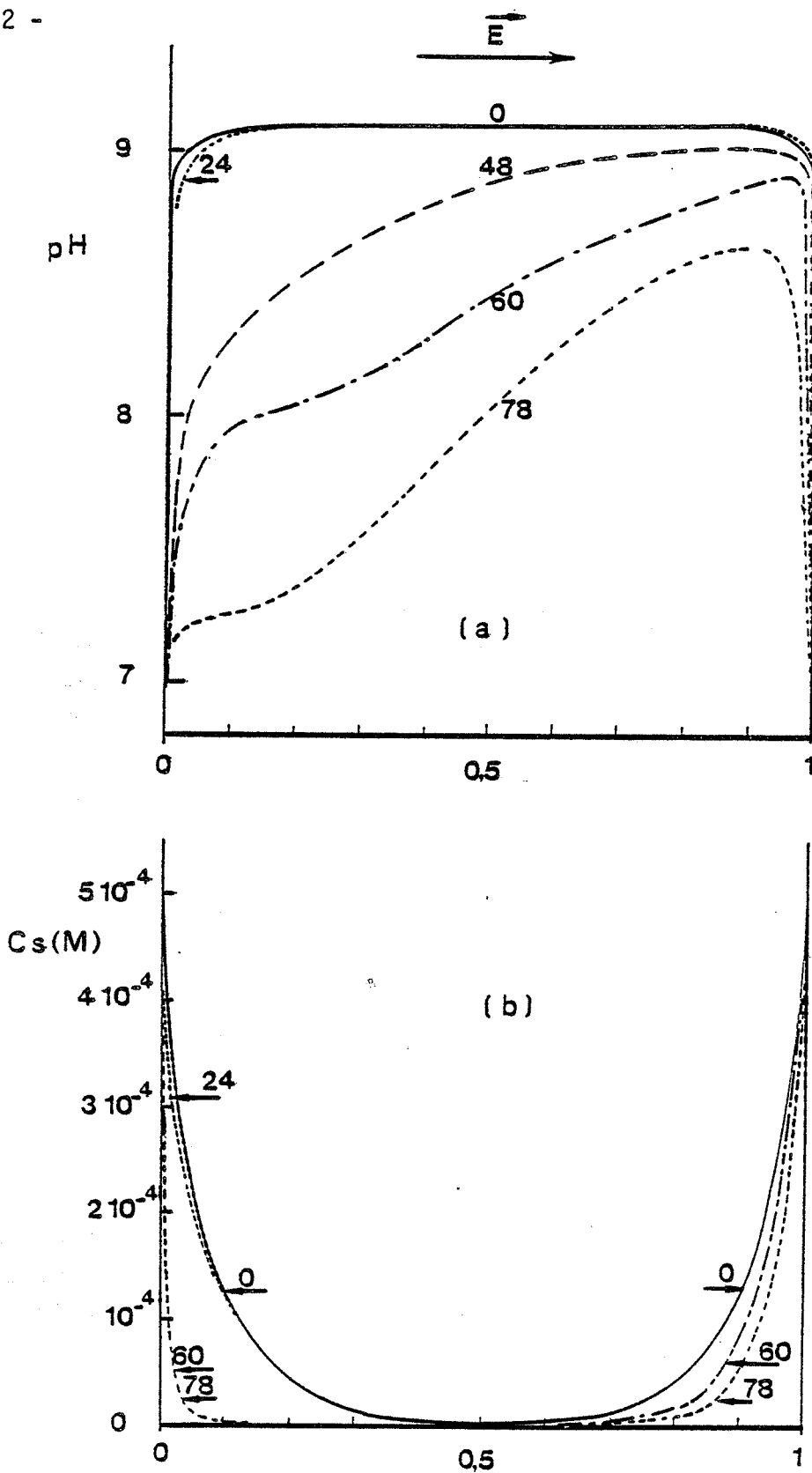


FIGURE 38 - Influence de la densité de courant sur les profils de pH (Fig. 38a) et de concentration de substrat (Fig. 38b) au sein de la membrane. Données numériques introduites dans le modèle :
 $C_A(o) = 5,015 \cdot 10^{-3} M$; $C_B(o) = 10^{-3} M$; $C_s(o) = 5 \cdot 10^{-4} M$;
 $V_m = 2 \cdot 10^{-2} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $\text{pH}(o) = 5,80$; $e = 2,5 \text{ mm}$.

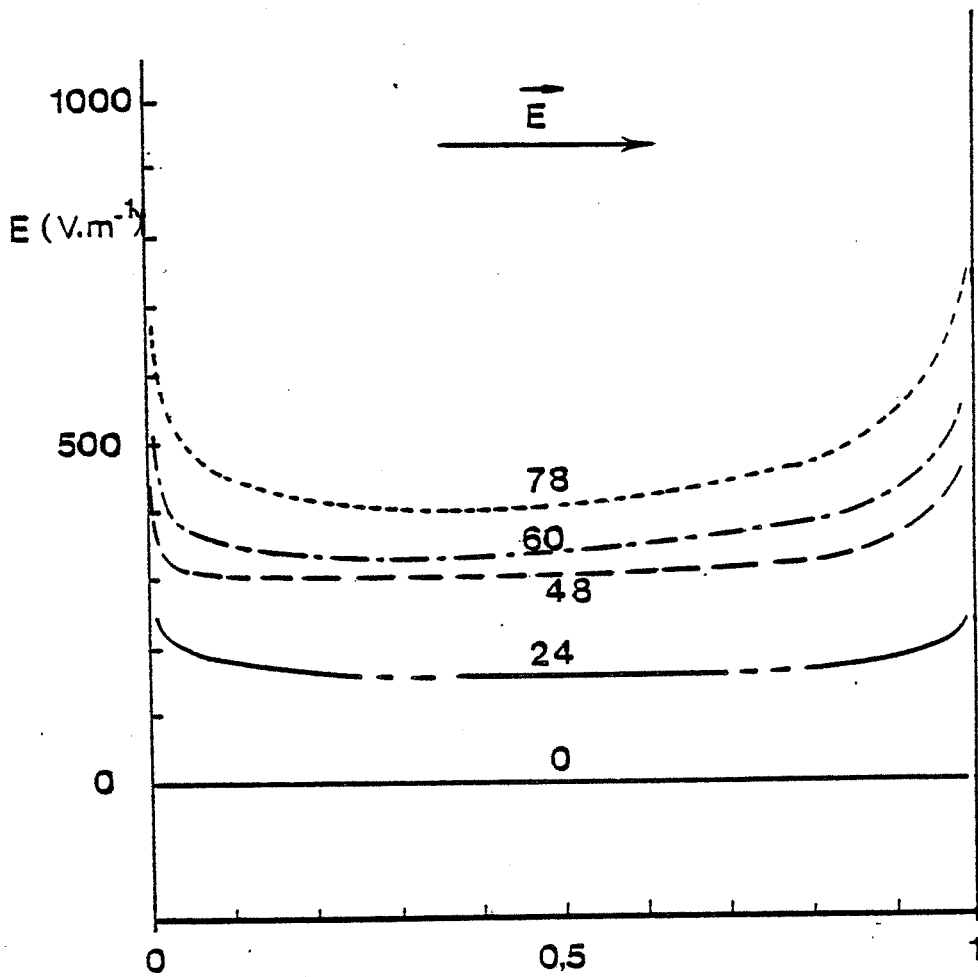


FIGURE 39 - Profils de champ électrique intramembranaire pour différentes valeurs de la densité de courant : 0 ; 24 ; 48 ; 60 et 78 mA.dm⁻².
Données numériques introduites dans le modèle :
 $C_A(o) = 5,015 \cdot 10^{-3} M$; $C_B(o) = 10^{-3} M$; $C_S(o) = 5 \cdot 10^{-4} M$;
 $V_m^o = 2 \cdot 10^{-2} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $\text{pH}(o) = 5,80$; $e = 2,5 \text{ mm}$.

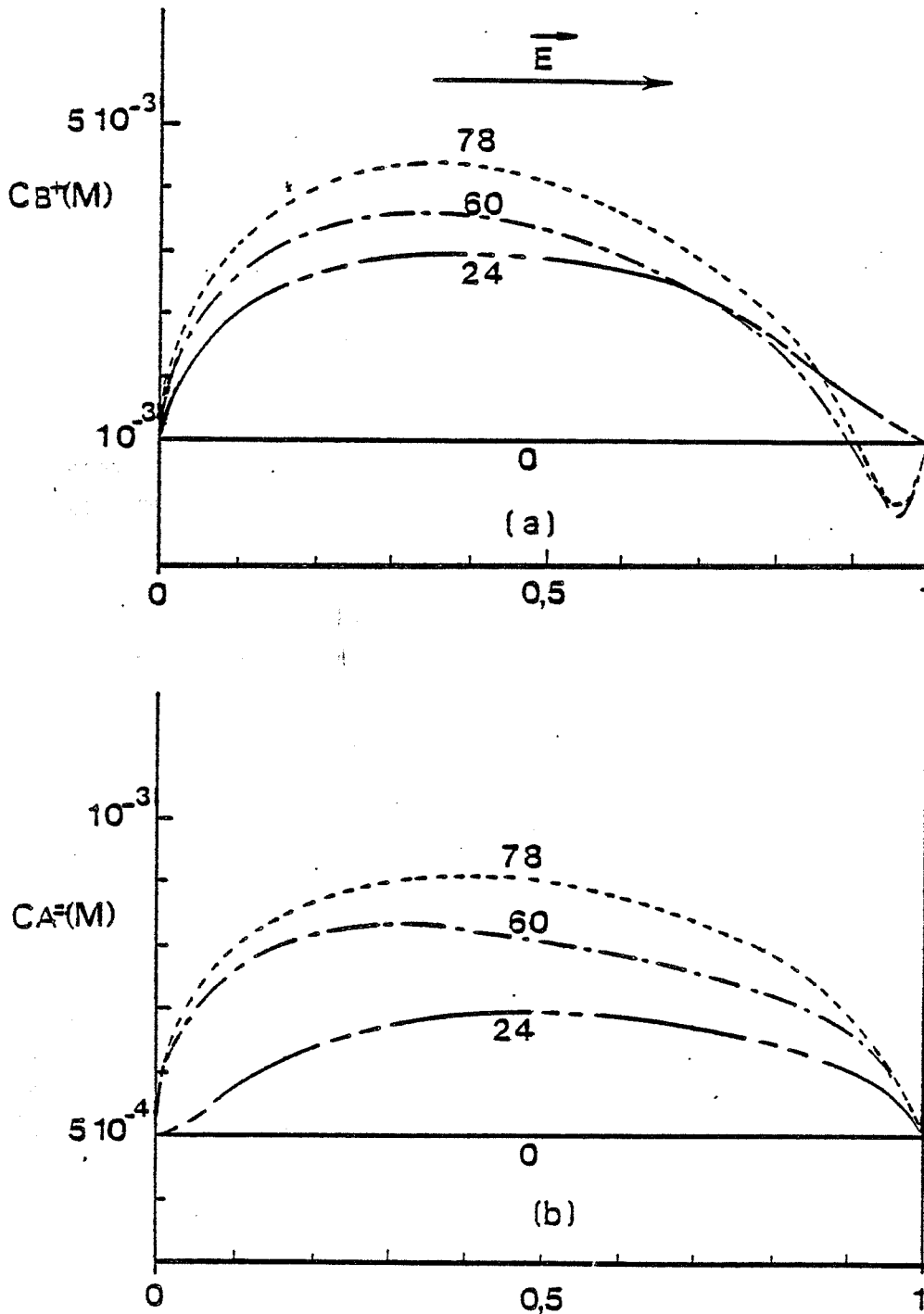


FIGURE 40 - Influence de la densité de courant sur les profils de concentration du sel de fond.

Fig. 40a : profil de concentration de l'espèce B⁺

Fig. 40b : profil de concentration de l'espèce A²⁻

Données numériques introduites dans le modèle :

CA(0) = 5,015 · 10⁻³ M ; CB(0) = 10⁻³ M ; Cs(0) = 5 · 10⁻⁴ M ;

V_m⁰ = 2 · 10⁻² mole · dm⁻³ · s⁻¹ ; pH(0) = 5,80 ; e = 2,5 mm.

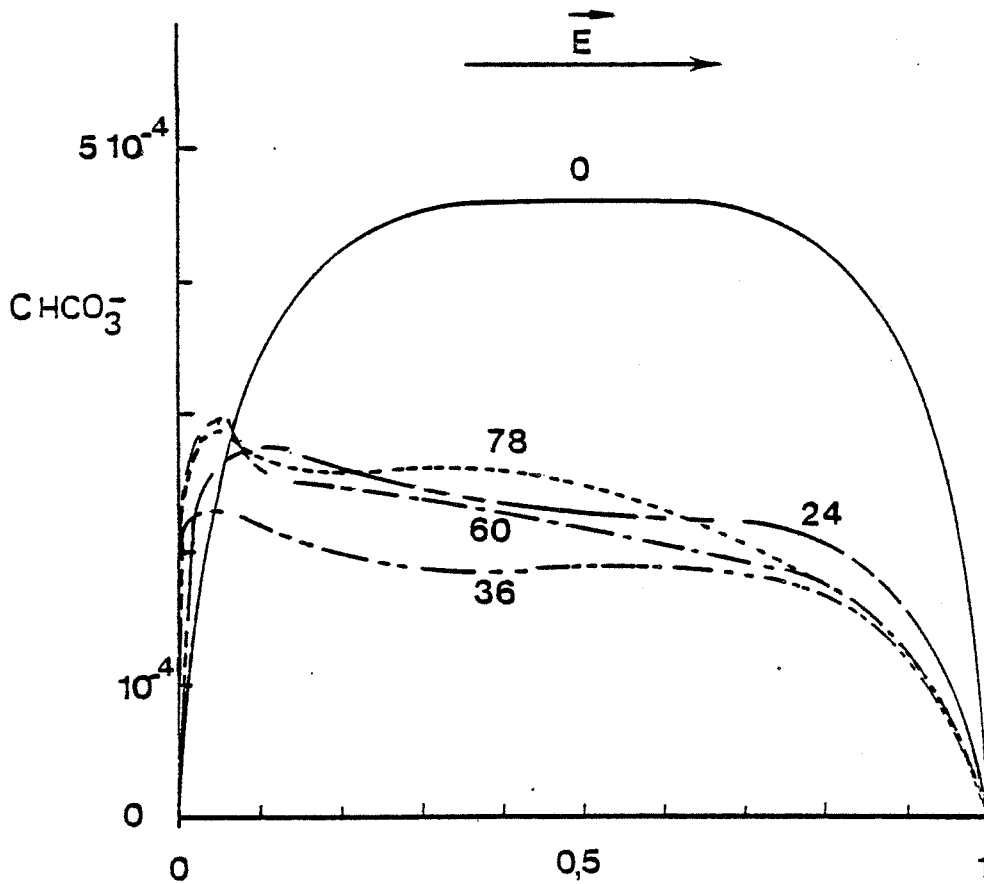


FIGURE 41 - Influence de la densité de courant sur les profils de concentration de HCO_3^-

Données numériques introduites dans le modèle :

$C_A(o) = 5,015 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_B(o) = 10^{-3} \text{ M}$; $C_s(o) = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$;

$V_m^o = 2 \cdot 10^{-2} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $\text{pH}(o) = 5,80$; $e = 2,5 \text{ mm}$.

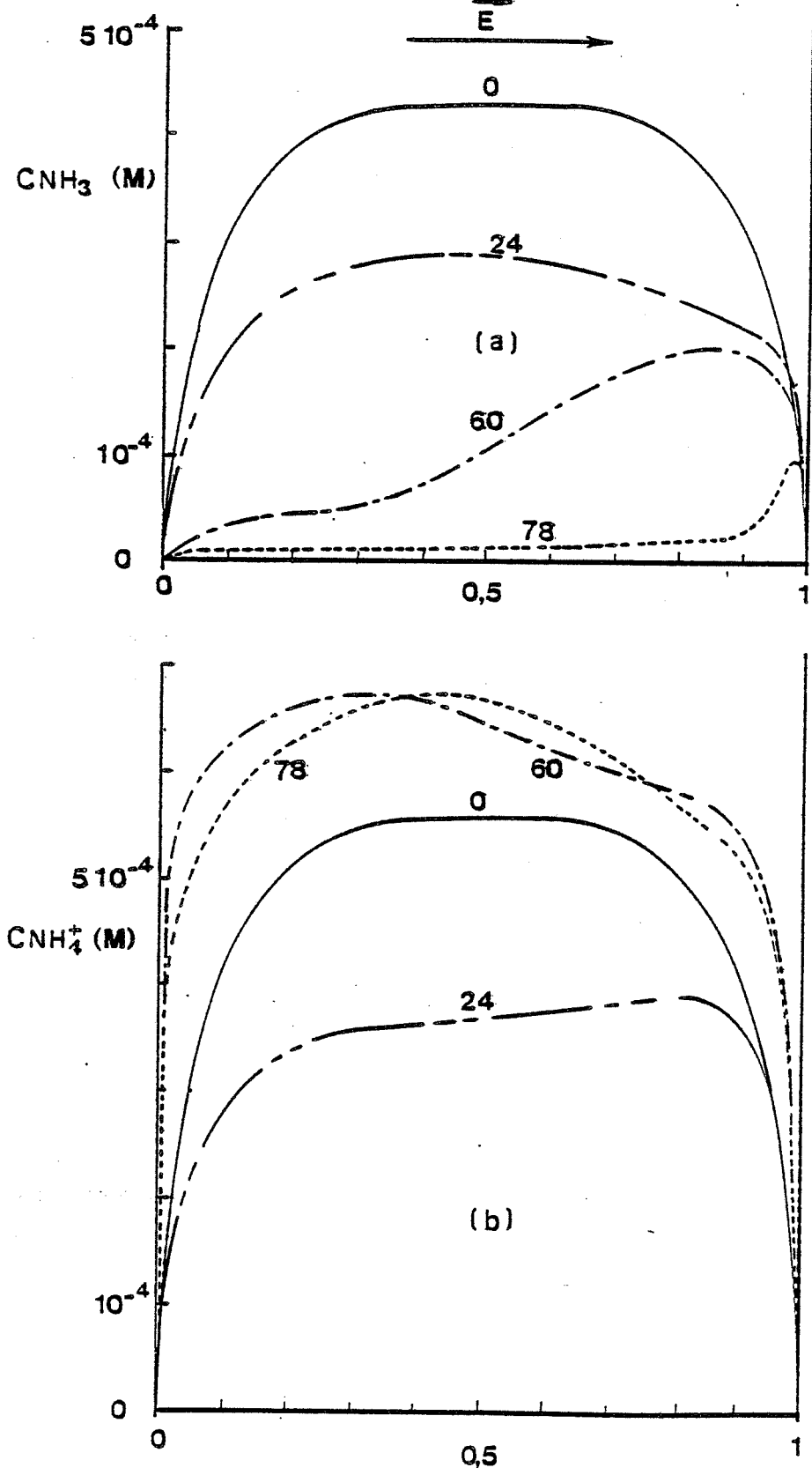


FIGURE 42 - Influence de la densité de courant sur les profils de concentration de NH_3 (Fig. 42a) et de NH_4^+ (Fig. 42b).

Données numériques introduites dans le modèle :
 $C_A(o) = 5,015 \cdot 10^{-3} M$; $C_B(o) = 10^{-3} M$; $C_S(o) = 5 \cdot 10^{-4} M$;
 $V_m = 2 \cdot 10^{-2} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $\text{pH}(o) = 5,80$; $e = 2,5 \text{ mm}$.

l'équation (22)) ;

- une modification des équilibres de dissociation des espèces acides et basiques faibles résultant de la perturbation du profil de pH, (Figure 3).

En ce qui concerne les espèces A^{2-} et B^+ l'application d'une densité de courant imposée se traduit par l'apparition d'un profil de concentration asymétrique. La réaction enzymatique produisant des espèces ioniques, la conductivité intramembranaire est différente de la conductivité de la solution de substrat. Cet effet se traduit par l'apparition d'un profil de champ électrique dans la membrane (figure 39).

3°) Conclusion

Le modèle proposé fait apparaître un bon accord entre résultats théoriques et résultats expérimentaux. Dans la gamme de densité de courant étudiée, la modification de la vitesse de réaction est attribuable à une modification du pH intramembranaire, induite par une perturbation des profils de concentration des espèces ioniques présentes.

La méthode de détermination des vitesses expérimentales de réaction (pH-stat) ne permet pas d'étudier individuellement les compartiments anodique et cathodique de la membrane, du fait de l'électromigration des produits de réaction.

L'étude d'un système enzymatique à substrat ionique devrait permettre de compléter cette étude. Nous avons étudié l'influence d'une densité de courant sur le système acétylcholine/acétylcholinestérase.

III - ETUDE DU SYSTEME ACETYLCHOLINE/ACETYLCHOLINESTERASE

L'étude théorique de l'influence de la densité de courant sur la vitesse de consommation de substrat ainsi que sur les différents profils de concentration a été étudiée en fonction des paramètres suivants :

- concentration en substrat $C_S(o)$
- concentration en sel de fond $C_A(o)$; $C_B(o)$
- pH de la solution de substrat $pH(o)$
- concentration d'enzyme immobilisé dans la membrane (terme V_m^o).

Ces différents résultats sont comparés aux résultats expérimentaux obtenus.

Les caractéristiques de ce système enzymatique ont été décrites dans le chapitre I.

1°) Etude mathématique

a) Hypothèses

Comme pour le système urée/uréase, et conformément aux conclusions de l'étude précédente, nous faisons l'hypothèse que les modifications d'activité, susceptibles d'intervenir dans la gamme de densité de courant étudiée, résultent d'une perturbation des profils de concentration intramembranaire.

Les différentes constantes physiques utilisées lors de la modélisation sont présentées dans le tableau (2).

La différence essentielle de ce système par rapport au précédent est le caractère ionique du substrat. Celui-ci participe par conséquent au passage du courant au même titre que le sel de fond ou les produits ioniques de la réaction enzymatique.

Constantes physiques utilisées pour la modélisation du système Acétylcholine/Acétylcholinestérase.

Espèce chimique	mobilité électrique μ_i ($\text{dm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)	coefficient de diffusion D_i ($\text{dm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
H^+	$+ 3,65 \cdot 10^{-5}$	$9,31 \cdot 10^{-7}$
Acétylcholine	$+ 3,59 \cdot 10^{-6}$	$0,92 \cdot 10^{-7}$
choline	$+ 3,59 \cdot 10^{-6}$	$0,92 \cdot 10^{-7}$
B^+	$+ 5,20 \cdot 10^{-6}$	$1,96 \cdot 10^{-7}$
$\text{CH}_3 \text{COO}^-$	$- 4,24 \cdot 10^{-6}$	$1,10 \cdot 10^{-7}$
OH^-	$- 2,06 \cdot 10^{-5}$	$5,28 \cdot 10^{-7}$
A^{2-}	$- 8,29 \cdot 10^{-6}$	$1,06 \cdot 10^{-7}$
$\text{CH}_3 \text{COOH}$	—	$1,10 \cdot 10^{-7}$

TABLEAU 2

b) Résultats

α) Influence de la concentration en substrat $C_S(o)$.

Les données numériques introduites dans le modèle sont :

$$V_m^o = 10^{-4} \text{ mole.dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1} ; \text{pH}(o) = 7,0 ; e = 1,25 \cdot 10^{-2} \text{ dm} ; C_A(o) = 10^{-4} \text{ M} ; \\ C_B(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}.$$

Le substrat est introduit sous forme de sel $(S^+)_2, A^{2-}$ et le sel de fond est supposé être $(B^+)_2, A^{2-}$.

L'évolution de la vitesse théorique de consommation de substrat (V_t^S en $\mu\text{mole.mn}^{-1}$) en fonction de la densité de courant, pour différentes valeurs de la concentration en substrat aux bornes de la membrane ($C_S(o)$) est présentée sur la Figure 43. Cette vitesse a été calculée à partir de l'équation (31). Pour une densité de courant donnée, la valeur du champ électrique intramembranaire est d'autant plus faible que la concentration en substrat est élevée, conformément à l'augmentation du terme $\sum_i z_i \mu_i C_i$ de l'équation (25).

L'augmentation de la vitesse théorique de consommation de substrat avec la densité de courant peut avoir deux causes :

- une augmentation du terme $V_m^{\text{pH}}(x)$ par suite d'une modification du profil de pH intramembranaire.

- une augmentation de la concentration locale de substrat ($C_S(x)$) induisant une augmentation du terme de réaction :

$$V_m^{\text{pH}}(x) \cdot C(x) / K_m^{\text{pH}}(x) + C_S(x)$$

L'évolution des profils de concentration de substrat pour des valeurs croissantes de la densité de courant est présentée sur la figure 44, pour deux valeurs de la concentration en substrat aux bornes de la membrane : Fig. 44a, $C_S(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\mathcal{I} = 0,25$ et 45 mA.dm^{-2} ; Fig. 44b, $C_S(o) = 10^{-3} \text{ M}$, $\mathcal{I} = 0, 60, 100$ et 180 mA.dm^{-2} .

L'évolution correspondante des profils de pH intramembranaire est présentée sur les figures 45a et b.

Sous l'influence du champ électrique, la concentration intramembranaire en substrat augmente (Fig. 44 a et b). Le passage du courant électrique se traduit par une augmentation du flux entrant de substrat au niveau de l'interface anodique de la membrane.

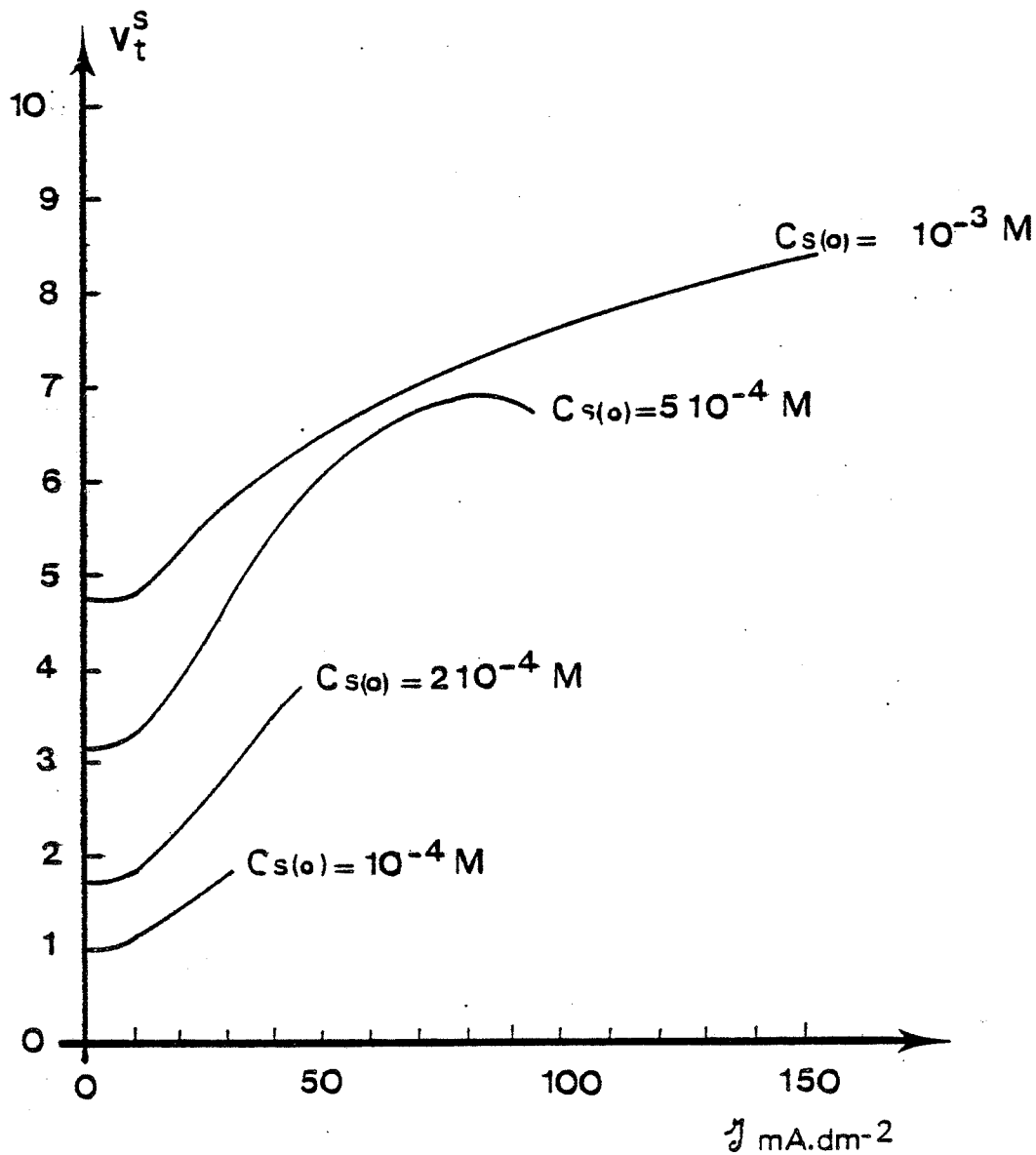


FIGURE 43 - Vitesse théorique de consommation de substrat (V_t^S en micromole.mn⁻¹) en fonction de la densité de courant pour différentes valeurs de la concentration en substrat $C_{s(o)}$.

Données numériques introduites dans le modèle :

$V_m = 10^{-4} \text{ mole.dm}^{-3}.\text{s}^{-1}$; $C_A(o) = 10^{-4} \text{ M}$; $C_B(o) = 2.10^{-4} \text{ M}$;
 $\text{pH}(o) = 7,0$; $e = 1,25 \text{ mm}$.

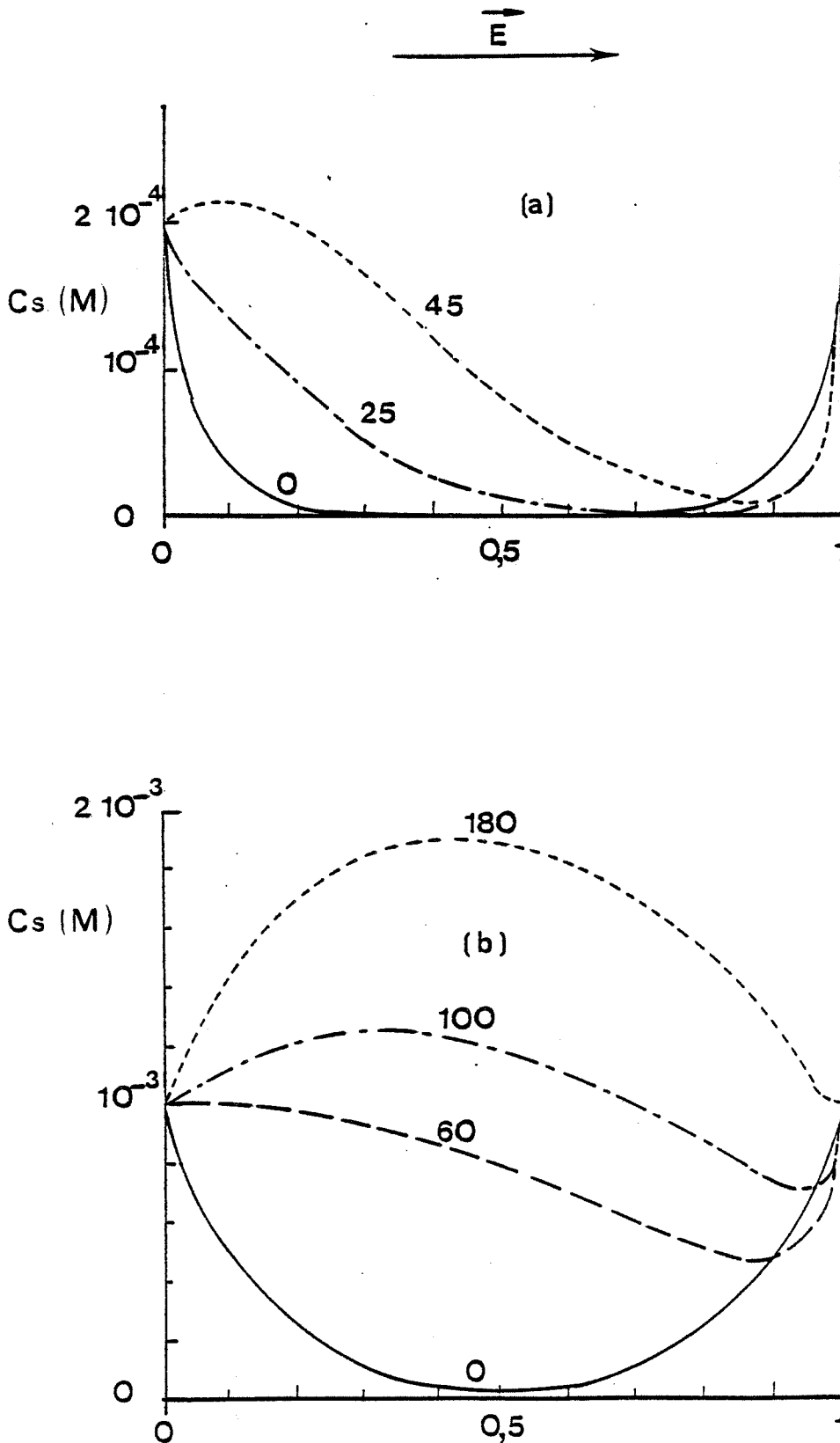


FIGURE 44 - Influence de la densité de courant sur les profils de concentration du substrat pour deux valeurs de la concentration en substrat aux bornes de la membrane ($C_s(0)$).

Fig. 44a - $C_s(0) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $\mathcal{I} = 0,25$ et $45 \text{ mA} \cdot \text{dm}^{-2}$

Fig. 44b - $C_s(0) = 10^{-3} \text{ M}$; $\mathcal{I} = 0,60, 100$ et $180 \text{ mA} \cdot \text{dm}^{-2}$

Données numériques introduites dans le modèle : idem Fig. 43.

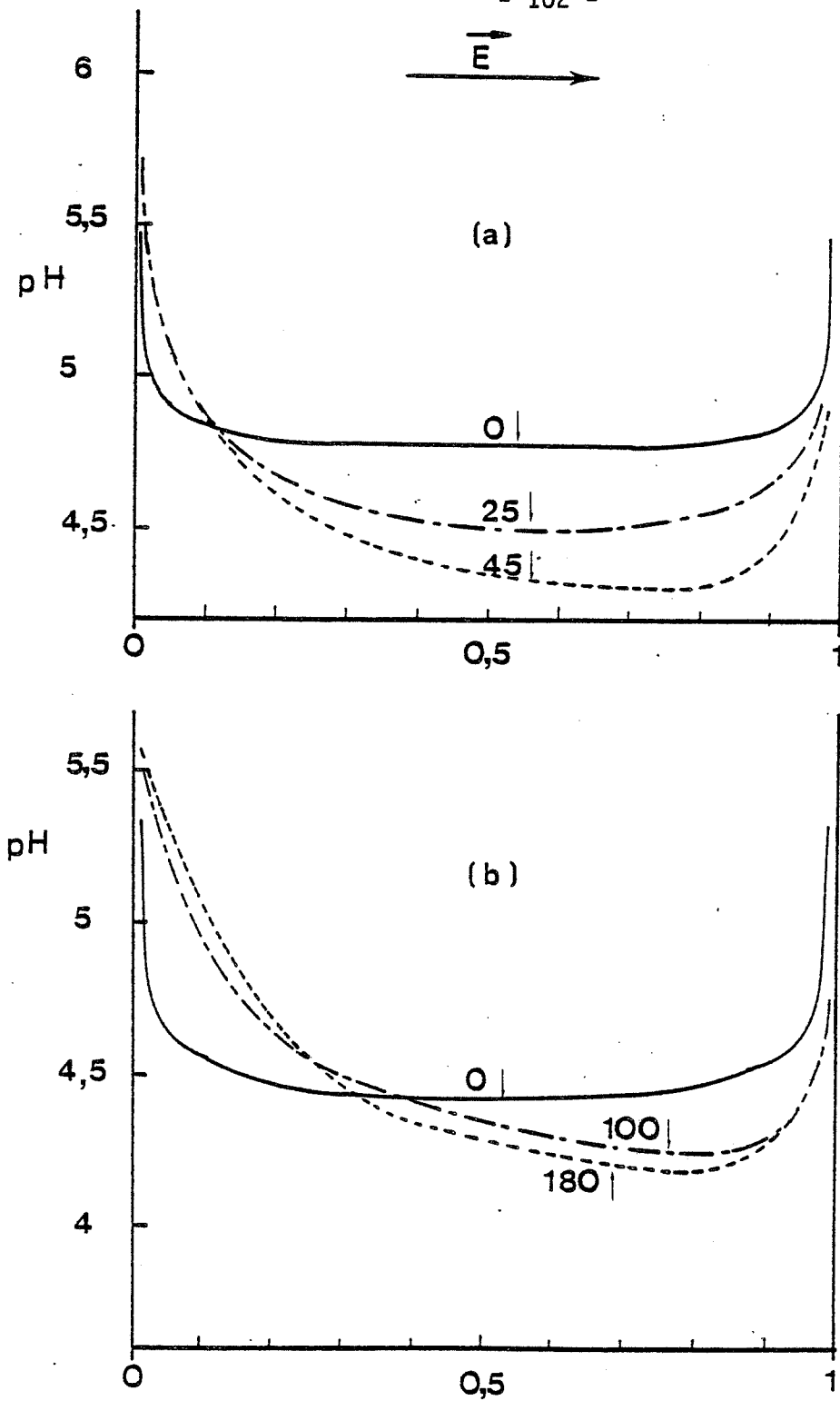


FIGURE 45 - Influence de la densité de courant sur les profils de pH pour deux valeurs de la concentration en substrat aux bornes de la membrane ($C_s(o)$).

Fig. 45a : $C_s(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $\mathcal{I} = 0,25 \text{ et } 45 \text{ mA}\cdot\text{dm}^{-2}$

Fig. 45b : $C_s(o) = 10^{-3} \text{ M}$; $\mathcal{I} = 0, 100 \text{ et } 180 \text{ mA}\cdot\text{dm}^{-2}$

Données numériques introduites dans le modèle :

$V_m^o = 10^{-4} \text{ mole}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$; $C_A(o) = 10^{-4} \text{ M}$; $C_B(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$;

$\text{pH}(o) = 7,0$; $e = 1,25 \text{ mm}$.

Un effet de conductivité analogue à celui décrit pour le sel de fond lors de l'étude du système urée/uréase peut être observé pour l'acétylcholine. Il se traduit par la possibilité d'observer une concentration intramembranaire de substrat supérieure à la concentration en substrat aux bornes de la membrane (Fig. 44b).

Les profils de pH symétriques pour une densité de courant nulle résultent du caractère acide du produit de réaction (acide acétique). La présence d'une densité de courant se traduit par une perturbation de ces profils (Fig. 45).

Sous l'influence du champ électrique intramembranaire, les deux paramètres déterminant le terme de réaction dans l'équation (22) $C_s(x)$ et $V_m^{pH}(x)$ sont modifiés. Pour prendre en compte les variations simultanées de ces deux paramètres, nous avons représenté sur la figure 46 les profils correspondant d'activité enzymatique locales A définie précédemment (Chapitre I, Equation 30).

$$A(x) = \frac{V_m^{pH}(x) C_s^{pH}(x)}{K_m(x) + C_s(x)}$$

Pour $C_s(o) = 10^{-3}M$ (Fig. 46b), le profil d'activité enzymatique locale tend vers un profil limite ($V_m^{pH}(x)$) correspondant à une cinétique d'ordre 0 par rapport au substrat ($C_s(x) > K_m(x) \Rightarrow A(x) \rightarrow V_m^{pH}(x)$).

Pour $C_s(o) = 2 \cdot 10^{-4}M$ (Fig. 46a), la concentration de substrat au sein de la membrane reste du même ordre de grandeur que le K_m . Le profil d'activité enzymatique locale ne tend pas vers un profil limite dans la gamme de densité de courant étudiée.

Ces deux comportements différents apparaissent sur la figure 43. Pour $C_s(o) = 10^{-3}M$, la vitesse théorique de consommation de substrat tend vers un plateau lorsque la densité de courant augmente, contrairement à ce qui est observé pour $C_s(o) = 2 \cdot 10^{-4}M$.

Nous avons représenté sur les figures suivantes les profils de concentration des différentes espèces chimiques présentes ainsi que le profil de champ électrique, dans le cas où $C_s(o) = 10^{-3}M$, et pour des valeurs croissantes de la densité de courant (0, 40, 100 et 180 mA.dm⁻²).

- figure 47 : profil de concentration de A^{2-}
- figure 48 : profil de concentration de B^+
- figure 49 : profil de concentration des espèces CH_3COO^- (Fig. 49a) et CH_3COOH (Fig. 49b)
- Figure 50 : profil de concentration de la choline
- Figure 51 : profil de champ électrique.

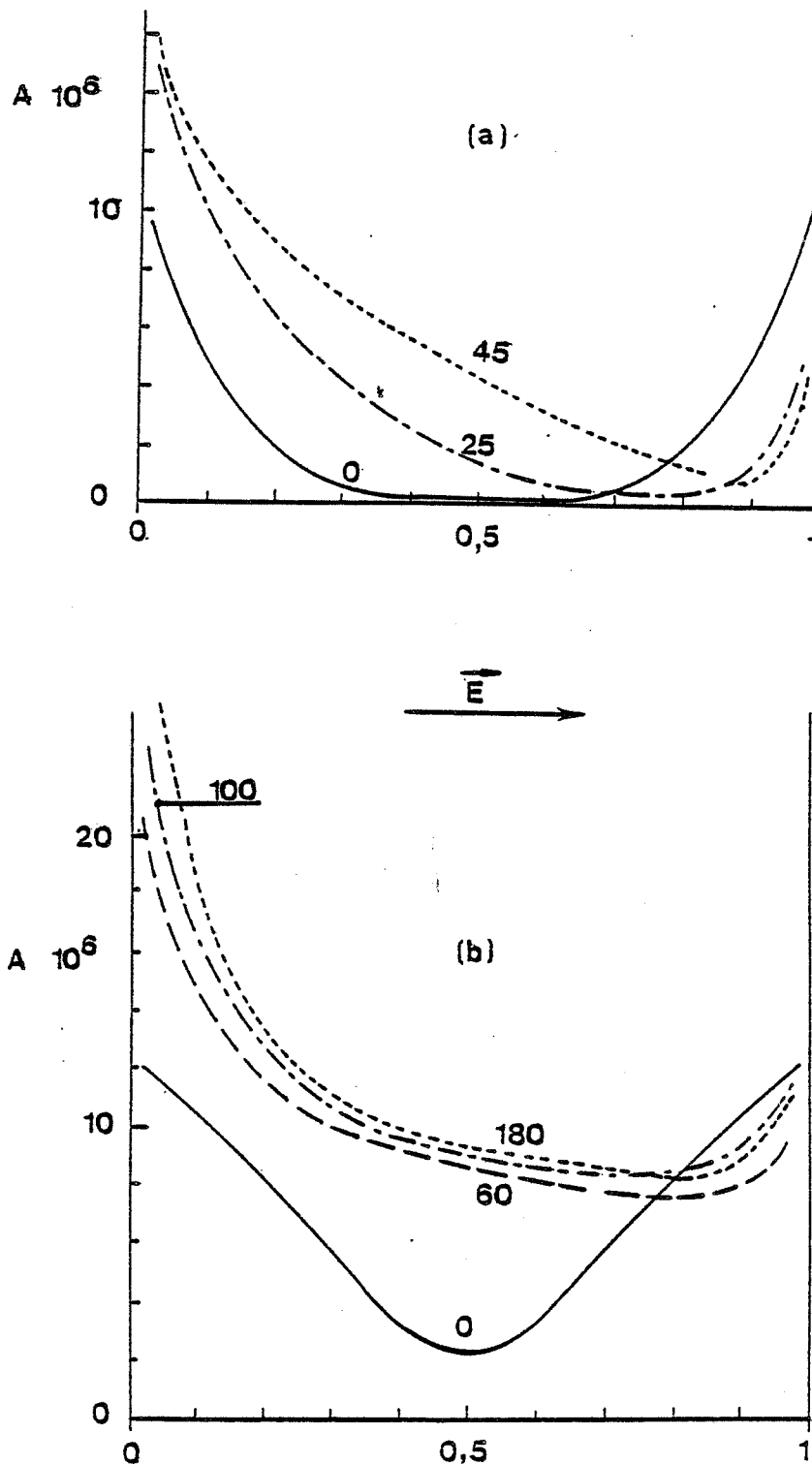


FIGURE 46 - Influence de la densité de courant sur le profil d'activité enzymatique locale (A en $\text{mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$) pour deux valeurs de la concentration en substrat aux bornes de la membrane ($C_s(o)$).

Fig. 46a : $C_s(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $\mathcal{J} = 0,25$ et $45 \text{ mA} \cdot \text{dm}^{-2}$

Fig. 46b : $C_s(o) = 10^{-3} \text{ M}$; $\mathcal{J} = 0,60, 100$ et $180 \text{ mA} \cdot \text{dm}^{-2}$

Données numériques introduites dans le modèle :

$V_m^o = 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $C_A(o) = 10^{-4} \text{ M}$; $C_B(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$;
 $\text{pH}(o) = 7,0$; $e = 1,25 \text{ mm}$.

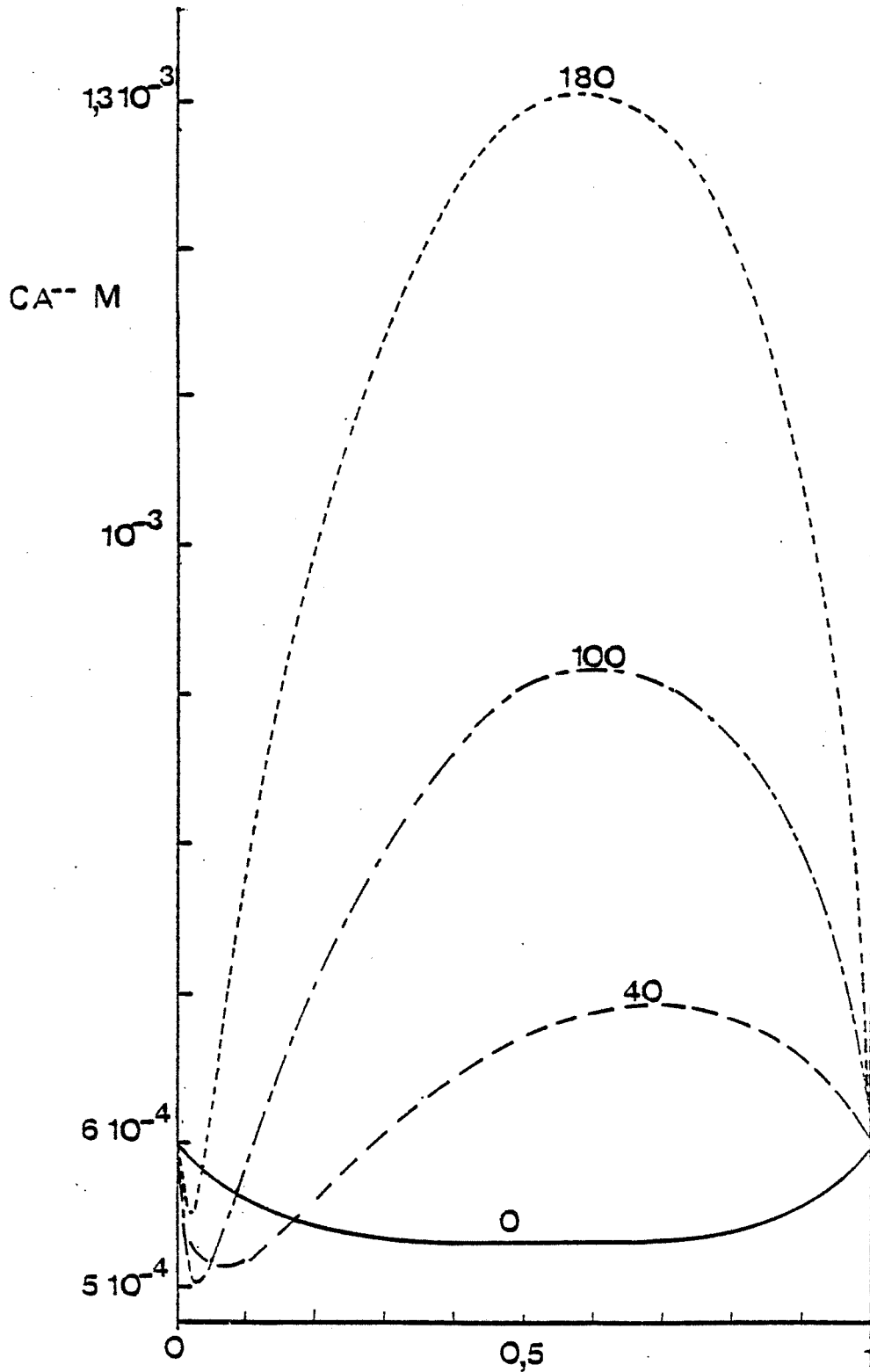


FIGURE 47 - Influence de la densité de courant sur le profil de concentration de l'espèce A^{2-}

Données numériques introduites dans le modèle :

$V_m^0 = 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $C_A(0) = 10^{-4} \text{ M}$; $C_B(0) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$;
 $\text{pH}(0) = 7,0$; $e = 1,25 \text{ mm}$.

avec $C_s(0) = 10^{-3} \text{ M}$.

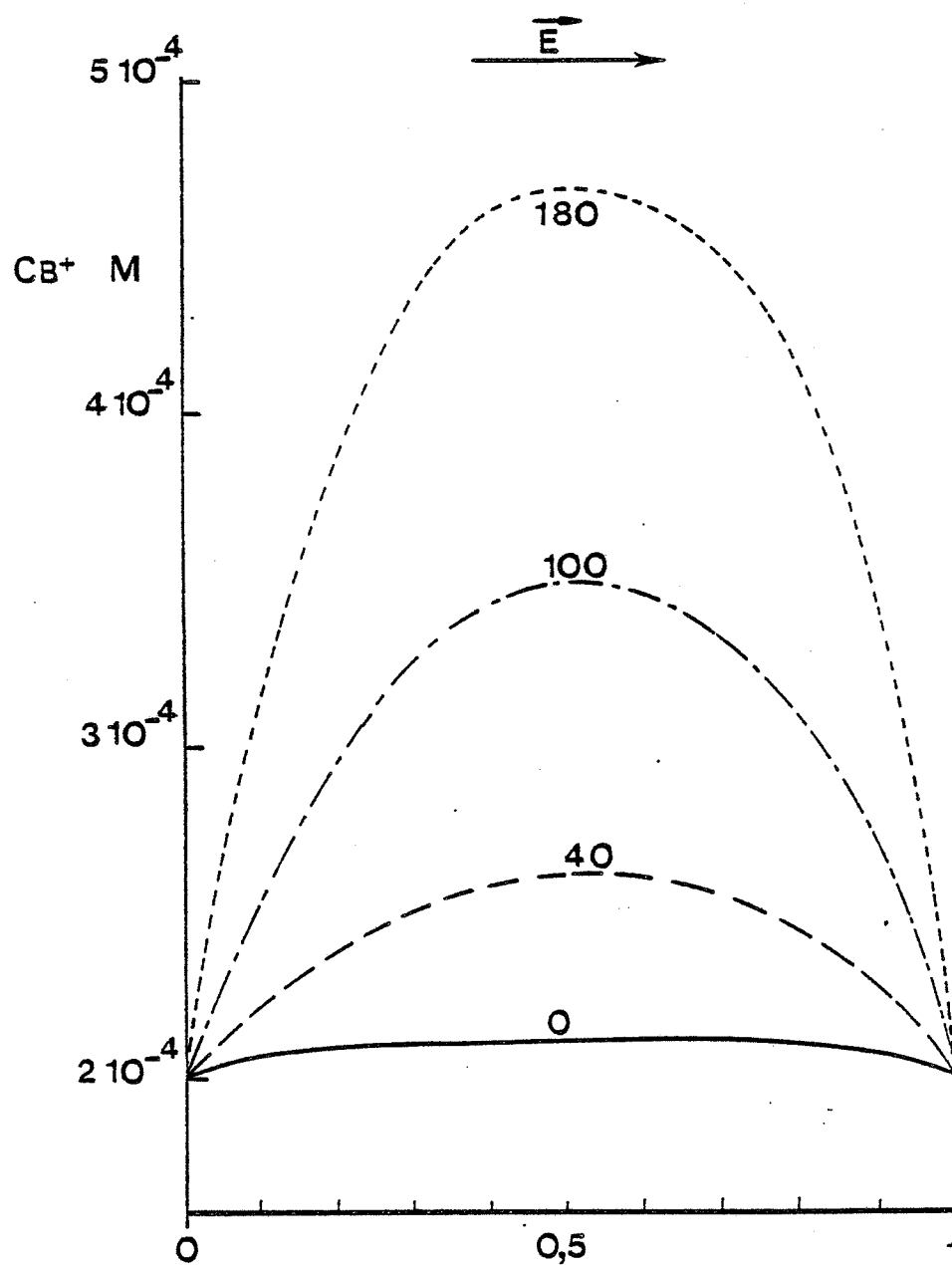


FIGURE 48 - Influence de la densité de courant sur le profil de concentration de l'espèce B^+ .

Données numériques introduites dans le modèle :

$v_m^0 = 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $C_A(o) = 10^{-4} \text{ M}$; $C_B(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$;
 $\text{pH}(o) = 7,0$; $e = 1,25 \text{ mm}$.

avec $C_s(o) = 10^{-3} \text{ M}$.

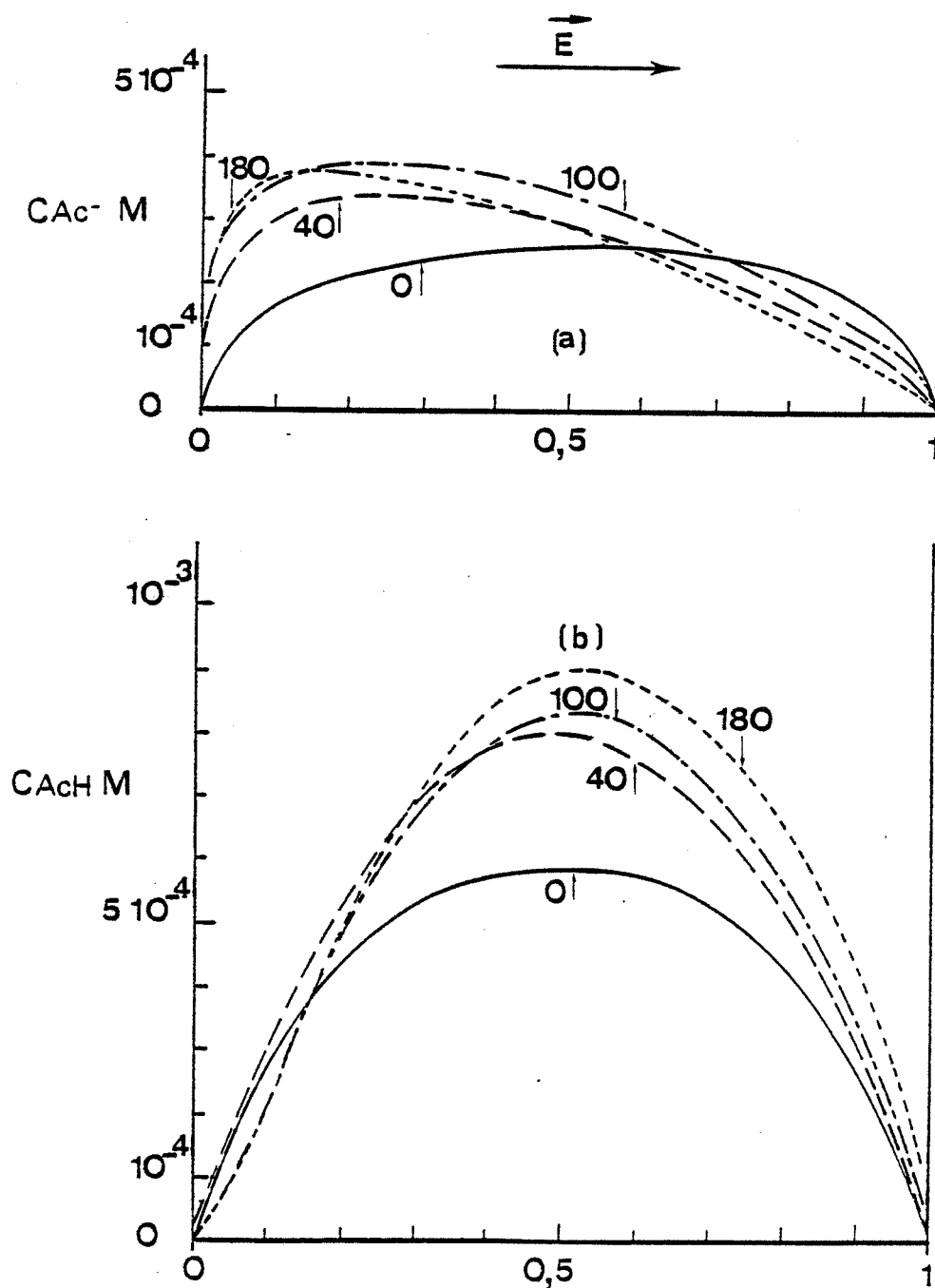


FIGURE 49 - Influence de la densité de courant sur les profils de concentration de $CH_3 \cdot COO^-$ (Fig. 49a) et de CH_3COOH (Fig. 49b).

Données numériques introduites dans le modèle :

$V_m = 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $C_A(o) = 10^{-4} \text{ M}$; $C_B(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$;
 $\text{pH}(o) = 7,0$; $e = 1,25 \text{ mm}$.

avec $C_s(o) = 10^{-3} \text{ M}$.

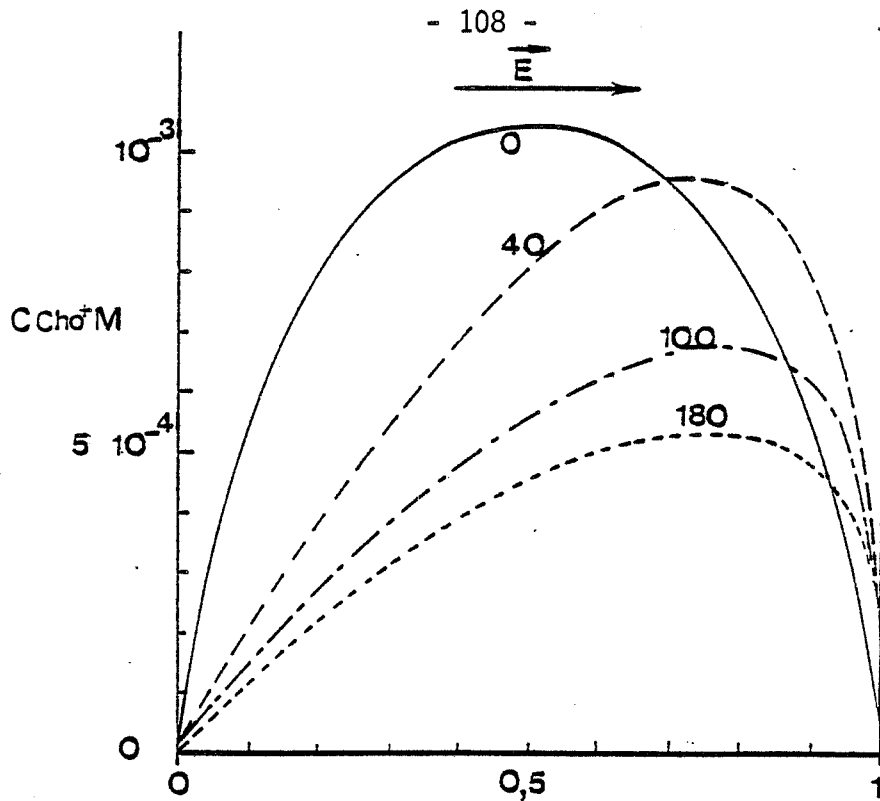


FIGURE 50 - Influence de la densité de courant sur le profil de concentration du produit de réaction : la choline.

Données numériques introduites dans le modèle :

$$V_m^{\circ} = 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1} ; C_A(o) = 10^{-4} \text{ M} ; C_B(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M} ;$$

$$\text{pH}(o) = 7,0 ; e = 1,25 \text{ mm.}$$

$$\text{avec } C_s(o) = 10^{-3} \text{ M.}$$

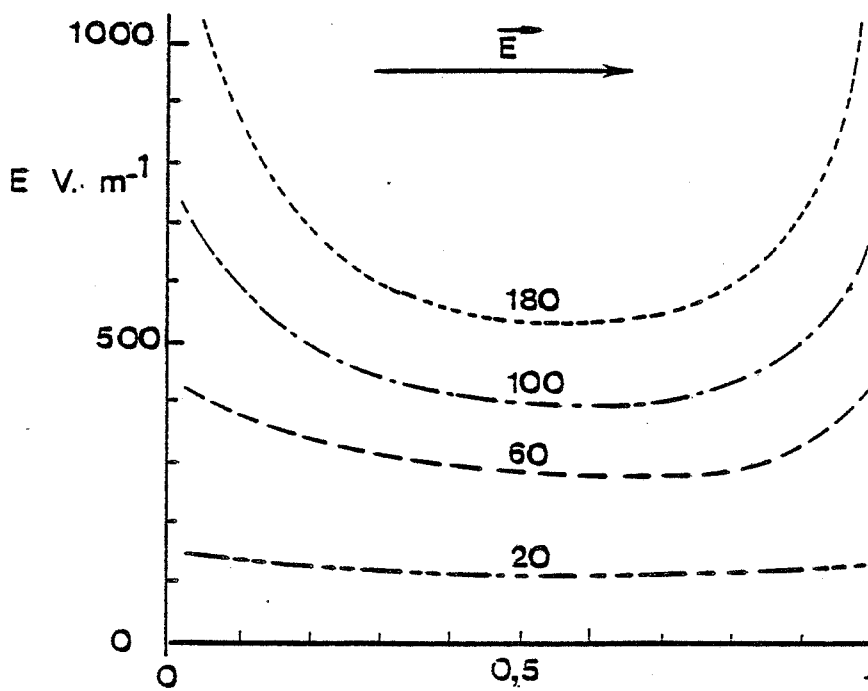


FIGURE 51 - Profil de champ électrique intramembranaire pour différentes valeurs de la densité de courant : 0, 20, 60, 100 et 180 $\text{mA} \cdot \text{dm}^{-2}$.

Données numériques introduites dans le modèle : idem Fig. 50 .

Comme pour le système urée/uréase, la modification des profils de concentration résultant de la présence d'un champ électrique intramembranaire sont attribuables à :

- un effet direct du champ électrique sur les espèces ioniques par l'intermédiaire du terme d'électromigration (équation 22) ;
- une modification de l'activité enzymatique locale par l'intermédiaire de $V_m^{pH}(x)$ et de $C_s(x)$;
- une modification de l'équilibre de dissociation de l'espèce acide faible résultant de la perturbation du profil de pH (Fig. 6).

En absence de courant imposé, le gradient de potentiel de diffusion (2 à 3 V.dm⁻¹ maxi) se traduit par une légère modification du profil de concentration des espèces A²⁻ et B⁺ (Fig. 47 et 48 ; $\mathcal{J} = 0$).

β) Influence de la concentration en sel de fond

Les phénomènes observés dépendent essentiellement du champ électrique intramembranaire dont la valeur est inversement proportionnelle à la concentration en sel de fond. L'évolution de la vitesse de consommation de substrat en fonction de la densité de courant pour différentes valeurs de la concentration en sel de fond est présentée sur la figure 52.

Pour une densité de courant nulle, la vitesse de réaction est indépendante de la force ionique du milieu, le gradient de potentiel de diffusion ne modifiant que dans une très faible mesure les différents profils de concentration.

L'augmentation de la vitesse de réaction avec la densité de courant est d'autant plus rapide que la force ionique de la solution de substrat est faible. Toutefois, le gain absolu d'activité est plus important pour des forces ioniques élevées, bien que nécessitant un courant plus fort.

L'examen des profils de concentration du substrat ainsi que des profils de pH pour deux valeurs de la concentration en sel de fond ; CA(o) = CB(o) = 0 (figure 53) et CA(o) = 5.10⁻⁴M, CB(o) = 10⁻³M ;(figure 54) fait apparaître :

- une faible modification du profil de pH ;
- une augmentation globale de la concentration en substrat au sein de la membrane lorsque la densité de courant croît.

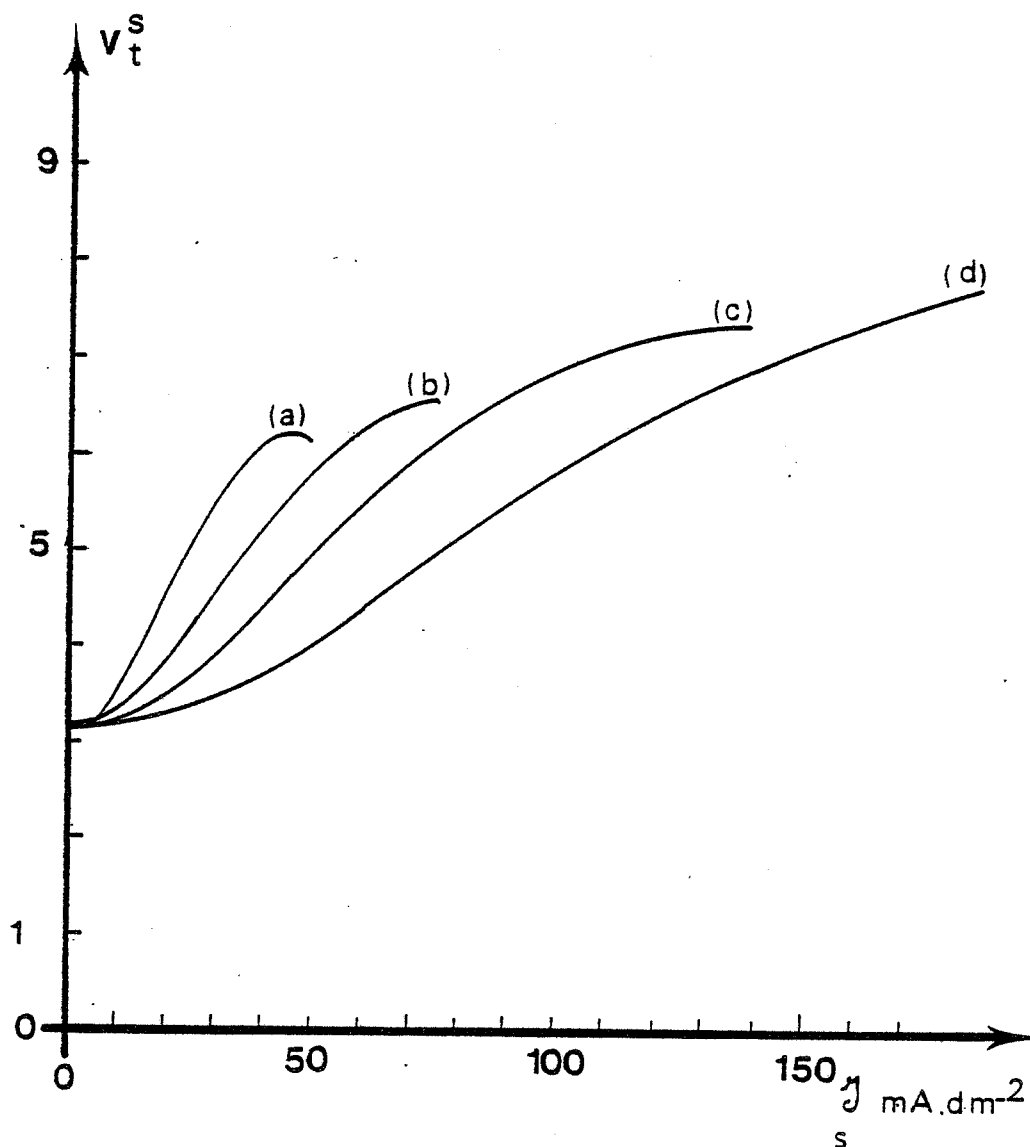


FIGURE 52 - Vitesse théorique de consommation de substrat (v_t^s en $\mu\text{mole.mn}^{-1}$) en fonction de la densité de courant pour différentes valeurs de la concentration en sel de fond :

(a), $C_A(o) = C_B(o) = 0$; (b) $C_A(o) = 10^{-4}\text{M}$, $C_B(o) = 2.10^{-4}\text{M}$;
 (c) $C_A(o) = 2,5.10^{-4}\text{M}$, $C_B(o) = 5.10^{-4}\text{M}$; (d) $C_A(o) = 5.10^{-4}\text{M}$,
 $C_B(o) = 10^{-3}\text{M}$.

Données numériques introduites dans le modèle :

$V_m = 10^{-4} \text{ mole.dm}^{-3} . \text{s}^{-1}$; $C_s(o) = 5.10^{-4}\text{M}$; $\text{pH}(o) = 7,0$; $e = 1,25 \text{ mm}$.

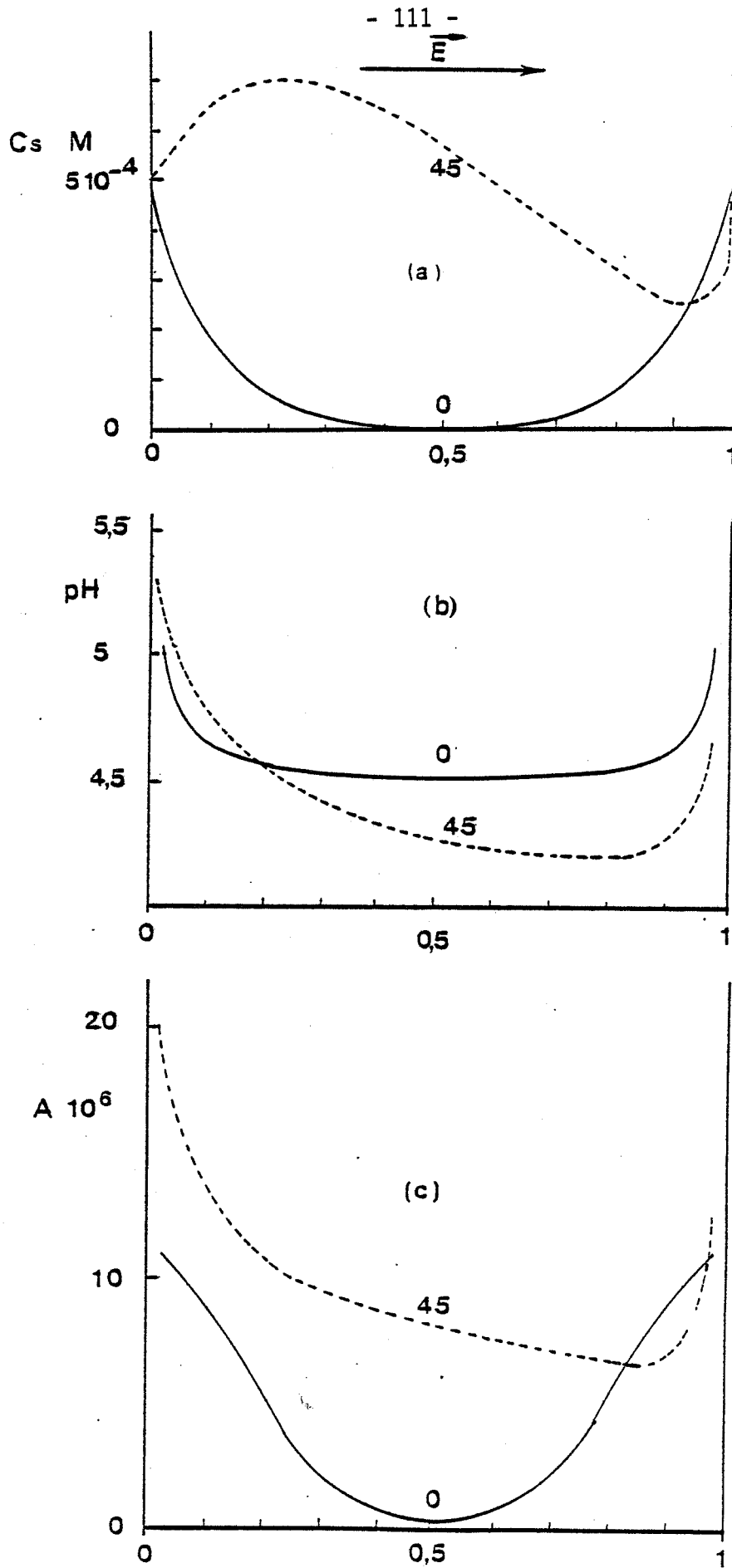


FIGURE 53 - Influence de la densité de courant sur les profils de concentration de substrat (Fig. 53a), les profils de pH (Fig. 53b) et sur les profils d'activité enzymatique locale (A en $\text{mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$) (Fig. 53c) en absence de sel de fond ; $C_A(0) = C_B(0) = 0$.
 Données numériques introduites dans le modèle : idem Fig. 52.

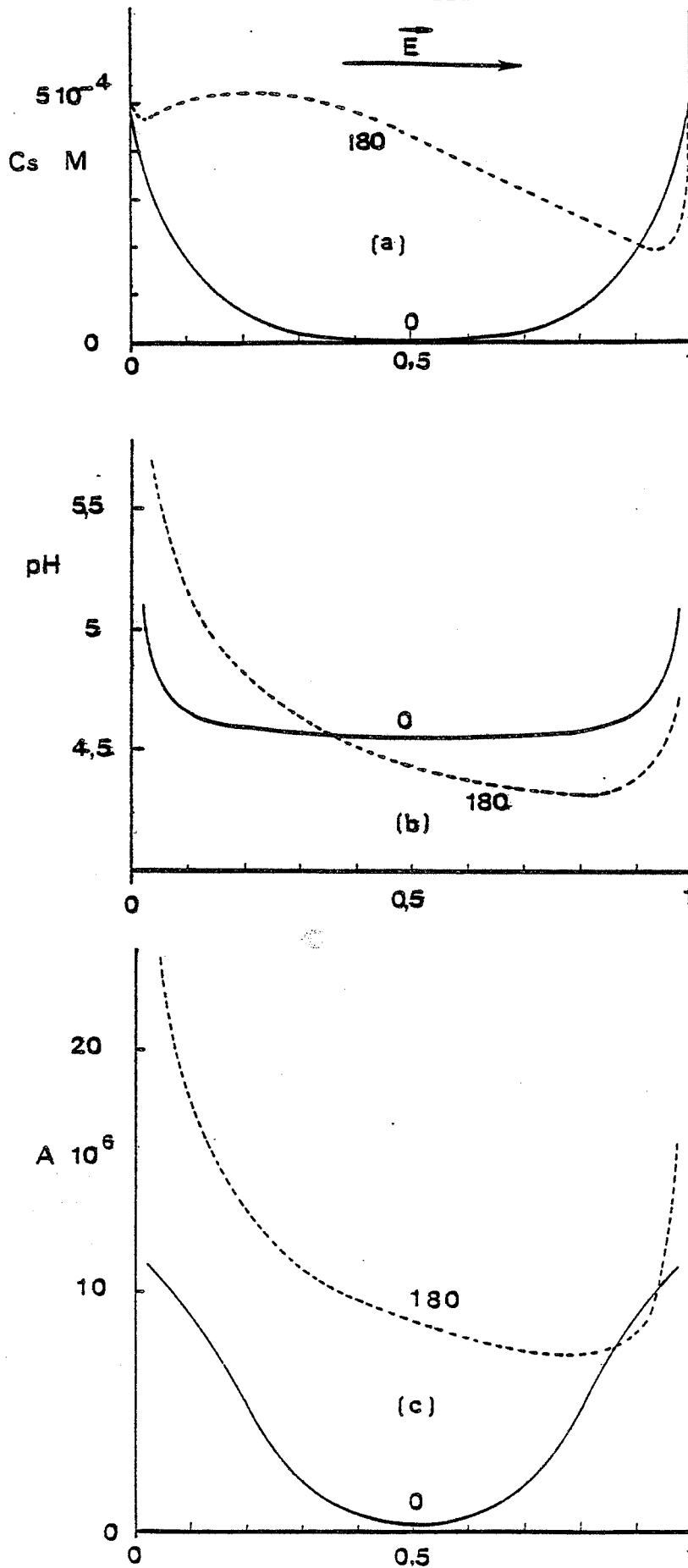


FIGURE 54 - Influence de la densité de courant sur les profils de concentration de substrat (Fig. 54a), les profils de pH (Fig. 54b) et sur les profils d'activité enzymatique locale (A en $\text{mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$) (Fig. 54c) en présence de sel de fond ; $C_A(0) = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_B(0) = 10^{-3} \text{ M}$. Données numériques introduites dans le modèle : idem Fig. 52.

Pour prendre en compte les variations simultanées des termes $C_S(x)$ et $V_m(x)$, nous avons représenté sur les figures 53c et 54c les profils d'activité enzymatique locale $A(x)$.

La courbe obtenue pour une densité de courant égale à 180 mA.dm^{-2} ($C_A(o) = 5.10^{-4} \text{ M}$; $C_B(o) = 10^{-3} \text{ M}$) fait apparaître un profil d'activité enzymatique locale légèrement supérieur à celui obtenu pour $\mathcal{J} = 45 \text{ mA.dm}^{-2}$ ($C_A(o) = C_B(o) = 0$). Ceci se traduit sur la figure 52 par une augmentation plus importante de la vitesse de consommation de substrat en présence de sel de fond.

γ) Influence de la concentration d'enzyme immobilisé

Le terme V_m (Equation 22) représente, à une constante près, la concentration d'enzyme immobilisé au sein de la membrane.

L'application d'une densité de courant se traduit par une augmentation globale de la concentration en substrat ionique au sein de la membrane. Cet effet se traduit d'autant plus par une augmentation de la vitesse de consommation de substrat que la membrane est concentrée en sites actifs. La figure 55 illustre ce phénomène. La figure 56 représente les profils correspondant de concentration de substrat pour deux valeurs de la densité de courant (0 et 100 mA.dm^{-2}) et pour trois valeurs du terme V_m : Fig. 56a, $V_m = 10^{-3}$; Fig. 56b, $V_m = 10^{-4}$ et Fig. 56c, $V_m = 10^{-5} \text{ mole.dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Pour une densité de courant nulle, l'augmentation de la concentration d'enzyme immobilisé se traduit par une augmentation de la vitesse de consommation de substrat (Fig. 55). Néanmoins, pour une membrane très active, la vitesse de réaction devient limitée par la vitesse de diffusion du substrat aux interfaces, comme le montre l'évolution des profils de concentration de substrat lorsque le terme V_m augmente ($\mathcal{J} = 0$; Fig. 56).

En présence d'une densité de courant, le flux entrant de substrat au niveau de l'interface anodique de la membrane augmente, la composante diffusionnelle de ce flux devenant rapidement négligeable devant le terme d'électromigration (Equation 19) lorsque la densité de courant augmente. Cet apport de substrat par électrotransport se traduit d'autant plus par une augmentation de la vitesse de consommation de substrat (Fig. 55) que la membrane est concentrée en enzyme (si $C_S(x) \lesssim K_m(x)$) comme le montre l'évolution des profils de concentration de substrat lorsque le terme V_m augmente ($\mathcal{J} = 100 \text{ mA.dm}^{-2}$; Fig. 56).

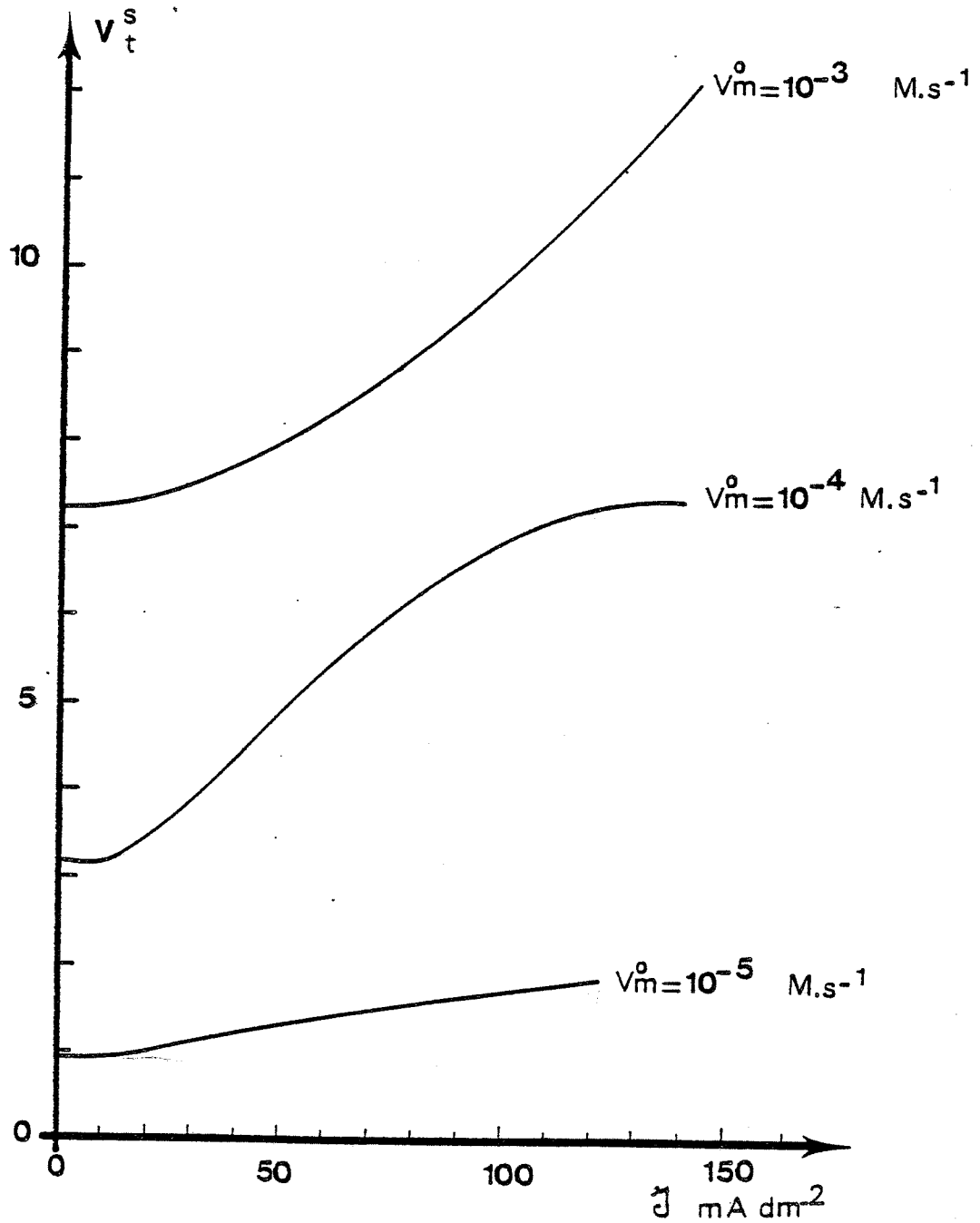


FIGURE 55 - Vitesse théorique de consommation de substrat (v_t^s en $\mu\text{mole} \cdot \text{mm}^{-1}$) en fonction de la densité de courant, pour trois valeurs du terme V_m : 10^{-5} , 10^{-4} et $10^{-3} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$.

Données numériques introduites dans le modèle :

$C_A(o) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_B(o) = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH}(o) = 7,0$; $C_s(o) = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$;
 $e = 1,25 \text{ mm}$.

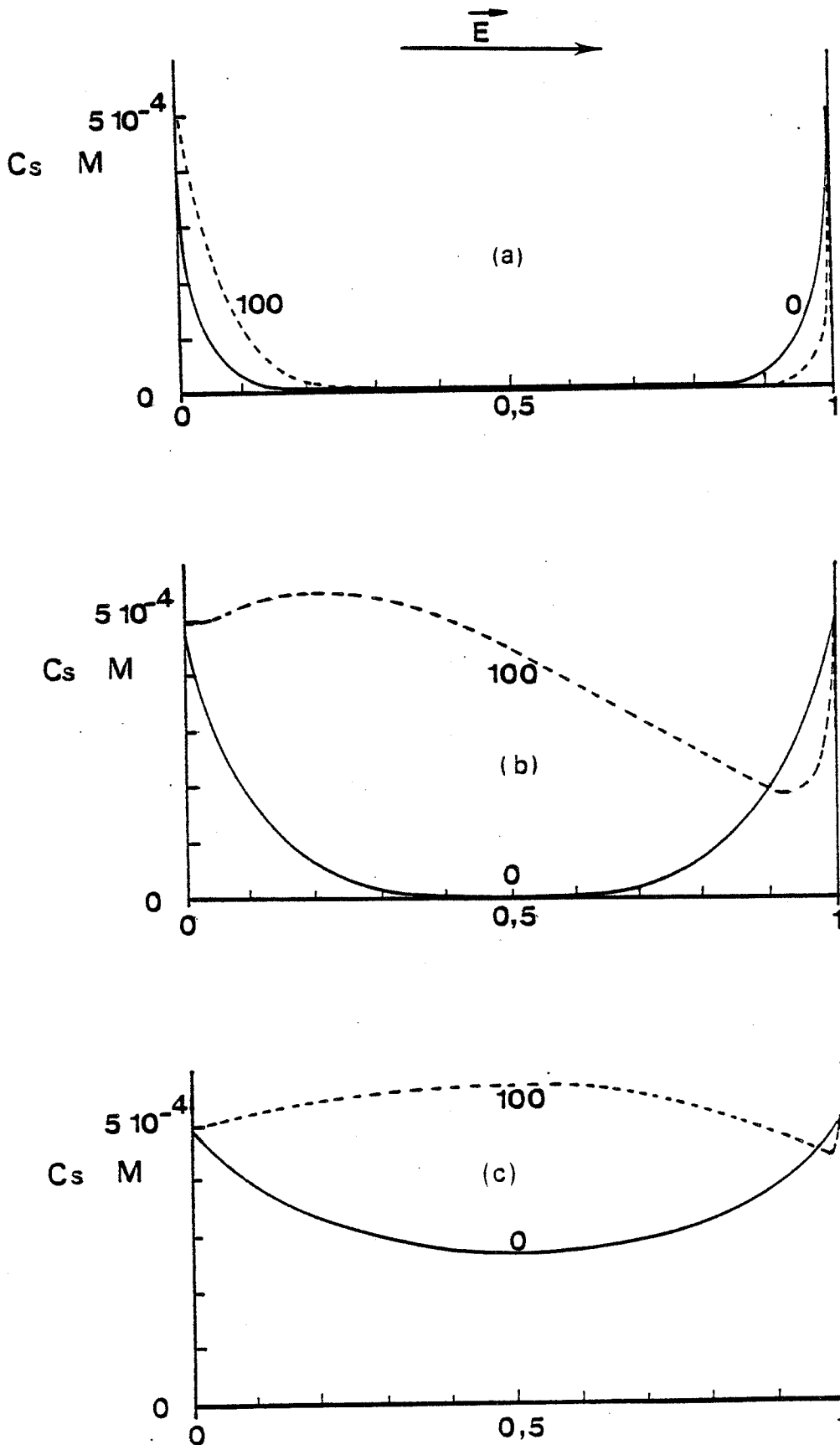


FIGURE 56 - Influence de la densité de courant sur les profils de concentration de substrat, pour trois valeurs du terme V_m :

Fig. 56a : $V_m = 10^{-3} \text{ mole.dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $\mathcal{I} = 0$ et 100 mA.dm^{-2}

Fig. 56b : $V_m = 10^{-4} \text{ mole.dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $\mathcal{I} = 0$ et 100 mA.dm^{-2}

Fig. 56c : $V_m = 10^{-5} \text{ mole.dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $\mathcal{I} = 0$ et 100 mA.dm^{-2}

Données numériques introduites dans le modèle : idem Fig. 55.

3) Influence du pH de la solution de substrat pH(o)

Comme dans le cas du système urée/uréase, le pH intramembranaire dépend essentiellement des contraintes diffusionnelles sur les produits de réaction.

La figure 57 représente la vitesse théorique de consommation de substrat (V_t^S en $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}$) en fonction de la densité de courant pour différentes valeurs du pH aux bornes de la membrane pH(o).

Pour $5,0 \leq \text{pH}(o) \leq 9,0$ les courbes obtenues sont voisines quelle que soit la densité de courant.

Pour $\text{pH}(o) = 4,0$, la membrane est globalement moins active.

Les profils de pH correspondants pour deux valeurs de la densité de courant (0 et $70 \text{ mA}\cdot\text{dm}^{-2}$) et pour trois valeurs de pH(o) (9,0 ; 5,0 et 4,0) sont présentés sur la figure 58.

Pour $\text{pH}(o) = 5,0$ et $\text{pH}(o) = 9,0$, les profils de pH obtenus sont proches, quelle que soit la valeur de la densité de courant (0 ou $70 \text{ mA}\cdot\text{dm}^{-2}$).

Pour $\text{pH}(o) = 4,0$, l'acide acétique, produit de la réaction enzymatique, ne modifie que dans une très faible mesure le profil de pH intramembranaire ($\text{pH}(x) \approx \text{pH}(o) ; \forall x$).

2°) Etude expérimentale

Cette étude a pour but de montrer la possibilité de moduler la vitesse de consommation de substrat par application d'une densité de courant dans le cas du système acétylcholine/acétylcholinestérase et de confirmer ainsi les résultats de l'étude mathématique.

Nous avons étudié les variations de la vitesse de consommation de substrat en fonction de la densité de courant pour différentes valeurs des paramètres réactionnels : $C_s(o)$ et pH(o).

Auparavant, et afin de vérifier l'exactitude du modèle, nous avons, comme pour l'étude du système urée/uréase, réalisé une électrode de pH enrobée d'une membrane à acétylcholinestérase immobilisé. Ce montage a permis

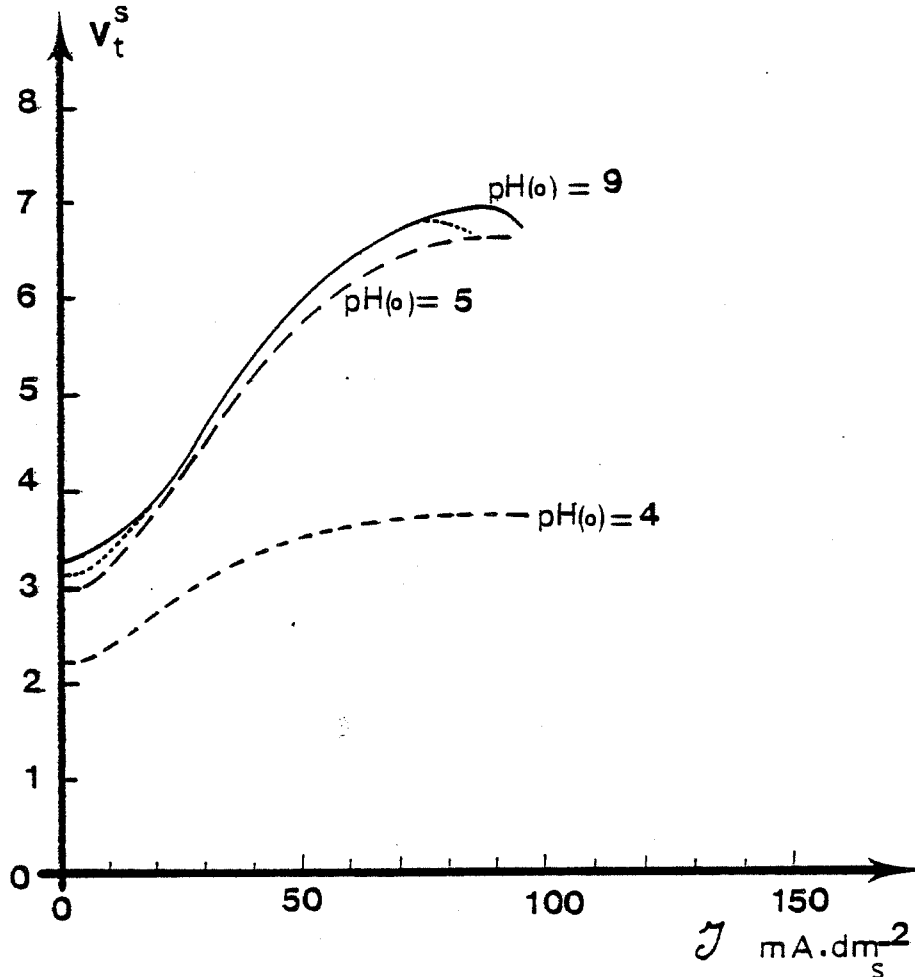


FIGURE 57 - Vitesse théorique de consommation de substrat (v_t^s en $\mu\text{mole} \cdot \text{mn}^{-1}$) en fonction de la densité de courant, pour différentes valeurs du pH aux bornes de la membrane : $\text{pH}(o) = 9,0$; $7,0$; $5,0$ et $4,0$.

Données numériques introduites dans le modèle :

$C_s(o) = 5 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $V_m = 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; $e = 1,25 \text{ mm}$; $C_A(o) = 10^{-4} \text{M}$ et $C_B(o) = 2,1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ pour $\text{pH}(o) = 9$; $C_A(o) = 10^{-4} \text{M}$ et $C_B(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ pour $\text{pH}(o) = 7$; $C_A(o) = 1,05 \cdot 10^{-4} \text{M}$ et $C_B(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ pour $\text{pH}(o) = 5$; $C_A(o) = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ et $C_B(o) = 2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ pour $\text{pH}(o) = 4$.

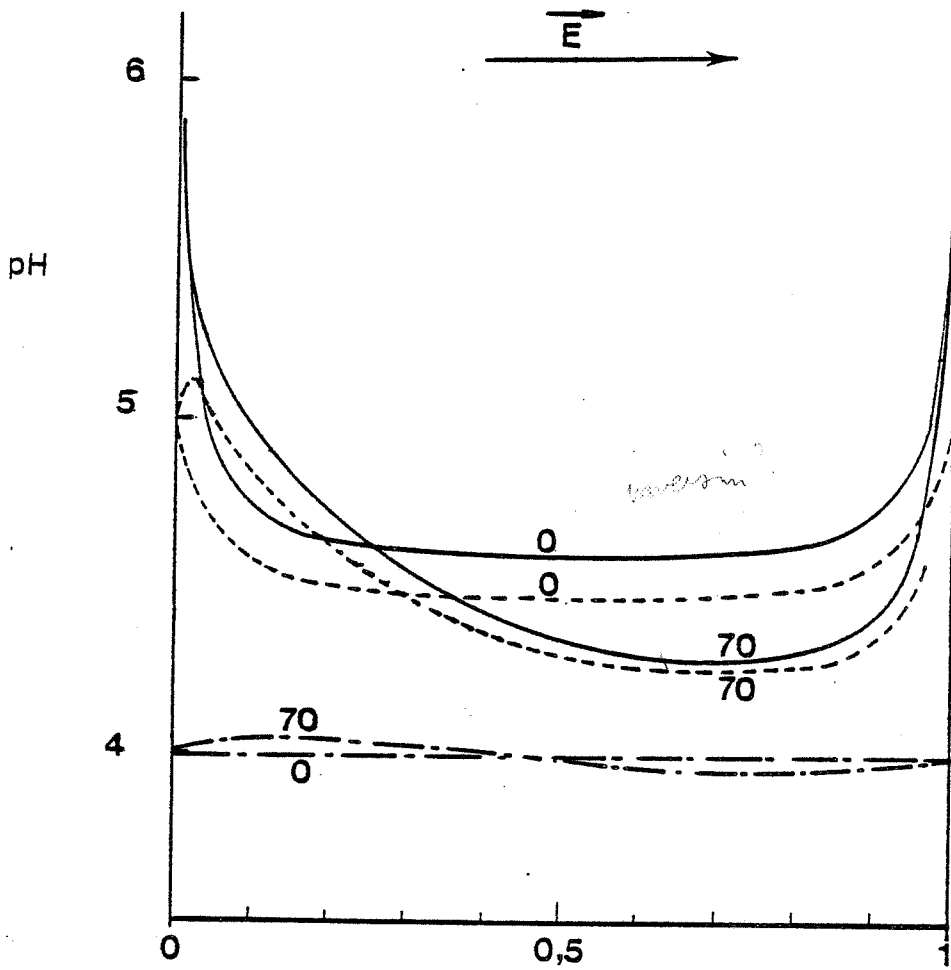


FIGURE 58 - Influence de la densité de courant sur les profils de pH intramembra-
naire pour trois valeurs du pH aux bornes de la membrane :

—— pH(o) = 9,0 ; ----- pH(o) = 5,0 ; -.-.-.-.- pH(o) = 4,0
 $\mathcal{I} = 0$ et 70 mA.dm⁻².

Données numériques introduites dans le modèle : idem Fig. 57.

d'étudier la variation du pH au plan médian de la membrane (pH $e/2$) en fonction de la concentration en substrat. La courbe expérimentale a été comparée aux courbes théoriques obtenues à partir du modèle, pour une densité de courant nulle.

a) Matériel et méthodes

α) Electrode enzymatique

L'électrode enzymatique réalisée est composée d'une électrode de pH (Metrohm, réf :6.0203.000) sur laquelle est déposée une membrane de 0,2 mm d'épaisseur, obtenue par coréticulation d'albumine et d'acétylcholinestérase (SIGMA, type VI-S 490 unités/mg) conformément au mode opératoire décrit dans l'annexe 2. La réponse de l'électrode enzymatique en fonction de la concentration en substrat d'une solution non tamponnée de K_2SO_4 ($5,75 \cdot 10^{-4} M$) a été étudiée.

β) Etude de l'influence d'une densité de courant

L'étude de l'influence d'une densité de courant sur la vitesse de consommation de substrat a été réalisée grâce au dispositif expérimental précédemment décrit lors de l'étude du système urée/uréase (figure 24a).

La membrane enzymatique est réalisée en utilisant le mode opératoire décrit dans l'annexe 2. La surface effective de la membrane est de 10 cm^2 . Le débit des différentes solutions est de $180 \text{ cm}^3 \cdot \text{mn}^{-1}$. La vitesse de consommation de substrat est déterminée à partir de la vitesse d'adjonction d'une solution de soude par le dispositif de pH-stat en utilisant l'équation (38).

Comme dans le cas du système urée/uréase, des essais "à blanc" ont été réalisés. Ces manipulations faites en absence de membrane enzymatique (toutes choses égales par ailleurs) ont pour but de vérifier l'absence de réponse des deux pH-stats dans la gamme de densité de courant utilisée.

Nous avons étudié :

- la vitesse de consommation de substrat en fonction de la densité de courant pour trois valeurs de la concentration en substrat aux bornes de la membrane: $C_s(o) = 5 \cdot 10^{-4} M$, $10^{-3} M$ et $2 \cdot 10^{-3} M$.

- la vitesse de consommation de substrat en fonction de la densité de courant pour trois valeurs du pH aux bornes de la membrane : $\text{pH}(o) = 8,4$; $7,0$; $5,1$.

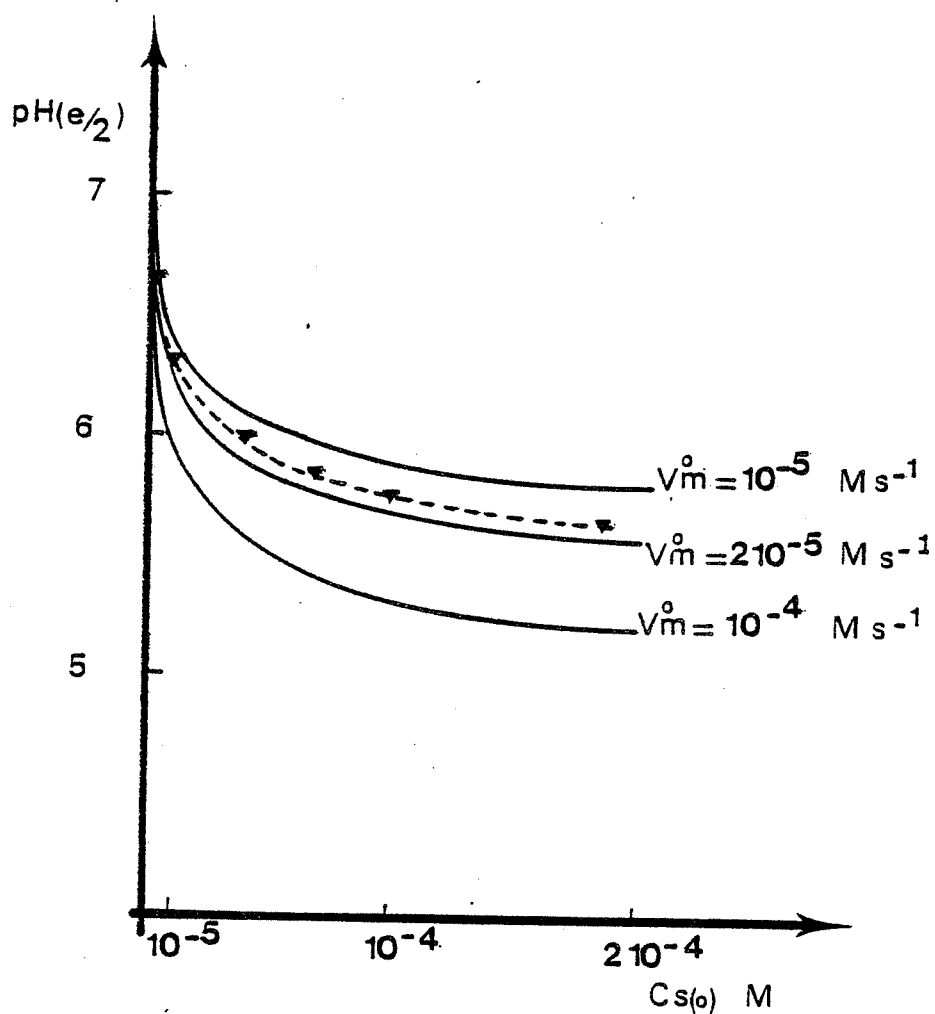


FIGURE 59 - Variations expérimentale (---) et théorique (—) en fonction de la concentration en substrat, du pH à l'interface membrane/électrode, obtenues en milieu non tamponné pour une électrode pH enrobée d'acétylcholinestérase immobilisée. Les courbes théoriques ont été obtenues à partir des données numériques suivantes : $\text{pH}(o) = 7,0$; $e = 0,2 \text{ mm}$.

b) Résultats

La figure 59 représente la réponse de l'électrode enzymatique (pH e/2) en fonction de la concentration en acétylcholine. La courbe expérimentale (---▼---) se situe dans le réseau de courbes obtenues à partir du modèle, en absence de densité de courant, pour trois valeurs du terme V_m^0 : 10^{-5} ; 2.10^{-5} et 10^{-4} mole. $dm^{-3}.s^{-1}$ (courbes trait plein).

Ce résultat permet de constater le bon accord entre le modèle et les résultats expérimentaux, pour une densité de courant imposé nulle.

La vitesse de consommation de substrat (V_e^S en micromole. mn^{-1}) en fonction de la densité de courant pour trois valeurs de la concentration en substrat est présentée sur la figure 60.

Ces résultats expérimentaux font apparaître comme le laissait prévoir le modèle une augmentation d'activité de la membrane enzymatique en présence d'un courant imposé. La gamme de variation de la densité de courant pour laquelle ces phénomènes sont observés correspond aux valeurs prévues par le modèle (0-150 mA. dm^{-2}). L'allure générale des courbes expérimentales obtenues reflète sensiblement les courbes obtenues par le modèle (figure 43).

L'influence du pH de la solution de substrat sur les courbes obtenues est présentée sur la figure 61. La comparaison avec les résultats théoriques (figure 57) n'est pas très bonne, bien qu'un certain nombre de points communs apparaissent :

- aux faibles valeurs de la densité de courant ($\mathcal{I} \leq 10$ mA. dm^{-2}) la vitesse de réaction n'augmente pas.
- pour des valeurs de la densité de courant plus élevées ($\mathcal{I} > 20$ mA. dm^{-2}) la vitesse de consommation de substrat augmente rapidement.

3°) Conclusions

Comme le laissaient prévoir les résultats de l'analyse mathématique du système acétylcholine/acétylcholinestérase, l'application d'une densité de courant se traduit par une augmentation de la vitesse de consommation de substrat. Cet effet peut être attribué à une augmentation de la concentration intramembranaire en acétylcholine résultant de l'effet d'électrotransport du substrat ionique.

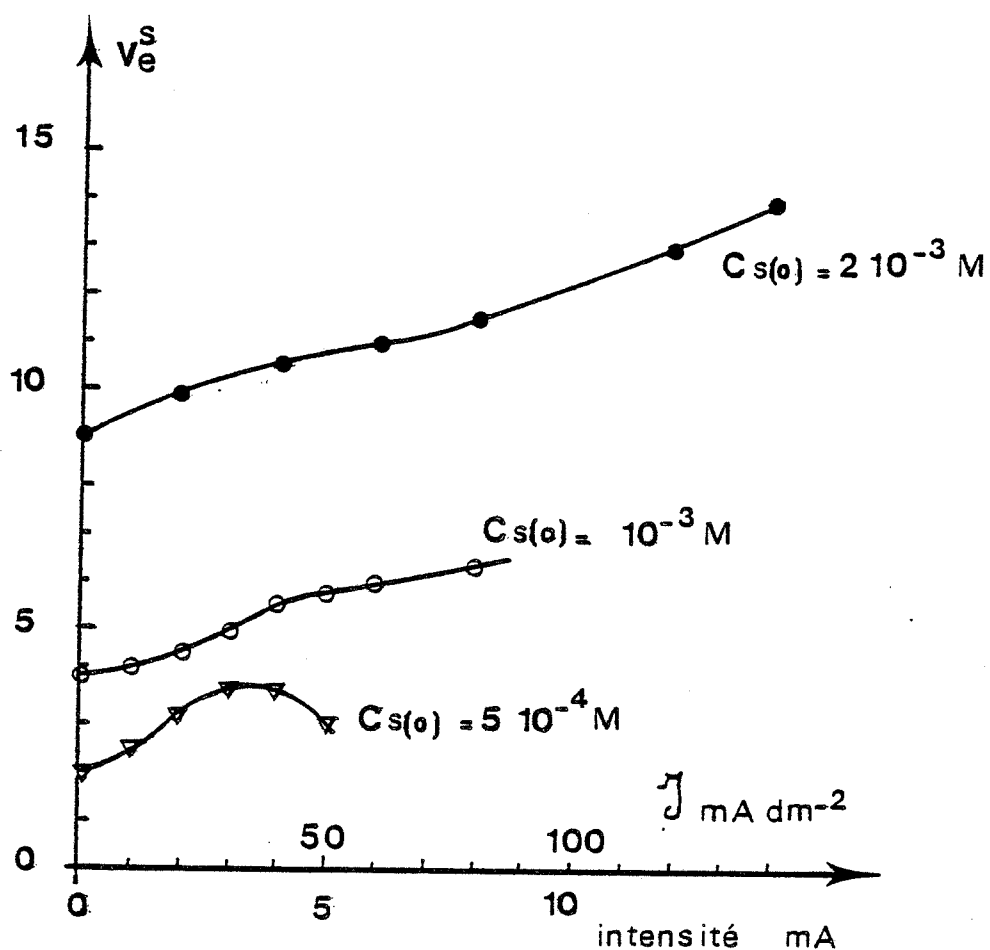


FIGURE 60 - Vitesse expérimentale de consommation de substrat (v_e^s en $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) en fonction de la densité de courant pour trois valeurs de la concentration en substrat $C_{s(o)}$: $\text{---}\nabla\text{---}$, $C_{s(o)} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $\text{---}\circ\text{---}$, $C_{s(o)} = 10^{-3} \text{ M}$; $\text{---}\bullet\text{---}$, $C_{s(o)} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Conditions expérimentales : $\text{pH}(o) = 6,00$; $25,0^\circ\text{C}$.

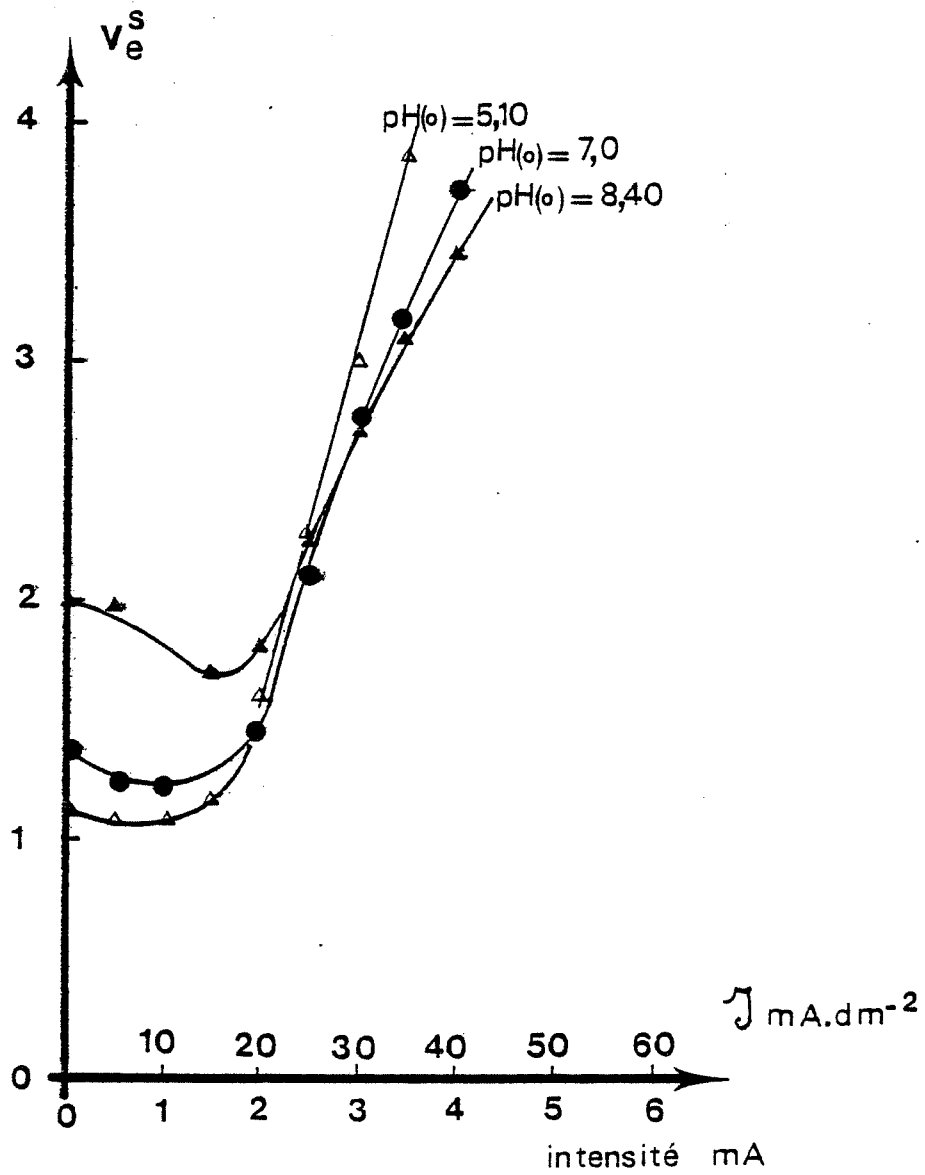


FIGURE 61 - Vitesse expérimentale de consommation de substrat (v_e^s en micromole.mn⁻²) en fonction de la densité de courant, pour trois valeurs du pH de la solution de substrat pH(o) : 5, 10 ; 7,00 et 8,40. Conditions expérimentales : $C_s(o) = 5.10^{-4}M$; $K_2SO_4 = 10^{-4}M$; 25,0°C.

La perturbation du profil de pH intramembranaire qui résulte de la modification des profils de concentration des diverses espèces ioniques n'est pas le phénomène prépondérant dans les modifications d'activité observées, contrairement à ce qui est décrit dans le cas du système urée/uréase.

Pour une membrane fortement active, la vitesse de consommation de substrat est en général limitée par les contraintes de diffusion internes et/ou externes à la membrane enzymatique [ENGASSER et HORVATH - 1973 ; HORVATH et ENGASSER - 1974 ; SUNDARAM - 1978 ; KASCHE et BUCHOLZ - 1979 ; ENGASSER et HISLAND - 1979 ; MARC et ENGASSER - 1982]. Dans le cas d'un substrat ionique, l'application d'une densité de courant se traduit par une augmentation de la concentration intramembranaire en substrat et par conséquent, par une disparition de ces limites diffusionnelles.

IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le modèle mathématique réalisé pour l'étude de l'influence d'une densité de courant sur l'activité catalytique d'une membrane enzymatique suppose que le système formé par l'association du support protéique et du catalyseur enzymatique ne comporte pas de charges électriques fixes. Cette hypothèse, commune à beaucoup de modèles, doit être discutée.

La membrane formée par coréticulation d'albumine et d'enzyme contient approximativement 10 % de protéine et 90 % d'eau. Cette composition entraîne deux effets :

- La structure macromoléculaire des protéines leur confère un caractère polyélectrolytique [SUN - 1969, 1970] susceptible d'induire un effet de tampon pH au sein de la membrane.
- La présence de fonctions carboxyliques et de fonctions amines que ce soit sur l'albumine [SAIFER et PALO - 1969] ou sur l'enzyme introduit des charges électriques fixes susceptibles d'interférer avec les espèces ioniques qui participent à la réaction enzymatique [DAVID - 1973].

L'effet tampon vis-à-vis du pH, induit par la nature macromoléculaire du support, influence l'établissement des profils de pH au sein de la membrane en régime transitoire [CHAY - 1979, 1980] mais pas les profils obtenus à l'état stationnaire comme le prouvent les résultats expérimentaux présentés sur les figures 35 et 59.

Le caractère acide et basique faible des fonctions carboxylique et amine permet de définir pour une protéine son point isoélectrique (pI). C'est la valeur du pH pour laquelle la résultante des charges négatives (carboxylate) et positives (ammonium) est globalement nulle. La protéine est chargée positivement pour $\text{pH} < \text{pI}$ et négativement pour $\text{pH} > \text{pI}$. L'albumine et l'uréase ont un point isoélectrique de 5 et 5,4 respectivement. La réaction entre le glutaraldéhyde et diverses protéines a été étudiée plus particulièrement par HOOPWOOD [HOOPWOOD - 1969 ; 1970 a,b ; HOOPWOOD et col. - 1970]. Cette réaction se traduit par une diminution du pI de la protéine attribuable à la disparition de fonctions amines primaires lors de la formation de liaisons intra et intermoléculaires.

En conséquence, il est possible d'attribuer aux membranes utilisées dans cette étude un pI voisin de quatre.

Les charges fixes portées par la membrane excluent les ions de même signe et une différence de potentiel de DONNAN s'établit à chaque interface membrane/solution. Lorsque la force ionique du milieu augmente, la charge effective portée par les macromolécules diminue conformément à l'effet polyélectrolytique [VALLIN - 1980 a,b].

Dans le cas du système urée/uréase, la réaction enzymatique se traduit par une augmentation du pH intramembranaire ($\text{pH} \rightarrow 9,2$) et la membrane est globalement chargée négativement [DAVID - 1973].

Dans le cas du système acétylcholine/AChE, la réaction enzymatique diminue le pH intramembranaire ($\text{pH} \xrightarrow{\approx} 4$). La membrane est globalement moins chargée que dans le cas du système urée/uréase.

Ces charges fixes sont-elles susceptibles de modifier de façon notable les profils de concentration des espèces chargées dans la membrane et par conséquent, de mettre en cause la validité des équations utilisées dans notre modèle ?

Pour discuter de l'influence de ces charges fixes, il est nécessaire de dissocier dans notre modèle, les résultats obtenus en absence et en présence d'un courant imposé.

- Pour une densité de courant non nulle, la gamme d'intensité étudiée se traduit par des valeurs de champ électrique intramembranaire relativement élevées ($10-100 \text{ V.dm}^{-1}$) devant lesquelles les valeurs du champ électrique issues du potentiel de diffusion et du potentiel électrostatique dû aux charges fixes peuvent

être négligées.

- Pour une densité de courant nulle, il faudrait pouvoir comparer les influences relatives du potentiel de diffusion et du potentiel électrostatique dû aux charges fixes [KALTHOD et RUCKENSTEIN - 1982 a,b]. Dans l'hypothèse où le potentiel électrostatique ne serait pas négligeable par rapport au potentiel de diffusion (pris en compte dans notre modèle), il faut avoir à l'esprit que :

(1) le pH intramembranaire est gouverné essentiellement par les produits de réaction enzymatique.

(2) le gradient de potentiel de diffusion ne modifie que très peu les profils de concentration observés pour les deux systèmes étudiés.

Ces deux remarques montrent que la présence d'un potentiel électrostatique comparable au potentiel de diffusion n'aurait que des effets minimes sur les profils de concentration des différentes espèces qui participent à la réaction enzymatique, et par conséquent, sur l'activité enzymatique membranaire.

Une autre hypothèse faite, est l'absence de couches-limites de diffusion aux interfaces membrane/solution. Les effets de ces couches non agitées sur le comportement cinétique de systèmes enzymatiques immobilisés ont fait l'objet de nombreuses études [HORVATH et ENGASSER - 1974 ; De SIMONE - 1977 ; PENNLIN et col. - 1977 ; SUNDARAM - 1978]. Dans notre étude expérimentale, la vitesse de circulation de la solution de substrat a été choisie aussi élevée que possible de manière à minimiser l'importance de ces couches de diffusion. Nous supposons dans notre étude théorique que la concentration de substrat aux bornes de la membrane est égale à la concentration du substrat dans la solution.

Par ailleurs, les deux systèmes étudiés sont susceptibles de donner lieu, en absence de courant imposé et dans certaines conditions, à des phénomènes d'hystérésis ainsi qu'à des oscillations chimiques temporelles [KERNEVEZ et col. - 1978 ; BARBOTIN et col. - 1979 ; SELEGNY et VINCENT - 1980 ; FRIBOULET et col. - 1981 ; VINCENT et SELEGNY - 1981]. Aucun résultat expérimental ne permet de penser que ces phénomènes interviennent en présence d'une densité de courant imposée, tout au moins, dans les conditions expérimentales utilisées.

L'étude de l'influence d'une densité de courant imposée sur le comportement cinétique de systèmes enzymatiques immobilisés a été réalisée. Deux enzymes ont été étudiés :

- l'uréase catalysant la décomposition de l'urée (substrat non ionique)

en produits de réaction acides et basiques faibles.

- l'acétylcholinestérase catalysant la décomposition et l'acétylcholine (substrat ionique) en choline (produit ionique) et en acide acétique.

Pour ces deux systèmes, nous avons mis en évidence expérimentalement, la possibilité d'augmenter la vitesse de conversion du substrat à l'aide d'un champ électrique externe continu.

Pour comprendre l'origine de cette modification d'activité, un modèle a été réalisé prenant en compte les équations de diffusion-réaction, classiques en cinétique hétérogène, associées à un terme d'électromigration des espèces ioniques au sein de la membrane. La nature acide ou basique faible des produits de réaction induit une rétroaction du pH sur la cinétique enzymatique par l'intermédiaire de la pH dépendance des paramètres V_m et K_m .

La modélisation de ces deux systèmes permet d'analyser d'une part, leur comportement cinétique en absence de courant imposé et en milieu non tamponné et d'autre part, les modifications obtenues par application d'une densité de courant.

La nature différente des deux substrats utilisés implique deux mécanismes fondamentalement différents de l'augmentation de l'activité enzymatique.

Dans le cas du système urée/uréase, le profil de champ électrique intramembranaire résultant de l'application d'une densité de courant se traduit par une modification des profils de concentration des différentes espèces induisant une modification du profil de pH. Par l'intermédiaire de la pH dépendance des paramètres cinétiques V_m et K_m , cette modification du pH intramembranaire résulte en une augmentation de l'activité enzymatique.

Dans le cas du système acétylcholine/AChE, l'électrotransport du substrat ionique provoque une augmentation de sa concentration au sein de la membrane et par conséquent une augmentation de l'activité enzymatique lorsque la concentration en substrat n'implique pas une cinétique d'ordre 0. Ce phénomène se superpose à une variation des paramètres cinétiques V_m et K_m par suite d'une modification du profil de pH intramembranaire.

Il est nécessaire de situer nos résultats théoriques et expérimentaux par rapport à la littérature et plus particulièrement par rapport aux travaux où un champ électrique externe est utilisé pour moduler l'activité catalytique d'une membrane contenant un enzyme immobilisé.

KUBO et col. [1976] ont décrit l'influence d'un champ électrique sur la lipase immobilisée dans une membrane constituée par l'association collagène-cristaux liquides. Les modifications observées résultent du réarrangement des molécules de cristaux liquides sous l'influence d'un champ électrique et non de modifications intrinsèques de l'activité enzymatique.

VALLETON a réalisé, en 1980, une étude théorique de l'influence d'une densité de courant imposée sur différents systèmes enzymatiques "idéaux" où les espèces ioniques participant à la réaction enzymatique (substrat, produits, effecteurs) sont supposées entièrement dissociées. En conséquence, les espèces acides ou basiques substrats ou produits de la réaction sont des acides ou des bases fortes. Par ailleurs, l'auteur a développé un modèle où les équations de diffusion-réaction électromigration sont appliquées aux espèces H^+ et OH^- contrairement à notre étude, où la concentration de ces espèces est calculée à partir de l'équation d'électroneutralité. Ces deux hypothèses de travail induisent un certain nombre de différences par rapport à nos résultats et notamment en ce qui concerne les modifications des profils de pH intramembranaire.

BOURDILLON et THOMAS [1979] ont étudié l'influence d'un champ électrique sur une membrane artificielle contenant de l'hexokinase immobilisée. La complexité du système enzymatique étudié (présence d'ATP et d'ions Mg^{2+}) n'a pas permis à ces auteurs d'interpréter les phénomènes observés. Néanmoins, d'après notre étude, les variations d'activité observées pourraient correspondre à l'apparition d'une dissymétrie de comportement de la membrane (diminution de la vitesse de consommation de substrat dans le compartiment anodique et augmentation simultanée dans le compartiment cathodique) et non à une modification globale de l'activité enzymatique membranaire.

CHAPITRE IV

ETUDES PROSPECTIVES



CHAPITRE IV

ETUDES PROSPECTIVES

I - INTRODUCTION

Nous avons voulu terminer cette étude par quelques essais d'application pratique des résultats de notre travail. Dans cette optique, nous avons étudié en collaboration avec la Société Rhône-Poulenc, l'influence d'une densité de courant sur deux enzymes, la lactase et l'aminocyclase [CLOUS - 1979 et NEYRET - 1980]. En dernier lieu, nous avons étudié l'influence de la co-immobilisation de glucose oxydase sur la vitesse d'hydrolyse du lactose par une lactase immobilisée.

II - INFLUENCE D'UNE DENSITE DE COURANT SUR LA LACTASE

1°) Introduction

Le lactosérum ou "petit lait" est un sous produit de la fabrication du fromage obtenu lors de la coagulation du lait par la présure. C'est une solution de sels minéraux, de lactose (45-50 g/litre) et de protéines.

Après récupération de ces protéines (ultrafiltration, résines échangeuses d'ions) les jus lactosés résiduels peuvent être récupérés et valorisés. Ceci permet par ailleurs d'éviter les problèmes de pollution liés au rejet d'effluents liquides riches en matières organiques.

Le processus d'assimilation du lactose par l'organisme passe par l'hydrolyse de ce sucre en glucose et galactose sous l'action d'un enzyme intestinal : la lactase. La sécrétion de cet enzyme décroît rapidement avec l'âge. On estime qu'à l'âge adulte, 20 % des individus de race blanche et 80 % des individus de race noire ont une déficience en lactase.

Il apparaît par conséquent intéressant de développer de nouveaux procédés permettant de transformer ces jus lactosés en hydrolysats concentrés, à haute valeur nutritive.

La société RHONE-POULENC a développé un procédé d'hydrolyse du lactose par une lactase (β -galactosidase - E.C. 3.2.1.23 d'*Aspergillus Niger*) immobilisée par liaison covalente sur grains de silice activée au glutaraldéhyde. La "sphérolactase" obtenue a les caractéristiques suivantes :

- pH optimum de fonctionnement compris entre 3 et 4 ;
- Domaine de stabilité compris entre pH = 4 et pH = 8
- Température optimum d'utilisation 55°C
- Activité : 65 unités par gramme. Une unité est la quantité de support qui hydrolyse une micromole de lactose par minute, à pH = 4,5 et à 55°C.

2°) Hydrolyse du lactose par la sphérolactase.

Le schéma de principe du montage expérimental est présenté sur la figure 62. La solution de lactose ($2 \cdot 10^{-3} M$; 25,0°C ; pH = 5, 6 ou 7 ; $[K_2SO_4] = 5,75 \cdot 10^{-4} M$; 120 cm³) continuellement recyclée, traverse le compartiment central (Fig. 62) contenant la sphérolactase (2 g) contenue entre deux toiles de nylon très fines. Le débit de circulation est de 10 litres/heure.

Les compartiments latéraux (B et B' ; Fig. 62) contiennent une solution aqueuse de K_2SO_4 $5,75 \cdot 10^{-4} M$.

Pour une différence de potentiel donnée variant entre 0 et 30V (constante sur la durée d'une expérience et correspondant à une densité de courant comprise entre 0 et 80 mA/dm²) la solution lactosée circule pendant un temps déterminé : 15, 30 ou 60 minutes. En cours d'expérience, des échantillons de cette solution (1mL) sont régulièrement prélevés et le glucose formé est dosé dans un dispositif annexe par une méthode enzymatique (dosage de l'acide gluconique formé par oxydation du glucose par la glucose-oxydase).

Cette étude ne fait apparaître aucune influence du champ électrique sur la vitesse de conversion du lactose en glucose et galactose. Ce résultat est en accord avec les conclusions de l'étude des systèmes urée/uréase et acétylcholine/AChE:

- le substrat et les produits de réaction ne sont pas des espèces ioniques et par conséquent, la présence d'un champ électrique ne perturbe ni le transfert de substrat, ni l'évacuation des produits de réaction.
- la réaction enzymatique ne produit pas d'espèces acides ou basiques faibles dont la répartition au niveau du site actif de l'enzyme pourrait être influencée par la présence d'un champ électrique et donc modifier la cinétique réactionnelle.

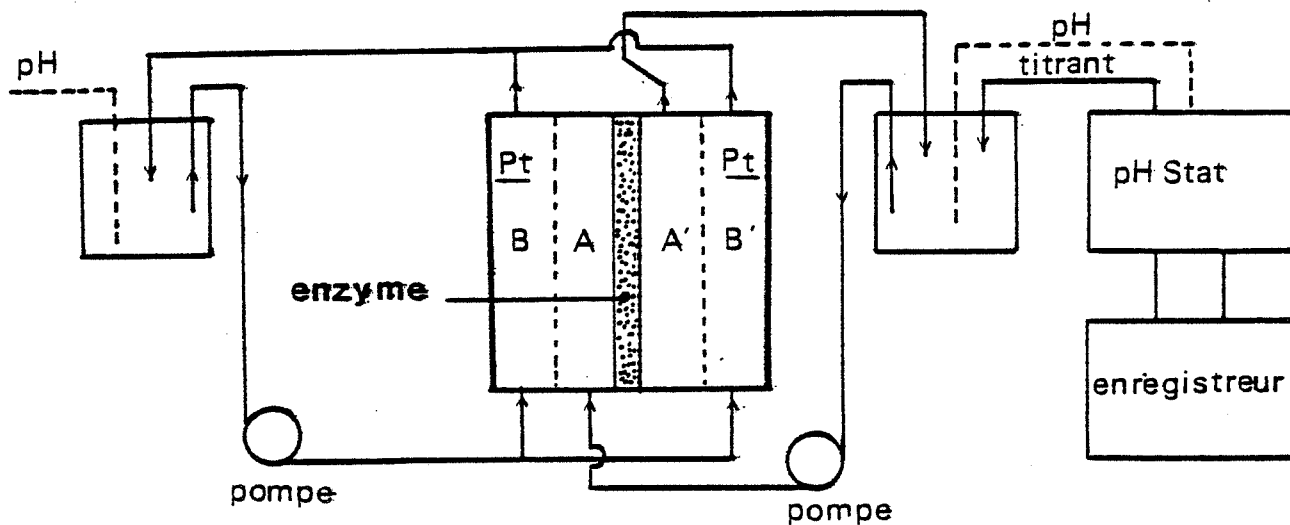


FIGURE 62 - Représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour l'étude de l'influence d'une densité de courant sur la cinétique d'hydrolyse du lactose par la lactase immobilisée.

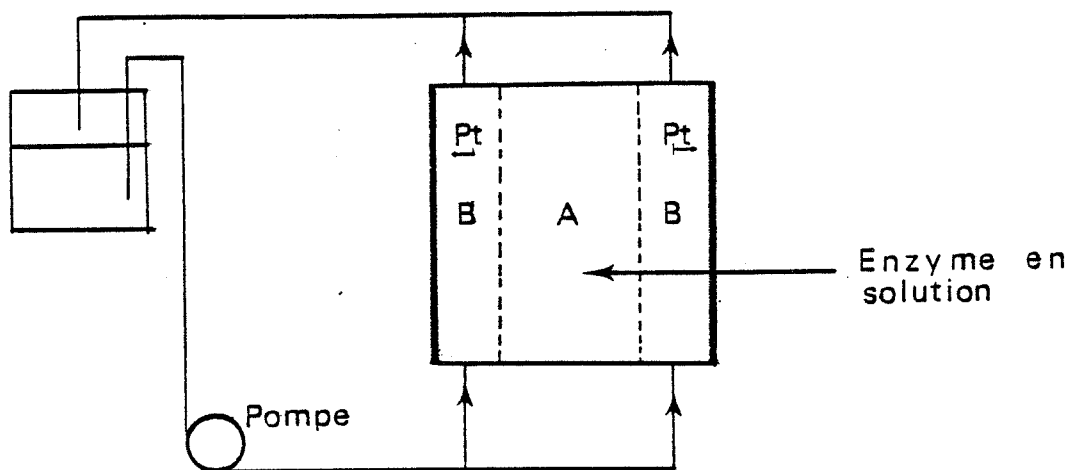


FIGURE 63 - Représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour l'étude de l'influence d'une densité de courant sur la cinétique d'hydrolyse du lactose par la lactase en solution.

Il est toutefois intéressant de constater que le champ électrique n'agit pas sur la protéine enzymatique (dans la gamme de différence de potentiel utilisée) conformément aux conclusions de l'étude des deux systèmes précédemment décrits.

Pour confirmer ce résultat, et à l'initiative de RHONE-POULENC, des manipulations ont été réalisées en phase homogène, avec la lactase en solution.

3°) Hydrolyse du lactose par la lactase en solution

Le schéma de principe du dispositif expérimental utilisé est présenté sur la figure 63. Les manipulations sont réalisées en batch. Le compartiment central contient la solution de lactose (40 g.L^{-1} ; $\text{pH} = 4,5$; $25,0^\circ\text{C}$; $[\text{K}_2\text{SO}_4] = 5,75 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; 20 cm^3). $1,5 \text{ cm}^3$ d'une solution aqueuse de lactase sont introduits en début de manipulation. Les compartiments latéraux contiennent une solution aqueuse de K_2SO_4 ($5,75 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Des manipulations de durée constante (20 mn.) ont été réalisées pour des différences de potentiel appliquées constantes (0 ; 10 et 20V). En fin de manipulation, la réaction est stoppée par une trempe du mélange réactionnel (3mn à 100°C).

Le glucose formé par hydrolyse du lactose est dosé par une méthode enzymatique.

Toutes choses égales par ailleurs, aucune variation de la cinétique d'hydrolyse du lactose, en fonction de la différence de potentiel appliquée aux bornes de la cellule n'a été observée. Des manipulations réalisées en faisant varier le pH du mélange réactionnel, la quantité d'enzyme en solution et la durée d'expérience n'ont apporté aucune donnée supplémentaire.

4°) Réaction d'immobilisation de la lactase sur grains de silice activée au glutaraldéhyde

Dans le but d'améliorer les performances de la "sphérolactase", nous avons étudié précédemment l'influence d'une densité de courant sur la réaction d'hydrolyse du lactose par ce support enzymatique. Dans cette optique, une deuxième démarche consiste à augmenter l'activité de la sphérolactase au cours de son élaboration, c'est-à-dire, au cours de la réaction d'immobilisation de la lactase sur la silice activée au glutaraldéhyde.

L'immobilisation de l'enzyme se fait par formation de liaisons covalentes entre la lactase et le support porteur de fonctions aldéhyde.

Le schéma de principe du montage expérimental utilisé est identique à celui présenté sur la figure 62. Le support (2g) est placé entre deux toiles de nylon et traversé par la solution de lactase à 4 % (120 cm^3 ; pH = 4,5 ; $25,0^\circ\text{C}$; $125 \text{ cm}^3 \cdot \text{mn}^{-1}$) pendant une durée de trois heures.

Afin de contrôler le bilan global de la réaction, des mesures d'activité ont été réalisées sur :

- la solution enzymatique initiale
- la solution enzymatique après réaction
- les solutions de rinçage de la sphérolactase obtenue
- la sphérolactase.

Des manipulations réalisées en faisant varier la différence de potentiel appliquée aux bornes de la cellule (0 ; 20 et 30V) ne font apparaître aucune variation notable de l'activité de la sphérolactase obtenue.

III - INFLUENCE D'UNE DENSITE DE COURANT SUR LA REACTION D'IMMOBILISATION DE L'AMINOACYLASE SUR SUPPORT ECHANGEUR D'IONS

1°) Introduction

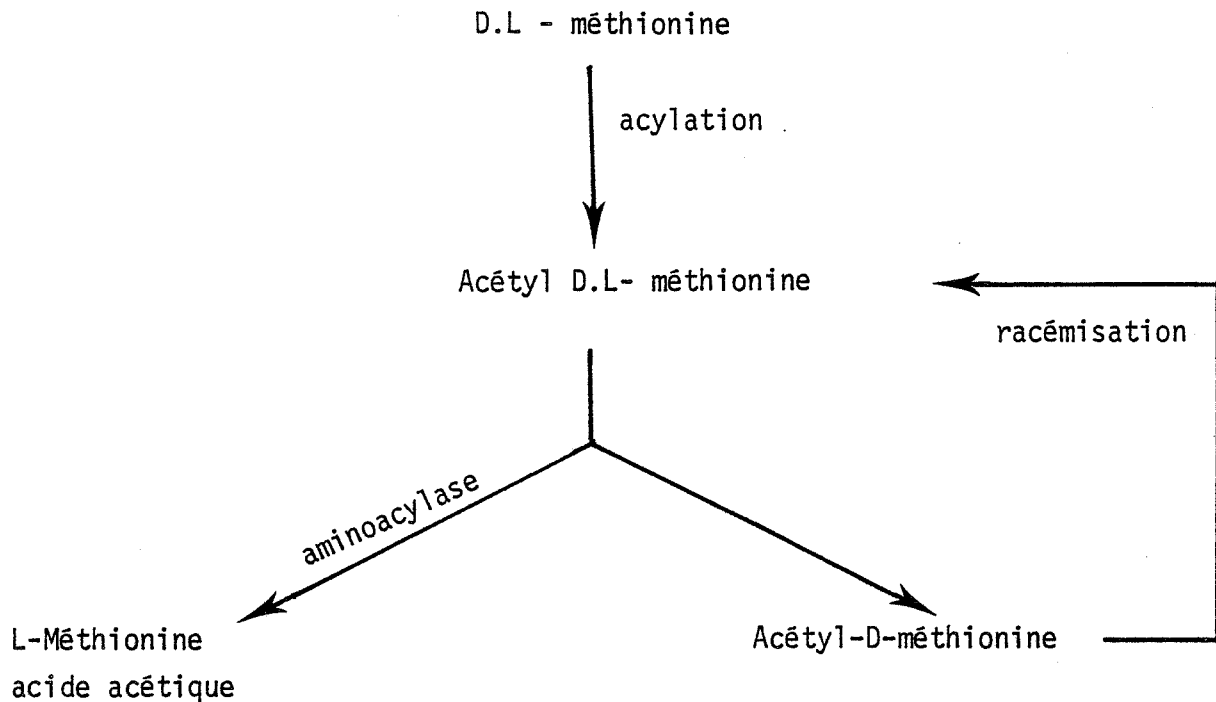
La synthèse d'acides aminés à des fins alimentaires ou industrielles peut être réalisée selon deux voies :

- par synthèse chimique donnant un mélange racémique D-L ;
- par fermentation qui fournit l'isomère L.

L'examen des besoins en acides aminés de diverses espèces animales fait apparaître une déficience soit en L-méthionine, soit en L-lysine, selon la provenance des protéines alimentaires. Contrairement à la plupart des acides aminés, la méthionine est obtenue par synthèse chimique totale, conduisant au mélange racémique. Bien que la méthionine soit l'un des rares acides aminés dont les formes chirales D et L soient assimilables par l'homme, il est important de disposer de méthodes permettant d'obtenir l'un des isomères optiques à partir du mélange racémique.

Le procédé de fabrication de L-méthionine à partir du mélange racémique a été le premier exemple d'application des enzymes immobilisés à l'échelle industrielle. Il a été développé par la firme TANABE SEIYAKU sous l'impulsion des travaux de CHIBATA et TOSA en 1969.

Le principe de la réaction est présenté sur le schéma suivant :



La Société RHONE-POULENC commercialise une silice poreuse (sphérosil) qui se prête bien à la préparation de supports échangeurs d'ions. Il est possible, en particulier, d'immobiliser l'aminoacylase sur ce type de support (sphéroaminoacylase) par l'intermédiaire de groupes ammonium quaternaire ($-N^+(CH_3)_3, Cl^-$) portés par le sphérosil (sphérosil QMA).

2°) Etude expérimentale

L'influence d'un champ électrique sur la réaction d'immobilisation de l'aminoacylase sur sphérosil QMA a été étudiée à l'aide du montage expérimental présenté sur la figure 64. Le compartiment central contient 24g de support conditionné sous forme $-N^+(CH_3)_3, Cl^-$. Les compartiments extérieurs contiennent une solution aqueuse de K_2SO_4 $5,75 \cdot 10^{-4} M$.

La solution enzymatique contenant 0,5 % en poids d'enzyme ($40 cm^3$; P_i $10^{-3} M$, $pH = 7,0$; $25,0^\circ C$) est introduite sans recyclage au niveau du compartiment central.

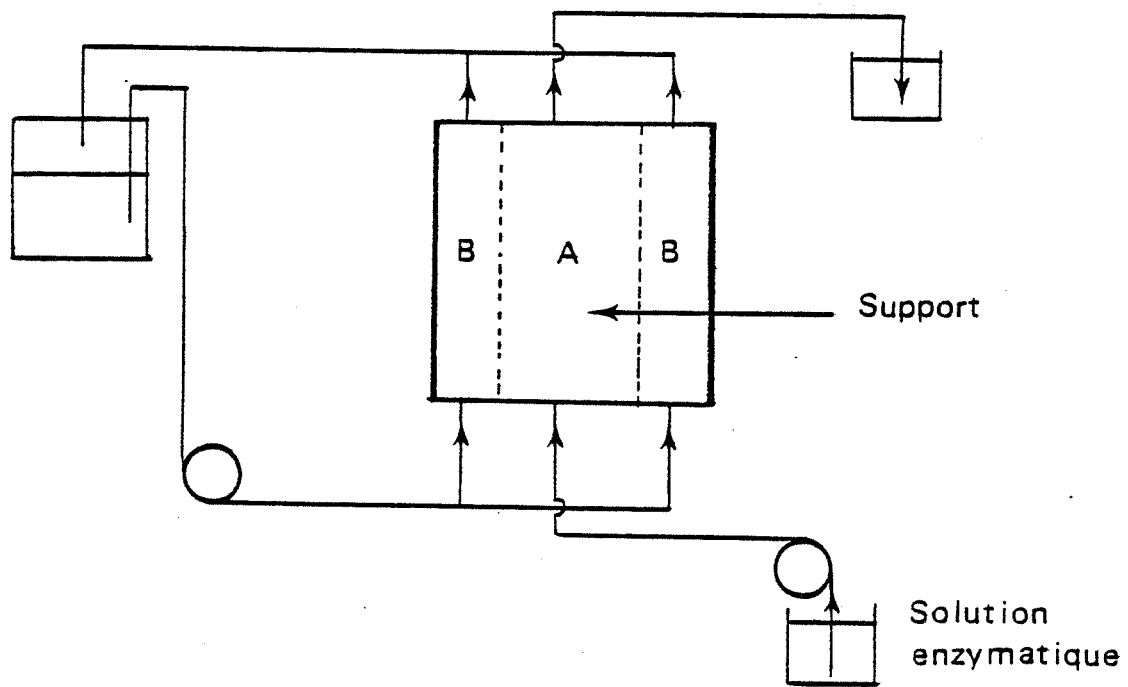


FIGURE 64 - Représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour l'étude de l'influence d'une densité de courant sur la réaction de fixation de l' amino-acylase sur support échangeur d'ions.

différence de potentiel appliquée (Volt)	nombre de manipulations	quantité d'aminocyclase initiale (unité)		activité de la sphéroaminocyclase (unité) (c)	quantité d'aminocyclase récupérée (unité) (d)
		(a)	(b)		
0	5	450		53	200
10	2	420		58	180
20	2	400		60	190
30	2	435		77	210
40	2	440		84	230
50	2	435		105	210
60	2	490		120	290

- (a) une unité est la quantité d'enzyme (ou de support) produisant une micromole d'acide acétique à partir d'acétyl-DL-méthionine par minute à pH 7 et à 25°C.
- (b) contenue dans les 40 cm³ de solution enzymatique avant passage dans la cellule.
- (c) contenue dans les 24g de support introduits dans la cellule.
- (d) contenue dans les 40 cm³ de solution enzymatique après passage dans la cellule et dans les eaux de rinçage.

TABLEAU 3

En fin de manipulation, les activités des différentes solutions enzymatiques (solutions initiale, finale et solution de rinçage) ainsi que l'activité de la sphéroaminoacylase obtenue sont déterminées par la technique du pH-stat à partir de la vitesse d'hydrolyse de l'acétyl D-L-méthionine en L-méthionine et acide acétique.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.

L'activité de la sphéroaminoacylase obtenue augmente lorsque la différence de potentiel appliquée aux bornes de la cellule augmente.

Cet effet peut avoir deux causes :

- la quantité d'enzyme immobilisé par gramme de support augmente
- pour une même quantité d'enzyme immobilisé par gramme de support, le complexe enzyme-sphérosil est plus actif.

Si l'on suppose qu'il n'y a pas de dénaturation de l'enzyme au cours de la réaction d'immobilisation, et que la quantité totale d'enzyme se répartit sans perte entre les différentes solutions et le support, la deuxième hypothèse semble être la plus probable.

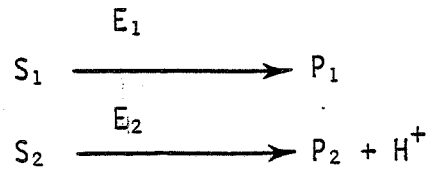
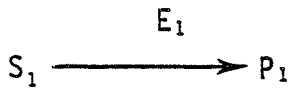
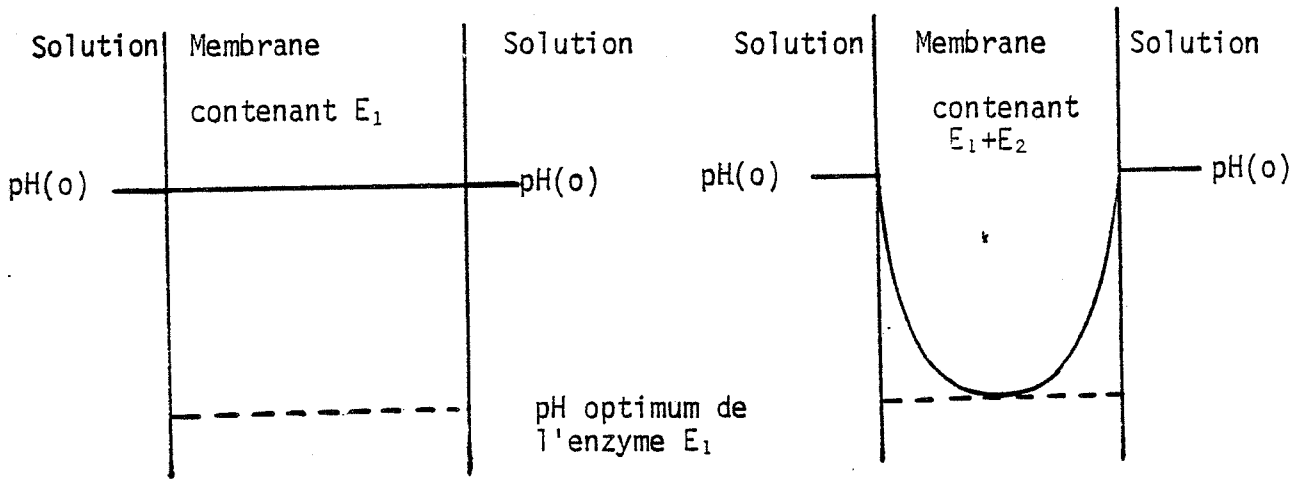
En absence d'étude plus approfondie, il est difficile d'avancer une explication de cet effet du champ électrique sur la réaction d'immobilisation.

IV - INFLUENCE DE LA CO-IMMOBILISATION DE GLUCOSE-OXYDASE SUR LA CINETIQUE d'HYDROLYSE DU LACTOSE PAR UNE LACTASE IMMOBILISEE

1°) Introduction

Les courbes théoriques et expérimentales (fig. 31a et 34a) qui montrent l'évolution du pH intramembranaire en fonction de la concentration en substrat, en absence de densité de courant et en milieu non tamponné font apparaître des gradients de pH élevés entre la membrane et la solution.

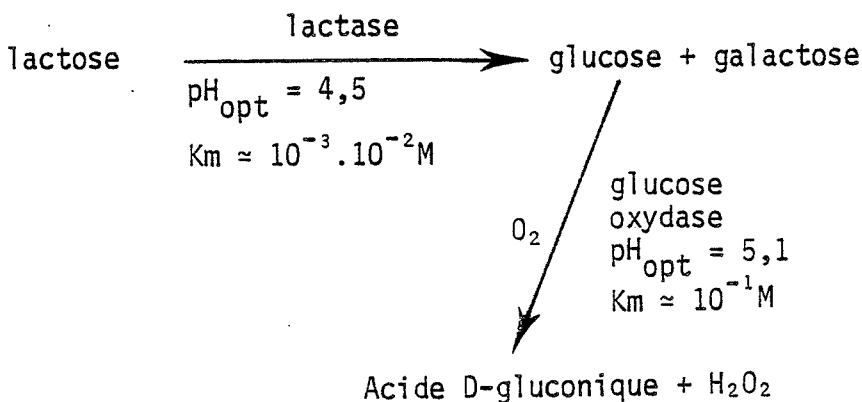
Il nous a semblé intéressant d'utiliser cette propriété pour décaler le pH au sein de la membrane vers le pH optimum de l'enzyme immobilisé sans modifier le pH de la solution de substrat, conformément au schéma ci-après.



Nous avons appliqué ce raisonnement au système lactose/lactase (E_1) en utilisant un second système enzymatique (E_2) glucose/glucose oxydase où l'un des produits de la première réaction enzymatique (le glucose) est le substrat de la réaction enzymatique 2.

L'étude du comportement cinétique de systèmes multienzymatiques immobilisés [ENGASSER et HISLAND - 1979] constitue, pour le génie enzymatique, la base du développement des réacteurs dits "de deuxième génération". L'étude théorique du couple lactase-glucose oxydase immobilisé a notamment été étudié par D. THOMAS [1971].

Le schéma réactionnel est le suivant :



La glucose oxydase contient des traces de catalase (800 U/mg) qui catalyse la décomposition de H_2O_2 . Pour que l'acide gluconique formé ($pK_a = 3,86$ à $25^\circ C$) à partir du glucose provoque l'établissement en milieu non tamponné d'un profil de pH, il faut qu'il existe au niveau de l'enzyme des contraintes de diffusion sur les produits de réaction.

2°) Etude expérimentale

Trois dérivés insolubles A, B et C pour lesquels le rapport glucose oxydase, lactase varie, ont été réalisés. Ils sont obtenus par enrobage de grains de silice ($\emptyset = 200\mu$) à l'aide d'un mélange enzyme-albumine réticulé par le glutaraldéhyde selon le mode opératoire décrit ci-dessous.

4 g de support sont introduits dans 3 cm^3 d'une solution (I) contenant :

- 1 ml solution aqueuse d'albumine à 17,5 % ;
- 1 ml d'eau permutée ;
- 1 ml solution aqueuse de lactase à $200\text{mg}/\text{cm}^3$ (4 unités/ μl) (Réf. 8/78 fournie par RHONE-POULENC) ;
- x μL d'une solution aqueuse de glucose oxydase (SIGMA - type II) contenant 4 unités par μL d'enzyme.

Pour le dérivé A	x = 0 μL
Pour le dérivé B	x = 10 μL
Pour le dérivé C	x = 20 μL

Au bout d'une heure, ces grains de support imbibés de la solution (I) sont séparés et plongés pendant 10 min. dans 40 cm^3 d'une solution agitée de glutaraldéhyde à 12,5 % contenant du tampon phosphate 0,12M; pH 7,0.

Les supports obtenus (A, B, C) se caractérisent par un film protéique enrobant le grain de silice ($\emptyset \approx 250\mu$).

Le schéma de principe du montage expérimental utilisé est présenté sur la figure 65. La colonne contient 900 mg de support et est traversée par une solution de lactose (40 g/L) non tamponnée circulant avec un débit de $120\text{ cm}^3/\text{heure}$. Elle est assimilable à un microréacteur à lit fixe et à flux ascendant.

Le pH de la solution est maintenu constant (pH = 7) par un dispositif pH-stat qui permet également de déterminer la vitesse de production d'acide gluconique.

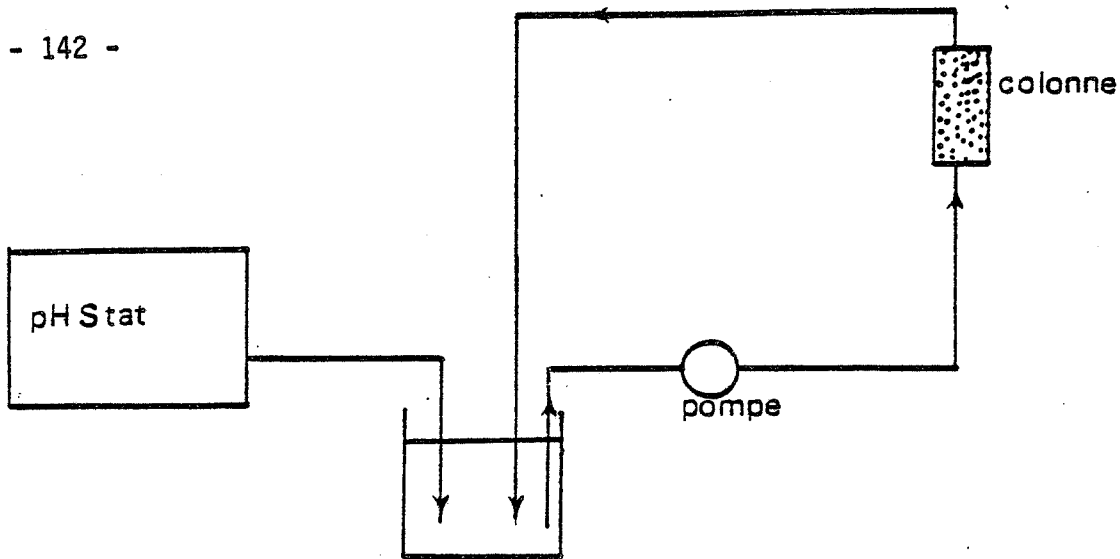


FIGURE 65 - Représentation schématique du dispositif expérimental utilisé pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse enzymatique du lactose par la lactase immobilisée.

	Sphérolactase	Dérivé A	Dérivé B	Dérivé C
glucose oxydase X100 Lactase (a)	0	0	1 %	2 %
vitesse production acide gluconique mole/heure/gramme	0	0	$1,1 \cdot 10^{-5}$ (b)	$3 \cdot 10^{-5}$ (b)
vitesse production glucose mole/heure/gramme	$0,97 \cdot 10^{-4}$ (b)	$1,5 \cdot 10^{-4}$ (b)	$2,5 \cdot 10^{-4}$ (b)	$4,33 \cdot 10^{-4}$ (b)
pH de la solution de substrat après le réacteur	7,0	7,0	6,35	6,10

(a) déterminé par le rapport du nombre d'unités de glucose oxydase au nombre d'unités de lactase dans la solution I.

(b) les vitesses de réaction sont déterminées à 25°C, pour une solution de lactose (40g/litre) en milieu non tamponné, pour un pH maintenu constant (pH-stat) et égal à 7,0.

Des prélèvements successifs (1-2 cm³) sont effectués. Le glucose contenu dans ces échantillons est transformé en acide D-gluconique par la glucose oxydase puis dosé par la technique du pH-stat par une solution de soude 10⁻¹M.

La figure 66 représente l'évolution de la quantité de glucose formé en fonction du temps, pour les trois dérivés insolubles A, B et C. Le tableau 4 résume les vitesses de production de glucose et d'acide gluconique obtenues pour les différents types de support.

- La présence de glucose oxydase co-immobilisée se traduit par une augmentation de la vitesse d'hydrolyse du lactose.

- La quantité d'acide gluconique formé reste faible devant la quantité de glucose (B : 4,5 % ; C : 7 %).

L'augmentation d'activité des supports B et C par rapport au support A est attribuable à deux effets :

- Création d'un gradient de pH au sein de la particule de support par suite de la formation d'acide D-gluconique. Le pH optimum de la lactase se situant vers 4,5 et le pH de la solution de substrat étant proche de 7, ceci se traduit par une augmentation de l'activité de la lactase.

- Diminution du pH de la solution de substrat au cours de sa progression au sein du lit de support par suite de la production d'acide gluconique. Cette variation du pH reste cependant faible (Tableau 4).

De manière à mieux visualiser le gradient de pH au sein de la particule, nous avons réalisé une électrode enzymatique obtenue par coréticulation d'albumine, de lactase (40 unités) et de glucose oxydase (0,8 unité) suivant le mode opératoire décrit dans l'annexe 2. La réponse de l'électrode en fonction du temps pour différentes valeurs de la concentration en lactose est présentée sur la figure 67.

La présence de glucose oxydase se traduit par une diminution du pH intramembranaire. Celui-ci tend vers 4,65 pour une concentration en lactose de 40 g/litre et pour un rapport glucose oxydase/lactase de 2 %. Ce rapport correspond à la composition du dérivé C précédemment étudié.

La présence d'un gradient de pH important entre la solution de substrat (pH(o) = 7) et la particule contenant le système enzymatique immobilisé (pH(e/2) = 4,65) se traduit par une augmentation de l'activité enzymatique (Fig. 66) par l'intermédiaire de la pH-dépendance du Vm de la lactase (pH optimum ≈ 4,5).

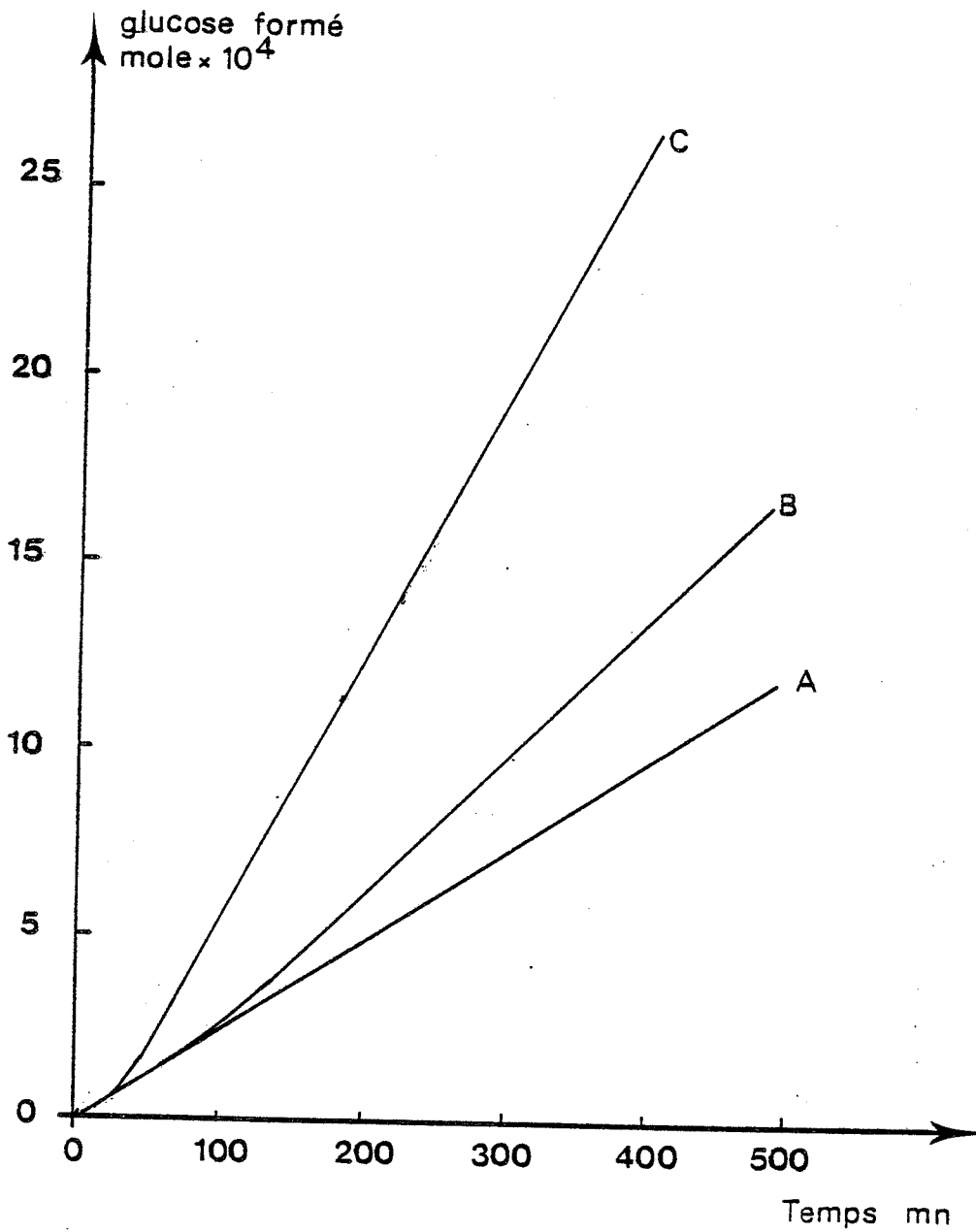


FIGURE 66 - Quantité de glucose formé (mole) en fonction de temps pour trois dérivés insolubles de la lactase pour lesquels le rapport glucose-oxydase/lactase varie : A, 0 % ; B, 1 % ; C, 2 %.

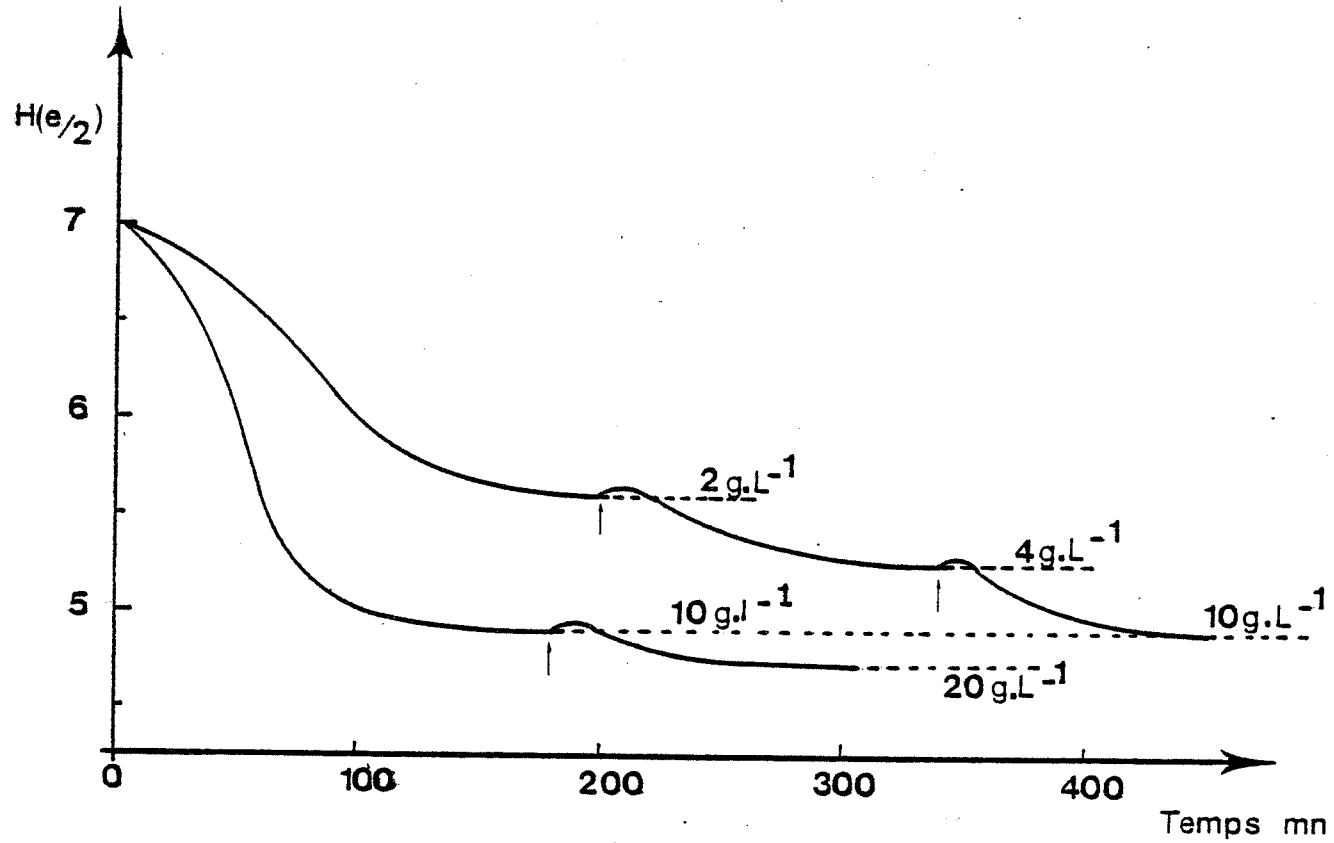


FIGURE 67 - Variation en fonction du temps, du pH à l'interface membrane/électrode obtenue en milieu non tamponné pour différentes valeurs de la concentration en lactose avec une électrode pH enrobée d'une membrane contenant de la lactase immobilisée et 2 % de glucose oxydase.

V - CONCLUSIONS

L'ensemble des études expérimentales présentées dans ce chapitre à caractère purement prospectif, permet de dégager un certain nombre de résultats.

L'immobilisation d'aminocyclase sur support échangeur d'ions (sphérosil QMA) en présence d'un champ électrique externe continu, fait apparaître une modification de l'activité du support enzymatique obtenu. Des études complémentaires devraient permettre de déterminer l'origine et la nature de cette modification, ainsi que ses limites.

L'étude du couple glucose oxydase/lactase immobilisé a permis de mettre en évidence l'augmentation de l'activité de la lactase consécutive à la co-immobilisation de glucose oxydase. Lorsque, dans un procédé industriel, il est impossible ou coûteux, d'ajuster par adjonction d'acide ou de base, le pH de la solution de substrat au pH de fonctionnement optimum de l'enzyme immobilisé, cette méthode peut se révéler avantageuse. Notamment en industrie agro-alimentaire, la mise en pH trop acide ou basique du milieu peut conduire à une dégradation des substances fragiles pouvant nuire à la qualité du produit alimentaire.

CONCLUSIONS

Dans le cadre des biotechnologies, nous avons étudié un certain nombre de points susceptibles de contribuer au développement du génie enzymatique.

L'utilisation d'enzymes immobilisés à des fins analytiques nous a permis de réaliser un capteur enzymatique dont le principe, basé sur la variation d'enthalpie de la réaction catalysée, offre l'intérêt d'être commun à la majorité des réactions enzymatiques. Malgré un seuil de détection encore limité, il présente l'avantage d'être facilement mis en oeuvre, d'avoir un faible prix de revient, ainsi qu'un temps de réponse très faible et enfin, d'être peu sensible aux inhibiteurs.

L'utilisation d'un champ électrique externe a permis d'augmenter l'activité d'enzymes immobilisés dans une membrane artificielle. Les systèmes suivants ont été étudiés :

- le système urée/uréase qui fait intervenir un substrat non ionique et des produits de réaction conduisant à la formation d'espèces chargées .

- le système acétylcholine/acétylcholinestérase qui fait intervenir à la fois un substrat ionique et des produits de réaction ioniques (choline et ion acétate).

Dans l'étude du comportement cinétique du système urée/uréase, la mise au point d'un modèle prenant en compte les phénomènes de diffusion-réaction-électromigration des espèces ioniques au sein de la membrane a permis de comprendre les modifications d'activité observées expérimentalement. Ce modèle, étendu au système acétylcholine/acétylcholinestérase confirme la possibilité de moduler la vitesse de réaction par application d'un champ électrique.

Le couplage des propriétés électrophorétiques du courant électrique avec la remarquable spécificité des enzymes immobilisés constitue un domaine riche de possibilités. Il semble en particulier possible de concevoir un réacteur enzymatique assurant simultanément la synthèse d'une espèce chimique et sa séparation du milieu réactionnel. Le champ électrique serait alors susceptible

d'une part d'augmenter la cinétique de réaction et d'autre part de permettre la séparation des espèces de signes opposés. Le choix de systèmes enzymatiques satisfaisants aux exigences d'un tel réacteur ainsi que l'étude théorique et expérimentale de son fonctionnement constituent une voie de recherche très intéressante.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons appliqué nos résultats à des systèmes enzymatiques présentant un intérêt industriel. Dans la fabrication de L-méthionine, nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité de l'aminocyclase, immobilisée en présence d'un champ électrique, sur support échangeur d'ions.

Ces résultats laissent entrevoir d'intéressantes et multiples possibilités, issues de l'association du champ électrique et du comportement cinétique des enzymes, en particulier en phase hétérogène.

ANNEXES



ANNEXE 1

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA VARIATION DES PARAMETRES CINETIQUES V_m ET K_m EN FONCTION DU pH POUR L'UREASE ET L'ACETYLCHOLINESTERASE

Les deux enzymes utilisés pour l'étude de l'influence d'une densité de courant sur le comportement cinétique de l'uréase et de l'acétylcholinestérase en milieu hétérogène ont fait l'objet d'une étude préalable pour déterminer les fonctions de pH-dépendance de V_m et K_m introduites dans le modèle.

I - SYSTEME UREE/UREASE

Pour une valeur donnée du pH de la solution de substrat, la vitesse de consommation d'urée (v) est étudiée en fonction de la concentration en substrat (C_s). Les vitesses de réaction sont déterminées par la technique du pH-stat en utilisant les équations 35.

La détermination des valeurs de V_m^{pH} et K_m^{pH} est réalisée par la méthode de Lineveawer-Burk en traçant $1/v = f(1/C_s)$.

Une unité théorique d'uréase (SIGMA ; type IX ; 5,1 Unités Sigma/mg) est dissoute dans 50 cm³ d'une solution de K₂SO₄ (10⁻²M) thermorégulée à 25,0 ± 0,1°C.

Le pH de cette solution enzymatique est ajusté à la valeur désirée (5,00 ≤ pH ≤ 9,00) par adjonction d'une solution d'acide (H₂SO₄ 10⁻¹N) ou de base (NaOH 10⁻²N). La concentration de substrat désirée est obtenue par adjonction d'une solution d'urée molaire à l'aide d'une microburette (Gilmont réf. 53200 A). Pour chaque valeur de la concentration en substrat, la vitesse de réaction est déterminée à l'aide du pH-stat.

La figure 4 représentant l'évolution de $V_m^{\text{pH}^\circ}$ et $K_m^{\text{pH}^\circ}$ a été donnée précédemment (Chap. I).

Les valeurs de V_m° et K_m° sont :

$$V_m^\circ = 1,08 \cdot 10^{-4} \text{ mole dm}^{-3} \cdot \text{mn}^{-1}$$

$$K_m^\circ = 3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mole dm}^{-3}$$

à pH(0) = 7,0, pour 1 unité d'uréase à 25°C.

Ces variations de V_m et K_m sont analogues à celles observées dans la littérature [MIDDLEMAN et BOLLMEIER - 1979].

II - SYSTEME ACETYLCHOLINE/AChE

La démarche expérimentale est la même que celle précédemment décrite pour l'étude du système urée/uréase. La détermination de la vitesse de réaction se fait par l'intermédiaire de l'équation (38). Deux unités théoriques d'enzyme sont utilisées (SIGMA, type VI-S- 490 unités/mg). La concentration de substrat varie entre $5 \cdot 10^{-5} M$ et $3 \cdot 10^{-3} M$, le titrant est une solution de soude $10^{-1} N$.

L'une des caractéristiques du système étudié est de donner lieu à une réaction d'autohydrolyse [GUYONNET - 1978] particulièrement sensible pour des valeurs de pH supérieures à 7,50 et se superposant à la réaction enzymatique. Il a été par conséquent nécessaire de déterminer pour chaque valeur du pH la vitesse d'autohydrolyse du substrat en fonction de la concentration en substrat et en absence d'enzyme.

La précision des mesures ne nous a pas permis de déterminer précisément les valeurs de K_m^{pH} . En conséquence, nous n'avons pas obtenu de courbe donnant la variation de $K_m^{\text{pH}}/K_m^{\circ}$ en fonction du pH.

La figure (7) représentant l'évolution de $V_m^{\text{pH}}/V_m^{\circ}$ en fonction du pH a été donnée précédemment (chap. I).

La valeur de V_m° est :

$$V_m^{\circ} = 2,24 \cdot 10^{-5} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{mn}^{-1}$$

à $\text{pH}(\circ) = 8,25$ pour deux unités théoriques d'enzyme à $25^{\circ}C$.

La valeur de K_m° introduite dans le modèle est :

$$K_m^{\circ} = 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{dm}^{-3}$$

avec $K_m^{\text{pH}}/K_m^{\circ} = 1$ pour $4 \leq \text{pH} \leq 9$.

ANNEXE 2

CARACTERISTIQUES ET DEFINITIONS RELATIVES AUX ENZYMES UTILISES DANS CE TRAVAIL MODE OPERATOIRE POUR LA REALISATION DES MEMBRANES ENZYMATIQUES

Catalase E.C. 1.11.1.6

Une unité de catalase décompose $1,0\mu$ mole de H_2O_2 par minute, à pH 7,0 et à $25^\circ C$, la concentration de H_2O_2 variant de $10,3$ à $9,2\mu$ mole/ cm^3 de solution.

Glucose oxydase E.C. 1.1.3.4

Une unité de glucose oxydase oxyde $1,0\mu$ mole de β -D-glucose en acide D-gluconique et H_2O_2 par minute, à pH 5,1 et à $35^\circ C$.

Uréase E.C. 3.5.1.5.

Une unité Sigma d'uréase libère 1 mg d'azote ammoniacal en 5 minutes, à pH 7,0 et à $30^\circ C$ et correspond à 11,4 Unités Internationales.

Acétylcholinestérase E.C. 3.1.1.7

Une unité hydrolyse $1,0\mu$ mole d'acétylcholine en choline et acétate par minute, à pH 8,0 et à $37^\circ C$.

1°) Réalisation des thermistances utilisant un enzyme immobilisé

L'enzyme est dissous dans $200\mu L$ d'une solution aqueuse d'albumine humaine à 17,5 %. $40\mu L$ d'une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 12,5 % (Pi, 0,05M ; pH = 7) sont ajoutés et la solution est agitée manuellement pendant quelques secondes. Une goutte de cette solution (≈ 20 mg) est déposée sur l'élément sensible de la thermistance. L'ensemble est laissé 15 mn à température ambiante pour que la réaction de coréticulation s'effectue. Le capuchon de verre est placé et le capteur ainsi obtenu est conservé à température ambiante dans une solution de tampon phosphate 0,1M ; pH = 7.

2°) Réalisation des membranes utilisées pour l'étude de l'influence d'une densité de courant sur le comportement cinétique de l'uréase et de l'acétylcholinestérase immobilisées

La quantité adéquate d'enzyme (Uréase, ≈ 2500 I.U. ; Acétylcholinestérase, ≈ 4000 I.U.) est dissoute dans 2 mL d'une solution d'albumine humaine à 17,5 %. 0,4 mL d'une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 12,5 % (Pi ; 0,05M ; pH = 7) sont ajoutés et la solution est agitée pendant quelques secondes. Une partie de cette solution est déposée sur une toile nylon (45 x 65 x 0,2 mm) placée sur une plaque de verre et l'ensemble est laissé 15 minutes à température ambiante pour permettre la coréticulation. L'épaisseur de la membrane ainsi obtenue est de 1 mm. Elle est plongée dans une solution de tampon phosphate pH 7,0 ; 0,1M avant son insertion dans la cellule.

3°) Réalisation des électrodes enzymatiques

La réalisation de la solution albumine-enzyme-glutaraldéhyde est la même que celle décrite précédemment. L'électrode de verre (Metrohm. Réf. 6.0203.000) est plongée dans cette solution puis retirée rapidement. Un film protéique enrobe l'élément sensible de l'électrode. Celle-ci est manuellement mise en rotation autour de son axe jusqu'à la prise en masse du film de manière à assurer une homogénéité de l'épaisseur de la membrane. L'électrode est ensuite conservée dans une solution de tampon phosphate pH 7,0 ; 0,1M.

BIBLIOGRAPHIE



BIBLIOGRAPHIE

- A -

- ANFALT, T., GRANELI, A. et JAGNER D. Anal. Letters, 6, 969, 1973
- ATKINSON B., ROTT, J. et ROUSSEAU, I. Biotechnol. Bioeng., 19, 1037, 1977

- B -

- BARBOTIN, J.N., DAVID, A., HERGAVAUULT, J.F., ROMETTE, J.L. et THOMAS, D. Coll. CNRS n° 258, Ech. Ion. Transmemb. 1979
- BEAUX, J. Thèse, Grenoble, 1983
- BEAUX, J. et TRAN-MINH, C. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 288, série C - 545, 1979
- BEEZER, A.E. et STUBBS, C.D. Talanta, 20, 27, 1973
- BEEZER, A.E. Thermochemica Acta, 7, 241, 1973
- BEEZER, A.E., STEENSON, T.I. et TYRELL, H.V. Talanta, 21, 467, 1974
- BEREZIN, I.V., VARFOLOMEEV, S.D. et LOMONOSOV, M.V. Enz. Eng., 5, 95, 1980
- BOUGNOL, V. Thèse, Saint-Etienne, n° 6 C.I., 1976
- BOURDILLON, C. et THOMAS D. FEBS Lett., 52, 483, 1979
- BROUN G.B. et TRAN-MINH, C. "Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins", Vol. 1, Plenum Press, 1977

- C -

- CARR, P.W. et BOWERS, L.D. "Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry", Vol. 56, John Willey, 1980
- CHAY, T.R. J. Théor. Biol., 80, 83, 1979
- CHAY, T.R. Biophys. J., 30, 99, 1980
- CLOUS, P. Rapport interne - 1979
- COONEY, C.L., WEAVER, J.C., TANNENBAUM, S.R., FALLER D.V. et SHIELDS, A. "Enzyme Engineering", Vol. 2, Plenum Press, 1974

- D -

- DANIELSSON, B., GADD, K., MATTIASSON, B. et MOSBACH, K. Anal. Lett., 9, 987, 1976
- DANIELSSON, B., GADD, K., MATTIASSON, B. et MOSBACH, K. Clin. Chim. Acta, 163, 1977
- DANIELSSON, B., MATTIASSON, B., KARLSSON, R. et WINQUIST, F. Biotechnol. Bioeng., 21, 1749, 1979
- DANIELSSON, B., RIEKE, E., MATTIASSON, B., WINQUIST F. et MOSBACH, K. Appl. Biochem. Biotechnol., 6, 207, 1981
- DAVID, A. Thèse, Rouen, 1973
- De SIMONE, J.A. J. Théor. Biol., 68, 225, 1977
- DIXON, M. et WEBB, E.C. "Enzymes", Longman, 1958

- E -

- ENGASSER, J.M. et HORVATH, C. J. Théor. Biol., 42, 137, 1973
ENGASSER, J.M. et HISLAND, P. J. Théor. Biol., 77, 427, 1979

- F -

- FRIBOULET, A., DAVID, A. et THOMAS, D. J. Memb. Sc., 8, 33, 1981
FRINGELI, U.P. et HOFER, P. Neurochem. Internat., 2, 185, 1980
FULTON, S.P., COONEY, C.L. et WEAVER, J.C. Anal. Chem., 52, 505, 1980

- G -

- GOLDSTEIN, L., LEVIN, Y. et KATCHALSKI, E. Biochem., 3 (12), 1913, 1964
GREGORY, R.B. et KINDERLERER, J. Int. J. Bio-Médical Computing, 11, 53, 1980
GUILBAULT, G.G., SMITH, R.K. et MONTALVO, J.G. Anal. Chem., 41, 600, 1969
GUILBAULT, G.G. et HRABANKOVA, E. Anal. Chem., 42, 1779, 1970
GUILBAULT, G.G. et MONTALVO, J.G. J. Am. Chem. Soc., 92, 2533, 1970(a)
GUILBAULT, G.G. et MONTALVO, J.G. Anal. Lett., 2, 289, 1970(b)
GUILBAULT, G.G. et SHU, F.R. Anal. Chem., 44, 2161, 1972
GUILBAULT, G.G. "Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides", Vol. 1, 293, Ed. WEETALL, H.H., Marcel Dekker Inc., 1975
GUTCHO, S.J. "Immobilized Enzymes, Preparations and Engineering Techniques", Noyes Data Corporation, 1974
GUYONNET, R. Thèse, Lyon, n° 805, 1978

H

- HAMILTON, B.K., STOCKMEYER, L.J.
et COLTON, C.K. J. Théor. Biol., 41, 547, 1973
- HAMILTON, B.K., GARDNER, C.R. et
COLTON, C.K. AIChE J., 20 (3), 503, 1974
- HENRI, V. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 142, 97, 1906
- HICKS, G.P. et UPDIKE, S.K. Anal. Chem., 38, 726, 1966
- HOPWOOD, D. Histochem., 17, 151, 1969
- HOPWOOD, D. Histochem., 24, 50, 1970(a)
- HOPWOOD, D. Histochem. J., 3, 201, 1970(b)
- HOPWOOD, D., ALLEN, C.R. et
Mc CABE, M. Histochem. J., 2, 137, 1970
- HORNBY, W.E., LILLY, M.D. et
CROOK, E.M. Biochem. J., 107, 669, 1968
- HORVATH, C. et ENGASSER, J.M. Biotechnol. Bioeng., 16, 909, 1974

J

- JOHANSSON, A., MATTIASSON, B.,
et MOSBACH, K. Methods Enzymol., 659, 1976

K

- KALTHOD, D.G. et RUCKENSTEIN, E. Biotechnol. Bioeng., 24, 2189, 1982(a)
- KALTHOD, D.G. et RUCKENSTEIN, E. Biotechnol. Bioeng., 24, 2357, 1982(b)
- KARUBE, I., YUGETA, Y. et
SUZUKI, S. Biotechnol. Bioeng., 19, 1493, 1977

- KASCHE, V. et BUCHOLZ, K. Dechema Monogr., 84, 208, 1979
- KERNEVEZ, J.P., MURARAY, J.D.,
JOLY, G., DUBAN, M.C. et THOMAS D. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 287, série A-961,
1978
- KOBAYASHI, T. et LAIDLER, K.J. Biotechnol. Bioeng., 16, 77, 1974
- KUBO, M., KARUBE, I. et SUZUKI, S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 69(3),
731, 1976

- L -

- LAIDLER, K.J. et BUNTING, P.S. "The Chemical Kinetics of Enzyme Action",
Clarendon Press, 1973
- LAIDLER, K.J. et PETERMAN, B.F. Methods in Enzymology 63(10), 234, 1979

- M -

- MARC, A. et ENGASSER, J.M. J. Théor. Biol., 94, 179, 1982
- MATTIASSON, B. FEBS Letters, 77, 107, 1977
- MATTIASSON, B., BORREBAECK, C.,
SANFRIDSON, B. et MOSBACH, K. Biochim. Biophys. Acta, 483, 221, 1977(a)
- MATTIASSON, B., MOSBACH, K. et
SVENSON, A. Biotechnol. Bioeng., 19, 1643, 1977(b)
- MATTIASSON, B. et BORREBAECK, C. FEBS Lett., 85, 119, 1978
- MATTIASSON, B., DANIELSSON, B.,
HERMANSSON, C. et MOSBACH, K. FEBS Lett., 85, 203, 1978
- MIDDLEMAN, S. et BOLLMEIER, J.P. Biotechnol. Bioeng., 21, 2303, 1979
- MONK, P. et WADSÖ, I. Acta Chem. Scand., 23(1), 3, 1969
- MOSBACH, K., DANIELSSON, B. et
MATTIASSON, B. 578th meeting, Galway, vol. 7, 11, 1979

_ N _

NEYRET, C.

Rapport interne, 1980

_ O _

OSIPOV, I.V. et VARFOLOMEEV, S.D.

Enz. Eng., 5, 119, 1980

_ P _

PENNINGTON, S.N.

Natl. Sci. Found. Res. Appl. Natl. Needs,
124, 1975

PENNLIN, J.A., ROSENBAUM, J.S.,
De SIMONE, J.A. et MIKULECKY, D.C.

Mathem. Bio Sci., 37, 1, 1977

_ R _

REHAK, N.N., EVERSE, J., KAPLAN, N.O.
et BERGER, R.L.

Anal. Biochem., 70, 381, 1976

_ S _

SAIFER N. et PALO, R.

Anal. Biochem., 27(1), 1, 1969

SELEGNY, E., VINCENT, J.C.,
STONER, G. et DEMARTY, M.

C.R. Acad. Sc. Paris, t. 285, série D-117,
1977

- SELEGNY, E. et VINCENT, J.C. J. Chim. Phys., 77 (11/12), 1083, 1980
- SELEGNY, E., VALLETON, J.M. et VINCENT, J.C. Bioelectrochem. Bioenerg., sous presse, 1983
- SETO, Y.J. et HSIEH, S.T. Biotechnol. Bioeng., 18, 813, 1976
- SETO, Y.J. et HSIEH, S.T. Biotechnol. Bioeng., 20, 455, 1978
- SHULER, M.L., ARIS, R. et TSUCHIYA, H.M. J. Theor. Biol., 35, 67, 1972
- SUN, S.F. Arch. Biochem. Biophys., 129(2), 411, 1969
- SUN, S.F. Biochim. Biophys. Acta, 20(3), 434, 1970
- SUNDARAM, P.V. J. Solid-Phase Biochem., 3(3), 241, 1978

- T -

- THOMAS, D. Thèse, Rouen, 1971
- THOMAS, D. "Analysis and Control of Immobilized Enzyme Systems", 115, Ed. THOMAS, D et KERNEVEZ, J.P., North Holland Publishing Company, 1976
- TIPTON, K.F. et DIXON, H.B.F. "Methods in Enzymology", Vol. 63, Acad. Press, 1979
- TRAN-MINH, C., BERJONNEAU, A.M. et BROUN, G. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 275, série D-121, 1972(a)
- TRAN-MINH, C., SELEGNY, E. et BROUN, G. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 275, série C-309, 1972(b)
- TRAN-MINH, C. et BROUN, G. C.R. Acad. Sc. Paris; t. 276, série D-2215, 1973
- TRAN-MINH, C. et BROUN, G. Anal. Chem., 47 (8), 1359, 1975
- TRAN-MINH, C., BOUGNOL-BILHOU, V. et LANCELOT, F. Dechema 6th European Symp.-Heidelberg, III, 125, 1976
- TRAN-MINH, C. et VALLIN D. Anal. Chem., 50 (13), 1874, 1978
- TRAN-MINH, C. et BEAUX J. Anal. Chem., 51(1), 91, 1979

- U -

- UPDIKE, S.J. et HICKS, G.P. Nature (London), 214, 936, 1967(a)
UPDIKE, S.J. et HICKS, G.P. Science, 270, 158, 1967(b)

- V -

- VALLETON, J.M. Thèse, Rouen, 1980
VALLETON, J.M., VINCENT, J.C. et SELEGNY, E. Biophys. Chem., 15, 235, 1982
VALLETON, J.M. Thèse, Rouen, 1984.
VALLETON, J.M., VINCENT, J.C. et SELEGNY, E. Soumis à publication
VALLIN D. et TRAN-MINH, C. Biochim. Biophys. Acta, 571, 321, 1979
VALLIN D., HUGUET, J. et VERT, M. Polym. J., 12 (2), 113, 1980(a)
VALLIN D., HUGUET, J. et VERT, M. "Polymeric Amines and Ammonium Salts", Ed. GOETHALS, E.J., Pergamon Press, 1980(b)
VARFOLOMEEV, S.D. et BEREZIN, I.V. J. Mol. Catal., 4 (6), 387, 1978
VINCENT, J.C. et SELEGNY, E. C.A. Acad. Sc. Paris, t. 292, série 3-173, 1981

- W -

- WEAVER, J.C., COONEY, C.L., FULTON, S.P., SCHULER, P. et TANNENBAUM, S.R. Biochim. Biophys. Acta, 452, 285, 1976
WEETAL, H.H. "Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides", Vol. 1, Ed. WEETALL, H.H., Marcel Dekker, 1975.

Y

YOSHIOKA, A., WATANABE, H.,
KIKUCHI, K. et FUJIMORI, M.

Science Pap. Coll. Gén. Educ. Univ.
Tokyo, 29(2), 139, 1979

YOURTEE, D.M., BROWN, H.D. et EVANS,
W.J.

Anal. Lett., 8(1), 41, 1975

RESUME

Un certain nombre de facteurs limite aujourd'hui le développement de procédés industriels utilisant la catalyse enzymatique en phase hétérogène. Leur étude a permis la compréhension des systèmes mettant en jeu le transfert de chaleur et de matière en présence d'un champ électrique imposé.

Ce travail trouve des applications pratiques et industrielles notamment :

- la réalisation d'un capteur enzymatique qui utilise la variation d'enthalpie de la réaction enzymatique comme grandeur mesurable.

- l'optimisation de l'activité catalytique d'une membrane artificielle contenant un enzyme immobilisé, par application d'un gradient de potentiel électrique externe.

MOTS-CLES :

Enzyme immobilisé - Cinétique hétérogène - Modélisation biologique -
Champ électrique - Activité enzymatique - Cinétique enzymatique -
Capteur enthalpimétrique - Transfert de chaleur - Transfert de matière.