

# Vers l'utilisation des processus bioélectrochimiques à l'échelle industrielle

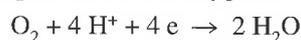
Karine Délécouls, Régine Basséguy, Alain Bergel

## 1. Des processus ubiquitaires à la base de la vie

Il est surprenant de voir le rôle fondamental joué par les réactions d'oxydoréduction dans un nombre considérable de processus physiologiques vitaux. Prenons l'exemple d'un sportif quelconque, marathonien, cycliste ou skieur de fond qui, entre deux profondes inspirations, absorbe une boisson énergétique au glucose. A quel mécanisme cellulaire correspond donc son besoin intuitif et irrésistible d'oxygène et de glucose ? Sans s'en douter, il est en train de fournir à ses cellules le point haut et le point bas d'une longue cascade de réactions d'oxydoréduction qui produit l'énergie nécessaire à sa performance. La molécule de glucose est d'abord scindée en deux molécules d'acide lactique, elles-mêmes dégradées en dioxyde de carbone dans un enchaînement cyclique de réactions d'oxydoréduction. De ce cycle sont extraites huit paires d'électrons qui s'écoulent le long de la chaîne respiratoire, succession continue de systèmes d'oxydoréduction où la forme réduite de chaque molécule réagit avec la forme oxydée de la suivante, pour atteindre l'ultime accepteur d'électrons : l'oxygène. Le glucose joue le rôle de source d'électrons, l'oxygène les évacue en fin de chaîne.

Tout au long du parcours, en perdant de son pouvoir énergétique, chaque paire d'électrons assure la régénération de trois molécules d'ADP en ATP, le vecteur énergétique du muscle. De l'entrée de la molécule de glucose à l'évacuation des électrons par réduction de l'oxygène, une foule de molécules diverses sont impliquées (composés pyridiniques, flaviniques, hémiques...) dans des réactions successives de réduction puis d'oxydation catalysées par des enzymes spécifiques : les oxydoréductases.

L'efficacité de ces réactions conditionne évidemment la performance du sportif, mais plus largement aussi la qualité de vie de chacun de nous. Si par exemple cet enchaînement de réactions ne parvient pas à détruire l'acide lactique formé par la dégradation du glucose, d'horribles crampes viendront rapidement raidir les muscles du marathonien. De la même façon, la dernière étape de réduction de l'oxygène conduit idéalement à la formation d'eau grâce à la capture de quatre électrons par chaque molécule d'oxygène :



mais lorsqu'elle ne se déroule pas de façon convenable, cette réduction peut produire les redoutés radicaux libres  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ou  $\text{OH}^{\cdot}$  qui détruisent les tissus, et accélèrent l'effet néfaste du temps sur nos organismes.

Il serait facile de multiplier les illustrations, en décrivant par exemple les cascades de systèmes d'oxydoréduction qui régissent la photosynthèse et gèrent la transformation

annuelle d'environ  $4.10^{21}$  Joule d'énergie solaire pour fixer entre 30 et  $60.10^9$  tonnes de carbone. Des illustrations plus curieuses peuvent encore être trouvées dans le monde des microorganismes, telles certaines bactéries capables d'évacuer les électrons en oxydant des matériaux métalliques.

## 2. Du processus physiologique au procédé industriel

La clé de ces chaînes d'oxydoréduction est détenue par des enzymes spécifiques, les oxydoréductases, qui sont capables de catalyser la plus grande partie des réactions impliquées. Ces enzymes catalysent ainsi des réactions qui produisent de nombreux composés correspondant à des marchés industriels majeurs dans les secteurs de la chimie fine et de la pharmacie. Les oxydoréductases sont des enzymes essentielles par exemple dans la synthèse d'alcools, d'aldéhydes et de cétones qui sont au cœur des industries des parfums, arômes et additifs alimentaires. Ces enzymes sont encore capables de synthétiser les isomères optiques purs de certains composés chiraux. Cette propriété intéresse au premier chef l'industrie pharmaceutique; de très nombreux médicaments sont en effet des molécules chirales, dont seul l'un des isomères possède une activité thérapeutique, alors que les autres peuvent être nocifs et provoquer des effets secondaires indésirables, ou même être toxiques et amener des conséquences plus dramatiques. Il faut encore noter que, comme la plupart des enzymes, les oxydoréductases présentent des avantages importants pour une utilisation en synthèse :

- elles assurent généralement des vitesses de réaction élevées;
- les réactions sont très sélectives : très peu de composés secondaires sont formés;
- les synthèses ont lieu dans des conditions douces : milieu aqueux, pH proche de la neutralité, température proche de l'ambiante, pression atmosphérique.

Devant autant d'intérêts, les biotechnologues ne sont pas restés inactifs. De nombreuses oxydoréductases sont d'ores et déjà utilisées grâce aux techniques de fermentation. Le microorganisme qui contient les enzymes souhaitées est d'abord cultivé dans un fermenteur, dans un milieu qui assure sa croissance rapide. Dans la deuxième étape, le fermenteur est alimenté en un substrat spécifique que les enzymes sauront transformer en produit voulu. Il est également nécessaire d'alimenter le fermenteur avec un second substrat qui servira de source ou de puits d'électrons selon que la trans-

formation désirée est une réduction ou une oxydation. Malheureusement, si chaque enzyme prise séparément est très sélective, un microorganisme contient de nombreux systèmes enzymatiques différents, qui sont susceptibles chacun de transformer le substrat initial en un produit spécifique différent. Les fermentations délivrent en conséquence des mélanges complexes dans lesquels le produit recherché est noyé dans une foule de produits secondaires (fig. 1A). Les techniques de fermentation ne permettent d'exploiter que très imparfaitement les remarquables propriétés des oxydoréductases.

Un procédé bioélectrochimique, représente la méthode de mise en œuvre des oxydoréductases la plus efficace. Il s'agit d'utiliser ces enzymes isolées, c'est-à-dire extraites du microorganisme qui les a produites. Plusieurs dizaines d'oxydoréductases isolées sont d'ores et déjà disponibles commercialement, et leur extraction puis leur purification sont des opérations couramment pratiquées à l'heure actuelle. Le problème consiste essentiellement à associer ces enzymes à une électrode afin de fournir ou d'extraire les électrons qui sont nécessaires à la réaction souhaitée. En d'autres termes, réaliser un procédé bioélectrochimique de synthèse consiste à reconstruire au voisinage d'une électrode, qui sert de source ou de puits d'électrons, une chaîne d'oxydoréduction qui permette d'acheminer les électrons jusqu'au substrat à transformer. Le schéma général d'un tel procédé, présenté sur la figure 1B, est identique à celui d'un capteur électro-enzymatique, mais dans ce cas le substrat et l'énergie électrique sont considérés comme des entrées,

l'unique sortie du réacteur étant constituée par le produit recherché. En outre le réacteur doit alors être conçu de façon que la transformation du substrat soit la plus rapide et la plus sélective possible et assure la plus grande stabilité possible pour les enzymes. Les enzymes seront alors exploitées de façon optimale.

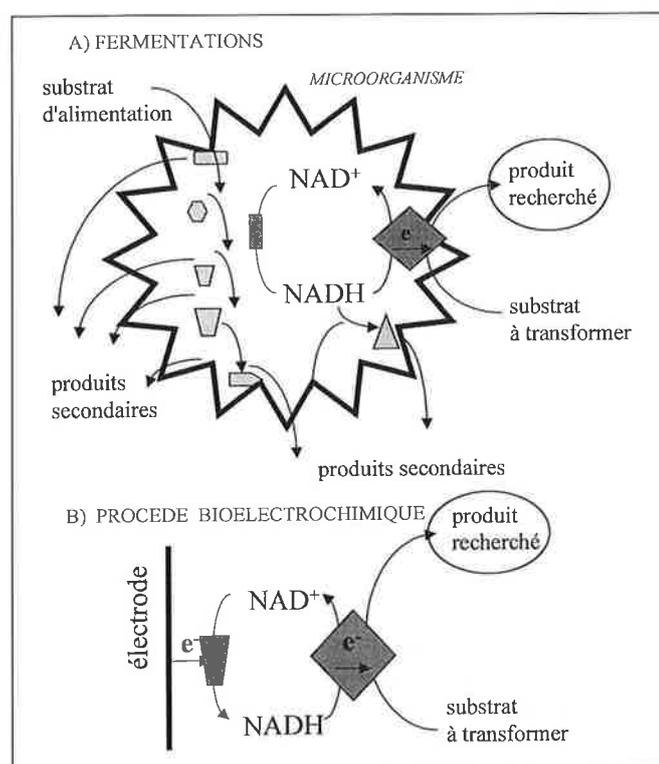
### 3. Un rapide état de l'art

Le premier exemple convaincant de réacteur bioélectrochimique a été présenté il y a une quinzaine d'années par l'équipe de G.M. Whitesides [1]. Il est fondé sur l'utilisation de deux oxydoréductases pour catalyser les réactions qui permettent de transférer les électrons depuis l'électrode jusqu'à l'acide pyruvique qui est réduit en acide D-lactique (fig. 2). Pour une première tentative les résultats obtenus sont excellents puisque un taux de transformation de 94 % est atteint avec un produit de grande pureté. La voie semblait alors tracée vers un rapide transfert à l'échelle industrielle. Toutefois le procédé tel qu'il est conçu souffre de deux inconvénients rédhibitoires:

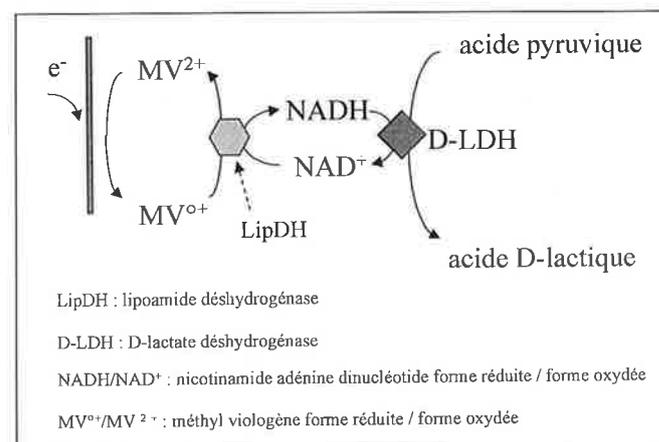
- il utilise le méthyl viologène comme premier relais électronique : c'est un composé très toxique, qu'il est difficile d'impliquer dans la synthèse de composés à usage alimentaire ou pharmaceutique;

- les enzymes sont libres en solution dans l'ensemble du réacteur, or seule la très faible partie des enzymes localisée au voisinage immédiat de l'électrode est réellement active. Dans cette configuration de réacteur, la majeure partie de l'enzyme ne participe pas à la réaction. Le coût des enzymes constituant de loin l'investissement le plus lourd, en perdre la plus grande partie dans la solution n'est absolument pas acceptable en termes de rentabilité.

Permettre l'émergence des procédés bioélectrochimiques à l'échelle industrielle passe nécessairement par la résolution de ces deux problèmes [2, 3]. Les travaux menés au Laboratoire de Génie Chimique depuis quelques années ont apporté des avancées significatives dans ces deux directions. Tout d'abord l'emploi d'une hydrogénase permet de s'affranchir du médiateur électrochimique méthyl viologène. L'hydrogénase adsorbée à la surface de l'électrode permet de catalyser le transfert direct des électrons de l'électrode au

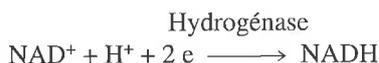


**Figure 1** - Utilisation des oxydoréductases pour la synthèse ; A) dans les fermentations : les 2 enzymes nécessaires à la transformation sont contenues dans le microorganisme dont le métabolisme fournit les électrons nécessaires à la réduction. Un grand nombre de produits secondaires sont obtenus ; B) dans un procédé bioélectrochimique : les 2 enzymes sont extraites du micro-organisme et l'électrode amène les électrons. Seul le produit souhaité est obtenu.



**Figure 2** - Réduction de l'acide pyruvique dans un réacteur bioélectrochimique [1].

composé nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) pour le réduire en NADH [4,5]:



La seconde réaction reste inchangée.

Il faut remarquer que c'est là l'un des rares exemples où un transfert d'électrons très rapide est possible directement depuis la surface d'une électrode jusqu'à une enzyme.

Le confinement des enzymes au voisinage de l'électrode est un problème qui n'a pas trouvé de solution évidente à ce jour. L'équipe de C. Bourdillon [6, 7] a proposé des techniques intéressantes en travaillant sur des systèmes divers, parmi lesquels l'oxydation du glucose ou de l'éthanol. Les diverses méthodes testées ont permis d'étayer une discussion dont on peut citer divers points importants:

- l'immobilisation par liaison covalente des enzymes à la surface de l'électrode peut constituer une solution efficace, mais dont l'intérêt peut être amoindri à cause du masquage d'une partie de l'électrode par les enzymes : la surface de l'électrode disponible pour transférer les électrons diminue et limite la vitesse de la réaction globale;

- les enzymes libres en solution et percolées à travers des électrodes poreuses donnent de bons résultats, mais sont soumises à une dénaturation rapide;

- la dénaturation intrinsèque du nicotinamide adénine dinucléotide, qui est un médiateur électrochimique très souvent utilisé, limite significativement la durée de vie des nombreux systèmes où il est indispensable.

Au Laboratoire de Génie Chimique, l'immobilisation d'enzymes par rétention au sein d'une matrice de polymère déposé électrochimiquement à la surface de l'électrode a donné d'excellents résultats [8-10]. Pour ce type de technique l'inconvénient majeur résidait dans la faible perméabilité des matrices de polymère. Il est en effet indispensable que les médiateurs et les substrats puissent diffuser très rapidement au sein de la matrice pour atteindre les enzymes afin que la transformation ait lieu à une vitesse suffisante. L'obstacle a été pallié en mettant au point une nouvelle technique de déposition du polymère. Toutefois, cette technique n'est pour l'instant applicable qu'à des enzymes relativement robustes, comme la glucose oxydase utilisée au laboratoire. Un système similaire a donné des résultats encourageants avec la peroxydase utilisée par l'équipe de P.N. Bartlett pour la production de peroxyde d'hydrogène par réduction de l'oxygène dissous [11]. Des tentatives plus ambitieuses ont été envisagées, où non seulement les enzymes mais la totalité de la chaîne d'oxydoréduction, médiateurs électrochimiques compris, est immobilisée à la surface de l'électrode [12, 13]. Les vitesses de réactions obtenues dans ces derniers cas restent cependant très faibles.

La possibilité de retenir l'enzyme grâce à une membrane semi-perméable est actuellement envisagée par différentes équipes [14, 15]. Dans ce cas la rétention est due à un effet stérique : la membrane retient les enzymes qui ont de fortes masses molaires, mais laisse diffuser substrats et produits qui sont beaucoup moins volumineux. Dans certains cas des effets électrostatiques ou hydrophobes peuvent aussi se combiner aux effets stériques. Les résultats obtenus restent modestes, car les appareillages sont le plus souvent des réac-

teurs conçus pour d'autres usages, plus ou moins bien adaptés à la spécificité des réactions biochimiques. Au sein du Laboratoire de Génie Chimique des recherches sont en cours pour concevoir de nouveaux réacteurs électro-membranaires capables d'exploiter ces systèmes de manière optimale.

Sans prétendre à l'exhaustivité, il faut signaler d'autres pistes de recherche importantes. Plusieurs équipes tentent par exemple de synthétiser de nouveaux composés organiques capables d'assurer des transferts électroniques très rapides entre l'électrode et le nicotinamide adénine dinucléotide [16]. Ce composé pyridinique est en effet le médiateur électrochimique naturel de très nombreuses oxydoréductases et maîtriser efficacement son oxydation ou sa réduction permettrait d'ouvrir la porte à une multitude de réactions de synthèse particulièrement intéressantes.

#### 4. Un cas plus simple : la régénération de l'hémoglobine

Pour terminer il peut être intéressant de rappeler l'un des premiers travaux réalisés au Laboratoire de Génie Chimique sur la conception d'un réacteur électrochimique destiné à réduire la méthémoglobine [17, 18]. Ce composé produit par l'autooxydation de l'hémoglobine a perdu toutes les propriétés de fixation de l'oxygène et présente une sévère toxicité. Sa présence, notamment dans les dérivés de traitement du sang humain, est à proscrire. Réduire la méthémoglobine en hémoglobine est par conséquent une étape indispensable si l'on envisage d'utiliser la molécule à des fins médicales comme la fabrication de sang artificiel par exemple. Un système bioélectrochimique a été mis en œuvre, particulièrement simple, puisqu'il ne nécessite qu'un seul relais électrochimique entre l'électrode et la méthémoglobine. De plus les réactions sont spontanément très rapides et aucune catalyse par les oxydoréductases n'est nécessaire. Grâce à cette simplicité, une maquette de laboratoire a pu être conçue rapidement, qui préfigure exactement le réacteur industriel. L'hémoglobine obtenue en sortie du réacteur avait parfaitement retrouvé la totalité de ses propriétés de fixation de l'oxygène. Pour la première fois, la démonstration était faite que, dans d'excellentes conditions de rentabilité industrielle, un procédé bioélectrochimique pouvait traiter avec une grande efficacité une biomolécule aussi fragile que l'hémoglobine. Il reste à faire le même type de démonstration sur les systèmes plus complexes, ceux en particulier mettant en œuvre les oxydoréductases.

#### 5. Un vaste potentiel à défricher

Les diverses formes de vies sont autant de preuves, déclinées à l'infini, de l'exceptionnelle efficacité des réactions d'oxydoréduction à l'échelle cellulaire. Il faut y voir une source quasi inépuisable de nouveaux procédés de synthèse, à condition de savoir transformer ces processus physiologiques en procédés industriels rentables. Les équipes de chercheurs qui tentent de relever ce défi sont encore peu nombreuses, mais les avancées significatives obtenues ces dernières années permettent de fonder des espoirs justifiés.

## Références

- [1] R. DiCosimo, C.-H. Wong, L. Daniels, G.M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 4622.
- [2] R. Devaux-Basséguy, A. Bergel, M. Comtat, *Enz. Microb. Technol.*, **1997**, *20*, 248.
- [3] A. Bergel, R. Devaux, *J. Chim. Phys.*, **1996**, *93*, 753.
- [4] J. Cantet, A. Bergel, M. Comtat, J.-L. Séris, *J. Mol. Catal.*, **1922**, *73*, 371.
- [5] P. Gros, C. Zaborosch, H.G. Schlegel, A. Bergel, *J. Electroanal. Chem.*, **1996**, *405*, 189.
- [6] A. Fassouane, J.-M. Laval, J. Moiroux, C. Bourdillon, *Biotechnol. Bioeng.*, **1990**, 935.
- [7] R. Lortie, A. Fassouane, J.-M. Laval, C. Bourdillon, *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *39*, 157.
- [8] P. Gros, P. Aptel, A. Bergel, brevet FR 96.00759, Université Paul Sabatier, **1996**
- [9] P. Gros, T. Gibson, A. Bergel, M. Comtat, *J. Electroanal. Chem.*, **1997**, *437*, 125.
- [10] P. Gros, A. Bergel, *Chem. Eng. Sci.*, **1996**, *51*, 2337.
- [11] P.N. Bartlett, D. Pletcher, J. Zeng, The Electrochemical Society, spring meeting, Montréal-Québec-Canada, **1997**, *97-1*, 1200.
- [12] H. Günther, A.S. Paxinos, M. Schultz, H. Simon, Dechema Biotechnol. Conf. 4, **1990**, 281-284
- [13] M. Beley, J.-P. Collin, *J. Mol. Catal.*, **1993**, *79*, 133
- [14] M.T. Grimes, D.G. Druckhammer, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 6148.
- [15] B. Brielbeck, M. Frede, E. Steckhan, *Biocatalysis*, **1994**, *10*, 49.
- [16] G. Hilt, E. Steckhan, *J. Chem. Soc. Commun.*, **1993**, 1706.
- [17] P. Labrune, A. Bergel, M. Comtat, *Biotechnol. Bioeng.*, **1990**, *36*, 323.
- [18] P. Labrune, A. Bergel, *Chem. Eng. Sci.*, **1992**, *47*, 1229.

## ANALYSER VOS ÉCHANTILLONS AVEC L'ICP LE PLUS PERFORMANT.

# L'ULTIMA

est le plus puissant des ICP

- ▶ Les plus basses limites de détection
- ▶ Une très haute résolution programmable
- ▶ Une excellente précision et rapidité d'analyse
- ▶ L'analyse dans l'UV lointain

## C'est aussi :

- ▶ Un logiciel Windows 95 intelligent et convivial incluant un "Assistant Expert"
- ▶ Un système "IMAGE-NAVIGATOR" qui permet la prise rapide de l'empreinte totale d'un échantillon inconnu pour son identification.

Contactez-nous au Tél. : 01 64 54 13 24 - Fax : 01 69 09 90 88



Les plus grands laboratoires  
du monde entier nous font  
confiance !



16-18, Rue du Canal  
91165 Longjumeau  
Cedex (France)