

~~TH-199~~

T H E S E

présentée pour l'obtention

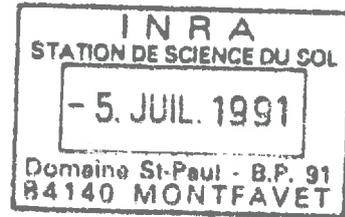
du

DIPLOME DE DOCTEUR DE 3E CYCLE

à

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

- Paris 6 -



FB
BC2

Spécialité : BIOPHYSIQUE

par M. HERVE QUIQUAMPOIX

Sujet de la thèse :

*Activité enzymatique aux interfaces solide-liquide
dans les sols : effet des interactions électrostatiques
entre une β -glucosidase et quelques minéraux et
complexes organo-minéraux.*

Soutenue le 19 avril 1985

devant la Commission composée de :

M. C.M. GARY-BOBO

Président

M. J. GUERN

Examineur

M. P. ROUXHET

"

M. P. CHASSIN

"

AVANT - PROPOS

Je tiens à remercier Messieurs C. - M. GARY-BOBO, J. GUERN et P. ROUXHET d'avoir accepté de faire partie du jury et M. P. CHASSIN pour l'aide constante qu'il m'a apportée dans la réalisation de ce travail.

Je remercie également tous les collègues avec lesquels j'ai eu des discussions fructueuses, en particulier, Mme M. TERCE et Messieurs R. PROST, Ph. CAMBIER ainsi que A. BRUAND.

C'est avec un plaisir tout particulier que je remercie M. J. - P. PETRAUD qui a assuré avec une extrême précision l'essentiel du travail expérimental.

Enfin, je remercie Mme C. NOUGAREDE pour la dactylographie du manuscrit.

S O M M A I R E

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

INTERACTIONS ENTRE LES ENZYMES ET LES ARGILES :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. INTRODUCTION

1.2. ADSORPTION DES PROTEINES SUR LES ARGILES

1.2.1. CINETIQUE DE L'ADSORPTION

1.2.2. DONNEES OBTENUES PAR DIFFRACTION DES RAYONS X

1.2.3. NATURE DES FORCES IMPLIQUEES DANS L'ADSORPTION

1.2.3.1. Forces électrostatiques

1.2.3.2. Forces de Van der Waals

1.3. ACTIVITE DES ENZYMES ADSORBEES SUR LES ARGILES

1.3.1. OBSERVATIONS

1.3.2. INTERPRETATIONS

1.3.2.1. Hypothèse d'une influence de la couche diffuse sur le site actif

1.3.2.2. Hypothèse d'un changement de conformation sous l'effet des forces de Van der Waals

CHAPITRE 2

ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA β -GLUCOSIDASE

ET LA MONTMORILLONITE : HYPOTHESE D'UN CHANGEMENT

DE CONFORMATION SOUS LA DEPENDANCE DES FORCES ELECTROSTATIQUES

2.1. INTRODUCTION

2.1.1. NECESSITE D'UN NOUVEAU MODELE POUR EXPLIQUER L'INFLUENCE DES ARGILES SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES.

2.1.2. CHOIX DU SYSTEME EXPERIMENTAL.

2.1.2.1. L'enzyme

2.1.2.2. L'argile

2.2. MATERIELS ET METHODES

2.2.1. MATERIELS.

2.2.1.1. Préparation de la montmorillonite sodique.

2.2.1.2. Enzymes, substrat et tampons.

2.2.2. METHODES.

2.2.2.1. Protocole A : activité de l'enzyme en l'absence d'argile.

2.2.2.2. Protocole B : activité de l'enzyme en présence d'argile.

2.2.2.3. Protocole C : activité du surnageant de centrifugation.

2.2.2.4. Mode opératoire des différentes expériences.

2.3. RESULTATS ET DISCUSSION

2.3.1. INTERACTIONS ENTRE LA β -GLUCOSIDASE
ET LA MONTMORILLONITE EN FONCTION DU
PH ET DE LA FORCE IONIQUE.

2.3.1.1. β -glucosidase d'Amandier

2.3.1.2. β -glucosidase d'Aspergillus
niger

2.3.2. INFLUENCE DU PH INITIAL SUR LES COURBES
D'ACTIVITE EN FONCTION DU PH DE LA
 β -GLUCOSIDASE D'AMANDIER ADSORBEE SUR
LA MONTMORILLONITE.

2.3.3. ACTIVITE D'UN MELANGE DE β -GLUCOSIDASE
D'AMANDIER ET D'ASPERGILLUS NIGER EN
PRESENCE DE MONTMORILLONITE.

2.4. CONCLUSION

CHAPITRE 3

INTERACTIONS β -GLUCOSIDASE-SURFACES MINERALES :

COMPARAISON DES EFFETS DE LA GOETHITE, DE LA KAOLINITE

ET DE LA MONTMORILLONITE

3.1. INTRODUCTION

3.2. MATERIELS ET METHODES

3.2.1. MATERIELS

3.2.1.1. Préparation de la kaolinite

3.2.1.2. Préparation de la goethite

3.2.2. METHODES

3.3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.3.1. INTERACTIONS β -GLUCOSIDASE-GOETHITE
EN FONCTION DU PH ET DE LA FORCE
IONIQUE.

3.3.2. AFFINITE COMPAREE DE LA β -GLUCOSIDASE
POUR LES SURFACES DE GOETHITE ET DE
MONTMORILLONITE.

3.3.3. INTERACTIONS β -GLUCOSIDASE-KAOLINITE
EN FONCTION DU PH ET DE LA FORCE
IONIQUE.

3.3.4. INFLUENCE DE L'AIRE SPECIFIQUE DE LA
KAOLINITE ET DE LA MONTMORILLONITE.

3.4. CONCLUSION

CHAPITRE 4

EFFET D'UN REVETEMENT ORGANIQUE SUR LES INTERACTIONS

β -GLUCOSIDASE-MONTMORILLONITE

4.1. INTRODUCTION

4.2. MATERIELS ET METHODES

4.2.1. MATERIELS ET METHODES

4.2.1.1. Préparation du complexe
montmorillonite-pentylammonium.

4.2.1.2. Préparation de la fraction
argileuse de sol.

4.2.1.3. Polymères et enzyme.

4.2.2. METHODES

4.3. RESULTATS ET DISCUSSION

4.3.1. ACTIVITE ENZYMATIQUE EN PRESENCE D'UN
COMPLEXE MONTMORILLONITE-PENTYLAMINE.

4.3.2. EFFET DU POLYETHYLENE GLYCOL SUR LES
INTERACTIONS ENTRE LA β -GLUCOSIDASE
ET LA MONTMORILLONITE.

4.3.2.1. Apport de β -glucosidase
précédant celui de poly-
éthylène glycol.

4.3.2.2. Apport de polyéthylène
glycol précédant celui de
 β -glucosidase.

4.3.3. EFFETS DU LYSOZYME SUR LES INTERACTIONS
ENTRE LA β -GLUCOSIDASE ET LA MONTMO-
RILLONITE.

4.3.3.1. Apport de β -glucosidase pré-
cédant celui de lysozyme.

4.3.3.2. Apport de lysozyme précédant
celui de β -glucosidase.

4.3.4. ACTIVITE ENZYMATIQUE EN PRESENCE D'UNE
FRACTION ARGILEUSE DE SOL RICHE EN
MATIERE ORGANIQUE.

4.4. CONCLUSION

CONCLUSION

INTRODUCTION

Le sol est un système poreux présentant trois phases : solide, liquide, gaz. Ceci représente un milieu très particulier pour l'activité biologique.

En effet, la majorité des recherches en biologie se fait en milieu liquide (tube à essai du biochimiste ou du microbiologiste). On conçoit aisément que ce type d'étude puisse facilement s'appliquer aux écosystèmes aquatiques. Par contre, les facteurs physicochimiques intervenant dans l'écologie des microorganismes du sol ne vont pas dépendre uniquement de la composition de la solution aqueuse.

Trois nouveaux paramètres liés à la porosité du milieu interviennent :

- un facteur stérique lié à la forme et à la dimension des pores,
- un facteur hydrique lié à la présence ou non d'une phase aqueuse dans ces pores,
- un facteur interfacial dû au fait que la phase solide délimitant ces pores présente une grande surface adsorbante.

La prise en compte de tous ces facteurs rend le problème très complexe. Il est pourtant un aspect de l'activité biologique des sols pour lequel il est légitime de privilégier le facteur interfacial : l'activité des enzymes exocellulaires.

Les enzymes exocellulaires jouent un rôle très important dans les sols. En effet, les éléments nécessaires à la vie C, N, S et P participent à des cycles biogéochimiques dans lesquels ils sont successivement incorporés dans des molécules biologiques puis libérés.

Les microorganismes réalisent la majeure partie des dégradations permettant la restitution de ces éléments sous une forme assimilable.

Or les microorganismes ne peuvent faire passer les macromolécules du milieu extérieur au travers de leur membrane pour les dégrader dans le milieu intracellulaire. Ils doivent donc excréter des enzymes exocellulaires qui vont dégrader ces polymères en monomères constitutifs (cellulases, protéases) ou libérer certains groupements (arylsulfatases, phosphatases). Il peut alors exister des perméases membranaires spécifiques de ces petites molécules permettant leur transfert à l'intérieur de la cellule.

Les enzymes exocellulaires du sol se trouvent donc, cas assez rare en biologie, dans un milieu extérieur non contrôlé comme le serait un milieu intérieur. Elles vont en particulier se trouver en présence de certains minéraux aux surfaces fortement chargées et de grande aire spécifique, les argiles, et qui vont donc montrer une grande capacité d'adsorption vis-à-vis de ces enzymes. Cette adsorption va entraîner une perturbation du fonctionnement enzymatique.

Mais si les caractéristiques de cette modification du fonctionnement enzymatique sont assez unanimement reconnues (en particulier le déplacement de l'optimum d'activité vers les pH alcalins), il en va autrement des explications de ce phénomène (concentration des protons à la surface de l'argile ou modification de conformation de l'enzyme).

L'objet de cette étude est donc d'apporter une contribution à la connaissance des mécanismes responsables des modifications de l'activité des enzymes adsorbées.

CHAPITRE 1

INTERACTIONS ENTRE LES ENZYMES ET LES ARGILES :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. INTRODUCTION

De nombreuses revues bibliographiques ont déjà été publiées sur ce sujet (DURAND, 1965 ; SKUJINS, 1976 ; BURNS, 1978 ; THENG, 1979 ; BURNS ; 1984).

Une importante partie des publications citées dans ces revues concerne l'activité enzymatique naturelle des sols. Nous ne nous y intéresserons pas car, l'objet de cette thèse étant d'étudier les mécanismes expliquant les perturbations de l'activité enzymatique dues aux argiles, ceci implique que l'on puisse comparer l'activité de l'enzyme libre et celle de l'enzyme adsorbée. En conséquence, nous restreindrons notre étude aux travaux portant sur des enzymes préalablement isolées à partir de microorganismes ou de tissus, et que l'on peut ajouter à des suspensions d'argile.

1.2. ADSORPTION DES PROTEINES SUR LES ARGILES

1.2.1. CINETIQUE DE L'ADSORPTION

Le phénomène est très rapide. Selon ARMSTRONG et CHESTERS (1964), 90 % de l'adsorption maximale est atteinte en

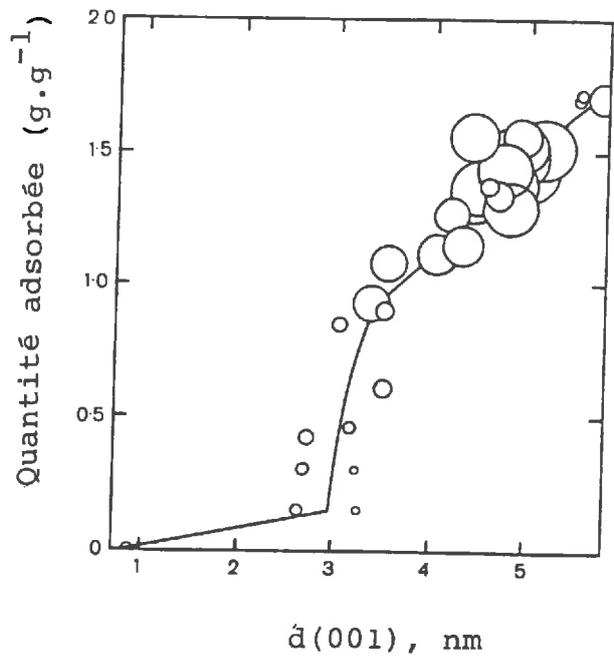


Figure 1.1. : Variation de d(001) avec la quantité de lysozyme adsorbée par la montmorillonite.

(Mc LAREN et al, 1958)

3 minutes. Cet ordre de grandeur est confirmé par d'autres auteurs (Mc LAREN et al, 1958 ; MORGAN et CORKE, 1976). SIMPSON et HUGHES (1978) considèrent que l'équilibre est atteint au bout d'une heure.

1.2.2. DONNEES OBTENUES PAR DIFFRACTION DES RAYONS X

La présence de protéines augmente la distance interfeuillet de la montmorillonite (TALIBUDEEN, 1955 ; Mc LAREN et al, 1968 ; HARTER et STOTZKY, 1973 ; ALBERT et HARTER, 1973 ; SIMPSON et HUGHES, 1968).

HARTER et STOTZKY (1973) montrent, en comparant des données obtenues par diffraction des RX et par microscopie électronique, que la caséine, la chymotrypsine, le lysozyme, l'ovomucoïde et la catalase s'adsorbent sur les surfaces basales de la montmorillonite. Seule, la pepsine, de point isoélectrique bas, semblerait s'adsorber sur les surfaces latérales.

L'interprétation des distances entre les feuillet des complexes montmorillonite-protéine varie selon les auteurs.

Selon Mc LAREN et al. (1958) la distance $d(001)$ augmente progressivement avec la quantité de lysozyme adsorbé (figure 1.1.). Ils interprètent cette distance $d(001)$ comme une valeur moyenne reflétant la présence de feuillet ayant intercalé la protéine et d'autres ne l'ayant pas intercalée.

Travaillant également sur le lysozyme, ARMSTRONG et CHESTERS (1964) estiment par contre que l'étroitesse des pics de diffraction est incompatible avec l'interprétation précédente. Pour expliquer les variations de $d(001)$ avec la quantité de protéines fixées, ils considèrent que la molécule

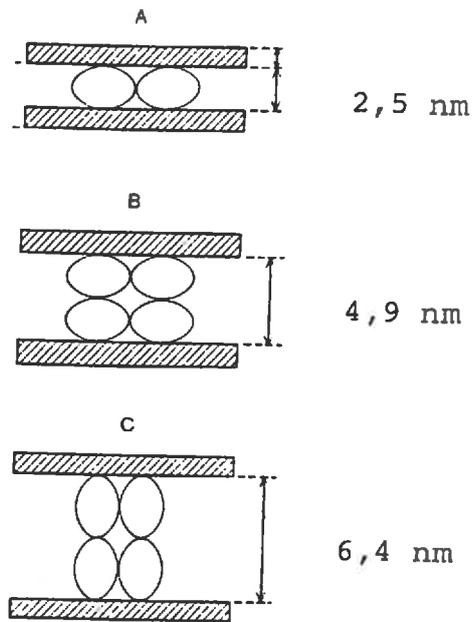


Figure 1.2. : Orientation possible de la molécule de lysozyme dans l'espace interfoliaire de la montmorillonite)

(ARMSTRONG et CHESTERS, 1964).

de lysozyme a une forme ellipsoïdale et qu'elle peut s'adsorber (figure 1.2) :

- soit avec le grand axe parallèle à la surface : en couches monomoléculaires, puis en couches bimoléculaires quand la quantité de protéines fixées s'accroît,
- soit avec le grand axe perpendiculaire à la surface et en couches bimoléculaires aux plus fortes quantités fixées.

Commentant les travaux de Mc LAREN (1958), THENG (1979) fait remarquer que les points obtenus sur la figure 1.1 l'ont été pour des valeurs de pH variant entre 1,9 et 10,3 et des forces ioniques allant de 0,0375 à 0,1375 M. Dans ces conditions des changements de conformation de la protéine peuvent également rendre compte des résultats observés.

Enfin, SIMPSON et HUGHES (1978), en étudiant les complexes montmorillonite-arylsulfatase, montrent que l'espacement basal $d(001)$ est de 1,9 nm, ce qui ne laisse qu'une épaisseur de 0,9 nm pour la protéine. Or le diamètre de celle-ci peut être estimé à 5 nm en solution. Ils concluent donc à une dénaturation de cette enzyme lors de son adsorption.

1.2.3. NATURE DES FORCES IMPLIQUEES DANS L'ADSORPTION

1.2.3.1. Forces électrostatiques

Mc LAREN et al (1958) ont montré que la saturation des surfaces de montmorillonite par le lysozyme entraînait la libération de la presque totalité du sodium échangeable. Ce mécanisme d'échange ionique est confirmé par ALBERT et HARTER (1973) qui récupèrent une quantité de sodium correspondant à 97 % de la capacité d'échange d'une smectite lorsqu'ils ajoutent du lysozyme dans le rapport pondéral 2 : 1 (protéine : argile).

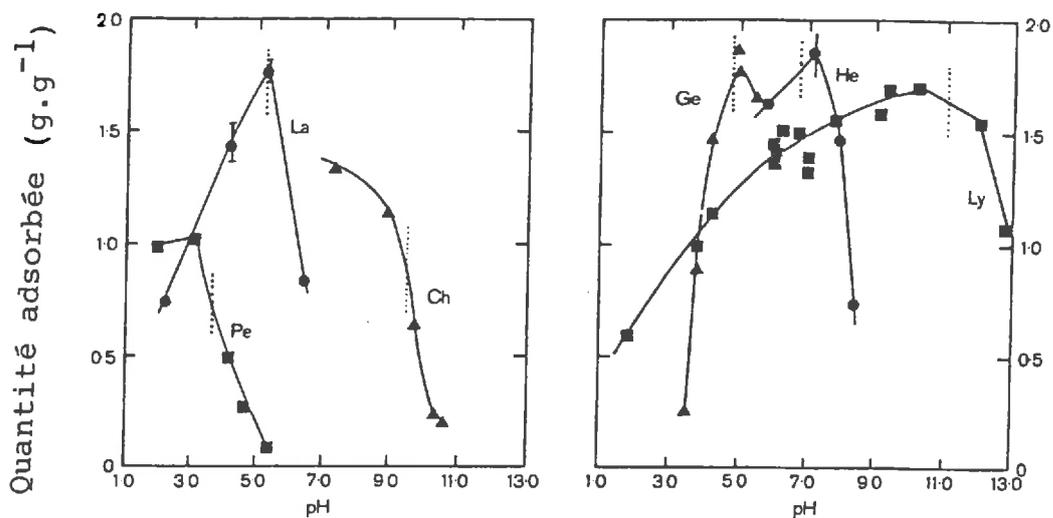


Figure 1.3. : Relation entre la quantité maximale de protéine adsorbée par la montmorillonite et le pH de la suspension.

Les lignes verticales en pointillé indiquent le point isoélectrique des protéines

Ch : chymotrypsinogène

Ge : gélatine

He : hémoglobine

La : β-lactoglobuline

Ly : lysozyme

Pe : pepsine

(Mc LAREN, 1958)

HAMZEHI et PFLUG (1981) étudient l'adsorption de 5 enzymes sur 3 argiles sodiques : la kaolinite, la palygorskite et la montmorillonite dont les capacités d'échange cationique croissent dans cet ordre. Ils observent que pour toutes les enzymes la quantité maximale adsorbée suit ce classement.

HARTER et STOTZKY (1971) étudient l'influence de l'ion compensateur de la charge de la montmorillonite sur la quantité de protéines adsorbées. Ils trouvent que cette quantité diminue dans l'ordre $H^+ > Na^+ > Ca^{2+} > Al^{3+} > La^{3+} > Th^{4+}$. Ce comportement peut aussi bien refléter la capacité décroissante de la protéine à déplacer ces ions que la moindre accessibilité des surfaces minérales interfoliaires. D'après LARSSON et SIFFERT (1983) la dernière hypothèse est vraisemblable puisqu'il n'y aurait pas de diffusion latérale lors de l'intercalation de protéines entre les feuillets de montmorillonite. *quels que soit le cation ?*

Une observation en faveur des forces électrostatiques est la diminution de l'adsorption lorsque la protéine est acétylée (HAMZEHI et PFLUG, 1981). L'acétylation touche les groupements hydroxyles, sulfhydryles et aminés.

1.2.3.2. Forces de Van der Waals

La faible désorption des protéines lors de l'élution par des solutions salines incite HARTER (1975) à penser que les forces électrostatiques ne sont pas les seules impliquées et que les forces de Van der Waals doivent intervenir.

Mc LAREN et al (1958) ainsi que HAMZEHI et PFLUG (1981) ont étudié l'adsorption en fonction du pH. Ils montrent que l'adsorption maximale a lieu au voisinage du point isoélectrique de la protéine (figure 1.3).

Selon HAMZEHI et PFLUG cela s'expliquerait par le

Tableau 1.1. : Déplacement de l'optimum de pH (Δ pH) des enzymes adsorbées sur les argiles.

Enzyme	Argile	Δ pH	Références
Chymotrypsine	Kaolinite	+ 2,0	Mc LAREN et ESTERMANN (1957)
Chitinase	Kaolinite	+ 1,1	SKUJIN et al. (1974)
Papaïne	Kaolinite	+ 0,8	BENESI et Mc LAREN (1975)
Phosphatase	Kaolinite	+ 0,7	RAMIREZ-MARTINEZ et Mc LAREN (1966)
Catalase	Kaolinite	+ 0,65	ALIEV et al. (1976)
Chymotrypsine	Montmorillonite	+ 2,0	Mc LAREN et PETERSON (1965)
Cellulase	Montmorillonite	+ 1,2	PFLUG (1982)
Catalase	Montmorillonite	+ 1,0	ALIEV et al. (1976)
Uréase	Montmorillonite	+ 0,6	DURAND (1964)
Enzyme bactériolytique	Montmorillonite	0,0	HASKA (1981)

fait que c'est en ce point que la solubilité est la plus faible. La protéine ne portant pas de charge nette au point isoélectrique, les forces de liaison seraient probablement du type Van der Waals.

MORGAN et CORKE (1976) obtiennent un certain degré de désorption en traitant les complexes argile-protéine par de l'urée 8 M, alors qu'en absence d'urée il n'y a pas de désorption. Ils en concluent que les liaisons hydrogène interviennent.

1.3. ACTIVITE DES ENZYMES ADSORBEES SUR LES ARGILES

1.3.1. OBSERVATIONS

Un effet très généralement observé est le déplacement de l'optimum de pH de l'activité de l'enzyme adsorbée vers des valeurs plus élevées (tableau 1.1). Le déplacement d'optimum peut atteindre 2 unités pH (Mc LAREN et ESTERMANN, 1957, Mc LAREN et PETERSON, 1965) et rares sont les auteurs n'observant pas ce déplacement (HASKA, 1981).

On observe également une baisse de l'activité des enzymes adsorbées (SKUJINS et al, 1973 ; ALIEV et al, 1976 ; MAKBOUL et OTTOW, 1979 ; PFLUG, 1982).

Ces deux effets sont observés aussi bien avec la kaolinite que la montmorillonite (figure 1.4).

1.3.2. INTERPRETATIONS

1.3.2.1. Hypothèse d'une influence de la couche diffuse sur le site actif

Cette hypothèse repose sur le déplacement de l'optimum d'activité de l'enzyme adsorbée (Δ pH). En effet, les

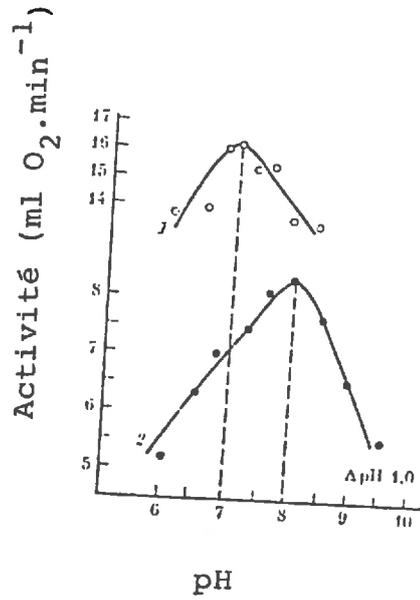
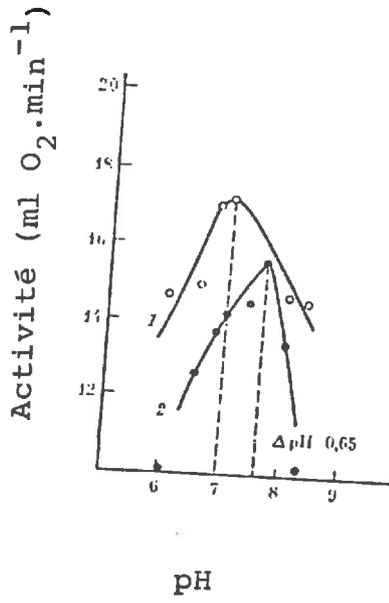


Figure 1.4. : Activité de la catalase

- : en solution
- A : ● : adsorbée sur la kaolinite
- B : ● : adsorbée sur la montmorillonite

(ALIEV et al, 1976)

argiles étant chargées négativement, les ions au voisinage de la surface doivent se répartir selon une distribution de Boltzmann.

En conséquence le pH interfacial (pH_i) est relié au pH de la solution (pH_s) par la relation :

$$\text{pH}_i = \text{pH}_s + 0,43e\psi/kT$$

On peut également utiliser une relation faisant intervenir le potentiel électrocinétique ξ (exprimé en mV), selon HARTER et ROE (1940) :

$$\text{pH}_i - \text{pH}_s = \xi/60$$

Ainsi le site actif de l'enzyme adsorbée se trouve placé dans un microenvironnement de pH plus acide que l'enzyme en solution, d'où le pH observé (Mc LAREN et ESTERMANN, 1957 ; Mc LAREN et PACKER, 1970 ; KATCHALSKI et al, 1971 ; ALIEV et al, 1976 ; DOUZOU et PETSKO, 1984).

Cette hypothèse est séduisante. Nous ferons toutefois quelques remarques.

- Il n'existe aucun travail montrant à la fois l'influence du pH et de la force ionique sur l'activité des enzymes adsorbées sur les argiles. Or, selon la théorie de GOUY et CHAPMANN, l'épaisseur de la couche diffuse χ^{-1} diminue avec l'élévation de la force ionique I :

$$\chi^{-1} \text{ (nm)} \simeq 0,3 \cdot I^{-1/2}$$

D'après cette relation le déplacement d'optimum de pH devrait diminuer avec la force ionique (DOUZOU et PETSKO, 1984) comme cela est indiqué sur la figure 1.5.

- On devrait observer une activité de l'enzyme adsorbée plus forte que celle de l'enzyme libre au-dessus d'un certain pH. Or toutes les figures publiées montrant apparemment cet effet

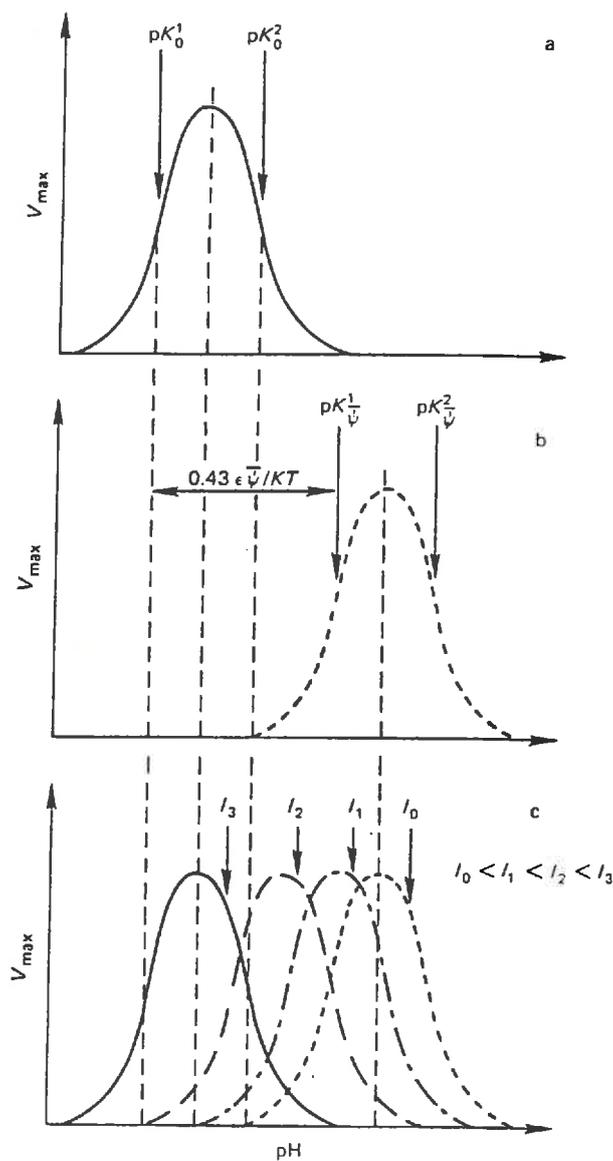


Figure 1.5. : Effet de la force ionique sur les courbes d'activité en fonction du pH des enzymes adsorbées

- a. Enzyme libre
- b. Enzyme adsorbée sur une surface électro-négative
- c. Effet de la force ionique.

(DOUZOU et PETSKO, 1984).

(Mc LAREN et ESTERMANN, 1957 ; BENESI et Mc LAREN, 1975) sont en fait exprimées en activité relative par rapport au maximum d'activité (figure 1.6).

Par contre, lorsque les activités sont exprimées en valeur absolue, la courbe représentant l'activité de l'enzyme en présence d'argile reste toujours comprise dans l'enveloppe de celle représentant l'activité en fonction du pH de l'enzyme en solution (ALIEV et al, 1976 ; PFLUG, 1982) comme on peut le voir sur la figure 1.4

L'interprétation de ces courbes est compliquée par le fait qu'à de très rares exceptions (SKUJINS et al, 1974) il n'est pas vérifié si l'enzyme est totalement adsorbée sur tout le domaine de pH étudié.

1.3.2.2. Hypothèse d'un changement de conformation sous l'effet des forces de Van der Waals

Cette hypothèse (MORGAN et CORKE, 1976 ; HAMZEHI et PFLUG, 1981 ; PFLUG, 1982 ; MAKBOUL et OTTOW, 1984) peut rendre compte d'un phénomène que n'explique pas la précédente, à savoir la diminution d'activité de l'enzyme adsorbée par rapport à l'enzyme libre, quel que soit le pH étudié.

Elle s'appuie principalement sur le fait que la quantité maximale d'enzyme adsorbée s'observe à son point isoélectrique (Mc LAREN et al, 1958 ; ARMSTRONG et CHESTERS, 1964 ; HAMZEHI et PFLUG, 1981).

Un autre argument repose sur les modifications de la vitesse maximale et de la constante de Michaelis de l'enzyme désorbée (MAKBOUL et OTTOW, 1984).

L'hypothèse modification de conformation (mais non nécessairement due aux forces de Van der Waals) est renforcée par les résultats de diffraction des RX montrant que la distance interfeuilletts de certains complexes

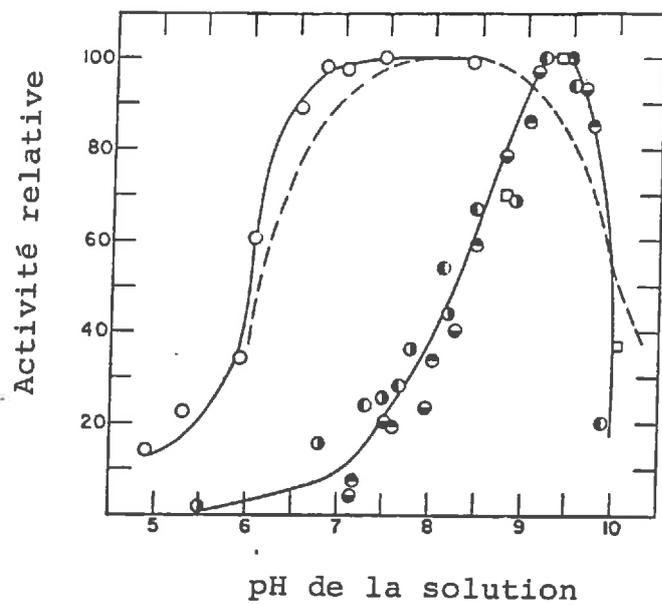


Figure 1.6. : Activité de la chymotrypsine en solution (O) et adsorbée sur la kaolinite (●)

(Mc LAREN et ESTERMANN).

montmorillonite-protéine est inférieure au diamètre de ces protéines en solution (SIMPSON et HUGHES, 1978).

Par contre, la principale critique que l'on peut faire à l'encontre de cette hypothèse est qu'elle n'explique pas du tout le fait que le pH optimal de l'enzyme adsorbée soit déplacé vers les pH élevés.

CHAPITRE 2

ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA β -GLUCOSIDASE

ET LA MONTMORILLONITE : HYPOTHESE D'UN CHANGEMENT

DE CONFORMATION SOUS LA DEPENDANCE DES FORCES ELECTROSTATIQUES

2.1. INTRODUCTION

2.1.1. NECESSITE D'UN NOUVEAU MODELE POUR EXPLIQUER L'INFLUENCE DES ARGILES SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES.

Nous avons vu lors de notre étude bibliographique que les deux principaux effets des argiles sur l'activité des enzymes étaient :

- une diminution globale d'activité
- un déplacement vers les pH alcalins du pH optimal de la réaction.

Nous avons également vu que deux modèles contradictoires avaient été développés pour expliquer ces effets :

- un premier modèle impliquant que l'enzyme adsorbée conserve la même conformation qu'à l'état libre et expliquant le déplacement de pH optimal vers les pH alcalins par le fait que le site actif de l'enzyme se trouve dans un microenvironnement de pH plus acide au voisinage de la surface

qu'au sein du solvant aqueux (couche diffuse de la théorie de GOUY et CHAPMAN). Les deux principales critiques que l'on peut faire à ce modèle sont les suivantes :

- . les mesures d'épaisseur des protéines adsorbées sur la montmorillonite par diffraction des rayons X montrent que dans certains cas elles ont subi une dénaturation telle qu'elles sont déroulées à la surface de l'argile. Ce n'est bien sûr pas un cas général, mais il suffit à introduire le doute car entre la dénaturation totale et le maintien de la conformation native, il doit bien exister des stades intermédiaires que l'on ne peut déceler par de simples mesures d'épaisseur en diffraction des RX.
- . les valeurs des déplacements d'optimum de pH sont trop élevées compte tenu de l'influence de la force ionique sur l'épaisseur de la couche diffuse et des dimensions moyennes d'une enzyme.

- un second modèle explique les effets observés par une modification de conformation de l'enzyme adsorbée due exclusivement aux forces de Van der Waals, ceci étant appuyé sur le fait que la quantité maximale de protéine adsorbée est trouvée au point isoélectrique de celle-ci. L'effet primaire du pH ne va donc jouer que sur l'adsorption plus ou moins grande de l'enzyme, l'état structural de l'enzyme adsorbée étant indépendant du pH. C'est justement là que peut se situer la principale critique de ce modèle : le déplacement d'optimum de pH résulte donc des caractéristiques nouvelles de l'enzyme modifiée par l'adsorption, mais il n'y a aucune raison à ce que l'optimum d'activité de celle-ci soit systématiquement décalé vers les pH plus élevés.

Hormis ces critiques, nous n'avons pas de modèle de rechange bien précis lorsque nous avons commencé cette étude, c'est

pourquoi le modèle que nous proposons sera introduit ultérieurement dans la discussion pour unifier les interprétations de nos résultats expérimentaux. Disons simplement que tout est parti de la constatation qu'aucun chercheur n'avait étudié l'effet conjoint de la force ionique et du pH sur l'activité des enzymes adsorbées sur les argiles. Nous avons réalisé cette étude, puis toutes les autres expériences se sont enchaînées logiquement.

2.1.2. CHOIX DU SYSTEME EXPERIMENTAL.

2.1.2.1. L'enzyme

Pour n'étudier que l'effet de l'argile sur l'enzyme, il fallait que ni le substrat, ni le produit formé au cours de la réaction ne s'adsorbent eux-mêmes sur l'argile pour ne pas modifier la constante apparente de Michaelis (CERVELLI et al., 1973) et ne pas fausser la mesure de la quantité de produit apparu.

Nous avons donc éliminé non seulement les substances cationiques du fait des charges nettes négatives des argiles, mais également les substances comportant des groupements phosphate ou sulfate car ces anions peuvent se complexer sur les surfaces latérales des argiles. Or, ce simple constat élimine d'emblée trois des quatre cycles biogéochimiques auxquels participent des enzymes exocellulaires du sol : cycle de l'azote (protéases libérant des oligopeptides et des acides aminés zwitterioniques, amidohydrolases libérant le cation ammonium), cycle du phosphore (phosphatases libérant l'anion phosphate), cycle du soufre (arylsulfatases libérant l'anion sulfate).

De plus, les substrats électriquement neutres ont l'avantage de simplifier les interprétations dans les discussions sur le modèle impliquant la couche diffuse.

Nous avons donc restreint notre choix aux enzymes intervenant dans le cycle du carbone. Parmi celles-ci, nous éliminerons les amylases et les cellulases qui hydrolysent des polymères neutres (naturels ou leurs dérivés de synthèse solubles) car ces polymères s'adsorbent spontanément sur les argiles sous l'effet des forces de Van der Waals. Il restait le choix entre les α -glucosidases, β -glucosidases et invertases. Nous avons finalement choisi la β -glucosidase car elle intervient dans une des réactions consécutives de dégradation de la cellulose, biopolymère quantitativement le plus important dans les sols. De plus, certains auteurs considèrent l'activité β -glucosidasique des sols comme un révélateur possible de l'aptitude de ceux-ci à dégrader la cellulose (SARATHCHANDRA et PERROTT, 1984).

2.1.2.2. L'argile

Mc LAREN avait jeté les bases de sa théorie à partir d'expériences portant sur les interactions enzyme-kaolinite. Les expériences menées ultérieurement avec la montmorillonite (DURAND) montrèrent le même type d'effet. La montmorillonite saturée par les ions Na^+ présente de nombreux avantages expérimentaux sur la kaolinite. En effet, la montmorillonite sodique est presque entièrement dissociée en feuillets élémentaires en suspension, ce qui fait que l'aire des surfaces accessibles à l'enzyme est très élevée : $800 \text{ m}^2/\text{g}$ de montmorillonite ; cette valeur n'étant que de l'ordre de $15 \text{ m}^2/\text{g}$ pour une kaolinite. Autre conséquence de cette dissociation en feuillets, la montmorillonite sodique en suspension va présenter un très large excès de surfaces basales par rapport aux surfaces latérales. En prenant une taille moyenne de feuillet de $200 \text{ nm} \times 200 \text{ nm} \times 1 \text{ nm}$, les surfaces basales représentent 99 % de l'aire totale, les surfaces latérales 1 %. Or, cette minimisation des surfaces latérales simplifie l'interprétation des résultats car elles ont toujours des charges variables en fonction du pH (rupture du réseau cristallin laissant des valences insatisfaites et responsables de la fixation de protons ou d'hydroxyles, alors que les surfaces basales, dans le cas de la montmorillonite, portent une charge élevée (capacité d'échange cationique de l'ordre de

10^{-3} éq.g⁻¹) indépendante du pH, et dont l'origine vient de la substitution d'atomes d'Al par des atomes de Mg dans la couche octaédrique. Cette indépendance de la charge électrique du minéral vis-à-vis du pH facilite les interprétations face à une enzyme qui en tant que polyampholyte voit sa charge varier avec le pH, et ceci justifiera que nous fassions de la montmorillonite sodique un minéral modèle pour l'élaboration d'un nouveau modèle d'interaction.

2.2. MATERIELS ET METHODES

2.2.1. MATERIELS.

2.2.1.1. Préparation de la montmorillonite sodique.

La fraction inférieure à 2 μm d'une montmorillonite du Wyoming est séparée par centrifugation. L'argile est saturée en sodium par apport d'une solution 1 M de NaCl, puis lavée à l'eau bipermutée. Le traitement est répété deux fois. L'élimination de sels en excès est achevée par dialyse jusqu'à ce que l'on ne détecte plus de chlorure par le test Ag NO₃.

2.2.1.2. Enzymes, substrat et tampons.

La β -glucosidase d'Amandier (*Amygdalus communis*) vient de la firme SIGMA (G-8625, type II). La α -glucosidase d'*Aspergillus niger* est une impureté contenue dans une préparation commerciale de cellulase d'*Aspergillus niger* vendue par SIGMA (C-7377, type I).

Le substrat utilisé pour doser l'activité β -glucosidasique est le 4-nitrophényl- β -D-glucopyranose (laboratoires SARGET).

Les tampons sont préparés en acidifiant avec HCl des solutions de citrate trisodique (pH 1 à pH 7,5) ou de phosphate trisodique (pH 7 à pH 8,5).

2.2.2. METHODES

La plupart des expériences sont réalisées en mesurant l'activité enzymatique selon trois protocoles différents : A, B et C.

2.2.2.1. Protocole A : activité de l'enzyme en l'absence d'argile

Cette mesure est destinée à déterminer l'activité spécifique de l'enzyme en solution en fonction du pH et à servir ainsi de témoin pour les autres mesures.

Toute l'expérience se déroule dans un bain marie à 25°C.

- On apporte séquentiellement dans un tube à essai le tampon, l'enzyme et éventuellement une solution de NaCl.

- On laisse un temps d'incubation de 2 heures.

- La mesure d'activité commence avec l'apport du substrat. Le temps de réaction est de 20 minutes.

- La réaction enzymatique est arrêtée par apport d'une solution alcaline de Na_2CO_3 0,2 M (pH 11).

- Le pH élevé permet le dosage spectrophotométrique direct du 4-nitrophénol, produit de la réaction, qui absorbe la lumière à 400 nm en conditions alcalines. Nous avons vérifié que la loi de Beer-Lambert était respectée dans le domaine de concentration étudié et nous avons déterminé le coefficient d'extinction molaire : $\epsilon = 1,783 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Les concentrations finales (avant l'apport de Na_2CO_3) sont :

- β -glucosidase d'Amandier : $8,35 \mu\text{g.ml}^{-1}$
- β -glucosidase d'*Aspergillus niger* : $385 \mu\text{g.ml}^{-1}$
- 4-nitrophényl- β -D-glucopyranose : 10mM

- La concentration du tampon et de Na Cl détermine la force ionique et nécessite quelques explications. En effet la notion de force ionique, qui provient de la théorie de DEBYE et HÜCKEL, ne se quantifie que pour des ions que l'on peut considérer comme des charges ponctuelles. Ce n'est pas le cas des anions citrate ou phosphate. L'emploi d'un tampon étant nécessaire dans ce type d'expérience, nous avons estimé la force ionique par la concentration en ions Na^+ introduits par le tampon trisodique ou par la solution de Na Cl. En conséquence, les différentes forces ioniques ont été obtenues de la façon décrite dans le tableau 2.1.

2.2.2.2. Protocole B : activité de l'enzyme en présence d'argile

Cette mesure est la somme des activités correspondant à la fraction enzymatique adsorbée et à la fraction enzymatique libre.

Les seules différences avec le protocole A sont les suivantes :

- au début on apporte dans l'ordre : le tampon, l'enzyme, la montmorillonite et éventuellement une solution de Na Cl.

- Avant d'effectuer le dosage spectrophotométrique du produit de la réaction enzymatique, on élimine la montmorillonite par centrifugation. Il a été vérifié que le

Tableau 2.1. : Concentration finale en Na^+ selon les quantités de tampon et de NaCl apportées.

$[\text{Na}^+]$ (mM)	[tampon trisodique] (mM)	$[\text{NaCl}]$ (mM)
2	0,7	0
10	3,5	0
20	7	0
40	7	20
270	7	250

4 -nitrophénol ne s'adsorbait pas sur la montmorillonite.

La concentration finale de montmorillonite sodique est 3 mg.ml^{-1} .

2.2.2.3. Protocole C : activité du surnageant de centrifugation

Cette mesure consiste à séparer par centrifugation l'enzyme libre (surnageant) de l'enzyme adsorbée sur la montmorillonite (culot) ; puis à doser l'enzyme libre en mesurant l'activité dans le surnageant. On connaît ainsi la composante revenant à l'enzyme libre dans la mesure faite selon le protocole B.

Le protocole est presque semblable au protocole B. La seule différence est qu'après les deux heures d'incubation le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à environ 30 000 g. On mesure ensuite l'activité d'une aliquote de surnageant comme dans les protocoles différents.

2.2.2.4. Mode opératoire des différentes expériences

Les expériences montrant l'effet du pH et de la force ionique (paragraphe 2.3.1.) correspondent rigoureusement aux protocoles A, B et C.

Les expériences montrant l'influence du pH initial sur l'activité de la β -glucosidase adsorbée (paragraphe 2.3.2.) sont réalisées en laissant une série de mélanges identiques correspondant au protocole B (force ionique de 20 mM, tous les pH identiques) subir une préincubation de 2 heures. Le pH est ensuite modifié en ajoutant du tampon citrate concentré ayant des pH différents. On laisse incuber de nouveau 2 heures, avant de mesurer l'activité. La force ionique est de 170 mM. Trois séries de pH de préincubation ont été étudiées : 3,6 - 4,2 et 5,7. Les pH de mesure d'activité vont de 2,5 à 6,5.

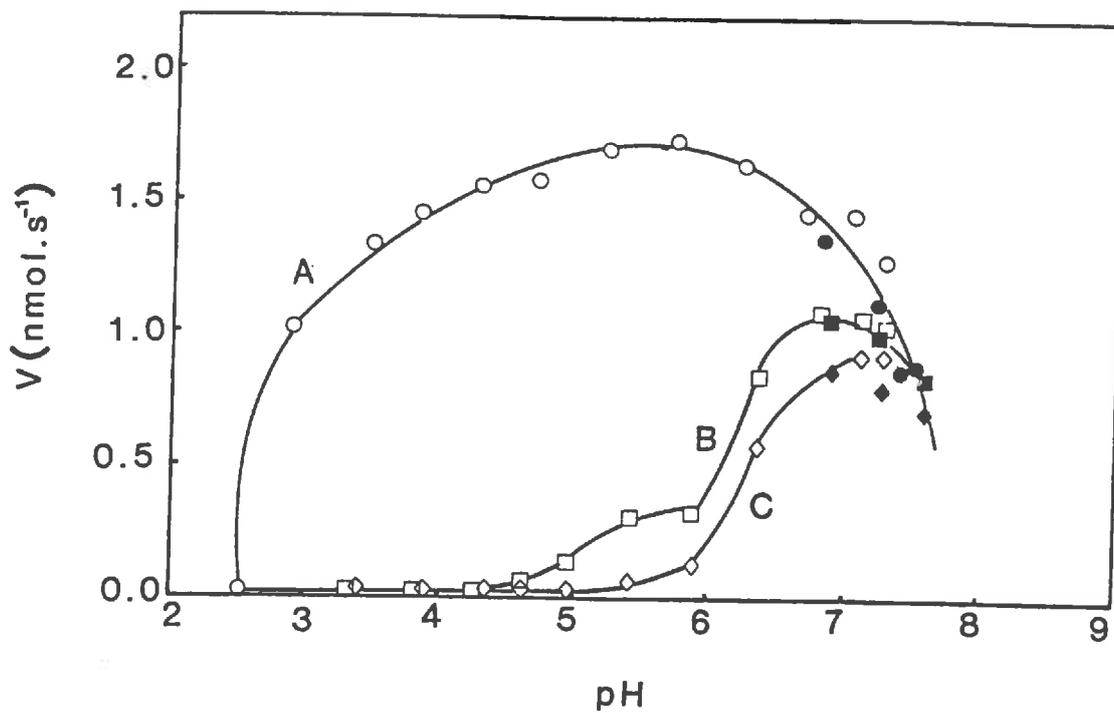


Figure 2.1. : Effet de la montmorillonite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$[\text{Na}^+] = 2 \text{ mM}$.

○ : Témoin (A)

□ : En présence de montmorillonite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
 Symboles fermés pour le tampon phosphate.

Les mesures d'activité des deux β -glucosidases mélangées suivent les protocoles A, B et C pour une force ionique de 20 mM. La seule différence réside dans une légère modification des concentrations finales d'enzyme :

- β -glucosidase d'Amandier : $3,75 \mu\text{g.ml}^{-1}$
- β -glucosidase d'*Aspergillus niger* : $280 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

2.3. RESULTATS ET DISCUSSION

2.3.1. INTERACTIONS ENTRE LA β -GLUCOSIDASE ET LA MONTMORILLONITE EN FONCTION DU PH ET DE LA FORCE IONIQUE.

2.3.1.1. β -glucosidase d'Amandier.

Les résultats correspondant aux forces ioniques de 2, 10, 20, 40 et 270 mM sont présentés respectivement sur les figures 2.1 à 2.5.

Sur chaque figure les courbes A, B et C correspondent respectivement à l'activité enzymatique du témoin sans argile, à l'activité enzymatique en présence d'argile et à l'activité enzymatique du surnageant (cf. protocoles décrits précédemment). Rappelons simplement que la courbe B représente la somme des activités de l'enzyme à l'état libre et à l'état adsorbé, alors que la courbe C ne mesure que l'activité de la fraction non adsorbée.

L'observation simultanée des figures 2.1 à 2.5 (on peut se reporter à la figure 2.6 qui les représente ensemble à échelle réduite) fait apparaître trois domaines de pH dans les courbes d'activité en présence de montmorillonite (courbes B) :

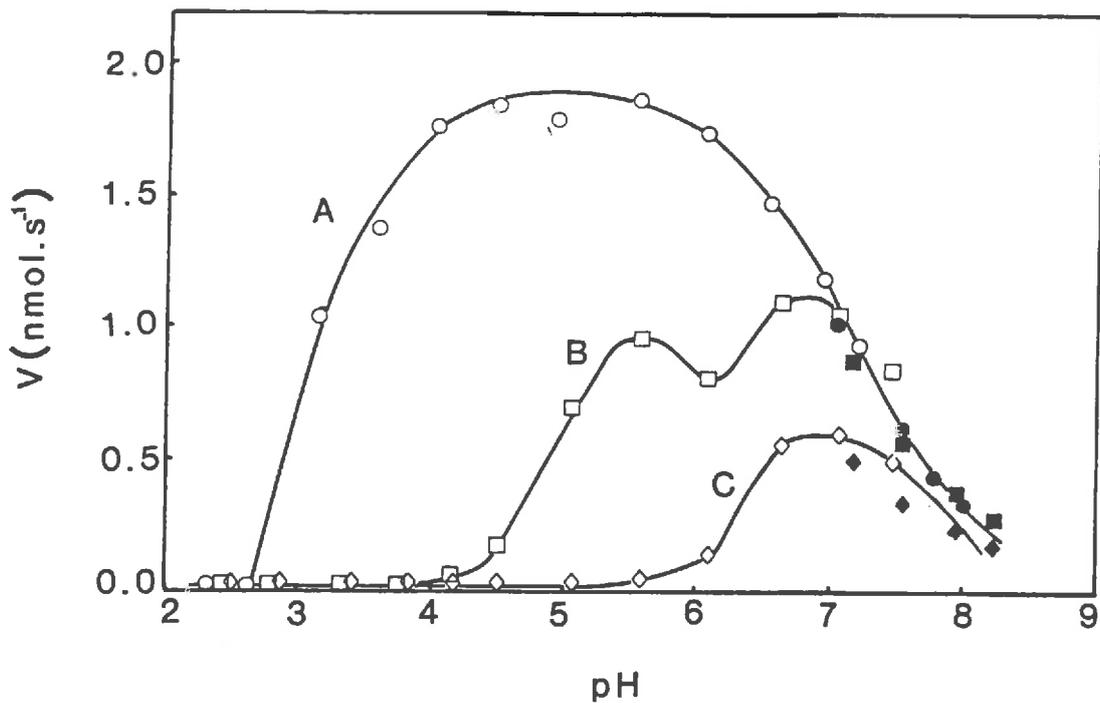


Figure 2.2. : Effet de la montmorillonite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$$[\text{Na}^+] = 10 \text{ mM}$$

○ : Témoin (A)

□ : En présence de montmorillonite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

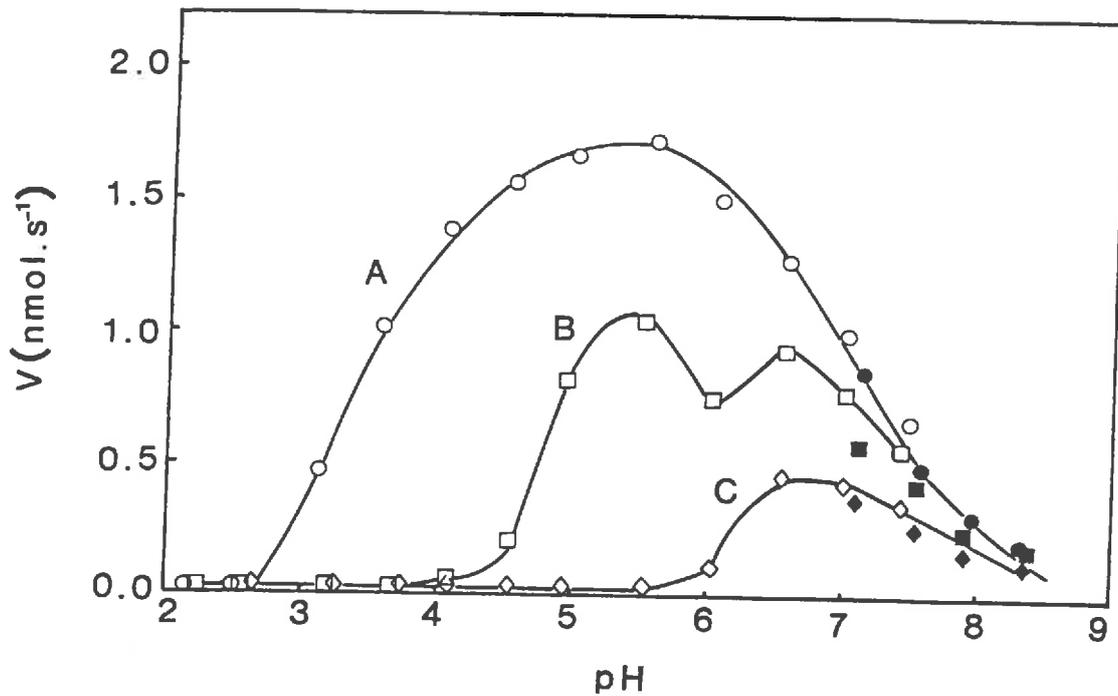


Figure 2.3. : Effet de la montmorillonite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$[\text{Na}^+] = 20 \text{ mM}$

○ : Témoin (A)

□ : En présence de montmorillonite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

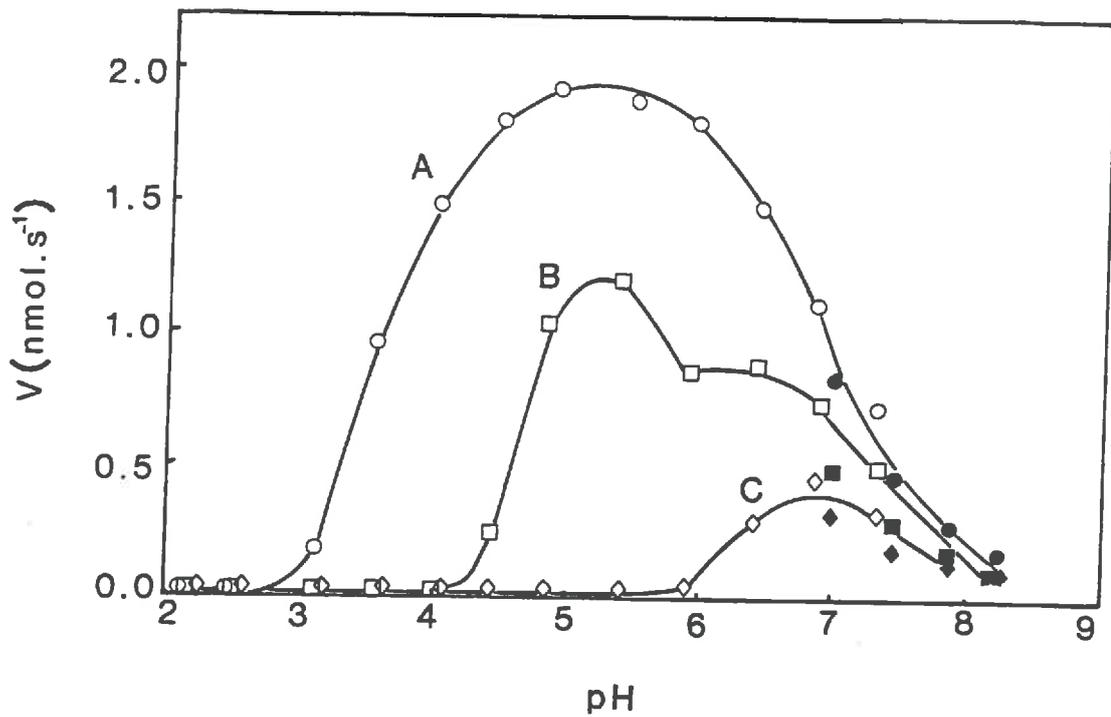


Figure 2.4. : Effet de la montmorillonite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$$[\text{Na}^+] = 40 \text{ mM}$$

○ : Témoin (A)

□ : En présence de montmorillonite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

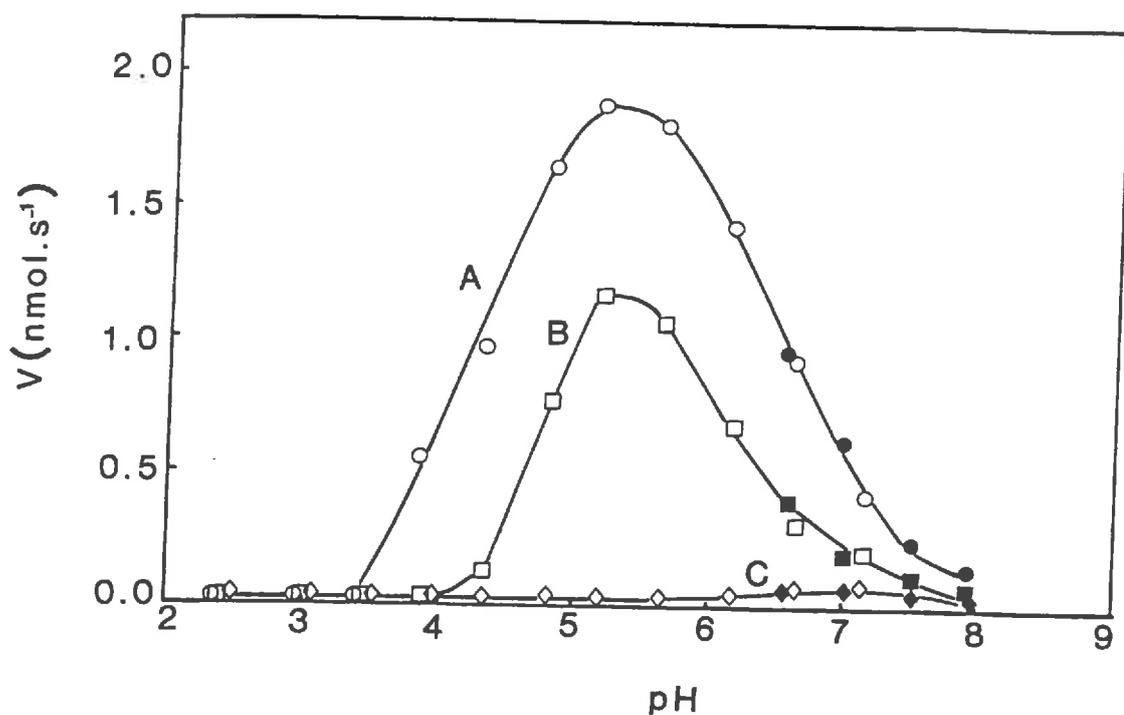


Figure 2.5. : Effet de la montmorillonite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

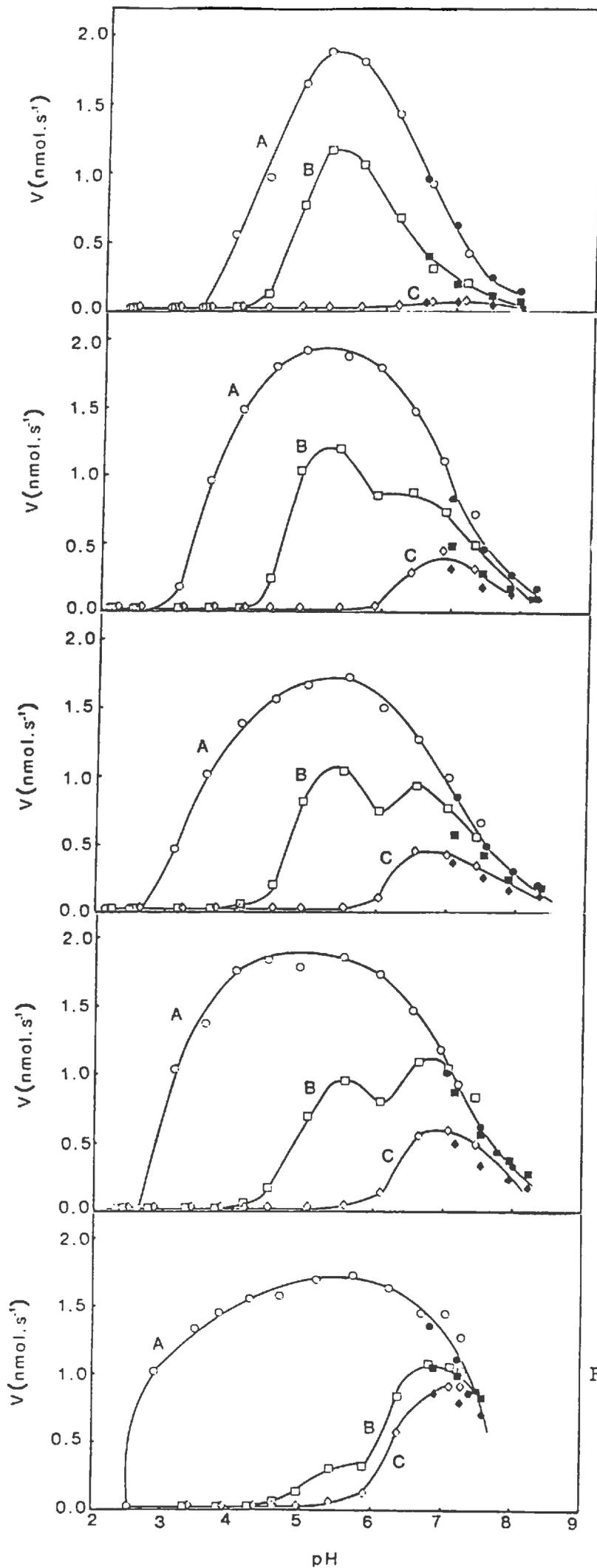
$$[\text{Na}^+] = 270 \text{ mM}$$

○ : Témoin (A)

□ : En présence de montmorillonite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.



$[Na^+] = 270 \text{ mM}$

$[Na^+] = 40 \text{ mM}$

$[Na^+] = 20 \text{ mM}$

$[Na^+] = 10 \text{ mM}$

$[Na^+] = 2 \text{ mM}$

Figure 2.6. : comparaison des figures 2.1. à 2.5.

- pH inférieurs à 4 : on n'observe aucune activité enzymatique, quelle que soit la force ionique.
- pH compris entre 4 et 6 : l'activité croît jusqu'à un maximum situé vers 5,5 puis redécroit ensuite jusqu'à pH 6. Le rapport B/A à ce premier maximum varie avec la force ionique. Il est de 20 % à 2 mM, 50 % à 10 mM, puis atteint une valeur fixe de 60 % pour les forces ioniques supérieures.
- pH supérieurs à 6 : on observe que l'activité croît puis décroît avec apparition d'un maximum vers pH 7. Ce deuxième maximum est d'autant plus marqué que la force ionique est faible. A 2 mM il est nettement supérieur au premier maximum. A 10 mM il ne lui est que légèrement supérieur. A 20 mM il devient légèrement inférieur au premier maximum. A 40 mM on n'observe plus qu'un épaulement et à 270 mM le deuxième maximum a complètement disparu.

Si l'on observe maintenant les courbes d'activité du surnageant (courbes C), on n'observe plus que deux domaines de pH :

- pH inférieurs à 6 : aucune activité quelle que soit la force ionique.
- pH supérieurs à 6 : l'activité croît jusqu'à un maximum vers pH 7 puis redécroit. Ce maximum atteint des valeurs élevées à basse force ionique et s'estompe avec l'augmentation de force ionique pour disparaître à 270 mM.

Insistons sur le fait que l'activité mesurée par la courbe C ne se rapporte pas, contrairement aux courbes A et B, à une même quantité d'enzyme. Il s'ensuit que le déplacement

apparent du maximum de la courbe C par rapport à la courbe A n'est pas dû à un changement des propriétés catalytiques vis-à-vis du pH mais reflète la quantité d'enzyme non adsorbée en fonction du pH.

L'effet combiné du pH et de la force ionique nous suggère un nouveau modèle pour expliquer l'effet des argiles sur l'activité enzymatique. Ce modèle fait jouer un rôle prépondérant aux forces électrostatiques sans négliger toutefois les forces de Van der Waals et repose sur les considérations préalables suivantes :

- Les enzymes, comme toutes les protéines, ont des propriétés polyamphotériques dues à la présence d'acides aminés ionisables négativement (acide aspartique, acide glutamique) ou positivement (lysine, arginine, histidine). En conséquence la charge nette de l'enzyme est positive en dessous du point isoélectrique, neutre en ce point et chargée négativement pour les pH situés au-dessus.
- La montmorillonite porte essentiellement une charge électrique négative indépendante du pH due à des substitutions isomorphiques octaédriques d' Al^{3+} par Mg^{2+} .

A partir de cette distinction entre la charge variable de l'enzyme et la charge fixe de la montmorillonite, nous pouvons interpréter les résultats obtenus de la façon suivante :

- à pH supérieur à 6, l'enzyme se trouve au-dessus de son point isoélectrique. Elle est chargée négativement. Aux faibles forces ioniques les répulsions électrostatiques avec la surface minérale de même charge sont telles que l'enzyme ne peut s'adsorber. Dans ces conditions la montmorillonite ne peut affecter l'activité

enzymatique. Lorsque la force ionique augmente, les forces électrostatiques sont progressivement écrantées. A force ionique élevée, les forces de répulsion électrostatiques deviennent plus faibles que les forces d'attraction de Van der Waals, indépendantes de la force ionique, et l'enzyme est adsorbée.

- entre pH 4 et pH 6 l'enzyme est peu chargée car elle se trouve au voisinage de son point isoélectrique. Les interactions électrostatiques sont donc très faibles. Par contre, les forces d'attraction de Van der Waals subsistent et provoquent l'adsorption de l'enzyme. Ces forces ne seraient toutefois pas suffisamment intenses pour modifier profondément la structure de l'enzyme et l'activité de l'enzyme à l'état adsorbé est peu perturbée.
- à pH inférieur à 4, l'enzyme se trouve en dessous de son point isoélectrique et porte une charge positive donc les interactions entre la protéine et la surface de la montmorillonite seraient dues aux forces électrostatiques attractives et aux forces de Van der Waals. La résultante de ces forces serait suffisamment importante pour induire une modification de conformation de l'enzyme telle qu'elle perd son activité catalytique.

On peut quantifier l'activité relative R de l'enzyme adsorbée en rapportant l'activité provenant de la fraction adsorbée (B - C) à l'activité d'une quantité égale d'enzyme en solution (A - C)

$$R = (B - C)/(A - C)$$

On peut de même obtenir la proportion d'enzyme adsorbée en faisant le rapport (A - C)/A.

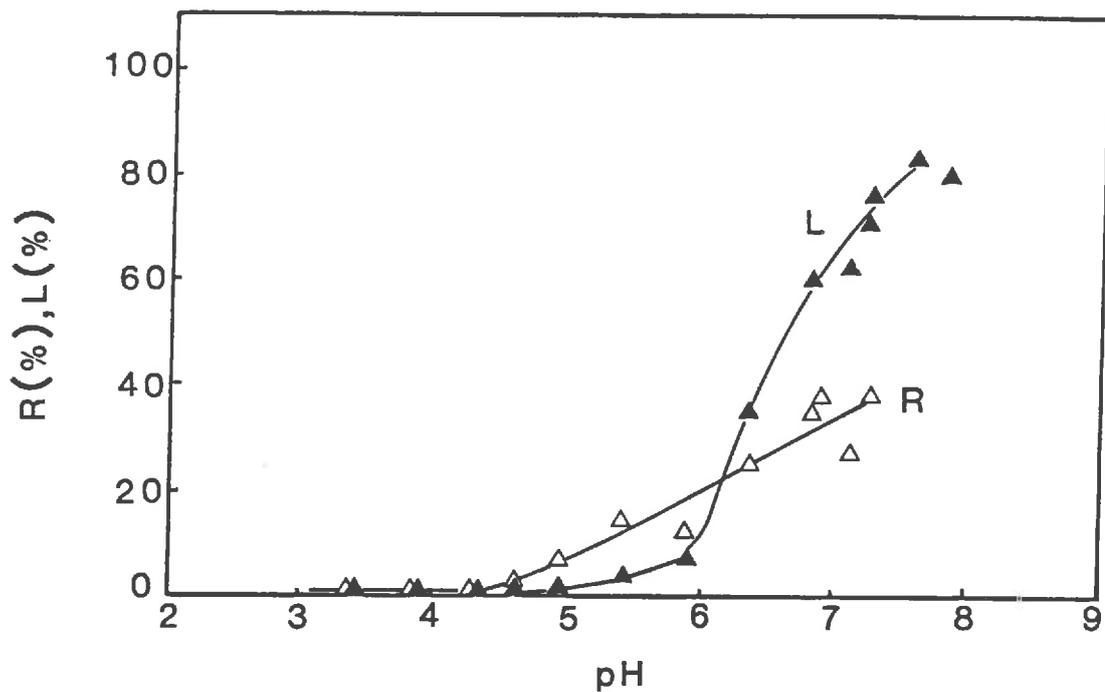


Figure 2.7. : Activité relative R (Δ) et quantité relative non adsorbée L (\blacktriangle) de β -glucosidase d'Amandier en présence de montmorillonite

$$[\text{Na}^+] = 2 \text{ mM.}$$

Toutefois la comparaison avec la fonction R est plus facile si on considère la proportion d'enzyme non adsorbée $L = C/A$ car, selon notre modèle, R et L sont des fonctions variant dans le même sens. Elles augmentent lorsque les forces d'attractions décroissent, c'est-à-dire lorsque croît le pH.

Nous avons représenté ces courbes pour les forces ioniques de 2 mM (fig. 2.7), 40 mM (fig. 2.8) et 270 mM (fig. 2.9).

Les courbes L, de valeur nulle en dessous de pH 6, croissent à partir de cette valeur avec une pente d'autant plus forte que la force ionique est faible. Ceci confirme l'importance des forces électrostatiques dans les phénomènes d'adsorption.

Aux forces ioniques 40 et 270 mM, les courbes R ont une valeur nulle en dessous de pH 4, puis augmentent jusqu'à une valeur de 60 % à pH 5,5 pour redécroître ensuite. Cette diminution à pH élevé est inattendue et semble contredire notre hypothèse de forces d'attraction décroissant avec le pH.

On peut toutefois lever cette contradiction en raisonnant non plus sur la protéine dans son intégralité, mais sur les acides aminés qui la constituent. Il est connu que la stabilité de l'enzyme en milieu isotrope est maximale en son point isoélectrique. On peut penser qu'à une interface électriquement chargée, l'apparition d'un excès de charge, dans un sens ou l'autre, va déstabiliser la structure de la protéine. Ceci a déjà été vu pour les pH acides ; nous n'y reviendrons pas.

Pour les pH alcalins, cela se produira lorsque l'enzyme se trouve au-dessus de son point isoélectrique et dans des conditions pour lesquelles elle reste néanmoins adsorbée (force ionique suffisamment élevée). Ainsi pour les pH acides les déformations sont dues à des forces d'attraction électrostatiques. Inversement, aux pH alcalins, les

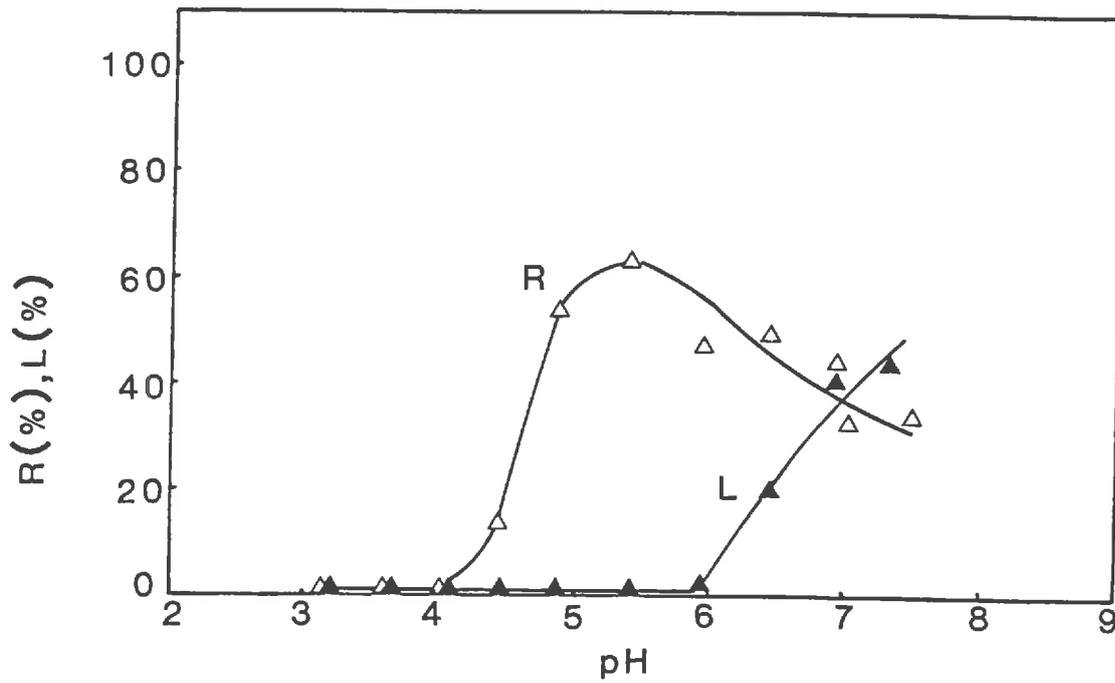


Figure 2.8. : Activité relative R (△) et quantité relative non adsorbée L (▲) de β -glucosidase d'Amandier en présence de montmorillonite

$$[\text{Na}^+] = 40 \text{ mM.}$$

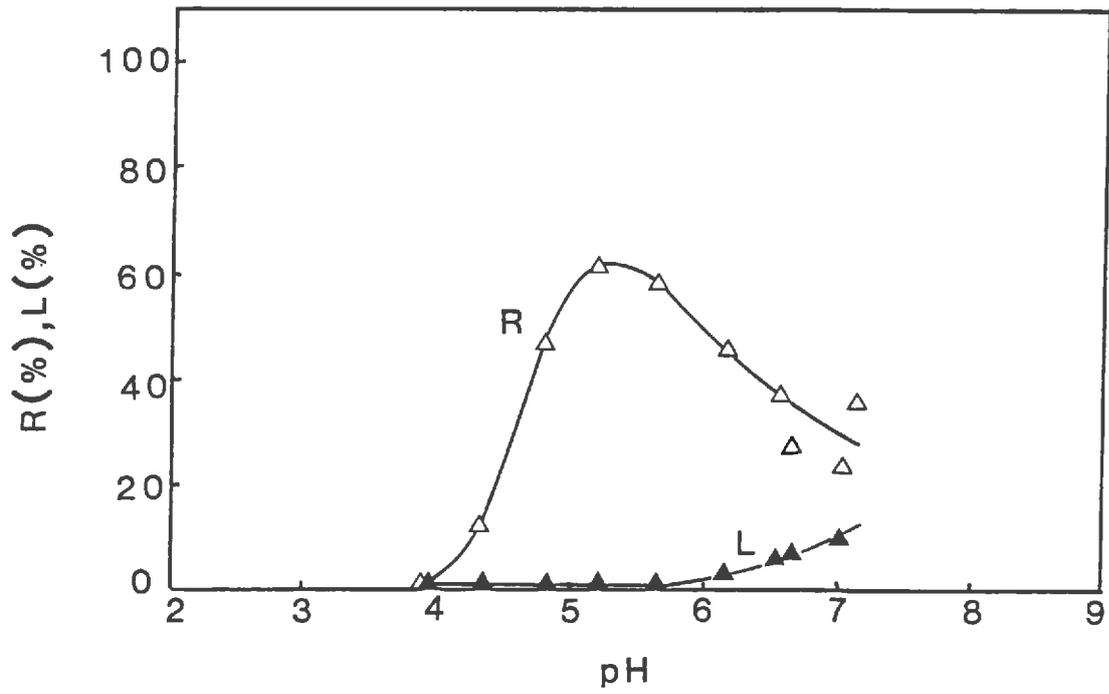


Figure 2.9. : Activité relative R (△) et quantité relative non adsorbée L (▲) de β -glucosidase d'Amandier en présence de montmorillonite

$$[\text{Na}^+] = 270 \text{ mM.}$$

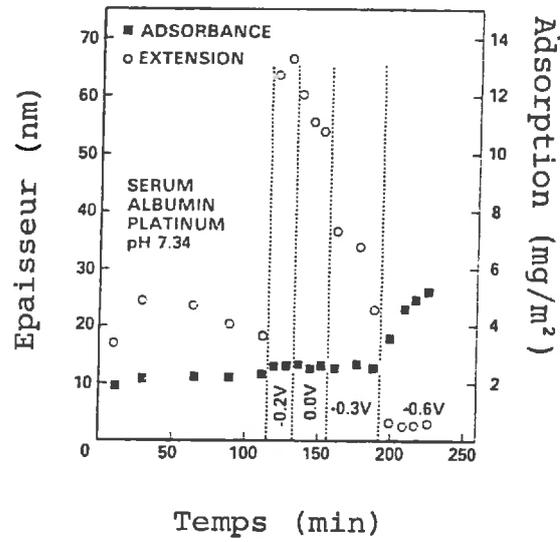


Figure 2.10. : Epaisseur (O) et quantité adsorbée (■) de sérum albumine humaine adsorbée sur du platine. Les potentiels appliqués sont indiqués entre les lignes verticales en pointillé.

(MORRISSEY et al, 1976)

déformations de l'enzyme adsorbée ont pour origine les forces de répulsion électrostatiques.

Nous avons été confortés dans cette hypothèse par les travaux de MORRISSEY et al. (1976). Ils mesurent par ellipsométrie l'épaisseur d'un film de protéines adsorbé sur une électrode de platine dont ils font varier le potentiel électrique. Les protéines étudiées sont chargées négativement au pH de l'expérience. Lorsque le potentiel appliqué est négatif, l'épaisseur du film augmente (fig. 2.10). A l'inverse, lorsque le potentiel est positif, l'épaisseur de la couche protéique diminue. La sérum albumine humaine passe d'une épaisseur de 65 nm à 20 nm lorsque le potentiel passe de -0,2 V à + 0,3 V alors que la quantité de protéines adsorbée reste constante (fig. 2.10). Ceci montre que le phénomène mesuré est bien une modification de structure de la protéine et non une variation du nombre de couches de protéines adsorbées.

Ainsi, dans ces expériences, les isothermes d'adsorption ne permettent pas de distinguer entre des surfaces de charge opposée. Par contre, des mesures liées à un paramètre de structure, l'ellipsométrie dans le travail de MORRISSEY ou l'activité enzymatique dans notre travail, permettent cette distinction.

Par ailleurs, le fait que la quantité maximale de protéines adsorbée sur les argiles soit trouvée au voisinage du point isoélectrique (Mc LAREN et al, 1958) ne signifie pas que seules les forces de Van der Waals jouent un rôle dans les interactions. Cette confusion est à l'origine du modèle de modification de conformation par les forces de Van der Waals qui ne peut expliquer rationnellement le déplacement de l'optimum d'activité de l'enzyme adsorbée vers les pH alcalins.

Il reste à expliquer pourquoi l'activité de l'enzyme adsorbée ne dépasse pas 60 % de celle de l'enzyme en solution. Nous pouvons faire trois hypothèses :

- Une partie des enzymes s'adsorbe avec le site actif contre la surface minérale et ne peut donc dégrader le substrat.

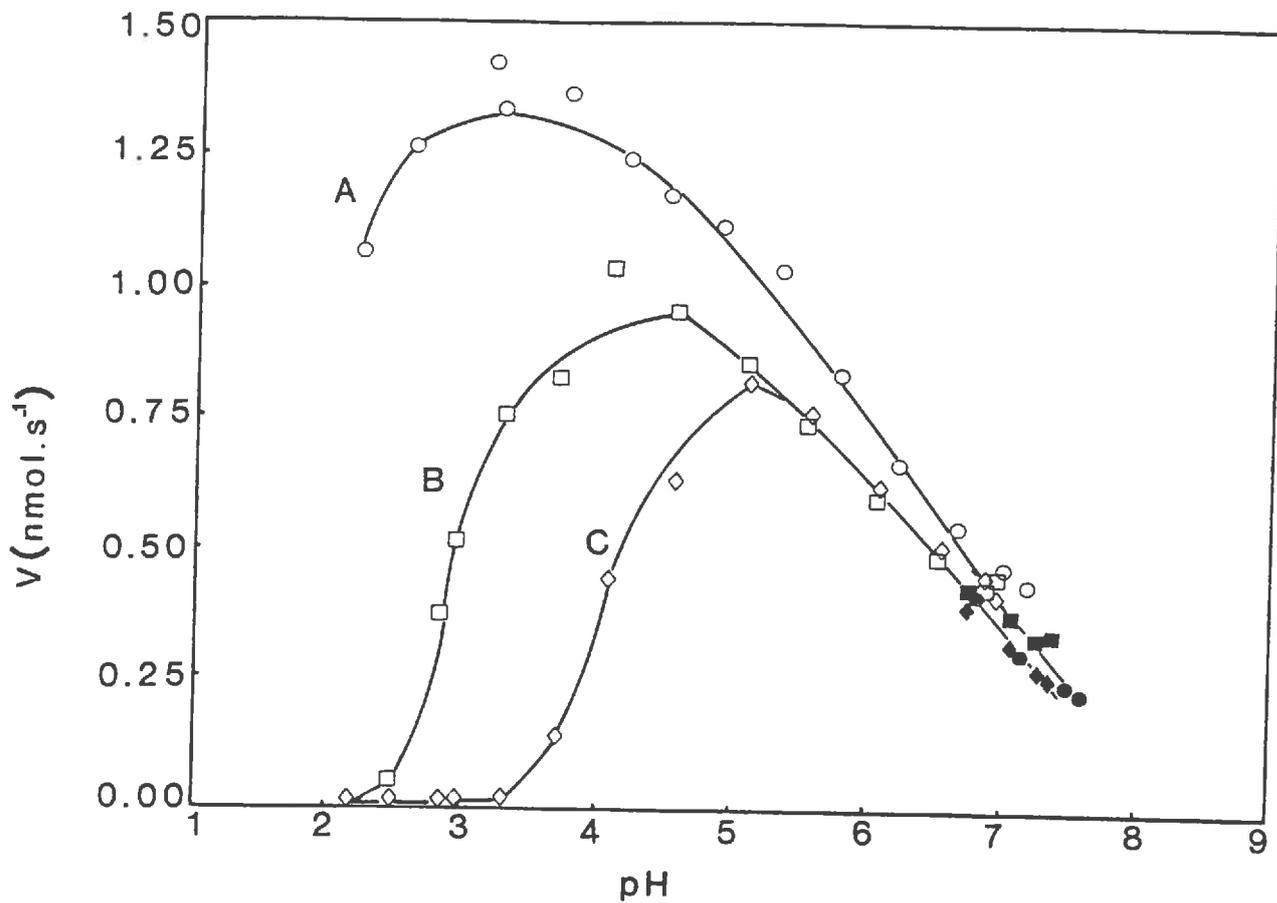


Figure 2.11. : Effet de la montmorillonite sur l'activité de la β -glucosidase d'*Aspergillus niger*

$$[\text{Na}^+] = 2 \text{ mM}$$

○ : Témoin (A)

□ : En présence de montmorillonite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

- Il existe plusieurs isoenzymes de points isoélectriques différents qui vont se trouver avec une charge nulle, donc une configuration active conservée, à des pH différents. Les deux principales isoenzymes de la β -glucosidase d'Amandier ont des points isoélectriques de 4,4 et 6,4 (JDANOV et al, 1977).
- Il y a, même au point isoélectrique, une légère déformation de la protéine due à des interactions entre charges négatives et positives de l'enzyme et la surface négative de l'argile.

2.3.1.2. β -glucosidase d'*Aspergillus niger*.

Les expériences correspondant aux forces ioniques de 2, 20 et 270 mM sont représentées sur les figures 2.11, 2.12 et 2.13.

On constate en observant les courbes A, B et C une relative insensibilité à la force ionique, ce qui contraste avec les résultats obtenus avec la β -glucosidase d'Amandier.

On s'aperçoit que la principale différence est l'indépendance par rapport à la force ionique de la courbe C d'activité du surnageant : à partir de pH 5,5, il n'y a plus de fraction enzymatique adsorbée aussi bien à 2 mM qu'à 270 mM. Une conséquence indirecte de ce comportement est que la courbe B ne peut présenter comme précédemment de deuxième maximum dont la valeur varie avec la force ionique. Cette remarque étant faite, le modèle élaboré pour la β -glucosidase d'Amandier reste valable.

Les courbes d'activité relative R et de proportion d'enzyme non adsorbée L pour la force ionique 20 mM sont présentées sur la figure 2.14.

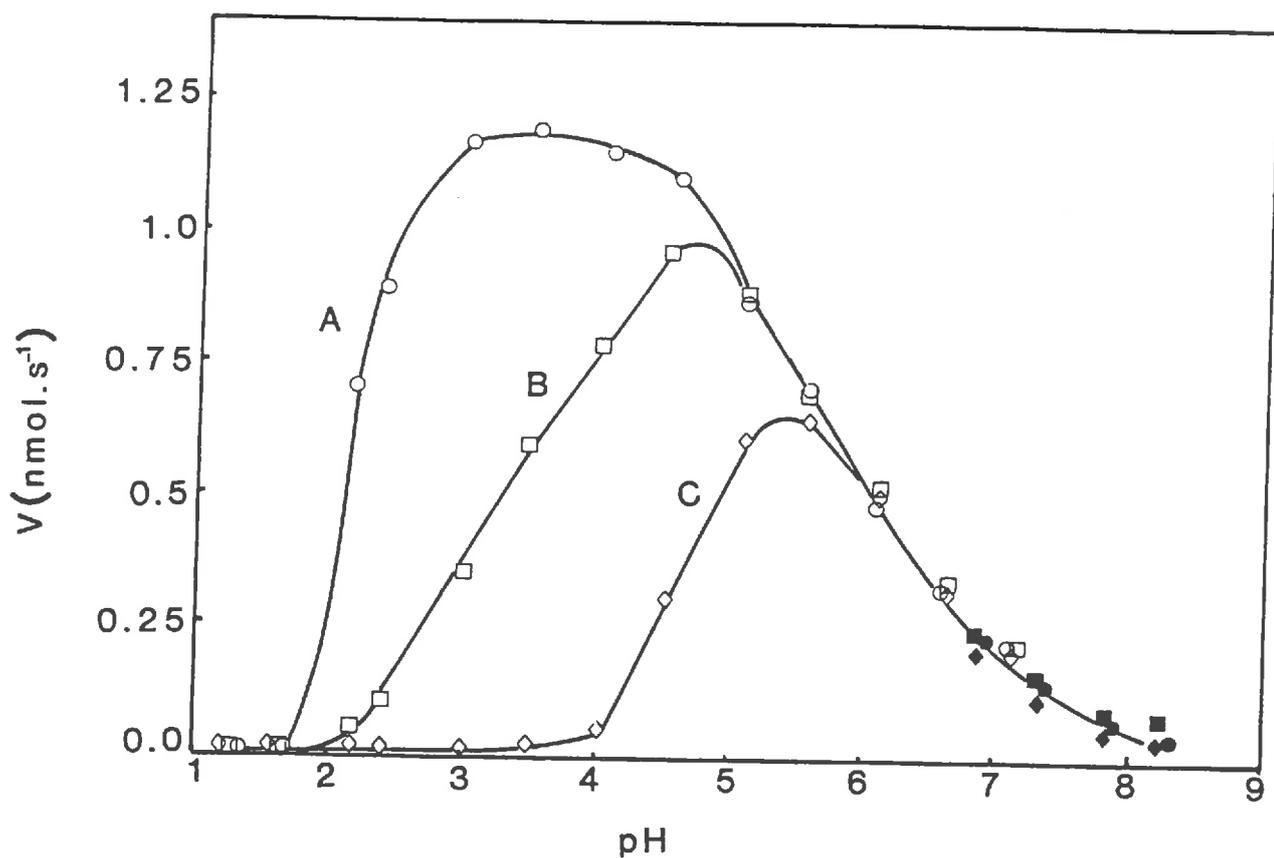


Figure 2.12. : Effet de la montmorillonite sur l'activité de la β -glucosidase d'*Aspergillus niger*

$[\text{Na}^+]$: 20 mM

○ : Témoin (A)

□ : En présence de montmorillonite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

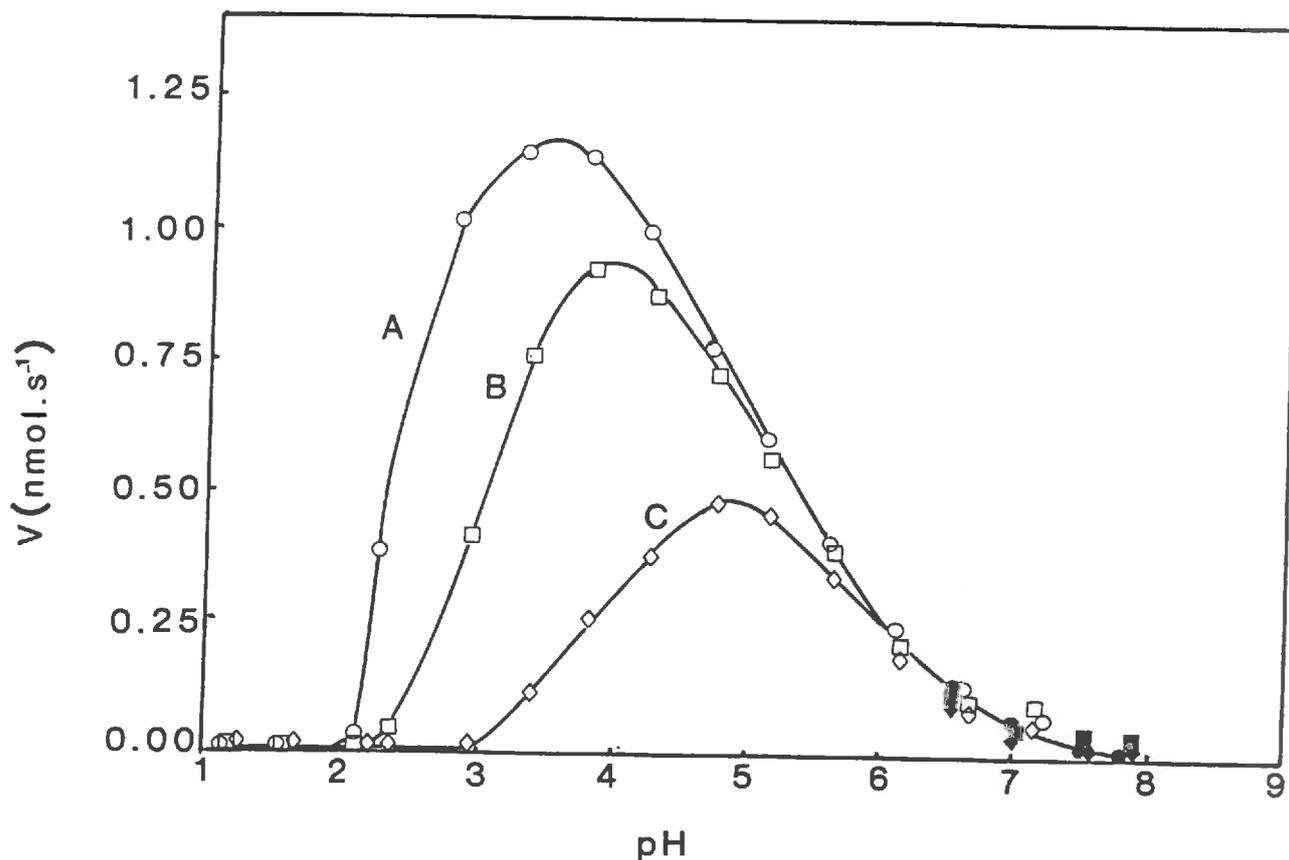


Figure 2.13. : Effet de la montmorillonite sur l'activité de la β -glucosidase d'*Aspergillus niger*

$$[\text{Na}^+] = 270 \text{ mM}$$

○ : Témoin (A)

□ : En présence de montmorillonite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

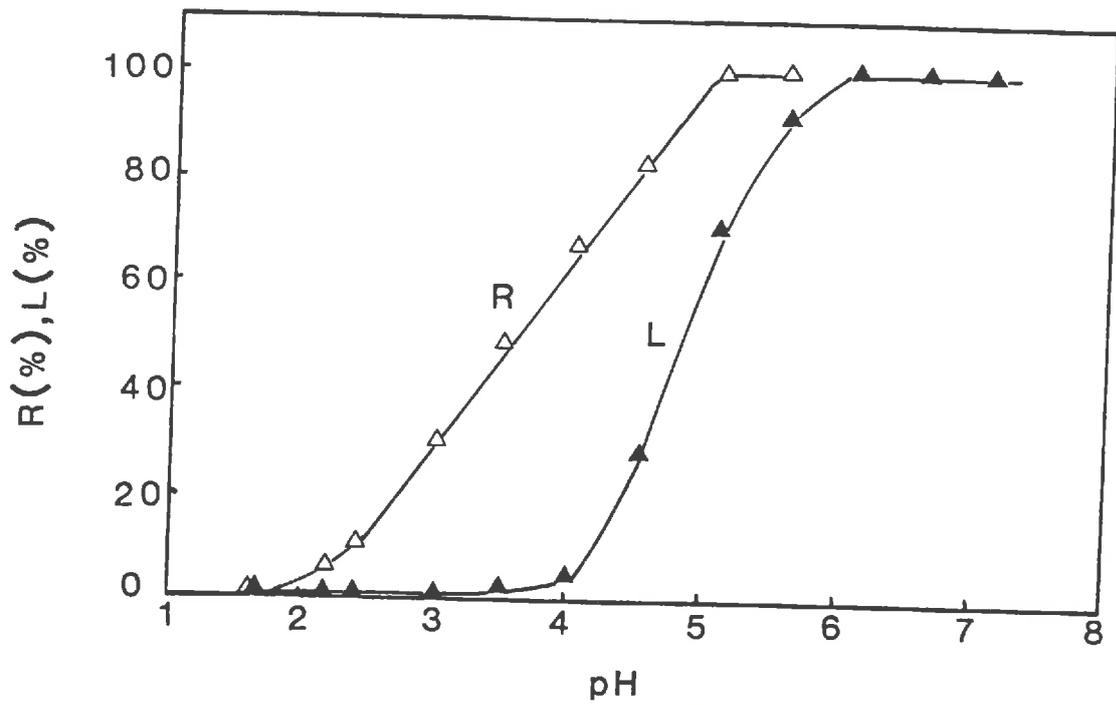


Figure 2.14. : Activité relative R (Δ) et quantité relative non adsorbée L (\blacktriangle) de β -glucosidase d'*Aspergillus niger* en présence de montmorillonite

$$[\text{Na}^+] = 20 \text{ mM.}$$

Les propriétés moléculaires responsables des différences entre les deux β -glucosidases sont probablement une plus grande proportion d'acide aminés à chaîne latérale carboxylique pour *Aspergillus niger*. Ainsi au-dessus du point isoélectrique la charge nette peut prendre des valeurs élevées conduisant à des répulsions électrostatiques supérieures en valeur absolue aux forces d'attraction de Van der Waals, même aux forces ioniques élevées. Cet excès d'acides aminés anioniques semble confirmé par le fait que l'adsorption n'est totale que jusque vers pH 3-4 contre pH 6 pour la β -glucosidase d'Amandier, ce qui traduirait un point isoélectrique plus bas pour *Aspergillus niger*.

2.3.2. INFLUENCE DU PH INITIAL SUR LES COURBES D'ACTIVITE EN FONCTION DU PH DE LA β -GLUCOSIDASE D'AMANDIER ADSORBEE SUR LA MONTMORILLONITE.

Les résultats portés sur la figure 2.15 montrent que l'enzyme préincubée en l'absence d'argile est stable, dans les limites de temps de l'expérience, aux pH 3,6 - 4,2 et 5,7.

Par contre, lorsque la préincubation à ces mêmes pH a lieu en présence de montmorillonite, les valeurs maximales obtenues entre pH 5 et 5,5 sont différentes.

Exprimées par rapport au témoin (B/A), ces valeurs maximales sont :

- 0 % pour pH_i = 3,6
- 20 % pour pH_i = 4,2
- 60 % pour pH_i = 5,7.

Ces expériences permettent de démontrer de façon indiscutable que les modèles décrivant l'interaction enzyme-argile par un effet de couche diffuse au niveau du site actif ou par une modification de conformation sous l'effet des forces de Van der Waals ne sont pas adéquats.

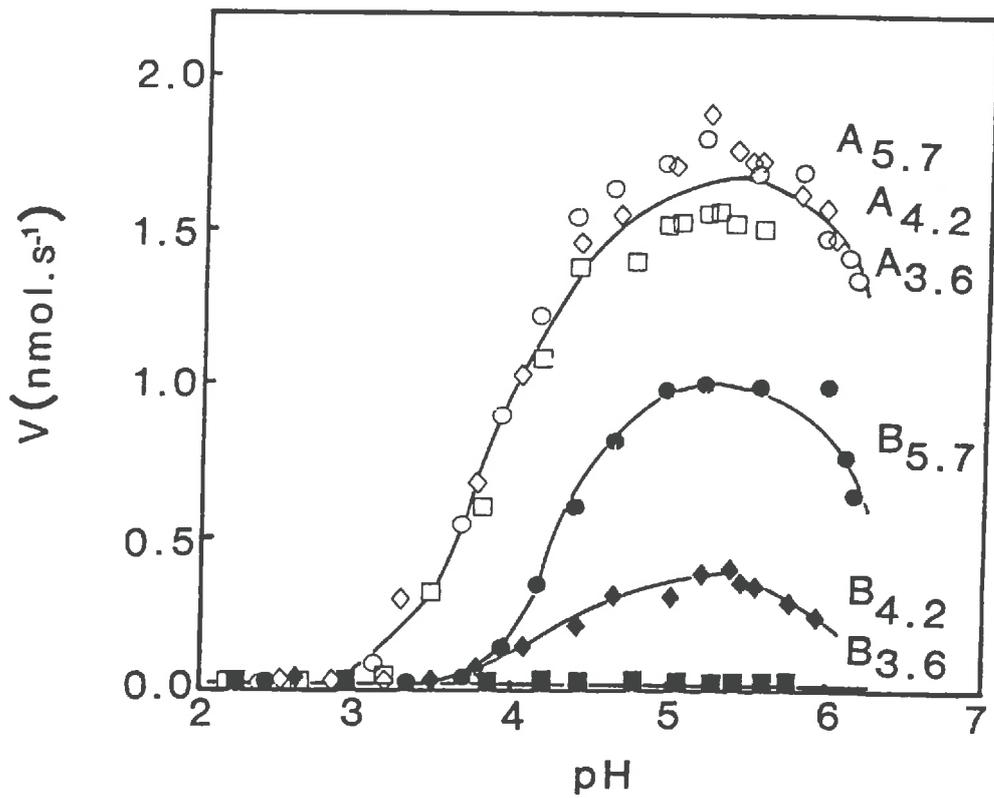


Figure 2.15. : Effet d'une préincubation à un pH différent de la mesure d'activité enzymatique
 Protocoles A et B
 Le pH indiqué en indice est celui du milieu de préincubation.

En effet, selon le modèle de couche diffuse, l'enzyme, n'ayant pas subi d'altérations structurales, doit garder la même activité quel qu'ait été le pH de préincubation antérieur puisque le nouveau pH interfacial résulte d'un équilibre instantané.

Pour des raisons différentes le modèles de modification de conformation sous l'effet de forces de Van der Waals laisse également prévoir une activité indépendante du pH de préincubation. En effet, ces forces étant indépendantes du pH, la modification de la structure doit également être indépendante du pH.

Par contre le modèle de modification de conformation impliquant les forces électrostatiques peut expliquer les résultats obtenus, à condition de considérer que ces altérations sont irréversibles.

Cette irréversibilité peut s'expliquer par le grand nombre de liaisons que la protéine contracte avec la surface lorsqu'elle se déploie sous l'effet des attractions électrostatiques. La rupture de toutes ces liaisons en même temps exigerait une énergie d'activation très élevée lors d'une élévation ultérieure de pH.

Remarquons que cette expérience permet d'éliminer une hypothèse qui, bien que n'ayant jamais été invoquée, pourrait expliquer le déplacement de pH optimal en présence d'argile. Lorsqu'une enzyme fonctionne à une interface, un équilibre s'établit entre la vitesse de consommation du substrat et l'approvisionnement par diffusion de l'enzyme en substrat. Ainsi la concentration en substrat peut être beaucoup plus faible à l'interface que dans la solution. Si la constante de Michaelis est plus élevée aux pH acides cela peut expliquer le déplacement de pH optimal. Mais dans ce cas nous avons encore un modèle d'équilibre instantané incompatible avec l'irréversibilité des effets du pH.

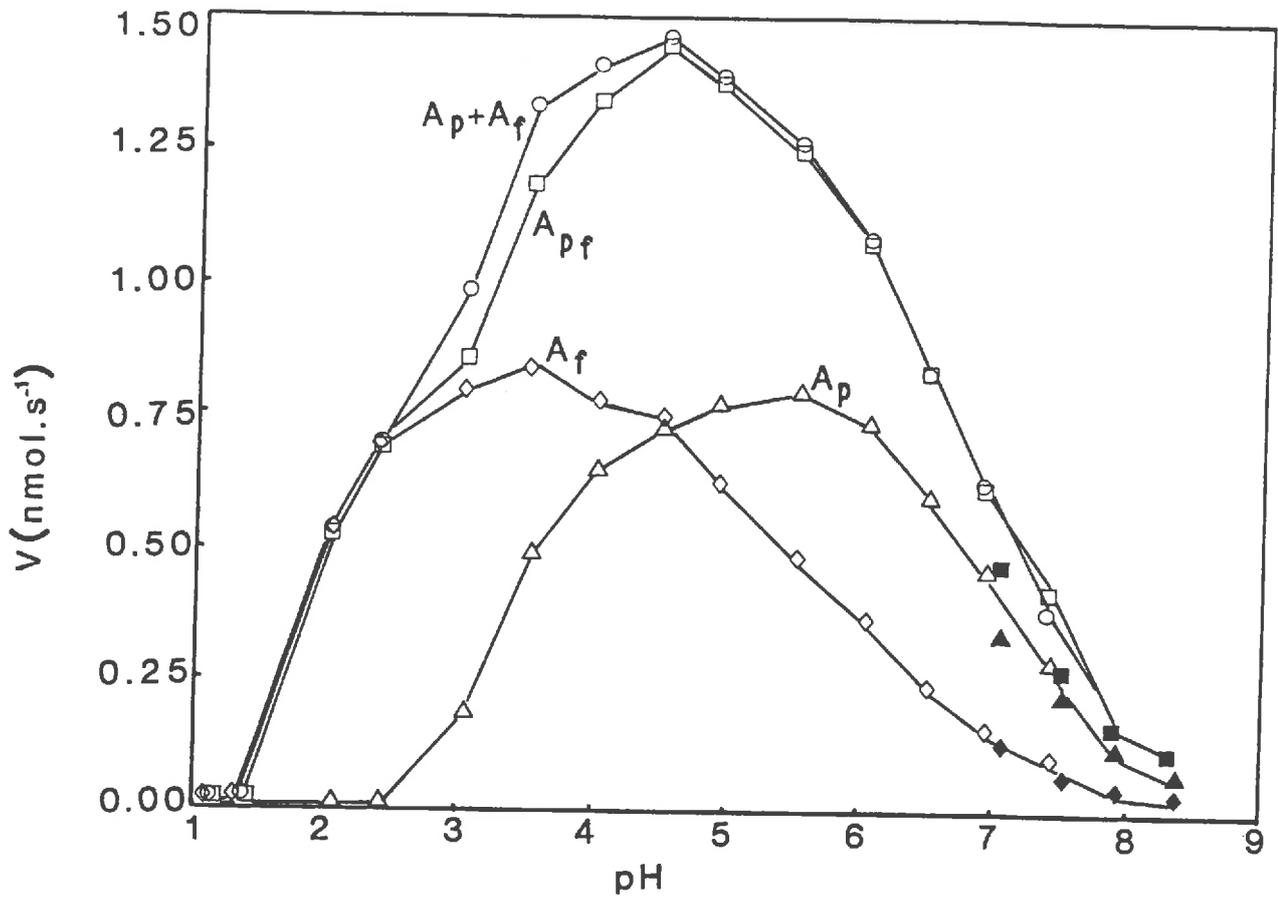


Figure 2.16. : Activité d'un mélange de β -glucosidases
Protocole A

\triangle : Amandier (Ap)

\diamond : A. niger (Af)

\square : mélange (Apf)

\circ : sommation de Ap + Af

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

2.3.3. ACTIVITE D'UN MELANGE DE β -GLUCOSIDASE D'AMANDIER
ET D'ASPERGILLUS NIGER EN PRESENCE DE
MONTMORILLONITE.

L'activité d'un mélange des deux β -glucosidases est la somme des activités individuelles de ces enzymes, tant pour les expériences de type A (fig. 2.16), B (fig. 2.17) et C (fig. 2.18). Les pH optimaux très différents des enzymes en solution rendent les résultats très significatifs (pH 3,5 pour *Aspergillus niger* ; pH 5,5 pour l'Amandier).

Cette expérience peut sembler sans grand intérêt, car de résultat prévisible. Nous l'avons pourtant réalisée pour disposer d'un argument contre une hypothèse possible, bien que jamais formulée, expliquant le déplacement de pH optimal de l'enzyme adsorbée par un phénomène d'agrégation des feuillets de montmorillonite. Cette hypothèse consiste à supposer que les enzymes, chargées positivement en dessous de leur point isoélectrique, provoquent la floculation de la montmorillonite. L'enzyme se trouve alors piégée entre les feuillets d'argile, ce qui produit une baisse d'activité par limitation de la diffusion du substrat jusqu'au site actif. A priori cette hypothèse et celle faisant intervenir les forces électrostatiques dans la modification de conformation sont difficiles à séparer à partir des expériences réalisées précédemment car le mécanisme de base est le même, à savoir les interactions entre une enzyme chargée positivement et une surface minérale chargée négativement.

Le faible taux de recouvrement de la montmorillonite par la β -glucosidase d'Amandier (inférieur à 1 %), dû à la faible quantité d'enzyme utilisée, est bien sûr un argument contre cette hypothèse de floculation. On attendrait plutôt dans ces conditions un effet flocculant (donc inhibiteur) augmentant avec la force ionique, ce qui est contraire à l'observation.

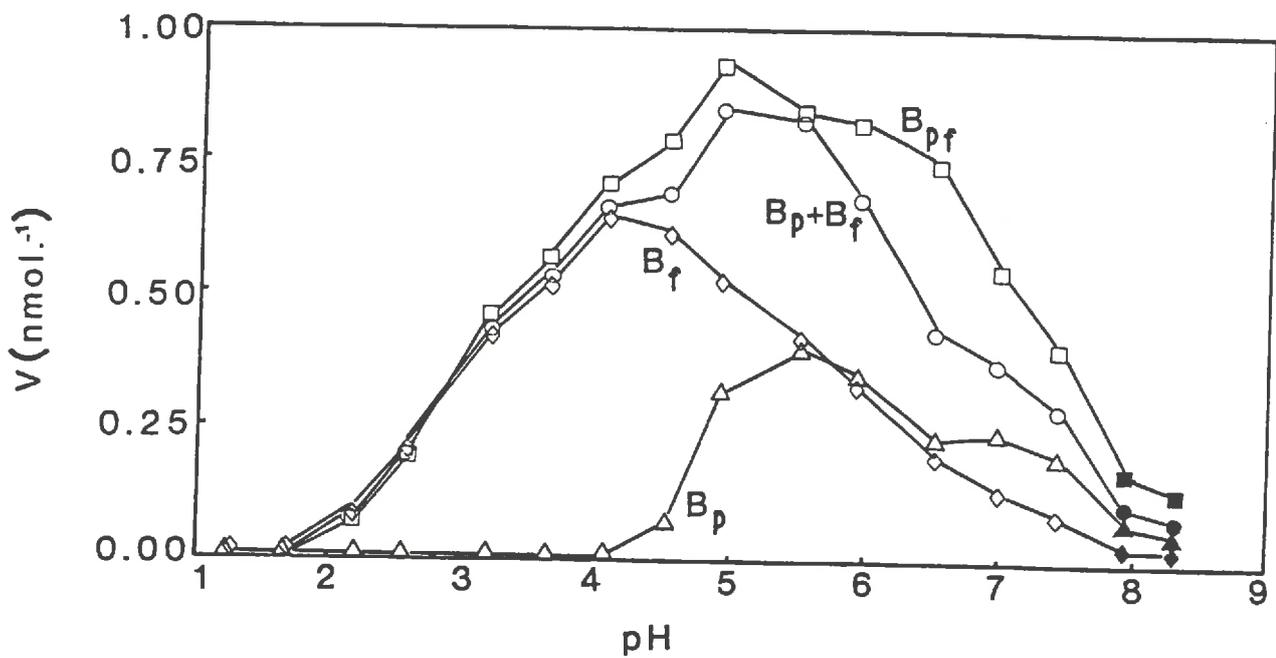


Figure 2.17. : Activité d'un mélange de β -glucosidases
Protocole B

Δ : Amandier (Bp)

\diamond : A. niger (Bf)

\square : mélange (Bpf)

\circ : sommation de Bp + Bf

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

L'additivité des activités enzymatiques des β -glucosidases d'Amandier et d'*Aspergillus niger* dans les expériences de type A, B et C va donner un argument supplémentaire pour éliminer l'hypothèse de floculation.

Le raisonnement est le suivant :

- Le mélange ne modifie pas les propriétés d'adsorption de chacune des enzymes. A pH 3,7 l'adsorption de chacune des deux enzymes est totale (fig. 2.18).
- A pH 3,7 l'activité relative de l'enzyme adsorbée $R = (B - C)/(A - C)$ est de 0,70 pour *Aspergillus niger* et de 0,00 pour l'Amandier.

Donc, en observant ce qui se passe à pH 3,7 on peut faire deux hypothèses :

- première hypothèse : la floculation dépend de la fraction protéique d'*Aspergillus niger* car c'est la plus concentrée. Nous interprétons les 70 % d'activité relative comme étant dus à 30 % d'enzymes situées entre les feuillets. En ce cas l'activité du mélange en présence d'argile devrait être 70 % de celle du mélange en solution, soit $0,95 \text{ nmol.s}^{-1}$. Or, elle n'est que de $0,57 \text{ nmol.s}^{-1}$, c'est-à-dire pratiquement identique à la valeur obtenue pour la seule β -glucosidase d'*Aspergillus niger* ($0,53 \text{ nmol.s}^{-1}$).
- deuxième hypothèse : la floculation dépend au contraire de la β -glucosidase d'Amandier car c'est elle qui a le point isoélectrique le plus élevé. L'activité relative nulle de cette enzyme nous conduit à supposer que la totalité des enzymes est piégée entre les feuillets. Nous devrions donc n'observer aucune activité avec le

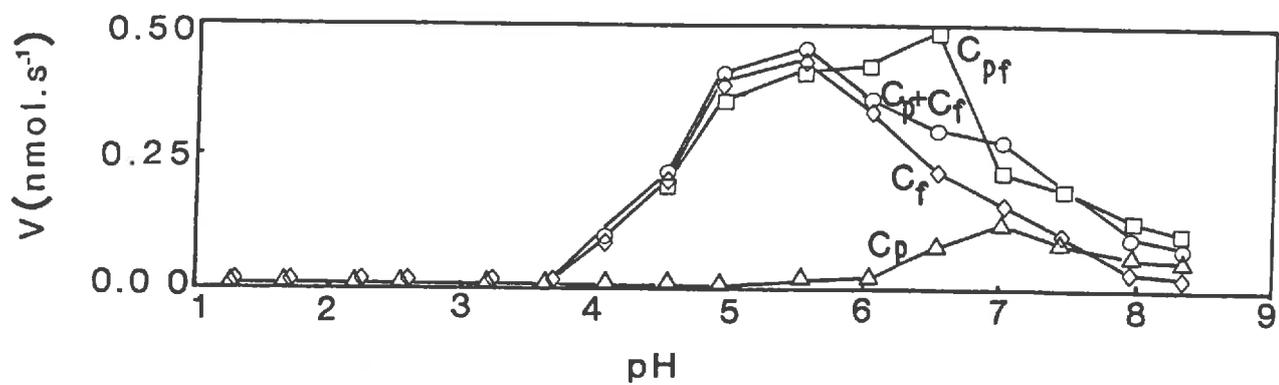


Figure 2.18. : Activité d'un mélange de β -glucosidases
Protocole C

Δ : Amandier (Cp)

\diamond : A. niger (Cf)

\square : mélange (Cpf)

\circ : sommation de Cp + Cf

mélange en présence de montmorillonite. Ce n'est pas le cas.

Nous voyons donc que les conséquences logiques de l'hypothèse de floculation (différentes enzymes adsorbées sur un même feuillet doivent avoir le même taux d'inactivation) ne sont pas vérifiées. Nous rejetons donc cette hypothèse.

2.4. CONCLUSION

Nous avons montré que les modèles expliquant le déplacement de pH optimal des enzymes adsorbées sur les argiles par un effet de couche diffuse ou par une modification de la structure de l'enzyme par les forces de Van der Waals ne convenaient pas.

En effet, ces deux modèles n'auraient pas dû montrer une influence du pH initial lors d'expériences pour lesquelles le pH d'incubation avec la montmorillonite diffère du pH de mesure d'activité enzymatique.

L'étude de l'activité de la β -glucosidase en présence de montmorillonite lorsque l'on fait varier le pH et la force ionique nous conduit à proposer un nouveau modèle qui attribue un rôle très important aux forces électrostatiques dans les modifications de conformation de l'enzyme.

Ainsi, on peut distinguer 3 domaines de pH selon la charge nette que porte l'enzyme :

- pH inférieur au point isoélectrique : les forces électrostatiques entre l'enzyme et la surface d'argile sont attractives et conduisent à une perte de la configuration active.

- pH voisin du point isoélectrique : la charge électrique de l'enzyme est faible et elle est donc adsorbée sur la surface minérale par les forces de Van der Waals. Ces forces ne sont pas assez intenses pour modifier la structure protéique et l'enzyme reste active.

- pH supérieur au point isoélectrique : l'enzyme est chargée négativement et ne s'adsorbe pas sur l'argile. Toutefois à des forces ioniques élevées les forces de répulsion électrostatiques peuvent être plus faibles que les forces d'attraction de Van der Waals et l'enzyme s'adsorbe.

CHAPITRE 3

INTERACTIONS β -GLUCOSIDASE-SURFACES MINÉRALES :

COMPARAISON DES EFFETS DE LA GOETHITE, DE LA KAOLINITE

ET DE LA MONTMORILLONITE

3.1. INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent nous avons proposé un modèle d'interaction qui fait jouer un rôle important à la charge électrique portée par la surface minérale. Mais les minéraux rencontrés dans les sols ne sont pas tous aussi électronégatifs que la montmorillonite (C.E.C. = 10^{-3} éq.g⁻¹) . C'est pourquoi nous avons étudié la kaolinite qui est décrite comme une argile peu chargée, (C.E.C. de l'ordre de 10^{-5} éq.g⁻¹) . Il était également intéressant d'étudier un autre groupe de minéraux rencontrés dans les sols, les oxyhydroxydes de fer qui sont des minéraux à charge variable en fonction du pH. Nous avons choisi la goethite (α FeOOH) qui devrait être chargée positivement dans le domaine de pH étudié (point de charge nulle vers pH 8,5).

3.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.2.1. MATÉRIELS

Seule la β -glucosidase d'Amandier a été utilisée. Pour les substances organiques utilisées, voir le paragraphe 2.2.1.2.

3.2.1.1. Préparation de la kaolinite

Une kaolinite de St Austell de dimension inférieure à 2 μm est saturée en sodium par contact avec une solution de NaCl. On apporte ainsi une quantité de sodium égale à environ 20 fois la capacité d'échange en deux fois. L'élimination des sels en excès se fait par lavage à l'eau bipermutée et centrifugation jusqu'à ce que le test de détection des chlorures avec Ag NO_3 se montre négatif.

3.2.1.2. Préparation de la goethite

La goethite a été préparée selon le protocole de SCHWERTMANN et al. (à paraître) en ajoutant de la KOH à une solution de $\text{Fe (NO}_3)_3$ et en laissant vieillir ce mélange deux semaines à 20°C.

3.2.2. METHODES

Les protocoles A, B et C sont les mêmes que dans le chapitre 2.

Les expériences montrant l'effet du pH et de la force ionique sur les interactions β -glucosidase-goethite (paragraphe 3.3.1) et β -glucosidase-kaolinite (paragraphe 3.3.3.) correspondent aux protocoles A, B et C avec les concentrations minérales finales suivantes :

- goethite : 3 mg. ml⁻¹

- kaolinite : 12 mg. ml⁻¹

La comparaison de l'affinité de la β -glucosidase pour les surfaces de goethite et de

montmorillonite (paragraphe 3.3.2.) se compose de 3 expériences :

- Dans une première expérience on effectue un mélange de β -glucosidase et de goethite selon un protocole de type B. On laisse s'écouler un temps de 2 heures. Puis on ajoute une suspension de montmorillonite. On attend à nouveau 2 heures. On mesure enfin l'activité enzymatique.

- La seconde expérience est construite sur le même modèle que la précédente, mais on apporte la montmorillonite avant la goethite.

- Dans la troisième expérience, on mélange préalablement la goethite et la montmorillonite. Puis on l'ajoute à la β -glucosidase selon le protocole B. Après avoir attendu 4 heures, on mesure l'activité enzymatique.

Dans ces 3 expériences la concentration finale de goethite est 3 mg.ml^{-1} et celle de montmorillonite est $0,3 \text{ mg.ml}^{-1}$.

L'étude de l'influence des surfaces spécifiques de la kaolinite et de la montmorillonite est réalisée à partir d'une série d'expériences de type C (à pH 5 et à une force ionique de 20 mM) dans lesquelles on apporte des quantités variables de montmorillonite ou de kaolinite tout en gardant constante la quantité de β -glucosidase.

3.3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.3.1. INTERACTIONS β -GLUCOSIDASE-GOETHITE EN FONCTION DU PH ET DE LA FORCE IONIQUE.

Les résultats sont présentés sur les figures 3.1., 3.2. et 3.3. qui correspondent respectivement aux

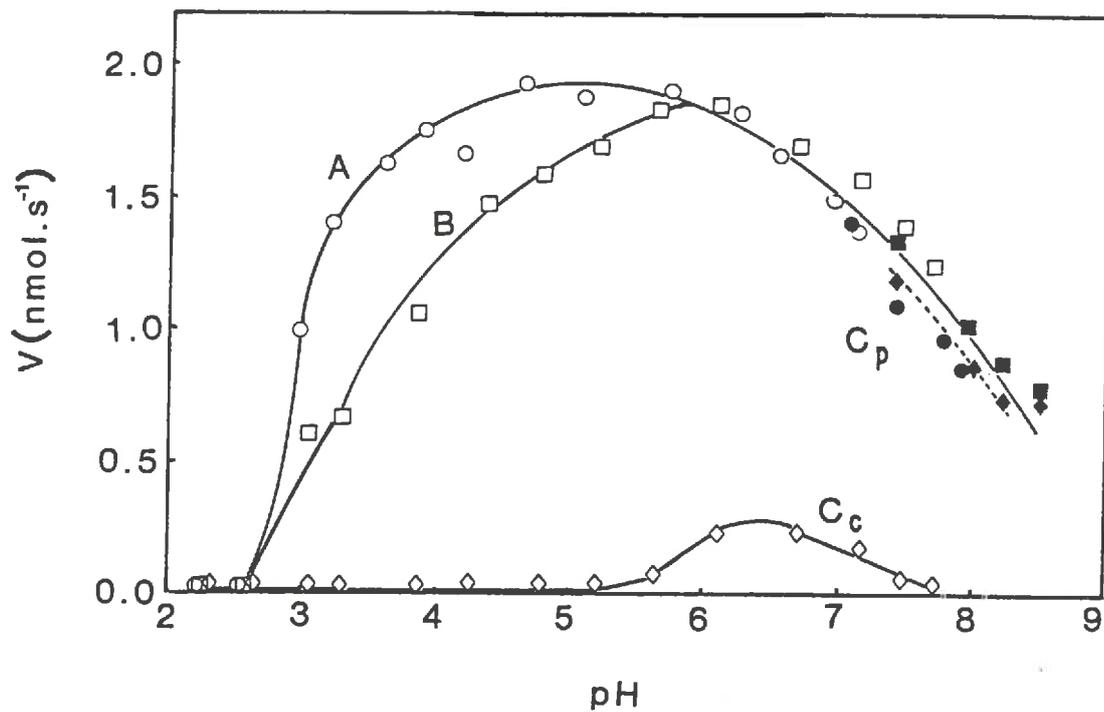


Figure 3.1. : Effet de la goethite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$$[\text{Na}^+] = 2 \text{ mM}$$

- : Témoin (A)
- : En présence de goethite (B)
- ◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
 Symboles fermés pour le tampon phosphate.

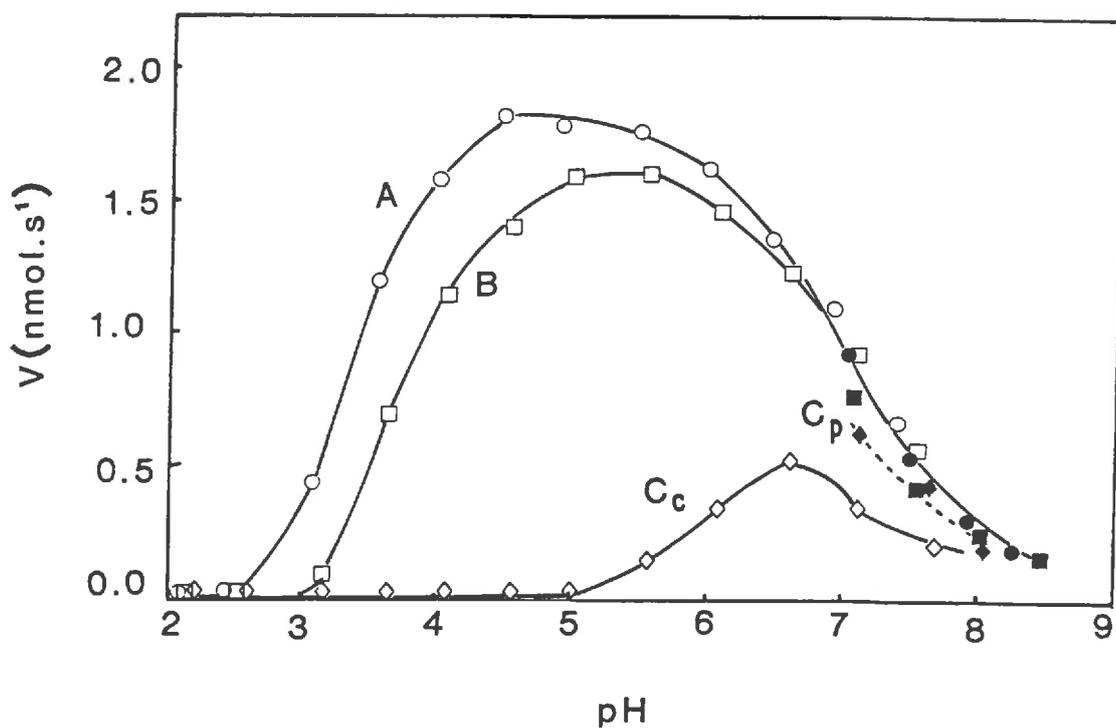


Figure 3.2. : Effet de la goethite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$$[\text{Na}^+] = 20 \text{ mM}$$

○ : Témoin (A)

□ : En présence de goethite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

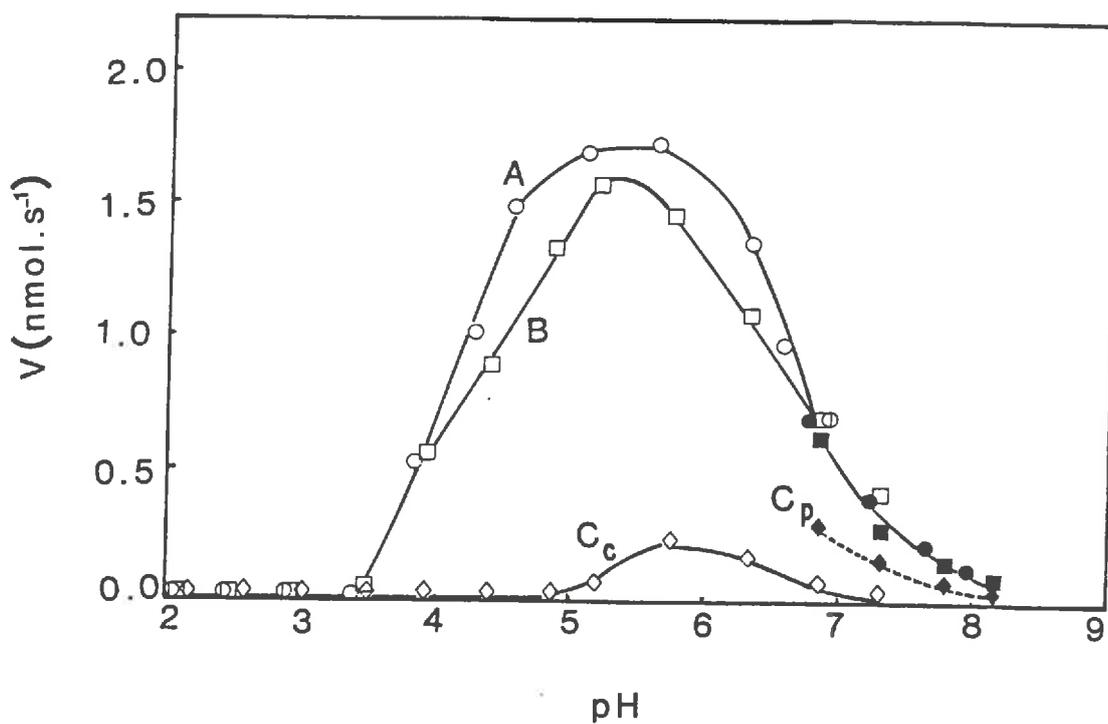


Figure 3.3. : Effet de la goethite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$$[\text{Na}^+] = 270 \text{ mM}$$

○ : Témoin (A)

□ : En présence de goethite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

forces ioniques de 2, 20 et 270 mM. Les courbes A, B et C correspondent au protocole décrit dans "matériel et méthode". Les résultats obtenus avec la goethite sont très différents de ceux observés avec la montmorillonite.

Aux trois forces ioniques étudiées, on constate que la courbe B d'activité en présence de goethite est presque identique à la courbe témoin A. En particulier il n'y a pratiquement pas d'inhibition à pH acide.

Si l'on compare les courbes d'activité de la fraction non adsorbée, on observe qu'il y a un effet très marqué du tampon. Dans le cas de la montmorillonite on rappelle que les courbes obtenues avec les tampons citrate et phosphate étaient identiques.

A l'inverse avec la goethite et pour une force ionique de 2 mM (fig. 3.1) on note que l'activité du surnageant est nulle à partir de pH 7,5 avec le tampon citrate. Par contre, dans les mêmes conditions de force ionique, l'activité observée avec le tampon phosphate est égale au témoin A. Cette différence de comportement s'atténue quand la force ionique augmente (fig. 3.2 et 3.3).

Ces résultats sont incompatibles avec le maintien simultané des deux hypothèses de départ :

- la surface de goethite est chargée positivement en dessous du point de charge nulle qui, selon les auteurs, se situe vers pH 8-9 (PARFITT, 1978 ; HUNTER et NEVILLE, 1980 ; BOWDEN et al., 1980).

- La surface minérale modifie l'activité enzymatique en induisant des changements de structure de la protéine dus principalement aux forces d'attraction électrostatiques.

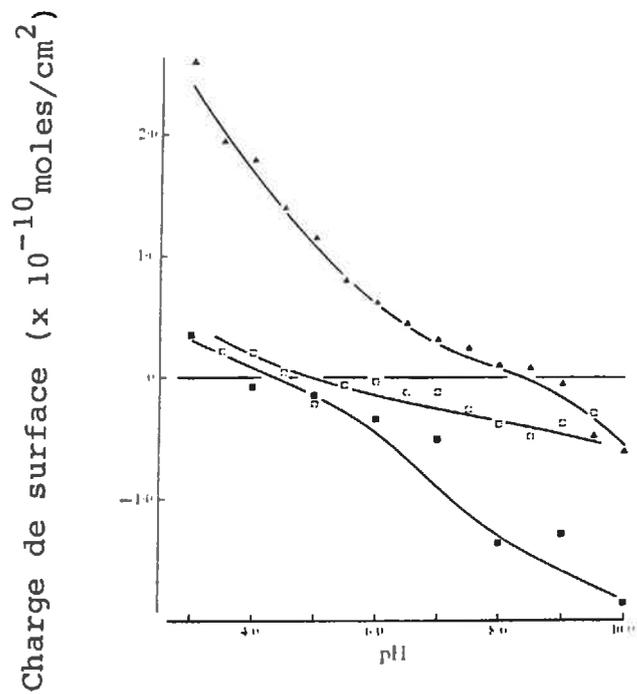


Figure 3.4. : Charge nette de la goethite

▲ : KCl 0,01 M seul

■ : en présence d'une concentration initiale de phosphate 645 μM

□ : en présence d'une concentration initiale de citrate 365 μM

(BOWDEN et al, 1980).

Ainsi, aux pH inférieurs à 4, on devrait avoir des valeurs d'activité non nulles pour le surnageant. En effet l'enzyme ne devrait pas s'adsorber car, d'après les résultats obtenus avec la montmorillonite, la β -glucosidase porte une charge positive. Il devrait donc y avoir une répulsion électrostatique avec la surface de goethite. Or, il n'en est rien. De même nous devrions observer au-dessus de pH 6 non seulement une adsorption totale de l'enzyme mais également une inhibition très nette car l'enzyme porte une charge négative. Ce n'est pas du tout le cas.

Au contraire, tout se passe comme si la surface de goethite était électriquement neutre en présence du tampon citrate, car il n'y a pratiquement pas d'inhibition de l'enzyme adsorbée. Inversement la surface de ce minéral serait chargée négativement en présence du tampon phosphate, car il y a peu d'enzyme adsorbée surtout à faible force ionique (figure 3.1.).

D'une façon générale les oxyanions sont spécifiquement adsorbés par les oxyhydroxydes de fer et d'aluminium. En particulier la goethite adsorbe les anions phosphate, sulfate, arsénate et citrate par échange de ligand avec les groupements OH et OH⁺ de surface (HINGSTON et al., 1972 ; HINGSTON et al., 1974 ; PARFITT, 1978 ; BOWDEN et al., 1980).

Cette adsorption spécifique se traduit par une modification du potentiel de surface de l'oxyde considéré. Pour le cas qui nous intéresse, la fixation d'anions citrate par la goethite a pour effet d'abaisser le point de charge nulle de 8,5 à 5, et de diminuer fortement la valeur absolue de la charge comme cela est indiqué sur la figure 3.4 (BOWDEN et al., 1980).

Ceci explique donc les résultats obtenus avec le tampon citrate, car selon notre modèle une surface très

faiblement chargée ne modifiera pas la conformation de l'enzyme.

Par contre, la fixation de phosphate par la goethite (BOWDEN et al., 1980) rend la surface du minéral très électronégative au-dessus de pH 7. Là encore, il y a un bon accord entre les travaux de BOWDEN et nos résultats puisque pour des pH compris entre 7 et 8 et à une force ionique faible (2 mM) l'enzyme, qui se trouve située au-dessus de son point isoélectrique, ne s'adsorbe pas par suite d'une répulsion de nature électrostatique. Par contre, avec le tampon citrate, les forces de répulsion seront faibles et l'enzyme s'adsorbera sous l'effet des forces de Van der Waals.

Ces expériences avec la goethite permettent également d'éliminer une des trois hypothèses proposées dans la chapitre précédent pour expliquer que l'activité maximale de la β -glucosidase adsorbée sur la montmorillonite reste toujours inférieure à celle mesurée en solution..

Rappelons que les hypothèses proposées étaient :

- une partie des enzymes est adsorbée aléatoirement avec le site actif contre la paroi minérale,

- il existe plusieurs isoenzymes de points isoélectriques différents,

- bien que la résultante des forces s'appliquant sur la protéine soit faible, il y a des tensions induites par les forces électrostatiques, la surface minérale étant répulsive pour les acides aminés anioniques et attractive pour les acides aminés cationiques.

La goethite neutre (ions citrate) ne montre pas cet effet inhibiteur. On peut éliminer la première hypothèse qui ne dépend pas de la charge de la surface. Par contre, les deux dernières hypothèses restent valables, la faible valeur

des forces électrostatiques ne pouvant plus agir de façon différentielle selon le pH sur les isoenzymes, ni agir sur les acides aminés de charge différente de l'enzyme.

3.3.2. AFFINITE COMPAREE DE LA β -GLUCOSIDASE POUR LES SURFACES DE GOETHITE ET DE MONTMORILLONITE.

Pour savoir si la protéine s'adsorbe sélectivement sur la montmorillonite ou la goethite, nous avons mesuré l'activité enzymatique de la β -glucosidase pour des ordres différents d'apport des minéraux. Cette étude a été réalisée avec des quantités de minéraux telles que l'aire des surfaces d'adsorption soit constante, 3 mg.ml⁻¹ pour la goethite (aire spécifique = 80 m².g⁻¹) et 0,3 mg.ml⁻¹ pour la montmorillonite (aire spécifique = 800 m².g⁻¹).

Nous voyons sur la figure 3.5 que la courbe d'activité en fonction du pH est déterminée par le minéral apporté en premier.

Nous pouvons interpréter ce résultat en admettant que l'enzyme est adsorbée irréversiblement par la première surface qu'elle rencontre. Dans la limite de temps de notre expérience (4 h) il n'y aurait pas d'échange notable de l'enzyme entre les surfaces de goethite et de montmorillonite. En effet, nous aurions les mêmes résultats quel que soit l'ordre d'apport des deux minéraux dans l'hypothèse d'un échange rapide.

Ces résultats sont en accord avec ceux de BRASH et al. (1983) montrant que les protéines ne se désorbent des surfaces solides que s'il y a un échange avec les protéines en solution. En particulier il n'y a pas de désorption observables au bout d'une dizaine d'heures quand on élimine les protéines en solution.

Pour les pH inférieurs à 5, c'est-à-dire dans le domaine dans lequel on peut déterminer sans ambiguïté le

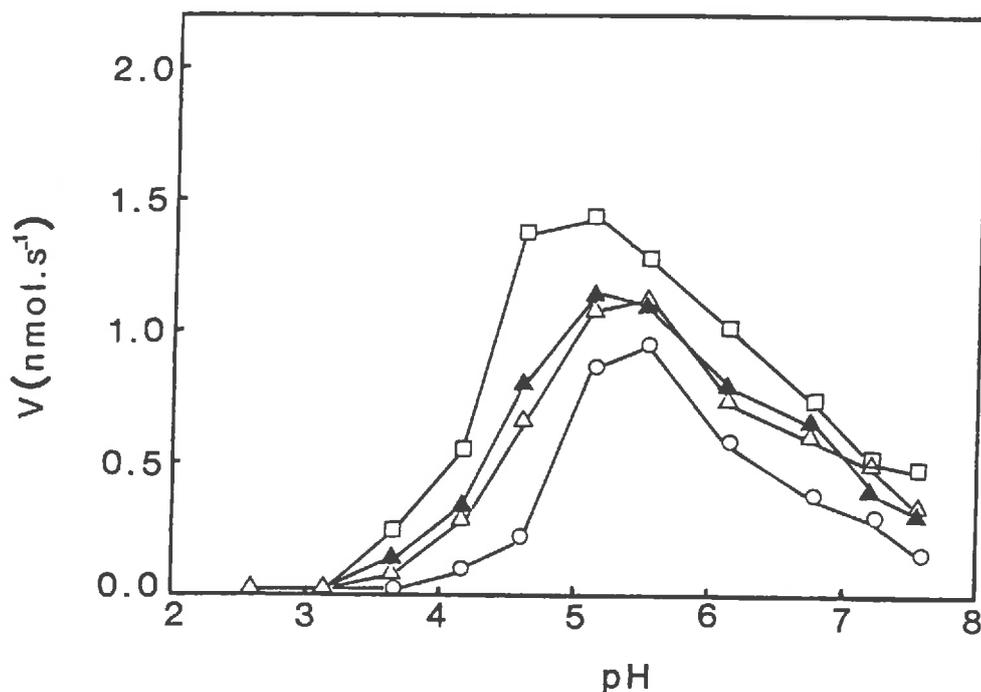


Figure 3.5. : Influence de l'ordre d'apport de la goethite et de la montmorillonite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier.

- : Goethite puis montmorillonite (GM)
- : Montmorillonite puis goethite (MG)
- △ : Goethite et montmorillonite apportées en même temps
- ▲ : Moyenne des courbes GM et MG.

minéral qui conditionne l'activité de la β -glucosidase, l'adsorption est totale. Cette absence d'enzymes libres explique donc l'irréversibilité observée.

Si l'on ajoute en même temps la goethite et la montmorillonite, on constate (figure 3.5) que la courbe expérimentale est la moyenne des deux courbes "montmorillonite-goethite" et "goethite-montmorillonite". Comme les aires des surfaces de montmorillonite et de goethite sont égales, nous pouvons conclure que nous avons la même probabilité d'adsorption de la β -glucosidase par la goethite et la montmorillonite. Ce résultat est intéressant car à pH acide, les forces d'attraction plus élevées avec la montmorillonite qu'avec la goethite. On pouvait donc penser que l'adsorption se serait faite préférentiellement sur la montmorillonite, ce qui est contraire à l'observation.

Pour rendre compte de nos observations, nous sommes conduits à proposer un modèle où interviendraient successivement les phénomènes d'adsorption et de transition conformationnelle.

- la première étape, l'adsorption, ne nécessite que des énergies d'attraction faibles. La cinétique d'adsorption est réglée par la diffusion de l'enzyme vers la surface qui se comporte comme parfaitement adsorbante, c'est-à-dire que tout choc moléculaire sur la surface conduit à une adsorption. Les forces d'attraction électrostatiques n'interviennent pas dans la cinétique d'adsorption car elles n'agissent qu'à courte distance. Cette hypothèse rend parfaitement compte de l'égalité d'affinité de l'enzyme pour la goethite et la montmorillonite.

Dans ces conditions la cinétique d'adsorption obéit à une loi en $t^{1/2}$ (SCHMITT, 1983).

$$N(t) = 2 C (Dt/\pi)^{1/2}$$

avec :

N = nombre de molécules adsorbées

C = concentration en solution

D = coefficient de diffusion

t = temps

$\pi = 3,14$

Cette cinétique en $t^{1/2}$ a déjà été observée pour des protéines s'adsorbant à des interfaces fluide-fluide (MAC RITCHIE, 1978).

- La deuxième étape consiste en une transition conformationnelle de l'enzyme à l'interface qui ne se produit que pour des énergies d'interaction fortes (montmorillonite et pH inférieur au point isoélectrique de l'enzyme) et non pour les énergies d'interaction faibles (goethite ayant fixé des anions citrate et sur tout le domaine de pH).

Ce modèle impliquant deux étapes simplifie également l'idée que l'on peut se faire de l'interaction d'une enzyme avec un ensemble de plusieurs espèces minérales (cas d'un sol).

L'activité enzymatique Y en présence de n minéraux peut être écrite :

$$\text{avec : } y = \frac{\sum_{i=1}^n (S_i \cdot X_i)}{\sum_{i=1}^n S_i}$$

S_i = aire développée par la surface minérale i si les conditions de pH et de force ionique font que la surface se montre attractive vis-à-vis de l'enzyme, $S_i = 0$ si ces conditions font qu'elle se montre répulsive.

X_i = activité de l'enzyme adsorbée sur la surface minérale i (X_i diminuant lorsque les forces d'attraction vers la surface augmentent).

Remarquons que si l'adsorption avait été fonction de la valeur des énergies d'attraction, nous n'aurions pas pu prévoir l'effet d'un mélange de minéraux sur l'activité enzymatique à partir des effets des minéraux pris isolément. Il aurait fallu déterminer en plus pour chaque minéral la cinétique d'adsorption de l'enzyme pour prévoir la répartition sur les différents minéraux du mélange. Ceci aurait posé des problèmes pratiques de mesure car l'adsorption est très rapide, de l'ordre de quelques minutes (ARMSTRONG et CHESTERS, 1964 ; MORGAN et CORKE, 1976 ; SCHMITT, 1983).

3.3.3. INTERACTIONS β -GLUCOSIDASE-KAOLINITE EN FONCTION DU PH ET DE LA FORCE IONIQUE.

Les expériences menées aux forces ioniques 2 mM, 20 mM et 270 mM sont représentées respectivement sur les figures 3.6, 3.7 et 3.8.

L'expérience menée à 270 mM présente des résultats semblables à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec la montmorillonite : adsorption complète de l'enzyme sur tout le domaine de pH, pH optimal de l'enzyme adsorbée égal à 5 tout comme l'enzyme libre. A ce pH, l'activité de l'enzyme adsorbée atteint 60 % de celle de l'enzyme libre.

A force ionique moyenne (20 mM) les résultats sont également très semblables à ceux obtenus avec la montmorillonite. L'enzyme adsorbée n'a pas d'activité aux pH inférieurs à 4, et présente une activité optimale d'environ 60 % de celle du témoin vers pH 5,5. La seule petite différence est observée pour des pH supérieurs à 6. En effet, l'activité du surnageant est un peu plus faible que pour la montmorillonite, ce qui se traduit par l'absence d'un

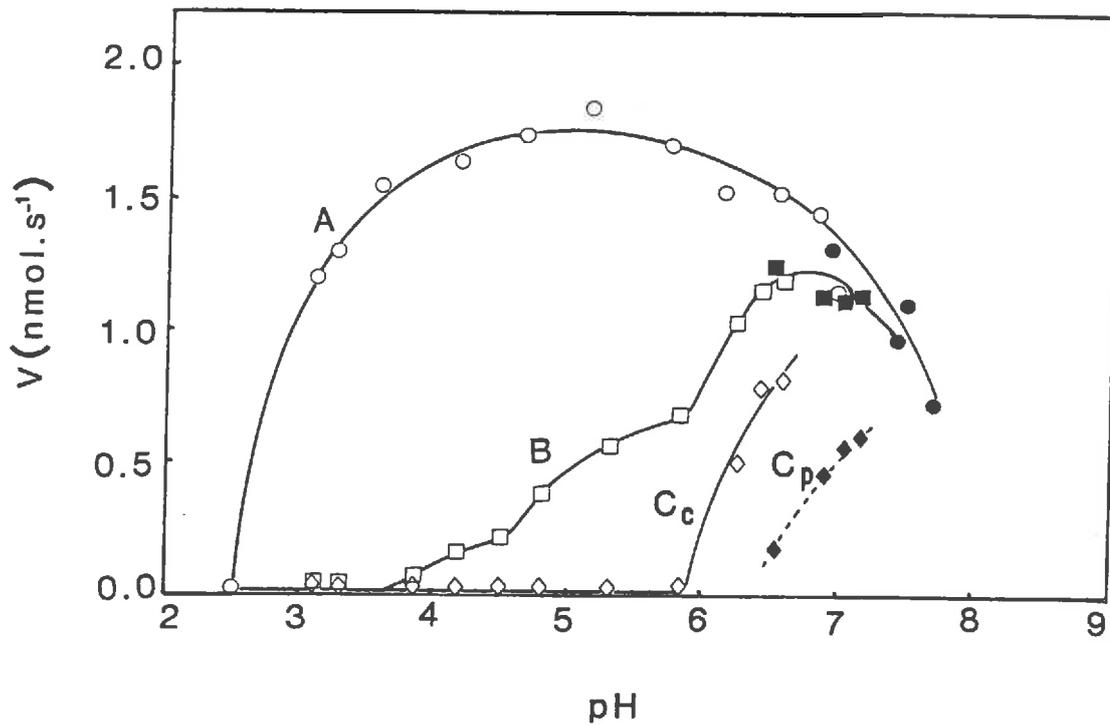


Figure 3.6. : Effet de la kaolinite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$$[\text{Na}^+] = 2 \text{ mM}$$

○ : Témoin (A)

□ : En présence de kaolinite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate

Symboles fermés pour le tampon phosphate.

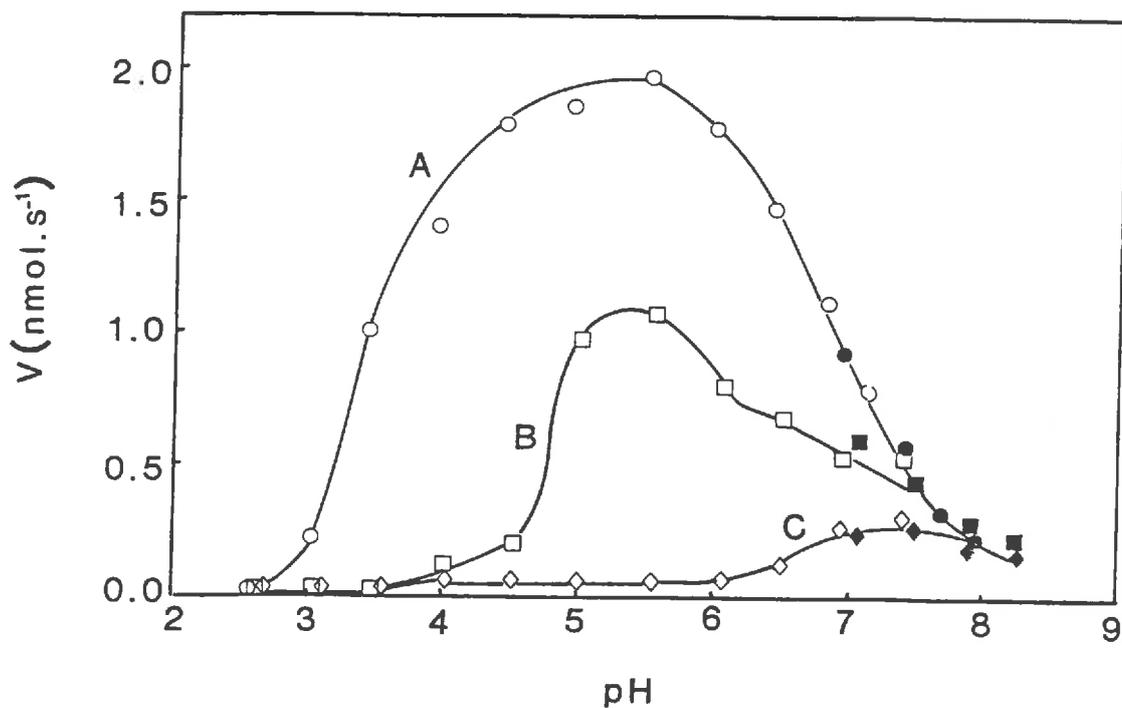


Figure 3.7. : Effet de la kaolinite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$$[\text{Na}^+] = 20 \text{ mM}$$

○ : Témoin (A)

□ : En présence de kaolinite (B)

◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
Symboles fermés pour le tampon phosphate.

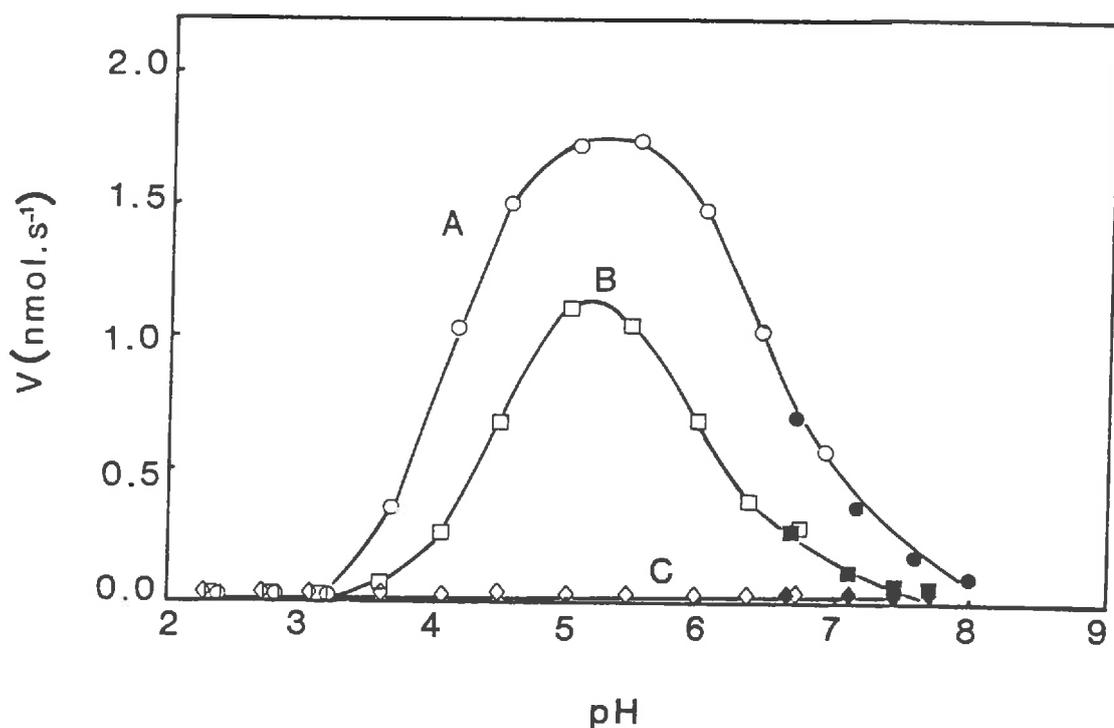


Figure 3.8. : Effet de la kaolinite sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$$[\text{Na}^+] = 270 \text{ mM}$$

- : Témoin (A)
- : En présence de kaolinite (B)
- ◇ : Surnageant (C)

Symboles ouverts pour le tampon citrate
 Symboles fermés pour le tampon phosphate.

deuxième maximum sur la courbe B. De ce point de vue, les résultats avec la kaolinite pour une force ionique 20 mM ressemblent plus aux résultats obtenus avec la montmorillonite à une force ionique de 40 mM (ou même un peu plus car l'épaulement à partir de pH 6 est moins marqué).

A faible force ionique (2 mM) on observe une activité en présence de kaolinite se traduisant par une courbe B de même forme qu'avec la montmorillonite : inhibition de l'activité enzymatique très forte à pH acide et augmentation très forte au-dessus de pH 6 correspondant à une augmentation de la fraction non adsorbée. Par contre, les deux différences par rapport à la montmorillonite que l'on remarque sont :

- une différence quantitative : l'activité observée à pH 6, juste avant la rupture de pente est de 40 % de celle du témoin alors qu'elle n'est que de 20 % en présence de montmorillonite.

- une différence qualitative : la courbe d'activité du surnageant montre à pH alcalin une différence marquée selon que l'on emploie du tampon citrate ou du tampon phosphate : les valeurs sont plus faibles avec le tampon phosphate (4 fois plus faible à pH 6,5) et paraissent décalées vers les pH alcalins).

Nous allons d'abord interpréter les résultats obtenus selon notre modèle d'interaction des enzymes avec les minéraux et ensuite, nous confronterons nos conclusions aux résultats obtenus par d'autres auteurs.

La très grande ressemblance des résultats obtenus avec la kaolinite et la montmorillonite nous conduit à tenir le même raisonnement qu'avec cette dernière : la kaolinite (en tampon citrate) est électronégative sur tout le domaine de pH étudié, à pH acide l'enzyme chargée positivement subit des forces électrostatiques qui la dénaturent, au voisinage du point électrique l'enzyme est

adsorbée par des forces de Van der Waals qui ne sont pas assez intenses pour déformer sa structure et au-dessus du point isoélectrique l'enzyme ne s'adsorbe pas à force ionique faible (répulsion électrostatique) et s'adsorbe à force ionique élevée (écranage des forces de répulsion électrostatiques qui deviennent inférieures aux forces d'attraction de Van der Waals).

Le champ électrique de surface de la kaolinite serait toutefois peu inférieur à celui de la montmorillonite comme semble le suggérer la moindre inactivation de l'activité enzymatique à faible force ionique et la plus faible valeur de la fraction libre à force ionique moyenne.

Mais alors que la forte charge négative des surfaces de montmorillonite n'est mise en doute par personne, il n'en est pas de même pour la kaolinite.

Le rôle dans l'origine de la charge de la dissociation-protonation des groupements silanol et aluminol de bord du cristal n'est pas contesté et rend compte de la variation avec le pH de cette charge. Les surfaces de bord peuvent représenter 20 % de l'aire totale des surfaces ce qui est nettement plus que pour la montmorillonite.

Par contre, il y a une controverse sur le point de savoir si la kaolinite porte ou non une charge négative due à des substitutions isomorphiques sur les surfaces basales. FERRIS et JEPSON (1975) pensent que les surfaces basales ne sont pas chargées car la mesure de la capacité d'échange cationique en fonction du pH montrerait l'absence de charges négatives à bas pH. A l'opposé, BOLLAND et al (1976) font remarquer que les résultats des auteurs précédents peuvent être faussés par la libération de cations Al^{3+} à bas pH et si on corrige les mesures de capacité d'échange par ce facteur, on trouve que la kaolinite porte une charge négative indépendante du pH en plus de celle provenant de la dissociation des hydroxyles de bord. Ils montrent même que sur des échantillons de kaolinite d'origine

différente, on trouve des densités surfaciques de charge très voisines de celle de la montmorillonite ($1,1$ à $1,5 \cdot 10^{-6}$ éq.m⁻²).

Une dernière hypothèse (TALIBUDEEN et GOULDING, 1983) considère que la charge indépendante du pH mesurée avec les échantillons de kaolinite proviendrait d'impuretés de type mica ou smectite.

La similitude des résultats obtenus nous amène à conclure qu'il existe sur la kaolinite et la montmorillonite des surfaces ayant des densités de charges surfaciques voisines.

- 1er cas : la C.E.C. est due à des charges variables. Dans ce cas, on ne devrait pas observer d'adsorption aux bas pH car les sites sont chargés positivement. Toutefois, l'adsorption d'ions citrate peut abaisser le potentiel comme nous l'avons observé avec la goéthite. Cette hypothèse est raisonnable car, au-dessus de pH 6, les quantités adsorbées dépendent du tampon.

- 2me cas : la C.E.C. est due à des charges variables et à des substitutions isomorphiques. Nous allons essayer de vérifier cette hypothèse en étudiant comment varient les quantités adsorbées en fonction de la concentration en argile.

3.3.4. INFLUENCE DE L'AIRE SPECIFIQUE DE LA KAOLINITE ET DE LA MONTMORILLONITE.

Comme nous n'employons pas une enzyme purifiée, il est difficile de calculer le taux de recouvrement des surfaces minérales par l'enzyme car nous ignorons la taille et la forme des autres contaminants protéiques présents.

Néanmoins, les surfaces spécifiques de la kaolinite de St Austell ($14 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) et de la

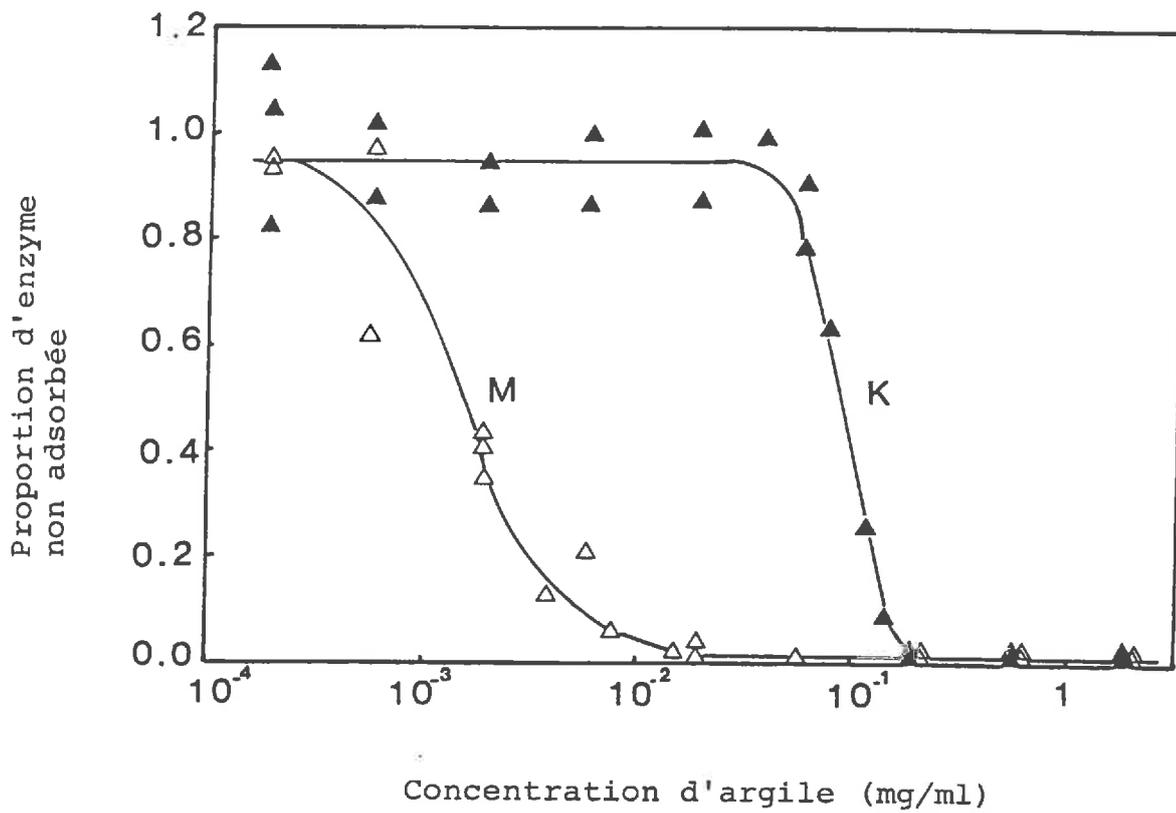


Figure 3.9. : Effet du rapport de concentration argile/ β -glucosidase d'Amandier sur l'adsorption.

▲ : kaolinite

△ : montmorillonite.

montmorillonite du Wyoming (environ $800 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) étant connues on peut comparer leur pouvoir adsorbant vis-à-vis de la β -glucosidase en faisant varier la concentration massique de ces minéraux. La mesure du pouvoir adsorbant est réalisée en étudiant l'activité du surnageant (selon le protocole habituel) à pH 5 et à une force ionique de 20 mM car, dans ces conditions, les surfaces de kaolinite et de montmorillonite sont parfaitement adsorbantes. Ces conditions sont également celles où la β -glucosidase en solution présente son activité optimale, ce qui accroît la précision de la détermination des quantités d'enzyme non adsorbées.

Les résultats sont présentés sur la figure 3.9. Si l'on prend comme point de comparaison les concentrations massiques pour lesquelles 50 % de l'enzyme est adsorbée, il faut 55 fois plus de kaolinite que de montmorillonite. Il est intéressant de noter que le rapport des aires spécifiques de la montmorillonite et de la kaolinite est pratiquement identique à cette valeur.

Au vu de ces résultats on peut conclure que les surfaces basales sont impliquées dans l'adsorption. En effet

- aux taux de recouvrement importants : si les surfaces latérales étaient les seules impliquées, le rapport des concentrations massiques aurait dû être d'environ 250.
- aux faibles taux de recouvrement : on a montré précédemment que l'adsorption était un phénomène contrôlé par la diffusion et non par l'intensité des forces de nature attractive.

Par ailleurs et selon le modèle proposé pour expliquer l'activité de la β -glucosidase en fonction du pH, nous sommes obligés d'admettre que les surfaces basales de la kaolinite portent une charge négative.

3.4. CONCLUSION

La charge électrique de la goethite varie selon la nature des oxyanions qui se complexent avec les hydroxyles de surface. En présence d'ions citrate la surface est neutre. En conséquence l'activité de l'enzyme adsorbée est intégralement conservée. Ceci confirme l'hypothèse de l'intervention des forces électrostatiques dans la modification de conformation des enzymes adsorbées sur la montmorillonite puisque les seules forces d'attraction de Van der Waals semblent incapables de modifier la structure protéique.

En présence d'ions phosphate et à pH alcalin la surface de goethite est au contraire négative. La β -glucosidase, qui est également chargée négativement à ces pH, ne s'adsorbe pas.

Une comparaison des effets de la montmorillonite et de la kaolinite sur l'activité enzymatique indique que leur densité surfacique de charge serait voisine. Seule l'aire spécifique de ces argiles les distingue lorsque l'on fait varier les rapports entre quantité d'enzyme et quantité d'argile.

L'adsorption de la β -glucosidase sur une surface minérale est irréversible. Le phénomène observé se décompose en deux étapes :

- une adsorption qui ne nécessite pas des forces d'attraction élevées. La cinétique d'adsorption est limitée par la diffusion. Ainsi, aux pH où l'enzyme est chargée positivement ou neutre, la probabilité d'adsorption est la même pour une surface négative de montmorillonite ou une surface neutre de goethite recouverte de citrate.

- un réarrangement de la structure de l'enzyme à l'interface lorsque les énergies d'attraction sont fortes. Ceci explique que l'enzyme chargée positivement à pH acide perd sa conformation active avec la montmorillonite mais non avec la goethite en tampon citrate.

CHAPITRE 4

EFFET D'UN REVETEMENT ORGANIQUE SUR LES INTERACTIONS

β -GLUCOSIDASE-MONTMORILLONITE

4.1. INTRODUCTION

Nous avons déjà étudié l'effet de surfaces minérales nues (montmorillonite, kaolinite, goethite) sur l'activité de la β -glucosidase. Dans le cas de la goethite, nous avons toutefois noté que l'adsorption d'anions citrate ou phosphate jouait un rôle considérable. Ceci laisse présager l'importance que peuvent jouer les molécules organiques adsorbées en modifiant les conditions physico-chimiques à l'interface solide-liquide.

Or, on sait que dans les sols une quantité notable de matière organique se trouve étroitement liée à la phase minérale (complexe argilo-humique). Il est donc nécessaire d'étudier l'effet sur l'activité enzymatique de surfaces minérales recouvertes de différents types de substances organiques modèles et de les comparer avec celui induit par des fractions fines de sols naturels extraites sans destruction de la matière organique. Seule, cette étude peut permettre de dire dans quelle mesure le modèle d'interaction que nous avons proposé précédemment reflète ce qui se passe réellement dans le milieu naturel.

4.2. MATERIELS ET METHODES

4.2.1. MATERIELS ET METHODES

4.2.1.1. Préparation du complexe montmorillonite-pentylammonium

Le complexe est formé par échange ionique entre une montmorillonite du Wyoming et une solution de chlorure de pentylammonium. On apporte 5 fois la capacité d'échange en trois cycles de saturation, puis lavage et centrifugation.

4.2.1.2. Préparation de la fraction argileuse de de sol

L'échantillon provient d'un sol limoneux maintenu en jachère nue avec apport de fumier (100 tonnes ha⁻¹.an⁻¹). La fraction granulométrique inférieure à 2 µm de ce sol est obtenue par sédimentation.

Cette fraction contient 6,4 mg de N. g⁻¹ et 51 mg de C.g⁻¹ se répartissant en :

- acides fulviques : 21 %
- acides humiques : 29 %
- humine : 50 %

La composition minérale est :

- smectites et interstratifiés : 43 %
- illite : 34 %

- kaolinite

: 10 %

L'aire spécifique est $220 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$.

La capacité d'échange cationique du support minéral seul est $3,2.10^{-4} \text{ éq.g}^{-1}$ et celle du complexe organo-minéral est $6,3.10^{-4} \text{ éq.g}^{-1}$.

4.2.1.3. Polymères et enzyme

Le polyéthylène glycol 10 000 vient de la firme MERCK (Art. 821881).

Le lysozyme de blanc d'oeuf de poule vient de la firme SIGMA (L-6876).

On utilise la β -glucosidase d'Amandier précédemment décrite (paragraphe 2.2.1.2.).

4.2.2. METHODES

Les protocoles A, B et C sont les mêmes que dans le chapitre 2.

Les expériences effectuées avec le complexe montmorillonite-pentylammonium et avec la fraction argileuse de sol correspondent aux protocoles A, B et C à une force ionique 20 mM et à une concentration minérale de 3 mg.ml^{-1} . (paragraphe 4.3.1. et 4.3.4.).

L'influence sur l'activité enzymatique d'un recouvrement de la montmorillonite par le polyéthylène glycol (paragraphe 4.3.2.) est étudiée par une série d'expériences de type A, B et C dans lesquelles on mélange d'abord le lysozyme et la montmorillonite. On attend 2 heures. Puis on apporte la β -glucosidase d'Amandier. On laisse à nouveau 2 heures d'incubation, puis on mesure l'activité enzymatique.

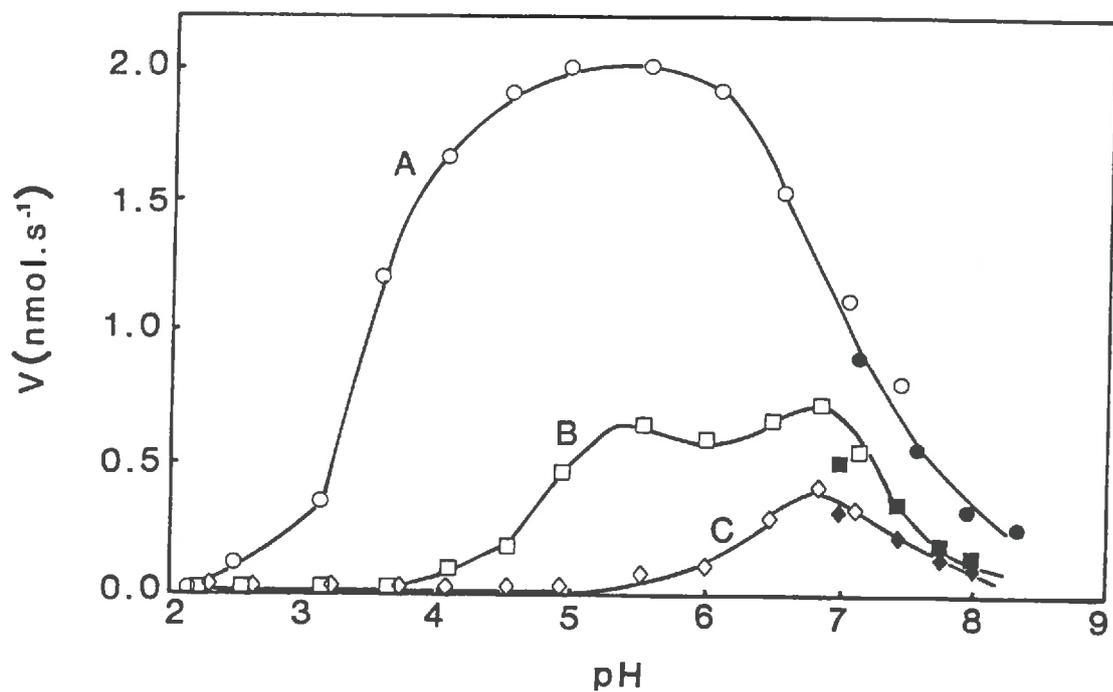


Figure 4.1. : Effet d'un complexe montmorillonite-pentylammonium sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$$[\text{Na}^+] = 20 \text{ mM}$$

- : Témoin (A)
- : En présence du complexe (B)
- ◇ : Surnageant (C)

Cette étude est complétée par une autre expérience de type B dans laquelle on mélange d'abord la montmorillonite et la β -glucosidase. On attend 2 heures. On apporte le polyéthylène glycol. Après 2 heures, on mesure l'activité.

Dans ces deux séries d'expériences le rapport pondéral polyéthylène glycol/montmorillonite est égal à 0,3. Ce rapport est suffisant pour saturer les surfaces minérales par le polymère (PARFITT et GREENLAND, 1970 ; CHASSIN, 1975).

L'influence d'un recouvrement de la montmorillonite par le lysozyme est étudiée de la même façon que pour le polyéthylène glycol (paragraphe 4.3.3.).

Le rapport pondéral lysozyme/montmorillonite est égal à 3, ce qui est, là encore, suffisant pour saturer les surfaces minérales (Mc LAREN, 1958).

4.3. RESULTATS ET DISCUSSION

4.3.1. ACTIVITE ENZYMATIQUE EN PRESENCE D'UN COMPLEXE MONTMORILLONITE-PENTYLAMINE.

On observe sur la figure 4.1 que la β -glucosidase en présence d'un complexe montmorillonite-pentylammonium (courbe B) se comporte comme la montmorillonite sodique : on n'observe pas d'activité en dessous de pH 4, puis on a un premier pic d'activité à pH 5,5 dû à l'enzyme adsorbée, et enfin un deuxième pic d'activité à pH 7 dû à la fraction de l'enzyme non adsorbée.

Ce comportement n'est pas celui auquel nous nous attendions. En effet, l'idée que nous avons suivie était d'établir un parallèle avec les travaux de P. CHASSIN et C. JOUANY qui, en étudiant les composantes polaires et dispersées

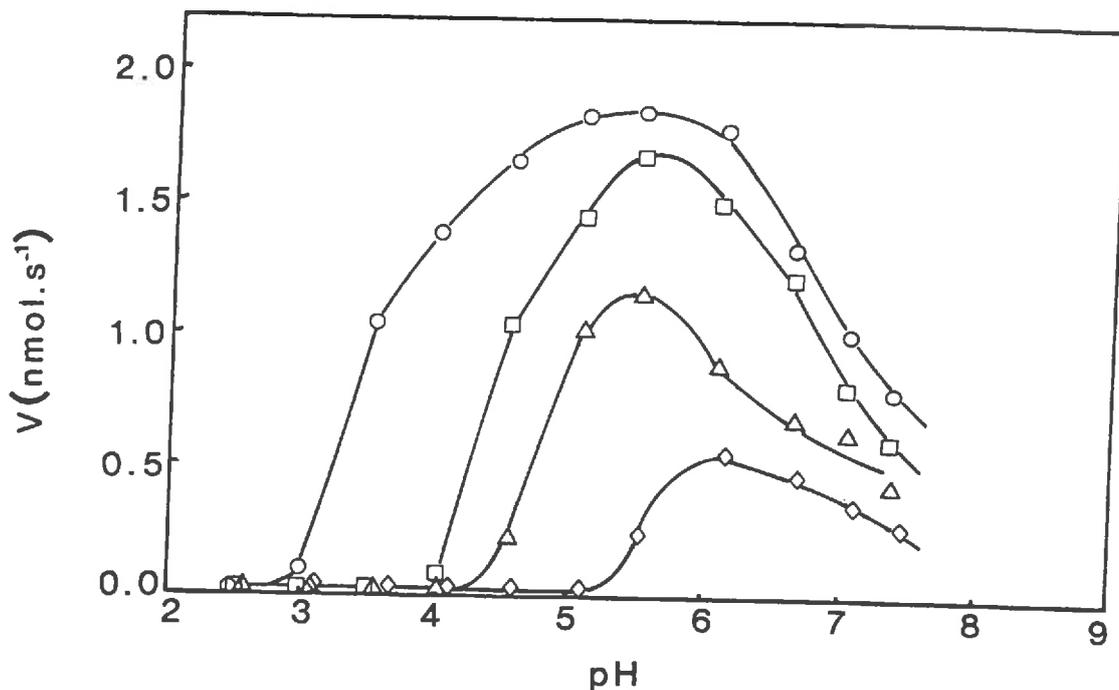


Figure 4.2. : Effet d'un recouvrement de la montmorillonite par le polyéthylène glycol sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

○ : Témoïn (A)

- Polyéthylène glycol apporté avant la β -glucosidase :

□ : En présence du complexe (B)

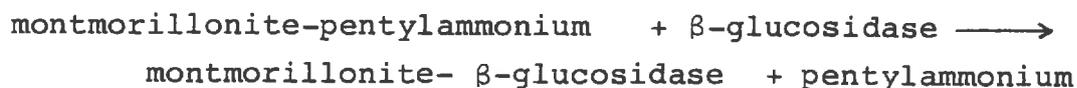
◇ : Surnageant (C)

- β -glucosidase apportée avant le polyéthylène glycol :

△ : En présence du minéral (B)

des énergies de surface de complexes montmorillonite-alkylamines, établissent que la surface perd rapidement les caractères de la montmorillonite pour ne plus présenter que ceux de la phase organique à partir d'une certaine longueur de la chaîne hydrocarbonée. Nous pensons donc que la surface aurait présenté un caractère électriquement neutre se traduisant par une activité de l'enzyme adsorbée semblable à ce que nous avons observé avec la goethite en présence de citrate.

Nous sommes donc conduits à faire l'hypothèse qu'il y a eu un échange entre les molécules d'enzyme et une partie des molécules de pentylamine à la surface de la montmorillonite



Cet échange peut facilement s'expliquer par la disproportion des poids moléculaires : 80 pour la pentylamine, de l'ordre de 10^5 pour la β -glucosidase. Bien que dans les deux cas le facteur prépondérant responsable de l'adsorption soit le même, à savoir les interactions électrostatiques entre groupements aminés électropositifs et surface d'argile électronégative, on sait que pour des macromolécules d'une même série chimique la sélectivité pour une surface augmente avec le poids moléculaire (SCHMITT, 1983). En prenant comme densité de charge de l'argile une aire de $1,35 \text{ nm}^2$ par charge élémentaire et en considérant la β -glucosidase comme une protéine globulaire de 5 nm de diamètre, on peut calculer que l'adsorption de l'enzyme nécessite le départ de 15 molécules de pentylamine dans l'hypothèse d'un maintien de la structure de la protéine.

4.3.2. EFFETS DU POLYETHYLENE GLYCOL SUR LES INTERACTIONS ENTRE LA β -GLUCOSIDASE ET LA MONTMORILLONITE.

Nous avons distingué deux cas suivant l'ordre d'apport de la β -glucosidase et du polyéthylène glycol.

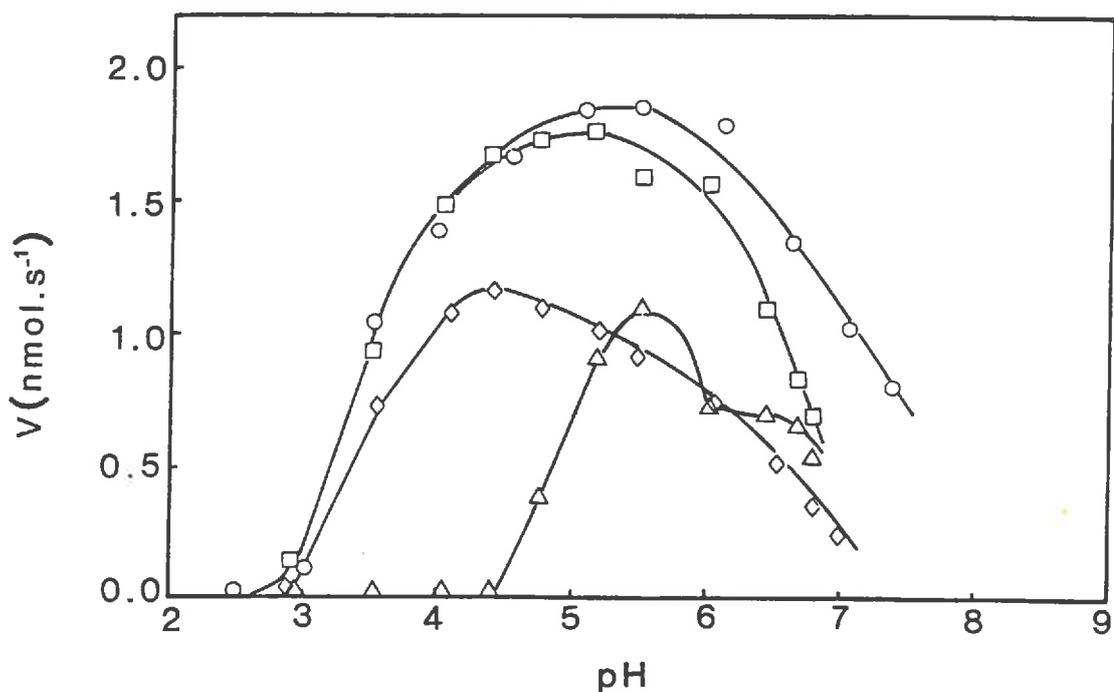


Figure 4.3. : Effet d'un recouvrement de la montmorillonite par le lysozyme sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

- : Témoin (A)
- Lysozyme apporté avant la β -glucosidase :
 - : En présence du complexe (B)
 - ◇ : Surnageant (C)
- β -glucosidase apportée avant le lysozyme
 - △ : En présence du minéral (B)

4.3.2.1. Apport de β -glucosidase précédant celui de polyéthylène-glycol.

La figure 4.2 montre que dans ce cas l'effet obtenu est très proche de ce qu'il est avec la montmorillonite sodique pure. Ceci est en accord avec l'irréversibilité déjà notée des altérations structurales de la β -glucosidase adsorbée sur la montmorillonite.

4.3.2.2. Apport de polyéthylène glycol précédant celui de β -glucosidase.

Dans cette situation expérimentale, on constate qu'en dessous de pH 4, on a une inactivation totale de l'enzyme et qu'à partir de pH 5,5, l'activité est identique au témoin sans argile. L'activité du surnageant est nulle en dessous de pH 5.

Une hypothèse simple peut expliquer ces résultats. En dessous de pH 4 nous avons déjà considéré que l'enzyme portait une charge positive nette, on peut donc supposer qu'elle déplace le polyéthylène glycol qui, étant neutre, est moins énergétiquement fixé à la surface. L'enzyme adsorbée subit alors les altérations structurales qui se produisent à ces pH avec les surfaces nues de montmorillonite. Par contre, au-dessus de pH 4 la β -glucosidase perd sa charge positive et par la même occasion son pouvoir d'adsorption compétitif vis-à-vis du polyéthylène-glycol. Dans ces conditions, une couche de polymères neutres est intercalée entre l'argile et l'enzyme, ce qui réduit les interactions électrostatiques, pour deux raisons principalement :

- d'une part l'enzyme se trouve à une distance plus grande de la surface minérale, donc en un point où la valeur absolue du potentiel électrique est plus basse,
- d'autre part dans la théorie de Gouy et Chapman, l'épaisseur de la couche diffuse χ^{-1} est proportionnelle à la racine carrée de la

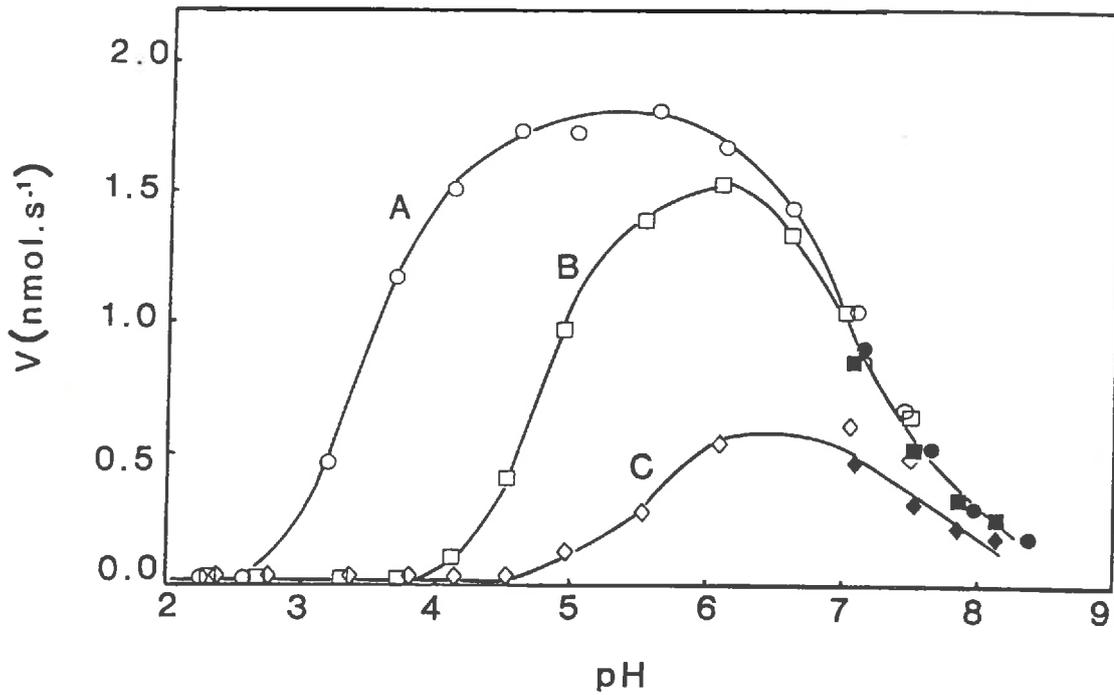


Figure 4.4. : Effet d'une fraction argileuse de sol riche en matière organique sur l'activité de la β -glucosidase d'Amandier

$[\text{Na}^+] = 20 \text{ mM}$

- : Témoin (A)
- : En présence de la suspension de sol (B)
- ◇ : Surnageant (C)

permittivité du milieu. Or justement la permittivité relative du polyéthylène est égale à 2,25 alors que celle de l'eau est égale à 78,2.

4.3.3. EFFETS DU LYSOZYME SUR LES INTERACTIONS ENTRE LA β -GLUCOSIDASE ET LA MONTMORILLONITE.

4.3.3.1. Apport de β -glucosidase précédant celui de lysozyme.

Sur la figure 4.3 on peut voir que le résultat est identique à ce qui avait été obtenu dans les mêmes conditions avec le polyéthylène glycol, c'est-à-dire que l'apport ultérieur d'un polymère ne modifie pas la courbe traduisant les interactions entre la β -glucosidase et la montmorillonite sodique.

Le lysozyme étant une protéine dont le point isoélectrique est de 11,7, il peut être considéré comme chargé positivement sur tout le domaine de pH étudié. Donc, s'il était raisonnable de considérer que le polyéthylène glycol neutre ne déplace pas à bas pH la β -glucosidase cationique, on ne peut par contre totalement exclure l'hypothèse d'un déplacement par le lysozyme. Toutefois, il faudrait alors admettre que les modifications de structure consécutives aux interactions avec la surface minérale à bas pH restent irréversibles, même si l'enzyme est désorbée. Cela n'a bien sûr rien d'impossible, mais étant donné la parfaite identité des courbes obtenues avec le polyéthylène glycol et le lysozyme, il nous semble plus probable de considérer que la β -glucosidase est irréversiblement adsorbée à bas pH.

4.3.3.2. Apport de lysozyme précédant celui de β -glucosidase.

Les résultats sont très différents de ce qui avait été obtenu avec le polyéthylène glycol en suivant le même protocole expérimental. Nous observons (figure 4.2) que la

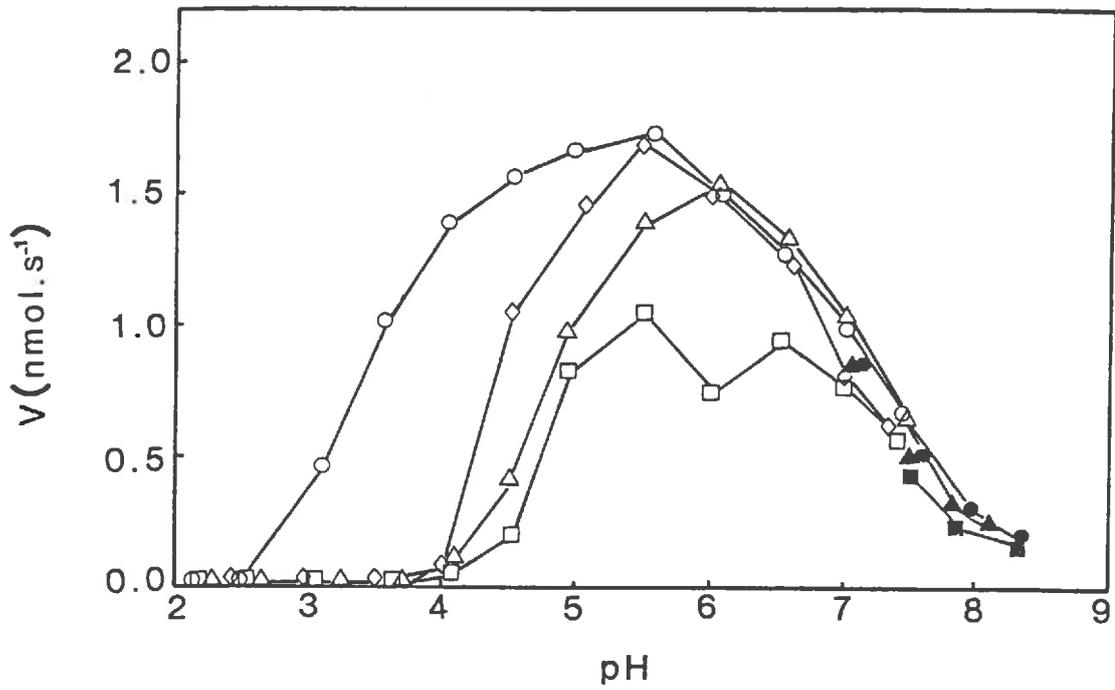


Figure 4.5. : Comparaison des effets sur l'activité d'une β -glucosidase d'Amandier

- d'une fraction de sol : Δ
- d'un complexe montmorillonite-polyéthylène glycol : \diamond
- de la montmorillonite sodique : \square
- témoin (A) : \circ

courbe d'activité enzymatique en présence de montmorillonite recouverte de lysozyme est pratiquement identique à la courbe témoin ne comportant que la β -glucosidase (identique entre pH 3 et pH 5, légèrement inférieure au-dessus de pH 5). La courbe d'activité du surnageant C montre une très faible adsorption de l'enzyme à pH inférieur à 4, puis une adsorption croissante au delà de ce pH.

Cette absence totale d'effet inhibiteur aux pH acides nous conduit à interpréter ce résultat comme une saturation des sites d'adsorption de la montmorillonite par le lysozyme qui, contrairement au polyéthylène glycol est plus énergétiquement fixé du fait de sa forte charge positive et n'est donc pas déplacé par la β -glucosidase. Ceci conduit à un renversement du signe de la charge de la surface ainsi que le montre l'absence d'adsorption à pH acide lorsque la β glucosidase est chargée positivement. La légère baisse d'activité par rapport au témoin vers pH 7 s'explique par le fait que les interactions électrostatiques modifiant la conformation sont alors inversées : surface positive, enzyme négative.

4.3.4. ACTIVITE ENZYMATIQUE EN PRESENCE D'UNE FRACTION ARGILEUSE DE SOL RICHE EN MATIERE ORGANIQUE.

Les résultats portés sur la figure 4.4 montrent que l'activité enzymatique en présence de la fraction de sol est complètement inhibée en-dessous de pH 4 comme dans les expériences correspondantes avec la montmorillonite et la kaolinite ; par contre, au-dessus de cette valeur l'activité croît jusqu'à un maximum vers pH 6, puis à partir de cette valeur décroît de façon identique au témoin.

Si nous comparons sur la figure 4.5 les courbes d'activité correspondant au témoin, à l'effet de la montmorillonite, de la fraction de sol et de la montmorillonite préalablement recouverte de polyéthylène glycol, nous remarquons que le modèle dont se rapproche le plus la fraction

de sol étudiée est le complexe montmorillonite-polyéthylène glycol. Nous reprendrons donc l'interprétation déjà formulée pour ce complexe. Remarquons tout d'abord que les argiles du sol étudié, malgré leur diversité sont toutes chargées négativement : l'illite que nous n'avons pas étudiée porte une densité de charge encore plus importante que la montmorillonite et nous avons vu que la seule argile rencontrée ici qui aurait pu passer pour peu chargée, la kaolinite, se comporte en fait comme un matériau de même densité surfacique de charge que la montmorillonite.

Donc, lorsque l'enzyme se trouve à pH acide en-dessous de son point isoélectrique, elle est chargée positivement et peut s'échanger avec certaines fractions de la matière organique des sols, probablement des composés polymériques neutres ou anioniques. L'enzyme subit alors une modification de conformation due aux attractions électrostatiques entre groupements aminés et surface minérale. Lorsque le pH augmente, l'enzyme en perdant sa charge positive perd également son pouvoir de déplacer les polymères déjà présents sur la surface, ce qui fait que sa structure n'étant plus perturbée par un fort champ électrique, son pouvoir catalytique devient progressivement égal à celui d'une enzyme en solution.

4.4. CONCLUSION

Nous proposons un modèle simple rendant compte de l'effet d'une suspension de sol naturel sur l'activité enzymatique. Il consiste à tenir compte non seulement du support argileux électronégatif, mais aussi d'un recouvrement de la surface minérale par des substances organiques s'échangeant avec l'enzyme quand celle-ci est chargée positivement. A cet égard, des molécules de faible poids moléculaire, ions alkylammonium par exemple, ne peuvent modéliser l'effet de la matière organique car elles peuvent

être déplacées sur tout le domaine de pH. Un polymère porteur d'un excès de charges positives comme le lysozyme ne convient également pas car à l'opposé du cas précédent, il n'est pas du tout déplacé par la β -glucosidase, même à pH acide. Par contre, un polymère neutre comme le polyéthylène glycol a le comportement requis : échangeable par l'enzyme se trouvant en dessous de son point isoélectrique mais non échangeable au-dessus.

CONCLUSION

Cette étude montre que les forces électrostatiques s'établissant entre une enzyme et une surface minérale sont un facteur essentiel de l'activité enzymatique aux interfaces solide-liquide.

En conséquence nous proposons un modèle expliquant les modifications des courbes d'activité en fonction du pH des enzymes adsorbées par des changements de conformation dus principalement aux forces électrostatiques.

Les principaux arguments en faveur de cette hypothèse sont résumés :

- 1- Lorsque l'on fait varier le pH, on observe que l'activité à un pH donné d'une enzyme adsorbée sur la montmorillonite dépend du pH antérieur. Or ce résultat est incompatible avec l'hypothèse d'une acidification au niveau du site actif par un phénomène de couche diffuse et avec l'hypothèse d'une modification de conformation sous l'effet des forces de Van der Waals. En effet, ces deux hypothèses, souvent avancées, prévoient une absence d'influence du pH antérieur.

Par contre une hypothèse de modification de conformation dépendant des forces électrostatiques est compatible avec cette observation.

- 2- L'adsorption et l'activité de l'enzyme est très sensible à la charge de l'adsorbant.

2.1.- si la surface est chargée négativement on observe 3 zones de pH que l'on peut interpréter sur la base de la charge de l'enzyme

- aux pH inférieurs au point isoélectrique les interactions électrostatiques entre la surface et l'enzyme sont fortes et conduisent à une dénaturation de cette dernière.

- aux pH voisins du point isoélectrique l'enzyme est adsorbée sous l'effet de forces de Van der Waals trop faibles pour modifier la structure protéique. L'enzyme reste donc active.

- aux pH supérieurs au point isoélectrique l'enzyme et la surface portent des charges de même signe. Ainsi à faible force ionique, l'enzyme ne s'adsorbe pas. Par contre, à force ionique élevée les forces attractives de Van der Waals deviennent plus importantes que les forces répulsives électrostatiques et l'enzyme s'adsorbe.

2.2.- si la surface est très peu chargée (goethite ayant fixé des ions citrate) l'enzyme adsorbée garde la même activité qu'en solution. On peut penser que l'adsorption se fait principalement par les forces de Van der Waals qui ne sont pas assez intenses pour affecter la structure de l'enzyme.

2.3.- si la surface est chargée positivement (montmorillonite recouverte de lysozyme)

l'enzyme ne s'adsorbe pas à pH acide car elle est alors cationique. L'adsorption augmente lorsque le pH croît. Parallèlement une inhibition de l'activité enzymatique se manifeste à pH alcalin (enzyme négative, complexe organo-minéral positif) montrant un effet symétrique de celui observé avec les surfaces négatives.

3- L'effet sur l'activité enzymatique de différents revêtements organiques de la montmorillonite peut s'interpréter sur la base d'un échange de l'enzyme avec les molécules du revêtement. Là encore les interactions électrostatiques jouent un rôle important. Ainsi, on peut expliquer les résultats obtenus avec les différents revêtements étudiés de la façon suivante :

- 3.1.- les ions organiques de faible poids moléculaire (pentylammonium) sont facilement échangés par l'enzyme, quelle que soit sa charge.
- 3.2.- les polymères neutres (polyéthylène glycol) ne sont échangés que lorsque l'enzyme est chargée positivement.
- 3.3.- les polymères chargés positivement (lysozyme) sont fortement fixés, conduisant à un renversement de la charge de la surface et ne sont pas échangés par l'enzyme.

Pour conserver la cohérence du modèle proposé, nous avons été conduits à admettre que la kaolinite avait une densité surfacique de charge voisine de celle de la montmorillonite.

Par contre nous avons montré que la cinétique d'adsorption ne dépendait pas de l'intensité des forces d'attraction (électrostatiques ou de Van der Waals) et était réglée par la diffusion.

Pour conclure, remarquons que le modèle proposé est utile dans deux domaines d'application :

- La biologie des sols où il permet de comprendre les interactions des enzymes avec les systèmes adsorbants complexes des sols. Ainsi un mélange de différents minéraux recouverts de substances organiques mal définies se comporte vis-à-vis de l'activité enzymatique comme une suspension de montmorillonite recouverte de polyéthylène glycol.
- La biotechnologie des enzymes fixées où il permet de rationaliser le choix des surfaces d'adsorption. Notons que la goethite ayant fixé des ions citrate semble un excellent support : aire spécifique importante, bonne fixation de l'enzyme et activité enzymatique non perturbée du fait de la faible charge de la surface.

BIBLIOGRAPHIE

ALBERT J.T., HARTER R.D. 1973 - Adsorption of lysozyme and ovalbumin by clay : effect of clay suspension pH and clay mineral type. Soil Sci., 115, 130-136.

ALIEV R.A., GUSEV V.S., ZVYAGINTSEV D. G. 1976 - Effets d'adsorbants sur le pH optimal de l'activité de la catalyse (en russe). Vestnik Moskovskogo Universiteta. Pochvovedenie, 31, 67-70.

ARMSTRONG D.E., CHESTERS G. 1964 - Properties of protein-bentonite complexes as influenced by equilibration conditions. Soil Sci., 98, 39-52.

BENESI A., Mc LAREN 1975 - Redox dependence of papain enzyme activity on charged kaolinite surfaces and in solution. Soil Biol. Biochem., 7, 379-381.

BOLLAND M.D.A., POSNER A.M., QUIRK J.P. 1976 - Surface charge of kaolinites in aqueous suspension. Aust. J. Soil Res., 14, 197-216.

BOWDEN J.W., NAGARAJAH S., BARROW N.J., POSNER A.M., QUIRK J.P. 1980 - Describing the adsorption of phosphate, citrate and selenite on a variable-charge mineral surface; Aust. J. Soil Res. 18, 49- 60.

BRASH J.L., UNIYAL S., PUSINERI C., SCHMITT A. 1983 - Interaction of fibrinogen with solid surfaces of varying charge and hydrophobic-hydrophilic balance. II. Dynamic exchange between surface and solution molecules. J. Colloid Interface Sci., 95, 28- 36.

BURNS R.G. 1978 - Soil enzymes . R.G. Burns ed. Academic Press, London.

BURNS R.G. 1984 - Microorganisms, enzymes and soil colloid surfaces. NATO Workshop. Gand.

CHASSIN P. 1975 - Etude des interactions montmorillonite calcique-eau-diols. Hydratation des complexes montmorillonite-diols. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Physiques présentée à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI).

DOUZOU P., PETSKO G.A. 1984 - Proteins at work : "stop-action" pictures at subzero temperatures. Advances in Protein Chemistry, 36, 245-361.

DURAND G. 1964 - Modifications de l'activité de l'uréase en présence de bentonite. C.R. Acad. Sci. Paris, 259, 3397-3400.

- DURAND G. 1965 - Les enzymes dans le sol. Rev. Ecol. Biol. Sol, 2, 141-205.
- FERRIS A.P., JEPSON W.B. 1975 - The exchange capacities of kaolinite and the preparation of homoionic clays. J. Colloid. Interface Sci., 51, 245-259.
- HAMZEHI E., PFLUG W. 1981 - Sorption and binding mechanism of polysaccharide cleaving soil enzymes by clay minerals. Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. 144, 505-513.
- HARTER R.D., 1975 - Effect of exchange cations and solution ionic strength on formation and stability of smectite-protein complexes. Soil Sci., 120, 174-181.
- HARTER R.D., STOTZKY G. 1971 - Formation of clay-protein complexes. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 383-389.
- HARTER R.D., STOTZKY G. 1973 - X-ray diffraction, electron microscopy, electrophoretic mobility, and pH of some stable smectite-protein complexes. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 37, 116-123.
- HARTLEY G.S., ROE J.M. 1940 - Ionic concentrations at surface. Trans. Faraday Soc., 36, 101-109.
- HASKA G. 1981 - Activity of bacteriolytic enzymes adsorbed to clays. Microb. Ecol. 7, 331-341.
- HUGHES J.D., SIMPSON G.H. 1978 - Arylsulphatase-clay interactions. II. The effect of kaolinite and montmorillonite on arylsulphatase activity.
- HUNTER R.J., NEVILLE P.C. 1980 - Colloid chemical aspects of slime coating removal. Colloids and surfaces, 1, 257-268.
- JDANOV Yu. A., KESSLER R.M., YAKUBOVA N.R., CHERSTNEV K.B. 1977 - Spécificité de substrat de la β -glucosidase d'Amande douce (en russe). Biokhimiya, 42, 26-33.
- KATCHALSKI E., SILMAN I., GOLDMAN G. 1971 - Effect of the microenvironnement on the mode of action of immobilized enzymes. Advances in Enzymology, 34, 445-536.
- LARSSON N., SIFFERT B. 1983 - Formation of lysozyme-containing crystals of montmorillonite. J. Colloid Interface Sci., 93, 424-431.
- LAURA R.D. 1975 - On the protective effect of clay minerals. Soil Sci. 120, 241-243.
- LAURA R.D. 1976 - On the interlamellar spacings of protein-montmorillonite complexes. Soil Sci., 121, 189-190.
- Mc LAREN A.D., ESTERMANN E.F. 1957 - Influence of pH on the activity of chymotrypsin at a solid-liquid interface. Arch. Biochem. Biophys., 68, 157-160.

Mc LAREN A.D., PETERSON G.H., BARSHAD I. 1958 - The adsorption and reactions of enzymes and proteins on clays minerals : Soil Sci. Soc. Am. Proc., 22, 239-244.

Mc LAREN A.D., PETERSON G.H. 1965 - Physical chemistry and biological chemistry of clay mineral-organic nitrogen complexes. In : W.V. BARTHOLOMEW and F.E. CLARK (Editors), Soil Nitrogen. American Society of Agronomy, Monograph 10, Madison, Wisconsin, pp. 259-284.

Mc LAREN A.D., PACKER L. 1970 - Some aspects of enzyme reactions in heterogeneous systems. Advances in Enzymology, 33, 245-308.

MAKBOUL H.E., OTTOW J.C.G. 1979 - Clay minerals and the Michaelis constant of urease. Soil Biol. Biochem., 11, 683-686.

MAKBOUL H.E., OTTOW J.C.G. 1979 - Michaelis constant (K_m) of acid phosphatase as affected by montmorillonite, illite and kaolinite clay minerals. Microb. Ecol., 5, 207-213.

MAKBOUL H.E., OTTOW J.C.G. 1984 - Kinetic behaviour of alkaline phosphatase desorbed from different clay minerals. Z. Pflanzenernaehr. Bodenk., 147, 497-501.

MORGAN H.W., CORKE C.T. 1976 - Adsorption, desorption and activity of glucose oxidase on selected clay species. Can. J. Microbiol., 22, 684-693.

MORRISSEY B.W., SMITH L.E., STROMBERG R.R., FENSTERMAKER C.A. 1976 - Ellipsometric investigation of the effect of potential on blood protein conformation and adsorbance. J. Colloid Interface Sci., 56, 557-563.

PARFITT R.L. 1978 - Anion adsorption by soils and soil materials. Adv. Agron., 30, 1-50.

PARFITT R.L., GREENLAND D.J. 1970 - The adsorption of polyethylene glycols on clay minerals. Clay Minerals, 8, 305-315.

PFLUG W. 1982 - Effect of clay minerals on the activity of polysaccharide cleaving soil enzymes. Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. 145, 493-502.

RAMIREZ-MARTINEZ J.R., Mc LAREN A.D. 1966 - Some factors influencing the determination of phosphatase activity in native soils and in soils sterilized by irradiation. Enzymologia, 31, 23-38.

SCHMITT A., "Macromolécules aux interfaces, adsorption à l'interface solide-liquide", cours de l'Ecole d'Eté d'Aussois (1983). Les Editions de Physique. A.M. CAZABAT, M.VEYSSIE. 245-288. pp. 463 (juin 1984). Colloïdes et Interfaces.

SCHWERTMANN U., CAMBIER Ph., MURAD E. (à paraître). Properties of goethites of varying crystallinity.

SIGG L., STUMM W. 1981 - The interaction of anions and weak acids with the hydrous goethite (α -FeOOH) surface. *Colloids and Surfaces*, 2, 101-107.

SIMPSON G.H., HUGHES J.D. 1978 - Arylsulphatase-clay interactions. I. Adsorption of arylsulphatase by kaolinite and montmorillonite. *Aust. J. Soil Res.*, 16, 27-33.

SKUJINS J. 1976 - Extracellular enzymes in soil. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 6, 383-421.

SKUJINS J., PUKITE A., Mc LAREN A.D. 1974 - Adsorption and activity of chitinase on kaolinite. *Soil Biol. Biochem.* 6, 179-182.

TALIBUDEEN O. 1955 - Complex formation between montmorillonite clays and amino-acids and proteins. *Trans. Faraday Soc.*, 51, 581-590.

TALIBUDEEN O., GOULDING K.W.T. 1983 - Apparent charge heterogeneity in kaolins in relation to their 2 : 1 phyllosilicate content. *Clays Clay Minerals*, 31, 137-142.

THENG B.K.G. 1979 - Formation and properties of clay-polymer complexes. Elsevier, Amsterdam.