

50376
1975
65

50376
1975
65

N° d'ordre : 91

THESE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
SPECIALITE: SCIENCES NATURELLES

par

Francis ROSILLON



ETUDE DE L'ACTIVITE UREASIQUE DE PROTEUS morganii EMPRISONNE DANS UN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Soutenue le 3 octobre 1975, devant la commission d'examen

Membres du jury : MM. Professeur J. GUILLAUME Président
Professeur E.J. BONNOT
Professeur J. KREMBEL
Docteur Y. MOSCHETTO
Professeur H. POINT



0300132862

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à Monsieur le Professeur J. GUILLAUME qui a eu l'amabilité de nous accepter au sein de l'Unité de Microbiologie et de Technologie Alimentaire de l'Institut Pasteur au C.E.R.T.I.A.* Nous lui devons d'avoir pu réaliser cette étude. Par ses nombreux conseils, il a suivi l'évolution de ce travail combien intéressant.

A Monsieur le Professeur E. J. BONNOT, qu'il veuille bien trouver ici l'hommage de toute notre reconnaissance.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Monsieur Y. MOSCHETTO, Directeur du centre de Technologie Biomédicale de Lille ainsi qu'à Monsieur J. KREMBEL, Professeur de Chimie Biologique, qui ont accepté de juger cette thèse.

Nous témoignons de notre profonde sympathie à Monsieur le Professeur H. POINT tout en le remerciant pour l'enseignement reçu.

Notre gratitude s'adresse également à tous ceux qui nous ont aidé amicalement,
à Monsieur B. PLICHON,
à Monsieur WERQUIN,
à tout le personnel du laboratoire de Technologie Alimentaire et spécialement à Madame N. THOMAS et à Monsieur A. DECO pour leur collaboration technique.

Nous remercions le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille qui nous a fourni les échantillons de sérum nécessaire à l'application de notre méthode.

*C.E.R.T.I.A. : Centre d'Etudes et de Recherches Technologiques des Industries Alimentaires.

table des matières

	pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : DE LA PREPARATION DES ENZYMES INSOLUBILISEES	4
1.1. Rappel des principales techniques d'insolubilisation	5
1.1.1. Insolubilisation par adsorption physique	5
1.1.2. Insolubilisation par inclusion dans un gel insoluble	5
1.1.3. Insolubilisation par liaison covalente de la protéine à un support convenable insoluble dans l'eau	6
1.1.4. Insolubilisation par fixation sur un polymère au moyen d'un agent de réticulation bifonctionnel	6
1.2. Influence du processus d'insolubilisation sur l'activité enzymatique	6
1.3. Immobilisation des cellules	8
CHAPITRE 2 : PRESENTATION DE L'UREASE	10
2.1. Généralités	11
2.1.1. Mise en évidence et purification	11
2.1.2. Propriétés moléculaires	13
2.1.2.1. Détermination du poids moléculaire	13
2.1.2.2. Autres propriétés physiques	13
2.1.2.3. Composition chimique	14
2.1.2.4. Propriétés immunologiques	15
2.1.3. Etude du processus enzymatique	15
2.1.3.1. Mécanisme de réaction	15
2.1.3.2. Spécificité du substrat	16

2.1.3.3. Etude cinétique	16
2.1.3.4. Etude du site actif	18
2.2. Dérivés insolubles d'uréase	19
2.2.1. Préparation et propriétés de dérivés d'uréase insolubles dans l'eau	19
2.2.2. Electrode spécifique pour le dosage enzymatique de l'urée	20
2.2.3. Microcapsules d'uréase	21
2.2.4. De l'application des dérivés insolubles d'uréase	21
2.3. L'uréase bactérienne	22
 CHAPITRE 3 : CHOIX ET ETUDE DE PROTEUS morganii	 24
3.1. Choix de la souche	25
3.1.1. Choix du genre Proteus d'après la littérature	25
3.1.2. Essais relatifs à la détermination de l'espèce Proteus morganii	26
3.1.2.1. Vérification qualitative de la présence d'uréase	26
3.1.2.2. Etude enzymatique comparative	27
3.1.2.3. Conclusion	28
3.2. Etude de l'activité uréasique chez Proteus morganii	30
3.2.1. Traitement mutagène par les U.V.	31
3.2.1.1. Théorie - Principe	31
3.2.1.2. Technique	31
3.2.1.3. Résultats	34
3.2.2. Détermination des conditions de culture	34
3.2.2.1. Conservation des cellules après mutation	34
3.2.2.2. Choix d'un milieu de culture fournissant une grande quantité de cellules	34
3.2.2.2.1. Culture sur milieux exempts d'urée	35

3.2.2.2.2. Culture sur milieux contenant de l'urée	38
3.2.2.3. Culture du milieu SP ₂ $\frac{3}{4}$ glucosé en fermenteur	43
3.2.2.4. Mode d'expression de la concentration en cellules	47
3.2.3. Etude de l'activité uréasique des cellules en suspension libre	49
3.2.3.1. Matériel et méthodes	49
3.2.3.2. Etude du rapport cellules/substrat	55
3.2.3.3. Etude des conditions optimales d'hydrolyse	55
3.2.3.3.1. Etude du pH	55
3.2.3.3.2. Etude de la température	57
3.2.3.3.3. Conclusion	57
3.2.3.4. Détermination de la constante de Michaëlis - Menten	59
 CHAPITRE 4 : ETUDE ENZYMATIQUE DES CELLULES IMMOBILISEES	 61
4.1. Procédé d'immobilisation des cellules dans le gel de polyacrylamide	62
4.1.1. Description du processus d'immobilisation	62
4.1.2. Préparation du gel de polyacrylamide	64
4.1.2.1. Réactifs	64
4.1.2.2. Mode d'expression de la concentration en monomère d'un gel	67
4.1.2.3. Polymérisation du gel	67
4.1.2.4. Découpage du gel	68
4.1.2.5. Perméabilisation des cellules	68
4.1.2.6. Conservation du gel	69
4.1.3. Examen microscopique du gel	69
4.2. Matériel et technique d'hydrolyse	71
4.2.1. Etude en "batch"	71
4.2.2. Etude en continu	72

4.2.2.1. Principe	72
4.2.2.2. Matériel	72
4.2.2.3. Mode opératoire	75
4.2.2.4. Avantages du procédé et application	75
4.3. Etude de l'influence des différents paramètres d'hydrolyse	76
4.3.1. Composition du gel : concentrations en monomère	76
4.3.1.1. Etude de la concentration en acrylamide total (T %)	76
4.3.1.2. Etude de la concentration en M.B.A. (C %)	78
4.3.1.3. Conclusions et discussion	79
4.3.2. Influence du pH	83
4.3.3. Influence de la concentration en cellules	84
4.3.4. Influence du débit	88
4.3.4.1. Hydrolyse à débit faible (de 0,5 à 3 ml/minute)	88
4.3.4.2. Hydrolyse à débit fort (de 2 à 12 ml/minute)	89
4.3.5. Influence de la concentration en cellules et du débit	91
4.3.6. Détermination de la constante de Michaëlis-Menten du système insoluble	93
4.3.6.1. Détermination du temps d'action pour que l'hydrolyse varie linéairement	93
4.3.6.2. Représentation selon Lineweaver-Burk	94
4.4. Etude de la viabilité du système enzymatique	98
4.5. Rendement des cellules immobilisées par rapport à une suspension libre. Influence du traitement au toluène	101
 CHAPITRE 5 : DOSAGE DE L'UREE EN CONTINU	 105
5.1. Mise au point du dosage en solution aqueuse	106
5.1.1. Etablissement de la droite d'étalonnage	106
5.1.2. Test de stabilité des colonnes	109
5.2. Dosage de l'urée dans les liquides biologiques	111

5.2.1. Méthode de référence	111
5.2.1.1. Principe	111
5.2.1.2. Réactifs	111
5.2.1.3. Mode opératoire	112
5.2.1.4. Droite d'étalonnage	112
5.2.2. Etude des interférences	114
5.2.2.1. Interférence du glucose	114
5.2.2.2. Interférence des protéines et acides aminés	115
5.2.3. Essais en continu	117
5.2.3.1. Dosage de l'urée urinaire	118
5.2.3.2. Dosage de l'urée sérique	121
CONCLUSION	124
BIBLIOGRAPHIE	127

INTRODUCTION

Immobiliser des cellules bactériennes dans un gel de polyacrylamide et étudier l'activité enzymatique de ce système insoluble constituent l'objet de notre travail.

Il s'agit donc d'un travail d'enzymologie microbienne avec à l'appui une technique d'insolubilisation des composés à activité biologique.

Il ne nous paraît pas nécessaire de rappeler l'importance considérable des enzymes dans de nombreux domaines. Ces biocatalyseurs, permettant à l'ensemble des réactions qui entretiennent la vie de se réaliser, sont employés en médecine, en biochimie et dans un grand nombre d'industries. Très souvent, les enzymes créent à leurs nombreux utilisateurs quelques difficultés. Ceux-ci se trouvent d'abord confrontés aux méthodes d'isolement et de purification de l'enzyme qui, en fin de traitement, leur coûtent en général un prix très élevé. Il suffit d'examiner les catalogues de produits chimiques pour s'en rendre compte. D'autre part, les enzymes, comme tous les catalyseurs, se retrouvent intactes après réaction avec leur substrat. Utilisées en solution, les enzymes sont très difficiles à récupérer et la perte de substances encore capables de réagir ne peut être évitée.

Notre travail n'a pas la prétention de résoudre ces problèmes mais simplement d'étudier un type nouveau de présentation des enzymes utilisées en analyse biochimique.

Lors de cette étude, notre source d'enzyme n'est pas une substance chimiquement pure, cristallisée ou lyophilisée mais bien une

cellule bactérienne entière avec tous ses constituants parmi lesquels se trouve l'enzyme nécessaire à l'analyse. Ces cellules bactériennes au lieu de se trouver en suspension libre dans un liquide physiologique sont emprisonnées lors de la polymérisation dans un gel de polyacrylamide. Le matériel ainsi formé est constitué d'un support solide, inerte et de substances biologiquement actives. Beaucoup d'enzymes ne sont-elles pas in vivo fixées elles aussi à un support?

La grande souplesse d'un tel système permet son utilisation en colonne. Dès lors, une étude en continu de l'activité enzymatique des cellules devient réalisable.

L'enzyme étudiée est l'uréase que nous utilisons afin de doser l'urée dans les liquides biologiques. Ce dosage est actuellement réalisé par l'emploi d'uréase purifiée.

Après avoir pris en considération les nombreuses sources possibles d'enzyme, notre choix s'est porté sur les cellules de *Proteus morgani*, microorganisme faisant partie de la famille des Enterobacteriaceae. Un traitement mutagène de la souche ayant pour but l'amélioration de son activité uréasique ainsi que la détermination des conditions de productivité des cellules bactériennes sont réalisés.

Voilà donc de quoi se compose notre matériel enzymatique mais allait-il réagir spécifiquement avec l'urée? De plus quelles étaient les conditions optimales de réaction d'hydrolyse?

Après une étude théorique très prometteuse sur le comportement et la viabilité d'un tel système, nous avons pu procéder au dosage proprement dit et à partir de là envisager l'application en analyse courante de laboratoire.

Chapitre 1

DE LA PREPARATION

DES ENZYMES INSOLUBILISEES

1.1. rappel des principales techniques d'insolubilisation

Selon I.H.SILMAN et E.KATCHALSKI (53), il existe 4 méthodes principales d'insolubilisation de protéines biologiquement actives. Les composés antigéniques et les anticorps, tout comme les enzymes, peuvent être rendus insolubles par l'un des processus suivants :

1.1.1. INSOLUBILISATION PAR ADSORPTION PHYSIQUE.

La fixation a lieu sur des supports inertes tels que le verre, le charbon de bois, la cellulose, l'alumine ou sur des résines synthétiques échangeuses d'ions. La β -galactosidase (33) a pu être fixée sur couche de diethylamino-éthylcellulose ainsi que sur des résines phenol-formaldéhyde tandis que la ribonucléase est immobilisée sur résine cationique (8). Cette technique ancienne de physisorption sur supports inertes ne permet pas l'immobilisation totale de la quantité d'enzyme utilisée.

1.1.2. INSOLUBILISATION PAR INCLUSION DANS UN GEL INSOLUBLE.

L'inclusion s'effectue à l'intérieur d'un gel en réseau dont les pores trop petits retiennent les protéines fixées et empêchent celles-ci de se libérer. Les gels sont souvent des polyamides. P.BENFELD et J.WAN fixent des enzymes dans un gel de polyacrylamide mais ils remarquent que de petites quantités sont libérées après lavage du gel.

1.1.3. INSOLUBILISATION PAR LIAISON COVALENTE DE LA PROTEINE A UN SUPPORT CONVENABLE INSOLUBLE DANS L'EAU.

La liaison covalente s'effectue sur des groupes fonctionnels de la protéine; groupes non-essentiels pour son activité biologique. Il s'agit donc d'une réaction de liaison sans dénaturation. Les groupes fonctionnels peuvent être des groupes amine, carboxyl, sulfhydryl, hydroxyl, cystéine ou sérine. E.KATCHALSKI et A.BAR-ELI (5, 34) préparent par cette méthode des dérivés insolubles de trypsine, chymotrypsine et uréase.

1.1.4. INSOLUBILISATION PAR FIXATION SUR UN POLYMERE AU MOYEN D'UN AGENT DE RETICULATION BIFONCTIONNEL.

L'insolubilisation peut se faire soit par formation d'un filet tridimensionnel comme étant le résultat de l'entrecroisement intermoléculaire de la protéine soit par liaison de la protéine à un support insoluble via le réactif bifonctionnel convenable. Il existe 2 groupes de réactifs :

- les réactifs "homo"bifonctionnels : possèdent 2 groupes identiques.
Exemples : bis-diazobenzidine, bis-diazohexane, p.p'-difluoro-m.m'-dinitrodiphenylsulfone.
- les réactifs "hétéro"bifonctionnels : possèdent 2 groupes différents.
Exemples : toluene 2-isocyanate-4-isothiocyanate, p-nitrophenyl chloroacetate.

1.2. influence du processus d'insolubilisation sur l'activité enzymatique

Un bon support doit être complètement insoluble, d'une

grande résistance biochimique et chimique, incompressible, hydrophile, suffisamment perméable pour permettre l'approche des groupes réactifs par l'enzyme; il doit être susceptible d'une utilisation sur colonne, susceptible de transformation en une forme réactive (activation possible) et dépourvu de centres adsorbants. Le support idéal, remplissant toutes ces conditions, semble impossible à trouver. Un compromis doit dès lors être envisagé.

Le type d'insolubilisation utilisé est très important; il peut provoquer, pour une même enzyme, des dénaturations très variables. Ainsi la chymotrypsine fixée sur la C.M.-cellulose conserve 85 à 99% de son activité initiale alors que la même enzyme liée au même support par liaison covalente ne présente plus qu'une activité enzymatique résiduelle (A.E.R.) de 10 à 55% (21).

Remarque : L'activité enzymatique résiduelle (A.E.R.) est le rapport existant entre l'activité enzymatique du dérivé insoluble et l'activité de l'enzyme pure en solution.

En général pour conserver une bonne A.E.R., la fixation doit se faire le plus près possible de 0°C, pendant un temps n'excédant pas 24 h.

Le dérivé insoluble peut avoir des propriétés enzymatiques très différentes de celles de l'enzyme libre. Par exemple, la trypsine native hydrolyse les 15 liaisons lysyles de la chaîne polypeptidique du pepsinogène alors que son dérivé insoluble n'en hydrolyse que 10. Ces propriétés nouvelles semblent indiquer que la nature chimique du support, au moins dans le cas de dérivés ioniques, impose des restrictions à la spécificité des enzymes immobilisées. Ces restrictions résultent probablement d'interactions ioniques entre le support et différentes zones ou diverses séquences des substrats de grande masse moléculaire (13).

En général, l'immobilisation d'une enzyme sur un support insoluble entraîne une diminution de l'activité enzymatique (53). Cette perte d'activité est fonction de l'enzyme, du support et du substrat utilisés, ainsi que de la méthode d'insolubilisation mise en oeuvre.

1.3. immobilisation des cellules

La plupart des travaux effectués dans ce domaine traitent de la fixation directe de la molécule d'enzyme purifiée sur un support insoluble (13, 64, 4, 8). En général, l'activité enzymatique résiduelle du système est assez faible. Les différents groupements fonctionnels du support sont vraisemblablement peu spécifiques et leur réaction probable avec des sites actifs de l'enzyme serait une raison de la dénaturation importante observée au cours de la fixation.

Dès lors, certains auteurs ont envisagé l'utilisation de cellules entières immobilisées comme source d'enzyme. P.LENOIR (38) immobilise des cellules d'*Escherichia coli* sur support de polyacrylamide afin d'effectuer l'hydrolyse du lactose par la β -galactosidase des cellules.

I.CHIBATA, T.TOSA et T.SATO (17) utilisent l'aspartase contenue dans des cellules d'*Escherichia coli* fixées également sur gel de polyacrylamide. Après avoir étudié les propriétés enzymatiques de ce système insoluble, les auteurs (59) rapportent la production en continu d'acide L-aspartique par l'emploi du gel en colonne.

D'autres auteurs encore choisissent d'immobiliser des champignons ou bien des actinomycètes (*Streptomyces phaeochromogenes*) (38).

Dans le cas d'immobilisation de cellules entières, l'enzyme intracellulaire n'est pas altérée lors du processus de fixation.

Cette fixation a lieu en effet de façon indirecte; les groupes fonctionnels du support ne peuvent réagir qu'avec les constituants de la membrane cellulaire. De ce fait, les systèmes enzymatiques cellules/support possèdent en général une activité enzymatique résiduelle et un temps de viabilité supérieur au système utilisant l'enzyme purifiée.

Chapitre 2

PRESENTATION DE L'UREASE

2.1. généralités

Une commission internationale (Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry) a mis au point un système de classification des enzymes ainsi qu'une nomenclature précise dont l'usage, depuis son entrée en vigueur en 1961, s'est largement répandu. Cette commission divise les enzymes en 6 groupes (42) :

1. les oxydoréductases
2. les transférases
3. les hydrolases
4. les lyases
5. les isomérases
6. les ligases ou synthétases.

Dans la nomenclature suggérée, une enzyme comporte un numéro d'ordre composé de 4 chiffres, un nom systématique et un nom commun recommandé. (51).

Ainsi l'uréase est appelée urée amidohydrolase (nom systématique) et est reprise sous le numéro de code E.C. 3.5.1.5. Elle fait donc partie du groupe des hydrolases agissant sur la liaison C-N non peptidique.

2.1.1. MISE EN EVIDENCE ET PURIFICATION.

L'uréase est présente dans de nombreux organismes aussi bien végétaux qu'animaux. Elle se trouve chez un grand nombre d'invertébrés et chez tous les vertébrés (3). Sa découverte remonte au siècle dernier.

J.E.VARNER (62) cite M.MUSCULUS comme étant le premier en 1876 à rapporter des expériences avec l'uréase. Il filtre des bactéries et met en évidence l'attaque de l'urée. Il note également la présence d'uréase

dans les urines de malades atteints de troubles à la vessie.

P.MIQUEL en 1890 observe l'uréase chez plusieurs microorganismes. Mais il faut attendre 1926 pour que l'uréase fasse réellement parler d'elle. Elle est connue comme étant la première enzyme isolée cette année-là à l'état cristallisé par J.B.SUMNER (18). Ce dernier choisit la farine de soja ou plus précisément la farine de fève de Jack (*Canavalia ensiformis*) comme source d'enzyme. La quantité d'uréase représentant en moyenne 0,15% en poids sec de farine dépend de l'âge de la graine ainsi que de la méthode de préparation de la farine (49).

La cristallisation est réalisée en traitant cette farine de fève de Jack par une solution aqueuse d'acétone à 31,6% et en laissant simplement le filtrat au réfrigérateur. On peut obtenir en 24 heures une première cristallisation qui représente près de 25% de l'activité initiale (11). Une recristallisation en solution aqueuse d'acétone tamponnée à pH 5,9-6,2 par des citrates ou phosphates fournit des cristaux octaédriques de 3 à 5 μ très solubles dans l'eau et doués d'une activité 700 fois plus grande que celle de la farine la plus active (55).

Plusieurs modifications furent apportées à la méthode de Sumner, notamment l'ajout de β -mercaptoéthanol pour diminuer l'agrégation et de l'E.D.T.A. pour complexer les ions métalliques gênants (49).

Remarque : Sumner définit l'unité d'activité enzymatique comme étant la faculté que possède l'enzyme de libérer 1 mg d'azote ammoniacal provenant d'urée à 20°C pendant 5 minutes et à pH 7.

2.1.2. PROPRIETES MOLECULAIRES.

2.1.2.1. Détermination du poids moléculaire.

L'uréase peut exister sous de multiples formes possédant une activité et des propriétés différentes et d'abord un P.M. différent. Ceci a été démontré par diverses techniques dont l'ultrafiltration et la filtration sur gel. Certaines formes se sont montrées inactives au point de vue enzymatique (27). L'uréase de Sumner possède un P.M. de 485.000. Ce résultat a pu être obtenu par la combinaison de la vitesse de sédimentation et des données de diffusion (49). Mais l'uréase peut se dissocier en sous-unités de P.M. inférieur. Elle serait formée de chaînes de polypeptides possédant chacune un P.M. égal à 30.000 (n). Ainsi l'uréase de Sumner vaut 16 n. Une autre uréase de P.M. égal à 236.000 (8 n) est obtenue par traitement au glycérol (49, 10) et est étudiée par D.P.BLATTNER et collaborateurs selon une méthode électrophorétique.

L'uréase dans une solution d'urée 8 M possède un P.M. de 60.000 (2 n) (49). J.A.ANDERSEN et collaborateurs (2) purifient une uréase provenant de *Proteus mirabilis*. Son P.M. déterminé par filtration sur gel Sephadex G.200 est égal à 151.000.

Une telle complexité au niveau moléculaire pourrait être également influencée par la température (40).

2.1.2.2. Autres propriétés physiques.

1 - Constante de diffusion = $3,46 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ (49)

à 20°C et dans du Na_2SO_3 .

2 - Volume spécifique = 0,73 (42, 49)

il dépend de la température et du pH.

3 - Absorption dans l'U.V.

Le maximum d'absorption se situe vers 272 nm (30) mais le rapport absorption à 280 nm / absorption à 260 nm est souvent donné pour caractériser une uréase et vaut 1,8 (49).

4 - Point isoélectrique = 5 - 5,1

Cette valeur a été trouvée par Sumner (49)

2.1.2.3. Composition chimique.

L'uréase constituée d'holoprotéines (24) est d'une grande complexité dans sa composition chimique qui d'ailleurs n'est pas entièrement connue.

Les résultats obtenus à partir d'une uréase de P.M. égal à 480.000 sont différents d'un auteur à l'autre. Ces résultats nous rapportent le nombre de groupes sulfhydryls; ces groupes étant très importants lors de la réaction enzymatique; et la présence de différents groupements d'acides aminés.

1 - Détermination du nombre de - SH / mole d'uréase :

G.GORIN et C.CHIN (29) par titration avec le N - éthylmaleimide obtiennent 21 groupes - SH qui réagissent rapidement sans perte d'activité enzymatique,

7 à 8 groupes qui réagissent plus lentement avec une perte de 90% de l'activité uréasique,

et 16 à 20 groupes qui réagissent lentement.

A.H.NEIMS et collaborateurs (45) notent la présence de 53 groupes - SH / mole d'uréase.

G.GORIN (30) trouve que 48 moles de p - chloromercuribenzoate réagissent avec l'uréase et parle d'un total de 47 - 48 groupes - SH / mole.

2 - Mise en évidence de résidus d'acides aminés :

K.R.LYNN (39) met en relation la constante de Michaëlis - Menten avec le pH et le pK obtenus. Il suggère la présence d'histidine et de groupements α -ammonium.

G.GORIN et collaborateurs (30) notent la présence de 77 groupes méthionyl, 29 groupes cystinyl et 47 groupes cysteinyl.

D'après J.E.VARNER (62), l'étude par chromatographie sur papier d'une uréase de fève de Jack révèle la présence des acides aminés suivants : alanine, arginine, cysteine, phenylalanine, glycine, acide glutamique, histidine, isoleucine, méthionine, proline, sérine, tyrosine, thréonine et tryptophane.

2.1.2.4. Propriétés immunologiques.

F.J.REITHEL (49) rapporte que l'injection d'uréase chez le lapin provoque la formation d'anticorps et la précipité formé entre l'uréase et son anticorps possède une activité catalytique. Les régions antigéniques et catalytiques ne sont donc pas identiques.

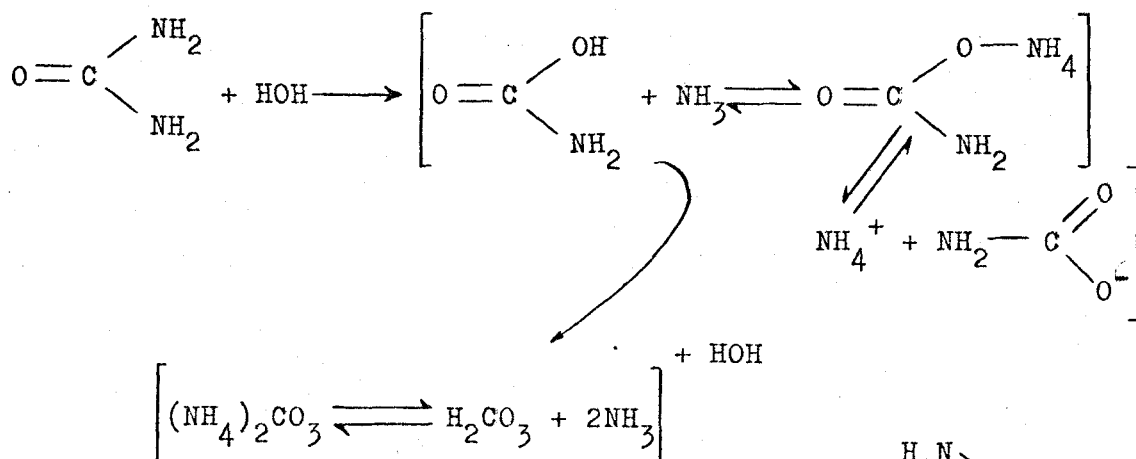
2.1.3. ETUDE DU PROCESSUS ENZYMATIQUE.

Le catalogue de la commission internationale des enzymes répertorie la réaction catalytique de l'uréase comme : $\text{urée} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$. Deux liaisons C - N sont donc rompues. Il est évident que la réaction stoechiométrique est la résultante de 2 réactions composées. Toutes les conjonctures concernant les mécanismes de ces réactions et la nature des intermédiaires doit tenir compte de l'action des inhibiteurs.

2.1.3.1. Mécanisme de réaction.

Les travaux de GORIN et BLAKELEY sont cités par F.J.

REITHEL (49). Ces auteurs ont mis en évidence le carbamate comme intermédiaire dans la réaction en 2 temps :



L'uréase forme un complexe carbamoyl $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagup \\ \text{O}=\text{C} \end{array}$ -enzyme où l'eau est probablement un accepteur dans la réaction de transfert. Le carbamate devient ainsi le substrat obligatoire de la seconde réaction. Il est à noter que K.KOBASHI et collaborateurs (36) mettent en évidence la formation d'un complexe inactif uréase - acide hydroxamique dans lequel 2 moles d'acide hydroxamique sont liées à 1 mole d'uréase. D'après les auteurs, il y aurait 2 sites actifs par mole d'enzyme.

2.1.3.2. Spécificité du substrat.

L'enzyme n'est pas absolument spécifique de l'urée et peut réagir avec l'hydroxyurée (9) et la dihydroxyurée (26). Cette dernière est hydrolysée plus rapidement que la monohydroxyurée et les produits d'hydrolyse sont l'hydroxylamine et le CO_2 .

2.1.3.3. Etude cinétique.

KISTIAKOWSKY et récemment K.R.LYNN et P.E.YANKWICH ont étudié cinétiquement l'uréase. La température, le pH, l'étendue de la réaction, la force ionique, la concentration de réactifs, le type de tampon et l'âge de la préparation modifient le comportement de l'uréase.

Chaque préparation d'uréase est unique et des valeurs de K_m peuvent varier fortement d'une préparation à l'autre.

- Exemples (49) : - Uréase provenant de *Bacillus pasteurii* (tampon phosphate, pH = 7, $t^\circ = 20^\circ\text{C}$) possède un $K_m = 130 \cdot 10^{-3}$ moles / l.
- Uréase provenant de fève de Jack (tampon maleate, pH = 7, $t^\circ = 21^\circ\text{C}$) possède un $K_m = 4,9 \cdot 10^{-3}$ moles / l.

L'énergie d'activation de l'hydrolyse de l'urée catalysée par l'uréase est de 8 Kcal /mole (43).

-Inhibiteurs de la réaction enzymatique.

1 - Inhibition par son substrat :

L'uréase est inhibée par son substrat en forte concentration. Cette inhibition peut être levée grâce à l'addition de glycine. D'après BALDWIN (3), il y aurait lors de la réaction formation d'un premier complexe ES à hydrolyse facile. Une concentration en urée très importante entraînerait la formation d'un second complexe ES_2 très stable.

L'ammoniac formé par la réaction d'hydrolyse est aussi un inhibiteur (6).

2 - Inhibition par les cations lourds :

Les principaux inhibiteurs sont Ag^+ , Hg^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , Mn^{++} (rangés par ordre décroissant du pourcentage d'inhibition) (62).

Cette inhibition peut être expliquée par le fait que les ions métalliques forment avec les groupements - SH intervenant dans la configuration du site actif de l'enzyme des liaisons irréversibles. Cu^{++} et Zn^{++} sont des inhibiteurs non-compétitifs (35).

3 - Inhibition compétitive de l'ion nitrate (35) et de la thiourée (6) :
Elle est beaucoup moins importante que celle due aux cations.

-Activateurs.

Ce sont des substances qui réduisent les groupements disulfure (- S - S -) en régénérant les fonctions thiol sur l'uréase. Exemples : arsénobenzol, acide ascorbique, acide cyanhydrique (24). L'ion $\text{HPO}_4^{=}$ est également activateur; selon FASMAN et NIEMANN, il est possible que le carbamyl phosphate soit un intermédiaire dans le mécanisme de réaction. Le tampon pH (K_2HPO_4 et KH_2PO_4) utilisé lors de la réaction enzymatique agit selon 2 façons : d'une part l'ion phosphate qui active la réaction, d'autre part l'ion K^+ qui l'inhibe (25).

2.1.3.4. Etude du site actif.

Diverses hypothèses ont été émises quant au nombre de sites actifs par mole d'uréase ainsi qu'à la nature des groupements intervenant dans la réaction enzymatique. Nous nous bornerons à donner les 3 hypothèses suivantes :

- 1 - K.R.LYNN (39) suggère la présence d'un groupement histidine dont le $\text{pK}_b = 5,8$; d'un groupement α -ammonium de $\text{pK}_a = 7$ et sulfhydryl de $\text{pK}_a = 8,3$. Ces valeurs ont été obtenues à partir des données de K_m , V_{max} et pH fournies lors d'une étude cinétique. Selon l'auteur, les groupes α -ammonium et sulfhydryl interviennent dans la formation du complexe ES en tant qu'agents de liaison et le groupe histidine dans la réaction du complexe comme catalyseur.
- 2 - La corrélation du changement d'activité enzymatique avec la titration des groupes sulfhydryl essentiels montre qu'il y aurait 8 sites actifs par mole d'uréase de P.M. égal à 480.000 (49). Il est à noter que l'uréase possède toujours une activité enzymatique lors-

qu'elle est en présence d'urée 8 M alors que son poids moléculaire est réduit à 60.000 (2 n). Il y aurait donc une région catalytique pour 2 sous-unités d'uréase (voir 2.1.2.1.).

- 3 - Selon une étude effectuée par K.KOBASHI et collaborateurs (36), le nombre de sites actifs par mole d'uréase serait égal à 2. Cette conclusion est basée sur la caractérisation dans le complexe enzyme-inhibiteurs de seulement 2 moles d'acide hydroxamique par mole d'uréase d'un P.M. égal à 480.000 (16 n). Les auteurs démontrent que ce complexe ne présente plus d'activité catalytique. En tenant compte que les groupes - SH interviennent dans le mécanisme de réaction, ils suggèrent qu'un grand nombre de ces groupes sont nécessaires à la maintenance de la configuration de l'enzyme plutôt que dans une fonction directe du site actif.

2.2. dérivés insolubles de l'uréase

Actuellement, l'uréase est utilisée par de nombreux laboratoires dans la fonction de dérivés insolubles dans l'eau. Les techniques de fixation diffèrent d'un auteur à l'autre mais dans l'ensemble les résultats obtenus sont très prometteurs. Tous les travaux sont effectués à partir d'uréase purifiée.

2.2.1. PREPARATIONS ET PROPRIETES DE DERIVES D'UREASE INSOLUBLES DANS L'EAU.

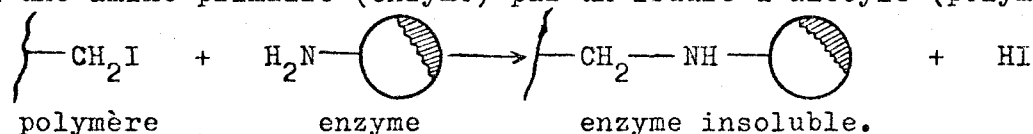
E.RIESEL (50) cite J.B.SUMNER et V.A.GRAHAM qui, en 1925, obtiennent la première préparation insoluble d'uréase. De petites quantités de chlorure de sodium sont ajoutées à une solution alcoolique d'uréase. Le mélange est abandonné au congélateur pendant 1 à 2 jours. Le

produit insoluble formé consiste en des molécules d'uréase entrecroisées grâce aux ponts disulfures intermoléculaires.

E. RIESEL et E. KATCHALSKI (50) préparent des dérivés insolubles en couplant l'uréase avec un sel de diazonium, dérivé d'un copolymère de p-amino - D.L. - phenylalanine et L. - leucine. Les auteurs utilisent de l'uréase inactivée avant fixation par le p - chloromercuribenzoate qui permet le blocage des groupes - SH. La cystéine ajoutée après fixation de l'enzyme permet la réactivation.

Les dérivés insolubles obtenus contiennent 15 à 60 mg de protéines pour 100 mg d'enzyme insoluble dans l'eau et présentent une perte d'activité de 50% par rapport à l'uréase libre.

E. BROWN et A. RACOIS (12) font réagir l'uréase avec du polyméthacrylate d'iodo-4 n-butyle pour former un dérivé uréase / polymère insoluble dans l'eau. La réaction de fixation se ramène à l'alcoylation d'une amine primaire (enzyme) par un iodure d'alcoyle (polymère) :



L'activité enzymatique de ces dérivés peut atteindre 70% de l'activité de l'uréase initiale. Ils présentent une activité maximale à pH 7 tout comme l'uréase pure.

2.2.2. ELECTRODE SPECIFIQUE POUR LE DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'UREE.

G.G. GUILBAULT et J.G. MONTALVO (31) fabriquent une électrode pour le dosage spécifique de l'urée. Les auteurs immobilisent l'uréase dans une couche de gel de polyacrylamide de 60 à 350µ d'épaisseur. Le gel est fixé à la surface d'une électrode en verre Beckman sensible à l'ion NH_4^+ . Après contact de l'électrode avec la solution

d'urée, le substrat diffuse dans la couche de gel où se déroule la réaction d'hydrolyse. La concentration en NH_4^+ proportionnelle à la concentration en urée est décelée par mesure du potentiel de l'électrode après un temps suffisant pour que le processus de diffusion soit stable.

Selon KATZ et COWANS (35), $E = 54,8 \log \text{NH}_4^+ + 229,4$. Lorsque la concentration en urée est inférieure au K_m apparent de l'enzyme immobilisée mais supérieur à 0,6 mg / 100 ml de solution, le potentiel de l'électrode varie linéairement avec le logarithme de la concentration en urée (31).

Les auteurs appliquent cette méthode au dosage de l'urée dans le sang et l'urine.

Remarque : S.I.UPDIKE et G.P.HICKS (60, 61) ont également mis au point une électrode à enzyme avec la glucose oxydase.

2.2.3. MICROCAPSULES D'UREASE.

P.V.SUNDARAM (56) prépare des microcapsules sphériques en nylon contenant une solution aqueuse d'uréase. L'auteur étudie les propriétés cinétiques de la réaction d'hydrolyse de l'urée par ces capsules qui possèdent un diamètre de 10 à 30 μ . Ces dérivés insolubles d'uréase présentent un pH optimum de réaction nettement plus acide que celui de l'uréase en solution libre. Les valeurs du K_m sont augmentées dans le cas d'uréase encapsulée.

2.2.4. DE L'APPLICATION DES DERIVES INSOLUBLES D'UREASE.

L'application première de ces dérivés insolubles d'uréase présentée sous forme de colonne ou bien avec une électrode spécifique est donc le dosage de l'urée dans les liquides biologiques(13).

D'autres auteurs préconisent l'utilisation de tels dérivés dans la création de reins artificiels (63).

2.3. l'uréase bactérienne

L'uréase bactérienne est une enzyme intracellulaire. Elle ne traverse pas la paroi des cellules bactériennes.

D'après H.SENECA et collaborateurs (52), il s'agit d'une macroglobuline de P.M. égal à 473.000 qui possède 37 groupes - SH. Le pH optimum de réaction est de 7,2 - 7,5. J.A.ANDERSEN et collaborateurs (2) purifient partiellement l'uréase de *Proteus mirabilis* et déterminent son poids moléculaire par filtration sur gel Sephadex. Ce dernier est trouvé égal à 151.000.

L'uréase bactérienne agit de la même façon que l'uréase de Sumner : son activité est due aux groupements sulfhydryl (57) et les cations comme Hg^{++} , Cu^{++} et Ag^{++} causent une inactivation irréversible par oxydation des - SH en - S - S - (52).

La synthèse de l'uréase peut être induite ou non par l'urée suivant le type de bactérie. Pour *Proteus rettgeri*, la synthèse de l'enzyme est induite. Selon I.MAGANA-PLAZA et J.RUIZ-HERRERA (41), cette biosynthèse serait inhibée fortement par l'ion NH_4^+ et également par le glucose. D'après J.E.VARNER (62), l'uréase élaborée par les microorganismes (*Micrococcus urea* et *Proteus vulgaris*) est principalement formée pendant le vieillissement et la désintégration des cellules. Nous avons cependant constaté que des cellules de *Proteus morgani* conservées en chambre froide voient leur activité uréasique diminuer en fonction du temps de stockage.

Il est présumé (62) que l'uréase permette aux bactéries

d'utiliser l'urée provenant de déchets d'animaux en tant que source d'ammoniac et rende l'azote disponible pour la synthèse d'acides aminés (52).

L'hydrolyse de l'urée n'est pas une réaction produisant de l'énergie. Par son alcalinité, elle inhibe les organismes non-alcalino-résistants (54).

Chapitre 3

CHOIX ET ETUDE

DE *PROTEUS morganii*

Notre travail consiste à immobiliser non pas l'uréase purifiée mais bien des cellules entières dans lesquelles est contenue l'enzyme. Ces cellules sont des bactéries mais nous pourrions utiliser d'autres organismes animaux ou végétaux. P.LENOIR (38) cite K. et R.MOSBACH qui ont immobilisé sur support de polyacrylamide un lichen : *Umbilicaria pustulata* tandis que K.MOSBACH et LARSON fixent un champignon : *Curvularia lunata* afin d'utiliser son activité β -hydroxylasique.

Les bactéries possèdent l'énorme avantage de se reproduire très rapidement et dans des conditions de culture faciles à réaliser.

3.1. choix de la souche

3.1.1. CHOIX DU GENRE PROTEUS D'APRES LA LITTERATURE.

Quelles sont les espèces bactériennes qui possèdent une activité uréasique? Une littérature abondante (15, 37, 46, 48) peut nous donner toutes les indications à ce sujet.

espèce bactérienne	activité uréasique
famille des Enterobacteriaceae :	
<i>Citrobacter</i>	+ à 30°C douteuse
<i>Klebsiella</i>	+ à 30°C
<i>Enterobacter cloaceae</i>	±
<i>Serratia</i>	± très lente
<i>Proteus</i>	+ très active
famille des Brucellaceae :	
<i>Pasteurella pseudo-tuberculosis</i>	+

espèce bactérienne	activité uréasique
famille des Bacillaceae :	
Bacillus pasteurii	+
Bacillus lentus	+
Clostridium sordelli	+ très active
famille des Micrococcaceae :	
Micrococcus ureae	+
famille des Mycobacteriaceae :	
Mycobacterium tuberculosis	+
Mycobacterium bovis	+

Parmi toutes ces souches, nous retiendrons le genre *Proteus* après élimination des autres espèces : celles à action uréasique peu active (*Serratia...*), celles dont la culture est exigeante (*Mycobacterium*, *Micrococcus*), des bactéries anaérobies (*Clostridium*) et sporulées (*Bacillus*).

Le genre retenu appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* se cultive facilement tout en ayant une forte activité uréasique.

3.1.2. ESSAIS RELATIFS A LA DETERMINATION DE L'ESPECE :

PROTEUS morganii.

Pour réaliser ces essais, nous disposons de 4 souches dont la pureté a préalablement été vérifiée. Il s'agit de *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii*, *Proteus rettgeri* et *Proteus vulgaris*. (Collection I.P.L.)

3.1.2.1. Vérification qualitative de la présence d'uréase.

- technique : Utilisation du milieu de STUART (15).

-composition : KH_2PO_4

3,64 g

Na ₂ HPO ₄	3,8 g
Urée	8 g
Extrait de levures	0,04 g
Sol. de rouge de phénol à 0,02%	20 ml
Eau distillée	380 ml

-dissoudre sans chauffer

-ajuster le pH à 6,8 si nécessaire

-stériliser par filtration sur bougie Chamberland L3 ou sur filtre Seitz

-répartir aseptiquement 2 ml par tube de 160 x 16 mm et vérifier la stérilité.

Après inoculation large du milieu par les 4 souches étudiées et incubation à 37°C, l'hydrolyse de l'urée se manifeste par un virage de l'indicateur au rouge pourpre (pH ≥ 8).

- résultats :

microorganismes	temps d'incubation en heures				
	1	2	3	6	12
Proteus mirabilis	-	-	-	+	+++
Proteus morganii	+	++	++	+++	+++
Proteus rettgeri	-	-	+	+	+++
Proteus vulgaris	-	-	+	+	+++

3.1.2.2. Etude enzymatique comparative.

- technique : Pour chaque souche, une même quantité de cellules est mise en présence d'une solution d'urée de telle sorte que le rapport $\frac{\text{cellules}}{\text{substrat}}$ soit égal à 0,5.

Le pH de cette solution est de 6,7. Les cellules ont été préalablement traitées au toluène afin de libérer l'en-

zyme. Nous étudions la réaction d'hydrolyse de l'urée en fonction du temps d'incubation à 37°C. Des prélèvements réalisés après des temps déterminés nous renseignent sur le pourcentage d'hydrolyse (technique détaillée voir plus bas).

- résultats : (en % d'hydrolyse)

réf. courbe	microorganismes	temps d'incubation						
		10'	20'	30'	60'	90'	2 h	3 h
(1)	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0	0	0	14
(2)	<i>Proteus morganii</i>	52	83	95	100	100	100	100
(3)	<i>Proteus rettgeri</i>	0	0	0	0	10	19	34
(4)	<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0	0	0	10

voir figure 1.

3.1.2.3. Conclusion.

D'après les résultats obtenus, *Proteus morganii* est la souche présentant l'activité uréasique la plus marquée. Elle est donc retenue pour la suite des essais.

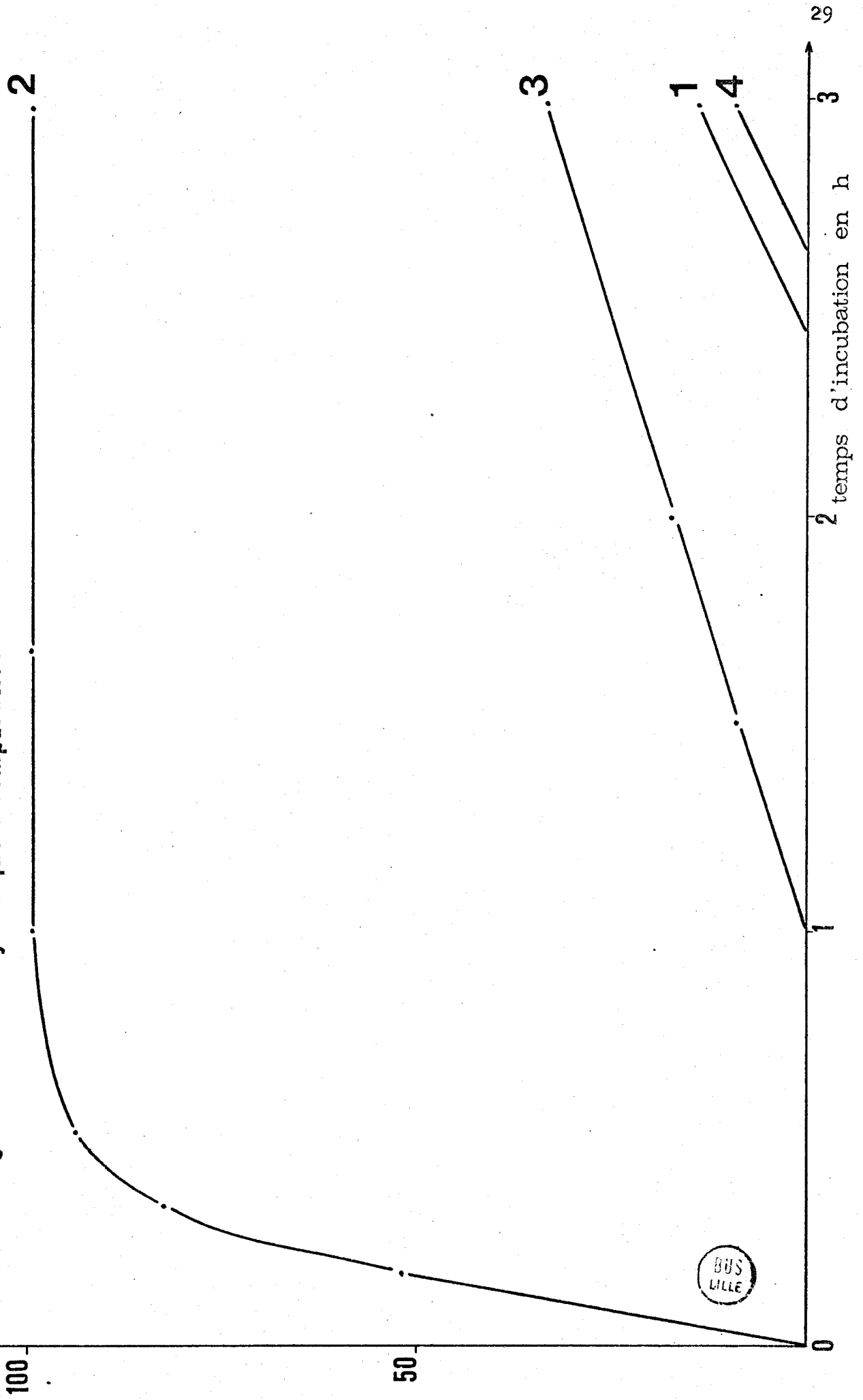
Il est à noter que M.CATSARAS (16) choisit *Proteus morganii* comme étant une souche à action uréasique rapide comparée à *Proteus rettgeri*.

Présentation de *Proteus morganii* :

- habitat : tractus intestinal des animaux et de l'homme (37). Dans la nature, ils apparaissent dans les endroits contaminés fécalement.
- morphologie : il s'agit d'un bacille à gram négatif (1 à 2 μ sur 0,4 à 0,6 μ), dépourvu de capsule et généralement mobile grâce à des cils péritriches (48).

hydrolyse
en %

fig 1 étude enzymatique comparative



BUS
LILLE

- caractères cultureux : culture en aérobiose (anaérobiose facultative),
température optimale égale à 37°C,
sur gélose inclinée, les colonies apparaissent gris-blanchâtres, lisses et brillantes et peuvent envahir la surface du milieu, il se forme un trouble épais par culture en bouillon ordinaire.

- caractères biochimiques :	indol	+	
	citrate	-	
	glucose	+] sur milieu de Kligler
	lactose	-	
	gaz	+	
	H ₂ S	-	
	mannitol	-	
	A.P.P.	+	
	uréase	+	

Cette espèce est légèrement pathogène et peut provoquer une diarrhée fétide.

Il peut exister chez *Proteus morganii* certaines formes n'hydrolysant pas l'urée.

3.2. étude de l'activité uréasique chez *proteus morganii*

Avant d'effectuer l'étude enzymatique proprement dite, nous allons tâcher d'améliorer la qualité du matériel cellulaire utilisé. Nous viserons d'abord à produire des microorganismes possédant une forte activité uréasique, ceci en isolant par traitement mutagène

une souche convenable. Par le choix judicieux d'un milieu de culture favorable, nous veillerons à produire une quantité importante de cellules.

3.2.1. TRAITEMENT MUTAGÈNE PAR LES U.V.

3.2.1.1. Théorie - Principe.

Les rayons lumineux de longueur d'onde égale à 253,7 nm possèdent un pouvoir mutagène sur les cellules bactériennes. Des modifications se produisent au niveau de la structure du D.N.A. par formation de ponts entre les bases (32).

Exemple : - TT - TC - CC -

La polymérase étant incapable de réagir avec les dimères ainsi formés, il peut y avoir modification des propriétés de la souche microbienne. Il faudra se méfier du phénomène de photoréactivation en plaçant les cellules traitées à l'obscurité pendant un certain temps. La lumière visible induit la fonction d'enzymes qui coupent les dimères et rétablissent la structure du D.N.A.

Les suspensions de cellules subissent 3 traitements successifs aux U.V. et après chaque traitement, les colonies à action uréasique élevée sont isolées.

3.2.1.2. Technique.

- mettre la souche en culture à 37°C dans 10 ml de milieu SP₂ glucosé
- ajouter à ces 10 ml de culture jeune 50 à 100 ml de SP₂ glucosé stérile
- répartir la suspension en boîtes de Pétri à raison de 10 ml par boîte
- soumettre les boîtes à l'action des U.V. dans les conditions suivantes : longueur d'onde : 253,7 nm

temps d'action : 2 à 10 minutes

distance boîte / source lumineuse : 6 cm

la boîte est animée d'un mouvement rotatif afin que toute la surface du milieu soit exposée de la même façon.

- placer les boîtes à l'obscurité pendant 1 heure afin d'éviter le phénomène de photoréactivation
- ensemercer après dilution en tryptone-sel sur milieu gélosé tel que tryptone agar. L'ensemencement s'effectue en nappe. Le témoin est constitué par la souche ensemencée avant traitement aux U.V.
- après incubation à 37°C pendant 24 heures, effectuer un comptage de colonies
- recouvrir le milieu de base par 10 à 15 ml de milieu de Stuart gélosé modifié
- placer les boîtes à 37°C et après $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1 et 2 heures sélectionner les colonies qui développent le halo rouge le plus intense ou qui virent les premières
- repiquer les colonies à action uréasique élevée dans 10 ml de SP₂ glucosé
- recommencer un nouveau traitement aux U.V.

Remarque : Milieux de culture utilisés :

-SP₂ glucosé : voir 3.2.2. détermination des conditions de culture.

-tryptone-sel :

tryptone	1	g
NaCl	8,5	g
eau distillée	1.000	ml
pH 7 à 7,2		
autoclaver 20 minutes à 121°C		

-tryptone agar :

tryptone	10	g
glucose	1	g
extrait de levures	3	g
amidon soluble	2	g
K_2HPO_4	1	g
NaCl	5	g
agar biomar	15	g
eau distillée	1.000	ml

pH=7

autoclaver 20 minutes à 121°C

-milieu de Stuart gélosé enrichi :

tryptone	3	g
extrait de levures	1,5	g
KH_2PO_4	3,64	g
Na_2HPO_4	3,8	g
rouge de phénol	4	mg
eau distillée	300	ml

pH=6,8

agar 6 g

répartir en flacons de 130 ml à raison de 75 ml /
flacon.

autoclaver à 121°C pendant 20 minutes

après refroidissement de la gélose à 45°C environ,
ajouter aseptiquement dans chaque flacon 25 ml d'u-
ne solution d'urée à 8% stérilisée auparavant sur
bougie Chamberland.

3.2.1.3. Résultats.

- mutation 1 : témoin : $6,5 \cdot 10^{10}$ germes / ml
 essai après 2 minutes d'exposition : $4 \cdot 10^8$ germes / ml
 essai après 5 minutes d'exposition : $0,5 \cdot 10^8$ germes/ml
 5 colonies sont sélectionnées sur l'ensemble des boîtes.
- mutation 2 : témoin : $7,5 \cdot 10^{11}$ germes / ml
 essai après 5 minutes d'exposition : $5 \cdot 10^8$ germes / ml
 essai après 10 minutes d'exposition : $3 \cdot 10^8$ germes / ml
 sélection de 4 colonies.
- mutation 3 : témoin : $9 \cdot 10^9$ germes / ml
 essai après 5 minutes d'exposition : $8 \cdot 10^6$ germes / ml
 choix au hasard de 5 colonies.

L'activité uréasique de la souche après traitement mutagène est supérieure à celle de la souche de départ. Le rendement enzymatique des cellules bactériennes subit une amélioration importante.

3.2.2. DETERMINATION DES CONDITIONS DE CULTURE.

3.2.2.1. Conservation des cellules après mutation.

La souche est repiquée le moins souvent possible sur gélose ordinaire inclinée. Les tubes sont placés à l'incubateur à 37°C pendant 14 à 16 heures et stockés ensuite en chambre froide.

3.2.2.2. Choix d'un milieu de culture fournissant une grande quantité de cellules.

Nous étudions les courbes de croissance de *Proteus morgani* dans différents milieux de culture contenant ou non de l'urée. La détermination du poids sec de cellules produites et leur rendement

enzymatique permettent d'orienter le choix du milieu.

Technique : -ensemencer 200 ml de milieu avec 10 ml de culture jeune de la souche dans ce même milieu

-placer sur shaker à 28°C

-suivre les courbes de croissance par lecture de la densité optique à 600 nm

L'activité uréasique est étudiée de la façon suivante :

dans un tube de 160 x 16 mm introduire :

solution d'urée à 100 ppm : 5 ml

tampon pH 6,5 : 2 ml

suspension microbienne traitée au toluène : 0,25 mg de cellules dans 3 ml.

-placer les tubes dans un bain-marie agité dont la température est réglée à 37°C. Le pourcentage d'hydrolyse est déterminé avec 10 ou 15 minutes de temps d'action.

3.2.2.2.1. Culture sur milieux exempts d'urée.

- composition des milieux :

bouillon ordinaire double :	extrait de viande	8 g
	NaCl	10 g
	peptone SC	20 g
	eau distillée	1.000 ml

pH 7,2

autoclaver 20 minutes à 121°C

bouillon SP ₂ glucosé :	tryptone	12 g
	extrait de levures	4 g
	K ₂ HPO ₄	18 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	peptone	10 g

eau distillée 800 ml
 pH 7,3
 autoclaver 20 minutes à 121°C
 glucose 15 g (200 ml
 d'une solution à 7,5%). Cette dernière solution, stérilisée séparément par tyndallisation, est ajoutée aseptiquement au milieu.

- résultats :

temps d'incubation en heures	densité optique	
	B.O. double	SP ₂ glucosé
0	0,03	0,03
1	0,03	0,035
2	0,14	0,17
3	0,53	0,56
5	1,25	1,28
6	1,61	1,61
7	1,90	2,00
8	2,05	2,15
9	2,20	2,35
poids sec de cellules dans 100 ml de milieu :		
	88 mg	92 mg

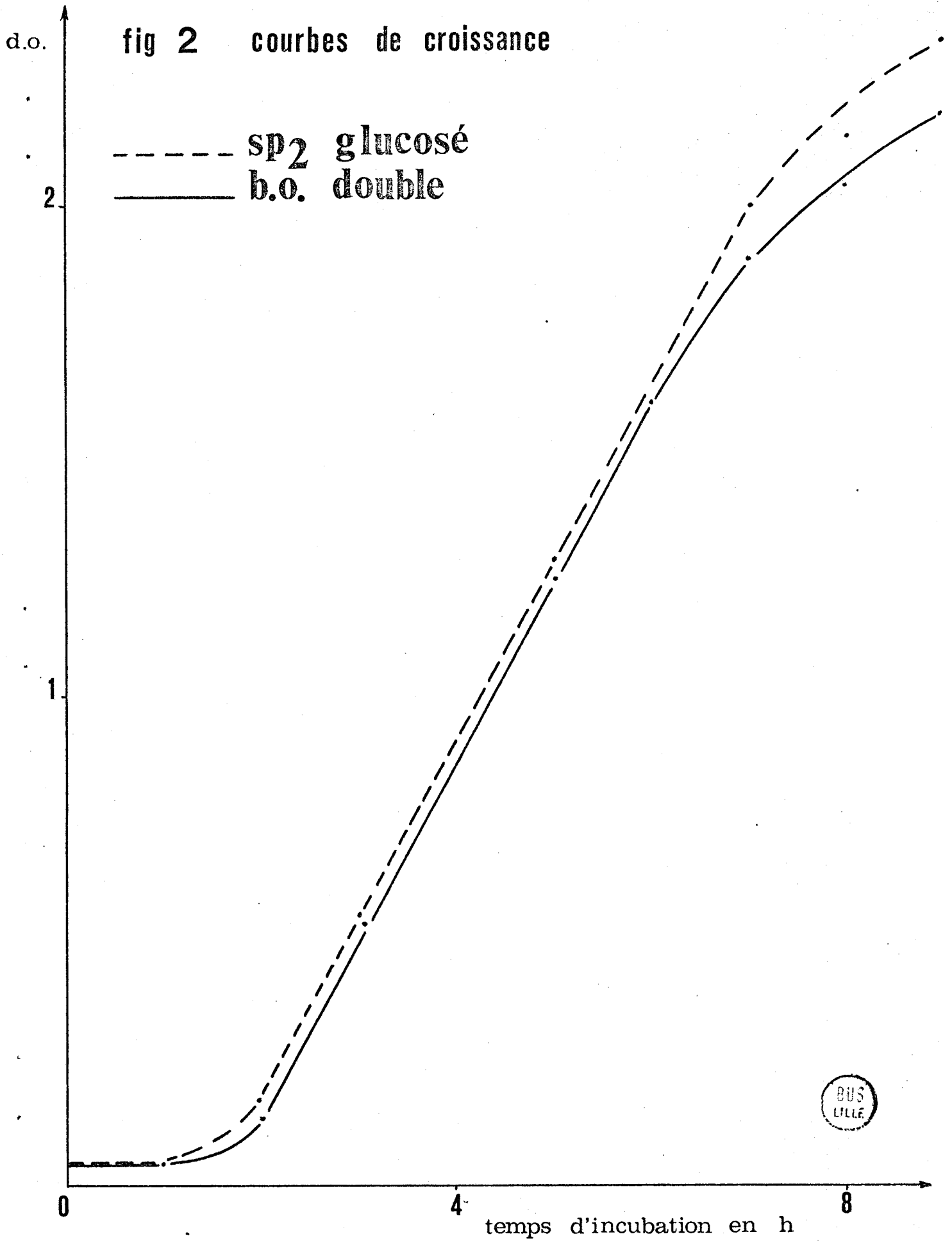
rendement enzymatique en pourcentage d'hydrolyse (temps d'action égal 15 minutes) : en B.O. double : 73,5 - 73,5 - 74 - 76

en SP₂ glucosé : 83,5 - 81 - 84,5 - 82

Le milieu retenu est donc le SP₂ glucosé vu le rendement uréasique des cellules qui y sont produites.

fig 2 courbes de croissance

----- sp₂ glucosé
———— b.o. double



3.2.2.2.2. Culture sur milieux contenant de l'urée.

A partir du milieu de base SP₂ glucosé, nous ajoutons l'urée en concentration croissante tout en diminuant dans les rapports $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ les teneurs en tryptone, peptone et extrait de levures et glucose.

- composition des milieux :

SP₂ glucosé (voir 3.2.2.2.1.)

SP ₂ $\frac{3}{4}$ glucosé : tryptone	9	g
extrait de levures	3	g
K ₂ HPO ₄	18	g
KH ₂ PO ₄	2	g
peptone	7,5	g
eau distillée	800	ml
pH 7,3		
autoclaver 20 minutes à 121°C		
glucose	11,25	g (150 ml d'une solution à 7,5%)
urée	5	g (50 ml d'une solution à 10%)

SP ₂ $\frac{1}{2}$ glucosé : tryptone	6	g
extrait de levures	2	g
K ₂ HPO ₄	18	g
KH ₂ PO ₄	2	g
peptone	5	g
eau distillée	800	ml
pH 7,3		
autoclaver 20 minutes à 121°C		
glucose	7,5	g (100 ml d'une solution à 7,5%)
urée	10	g (100 ml d'une solution à 10%)

SP ₂ $\frac{1}{4}$ glucosé : tryptone	3	g
extrait de levures	1	g
K ₂ HPO ₄	18	g
KH ₂ PO ₄	2	g
peptone	2,5	g
eau distillée	800	ml

pH 7,3

autoclaver 20 minutes à 121°C

glucose 3,75 g (50 ml d'une solution à 7,5%)

urée 15 g (150 ml d'une solution à 10%)

Remarques : Le milieu SP₂ étant très riche se contamine facilement.

Des essais ont été effectués en ajoutant le glucose au milieu et en autoclavant à 105°C pendant 30 minutes mais les risques de souillures sont très importants.

Nous avons donc ajouté stérilement après autoclavage du milieu à 121°C la solution de glucose préalablement tyndallisée ainsi que la solution d'urée stérilisée auparavant sur bougie de type Chamberland.

- résultats :

temps d'incubation en heures	SP ₂		SP ₂ $\frac{3}{4}$		SP ₂ $\frac{1}{2}$		SP ₂ $\frac{1}{4}$	
	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH
0	0,03	7,3	0,03	7,3	0,03	7,3	0,03	7,3
1	0,05	7,4	0,18	7,4	0,10	7,4	0,03	7,45
2	0,08	7,55	0,31	7,5	0,22	7,5	0,03	7,5
3	0,34	7,45	0,90	7,5	0,61	7,55	0,03	7,6
4	0,76	7,45	1,21	7,45	1,33	7,5	0,04	7,6

temps d'incubation en heures	SP ₂		SP ₂ $\frac{3}{4}$		SP ₂ $\frac{1}{2}$		SP ₂ $\frac{1}{4}$	
	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH
5	1,33	7,3	1,76	7,5	1,70	7,6	0,06	7,75
6	1,46	7,2	2,20	7,5	1,95	7,6	0,12	7,65
7	1,95	7	3,00	7,45	2,38	7,55	0,27	7,65
8	3,45	6,8	4,85	7,5	4,00	7,65	0,53	7,75
9	4,40	6,65	6,25	7,45	5,20	7,8	1,04	7,8
10	5,10	6,3	7,20	7,3	5,85	8,1	1,65	7,8
poids sec de cellules dans 100 ml de milieu :								
160 mg		208 mg		186 mg		24 mg		

rendement enzymatique en pourcentage d'hydrolyse (temps d'action égal 10 minutes) : milieu SP₂ glucosé : 66 - 65.

milieu SP₂ $\frac{3}{4}$ glucosé : 76 - 75

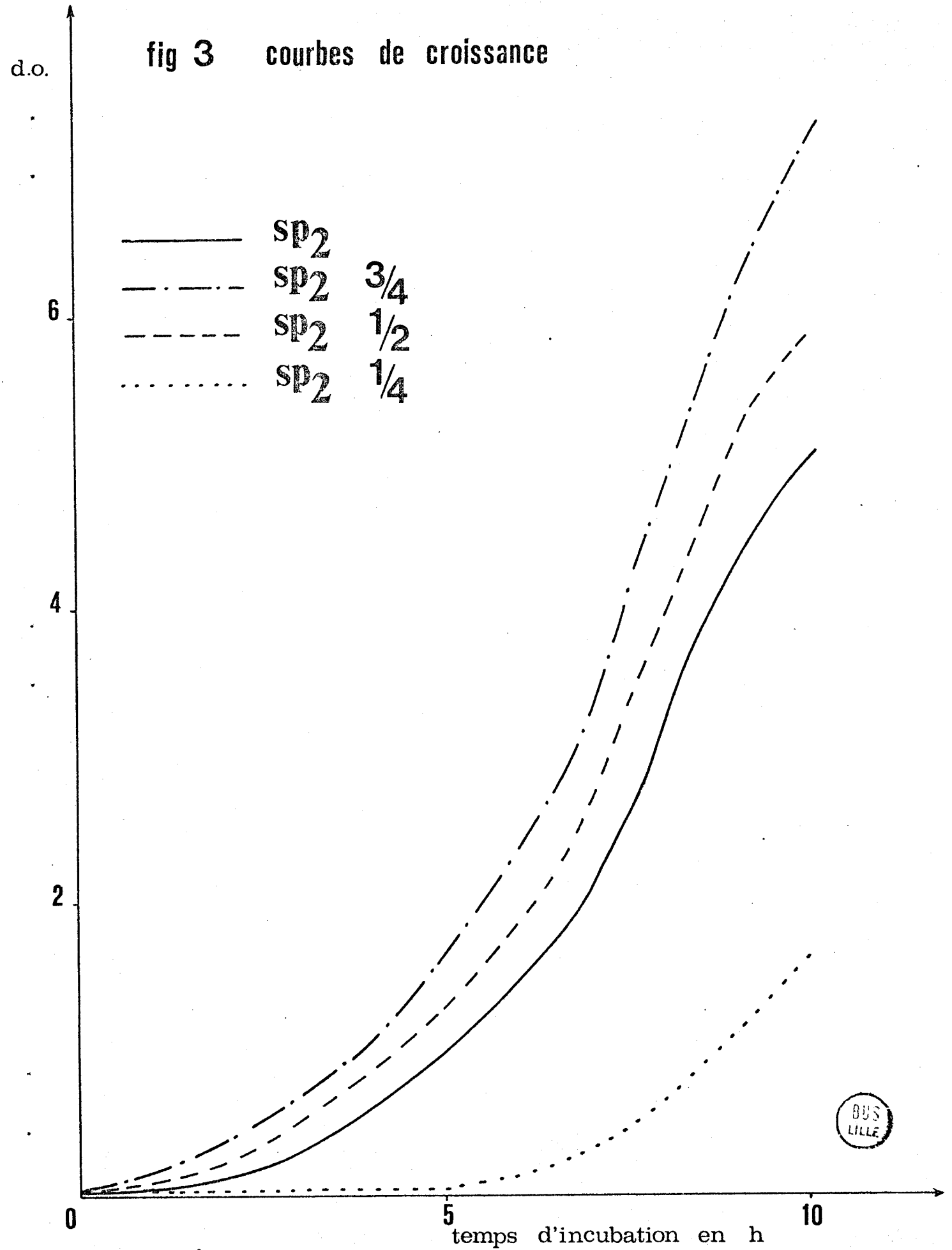
milieu SP₂ $\frac{1}{2}$ glucosé : 71,5 - 71,5

milieu SP₂ $\frac{1}{4}$ glucosé : 76,5 - 80

- conclusion :

Vu qu'il n'existe pas de différence considérable entre les pourcentages d'hydrolyse des 3 milieux contenant l'urée, le milieu SP₂ $\frac{3}{4}$ nous semble être le plus favorable car la croissance des cellules est rapide et la production abondante. Il est également à noter que, pour ce milieu, le pH reste équilibré tout au cours de la croissance. Cela peut s'expliquer par le fait que les microorganismes métabolisent à la fois le glucose, ce qui produit une diminution du pH par dégagement de CO₂, et l'urée, ce qui entraîne une augmentation du pH par formation d'NH₃.

fig 3 courbes de croissance



ph

fig 4 variation du ph

8

7

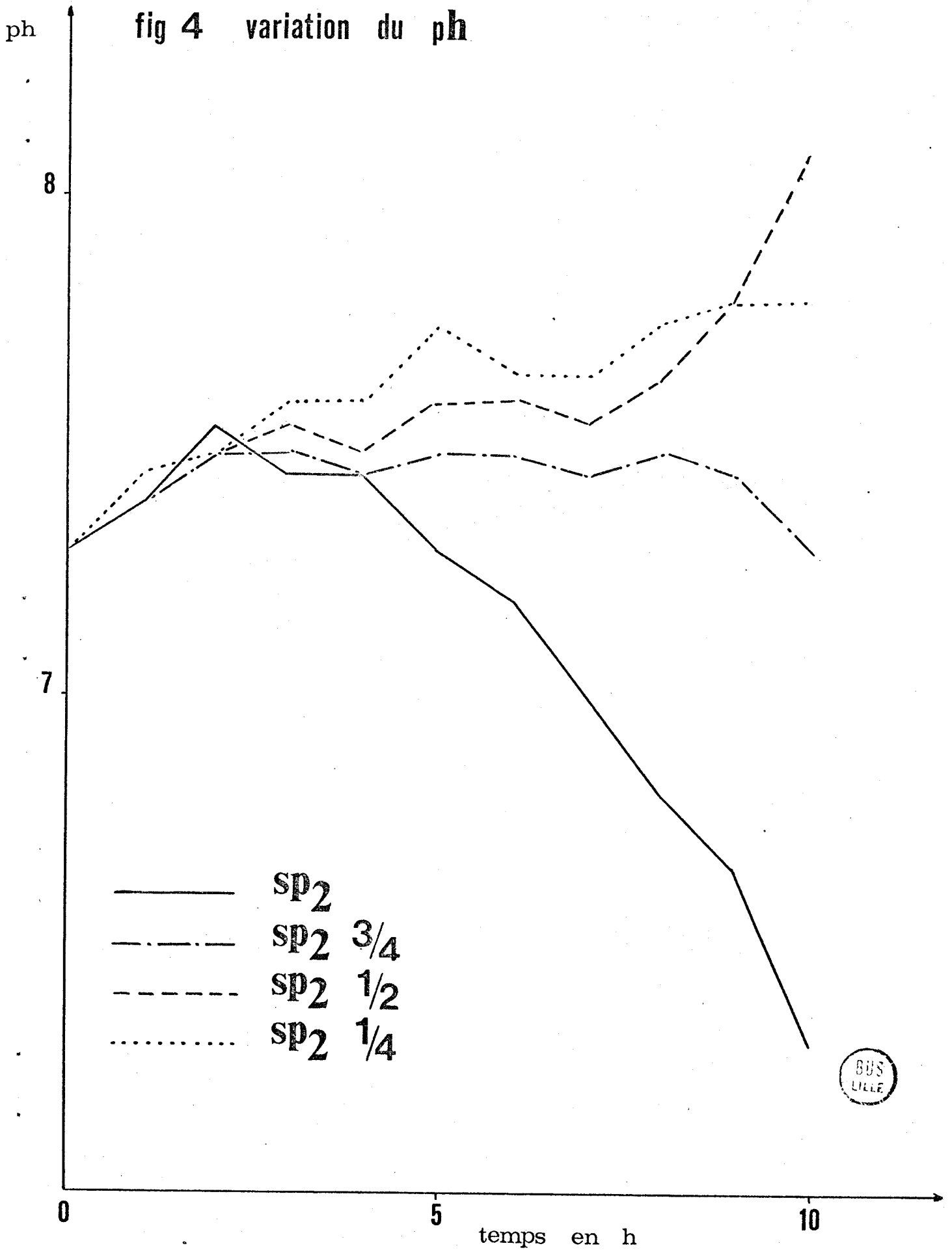
— SP2
- - - SP2 3/4
- - - SP2 1/2
... SP2 1/4

0

5

temps en h

10



3.2.2.3. Culture du milieu SP₂ $\frac{3}{4}$ glucosé en fermenteur.

Une culture en fermenteur nous permet d'obtenir une grande quantité de cellules. D'autre part, il est très intéressant d'étudier le comportement et le rendement de ce milieu en fermentation.

Le fermenteur BIOLAFITTE utilisé est d'une capacité de 15 litres.

- technique :

1 - stérilisation :

-autoclaver le fermenteur à vide pendant 2 heures à 121°C

-ajouter après autoclavage :

tryptone	:	126	g
extrait de levures	:	42	g
peptone	:	105	g
eau distillée	:	10,2	l

pH 7,3

-autoclaver de nouveau à 121°C pendant 1 heure $\frac{1}{2}$

-préparer séparément : solution de tampon phosphate :

K ₂ HPO ₄	:	252	g
KH ₂ PO ₄	:	28	g
eau distillée	:	1.000	ml

pH 7,3

autoclaver dans une fiole de précul-
ture à 105°C pendant 30 minutes.

solution d'urée :

urée	:	70	g
eau distillée	:	700	ml

stériliser sur filtre millipore.

solution de glucose :

glucose	:	157,5	g
---------	---	-------	---

eau distillée : 2.100 ml

autoclaver à 105°C pendant 30 min.

Les 3 solutions sont ajoutées dans le fermenteur au moment de l'ensemencement.

2 - préculture :

1,5 l de milieu sont ensemencés et mis sur shaker à 28°C pendant 14 heures.

3 - fermentation :

-mise en place de l'unité de fermentation et réglage automatique de la température à 37°C

-laisser la température se stabiliser et ajouter aseptiquement les différentes solutions ainsi que la préculture

-effectuer des lectures de densité optique à 600 nm et de pH toutes les 30 minutes

-en fin de phase exponentielle, centrifuger le milieu en continu

-après pesée des cellules (poids humide), laver celles-ci à 3 reprises par une solution stérile de KCl

-reprendre les cellules par du tampon phosphate pH 6,5

-conserver au congélateur.

Remarque : composition de la solution de KCl :

KCl : 11,5 g

tampon phosphate pH 8: 2,5 ml

porter à 1.000 ml avec de l'eau distillée

autoclaver pendant 20 minutes à 121°C

- résultats :

temps en heures	vitesse d'agitation en tours/min.	débit air l/min.	% O ₂	P ₁ /P ₂ en bars	pH	D.O.	antimousse 581/B 50%	remarques
0	400	3	21	2/0,5	7,3	0,60	2 ml	
½	-	-	-	-	7,4	1,05	0	
1	-	-	-	-	7,45	1,92	2 ml	
1½	-	-	-	-	7,65	2,75	2 ml	
2	500	5	-	2/0,7	7,85	4,45	0	
2½	-	-	-	-	8,15	6,40	0	+80ml HCl 3N
3	-	-	-	-	8,2	8,00	2 ml	+80ml HCl 3N
3½	-	-	-	-	8,15	9,30	0	+40ml HCl 3N
4	-	-	-	-	8,05	10,50	2 ml	
4½	-	-	-	-	7,9	11,20	0	
5	600	6	-	2/0,9	7,8	11,75	2 ml	
5½	-	-	-	-	7,75	12,10	0	

poids humide des cellules obtenues : 255,5 g pour 15 litres de milieu

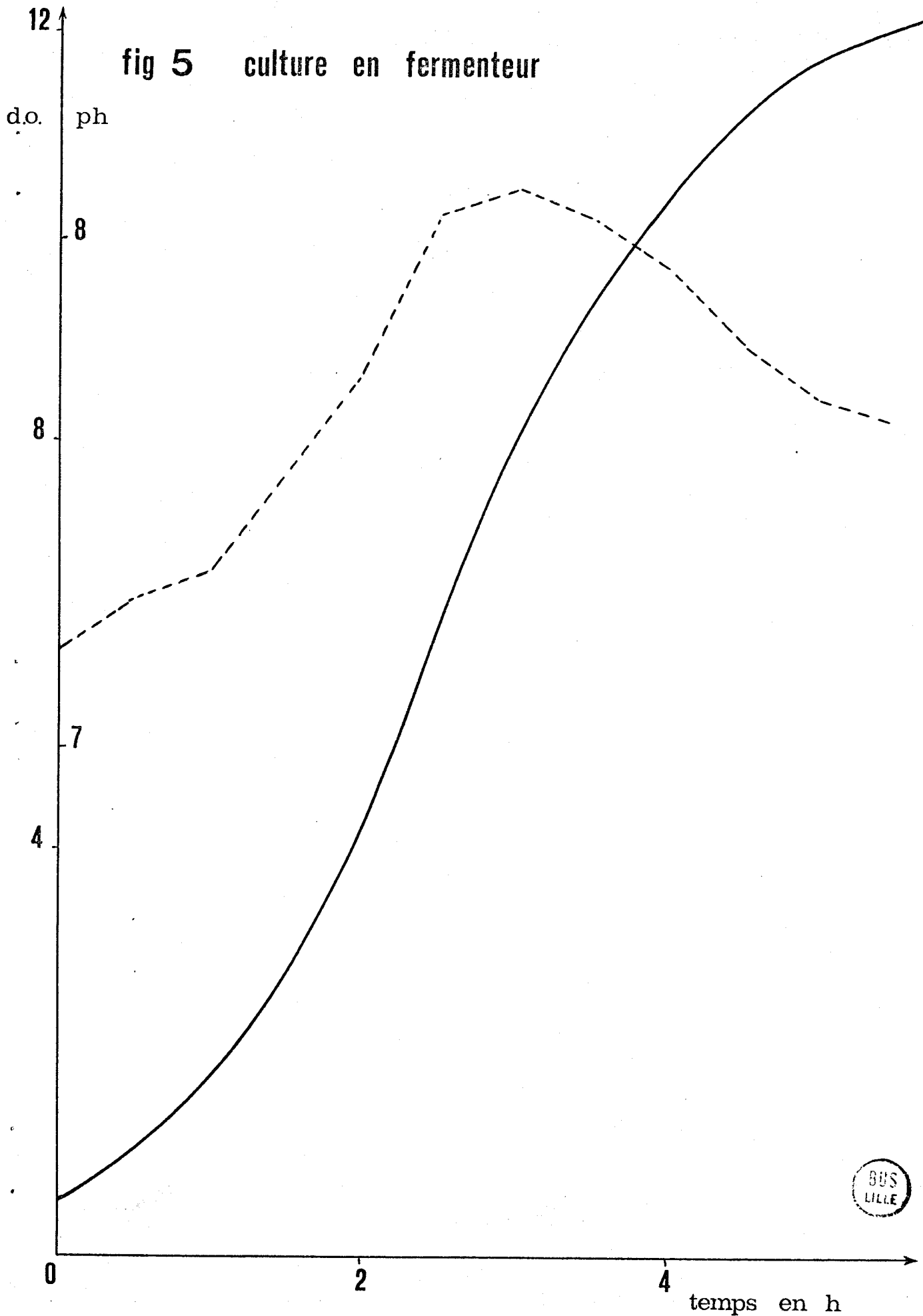
poids sec = 54 g.

- conclusion :

Nous constatons que le milieu en fermenteur se comporte de façon quelque peu différente par rapport à l'étude précédente. Nous obtenons un bon rendement en cellules et une croissance rapide. La forte augmentation de pH a dû être stoppée par l'addition d'acide fort.



fig 5 culture en fermenteur



3.2.2.4. Mode d'expression de la concentration en cellules.

La concentration en cellules est déterminée en vue de connaître le rendement de production d'un milieu de culture et de préparer à partir d'une suspension une quantité de cellules nécessaire à une réaction enzymatique. Dans le cas présent, il nous est impossible de quantifier l'uréase des cellules. Cette manipulation étant assez longue, nous choisissons d'effectuer une lecture de densité optique en relation avec le poids sec.

- technique :

Etablissement d'une droite d'étalonnage.

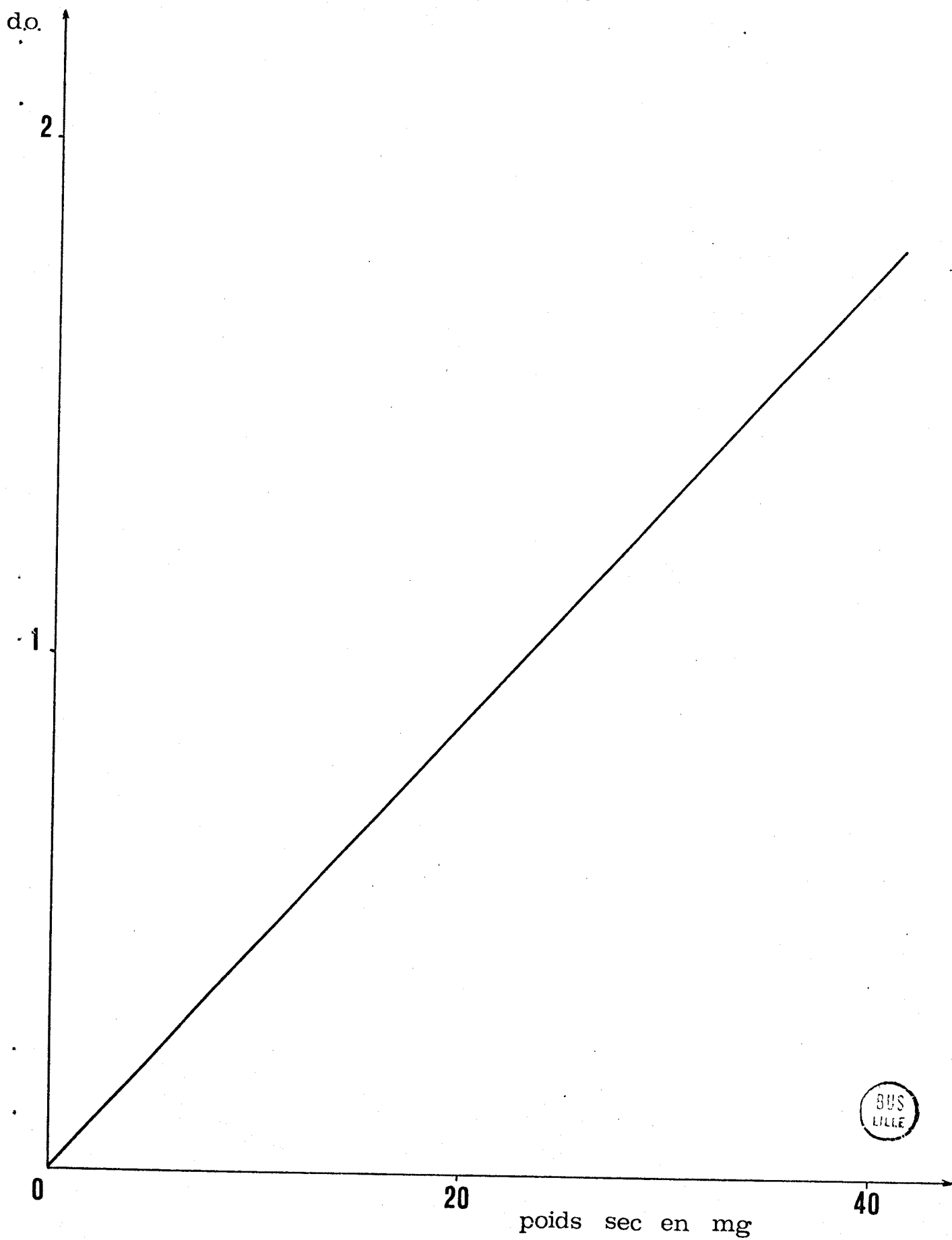
A partir de différentes suspensions microbiennes jeunes, nous allons effectuer les mesures suivantes :

- 1 - détermination du poids sec par passage au four à 105°C et pesée jusqu'à poids constant
- 2 - détermination de la densité optique d'une dilution au cinquième de chaque suspension afin de se ramener dans la gamme possible de lecture au spectrophotomètre (longueur d'onde = 600 nm)
- 3 - comptage par ensemencement sur gélose ordinaire après dilution d'une suspension bactérienne.

- résultats :

poids sec pour 1 ml de suspension	D.O. 600 nm
43,3 mg	1,90
21,5 mg	0,95
10,5 mg	0,475
5,2 mg	0,235
16,3 mg	0,735

fig 6 expression de la concentration en cellules

BUS
LILLE

comptage : 16,3 mg contiennent $1,8 \cdot 10^{11}$ cellules

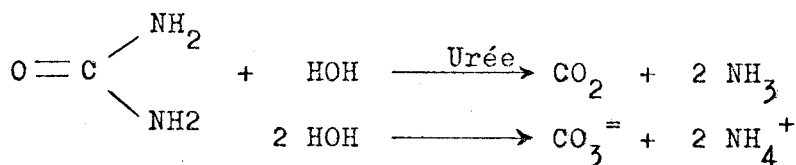
1 mg contient $1,08 \cdot 10^{10}$ cellules.

Remarque : Travaillant dans cette gamme de concentration, la densité optique est directement proportionnelle au poids sec et celui-ci est évidemment en relation avec le nombre de cellules. (Voir fig.6)

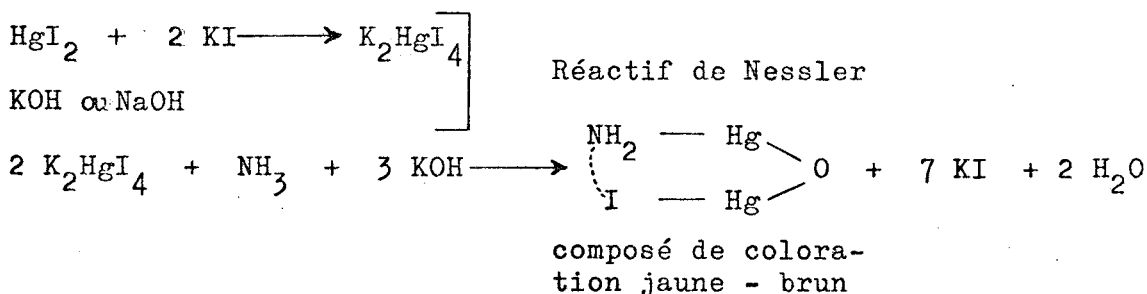
3.2.3. ETUDE DE L'ACTIVITE UREASIQUE DES CELLULES EN SUSPENSION LIBRE.

3.2.3.1. Matériel et méthodes.

- principe : le processus d'hydrolyse enzymatique de l'urée se résume donc à la réaction suivante :



Afin de connaître le pouvoir enzymatique de l'uréase bactérienne, nous allons mesurer le pourcentage d'hydrolyse de l'urée. L'ion NH_4^+ formé est stoechiométriquement proportionnel à la quantité d'urée hydrolysée. Le réactif de Nessler forme avec NH_4^+ un composé de couleur jaune-brun spectrophotométable. Il agirait de la façon suivante (28) :



Cette méthode permet de doser de très faibles quantités d' NH_4^+ (0,5 ppm) mais est malheureusement très sensible. Les solutions à doser doivent être exemptes de toute trace de matières organiques.

- réactifs :

-enzyme : suspension de cellules de *Proteus morganii* cultivées en milieu SP₂ $\frac{3}{4}$ glucosé et dont la concentration a été mesurée par lecture de densité optique. L'enzyme est libérée par traitement des cellules au toluène.

-solution d'urée : origine : Prolabo Rhône-Poulenc.

Solution préparée dans de l'eau distillée exempte d' NH_4^+ et à conserver en chambre froide.

-tampon pH 6,5 : solution 0,1 M de K_2HPO_4 et KH_2PO_4 .

Origine des produits : Prolabo Rhône-Poulenc.

-réactif de Nessler : solution A :

iodure de potassium (Prolabo)	20 g
iodure mercurique (Prolabo)	30 g
eau distillée	50ml

-chauffer jusqu'à dissolution

-ajouter 150 ml d'eau distillée et laisser reposer la solution pendant 24 heures à l'abri de la lumière

-filtrer dans une fiole jaugée de 250 ml et porter au trait avec de l'eau distillée

-conserver cette solution à l'abri de la lumière.

solution B : NaOH (Prolabo)	50 g
eau distillée	150 ml

-dissoudre et compléter à 250 ml avec de l'eau distillée.

réactif d'emploi : mélanger extemporanément les solutions A et B volume à volume. (Stabilité : 4 heures environ)

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau distillée exempte d'ammoniaque.

- mode opératoire :

1 - processus enzymatique :

La méthode suivante est très générale et peut être modifiée suivant les besoins de l'expérience (modifications de la quantité de solution utilisée). Pour chaque essai, nous notons les conditions de travail.

Méthode :

-introduire dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 ml :

- . solution d'urée à 2x ppm : 50 ml
- . tampon pH 6,5 (ou pH étudié) : 25 ml
- . suspension de bactéries lysées : y ml

compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

-placer la fiole au bain-marie agité à 37°C ou à la température étudiée.

-après un temps d'action déterminé, prélever une partie aliquote (10 ml) et ajouter 0,2 ml de KOH concentré. L'activité enzymatique est ainsi stoppée.

2 - dosage de l'ion NH_4^+ :

-centrifuger la solution prélevée à 10.000 tours/minute pendant 10 minutes pour éliminer les cellules en suspension.

-prélever 3 ml de solution contenant de 0 à 20 ppm d' NH_4^+ .

-effectuer si nécessaire des dilutions dans de l'eau distillée afin de se ramener dans la gamme possible de dosage.

-ajouter 0,3 ml de réactif de Nessler et laisser la coloration se développer pendant 5 minutes.

-effectuer une lecture de densité optique à 430 nm.

Appareil utilisé : Spectrophotomètre U.V.

M.Jean et R.Constant N° 5055

Domaine de longueur d'onde : 220 à 1.000 nm

Prolabo Paris.

Remarques : -le témoin est constitué par 3 ml d'eau distillée plus 0,3 ml de réactif de Nessler.

-stabilité de la coloration : 2 à 3 heures.

- établissement de la courbe d'étalonnage:

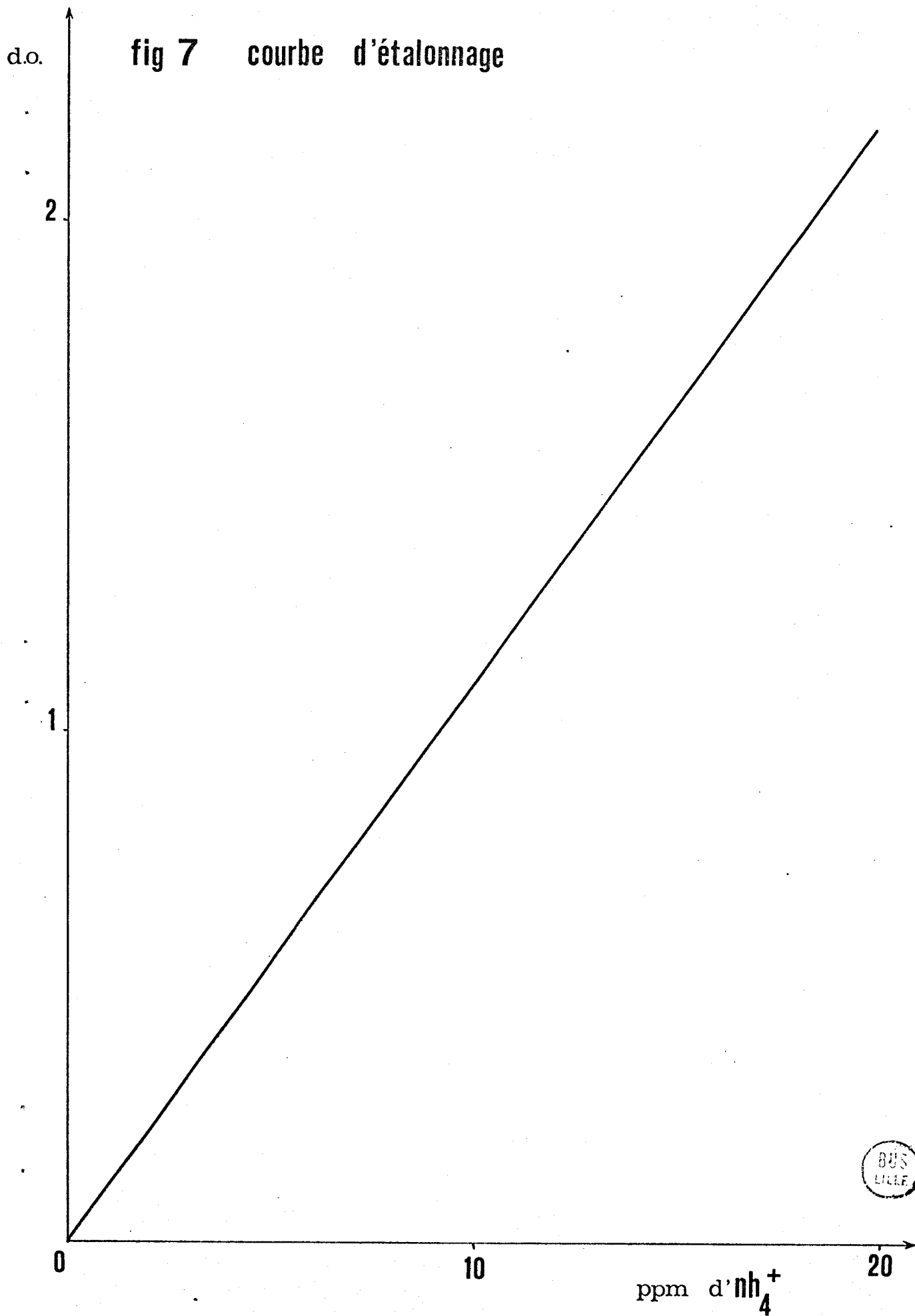
Les solutions contenant de 0 à 20 ppm en NH_4^+ sont préparées à partir d' $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Résultats :

Concentration en ppm d' NH_4^+	D.O. 430 nm
0	0
1	0,10
5	0,545
7,5	0,82
10	1,105
15	1,67
20	2,215



fig 7 courbe d'étalonnage

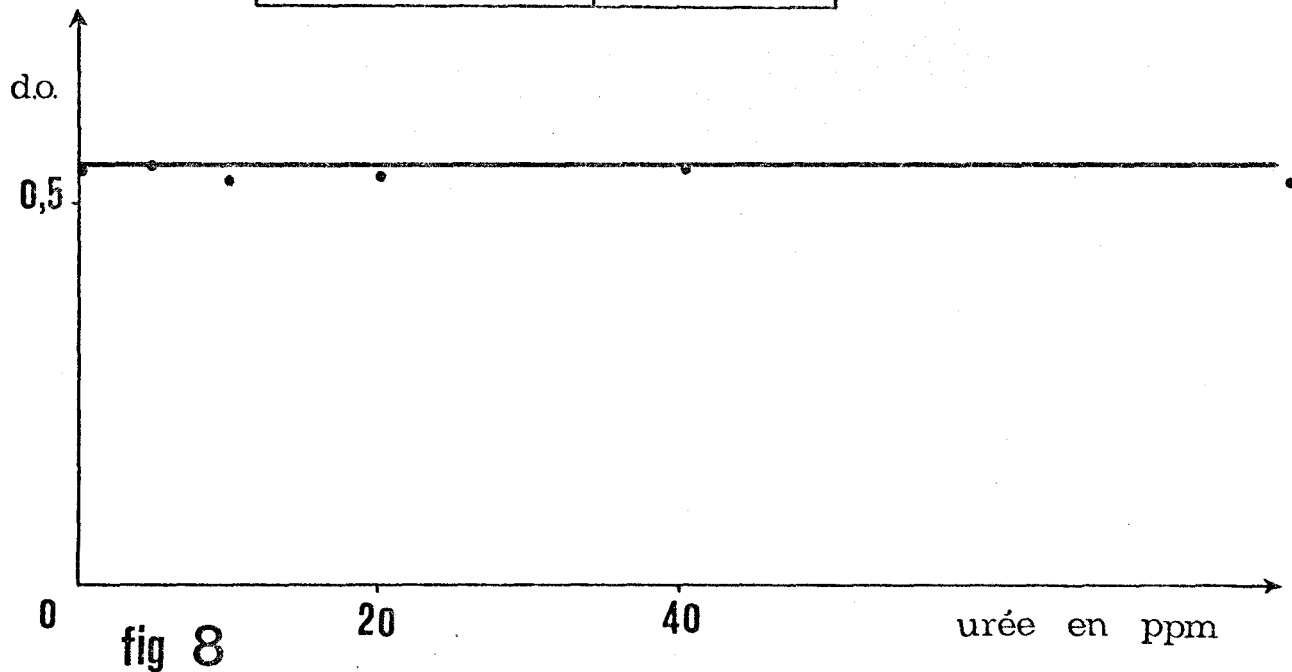


- étude de l'interférence de l'urée :

Résultats :

solution d' NH_4^+ à 5 ppm.

concentration en ppm d'urée	D.O. 430 nm
0	0,545
5	0,55
10	0,53
20	0,54
40	0,545
80	0,53



Il n'y a aucune interférence possible de l'urée.

Remarque : Exemple de calcul du pourcentage d'hydrolyse.

Une solution d'urée est à la concentration de 50 ppm, ce qui correspond lors d'une hydrolyse totale à 30 ppm d' NH_4^+ formé.

Une dilution aux $\frac{2}{3}$ permet de ramener la concentration en NH_4^+ dans la gamme possible de dosage.



La lecture au spectrophotomètre nous donne une densité optique égale à 1,17 ce qui correspond, par référence à la courbe d'étalonnage, à une concentration en NH_4^+ égale à 10,6 ppm.

$$\text{Pourcentage d'hydrolyse} = \frac{10,6 \times 100}{20} = 53\%$$

3.2.3.2. Etude du rapport cellules/substrat.

- conditions d'expérience : $t^\circ = 37^\circ\text{C}$

pH = 6,7

l'hydrolyse de l'urée est étudiée en fonction du temps d'action des cellules.

- résultats :

rapport $\frac{[\text{cellules}]}{\text{substrat}}$	% d'hydrolyse après des temps d'action de :										
	5'	10'	15'	20'	30'	45'	1h	1h15'	1h30'	2h	3h
0,05		4	6		11,5	15	20,5	26	30,5	39	60
0,1		10	20		25	29	38	51	56	80	80
0,25		28		47		78	83		90	94	94
0,5		53	71	83,5	95	97,5	100	100	100	100	100
1	50	84	95	100	100	100	100	100	100	100	100

Les courbes d'hydrolyse de l'urée par les cellules bactériennes répondent bien à celles de la cinétique enzymatique.

3.2.3.3. Etude des conditions optimales d'hydrolyse.

3.2.3.3.1. Etude du pH.

- conditions : $\frac{[\text{cellules}]}{\text{substrat}} = 0,5$

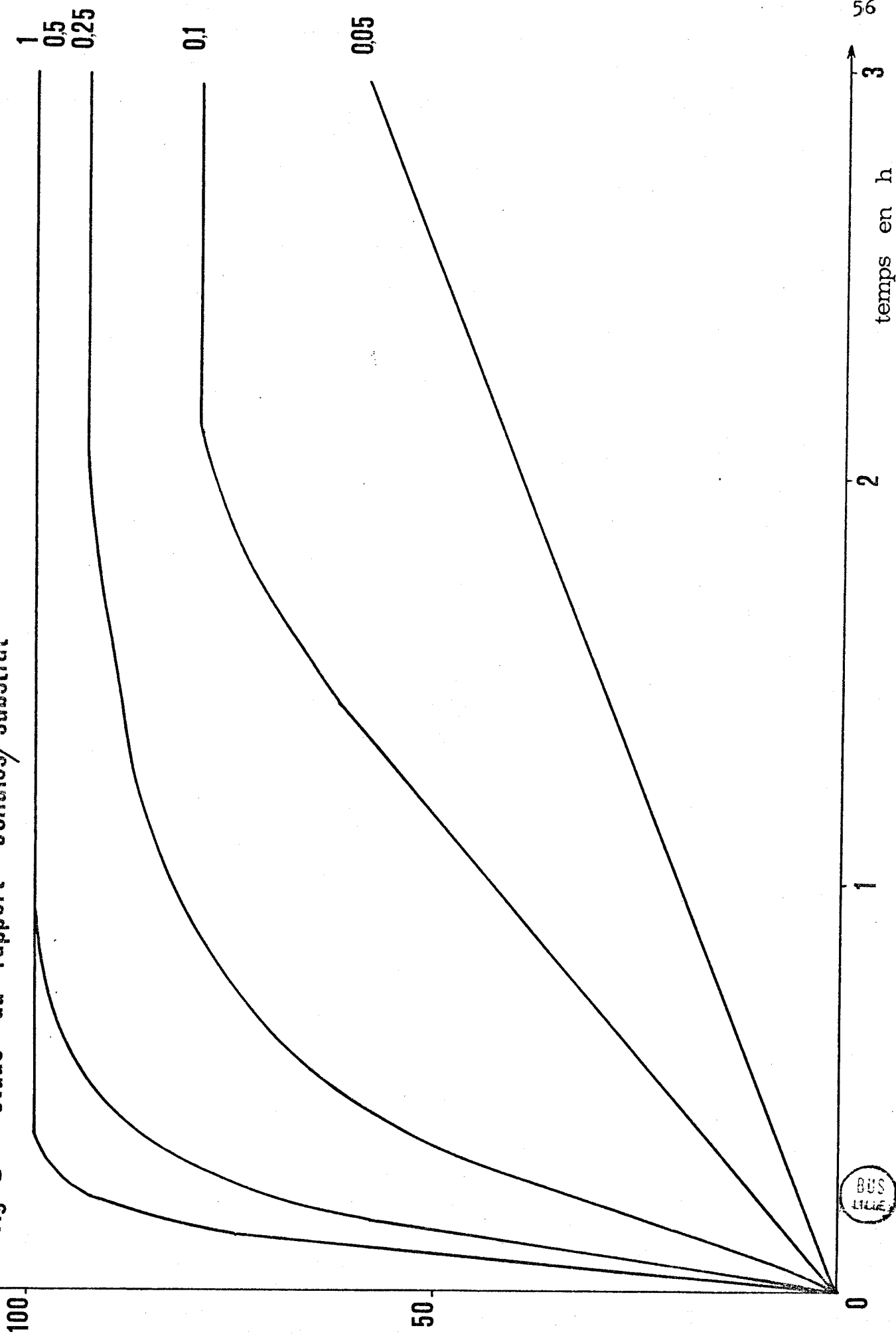
$t^\circ = 37^\circ\text{C}$

temps d'action = 15 minutes

pH = variable (stabilisé par des tampons phosphates 0,1M)

hydrolyse
en %

fig 9 étude du rapport cellules/substrat



- résultats :

pH	% d'hydrolyse
5	47,5
6	68
6,5	74
6,7	71
7	44
7,5	13
8	3
9	0
11	0

(voir fig.10)

3.2.3.3.2. Etude de la température.

- conditions : $\frac{\text{cellules}}{\text{substrat}} = 0,5$

pH = 6,7

temps d'action = 15 minutes.

- résultats :

t°	% d'hydrolyse
23	58
30	65
37	71
45	75
55	77

(voir fig.11)

3.2.3.3.3. Conclusion.

Le pH optimum de 6,5 est retenu pour la suite des essais. Le pH a énormément d'importance et doit être fixé avec précision. La température a par contre peu d'effet sur l'hydrolyse de l'urée.



fig 10 influence du pH

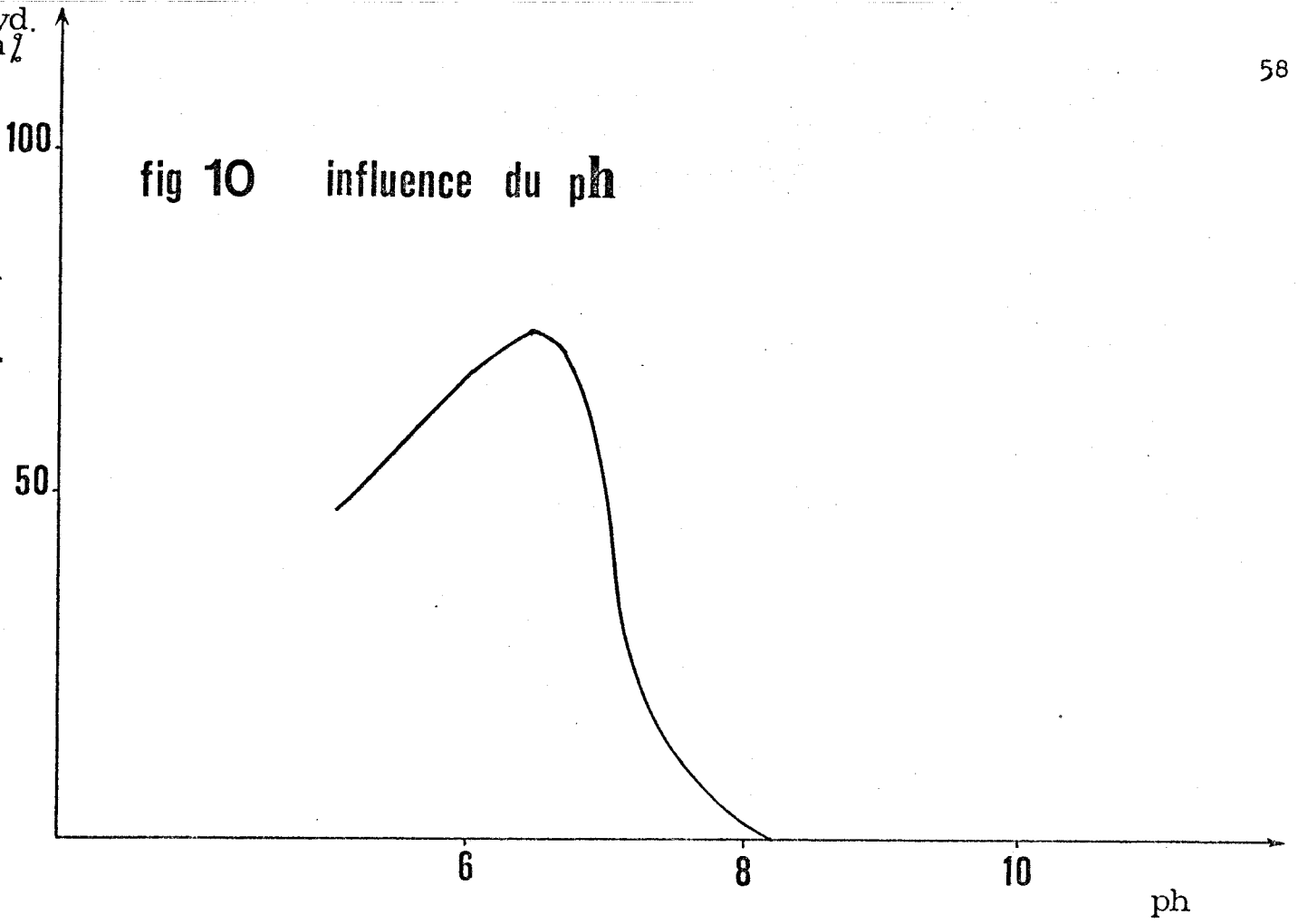
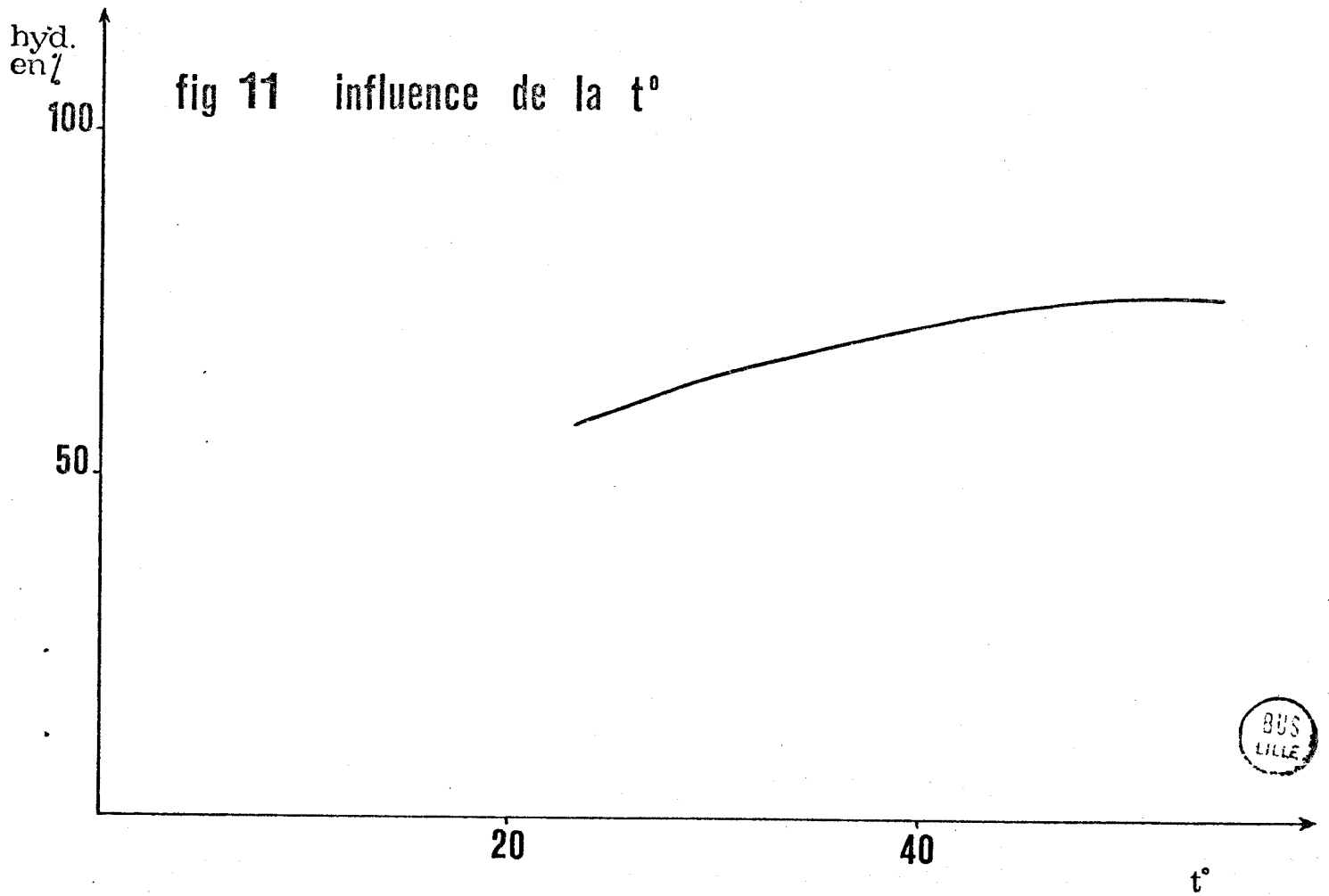


fig 11 influence de la t°



3.2.3.4. Détermination de la constante de Michaëlis-Menten.

Représentation selon Lineweaver-Burk.

- conditions d'expérience : dans un erlenmeyer de 100 ml placer :

-suspension de cellules à 0,3 mg/ml : 1 ml

-eau distillée : 4 ml

-tampon phosphate pH 6,5 : 2,5 ml

-urée à une concentration 4x : 2,5 ml

total : 10 ml.

placer les fioles à 37°C pendant 5 minutes,

déterminer par l'intermédiaire du dosage

de Nessler la quantité d'urée hydrolysée.

- résultats :

substrat en ppm	substrat en mM	nombre de ppm hydrolysés	nombre de mM hydrolysées	V (en mM/min)	1/V	1/S
20	0,333	17,1	0,285	0,057	17,5	3
30	0,5	22,2	0,37	0,074	13,5	2
40	0,666	24,7	0,41	0,082	12,2	1,5
50	0,833	30	0,5	0,1	10	1,2
75	1,25	35	0,585	0,117	8,5	0,8
100	1,66	37,4	0,625	0,125	8	0,6

D'après la figure 12, nous avons $-\frac{1}{K_m} = -1,38 \text{ milliM}^{-1}/\text{litre}$

$$K_m = 0,728 \cdot 10^{-3} \text{ Moles/litre.}$$

Les valeurs de K_m données par la littérature varient fortement selon l'origine de l'enzyme, il est difficile de juger de la valeur ci-dessus. Le K_m trouvé est quelque peu inférieur au K_m obtenu à partir d'uréase provenant de fève de Jack (49).

$1/v$
en mm/min

15

10

5

0

-1

1

2

3

$1/v$ en mm²/l

60

fig 12 représentation de lineweaver-burk



Chapitre 4

ETUDE ENZYMATIQUE

DES CELLULES IMMOBILISEES

4.1. procédé d'immobilisation des cellules dans le gel de polyacrylamide

Le procédé utilisé est donc l'inclusion de cellules de *Proteus morgani* à l'intérieur d'un gel en réseau dont les pores, trop petits, empêchent les bactéries emprisonnées de se libérer.

C'est en se basant sur une étude réalisée par P.LENOIR (38) que nous avons choisi le gel de polyacrylamide comme support d'emprisonnement des cellules. P.Lenoir parvient à immobiliser des cellules d'*Escherichia coli* en vue d'étudier l'activité enzymatique de leur β -galactosidase. Les résultats obtenus sont très prometteurs en ce qui concerne ce mode de fixation.

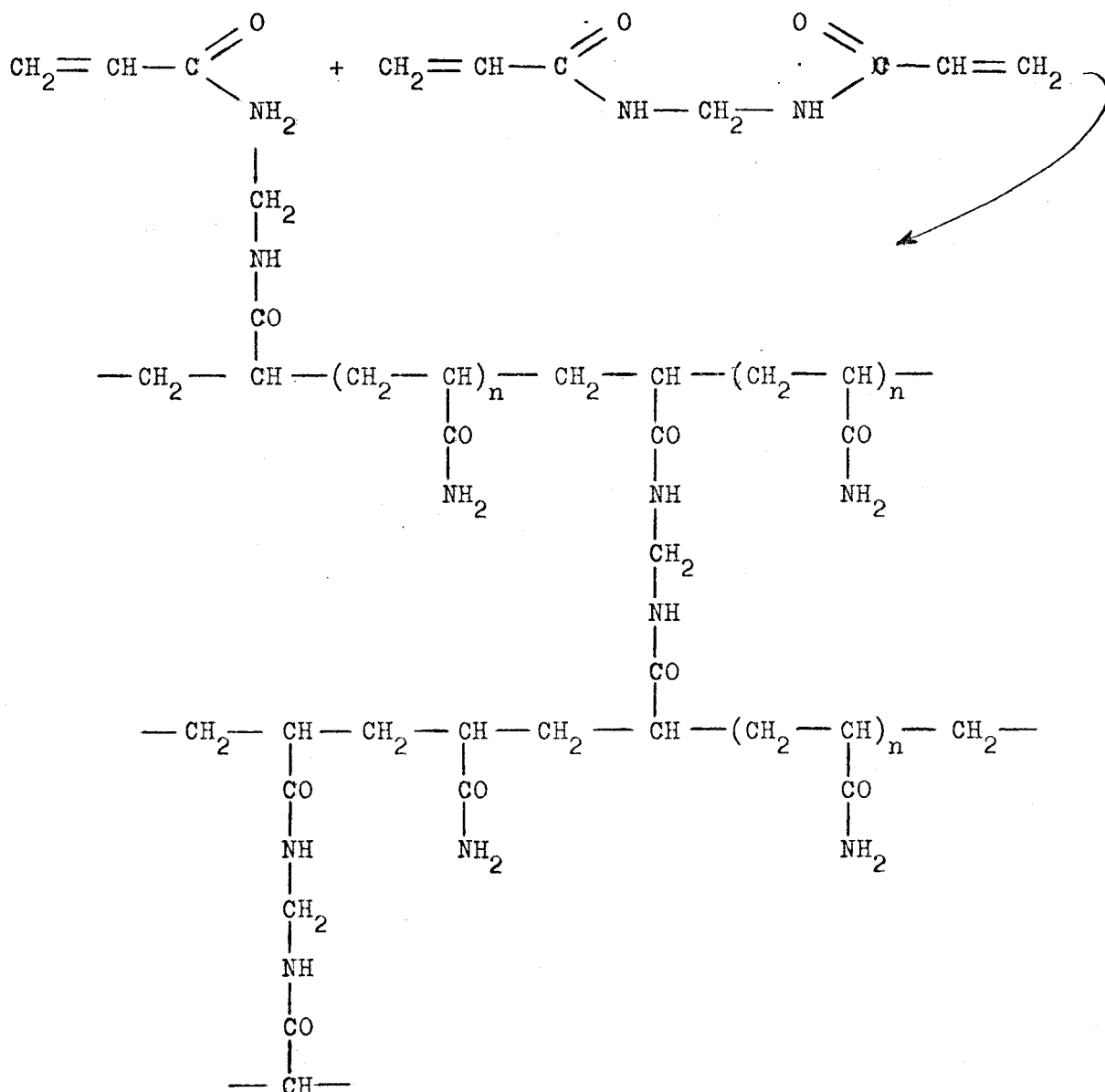
Il semble que ce procédé permette la fixation totale des cellules. De plus la préparation de ce système enzymatique insoluble ne présente aucune difficulté et s'effectue rapidement.

4.1.1. DESCRIPTION DU PROCESSUS D'IMMOBILISATION.

Le système enzymatique est formé par polymérisation d'une solution de monomère contenant des cellules bactériennes en suspension.

Le support d'emprisonnement des cellules est donc le gel de polyacrylamide; résultat d'une polymérisation du monomère : l'acrylamide $\text{NH}_2\text{—CO—CH=CH}_2$ avec une réticulation due à la présence du comonomère le N, N'-méthylènebisacrylamide $\text{CH}_2\text{=CH—CO—NH—CH}_2\text{—NH—CO—CH=CH}_2$. Nous obtenons ainsi un gel réticulé formé de longues chaînes plus ou moins anastomosées à configuration tridimensionnelle.

Structure du gel de polyacrylamide (58) :



La polymérisation radicalaire s'effectue en ajoutant comme catalyseur un système rédox qui fournit des radicaux libres.

Les systèmes utilisés sont :

soit le persulfate d'ammonium ou de potassium + N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) dans lequel le persulfate fournit des radicaux oxygènes libres,

soit riboflavine + TEMED qui entraîne une polymérisation photochimique.

Le gel est une matière inerte et neutre dont l'élasticité

et la dureté dépendent de la concentration en monomère. Dans ce réseau tridimensionnel, les groupements "amide" déterminent la polarité et par là le gonflement dans l'eau (23).

Le gel de polyacrylamide est vendu sous le nom commercial de Cyanogum 41 (44). Il peut être utilisé en électrophorèse (19) et aussi comme tamis moléculaire dans les techniques de filtration sur gel. Il est également employé pour immobiliser des enzymes purifiées : Y.DEGANI et T.MIRON (22) fixent la cholinestérase tandis que S.AMOTZ (1) prépare un dérivé insoluble de lysine. BUNTING et K.J. LAIDLER (14) choisissent le gel de polyacrylamide utilisé en fine membrane pour étudier la cinétique de la β -galactosidase immobilisée.

4.1.2. PREPARATION DU GEL DE POLYACRYLAMIDE.

4.1.2.1. Réactifs.

1 - solutions de monomère :

Acrylamide et N,N'-méthylènebisacrylamide (M.B.A.)

Origine : Merck - Schuchardt, 8011 Hohenbrunn bei München.

Apelab, 35, rue des écoles, 92 Bagneux France.

La solution aqueuse de monomère utilisée lors de la polymérisation contient les 2 produits ci-dessus. Les solutions doivent être conservées en chambre froide. Il est nécessaire de prendre certaines précautions lors de leur manipulation car les solutions d'acrylamide sont très irritantes pour la peau.

Remarque : L'acrylamide utilisé provient de deux firmes différentes (Merck - Apelab). Vu la très grande différence de prix entre ces deux firmes, nous avons testé dans les mêmes conditions des gels fabriqués d'une part avec l'acrylamide Merck et d'autre part avec l'acrylamide

Apelab. Une étude statistique basée sur la comparaison des variances nous a permis de mettre en évidence la différence éventuelle entre les 2 produits.

-conditions d'expérience :

Etude sur colonne du pourcentage d'hydrolyse des gels :

colonne : type 14 (voir plus bas)

quantité de gel : 1 g

T (concentration en monomère total) = 7,5%

C (concentration en M.B.A.) = 5%

concentration en cellules : 0,4 mg/g de gel

t° = 37°C

pH = 6,5

débit = 1,25 ml/minute

la solution d'urée à hydrolyser par passage sur colonne est à la concentration de 33,3 ppm.

-résultats :

MERCK			APELAB		
% d'hydrolyse (x_1')	$x_1 = x_1' - 40$	x_1^2	% d'hydrolyse (x_2')	$x_2 = x_2' - 40$	x_2^2
45	5	25	52	12	144
47,5	7,5	56,25	49	9	81
45,5	5,5	30,25	45,5	5,5	30,25
49	9	81	54	14	196
42,5	2,5	6,25	47,5	7,5	56,25
51,5	11,5	132,25	48	8	64
48	8	64	55	15	225
47,5	7,5	56,25	54,5	14,5	210,25
57,5	17,5	306,25	46,5	6,5	42,25

MERCK			APELAB		
% d'hydrolyse (x_1')	$x_1 = x_1' - 40$	x_1^2	% d'hydrolyse (x_2')	$x_2 = x_2' - 40$	x_2^2
61	21	441	54	14	196
48	8	64	51,5	11,5	132,25
51,5	11,5	132,25	52	12	144
48	8	64	42,5	2,5	6,25
44	4	16	52	12	144
45	5	25	56	16	256
45,5	5,5	30,25	43	3	9
$Sx_1 = 137 \quad Sx_1^2 = 1.530$ $\overline{x_1} = 8,5$			$Sx_2 = 163 \quad Sx_2^2 = 1.936,5$ $\overline{x_2} = 10$		
Somme des carrés = $Sx^2 - \frac{(Sx)^2}{n}$					
Variance = $\frac{\text{Somme des carrés}}{n - 1}$					
$S_{\text{Merck}} = 1.530 - \frac{(137)^2}{16} = 357$			$S_{\text{Apelab}} = 1.936,5 - \frac{(163)^2}{16} = 276,7$		
Variance Merck = $\frac{357}{15} = 23,8$			Variance Apelab = $\frac{276,7}{15} = 18,4$		

Test de Fisher de comparaison de 2 variances (47).

$$F = \frac{V_M}{V_A} = \frac{23,8}{18,4} = 1,293$$

La table de Fisher nous donne pour des D.L. de 15 au numérateur

15 au dénominateur

les valeurs suivantes de F :

seuil de probabilité	F
10 %	2
5 %	2,4
1 %	3,5



La valeur trouvée étant inférieure à la valeur des tables, il n'existe pas de différence significative entre les 2 variances. Les 2 produits sont donc considérés comme identiques, cependant l'acrylamide vendu par Merck est choisi car son prix est nettement inférieur au prix de l'acrylamide Apelab.

2 - solutions de catalyseurs :

-N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED)

(Koch-light laboratories Ltd , Colnbrook-Bucks England)

La solution d'emploi à 5% dans de l'eau distillée est à conserver en chambre froide et à l'abri de la lumière.

-K₂S₂O₈ (Prolabo France)

Solution d'emploi à 5% dans de l'eau distillée.

4.1.2.2. Mode d'expression de la concentration en monomère d'un gel.

Tout gel préparé peut être désigné par 2 chiffres : le premier indique la concentration en monomère total (T %), le second la concentration partielle en M.B.A. (C %)

T % = pourcentage total en monomère

$$= \frac{\text{poids d'acrylamide} + \text{poids de M.B.A.}}{\text{poids du gel}} \times 100$$

C % = pourcentage partiel en M.B.A.

$$= \frac{\text{poids de M.B.A.}}{\text{poids d'acrylamide} + \text{M.B.A.}} \times 100$$

Exemple : Un gel (7,5 - 5) contient 7,5% de monomère total dont 5% de M.B.A.

4.1.2.3. Polymérisation du gel.

- préparer des solutions mères de monomère en tenant compte des concentrations finales (T et C) après polymérisation.

- préparer une suspension bactérienne de concentration déterminée dans une solution tampon à pH 6,5. Une goutte de Tween 80 est ajoutée à la suspension afin de mouiller les cellules et de faciliter ainsi leur inclusion dans le gel.
- prélever 1,2 ml de solution de monomère et ajouter 0,8 ml de suspension microbienne.
- agiter et placer le tube dans un bain de glace fondante en vue de protéger le matériel enzymatique.
- ajouter 0,2 ml de TEMED et 0,2 ml de la solution de $K_2S_2O_8$.
- la polymérisation s'effectue au cours des 5 premières minutes mais nous laisserons le gel pendant 30 minutes dans le bain de glace.

Remarques : -des essais de polymérisation ont été effectués sans l'utilisation de bain de glace. La température atteinte à l'intérieur du gel était de 45 - 50°C.

-les quantités de solutions données ci-dessus permettent de fabriquer 2,4 g de gel environ (à contrôler par pesée). Pour des fabrications plus importantes, il est souhaitable de conserver les mêmes proportions entre les différents réactifs ajoutés.

4.1.2.4. Découpage du gel.

Le gel est découpé après polymérisation par passage sur grille métallique donnant des cubes de 1 mm d'arête. La dimension des particules influence le pourcentage d'hydrolyse de l'urée. Lors de cette étude, ce paramètre de fabrication reste constant.

4.1.2.5. Perméabilisation des cellules.

Immédiatement après le découpage, une quantité déterminée

de gel est pesée avec précision et est placée dans une solution de tampon phosphate pH 6,5 0,05 M.

La perméabilisation des cellules s'effectue alors par ajout de quelques gouttes de toluène. La solution (gel-tampon pH-toluène) est placée après agitation en chambre froide pendant 24 heures. C'est dans cette solution que se produit le gonflement du gel.

4.1.2.6. Conservation du gel.

Après 24 heures, le gel est lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée et est finalement remis en suspension dans le tampon pH 6,5. Il peut être utilisé immédiatement mais on peut aussi le stocker en chambre froide (voir test de viabilité).

Certains auteurs (33) conservent des préparations enzymatiques insolubles (gels) sous forme lyophilisée et remarquent une meilleure conservation par rapport à la forme hydratée. Cela dépend évidemment de la nature de l'enzyme fixée.

4.1.3. EXAMEN MICROSCOPIQUE DU GEL.

Il nous paraît très intéressant d'observer le gel au microscope afin de se rendre compte de la répartition des cellules incluses.

- technique :

Le gel (7,5 - 5) contenant 1 mg de cellules par g est découpé en languettes de 4 mm² de section environ.

-placer les languettes à 55°C pendant 1 heure $\frac{1}{2}$. Cela nous permet d'obtenir un gel dur plus facile à découper.

-découper en lamelles minces.

-placer les préparations dans une solution de Fuchsine de Ziehl (15).

- laisser en contact pendant 10 secondes.
- laver à l'eau.
- monter la coupe entre lame et lamelle et examiner à l'immersion.
- grossissement : 630 fois.
- observations :

Par cette technique, seules les bactéries sont visibles. Des essais ont été faits afin de pouvoir colorer le gel mais aucun résultat n'a été obtenu. Certains colorants pourraient se fixer sur des chaînes terminales libres du gel. Le vert de méthyl et le vert d'iode utilisés avant polymérisation se trouvent décolorés une fois que le gel s'est formé.

Le gel de polyacrylamide reste un matériel très difficile à découper. Les cellules observées sont situées à des niveaux différents : cela explique le manque de netteté des clichés.

Les cellules sont réparties uniformément dans le gel.

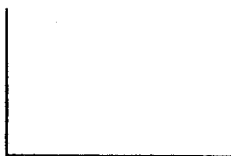


photo I : gel de polyacrylamide avec cellules de *Proteus morganii*.

4.2. matériel et techniques d'hydrolyse

4.2.1. ETUDE EN "BATCH"

L'hydrolyse de l'urée s'effectue dans ce cas d'une façon similaire à l'hydrolyse réalisée par de l'uréase purifiée ou bien par une suspension libre de cellules bactériennes.

Une quantité déterminée de gel (exprimée en g de gel non gonflé) est placée dans un récipient contenant une solution d'urée tamponnée à pH 6,5. L'hydrolyse a lieu en bain-marie agité à 37°C pendant un temps déterminé. Le pourcentage d'hydrolyse est obtenu par la méthode au réactif de Nessler en donnant la quantité d'ammoniac présente dans le mélange.

Mode opératoire : (valable pour la plupart des essais réalisés en "batch")

Il est parfois nécessaire de modifier certains paramètres mais nous veillerons à conserver les mêmes proportions en réactifs que ci-dessous :

-placer dans un erlenmeyer de 100 ml :

- . gel de polyacrylamide + cellules : 1 g
- . tampon pH 6,5 : 2,5 ml
- . solution d'urée : 2,5 ml

-porter à 10 ml avec de l'eau distillée.

-mettre au bain-marie à 37°C pendant un temps déterminé.

-ajouter 0,2 ml de KOH concentré pour bloquer la réaction enzymatique.

-laisser décanter le gel et prélever 3 ml de liquide sur lesquels est effectué le dosage par la méthode Nessler.

Ce procédé est utilisé lors de l'étude théorique sur le

comportement du système enzymatique insoluble. Il est peu recommandé pour l'application en laboratoire d'un dosage courant de l'urée, le procédé en continu étant nettement plus pratique.

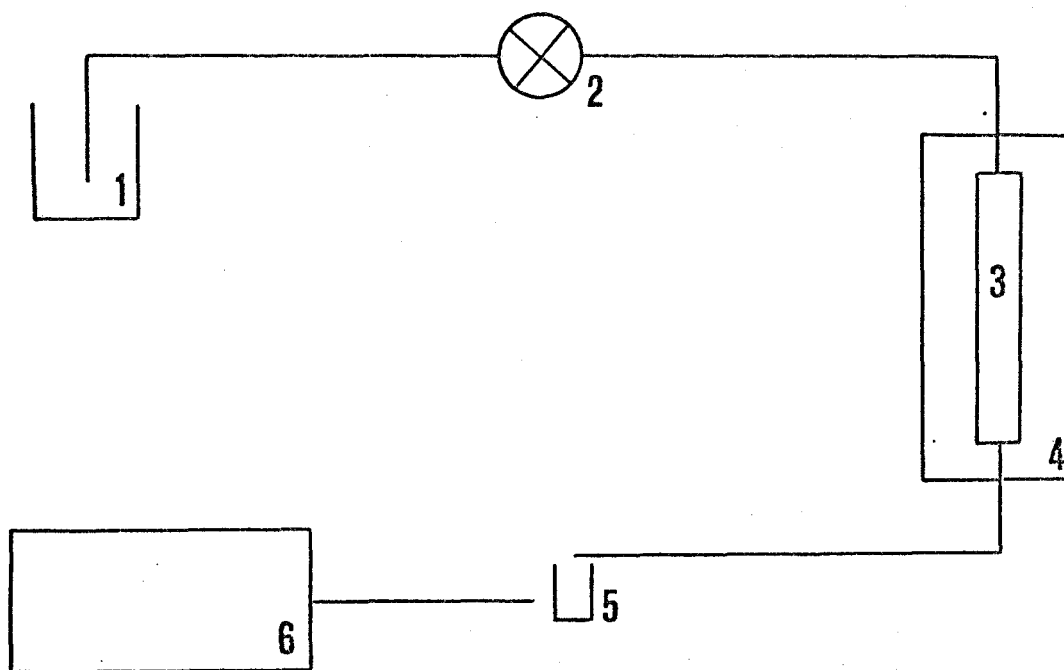
4.2.2. ETUDE EN CONTINU.

4.2.2.1. Principe.

Une solution d'urée est hydrolysée par passage sur colonne contenant le système enzymatique. La quantité d'urée hydrolysée est déterminée par dosage de 1°NH_4^+ dans l'effluent.

4.2.2.2. Matériel.

Schéma de montage : (voir photo II)



- 1 - récipient contenant la solution à doser.
- 2 - pompe péristaltique LKB type 4912A (faible débit)
- pompe péristaltique Buchler (fort débit).

3 - colonne contenant le gel à activité enzymatique (voir photo III).

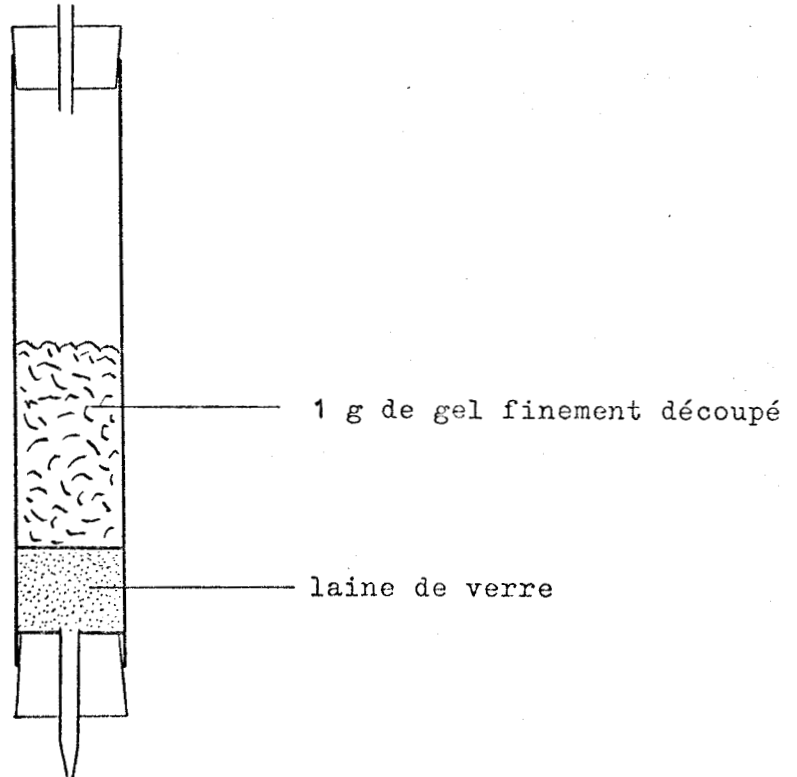
Nous utilisons des colonnes de 2 types :

-type 14 : section = 154 mm^2

diamètre intérieur = 14 mm

-type 10 : section = $78,5 \text{ mm}^2$

diamètre intérieur = 10 mm.



4 - enceinte thermostatisée.

Nous utilisons un bain-marie dans lequel plonge une résistance à température réglable. Nous travaillons à la température constante de 37°C .

5 - récipient de récolte de la solution hydrolysée.

6 - spectrophotomètre.



photo II. : Appareillage en continu.

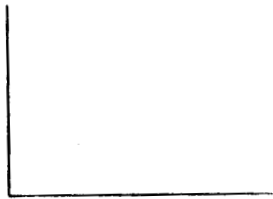


photo III : Colonnes (14, 10) à activité enzymatique.

4.2.2.3. Mode opératoire.

- préparer les colonnes en disposant 1 g de gel sur une couche de 10 mm de laine de verre (voir croquis).
- laver le gel à plusieurs reprises avec de l'eau distillée.
- placer la colonne dans le bain-marie dont la température a été préalablement amenée à 37°C et laisser la température se stabiliser.
- effectuer les raccordements étanches d'entrée et de sortie de la colonne.
- actionner la pompe péristaltique afin d'éliminer l'eau du gel.
- laisser passer un tampon d'air pour sécher le gel.
- aspirer avec un débit déterminé la solution d'urée dont le pH est fixé à 6,5.
- après 5 minutes d'écoulement libre, prélever 3 fois 3 ml de solution à la sortie de la colonne.
- ajouter à chaque prélèvement 0,3 ml de réactif de Nessler et lire après 5 minutes de repos la densité optique à 430 nm.
- déterminer le pourcentage d'hydrolyse de la solution d'urée.

4.2.2.4. Avantages du procédé et application.

Ce processus d'hydrolyse en continu apporte de nombreux avantages par rapport au système "batch" ou système classique d'hydrolyse.

- 1 - L'échange Enzyme/Substrat est facile à réaliser et dépend de paramètres bien déterminés comme le débit.
- 2 - Il ne peut y avoir empoisonnement de l'enzyme par les produits de réaction car ceux-ci sont éliminés dans l'effluent. Dans le cas de l'urée, nous avons remarqué que l'ammonium produit est un inhibiteur de réaction. Cette inhibition est levée grâce à un tel processus.

3 - Un système en continu permet une automatisation du dosage . La colonne à activité enzymatique peut être introduite dans une chaîne analytique.

4.3. étude de l'influence des différents paramètres d'hydrolyse

Après avoir étudié les conditions de culture en vue d'une production optimale de cellules et d'enzyme, nous allons envisager les différents paramètres intervenant lors de la réaction enzymatique du gel. Le but de ce travail est de déterminer les conditions optimales d'hydrolyse tout en complétant nos connaissances théoriques sur le comportement du gel de polyacrylamide.

4.3.1. COMPOSITION DU GEL : CONCENTRATIONS EN MONOMERE.

La concentration en monomère est très importante lors de la fabrication du gel. Elle agit sur les propriétés de dureté, d'élasticité et de couleur du gel et par là sur le rendement enzymatique du système.

Diverses études réalisées en "batch" ou en continu, nous permettent de déterminer les concentrations optimales en monomère.

4.3.1.1. Etude de la concentration en acrylamide total (T %).

1 - procédé "batch".

conditions de l'essai : C (concentration partielle en MBA) = 0,5%

gel = 1 g

concentration en cellules = 0,35mg/g de gel

solution d'urée à 50 ppm

t° = 37°C

pH = 6,5

temps d'action = 15 minutes.

résultats :

T %	% d'hydrolyse	aspect du gel		
		dureté	élasticité	couleur
2,5	-	ne se forme pas		
5	-	très flasque, impossible à découper		
7,5	65,5	flasque	très élastique	transparent
10	57	mou	élastique	transparent
15	52	dur	élastique	transparent
20	44	dur	élastique	transparent
30	38	très dur	peu élastique	légèrement blanchâtre

(voir fig.13)

2 - procédé en continu.

conditions de l'essai : C = 0,5%

gel = 1 g

concentration en cellules = 0,2mg/g de gel

solution d'urée = 50 ppm

t° = 37°C

pH = 6,5

débit = 1,25 ml/minute

colonne type 14

résultats :

T %	% d'hydrolyse
7,5	19,4
10	18



T %	% d'hydrolyse
15	17,8
20	12,6
30	6,4

(voir fig.14)

4.3.1.2. Etude de la concentration en M.B.A. (C %).

1 - procédé "batch".

conditions de l'essai : T = 7,5%

gel = 1 g

concentration en cellules = 0,4mg/g de gel

solution d'urée = 50 ppm

t° = 37°C

pH = 6,5

temps d'action = 5 minutes.

résultats :

C %	% d'hydrolyse	aspect du gel		
		dureté	élasticité	couleur
0,5	46,5	flasque	très élastique	transparent
1	24	mou	élastique	voilé
5	59	mou	peu élastique	blanchâtre
10	63	dur	pas élastique	blanc
15	61	très dur	pas élastique	blanc
20	65	cassant	pas élastique	blanc

(voir fig.15)

2 - procédé en continu.

conditions de l'essai : T = 7,5%

gel = 1 g

concentration en cellules = 0,4mg/g de gel

solution d'urée = 50 ppm

t° = 37°C

pH = 6,5

débit = 1,25 ml/minute

colonne type 14.

résultats :

C %	% d'hydrolyse
0,5	44
1	40
5	44,5
10	44
15	45
20	46

(voir fig.16)

4.3.1.3. Conclusions et discussion.

Notre choix s'est porté sur le gel (7,5 - 5) car celui-ci présente le pourcentage d'hydrolyse le plus élevé. En outre, par ses propriétés mécaniques favorables, le gel peut être manipulé sans difficultés lors du découpage et du remplissage des colonnes alors que d'autres gels trop cassants ou trop flasqués ne peuvent être traités aussi facilement.

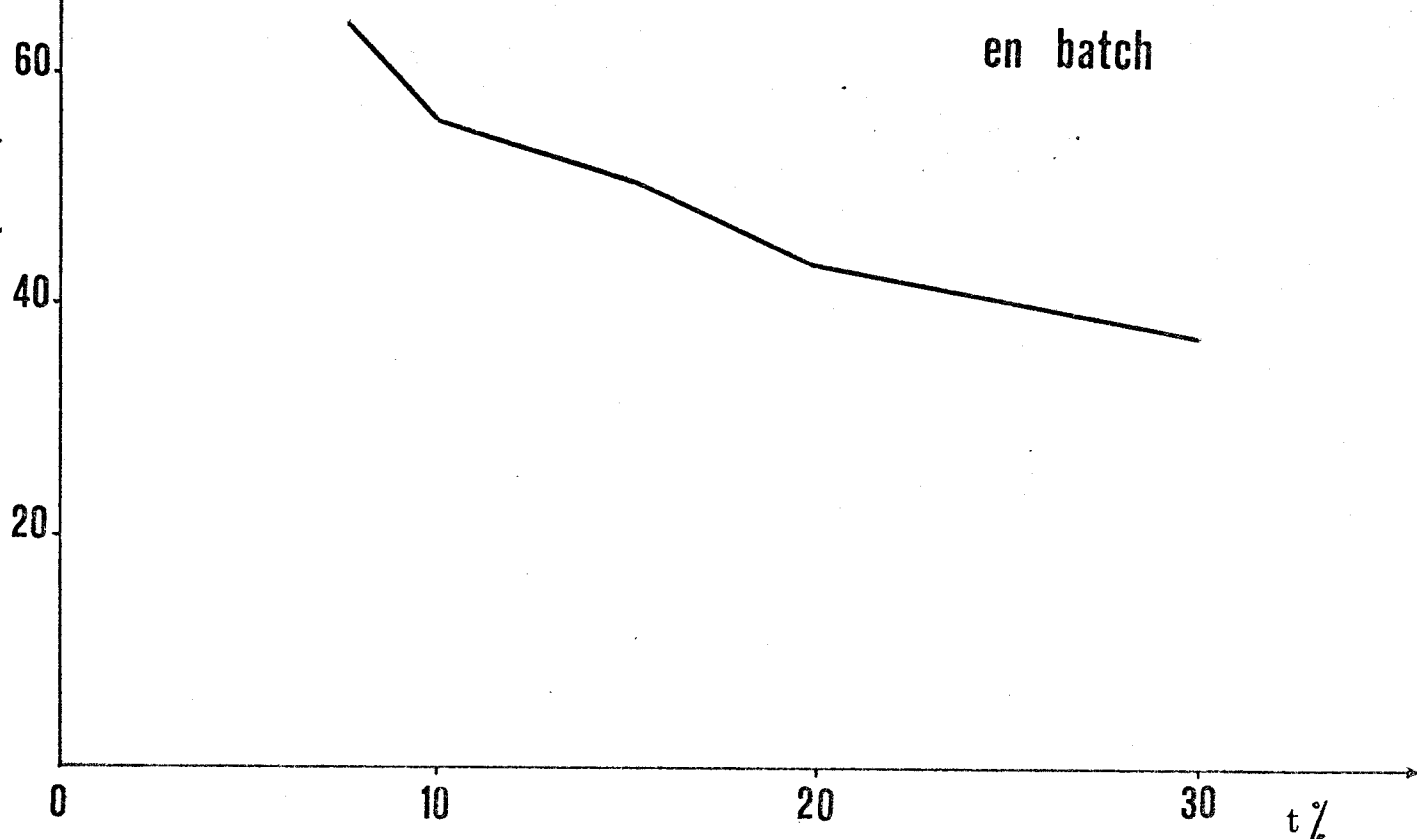
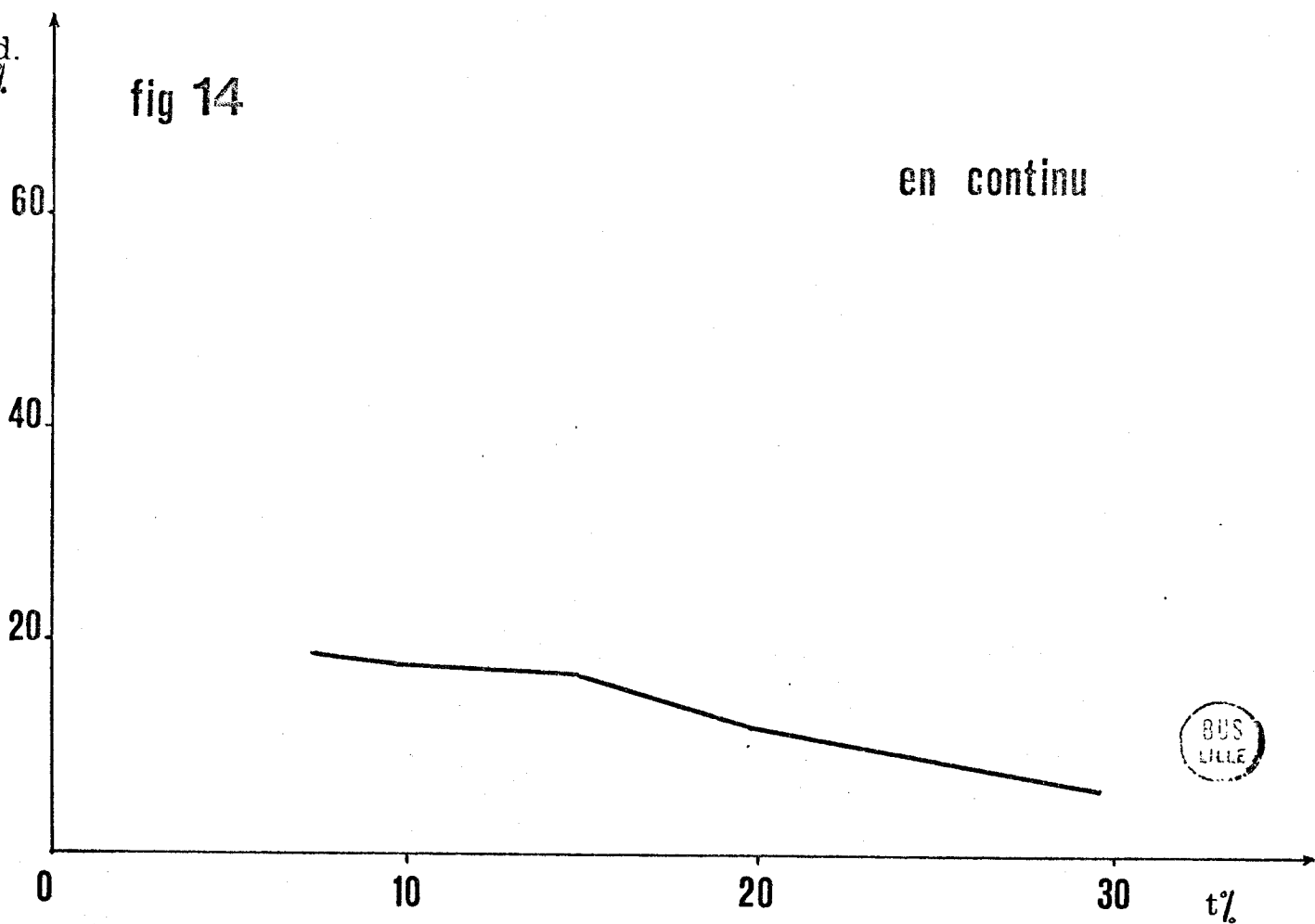
fig 13 influence de t pour $c=0,5\%$ 

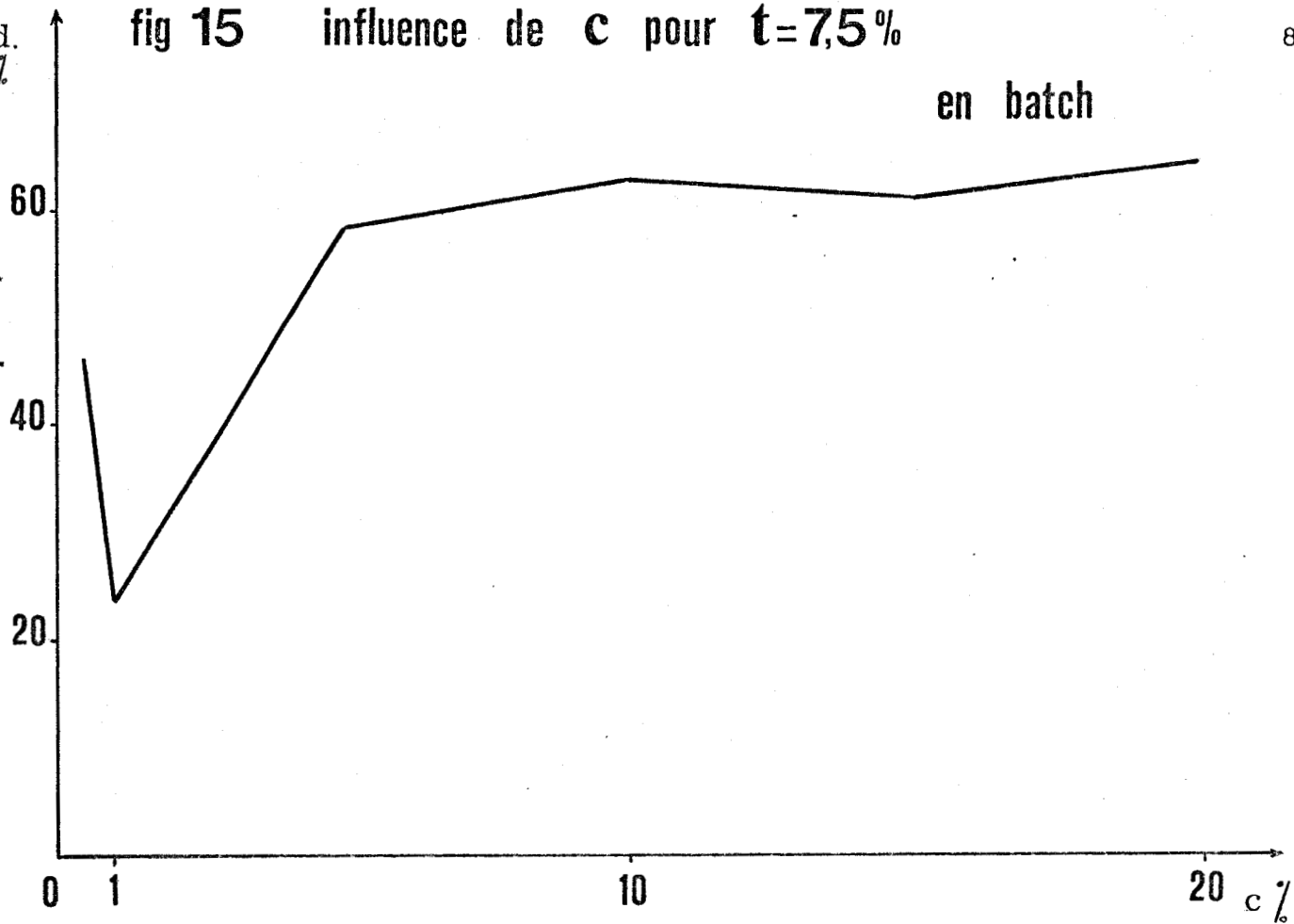
fig 14



hyd.
en %

fig 15 influence de c pour t=7,5%

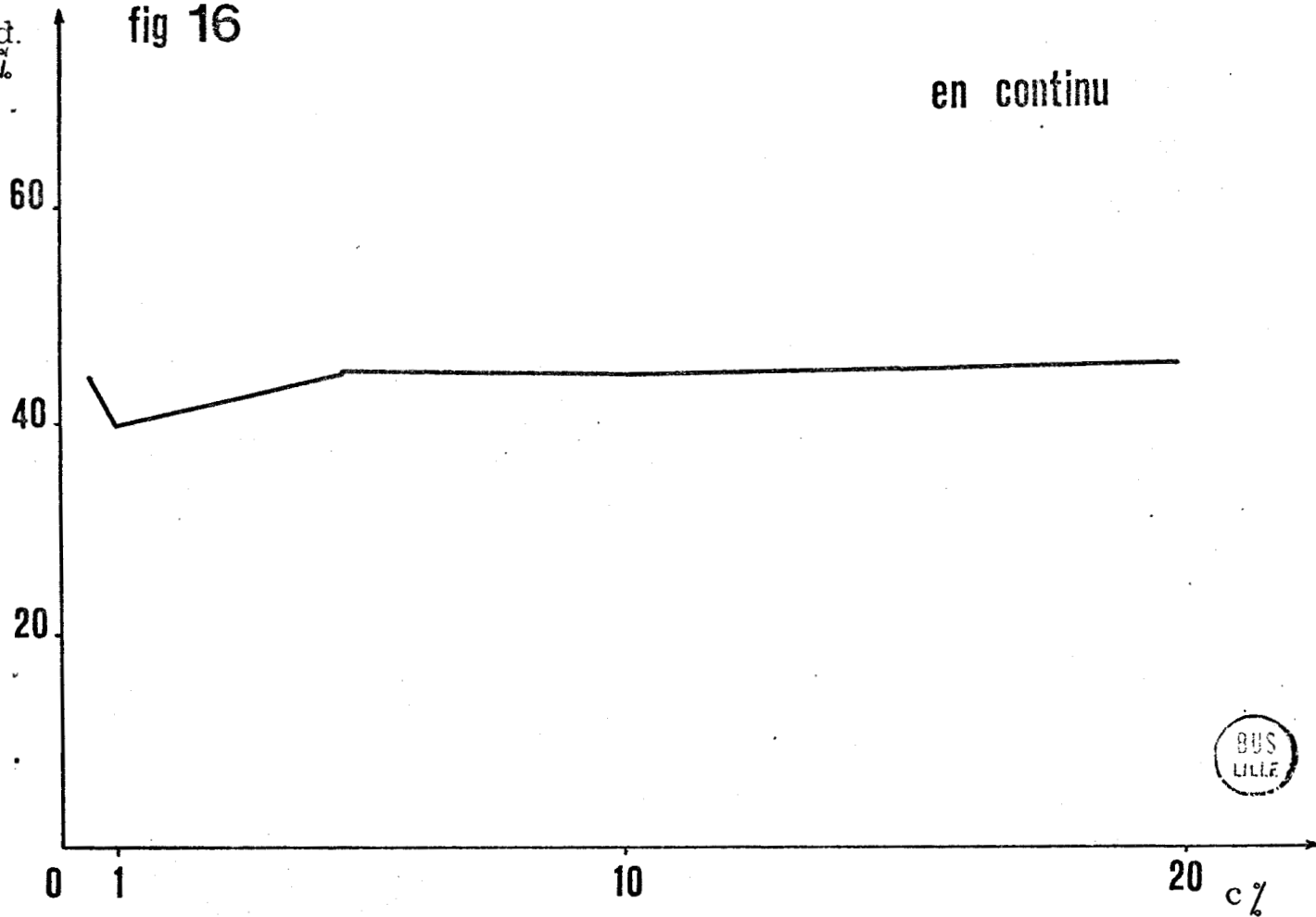
en batch



hyd.
en %

fig 16

en continu



L'aspect du gel est modifié surtout par le pourcentage en M.B.A. Pour des concentrations croissantes en M.B.A., la couleur varie de l'incolore au blanc jaunâtre et sa consistance d'abord flasque devient ensuite très dure.

Une variation dans la teneur en acrylamide total confère au gel une même couleur et pratiquement une même élasticité. Seule la dureté augmente fortement pour des valeurs croissantes de T %.

Lors de la préparation de dérivés insolubles d'enzymes purifiées fixées sur gel de polyacrylamide, de nombreux auteurs (21) retiennent une valeur de 5% en M.B.A. lors de la fabrication du gel. C'est pour cette valeur que les pores du gel sont les plus petits (58).

Le gonflement du gel est principalement influencé par le pourcentage en M.B.A. : le gonflement augmente si C % diminue. Par contre, il est directement proportionnel à la concentration en monomère total (T %).

Remarques : Les courbes obtenues par les 2 procédés sont surtout différentes par leur valeur d'amplitude. Une amplitude plus importante est observée lors des essais d'hydrolyse en "batch".

Nous pourrions remarquer à cet effet que l'hydrolyse en "batch", tout comme en continu, dépend du contact particules de gel/solution d'urée. Les gels à fort gonflement possèdent une densité légèrement supérieure à celle de l'eau et la suspension est plus homogène que pour les gels à faible gonflement. Ce paramètre est de moindre importance pour les essais réalisés en continu.

Nous pouvons noter également que l'inhibition due au substrat dans le cas du procédé "batch" pourrait être influencée par la concentration en monomère.

4.3.2. INFLUENCE DU pH.

Etude en "batch".

Les courbes d'activité en fonction du pH sont en général identiques pour l'enzyme libre et son dérivé insoluble. Il arrive cependant que ces courbes diffèrent quelque peu. E. BROWN et A. RACOIS (13) citent le cas de la trypsine et de la chymotrypsine fixées sur des copolymères maléique-éthylène (E.M.A.) où les courbes d'activité du dérivé en fonction du pH peuvent être déplacées de 1 à 2 unités vers les pH alcalins. Selon ces mêmes auteurs, dans leur grande majorité, les dérivés insolubles résistent mieux aux pH extrêmes que l'enzyme libre. Ceci est vraisemblablement dû au fait que le pH du microenvironnement de l'enzyme fixée diffère de celui de la solution. Dans le cas de l'uréase, il est intéressant de savoir si le pH optimum d'hydrolyse obtenu pour les cellules en suspension libre reste valable ou non pour les cellules immobilisées.

- conditions d'expérience : quantité de cellules : 0,3mg/g de gel
- gel (7,5 - 5) : 1 g
- solution d'urée à 50 ppm
- $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$
- temps d'action = 10 minutes.

- résultats :

pH	% d'hydrolyse	
	en suspension libre	cellules immobilisées
5	67	32
6	83	33
6,5	84,5	49
6,7	77	42,5

pH	% d'hydrolyse	
	en suspension libre	cellules immobilisées
7	61	36,5
7,5	31	19,5
8	16	15
9	8	7
10	0	0

(voir fig.17)

- conclusion : Le pH optimum d'hydrolyse est de 6,5 aussi bien pour les cellules en suspension libre que pour les cellules immobilisées sur gel. Les courbes obtenues sont d'allure identique sauf en milieu acide où le système insoluble présente un pourcentage d'hydrolyse inférieur.

4.3.3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CELLULES.

La quantité d'enzyme présente influence toute réaction enzymatique. De même, l'hydrolyse de l'urée varie avec la quantité de cellules immobilisées dans le gel.

- conditions d'expérience : concentration en cellules = de 0,3 à 30 mg/g
de gel

gel (7,5 - 5) : 1 g

solution d'urée à 500 ppm

t° = 37°C

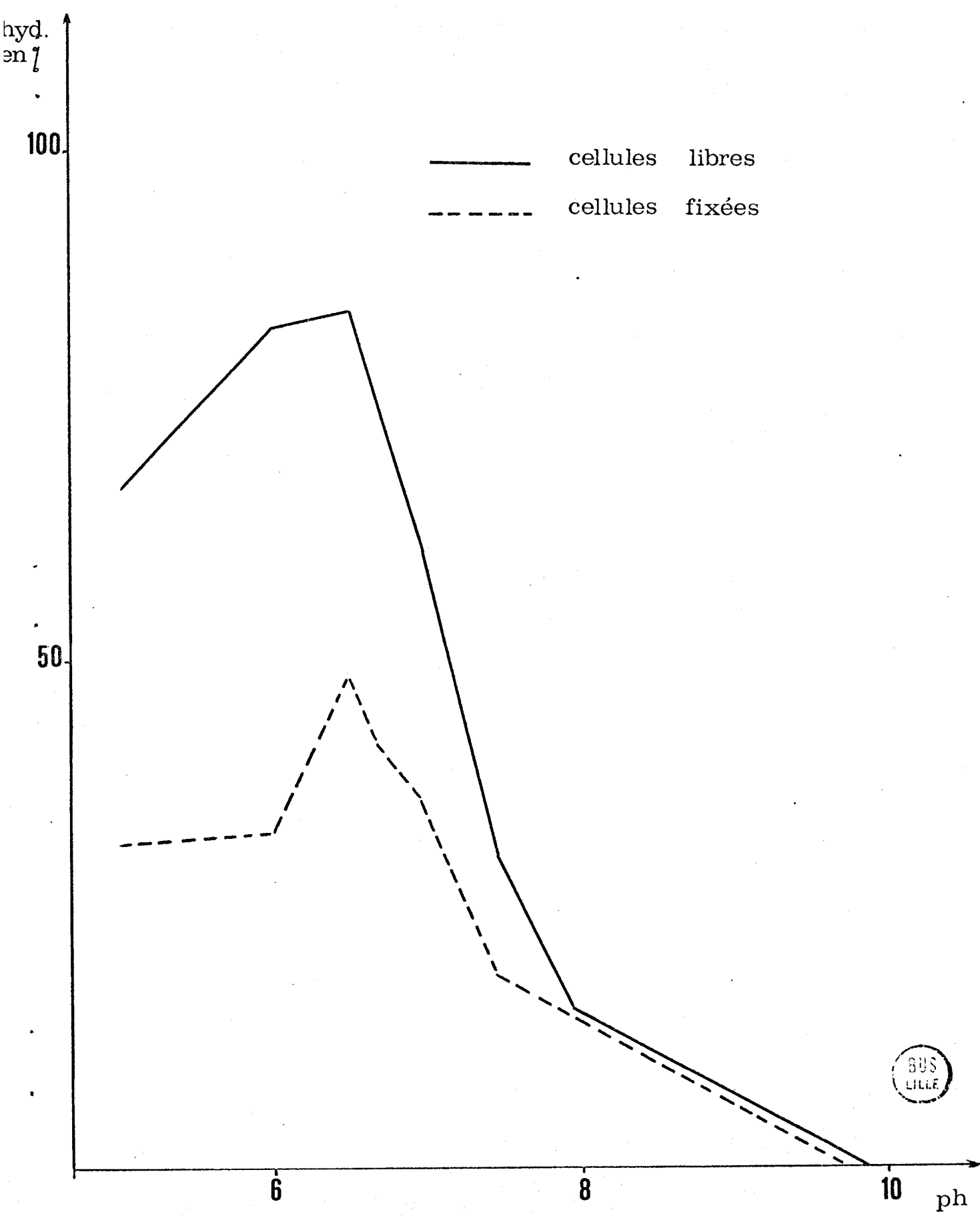
pH = 6,5

"batch" : temps d'action = 10 minutes

continu : débit = 2,1 ml/minute

colonne type 10

fig 17 influence du pH



- résultats :

poids sec de cellules par g de gel	% d'hydrolyse	
	"batch"	continu
0,3	15	8
0,5	20	11,5
1	33,5	19
5	67,5	63,5
10	75	78
20	82,5	86
30	86	90

(voir fig.18)

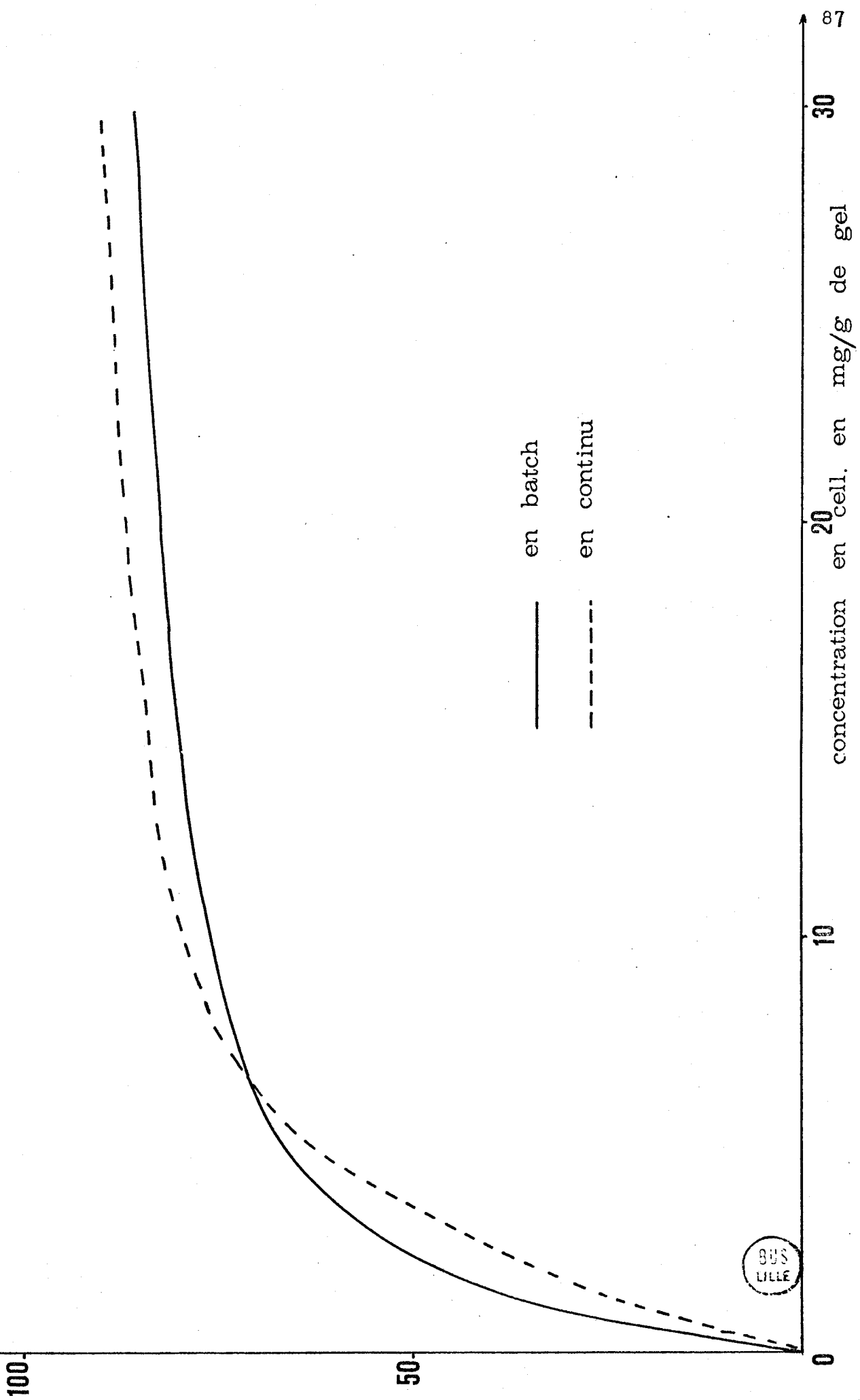
- conclusions : Il existe une relation linéaire entre le poids sec de cellules et le pourcentage d'hydrolyse pour des concentrations inférieures à 5 mg/g de gel.

Du point de vue économique, il est plus intéressant de travailler avec de faibles quantités de cellules.

Nous pouvons aussi remarquer l'allure identique des courbes en "batch" et en continu.

hyd.
en %

fig 18 influence de la concentration en cell.



concentration en ²⁰ cell. en mg/g de gel

4.3.4. INFLUENCE DU DEBIT.

Etude en continu.

Jusqu'à présent, nous avons toujours opéré à débit constant. L'hydrolyse en relation directe avec le temps de contact enzyme/substrat diminue évidemment si le facteur étudié ici augmente. Nous allons effectuer des essais à des débits faibles ensuite à des débits plus élevés.

4.3.4.1. Hydrolyse à débit faible (de 0,5 à 3 ml/minute).

- conditions : concentration en cellules : 5 mg/g de gel

gel (7,5 - 5) : 1 g

solution d'urée à 500 ppm

t° = 37°C

pH = 6,5

colonne type 10.

- résultats :

débit	% d'hydrolyse
0,533	100
0,815	100
1,19	94,5
1,66	74
2,1	65
2,5	55,5
3	47

(voir fig.19)

4.3.4.2. Hydrolyse à débit fort (de 2 à 12 ml/minute).

- conditions : concentration en cellules : 5mg/g de gel
gel (7,5 - 5) : 1 g
solution d'urée à 100 ppm
 $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$
pH = 6,5
colonne type 10
appareil : pompe Buchler.

- résultats :

débit	% d'hydrolyse
2	93
4	68
6	58,5
8	52
10	47
12	40,5

(voir fig.20)

- conclusion : Les courbes obtenues sont de forme hyperbolique. Les variations du pourcentage d'hydrolyse sont les plus fortes pour les petits débits. Cela dépend de la concentration en urée de la solution hydrolysée.

fig 19 influence du débit

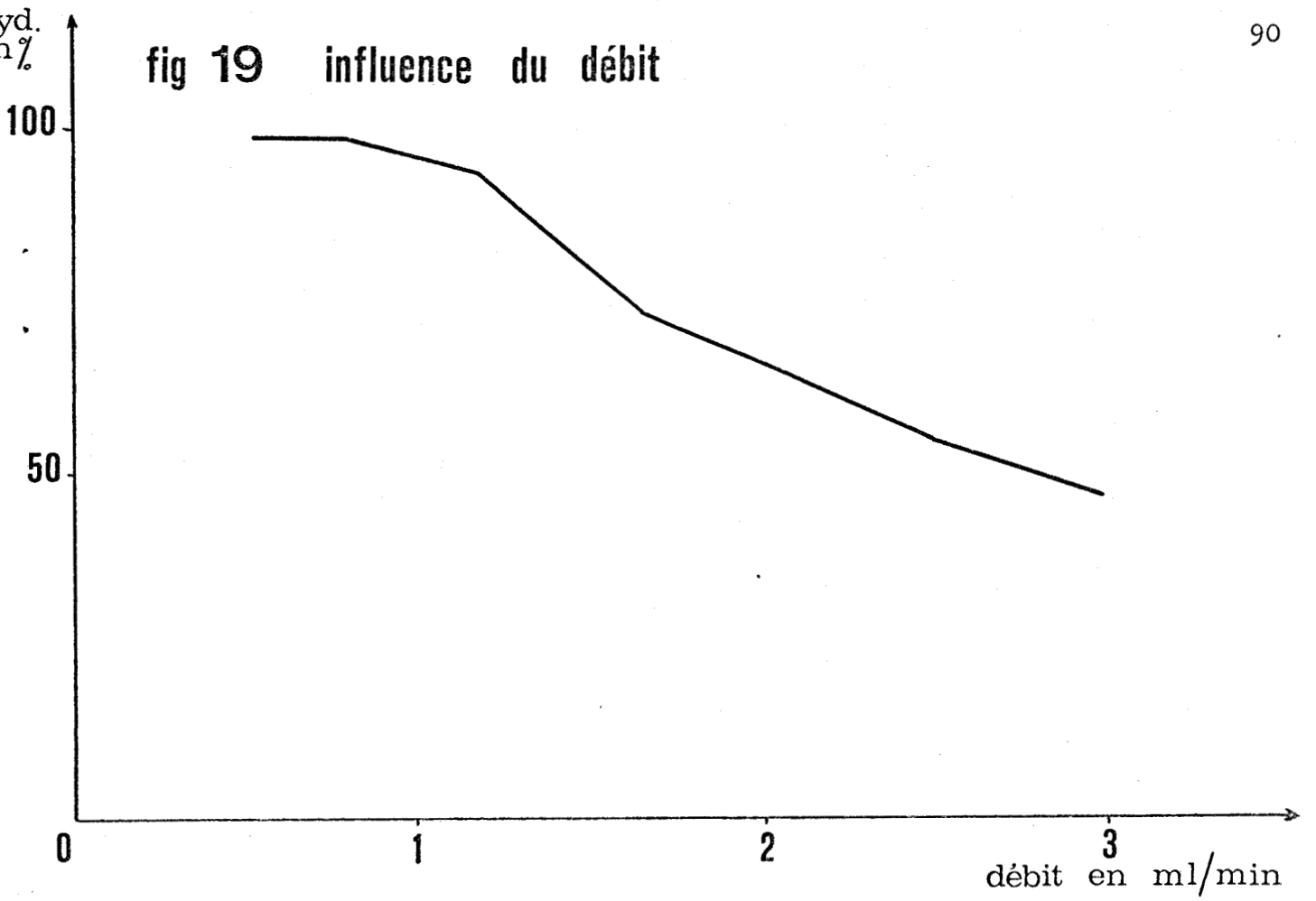
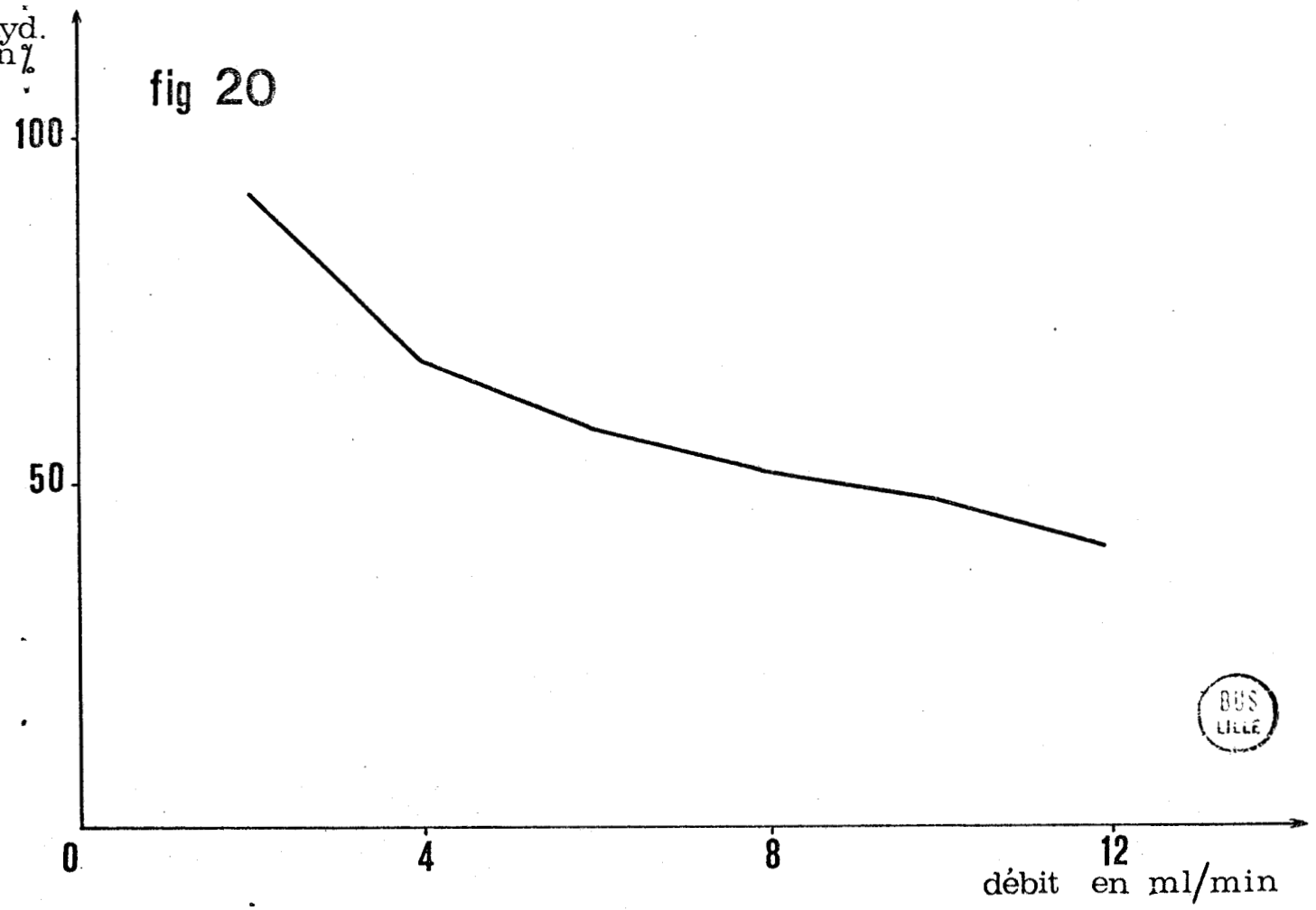


fig 20



4.3.5. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CELLULES ET DU DEBIT.

Nous réalisons différents essais au cours desquels le rapport concentration en cellules sur le débit est constant et vaut $5/2$. Les 2 facteurs étudiés agissent de façon inverse sur la réaction d'hydrolyse. Le pourcentage d'hydrolyse reste-t-il constant lorsque ces 2 facteurs varient dans les mêmes proportions?

- conditions : concentration en cellules : de 5 à 30 mg/g de gel
 gel (7,5-- 5) : 1 g
 solution d'urée à 500 ppm
 $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$
 pH = 6,5
 débit : de 2 à 12 ml/minute
 colonne type 10.

- résultats :

pois sec de cellules par g de gel	débit (ml/min.)	% d'hydrolyse
5	2	58
10	4	47,5
20	8	37
30	12	24

(voir fig.21)

- conclusion : L'hydrolyse diminue au fur et à mesure que la concentration en cellules et le débit croissent proportionnellement. La courbe nous montre qu'il existe une relation linéaire entre les 3 facteurs. Par cette étude, l'intérêt de travailler avec une concentration faible en cellules et un faible débit se confirme. Suivant de telles conditions opératoires, le débit a une influence plus forte sur l'hydrolyse que la concentration en cellules.

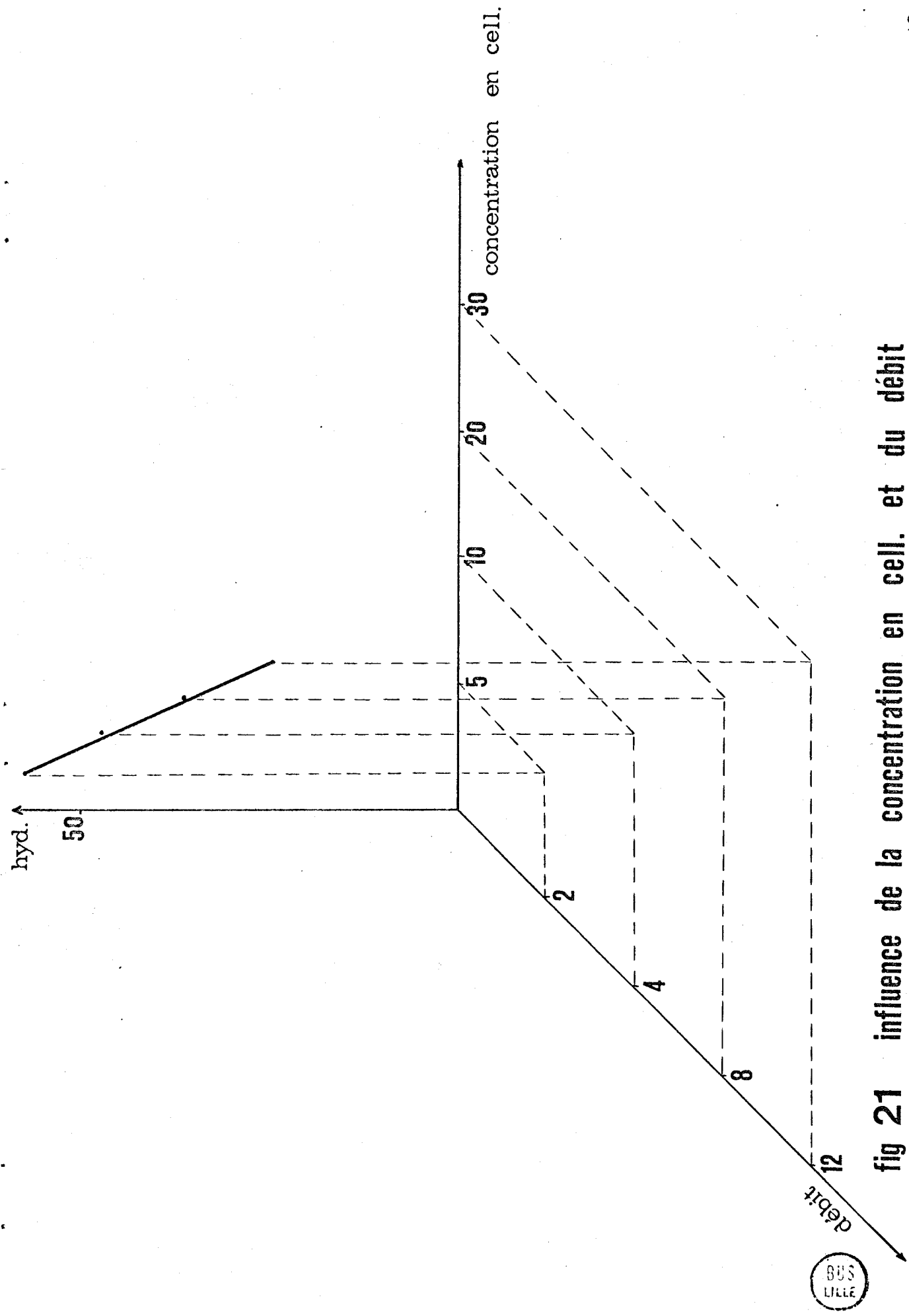


fig 21 influence de la concentration en cell. et du débit

4.3.6. DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN DU SYSTEME INSOLUBLE.

En général, le K_m d'un dérivé insoluble est supérieur à celui de l'enzyme libre; il peut être parfois identique ou inférieur (13, 64). Il dépend des mêmes facteurs que la vitesse de réaction mais, en plus, il est fonction de la répartition du gel dans la solution lors d'une étude en "batch". En continu, le K_m est influencé par le débit de la colonne.

Dans le cas présent, nous allons comparer le K_m des cellules en suspension libre (voir 3.2.3.4.) avec le K_m des cellules immobilisées sur gel. Afin de pouvoir comparer les 2 résultats, cette étude s'effectue en "batch".

4.3.6.1. Détermination du temps d'action pour que l'hydrolyse varie linéairement.

Il s'agit de déterminer la courbe enzymatique en fonction du temps.

- mode opératoire :

-placer dans un erlenmeyer :

- . gel à 0,3 mg de cellules/g de gel : 10 g
- . tampon pH 6,5 : 25 ml
- . solution d'urée à 200 ppm : 25 ml.

-compléter avec de l'eau distillée.

-placer le récipient au bain-marie agité à 37°C.

-effectuer des prélèvements toutes les 2,5 minutes et rechercher par le réactif de Nessler la quantité d'urée hydrolysée.

- résultats :

temps d'action (en minutes)	% d'hydrolyse
2,5	14
5	24
7,5	29
10	34,5
12,5	41
15	49,5
17,5	57,5
20	62
25	73
30	81
40	86

(voir fig.22)

- conclusion : un temps d'action de 10 minutes est retenu pour la détermination du K_m .

4.3.6.2. Représentation selon Lineweaver-Burpk.

- conditions d'expérience :

-dans un erlenmeyer placer :

- . gel (7,5 - 5) à 0,3 mg de cellules/g : 1 g
- . tampon pH 6,5 : 2,5 ml
- . solution d'urée à la concentration 4x : 2,5 ml.

-compléter à 10 ml avec de l'eau distillée.

-mettre les fioles au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes.

-rechercher le pourcentage d'urée hydrolysée par la méthode au réactif de Nessler.

- résultats et calculs :

substrat en ppm	substrat en mM	n ^{bre} de ppm hydrolysés	n ^{bre} de mM hydrolysées	V (en mM/min.)	1/V	1/S
20	0,333	12,5	0,208	0,0208	48	3
30	0,5	16,3	0,271	0,0271	37	2
40	0,666	19,1	0,318	0,0318	31,4	1,5
50	0,833	21	0,350	0,035	28,6	1,2
75	1,25	24,5	0,408	0,0408	24,5	0,8
100	1,66	30	0,498	0,0498	21	0,6

(voir fig.23)

- conclusion :

D'après la figure 23, nous avons $-\frac{1}{K_m} = -1,25$ en milliMole⁻¹/litre.

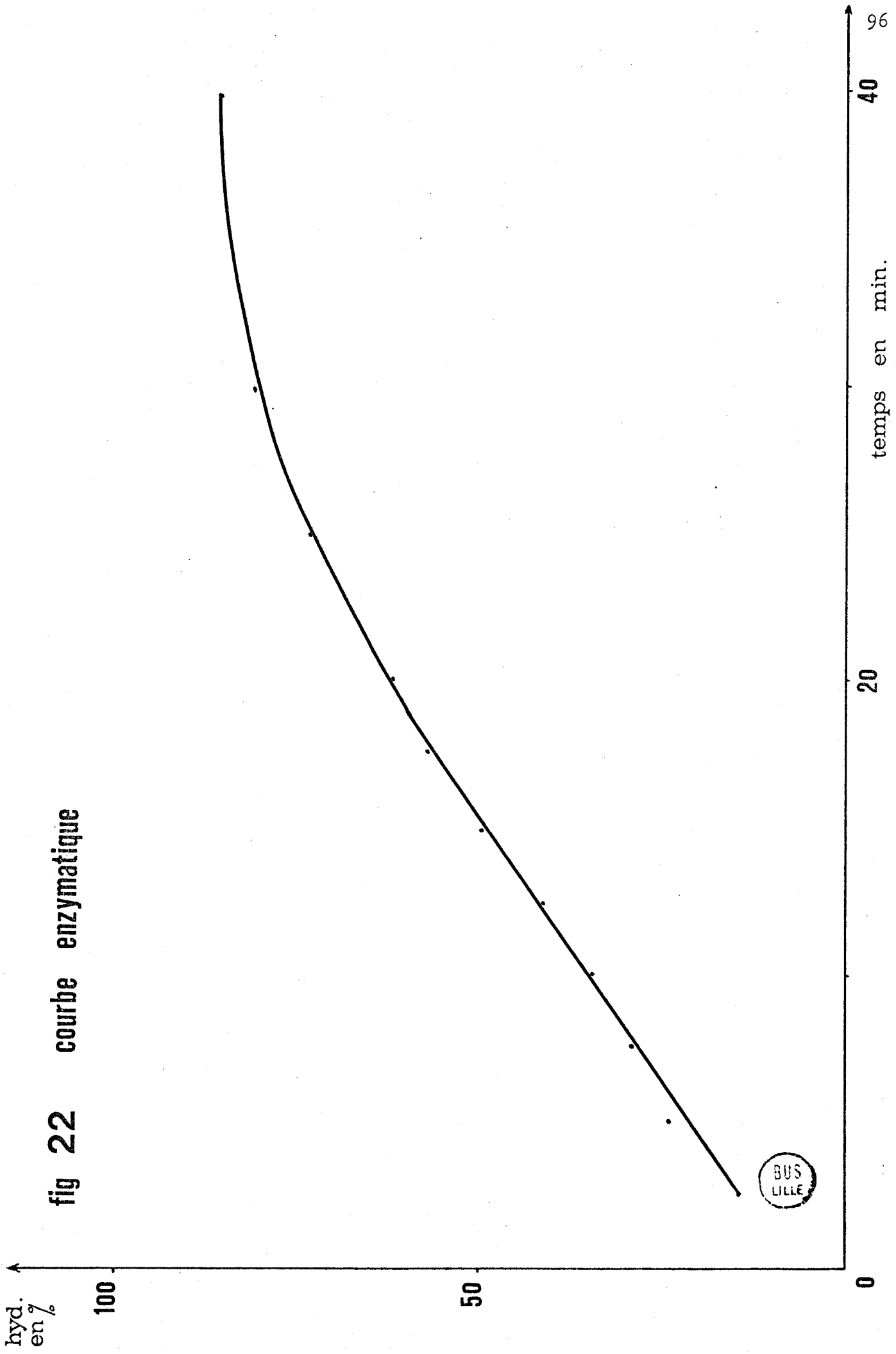
$$K_m = 0,8 \cdot 10^{-3} \text{ Moles/litre}$$

Rappelons que la valeur trouvée pour les cellules bactériennes en suspension libre était de $0,728 \cdot 10^{-3}$ Moles/litre.

Il semble que le K_m du système enzymatique insoluble lui est légèrement supérieur. L'affinité enzyme/substrat est donc meilleure lorsque les cellules se trouvent en suspension libre mais il faut être très prudent lors de la conclusion car les 2 expériences ont été réalisées dans des conditions d'agitation quelque peu différentes et à des temps différents.

hyd.
en %

fig 22 courbe enzymatique



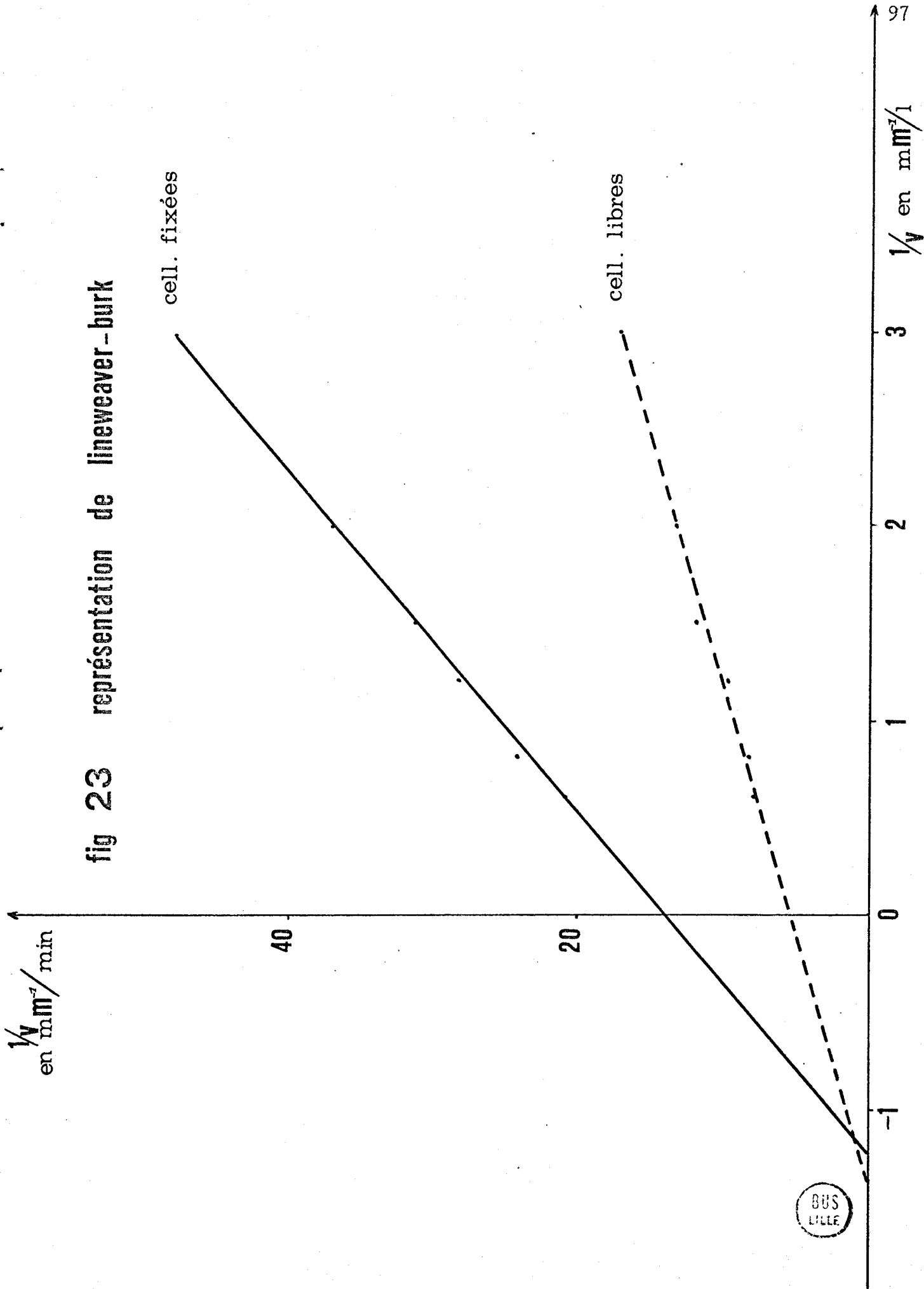
$\frac{1}{V}$
en mm^2/min

fig 23 représentation de lineweaver-burk

cell. fixées

cell. libres

$\frac{1}{V}$ en mm^2/l



BUS
LILLE

4.4. étude de la viabilité du système enzymatique

L'application d'un tel système enzymatique en vue d'un dosage biochimique implique son utilisation à long terme après stockage du matériel.

Le temps de viabilité dépend évidemment du mode de conservation choisi ainsi que des conditions de milieu. Le système peut être stocké soit sous forme lyophilisée soit en suspension dans un tampon pH. La dénaturation de l'enzyme est fonction également de la nature des ions présents et de leur concentration.

Test de contrôle.

Le gel de polyacrylamide à activité enzymatique est conservé en chambre froide dans un tampon phosphate 0,05 M de pH = 6,5. Le rendement d'hydrolyse est mesuré en fonction du temps de stockage et la viabilité est exprimée en pour - cent par rapport à la valeur initiale.

- conditions d'expérience : quantité de cellules : 20 mg/g de gel

gel (7,5 - 5) : 1 g

solution d'urée : 25 ppm

t° = 37°C

pH = 6,5

débit = 2 ml/minute

colonne type 14

- résultats :

temps (en jours)	colonne 1	colonne 2	colonne 3	colonne 4
0	100	100	100	100
5	100	100	100	100
11	95	98	100	100
18	85	100	100	100
27	79	91	100	100
35	67	79	100	100
47	64	74	100	100
62	62	62	100	98
88	64	62	99	95
104	64,5	60,5	97	89
116	62	59	95	87
130	60	59	86	85
146	50,5	53,5		
165	51,5	58,5	81	82



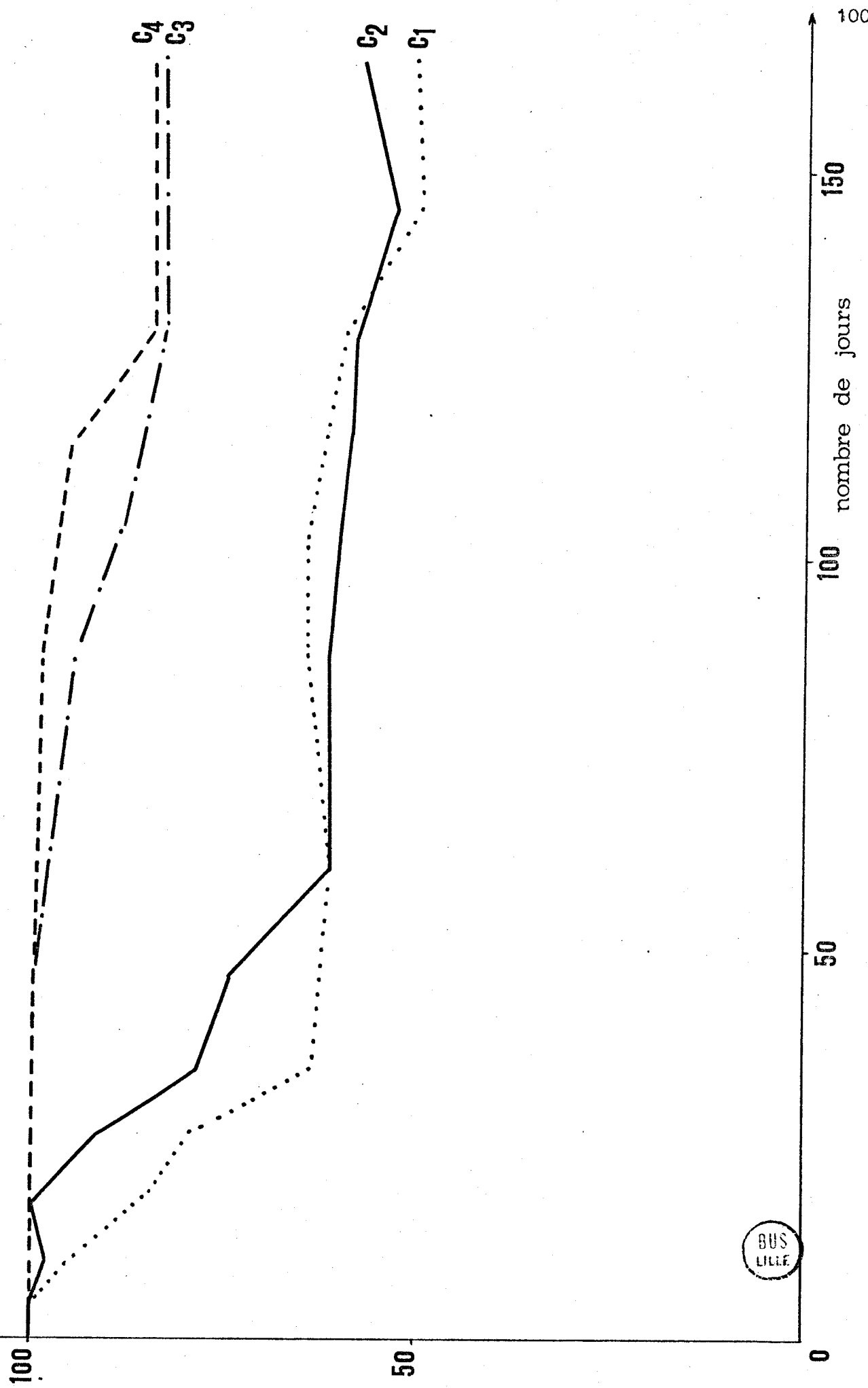
(voir fig.24)

Les résultats 1 et 2 sont obtenus chaque fois avec une seule colonne que nous stockons et que nous réutilisons lors de l'essai suivant. Les résultats 3 et 4 correspondent à l'utilisation d'une colonne par essai.

- conclusion : nous notons une très bonne conservation pour les colonnes 3 et 4. Après 50 jours, le pourcentage d'hydrolyse est toujours identique à la valeur initiale. Par contre, la dénaturation est très importante lorsque le gel est réutilisé plusieurs fois (colonnes 1 et 2).

hyd
en %

fig 24 test de viabilité



BUS
LILLE

4.5. rendement des cellules immobilisées par rapport à une suspension libre influence du traitement au toluène

Quel est le rendement d'hydrolyse des cellules immobilisées dans le gel de polyacrylamide par rapport aux cellules libres en suspension?

Etant donné que l'urée est un substrat de faible poids moléculaire (25) capable de traverser la paroi bactérienne, le traitement au toluène est-il nécessaire?

Une étude statistique basée sur une analyse de variance (47) nous permet de déceler l'importance de ces différents facteurs.

- conditions d'expérience : 10 ml de solution d'urée à 50 ppm sont hydrolysés par 0,3 mg (poids sec) de bactéries se trouvant soit en suspension libre, soit incluses dans 1 g de gel (7,5 - 5) de polyacrylamide (procédé "batch"). Le comportement de cellules traitées et non-traitées au toluène est étudié. L'hydrolyse s'effectue à pH = 6,5 et à la t° de 37°C. Les résultats sont exprimés en % d'hydrolyse.

- résultats :

1 - cas des cellules en suspension libre :

sans traitement au toluène	avec traitement au toluène
54	91
56	85
55	87
57	89

S= 352

\bar{x} = 88

2 - cas des cellules fixées sur gel :

sans traitement au toluène	avec traitement au toluène
38	51
36	45
30	47
34	49

$$S = 192$$

$$\bar{x} = 48$$

Etude statistique : analyse de variance..

L'étude statistique montre s'il existe une différence significative ou non entre les résultats obtenus par action des facteurs étudiés : toluène et mode d'utilisation des cellules.

- données : A_0 : cellules en suspension libre
- B_0 : pas de traitement au toluène
- A_1 : cellules fixées sur gel
- B_1 : avec traitement au toluène.

	A_0	A_1
B_0	54 - 56 - 55 - 57	51 - 45 - 47 - 49
B_1	91 - 85 - 87 - 89	38 - 36 - 34 - 30

- calcul de la somme des carrés des différentes sources de variation :

$$\text{somme des carrés variation A} = \frac{(\text{effet total})^2}{n}$$

$$\text{effet total A} = Sx_a - Sx_o$$

$$\text{effet total AB} = Sx_{ab} + Sx_o - Sx_a - Sx_b$$

- variance = $\frac{\text{somme des carrés}}{\text{nombre de D.L.}}$

- tableau de la somme des carrés :

combinaison factorielle	résultats	source de variation	effet total	S des carrés
(1)	222			
a	138	A	-234	3.422
b	352	B	184	2.116
ab	192	AB	-76	361
total	904			

- tableau d'analyse de variance :

source de variation	D.L.	Somme des carrés	Variance	F	conclusions
A	1	3.422	3.422	107 ^{**}	différences hautement significatives
B	1	2.116	2.116	66 ^{**}	
AB	1	361	361	11,3 ^{**}	
erreur	12	382	31,8		
total	15	6.281			

Test de Fisher de comparaison de 2 variances (47) :

La table nous donne pour des D.L. de 1 au numérateur

de 12 au dénominateur

les valeurs suivantes de F :



seuil de probabilité	F
10 %	3,2
5 %	4,7
1 %	9,3

inférieur à la valeur trouvée : diff.significative

inférieur à la valeur trouvée : diff.hautement significative.

- conclusions :

Nous observons que la fixation des cellules bactériennes sur gel de polyacrylamide a pour effet d'abaisser significativement le pourcentage d'hydrolyse obtenu grâce à une suspension libre. D'autre part, le traitement au toluène en rendant perméable la paroi bactérienne permet d'augmenter fortement le rendement d'hydrolyse.

Il existe également une différence hautement significative en ce qui concerne l'interaction entre ces 2 facteurs (AB). Les cellules fixées sur gel et les cellules en suspension libre sont influencées différemment par le traitement au toluène.

Le rendement d'hydrolyse des cellules immobilisées par rapport aux cellules libres est de $\frac{48}{88}$, soit 54,54%.

Chapitre 5

DOSAGE DE L'UREE

EN CONTINU

Jusqu'à présent, nous avons employé des solutions aqueuses d'urée. Il convient donc avant de doser l'urée dans les liquides biologiques de mettre au point le dosage en solution aqueuse. Les liquides biologiques sont des milieux complexes où des substances autres que l'urée peuvent interférer sur le résultat du dosage.

5.1. mise au point du dosage en solution aqueuse

5.1.1. ETABLISSEMENT DE LA DROITE D'ETALONNAGE.

Des solutions d'urée (de 0 à 100 ppm) sont hydrolysées par passage sur colonne de type 10 contenant 1 g de gel. Chaque colonne n'est utilisée qu'une seule fois.

- mode opératoire :

-préparation des solutions :

- . solution d'urée de concentration 4x : 10 ml
- . tampon pH 6,5 : 10 ml
- . eau distillée : 20 ml.

-après lavage de la colonne à l'eau distillée (25 ml), placer celle-ci dans le bain-marie à 37°C et laisser la t° se stabiliser.

-régler le débit de la pompe à 2 ml/minute et après passage sur colonne pendant 5 minutes de la solution à doser, effectuer un prélèvement.

-reprendre 1 ml et ajouter 2 ml d'eau distillée ainsi que 0,3 ml de réactif de Nessler.

-lire après 5 minutes de repos la densité optique à 430 nm.

- résultats :

1 - cas où la concentration en cellules = 5 mg/g de gel :

urée en ppm	D.O.
10	0,21
20	0,425
30	0,63
40	0,79
50	0,975
60	1,02
100	1,88

(voir fig.25)

2 - cas où la concentration en cellules = 10 mg/g de gel :

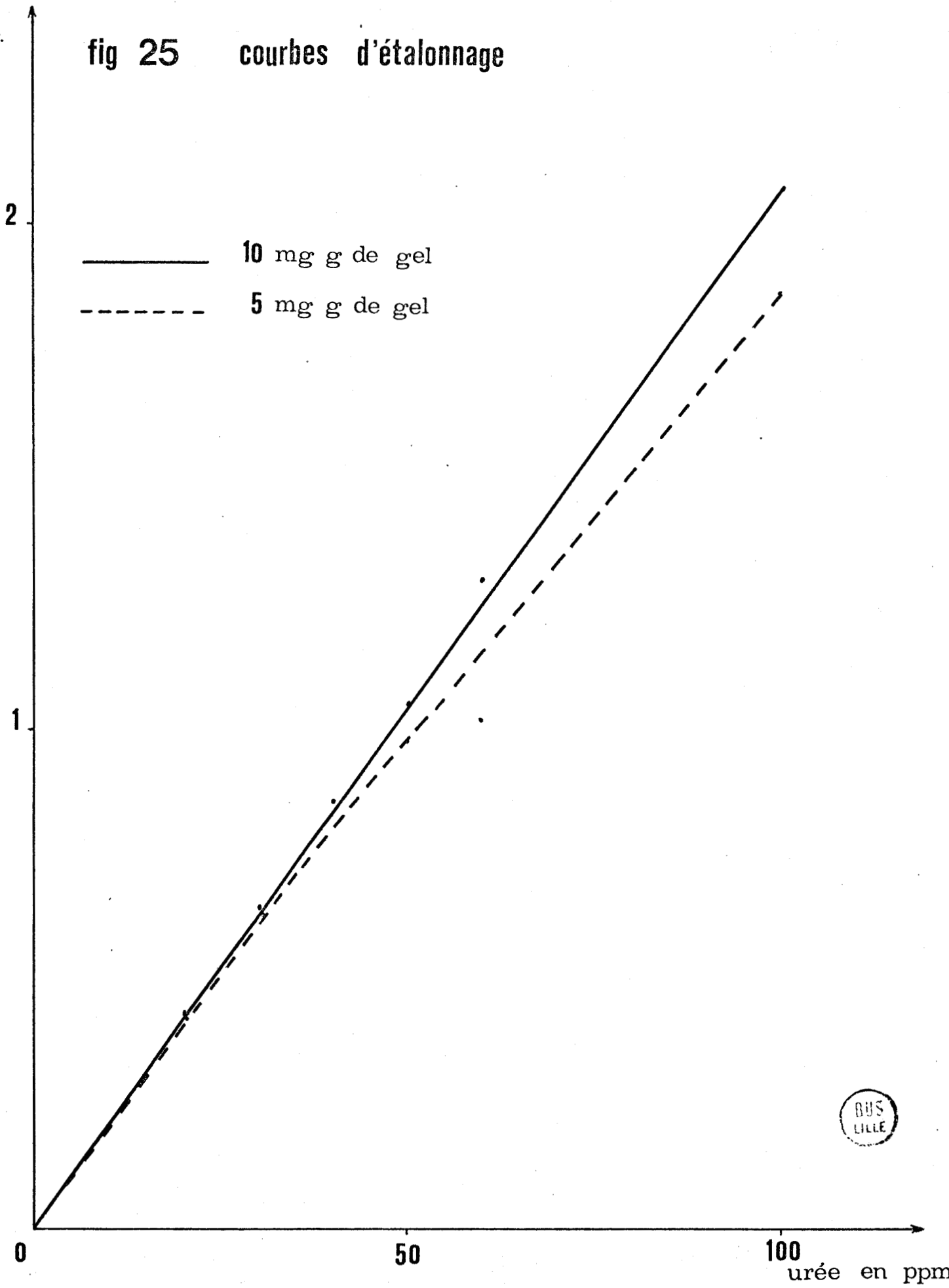
urée en ppm	D.O.
10	0,21
20	0,435
30	0,64
40	0,855
50	1,05
60	1,30
100	2,08

(voir fig.25)

- conclusion : une concentration en cellules de 5 mg/g de gel est insuffisante pour le dosage des solutions d'urée de 50 à 100 ppm. Pour que l'hydrolyse soit totale, il nous faut utiliser des colonnes à plus forte densité en cellules.



fig 25 courbes d'étalonnage



5.1.2. TEST DE STABILITE DES COLONNES.

Utilisation de 4 colonnes en continu pendant 8 heures sans interruption.

- conditions : concentration en cellules : 10 mg/g de gel

gel (7,5 - 5) : 1 g

solution d'urée à 40 ppm

t° = 37°C

pH = 6,5

débit : 2 ml/minute

colonne type 10.

- résultats : (en ppm d'urée)

temps en heures	colonne 1	colonne 2	colonne 3	colonne 4
0	40,5	40,5	40	40
1	40	38,5	40	39
2	40,5	38,5	39,5	35
3	39,5	37	40	32
4	39	33	36,5	30,5
5	37	31,5	35	30
6	33,5	27	33	26,5
7	32,5	25	31,5	23,5
8	22	16	23,5	17

(voir fig.26)

- conclusion : en moyenne, la stabilité du résultat (40 ± 1 ppm) est assurée pour une période d'utilisation des colonnes de 3 heures et moins.

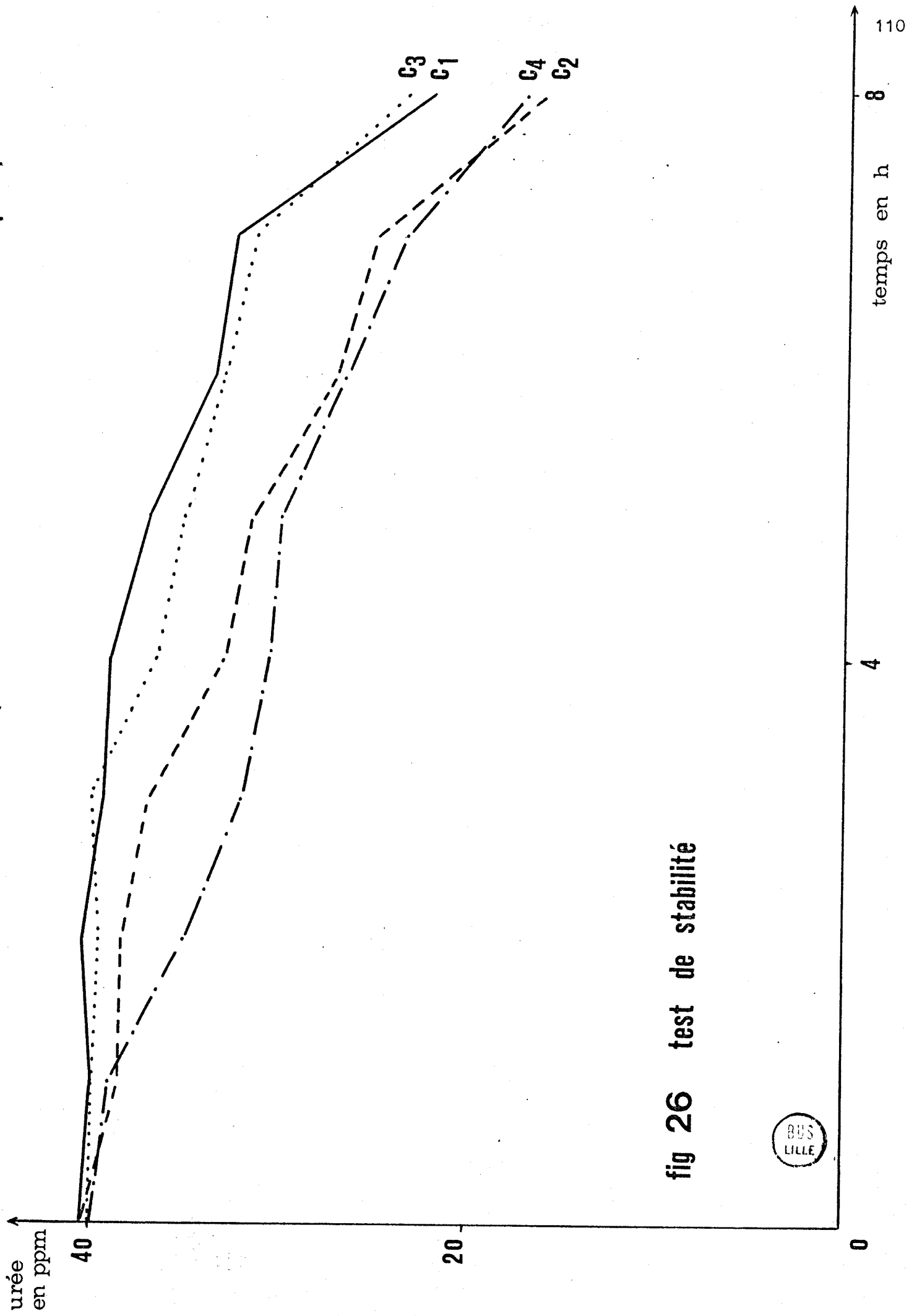


fig 26 test de stabilité



5.2. dosage de l'urée dans les liquides biologiques

5.2.1. METHODE DE REFERENCE.

5.2.1.1. Principe.

L'urée est transformée par l'uréase (B.D.Mérieux) en carbonate d'ammonium. Ce dernier est dosé après élimination des protéines par voie colorimétrique à l'aide du réactif de Nessler stabilisé.

5.2.1.2. Réactifs.

- uréase : B.D.Mérieux en poudre.
- solution de tungstate de sodium à 10% dans l'eau distillée.
- acide sulfurique 2/3 N.
- réactif de Nessler stabilisé : mélanger extemporanément 1 volume de solution A, 1 volume de solution B (voir plus haut), 1 volume d'une solution de $K_2S_2O_8$ à 0,5% dans l'eau distillée et 1 volume d'une solution aqueuse de gluconate de potassium à 1%.

Remarques : -tous les réactifs sont préparés avec de l'eau distillée exempte d'ammoniac. Il est recommandé de la vérifier au préalable à l'aide du réactif de Nessler.

-les solutions de gluconate de potassium et de $K_2S_2O_8$ doivent être conservées au réfrigérateur. Elles restent stables pendant une semaine.

-le réactif de Nessler stabilisé doit être utilisé dans l'heure qui suit sa préparation.

5.2.1.3. Mode opératoire.

- prélever 1 ml de solution à doser et ajouter 1 ml de tampon phosphate pH 6,5.
- ajouter 20 mg d'uréase.
- placer à l'incubateur à 37°C pendant 45 minutes.
- introduire 1,5 ml d'acide sulfurique et 1,5 ml de la solution de tungstate de sodium afin de déprotéiniser la solution - agiter.
- centrifuger à 10.000 tours/minute pendant 10 minutes.
- prélever 1 ml de surnageant limpide et ajouter 2 ml d'eau distillée.
- après ajout de 0,6 ml de réactif de Nessler stabilisé, attendre 10 minutes et effectuer une lecture de densité optique à 430 nm.

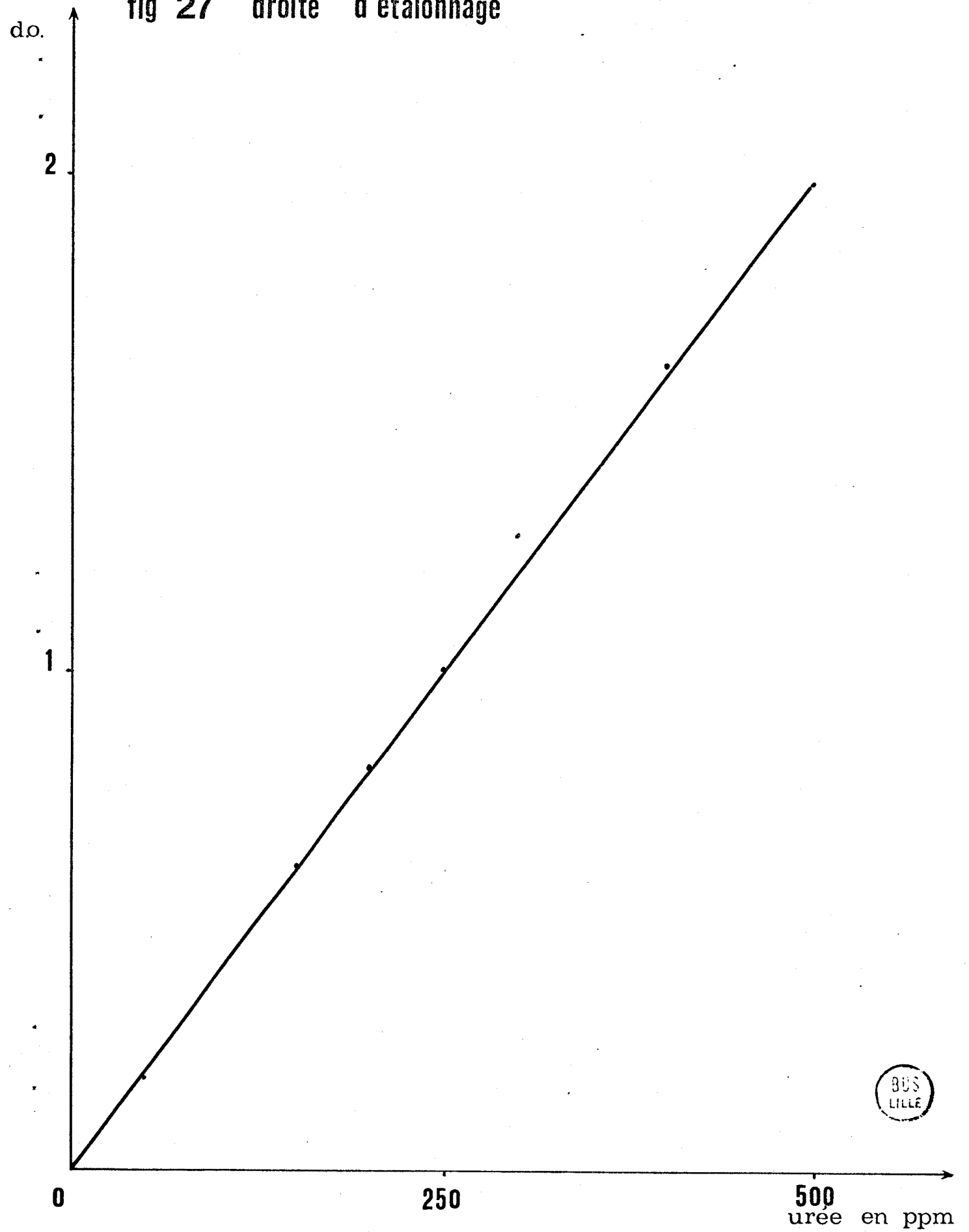
Afin de se trouver dans la gamme possible de dosage de l'urée, il est nécessaire d'opérer sur des solutions d'urine au 1/100 et de sérum au 1/2.

5.2.1.4. Droite d'étalonnage.

urée en ppm	D.O.
20	0,085
50	0,18
75	0,295
100	0,42
125	0,52
150	0,61
200	0,815
250	1,005
300	1,29
400	1,63
500	2,00

(voir fig.27)

fig 27 droite d'étalonnage

BUS
LILLE

5.2.2. ETUDE DES INTERFERENCES.

L'hydrolyse enzymatique spécifique de l'urée peut être compromise par l'utilisation d'une cellule entière comme source d'enzyme. La cellule bactérienne contient de nombreuses enzymes capables de dégrader différents substrats. Les produits de dégradation susceptibles d'être formés peuvent interférer sur le dosage de l'ammoniac par la méthode au réactif de Nessler.

5.2.2.1. Interférence du glucose.

Dans le sérum, la concentration en glucose est de 1 g/litre. La réaction possible de la cellule bactérienne avec le glucose entraînerait un dégagement de CO_2 et dès lors une variation de pH. Pratiquement, le CO_2 dégagé éventuellement ne peut gêner la réaction d'hydrolyse de l'urée vu que seul l'ion NH_4^+ est retenu pour le dosage et que la réaction s'effectue en milieu tamponné. Il s'agit donc plutôt d'une étude théorique visant à analyser le comportement du système enzymatique en milieu complexe.

- principe : mise en évidence du CO_2 dégagé par le respiromètre de Warburg.
- mode opératoire :
 - placer dans les fioles 1 g de gel (7,5 - 5) contenant 10 mg de cellules et porter à 4 ml avec de l'eau distillée.
 - ajouter dans la cupule 0,2 ml d' H_2SO_4 concentré de densité égale à 1,83.
 - verser alors dans le témoin : 1 ml d'eau distillée,
dans l'essai : 1 ml d'une solution de glucose.
 - mettre les fioles en agitation dans le bain-marie préalablement réglé à 37°C et effectuer le réglage de niveau des manomètres.

- résultats : des essais ont été effectués en utilisant des solutions de glucose à 0,1% et 1% et se sont comportés comme identiques aux témoins. Il n'y a donc pas de production de CO₂ et nous pouvons noter ainsi une interférence nulle du glucose.

Remarque : toutes les solutions utilisées sont préparées à partir d'eau distillée, bouillie et refroidie afin d'éliminer le gaz dissout.

5.2.2.2. Interférence des protéines et acides aminés.

- principe : une solution de protéines et acides aminés en concentrations similaires à celles du sérum sanguin est passée sur colonne à activité enzymatique. Un dosage de Nessler est effectué sur l'effluent après défécation.

- mode opératoire :

- 1 - sur une colonne contenant 1 g de gel (à 10 mg de cellules/g), faire passer avec un débit de 0,5 ml/minute et à 37°C la solution suivante :

placer dans une fiole de 100 ml :

-sérum albumine bovine	: 7,2 g
-solution d'acides aminés *	: 10 ml
-glutamine	: 8,3 mg
-créatine	: 5 mg

-compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

* Solution d'acides aminés à 3,6 g/litre :

cette solution contient en quantités égales les acides aminés suivants : alanine - phénylalanine - arginine - chlorydrate de cystéine - cystine - leucine - lysine - méthionine - proline - sérine - thréonine - tryptophane - tyrosine - valine - glycolle-histidine.

2 - dosage par le réactif de Nessler de l'ammoniac formé éventuellement après passage sur colonne (7):

-prélever 1 ml de solution et ajouter 3 ml d' HClO_4 à 4% pour déprotéiniser.

-agiter et filtrer.

-reprendre 0,5 ml de filtrat et ajouter 2,5 ml d'eau distillée ainsi que 0,3 ml de réactif de Nessler.

-attendre 5 minutes et lire la densité optique à 430 nm.

Résultat (en ppm) = nombre de ppm d' NH_4^+ (voir fig.7) x 24.

Remarques : -le témoin est constitué en prélevant 1 ml de solution avant son passage sur colonne.

-réactif de défécation :

HClO_4 4% (P/V) : 3,42 ml d'une solution d' HClO_4 de densité = 1,67 (70%) sont portés à 100 ml avec de l'eau distillée.

- résultats :

1 - essais à pH initial de 4,95 :

colonne	pH final	D.O.
1	4,95	0 0 0 0
2	4,95	0 0 0 0,5

2 - essais à pH fixé à 6,5 :

colonne	pH final	D.O.
3	6,5	0 0 0,5 0
4	6,5	0 0,5 0 0
5	6,55	0,5 0,5 0 0
6	6,5	0 0 0 0

- conclusion : l'interférence est négligeable; au maximum, il se forme $0,05 \times 24 = 1,2$ ppm d' NH_4^+ alors que le sérum sanguin contient 300 ppm d'urée.

5.2.3. ESSAIS EN CONTINU.

- technique du dosage :

-prélever 10 ml de sérum non dilué ou bien d'une solution d'urine diluée au centième dans l'eau distillée.

-ajouter 25 ml de tampon phosphate pH 6,5 0,1 M
et 65 ml d'eau distillée.

-passer la solution sur colonne avec un débit de 2 ml/minute.

-après 5 minutes, effectuer un prélèvement en vue du dosage.

SERUM

-prélever 5 ml et ajouter
1,5 ml de tungstate de sodium
et 1,5ml d' H_2SO_4 (voir 5.2.1.2.). Nessler.

URINE

-prélever directement 3 ml de solution et ajouter 0,3 ml de réactif de

SERUM

- agiter et centrifuger 10 minutes à 10.000 tours/minute.
- prélever de nouveau 3 ml de surnageant et ajouter 0,3 ml de réactif de Nessler.
- résultats :
 - Urine en mg/l = nombre de ppm d' NH_4^+ (voir fig.7)x10/6 x 1.000
 - Sérum en mg/l = nombre de ppm d' NH_4^+ x 10/6 x 10 x 8/5

5.2.3.1. Dosage de l'urée urinaire.

Le dosage effectué sur un même échantillon d'urine par la méthode de référence et la méthode en continu donne les résultats suivants exprimés en g/l :

méthode de référence	méthode en continu
16,8	16,5
16,7	17
16,2	16,8
16,8	17
16	16,7
16,2	17,6
16,8	17
15,9	17,1
16	17,2
15,8	17,6
15,8	17,8

Etude statistique :

Test de DARMOIS (20).

Ce test statistique permet la comparaison de moyennes de 2 séries de résultats lorsque les variances sont inégales ou lorsque leur égalité n'a pas été vérifiée. L'hypothèse contrôlée $m_1 = m_2$ est vérifiée en utilisant la fonction discriminante suivante :

$$R = \frac{n_2 \cdot Sx_1 - n_1 \cdot Sx_2}{\sqrt{n_1 \cdot n_2 (n_2 \cdot S_1^2 + n_1 \cdot S_2^2)}}$$

$$\text{avec } S_1^2 = \text{Variance 1} = \frac{Sx_1^2 - \frac{(Sx_1)^2}{n_1}}{n_1 - 1}$$

$$\text{Si } n_1 = n_2 \quad R \text{ devient : } R = \frac{Sx_1 - Sx_2}{\sqrt{n_2 (S_1^2 + S_2^2)}}$$

Détermination des limites R_{α_1} et $R_{1-\alpha_2}$:

Les limites R_{α_1} et $R_{1-\alpha_2}$ de l'intervalle de refus peuvent être déterminées en utilisant la table de DARMOIS. Celle-ci donne pour les nombres de D.L. $n_1 - 1$ et $n_2 - 1$ et pour α inférieur à 0,5, la valeur $R_{1-\alpha}$ ayant la probabilité α d'être dépassée lorsque l'hypothèse nulle est vraie. Elle est utilisée dans le cas où l'hypothèse contrôlée est $m_1 = m_2$ en choisissant α égal à 0,10 ($\alpha_1 = \alpha_2 = 0,05$).

La valeur expérimentale R est ensuite comparée aux limites R_{α_1} et $R_{1-\alpha_2}$.

L'hypothèse $m_1 = m_2$ est réfutée si $R < R_{\alpha_1}$
ou $R > R_{1-\alpha_2}$,

elle n'est pas réfutée si $R_{\alpha_1} < R < R_{1-\alpha_2}$.

- résultats et calculs :

soient x_1 : résultats obtenus par la méthode en continu

x_2 : résultats obtenus par la méthode de références.

x_1	x_1^2	x_2	x_2^2
16,5	272	16,8	282
17	289	16,7	279
16,8	282	16,2	263
17	289	16,8	282
16,7	279	16	256
17,6	310	16,2	263
17	289	16,8	282
17,1	293	15,9	253
17,2	296	16	256
17,6	310	15,8	250
17,8	317	15,8	250
$Sx_1 = 188,3$	$Sx_1^2 = 3.286$	$Sx_2 = 179$	$Sx_2^2 = 2.916$

$$s_1^2 = \frac{3.286 - \frac{(188,3)^2}{11}}{10} = 6,3$$

$$s_2^2 = \frac{2.916 - \frac{(179)^2}{11}}{10} = 0,32$$

$$R = \frac{(188,3 - 179)}{\sqrt{11(6,3 + 0,32)}} = 1,094$$



d'après la table de DARMOIS (20) : pour D.L.₁=10

D.L.₂=10

$R_{0,95} = 2,84$

$R_{0,05} = -2,84$

- conclusion : l'hypothèse d'égalité des moyennes de ces 2 méthodes de dosage de l'urée urinaire est acceptée. Les résultats obtenus avec la méthode de référence sont légèrement inférieurs à ceux obtenus par un dosage en continu sur colonne mais cette différence n'est pas statistiquement significative.

Nous pourrions également noter la simplicité et la rapidité du dosage en continu avec l'enzyme fixée comparé à la méthode de référence.

5.2.3.2. Dosage de l'urée sérique.

L'échantillon analysé est formé d'un pool de différents sérums et nous est fourni par le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille. La concentration en urée de l'échantillon analysé par le C.R.T.S. grâce à une méthode de dosage automatique est de 0,312 g/l. Cette valeur sera retenue comme valeur de référence.

Résultats en continu (en g/l)

avec des colonnes différentes	avec une même colonne
0,352	0,3305
0,338	0,338
0,328	0,336
0,333	0,336
0,347	0,340
0,341	0,338
0,352	0,354
0,325	0,351
0,322	0,351
0,333	
0,338	
0,341	

Etude statistique :

Comparaison d'une moyenne à une valeur de référence (20).

Nous voulons vérifier l'égalité de la moyenne m ou \bar{x} à une valeur de référence m_0 . L'hypothèse nulle est donc $m = m_0$.

La population est supposée normale mais sa variance est inconnue.

La moyenne est calculée de la façon suivante :

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + \dots + x_n)$$

Nous prenons comme fonction discriminante : $Z = \frac{\bar{x} - m_0}{S/\sqrt{n}}$

$$\text{avec } S^2 = \text{Variance} = \frac{1}{n-1} \cdot S(x - \bar{x})^2 = \frac{Sx^2 - \frac{(Sx)^2}{n}}{n-1}$$

n = nombre de résultats.

Z suit une loi de STUDENT à $n - 1$ degrés de liberté.

Nous pouvons donc calculer $Z_{1 - \alpha/2} = t_{1 - \alpha/2}$ en désignant par t la variable de Student; α étant le risque de première espèce, risque de rejeter l'hypothèse $m = m_0$ alors qu'elle est exacte.

Il s'agit ensuite de comparer la valeur expérimentale de $|Z|$ à $t_{1 - \alpha/2}$, c'est-à-dire que nous vérifions l'inégalité :

$$m_0 - t_{1 - \alpha/2} \cdot \frac{S}{\sqrt{n}} < \bar{x} < m_0 + t_{1 - \alpha/2} \cdot \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (I)$$

- résultats et calculs :

Nous considérons l'ensemble des 21 résultats sans faire de distinction quant au nombre de colonnes utilisées. Chaque résultat est multiplié par 100.

$$\bar{x} = \frac{7.124,5}{21} = 339,2$$

$$S^2 = \frac{2.418.766 - \frac{(7.124,5)^2}{21}}{20} = 84,75$$

$$S = 9,2$$

La table t de Student (47) donne pour un D.L. de 20 :

$$t_{0,975} = 2,09,$$

en remplaçant dans l'inégalité (I), nous avons :

$$312 - 2,09 \times \frac{9,2}{21} < 339,2 < 312 + 2,09 \cdot \frac{9,2}{21}$$

La seconde partie de l'inégalité n'est pas vérifiée.

- conclusion : l'hypothèse d'égalité de la moyenne (0,339 g/l) avec la valeur de référence (0,312 g/l) ne peut être acceptée. La méthode de dosage en continu nous donne un résultat supérieur de 8% par rapport à la valeur étalon.

CONCLUSION

Ainsi se termine cette étude de l'activité enzymatique d'un système insoluble : gel/cellules bactériennes. Ce nouveau type de matériel enzymatique est certes à retenir lors des dosages en chimie clinique ou bien dans l'industrie, en cas de transformation d'un produit.

Ce travail a consisté en la mise au point de ce matériel nouveau en prenant comme exemple l'uréase contenue dans des cellules de *Proteus morgani*, elles-mêmes incluses dans un gel de polyacrylamide. Avant de parvenir au dosage final de l'urée dans les liquides biologiques, il nous a fallu étudier séparément les différents facteurs du système. A ce sujet, quelques constatations méritent d'être reprises ci-dessous.

Le gel de polyacrylamide, déjà utilisé par de nombreux auteurs, peut être considéré comme un support convenable. La préparation du gel est d'abord très simple et ne demande pas des conditions particulières de polymérisation; le gel reste facile à manipuler une fois les concentrations en monomères choisies. Il s'agit de plus d'un matériel inerte, très hydrophile.

Le choix de la source enzymatique est très important. Partant d'une souche à forte activité uréasique (*Proteus morgani*), nous améliorons la qualité de ce matériel cellulaire en effectuant un traitement mutagène par les U.V. Une quantité importante de cellules nous est fournie grâce à la culture en fermenteur de la souche dans un milieu favorable qu'est le $SP_2 \frac{3}{4}$ glucosé.

Nous disposons maintenant des deux éléments importants

du système : le support et l'enzyme. Il nous reste dès lors à déterminer les différents paramètres en vue d'obtenir un rendement uréasique optimum. D'abord la composition du gel (7,5 - 5) qui, par la concentration en monomère, influence l'hydrolyse, un pH de 6,5 valable pour les cellules fixées comme pour les cellules libres et enfin, une concentration en cellules de 10 mg/g de gel et un débit de 2 ml/mi-
minute nous permettent de doser l'urée en continu. Le calcul de la constante de Michaëlis-Menten du système insoluble nous donne une valeur similaire au K_m des cellules en suspension libre tandis que le rendement d'hydrolyse est de 54,54 %, toujours par rapport aux cellules non-fixées. Nous remarquons également une très bonne viabilité lors du stockage des colonnes après fabrication par contre, la dénaturation est très importante pour les colonnes réutilisées plusieurs fois. Il serait intéressant, afin d'augmenter cette viabilité, de choisir de meilleures conditions de conservation des colonnes.

Le dosage de l'urée urinaire est simple, rapide et fournit de très bons résultats. En ce qui concerne l'urée sérique, les valeurs obtenues sont quelque peu supérieures à la valeur choisie comme référence.

Ces colonnes à activité uréasique pourraient constituer l'élément principal des chaînes automatiques de dosage de l'urée dans les laboratoires cliniques en se basant, en fin de chaîne, sur une méthode électrochimique de mesure de l'ion NH_4^+ formé lors du passage des liquides sur colonne. Nous pourrions aussi envisager, pourquoi pas, une électrode spécifique entourée d'une couche de gel de polyacrylamide contenant des cellules bactériennes. Ceci serait un très bel avenir pour un processus de ce genre.

bibliographie

1. AMOTZ S.
Brevet allemand N° 1959169 (1970) : Enzymic reactions with insoluble enzymes.
Chem. Abstr. (1970) 73 31 926 t.
2. ANDERSEN J.A., KOPKO F., SIEDLER A.J. and NOHLE E.G.
2 826 : Partial purification and properties of urease from *Proteus mirabilis*.
Federation proc. (1969) 28 764
3. BALDWIN E.
Dynamic aspects of Biochemistry (1963) 98.
4ème Ed. : Cambridge at the University Press.
4. BAR-ELI A., KATCHALSKI E.
Preparation and properties of water-insoluble derivatives of trypsin.
J.Biol.Chem. (1963) 238 1690
5. BAR-ELI A. and KATCHALSKI E.
Brevet britannique N° 916931 (1963) : Preparation and properties of water-insoluble derivatives of trypsin.
Chem. Abstr. (1963) 58 11618h
6. BARMAN TH.E.
Enzyme Handbook (1969) II 648
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York.
7. BERGMAYER H.V.
Methods of Enzymatic Analysis 401.
Academic Press.
8. BERNFELD P. and WAN J.
Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattices of synthetic polymers.
Science (1963) 142 678

9. BLAKELEY R.L., HINDS J.A., KUNZE H.E., WEBB E.C., and ZERNER B.
Jack Bean Urease (E C 3.5.1.5.). Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids.
Biochemistry (1969) 8 1991.
10. BLATTLER D.P., CONTAXIS C.C., and REITHEL F.J.
Dissociation of urease by glycol and glycerol.
Nature (1967) 216 274.
11. BOULANGER P., POLONOVSKI J., TAYEAU F., MANDEL P. et BISERTE G.
Biochimie médicale 251, 899.
Ed. Masson (1961).
12. BROWN E. et RACOIS A.
Préparation et propriétés de dérivés insolubles de l'uréase et de la trypsine.
Bull.Soc.Chim. (1971) 12 4351.
13. BROWN E. et RACOIS A.
Propriétés des enzymes immobilisées.
Bull. Soc. Chim. (1974) 3-4 743-751.
14. BUNTING and LAIDLER K.J.
Kinetic Studies on Solid-Supported β -galactosidase.
Biochemistry (1972) 11 4477.
15. BUTTIAUX R., BEERENS H. et TACQUET A.
Manuel de Techniques bactériologiques (1969) 298, 316.
Ed. Flammarion. (1969)
16. CATSARAS M.
Réaction enzymologique rapide : β -galactosidase et uréase associées.
An. Inst. Pasteur Lille (1965) 16 175.
17. CHIBATA I., TOSA T. and SATO T.
Immobilized aspartase containing microbial cells : Preparation and enzymatic properties.
Appl. microbiol. (1974) 27 878-885
18. COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O.
SUMNER J.B. : Urease.
Methods in Enzymology (1955) II 378.
Academic Press New-York. (1955)

19. COLOWICK S.P. and KAPLAN N.O.
Methods in Enzymology (1962) XXV B 179 XXVI C 20.
Academic Press.
20. Commissariat à l'Energie Atomique.
Méthodes statistiques en chimie analytique :
Vol.5 fasc. 1 : Comparaison à des valeurs de référence
fasc. 2 : Comparaison de séries de résultats.
Ed. Dunod (1969).
21. DAHLQVIST A., MATTIASSON B. and MOSBACH K.
Hydrolysis of β -galactosides using polymer-entrapped lactase.
A study towards producing lactose-free milk.
Biotechnol. Bioeng. (1973) XV 395,-402.
22. DEGANI Y. and MIRON T.
Immobilisation of cholinesterase in cross-linked polyacrylamide.
Biochim. Biophys. Acta (1970) 212 362.
23. DETERMANN H.
Chromatographie sur gel (1969) II 13-19.
24. DEYSSON G.
Physiologie et Biologie des plantes vasculaires (1970) III 1^epart29
Société d'édition d'enseignement supérieur (1970).
25. FASMAN G.D. and NIEMANN C.
A reinvestigation of the kinetics of the urease-catalysed hydro-
lysis of urea.
I. The activity of urease in the presence of sodium and potassium
phosphate.
J. Am. Chem. Soc. (1951) 73 1646.
26. FISHBEIN W.N.
Urease catalysis : III. Stoichiometry, kinetics and inhibitory
properties of a third substrate : dihydroxyurea.
J. Biol. Chem. (1969) 244 1188.
27. FISHBEIN W.N., SPEARS C.L. and SCURZI W.
Spectrum of urease isozymes : genetic, polymeric and conformeric.
Nature (1969) 223 191.

28. GERARD G.
Cours de chimie analytique qualitative (1971).
I.E.T.S.E. Izel-sur-Semois.
29. GORIN G. and CHIN C.
Urease : IV. its reaction with N - éthylmaleimide and with
silver ion.
Biochim. Biophys. Acta. (1965) 99 418.
30. GORIN G., FUCHS E., BUTLER L.G., CHOPRA S.L. and HERSH R.T.
Some properties of urease.
Biochemistry (1962) 1 911.
31. GUILBAULT G.G. and MONTALVO J.G.
A urea-specific enzyme electrode.
J.Am. Chem. Soc. (1969) 91 2164.
32. GUILLAUME J.
Mode d'action des U.V.
Cours de microbiologie (1973).
Université de Lille.
33. HINBERG I., KORUS R. and O'DRISCOLL K.F.
Gel entrapped enzymes : kinetic studies of immobilized β -galacto-
sidase.
Biotechnol. Bioeng. (1974) 16 943-963.
34. KATCHALSKI E. and BAR-ELI A.
Insoluble modified enzymes.
Brevet israélien 13.950 (1960).
Chem. Abstr. (1962) 56 7702h.
35. KATZ and COWANS
Direct potentiometric study of the urea-urease system.
Biochim. Biophys. Acta. (1965) 107 605.
36. KOBASHI K., HASE J. and KOMAI T.
Evidence for the formation of an inactive urease-hydroxamic acid
complex.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1966) 23 34.
37. LASKIN A.I. and LECHEVALIER H.A.
Handbook of microbiology (1973) I 231- 238.
Published by C.R.C. Press. (1973)

38. LENOIR P.
Etude d'un procédé d'immobilisation de l'activité enzymatique.
D.E.A. Université de Lille I (1973).
39. LYNN K.R.
Some properties and purifications of urease.
Biochim. Biophys. Acta. (1967) 146 205.
40. LYNN K.R. and YANKWICH P.E.
¹³C kinetic isotope effects in the urease catalysed hydrolysis
of urea - temperature dependence.
Biochim. Biophys. Acta. (1962) 56 512.
41. MAGAÑA-PLAZA I. and RUIZ-HERRERA J.
Mechanisms of regulation of urease biosynthesis in *Proteus rettgeri*.
J. Bacteriol. (1967) 93 1294.
42. MAHLER H.R. and CORDES E.H.
Biological Chemistry (1967) 279-284.
A harper international edition. (1967).
43. MILLER R.J., PINKHAM C., OVERMAN A.R. and DUMFORD S.W.
Temperature effects on the acid hydrolysis of glucose 1-phosphate
and urease hydrolysis of urea.
Biochim. Biophys. Acta. (1968) 167 607.
44. MORRIS C.J.O.R. and MORRIS P.
Separation methods in biochemistry (1963) 712.
Ed. Sir Isaac Pitman London. (1963).
45. NEIMS A.H., COFFEY D.S. and HELLERMAN L.
A sensitive radioassay for sulfhydryl groups with tetraethyl-
thiuramdisulfide.
J. Biol. Chem. (1966) 241 3036.
46. NORRIS J.R. and RIBBONS D.W.
Methods in microbiology (1971) 3A 412 et 6A 37.
Academic Press London. (1971).
47. PHILIPPE J.
Les méthodes statistiques en pharmacie et en chimie. (1967)
Ed. Masson et C^{ie} (1967).

48. PREVOT A.R.
Traité de systématique bactérienne (1961) 1 320, 325 et 2 202.
Ed. Dunod (1961).
49. REITHEL F.J.
The enzymes IV 1-21 Ureases.
Academic Press London.
50. RIESEL E. and KATCHALSKI E.
Preparation and properties of water-insoluble derivatives of urease.
J. Biol. Chem. (1964) 239 1521.
51. SCHAPIRA G.
Eléments de biochimie générale (1959) 119, 165.
Ed. Flammarion (1959).
52. SENECA H., PEER P. and NALLY R.
Microbial urease.
Nature (1962) 193 1106.
53. SILMAN I.H. and KATCHALSKI E.
Water-insoluble derivatives of enzymes, antigens and antibodies.
Ann. Rev. Biochem. (1966) 35 II 873.
54. STANIER R.Y., DOUDOROFF M. and ADELBERG E.A.
The microbial world (1963) 445-536.
Published by Prentice-Hall (1963).
55. SUMNER J.B. and HAND D.B.
Crystalline urease II.
J. Biol. Chem. (1928) 76 149.
56. SUNDARAM P.V.
The kinetic properties of microencapsulated urease.
Biochim. Biophys. Acta. (1973) I 319-328.
57. THIMANN K.V.
The life of bacteria (1963) 330.
Ed. The Macmillan Company New-York.
58. TIOLLAIS P., GALIBERT F. et AUGER M.A.
Electrophorèse des acides ribonucléiques.
Biochimie (1972) 3 341-353.

59. TOSA T., SATO T., MORI T. and CHIBATA I.
Basic studies of continuous production of L-aspartic acid by
immobilized Escherichia coli cells.
Appl. microbiol. (1974) 27 886-889.
60. UPDIKE S.J. and HICKS G.P.
Reagentless substrate analysis with immobilized enzymes.
Science (1967) 158 270.
61. UPDIKE S.J. and HICKS G.P.
The enzyme electrode.
Nature (1967) 214 986.
62. VARNER J.E.
The enzymes (1960) 4 247.
Academic Press (1960).
63. VOLFIN P.
Les enzymes stabilisées sur supports insolubles.
La recherche (1971) 13 571.
64. WILSON R.J.H., KAY G. and LILLY M.D.
The preparation and kinetics of lactate dehydrogenase attached
to water-insoluble particles and sheets.
Biochem. J. (1968) 108 845.

