

Quelques applications récentes de la bioélectrochimie en France

Maurice Comtat

L'anecdote veut que la bioélectrochimie soit née il y a deux cents ans sur un balcon comme une conséquence de la brise bolognaise. C'en effet sur un balcon en fer que Luigi Galvani, professeur d'anatomie à l'université de Bologne, avait suspendu, au moyen de crochets en cuivre passant par les nerfs lombaires, les grenouilles qu'il venait de disséquer, dans le but de les faire sécher. Chaque fois que, dans le mouvement de balancement imprimé par la brise, les crochets venaient au contact du fer, les grenouilles mortes ou vives étaient prises de vives convulsions. Galvani attribua ce phénomène à un fluide particulier. On sait que Volta, s'emparant de la découverte, démontra, grâce à sa pile, que le prétendu fluide nerveux n'existait pas et que la contraction était la conséquence de phénomènes électriques.

L'électrophysiologie venait de naître et il faut remarquer que les premiers développements de l'électrochimie sont la conséquence de ce fait expérimental.

Actuellement, la bioélectrochimie peut être définie comme la discipline qui a pour mission l'application des concepts, des théories et des méthodes de l'électrochimie à l'étude des molécules biologiques - ou de leurs modèles - et des systèmes biologiques organisés. Par extension, c'est aussi la partie de la physicochimie consacrée à l'étude de la propagation des signaux électriques émis par les êtres vivants ou encore des réactions de ces derniers à l'application de champs électriques externes.

En 1991, les traités d'électrophysiologie et de bioélectrochimie sont relativement nombreux, une revue existe pour la publication d'articles de bioélectrochimie et de bioénergétique [1], divers groupes ou sociétés savantes tentent de promouvoir la discipline, le secteur de la recherche est actif, comme en atteste la fréquence des congrès ou des écoles scientifiques traitant du sujet. Cependant les applications ayant débouché au stade industriel sont rares voire pratiquement inexistantes. C'est là sans doute la conséquence des cloisonnements de la science qui ont conduit aux développements indépendants de l'électrochimie, de la partie de la biochimie traitant des transferts d'électrons et de la bioénergétique. Il a fallu qu'émergent les notions d'interdisciplinarité pour que se constituent les groupes de réflexion nécessaires à la mise en commun des problèmes relevant de l'électrochimie et de la biologie. En France, le groupe français de bioélectrochimie (*encadré*) n'a qu'une dizaine d'années d'existence et les notions d'électrochimie inculquées aux étudiants de biologie s'arrêtent souvent à la thermodynamique des piles réversibles. On ne s'étonnera donc pas que les applications industrielles de la bioélectrochimie soient relativement rares. Cependant on assiste, depuis quelques années, à une certaine effervescence dans la proposition de biocapteurs et de procédés bioélectrochimiques.

Le but de cet article est de faire le point des réalisations françaises dans ces deux secteurs qui sont les seuls à avoir conduit à des transferts technologiques vers l'industrie.

Le Groupe français de bioélectrochimie GFB

Le GFB est une association régie par la loi 1901, qui a pour objectifs :

- de faciliter les rencontres et les échanges entre les chercheurs intéressés par la bioélectrochimie (électrochimistes travaillant sur des molécules biologiques, biologistes utilisant les méthodes et concepts de l'électrochimie) ;
- de favoriser l'établissement de collaborations scientifiques entre différents laboratoires ou différentes équipes de recherche francophones ;
- d'établir des relations avec les sociétés savantes ayant des préoccupations scientifiques voisines du GFB ;
- de servir d'interlocuteur auprès des institutions scientifiques nationales et internationales.

Depuis sa création en 1982, le GFB a organisé trois congrès nationaux : Port Leucate, Strasbourg et Aussois (de 120 à 80 personnes), quatre journées thématiques regroupant environ 40 personnes par réunion.

Il a édité deux annuaires et sept lettres d'information destinées à maintenir le contact entre les membres du GFB entre deux congrès.

Le GFB est organisé en quatre groupes thématiques :

- A : molécules biologiques et modèles
- B : membranes biologiques et modèles, bioénergétique
- C : électrophysiologie et effets des champs
- D : applications analytiques, médicales et industrielles.

En 1991, le GFB a organisé, du 3 au 5 décembre, à Lyon (Axotel Perrache), son quatrième congrès national dont les thèmes étaient :

- bioélectrochimie et environnement (biocorrosion, dépollution, capteurs et contrôle) ;
- bioélectrochimie et stress oxydatif (bioélectrochimie de l'oxygène, biomimétique, antioxydants, modèles d'enzymes, conception de nouveaux catalyseurs) ;
- bioélectrochimie et reconstruction membranaire (mesures, canaux ioniques, vésicules, avancées récentes en physiologie végétale).

Le programme était complété par un forum de la bioélectrochimie par affiches commentées. Pour tous renseignements, s'adresser à M. Comtat, Université Paul Sabatier, Toulouse.

I. Les biocapteurs électrochimiques

Un biocapteur électrochimique est un dispositif dans lequel sont associés un élément sensible de reconnaissance ionique ou moléculaire basé sur des biomolécules - enzymes, antigènes, anticorps - ou des systèmes organisés - microorganismes, cellules - et un transducteur électrochimique - électrodes à détection ampérométrique ou potentiométrique, transistors à effet de champs. Ces capteurs sont de véritables interfaces de conversion d'une concentration de substrat ou d'une activité biologique en signal électrique et tirent leur avantage essentiel de la sélectivité de l'élément de reconnaissance moléculaire.

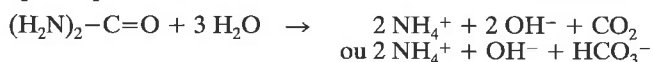
Les combinaisons système de reconnaissance-transducteur sont très nombreuses, ce qui explique le foisonnement des publications et l'abondance des congrès internationaux portant sur la mise au point et les applications de ces biocapteurs. Des ouvrages généraux existent [2, 3] et les mises au point périodiques de la revue *Analytical Chemistry* sont très utiles pour une bibliographie rapide. Les enjeux analytiques sont importants avec des retombées dans les secteurs de la médecine, de la biologie clinique, de la chimie, de la biotechnologie et de l'environnement. D'ailleurs, quelques organismes internationaux ont pour objectif de vendre l'information bibliographique et des études prospectives souvent très optimistes et très alléchantes.

Les électrodes à enzymes sont les plus répandues et les quelques exemples donnés ci-dessous ont pour but de les décrire et d'analyser leurs caractéristiques générales pour mieux comprendre leurs applications essentielles et définir leurs limites.

Une électrode à enzymes est un capteur dans lequel on associe, à une réaction enzymatique de transformation d'un substrat, la détection par une mesure électrochimique de l'un des produits ou réactifs de la réaction. Depuis la proposition d'un tel capteur par Updike et Hicks [4], un grand nombre de travaux a été réalisé et impose une classification. Elle peut se faire soit à partir du type d'enzyme utilisée (hydrolase, oxydoréductase...), soit plus couramment à partir du mode de détection électrochimique, potentiométrique ou ampérométrique.

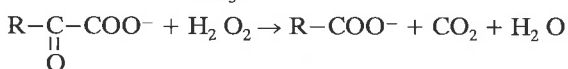
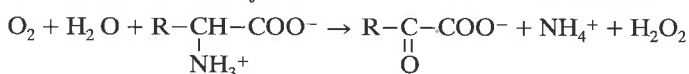
Dans une électrode à détection potentiométrique, c'est le potentiel à courant nul d'une électrode indicatrice qui est mesuré par rapport à une électrode de référence. Les électrodes les plus utilisées sont des électrodes à membrane de verre indicatrices du proton ou de l'ion NH_4^+ , des électrodes sensibles à CO_2 dissous ou des électrodes à membrane cristalline indicatrices de CN^- ou de F^- .

La plus répandue est l'électrode à urée basée sur la réaction :



dans laquelle on détecte, suivant les conditions de pH, soit NH_4^+ soit CO_2 dissous.

Les réactions mises en jeu dans le cas des acides aminés sont :



Bien d'autres substrats sont également dosés, comme la pénicilline, la créatinine, l'amygdaline...

L'emploi d'électrodes à membrane pour la détection et la corrélation de leur potentiel à la concentration C_i en substrat dans la solution à doser par une loi du type $E = A + B \ln C_i$ fait que le domaine de concentration accessible est en général étendu (3 à 4 décades) mais que la précision est quelquefois limitée, notamment si la température n'est pas strictement régulée.

La sélectivité est liée à la fois à l'enzyme utilisée et à l'électrode de détection et il convient fréquemment de trouver des compromis pour l'emploi des électrodes ; par exemple, le pH optimal d'emploi d'une uréase n'est pas nécessairement le même que le pH auquel l'électrode spécifique de NH_4^+ présente ses meilleures possibilités de détection.

Au niveau technologique, diverses solutions sont proposées pour l'emploi de l'enzyme qui peut être soit en solution, confinée au contact de l'électrode spécifique par une membrane semi-perméable, soit immobilisée dans un gel, dans un polymère par coréticulation. L'enzyme peut également être greffée en surface d'une membrane naturelle ou synthétique.

Dans une électrode à enzyme à détection ampérométrique, un produit ou un réactif de la réaction enzymatique subit une électrolyse à potentiel constant sur une électrode inattaquable de platine, d'or ou de carbone vitreux et la mesure de l'intensité d'électrolyse est faite dans des conditions telles qu'elle soit directement proportionnelle à la concentration de l'espèce à doser.

La loi de proportionnalité directe entre la grandeur électrique et la concentration en substrat fait que le domaine de concentration accessible est moins étendu qu'avec les électrodes potentiométriques mais que la précision est supérieure.

Les modes de fixation de l'enzyme sont les mêmes que précédemment.

Les électrodes les plus répandues sont :

- l'électrode à glucose avec la réaction $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}_2$ catalysée par une glucose oxydase associée à la détection de H_2O_2 produit ou de O_2 consommé,

- les électrodes à amino-acides avec des détections des mêmes espèces que dans l'électrode précédente,

- les électrodes à alcool $\text{R}-\text{CH}_2\text{OH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{R}-\text{CHO} + \text{H}_2\text{O}_2$

- l'électrode à acide urique $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3 + \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{CO}_2$

- l'électrode à lactate $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^- + 2 \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} \rightarrow \text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3^- + 2 \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} + 2 \text{H}^+$ ou $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^- + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+$

La figure 1 montre le schéma de principe d'une électrode à enzyme, soit à détection potentiométrique, soit à détection ampérométrique.

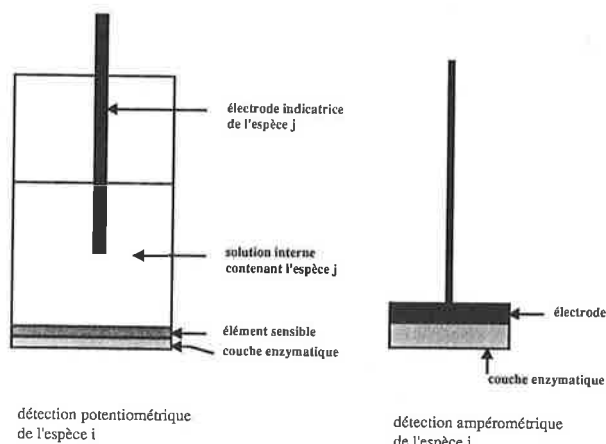


FIGURE 1 - Schéma de principe des électrodes à enzymes à détection potentiométrique ou ampérométrique.

Les paramètres régissant le fonctionnement de ces capteurs, quel que soit le mode de détection, peuvent être regroupés en trois catégories :

- enzymatiques : nature, concentration, activité, stabilité des enzymes, pH et température de la solution analysée. En général il s'agit de trouver les conditions expérimentales telles que la réaction soit la plus rapide possible et que l'enzyme puisse être utilisée sur des périodes longues ;

- géométriques et rhéologiques : profondeur de la chambre réactionnelle, épaisseur et perméabilité des membranes. Il s'agit fré-

quement de faire jouer aux membranes placées en surface des transducteurs un rôle protecteur de la couche enzymatique mais aussi un rôle de frein diffusif chargé de minimiser le flux de substrat entrant en contact avec l'enzyme ;

- électrochimiques : nature et état de surface du détecteur.

Dans le cas de la détection ampérométrique, le choix du potentiel joue un rôle fondamental dans la sélectivité du capteur. La valeur de ce potentiel doit permettre une réaction interfaciale de l'espèce détectée aussi rapide que possible, mais doit être telle que les espèces présentes dans l'échantillon ne réagissent pas électrochimiquement.

Le fait que ces paramètres soient souvent dépendants les uns des autres conduit fréquemment à une optimisation empirique des biocapteurs. Néanmoins des tentatives de modélisation, par la prise en compte du couplage du transfert de matière et des réactions enzymatiques ont été faites et ont conduit à l'optimisation des paramètres géométriques et enzymatiques.

Dans le cas des enzymes fixées, la connaissance de l'activité de surface et de l'évolution de cette activité au cours du temps pose quelques problèmes pour la modélisation.

Chaque capteur peut être considéré comme un cas d'espèce dont les performances sont étroitement corrélées à l'activité enzymatique et à son maintien au cours du temps.

De façon générale, les biocapteurs sont cependant des dispositifs à la technologie simple donc peu onéreux, qui permettent, sur des temps de quelques secondes à deux minutes, d'atteindre des concentrations étalées sur des plages de une à quatre décades. La précision est comprise entre 1 et 10 % suivant le mode de détection.

La durée de vie du capteur, avec un lot d'enzyme donné, dépend de la nature de l'enzyme et naturellement des conditions d'utilisation et de stockage du capteur.

Les applications principales concernent la détection de substrats dans des fluides biologiques : urée, acide urique, glucose, sucres, alcools... Toutefois ces capteurs peuvent également conduire à des mesures d'activité enzymatique ou à la détermination de concentrations d'inhibiteurs de la réaction enzymatique. De ce fait, leur emploi peut être envisagé dans des secteurs variés de la médecine, de l'agroalimentaire, de la chimie ou de l'environnement. Il est étonnant que ces capteurs ne soient pas plus répandus d'autant que le montage du dispositif de mesure peut être modulaire et réalisé à partir de potentiostats, enregistreurs et électrodes commercialisées. Des laboratoires d'analyse ou de contrôle de l'industrie, des services d'enseignement des universités et grandes écoles possèdent, pour leurs applications personnelles, de tels capteurs et font rarement part de leur expérience et savoir-faire, ce qui laisse planer un doute sur d'éventuelles applications. Mais le marché est peu porteur pour l'instant, car il souffre des problèmes liés au développement de l'instrumentation légère.

Actuellement, la mise au point de nouveaux capteurs se fait suivant quatre directions :

- développement de capteurs bi- ou multienzymatiques : le produit d'une réaction enzymatique est substrat d'une seconde et on comprend que de tels dispositifs permettent d'étendre le champ des substrats détectés et d'affiner la sélectivité d'une analyse. Les problèmes essentiels sont liés à la compatibilité des conditions expérimentales pour la mise en œuvre des diverses enzymes. La proposition de tels capteurs passe par une étude cinétique détaillée des différentes réactions enzymatiques pour choisir les vitesses optimales de consommation de substrats ;

- emploi de microorganismes, ou de cellules ou fragments de cellule : l'objectif visé est de contourner l'obstacle de la purification enzymatique. Bien entendu ces capteurs, en général plus robustes que les capteurs à enzymes, sont moins sélectifs, répondent plus lentement et leurs créneaux d'application sont surtout ceux de l'agroalimentaire et de l'environnement ;

- mise en œuvre des réactions antigène-anticorps : c'est une recherche qui permet de diversifier largement les substrats détectés

et qui conduit à la simplification du protocole de dosage immunologique. La détection d'un marqueur radioactif est remplacée par une mesure électrochimique. Toutes les techniques classiques de l'immunologie peuvent être transposées et un exemple simple de dosage sandwich est représenté sur la figure 2, dans le cas où une enzyme a été greffée sur un antigène. Lorsque les réactions antigène-anticorps ont atteint l'équilibre, le substrat de l'enzyme est injecté à la solution et le produit est détecté par une réaction d'électrode ;

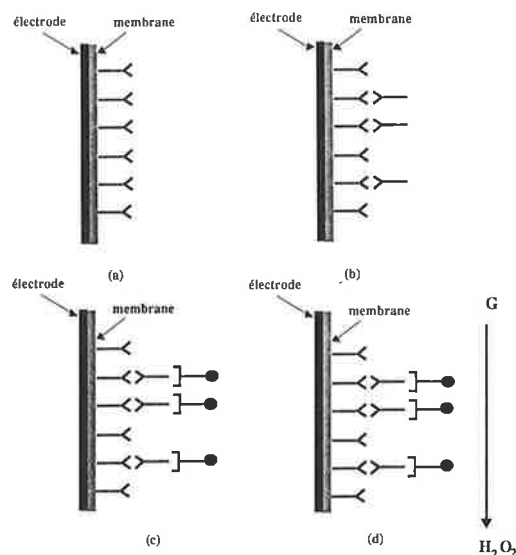


FIGURE 2 - Exemple de réalisation d'un dosage immunologique avec une électrode à enzyme à détection ampérométrique.

Une membrane, sur laquelle est greffé l'antigène, est au contact d'une électrode de platine (a). Dans un premier temps, la réaction antigène-anticorps a lieu (b). Un antigène avec une glucose oxydase greffée est injectée dans la solution (c). Une fois l'équilibre atteint, du glucose G est à son tour introduit dans la solution (d). La glucose oxydase catalyse la réaction de production d'eau oxygénée détectée électrochimiquement.

- exploitation des méthodes d'activation de la réaction de transfert électronique entre l'électrode et une enzyme. Depuis quelques années, l'emploi de médiateurs greffés sur des électrodes, l'utilisation d'activateurs de surface ou d'ions électroinactifs qui permettent la modulation du transfert électronique, la mise en œuvre d'enzymes dont le centre rédox est connecté électriquement à l'électrode par des relais électroniques greffés ont conduit à la proposition de nouveaux capteurs dits de deuxième génération, qui peuvent fonctionner sans cosubstrat. L'exemple le plus intéressant est celui d'une glucose oxydase connectée électriquement à une électrode de platine ou de carbone vitreux, qui permet de doser le glucose dans des milieux très pauvres en oxygène. Cette recherche touche à ce qu'il est convenu d'appeler l'électronique biomoléculaire et permet de proposer des circuits dotés de fonctions d'addition, de soustraction, de multiplication (fig. 3).

Un deuxième secteur très actif de la recherche est celui de la mise en œuvre des biocapteurs dans des applications très spécifiques. Par exemple les électrodes à glucose oxydase miniaturisées sont utilisées pour le contrôle continu du glucose in vivo. De même le dosage continu de certains substrats par électrode enzymatique est envisagé pour le contrôle et la régulation de fermenteurs ou d'appareils de cultures cellulaires.

Enfin, on assiste à la multiplication des travaux théoriques de modélisation pour enlever l'empirisme qui prévaut encore dans la mise au point des capteurs bioélectrochimiques.

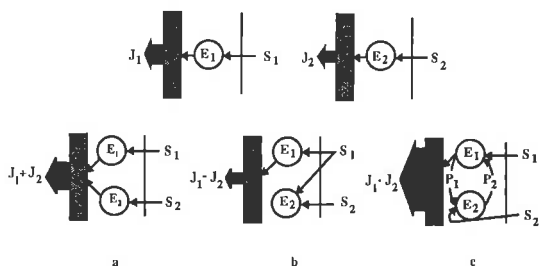


FIGURE 3 - Mise en œuvre d'électrodes à enzymes à détection ampérométrique pour assurer les opérations d'addition (a), de soustraction (b) et de multiplication (c) d'après [3].

La situation française

La recherche sur les biocapteurs électrochimiques a commencé vers 1975 et dès 1978 deux journées d'étude permettaient la rencontre des équipes :

- du laboratoire de Technologie Enzymatique de Compiègne (professeur D. Thomas) qui présentait des travaux théoriques et expérimentaux sur des électrodes spécifiques du glucose et des sucres ;

- du laboratoire de Biologie et Technologie des membranes de Lyon (Professeur D. Gautheron) et du laboratoire d'Énergétique Biochimique de Créteil (Professeur R. Buvet) qui présentaient une électrode spécifique du glucose ;

- de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne (C. Tran Minh) qui présentait une électrode à uréase et une électrode à cholinestérase pour le dosage des inhibiteurs d'enzymes ;

- du laboratoire de Chimie Physique et Électrochimie de Toulouse (Professeur J. Mahenc) qui présentait une électrode spécifique de l'ion $L(+)$ lactate et quelques applications médicales.

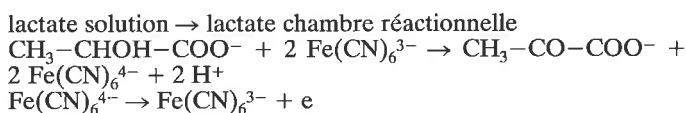
Les prototypes des matériels de quatre équipes étaient exposés et une demi-journée fut consacrée à des démonstrations.

Cette recherche active, qui plaçait la France en bonne position dans la compétition internationale, n'a pas conduit aux transferts technologiques escomptés.

En 1991, la conséquence de ces recherches se solde par deux capteurs industrialisés et commercialisés.

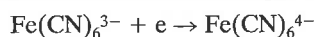
Microzym (Société Sétric Génie Industriel)

Le capteur est une électrode à enzyme sélective de l'ion $L(+)$ lactate, basée sur le mécanisme suivant :



La réaction enzymatique a lieu dans une chambre réactionnelle de quelques microns d'épaisseur délimitée par la surface d'une électrode de platine et une membrane semi-perméable en cellophane. L'enzyme est une lactate déshydrogénase extraite de levure de boulangerie de souche *Hansenula anomala*, qui est en solution dans la chambre réactionnelle.

La contre-électrode qui ferme le circuit d'électrolyse, est une cathode en platine de surface plus importante que celle du transducteur, siège de la réaction électrochimique :



L'ion $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ est ajouté à la solution à doser à une concentration telle qu'elle soit nettement supérieure à la concentration de l'ion $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ formé dans la chambre réactionnelle. De ce fait, il suffit d'appliquer entre anode et cathode une différence de potentiel constante de l'ordre de 80 mV pour maintenir l'anode à un potentiel correspondant au palier de diffusion de l'ion $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. C'est l'application du principe des détecteurs électrochimiques dits à deux électrodes faiblement polarisées.

L'optimisation de l'électrode à enzyme par la prise en compte de paramètres enzymatiques, électrochimiques et géométriques permet d'obtenir un signal électrique directement proportionnel à la concentration du lactate dans la solution dosée, sur le domaine $0,05 \cdot 10^{-3} - 8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, avec une précision 2 % en des temps de l'ordre de vingt secondes. Deux cents dosages peuvent être réalisés avec un même lot d'enzyme.

L'appareil associé comprend une source de tension continue et un dispositif de mesure de l'intensité du courant d'électrolyse piloté par un microprocesseur.

Parmi les nombreuses applications envisageables - analyse en biologie clinique, obstétrique, chirurgie cardiovasculaire, contrôle du taux de lactate chez l'arthritique des membres inférieurs soumis à des épreuves d'efforts quantifiés -, qui avaient fait l'objet des recherches consécutives à la mise au point du capteur, l'industriel qui développe et vend le capteur s'est orienté exclusivement, pour l'instant, vers la médecine du sport et le contrôle d'athlètes de haut niveau. Dans ce seul secteur, le marché est d'une cinquantaine d'appareils par an ; il faut noter que c'est le seul succès commercial européen actuel.

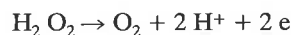
Dans le cadre de la diversification, SGI a mis au point le protocole expérimental pour adapter ce capteur et l'appareillage au dosage du glucose. Le principe de fonctionnement est le même, la lactico-déshydrogénase étant remplacée par la glucose oxydase. Le créneau commercial visé est le dosage de ce métabolite dans les industries biotechnologiques et agroalimentaires et ne concerne pas la médecine.

Gluc 1 (Radiometer Soléa Tacussel)

C'est une électrode à enzyme sélective du glucose, basée sur l'association de la réaction :



et de la détection du peroxyde d'hydrogène par la réaction anodique :



réalisée sur électrode de platine portée au potentiel de 0,6 V par rapport à une électrode au calomel saturée. L'enzyme est immobilisée par greffage sur un film de collagène ou sur une membrane préactivée.

La cathode est l'électrode de deuxième espèce $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$.

Le domaine de linéarité s'étend de 10^{-3} à $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$, le temps de réponse est de 30 à 45 secondes, avec une reproductibilité de 0,5 à 2 %.

La corrélation avec d'autres méthodes enzymatiques de dosage du glucose est excellente. La durée de vie d'une membrane interchangeable est d'au moins mille mesures ou de trois mois environ.

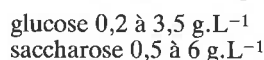
L'appareil associé est une unité dite ampérométrique qui permet l'application de la tension aux bornes et la mesure de l'intensité avec soustraction éventuelle du courant résiduel.

Un deuxième appareil plus automatisé associé à cette électrode est le Glucoprocasseur.

MC2 (Dosivit)

Ce capteur est une réalisation plus récente, mis au point à l'université de Nantes, qui a donné lieu à un transfert de technologie avec la création de la société Dosivit.

Il s'agit d'une électrode ampérométrique dans laquelle le conducteur électronique, l'enzyme et un médiateur sont combinés de façon homogène. La surface du capteur est renouvelable par polissage et le capteur ne nécessite pas de membrane semi-perméable. Cinq substrats peuvent être dosés, suivant la nature de l'enzyme, avec les plages de linéarité suivantes :



lactose 0,5 à 6 g.L⁻¹
 lactate 0,05 à 2 g.L⁻¹
 éthanol 0,015 à 2,4 g.L⁻¹

Le créneau commercial visé est surtout celui de l'industrie agro-alimentaire.

Quelques capteurs sont en voie de développement, mais non commercialisés.

Capteur à carnitine (collaboration entre la société Elf Aquitaine et le laboratoire de Génie Chimique et Electrochimie de l'Université Paul Sabatier à Toulouse)

La L carnitine (CH₃)₃N⁺CH₂-CHOH-CH₂-COO⁻ est présente dans de nombreux tissus animaux, particulièrement le muscle, mais aussi dans les plantes et les microorganismes. Le rôle physiologique de cette molécule est de transporter les acides gras à longue chaîne au-travers de la membrane mitochondriale et de contrôler de ce fait leur oxydation.

Parce que les acides gras représentent la source énergétique essentielle du myocarde et sont les substrats essentiels des muscles squelettiques, il a été montré que les déficits en carnitine conduisent à l'accumulation des lipides intracellulaires et à des myopathies musculaires et cardiaques.

Le dosage de ce substrat est important pour le contrôle des appareils de production.

Le capteur développé pour suivre les réacteurs de bioconversion est basé sur la réaction :

carnitine + NAD⁺ → déshydrocarnitine + NADH + H⁺
 catalysée par une carnitine déshydrogénase CDH.

Le potentiel nécessaire à l'oxydation de NADH à une vitesse importante, est élevé (0,8 V/ecs) et le capteur basé sur la détection de NADH présente de nombreuses interférences.

Une deuxième réaction est associée à la précédente, catalysée par une diaphorase :

NADH + 2 Fe(CN)₆³⁻ → NAD⁺ + 2 Fe(CN)₆⁴⁻ + H⁺
 et l'ion Fe(CN)₆⁴⁻ est oxydé sur électrode inattaquable.

Les deux enzymes sont en solution dans une chambre réactionnelle à pH 9,0.

Le capteur a une réponse linéaire dans le domaine 10⁻⁴ – 10⁻² mol.L⁻¹, la précision est de 2 % environ et le dosage demande 2 minutes. La reproductibilité des mesures sur une journée est de 5 %. Les valeurs données par le capteur et par les autres méthodes de détermination de la concentration ne diffèrent pas de plus de 2 %. 75 déterminations ont pu être réalisées en trois jours avec les mêmes lots d'enzymes et 160 déterminations sur un mois pour suivre la synthèse de la carnitine dans divers réacteurs.

Capteurs des ions phosphate (laboratoire de technologie enzymatique de l'Université de Lyon)

Un dosage sensible et spécifique des ions phosphates par un capteur est un des challenges actuels du contrôle de la pollution.

Le dosage des phosphates peut être envisagé de plusieurs façons :

- par la mise en œuvre d'une phosphatase alcaline et d'une glucose oxydase avec détection de la quantité d'oxygène consommée dans la réaction qui est corrélée à la concentration des ions phosphates qui inhibent la première enzyme ;
- par l'emploi d'une phosphatase de plante avec détection de l'oxygène consommé ou du peroxyde d'hydrogène produit ;
- avec un capteur photomicrobiologique. Sous l'effet de l'irradiation, la concentration locale d'oxygène au contact de l'algue verte de *Chlorella vulgaris* est modifiée en présence de phosphate et cette modification est suivie par une électrode à oxygène.

L'emploi d'un dispositif bienzymatique (fig. 4) semble prometteur [6]. Il s'agit d'une électrode à détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène produite près d'une membrane où sont co-immobilisées une nucléoside phosphorylase et une xanthine oxydase.

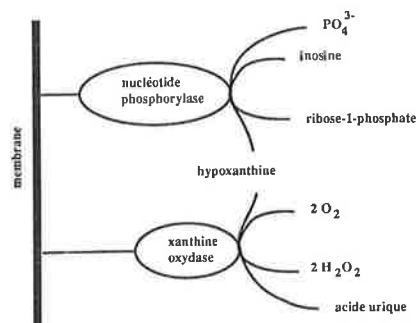


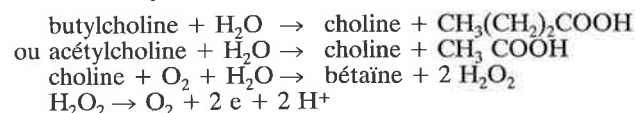
FIGURE 4 - Schéma de principe d'une électrode bienzymatique pour la détection des ions phosphates. La membrane est fixée sur une électrode de platine sur laquelle est détectée l'eau oxygénée, par électrolyse à potentiel constant.

Le seuil de détection est de 10⁻⁷ mol.L⁻¹ et le dosage des phosphates peut être pratiqué sur l'intervalle de concentration 10⁻⁷ – 10⁻⁵ mol.L⁻¹.

Capteurs pour la détection de composés organochlorés (Université de Perpignan et École des Mines de Saint-Étienne)

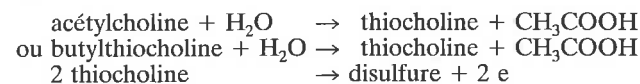
Ces capteurs ont pour objectif la détection de composés organophosphorés utilisés comme pesticides, insecticides ou herbicides. Ce sont essentiellement des capteurs électrochimiques qui reposent sur la mise en œuvre d'une ou de deux réactions enzymatiques dont l'enzyme est inhibée par la substance à détecter.

Dans le cas de biocapteurs bi-enzymatiques (système acétylcholinestérase / choline oxydase ou butylcholinestérase / choline oxydase), l'hydrolyse enzymatique du substrat conduit à la formation de choline qui est oxydée dans une réaction catalysée par la choline oxydase avec formation de H₂O₂.



La libération enzyme-dépendante de H₂O₂ est mesurée ampérométriquement. L'inhibition de la cholinestérase par les composés organophosphorés et les carbamates se traduit par une diminution de la libération de H₂O₂.

Dans le cas d'un biocapteur mono-enzymatique (système acétylcholinestérase et butylcholinestérase seule) l'hydrolyse enzymatique du dérivé thiocholine conduit à la formation de thiocholine qui, par oxydation anodique, donne un composé de type disulfure.



Les limites de détection sont de l'ordre de 10⁻¹¹ mol.L⁻¹ dans le cas du paraoxon.

Ces biocapteurs pourraient être développés dans l'avenir pour détecter des traces de pesticides dans les fruits, l'eau et les sols.

Capteurs à glucose utilisables in vivo (LABAM de l'Université de Créteil)

Les recherches conduites en collaboration avec l'Université du Kansas et les équipes de diabétologie de l'Hôtel Dieu à Paris ont

pour objet la mesure continue du taux de glucose dans l'organisme. Un capteur classique à glucose oxydase est miniaturisé et implanté sous la peau ; il donne des résultats très satisfaisants avec de bonnes corrélations avec le taux de glucose sanguin, sur des périodes de plusieurs jours. Les problèmes de biocompatibilité rencontrés sont inhérents aux systèmes utilisés in vivo. Leur maîtrise permettrait une avancée très sensible dans la proposition de pompes à insuline asservie au taux de glucose.

Ces exemples montrent une activité de recherche soutenue en France et on assiste à un regain d'intérêt pour le secteur des biocapteurs électrochimiques. En effet, les industriels ont toujours des problèmes d'analyse non résolus qui imposeraient l'emploi de tels capteurs. De même l'émergence de problèmes liés à un meilleur contrôle des effluents industriels ou des eaux résiduaires est un facteur de développement de ces capteurs. Pour éviter certaines déconvenues rencontrées dans les années précédentes, lors de l'industrialisation et de la commercialisation de ces capteurs, un club rassemblant universitaires et industriels a été créé et a pour but de coordonner les efforts de recherche et de développement (*encadré*). Notons que les capteurs figuraient dans le dernier appel d'offres du ministère de la Recherche et de la Technologie, dans le thème instrumentation et que le CNRS a inscrit les microcapteurs dans le programme interdisciplinaire de recherche ULTIMATECH.

Il faut espérer que ce soutien par les pouvoirs publics, lié à de nouvelles collaborations, permettra de maintenir la recherche à un bon niveau et de développer la production française de biocapteurs électrochimiques. Il y va de la lutte contre la concurrence japonaise, allemande ou anglo-saxonne.

Le club Capteurs pour les applications biologiques et agroalimentaires CAB

Le CAB est une association régie par la loi 1901 qui a pour but de favoriser la rencontre entre :

- universitaires impliqués dans la recherche de la mise au point et du développement de biocapteurs,
- industriels chargés de la fabrication et de la commercialisation de ces biocapteurs et de l'appareillage correspondant,
- industriels ayant des problèmes spécifiques d'analyse nécessitant la mise en œuvre de tels capteurs.

Créé en 1990, le CAB a à son actif :

- l'organisation de quatre journées scientifiques ;
- l'aménagement d'un stand à Bioexpo 91 (Paris) sur lequel étaient présentés les buts du club, ses projets, ses réalisations ;
- la participation à l'exposition Capteurs 91 (Paris), avec les mêmes objectifs.

II. Les procédés bioélectrochimiques

Ce sont des procédés dans lesquels est dénombrée au moins une réaction de transfert électronique directe ou indirecte entre le métal d'une électrode et une biomolécule en solution ou immobilisée en surface de l'électrode. Ces procédés sont essentiellement orientés vers la préparation de produits chimiques ou biochimiques à haute valeur ajoutée. Les exemples développés ci-dessous sont les premiers à avoir atteint un stade de développement industriel ou préindustriel.

Procédé de réduction de la méthémoglobine (laboratoire de Génie Chimique et Electrochimie, Université Toulouse III)

La méthémoglobine (MetHb) est une hémoprotéine dans laquelle le fer est au degré d'oxydation +III. Présente dans le

sang à des teneurs de l'ordre de 1 %, elle ne joue aucun rôle dans le transport de l'oxygène, qui est assuré par suite de l'équilibre entre la déoxyhémoglobine (Hb) et l'oxyhémoglobine (HbO₂). Dans l'organisme sa concentration est maintenue à une faible valeur grâce aux systèmes enzymatiques réducteurs présents dans le globule rouge. La méthémoglobine apparaît à la suite de divers traitements physiques du sang - lyophilisation, procédés de séparation par membranes ou par résines échangeuses d'ions - Sa réduction est dans certains cas une impérieuse nécessité, notamment pour la valorisation des effluents de l'industrie pharmaceutique de production de l'albumine ou des immunoglobulines. Il est alors fondamental d'obtenir une déoxyhémoglobine ayant conservé ses propriétés fonctionnelles pour la fixation de l'oxygène.

Les paragraphes suivants décrivent la démarche adoptée au laboratoire pour résoudre ce problème et proposer un appareil capable de traiter environ 100 litres de sang par jour.

a/ Mise au point du procédé de réduction bioélectrochimique [7]

La méthode d'étude est la spectroélectrochimie en couche mince, qui permet d'analyser de faibles volumes de solution (quelques dizaines de microlitres) sans soumettre les biomolécules à des contraintes de cisaillement et d'acquérir simultanément des données optiques et électrochimiques.

La réduction directe sur électrode de platine, non observable sur la courbe intensité-potentiel, est possible, comme le montrent les spectres enregistrés au cours d'une électrolyse à potentiel constant d'une durée de plusieurs dizaines de minutes. Toutefois la lenteur de la réduction exclut la proposition d'un procédé et impose l'emploi d'un catalyseur. Le médiateur choisi est la flavine mononucléotide (FMN), dernier relai électronique dans le globule rouge pour la réduction de la méthémoglobine. Cette molécule réagit très rapidement sur électrode de platine avec des constantes de transfert électronique de l'ordre de 1 cm.s⁻¹. La réduction de la méthémoglobine est ainsi rapide et le fait que la flavine soit son partenaire biologique naturel permet la conservation de l'intégrité fonctionnelle de l'hémoglobine. En effet la courbe de saturation qui donne le rapport entre les concentrations de Hb et HbO₂ en fonction de la pression partielle d'oxygène au-dessus de la solution est identique avant et après le traitement électrochimique.

Dès lors, le procédé bioélectrochimique devient envisageable, mais il convient de passer d'une expérience de laboratoire réalisée sur un faible volume de solution à un appareillage permettant de traiter 100 litres de solution par jour. L'extrapolation n'est pas possible et une démarche de génie chimique non conventionnelle s'est imposée. L'analyse des contraintes liées aux biomolécules a été possible grâce à la mise au point d'un dispositif dans lequel sont traités 200 cm³ environ.

b/ Le module de laboratoire et l'analyse des contraintes [8]

Les problèmes essentiels imposés par la nature des molécules traitées ont conduit à la proposition d'un appareillage original. Il fonctionne en anaérobiose stricte : en effet, la réaction de l'oxygène dissous avec la flavine réduite est très rapide, nettement plus rapide que la réaction de la méthémoglobine avec la flavine réduite. Il a donc fallu procéder à un dégazage préalable de la solution à traiter à l'aide d'un gaz inerte, qui arrive en surface de la solution ; le barbotage du gaz est à exclure à cause de la formation de mousses. Par ailleurs le dimensionnement du compartiment anodique est tel que l'oxygène produit au niveau de l'anode ne parvienne pas au contact de la membrane semi-perméable qui sépare les deux compartiments. La solution tourne en circuit fermé et elle est en permanence déoxygénée par un barbotage d'argon.

Cet appareil fonctionne à basse température - de 3 à 6 °C - pour éviter la prolifération bactérienne. Enfin il est conçu de façon à éviter des contraintes de cisaillement importantes qui condui-

raient à la dénaturation des molécules biologiques ; cette condition impose des débits faibles et, de ce fait, des surfaces spécifiques d'électrodes importantes.

Le dispositif de laboratoire est représenté sur la figure 5. L'élément central est un électrolyseur filtre-pressé avec une membrane semi-perméable séparant les deux compartiments. L'anolyte et le catholyte circulent en circuit fermé. Les compartiments sont en série avec un bac de stockage dans lequel est éliminé l'oxygène, un échangeur de chaleur et une pompe péristaltique. Les échangeurs de chaleur et les pompes sont à l'extérieur de l'enceinte réfrigérée.

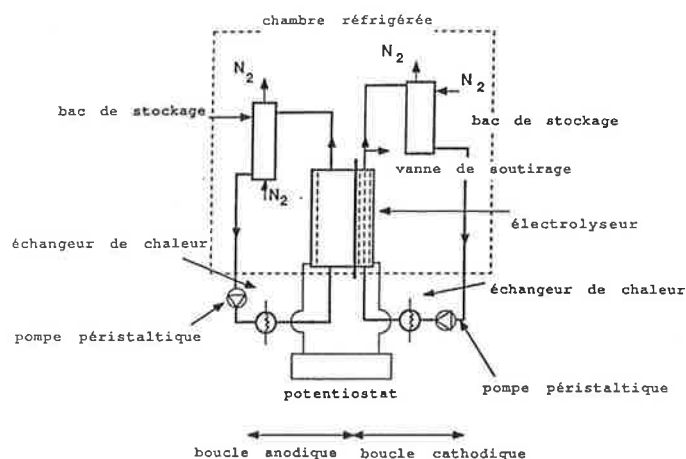


FIGURE 5 - Schéma de principe de l'appareillage pour la réduction électrochimique de la méthémoglobine.

Les tubulures sont en acier inoxydable, à l'exception des tubes des pompes péristaltiques qui sont en Viton, matériau le plus imperméable à l'oxygène.

Le matériau d'électrode a été choisi en fonction de la constante de transfert électronique avec la flavine et le platine irradié a été retenu en raison de ses propriétés mécaniques et de son inertie chimique.

L'électrode sélectionnée est constituée d'un empilement de grilles ou de plaques de métal déployé. Un tel type d'électrode présente une surface relativement importante par unité de volume ($1\ 000\ \text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$) et de bons coefficients de transfert de matière. Il a été préféré à une électrode plane avec des promoteurs de turbulence en matériaux inertes à faible surface spécifique.

c/ La modélisation et l'optimisation

La modélisation est rendue complexe par le nombre élevé de réactions qui entrent en jeu, dont certaines sont encore mal connues. L'hydrodynamique au sein de l'électrode volumique est difficilement quantifiable, les faibles dimensions de l'appareil interdisant de négliger les effets de bords et d'entrée-sortie. Les hypothèses simplificatrices suivent deux grands axes :

- Les effets cinétiques sont découplés des effets hydrodynamiques en supposant qu'il existe un film près de l'électrode, qui est uniquement le siège des transferts de matière par diffusion et des réactions biochimiques. Le mélange convectif homogénéise parfaitement le reste de la solution.

- Un mécanisme réactionnel simplifié est utilisé. Les étapes élémentaires sont regroupées et seul le nombre minimal d'espèces intermédiaires est mis en jeu.

Les résultats du modèle sont comparés aux résultats expérimentaux obtenus avec la maquette de laboratoire et l'ajustement d'un seul paramètre cinétique permet de faire coïncider parfaitement les deux types de résultats.

d/ L'extrapolation

Elle est conduite sur la base du traitement de 100 litres de solution par jour, renfermant 100 g/l d'hémoglobine dont 40 % sous la forme méthémoglobine. La contrainte imposée a été de travailler à vitesse de circulation constante, afin d'éviter toute dégradation de la molécule.

L'optimisation du pilote est menée en minimisant le volume de l'électrolyseur, aussi bien pour obtenir un appareil compact que pour restreindre la surface d'électrode nécessaire, qui constitue l'investissement le plus important.

Le résultat de cette étude conduit à un pilote industriel de trois modules placés en parallèles, constitué chacun de cinq plaques d'électrodes en métal déployé, de dimensions $10\ \text{cm} * 50\ \text{cm}$, représentant une surface totale d'électrode de l'ordre de $1,5\ \text{m}^2$. Notons que l'extrapolation linéaire des résultats donnés par le module de laboratoire, sans prendre en compte les résultats de la modélisation, aurait conduit à une surface de l'ordre de $15\ \text{m}^2$.

Avec un tel appareillage, la consommation d'électricité représente un coût négligeable proche de $4 \cdot 10^{-4}$ centimes par gramme d'hémoglobine. Le prix de fonctionnement est celui de la flavine (2 centimes /g d'hémoglobine). L'amortissement de l'électrode en platine, effectué sur une période de trois ans, se chiffre à 3,5 centimes /g d'hémoglobine.

Le bilan de cette recherche de plusieurs années, menée en étroite collaboration avec un industriel de la pharmacie française (Institut Mérieux), a permis, à notre connaissance, de proposer le premier procédé bioélectrochimique utilisable à l'échelle industrielle. L'appareil issu de ces recherches permet de traiter 100 litres de solution par jour dans des conditions d'anaérobiose stricte, à basse température, dans des conditions hydrodynamiques qui évitent la dénaturation des protéines sous l'effet des contraintes de cisaillement. On a là un exemple original de ce que pourrait être la recherche dans le domaine de la mise au point des procédés bioélectrochimiques. La démarche peut être étendue à la préparation d'autres produits biologiques à haute valeur ajoutée et l'appareillage est adaptable.

Régénération des cofacteurs enzymatiques

Le prix élevé des cofacteurs intervenant dans des réactions d'oxydo-réduction catalysées par des enzymes exclut leur utilisation en quantité stoechiométrique et impose leur régénération sur un nombre de cycles importants. Il semble d'ailleurs que ce soit l'absence de systèmes de régénération satisfaisants qui bloque à l'heure actuelle le développement de l'emploi à grande échelle des oxydoréductases dans le domaine de la chimie fine.

C'est la raison pour laquelle on assiste à la multiplication des travaux portant sur les méthodes de régénération. Si l'on s'en tient à la seule réduction de NAD^+ pour former NADH , réaction demeurant plus délicate que la réaction inverse d'oxydation, ces méthodes peuvent être classées en quatre groupes :

- la régénération chimique par action d'un réducteur fort tel que le dithionite de sodium très souvent dénaturante ;

- la régénération par une deuxième réaction enzymatique. Suivant la nature de l'enzyme employée dans la réaction principale, on peut envisager une régénération par un second substrat avec la même enzyme ou la mise en œuvre d'une deuxième enzyme. Un exemple pour le premier type est celui de l'utilisation de l'alcool déshydrogénase de foie de cheval, tandis que l'on trouve, pour le deuxième type, l'emploi de formiate déshydrogénase, de glucose-6-phosphate déshydrogénase ou d'hydrogénase. On notera dans ce dernier cas la recherche d'enzymes qui conduisent à des produits facilement séparables du milieu réactionnel (CO_2) ou n'ayant pour conséquence qu'une variation de pH.

Les différentes stratégies de mise en œuvre de ces enzymes ont été comparées. Plusieurs applications ont été envisagées (synthèse d'acide D-lactique et d'acide isocitrique, d'acide 12-cétochénodéoxycholique, de carnitine), parmi lesquelles se trouvent de nombreux travaux sur la production des acides aminés.

Notons la proposition d'un système hybride chimique-enzymatique dans lequel un complexe du rhodium sert de catalyseur dans la réduction de NAD^+ par l'hydrogène moléculaire dispersé dans une solution contenant du pyruvate. Ce dispositif permet soit la transformation du lactate en pyruvate par l'emploi d'une lactate déshydrogénase, soit la réduction asymétrique de la 2-norbornone par utilisation d'une alcool déshydrogénase ;

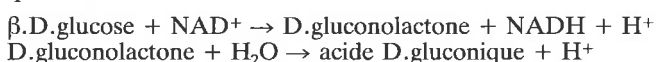
- la régénération par des cellules microbiennes à activité hydrogénéase, alcool déshydrogénase ou malate déshydrogénase ;

- la régénération électrochimique qui peut avoir lieu directement sur des électrodes de diverses natures (plomb, carbone, platine, mercure), sur des électrodes à surface modifiée ou par l'intermédiaire de médiateurs d'oxydo-réduction fixés. L'avantage majeur de ce dernier type de procédé est l'économie des opérations de séparation du deuxième produit réactionnel.

Il faut reconnaître qu'à l'heure actuelle les procédés de régénération enzymatique sont les plus performants.

a/ Régénération électrochimique de NAD^+ (laboratoire de Technologie enzymatique de Compiègne et Université de Paris VI)

Deux réacteurs de laboratoire [9, 10] ont été mis au point pour assurer la production électrochimique de NAD^+ enzymatiquement actif, comme conséquence d'une recherche fondamentale menée depuis plusieurs années. Le principe met en jeu dans chaque cas, les réactions suivantes :



associées à la réaction d'électrode :



Le premier réacteur est de type batch, de 150 cm^3 de volume avec 5 cm^2 d'électrode, le second est un réacteur piston de 13 cm^3 de volume utile, avec une électrode en feutre de carbone de $0,5 \text{ m}^2$ de surface. Dans les deux cas, le nombre de cycles par heure est de l'ordre de 250. Il faut remarquer que les rendements sont très élevés et que le procédé global risque d'être limité par le manque de stabilité des coenzymes participant à des réactions d'hydrolyse et non par les réactions d'électrode. Les exemples mis en jeu, actuellement, portent sur des réactions thermodynamiquement défavorables avec un recyclage efficace de NAD^+ et une élimination concomitante du produit organique formé.

b/ Régénération électroenzymatique de NADH (laboratoire de Génie Chimique et Electrochimie de Toulouse III en collaboration avec Elf Aquitaine)

L'obstacle au développement des procédés électrochimiques pour la régénération de NADH est dû à l'apparition, dans le processus de réduction, d'un intermédiaire radicalaire susceptible d'une rapide dimérisation. De ce fait, la réaction électrochimique directe, sur des électrodes de différentes natures et sur des électrodes à surface modifiée, n'a jamais donné des résultats aussi satisfaisants que dans le cas de l'oxydation.

Une voie originale semble s'ouvrir par la découverte des possibilités de catalyse de la réduction électrochimique par l'hydrogénéase d'*Alcaligenes eutrophus* [11]. Cette enzyme rend en effet possible le passage direct des électrons d'une électrode de platine, portée au potentiel convenable, vers NAD^+ et assure un rendement en NADH supérieur à 99 %. Aucun médiateur en solution n'est nécessaire et les vitesses de réaction sont suffisantes pour que le procédé soit viable à l'échelle industrielle. Des fréquences de régénération de NADH de l'ordre de 450 par heure ont d'ores et déjà été obtenues avec un réacteur analytique. L'étape de conception d'une maquette est en cours. Elle exige la création d'une nouvelle configuration de réacteur, qui permette simultanément d'amener le substrat à transformer près de l'électrode et de confiner l'enzyme (ou les enzymes) dans son voisinage. Un réacteur électrochimique muni d'une membrane d'ultra-

filtration à travers laquelle percole la solution est le dispositif qui semble le mieux adapté.

L'effort de développement de nouveaux réacteurs pour la préparation des composés évoqués pourra sans doute être valorisé dans d'autres procédés relevant de la chimie fine, nécessitant la mise en jeu des protéines d'oxydo-réduction et des cofacteurs. Il est possible d'envisager également la préparation d'espèces biologiques sous la forme réduite sans nécessiter une séparation ultérieure des réducteurs ou la régulation de la concentration d'une molécule sous une forme donnée d'oxydo-réduction. De même, certaines réactions électroenzymatiques de fixation de dioxyde de carbone atmosphérique sont envisageables et intéressent à la fois les secteurs de la chimie fine et de l'environnement.

Les obstacles rencontrés dans le développement des procédés bioélectrochimiques sont de diverses natures. Le premier concerne l'activation du transfert électronique hétérogène métal-biomolécule qui est en général très lent. De nouveaux outils déjà évoqués - médiateurs en solution ou fixés sur les électrodes, électrodes modifiées par des activateurs de surface, connexion électrique moléculaire... - existent et peuvent être mis à profit pour multiplier le nombre de transferts rapides intéressant les applications biotechnologiques. Le second a trait à la biocompatibilité qu'il faut assurer entre l'électrode et l'ensemble des molécules biologiques. La solution repose dans une analyse détaillée du processus biologique et sur l'emploi de la biomimétique. L'utilisation des partenaires naturels impliqués dans les échanges électroniques au niveau des organismes permet de maintenir l'intégrité fonctionnelle des molécules mises en jeu dans le procédé. Le troisième est lié à la mise en œuvre des molécules dans l'appareillage. Il convient en effet de minimiser les contraintes de cisaillement et d'éviter l'apparition de mousses. Ces impératifs nécessitent une démarche originale dans le domaine du génie chimique et imposent, à chaque étape du développement de procédé, d'opérer avec des solutions réelles et d'avoir les moyens de contrôle du maintien de l'intégrité fonctionnelle des molécules.

Quelques contacts

Laboratoire de biotechnologie, École des mines de Saint-Étienne, C. Tran Minh

Laboratoire de technologie enzymatique, Université de Lyon I, P. Coulet

Laboratoire de bioélectrochimie et d'analyse du milieu, Université de Créteil, D. Thévenot

IUT, Université de Perpignan, J.L. Marty

Laboratoire de Génie Chimique et Electrochimie, Université de Toulouse III, M. Comtat

Sétric Génie Industriel, Toulouse, F. Leme

Radiometer Soléa Tacussel, Villeurbanne, J. Fombon

Dosivit. CNRS et Université de Nantes, N. El Murr

Université technologique de Compiègne, C. Bourdillon

Conclusion

Que ce soit dans le domaine des biocapteurs électrochimiques ou dans celui des procédés bioélectrochimiques, le développement est étroitement lié à quelques succès des réalisations actuelles. Il semble que l'état de la recherche soit tout à fait correct. Les deux premiers congrès du GFB ont permis de faire le recensement des thèmes de recherche en cours ; les collaborations ont commencé à s'établir et les différents groupes de recherche sont reconnus à l'échelon national et international. Les contacts entre les industriels et les universitaires sont de plus en plus fréquents et des relations de confiance se sont instaurées à propos des premières

réalisations. Par ailleurs, la volonté des universitaires de développer l'enseignement de l'électrochimie est manifeste. Voilà quelques facteurs encourageants pour le développement ultérieur de la bioélectrochimie.

Bibliographie

[1] Bioelectrochemistry and bioenergetics (Elsevier) : publication couplée avec *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*.
[2] Biosensors. Fundamentals and applications, A.P. Turner, I. Karube et G.S. Wilson, Oxford Science Pub, 1987.

[3] Biosensoren, F. Scheller et F. Schubert, Akademie Verlag, Berlin, 1989.
[4] S.J. Updike et G.P. Hicks, *Nature*, 1967, 214, 986.
[5] M. Comtat, M. Galy, P. Goulas et J. Souppe, *Anal. Chim. Acta*, 1988, 208, 295.
[6] E.M. d'Urso et P.R. Coulet, *Anal. Chim. Acta*, 1991, 239, 1.
[7] H. Durliat et M. Comtat, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 11497.
[8] P. Labrune, A. Bergel et M. Comtat, *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 36, 323.
[9] A. Fassouane, J.M. Laval, J. Moiroux et C. Bourdillon, *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 35, 935.
[10] J.M. Laval, J. Moiroux et C. Bourdillon, *Biotechnol. Bioeng.*, 1991, 38, 788.
[11] H. Durliat, M. Comtat et J.L. Seris, *Anal. Lett.*, 1991, 24, 1 471.