



**HAL**  
open science

**Exploitation de signaux biologiques pour la réalisation  
de capteurs environnementaux. Application à la  
construction d'un biocapteur à micro-algues  
immobilisées et d'une bioélectrode à enzyme immobilisée**

Christophe Védrine

► **To cite this version:**

Christophe Védrine. Exploitation de signaux biologiques pour la réalisation de capteurs environnementaux. Application à la construction d'un biocapteur à micro-algues immobilisées et d'une bioélectrode à enzyme immobilisée. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2003. Français. NNT: . tel-00089092v1

**HAL Id: tel-00089092**

**<https://theses.hal.science/tel-00089092v1>**

Submitted on 9 Aug 2006 (v1), last revised 18 Sep 2014 (v2)

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

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

**THESE**

présentée par

**Christophe VEDRINE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

**DE L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT ETIENNE  
ET DE L'UNIVERSITE JEAN MONNET**

Spécialité : Génie des Procédés

**EXPLOITATION DE SIGNAUX BIOLOGIQUES POUR LA  
REALISATION DE CAPTEURS ENVIRONNEMENTAUX**

**APPLICATION A LA CONSTRUCTION D'UN BIOCAPTEUR A MICRO-ALGUES  
IMMOBILISEES ET D'UNE BIOELECTRODE A ENZYME IMMOBILISEE**

**Soutenue publiquement le 14 février 2003**

JURY :	Monsieur J-M. Chovelon	Rapporteur
	Madame C. Durrieu	
	Monsieur J-M. Kauffmann	Président du jury & Rapporteur
	Monsieur C. Lambert	
	Monsieur J-C. Leclerc	
	Monsieur C. Tran-Minh	



## REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au Centre Sciences des Processus Industriels et Naturels de L'Ecole des Mines de Saint-Etienne, dirigé par Monsieur Michel Cournil.

Je voudrais remercier Monsieur Canh Tran Minh, directeur de cette thèse, pour l'accueil qu'il m'a accordé dans son laboratoire. Mes remerciements vont aussi à Madame Claude Durrieu en tant que codirectrice de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Jean-Claude Leclerc, Professeur à l'Université Jean Monnet de Saint Etienne, pour sa collaboration et pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

J'adresse mes vifs remerciement à Monsieur Claude Lambert, Docteur au CHU de Saint Etienne, pour nos nombreuses discussions, son aide très efficace et chaleureuse et sa participation à ce jury.

Je suis également reconnaissant à Monsieur Jean-Marc Chovelon, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1 et à Monsieur Jean-Michel Kauffmann, Professeur à l'Université libre de Bruxelles, pour avoir accepté d'être rapporteurs et membres de ce jury.

Je remercie également tout le personnel du Département Physico-Chimie des Matériaux Multi-composants pour leur aide et leur disponibilité.

Je suis très reconnaissant envers Anne-Marie, pour son aide, son franc parlé et nos discussions très enrichissantes.

Je tiens à remercier plus particulièrement Silvia, Arnaud, Alexandre pour leur soutien moral, leur aide, leurs nombreux conseils et nos discussions toujours enrichissantes.

Je souhaite à mes camarades étudiants en thèse ou en DEA une bonne continuation, en particulier à Vincent.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Madame Christine Pernelle (CNAM, chaire de génie analytique, Paris), à Monsieur Jacques Mallet et à Madame Sylvie Berrard (laboratoire de génétique moléculaire de la neurotransmission et des processus neurodégénératifs, Paris) pour m'avoir fait partager leur enthousiasme et leur goût pour la science.

*Je dédie ce travail à mes proches sans lesquels, je n'aurais pu aller au bout de cette expérience.*



## SOMMAIRE

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I Rappels bibliographiques : Les Biocapteurs</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1 Les biocapteurs</b> .....	<b>5</b>
I.1.1 Introduction.....	5
I.1.2 Définition.....	5
I.1.2.1 L'élément biologique.....	6
I.1.2.2 Le transducteur.....	7
I.1.3 Immobilisation de l'élément biologique.....	7
<b>I.2 Les biocapteurs environnementaux</b> .....	<b>9</b>
I.2.1 Cahier des charges d'un biocapteur pour une application dans l'environnement.....	9
I.2.2 Les différents types de biocapteurs.....	10
I.2.2.1 Les biocapteurs enzymatiques.....	10
I.2.2.1.1 Systèmes basés sur la conversion du substrat.....	11
I.2.2.1.2 Systèmes fondés sur l'inhibition de l'activité enzymatique.....	15
I.2.2.2 Les biocapteurs immunologiques.....	19
I.2.2.2.1 Principe et classification de la détection immunologique.....	19
I.2.2.2.2 Exemples de biocapteurs immunologiques pour la détection de pesticides.....	20
a) Electrochimique.....	20
b) Piézoélectrique.....	22
c) Optique.....	22
I.2.2.3 Les biocapteurs utilisant des micro-organismes ou des organites.....	25
I.2.2.3.1 Les biocapteurs fondés sur la mesure de l'activité respiratoire des micro-organismes.....	25
a) Biocapteurs mesurant la DBO.....	25
b) Les biocapteurs fondés sur l'inhibition de la chaîne respiratoire.....	26
I.2.2.3.2 Biocapteurs à cellules entières potentiométriques.....	27
I.2.2.3.3 Les biocapteurs utilisant des micro-organismes génétiquement modifiés.....	27
I.2.2.3.4 Les biocapteurs utilisant le photosystème II (PSII) de cellules végétales et de cyanobactéries.....	29
a) Biocapteurs mesurant la production de l'oxygène photosynthétique.....	29
b) Biocapteurs mesurant le flux électronique.....	30
c) Biocapteurs mesurant la fluorescence chlorophyllienne.....	32
<b>I.3 Conclusion</b> .....	<b>34</b>
<b>Chapitre II Les micro-algues</b> .....	<b>36</b>
<b>II.1 Rappels sur les micro-algues</b> .....	<b>37</b>
II.1.1 Utilisation des micro-algues en biotechnologie.....	37
II.1.2 Activité photosynthétique.....	38
II.1.3 Appareil photosynthétique.....	39
II.1.3.1 Les thylakoïdes.....	40
II.1.3.2 Les photosystèmes.....	41
a) L'antenne.....	41
b) Le centre réactionnel.....	42
c) Les deux photosystèmes.....	43
II.1.3.3 Le fonctionnement de la chaîne photosynthétique.....	43
a) Transport non cyclique d'électrons.....	44
b) Transport cyclique d'électrons.....	44
II.1.4 La fluorescence chlorophyllienne.....	45
II.1.4.1 Origine de la fluorescence chlorophyllienne.....	45
II.1.4.2 Cinétique d'induction de la fluorescence chlorophyllienne.....	46
II.1.5 Présentation des différentes micro-algues utilisées.....	49
II.1.6 Croissance et division cellulaire de <i>Chlorella</i> .....	52
II.1.7 Cytométrie de flux.....	53

<b>II.2 Matériel et méthodes</b> .....	<b>54</b>
II.2.1 Cultures des micro-algues .....	54
II.2.1.1 Provenance des souches.....	54
II.2.1.2 Milieu de culture.....	54
II.2.1.3 Mise en culture et maintenance .....	54
II.2.1.4 Appareillage .....	56
II.2.1.5 Suivi de la culture.....	56
a) Mesure des spectres d'absorption des suspensions algales .....	56
b) Dosage de la concentration en chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> des cultures algales.....	56
c) Numération cellulaire.....	57
II.2.2 Cytométrie de flux.....	57
II.2.2.1 Le cytomètre de flux.....	57
a) Le système fluïdique .....	57
b) Le système optique.....	57
II.2.2.2 Mesures réalisées sur deux types de culture algale.....	58
II.2.3 Immobilisation des micro-algues.....	59
<b>II.3 Résultats et discussion</b> .....	<b>61</b>
II.3.1 <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/12 .....	61
II.3.1.1 Spectre d'absorption .....	61
II.3.1.2 Evaluation de la concentration cellulaire d'une culture algale .....	62
II.3.2 Culture de <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/12.....	64
II.3.2.1 Culture en batch.....	64
II.3.2.2 Culture en continu .....	65
II.3.2.3 Caractérisation des cultures en continu de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	67
a) Choix de la durée séparant le début de l'éclairéement et le soutirage.....	67
b) Etude des populations cellulaires en cytométrie de flux .....	67
c) Populations cellulaires et concentration en chlorophylles de cultures en continu 12:12 indépendantes.....	69
II.3.3 Culture en continu de différentes souches algales.....	70
II.3.4 Immobilisation des micro-algues.....	72
<b>II.4 Conclusion</b> .....	<b>74</b>
<b>Chapitre III Biocapteur à cellules entières fondé sur la fluorescence chlorophyllienne.....</b>	<b>75</b>
<b>III.1 Introduction</b> .....	<b>76</b>
<b>III.2 Développement du biocapteur</b> .....	<b>76</b>
III.2.1 Conception du biocapteur.....	76
III.2.1 Signal issu de la membrane algale .....	78
<b>III.3 Matériels et Méthodes</b> .....	<b>79</b>
III.3.1 Réactifs.....	79
III.3.2 Appareillage .....	80
III.3.3 Méthodes.....	81
III.3.3.1 Spectres d'excitation et d'émission de la fluorescence .....	81
III.3.3.2 Expérience type.....	81
III.3.3.3 Caractéristiques du biocapteur .....	82
a) Répétabilité et réversibilité de l'action d'un toxique.....	82
b) Effet de la charge algale.....	82
c) Effet de la température et du pH .....	82
d) Temps de réponse.....	83
e) Durée de vie en fonctionnement et conservation des membranes en stockage .....	83
III.3.3.4 Analyse HPLC d'un échantillon issu d'un pilote de biodégradation.....	83
III.3.3.5 Biocapteur multi-biorécepteur.....	84
a) Temps de réponse.....	84
b) Réponse des différentes micro-algues à l'atrazine et au diuron .....	84
<b>III.4 Résultats et discussion</b> .....	<b>85</b>
III.4.1 Détermination des longueurs d'onde expérimentales pour la mesure de la fluorescence chlorophyllienne.....	85
III.4.1.1 <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/12.....	85

III.4.1.2 Choix du compromis pour la mesure de la fluorescence chlorophyllienne de plusieurs micro-algues utilisées simultanément.....	86
a) Spectres d'émission.....	86
b) Spectres d'excitation.....	87
III.4.2 Optimisation et caractéristiques de la réponse du biocapteur utilisé avec <i>Chlorella vulgaris</i> .....	88
III.4.2.1 Le biocapteur.....	88
III.4.2.1.1 Eléments constituant le biocapteur.....	88
III.4.2.1.2 Fonctionnement du biocapteur.....	90
III.4.2.1.3 Signal expérimental obtenu.....	90
III.4.2.2 Traitement du signal.....	91
III.4.2.3 Stabilisation du signal et influence des concentrations d'atrazine sur la réponse du biocapteur.....	92
a) Stabilisation du signal.....	92
b) Influence des concentrations d'atrazine sur la réponse du biocapteur.....	93
III.4.2.4 Réponse brute du biocapteur à l'atrazine.....	94
III.4.2.5 Répétabilité et reproductibilité des mesures.....	95
a) Répétabilité.....	95
b) Reproductibilité.....	96
III.4.2.6 Effet de la charge algale immobilisée dans la membrane.....	96
a) Effet de la charge sur l'intensité de la fluorescence.....	97
b) Effet de la charge sur la réponse du biocapteur à l'atrazine.....	98
III.4.2.7 Effets de la température et du pH sur la réponse du biocapteur.....	99
a) Effet de la température.....	99
b) Effet du pH.....	100
III.4.2.8 Temps de réponse du biocapteur.....	101
III.4.2.9 Durée de vie en fonctionnement et conservation des membranes en stockage.....	102
a) Evolution de l'intensité de la fluorescence de membranes algales pendant 27 jours.....	102
b) Evolution de la réponse des micro-algues à l'atrazine pendant 27 jours.....	103
c) Conservation des membranes en stockage.....	105
III.4.3 Réponse à différents polluants du biocapteur fondé sur <i>Chlorella vulgaris</i> .....	106
III.4.3.1 Les herbicides anti-PSII.....	106
III.4.3.2 Les métabolites issus de la dégradation de l'atrazine.....	108
III.4.3.3 Les herbicides inhibiteurs anti-PSII et découplants.....	110
III.4.3.4 Composés phénoliques.....	113
III.4.3.5 Les métaux lourds.....	115
III.4.3.6 Les détergents.....	116
III.4.4 Applications du biocapteur.....	117
III.4.4.1 Réponse du biocapteur dans des milieux réels.....	117
III.4.4.2 Etude d'un mélange complexe.....	118
a) Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	118
b) Analyse par le biocapteur.....	120
III.4.5 Utilisation simultanée de plusieurs biorécepteurs dans le biocapteur.....	122
a) Atrazine.....	122
b) Diuron.....	124
c) Temps de réponse.....	125
<b>III.5 Conclusion.....</b>	<b>126</b>
<b><i>Chapitre IV Biocapteur ampérométrique à enzyme immobilisée.....</i></b>	<b><i>128</i></b>
<b>IV.1 Introduction.....</b>	<b>129</b>
IV.1.1 Rappels sur les cinétiques enzymatiques.....	129
IV.1.1.1 Equation de Michaelis-Menten.....	129
IV.1.1.2 Inhibition de la réaction enzymatique.....	131
IV.1.2 Utilisation d'un film de polymère pour l'immobilisation de la PPO.....	132
<b>IV.2 Principe du biocapteur à polyphénol oxydase.....</b>	<b>135</b>
IV.2.1 La polyphénol oxydase.....	135
IV.2.2 Principe du biocapteur.....	138
<b>IV.3 Matériels et méthodes.....</b>	<b>140</b>
IV.3.1 Réactifs pour la fabrication et l'étude du biocapteur.....	140
IV.3.2 Appareillage.....	141

IV.3.3	Elaboration des bioélectrodes .....	141
IV.3.4	Mesures ampérométriques .....	142
a)	Influence de la quantité d'enzyme utilisée lors de son immobilisation dans un film de PEDT.....	142
b)	Optimisation de la durée d'électropolymérisation.....	143
c)	Optimisation de la température et du pH de travail du biocapteur.....	143
d)	Détection d'inhibiteurs de la bioélectrode.....	143
e)	Etude de la conservation de la bioélectrode .....	143
<b>IV.4</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>144</b>
IV.4.1	Optimisation de la réponse de la bioélectrode PEDT/PPO .....	144
IV.4.1.1	Influence de la quantité d'enzyme utilisée lors de son immobilisation dans un film de PEDT .....	144
IV.4.1.2	Optimisation de la durée d'électropolymérisation .....	146
IV.4.1.3	Optimisation de la température et du pH de travail du biocapteur .....	148
IV.4.1.4	Paramètres optimisés pour la préparation des bioélectrodes PEDT/PPO met A et PEDT/PPO met B.....	149
IV.4.1.5	Etude de la reproductibilité des électrodes PEDT/PPO met A et PEDT/PPO met B .....	150
IV.4.1.6	Etude de la conservation d'une électrode PEDT/PPO met A.....	151
IV.4.2	Performances du biocapteur dans les conditions optimisées pour la détection de différents composés .....	151
IV.4.2.1	Détection de composés di-phénoliques.....	151
IV.4.2.2	Détection de composés mono-phénoliques.....	154
IV.4.2.3	Détection de composés inhibiteurs de la PPO.....	156
<b>IV.5</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>159</b>
	<i>Conclusion générale.....</i>	<i>160</i>
	<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>164</i>
	<i>Annexes.....</i>	<i>177</i>
	<i>Publications .....</i>	<i>185</i>

## ABREVIATIONS

2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
2,4,5-T	Acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique
Ab	Anticorps
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP – ATPase	Adénosine triphosphate - adénosine triphosphatase
CE <sub>50</sub>	Concentration efficace du produit qui, introduit dans le milieu à tester, entraîne une hausse de 50% du signal mesuré
Cyt-f, Cyt-b <sub>6</sub>	Cytochromes f, b <sub>6</sub>
DO <sub>685</sub> – DO <sub>760</sub>	Densité optique respectivement à 685 nm et à 760nm
GOD	Glucose oxydase
PPO	Polyphénol oxydase
ECS	Electrode au calomel saturé
EDT	3,4-éthylènedioxythiophène
Fd	Ferrédoxine
Fe-S	Protéine fer-soufre
FNR	Ferrédoxine-NADP réductase
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
PC	Plastocyanine
PEDT	Poly(3,4-éthylènedioxythiophène)
PEDT/PPO	Electrode de carbone vitreux recouverte d'un film de PEDT contenant la PPO
PEG	Polyéthylène glycol
Phe	Phéophytine
PQ	Plastoquinone
PSI, PSII	Photosystème I, photosystème II
Q <sub>A</sub> , Q <sub>B</sub>	Quinones A, B
SDS	Dodécyle sulfate de sodium (nommé également lauryl-sulfate)
TCNQ	7,7,8,8-tétracyanoquinodiméthane

TLS	« Trilaminar Sheaths » : couche externe de la paroi de cellules algales composée de chaînes aliphatiques et de macro-molécules non-hydrolysables
X	Accepteur primaire du photosystème I

Micro-algues utilisées

CV12	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/12
CV11B	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11B
CV Lém	<i>Chlorella vulgaris</i> du Léman SHL 163-1
SC	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (plus connue sous le nom de <i>Selenastrum capricornutum</i> ) CCAP 278/4
SS	<i>Scenedesmus subspicatus</i> CCAP 276/20
CI	<i>Chlamydomonas intermedia</i> SHL 113

## **INTRODUCTION GENERALE**



Le principe de précaution appliqué plus particulièrement au domaine de la santé publique et les risques de contamination des eaux par des polluants d'origine industrielle ou agricole mettent en évidence la nécessité de disposer de systèmes de contrôle en continu et *in situ*.

Les méthodes actuelles couramment employées pour la détection et le dosage d'une espèce chimique ou biochimique utilisent des instruments d'analyse tels que les chromatographes et les spectromètres. Ces appareils sont généralement complexes, coûteux, volumineux et souvent difficiles à mettre en œuvre. De plus, les phases de préparation des échantillons et d'exploitation des résultats augmentent souvent la durée totale de l'analyse.

Le matériel vivant peut être à la base de nouvelles méthodes de dosage et de suivi en continu de polluants. Son utilisation pour le contrôle de la qualité de l'environnement est ancienne, comme par exemple les esclaves goûteurs de l'Antiquité ou les canaris des mineurs de fond. Le couplage d'un élément biologique, assurant la reconnaissance moléculaire, et d'un transducteur, capable de transformer le signal d'origine biologique en un signal électrique quantifiable, constitue le biocapteur. Cette configuration apporte de grandes améliorations, en termes de rapidité et de finesse, à notre perception de la réponse biologique, et permet d'exploiter la sélectivité, la sensibilité et la rapidité de détection du matériel vivant pour un très large éventail de substances cibles.

L'élaboration industrielle de tels capteurs reste limitée. Les travaux de recherche actuels visent à améliorer la sensibilité et la stabilité des éléments biologiques immobilisés afin de rendre ces biocapteurs économiquement viables. Les travaux présentés dans cette étude s'inscrivent dans cette optique. Dans le but de détecter une large gamme de polluants, notre intérêt s'est porté sur deux types de biocapteurs ayant des spectres complémentaires de détection de molécules présentant un danger pour l'environnement : l'un à cellules entières, l'autre fondé sur l'activité catalytique d'une enzyme. Notre objectif est d'optimiser les performances de ces deux biocapteurs afin de résoudre le problème majeur des capteurs utilisant du matériel vivant : l'obtention d'éléments biologiques immobilisés sensibles et stables dans le temps. Pour ce faire, nous cherchons à mettre au point les conditions optimales d'élaboration et de fonctionnement de ces deux biocapteurs. A travers cette mise au point, nous visons aussi à comparer leurs performances respectives, leurs avantages et leurs inconvénients. L'objectif final de cette comparaison est de déterminer les critères d'utilisation de chaque capteur et ainsi de pouvoir choisir d'utiliser l'un ou les deux biocapteurs simultanément, en fonction du milieu, des molécules et des critères de l'analyse projetée.

Après une présentation générale des biocapteurs, l'étude bibliographique du chapitre I expose les différents types de biocapteurs développés dans le domaine de l'environnement.

Le chapitre II est consacré tout d'abord à la description de la physiologie des micro-algues. Un intérêt plus particulier est porté sur l'activité photosynthétique et sur la fluorescence chlorophyllienne de ces micro-organismes, utilisées dans notre biocapteur. *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12, micro-algue très utilisée dans les laboratoires, a été choisie comme algue modèle. Le développement et la mise en œuvre de cultures en continu de cette micro-algue sont ensuite décrits. Les résultats intéressants obtenus avec cette souche algale nous ont permis de mettre au point la culture en continu de 5 autres souches : *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11B, *Chlorella vulgaris* du Léman SHL 163-1, *Pseudokirchneriella subcapitata* (plus connue sous le nom de *Selenastrum capricornutum*) CCAP 278/4, *Scenedesmus subspicatus* CCAP 276/20 et *Chlamydomonas intermedia* SHL 113. Enfin, nous présentons l'immobilisation des cellules algales dans des membranes qui pourront s'intégrer au sein d'un biocapteur.

Le chapitre III est consacré à la mise au point d'un biocapteur algal fondé sur la mesure de la cinétique d'induction lente de la fluorescence chlorophyllienne pour la détection de polluants de milieux aquatiques. La première partie de ce chapitre aborde la conception du biocapteur, puis l'optimisation des conditions opératoires, avec *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12 comme algue modèle, et l'atrazine (un herbicide inhibant la photosynthèse) comme polluant modèle. Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à la réponse du biocapteur à différents types de flux polluants. Nous avons fait varier la nature du polluant étudié (herbicides anti-PSII, agents découplants, métabolites de dégradation de l'atrazine, métaux lourds, détergents), la nature du flux porteur (eaux naturelles) et la complexité de l'échantillon étudié (effluent viticole). Ce chapitre se termine par l'étude de la faisabilité de l'utilisation simultanée de plusieurs micro-algues au sein du même biocapteur. La réponse de ces différents micro-organismes à deux herbicides a été évaluée.

Le chapitre IV concerne la mise au point d'un biocapteur enzymatique pour la détection de composés phénoliques et de deux herbicides. Nous avons étudié plus particulièrement l'immobilisation de la polyphénol oxydase (PPO) dans un film électrogénéré de poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDT).

En conclusion, après avoir rappelé l'essentiel des résultats, nous présentons les développements à envisager pour le passage de ces deux biocapteurs du stade d'outil de laboratoire à celui de prototype.

**CHAPITRE I**  
**RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES : LES BIOCAPTEURS**



## I.1 LES BIOCAPTEURS

### I.1.1 Introduction

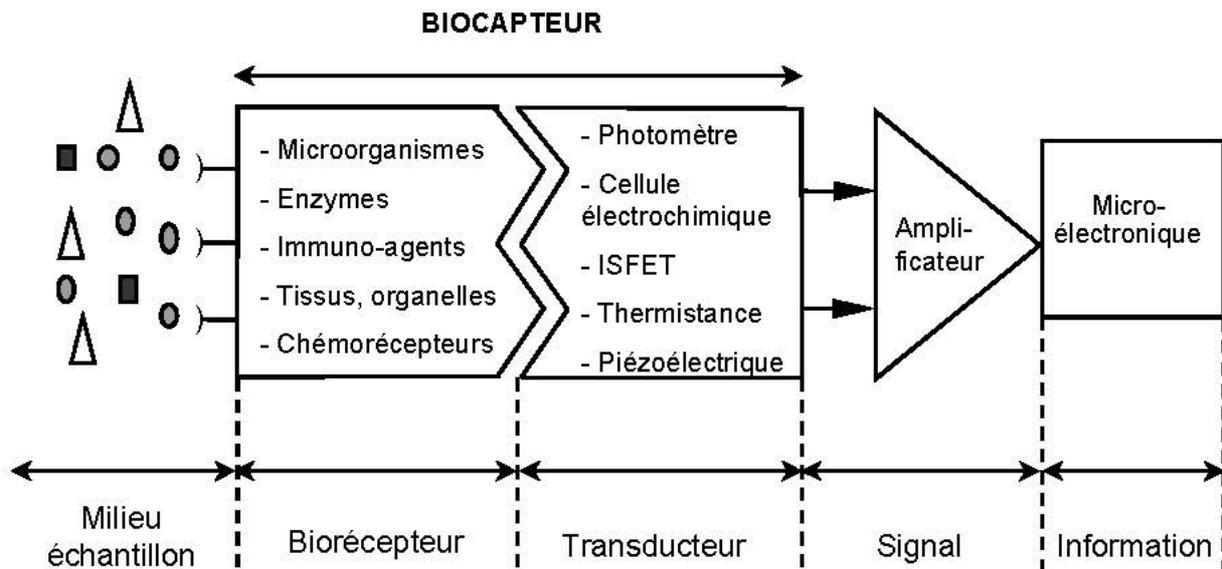
Les premiers biocapteurs, développés au début des années 1960, sont des électrodes enzymatiques permettant le dosage du glucose dans une solution biologique (Clark et Lyons, 1962 ; Updike et Hicks, 1967). Depuis, les biocapteurs ont connu un développement considérable en raison de leurs nombreuses applications potentielles, que ce soit dans les domaines médical, agro-alimentaire ou du contrôle de l'environnement. Dans ce dernier, les contraintes en termes de coût, de suivi en continu, de portabilité ... font des biocapteurs une solution alternative, particulièrement intéressante, aux techniques traditionnelles (chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse ou chromatographie en phase liquide haute performance). Ils peuvent ainsi devenir des outils complémentaires et apporter des avantages, comme la mesure *in situ* et en continu, par rapport aux techniques classiques d'analyses disponibles en laboratoire.

Ce chapitre présente les différents composants d'un biocapteur et les différents principes de fonctionnement de biocapteurs environnementaux.

### I.1.2 Définition

Un biocapteur est un dispositif analytique conçu pour transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable. Il combine un composant biologique appelé « biorécepteur » et un « transducteur » représentant le mode de détection (Tran-Minh, 1991).

La Figure I.1 présente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans un milieu échantillon, toute l'information utile à son évaluation. Cette donnée pourra être traitée, enregistrée, stockée pour une utilisation ultérieure.



*Figure I.1. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur (Tran-Minh, 1991).*

On distingue deux types de biocapteurs (Comtat et Bergel, 1997) :

- « Les biocapteurs d'affinité » sont fondés sur de simples interactions entre les espèces chimiques en solution et le biorecepteur. La molécule à détecter n'est pas détruite.
- « Les biocapteurs métaboliques » reposent sur une réaction spécifique entre l'espèce en solution et le biorecepteur. La molécule recherchée est alors dégradée. La diminution de la concentration d'un réactif ou la formation de produits est alors détectée.

### 1.1.2.1 L'élément biologique

Le biorecepteur est le premier maillon du biocapteur. Il permet d'identifier l'espèce à détecter. En effet, l'élément biologique utilisé possède des sites particulièrement sélectifs. Le biorecepteur assure ainsi la reconnaissance moléculaire de l'espèce à mesurer. En présence du composé à doser, il doit fournir un effet physico-chimique détectable par le transducteur. L'activité du biorecepteur peut se traduire par des processus différents tels que la biocatalyse, le couplage immunologique ou la chémoréception (Tran-Minh, 1991). Cette modification, très localisée, de l'espèce présente dans l'échantillon, se fait généralement par l'intermédiaire d'une enzyme immobilisée qui transforme ce substrat en un produit détectable par le transducteur : c'est le cas des capteurs enzymatiques. L'emploi de micro-organismes, de cellules entières ou d'organites est parfois envisagé. En effet, le maintien du biorecepteur dans

son environnement initial permet d'augmenter sa stabilité, d'éviter des étapes de purification et de réduire le coût de production.

### 1.1.2.2 Le transducteur

Le transducteur est l'élément physique qui sert à exploiter la modification biochimique du substrat par le biorécepteur pour la transformer en signal électrique. Le transducteur assure la conversion d'un type d'énergie en un autre. Le type de transducteur sera choisi en fonction des modifications biochimiques se produisant au niveau du biorécepteur. Cette adéquation entre le transducteur et l'élément biologique permettra d'obtenir un signal sensible, facilement exploitable et avec un minimum de bruit de fond. Plus le bruit de fond sera faible au niveau du transducteur, plus il assurera un seuil de détection bas et améliorera les performances du biocapteur (Tran-Minh, 1991 ; Comtat et Bergel, 1997).

### 1.1.3 Immobilisation de l'élément biologique

L'immobilisation de l'élément biologique au contact du transducteur (par exemple pour une électrode enzymatique) ou placé dans une position optimale vis-à-vis du transducteur (par exemple une fibre optique n'est pas forcément en contact avec le biorécepteur mais elle doit être alignée avec celui-ci), est nécessaire à une bonne détection du signal biochimique issu du biorécepteur. Cette immobilisation permet aussi la stabilisation de l'élément biologique et une utilisation répétée du biocapteur (Tran-Minh, 1991).

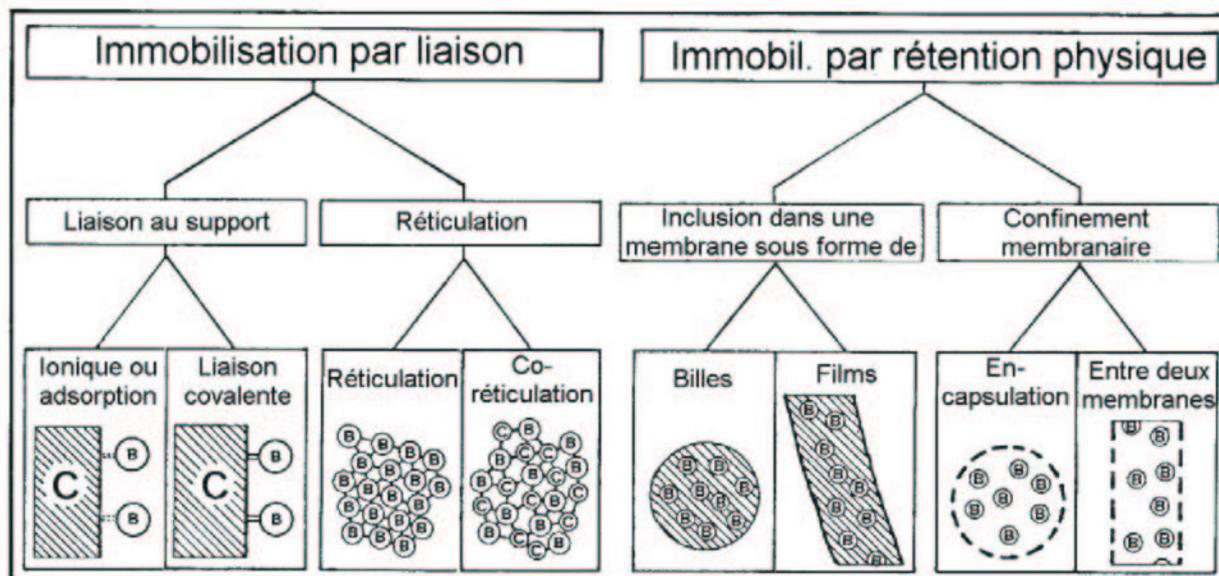
Plusieurs méthodes d'immobilisation permettent de réaliser une association biorécepteur-transducteur n'empêchant pas l'accès du polluant au biorécepteur (Mulchandani et Rogers, 1998b ; Callegari, 1989b ; Hartmeier, 1988).

#### Immobilisation par liaison :

- L'adsorption met en jeu des interactions de faible énergie entre le support et l'élément biologique.
- Le couplage covalent (« covalent-binding ») lie de manière quasiment irréversible le matériel biologique et un support préalablement activé (il existe des membranes commercialisées déjà préactivées).
- La réticulation (« cross linking ») et la co-réticulation mettent en jeu des réactifs bifonctionnels comme le glutaraldéhyde.

Immobilisation par rétention physique : l'élément biologique est piégé du fait de sa taille

- Inclusion dans une matrice : gel (alginate, polyacrylamide...), polymère, support inerte du type filtre en fibres de verre
- Confinement membranaire



**Figure I.2.** Classification des méthodes d'immobilisation (Hartmeier, 1988).  
*b = biocatalyseur, c = support de fixation.*

Chaque technique comporte des avantages et des inconvénients regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau I.1.** Méthodes d'immobilisation de l'élément biologique : avantages et inconvénients (Mulchandani et Rogers, 1998b).

Méthode	Avantages	Inconvénients
Adsorption	Réutilisation possible de la matrice Traitement peu dénaturant, pas de modification de l'élément biologique	Fixation très fragile La moindre variation de pH, de la force ionique, de la température, peut provoquer la désorption
Couplage covalent	Faible contrainte diffusionnelle, liaisons fortes entre l'élément biologique et la matrice, résistance aux changements de pH et de force ionique	Matrice non réutilisable ; toxicité des molécules utilisées
Réticulation, co-réticulation	Utilisation conjointe à la rétention physique pour éviter les relargages de l'élément biologique	Les liaisons covalentes sont majoritairement formées entre les éléments biologiques et les protéines de charge plutôt qu'entre l'élément biologique et la matrice ; toxicité des molécules utilisées
Rétention physique	Traitement doux, pas de modification de l'élément biologique	Contraintes diffusionnelles potentiellement importantes, relargage possible de l'élément biologique

Le choix de la technique d'immobilisation dépend du type d'élément biologique utilisé (enzyme, cellule entière...), du transducteur et de l'environnement dans lequel le biocapteur va fonctionner. Il dépend également des stabilités mécanique et chimique de la matrice et de son coût. Il faut remarquer que la « meilleure » technique universelle n'existe pas (Bowers, 1986).

## I.2 LES BIOCAPTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Nous présenterons d'abord le cahier des charges d'un biocapteur environnemental et nous décrirons ensuite différents types de biocapteurs développés pour une application environnementale.

### ***1.2.1 Cahier des charges d'un biocapteur pour une application dans l'environnement***

Le développement d'un biocapteur, dont le but est une utilisation pour doser des molécules présentant un danger pour l'environnement, répond à un cahier des charges strict. Le coût des analyses, la sensibilité, l'encombrement, la portabilité, la complexité, le temps requis par analyse sont les principaux paramètres à prendre en compte lors de la conception du biocapteur. Le Tableau I.2 présente quelques critères et spécifications requis par les capteurs environnementaux.

**Tableau I.2.** Critères généraux à prendre en compte lors de la conception d'un biocapteur environnemental. (adapté de Rogers et Lin, 1992).

Critères	Spécifications
Coût	1 à 15 € par analyse
Type d'appareillage	Portable Autonome du point de vue énergétique
	utilisation sur site Facilement transportable dans une camionnette Source d'énergie extérieure minimale
Temps de formation du personnel	Après 1 à 2 heures de formation, l'opérateur est capable d'utiliser le biocapteur
Durée de l'expérience	1 à 60 minutes
Préparation de l'échantillon	La plus simple et la plus rapide
Sensibilité	ppm / ppb
Gamme dynamique	Au moins deux ordres de grandeur

### 1.2.2 Les différents types de biocapteurs

Des articles de synthèse font régulièrement le point et la promotion des biocapteurs. Les articles tels que ceux de Marty *et al.* (1995), Paddle (1996), Nistor et Emnéus (1999), Giardi *et al.* (2001), D'Souza (2001) montrent de nombreux exemples de biocapteurs et l'immense champ de recherches possibles.

Il est possible de classer les biocapteurs selon trois principaux groupes (Wollember *et al.*, 1994) :

- les systèmes très spécifiques d'un composé à détecter et à doser.
- les systèmes permettant de doser et de détecter un groupe de molécules (par exemple une famille chimique).
- les systèmes permettant de suivre une toxicité globale car, dans ce cas, le biorécepteur joue le rôle d'un bio-indicateur de toxicité (par exemple les électrodes à cholinestérase).

Ces trois types de biocapteurs ont été développés pour la détection de polluants dans l'environnement.

Nous allons maintenant décrire différents types et principes de détection de molécules susceptibles de nécessiter une surveillance dans l'environnement, ainsi que des exemples dans chaque classe de biocapteurs.

#### 1.2.2.1 Les biocapteurs enzymatiques

Les biocapteurs enzymatiques ont été les premiers étudiés et restent très étudiés encore aujourd'hui. Un nombre important d'enzymes sont capables de convertir un composé (substrat) en consommant (par exemple de l'oxygène), ou en générant d'autres composés (par exemple du peroxyde d'hydrogène). En suivant la quantité de composés consommés ou produits, il est alors possible de doser le composé d'intérêt (substrat de l'enzyme). D'autres composés sont des inhibiteurs de l'activité enzymatique. La mesure de la diminution de celle-ci permet alors de doser le composé inhibiteur.

Nous allons tout d'abord décrire les biocapteurs enzymatiques fondés sur la mesure de la quantité de substrat converti en produit par l'enzyme, puis les biocapteurs fondés sur la mesure de l'inhibition de l'enzyme par le produit à doser.

### I.2.2.1.1 Systèmes basés sur la conversion du substrat

De nombreux biocapteurs ont été développés pour la mesure de composés organiques (composés phénoliques, anilines, amines aromatiques).

Parmi ceux-ci, les biocapteurs fondés sur la tyrosinase ont connu de nombreux développements. Les différents principes de fonctionnement de ce type de biocapteur vont être maintenant décrits. Ils illustrent des stratégies de développements transposables à d'autres enzymes.

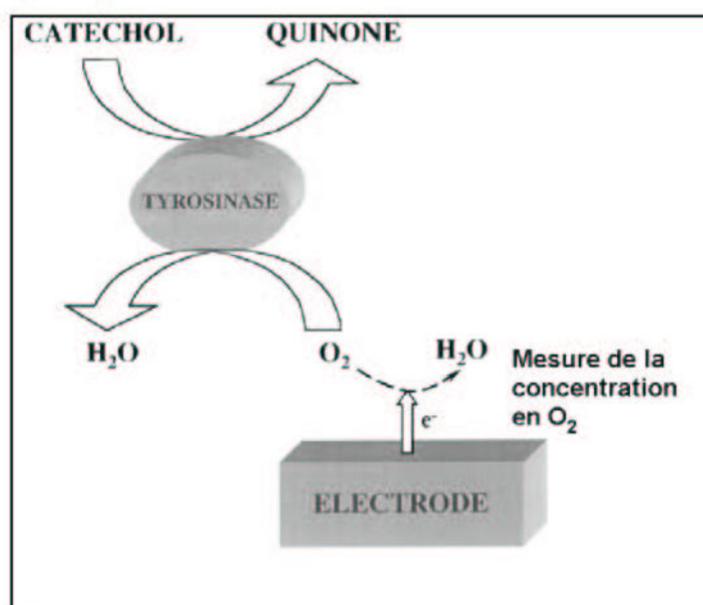
La tyrosinase catalyse la conversion de composés phénoliques en quinone via la réduction d'oxygène moléculaire en eau. Le catéchol a été choisi comme substrat modèle. La réaction d'oxydation du catéchol en ortho-quinone est la suivante :



Les mesures de la quantité d'oxygène consommée (co-substrat) ou de l'ortho-quinone formée (produit formé) lors de cette réaction permettent le dosage de catéchol présent dans la solution échantillon.

#### Mesure de la consommation d'oxygène

Ce premier type de biocapteur à tyrosinase consiste à mesurer l'évolution de la concentration d'oxygène au cours de la réaction enzymatique (Figure I.3). La mesure de la concentration en oxygène peut être effectuée avec une électrode de Clark (Campanella *et al.*, 1992 ; Campanella *et al.*, 1999).



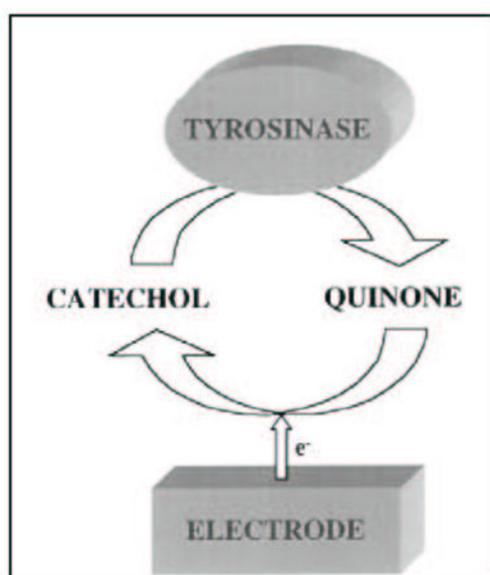
**Figure I.3.** L'oxydation du catéchol en ortho-quinone consomme de l'oxygène. Cette variation de concentration en oxygène est mesurée par une électrode de Clark (Nistor et Ennéus, 1999).

Il est également possible de mesurer la consommation en oxygène avec un capteur optique. Cette stratégie a été utilisée par Papkovsky *et al.* (1993).

Cette méthode de détection nécessite un contrôle de la concentration en oxygène des tampons et des solutions échantillons. Afin de contourner ce problème, des capteurs ont été développés pour détecter directement le produit de la réaction (l'ortho-quinone dans le cas de biocapteurs à tyrosinase). Simkus *et al.* (1996) utilisent les propriétés optiques des produits formés pour les détecter. Une détection électrochimique est également possible.

#### Détection de la quinone formée (par une méthode électrochimique)

L'ortho-quinone est un composé électroactif qui peut être réduit en catéchol à un potentiel de  $-0,2$  V/ECS (Figure I.4). La mesure du courant de réduction permet de doser la quantité d'ortho-quinone produite par la réaction enzymatique et donc de doser le catéchol présent dans l'échantillon.



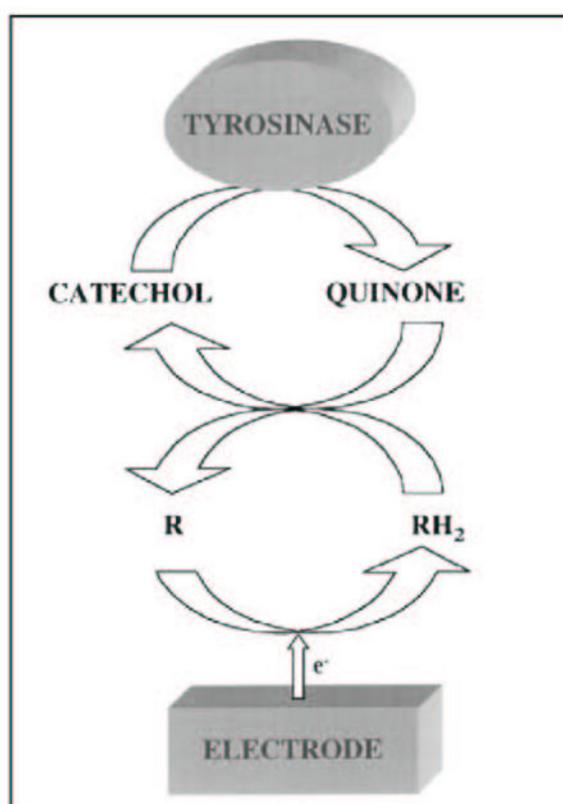
**Figure I.4.** L'ortho-quinone (formée par l'oxydation enzymatique du catéchol) est réduite électrochimiquement en catéchol. Ce courant de réduction est mesuré et permet de doser la quantité d'ortho-quinone enzymatiquement formée.

Cette méthode comporte plusieurs avantages. En effet, la détection électrochimique de l'ortho-quinone permet son recyclage en catéchol, ce qui conduit à une amplification du signal. Les réactions de polymérisation par accumulation de l'ortho-quinone au niveau de l'électrode sont limitées par ce recyclage. A la différence de la mesure de la concentration en oxygène ( $-0,6$  V/ECS), le potentiel de mesure de l'ortho-quinone ( $-0,2$  V/ECS) permet de

réduire le risque d'interférences électrochimiques provenant d'autres composés (Marko-Varga *et al.*, 1995).

Nous avons développé ce type d'électrode enzymatique (Chapitre IV) en immobilisant la tyrosinase dans un film de poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDT).

Une variante de ce type d'électrode consiste à introduire un médiateur redox (symbolisé  $RH_2$ ) afin d'augmenter le taux de transfert des électrons entre la quinone formée et l'électrode (Figure I.5). La quinone est réduite en catéchol en réagissant avec le médiateur qui passe d'un état réduit ( $RH_2$ ) à un état oxydé ( $R$ ). Les médiateurs utilisés sont le ferricyanure, le tétracyanoquinodiméthane (TCNQ) et le méthylphénazonium (Hedenmo *et al.*, 1997).



**Figure I.5.** L'ortho-quinone (formée par l'oxydation enzymatique du catéchol) est réduite en catéchol via l'oxydation du médiateur réduit ( $RH_2$ ) en médiateur oxydé ( $R$ ). La forme  $R$  du médiateur est alors réduite sur l'électrode. Ce courant de réduction est mesuré et permet de doser la quantité d'ortho-quinone enzymatiquement formée.

Les différentes méthodologies utilisées pour le développement de capteurs à tyrosinase toujours plus performants sont généralisables à de nombreux biocapteurs enzymatiques environnementaux. L'utilisation de nouvelles enzymes permet d'élargir les spectres de détection des produits d'intérêt. Le Tableau I.3, sans prétendre être exhaustif, présente différents biocapteurs développés récemment.

**Tableau I.3.** Exemples de biocapteurs enzymatiques (détection directe) applicable à la détection des polluants aquatiques (adapté de Bilitewski et Turner, 2000 ; Nistor et Emméus, 1999).

Polluants [limites de détection citées]	Enzyme immobilisée	Principe de la mesure	Références
Phénol [-] p-Crésol [-] 4-Chlorophénol [-] 4-Méthoxyphénol [-]	Tyrosinase	La tyrosinase immobilisée dans une pâte de carbone avec différents liants catalyse l'ortho-hydroxylation puis l'oxydation des composés phénoliques en ortho-quinones correspondantes. Ces dernières sont réduites sur l'électrode. Le courant de réduction est proportionnel à la quantité de composés phénoliques présents dans l'échantillon.	Wang <i>et al.</i> , 1997
Organonitrile [Benzonitrile : 10 µM]	Nitrilase	La nitrilase immobilisée catalyse l'hydrolyse de l'organonitrile en acide carboxylique et en ammoniac. L'acide carboxylique est réduit sur l'électrode. Le courant de réduction est proportionnel à la quantité d'organonitrile présent dans l'échantillon.	Liu <i>et al.</i> , 1995
Peroxyde d'hydrogène [1 µM]  Peroxyde de 2-Butanone [20 µM]	Peroxydase / 1,1-diméthyl ferrocène	La peroxydase catalyse la réduction des espèces peroxydées en oxydant le 1,1-diméthyl ferrocène (un médiateur redox). Le médiateur oxydé est réduit sur l'électrode. Le courant de réduction est proportionnel à la quantité de l'espèce peroxydée présente dans l'échantillon.	Wang <i>et al.</i> , 1996a
Aldéhydes [Benzaldéhyde : 5 µM]	Aldéhyde déshydrogénase (ADH)	Le NADH, enzymatiquement généré par l'ADH lors de l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques correspondants, est dosé en le réoxydant au niveau de l'électrode couverte d'un film de 3,4-dihydroxybenzaldéhyde. Ce dosage permet de déterminer la quantité d'aldéhyde présente dans l'échantillon.	Pariente <i>et al.</i> , 1995

### I.2.2.1.2 Systèmes fondés sur l'inhibition de l'activité enzymatique

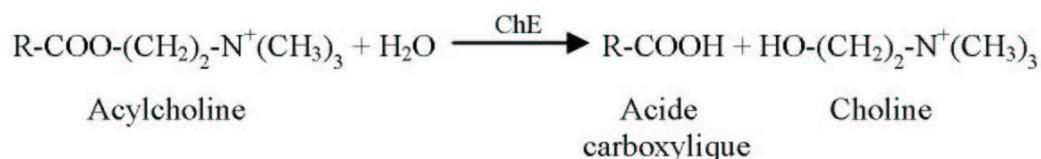
De nombreux polluants sont connus pour leur action inhibitrice de certaines enzymes. Cette propriété a permis la mise au point de nombreux tests de détection. Parmi les inhibiteurs présents dans l'ensemble de l'environnement (eau, air, sol), les pesticides et les métaux lourds représentent un danger important pour la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes. Le Tableau I.4 présente des exemples d'inhibiteurs de quelques enzymes.

**Tableau I.4.** Exemples d'enzymes inhibées par différents inhibiteurs (adapté de Bilitewski et Turner, 2000).

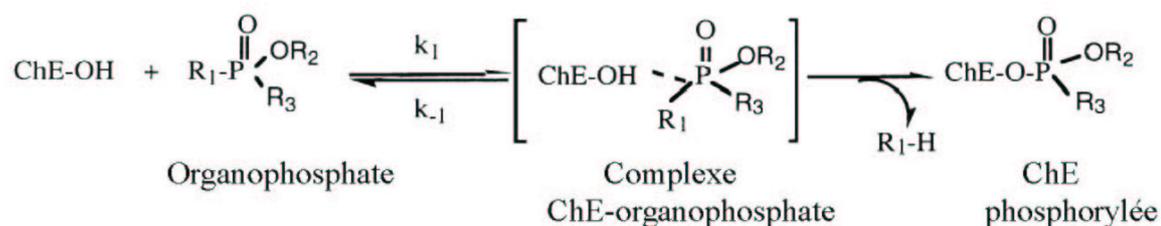
Inhibiteur	Enzyme	
Insecticides : Carbamates et Organophosphorés	Cholinestérase, phosphatase alcaline, phosphatase acide, acylase, lipase, chymotrypsine	
Herbicides : Sulfonylurées et Triazines	Tyrosinase, acétolactate synthase, peroxydase	
Fongicides : Dithiocarbamates	Aldéhyde déshydrogénase, tyrosinase	
Métaux lourds (sels) :	Cadmium	Cholinestérase, glycérol-3-phosphate déshydrogénase, L-lactate déshydrogénase, leucine aminopeptidase, phosphatase alcaline
	Cuivre	L-lactate déshydrogénase, uréase, glucose oxydase, cholinestérase, phosphatase acide
	Mercure	Uréase, L-glycérophosphate oxydase, pyruvate oxydase, L-lactate déshydrogénase, glucose oxydase, invertase, cholinestérase, phosphatase acide

Les cholinestérases et la tyrosinase sont les deux enzymes les plus étudiées et utilisées pour réaliser des biocapteurs fondés sur l'inhibition de l'activité enzymatique. Etant donné que le chapitre IV décrit la mise au point d'une électrode à tyrosinase afin de détecter l'atrazine et le diuron, seul le principe des biocapteurs fondés sur l'inhibition des cholinestérases sera décrit ci-après, à titre d'exemple.

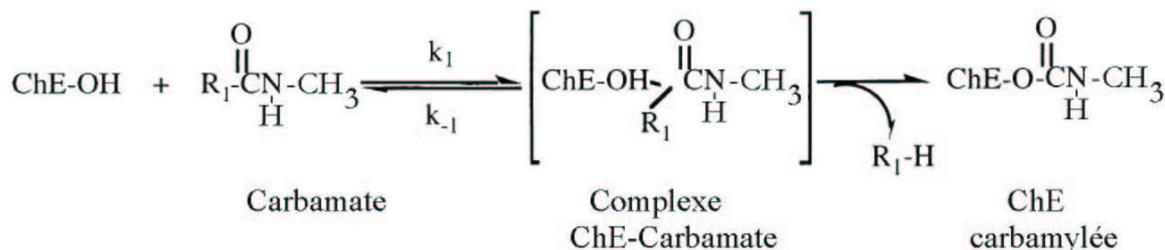
Les cholinestérases catalysent l'hydrolyse de l'acetylcholine en acide carboxylique et en choline. La réaction globale est :



Les pesticides comme les organophosphorés ont une « forme moléculaire » proche de celle du substrat. Ils peuvent se fixer irréversiblement sur le site actif de l'enzyme et, ainsi, l'inhiber (Trojanowicz et Hitchman, 1996). Les mécanismes d'inhibition des cholinestérases par les organophosphorés et les carbamates sont présentés ci-dessous.



*Inhibition de la cholinestérase par les pesticides organophosphorés  
(adapté de Nistor et Emnéus, 1999).*



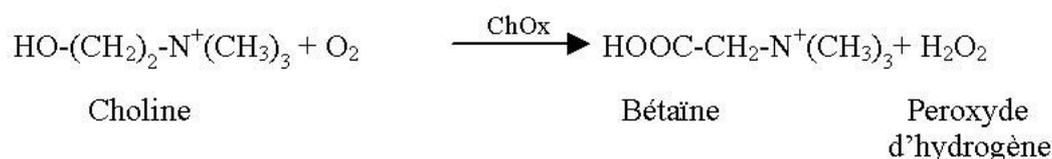
*Inhibition de la cholinestérase par les pesticides carbamates  
(adapté de Nistor et Emnéus, 1999).*

L'utilisation des cholinestérases comme éléments sensibles ne permet pas une détection d'un pesticide en particulier, mais permet d'estimer la quantité de molécules inhibitrices de cette enzyme. Il est alors possible de définir un « indice toxicologique » représentant la concentration de composés à tester qui induit un pourcentage d'inhibition de la cholinestérase équivalent à celui produit par une concentration connue d'un pesticide de référence (Bernabei *et al.*, 1993). En général, le composé de référence est le paraoxon (un puissant inhibiteur des cholinestérases).

L'activité de la cholinestérase peut être suivie par une méthode ampérométrique, potentiométrique, conductimétrique ou optique.

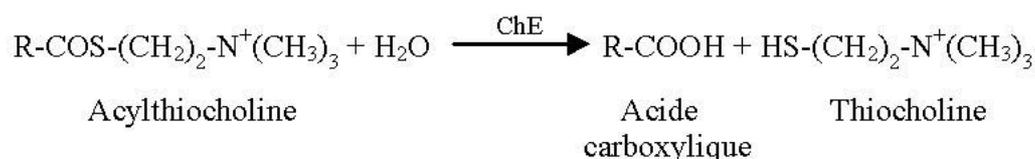
Deux exemples de détection ampérométrique vont être décrits.

- Une acétylcholinestérase et une choline oxydase sont co-immobilisées à la surface d'une électrode (Cremisini *et al.*, 1995). L'acétylcholinestérase catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine en acide acétique et choline. Puis la choline est oxydée, en présence d'oxygène, par la choline oxydase en bétaine et en peroxyde d'hydrogène (réaction ci-dessous). Le peroxyde d'hydrogène est alors électro-réduit en eau sur l'électrode. La mesure du courant de réduction permet de quantifier l'activité catalytique de l'enzyme et de détecter, ainsi, la présence d'un inhibiteur.



*La choline oxydase catalyse l'oxydation de la choline en bétaine et en peroxyde d'hydrogène.*

- Le substrat utilisé pour tester l'activité de la cholinestérase n'est plus de l'acétylcholine. Il est remplacé par de l'acylthiocholine (Marty *et al.*, 1993). L'acylthiocholine est hydrolysée enzymatiquement en acide carboxylique et en thiocholine qui est un produit électroactif (réaction ci-dessous).



*La cholinestérase catalyse l'hydrolyse de l'acylthiocholine en thiocholine et en acide carboxylique.*

La thiocholine formée est oxydée à la surface de l'électrode. Le courant d'oxydation permet de quantifier la quantité de thiocholine formée enzymatiquement et de déterminer, ainsi, l'activité enzymatique de la cholinestérase.

Le Tableau I.5 présente quelques exemples de biocapteurs fondés sur l'inhibition enzymatique pour détecter des molécules d'intérêt.

**Tableau I.5.** Exemples de biocapteurs enzymatiques (détection par inhibition) applicables à la détection des polluants.

Transducteur	Enzyme inhibée	Produits détectés [limites de détection citées]	Référence
Ampérométrique	Cholinestérase	organophosphorés [paraoxon : 0,1 nM], carbamates [carbofuran : 0,01 nM]	Albareda <i>et al.</i> , 2001 Montesinos <i>et al.</i> , 2001
	Tyrosinase	chlorophénols [3,4-dichlorophénol : 0,4 µM], carbamates [chloroisopropylphenylcarbamate : 2 µM ; 3-chloroaniline : 2 µM]	Besombes <i>et al.</i> , 1995a
		organophosphorés [diazinon : 5 µM ; dichlorvos : 75 nM]	Everett et Rechnitz, 1998
		diéthylthiocarbamate [2 µM], 4,6-dinitro- crésol [9 µM], acide benzoïque [5 µM], 2,4-D [7 µM]  atrazine [5 µM]	Wang <i>et al.</i> , 1996b  McArdle et Persaud, 1993
	Peroxydase	thiourée [-], éthylénethiourée [-]	Adeyoju <i>et al.</i> , 1995
	Phosphatase acide	organophosphorés [malathion : 5 nM ; parathion-méthyl : 2 nM ; paraoxon : 5 nM]	Mazzei <i>et al.</i> , 1996
Aldéhyde déshydrogénase	dithiocarbamates [maneb : 5 nM]	Noguer et Marty, 1997	
Conductimétrique	Uréase	métaux lourds [ Hg <sup>2+</sup> : 1µM ; Cu <sup>2+</sup> : 2 µM ; Cd <sup>2+</sup> : 5 µM ; Co <sup>2+</sup> : 10 µM ; Pb <sup>2+</sup> : 20 µM ; Sr <sup>2+</sup> : 100µM]	Zhylyak <i>et al.</i> , 1995
Optique (chimie-luminescence)	Phosphatase alcaline	organophosphorés [paraoxon : 0,2 µM]	Ayyagari <i>et al.</i> , 1995

### 1.2.2.2 Les biocapteurs immunologiques

Les biocapteurs immunologiques combinent la reconnaissance moléculaire des anticorps et un système de transduction physico-chimique approprié. La principale difficulté technique est la détection de la réaction antigène-anticorps. La majorité des biocapteurs développés utilise des marqueurs comme des enzymes, des composés chimiques fluorescents ou des composés électrochimiquement actifs (Marco et Barceló, 1996). Un inconvénient majeur des capteurs immunologiques provient du fait que la reconnaissance antigène-anticorps n'est pas facilement réversible (à la différence de la majorité de biocapteurs enzymatiques). Une étape de régénération du biorécepteur est donc nécessaire pour que le biocapteur immunologique soit à nouveau opérationnel.

#### *1.2.2.2.1 Principe et classification de la détection immunologique*

Les biocapteurs immunologiques et les tests immunologiques (par exemple : ELISA « Enzyme Link Immunosorbent Assay ») utilisent le même principe de base qui est celui de la reconnaissance moléculaire antigène-anticorps. Selon la configuration du test, des antigènes ou des anticorps marqués (fluorochrome, enzyme) sont utilisés. Ces marqueurs permettent l'obtention d'un signal mesurable (émission de fluorescence, variation de densité optique ou de densité de courant...).

On distingue deux types de tests immunologiques (Figure I.6) : compétitifs et non-compétitifs. Les tests non-compétitifs permettent la mesure directe du nombre de sites des anticorps occupés par la molécule à doser. Le signal mesuré est proportionnel à la concentration en analyte présent en solution jusqu'à saturation de l'ensemble des sites des anticorps immobilisés. Malgré les avantages en termes de limites de détection et de fiabilité de ce type de tests, ils ne peuvent pas s'appliquer aux petites molécules (haptènes) car ils nécessitent la présence de plusieurs épitopes sur la molécule à détecter. C'est pour cette raison que le principe le plus utilisé est celui du test compétitif. Ces tests permettent la mesure des sites des anticorps libres. Le signal mesuré est inversement proportionnel à la concentration en analyte présent en solution. Ils se déclinent en deux variantes (Figure I.6 A et B) :

- la variante A : l'anticorps est immobilisé et la molécule à doser est en compétition pour les sites des anticorps avec cette même molécule marquée.



Des capteurs immunologiques pour la détection d'herbicides comme l'atrazine (Romero *et al.*, 1998 ; Parellada *et al.*, 1998) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (Skládal et Kaláb, 1995) ont été développés. Le principe utilisé est un test compétitif (variante A). Le marqueur utilisé est une peroxydase. Les produits de la réaction enzymatique sont réduits au niveau de l'électrode. Le courant de réduction est mesuré et est inversement proportionnel à la concentration en atrazine ou 2,4-D. Keay *et McNeil* (1998) ont utilisé la glucose oxydase (GOD) comme marqueur pour réaliser un capteur à atrazine (test compétitif variante A). En présence de glucose, du peroxyde d'hydrogène est produit par la réaction enzymatique. Il migre vers l'électrode où une peroxydase catalyse sa réduction en eau. Le courant de réduction mesuré est, comme précédemment décrit, inversement proportionnel à la quantité d'atrazine.

Les biocapteurs potentiométriques détectent le changement de potentiel électrique lorsqu'il y a reconnaissance moléculaire de l'anticorps et de l'antigène. Des biocapteurs (format : compétitif variante A) ont été développés pour la détection de l'atrazine (Colapicchioni *et al.*, 1991), du 2,4-D et de l'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T) (Dzantiev et Zherdev, 1996). Dans le cas de la détection de l'atrazine, la reconnaissance antigène-anticorps est réalisée par la mesure de la modification du pH induite par la réaction enzymatique catalysée par la GOD servant de marqueur. La détection du 2,4-D et du 2,4,5-T est réalisée par la mesure de la variation du potentiel de l'électrode engendrée par la réaction enzymatique catalysée par une peroxydase.

Les biocapteurs conductimétriques mesurent des variations de la résistance ou de la conductance du milieu étudié. Sandberg *et al.* (1992) ont développé une électrode pour la détection de l'atrazine, composée d'un polymère conducteur dopé en iode sur lequel est fixé un anticorps anti-atrazine. La détection est fondée sur la compétition (test compétitif variante A) entre l'atrazine à doser et l'atrazine marquée avec une glucose oxydase (atrazine-GOD). Le dosage de l'atrazine-GOD fixée sur l'anticorps immobilisé utilise deux réactions enzymatiques couplées catalysées par la glucose oxydase marqueur de l'atrazine et une lactoperoxydase en solution. En présence de glucose, la cascade réactionnelle provoque l'oxydation de l'ion iodure en  $I_3^-$ , ce qui permet de mesurer une variation de la conductance de la solution étudiée, liée à la concentration en atrazine-GOD fixée sur l'anticorps immobilisé.

### b) Piézoélectrique

Les biocapteurs piézoélectriques permettent de détecter la liaison antigène-anticorps en suivant le changement de la fréquence de résonance caractéristique du cristal. Ainsi Yokoyama *et al.* (1995) et Steegborn et Skládal (1996) ont développé des capteurs à atrazine. Halámek *et al.* (2001) ont mis au point un capteur détectant le 2,4-D.

### c) Optique

La reconnaissance moléculaire antigène-anticorps sur la surface du transducteur se traduit par des changements des propriétés optiques de celui-ci. Les principes de fonctionnement de ces techniques sont décrits dans les articles suivants : Bilitewski et Turner, 2000 ; Brecht et Gauglitz, 1995a.

Nous allons détailler l'exemple RIANA : « River Analyser » (Barzen *et al.*, 2002) en raison de son développement actuel. Ce capteur est fondé sur un test compétitif variante B et utilise la technologie de la réflexion totale. Un faisceau laser se propage dans une lame de verre (transducteur) et génère des ondes évanescentes à la surface de cette lame. Ces ondes peuvent exciter des molécules fluorescentes proches de la surface du transducteur. La fluorescence émise est alors mesurée.

Tout d'abord un anticorps contenant un marqueur fluorescent est incubé avec l'analyte. Ce mélange est alors mis en contact avec le transducteur qui possède l'analyte lié de manière covalente à sa surface (Figure I.7). Les anticorps restant libres vont alors se fixer sur cet analyte lié au transducteur. La proximité du transducteur et du marqueur fluorescent de l'anticorps permet à ce dernier d'être excité et, ainsi, d'émettre en retour une fluorescence. Le signal de fluorescence mesuré est inversement proportionnel à la quantité de produits à doser.

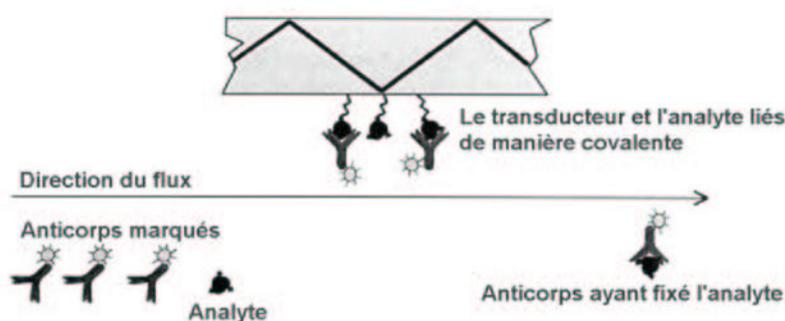


Figure I.7. Principe du biocapteur RIANA (Barzen *et al.*, 2002).

Le principe évoqué pour un couple anticorps/antigène a été réalisé avec trois couples antigène/anticorps. Le biocapteur RIANA est donc en mesure de détecter simultanément trois molécules polluantes. Ce projet, très ambitieux, financé par la Communauté Européenne, est en cours d'extension et porte le nom de AWACSS pour « Automated Water Analyser Computer System » (Willard, 2002). Les améliorations, par rapport à RIANA, porteront sur :

- La détection et le dosage simultanés de 30 molécules polluantes.
- L'amélioration de la conception de la cellule de mesures au niveau de la détection optique et de la micro-circulation des flux.
- L'intégration d'un système informatique de pilotage à distance et de gestion des alarmes pour une utilisation en continu sans opérateur.

Pour conclure cette partie concernant les biocapteurs immunologiques, le Tableau I.6 liste quelques exemples de réalisations.

Tableau I.6. Exemples de biocapteurs immunologiques.

Transducteur	Dispositif	Molécule à doser [limite de détection citée en nM]	Type de test	Elément immobilisé	Marqueur	Référence
Electrochimique	Ampérométrique	2,4-D [0,5]	C, variante A	Ab anti 2,4-D	Peroxydase	Skládal et Kaláb, 1995
		Atrazine [5 et 0,05]	C, variante A	Ab anti-Atrazine	Peroxydase	Parellada <i>et al.</i> , 1998 Romero <i>et al.</i> , 1998
		Atrazine [0,5]	C, variante A	Ab anti-Atrazine	GOD et Peroxydase	Keay et McNeil, 1998
	Potentiométrique	Atrazine [5]	C, variante A	Ab anti 2,4-D	GOD	Colapicchioni <i>et al.</i> , 1991
		2,4-D [180] 2,4,5-T [195]	C, variante A	Ab anti 2,4-D Ab anti 2,4,5-T	Peroxydase	Dzantiev et Zherdev, 1996
Conductimétrique	Atrazine [0,1]	C, variante A	Ab anti atrazine	GOD	Sandberg <i>et al.</i> , 1992	
Piézo-électrique		Atrazine [0,005]	C, variante A	Ab anti atrazine	Peroxydase utilisée en tant que protéine	Yokoyama <i>et al.</i> , 1995
		Atrazine [-]	C, variante B	Atrazine-albumine	-	Steebhorn et Skládal, 1996
		2,4-D [25] 2,4-D [0,05]	NC C, variante B	Ab anti 2,4-D 2,4-D-BSA	- -	Halámek <i>et al.</i> , 2001
Optique	Fibre-optique	Atrazine [0,5]	C, variante A	Ab anti-Atrazine	fluorescéine	Oroszlan <i>et al.</i> , 1993
	RIFS	Atrazine [1]	C, variante B	Atrazine-acide caproïque	-	Brecht <i>et al.</i> , 1995b
	Guide d'onde M-Z	Atrazine [0,5]	C, variante B	Atrazine-albumine	-	Schipper <i>et al.</i> , 1997
	Montage spécifique	2,4-D [5]	C, méthode spécifique	Ab anti 2,4-D	Cy5 (marqueur fluorescent)	Meusel <i>et al.</i> , 1998
	«Resonant mirror»	Atrazine [-]	C, variante B	Atrazine-albumine	-	Skládal <i>et al.</i> , 1999
	TIRF	2,4-D [0,32] Simazine [0,15] Isoproturon [0,53]  Atrazine [0,14] Alachlor [0,33] PCP [15,9]	C, variante B	DN1 ZABA IP5  ACA ANA N7	Cy5.5 (marqueur fluorescent)	Barzen <i>et al.</i> , 2002

NC = non compétitif, C = compétitif, RIFS = « Reflectometric Interference Spectroscopy », M-Z = Mach-Zehnder, TIRF = « Total Internal Reflection Fluorescence », DN1 = Dichloroaniline-acide glutarique, ZABA = Atrazine-4-acide aminobenzoïque, IP5 = 4-isopropylaniline hemiglutarate, ACA = Atrazine-acide caproïque, ANA = 2,6-diéthylaniline-n-acide acétique, N7 = pentachloroaniline-acide glutarique

### 1.2.2.3 Les biocapteurs utilisant des micro-organismes ou des organites

Les micro-organismes utilisés comme biorécepteurs présentent un grand nombre d'avantages. En effet, ils sont capables de métaboliser une grande variété de composés chimiques, ils peuvent s'adapter à un environnement défavorable et développer une capacité à dégrader de nouvelles molécules (D'Souza, 2001). Les micro-organismes paraissent être une alternative à l'utilisation d'enzymes purifiées coûteuses et manquant généralement de stabilité. En effet, la culture de ces organismes vivants est souvent simple et peu onéreuse. De plus, les enzymes produites dans la cellule se trouvent dans un environnement « naturel », favorable à leur stabilité. Ce raisonnement s'applique à toutes les protéines ou complexes protéiques jouant un rôle dans le métabolisme des micro-organismes.

Les biocapteurs à micro-organismes ont, en général, des durées de vie en fonctionnement supérieures aux capteurs enzymatiques. Ils sont moins sensibles aux variations de pH et de température (Arikawa *et al.*, 1998).

Contrairement à l'utilisation d'enzymes ou de complexes protéiques, l'utilisation de cellules entières permet d'obtenir une réponse plus physiologique à un toxique, c'est-à-dire une information sur l'effet d'un stimulus extérieur sur un système vivant (Bousse, 1996). Certes, il est difficile d'extrapoler ce comportement à un organisme supérieur, cependant, le passage d'un biocapteur moléculaire (enzyme, anticorps, récepteurs..) à un biocapteur cellulaire permet d'augmenter sa représentativité toxicologique dans le cadre d'un capteur ayant pour but de détecter des molécules toxiques.

Différents biocapteurs à cellules entières, ayant été développés pour des applications environnementales, vont maintenant être présentés.

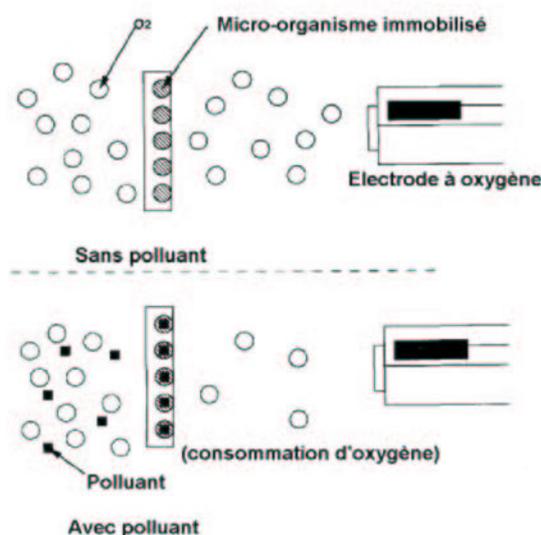
#### 1.2.2.3.1 Les biocapteurs fondés sur la mesure de l'activité respiratoire des micro-organismes

On distingue deux types de biocapteurs fondés sur la mesure de l'activité respiratoire du micro-organisme immobilisé. Tout d'abord, les biocapteurs destinés à mesurer l'ensemble « somme des composés organiques » présents dans l'eau (DBO = demande biochimique en oxygène). L'autre type de biocapteur est fondé sur la mesure de l'inhibition de l'activité respiratoire par un produit toxique.

##### a) Biocapteurs mesurant la DBO

Les micro-organismes sont susceptibles d'utiliser un grand nombre de substrats pour assurer leur survie. Les biocapteurs à DBO utilisent cette propriété. Lorsque le micro-

organisme utilise un substrat, l'activité respiratoire de celui-ci augmente et il s'ensuit une diminution de la quantité d'oxygène dissous. Le transducteur le plus souvent utilisé pour mesurer la diminution d'oxygène dissous est l'électrode à oxygène (Figure I.8). Chee *et al.* (2000) ont utilisé un transducteur optique (fibre optique) pour mesurer la consommation en oxygène de *Pseudomonas putida*.



**Figure I.8.** Principe de fonctionnement d'un biocapteur à DBO.

Il existe des biocapteurs permettant de donner une valeur représentative de la DBO qui ne sont pas fondés sur la mesure de la quantité en oxygène consommée par un micro-organisme immobilisé. Karube *et al.* (1977) furent les premiers à proposer ce type de biocapteur. Il est fondé sur la mesure de la production d'hydrogène et de formate à partir de composés organiques par *Clostridium buttridium* en condition anaérobie. Hyun *et al.* (1993) ont utilisé la bactérie luminescente *Photobacterium phosphorum* : l'assimilation de composés organiques est corrélée à l'émission lumineuse des cellules (une forte concentration en composés organiques se traduit par une importante émission de luminescence).

#### b) Les biocapteurs fondés sur l'inhibition de la chaîne respiratoire

Arikawa *et al.* (1998) ont développé un biocapteur permettant de doser des inhibiteurs de la chaîne respiratoire comme les sels de cyanures. Le biocapteur est tout d'abord incubé dans une solution ne contenant pas l'inhibiteur (configuration de la Figure I.8 sans polluant). La consommation de base du micro-organisme sert de référence. Puis, le biocapteur est mis en présence de l'inhibiteur. Celui-ci interagit et diminue la respiration du micro-organisme. La

concentration en oxygène, mesurée par l'électrode, augmente du fait de cette interaction inhibiteur – micro-organisme.

#### *I.2.2.3.2 Biocapteurs à cellules entières potentiométriques*

Les transducteurs potentiométriques permettent de suivre l'évolution du pH, la production de molécules comme le CO<sub>2</sub>, les ions ammonium, etc. Le métabolisme cellulaire peut donc être suivi par ce type de transducteur.

Simonian *et al.* (1998) et Mulchandani *et al.* (1998a) ont décrit un biocapteur utilisant une électrode à pH et un organisme génétiquement modifié (*E. coli*) pour mesurer des composés organophosphorés. La bactérie a été modifiée génétiquement afin de produire de grandes quantités d'organophosphate hydrolase à la surface des membranes cellulaires. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse d'un grand nombre de substrats. Cette réaction s'accompagne d'un changement de pH qui peut être mesuré avec une électrode à pH.

#### *I.2.2.3.3 Les biocapteurs utilisant des micro-organismes génétiquement modifiés*

L'incorporation d'un gène rapporteur dans un organisme permet de l'utiliser comme biorécepteur. Un gène rapporteur est constitué d'une région promotrice et d'un gène codant une protéine. La région promotrice permet la régulation de l'expression du gène en aval de cette région. Le principe général des gènes rapporteurs est fondé sur l'interaction entre la région promotrice et la molécule à détecter (Ramanathan *et al.*, 1997). Cette molécule induit une modification de l'expression du gène rapporteur, ce qui modifiera un signal mesurable. L'exemple, décrit à la Figure I.9, présente deux phases :

- en absence de toxique, une protéine régulatrice est fixée sur la région promotrice, inhibant fortement la transcription du gène (l'inhibition n'est pas complète). Le niveau de production de la protéine issue du gène rapporteur est à son niveau de base.
- en présence de toxique, la protéine régulatrice et le toxique interagissent. Le promoteur n'est plus inhibé, ce qui entraîne la transcription puis la traduction du gène rapporteur. La concentration intracellulaire en protéine issue du gène rapporteur augmente. La mesure de la quantité ou de la vitesse de production de cette protéine permet de doser le produit toxique.

La protéine produite peut être une enzyme (Figure I.9 A). Par exemple, le gène rapporteur *lux* permet la synthèse de la Luciférase qui catalyse une réaction bioluminescente. Une protéine fluorescente comme la GFP « green fluorescent protein » peut également être produite (Figure I.9 B).

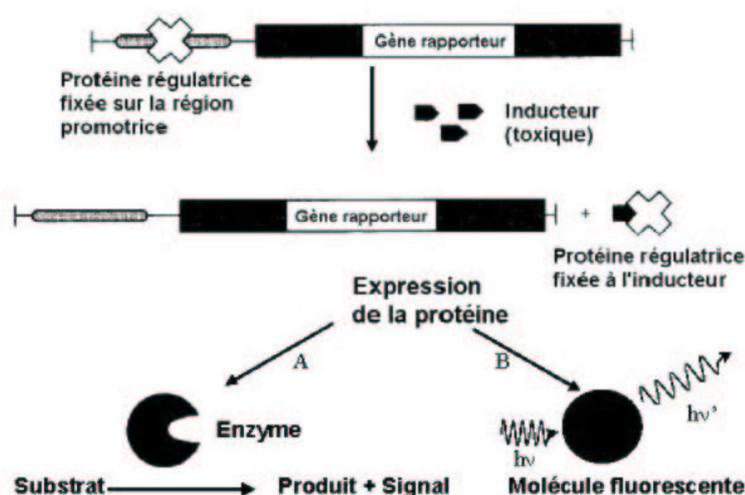


Figure I.9. Principe de la transduction du signal à l'aide d'un gène rapporteur.

Le Tableau I.7 liste quelques exemples de micro-organismes génétiquement modifiés, utilisables pour doser des molécules toxiques qui peuvent être présentes dans l'environnement.

Tableau I.7. Exemples de micro-organismes génétiquement modifiés pour la détection de toxiques.

Composés détectés	Micro-organisme	Signal mesuré en présence de toxiques	Référence
Composés toxiques pour des cellules eucaryotes (diuron, cuivre, mecoprop)	<i>S. cerevisiae</i> modifié pour exprimer la luciférase. L'apport de substrat est nécessaire pour doser l'activité luciférase des cellules	Diminution de la luminescence révélée	Hollis <i>et al.</i> , 2000
Zinc, Cuivre et Cadmium	<i>E. coli</i> et <i>PS. fluorescens</i> modifiés avec les gènes <i>luxCDABE</i> <sup>*</sup>	Diminution de la luminescence	Preston <i>et al.</i> , 2000
Naphtalène et Salicylate	<i>PS. fluorescens</i> contenant une construction génétique <i>nah-luxCDABE</i> <sup>*</sup> ( <i>nah</i> : promoteur sensible au naphtalène et aux métabolites de dégradation comme le salicylate)	Augmentation de la luminescence	Webb <i>et al.</i> , 1997
Métaux, solvants, molécules phytosanitaires	<i>E. coli</i> contenant une construction génétique <i>dnaKp-luxCDABE</i> <sup>*</sup> ou <i>grpE'-luxCDABE</i> <sup>*</sup> ( <i>dnaKp</i> et <i>grpE'</i> sont des promoteurs du système SOS des bactéries qui commande la synthèse de protéines chaperonnes si les cellules sont soumises à un stress)	Augmentation de la luminescence	Van Dyk <i>et al.</i> , 1994
Acide organique halogéné	<i>E. coli</i> contenant une construction génétique <i>DL-DEX - luxCDABE</i> <sup>*</sup> ( <i>DL-DEX</i> : promoteur sensible à l'acide 2-chloropropionique)	Augmentation de la luminescence	Tauber <i>et al.</i> , 2001
Arsenic	<i>E. coli</i> contenant une construction génétique <i>arsR-GFP</i> ( <i>arsR</i> : promoteur sensible à l'arsenic)	Augmentation de la fluorescence	Roberto <i>et al.</i> , 2002

\* La cassette de gènes *luxCDABE* contient l'ensemble des gènes permettant aux cellules de devenir luminescentes. Ces gènes encodent les enzymes : luciférase, réductase des acides gras, synthétase, transférase.

#### I.2.2.3.4 Les biocapteurs utilisant le photosystème II (PSII) de cellules végétales et de cyanobactéries

L'activité photosynthétique de nombreux micro-organismes et de végétaux leur permet de capter l'énergie solaire et de la transformer en énergie chimique. Le photosystème II joue un rôle clé dans cette transformation d'énergie. Ce complexe pigment-protéine permet, grâce à la lumière, le transfert d'électrons de l'eau vers des plastoquinones. Il est la cible d'un nombre important d'herbicides (dits anti-photosystème II) et peut être atteint par les métaux lourds. La mesure de l'activité photosynthétique permet de détecter la présence de molécules inhibant l'appareil photosynthétique (Overnell, 1976).

Le fonctionnement de la chaîne sera détaillé dans le chapitre II. Nous citerons ici uniquement les trois systèmes de mesure de cette activité exploitée par de nombreux biocapteurs. Les paramètres mesurés par ces trois systèmes sont :

			En cas d'inhibition du PSII
<ul style="list-style-type: none"> <li>• l'oxygène produit</li> <li>• le flux d'électrons circulant dans l'appareil photosynthétique</li> <li>• la fluorescence chlorophyllienne</li> </ul>	}	Biocapteurs ampérométriques  Biocapteurs optiques	Diminution du signal  Augmentation du signal

Les différents biocapteurs développés utilisent soit des micro-organismes vivants (micro-algues, cyanobactéries...), soit des organites des cellules végétales (chloroplastes). L'activité photosynthétique des cellules eucaryotes se déroule au niveau des thylakoïdes qui sont des vésicules aplaties se situant dans les chloroplastes.

##### a) Biocapteurs mesurant la production de l'oxygène photosynthétique

Ces biocapteurs permettent de suivre l'activité photosynthétique du biorécepteur en mesurant sa production d'oxygène lorsqu'il est éclairé. L'activité photosynthétique est proportionnelle à la quantité d'oxygène produit. Le système le plus répandu pour mesurer l'oxygène produit lors des réactions photosynthétiques est l'électrode à oxygène (électrode de Clark).

Les cellules entières et les chloroplastes ont été utilisés pour réaliser ce type de capteur. Cependant le manque de stabilité des chloroplastes est un inconvénient majeur à leur

utilisation. Rouillon *et al.* (1994, 1995a) ont réussi à améliorer la stabilité de chloroplastes en les immobilisant dans un film de polyvinyl-alcool.

Le Tableau I.8 présente les différents biocapteurs utilisant une électrode de Clark afin de mesurer l'oxygène produit lors des réactions photosynthétiques.

**Tableau I.8.** Exemples de biocapteurs fondés sur la mesure de la production d'oxygène de l'appareil photosynthétique.

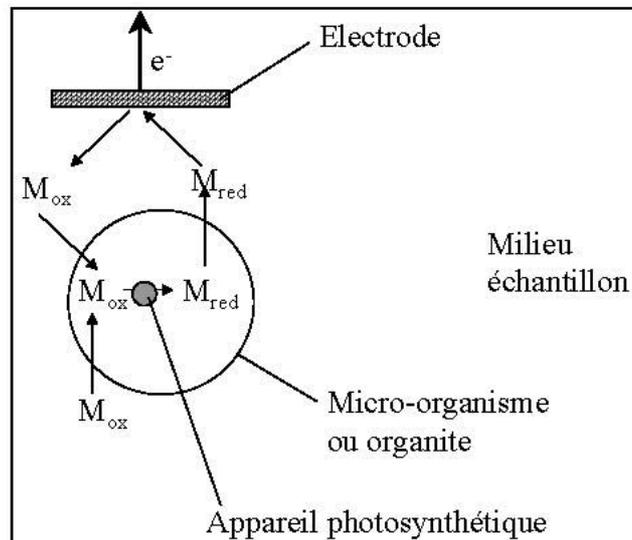
Biorécepteur	Immobilisation	Produits détectés [limites de détection citées]	Référence
PSII isolé de <i>Synechococcus elongatus</i> (cyanobactérie)	Entre une membrane de dialyse et une membrane de téflon	Atrazine [2 nM], Simazine [10 nM], Diuron [0,5 nM], Ioxynil [9 nM], Bromoxynil [200 nM], Dinoseb [60 nM]	Koblizek <i>et al.</i> , 1998
Chloroplastes et thylakoïdes (issus de feuilles d'épinard)	Film de polyvinyl-alcool	Diuron [70 nM] Atrazine [55 nM]	Rouillon <i>et al.</i> , 1994 Rouillon <i>et al.</i> , 1995a
<i>Chlorella vulgaris</i> (micro-algue)	Entre deux membranes d'alumine microporeuses (0,2 µM)	Atrazine [232 nM], Isoproturon [121 nM], Propanil [-]	Pandard et Rawson, 1993a
<i>Spirula subsala</i> (cyanobactérie)	Entre une membrane de dialyse et une membrane de téflon	Atrazine [-], Carbaryl [-], Cu <sup>2+</sup> [-], Hg <sup>2+</sup> [-]	Campanella <i>et al.</i> , 2000

#### b) Biocapteurs mesurant le flux électronique

La mesure directe de photo-courants permet de déterminer l'activité photosynthétique des thylakoïdes (Carpentier *et al.*, 1991). En effet, après l'absorption de la lumière par les thylakoïdes, des espèces réduites sont formées au niveau de la chaîne de transport d'électrons au niveau des photosystèmes I et II. Ces espèces réduites peuvent réduire l'oxygène dissous en ions superoxyde qui se dismutent spontanément en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène peut être dosé en l'oxydant au niveau d'une électrode de platine, à un potentiel de 750 mV vs. ECS. Il est possible d'utiliser des accepteurs d'électrons, comme le méthylviologène, pour augmenter l'intensité mesurée des photo-courants.

La mesure du flux d'électrons circulant dans la chaîne photosynthétique peut, également, être réalisée en utilisant des accepteurs d'électrons et une détection ampérométrique de leur état d'oxydation-réduction. Ces médiateurs redox sont mis en contact

avec les chloroplastes ou les cellules. Lorsque le biorécepteur reçoit de la lumière, les électrons circulant dans l'appareil photosynthétique sont détournés de leur accepteur naturel au profit du médiateur : celui-ci subit une réduction. Le médiateur réduit est alors dosé en le réoxydant sur une électrode ayant un potentiel imposé satisfaisant (Figure I.10).



**Figure I.10.** Principe de la mesure du flux d'électrons circulant dans la chaîne photosynthétique en utilisant un médiateur redox ( $M_{ox}$  = forme oxydée du médiateur,  $M_{red}$  = forme réduite du médiateur).

Le choix des médiateurs est un paramètre important pour l'optimisation de la réponse du biocapteur. Pandard *et al.* (1993b) ont utilisé sept médiateurs redox pour mesurer l'activité photosynthétique de micro-algues (*Chlorella*, *Scenedesmus* et *Selenastrum*). Seuls deux d'entre eux ont permis l'obtention d'un signal.

Le Tableau I.9 expose différents biocapteurs fondés sur la mesure du flux d'électrons circulant dans l'appareil photosynthétique afin d'en quantifier son activité et de détecter différents composés toxiques.

**Tableau I.9.** Exemples de biocapteurs fondés sur la mesure du flux d'électrons dans l'appareil photosynthétique.

Biorécepteur	Immobilisation	Détection du composé	Produits détectés [limites de détection citées]	Référence
Thylakoïdes (feuille d'épinard)	Matrice albumine et glutaraldéhyde	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> produit	Atrazine [1000 nM], Diuron [70 nM] Diuron [-], PbCl <sub>2</sub> [-], CdCl <sub>2</sub> [-]	Purcell <i>et al.</i> , 1990  Carpentier <i>et al.</i> , 1991
	Film de polyvinyl-alcool		Atrazine [200 nM], Diuron [20 nM]	Rouillon <i>et al.</i> , 1995b
<i>Synechococcus</i> (cyanobactérie)	Deux méthodes : *Membrane d'alumine microporeuse *Gel d'alginate	Ferricyanure de potassium réduit	Atrazine [-], Metoxuron [-], Linuron [-], Ioxynil [-]	Rawson <i>et al.</i> , 1989
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Selenastrum capricornutum</i> (micro-algues)	Entre deux membranes d'alumine microporeuses	<i>p</i> -benzoquinone réduit	Atrazine [-], Chlortoluron [-], Isoproturon[-], Propanil [-], Cu <sup>2+</sup> [-], Hg <sup>2+</sup> [-]	Pandard <i>et al.</i> , 1993b
<i>Synechocystis</i> (cyanobactérie)	Film de polyvinyl-alcool	2,5-dichlorobenzoquinone (DCBQ) réduit	Diuron [0,5 µM], HgCl <sub>2</sub> [50 µM]	Avramescu <i>et al.</i> , 1999

### c) Biocapteurs mesurant la fluorescence chlorophyllienne

La fluorescence chlorophyllienne a été très étudiée pour comprendre le fonctionnement de l'appareil photosynthétique. L'origine de cette fluorescence et les informations que peut fournir ce signal sur l'activité photosynthétique seront décrites dans le chapitre II.

Il est possible de corréler la modification de la fluorescence chlorophyllienne et l'activité photosynthétique. Les biocapteurs, en mesurant des modifications du tracé ou de l'intensité du signal de fluorescence, permettent de détecter et de doser des inhibiteurs de l'appareil photosynthétique.

Le Tableau I.10 présente des exemples de dispositifs expérimentaux fondés sur la mesure de la fluorescence chlorophyllienne. Weston et Robinson (1991) et Merz *et al.* (1996) ont développé des systèmes de mesure qui ne correspondent pas à la définition au sens strict des biocapteurs. En effet, l'élément biologique n'est pas réutilisable car il n'est pas

immobilisé sur un transducteur. Cependant, ces travaux sont représentatifs des recherches réalisées pour obtenir des systèmes permettant le dosage de composés toxiques.

Frense *et al.* (1998) et Naessens *et al.* (2000) ont mis au point des biocapteurs à micro-algues pour la détection de pesticides, en particulier, des herbicides anti-photosystème II. Ces biocapteurs se caractérisent par leur simplicité et leurs performances analytiques. Ils permettent de détecter une concentration en atrazine de  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ . La mesure de la fluorescence chlorophyllienne issue du PSII semble être une technique particulièrement bien adaptée à la détection de faibles concentrations en herbicides anti-PSII. Nous reviendrons plus en détail sur ce type de biocapteur dans le chapitre II.

Sanders *et al.* (2001) ont mis au point deux biocapteurs, l'un à cyanobactéries, l'autre à micro-algues, pour le dosage de gaz de combat. Ces résultats démontrent le potentiel important des biocapteurs mesurant l'activité photosynthétique au moyen de la fluorescence chlorophyllienne.

**Tableau I.10.** Dispositifs expérimentaux fondés sur la mesure de la fluorescence chlorophyllienne pour la détection de toxiques.

Biorécepteur	Signal	Milieu	Produits détectés [limites de détection citées]	Référence
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mesure en continu de la fluorescence d'un flux contenant la micro-algue et le polluant.	Liquide	Atrazine [-], Simazine [60 nM]	Weston et Robinson, 1991
Chloroplastes (petits pois)	Mesure de la cinétique rapide d'induction de fluorescence d'une référence (suspension de chloroplastes seuls) et de l'échantillon à doser (suspension de chloroplastes + toxique) en utilisant un appareil miniaturisé.	Liquide	Atrazine [-], Terbutylazine [-], Diuron [< 0,4 nM]	Merz <i>et al.</i> , 1996
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Les algues sont immobilisées sur une membrane en papier, puis recouvertes d'un gel d'alginate. Cette membrane est fixée au bout d'une fibre optique qui transmet le signal à une photodiode.	Liquide	Atrazine [5 nM], En drine [-]	Frense <i>et al.</i> , 1998
<i>Chlorella vulgaris</i>	Les algues sont immobilisées sur une membrane en fibre de verre. Cette membrane est intégrée dans une cellule de mesures. Une fibre optique multibrins transmet le signal à un spectrofluorimètre.	Liquide	Atrazine [5 nM], Simazine [1 nM], Diuron [0,1 nM]	Naessens <i>et al.</i> , 2000
<i>Nostoc commune</i> (cyanobactérie) <i>Chlorella vulgaris</i>	Les micro-organismes (cyanobactéries ou algues) sont immobilisés sur une membrane en fibre de verre. Cette membrane est intégrée dans une cellule permettant de travailler en flux. Une fibre optique transmet le signal à un spectrofluorimètre.	Gazeux	Gaz de combat : Tabun [-], Sarin [-], Gaz Moutarde [-], Dibutyl Sulfide [-]	Sanders <i>et al.</i> , 2001

### I.3 CONCLUSION

De nombreux biocapteurs ont été développés en laboratoire mais ils n'ont pas encore fait l'objet de développements industriels. Chaque type de biocapteur comporte des points forts et des points faibles. La reconnaissance moléculaire anticorps-antigène confère aux immunocapteurs une spécificité et une capacité de détection importantes. Cependant, la difficulté et le coût d'obtention des anticorps sont des obstacles à l'utilisation de cette technologie pour le développement de capteurs environnementaux. Le nombre important d'enzymes commercialement disponibles a contribué au développement des biocapteurs enzymatiques. Le manque de stabilité durable de ces capteurs est souvent un point faible. Les biocapteurs à micro-organismes utilisent un biorécepteur peu onéreux et facile à produire, ils sont plus représentatifs du monde vivant car ils utilisent des cellules entières, et sont généralement plus stables que les enzymes. L'amélioration de leurs performances en termes de limites de détection et de l'interprétation des signaux obtenus est souvent nécessaire.

Les freins au développement des biocapteurs se situent à deux niveaux :

- La législation n'impose pas une surveillance en continu. Ceci est pourtant un des points forts des biocapteurs qui ont été conçus pour réaliser des mesures *in situ* et en continu.
- Les performances (détection, stabilité...) des biocapteurs en conditions réelles (milieu aquatique) sont souvent nettement inférieures à celles obtenues en laboratoire. Il faut alors une délicate et longue mise au point afin de rendre le biocapteur opérationnel en milieu réel complexe.

Ce contexte impose de développer des biocapteurs fiables, robustes, peu onéreux et ayant un large spectre de détection. Pour répondre à ces critères, nous avons développé conjointement deux biocapteurs choisis en raison de leur complémentarité : un biocapteur à cellules entières et un biocapteur enzymatique.

- Le biocapteur à cellules entières

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, les biorécepteurs cellulaires sont plus résistants que les biorécepteurs moléculaires (enzyme, anticorps...). De plus, ils ont en général un spectre de détection plus étendu et donnent une information sur la toxicité du milieu étudié car ils sont fondés sur un élément biologique vivant. L'autonomie de vie et la place centrale des micro-algues au sein des écosystèmes font de ces micro-organismes des bio-indicateurs particulièrement intéressants. Ces avantages laissent supposer qu'il sera possible de développer un biocapteur ayant une sensibilité, une durée de vie et une représentativité

écotoxicologique intéressantes. Ainsi, nous répondrons aux besoins actuels en capteurs permettant la surveillance de l'environnement *in situ* et en continu.

- Le biocapteur enzymatique :

Malgré le coût relativement important d'une enzyme, le développement d'un biocapteur enzymatique se justifie si la méthode d'immobilisation de l'élément biologique permet d'obtenir une détection élevée et une bonne stabilité du biorécepteur. Fabiano *et al.* (2002) ont développé un biocapteur à glucose oxydase immobilisée dans un film de poly(3,4-éthylènedioxythiophène). Nous avons décidé d'utiliser cette méthode d'immobilisation prometteuse pour réaliser une électrode à tyrosinase. L'objectif de cette étude était de valider la méthode d'immobilisation avec une enzyme dont l'activité catalytique est beaucoup plus complexe que celle de la glucose oxydase, et ainsi de réaliser une bioélectrode ayant des propriétés intéressantes (sensibilité, durée de vie). Cette enzyme, commercialement disponible, a été choisie pour son large spectre de détection. En effet, elle permet la détection directe de composés phénoliques (Tableau I.3) et la détection par inhibition de pesticides (Tableau I.5).

Cette détection de toxiques commune à ces deux types de biocapteurs permettra en outre de comparer leurs performances.



**CHAPITRE II**  
**LES MICRO-ALGUES**



## II.1 RAPPELS SUR LES MICRO-ALGUES

Les micro-algues représentent un groupe extrêmement diversifié comptant environ 25000 espèces, dont seule une cinquantaine a été étudiée en détail des points de vue physiologique, biochimique ou de leur composition chimique. *Stricto sensu*, les micro-algues (dinoflagellées, diatomées, algues brunes, rouges et vertes) sont des organismes eucaryotes. Les cyanobactéries, qui étaient assimilées à des micro-algues et qui sont encore souvent dénommées algues bleues, sont des organismes procaryotes (Matsunaga et Takeyama, 1998).

Les algues unicellulaires sont reconnues comme étant des producteurs primaires du milieu aquatique. Elles sont à la base de la plupart des chaînes trophiques en constituant une source d'énergie et de matière organique (Merlin *et al.*, 1995). Elles interviennent dans la régulation des teneurs en oxygène dissous des milieux aquatiques.

### II.1.1 Utilisation des micro-algues en biotechnologie

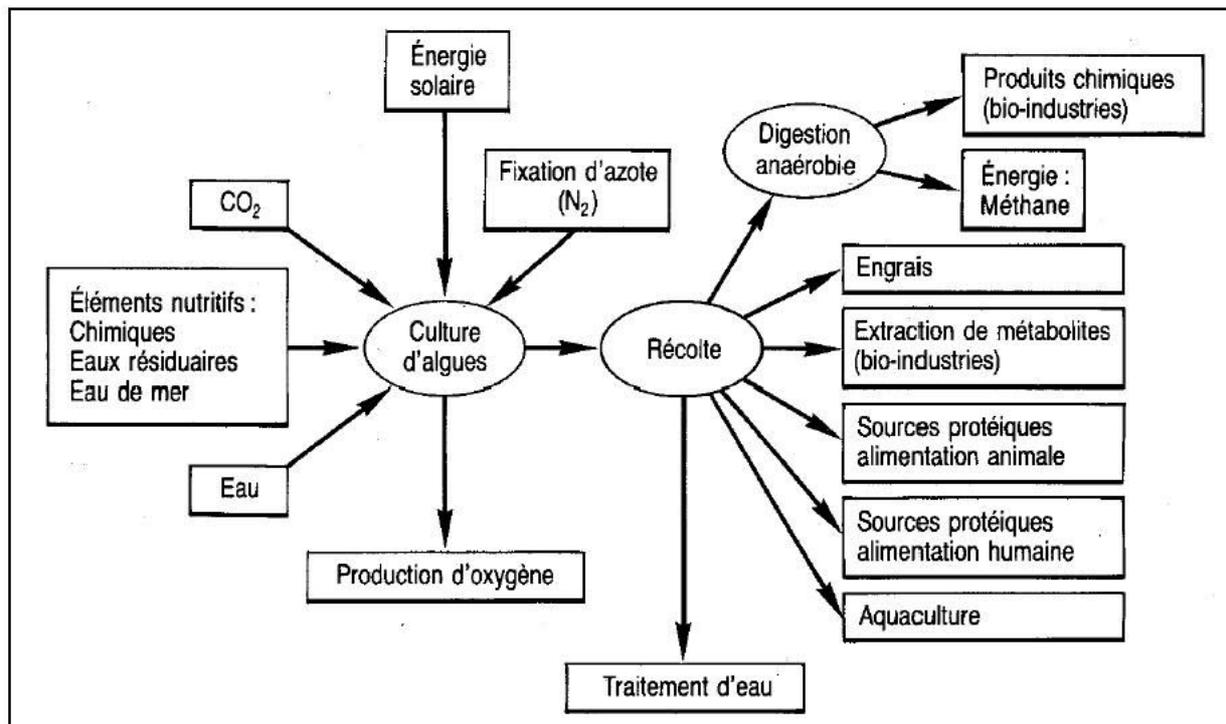


Figure II.1. Les domaines d'application des cultures de micro-algues (d'après Callegari, 1989a).

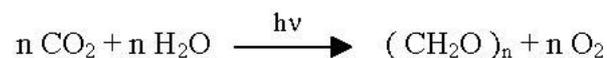
L'exploitation technologique des micro-algues s'étend à différents domaines (Figure II.1) (Callegari, 1989a ; Sasson, 1998) :

- l'extraction de produits de base pour les bio-industries tels que les lipides, le glycérol, les pigments, les hydrocarbures, les polysaccharides.
- la production d'énergie, après extraction des produits économiquement intéressants, la biomasse algale peut être convertie par fermentation en méthane ou en alcool.
- l'extraction ou l'excrétion de composés biologiquement actifs : toxines, inhibiteurs d'enzymes, antibiotiques et antifongiques.
- la production de substituts protéiques, de vitamines et d'acides aminés pour l'alimentation animale ou humaine.
- le traitement des eaux résiduelles urbaines (apport d'oxygène d'origine photosynthétique, biotransformation).

Les micro-algues représentent un potentiel pour des applications biotechnologiques. Elles seront utilisées dans le cadre de ce travail comme des bio-indicateurs de la présence de produits nocifs pour leur métabolisme, en particulier, vis-à-vis de leur appareil photosynthétique.

### II.1.2 Activité photosynthétique

Les cellules ayant une activité photosynthétique captent l'énergie solaire et la transforment en énergie chimique. Lorsqu'elles sont éclairées par de la lumière, le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) est réduit en molécules organiques (essentiellement des glucides). Cette réduction s'accompagne également d'un dégagement d'oxygène (O<sub>2</sub>) dont le volume est égal à celui du CO<sub>2</sub> qui a été réduit. L'équation globale de la réaction de la photosynthèse peut s'écrire :



La photosynthèse se décompose en deux phases (Tableau II.1) :

- La **phase lumineuse**, nécessitant de la lumière, fait intervenir les transporteurs d'électrons de la chaîne photosynthétique pour réduire le NADP<sup>+</sup> en NADPH et des ATPases pour phosphoryler l'ADP en ATP. Elle correspond à la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique.
- Les produits formés (ATP et NADPH) interviennent lors de la **phase sombre** dans les réactions de biosynthèse cellulaire. L'ATP et le NADPH sont utilisés pour la réduction du

CO<sub>2</sub> en molécules organiques. Les réactions chimiques qui se produisent au cours de cette phase ne nécessitent pas de lumière. La phase sombre correspond au stockage de l'énergie.

**Tableau II.1.** Equations générales de la photosynthèse.

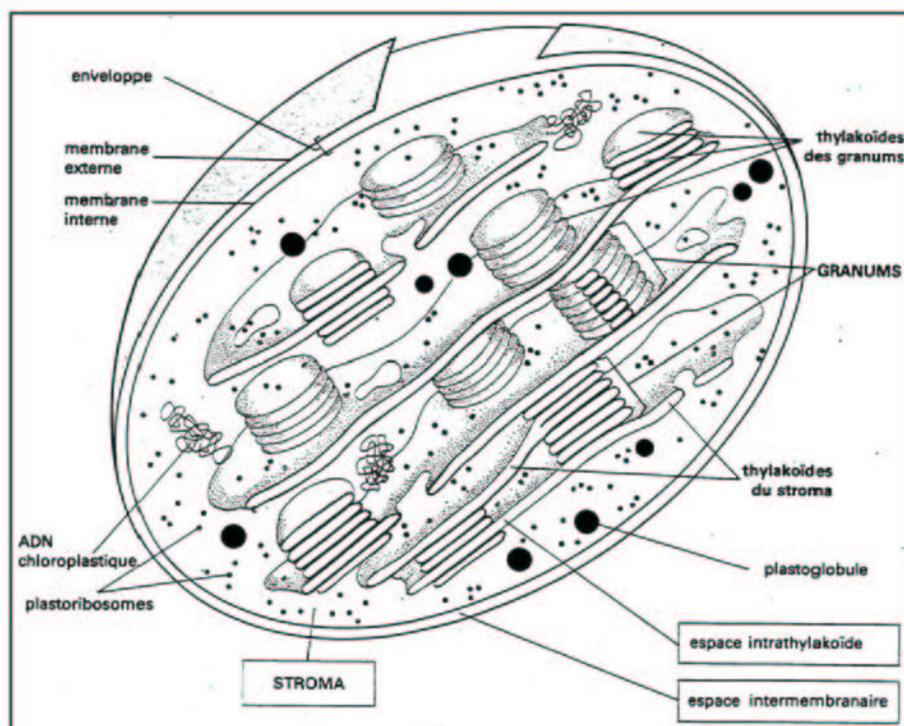
<b>Phase lumineuse de la photosynthèse</b>	
oxydation de l'eau	$2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$
réduction du NADP <sup>+</sup>	$2 \text{NADP}^+ + 2 \text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2 \text{NADPH}$
<b>BILAN</b>	$2 \text{NADP}^+ + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{NADPH} + 2 \text{H}^+$
Photophosphorylation	$\text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$
<b>Phase obscure de la photosynthèse</b>	
oxydation du NADPH	$2 \text{NADPH} + 2 \text{H}^+ + \text{CO}_2 \rightarrow (\text{CH}_2\text{O}) + 2 \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$
consommation d'ATP	$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$

Pi = phosphate inorganique

### II.1.3 Appareil photosynthétique

Chez les procaryotes photosynthétiques, les composantes moléculaires de l'appareil photosynthétique se situent dans des thylakoïdes.

L'appareil photosynthétique des cellules eucaryotes, que nous allons maintenant détailler, est localisé dans les chloroplastes (Figure II.2).



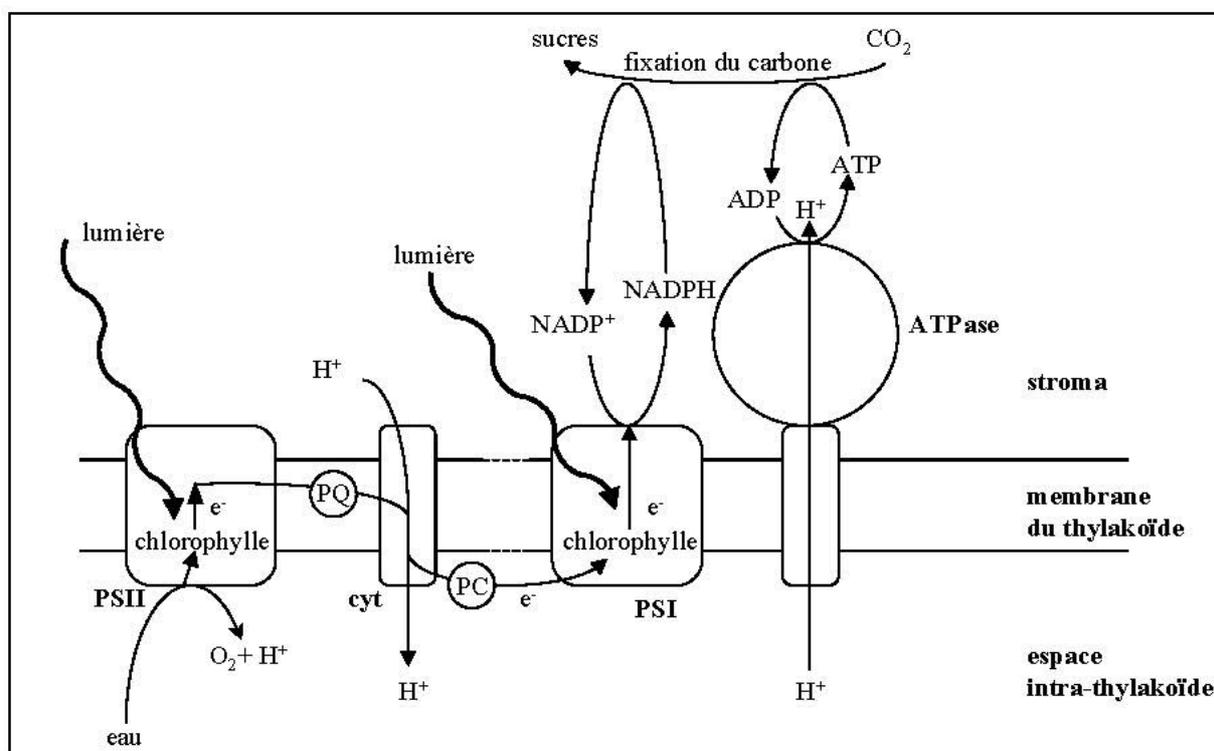
**Figure II.2.** Structure d'un chloroplaste de cellules de végétaux supérieurs (Berkaloff et al., 1981).

Ces organites photosynthétiques contiennent trois membranes distinctes (la membrane externe, la membrane interne et la membrane du thylakoïde) qui délimitent trois compartiments internes séparés (l'espace intermembranaire, le stroma et l'espace intra-thylakoïde). Le stroma est un gel très riche en protéines dont la plupart sont des enzymes. Il renferme des chaînes d'ADN chloroplastiques, des ribosomes, des plastoglobules (inclusions lipidiques riches en plastoquinones) et de l'amidon. C'est dans cet espace que se déroule la phase sombre de la photosynthèse.

Les thylakoïdes qui s'étendent à travers tout le stroma sont dénommés : *thylakoïdes du stroma*. Les thylakoïdes d'un granum sont interconnectés et forment un empilement spiralé. Chez les algues vertes (Chlorophycées), les thylakoïdes forment souvent des « piles » aux contours plus irréguliers que chez les végétaux supérieurs (Berkaloff *et al.*, 1981). La phase lumineuse de la photosynthèse se déroule dans les thylakoïdes.

### II.1.3.1 Les thylakoïdes

Les thylakoïdes jouent un rôle clé dans la photosynthèse. Le schéma ci-dessous représente une vision générale de la photosynthèse au cœur de laquelle se situent les thylakoïdes.



**Figure II.3.** Représentation schématique des réactions se déroulant lors de la photosynthèse au niveau des thylakoïdes. PSI, PSII : photosystèmes I, II ; PQ : plastoquinones ; PC : plastocyanine ; cyt : cytochrome (adapté de Redding et Peltier, 1998).

La membrane des thylakoïdes est une bicouche de lipides amphiphiles à laquelle sont associées des protéines. Celles-ci peuvent être classées en trois groupes :

➤ ATPases

Les ATPases sont des complexes protéiques qui comportent une partie catalytique hydrosoluble et une partie hydrophobe intégrée aux lipides membranaires qui constitue un canal à protons. Elles catalysent la formation d'ATP grâce au gradient de protons générés par le fonctionnement de la chaîne photosynthétique : la photophosphorylation.

➤ complexes chlorophylle-protéines (contenant également des caroténoïdes)

➤ constituants de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons

Ces deux derniers constituants forment la chaîne photosynthétique dont le fonctionnement va être maintenant détaillé.

### II.1.3.2 Les photosystèmes

Les complexes multiprotéiques appelés photosystèmes captent l'énergie lumineuse et la transfèrent à la chaîne photosynthétique de transport d'électrons. Ils sont composés d'un centre réactionnel et d'une antenne (Figure II.4).

#### a) L'antenne

L'antenne collecte l'énergie lumineuse. Elle est constituée d'un amas de plusieurs centaines de molécules de pigments fixées sur des protéines de la membrane du thylakoïde. Chez les Chlorophycées, on trouve deux types de pigments : les chlorophylles et les caroténoïdes.

Les chlorophylles sont des complexes porphyrine-magnésium. Les algues vertes comportent deux types de chlorophylles qui diffèrent l'une de l'autre par un groupement chimique (position 3 sur le noyau de la porphyrine : groupe méthyle pour la chlorophylle *a*, groupe formyle pour la chlorophylle *b*).

Les caroténoïdes regroupent les carotènes et les xanthophylles. Ces pigments sont liposolubles. Les carotènes, dont le plus abondant est le  $\beta$ -carotène, sont de longues molécules hydrophobes formées d'unités isoprène dont les extrémités sont cyclisées. Les xanthophylles sont des dérivés oxygénés des carotènes.

Les chlorophylles et les caroténoïdes absorbent l'énergie lumineuse grâce à leurs doubles liaisons conjuguées, les spectres d'absorption de chacun de ces pigments étant caractéristiques.

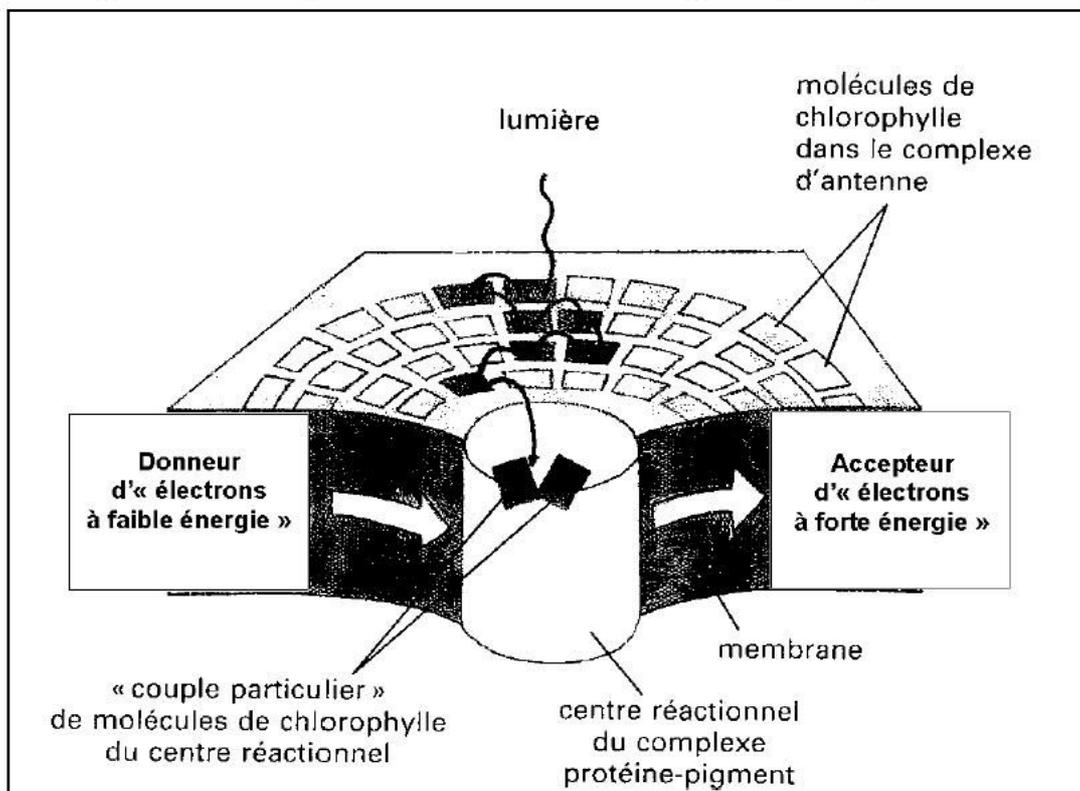
L'énergie lumineuse captée est transférée de pigment en pigment jusqu'au centre réactionnel. Ce transfert se déroule dans le sens suivant :

caroténoïdes → chlorophylle *b* → chlorophylle *a* → centre réactionnel  
(chlorophylles pièges)

*b) Le centre réactionnel*

Un centre réactionnel est formé de molécules de chlorophylle *a* entourées d'un donneur et d'un accepteur primaire d'électrons. Ces molécules de chlorophylle *a* sont appelées *chlorophylles pièges*. L'antenne collecte l'énergie lumineuse et la transfère aux molécules de chlorophylles pièges, ces molécules sont alors oxydées par perte d'électrons, eux-mêmes transférés à un accepteur primaire qui est ainsi réduit. Le retour à l'état réduit des molécules de chlorophylle *a* se fait grâce à l'oxydation d'un donneur primaire d'électrons.

La figure suivante représente de manière schématique un photosystème.



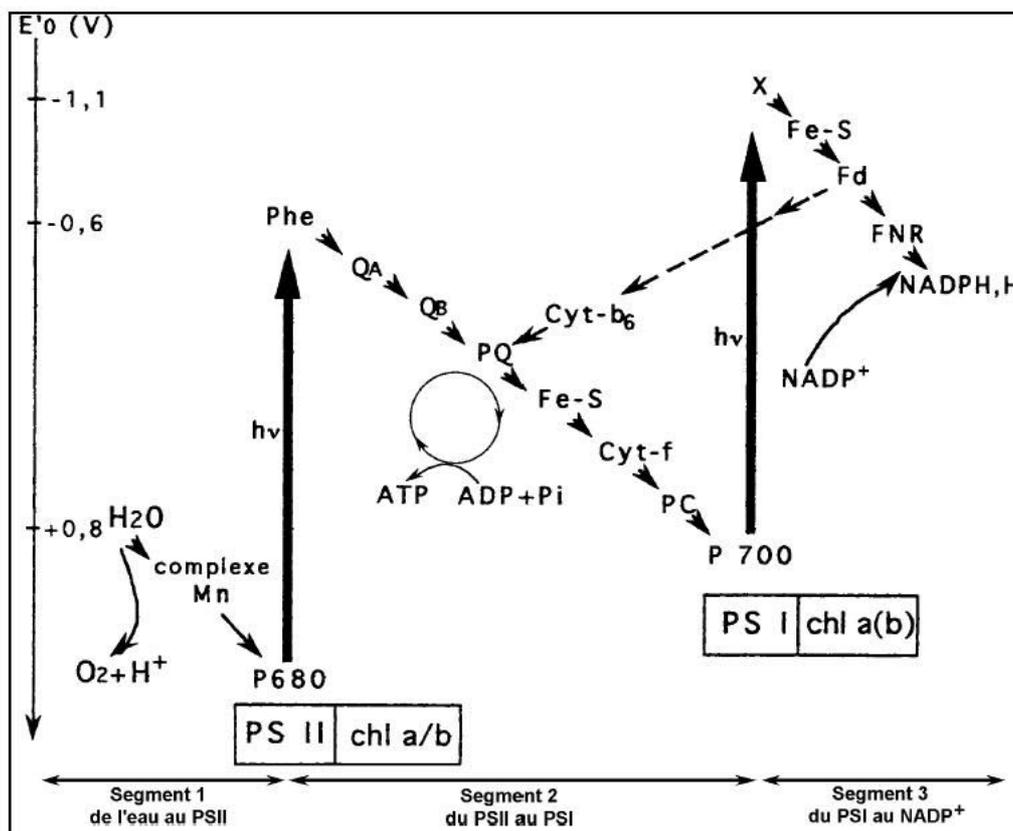
**Figure II.4.** Un photosystème est composé d'un centre réactionnel et d'une antenne (adapté d'Alberts et al., 1995).

### c) Les deux photosystèmes

On distingue deux photosystèmes nommés photosystème I (PSI) et photosystème II (PSII). L'antenne du PSII contient plus de chlorophylle *b* et de caroténoïdes que celle du photosystème I. De plus, les molécules de chlorophylle *a* des deux antennes, chimiquement identiques, n'ont pas les mêmes propriétés d'absorption de la lumière dans la partie rouge du spectre. La différence de spectre d'absorption tient à la nature des lipides et des protéines membranaires auxquels sont associées les molécules de chlorophylle *a* de l'antenne (Govindjee et Satoh, 1986).

#### II.1.3.3 Le fonctionnement de la chaîne photosynthétique

La chaîne photosynthétique peut être partagée en trois segments : le premier segment transporte les électrons de l'eau au PSII, le second du PSII au PSI, enfin, le troisième les transporte du PSI au NADP<sup>+</sup> (Figure II.5).



**Figure II.5.** Le flux d'électrons durant la photosynthèse (adapté de Prescott et al., 1995). PSI, PSII : photosystèmes I, II ; chl : chlorophylle ; P680, P700 : chlorophylles pièges des centres réactionnels du PSII et PSI ; Phe : phéophytine ; Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub> : quinones A, B ; PQ : plastoquinones ; Cyt-f, Cyt-b<sub>6</sub> : cytochromes f, b<sub>6</sub> ; Fe-S : protéines fer-soufre ; PC : plastocyanine ; X : accepteur primaire du photosystème I ; Fd : ferrédoxine ; FNR : ferrédoxine-NADP réductase.

---> transport cyclique d'électrons ; —> transport non cyclique d'électrons.

### *a) Transport non cyclique d'électrons*

#### *Segment 1*

Les électrons, générés lors de l'oxydation de l'eau, sont transportés au PSII par des intermédiaires comportant du manganèse.

#### *Segment 2*

La chaîne est composée de trois complexes protéiques : PSII, cytochrome *b<sub>6</sub>-f* (regroupant le cytochrome *b<sub>6</sub>*, une protéine fer-soufre, le cytochrome *f*), PSI.

Les chlorophylles pièges du PSII ayant absorbé des photons sont dans un état excité instable. Les électrons des molécules excitées sont alors transférés à un accepteur primaire (une phéophytine), puis aux quinones  $Q_A$  et  $Q_B$  (la phéophytine,  $Q_A$ ,  $Q_B$ , sont liées aux protéines D1 et D2 au sein du PSII). Ils sont ensuite transportés jusqu'à la chlorophylle piège du PSI par une succession de transporteurs (Figure II.5). Les plastoquinones (PQ), libres dans la phase lipidique de la membrane du thylakoïde, assurent le transport des électrons du PSII vers les cytochromes *b<sub>6</sub>-f*. Les plastocyanines (PC) permettent le transfert des électrons entre le cytochrome *b<sub>6</sub>-f* et le PSI.

Les herbicides anti-photosystème II inhibent le PSII en entrant en compétition avec le site de fixation de la quinone  $Q_B$  (situé au niveau de la protéine D1). Lorsque l'herbicide se fixe sur le PSII à la place de  $Q_B$ , le transport d'électrons est interrompu et l'ensemble de la chaîne de transport d'électrons se trouve bloqué (Oettmeier, 1999).

#### *Segment 3*

Ce troisième segment de la chaîne permet la réduction du  $NADP^+$  en NADPH.

Les chlorophylles pièges du PSI ayant absorbé des photons sont dans un état excité instable. Les électrons des molécules excitées sont alors transférés à un accepteur primaire (X), puis par une succession de transporteurs (protéines fer-soufre) jusqu'au  $NADP^+$  (Figure II.5).

### *b) Transport cyclique d'électrons*

Au niveau du thylakoïde existe un second processus de transport d'électrons mettant en jeu le photosystème I uniquement. Après être passé des chlorophylles pièges du PSI à l'accepteur primaire X, puis à la ferrédoxine, l'électron, au lieu d'être transporté au  $NADP^+$ , est transféré au cytochrome *b<sub>6</sub>*. L'électron revient au PSI en empruntant une partie du segment de la chaîne photosynthétique comprise entre les deux photosystèmes. L'énergie libérée au

cours des réactions d'oxydo-réduction est en partie récupérée pour la phosphorylation d'ADP en ATP.

### II.1.4 La fluorescence chlorophyllienne

#### II.1.4.1 Origine de la fluorescence chlorophyllienne

A température ambiante, la fluorescence émise par les micro-algues provient de manière prépondérante des molécules de chlorophylle *a* du photosystème II (Krause et Weis, 1991).

L'énergie lumineuse captée par les antennes collectrices est transférée de pigments en pigments par résonance jusqu'aux chlorophylles *a* du centre réactionnel (Rabinowitch et Govindjee, 1969). Celui-ci est alors dans un état excité, très instable. Les molécules peuvent retourner à l'état stable en empruntant différentes voies de désexcitation (Figure II.6) :

- émission de chaleur (perte thermique) (1)
  - émission de lumière phosphorescente (2)
  - émission de lumière fluorescente (3)
  - transfert successif d'électrons à la chaîne des transporteurs d'électrons (4)
- } Photoluminescence

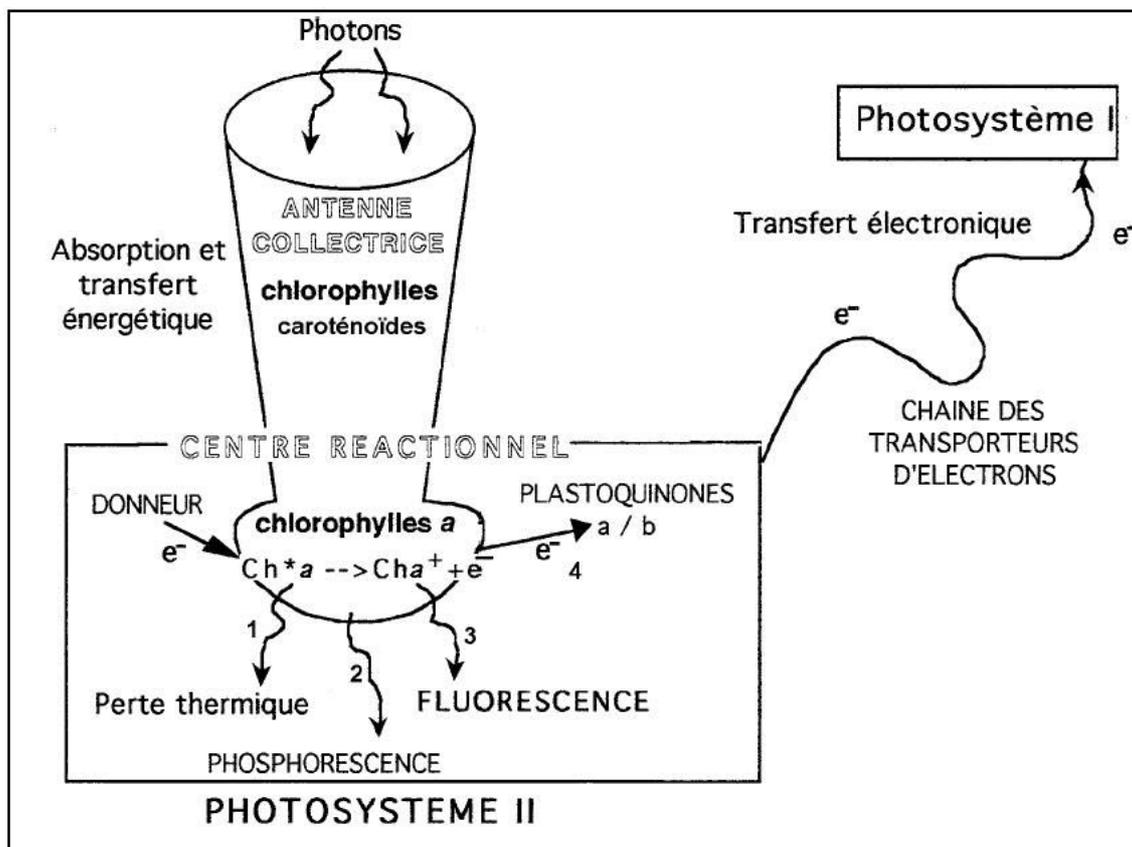


Figure II.6. Voies de désexcitation des molécules de chlorophylle *a* (adapté de Naessens, 1998).

La photoluminescence est une émission lumineuse provenant d'atomes et de molécules excités au préalable par absorption d'un rayonnement électromagnétique. En général, les radiations excitatrices ont une longueur d'onde inférieure à celle du rayonnement émis.

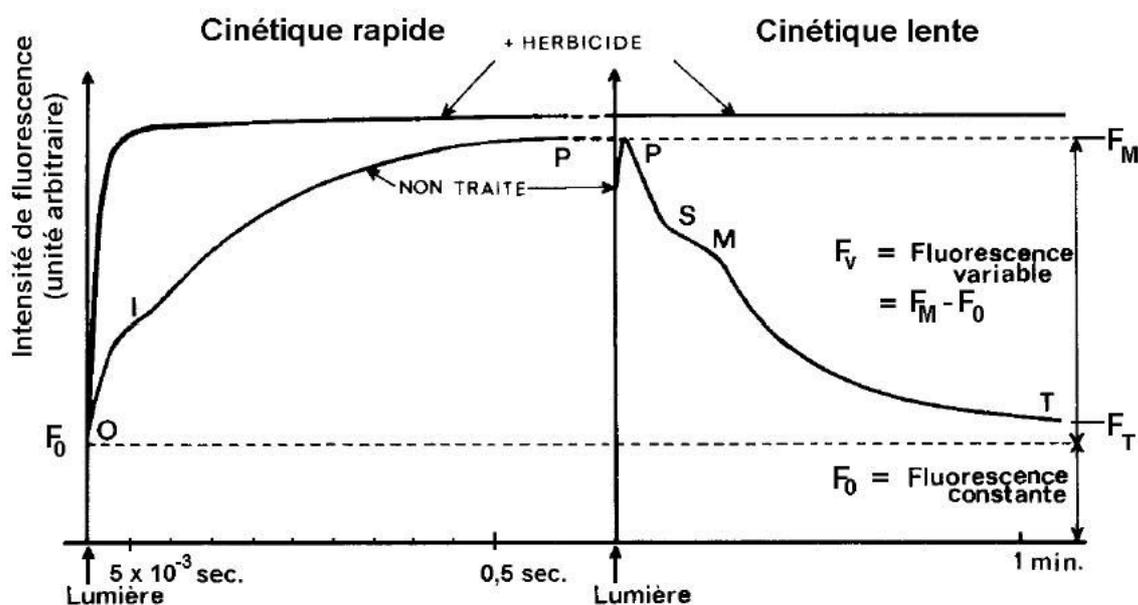
La photoluminescence peut être une fluorescence ou une phosphorescence :

- la fluorescence est une luminescence s'arrêtant lorsque l'excitation cesse (temps de persistance inférieur à  $10^{-8}$ s).
- la phosphorescence est une luminescence persistant un certain temps après l'arrêt de l'excitation (temps de persistance pouvant aller d'une fraction de seconde à plusieurs jours).

L'émission fluorescente dans des cellules algales présente un maximum d'intensité vers 685 nm (attribuable au PSII) et un épaulement vers 740 nm (attribuable au PSI) (Rabinowitch et Govindjee, 1969).

#### II.1.4.2 Cinétique d'induction de la fluorescence chlorophyllienne

Kautsky et Hirsch ont observé et décrit en 1931 une cinétique d'induction de la fluorescence de micro-algues préalablement maintenues à l'obscurité. Cette cinétique comporte différentes phases caractéristiques appelées O, I, P, S, M, T (Figure II.7).



**Figure II.7.** Cinétique d'induction de la fluorescence de feuilles de blé à 685 nm après une période obscure. Herbicide : chlortoluron à  $10^{-4}$  M dans le milieu de culture pendant 24 heures (adapté de Scalla, 1991).

Différentes phases se succèdent et mettent en jeu l'ensemble des transporteurs d'électrons de la chaîne photosynthétique :

Cinétique rapide (de l'ordre de 0,5 seconde)

- O : représente le niveau de fluorescence quand l'ensemble des accepteurs d'électrons  $Q_A$  est oxydé. La fluorescence (notée  $F_0$ ) est la composante constante de la fluorescence qui provient des antennes collectrices.
- O-I : la transition entre O et I est due à la réduction de  $Q_A$ . A l'étape I, une légère rediminution du signal notée D (non visible sur le schéma) peut avoir lieu et est attribuée à l'oxydation de  $Q_A$  lors du transfert entre  $Q_A$  et  $Q_B$ .
- I-P : la vitesse de réduction de  $Q_A$  est supérieure à celle de l'oxydation de PQ. La fluorescence est maximale, notée  $F_M$  (niveau P), lorsque les accepteurs d'électrons  $Q_A$  et PQ sont réduits.

Cinétique lente (de l'ordre de plusieurs minutes)

- P-S-M-T : les fluctuations de la fluorescence, jusqu'à l'obtention d'un état stationnaire T (le niveau de la fluorescence est noté  $F_T$ ), sont liées à la mise en route complète du métabolisme, transfert d'électrons entre le PSII et le PSI, assimilation du  $CO_2$ .

Les différentes intensités et la durée des fluctuations, décrites ci-dessus, varient beaucoup en fonction des cellules à activité photosynthétique étudiées et des conditions expérimentales.

En présence d'un herbicide anti-photosystème II

Les herbicides anti-PSII présentent la propriété d'accroître l'amplitude de la phase O-I au détriment de la phase I-P. Ils bloquent le transfert d'électrons de  $Q_A$  vers les accepteurs suivants.

De nombreuses études ont été réalisées sur la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne et ont permis de corréler des modifications de cette fluorescence à la présence de molécules toxiques vis-à-vis des cellules végétales (Tableau II.2).

**Tableau II.2.** Exemples d'études permettant de corrélérer la modification de la fluorescence chlorophyllienne et la présence de molécules toxiques.

Type de cinétique de fluorescence mesurée et paramètre mesuré	Molécules testées fréquemment [limites de détection citées]	Elément biologique	Référence
Rapide, mesure de l'évolution des cinétiques en présence de polluants	Atrazine [-], Diuron [-], Mercure [-], Cuivre[-]	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Samson et Popovic, 1988b
Rapide, soustraction entre un signal de référence et un signal modifié en présence de polluant	Atrazine [-], Diuron [ $< 0,4$ nM], Terbutylazine [-]	Chloroplaste de petits pois ou laitue	Merz <i>et al.</i> , 1996
Rapide, le niveau I (voir Figure II.7) a été plus particulièrement étudié	Atrazine [0,04 $\mu$ M], Simazine [0,08 $\mu$ M], Diuron [0,01 $\mu$ M], Isoproturon [0,04 $\mu$ M]	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	El Jay, 1995 El Jay <i>et al.</i> , 1997
Rapide, mesure d'un facteur proportionnel à $F_v^*$ en présence d'un herbicide	Atrazine [1 $\mu$ M], Diuron [0,3 $\mu$ M], Simazine [0,5 $\mu$ M]	<i>Chlorella fusca</i> <i>Phaedactylum tricornutum</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Scenedesmus subspicatus</i>	Conrad <i>et al.</i> , 1993
	Atrazine [80 nM], Simazine [80 nM], Diuron [12 nM]	<i>Chlorella fusca</i> <i>Phaedactylum tricornutum</i>	Arsalane <i>et al.</i> , 1993
Mesure de $F_M^*$ et $F_T^*$	Diuron [-]	Feuilles de petits pois et de blé	Karavaev <i>et al.</i> , 1998
Lente, mesure de $F_T^*$	Atrazine [5 nM], Simazine [1 nM], Diuron [0,1 nM]	<i>Chlorella vulgaris</i>	Naessens <i>et al.</i> , 2000
Lente (paramètre mesuré non spécifié)	Atrazine [5 nM], Endrine [-]	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Frense <i>et al.</i> , 1998

\*Définitions :  $F_0$  = composante constante de la fluorescence,  $F_M$  = composante maximale de la fluorescence,  $F_v = F_M - F_0$  : la composante variable de la fluorescence,  $F_T$  = fluorescence à l'état stationnaire.

Les limites de détection (de l'ordre du  $\mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine) des systèmes de mesures décrits par Merz *et al.* (1996), Frense *et al.* (1998), Naessens *et al.* (2000) sont dix à cent fois plus faibles que les valeurs données par les autres auteurs du Tableau II.2.

La cinétique de fluorescence rapide permet d'accéder au transfert d'électrons entre le PSII, les quinones ( $Q_A$ ,  $Q_B$ ), et les plastoquinones (PQ). La mesure de cette cinétique permet de détecter des molécules perturbant le transfert d'électrons entre le PSII et le PSI.

La cinétique de fluorescence lente permet une mesure des perturbations de l'ensemble du métabolisme photosynthétique de la cellule. Plusieurs phénomènes contribuent à faire diminuer la fluorescence chlorophyllienne de P à T, on les désigne sous le terme de « quenching ». Les deux types de « quenching » sont :

- « quenching » photochimique : il dépend de l'état d'oxydation de  $Q_A$ . Il est maximum lorsque le flux électronique est important, ce qui correspond à  $Q_A$  dans un état oxydé.
- « quenching » non-photochimique : il dépend majoritairement du gradient de protons établi de part et d'autre de la membrane du thylakoïde.

Si l'activité photosynthétique est intense (assimilation du CO<sub>2</sub> et production d'O<sub>2</sub> maximum), la fluorescence est minimale car la majeure partie de l'énergie lumineuse est utilisée pour le transfert d'électrons (production de NADPH) et pour la synthèse d'ATP (gradient de protons important).

Le biocapteur développé au cours de ce travail est fondé sur la mesure de la cinétique lente de la fluorescence. En effet, cette mesure est représentative de l'activité photosynthétique et du métabolisme des micro-algues. Son intérêt est donc d'appréhender l'ensemble des toxiques qui affectent non seulement le PSII, mais également le métabolisme de l'algue. De plus, l'appareillage à la base de la mesure de cette cinétique d'induction lente est très simple et susceptible d'être miniaturisé à bas prix. Ce dernier critère est un élément très important pour un développement futur de ce type de biocapteur.

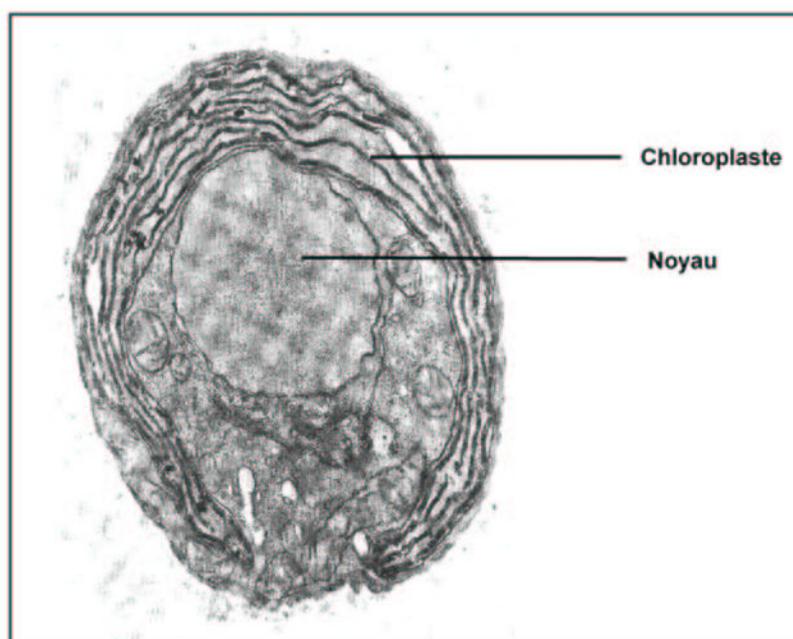
### **II.1.5 Présentation des différentes micro-algues utilisées**

Les différentes expériences décrites dans ce manuscrit ont été réalisées avec des Chlorophycées, ubiquistes de tous les milieux d'eaux douces. Les espèces *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* sont habituellement recommandées pour les tests d'écotoxicité en milieu hydrique. *Chlamydomonas* est un organisme modèle pour l'étude de la photosynthèse et du métabolisme des micro-algues (Harris, 1998).

*Chlorella vulgaris* (CCAP 211/12) est le micro-organisme le plus utilisé lors du développement du biocapteur. Cette micro-algue se cultive très facilement. Elle est de forme ronde et immobile (Figure II.8), ce qui facilite son immobilisation.

*Chlorella vulgaris* a un mode de reproduction asexuée. Les spores formées dans une cellule-mère s'échappent individuellement et germent en donnant chacune un organisme identique à celui qui les a produites (Gayral, 1975).

Les Chlorophycées ont une membrane plasmique (bi-couche lipidique) entourée d'une paroi lisse comportant une charpente cellulosique ayant une résistance mécanique importante. *Chlorella vulgaris* ne comporte pas de couche externe composée de chaînes aliphatiques et de macromolécules non-hydrolysables appelée TLS (« trilaminar sheaths »). Lorsqu'elle est présente, cette couche joue un rôle important de protection de la cellule vis-à-vis d'autres micro-organismes, de traitements chimiques (par exemple les détergents) ou enzymatiques, (Derenne *et al.*, 1992).



**Figure II.8.** *Chlorella vulgaris*, vue en microscopie à transmission (x 18000) (Rabinowitch et Govindjee, 1969).

Le tableau II.3 présente quelques données physiologiques relatives aux différentes algues utilisées lors de cette étude.

Position taxonomique commune aux différentes souches utilisées

Phylum	Chlorophyte
Embranchement	Chlorophycophyte
Classe	Chlorophycée
Sous-classe	Chlorophycidée
Ordre	cf. Tableau II.3

Tableau II.3. Caractéristiques des souches utilisées.

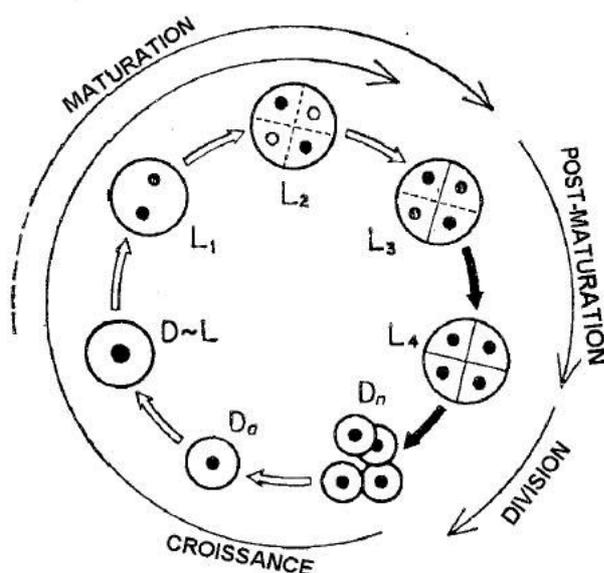
Souche algale (abréviation)	Cellules solitaires ou regroupées en colonies	Mobilité	Structure de la paroi	TLS	Position taxonomique (Ordre) Type de spores libérées lors des divisions cellulaires	Taille approximative et forme des algues (observation au microscope)
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/12 (CV12)	Solitaires	NON	Matrice contenant des protéines, des hémicelluloses, de la cellulose et des pectines (Evans, 1974 ; Leadbeater et Green, 1993)	NON	Chlorococcales	4 µm, ronde
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11B (CV 11B)						4 µm, ronde
<i>Chlorella vulgaris</i> du Léman SHL 136-1 (CV Lém)						2 µm, ronde
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> anciennement nommée <i>Selenastrum capricornutum</i> CCAP 278/4 (SC)				OUI		6 µm de longueur, en forme de croissant
<i>Scenedesmus subspicatus</i> CCAP 276/20 (SS)	Colonies de quelques cellules			OUI		8 µm, ovoïde
<i>Chlamydomonas intermedia</i> SHL 113 (CI)	Colonies de centaines de cellules	OUI	matrice cristalline de glycoprotéines (Dodge, 1973 ; Evans, 1974 ; Leadbeater et Green, 1993,)	NON	Volvocales zoospore (spore mobile)	12 µm, ovoïde

### II.1.6 Croissance et division cellulaire de *Chlorella*

L'étude de la croissance et de la division cellulaire de *Chlorella*, en particulier de *Chlorella ellipsoidea*, ont été réalisées sur des cultures synchrones. Une culture synchrone peut être définie comme étant une culture algale dans laquelle, après une période de croissance, la plupart des cellules entrent dans une phase de division cellulaire au même moment.

Il est possible de synchroniser les cellules d'une culture algale en les soumettant à un régime d'alternance de deux phases : une phase d'exposition à la lumière et une phase d'obscurité. La phase de croissance cellulaire se déroule pendant la phase lumineuse. La phase de division cellulaire se déroule principalement pendant la phase d'obscurité.

Tamiya (1964) distingue sept étapes lors du cycle de vie de *Chlorella* :  $D_n$ ,  $D_a$ ,  $D\sim L$ ,  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$ , et  $L_4$ .



**Figure II.9.** Représentation schématique du cycle de vie de *Chlorella ellipsoidea*. Les flèches blanches indiquent les étapes nécessitant de la lumière, les flèches noires montrent les étapes de la division cellulaire ne nécessitant pas la présence de lumière. Les différentes phases de la division cellulaire sont décrites dans le texte (adapté de Tamiya, 1964).

Les sept étapes sont définies de la manière suivante :

- $D_n$  (Cellules D naissantes) = cellules jeunes nouvellement produites (en l'absence de lumière) à partir des cellules mères  $L_4$ , incapables de se diviser à l'obscurité.
- $D_a$  (Cellules D actives) = cellules dérivant de  $D_n$  (en présence de lumière) ayant la plus forte activité photosynthétique, incapables de se diviser à l'obscurité.

- D~L = cellules dans un état de transition entre les états D et L, incapables de se diviser à l'obscurité.
- L<sub>1</sub> (cellules non matures) = cellules ayant une taille importante, mais incapables de se diviser à l'obscurité.
- L<sub>2</sub> (maturation partielle) = cellules capables de se diviser partiellement à l'obscurité (nombre d'autospores inférieur au nombre d'autospores libérées au moment de la division des cellules en phase L<sub>3</sub> ou L<sub>4</sub>)
- L<sub>3</sub> (cellules matures) = cellules capables de se diviser complètement à l'obscurité.
- L<sub>4</sub> (cellules complètement matures) = cellules sur le point de se diviser. Dans cet exemple, quatre autospores sont libérées. Cependant, selon l'espèce de chlorelle étudiée, le nombre de spores libérées peut atteindre seize.

La conception d'un biocapteur performant nécessite l'utilisation d'un biorécepteur se trouvant dans des conditions physiologiques favorables afin de fournir une information pertinente sur un éventuel dysfonctionnement de l'appareil photosynthétique en présence d'un toxique.

La connaissance du cycle cellulaire des micro-algues nous encourage à utiliser des cellules en phase D<sub>a</sub> qui ont une activité photosynthétique importante. Ce point sera abordé dans le paragraphe II.3.2.3.

### **II.1.7 Cytométrie de flux**

La cytométrie de flux est un outil performant permettant d'avoir des informations sur les stades de développement des cellules algales décrits à la Figure II.9, présents dans nos cultures. Cet outil, encore sous employé dans des études écotoxicologiques, est particulièrement bien adapté à ce type d'études (Stauber *et al.*, 2002). Il est susceptible d'apporter une aide précieuse à l'optimisation des conditions de culture algale. Cette méthode permet de compter, d'analyser, de trier sélectivement les cellules présentes dans des populations. Les cellules, injectées dans le flux du cytomètre, passent à travers un faisceau laser, ce qui permet de déterminer différents paramètres comme la taille, la granulosité, la fluorescence des cellules, la concentration d'un marqueur intracellulaire.

## II.2 MATERIEL ET METHODES

### II.2.1 Cultures des micro-algues

#### II.2.1.1 Provenance des souches

Les souches axéniques CCAP 211/12, CCAP 211/11B, CCAP 278/4, CCAP 276/20 proviennent de l'algothèque de l'« Institute of Freshwater Ecology, The Windermere Laboratory Far Sawrey, Ambleside, Cumbria LA22 OLP, UK ».

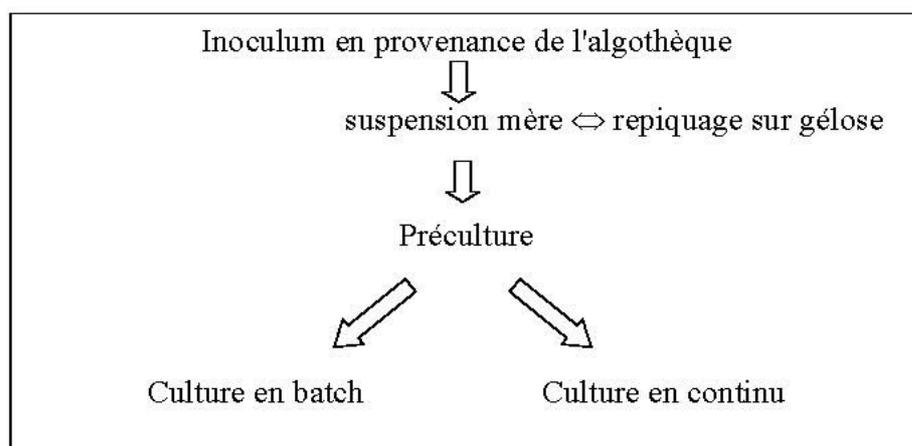
Les souches non axéniques SHL 136-1, SHL 113 proviennent de la station d'hydrobiologie Lacustre, 75 avenue de Corzent, BP 511, 74203 Thonon les Bains cedex.

#### II.2.1.2 Milieu de culture

Le milieu Lefebvre-Czarda (milieu L.C. oligo), décrit dans la norme expérimentale AFNOR T 90-304 (Août 1980), est préparé à partir de 6 solutions aqueuses minérales présentées en Annexe 1.

#### II.2.1.3 Mise en culture et maintenance

La mise en culture et la maintenance des souches algales nécessitent plusieurs étapes (Figure II.10).

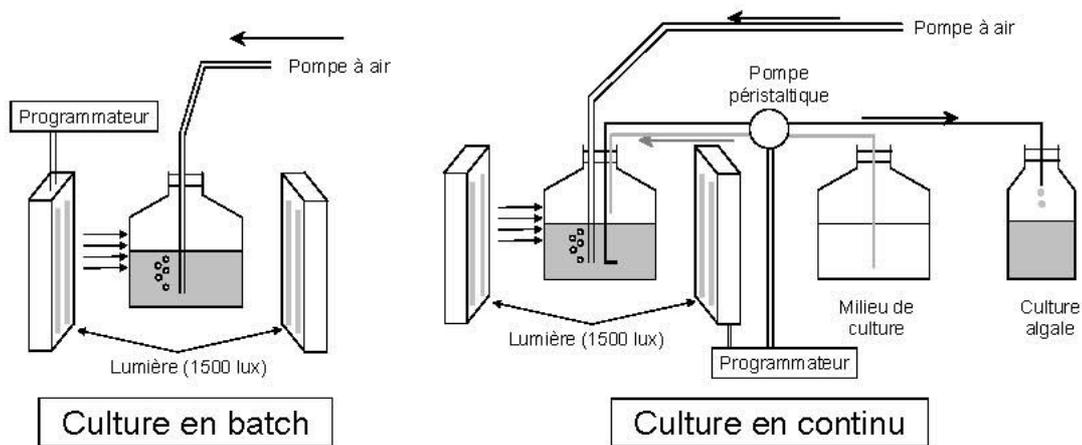


**Figure II.10.** *Étapes de la mise en culture et de la maintenance des souches algales.*

Les suspensions mères sont obtenues par transfert de l'inoculum (2 ml) dans un flacon d'Erlenmeyer contenant 20 ml de milieu L.C. oligo.

Après dix jours de croissance de ces suspensions mères dans une enceinte régulée à 20°C et sous une illumination de 1500 lux (photopériode de 12 heures), les repiquages sur gélose nutritive (30% agarose, milieu L.C. oligo) ont lieu. Les tubes gélosés sont conservés à 4°C. Ils permettent de réobtenir des suspensions mères. Les conditions de culture des suspensions mères (lumière, température, milieu nutritif) sont valables pour l'ensemble des cultures.

Les suspensions mères permettent d'obtenir des précultures par dilution au dixième dans 300 ml de milieu mis dans un flacon ayant une capacité d'un litre. Le repiquage au dixième de cette préculture permet l'ensemencement de la culture en batch et de la culture en continu.



**Figure II.11.** Montage utilisé pour réaliser des cultures en batch et en continu.

La culture en batch (Figure II.11) repose sur la croissance des algues dans un milieu nutritif non renouvelé. L'apport de dioxyde de carbone et l'agitation de la culture sont assurés par un bullage d'air dans la culture. L'air saturé en humidité est préalablement filtré (porosité du filtre = 0,2  $\mu\text{m}$ ) avant d'entrer dans le flacon.

La culture en continu (Figure II.11) consiste en un renouvellement permanent du milieu nutritif. Les débits d'apport du milieu nutritif et de soutirage sont égaux. Il est possible d'obtenir une concentration constante en micro-algues en jouant sur la vitesse de la pompe péristaltique. En effet, il existe un point d'équilibre entre la vitesse de croissance des algues et la vitesse de renouvellement du milieu nutritif. Il est possible de maintenir cette culture pendant environ cinq semaines en utilisant un stock de 8 litres de milieu nutritif.

### II.2.1.4 Appareillage

L'appareillage et l'équipement nécessaires aux cultures en batch et en continu sont :

- ◆ Climatiseur Vapac<sup>®</sup>.
- ◆ Trois tubes fluora- 18W/77 Osram<sup>®</sup>.
- ◆ Pompe à air pour aquarium Rena Air 400, débit de 400 l à l'heure.
- ◆ Filtre Millipore<sup>®</sup> FG50, porosité = 0,2 µm.
- ◆ Programmateur électronique Novo.
- ◆ Pompe Reglo, Ismatec programmable.
- ◆ Tuyaux manifold en silicone d'un diamètre interne de 0,64 mm.
- ◆ Tuyaux en téflon de 1 mm de diamètre.

### II.2.1.5 Suivi de la culture

#### a) *Mesure des spectres d'absorption des suspensions algales*

Quatre millilitres de culture algale sont placés dans une cuve en quartz Hellma<sup>®</sup> QS. Le spectre d'absorption entre 400 et 800 nm est alors tracé avec un spectrophotomètre Cary 300, Varian. La solution est diluée de manière à ne pas dépasser une densité optique de 0,8, quelle que soit la longueur d'onde.

#### b) *Dosage de la concentration en chlorophylles a et b des cultures algales*

Les chlorophylles *a* et *b* sont dosées par spectrophotométrie d'absorption UV après extraction à chaud par le méthanol. La suspension cellulaire est centrifugée à 10000 tours par minute pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 9 ml de méthanol et incubé à 45°C pendant 30 minutes. L'ensemble de ce protocole est répété une nouvelle fois. Le volume de la solution contenant les chlorophylles extraites est ajusté à 20 ml. Le spectre d'absorption de cette solution est déterminé entre 400 nm et 800 nm.

Le calcul des concentrations en chlorophylles *a* et *b* a été réalisé en utilisant les équations suivantes (Porra *et al.*, 1989) :

$$\text{Chl } a = 16,29 A^{665,2} - 8,54 A^{652}$$

$$\text{Chl } b = 30,66 A^{652} - 13,58 A^{665,2}$$

Avec  $A^{665,2}$  = Densité optique à 665,2 nm – Densité optique à 750 nm

$A^{652}$  = Densité optique à 652 nm – Densité optique à 750 nm

### *c) Numération cellulaire*

La numération cellulaire est réalisée avec une cellule de comptage de type Thoma<sup>®</sup> et à l'aide d'un microscope Olympus<sup>®</sup> BH-2. Cette numération est corrélée à la mesure de la densité optique à 760 nm mesurée avec un spectrophotomètre Cary<sup>®</sup> 300, Varian.

## **II.2.2 Cytométrie de flux**

### II.2.2.1 Le cytomètre de flux

Le cytomètre utilisé est : Epics-XL Beckman-Coulter, USA. Il est composé de deux parties : le système fluidique et le système optique (Figure II.12).

#### *a) Le système fluidique*

La suspension cellulaire, injectée dans une veine de liquide de section importante, s'écoule vers une buse de faible diamètre. Le diamètre diminuant, la vitesse augmente et, à la sortie de la buse, les cellules sont alors monodispersées et défilent à raison de plusieurs centaines par seconde dans un jet liquide ayant le diamètre de la buse (quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ ).

Un centrage hydrodynamique, assuré par un flux liquidien autour de l'échantillon, permet un positionnement précis du jet dans le faisceau laser ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ). Il est possible de faire passer les cellules une à une dans le faisceau lumineux.

#### *b) Le système optique*

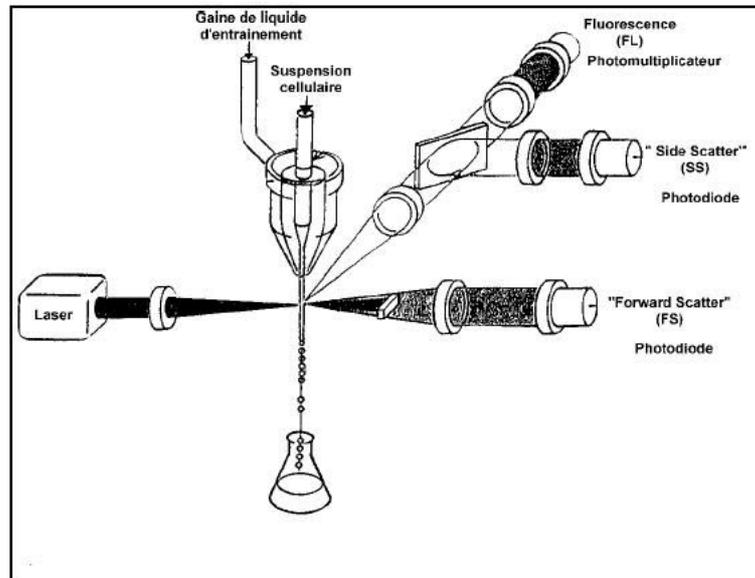
Les détecteurs situés autour du « carrefour » flux cellulaire/ faisceau laser, permettent l'analyse des caractéristiques des cellules.

Un premier détecteur (photodiode) localisé dans l'axe du faisceau laser reçoit la lumière diffusée par chaque cellule passant devant le trajet optique. Cette diffusion de la lumière est appelée « forward scatter » (FS) et est proportionnelle à la taille de la cellule.

Un second détecteur situé à  $90^\circ$  à la fois du flux cellulaire et du faisceau laser (dans le même plan que ce dernier) recueille la lumière diffusée. On parle de « side scatter » (SS), ce signal est proportionnel à la quantité d'organites (ou granulosité) présents dans la cellule.

Une série de détecteurs et de filtres sont alignés dans le prolongement du détecteur recueillant le « side scatter » et captent la lumière fluorescente (FL) émise par les fluorochromes fixés dans les cellules excitées par le faisceau laser.

Les signaux issus des photomultiplicateurs sont traités en temps réel par un micro-ordinateur qui génère les histogrammes, mono ou biparamétriques, représentant les signaux de la taille (FS), de la granulosité (SS), de la fluorescence (FL) à une longueur d'onde donnée.



*Figure II.12. Principe de fonctionnement d'un cytomètre de flux.*

#### II.2.2.2 Mesures réalisées sur deux types de culture algale

Deux cultures en continu sont testées. Elles sont obtenues avec les régimes lumineux suivants :

- 12 h d'éclaircissement : 12 h d'obscurité (noté 12:12)
- 24 h sur 24 h d'éclaircissement (noté 24/24).

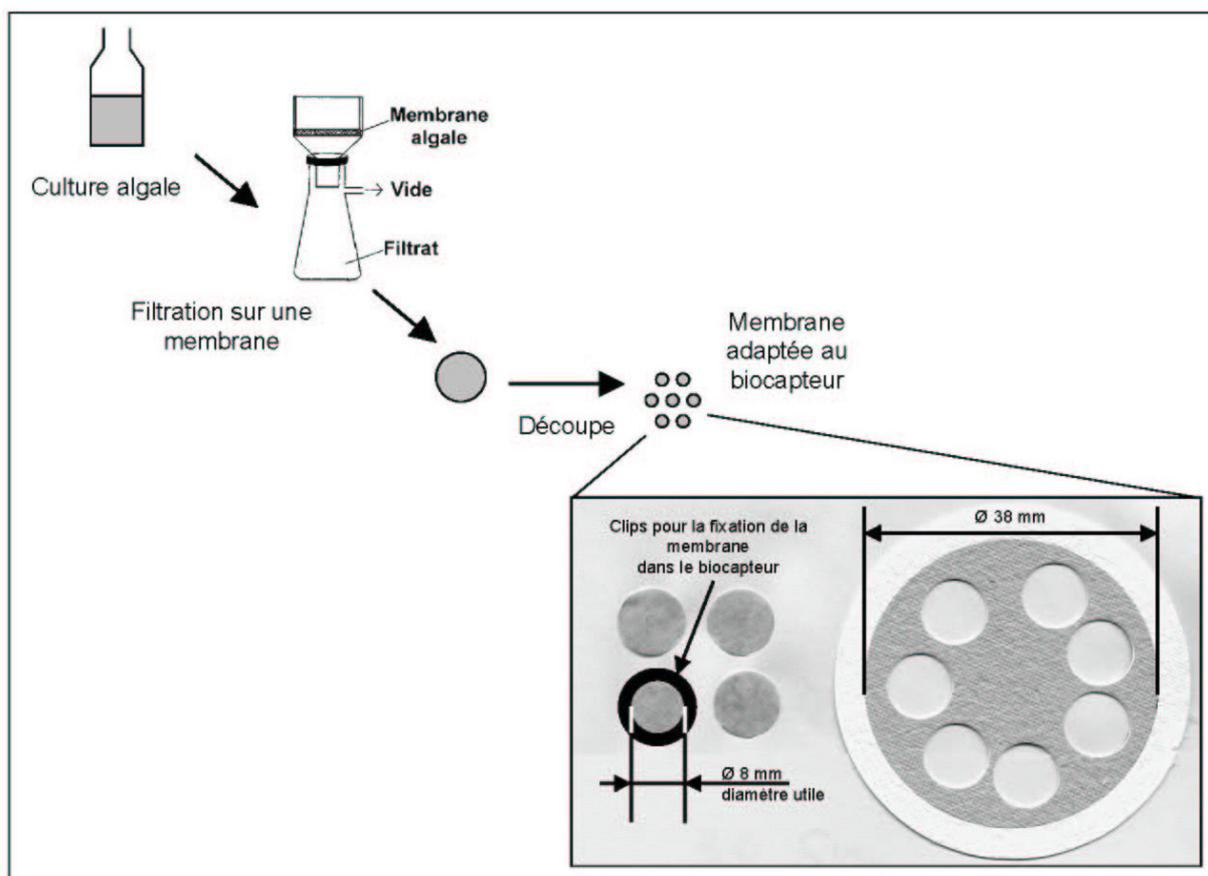
Les micro-algues sont prélevées 5 heures après le début de l'illumination de la culture 12:12.

Les suspensions algales ( $Do_{760} = 0,5$ ) sont incubées pendant 10 minutes avec 5  $\mu\text{M}$  de SYTO 24<sup>®</sup> (Molecular Probe). La molécule SYTO 24<sup>®</sup> est un marqueur fluorescent spécifique de l'ADN. Le maximum d'excitation de cette molécule lorsqu'elle est liée à l'ADN est à 490 nm et son maximum d'émission est à 515 nm. Ce couple de longueurs d'onde d'émission / excitation est compatible avec le couple  $\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm} / \lambda_{\text{émission}} = 525 \text{ nm}$  disponible sur le cytomètre.

Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme de trois graphes : la taille en fonction de la granulosité, le nombre de cellules en fonction de la taille, le nombre de cellules en fonction de la fluorescence à 525 nm (détermination de la quantité relative d'ADN dans chaque cellule).

### II.2.3 Immobilisation des micro-algues

Les algues issues des cultures sont en suspension dans le milieu nutritif. L'immobilisation de ces algues est nécessaire pour la réalisation du biocapteur. Les algues sont filtrées sur une membrane servant de support pour l'immobilisation sous vide modéré. Typiquement, 20 ml d'une suspension algale dont la densité optique à 760 nm est de 0,25 sont utilisés lors de la procédure d'immobilisation. La membrane ainsi obtenue, contenant les algues, est découpée en petites membranes d'un diamètre de 9 mm dont le diamètre utile est de 8 mm.



**Figure II.13.** Procédure de préparation des membranes algales et une photographie des membranes algales obtenues (*Chlorella vulgaris* dans cet exemple).

L'immobilisation des différentes micro-algues a nécessité l'essai de différentes membranes de filtration listées dans le Tableau II.4.

**Tableau II.4.** *Références des membranes utilisées.*

<b>Fabricant</b>	<b>Marque</b>	<b>Référence</b>	<b>Matériau</b>	<b>Porosité</b>
Whatman	QM-série	QM/A	Quartz	non déterminée
Whatman	GF-série	GF/A	Fibre verre	1,6 µm
Whatman	GF-série	GF/C	Fibre verre	1,2 µm
Whatman	GF-série	GF/D	Fibre verre	2,7 µm
Whatman	GF-série	GF/F	Fibre verre	0,7 µm
Schleicher & Schuell	papier pour analyses quantitatives	589/2	Papier	4-12 µm
Schleicher & Schuell	papier pour analyses quantitatives	589/1	Papier	12-25 µm
Schleicher & Schuell	filtre d'adsorption	GF 92	Quartz	non déterminée
Prolabo	papier pour analyses	bande bleue	Papier sans cendres	3 µm
Prolabo	papier pour analyses	bande blanche	Papier sans cendres	6 µm
Prolabo	papier pour analyses	bande rouge	Papier sans cendres	10 µm
Pall	Versapor	66387	Copolymère acrylique hydrophile sur support non tissé	3 µm

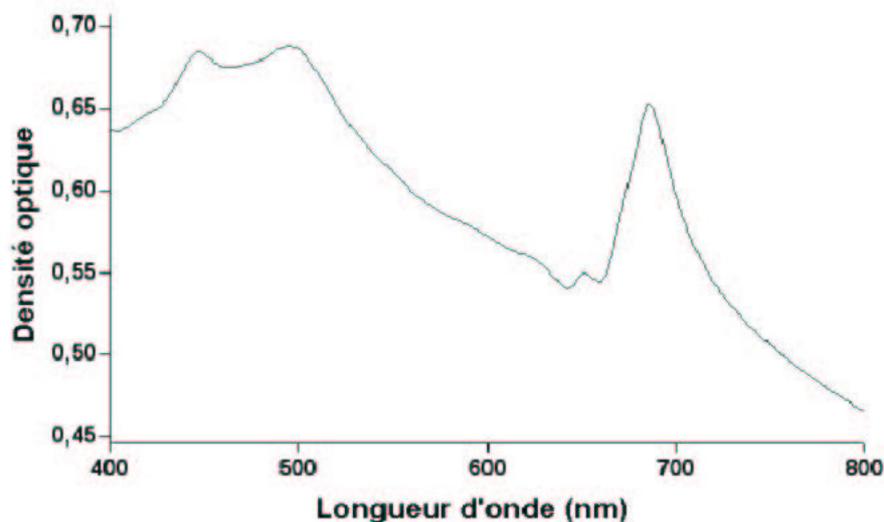
## II.3 RESULTATS ET DISCUSSION

*Chlorella vulgaris* a été utilisée comme algue modèle pour mettre au point le biocapteur. Cette souche est très souvent utilisée lors d'études de toxicité et elle est très souvent citée dans la bibliographie. Elle est facile à manipuler et à cultiver en laboratoire. Les travaux antérieurs de Martine Naessens (1998) ont permis l'acquisition d'un savoir-faire au sein du laboratoire. Nous avons donc décidé d'utiliser *Chlorella vulgaris* au cours des étapes de mise au point du biocapteur.

### II.3.1 *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12

#### II.3.1.1 Spectre d'absorption

Le spectre d'absorption de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12 (algues obtenues dans nos conditions de cultures) comporte quatre pics à 447, 496, 652 et 686 nm (Figure II.14). Les pics situés entre 400 et 500 nm sont la résultante des spectres d'absorption des caroténoïdes, des chlorophylles *a* et *b* (Govindjee et Braun, 1974). Les pics 652 et 686 nm sont caractéristiques de l'absorption des chlorophylles *b* et *a* respectivement.



**Figure II.14.** Spectre d'absorption de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12 (résultat représentatif des spectres obtenus avec dix cultures en continu). Conditions : mesure de la densité optique de 400 à 800 nm de 4 ml d'une culture en continu de *Chlorella vulgaris* (photopériode de 12 h, 1500 lux, 20°C,  $DO_{760}$  moyenne = 0,5).

La longueur d'onde  $\lambda = 760$  nm a été choisie afin de corréler la densité optique à la concentration cellulaire de la suspension algale. En effet, l'absorption des pigments (chlorophylles et caroténoïdes) à 760 nm est très faible. La densité optique mesurée à 760 nm

ne dépend pas de la teneur en pigments des cellules algales mais de la quantité de cellules de la culture : c'est une densité optique apparente due à la diffusion de la lumière par les algues.

La mesure du spectre d'absorption est un outil qui permet le suivi des cultures.

### II.3.1.2 Evaluation de la concentration cellulaire d'une culture algale

La concentration cellulaire d'une culture algale est évaluée selon deux méthodes :

- comptage au microscope, effectué à l'aide d'une cellule de Thoma
- mesure de la densité optique de la suspension algale

Une culture algale est une suspension cellulaire qui peut être modélisée comme étant une suspension de particules monodisperses diffusant et absorbant la lumière. Dans le cas de solutions diluées, il existe une relation entre la concentration en particules et la densité optique ( $D_o$ ) :

$$D_o(\lambda_0) = \ln \left\{ \frac{I_0(\lambda_0)}{I_L(\lambda_0)} \right\} = C_{ext} \cdot L \cdot N_p$$

Où

$N_p$  = Concentration en particules

$D_o(\lambda_0)$  = Densité optique de la solution à la longueur d'onde  $\lambda_0$

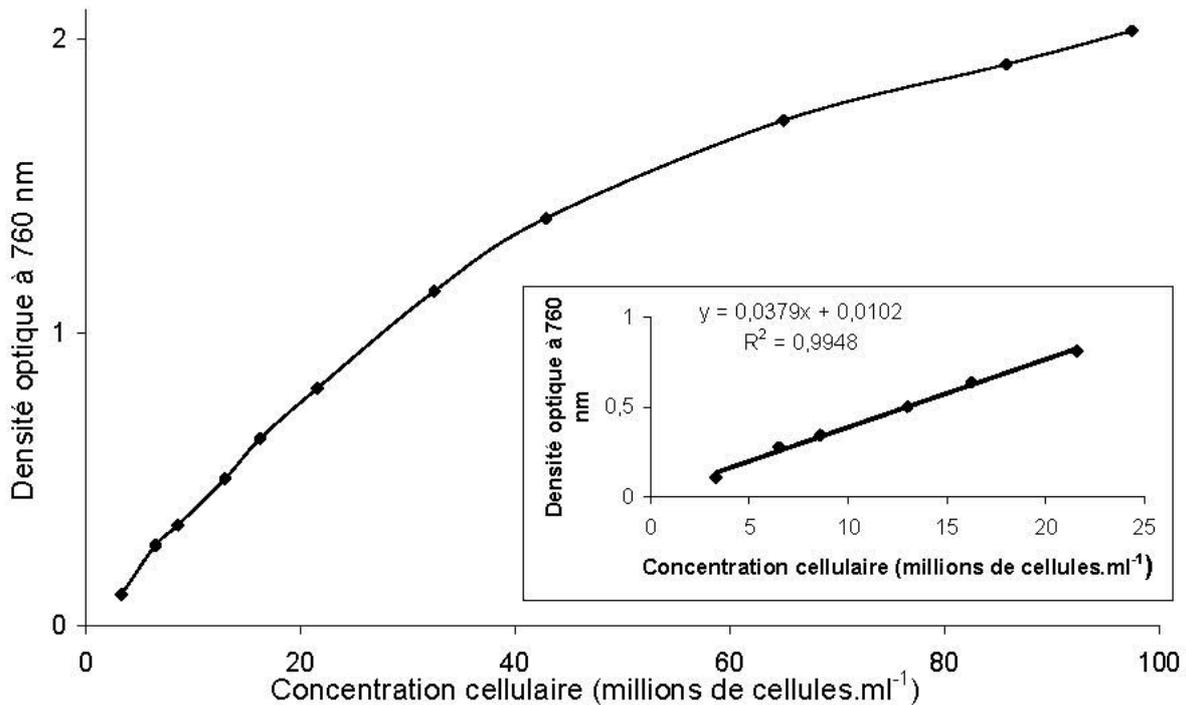
$L$  = Longueur du trajet optique

$I_0(\lambda_0)$  = Intensité du rayonnement incident

$I_L(\lambda_0)$  = Intensité du rayonnement transmis

$C_{ext} = C_{sca} + C_{abs}$  Le coefficient ( $C_{ext}$ ) d'extinction est la somme du coefficient d'absorption ( $C_{abs}$ ) et du coefficient de diffusion pure ( $C_{sca}$ ).

Une courbe d'étalonnage entre la densité optique à 760 nm et la concentration cellulaire d'une culture algale a été réalisée (Figure II.15). La densité optique de la culture a été déterminée à différentes dilutions. La numération cellulaire de la dilution au 1/10 a été réalisée avec une cellule de Thoma. La concentration cellulaire des autres solutions diluées est calculée en prenant en compte les facteurs de dilution.



**Figure II.15.** Courbe d'étalonnage de la densité optique mesurée à 760 nm en fonction de la concentration cellulaire de la suspension algale. Conditions : numération cellulaire (moyenne de trois mesures) avec une cellule de Thoma d'une suspension algale de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12 (issue d'une culture en mode batch, photopériode de 12 h, 1500 lux, 20°C), puis mesure de la densité optique à 760 nm de différentes dilutions de cette suspension cellulaire.

Il existe une relation linéaire entre la densité optique à 760 nm de la suspension et la concentration cellulaire, pour des densités optiques comprises entre 0,1 et 0,8. Elle s'exprime par la formule suivante :

$$Do_{760} = 0,0379 N + 0,0102 \quad \text{Où } N = \text{concentration cellulaire en millions de cellules.ml}^{-1}$$

$$\Leftrightarrow N = 26,27 Do_{760} - 0,21$$

Cette dernière équation permet une estimation rapide de la concentration en cellules d'une suspension dont la densité optique est connue.

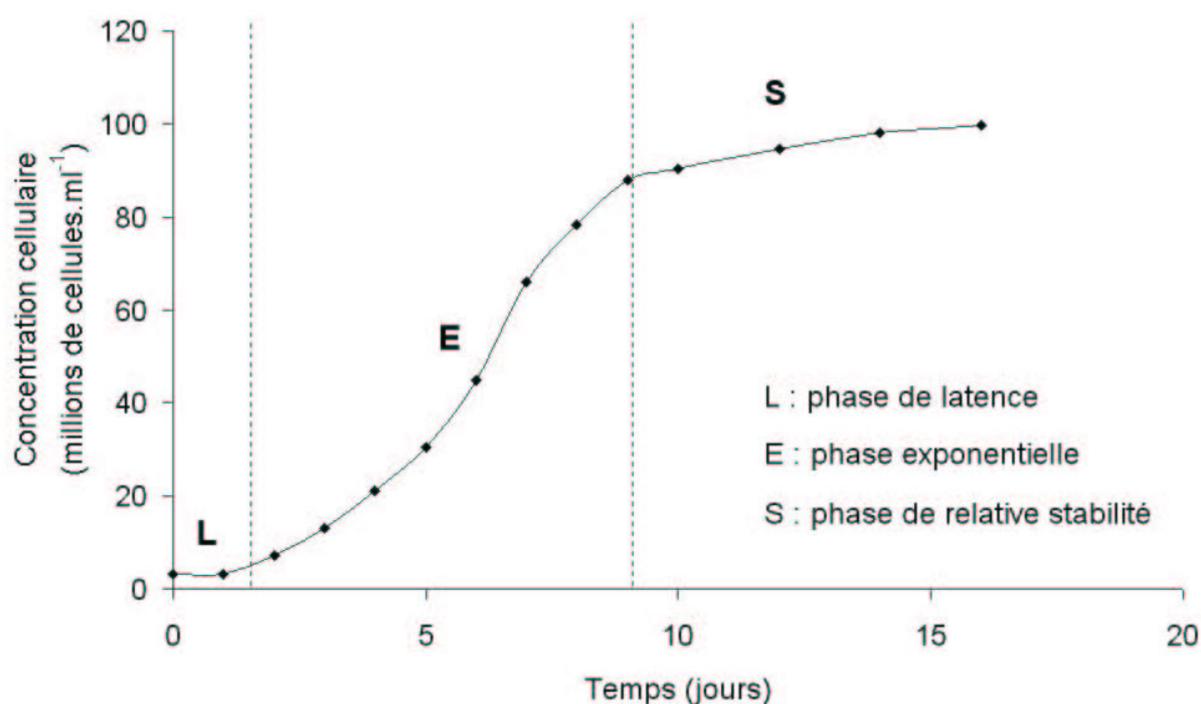
La mesure d'une densité optique est plus rapide, plus fiable que le comptage au microscope. Pour ces raisons, cette méthode a été choisie comme méthode de référence pour l'estimation de la biomasse algale.

### II.3.2 Culture de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12

#### II.3.2.1 Culture en batch

L'évaluation de la croissance de *Chlorella vulgaris* a été effectuée pendant 16 jours (Figure II.16). On distingue trois phases :

- Une phase de latence qui correspond à une adaptation de l'algue aux nouvelles conditions de culture, suite au repiquage réalisé (dilution au dixième de la préculture).
- Une phase de croissance exponentielle où le temps de doublement de la population cellulaire est constant.
- Une phase quasi-stationnaire où la vitesse de croissance a fortement ralenti, suite à l'épuisement du milieu de culture et à la mauvaise réception de la lumière due à la surpopulation.



**Figure II.16.** Courbe de croissance de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12 dans une culture en batch. Conditions : numération cellulaire (moyenne de trois mesures) quotidienne à l'aide d'une cellule de Thoma d'une suspension algale issue d'une culture en batch de *Chlorella vulgaris* (photopériode de 12 h, 1500 lux, 20°C,  $DO_{700}$  moyenne = 0,5).

La phase de croissance des algues en batch peut être décrite par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dN}{dt} = \alpha N \quad \text{Où } N = \text{Concentration cellulaire en millions de cellules.ml}^{-1}$$

$$\alpha = \text{taux de croissance en jour}^{-1}$$

Ceci donne une croissance exponentielle :

$$N = N_0 e^{\alpha t} \quad \text{Où } N_0 = \text{Concentration cellulaire initiale en millions de cellules.ml}^{-1}$$

$$t = \text{temps en jours}$$

La courbe de tendance de la phase exponentielle a l'équation suivante :

$$N = 2,79 e^{0,477 t} \quad \text{le coefficient de corrélation } R^2 = 0,98$$

$$\text{d'où } \alpha = 0,477 \text{ jour}^{-1}$$

Ce paramètre va nous permettre de calculer le débit théorique à utiliser lors de la mise en place d'une culture en continu de *Chlorella vulgaris*.

Les cultures en mode batch permettent de se familiariser avec la culture de micro-algues. La courte durée de la phase exponentielle limite la période de prélèvement à une semaine, ce qui impose la mise en place d'une nouvelle culture toutes les semaines. Cette préparation est très consommatrice en temps (préparation du milieu, autoclavage...), ce qui peut être évité en développant un mode de culture en continu. De plus, celui-ci permet d'obtenir des populations cellulaires constantes d'un jour à l'autre et d'une culture à l'autre.

### II.3.2.2 Culture en continu

Lors d'une culture en continu, la perte de cellules par soutirage peut être décrite par :

$$\frac{w}{v} N = \text{perte de cellules par soutirage}$$

$$\text{Où } w = \text{débit du soutirage en ml.jour}^{-1}$$

$$v = \text{volume de la culture en ml}$$

$$\frac{w}{v} = \text{fraction des cellules perdues en jour}^{-1}$$

L'équation différentielle décrivant la variation de la concentration cellulaire dans la culture en continu est :

$$\frac{dN}{dt} = \alpha N - \frac{w}{v} N$$

$$\Rightarrow \frac{dN}{dt} = N\left(\alpha - \frac{w}{v}\right)$$

$$\text{à l'équilibre : } \frac{dN}{dt} = 0 \Rightarrow \alpha = \frac{w}{v}$$

Estimation du débit de soutirage :

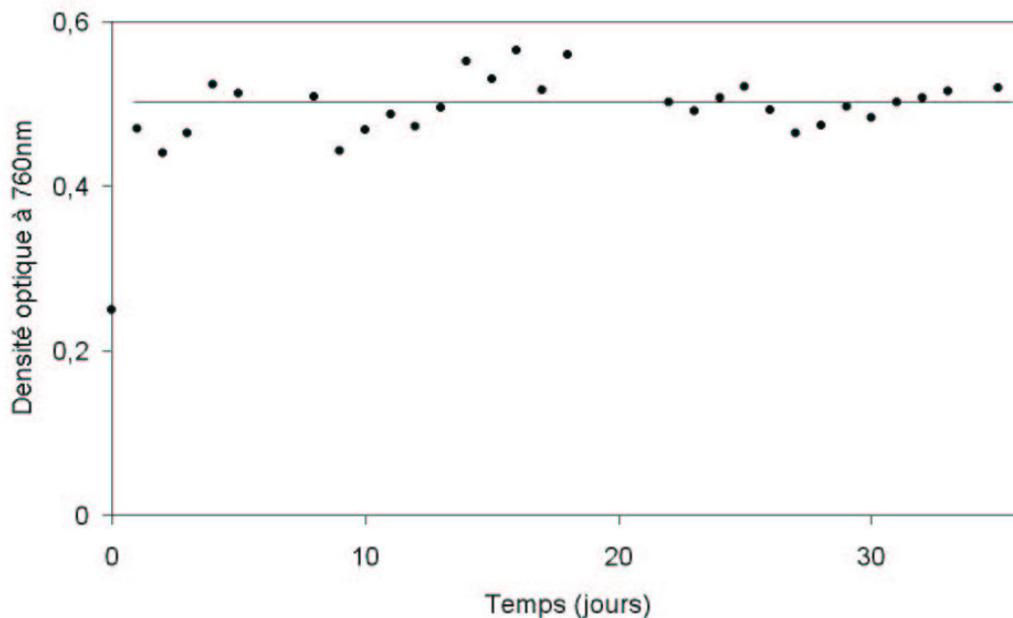
$$w = \alpha v \quad \text{avec} \quad \alpha = 0,477 \text{ jour}^{-1} \text{ (déterminé avec la culture en batch)}$$

Le volume de la culture est :  $v = 300 \text{ ml}$

$$\text{d'où } w = 0,477 \times 300 = 143,1 \text{ ml.jour}^{-1}$$

La pompe de soutirage est synchronisée avec le cycle lumineux (12 heures de lumière, 12 heures d'obscurité). La durée du soutirage est de 12 heures. Donc, le débit théorique de soutirage vaut alors  $12 \text{ ml.heure}^{-1}$  pendant 12 heures par jour. Cette valeur est une base de travail. Il s'est avéré que dans les conditions de la culture en continu la valeur réelle du débit de soutirage vaut en moyenne  $15 \text{ ml.heure}^{-1}$ .

La Figure II.17 montre l'évolution de la densité optique à 760 nm d'une culture continue de *Chlorella vulgaris*. La modification du débit de soutirage permet une stabilisation de la densité optique à une valeur moyenne de 0,5. Cette valeur correspond à la densité optique de la culture en batch ( Figure II.15 et Figure II.16) obtenue après 3 jours environ de croissance. Les algues sont dans les conditions du début de la phase exponentielle, c'est-à-dire dans des conditions optimales de croissance : une bonne accessibilité de la lumière au niveau de chaque cellule et une concentration en nutriments satisfaisante pour la physiologie de l'algue.



**Figure II.17.** Evolution de la densité optique à 760 nm d'une culture en continu de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12 (résultat représentatif de l'évolution de dix cultures en continu). Conditions : mesure quotidienne de la densité optique à 760 nm de 4 ml d'une culture en continu de *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12 (photopériode de 12 h, 1500 lux, 20°C,  $DO_{760}$  moyenne = 0,5).

### II.3.2.3 Caractérisation des cultures en continu de *Chlorella vulgaris*

#### a) Choix de la durée séparant le début de l'éclairement et le soutirage

Samuelsson et Öquist (1977) ont étudié l'effet de DCMU (herbicide anti-PSII) sur la fluorescence chlorophyllienne d'une culture synchrone de *Chlorella pyrenoidosa* prélevée à différents temps après le début de la phase lumineuse. Ils ont montré que l'augmentation de la fluorescence provoquée par le DCMU était d'autant plus marquée que l'activité photosynthétique de la micro-algue était grande. Cette réponse maximale est comprise entre 2 et 6 heures après le début de l'illumination de la culture.

Senger et Frickel-Faulstich (1974) ont montré que la capacité photosynthétique de *Scenedesmus obliquus* et *Chlamydomonas reinhardtii* était maximale après un temps correspondant à la moitié de la durée de la période d'illumination (entre 6 et 8 heures).

Le passage de l'état  $D_n$  à  $L_1$  dans des cultures en continu de *Chlorella ellipsoidea* et *Chlorella pyrenoidosa* nécessite respectivement 8 et 10 heures après le début de l'illumination (Tamiya, 1964).

Ces données nous ont amenés à réaliser les soutirages de la culture en continu de *Chlorella vulgaris* cinq heures après le début de la phase lumineuse afin de prélever les micro-algues dans un état où leur activité photosynthétique est importante.

#### b) Etude des populations cellulaires en cytométrie de flux

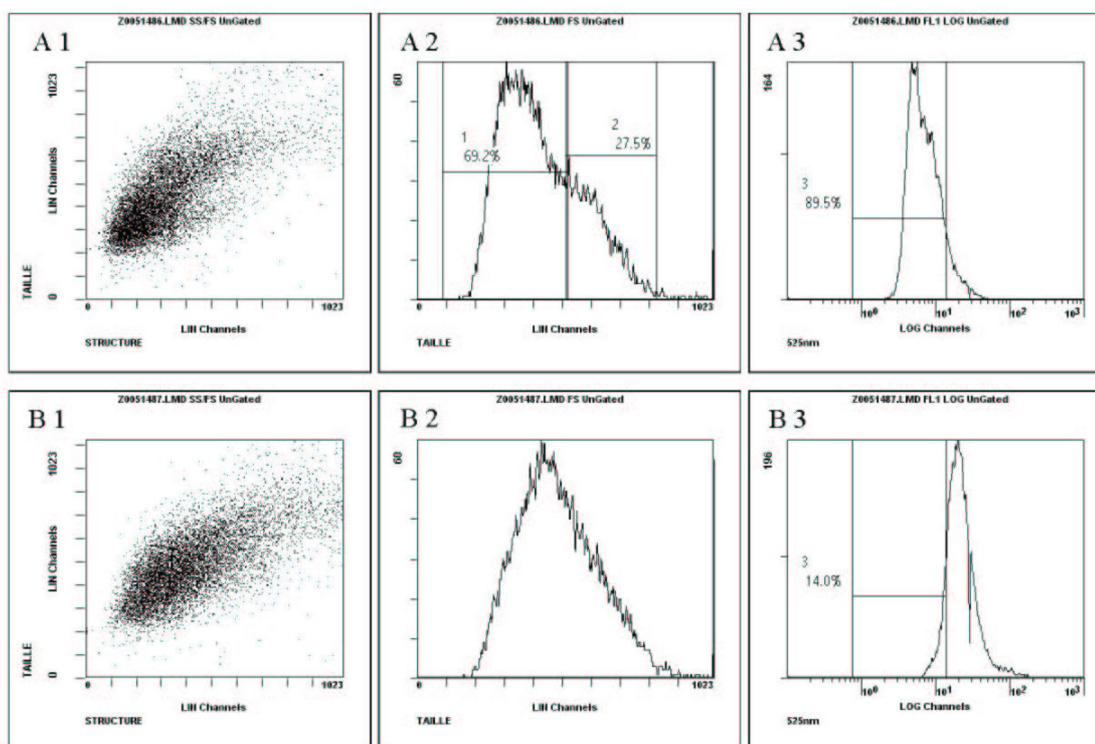
Cette étude n'a pas pour objectif d'être exhaustive. Le but est de caractériser et de vérifier la synchronisation de la culture cellulaire en utilisant la cytométrie de flux.

Nous avons réalisé une comparaison des populations cellulaires présentes dans deux cultures en continu dont le régime lumineux est : 12 h d'éclairement : 12 h d'obscurité (noté 12:12), 24 h sur 24 h d'éclairement (noté 24/24). Les micro-algues sont prélevées 5 heures après le début de l'illumination de la culture 12:12.

A la différence des cellules de la culture 12:12, les cellules de la culture 24/24 n'ont subi aucune synchronisation. Les Figures II.18 A1 et B1 représentent la taille des cellules en fonction de la quantité d'organites (granulosité) des cellules. Cette représentation permet une comparaison rapide des deux populations cellulaires. Les cellules de la culture 24/24 apparaissent d'une taille plus importante et plus dispersée que les cellules de la culture 12:12. Les graphiques A2 et B2, représentant le nombre de cellules en fonction de leur taille, permettent de préciser ces différences observées. En effet, la population de cellules 24/24 se présente sous la forme d'un pic assez large. La population cellulaire est composée de cellules

se trouvant dans toutes les phases du cycle de croissance et de division cellulaire. En revanche, la population 12:12 présente deux pics distincts : environ 70% de petites cellules et environ 30% de cellules de tailles plus grandes. Cette différence s'explique par la synchronisation de la culture 12:12 et le prélèvement 5 heures après le début de l'illumination de la culture.

L'étude du contenu en ADN des cellules de chaque population (A3 et B3) est cohérente avec ces résultats. Le marqueur fluorescent SYTO<sup>®</sup> 24 a été utilisé. Ce marqueur a été choisi pour sa spécificité de marquage de l'ADN. En outre, il ne nécessite pas la perméabilisation de la membrane cellulaire, ce qui permet une utilisation très simplifiée. Enfin, les marqueurs SYTO sont appelés à être largement utilisés car ils permettent l'obtention d'un rapport signal sur bruit important (Veal *et al.*, 2000).



**Figure II.18.** Analyse en cytométrie de flux des populations cellulaires de deux cultures en continu de *Chlorella vulgaris* : A 1,2,3 = 12:12 ; B 1, 2, 3 = 24/24. Axes : graphes A1 et B1 = taille en fonction de la granulosité, graphes A2 et B2 = nombre de cellules en fonction de la taille, graphes A3 et B3 = nombre de cellules en fonction de la fluorescence à 525 nm. Conditions : 1500 lux, 20°C

L'intensité de la fluorescence induite lorsque le marqueur SYTO<sup>®</sup> 24 est fixé à l'ADN est corrélée à la quantité d'ADN présent dans la cellule. L'interception (A3) de 90% des cellules 12:12 ne correspond qu'à une interception (B3) de 14% des cellules 24/24. La quantité d'ADN présent dans les cellules 24/24 est supérieure à celle des cellules 12:12. Les cellules 12:12 semblent être majoritairement comprises entre les phases de développement D<sub>n</sub>.

et D~L. Ces données sont cohérentes avec les résultats présents dans la bibliographie et confirment notre choix de prélèvement des cellules de la culture 12:12 cinq heures après le début de l'illumination.

c) *Populations cellulaires et concentration en chlorophylles de cultures en continu 12:12 indépendantes*

➤ Etude en cytométrie de flux des populations de différentes cultures en continu 12:12

La taille des populations cellulaires de quatre cultures en continu 12:12 indépendantes a été étudiée. Deux populations ont été trouvées : une population majoritaire de petites cellules et une population de cellules plus grandes. La proportion de petites cellules pour chaque culture est listée dans le Tableau II.5.

**Tableau II.5.** Proportion des petites cellules dans quatre cultures en continu (12:12) indépendantes.

Culture en continu N°	Pourcentage de petites cellules (%)
1	63
2	70
3	66
4	69
Moyenne ± écart type	67 ± 3

Ces résultats montrent que le protocole utilisé permet d'obtenir des populations cellulaires de *Chlorella vulgaris* semblables d'une culture à l'autre.

➤ Concentration en chlorophylles *a* et *b*

La concentration en chlorophylles *a* et *b* de quatre cultures en continu ( $D_{0.760} = 0,25$ ) a été déterminée. Les résultats sont reportés dans le Tableau II.6.

**Tableau II.6.** Concentration en chlorophylles *a* et *b* des quatre cultures en continu (12:12) indépendantes.

Culture en continu ( $D_{0.760} = 0,25$ ) N°	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	Chl <i>b</i> ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )
1	1,56	0,44
2	1,45	0,41
3	1,68	0,46
4	1,50	0,39
Moyenne ± écart type	1,55 ± 0,09	0,42 ± 0,03

Les quatre cultures ont des concentrations en chlorophylles *a* et *b* similaires. Le protocole de culture en continu permet d'obtenir des populations cellulaires de *Chlorella vulgaris* semblables sur le plan de leur concentration en pigments chlorophylliens.

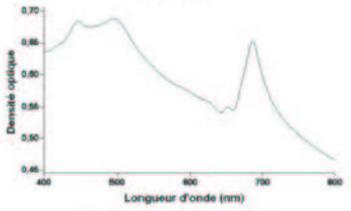
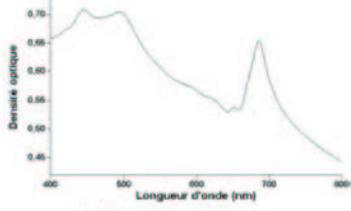
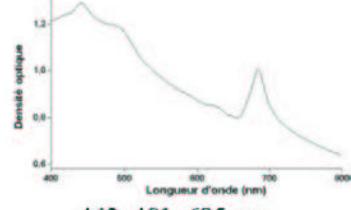
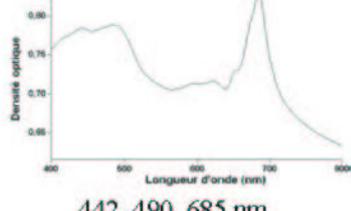
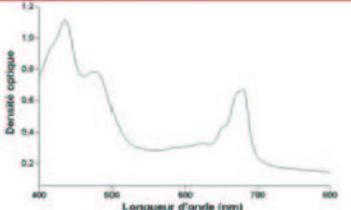
En conclusion, la cytométrie de flux a permis de confirmer que les cellules prélevées après 5 heures d'illumination se situent entre les phases  $D_n$  et  $D\sim L$  (probablement en phase  $D_a$ ). L'activité photosynthétique est maximale entre ces deux phases. De plus, le mode de culture en continu choisi permet d'obtenir des cultures algales reproductibles en termes de répartition en taille de la population cellulaire et de concentration en chlorophylles *a* et *b*.

### **II.3.3 Culture en continu de différentes souches algales**

Les paramètres de culture de CV 11B, CV Lém, SC, SS, CI (Tableau II.7) ont été déterminés empiriquement en se basant sur les paramètres de culture de CV 12. L'ajustement du débit de soutirage, du volume de la culture et de la concentration cellulaire (évaluée avec la densité optique) ont permis d'obtenir des cultures en continu stables pour l'ensemble des souches à l'exception de CI. Cette dernière pousse en colonies de plusieurs centaines de cellules, très difficiles à dissocier. La mesure de la densité optique est, dans ce cas, très imprécise.

L'estimation de la biomasse par la mesure de la densité optique à 760 nm a posé problème pour les souches non axéniques CV Lém et CI. Les bactéries se développant en même temps que les micro-algues CV Lém faussent l'estimation de la biomasse algale réellement présente. Dans le cas de CI, pour de fortes variations de la concentration cellulaire, la variation de la densité optique à 760 nm est faible. Il a donc été décidé de mesurer l'absorption de ces micro-algues au maximum d'absorption de la chlorophylle *a* (685 et 680 nm pour CV Lém et CI respectivement). Cette mesure est représentative de la chlorophylle *a* présente dans les cellules. Si l'on considère que la culture en continu permet d'obtenir des populations cellulaires identiques jour après jour (répartition de la taille et concentration en pigments par cellule identiques), on peut émettre l'hypothèse que la mesure de la densité optique au maximum d'absorption de la chlorophylle *a* est corrélée au nombre de cellules présentes dans la suspension.

Tableau II.7. Paramètres des cultures en continu des différentes souches utilisées.

	Volume de la culture (ml)	Valeur moyenne de la densité optique	Soutirage en ml.h <sup>-1</sup>	Régulation aisée	Spectre d'absorption (représentatif de dix spectres) et maxima relatifs de la densité optique (nm) de chaque souche algale
CV 12 <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/12	300	0,5 à 760 nm	15	Oui	 447, 496, 686 nm
CV 11B <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11B	300	0,5 à 760 nm	13	Oui	 447, 496, 686 nm
CV Lém <i>Chlorella vulgaris</i> du Léman SHL 133-1	400	1 à 685 nm	7	Oui	 442, 491, 685 nm
SC <i>Selenastrum capricornutum</i> CCAP 278/4	300	0,5 à 760 nm	10	Oui	 443, 495, 684 nm
SS <i>Scenedesmus subspicatus</i> CCAP 276/20	400	0,7 à 760nm	6	Oui	 442, 490, 685 nm
CI <i>Chlamydomonas intermedia</i> SHL 113	300	0,7 à 680nm	8	Non	 436, 475, 680 nm

### II.3.4 Immobilisation des micro-algues

Le choix des membranes, servant à l'immobilisation de chaque algue, a été réalisé en plusieurs étapes.

Tout d'abord, une sélection parmi les filtres disponibles au laboratoire (Tableau II.4) a été réalisée afin de tester des filtres dont la porosité est proche de la taille de l'algue à immobiliser. Cependant, les membranes Whatman QM/A et Schleicher & Schull GF 92 font exception. En effet, les porosités de celles-ci n'ont pas été fournies par le fabricant. Ces membranes ont donc été essayées avec les six souches algales.

Ensuite, des tests d'immobilisation ont été effectués en utilisant 20 ml de chaque suspension algale (densité optique de la suspension reportée dans le Tableau II.8). Les membranes semblant offrir une bonne immobilisation (bonne tenue des algues dans la membrane) ont été testées dans le biocapteur afin d'évaluer le relargage éventuel des algues après un fonctionnement du biocapteur de 14 heures. Ce relargage a été évalué de manière très approximative en comparant visuellement une membrane conservée imbibée d'eau et la membrane ayant séjourné dans le biocapteur. Le filtre choisi pour chaque micro-algue est listé dans le Tableau II.8. L'immobilisation de CV Lém n'a pas pu être obtenue de manière satisfaisante. La faible taille des cellules explique ce résultat. Cette souche a donc été abandonnée pour les études réalisées dans le biocapteur.

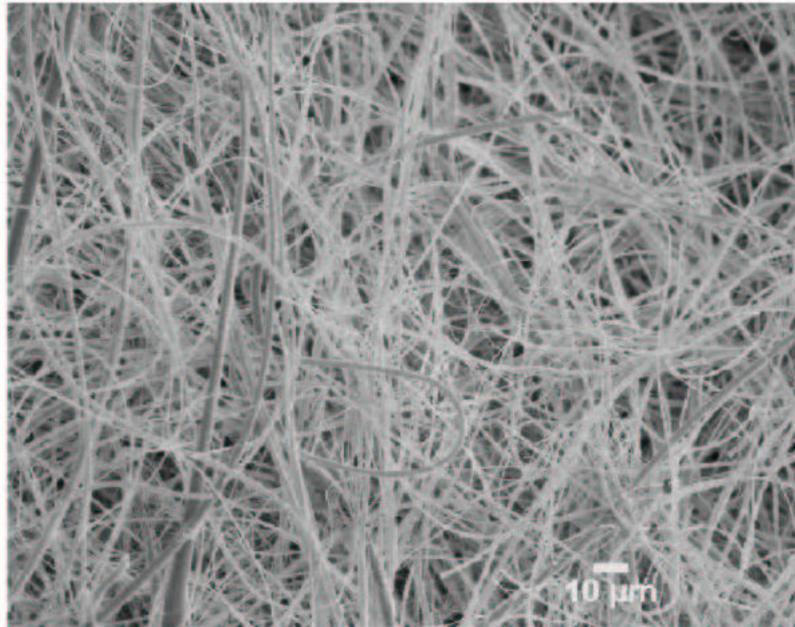
*Tableau II.8. Choix du filtre pour l'immobilisation de chaque souche.*

Souche algale	Densité optique des suspensions algales utilisées lors de l'immobilisation	Filtre choisi	Type de filtre
CV 12	0,25 à 760nm	Whatman QM/A	Fibres de quartz
CV 11B	0,25 à 760nm	Whatman QM/A	Fibres de quartz
CV Lém	0,33 à 685nm *	aucun	-
SC	0,25 à 760nm	S&S GF 92	Fibres de quartz
SS	0,25 à 760nm	S&S GF 92	Fibres de quartz
CI	0,33 à 680nm *	S&S 589/1	Papier

\* le choix de la longueur d'onde a été expliqué au II.3.3. Une suspension de CV12 ayant une densité optique à 760 nm de 0,25 a une densité optique à 685 nm de 0,33. Une densité optique correspondant au maximum d'absorption des chlorophylles a (680 nm pour CI et 685 nm pour CV lém), égale à 0,33, a donc été utilisée pour ces deux souches.

Les filtres composés de fibres de quartz (Figure II.19) semblent particulièrement bien adaptés à l'immobilisation des micro-algues. Celles-ci pénètrent et sont retenues dans le filtre

(filtration en profondeur). La porosité de ces filtres n'est pas adaptée à l'immobilisation de CI car cette souche se présente sous forme de colonies, même après agitation importante au vortex. Le filtre papier a une porosité élevée, il est apparu comme le support d'immobilisation le « moins mauvais ». Cependant, il est important de remarquer que le rendement de fixation de CI est très inférieur à celui obtenu pour les autres algues.



*Figure II.19. Filtre Whatman QM/A vu en microscopie à balayage.*

## II.4 CONCLUSION

Outre leur utilisation dans des applications industrielles, les micro-algues peuvent servir de bio-indicateur révélant la présence de substances toxiques dans un milieu aquatique.

Au cours de ce chapitre, la biologie des micro-algues a été présentée, en particulier la photosynthèse et la fluorescence chlorophyllienne, paramètres essentiellement mis en œuvre par notre biocapteur.

Les résultats obtenus avec des cultures en batch de *Chlorella vulgaris* (évaluation de la biomasse, spectre d'absorption) nous ont amenés à cultiver ces micro-algues dans des cultures en continu. Ce mode de culture présente de nombreux avantages :

- préparation et maintien de la culture moins consommateurs de temps que la mise en place répétée de plusieurs cultures en batch.
- reproductibilité d'une culture à l'autre.
- répétabilité d'un jour à l'autre de l'état physiologique des micro-algues.
- cellules ayant une activité photosynthétique importante.

L'ensemble de ces avantages nous a conduits à opter pour le même mode de culture pour d'autres souches de micro-algues.

Une étude sur l'immobilisation de ces micro-organismes a permis de définir la membrane à utiliser pour incorporer ces différents biorécepteurs dans le biocapteur que nous allons maintenant présenter.

**CHAPITRE III**  
**BIOCAPTEUR A CELLULES ENTIERES FONDE SUR LA**  
**FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE**



### III.1 INTRODUCTION

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressés à la conception et à la mise au point d'un biocapteur ayant un fonctionnement optimal en flux continu. Ce biocapteur doit répondre aux spécifications décrites dans le Tableau I.2. Il est destiné à être installé sur site pour effectuer la surveillance en ligne et en continu d'un effluent industriel, d'une rivière, d'un captage d'eau.

L'obtention et l'utilisation de cellules algales issues de cultures en continu a été la première étape dans la mise au point de ce biocapteur capable de détecter des polluants présents dans une solution. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre II, ces cellules ont une activité photosynthétique importante, ce qui est favorable à la détection de toxiques perturbant le fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

La seconde étape de ce travail a été la conception et la mise au point du biocapteur. Le travail effectué par Martine Naessens (1998) a été le point de départ de ce travail. *Chlorella vulgaris* a été la souche principalement utilisée au cours de ce développement.

Enfin, l'évaluation des performances du biocapteur pour détecter différents polluants et en utilisant différents biorécepteurs constitue l'étape de validation du biocapteur.

### III.2 DEVELOPPEMENT DU BIOCAPTEUR

#### **III.2.1 Conception du biocapteur**

Au cours de sa thèse, Martine Naessens (1998) a développé un biocapteur fondé sur la mesure de la fluorescence de membranes de *Chlorella vulgaris*. Ce biocapteur a été conçu pour un fonctionnement optimal en mode batch. Les principales caractéristiques de celui-ci sont : le changement rapide de la membrane supportant le biorécepteur, l'intégration d'une unique membrane dans la cellule de mesures, le faible volume mort de cette cellule.

Le fonctionnement optimal en flux continu du biocapteur impose quelques contraintes concernant :

- la robustesse et l'étanchéité de la cellule de mesures.
- la nécessité d'une période d'obscurité pour effectuer la mesure de la cinétique lente de l'induction de la fluorescence.
- une fréquence d'échantillonnage suffisamment importante.
- la représentativité statistique et écotoxicologique de l'information obtenue.

L'étanchéité de la cellule de mesures doit être satisfaisante pour que celle-ci reste remplie de liquide tout au long de l'expérience (plusieurs heures), ce que ne permettait pas le biocapteur de Martine Naessens (1998). En effet, le biocapteur doit être ouvert et refermé un grand nombre de fois afin de le nettoyer et de préparer une nouvelle expérience. Il est donc nécessaire de concevoir un outil robuste et dont l'étanchéité peut être obtenue d'une façon simple.

L'incubation des algues à l'obscurité pendant plusieurs minutes avant la mesure de cinétique d'induction de la fluorescence chlorophyllienne limite le nombre de mesures réalisables dans un biocapteur à cellule unique (une mesure toutes les 10 à 15 minutes par exemple lors de l'étude de Martine Naessens).

Le futur biocapteur devra pouvoir servir de système d'alarme *in situ* et en continu. Le nombre de mesures fournies par unité de temps (fréquence d'échantillonnage) devra être suffisamment important pour assurer une surveillance efficace et susceptible d'aboutir au déclenchement d'un signal d'alarme dans un délai raisonnable, lors d'une pollution. Concrètement, nous avons estimé qu'un temps de réponse inférieur à une heure est acceptable pour ce type d'application. De plus, l'utilisation d'une seule membrane dans le biocapteur pose le problème de la fiabilité et de la représentativité statistique de la mesure obtenue. A ce problème s'ajoute la représentativité écotoxicologique d'un système mono-membrane et, par conséquent, ne comportant qu'une seule souche algale.

En hiérarchisant ces contraintes, les représentativités statistiques et écotoxicologiques de la mesure obtenue ont retenu notre attention. Nous avons donc cherché à concevoir un biocapteur capable de répondre en priorité à cette problématique, tout en étant compatible avec les contraintes concernant le cycle de mesures de la fluorescence des micro-algues, l'échantillonnage, la robustesse et l'étanchéité de la chambre de mesures.

Le concept d'un biocapteur, comportant un plateau rotatif sur lequel cinq membranes peuvent être immobilisées, a émergé. En tournant d'un cinquième de tour, la fluorescence de chaque membrane serait mesurée pendant un temps déterminé, tandis que les autres membranes seraient incubées à l'obscurité. Mais la présence d'un plateau rotatif implique un risque accru de fuite. Cependant, le biocapteur n'étant pas destiné à effectuer un travail sous pression, l'utilisation d'un joint torique devrait permettre d'assurer une étanchéité satisfaisante et durable. La réalisation d'un biocapteur fondé sur ce concept est abordée dans le paragraphe III.4.2.1.

### III.2.1 Signal issu de la membrane algale

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, la mesure de la cinétique lente de la fluorescence chlorophyllienne est un moyen permettant de suivre l'évolution de l'activité photosynthétique d'un micro-organisme et, par conséquent, de détecter la présence d'éléments perturbant cette activité.

L'intensité de la réponse du biocapteur est variable selon le composé étudié. L'évolution de l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne est soit à la hausse, soit à la baisse (Tableau III.1) selon l'action des toxiques sur l'appareil photosynthétique et le métabolisme cellulaire.

Une augmentation du signal de fluorescence est observée lorsque le toxique bloque le flux d'électrons de l'appareil photosynthétique. C'est le cas des herbicides anti-PSII. Lors du fonctionnement normal de la chaîne photosynthétique, les chlorophylles dans un état excité transmettent l'énergie lumineuse captée à la chaîne de transporteurs d'électrons de l'appareil photosynthétique. Lors d'un blocage du flux d'électrons de la chaîne photosynthétique, les chlorophylles retournent à un état stable par émission de fluorescence. Ce blocage du flux d'électrons a pour conséquence l'arrêt de la synthèse d'ATP et de la réduction de  $\text{NADP}^+$  en NADPH.

Une diminution du signal de fluorescence est observée lorsque des toxiques, par exemple les détergents, provoquent une dégradation partielle ou complète des membranes, en particulier celles des thylakoïdes. L'organisation de l'appareil photosynthétique est alors profondément altérée, ce qui empêche son fonctionnement. Certains produits, nommés découplants, perméabilisent les membranes aux protons et diminuent, eux aussi, la fluorescence chlorophyllienne. Ce cas particulier sera abordé au paragraphe II.4.3.3.

**Tableau III.1.** Evolution du signal en fonction de l'effet du toxique sur la cellule algale.

Variation du signal de fluorescence provenant du PSII	Effet du toxique à l'origine de cette variation du signal
augmentation	blocage du flux d'électrons
diminution	destruction de l'architecture membranaire, perméabilisation des membranes aux protons, cas particulier des découplants (cf. II.4.3.3)

### III.3 MATERIELS ET METHODES

#### III.3.1 Réactifs

Le Tableau III.2 présente les différents composés dont la toxicité a été évaluée grâce au biocapteur, leur origine et le solvant utilisé pour les dissoudre.

**Tableau III.2.** Liste et informations sur les toxiques testés.

Types de polluants	Nom du composé	Fournisseur	Solvant utilisé pour la dissolution des composés lors de la préparation des solutions stocks *	
Herbicides	Atrazine	Riedel-de Haën	Ethanol	
	Simazine			
	Diuron			
	Isoproturon			
	Découplants et anti-PSII			DNOC (dinitro- <i>o</i> -crésol)
	Ioxynil			
	Bromoxynil			
Métabolites de dégradation de l'atrazine	Désisopropyl-atrazine		Pas de solution stock, préparation directe des solutions tests	
	Déséthyl-atrazine			
	2-hydroxy-atrazine			
	Désisopropyl-2-hydroxy-atrazine			
Dérivés phénoliques	Phénol	Carlo Erba	Eau	
	3-chlorophénol	Fluka	Ethanol	
	4-chlorophénol			
	Pentachlorophénol	Aldrich		
	<i>p</i> -crésol			
Métaux lourds	Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Merck		Eau
	CuSO <sub>4</sub>			
	HgCl <sub>2</sub>			
Détergents	DBS	Sigma		
	SDS			
	Triton X 100			

\* Les solutions stocks sont diluées extemporanément. La concentration finale en éthanol dans la solution test ne dépasse jamais 1%. A cette concentration, l'éthanol seul n'induit aucune réponse de la part des micro-algues.

### III.3.2 Appareillage

L'appareillage et l'équipement nécessaires au développement et à la mise au point du biocapteur algal sont :

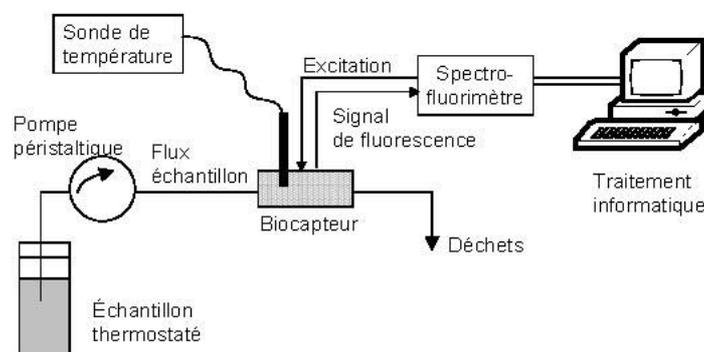
- ◆ Pompe Reglo, Ismatec programmable.
- ◆ Tuyaux manifold en Tygon<sup>®</sup> d'un diamètre interne 1,14 mm.
- ◆ Tuyau en téflon de 1 mm de diamètre.
- ◆ Cryothermostat Lauda E300.
- ◆ Flacon à double enveloppe.
- ◆ Sonde de température Checktemp2 (Hanna Instruments).
- ◆ Spectrofluorimètre Spex Fluorolog-2 dont les caractéristiques techniques sont regroupées dans le Tableau III.3.

**Tableau III.3.** Données techniques disponibles concernant le spectrofluorimètre Spex Fluorolog-2.

<b>Spectrofluorimètre Spex Fluorolog-2 F111</b>		
Source	lampe xénon 150 W	
Monochromateurs : excitation et émission	1 seul réseau de diffraction par monochromateur de 1200 rainures.mm <sup>-1</sup>	
Bande passante	variable de 0,95 à 18,85 nm	
Détecteur	photomultiplicateur R928 Hamamatsu refroidi par effet Peltier	
Constructeur de la fibre optique formant un faisceau bifurqué randomisé de brins	Spex	
Spécifications techniques de la fibre optique	Longueur totale	1 mètre
	Nature	silice/silice
	Côté source	diamètre 3 mm
	Côté détecteur	diamètre 3 mm
	Côté échantillon	diamètre 4,5 mm
Logiciel d'acquisition	DATAMAX <sup>®</sup> (adaptation de GRAMS/32)	

La Figure III.1 présente le montage utilisé lors des expériences réalisées sur le biocapteur algal. L'échantillon est placé dans une enceinte à double enveloppe dont la température est contrôlée par un thermocryostat. Une pompe péristaltique permet le transport de l'échantillon jusqu'au biocapteur dont la température interne est contrôlée. Le spectrofluorimètre permet la mesure de la fluorescence chlorophyllienne des membranes

algales à l'aide d'une fibre optique. Les données sont stockées au moyen d'un micro-ordinateur.



**Figure III.1.** Schéma du montage utilisé pour le développement et l'optimisation du biocapteur.

### III.3.3 Méthodes

#### III.3.3.1 Spectres d'excitation et d'émission de la fluorescence

Ces spectres sont réalisés sur des cellules immobilisées dans des membranes dans le biocapteur. Les spectres d'excitation sont réalisés pour des longueurs d'onde allant de 360 à 650 nm, la fluorescence de l'algue est collectée à 683 nm. Les spectres d'émission sont réalisés pour des longueurs d'onde allant de 550 à 800 nm, la longueur d'onde d'excitation est choisie au maximum d'excitabilité déterminé avec le spectre d'excitation.

#### III.3.3.2 Expérience type

Après le soutirage et l'immobilisation des micro-algues et la découpe à l'emporte-pièce des membranes décrites dans le chapitre II, ces petites membranes sont fixées dans le biocapteur.

Le milieu de référence (sans toxique) circule dans le biocapteur pendant 14 heures afin d'obtenir un signal stable. Puis, le toxique est incorporé au flux et la variation du signal est mesurée. Les conditions standards sont : milieu de référence = tampon phosphate (10 mM ; pH 7), température = 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

### III.3.3.3 Caractéristiques du biocapteur

#### a) Répétabilité et réversibilité de l'action d'un toxique

La répétabilité de la détection de  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine est évaluée en faisant circuler le milieu échantillon contenant le polluant pendant 1 heure, puis en rinçant le capteur avec un flux de tampon phosphate (10 mM ; pH 7) pendant 2 heures afin de revenir au signal de référence. Ce cycle est ensuite renouvelé. La mesure de chaque réponse du biocapteur à l'atrazine permet de déterminer la répétabilité.

Ce protocole est identique à celui utilisé pour déterminer la réversibilité de l'action d'un toxique donné, à une concentration fixée, sur les micro-algues.

#### b) Effet de la charge algale

Cinq membranes algales sont préparées en utilisant 5, 10, 20, 50 et 100 ml d'une suspension algale ( $\text{Do}_{760} = 0,25$ ), ce qui correspond à environ 1,5 ; 3 ; 6 ; 15 et 30 millions de cellules immobilisées par membrane de 8 mm de diamètre. Ces cinq membranes sont testées simultanément dans le biocapteur. Une solution de tampon phosphate (10 mM ; pH 7) est utilisée comme solution de référence. La température et le débit de travail sont fixés respectivement à  $20^\circ\text{C}$  et à  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

#### c) Effet de la température et du pH

La température du flux porteur est contrôlée grâce à un cryothermostat. Un échangeur thermique a été ajouté juste avant l'entrée du flux dans le biocapteur afin d'éviter le refroidissement ou le réchauffement du liquide lors du transport. Chaque expérience permet de déterminer la réponse du biocapteur à 50 et  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine à une température donnée. Celle-ci varie entre 10 et  $30^\circ\text{C}$ . Une solution de tampon phosphate (10 mM ; pH 7) est utilisée comme solution de référence. Le débit de travail est fixé à  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

Quatre solutions tampons (10 mM) permettent de couvrir une gamme de pH allant de 3 à 10 : tampon citrate-phosphate (pH 3 à 5), tampon phosphate (pH 6 à 8), tampon acide borique-borax (pH 9), tampon borax-NaOH (pH 10). Chaque expérience permet de déterminer la réponse du biocapteur à 50 et  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine à un pH donné. La température et le débit de travail sont fixés respectivement à  $20^\circ\text{C}$  et à  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

#### *d) Temps de réponse*

Le temps de réponse du biocapteur (95% de la réponse maximale) a été mesuré en réalisant une expérience de répétabilité de la réponse à  $50 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine, en changeant le débit à chaque injection de polluant. Les débits testés sont : 2, 4, 6, 8,  $10 \text{ ml.min}^{-1}$ .

#### *e) Durée de vie en fonctionnement et conservation des membranes en stockage*

La durée de vie du biocapteur est une expérience type, prolongée pendant 27 jours. Le flux porteur est de l'eau de Volvic à  $20^\circ\text{C}$ . Chaque jour, un flux d'eau de Volvic contenant  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine circule pendant une heure afin de déterminer la réponse quotidienne du biocapteur. Un flux d'eau de Volvic non polluée pendant 23 heures permet le rinçage du biocapteur.

Cinq méthodes de conservation des membranes, exposées dans le paragraphe III.4.2.9, sont testées. Après une période de conservation de 0, 15, 30, 60 et 120 jours, une expérience type est réalisée afin de mesurer la réponse des différentes membranes à 50 et  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine dans de l'eau de Volvic à  $20^\circ\text{C}$ .

### III.3.3.4 Analyse HPLC d'un échantillon issu d'un pilote de biodégradation

Le comportement du biocapteur algal a été évalué vis-à-vis d'un mélange complexe. Ce mélange est un échantillon provenant d'un pilote (bioréacteur) réalisant une biodégradation de produits phytosanitaires d'effluents viticoles. Nous avons réalisé une analyse en chromatographie liquide haute performance (HPLC) de cet échantillon dans le but de déterminer sa composition.

L'appareil utilisé est une chaîne HPLC Waters. Le détecteur PDA (« photo diode array ») permet l'acquisition en continu de spectres d'absorption de 210 nm à 400 nm. Le volume de la solution à analyser est de  $20 \mu\text{l}$ . Une colonne HPLC Novo-Pack C18 ( $4 \mu\text{m}$ ), d'un diamètre de 3,9 mm et d'une longueur de 300 mm, est utilisée pour séparer et analyser les produits présents dans l'échantillon.

Les éluants sont l'eau et l'acétonitrile (ACN). Ils sont dégazés et thermostatés à  $35^\circ\text{C}$  avant leur passage dans la colonne de façon à obtenir des temps de rétention reproductibles.

La programmation du gradient d'élution utilisée est la suivante :

- 50% eau – 50 % ACN pendant 1 minute, puis une montée linéaire de 30 minutes jusqu'à 0 % eau-100 % ACN.
- Le flux d'ACN pur se prolonge pendant 20 minutes.

Dix huit étalons (Riedel de Haën) présentés en Annexe 4 ont été utilisés pour calibrer l'appareil. L'intégration de l'aire de chaque pic obtenu a été réalisée au maximum d'absorption de chaque composé dosé. L'identification des produits détectés dans l'échantillon a été effectuée sur la base du temps de rétention et du spectre d'absorption de chaque produit détecté.

### III.3.3.5 Biocapteur multi-biorécepteur

La culture et la préparation des membranes pour chaque souche sont décrites dans le chapitre II.

#### *a) Temps de réponse*

Les temps de réponse du biocapteur pour chaque souche algale utilisée (95% de la réponse maximale) ont été mesurés en réalisant une expérience de répétabilité de la réponse (paragraphe III.3.3.3 a) à  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine et de diuron, en utilisant un débit de  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

#### *b) Réponse des différentes micro-algues à l'atrazine et au diuron*

La méthode décrite au paragraphe III.3.3.2 a été utilisée. Trois concentrations en polluant ont été utilisées : 4, 100 et  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$ .

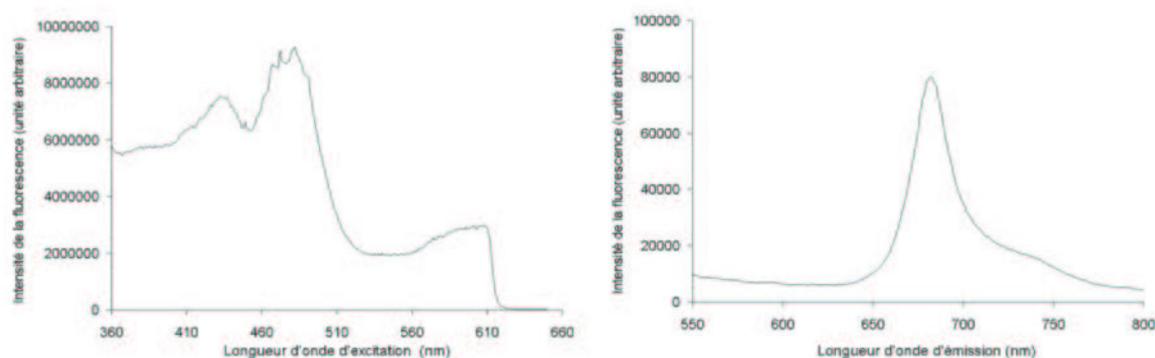
### III.4 RESULTATS ET DISCUSSION

Avant toute mesure dans le biocapteur, il est nécessaire de déterminer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission qui vont être utilisées pour mesurer la fluorescence émise par les membranes algales.

#### III.4.1 Détermination des longueurs d'onde expérimentales pour la mesure de la fluorescence chlorophyllienne

##### III.4.1.1 *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12

L'optimisation des longueurs d'onde d'excitation et d'émission permet d'obtenir le meilleur signal en terme d'intensité mesurée.



**Figure III.2.** Spectres d'excitation (à gauche) ( $\lambda_{\text{émission}} = 683 \text{ nm}$ ) et d'émission (à droite) d'une membrane contenant *Chlorella vulgaris* ( $\lambda_{\text{excitation}} = 482 \text{ nm}$ ) (résultats représentatifs de spectres obtenus avec trois membranes algales différentes). Conditions : membrane algale contenant  $6 \times 10^6$  cellules issues d'une culture en continu de *Chlorella vulgaris* (photopériode de 12 h, 1500 lux, 20°C,  $DO_{760}$  moyenne = 0,5).

La longueur d'onde d'excitation optimale est déterminée en mesurant l'émission à 683 nm. Le spectre d'excitation comporte trois pics à 433, 482 et 607 nm. La longueur d'onde où l'excitation est maximale est 482 nm. Elle correspondrait à la bande Soret d'absorption de la chlorophylle *b* du PSII (Hipkins et Baker, 1986). Cette longueur d'onde est utilisée pour la suite des expériences réalisées avec *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12.

La longueur d'onde d'émission optimale est déterminée en utilisant une longueur d'onde d'excitation égale à 482 nm. Le spectre d'émission comporte un pic majeur à 683 nm et un épaulement vers 740 nm. Ce pic à 683 nm correspond à la fluorescence du PSII et l'épaulement est attribuable à la fluorescence du PSI (Rabinowitch et Govindjee, 1969). La mesure de la fluorescence se fera donc par la suite à 683 nm.

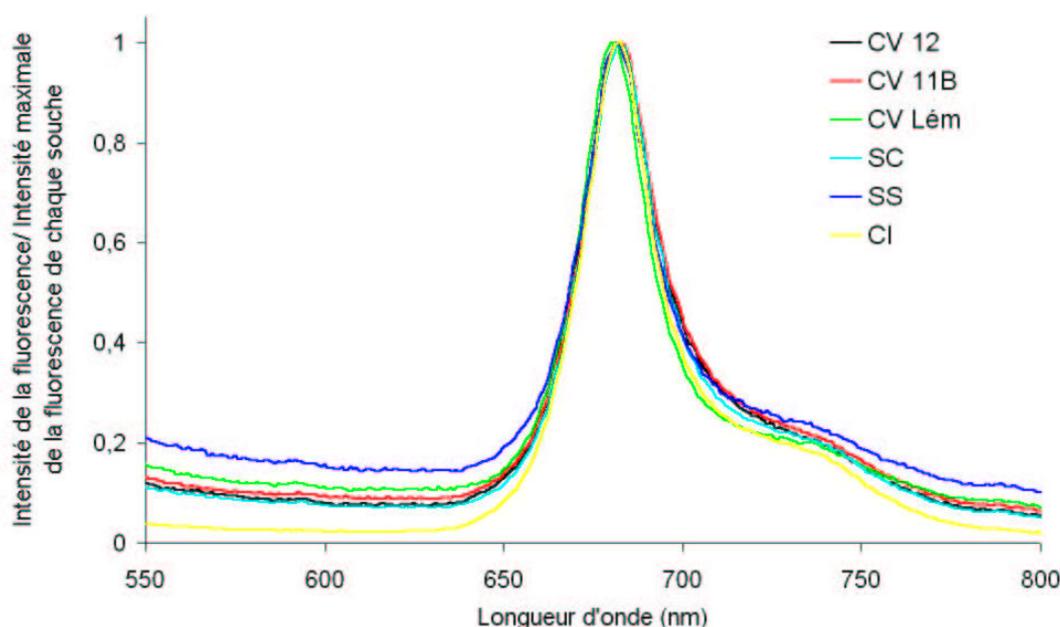
Il est intéressant de remarquer que le choix de la longueur d'onde d'excitation modifie légèrement le spectre d'émission. En effet, si la longueur d'onde d'excitation est fixée à 420 nm, l'épaule à 740 nm est plus importante, par rapport au pic à 683 nm, que lorsque la longueur d'onde d'excitation est fixée à 480 nm (Rabinowitch et Govindjee, 1969). Ce phénomène s'explique par les différences spectrales d'absorption de la chlorophylle *a* au sein des deux photosystèmes : une partie de la chlorophylle *a* absorbant *in vivo* à 420 nm est liée au PSI, ainsi qu'à la présence de chlorophylle *b* dans le PSII et à son absence dans le PSI.

#### III.4.1.2 Choix du compromis pour la mesure de la fluorescence chlorophyllienne de plusieurs micro-algues utilisées simultanément

L'utilisation de plusieurs souches dans le biocapteur impose de trouver un compromis acceptable pour le choix des longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

##### a) Spectres d'émission

Les spectres d'émission de l'ensemble des souches diffèrent très peu (Figure III.3).

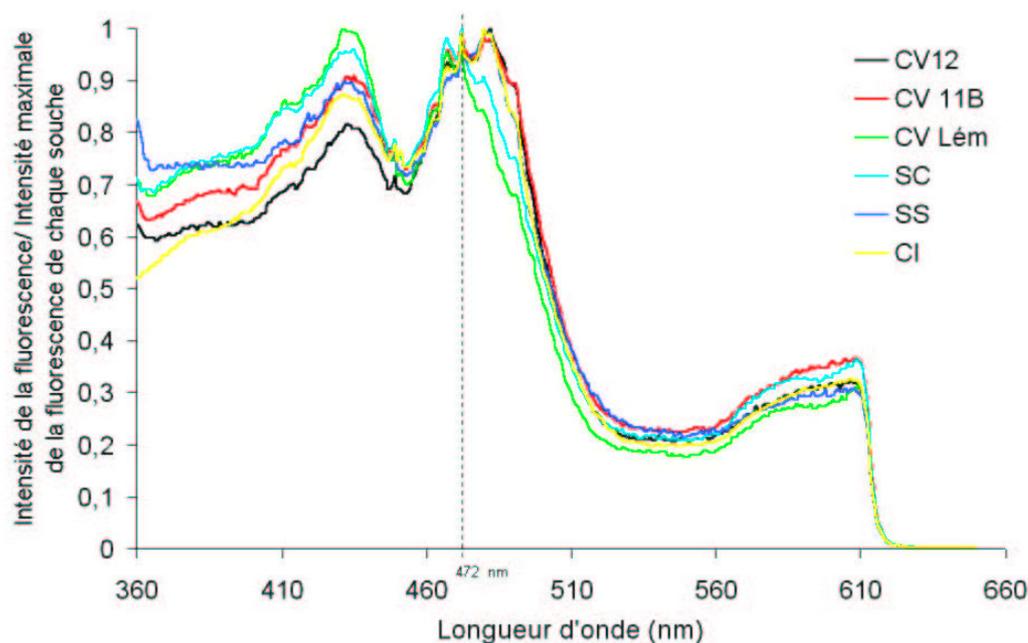


**Figure III.3.** Spectres d'émission des souches utilisées ( $\lambda_{excitation} = 472 \text{ nm}$ ). L'intensité de la fluorescence a été rapportée à l'intensité maximale de la fluorescence (émission maximale) obtenue pour chaque souche (résultats représentatifs de spectres obtenus avec trois membranes algales différentes pour chaque souche). Conditions : membranes contenant des cellules algales issues de cultures en continu (photopériode de 12 h, 1500 lux, 20°C).

Les six spectres d'émission des différentes souches se superposent pratiquement parfaitement. Nous avons décidé de mesurer l'émission fluorescente à 683 nm pour l'ensemble des souches.

### b) Spectres d'excitation

Les spectres d'excitation des différentes souches (Figure III.4) diffèrent beaucoup plus entre eux que les spectres d'émission.



**Figure III.4.** Spectres d'excitation des souches utilisées ( $\lambda_{\text{émission}} = 683 \text{ nm}$ ). L'intensité de la fluorescence a été rapportée à l'intensité maximale de la fluorescence (excitation maximale) obtenue pour chaque souche (résultats représentatifs de spectres obtenus avec trois membranes algales différentes pour chaque souche). Conditions : membranes contenant des cellules algales issues de cultures en continu (photopériode de 12 h, 1500 lux, 20°C).

Il est nécessaire de choisir une longueur d'onde d'excitation qui ne défavorise pas une souche au profit d'une autre. Le meilleur compromis se situe à 472 nm. En effet, à cette longueur d'onde la perte de signal d'émission de fluorescence mesuré par rapport au signal obtenu avec le maximum d'excitation pour chaque souche est au maximum de 3% (Tableau III.4).

**Tableau III.4.** Maximum d'excitation pour chaque souche et perte de signal d'émission de fluorescence pour chaque souche algale si la longueur d'onde d'excitation est fixée à 472 nm.

Souche algale	Maximum d'excitation (nm)	Perte relative du signal d'émission de fluorescence lorsque la longueur d'onde d'excitation est fixée à 472 nm par rapport au signal obtenu lorsque le maximum d'excitation est utilisé (%)
CV 12	482	1
CV 11B	472	0
CV Lém	431	3
SC	472	0
SS	480	2
CI	480	1

Le couple optimal de longueurs d'onde lors de l'utilisation simultanée des différentes souches algales est  $\lambda_{\text{excitation}} = 472 \text{ nm} / \lambda_{\text{émission}} = 683 \text{ nm}$ .

### III.4.2 Optimisation et caractéristiques de la réponse du biocapteur utilisé avec *Chlorella vulgaris*

L'atrazine est un herbicide anti-PSII dont le mécanisme d'action, bien connu, repose sur le blocage du transport d'électrons dans la chaîne photosynthétique. Elle est principalement utilisée dans les cultures de maïs. C'est une molécule modèle très souvent citée dans la bibliographie, dans des études d'écotoxicologie sur les micro-algues. Solomon *et al.* (1996) ont observé des variations saisonnières de la concentration en atrazine dans des eaux de surface. Par exemple, Hall *et al.* (1993) ont mis en évidence, dans un bassin-versant, une concentration de 43  $\mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine en mai, cette concentration a ensuite diminué rapidement en juin pour atteindre 1,8  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Un biocapteur, utilisé *in situ* et en continu, permettrait un suivi de ces évolutions.

L'ensemble de ces données nous a conduits à utiliser l'atrazine comme toxique modèle pour la mise au point et l'optimisation du biocapteur.

#### III.4.2.1 Le biocapteur

##### III.4.2.1.1 Eléments constituant le biocapteur

La cellule de mesures (Figure III.5 et Figure III.6) a été réalisée en Delrin<sup>®</sup> POM (polyoxyméthylène) noir (DuPont). Ce matériau, facile à usiner, a une bonne résistance mécanique à la température et aux pH acides et basiques.

Cette cellule de mesures se compose de deux parties :

- le support rotatif où sont placées cinq membranes algales qui se fixent à l'aide de petits clips.
- le support fixe dans lequel est maintenue la fibre optique qui permet la collecte de l'émission fluorescente issue de la membrane.

L'étanchéité entre ces deux pièces est assurée par un joint torique. Le volume de la chambre de mesures est de 10 ml. La distance entre la fibre optique et la membrane algale est fixée à 3 millimètres. Le faisceau de la lumière incidente couvre alors complètement la surface de la membrane algale, ainsi la fluorescence recueillie provient de l'ensemble de la membrane. De plus, cet espace permet la circulation du flux échantillon entre la fibre et la membrane.

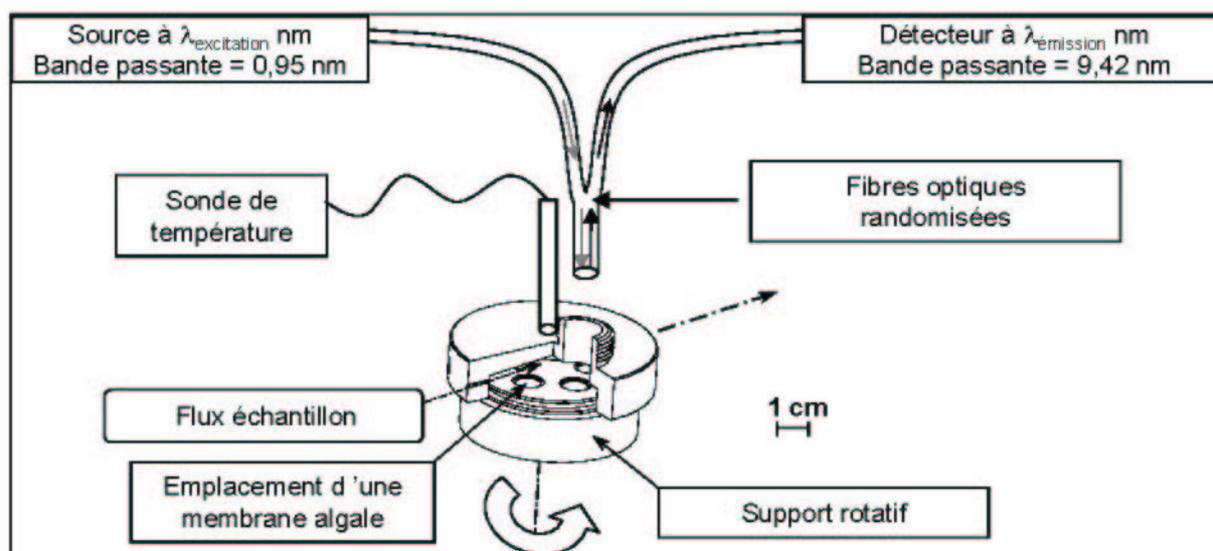


Figure III.5. Schéma du montage expérimental intégrant le biocapteur à multi-membranes.

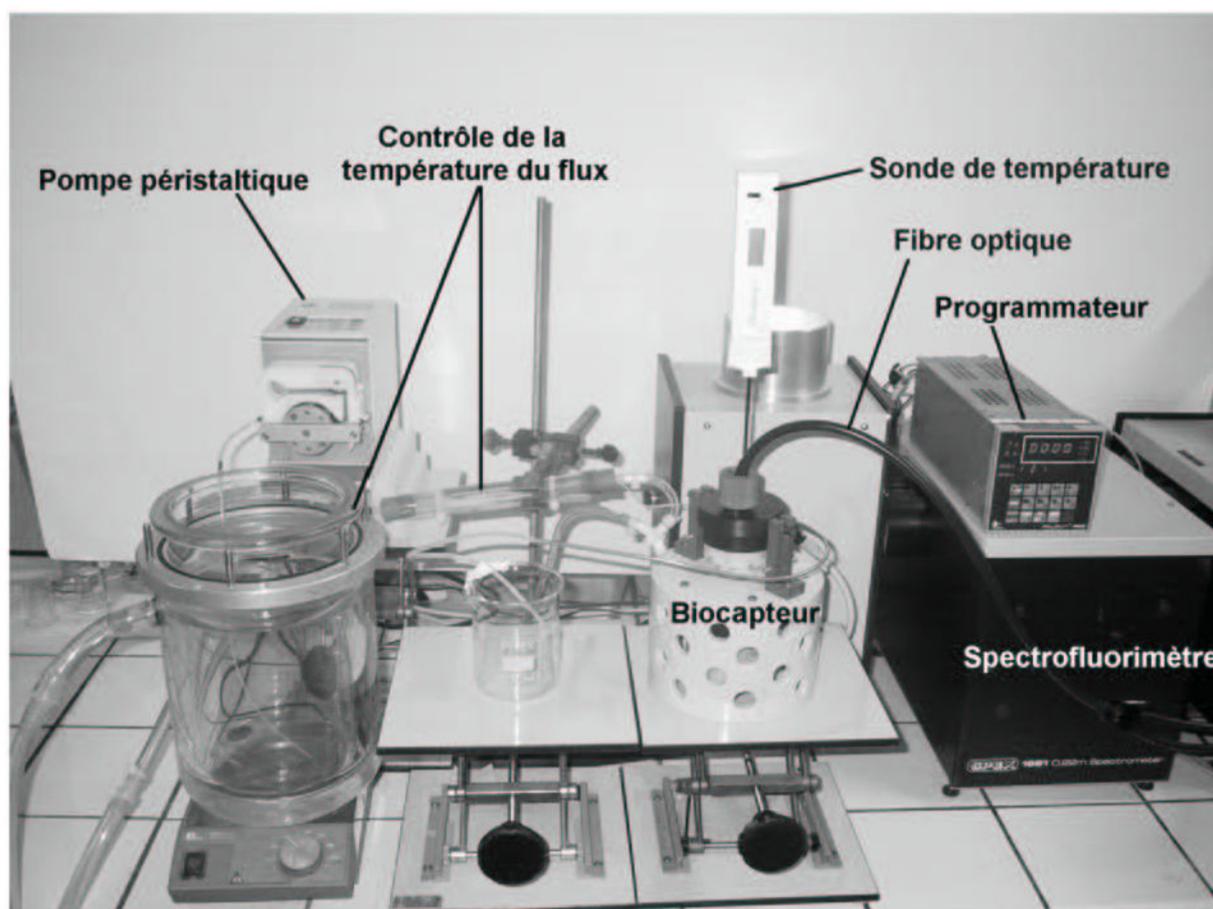


Figure III.6. Photographie du montage comportant le biocapteur algal pour le dosage de polluants dans un flux porteur.

#### III.4.2.1.2 Fonctionnement du biocapteur

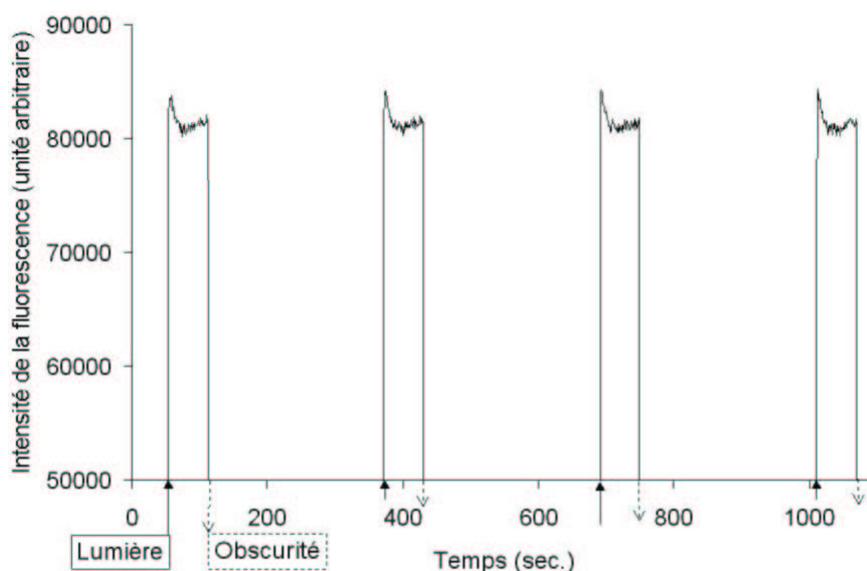
Les cinq membranes algales sont fixées sur le support rotatif. La partie fixe (supérieure) du biocapteur est mise en place sur ce même support. La chambre de mesures est remplie du milieu de référence. La fibre optique et la sonde de température sont mises en place sans introduire de bulles d'air. Un programmateur électronique pilote un moteur électrique qui permet la rotation du support mobile. Ce support réalise une rotation d'un cinquième de tour toutes les minutes. Chaque membrane subit donc un cycle de deux phases : une minute de mesures de la fluorescence chlorophyllienne, puis une période d'obscurité de 4 minutes. Ainsi, lorsque l'une d'elles est en phase de mesure, les quatre autres sont à l'obscurité jusqu'à la prochaine rotation du support. Tout au long de ce cycle de mesures, elles sont en contact avec le flux porteur comportant ou non un toxique.

#### III.4.2.1.3 Signal expérimental obtenu

Comme nous l'avons vu au moment de la conception du biocapteur, l'utilisation de plusieurs membranes permet une amélioration de la représentativité statistique et/ou écotoxicologique selon l'utilisation d'une souche ou de plusieurs souches algales.

Il est cependant nécessaire de trouver un compromis conciliant la nécessité d'une période d'obscurité pour la mesure de la cinétique de fluorescence lente et la fréquence d'échantillonnage de la mesure.

En appliquant un cycle de 1 min de mesures / 4 min d'obscurité et une période de stabilisation (cf. III.4.2.3.a), un signal d'induction de la fluorescence répétable est obtenu (Figure III.7) où l'on distingue un maximum atteint dès le début de la mesure, assimilable à un résidu du niveau P, puis une quasi-stabilisation du signal assimilable au niveau T. Le niveau maximal de la fluorescence P est atteint lorsque les accepteurs d'électrons  $Q_A$  et PQ sont réduits (cf. II.1.4.2.). Le niveau T correspond au régime stationnaire atteint, lorsque l'ensemble de la photosynthèse se déroule, ce qui comprend le transfert complet des électrons dans la chaîne photosynthétique, la production d'ATP et l'assimilation du  $CO_2$ .

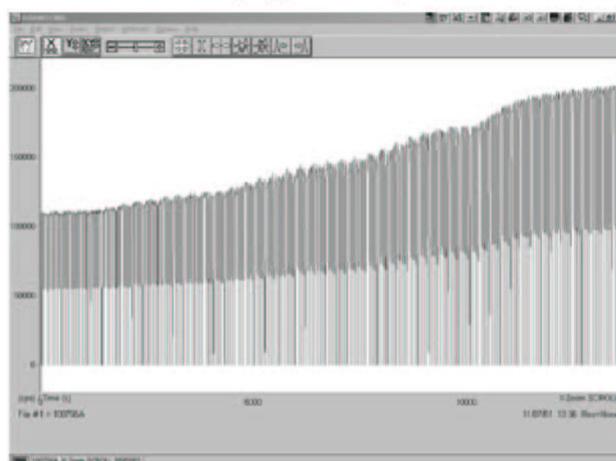


**Figure III.7.** Signal expérimental de la cinétique lente d'induction de la fluorescence issu d'une membrane algale. La fluorescence est mesurée pendant une minute puis la membrane est à l'obscurité pendant 4 minutes.

Ce cycle de mesures est compatible avec la mesure de la cinétique d'induction lente de la fluorescence chlorophyllienne et permet son suivi pour chaque membrane, avec une fréquence d'échantillonnage (12 mesures par heure) compatible avec la fonction de système d'alarme envisagée pour ce biocapteur.

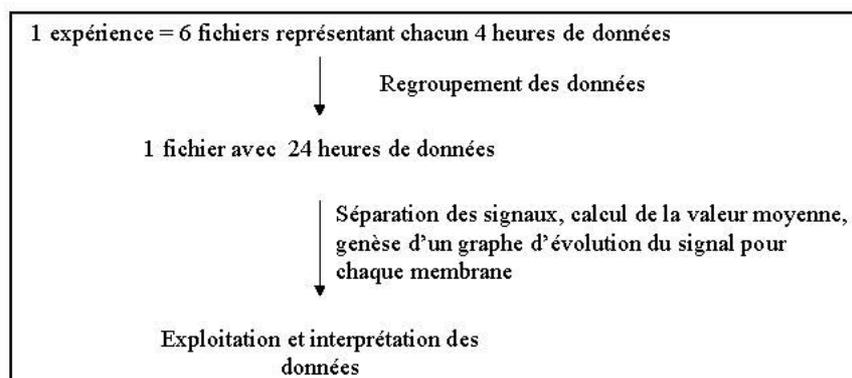
#### III.4.2.2 Traitement du signal

Le signal brut obtenu à partir du spectrofluorimètre se présente sous forme d'une succession de signaux de soixante secondes (Figure III.8).



**Figure III.8.** Exemple de signal brut obtenu directement à partir du spectrofluorimètre. Le signal des cinq membranes de charge identique augmente avec des concentrations croissantes en atrazine.

Il faut traiter ces signaux afin d'attribuer l'origine de chacun à chaque membrane. Une macro-commande Excel a été développée afin de réaliser cette tâche très répétitive et nécessitant un nombre important de calculs. En effet, une expérience représente environ 90000 mesures, car, le spectrofluorimètre mesure et enregistre le niveau de la fluorescence avec une fréquence d'échantillonnage d'une valeur du signal par seconde. Le principe de ce traitement est détaillé dans la Figure III.9.



**Figure III.9.** Principe de la macro-commande Excel qui permet un prétraitement des données brutes issues du spectrofluorimètre.

La valeur moyenne du niveau de la fluorescence de chaque cinétique d'induction mesurée durant une minute est calculée afin de limiter la quantité d'informations à traiter, tout en restant représentatif des étapes se déroulant lors de cette cinétique.

#### III.4.2.3 Stabilisation du signal et influence des concentrations d'atrazine sur la réponse du biocapteur

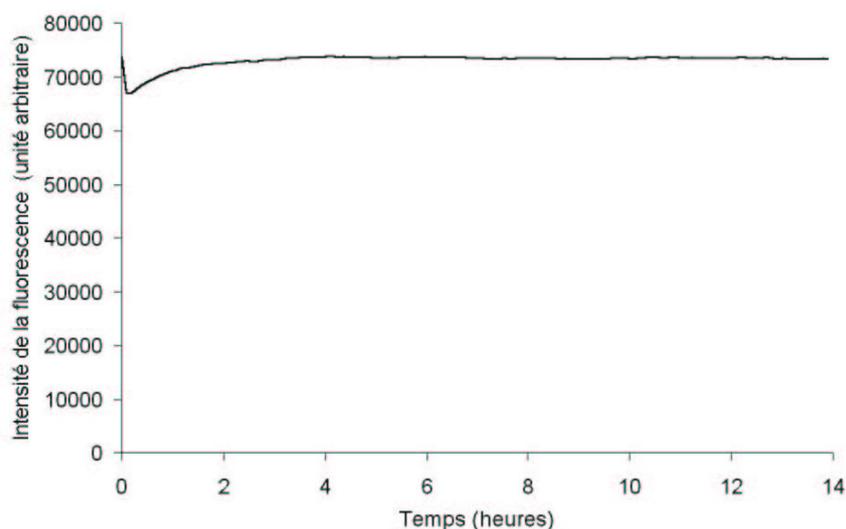
##### a) Stabilisation du signal

La détection de faibles quantités de polluant nécessite une stabilisation du signal de fluorescence.

L'intensité de la fluorescence d'une membrane algale évolue fortement les quatre premières heures après sa mise en place dans le biocapteur (Figure III.10), puis se stabilise. Les changements d'environnements chimique et lumineux des cellules peuvent expliquer ce phénomène. En effet, les micro-algues passent de conditions très favorables à leur croissance (culture en continu) à des conditions compatibles avec le maintien de leur métabolisme (immobilisation sur une membrane en fibre de quartz, modification du cycle lumineux, milieu

nutritif remplacé par un milieu très pauvre en nutriments). Les cellules réagissent à ces stimuli extérieurs en adaptant leur métabolisme à ces nouvelles conditions environnementales.

La durée de stabilisation du signal a été fixée à 14 heures pour des raisons pratiques. Les expériences sont préparées la veille (vers 18h). L'étude des propriétés du biocapteur commence le lendemain matin vers 8h.



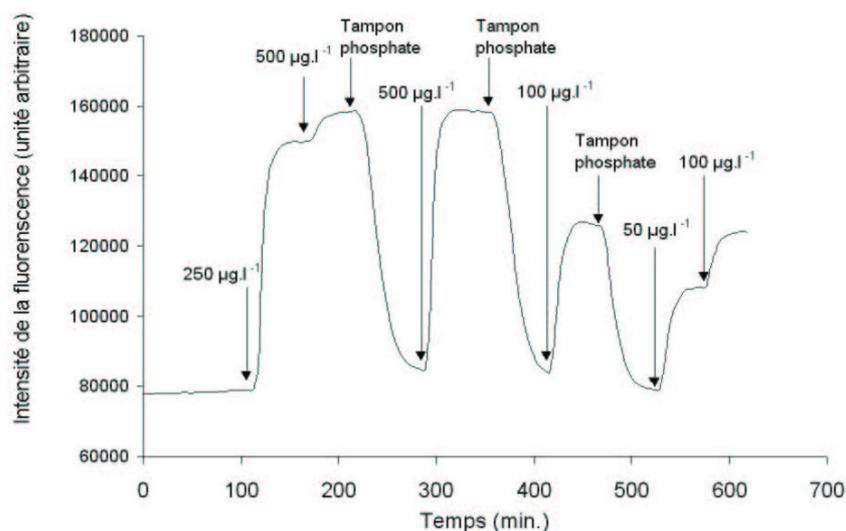
**Figure III.10.** Evolution de la fluorescence chlorophyllienne d'une membrane algale positionnée dans le biocapteur. Conditions : tampon phosphate (pH 7 ; 20°C), débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

#### b) Influence des concentrations d'atrazine sur la réponse du biocapteur

L'optimisation de la réponse du capteur à l'atrazine sera fondée sur la réalisation de courbes de doses-réponses. Avant de réaliser ces courbes, il est nécessaire de vérifier si le signal obtenu avec une dose unique ou avec une dose cumulée d'atrazine est le même. La Figure III.11 montre la réponse du biocapteur à une dose cumulée = 250 + 250 µg.l<sup>-1</sup>, puis à une dose unique = 500 µg.l<sup>-1</sup>, ensuite à une dose unique de 100 µg.l<sup>-1</sup>, enfin à une dose cumulée = 50 + 50 µg.l<sup>-1</sup>. Les niveaux de réponse atteints avec une dose unique ou des doses cumulées sont identiques, ce qui permet d'obtenir une courbe de doses-réponses en réalisant des ajouts cumulés d'atrazine.

#### Convention :

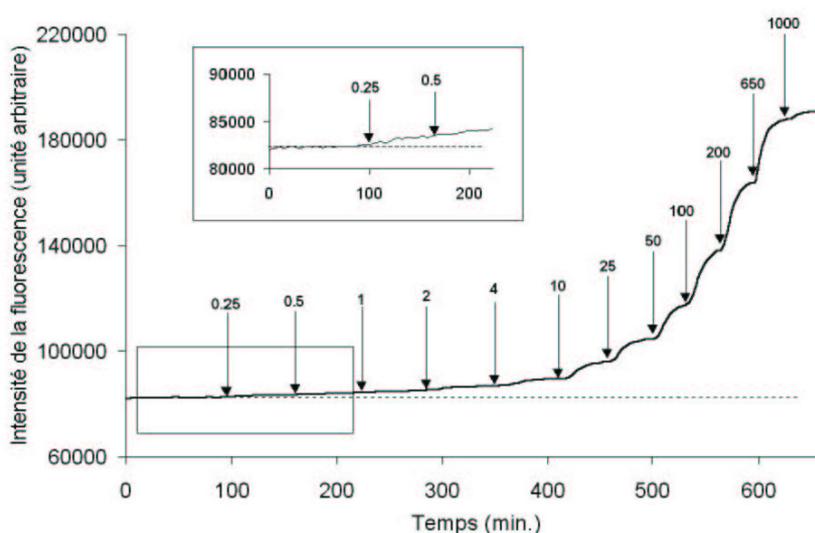
*Dans l'ensemble des figures illustrant les réponses du biocapteur, la flèche verticale indique l'instant et la concentration en toxique contenu dans le nouveau flux appliqué.*



**Figure III.11.** Comparaisons de la réponse du biocapteur à une dose unique et à des doses cumulées d'atrazine. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

#### III.4.2.4 Réponse brute du biocapteur à l'atrazine

La Figure III.12 illustre la réponse d'une membrane présente dans le biocapteur à des concentrations croissantes en atrazine. Après chaque addition d'atrazine dans le flux porteur, le signal augmente, puis se stabilise. La figure insérée visualise la réponse du biocapteur à 0,25 µg.l<sup>-1</sup> d'atrazine. Cette réponse correspond à la limite de détection (signal / bruit = 3) du biocapteur pour l'atrazine.



**Figure III.12.** Réponse du biocapteur utilisant des membranes de *Chlorella vulgaris* à des concentrations croissantes en atrazine (µg.l<sup>-1</sup>). Agrandissement : réponse du biocapteur à de faibles concentrations en atrazine. (----) Niveau de base de la fluorescence. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

Cette courbe est obtenue pour chaque polluant et permet de générer une courbe de doses-réponses (exemple : Figure III.15). La réponse pour chaque polluant est définie comme étant le pourcentage de stimulation de la fluorescence :

$$\text{Réponse (C}_{\text{polluant}}\text{) en \%} = \frac{F(\text{C}_{\text{polluant}}) - F(0)}{F(0)} \times 100$$

$C_{\text{polluant}}$  = Concentration en polluant en  $\mu\text{g.l}^{-1}$

$F(\text{C}_{\text{polluant}})$  = Intensité de la fluorescence mesurée pour la concentration en polluant

$C_{\text{polluant}}$

$F(0)$  = Intensité de la fluorescence mesurée lorsque le flux porteur ne contient pas de polluant : c'est le niveau de base de l'intensité de la fluorescence.

#### III.4.2.5 Répétabilité et reproductibilité des mesures

##### a) Répétabilité

La répétabilité des mesures du biocapteur pour le dosage de  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  a été évaluée au cours d'une même expérience. Les cinq membranes immobilisées dans le biocapteur subissent alternativement un flux contenant  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine pendant une heure et un flux dépourvu d'atrazine (rinçage) pendant deux heures. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau III.5.

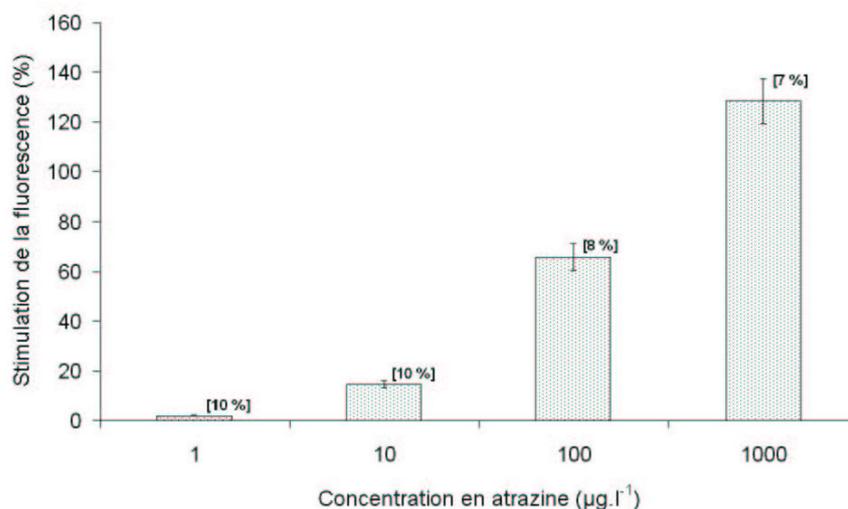
**Tableau III.5.** Etude de la répétabilité de la détection de l'atrazine.

Injection N°	Réponse à $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'atrazine en pourcentage de stimulation de la fluorescence (moyenne des cinq membranes)
1	1,43
2	1,37
3	1,66
4	1,35
5	1,55
Moyenne $\pm$ déviation standard	$1,47 \pm 0,11$
Coefficient de variation (%)	7,5 %

La répétabilité de la réponse du biocapteur à  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine est caractérisée par un coefficient de variation de 7,5%.

### b) Reproductibilité

La reproductibilité de la réponse du biocapteur à l'atrazine a été évaluée avec 5 expériences indépendantes en utilisant 5 cultures en continu différentes. La Figure III.13 présente l'intensité de la réponse obtenue lors des 5 expériences indépendantes à quatre concentrations différentes d'atrazine : 1, 10, 100 et 1000  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Le signal de chaque expérience est la moyenne des signaux issus de 5 membranes algales.



**Figure III.13.** Réponses du biocapteur à quatre concentrations en atrazine lors de cinq expériences indépendantes. Entre crochets : coefficient de variation de la réponse du biocapteur. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

Le coefficient de variation pour l'ensemble des concentrations testées est d'environ 10%. Ces résultats sont très satisfaisants dans la mesure où ces expériences ont été réalisées sur une période de 5 mois au cours de laquelle différentes cultures ont été utilisées. Ils confirment que les cultures en continu permettent l'obtention de biorécepteurs dans le même état physiologique et ayant une réponse identique vis-à-vis de l'atrazine.

#### III.4.2.6 Effet de la charge algale immobilisée dans la membrane

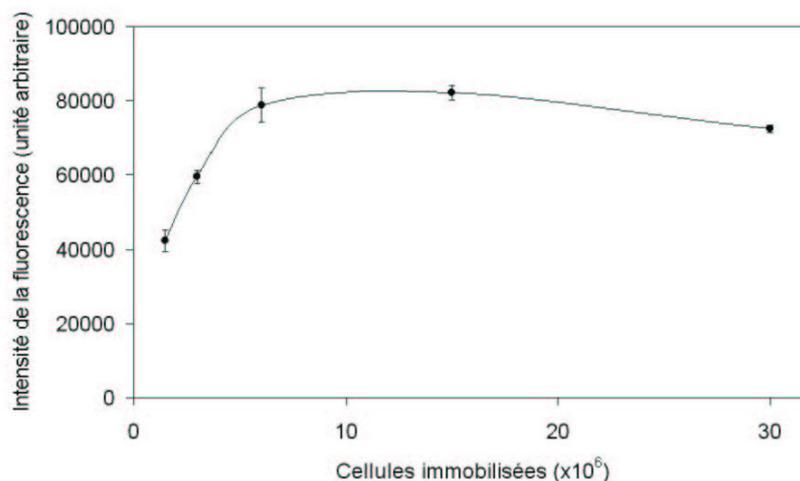
Lors de la mesure de l'effet de la quantité d'algues immobilisées dans la membrane sur l'intensité de la fluorescence de base (sans polluant) et en présence d'atrazine, aucune perte d'algues n'a été observée. En recueillant et en centrifugeant la solution ayant circulé dans le biocapteur, par spectrophotométrie nous n'avons pas détecté la présence de micro-algues ayant été relarguées.

a) Effet de la charge sur l'intensité de la fluorescence

Le nombre de cellules immobilisées est calculé à partir de la mesure de la densité optique à 760 nm de la suspension algale et du volume utilisé lors de l'immobilisation. Celle-ci est considérée comme complète (rendement de fixation  $\approx 100\%$ ). En effet, la mesure du spectre d'absorption du filtrat issu de la suspension algale n'a pas mis en évidence la présence de micro-algues.

La Figure III.14 montre l'évolution de l'intensité de la fluorescence en fonction de la quantité de micro-algues immobilisées dans la membrane. Dans un premier temps, la fluorescence augmente avec la quantité de micro-algues déposées jusqu'à un maximum d'intensité correspondant à  $15 \times 10^6$  cellules immobilisées. Ensuite, le signal de fluorescence décroît légèrement. Lorsque la membrane est fortement chargée en micro-organismes, ces derniers se trouvent très proches les uns des autres, des phénomènes de réabsorption de la fluorescence peuvent alors avoir lieu, ce qui peut expliquer cette diminution du signal.

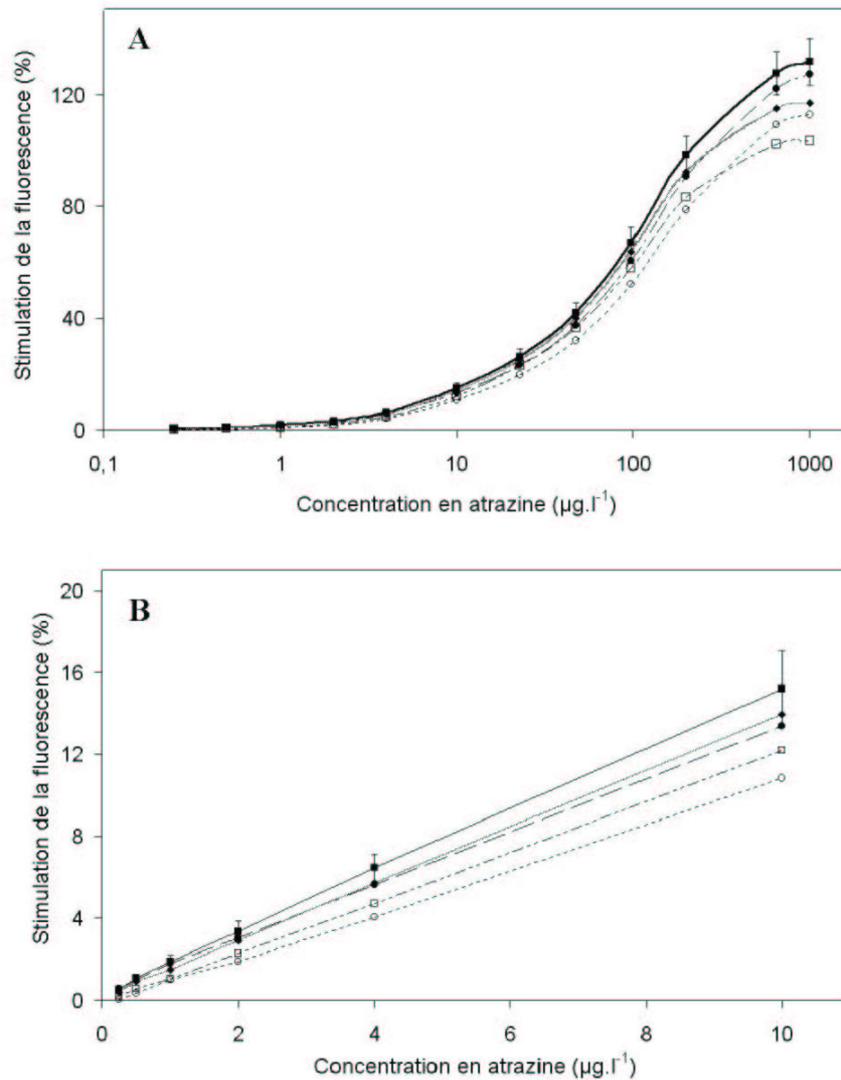
Ces résultats suggèrent qu'il vaut mieux utiliser des membranes contenant entre  $3 \times 10^6$  et  $15 \times 10^6$  cellules immobilisées par membrane. En effet, le signal de fluorescence ne doit pas avoir une intensité trop faible et il est préférable d'éviter d'utiliser des membranes fortement chargées en algues, dans lesquelles les polluants auraient des difficultés à atteindre l'ensemble des cellules.



**Figure III.14.** Effet de la charge algale sur l'intensité de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne de *Chlorella vulgaris*. Chaque point est la moyenne de trois mesures réalisées sur trois membranes préparées avec trois cultures en continu différentes. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

b) Effet de la charge sur la réponse du biocapteur à l'atrazine

Cinq membranes (une membrane par emplacement dans le biocapteur), dont la charge en micro-algues est différente, ont été soumises simultanément à des concentrations croissantes en atrazine. A fortes concentrations (Figure III.15 A) et à faibles concentrations (Figure III.15 B) en atrazine, la meilleure détection est obtenue lorsque  $6 \times 10^6$  cellules sont immobilisées par membrane.



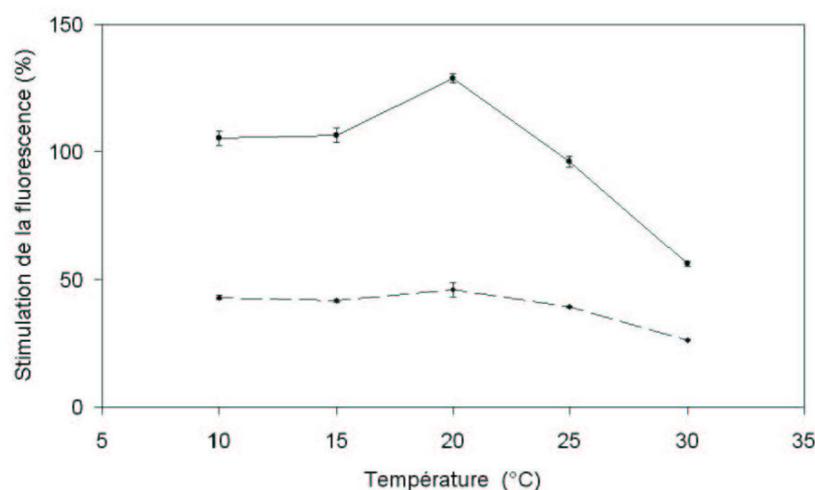
**Figure III.15.** A et B. Effet de la charge algale (*Chlorella vulgaris*) :  $1,5 \times 10^6$  (○) ;  $3 \times 10^6$  (●) ;  $6 \times 10^6$  (■) ;  $15 \times 10^6$  (◆) ;  $30 \times 10^6$  (□) cellules par membrane sur la réponse du biocapteur à différentes concentrations en atrazine. Chaque point est la moyenne de trois mesures réalisées sur trois membranes préparées avec trois cultures en continu différentes. Conditions: tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

### III.4.2.7 Effets de la température et du pH sur la réponse du biocapteur

Les effets de la température et du pH sur la réponse du biocapteur à des concentrations de 50 et 1000  $\mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine ont été étudiés.

#### a) Effet de la température

La gamme de températures étudiées est comprise entre 10 et 30°C (Figure III.16). La réponse du biocapteur est maximale à 20°C pour les deux concentrations testées. Cette valeur de la température n'est pas surprenante car les micro-algues sont cultivées à 20°C et se sont donc acclimatées à cette température pendant l'étape de culture en continu. Les températures comprises entre 10 et 25°C permettent une détection satisfaisante de l'atrazine. En revanche, au-delà de 25°C, la réponse du biocapteur diminue fortement (environ 50% de perte de signal à 30°C par rapport à la réponse obtenue à 20°C).



**Figure III.16.** Effet de la température sur la réponse du biocapteur à 50  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (----) et 1000  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (—) d'atrazine. Chaque point est la moyenne de trois mesures réalisées sur trois membranes préparées avec trois cultures en continu différentes. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), débit = 2  $\text{ml.min}^{-1}$ .

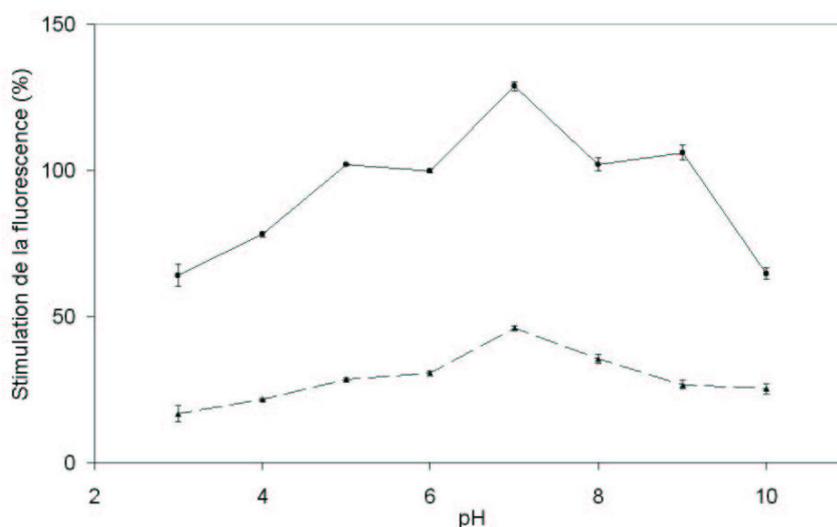
La diminution de la réponse du biocapteur à l'atrazine au-delà de 25°C peut s'expliquer par une baisse de l'activité de l'appareil photosynthétique et de l'ensemble du métabolisme algal. En effet, de fortes températures inhibent la photosynthèse en diminuant l'accumulation des chlorophylles, la synthèse protéique et l'activité des photosystèmes (Kaur *et al.*, 1989).

La légère diminution de la réponse du biocapteur à l'atrazine lorsque la température diminue de 20°C à 10°C peut s'expliquer par la modification de la perméabilité membranaire

à des substances indispensables à la photosynthèse ( $\text{CO}_2$ , phosphate inorganique...), la diminution des activités enzymatiques de la cellule et de la mobilité des plastoquinones au sein de la membrane intra-thylakoïde (Leclerc, 1999).

### b) Effet du pH

La gamme de pH étudiés est comprise entre 3 et 10 (Figure III.17). La réponse du biocapteur est maximale à pH 7 pour les deux concentrations testées. Comme dans le cas de la température, cette valeur de pH n'est pas surprenante car les micro-algues sont cultivées à pH 7 et se sont acclimatées à ce pH lors de leur culture en continu. Les pH compris entre 5 et 9 permettent une détection satisfaisante de l'atrazine. En revanche, aux pH les plus acides ou basiques, la réponse du biocapteur diminue fortement (environ 50% de perte de signal aux pH 3 et 10 par rapport à la réponse obtenue à pH 7).



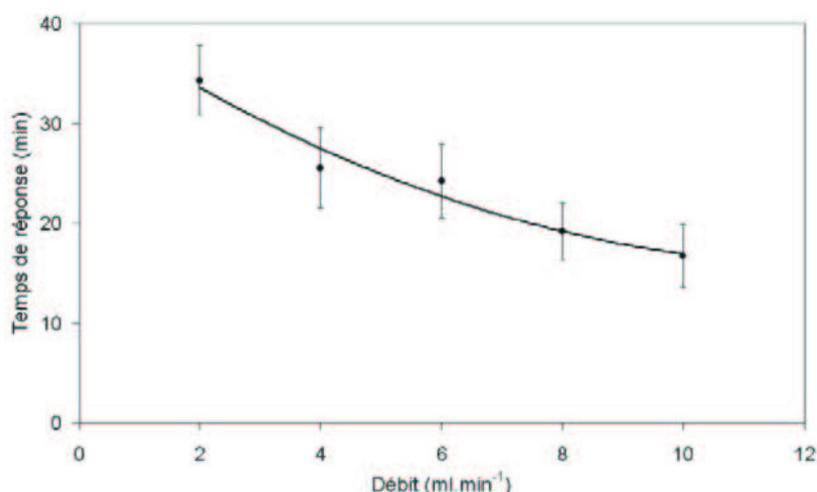
**Figure III.17.** Effet du pH sur la réponse du biocapteur à  $50 \mu\text{g.l}^{-1}$  (-----) et  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  (—) d'atrazine. Chaque point est la moyenne de trois mesures réalisées sur trois membranes préparées avec trois cultures en continu différentes. Conditions : concentration des solutions tampons = 10 mM tampon citrate-phosphate (pH 3 à 5), tampon phosphate (pH 6 à 8), tampon acide borique-borax (pH 9), tampon borax-NaOH (pH 10),  $20^\circ\text{C}$ , débit =  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

L'influence du pH sur le métabolisme algal dépend en grande partie du micro-organisme utilisé. Certaines algues comme *Dunaliella acidophila* ont une photosynthèse optimale à pH 1. Dans le cas de *Chlorella vulgaris*, à pH faible et élevé, les micro-algues ont une dépense énergétique importante pour lutter contre ces conditions stressantes, ce qui aurait pour conséquence une diminution de l'activité photosynthétique. Ce phénomène a été observé

avec *Euglena* qui supporte des eaux assez acides jusqu'à pH 4, cependant à pH 1 son activité photosynthétique décroît fortement (Leclerc, 1999).

#### III.4.2.8 Temps de réponse du biocapteur

Le temps de réponse est défini comme étant le temps nécessaire afin d'obtenir 95% de la valeur maximale du signal. Le temps de réponse à  $50 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine a été déterminé pour des débits compris entre  $2 \text{ ml.min}^{-1}$  et  $10 \text{ ml.min}^{-1}$  (Figure III.18).



**Figure III.18.** Temps de réponse du biocapteur (temps nécessaire pour atteindre 95% de la réponse maximale) à  $50 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine en fonction du débit. Condition : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C.

Le temps de réponse du biocapteur décroît quand le débit augmente. En fait, le temps de réponse comporte deux composantes :

$$T_{\text{réponse}} = T_{\text{biorécepteur}} + T_{\text{transport et mélange}}$$

Où  $T_{\text{biorécepteur}}$  = temps de réponse du biorécepteur : on émet l'hypothèse que ce temps est constant quelque soit le débit utilisé.

$T_{\text{transport et mélange}}$  = temps nécessaire au transport du toxique et de son mélange dans le biocapteur : ce temps est inversement proportionnel au débit.

Lorsque des débits élevés sont utilisés, le temps de réponse du biocapteur se rapproche du temps de réponse du biorécepteur. D'après les résultats présentés dans la Figure III.18, ce temps tend vers 10 minutes environ.

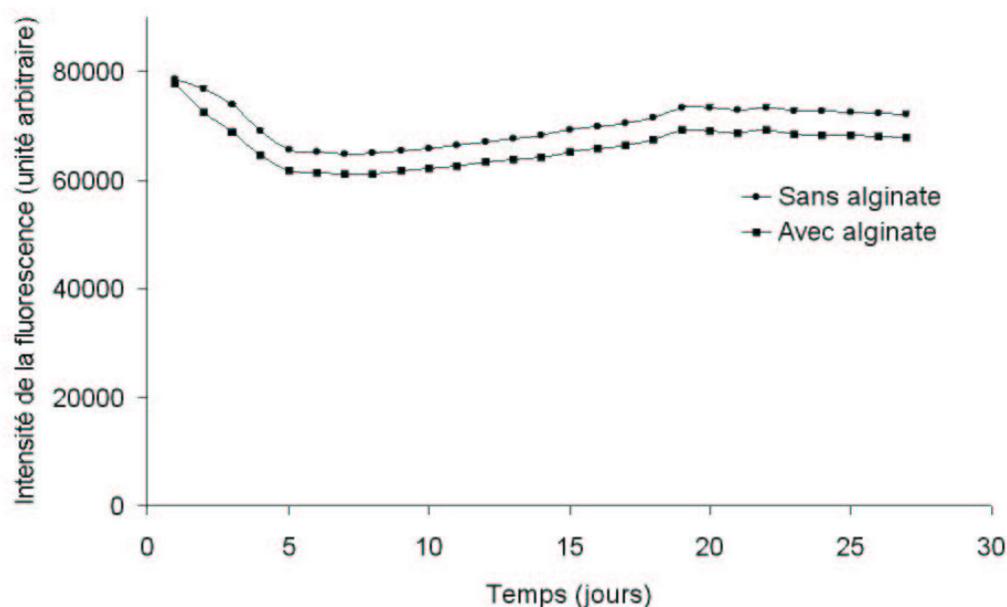
### III.4.2.9 Durée de vie en fonctionnement et conservation des membranes en stockage

#### a) Evolution de l'intensité de la fluorescence de membranes algales pendant 27 jours

Le biocapteur est maintenu en fonctionnement pendant 27 jours. Parmi les cinq membranes utilisées dans le biocapteur, deux d'entre elles ont subi l'ajout d'une couche d'alginate afin d'éviter le relargage des algues dans le flux porteur au cours du temps. Cette technique a été utilisée par Frense *et al.* (1998) pour l'immobilisation de *Scenedesmus subspicatus*.

L'intensité de la fluorescence des cinq membranes évolue de manière identique. On distingue trois phases :

- T = 0 - 5 jours : légère décroissance du signal.
- T = 5 - 19 jours : légère augmentation du signal
- T = 19 - 27 jours : quasi-stabilité du signal



**Figure III.19.** Evolution de l'intensité de la fluorescence de 3 membranes algales ne contenant pas une couche d'alginate et de 2 membranes contenant une couche d'alginate, en fonction du temps de fonctionnement du biocapteur. Conditions : flux porteur = eau de Volvic, 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

Les deux types de membranes ont un comportement analogue. A la fin de l'expérience, nous avons pu vérifier la présence du film d'alginate sur les membranes correspondantes (le gel d'alginate donne un aspect brillant aux membranes). Le relargage ne

semble donc pas être la cause de l'évolution en trois phases de la fluorescence chlorophyllienne.

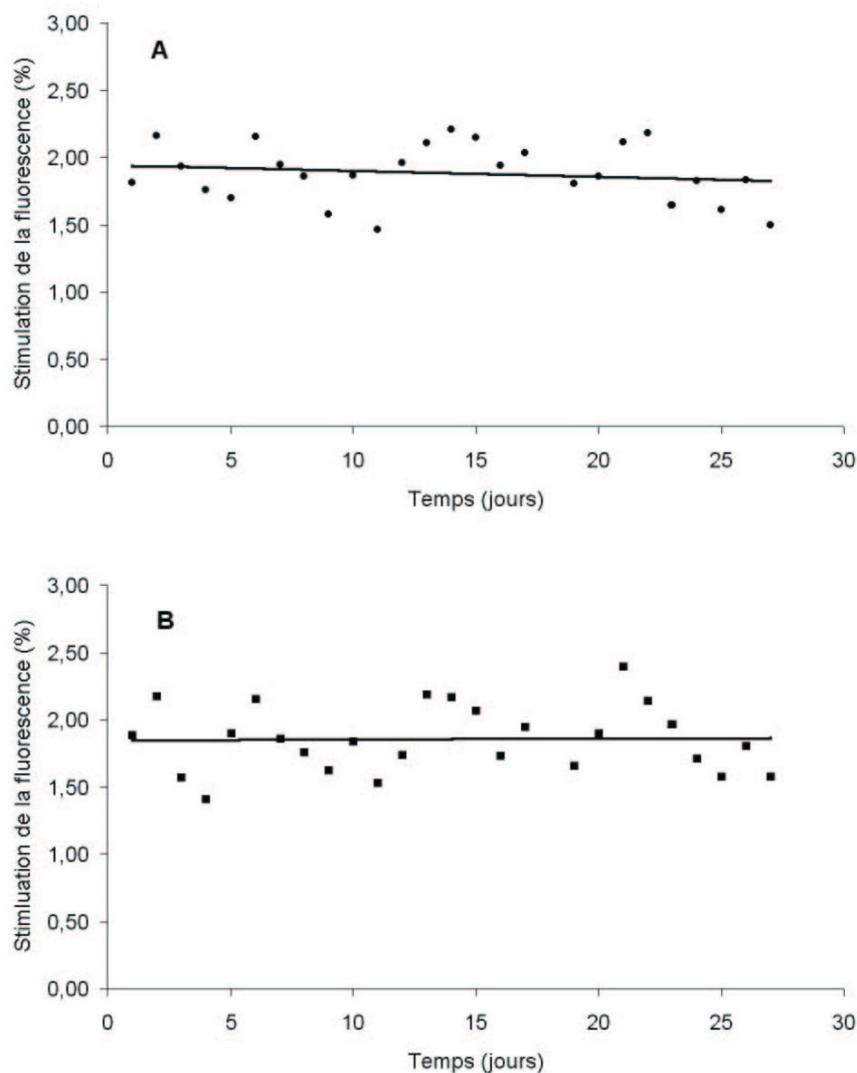
L'adaptation (à long terme) des cellules algales au cycle lumineux (1 minute de lumière, 4 minutes d'obscurité) pourrait expliquer cette évolution. La première phase de diminution correspondrait à une adaptation physiologique de l'appareil photosynthétique des micro-algues. Le rendement de ce dernier augmentant, il en résulterait une diminution de la fluorescence chlorophyllienne. Ensuite, la phase d'augmentation du signal correspondrait à une augmentation de la population au sein de la membrane.

La zone de quasi-stabilité du signal pourrait provenir de l'encrassement du biocapteur. Les solutions circulant dans le biocapteur ne sont pas stérilisées avant leur utilisation. Une couche ressemblant à un biofilm a pu être observée à l'intérieur du biocapteur à la fin de l'expérience. L'encrassement, généré par des bactéries, aurait diminué l'excitation lumineuse et la collecte des photons par la fibre optique lors de la phase de quasi-stabilité du signal, masquant ainsi la réelle évolution du signal.

Il est à noter que l'évolution du signal au cours du temps, en l'absence de polluant, est lente par rapport aux fluctuations occasionnées par un toxique, ce qui limite l'effet de cette dérive du signal sur la détection de polluants. Le polluant fait varier la fluorescence au bout de quelques dizaines de minutes de temps de contact.

#### *b) Evolution de la réponse des micro-algues à l'atrazine pendant 27 jours*

La réponse du biocapteur à  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine est évaluée quotidiennement pendant 27 jours. On estime que l'exposition quotidienne des micro-algues pendant une heure à cette concentration a un effet toxique limité sur leur métabolisme. Aucune perte significative en termes de détection de l'atrazine n'a été mise en évidence au cours des 27 jours de fonctionnement du biocapteur (Figure III.20 A et B).



**Figure III.20.** *A et B. Evolution de la réponse du biocapteur à  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine en fonction du temps d'utilisation. A Trois membranes non recouvertes d'alginate, B Deux membranes recouvertes d'alginate. Conditions : Flux porteur = eau de Volvic,  $20^{\circ}\text{C}$  ; pendant une heure par jour, passage d'une solution d'eau de Volvic contenant  $1 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine ; débit =  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .*

Les membranes pourvues et dépourvues d'une couche d'alginate présentent les mêmes caractéristiques de détection de l'atrazine. La présence d'une couche d'alginate ne constituerait donc pas une barrière diffusionnelle supplémentaire pour la diffusion de l'atrazine au sein de la membrane algale.

La durée de vie de ce biocapteur est un paramètre important pour son futur développement. Une autonomie de fonctionnement de 4 semaines est un élément indispensable pour réduire les coûts de maintenance d'un tel outil destiné à être mis en place en continu sur un site.

## c) Conservation des membranes en stockage

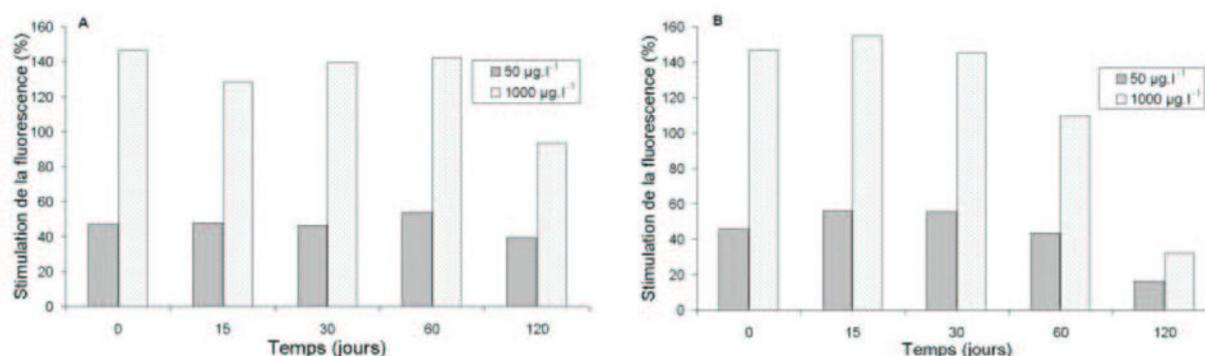
Cinq méthodes de conservation des membranes ont été envisagées (Tableau III.6).

**Tableau III.6.** Méthodes de conservation des membranes.

Méthode N°	Exposition à la lumière	Température (°C)	Hydratation de la membrane
1	Obscurité	4	Imbibée de milieu de culture
2	Obscurité	20	
3	Lumière ambiante	20	
4	Lumière de la culture en continu (12 heures / 12 heures)	20	
5	Obscurité	-18	Sèche

Les méthodes 3, 4, 5 sont rapidement abandonnées. En effet, l'exposition des membranes à la lumière ambiante ou à la lumière de la culture en continu se traduit par une croissance des algues. Les micro-organismes épuisent rapidement la faible quantité de milieu nutritif disponible (la membrane est simplement imbibée), ce qui entraîne un jaunissement (observé à l'œil nu) des membranes. Le signal de fluorescence issu de ces membranes est anormalement élevé, traduisant l'état de stress des micro-algues. De plus, ce signal ne se stabilise pas au bout de 14 heures et reste strictement décroissant tout au long de l'expérience. Les micro-algues ne survivent pas à la congélation à  $-18^{\circ}\text{C}$  (méthode 5).

Les méthodes 1 et 2 permettent une conservation de longue durée (Figure III.21 A et B). La conservation à  $4^{\circ}\text{C}$  et à l'obscurité permet de maintenir une détection de l'atrazine satisfaisante pendant 4 mois. En revanche, la méthode 2 permet de maintenir un niveau optimal de détection pendant 2 mois seulement.



**Figure III.21.** A et B. Evolution de la réponse à  $50 \mu\text{g.l}^{-1}$  et  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  des membranes algales conservées à l'obscurité, soit à  $4^{\circ}\text{C}$  (A), soit à  $20^{\circ}\text{C}$  (B). Conditions : flux porteur = eau de Volvic,  $20^{\circ}\text{C}$ , débit =  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

La conservation en l'absence de lumière empêche le déroulement de la phase lumineuse de la photosynthèse et prive les cellules de leur source principale d'énergie. Les

micro-algues ne se multiplient pas et restent dans un état « végétatif ». La conservation à 4°C ralentit d'autant plus le métabolisme général de l'algue, ce qui explique la meilleure conservation des membranes par rapport à une température de stockage de 20°C.

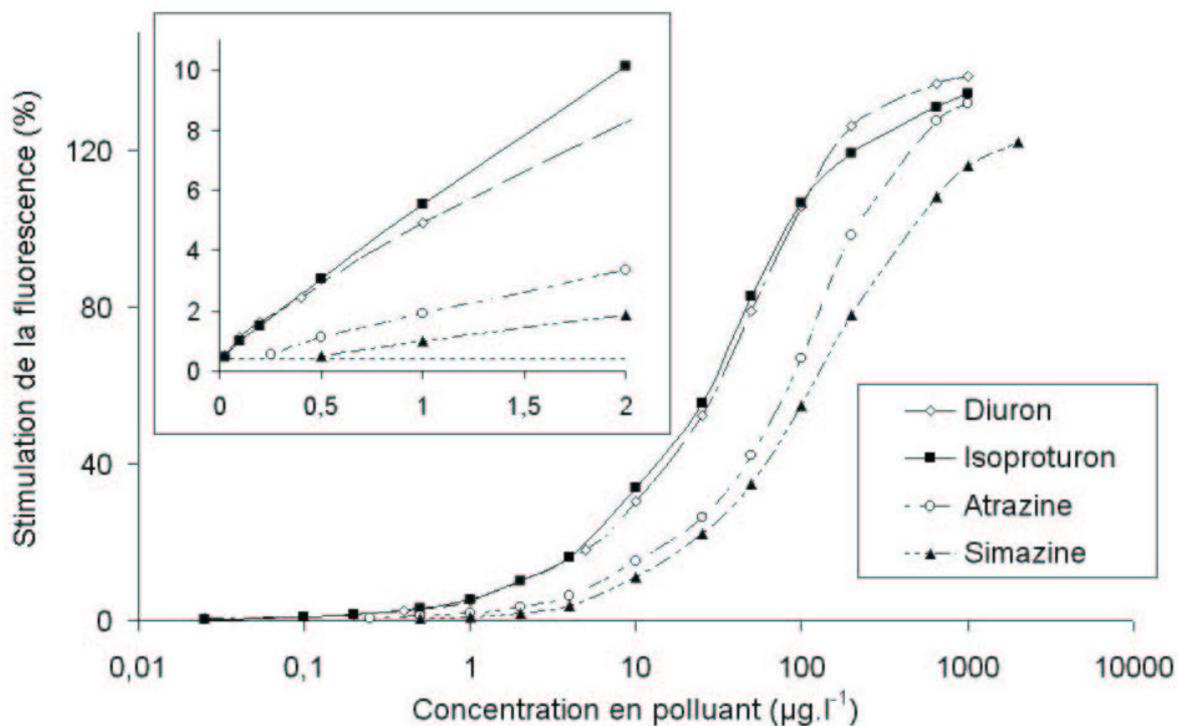
### III.4.3 Réponse à différents polluants du biocapteur fondé sur *Chlorella vulgaris*

Le biocapteur ainsi optimisé en utilisant l'atrazine comme herbicide modèle a été évalué pour la détection d'autres produits toxiques vis-à-vis des micro-algues.

#### III.4.3.1 Les herbicides anti-PSII

Environ 30% des herbicides disponibles sur le marché sont des inhibiteurs du PSII (Moreland, 1980 ; Draber *et al.*, 1991). Ce type d'herbicides regroupe plusieurs familles chimiques dont les deux plus importantes, par le nombre de molécules les constituant, sont les triazines et les urées substituées (Paternelle et Couteux, 2002). Deux molécules de chacune de ces deux familles ont été testées dans le biocapteur : l'atrazine et la simazine pour la famille des triazines, le diuron et l'isoproturon pour la famille des urées substituées.

La Figure III.22 présente les courbes de doses-réponses obtenues, ainsi que la détection de faibles concentrations de ces quatre molécules.



**Figure III.22.** Courbes de doses-réponses des herbicides anti-PSII. Agrandissement : réponse aux polluants pour des concentrations proches du ppb, (----) limite de détection. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

Lorsque la concentration en toxique augmente, l'augmentation de la fluorescence est linéaire aux faibles teneurs, puis un effet de saturation apparaît à de fortes concentrations. Ce résultat est cohérent avec le mécanisme d'action des herbicides anti-PSII utilisés. Ils bloquent le transport d'électrons en entrant en compétition avec la fixation de  $Q_B$  sur un site saturable de la protéine D1 (Scalla, 1991). De plus, ils inhibent le renouvellement et le mécanisme de réparation du photosystème II, en particulier de la protéine D1 (Draber *et al.*, 1991), qui sont des mécanismes indispensables au bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

L'agrandissement de la Figure III.22 montre l'évolution de la réponse du biocapteur pour de faibles concentrations en polluant. La limite de détection (Signal / Bruit = 3) correspond à 0,4% de stimulation de la fluorescence. Tout signal inférieur à cette valeur n'est pas considéré comme significatif. Il apparaît ainsi que la limite de détection du biocapteur pour l'atrazine, par exemple, est de  $0,25 \mu\text{g.l}^{-1}$ .

Le domaine de linéarité, la  $CE_{50}$  et la limite de détection sont propres à chaque produit testé et sont reportés dans le Tableau III.7.

**Tableau III.7.** Caractéristiques de la réponse du biocapteur pour la détection d'herbicides anti-PSII.

Herbicides	Limite de détection ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) (Signal / bruit = 3)	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Linéaire jusqu'à ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Réversibilité à $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$
Atrazine	0,25	$96 \pm 4$	10	Oui
Simazine	0,5	$127 \pm 4$	10	Oui
Isoproturon	0,025	$35 \pm 2$	2	Oui
Diuron	0,025	$39 \pm 3$	2	Oui

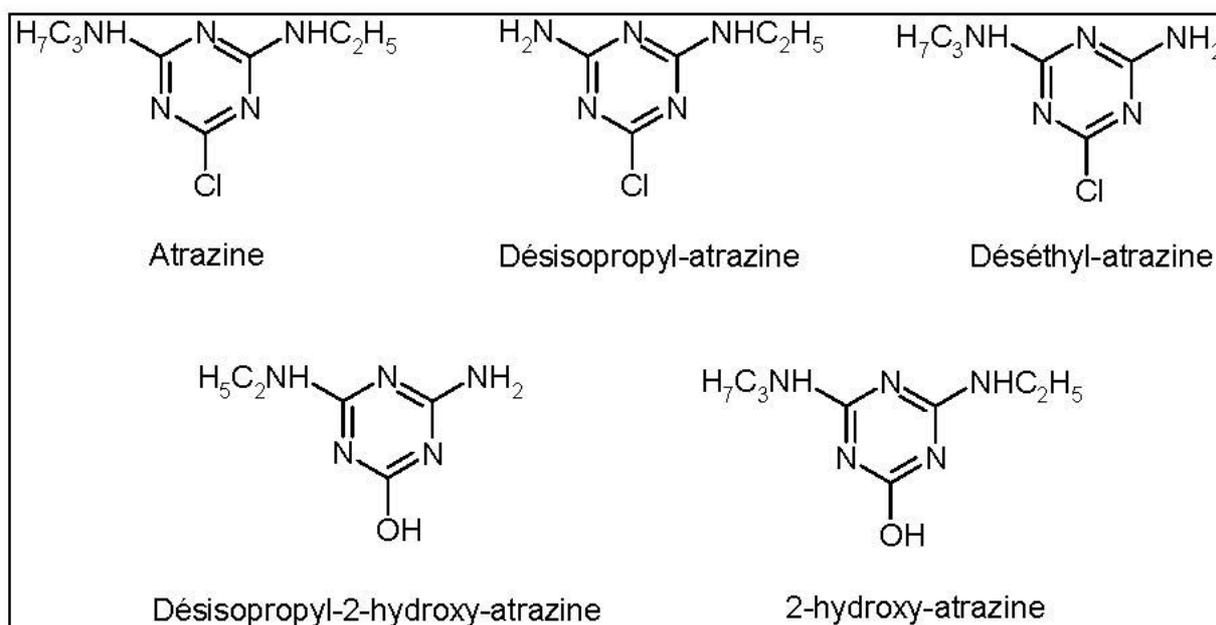
Les limites de détection et les  $CE_{50}$  ont la même évolution. Le classement en termes de performance de détection du biocapteur en fonction de l'herbicide testé est :

diuron = isoproturon > atrazine > simazine.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Ma *et al.* (2002), qui ont réalisé des tests d'inhibition de croissance de 96 heures avec *Chlorella vulgaris*.

### III.4.3.2 Les métabolites issus de la dégradation de l'atrazine

Les différents processus de dégradation de l'atrazine (photolyse, oxydation, hydrolyse, biodégradation, etc.) conduisent tout d'abord à une désalkylation des groupements éthyl ou isopropyl et/ou une hydrolyse du groupement chlore, cette dernière étape conduit à une hydroxytriazine (Schmitt *et al.*, 1996). Nous avons cherché à évaluer la réponse du biocapteur vis-à-vis de certains produits de dégradation de l'atrazine dont les formules chimiques sont reportées Figure III.23.



**Figure III.23.** Formules chimiques de l'atrazine et des composés issus de sa dégradation testés dans le biocapteur.

Aucune augmentation de l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne n'a pu être mesurée pour les composés : 2-hydroxy-atrazine et désisopropyl-2-hydroxy-atrazine pour des concentrations allant jusqu'à  $10 \text{ mg.l}^{-1}$ . Ces résultats concordent avec les données publiées par Stratton (1984). Il a montré que le 2-hydroxy-atrazine était relativement peu toxique vis-à-vis de la photosynthèse de *Chlorella pyrenoidosa*. De plus, Ebert et Dumford (1976) ont montré que le remplacement du groupement chlore, dans des amino et alkylaminotriazines, par un groupement hydroxyle réduit fortement leur pouvoir inhibant (voire l'annihile complètement dans le cas du désisopropyl-2-hydroxy-atrazine) sur la photosynthèse au sein de chloroplastes isolés.

Des courbes de doses-réponses (Figure III.24) ont pu être obtenues pour les composés : désisopropyl-atrazine et déséthyl-atrazine. Les caractéristiques de détection de ces deux composés sont reportées dans le Tableau III.8.

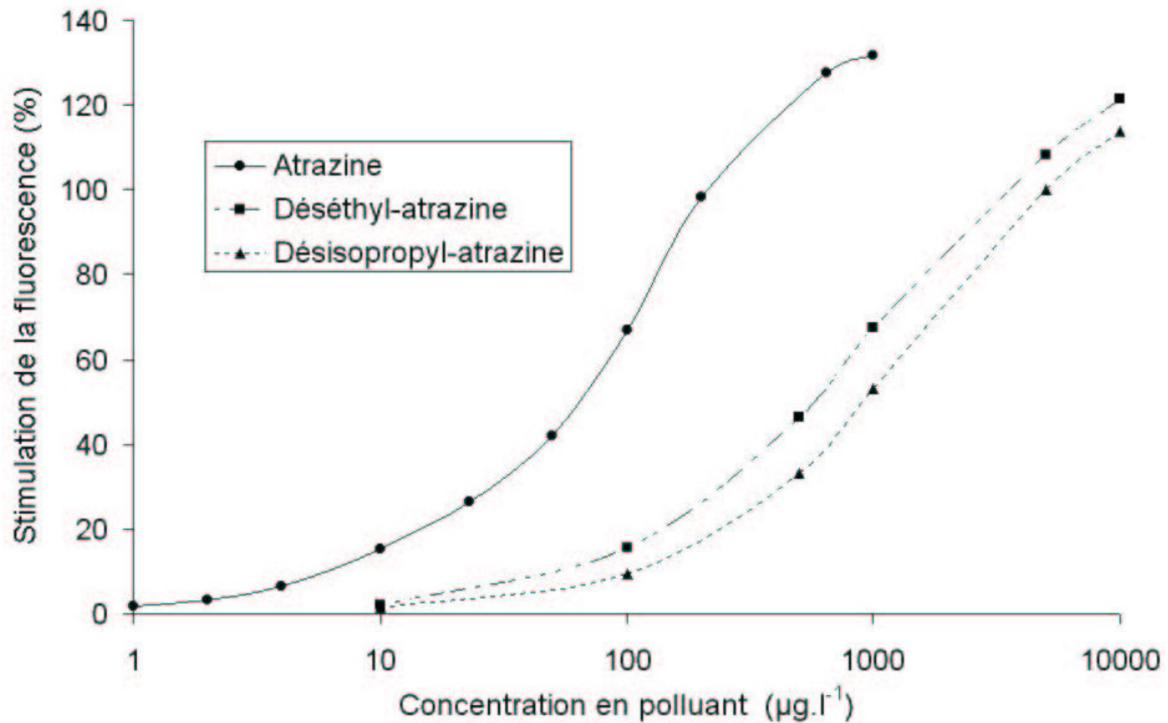


Figure III.24. Courbes de doses-réponses de l'atrazine et de ses métabolites. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

Tableau III.8. Caractéristiques de la réponse du biocapteur pour la détection de l'atrazine et de ses métabolites.

Polluants	Limite de détection (µg.l <sup>-1</sup> ) (Signal / bruit = 3)	CE <sub>50</sub> (µg.l <sup>-1</sup> )	Réversibilité
Atrazine	0,25	96 ± 4	Oui (à 1000 µg.l <sup>-1</sup> )
Déséthyl-atrazine	2,5	838 ± 10	Oui (à 10000 µg.l <sup>-1</sup> )
Désisopropyl-atrazine	5	1336 ± 30	Oui (à 10000 µg.l <sup>-1</sup> )
Désisopropyl-2-hydroxy-atrazine	Non détecté	-	-
2-hydroxy-atrazine	Non détecté	-	-

Les limites de détection et les  $CE_{50}$  ont la même évolution. Le classement en termes de performance de détection du biocapteur en fonction du composé testé est :

Atrazine > Déséthyl-atrazine > Désisopropyl-atrazine > Désisopropyl-2-hydroxy-atrazine et 2-hydroxy-atrazine.

Ce classement est identique à celui trouvé par Stratton (1984) qui a mesuré les perturbations de l'activité photosynthétique de *Chlorella pyrenoidosa* et *Scenedesmus quadricauda* (algues vertes) et d'*Anabaena inaequalis*, *Anabaena cylindrica*, *Anabaena variabilis* (cynaobactéries) occasionnées par l'atrazine et ses métabolites.

#### III.4.3.3 Les herbicides inhibiteurs anti-PSII et découplants

Ce type d'herbicides regroupe deux familles chimiques : les dinitrophénols et les nitriles. Ils ont deux modes d'action (Oettmeier *et al.*, 1987).

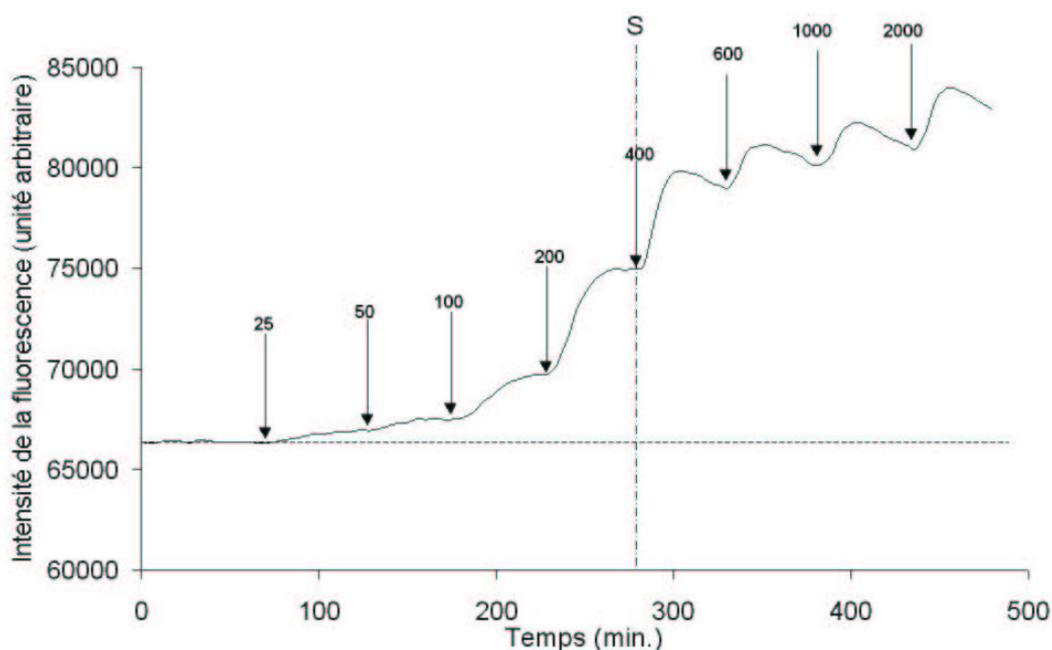
Ce sont des inhibiteurs anti-PSII, le mécanisme d'inhibition du transfert d'électrons est similaire dans son principe à celui des herbicides anti-PSII, comme l'atrazine, le diuron... Ce mode d'action fait augmenter la fluorescence chlorophyllienne.

Leur dénomination de découplant provient de leur second mode d'action. Ces composés sont capables de perméabiliser les membranes cellulaires aux ions  $H^+$ . Ce mécanisme conduit à de profondes perturbations du métabolisme, en particulier au niveau des mitochondries et de l'appareil photosynthétique, puis à la mort de la cellule (Scalla, 1991). Au niveau de l'appareil photosynthétique, la perméabilisation des membranes aux protons supprime la formation du gradient de concentration de protons, de part et d'autre de la membrane des thylakoïdes, nécessaire à la synthèse d'ATP. L'absence de ce gradient et de la synthèse d'ATP faciliterait l'écoulement des électrons dans la chaîne photosynthétique et ferait diminuer la fluorescence chlorophyllienne.

Les deux modes d'action de ces herbicides ont un effet opposé sur l'évolution de la fluorescence. Nous avons voulu étudier le comportement du biocapteur vis-à-vis de ces herbicides.

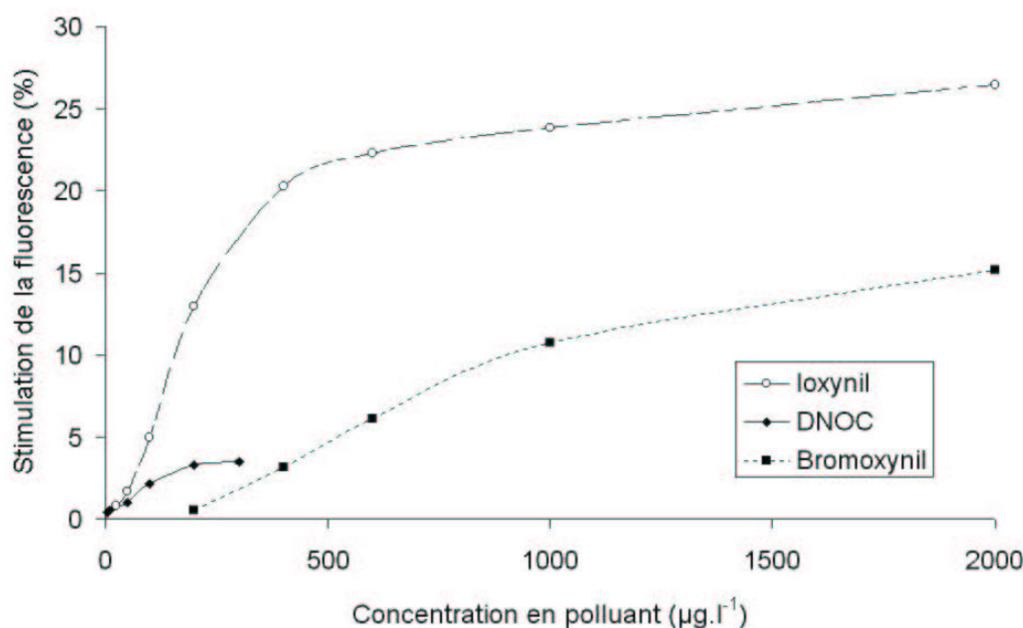
La Figure III.25 présente la réponse du biocapteur à l'ioxynil. Des courbes similaires ont été obtenues pour le dinitro-*o*-crésol (DNOC) et le bromoxynil. La réponse du biocapteur peut être séparée en deux phases distinctes. Pour des concentrations faibles, la réponse augmente à chaque ajout de polluant et se stabilise. Au-delà d'un seuil  $S$ , suite à l'ajout du polluant, le signal augmente puis diminue.

Cette réponse en deux temps peut s'expliquer par les deux modes d'action de ces herbicides. A de faibles concentrations, l'action anti-PSII serait prépondérante et l'action découplante serait négligeable. Au-delà d'un seuil  $S$ , suite à l'augmentation de la concentration du polluant, l'action anti-PSII provoquerait l'augmentation du signal dans un premier temps, puis l'action découplante, plus progressive, agirait et diminuerait la fluorescence.



**Figure III.25.** Réponse du biocapteur à des doses cumulées d'ioxynil ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ). Le seuil  $S$  délimite le changement de comportement du biocapteur. (----) Niveau de base de la fluorescence. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

La Figure III.26 montre les courbes de réponses du biocapteur à des doses cumulées en herbicide. Ces courbes montrent la stimulation de la fluorescence et ne rendent donc compte que de l'activité anti-PSII de l'herbicide. Elles ne correspondent pas à des courbes de doses-réponses classiques car, aux fortes concentrations, l'antagonisme des deux modes d'action de ces herbicides fait que deux doses cumulées n'auront pas le même effet qu'une dose unique.



**Figure III.26.** Courbes de réponses du biocapteur à des doses cumulées de DNOC, Bromoxynil, Ioxynil. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

Le Tableau III.9 récapitule les caractéristiques de détection des herbicides testés.

**Tableau III.9.** Caractéristiques de la réponse du biocapteur pour la détection de DNOC, Ioxynil, et Bromoxynil.

Polluant	Limite de détection (µg.l <sup>-1</sup> )	Encadrement du seuil (S) en µg.l <sup>-1</sup>	Réversibilité au-delà du seuil	Solubilité dans l'eau à 20°C
DNOC	5	100 < S < 200	Non	6,94 g.l <sup>-1</sup> à pH 7
Ioxynil	25	200 < S < 400	Non	50 mg.l <sup>-1</sup>
Bromoxynil	200	600 < S < 1000	Non	130 mg.l <sup>-1</sup>

La limite de détection et le seuil S de l'ioxynil sont inférieurs à ceux du bromoxynil. Le pouvoir inhibant anti-PSII et l'effet découplant sur *Chlorella vulgaris* de ce dernier seraient moins importants que ceux de l'ioxynil. Des études réalisées sur des chloroplastes isolés confirment que le pouvoir inhibant anti-PSII de l'ioxynil est plus important que celui du bromoxynil (Scalla, 1991 ; Fedtke, 1982).

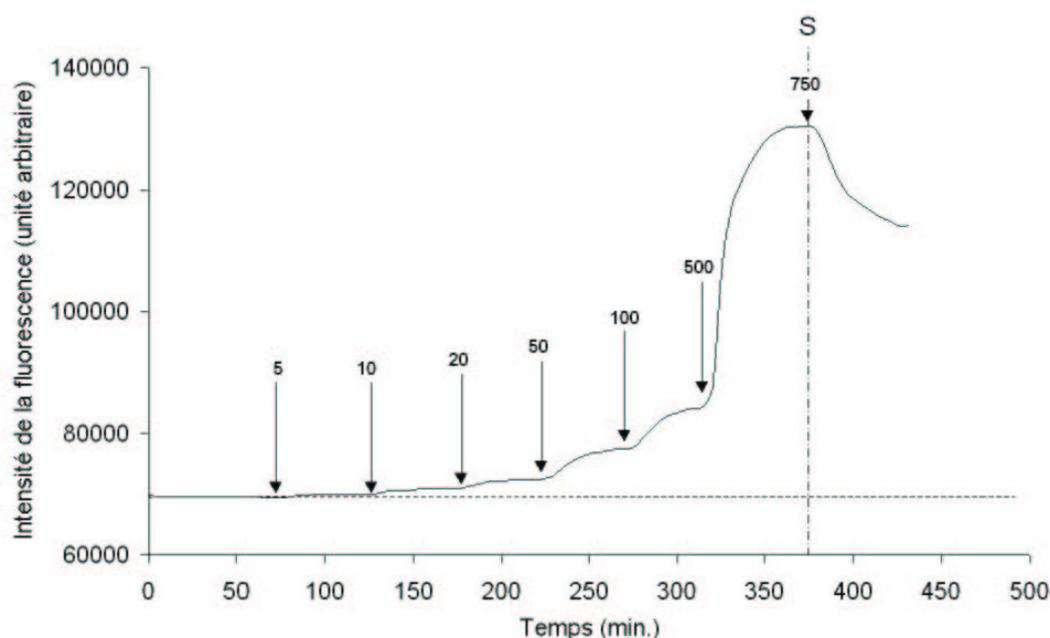
Le DNOC a un comportement particulier. L'augmentation du signal en fonction de l'augmentation de la concentration est plus importante pour l'ioxynil que pour le DNOC, ce qui est conforme aux données bibliographiques. En effet, ce dernier est reconnu comme ayant un pouvoir inhibant anti-PSII inférieur à celui de l'ioxynil (Scalla 1991 ; Fedtke, 1982). Cependant, la limite de détection du DNOC est cinq fois plus faible que celle de l'ioxynil.

Cette différence pourrait s'expliquer par l'accessibilité de l'herbicide au PSII. Le DNOC est beaucoup plus soluble dans l'eau que l'ioxynil et pourrait donc entrer et agir plus facilement dans les cellules algales.

#### III.4.3.4 Composés phénoliques

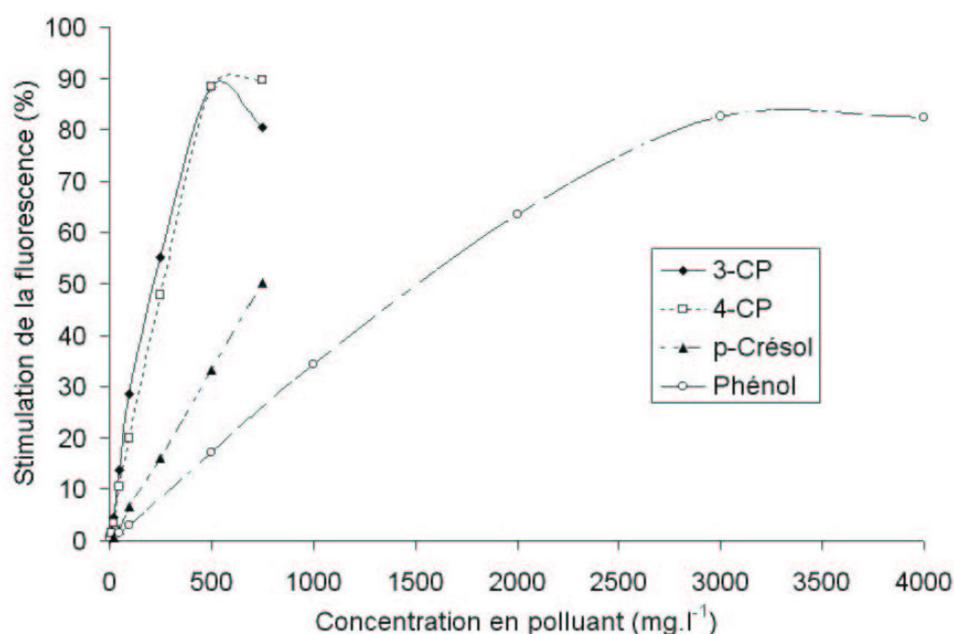
Les composés phénoliques sont massivement produits et utilisés dans de nombreux secteurs (Descotes *et al.*, 1992). Par exemple, les composés phénoliques chlorés sont assez répandus dans l'environnement. Ils sont utilisés dans l'industrie et l'agriculture car ils ont un large spectre d'action en tant que biocides. Les crésols sont, quant à eux, utilisés comme antiseptiques, désinfectants, xyloprotecteurs... (Descotes *et al.*, 1992). Nous avons donc décidé d'évaluer leur potentialité de détection par le biocapteur.

La Figure III.27 présente la réponse brute du biocapteur au 4-chlorophénol (4-cp). Des réponses similaires ont été obtenues pour le phénol, 3-chlorophénol (3-cp) et le p-crésol. Ces résultats nous ont permis d'obtenir les courbes de réponses du biocapteur à des doses cumulées de toxiques (Figure III.28). Dans un premier temps, la réponse du capteur augmente avec l'augmentation de la concentration en polluant. Il existe une valeur seuil (S) à partir de laquelle le signal diminue (Tableau III.10). A la différence des herbicides inhibiteurs du PSII et découplants, l'ajout d'une dose supplémentaire de polluant ne provoque pas une réponse en deux temps (augmentation, puis diminution), mais une diminution du signal.



**Figure III.27.** Réponse du biocapteur à des doses cumulées de 4-chlorophénol ( $\text{mg.l}^{-1}$ ). Le seuil S délimite le changement de comportement du biocapteur. (----) Niveau de base de la fluorescence. Conditions : tampon phosphate ( $10 \text{ mM}$  ;  $\text{pH } 7$ ),  $20^\circ\text{C}$ , débit =  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

Le pentachlorophénol (PCP) a aussi été testé. La réponse du biocapteur à une première dose de PCP se traduit par une augmentation du signal, puis à une diminution de celui-ci. L'exposition des micro-algues à des concentrations croissantes en PCP n'a pas permis d'obtenir une relation entre la concentration et l'intensité du signal. Le signal évolue en formant des vagues d'augmentation et de diminution, comme dans le cas d'ajout d'ioxynil au-delà du seuil S (cf. III.4.3.3. et Figure III.25).



**Figure III.28.** Courbes de réponses du biocapteur à des doses cumulées de 3-CP, 4-CP, p-Crésol, Phénol. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

**Tableau III.10.** Caractéristiques de la réponse du biocapteur pour la détection de composés phénoliques.

Polluant	Limite de détection en mg.l <sup>-1</sup>	Encadrement du Seuil (S) en mg.l <sup>-1</sup>
Phénol	50	3000<S<4000
3-Chlorophénol	5	250<S<500
4-Chlorophénol	5	500<S<750
p-Crésol	20	nd
Pentachlorophénol	0,1	nd

Le blocage du flux d'électrons dans l'appareil photosynthétique provoqué par les phénol, 3-CP, 4-CP, p-Crésol, pourrait provenir d'une inhibition directe du PSII en particulier au niveau du pool des plastoquinones. En effet, ces composés encombreraient les membranes biologiques en se dissolvant à l'intérieur.

Au-delà d'un certain seuil, ces composés auraient une action destructrice sur les membranes biologiques, et par conséquent, sur l'appareil photosynthétique. Il en résulterait une diminution de l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne.

Le comportement du PCP est plus complexe. Ce composé présente une action découplante (Fedtke, 1982). Les effets concomitants du blocage du flux d'électrons et du découplage, dès les faibles concentrations, pourraient expliquer les résultats obtenus.

#### III.4.3.5 Les métaux lourds

Les métaux lourds sont, en particulier chez les plantes et les micro-algues, des inhibiteurs de nombreuses enzymes (Van Assche et Clijsters, 1990), de l'activité ATPasique (Jeanne *et al.*, 1993) et de l'activité photosynthétique (Overnell, 1975).

Les essais ont été réalisés en utilisant un tampon MOPS (acide morpholino-3-propane sulfonide) (1 mM ; pH 7). Ce composé a été choisi car il ne forme pas de complexes avec les métaux (Overnell, 1975). De plus, celui-ci ne semble pas perturber le métabolisme algal car la cinétique d'induction de la fluorescence et l'intensité du signal sont semblables à celles obtenues lors de l'utilisation de tampon phosphate.

La réponse du biocapteur à trois sels de métaux lourds : le sulfate de cuivre, le nitrate de cadmium, le chlorure de mercure, est d'autant plus lente que les concentrations testées sont faibles (plusieurs heures). De ce fait, seule une concentration en toxique a pu être testée par expérience.

Le sulfate de cuivre est détectable à partir de  $50 \mu\text{g.l}^{-1}$ , alors que le nitrate de cadmium et le chlorure de mercure ne le sont qu'à partir de  $1 \text{mg.l}^{-1}$ . A  $1 \text{mg.l}^{-1}$ , le sulfate de cuivre et le nitrate de cadmium provoquent une augmentation monotone du signal respectivement pendant 1h30 et plus de 4 heures. En revanche, le chlorure de mercure provoque une évolution du signal en trois phases : augmentation / diminution / augmentation. Le Tableau III.11 récapitule les résultats obtenus.

**Tableau III.11.** Caractéristiques de la réponse du biocapteur pour la détection de métaux lourds. Conditions : tampon MOPS (1 mM; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

Toxique	Concentration la plus faible détectée	Evolution du signal
CuSO <sub>4</sub>	50 µg.l <sup>-1</sup>	A 50 et 100 µg.l <sup>-1</sup> augmentation monotone du signal. A 250 µg.l <sup>-1</sup> et 1 mg.l <sup>-1</sup> après une phase d'augmentation, respectivement de 4h et 1h30, le signal diminue de manière monotone.
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 mg.l <sup>-1</sup>	A 1 mg.l <sup>-1</sup> et 10 mg.l <sup>-1</sup> : augmentation monotone du signal.
HgCl <sub>2</sub>	1 mg.l <sup>-1</sup>	A 1 mg.l <sup>-1</sup> et 10 mg.l <sup>-1</sup> : évolution en plusieurs étapes : une augmentation, ensuite une phase de diminution, puis une augmentation supérieure à la première.

Les trois sels de métaux lourds provoquent des modifications du signal de l'intensité de la fluorescence. L'évolution du signal en plusieurs étapes, provoquée par le chlorure de mercure, illustre la complexité d'action de ce composé.

*Chlorella vulgaris* semble particulièrement affectée par de faibles concentrations en sulfate de cuivre. Samson *et al.* (1988a), Vavilin *et al.* (1995) ont montré que l'ion cuivre agirait directement sur l'appareil photosynthétique et inhiberait son fonctionnement en inactivant certains centres réactionnels du PSII, en inhibant le transport d'électrons et la synthèse de la protéine D1 (atteinte du mécanisme de réparation du PSII). Ces différents modes d'action de ce polluant expliqueraient les perturbations du signal de fluorescence des algues dès de faibles concentrations.

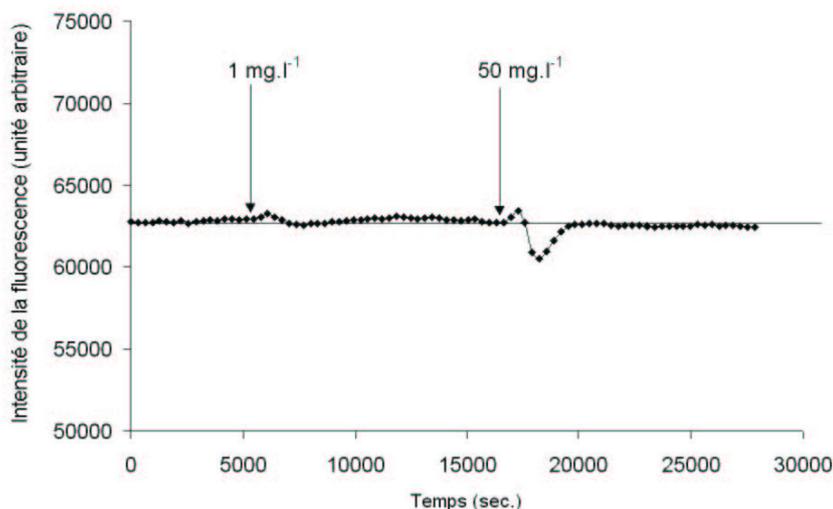
#### III.4.3.6 Les détergents

Les travaux de Gwenaél Corre (1998) ont montré que la photosynthèse pourrait être un indicateur précoce de la toxicité des détergents sur les micro-algues. Afin de voir si le biocapteur peut détecter ce type de molécules, nous avons réalisé des essais avec deux détergents anioniques : le dodécyle sulfate de sodium (SDS) et le dodécylbenzène sulfonate de sodium (DBS), et un détergent non-ionique : le Triton X-100.

Le Triton X-100 et le DBS font diminuer le signal. La dissolution et la dénaturation des membranes biologiques, en particulier celles des thylakoïdes, expliqueraient cette évolution du signal. Les concentrations détectées les plus faibles, après 3 heures d'exposition au Triton X-100 et au DBS, sont respectivement de 200 µg.l<sup>-1</sup> et 1 mg.l<sup>-1</sup>. L'absence de TLS chez *Chlorella vulgaris* peut expliquer les effets détectés à ces faibles concentrations. Le

Triton X-100 apparaît plus nocif vis-à-vis de l'activité photosynthétique de *Chlorella vulgaris* que le DBS. Ce résultat est en accord avec les données rapportées par Corre *et al.* (1996).

Le comportement du biocapteur vis-à-vis du SDS est très particulier. Suite à l'ajout de SDS, le signal augmente, puis diminue et réaugmente pour revenir au niveau de la fluorescence avant l'ajout du détergent (Figure III.29). Ce phénomène n'a été observé qu'avec ce détergent et aucune donnée similaire n'est, à notre connaissance, reportée dans la bibliographie. Nous pouvons estimer la limite de détection à  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de SDS.



**Figure III.29.** Réponse du biocapteur au SDS. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit =  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

Le profil de réponse, bien visible pour  $50 \text{ mg.l}^{-1}$ , pourrait traduire un phénomène d'adaptation de la cellule à la présence du détergent. Après une phase où le SDS fait augmenter la fluorescence, les cellules adapteraient leur métabolisme pour compenser les effets néfastes du SDS. Il y aurait alors surcompensation (diminution du signal de fluorescence) avant un retour à l'équilibre (retour au niveau de base de la fluorescence).

### III.4.4 Applications du biocapteur

#### III.4.4.1 Réponse du biocapteur dans des milieux réels

Des ajouts dosés d'atrazine ont été réalisés dans différentes eaux préalablement filtrées ( $0,22 \mu\text{m}$ ). A l'exception de l'eau de la Loire, la réponse du biocapteur est identique à celles des mesures effectuées lors de l'optimisation du biocapteur dans un tampon phosphate pH 7, 10 mM (Tableau III.12).

Nous avons tout d'abord pensé que le pH élevé de l'eau de la Loire était à l'origine des performances médiocres du biocapteur vis-à-vis de la détection de l'atrazine. L'ajustement du pH à 7 de l'eau de la Loire a permis de retrouver une réponse du biocapteur semblable à celle obtenue lors de l'utilisation de tampon phosphate (pH 7 ; 10 mM) pour des concentrations supérieures à  $25 \mu\text{g.l}^{-1}$ . En revanche, les performances du biocapteur pour des concentrations plus faibles sont médiocres. Nous avons remarqué que cette eau conserve une légère couleur marron, même après filtration. Une analyse poussée de la composition de cette eau serait nécessaire pour pouvoir interpréter ces résultats. On peut néanmoins émettre l'hypothèse de la présence de molécules capables de se lier à l'atrazine, comme les substances humiques (Hesketh *et al.*, 1996), ce qui empêcherait la pénétration dans les cellules de ce toxique quand il est présent à faibles concentrations.

**Tableau III.12.** Limites de détection de l'atrazine dans des expériences d'ajouts dosés et pH de différentes eaux utilisées. Conditions :  $20^\circ\text{C}$ , débit =  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

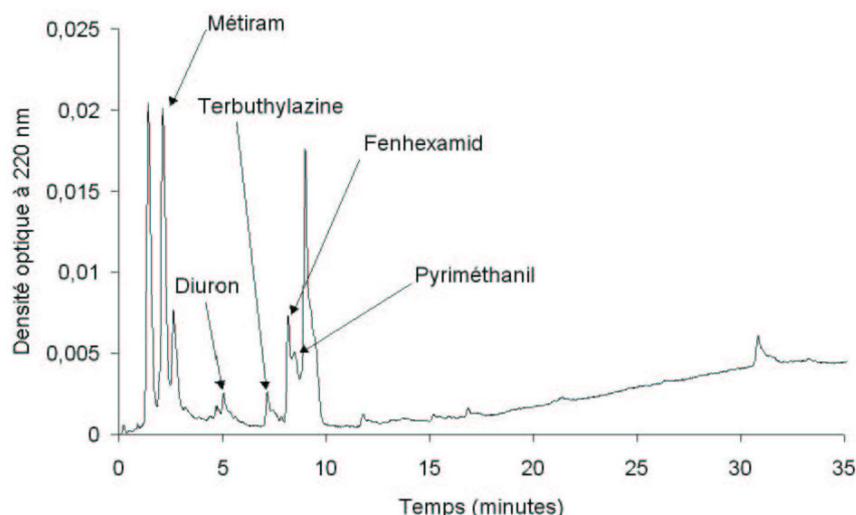
Provenance de l'eau utilisée	Limite de détection de l'atrazine ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	pH
Eau du robinet	0,25	7,3
Eau d'un lac (Chamagnieu)		7,9
Eau d'un étang (Saint-Bonnet-les-Oules)		7
Eau du Rhône (Givors)		7,6
Eau de la Loire (Saint Victor sur Loire)	1	9,3

#### III.4.4.2 Etude d'un mélange complexe

Nous avons étudié la réponse du biocapteur à un échantillon provenant d'un pilote (bioréacteur) réalisant une biodégradation de produits phytosanitaires d'effluents viticoles. A partir de cet échantillon, nous avons voulu vérifier si le biocapteur pouvait donner une information concernant la toxicité d'un mélange complexe.

##### a) Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Une analyse par HPLC de cet échantillon a été réalisée (Figure III.30).



**Figure III.30.** Chromatogramme de l'échantillon par analyse HPLC.

Le mélange étudié comporte de nombreux composés. Cinq d'entre eux ont pu être identifiés et dosés. Le Tableau III.13 récapitule les résultats obtenus.

**Tableau III.13.** Estimation des concentrations par HPLC des produits identifiés dans le mélange fourni.

Composé	Concentration	Action
Diuron	750 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Herbicide anti-PSII
Terbutylazine	220 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Herbicide anti-PSII
Pyriméthanil	890 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Fongicide
Fenhexamid	2,810 $\text{mg.l}^{-1}$	Fongicide
Métiram	40,150 $\text{mg.l}^{-1}$	Fongicide

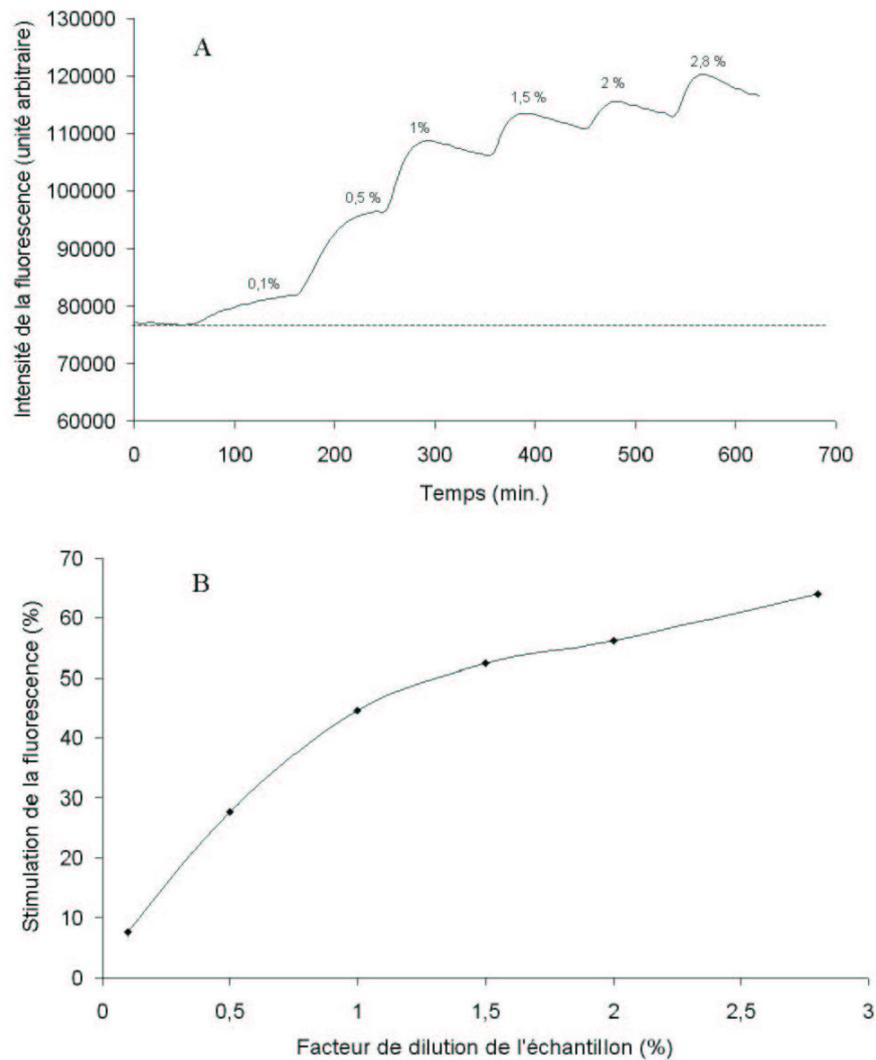
Avec notre biocapteur, 220  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de terbutylazine produisent une stimulation de la fluorescence de 96%. Cette valeur reportée sur la courbe d'étalonnage du diuron, équivaut à 80  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de diuron. Nous pouvons donc assimiler la concentration 220  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de terbutylazine à la concentration 80  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de diuron.

Ainsi, en supposant que le signal du biocapteur ne provient que de l'action des herbicides anti-PSII identifiés, il est possible de calculer une concentration équivalente en diuron pour le mélange de diuron et de terbutylazine dans cet échantillon. Cette concentration vaut  $750+80 = 830 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Si les effets des deux herbicides sont additifs, une

solution à  $830 \mu\text{g.l}^{-1}$  de diuron donnerait la même réponse qu'une solution contenant du diuron et du terbuthylazine dont la concentration respective seraient  $750$  et  $220 \mu\text{g.l}^{-1}$ .

*b) Analyse par le biocapteur*

L'échantillon a été testé dans le biocapteur à différentes dilutions, en réalisant des doses cumulées (Figure III.31).



**Figure III.31.** *A* : Réponse brute. *B* : Courbe de réponses du biocapteur à des doses cumulées de l'échantillon. Conditions : tampon phosphate (10 mM; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

Le signal atteint un plateau stable pour les dilutions 0,1% et 0,5%. Pour les concentrations supérieures, il augmente puis il diminue. L'augmentation de la concentration

en inhibiteurs anti-PSII explique la première phase d'augmentation du signal. Ensuite, sa diminution serait due à la toxicité des autres molécules présentes dans l'échantillon.

La concentration équivalente en diuron présente dans l'échantillon, déterminée grâce à la courbe d'étalonnage de ce composé, est égale à  $1800 \mu\text{g.l}^{-1}$ .

La concentration équivalente en diuron de l'échantillon, déterminée par le biocapteur, est environ deux fois plus élevée que celle déterminée avec les données fournies par l'HPLC. Du fait de la complexité du mélange étudié, des produits non identifiés par l'analyse HPLC pourraient agir comme inhibiteurs du PSII. Des synergies d'action entre les produits pourraient également intervenir. Ce dernier point n'est pas pris en compte lors du calcul d'une concentration équivalente en diuron.

Les résultats fournis par le biocapteur sont prometteurs. L'analyse d'un mélange complexe a permis d'obtenir des informations globales sur la présence d'inhibiteurs anti-PSII et d'autres composés toxiques pour les cellules algales. Ces données, relatives à la toxicité du mélange, sont complémentaires des données analytiques fournies par les analyses HPLC. Elles peuvent être utiles au suivi et au contrôle des réactions de biodégradation se déroulant dans le bioréacteur.

### III.4.5 Utilisation simultanée de plusieurs biorécepteurs dans le biocapteur

Le but de cette étude est de montrer s'il est possible d'utiliser différents biorécepteurs dans le biocapteur développé. Ainsi, une comparaison des performances de chaque biorécepteur pour la détection de polluants pourra être effectuée. Cependant, il est nécessaire de garder à l'esprit que les conditions de fonctionnement du biocapteur, en particulier le cycle de mesures, ont été optimisées pour *Chlorella vulgaris*. Il est donc vraisemblable que ces conditions opératoires ne soient pas optimales pour les autres souches algales.

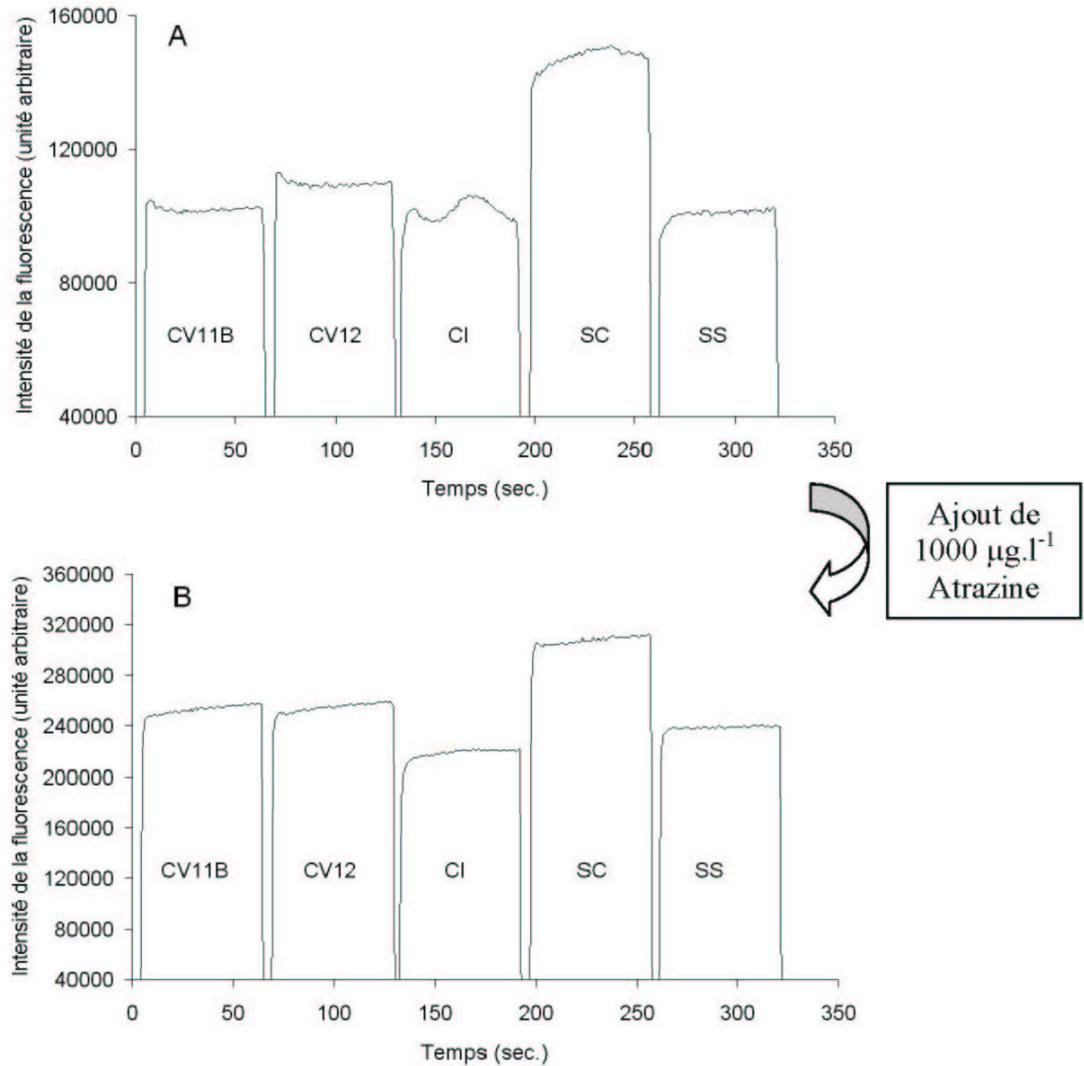
L'atrazine et le diuron ont été utilisés pour évaluer la réponse du biocapteur incorporant les cinq souches algales suivantes : *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11B (CV 11B), *Chlorella vulgaris* CCAP 211/12 (CV 12), *Chlamydomonas intermedia* SHL 113 (CI), *Selenastrum capricornutum* CCAP 278/4 (SC), *Scenedesmus subspicatus* 276/20 (SS).

#### a) Atrazine

La Figure III.32 montre les cinétiques d'induction de la fluorescence pour chaque souche en absence et en présence de  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine.

En absence d'atrazine, la diversité de ces cinétiques d'induction de la fluorescence des différentes micro-algues témoigne des différentes cinétiques de fonctionnement de la photosynthèse. Les deux souches de chlorelles ont un comportement semblable. On peut supposer que les micro-algues SC et SS sont dans un état de stress car leur cinétique d'induction ne comporte pas de résidu du pic P. Le transfert d'électrons du PSII vers le PSI serait perturbé. Ce stress peut provenir de la phase d'immobilisation et/ou du cycle lumineux imposé par les mesures dans le biocapteur.

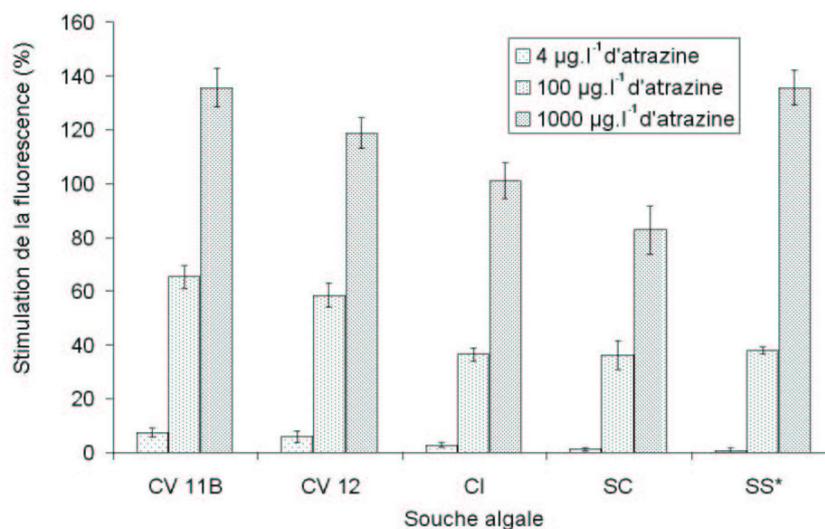
En présence de  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine, l'intensité du signal de la fluorescence augmente fortement et les cinétiques d'induction deviennent très semblables d'une souche algale à l'autre. La disparition du pic P est caractéristique de l'inhibition du PSII.



**Figure III.32.** Cinétique lente d'induction de la fluorescence des cinq souches algales utilisées. **A** : en absence d'atrazine. **B** : en présence de  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine. Conditions : tampon phosphate ( $10 \text{ mM}$  ;  $\text{pH } 7$ ),  $20^\circ\text{C}$ , débit =  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

Les réponses à  $4$ ,  $100$  et  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine des différentes algues sont présentées sur la Figure III.33. Les réponses de CV 11B et CV 12 à  $4$  et  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$  sont supérieures à celles des autres souches. A  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ , ces réponses sont approximativement deux fois plus élevées que pour les souches CI et SC. La réponse à  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  de SS est similaire à celles de CV 11B et CV 12.

Les réponses de SS à  $4$ ,  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$  présentées dans la Figure III.33 sont celles obtenues après  $1\text{h}30$  de circulation d'un flux d'atrazine. Ces deux valeurs ont été données à titre indicatif, elles ne correspondent pas au maximum de la réponse de cette algue pour ces deux concentrations.

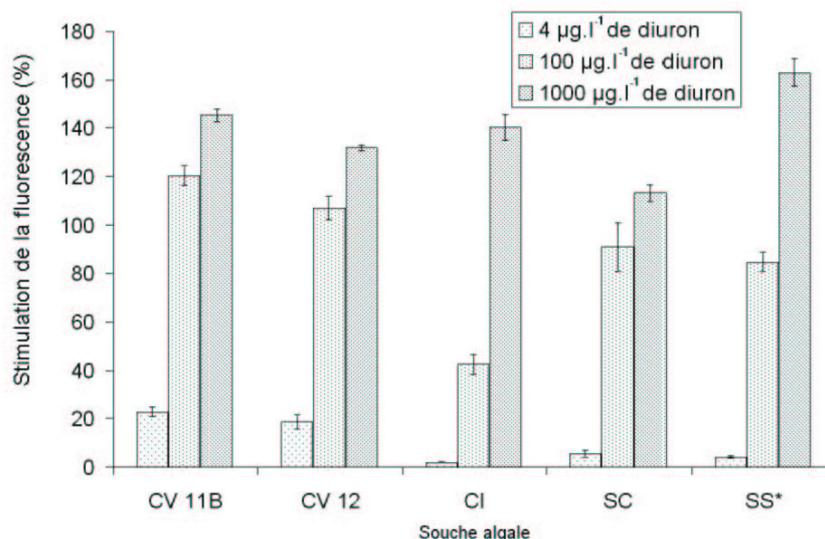


**Figure III.33.** Réponses des différentes micro-algues à 4, 100 et 1000  $\mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine. SS\* : les réponses à 4 et 100  $\mu\text{g.l}^{-1}$  sont obtenues après 1h30 de circulation du flux pollué. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

#### b) Diuron

Les différences de réponses observées avec l'atrazine, suivant les différentes algues, se retrouvent globalement avec le diuron (Figure III.34). Les réponses de CV 11B et CV12 à 4 et 100  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de diuron sont plus importantes que pour les autres souches. Les faibles réponses de CI à 4 et 100  $\mu\text{g.l}^{-1}$  montrent que cette souche est moins sensible au diuron que les autres.

Pour le diuron également, les réponses de SS à 4 et 100  $\mu\text{g.l}^{-1}$  sont plus longues à se stabiliser.



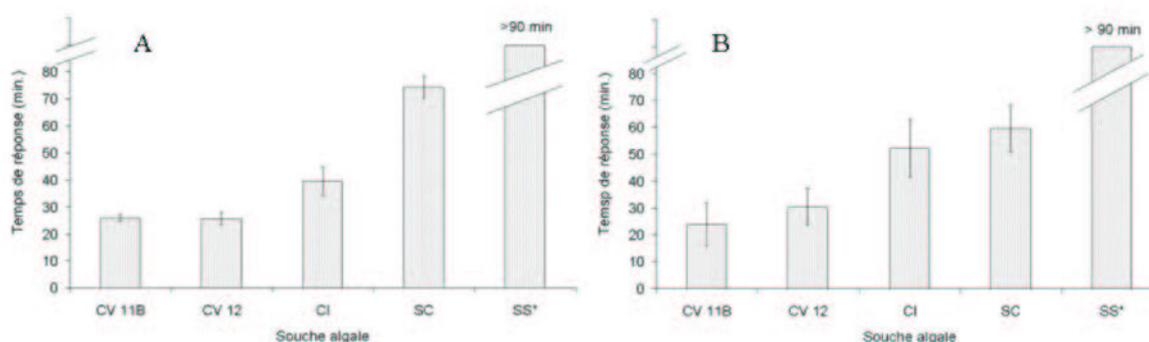
**Figure III.34.** Réponses des différentes micro-algues à 4, 100 et 1000  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de diuron. SS\* : les réponses à 4 et 100  $\mu\text{g.l}^{-1}$  sont obtenues après 1h30 de circulation du flux pollué. Conditions : tampon phosphate (10 mM ; pH 7), 20°C, débit = 2 ml.min<sup>-1</sup>.

Les différences de comportement entre les différentes micro-algues vis-à-vis de l'atrazine et du diuron peuvent provenir de nombreux facteurs tels que leur morphologie, leur cytologie, leur physiologie et leur génétique (Rojíčková-Padrťová et Maršálek, 1999).

Les deux clones de *Chlorella vulgaris* apparaissent plus sensibles aux herbicides à basses concentrations que les autres souches. Ce résultat ne concorde pas avec les tests de croissance de trois jours dans lesquels *Chlorella vulgaris* apparaît moins affectée que *Selenastrum capricornutum* par l'herbicide anti-PSII simétryne (de la famille des triazines) (Kasai et Hatakeyama, 1993). Cette différence pourrait provenir de l'activité enzymatique intense de *Chlorella vulgaris*. En effet, l'action phytotoxique des inhibiteurs du photosystème II ne s'explique pas par le simple blocage du flux d'électrons, mais elle résulte en fait de la cascade de réactions radicalaires et peroxydatives générées par ce blocage (Scalla, 1991). En luttant contre ces réactions grâce à son activité enzymatique importante, *Chlorella vulgaris* résisterait mieux et serait moins affectée par l'action phytotoxique de l'herbicide lors de tests de croissance. Cependant, l'inhibition du flux d'électrons pour cette souche algale serait plus importante que pour les autres souches, ce qui expliquerait la meilleure détection obtenue par notre biocapteur pour l'atrazine et le diuron.

### c) Temps de réponse

Le temps de réponse à  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine et de diuron de ces cinq souches montre une grande disparité de comportements (Figure III.35).



**Figure III.35.** Temps de réponse du biocapteur (temps nécessaire pour atteindre 95% de la réponse maximum) pour chaque souche utilisée à : A :  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'atrazine B :  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$  de diuron. Conditions: tampon phosphate (10 mM ; pH 7),  $20^\circ\text{C}$ , débit =  $2 \text{ ml.min}^{-1}$ .

Le classement des micro-algues par leur temps de réponse est :

$$\text{CV11B} = \text{CV12} < \text{CI} < \text{SC} < \text{SS}$$

La présence ou non de TLS (chapitre II) et la structure de la paroi de chaque souche peuvent être à l'origine des différences observées. En effet, on peut remarquer que les souches qui ont le temps de réponse le plus court, CV11B, CV12 et CI, sont dépourvues de TLS.

### III.5 CONCLUSION

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté le développement d'un biocapteur algal dans ses étapes de conception, optimisation des conditions opératoires, détermination des caractéristiques de la réponse du biocapteur, évaluation de son comportement dans des milieux complexes et lors de l'utilisation simultanée de plusieurs biorécepteurs.

La détection de l'atrazine par *Chlorella vulgaris* est optimale lorsque  $6 \times 10^6$  cellules sont immobilisées par membrane et lorsque le flux porteur a un pH de 7 et une température de 20°C. Lorsqu'un débit du flux porteur de  $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  est utilisé, le temps de réponse du biocapteur est de 15 minutes. Ce biocapteur est capable de détecter quotidiennement  $1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  d'atrazine pendant 4 semaines, lors d'un fonctionnement en continu, avec un flux porteur d'eau de Volvic.

La sensibilité de détection du biocapteur est variable selon le composé testé et son mode d'action. Les inhibiteurs anti-PSII, par exemple, peuvent être détectés à des concentrations inférieures au  $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ . En revanche, les composés phénoliques (à l'exception du pentachlorophénol) ne sont détectés qu'à partir de concentrations supérieures à plusieurs  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Malgré ces différences en terme de sensibilité, le large spectre de détection du biocapteur est particulièrement adapté à une application environnementale en tant que système d'alarme. Le suivi de la cinétique lente d'induction de la fluorescence chlorophyllienne permet la détection rapide et sensible de dysfonctionnements affectant le métabolisme algal. La mesure de la production de l'oxygène photosynthétique (Pandard et Rawson, 1993a) et du flux électronique issu du PSII (Pandard *et al.*, 1993b) de *Chlorella vulgaris* ne permettent pas de détecter la présence d'inhibiteurs de l'appareil photosynthétique à des concentrations aussi faibles que si l'on mesure la fluorescence chlorophyllienne.

L'étude réalisée avec des eaux de milieux naturels a mis en évidence le possible effet masquant de certaines molécules vis-à-vis de la détection de toxiques. Il est donc nécessaire de connaître le milieu dans lequel le biocapteur sera utilisé pour des mesures de pollutions afin de pouvoir tenir compte de ce biais éventuel lors de l'interprétation des résultats.

L'étude réalisée lors de l'utilisation simultanée de plusieurs biorécepteurs a donné des résultats prometteurs, mais, une optimisation des conditions opératoires est nécessaire. Il apparaît possible d'améliorer la représentativité écotoxicologique de la réponse du biocapteur et de permettre ainsi une meilleure gestion des risques de pollution d'un étang, d'une rivière et d'un captage d'eau destinée à la consommation humaine. De plus, la conservation de membranes contenant *Chlorella vulgaris* à 4°C et à l'obscurité permet de maintenir une détection de l'atrazine semblable à celle de membranes fraîchement préparées. Cette donnée est importante pour la commercialisation éventuelle d'un tel capteur : l'utilisateur final pourrait se dispenser de cultures algales, il lui suffirait de commander les membranes prêtes à l'emploi auprès du fabricant du biocapteur et de les conserver avant leur utilisation.

**CHAPITRE IV**  
**BIOCAPTEUR AMPEROMETRIQUE A ENZYME**  
**IMMOBILISEE**



## IV.1 INTRODUCTION

Le travail présenté dans ce chapitre est centré sur l'utilisation de la polyphénol oxydase (PPO) pour la réalisation d'un biocapteur enzymatique employé, soit pour le dosage de substrats, soit pour le dosage d'inhibiteurs de cette enzyme. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, cette enzyme est capable de détecter directement des composés phénoliques et peut aussi être inhibée par de nombreux composés tels que les pesticides. Elle semble donc particulièrement bien adaptée à la réalisation d'une bioélectrode destinée au domaine environnemental.

### IV.1.1 Rappels sur les cinétiques enzymatiques

#### IV.1.1.1 Equation de Michaelis-Menten

Une réaction enzymatique peut être représentée sous la forme simplifiée suivante :



avec :

$k_{+1}$  : constante d'association

$k_{-1}$  : constante de dissociation

$k_{+2}$  : constante catalytique

E : enzyme      S : substrat

P : produit      ES : complexe enzyme-substrat

On définit :

$$\text{La vitesse } V \text{ de formation du produit } V = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2} [ES] \quad (1)$$

$$\text{La vitesse de formation de ES} = k_{+1}[E][S]$$

$$\text{La vitesse de destruction de ES} = (k_{-1} + k_{+2}) [ES]$$

Durant l'état stationnaire, les vitesses de formation et de destruction du complexe ES sont égales. C'est l'équation de Briggs-Haldane.

$$k_{+1}[E][S] = (k_{-1} + k_{+2}) [ES] \quad \text{soit} \quad [ES] = \frac{k_{+1}[E][S]}{(k_{-1} + k_{+2})}$$

La concentration de l'enzyme non combinée [E] est égale à la concentration totale  $[E_T]$  moins celle du complexe ES.

$$[E] = [E_T] - [ES]$$

$$[ES] = \frac{k_{+1}([E_T] - [ES])[S]}{(k_{-1} + k_{+2})}$$

La résolution de cette équation par rapport à [ES] donne :

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{\frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k_{+1}} + [S]}$$

En substituant l'expression de [ES] dans (1), nous obtenons :

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2} [ES] = \frac{k_{+2} [E_T][S]}{\frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k_{+1}} + [S]}$$

En définissant :

$$V_M = k_{+2} [E_T] \quad \text{C'est la vitesse maximale de la réaction enzymatique}$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad \text{C'est la constante de Michaelis de l'enzyme}$$

On obtient l'équation de Michaelis-Menten :

$$V = V_M \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Deux cas limites se présentent :

$$\text{Si } [S] \ll K_M \Rightarrow V = \frac{k_{+2} [E_T]}{K_M} [S]$$

La cinétique de réaction est d'ordre 1 par rapport à S. La vitesse de la réaction est fonction de la concentration en substrat.

$$\text{Si } [S] \gg K_M \Rightarrow V = k_{+2} [E_T]$$

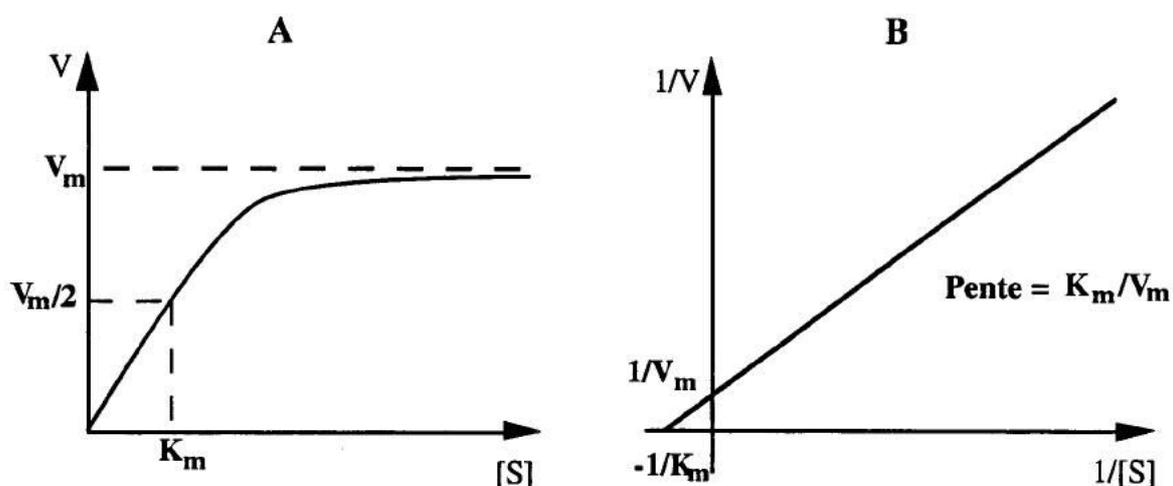
La cinétique de réaction est d'ordre 0 par rapport à S. On atteint la vitesse maximale  $V_M$

La représentation graphique de l'équation de Michaelis-Menten permet de décrire le comportement cinétique de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat spécifique (Figure IV.1 A). Les déterminations graphiques directes de  $V_M$  et  $K_M$  n'étant pas toujours très précises, d'autres méthodes ont été proposées. Elles reposent sur une

linéarisation de l'équation (A) de Michaelis-Menten. En prenant l'inverse de la vitesse on obtient :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_M} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_M}$$

Cette écriture de l'équation de Michaelis-Menten est appelée représentation de Lineweaver-Burk. La représentation graphique  $\frac{1}{V} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$  est une droite de pente  $\frac{K_M}{V_M}$  (Figure IV.1). Cette méthode sera utilisée dans ce chapitre dans le paragraphe IV.4.2.1.



**Figure IV.1.** A : Evolution de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat. B : Représentation de Lineweaver-Burk.

Les valeurs de la constante de Michaelis  $K_M$  et de la vitesse maximale  $V_M$  d'une enzyme peuvent fournir certains renseignements sur son activité. La constante de Michaelis permet de savoir quel est le degré d'adaptation de l'activité de l'enzyme à la concentration habituelle de son substrat dans la cellule. Pour la plupart des enzymes,  $K_M$  est approximativement égale à la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. Quand elle est élevée, cela signifie que la fixation du substrat sur l'enzyme est faible. Quand elle est faible, cela signifie que l'affinité du substrat pour l'enzyme est forte.

#### IV.1.1.2 Inhibition de la réaction enzymatique

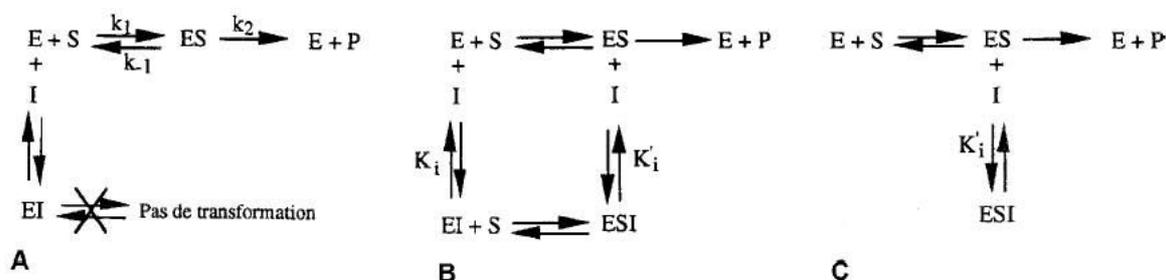
En présence d'inhibiteurs, la vitesse de la réaction enzymatique est réduite. L'inhibition de l'enzyme peut être classée en deux catégories principales : inhibition réversible et inhibition irréversible, selon que l'élimination de l'inhibiteur du milieu de

mesure restaure ou non l'activité de l'enzyme. Les modes d'action des inhibiteurs réversibles sur l'enzyme sont classés en trois groupes (Figure IV.2) : inhibition compétitive, inhibition non-compétitive, inhibition anti-compétitive.

*Inhibition compétitive* : L'inhibiteur a une structure très proche de celle du substrat et pourra se fixer sur le site actif de l'enzyme. Ce processus entraîne la formation d'un nouveau complexe enzyme-inhibiteur (EI) ne donnant pas lieu à la réaction catalytique. Par conséquent, le degré d'inhibition sera diminué par une augmentation de la concentration en substrat.

*Inhibition non compétitive* : L'inhibiteur se fixe à l'enzyme mais sur un site différent du site actif. Il n'empêche pas la formation du complexe enzyme-substrat (ES). Les molécules d'enzyme peuvent former trois types de complexes : enzyme-substrat (ES), enzyme-inhibiteur (EI) et enzyme-substrat-inhibiteur (ESI). La vitesse maximale  $V_M$  est diminuée alors que le  $K_M$  est inchangé en présence de ce type d'inhibiteur. On suppose souvent que l'interaction enzyme-inhibiteur n'est pas perturbée par la fixation du substrat sur l'enzyme c'est-à-dire que  $K_i = K'_i$ ,  $K_i$  et  $K'_i$  étant les constantes de dissociation respectives des complexes EI et ESI.

*Inhibition anti-compétitive* : L'inhibiteur ne se fixe qu'une fois que le couple enzyme-substrat (ES) est formé, il diminue la vitesse maximale  $V_M$ . L'inhibiteur ne peut pas se lier à l'enzyme libre.



**Figure IV.2.** Les différents modes d'action des inhibiteurs. A : inhibition compétitive B : inhibition non compétitive C : inhibition anti-compétitive.

#### IV.1.2 Utilisation d'un film de polymère pour l'immobilisation de la PPO

L'utilisation des films électropolymérisés appliqués à l'immobilisation d'enzymes s'est énormément développée dans les dernières années et a fait l'objet de nombreuses revues (Bartlett et Whitaker, 1987 ; Wallace *et al.*, 1999 ; Cosnier, 2000). La polymérisation électrochimique est un moyen simple et rapide pour l'immobilisation d'enzymes à la surface d'une électrode. L'électropolymérisation consiste en l'application d'un potentiel approprié à

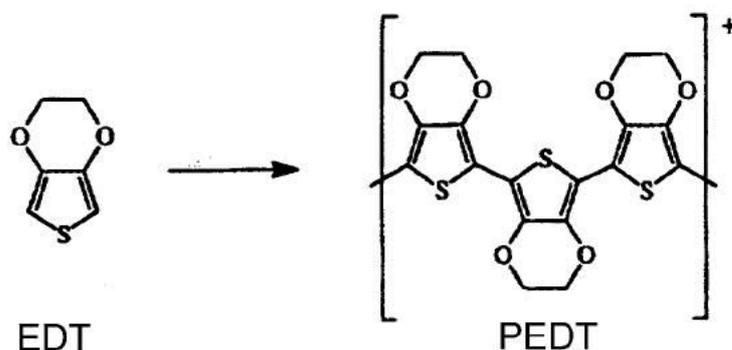
une électrode plongée dans une solution qui contient le monomère polymérisable et l'enzyme. La solution est de préférence aqueuse et à pH neutre pour préserver le composant biologique incorporé dans le polymère au cours de son immobilisation. L'électropolymérisation permet de maîtriser l'épaisseur et la quantité d'enzyme greffée sur la surface active de l'électrode. Ces propriétés peuvent être utilisées aussi dans la construction de micro-électrodes enzymatiques.

Il est important de remarquer que la cinétique enzymatique dans le film de polymère est différente de celle des solutions homogènes. Pour comprendre ce processus, il faut tenir compte des effets de la diffusion du substrat et du produit, ainsi que de la cinétique enzymatique. Cette différenciation entre les cinétiques des enzymes en solution et immobilisées permet de comprendre les résultats expérimentaux. En effet, il est probable que l'immobilisation de l'enzyme modifie l'activité molaire (turnover) de l'enzyme et son  $K_M$  (on définira alors le  $K_M$  apparent noté  $K_M^{app}$ ). Il est important de considérer aussi que la concentration de substrat dans le film peut être différente de sa concentration en solution. Le transport de masse du substrat et du produit à proximité de l'interface polymère-solution, la partition des espèces dans l'interface polymère-solution, la diffusion des espèces dans le film et la réaction électrochimique produite à la surface de l'électrode sont à prendre en compte. Les effets de migration des espèces chargées sous l'action du champ électrique sont habituellement négligés.

Différents polymères conducteurs ont été utilisés pour l'immobilisation des enzymes tels que : le poly(pyrrole) et ses dérivés, la poly(aniline) et le poly(thiophène). La plupart sont instables dans le temps. Leur instabilité thermiquement activée se traduit par une diminution importante de leur conductivité électrique au cours du temps. Après avoir suivi les mêmes tests de vieillissement à 70°C pendant 1300 heures, le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDT) conserve 98 % de sa conductivité initiale, le polypyrrole (PPY) 75 %, et la polyaniline (PANI) 50 % (Jolly *et al.*, 1998). Des essais ont démontré que le PEDT est plus stable que le polypyrrole vis-à-vis de l'hydrolyse, de la lumière et de la température (Lerch *et al.*, 1998).

Les différentes propriétés du PEDT nous ont conduits à l'utiliser comme matrice polymère pour l'incorporation de la PPO à la surface des électrodes. Ce composé, de la famille des polythiophènes, est un polymère conducteur relativement nouveau. En 1992, Heywang et Jonas ont comparé les potentialités du PEDT à celles du polypyrrole, un autre polymère conducteur répandu. Le PEDT possède une mobilité de charge et une stabilité élevées avec de très bonnes propriétés du film formé (Ghosh *et al.*, 1998). Le monomère, le

3,4-éthylènedioxythiophène (EDT) est un produit commercialisé sous le nom de Baytron, il a été récemment mis sur le marché par la Société Bayer AG. La Figure IV.3 montre la formation du polymère.



**Figure IV.3.** Schéma global de l'électropolymérisation du PEDT (Khan et Armes, 1999).

Le film homogène de PEDT se fixe à la surface de l'électrode par la polymérisation électrochimique du monomère 3,4-éthylènedioxythiophène (EDT) à des conditions modérées de pH et de température. La formation du film se fait en milieu aqueux et, éventuellement, un polymère hydrophile soluble dans l'eau du type polyvinylpyrrolidone (PVP) ou polyéthylène glycol (PEG) peut être ajouté à la solution d'électropolymérisation pour augmenter l'hydrophilie du polymère déposé. Les films obtenus sont bleus lorsqu'ils sont fins, et noirs lorsqu'ils sont plus épais. Ils adhèrent aux supports sur lesquels ils sont électropolymérisés.

## IV.2 PRINCIPE DU BIOCAPTEUR A POLYPHENOL OXYDASE

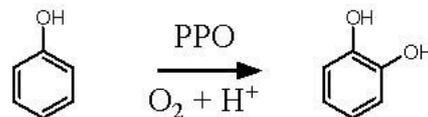
### IV.2.1 La polyphénol oxydase

La polyphénol oxydase (PPO) (monophénol mono-oxygénase EC 1.14.18.1), également appelée tyrosinase, est une métallo-protéine. Selon son origine, cette enzyme se présente sous la forme de monomères actifs (46 kDa, *Neurospora crassa*), de dimères, ou d'une protéine tétramérique (sous-unité de 67 kDa, *Aspergillus oryzae*) (Van Gelder *et al.*, 1997). Issue de différentes souches (végétale, animale), la PPO assure, entre autres, la biosynthèse des pigments (mélanine) de la peau des vertébrés (Riley, 1997 ; Del Marmol et Beermann, 1996). En effet, elle permet l'hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA). La PPO est aussi impliquée dans les systèmes de défense des plantes et des invertébrés (Walker et Ferrar, 1998 ; Söderhäll et Cerenius, 1998). En particulier chez la plante, la mélanine produite par la PPO peut isoler une zone endommagée ou infectée en créant une barrière physique, ce qui évite la propagation de l'infection par un agent pathogène.

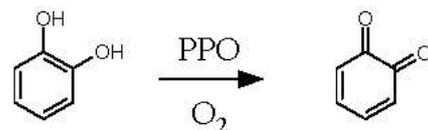
Le point isoélectrique de la PPO de champignon est environ 5 (Kertesz et Zito, 1965 ; Gerritsen *et al.*, 1994), elle porte donc des charges négatives à pH 7.

En présence d'oxygène, deux types de réactions peuvent être catalysées par cette enzyme :

- l'ortho-hydroxylation (activité crésolase) du mono-phénol en ortho-diphénol :



- L'oxydation (activité catécholase) de l'ortho-diphénol en ortho-quinone :

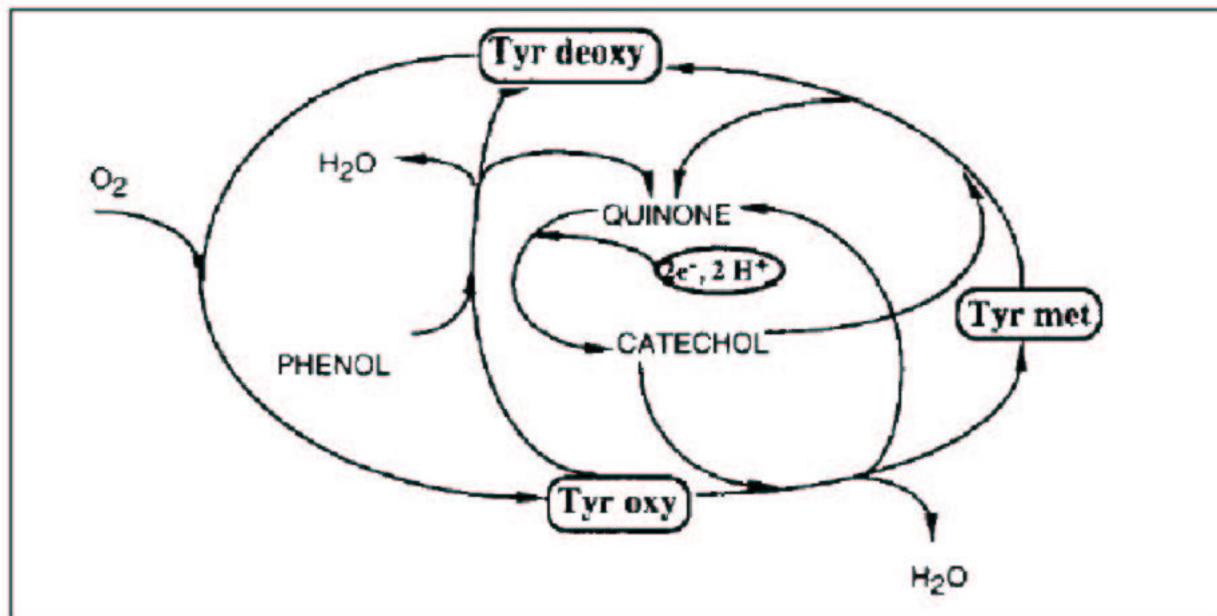


Le mécanisme de réduction de l'oxygène moléculaire en eau met en jeu l'échange de quatre électrons (Yaropolov *et al.*, 1996).

Le groupe prosthétique de la PPO est un site binucléaire de cuivre dont les variations de coordinance laissent apparaître trois formes limites sous lesquelles la PPO réagit différemment :

- forme « oxy »  $E(\text{Cu}^{2+} \text{O}_2^{2-} \text{Cu}^{2+})$
- forme « met »  $E(\text{Cu}^{2+} \text{Cu}^{2+})$ . Cette forme est prédominante dans la PPO issue de champignon (Hedenmo *et al.*, 1997).
- forme « déoxy »  $E(\text{Cu}^+ \text{Cu}^+)$

Ces trois formes interviennent dans tous les mécanismes moléculaires relatifs aux activités crésolase et catécholase de la PPO (Figure IV.4). Toutes les interactions enzyme/substrat ont lieu sur ces sites actifs. Le mécanisme d'action de la PPO est relativement complexe et n'a pas encore été entièrement élucidé à ce jour. Cette complexité, due à la présence de plusieurs mécanismes catalytiques, est néanmoins intéressante car, de ce fait, l'activité de la PPO est susceptible d'être affectée par une large variété d'inhibiteurs.

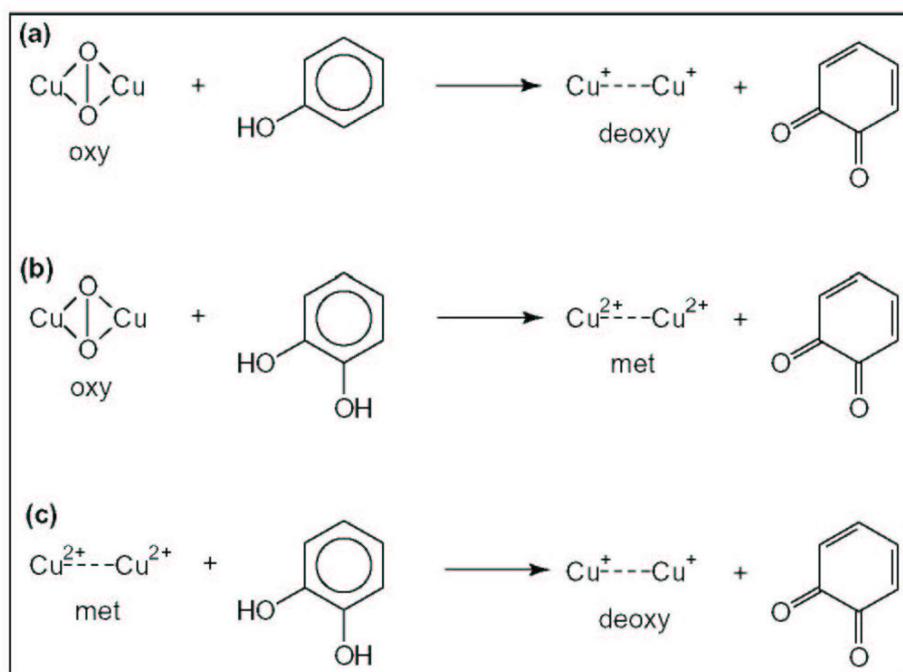


**Figure IV.4.** Schéma des cycles catalytiques crésolase et catécholase de la tyrosinase (Hedenmo *et al.*, 1997).

Lors de l'activité crésolase de la PPO, seule la forme « oxy » (Figure IV.5.a) de l'enzyme intervient. Le monophénol est lié en position axiale à l'un des atomes de cuivre de l'enzyme. Il doit alors subir un réarrangement stérique selon une géométrie de type

« bipyramide trigonale » qui l'oriente en position ortho pour l'étape d'hydroxylation. Ce mécanisme génère un orthodiphénolate coordonné qui est ensuite oxydé en quinone, laissant un site « déoxy » disponible pour l'oxygène moléculaire.

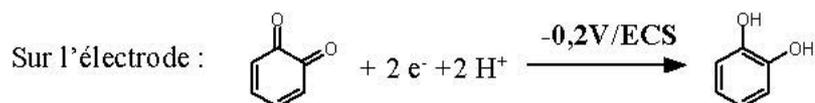
Les deux formes « met » et « oxy » de l'enzyme peuvent réagir indifféremment avec l'ortho-diphénol (catéchol) en l'oxydant en ortho-quinone (activité catécholase) (Figure IV.5.b et c). Contrairement au mécanisme antérieur, un réarrangement stérique du substrat ne s'avère pas nécessaire pour ce simple transfert électronique.



**Figure IV.5.** Réactions catalysées par la tyrosinase : (a) les composés monophénoliques sont hydroxylés en ortho-diphénols, puis oxydés en ortho-quinones (activité crésolase). (b) et (c) les ortho-diphénols sont oxydés en ortho-quinones (activité catécholase) (Decker et Tuczek, 2000).

### IV.2.2 Principe du biocapteur

La PPO est immobilisée à la surface d'une électrode de carbone vitreux dans un film de PEDT. L'enzyme catalyse, à partir d'un substrat (composé mono-phénolique ou di-phénolique), la production d'ortho-quinone. Ce composé électroactif peut alors être réduit à la surface de l'électrode.



Le principe de détection du biocapteur, représenté à la Figure IV.6, est fondé sur la mesure du courant de réduction à  $-0,2 \text{ V/ECS}$  de l'ortho-quinone enzymatiquement générée. La réponse ampérométrique de l'électrode est directement liée à la concentration en substrat dans la solution.

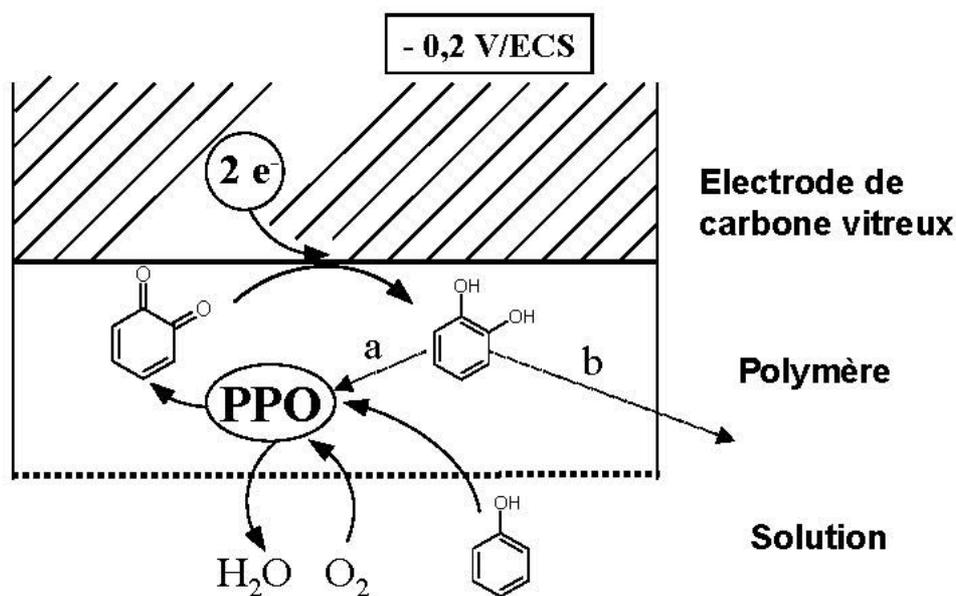


Figure IV.6. Représentation schématique du fonctionnement du biocapteur à PPO.

Ce mode de détection ampérométrique aboutit à la régénération de catéchol à la surface de l'électrode. Ce composé peut alors, soit diffuser vers la solution (Figure IV.6 b), soit entrer dans un nouveau cycle catalytique avec la PPO (Figure IV.6 a). Dans ce dernier cas, le processus se traduit par une amplification de la réponse de la bioélectrode (Coche-Guérente *et al.*, 1999).

La PPO nécessite un milieu aérobie. Dans la suite de ce chapitre, les résultats ont été obtenus en utilisant des solutions de tampon phosphate saturées en air comme électrolyte.

Fabiano *et al.* (2002) ont montré les potentialités de nouvelles bioélectrodes enzymatiques basées sur l'utilisation de films de PEDT pour la réalisation de biocapteurs ampérométriques. Ce chapitre est axé sur le développement d'une électrode à PPO immobilisée dans un film de PEDT. L'étude décrit la caractérisation et l'optimisation du biocapteur pour la détection directe du catéchol et de la dopamine. Le biocapteur ainsi obtenu a ensuite été calibré pour détecter le phénol, p-crésol, 4-chlorophénol et 3-chlorophénol (Figure IV.7). L'inhibition de cette bioélectrode a également permis la détection de l'atrazine et du diuron.

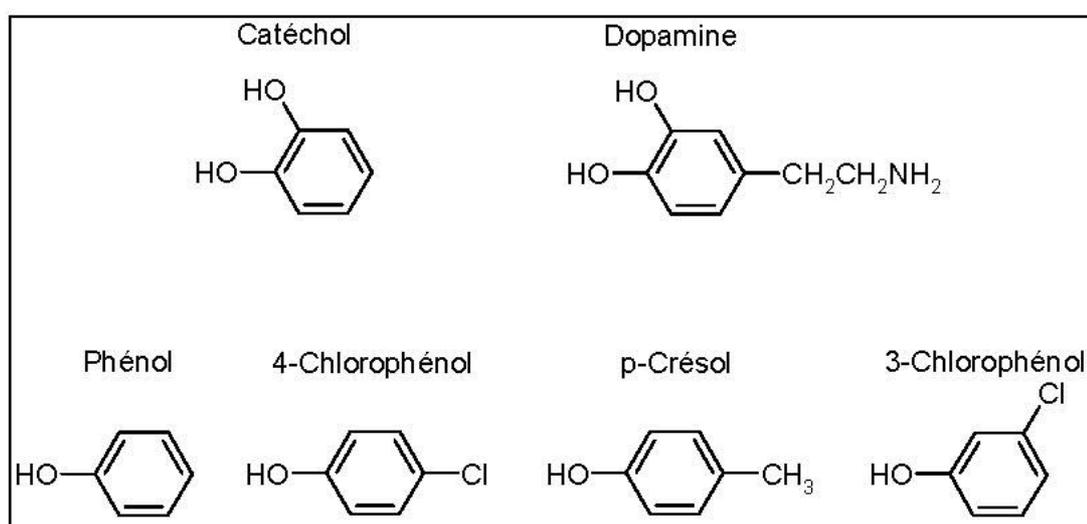


Figure IV.7. Substrats de la PPO utilisés lors de cette étude.

### IV.3 MATERIELS ET METHODES

#### IV.3.1 Réactifs pour la fabrication et l'étude du biocapteur

La polyphénol oxydase (EC 1.14.18.1) de champignon, fournie par Sigma, possède une activité de  $6680 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$  (une unité induit une augmentation de 0,001 de densité optique à 280 nm de 3 ml de solution de L-tyrosine (1 mM) par minute à pH 6,5 et à 25°C).

Les noms des produits utilisés pendant l'étude et leurs fournisseurs sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

*Tableau IV.1. Noms des produits utilisés et des fournisseurs correspondants.*

Produit	Fournisseur
Polyphénol Oxydase	Sigma
Catéchol	Sigma
Dopamine	Sigma
monomère 3,4-éthylènedioxythiophène	Bayer AG
poly(éthylène glycol) de MM = 15.000	Aldrich
3-chlorophénol	Fluka
4-chlorophénol	Fluka
Atrazine	Riedel-de Haën
Diuron	Riedel-de Haën
Phénol	Carlo Erba
Ethanol anhydre (qualité HPLC)	Carlo Erba
$\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	Prolabo
$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	Prolabo
KCl	Prolabo

L'atrazine et le diuron sont dissous dans de l'éthanol anhydre pour obtenir des solutions stocks à  $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Ces solutions sont conservées à 4°C pendant un mois.

Toutes les solutions de tampon phosphate sont préparées à partir d'eau ultrapure, de dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ), d'hydrogénophosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ) et de chlorure de potassium.

Pour chaque expérience, toutes les solutions aqueuses ont été réalisées à partir d'une eau ultrapure, obtenue par le système Milli Q<sup>®</sup>.

### IV.3.2 Appareillage

Un ensemble VoltaLab<sup>TM</sup> 21 (potentiostat/galvanostat PGP201 de Radiometer Copenhagen, piloté par le logiciel VoltaMaster 1) relié à un enregistreur thermique Sefram 8400 a été utilisé pour les études électrochimiques. Toutes les expériences électrochimiques ont été effectuées dans une cellule thermostatée (volume 10 ou 20 ml) avec un système à trois électrodes.

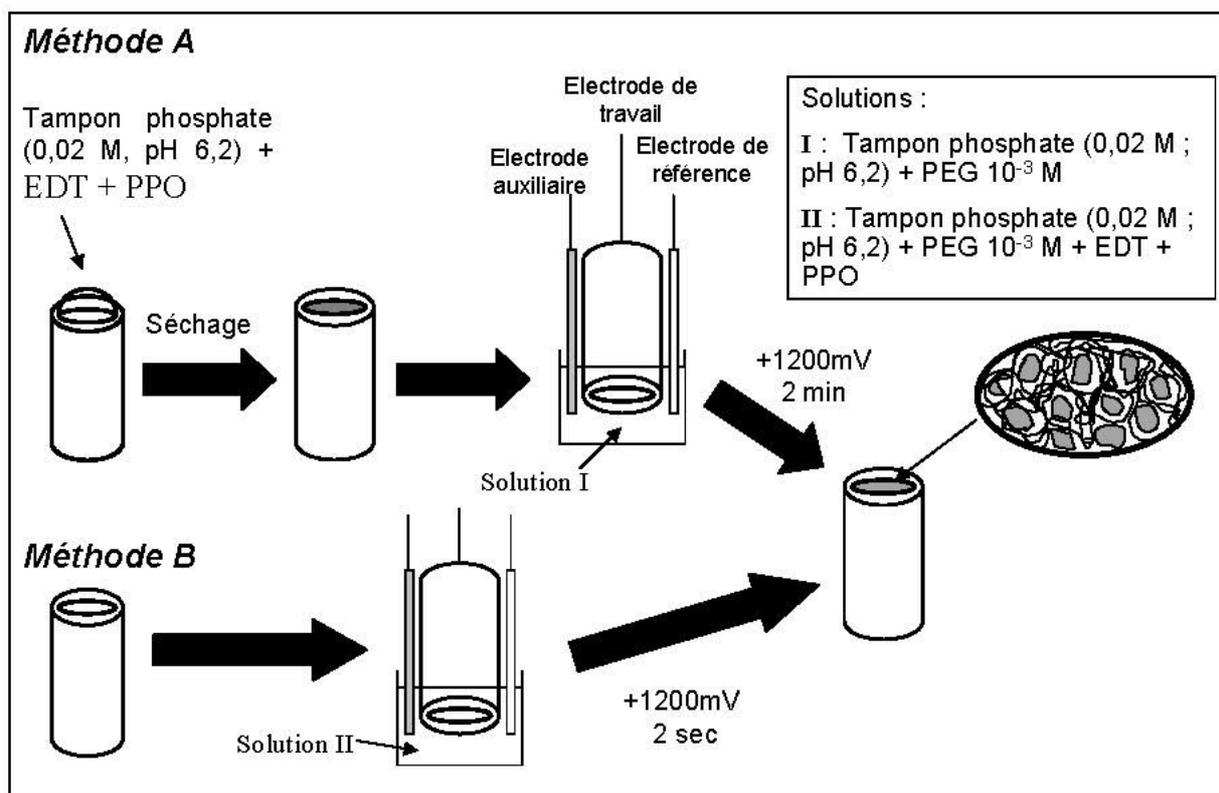
L'électrode de référence est l'électrode au calomel saturé (ECS) de chez Tacussel<sup>®</sup>. La contre-électrode est formée d'un fil de platine. Les électrodes de travail sont des électrodes de carbone vitreux de 3 mm de diamètre fournies par BAS<sup>®</sup>.

La surface des électrodes de travail a préalablement été polie avec un feutre approprié (kit de nettoyage PK-4 BAS<sup>®</sup>) et à l'aide de solutions de diamant de différents diamètres de particules (1, 3 et 15  $\mu\text{m}$ ).

### IV.3.3 Elaboration des bioélectrodes

Les bioélectrodes PEDT/PPO ont été élaborées selon deux procédés (Figure IV.8) en vue de la détection directe de composés phénoliques et de la détection indirecte (par inhibition) de pesticides.

- Méthode A (dosage direct des composés mono-phénoliques et di-phénoliques) : 1 mg de PPO est dissous dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate (0,02 M ; pH 6,2) contenant  $10^{-2}$  M de 3,4-éthylènedioxythiophène (EDT), correspondant à la limite de la solubilité du monomère dans l'eau. Cinq microlitres de ce mélange sont déposés à la surface d'une électrode de carbone vitreux (diamètre 3 mm). L'électrode est séchée à l'air pour obtenir un film de monomère et d'enzyme adsorbés (Figure IV.8). La polymérisation de l'EDT est effectuée à potentiel constant (+ 1,2 V/ECS) pendant 2 minutes dans une solution de tampon phosphate (0,02 M ; pH 6,2) contenant  $10^{-3}$  M de PEG. Les électrodes ainsi obtenues seront appelées par la suite : « PEDT/PPO met A »
- Méthode B (dosage des inhibiteurs de la PPO) : 1 mg de PPO est dissous dans 200  $\mu\text{l}$  d'une solution aqueuse contenant  $10^{-2}$  M d'EDT,  $10^{-3}$  M de PEG. La polymérisation de l'EDT est effectuée à potentiel constant (+ 1,2 V/ECS) pendant 2 secondes dans une solution de tampon phosphate (0,02 M ; pH 6,2) contenant  $10^{-3}$  M de PEG. Les électrodes ainsi obtenues seront appelées par la suite : « PEDT/PPO met B »



**Figure IV.8.** Méthodes de préparation d'une bioélectrode PEDT/PPO. La méthode A permet d'obtenir des électrodes pour le dosage des composés mono-phénoliques et di-phénoliques. La méthode B fournit des électrodes pour le dosage d'inhibiteurs de la PPO.

#### IV.3.4 Mesures ampérométriques

Les électrodes sont stabilisées dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M pH 6,5) à un potentiel de  $-0,2$  V/ECS jusqu'à l'obtention d'un courant résiduel stationnaire. De petits volumes de solutions de l'analyte (5 à 300  $\mu$ l) sont ensuite injectés dans la cellule. Les solutions stocks de substrats ou d'inhibiteurs sont préparées dans de l'eau ultrapure ou dans de l'éthanol anhydre (qualité HPLC), selon la solubilité du produit, et conservées à 4°C.

##### a) Influence de la quantité d'enzyme utilisée lors de son immobilisation dans un film de PEDT

La réponse du biocapteur à 5  $\mu$ M de catéchol a été enregistrée pour des électrodes fabriquées avec des dépôts de 6,25 à 50  $\mu$ g d'enzyme (méthode A). Pour les électrodes PEDT/PPO met B, la réponse à 25  $\mu$ M de dopamine est enregistrée pour des concentrations en enzyme allant de 0,8 à 10  $\mu$ g. $\mu$ l<sup>-1</sup>.

*b) Optimisation de la durée d'électropolymérisation*

Les réponses, à respectivement 5  $\mu\text{M}$  de catéchol pour les électrodes PEDT/PPO met A, et à 25  $\mu\text{M}$  de dopamine pour les électrodes PEDT/PPO met B, ont été enregistrées en fonction de la durée d'électropolymérisation utilisée. Les électrodes ont été électropolymérisées de 1 seconde à 8 minutes.

*c) Optimisation de la température et du pH de travail du biocapteur*

L'optimisation de la température et du pH de travail a été réalisée avec des électrodes PEDT/PPO met A. La réponse de l'électrode, en fonction de la température est enregistrée dans une solution d'analyse contenant du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) et du catéchol 5  $\mu\text{M}$ . La valeur de la réponse en densité de courant du biocapteur est alors relevée après stabilisation de ce courant pour chaque température. La réponse de l'électrode en fonction du pH est enregistrée dans des solutions de tampon phosphate 0,1 M dont les pH varient de 5 à 8. La concentration de catéchol est de 5  $\mu\text{M}$ .

*d) Détection d'inhibiteurs de la bioélectrode*

La réponse des électrodes à 25  $\mu\text{M}$  de dopamine est enregistrée. Lorsque la réponse est stable, un petit volume d'une solution d'inhibiteur est injecté dans la cellule de mesures. La diminution du signal est alors mesurée.

*e) Etude de la conservation de la bioélectrode*

Une bioélectrode PEDT/PPO met A est conservée à 4°C dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5). La réponse de cette électrode à 5  $\mu\text{M}$  de catéchol est évaluée quotidiennement dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) à 25°C.

## IV.4 RESULTATS ET DISCUSSION

### IV.4.1 Optimisation de la réponse de la bioélectrode PEDT/PPO

Deux méthodes de préparation des électrodes ont été développées : les électrodes préparées selon la méthode A ont été utilisées pour la détection de substrats ; les électrodes préparées avec la méthode B ont permis de détecter des inhibiteurs.

L'affinité de la PPO pour le catéchol est plus grande que pour la dopamine (Fenoll *et al.*, 2002). De plus, Besombes *et al.* (1995a) ont remarqué que l'inhibition des électrodes polypyrrole/PPO était plus marquée lorsque la dopamine était utilisée comme substrat. Il a donc été décidé d'utiliser la dopamine pour les expériences d'inhibition des électrodes PEDT/PPO met B.

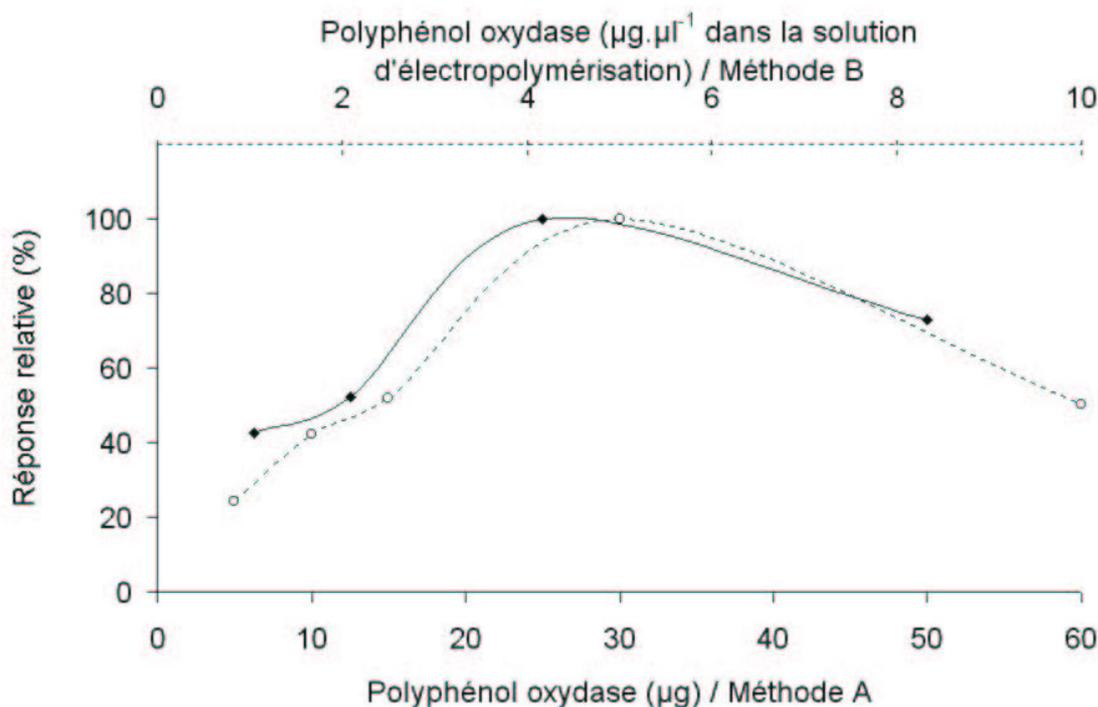
Fabiano *et al.* (2002) ont montré que le pH optimal de formation du film de PEDT était de 6,2 pour l'immobilisation de la glucose oxydase. Il a donc été décidé d'utiliser les mêmes conditions d'électropolymérisation (solution de tampon phosphate 0,02 M ; pH 6,2), compatibles avec la PPO. En effet, cette enzyme est stable pendant 12 heures en stockage dans des solutions dont le pH varie entre 4,5 et 9,3 (Kertesz et Zito, 1965). L'électropolymérisation de l'EDT a été réalisée à potentiel constant (+ 1,2 V/ECS) et permet la synthèse d'un film polymère stable de PEDT (Piro *et al.*, 2001).

#### IV.4.1.1 Influence de la quantité d'enzyme utilisée lors de son immobilisation dans un film de PEDT

La méthode A (Figure IV.8) de préparation des électrodes nécessite de fixer le volume de dépôt. Ce volume de dépôt a été fixé à 5  $\mu$ l au cours d'une étude préliminaire. C'est un compromis entre la taille de la goutte sur l'électrode, la vitesse de séchage et la quantité d'enzyme que l'on veut déposer.

La réponse du biocapteur selon l'utilisation ou non du monomère EDT à  $10^{-2}$  M dans la solution d'électropolymérisation n'est pas significativement différente. Le monomère déposé serait le seul à participer à la formation du film de PEDT et, ainsi, à emprisonner l'enzyme. Par conséquent, la solution d'électropolymérisation est composée de PEG  $10^{-3}$  M dans du tampon phosphate (0,02 M ; pH 6,2).

La Figure IV.9 illustre l'influence de la quantité d'enzyme initialement déposée (méthode A) ou dissoute (méthode B) sur la sensibilité du biocapteur. Il est à noter que la masse d'EDT déposée sur l'électrode (méthode A) est constante et égale à 50 nmoles.



**Figure IV.9.** Influence de la quantité d'enzyme sur la réponse à  $5 \mu\text{M}$  de catéchol d'une bioélectrode PEDT/PPO met A (—) (2 minutes d'électropolymérisation) et sur la réponse à  $25 \mu\text{M}$  de dopamine d'une bioélectrode PEDT/PPO met B (----) (2 secondes d'électropolymérisation). Conditions opératoires : solution tampon phosphate ( $0,1 \text{ M}$ ;  $\text{pH } 6,5$ ) contenant  $0,1 \text{ M KCl}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $-0,2 \text{ V/ECS}$ , système sous agitation.

Les deux types d'électrodes préparées présentent un maximum de sensibilité pour une quantité/concentration d'enzyme de  $25 \mu\text{g}$  (méthode A) et de  $5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  dans la solution d'électropolymérisation (méthode B).

Dans les deux cas, à faibles concentrations, la réponse des électrodes au substrat augmente lorsque la charge en enzyme augmente. Au-delà de l'optimum, on observe une diminution des performances en termes de détection des bioélectrodes. On peut émettre deux hypothèses, valables pour les deux méthodes d'immobilisation, pour expliquer ce phénomène.

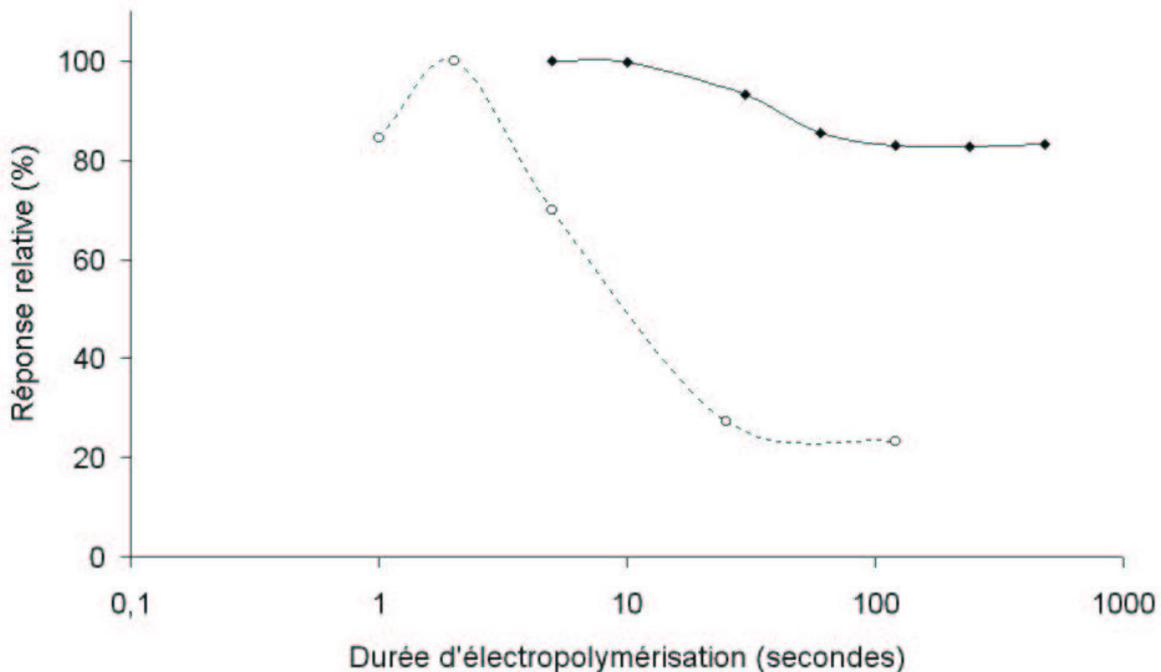
Tout d'abord, une concentration trop élevée d'enzyme réduirait l'adhérence du film à la surface de l'électrode et induirait une perte de biomatériau. Cependant, il n'a pas été observé macroscopiquement un détachement du biofilm.

La seconde hypothèse repose sur le fait que la production d'ortho-quinone aurait principalement lieu à l'interface film/solution. Plus la quantité d'enzyme présente dans le film est grande, plus la production d'ortho-quinone à cette interface serait grande. La perte des molécules d'ortho-quinone par dilution dans la solution aboutirait à une diminution de

l'efficacité de détection du substrat par l'électrode. Des résultats similaires ont été reportés par Shin et Kim (1995) avec une électrode polypyrrole-GOD.

#### IV.4.1.2 Optimisation de la durée d'électropolymérisation

La durée d'électropolymérisation est un des paramètres qui permet le contrôle de l'épaisseur du film électrogénéré (Bartlett et Whitaker, 1987 ; Wallace *et al.*, 1999). Nous l'avons fait varier dans un domaine compris entre 1 seconde et 8 minutes afin d'étudier son influence sur la réponse des biocapteurs PEDT/PPO met A et PEDT/PPO met B en présence respectivement d'une solution de catéchol 5  $\mu\text{M}$  et de dopamine 25  $\mu\text{M}$ . Les résultats sont présentés sur la Figure IV.10 .



**Figure IV.10.** Influence de la durée d'électropolymérisation (échelle logarithmique) sur la réponse à 5  $\mu\text{M}$  de catéchol d'une bioélectrode PEDT/PPO met A (—) et sur la réponse à 25  $\mu\text{M}$  de dopamine d'une bioélectrode PEDT/PPO met B (----). Conditions opératoires : solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) contenant 0,1 M KCl, 25°C, -0,2 V/ECS, système sous agitation.

La principale différence entre les deux méthodes de préparation des bioélectrodes réside dans les quantités d'EDT et d'enzyme susceptibles d'être immobilisées sur l'électrode. En effet, dans la méthode A, la quantité d'EDT polymérisable et d'enzyme immobilisable est fixe et est égale à la quantité déposée sur l'électrode. Lorsque l'ensemble de l'EDT est

polymérisé, une augmentation du temps d'électropolymérisation ne modifiera pas les propriétés de l'électrode. Au contraire, la méthode B utilise l'EDT et l'enzyme présents dans la solution d'électropolymérisation pour générer le film de polymère. Ainsi, plus la durée d'électropolymérisation est longue, plus le film croît en épaisseur, emprisonnant une quantité de plus en plus importante d'enzyme.

- Electrodes PEDT/PPO met A :

La réponse ampérométrique relative est élevée pour des durées courtes d'électropolymérisation (5 et 10 secondes). La réponse relative de l'électrode diminue ensuite d'environ 15%. Au-delà de 60 secondes, cette réponse reste constante. Pour une durée d'électropolymérisation très courte, nous avons obtenu une meilleure réponse, ceci peut s'expliquer par la formation d'une couche de polymère dont les contraintes diffusionnelles du substrat sont moins importantes que celles présentes dans le film issu d'une polymérisation plus longue. Cependant, nous avons observé macroscopiquement des problèmes d'adhérence du film à la surface de l'électrode, ce qui peut entraîner une perte d'enzyme retenue et une diminution importante de la sensibilité du biocapteur dans le temps. Une durée d'électropolymérisation de 120 secondes a été choisie pour assurer une rétention efficace de l'enzyme par le polymère et une bonne adhérence du polymère à l'électrode.

- Electrodes PEDT/PPO met B :

Contrairement à la méthode A, l'adhérence du film avec cette méthode est satisfaisante, même pour une durée très courte de polymérisation.

Deux secondes d'électropolymérisation permettent d'obtenir le meilleur compromis entre l'épaisseur du film et la quantité d'enzyme immobilisée. En effet, si la durée de polymérisation est trop courte (inférieure à deux secondes), la quantité d'enzyme immobilisée sur l'électrode est trop faible pour assurer une détection optimale. En revanche, si la durée d'électropolymérisation est trop longue (supérieure à deux secondes), l'épaisseur du film augmente et génère des contraintes diffusionnelles qui freinent le transfert vers l'électrode de l'ortho-quinone formée à l'interface film/solution. Shin et Kim (1995) ont obtenu des résultats semblables avec une électrode polypyrrole-GOD.

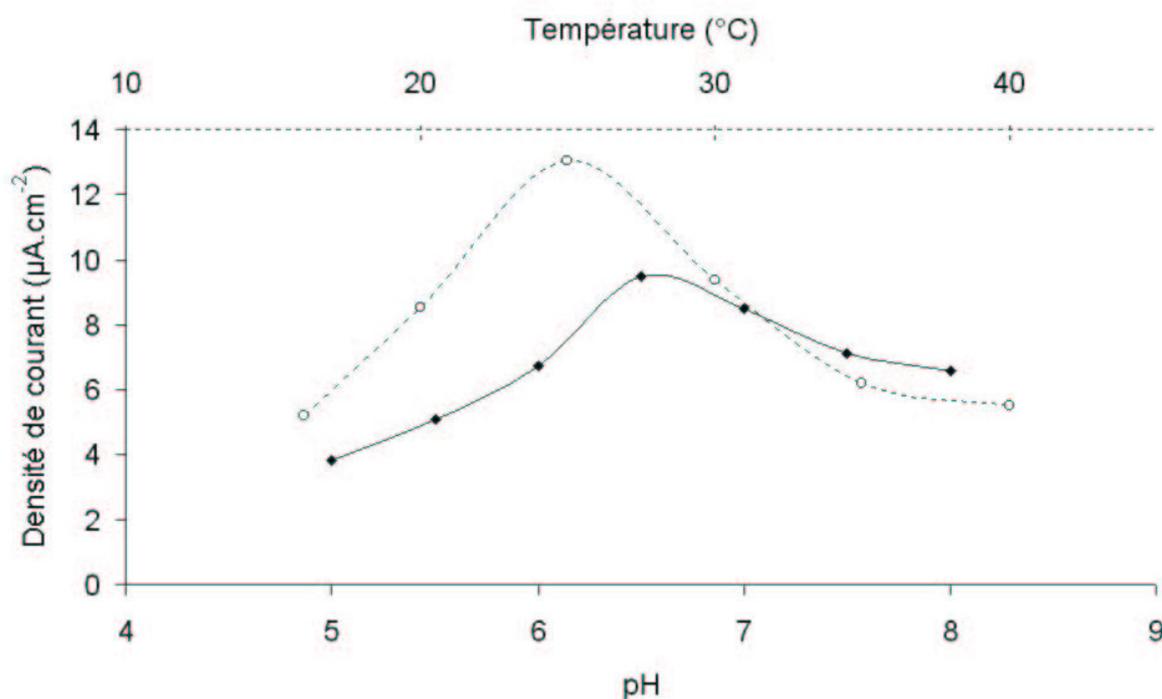
Dans la suite de ce travail, nous utiliserons 2 minutes de durée d'électropolymérisation pour la méthode A et 2 secondes pour la méthode B.

#### IV.4.1.3 Optimisation de la température et du pH de travail du biocapteur

L'optimisation de ces deux paramètres a été réalisée seulement avec des électrodes PEDT/PPO met A. En effet, l'environnement chimique de l'enzyme peut être considéré comme identique dans les deux méthodes d'immobilisation. On peut donc supposer que l'optimisation du pH et de la température réalisée avec les électrodes préparées selon la méthode A reste valable pour les électrodes PEDT/PPO met B.

Il existe une zone de températures pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. En effet, une augmentation de la température contribue à accroître la vitesse d'une réaction enzymatique jusqu'à une valeur limite, au-delà de laquelle la vitesse de la réaction chute rapidement en raison de la dénaturation irréversible de l'enzyme. L'activité enzymatique dépend également du pH du milieu réactionnel.

La réponse en densité de courant du biocapteur PEDT/PPO en présence de 5  $\mu\text{M}$  de catéchol a été étudiée dans une gamme de températures allant de 15 à 40°C et dans une gamme de pH allant de 5 à 8 (Figure IV.11).



**Figure IV.11.** Influence de la température (-----) [pH de travail = 6,5] et du pH (—) [température de travail = 25°C] sur la réponse en densité de courant d'une électrode PEDT/PPO met A. Conditions opératoires : 5  $\mu\text{M}$  catéchol, solution tampon phosphate 0,1 M contenant 0,1 M KCl, -0,2 V/ECS, système sous agitation.

L'intensité du courant augmente quand la température passe de 15 à 25°C, puis diminue pour des températures supérieures en raison de la dénaturation thermique de la

polyphénol oxydase. Nous avons choisi de travailler à 25°C afin d'obtenir la plus grande sensibilité. Munjal et Sawhney (2002) ont montré une grande dépendance entre la température optimale de travail de la PPO et la nature du support servant à l'immobilisation de l'enzyme. Par exemple, cette température est de 20°C dans un gel de polyacrylamide et de 40°C dans un gel de gélatine. Wang *et al.* (2000) et Cosnier et Innocent (1993) ont reporté une température optimale de 55°C et 50°C lorsque l'enzyme est immobilisée dans un sol-gel ou un film de polypyrrole. Les interactions entre la molécule servant de support à l'immobilisation et l'enzyme peuvent réduire la flexibilité conformationnelle de celle-ci. Des températures supérieures sont alors nécessaires pour qu'une conformation satisfaisante soit atteinte pour la bonne fixation du substrat et le bon fonctionnement de l'enzyme (Munjal et Sawhney, 2002).

Les variations de la densité de courant en fonction du pH présentent une forme caractéristique en cloche. La réponse ampérométrique du biocapteur est optimale pour un pH de 6,5. Ce résultat est semblable à celui obtenu par Cosnier et Innocent (1993) qui ont immobilisé la PPO dans un film de polypyrrole. Dans la suite de cette étude, nous avons choisi une valeur de pH de travail de 6,5.

#### IV.4.1.4 Paramètres optimisés pour la préparation des bioélectrodes PEDT/PPO met A et PEDT/PPO met B

L'étude précédente a permis d'établir les conditions d'électropolymérisation et de travail pour les deux méthodes de préparation des électrodes (Tableau IV.2).

**Tableau IV.2.** Récapitulatif des conditions de préparation des bioélectrodes.

	Méthode A	Méthode B
Solution de dépôt	5 µl de : Tampon phosphate (0,02 M ; pH 6,2) + EDT 10 <sup>-2</sup> M + PPO 5 mg.ml <sup>-1</sup>	-
Solution d'électropolymérisation	Tampon phosphate (0,02 M ; pH 6,2) + PEG 10 <sup>-3</sup> M	Tampon phosphate (0,02 M ; pH 6,2) + EDT 10 <sup>-2</sup> M + PPO 5 mg.ml <sup>-1</sup> + PEG 10 <sup>-3</sup> M
Durée d'électropolymérisation	2 minutes	2 secondes
Température de travail	25 °C	
pH de travail	6,5	
Composés dosés	mono-phénoliques et di-phénoliques	Inhibiteurs

#### IV.4.1.5 Etude de la reproductibilité des électrodes PEDT/PPO met A et PEDT/PPO met B

Nous avons réalisé une étude afin de connaître la reproductibilité des mesures des deux méthodes de préparation des bioélectrodes PEDT/PPO.

Le Tableau IV.3 présente l'intensité de la réponse ampérométrique de 8 électrodes PEDT/PPO met A à 5  $\mu\text{M}$  de catéchol et de 8 électrodes PEDT/PPO met B à 25  $\mu\text{M}$  de dopamine. Les conditions de préparation utilisées sont celles présentées dans le Tableau IV.2.

**Tableau IV.3.** Etude de la reproductibilité de la préparation de l'électrode PEDT/PPO selon la méthode utilisée. Conditions opératoires : solution tampon phosphate (0,1 M; pH 6,5), température 25°C, -0,2 V/ECS, système sous agitation.

N° d'électrode	Réponse ampérométrique à 5 $\mu\text{M}$ de catéchol ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) PEDT/PPO met A ***	Réponse ampérométrique à 25 $\mu\text{M}$ de dopamine ( $\text{nA}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) PEDT/PPO met B
1	6,62	481
2	4,00	311
3	6,20	269
4	6,60	311
5	5,54	396
6	8,34	509
7	4,92	495
8	4,95	524
Moyenne	5,90	412
Intervalle de confiance à 95%	0,90	67

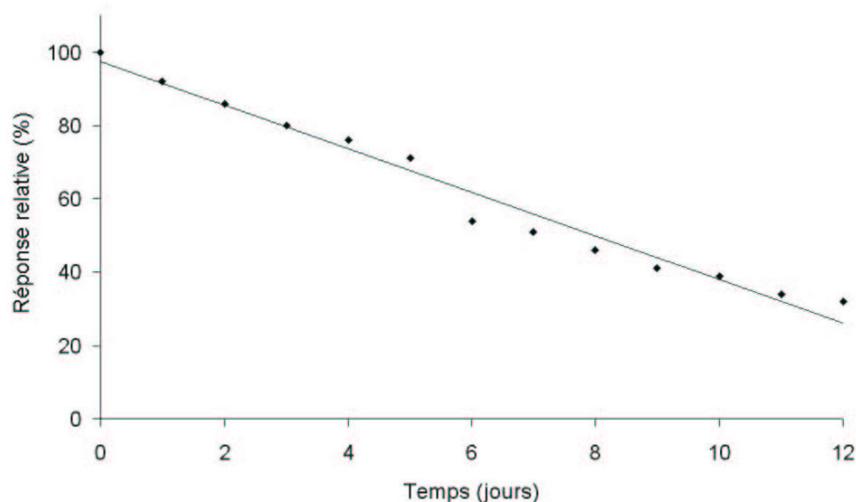
\*\*\* ces électrodes ont été réalisées avec un lot d'enzyme moins active ce qui explique la plus faible détection par rapport au reste de l'étude (notamment les données reportées Figure IV.13 et Figure IV.14)

Les 8 électrodes de chaque méthode ont un intervalle de confiance à 95% correspondant à environ 15% de la valeur moyenne de leur sensibilité.

Ces écarts entre les valeurs des réponses pourraient provenir du fait que les volumes de solution et la masse d'enzyme mesurés sont faibles, d'où des risques d'erreurs. De plus, il est difficile d'obtenir une solution d'électropolymérisation parfaitement homogène.

#### IV.4.1.6 Etude de la conservation d'une électrode PEDT/PPO met A

La réponse d'une bioélectrode PEDT/PPO met A à 5  $\mu\text{M}$  de catéchol, conservée à 4°C dans du tampon phosphate, a été évaluée quotidiennement. La réponse relative de cette électrode est de 30% après 12 jours de conservation (Figure IV.12).



**Figure IV.12.** Evolution de la réponse relative d'une électrode PEDT/PPO met A à 5  $\mu\text{M}$  de catéchol en fonction du temps de conservation, à 4°C, dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5). Conditions opératoires : solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5), température 25°C, -0,2 V/ECS, système sous agitation.

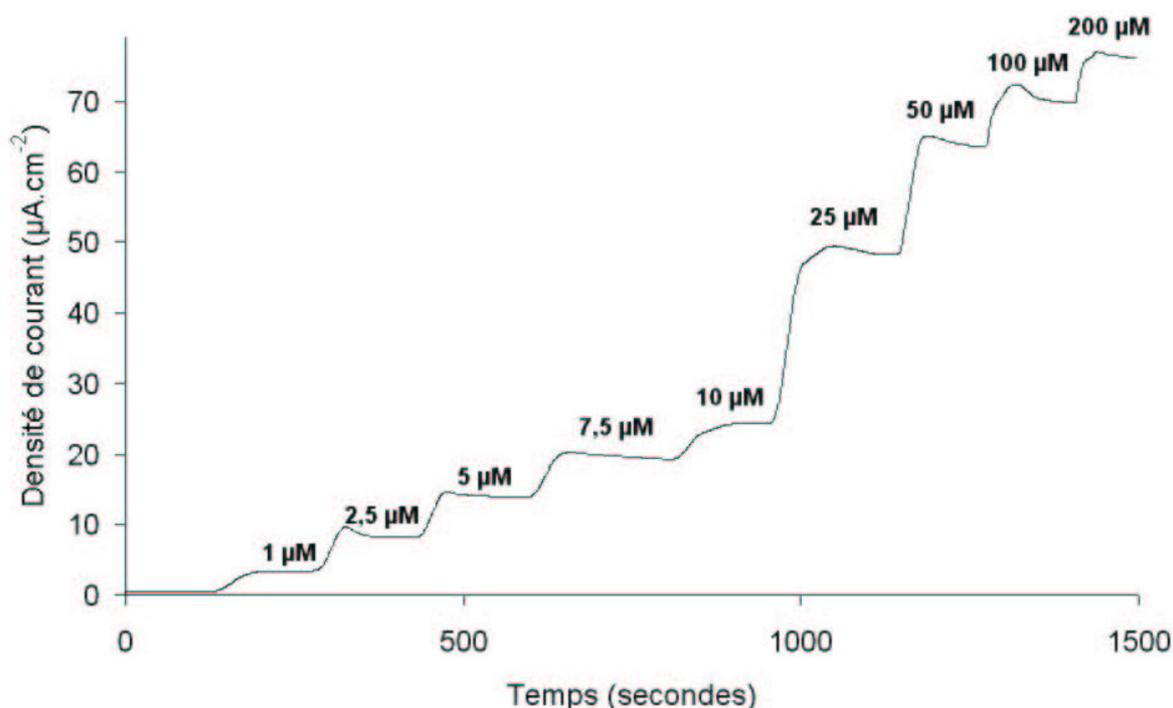
La dégradation rapide des performances de la bioélectrode au cours du temps peut provenir d'un relargage de l'enzyme et/ou de l'environnement chimique créé par le PEDT qui ne permet pas de stabiliser suffisamment l'enzyme afin de maintenir son activité.

#### **IV.4.2 Performances du biocapteur dans les conditions optimisées pour la détection de différents composés**

##### IV.4.2.1 Détection de composés di-phénoliques

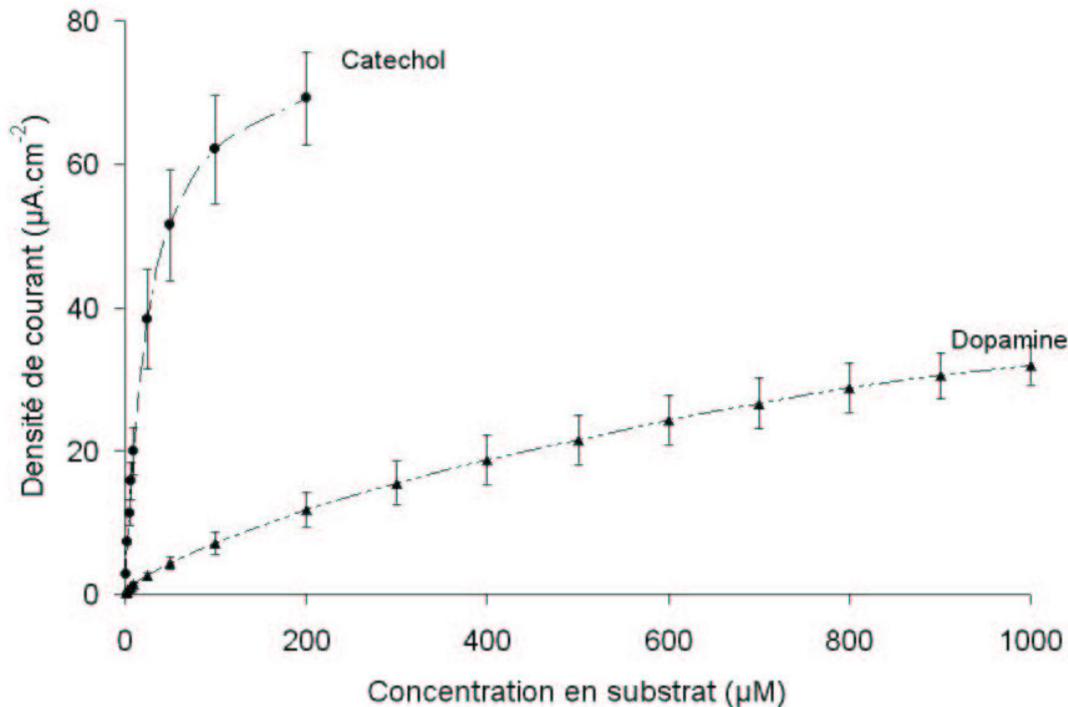
La Figure IV.13 présente la réponse ampérométrique caractéristique d'un biocapteur PEDT/PPO met A. Chaque saut correspond à des ajouts successifs de catéchol pour obtenir des concentrations cumulées de substrat allant de 1 à 200  $\mu\text{M}$ . Les réponses obtenues sont relativement stables. Le temps de réponse du biocapteur est d'environ 40 secondes. Ce temps est fluctuant d'une expérience à l'autre car il dépend beaucoup de la vitesse d'agitation qui est difficile à régler avec précision dans notre système. L'agitateur magnétique fonctionnant grâce à un flux d'eau génère très peu d'interférences électromagnétiques (peu de bruit de fond

au niveau de l'électrode), mais il ne permet pas un contrôle précis de la vitesse de rotation du barreau magnétique.



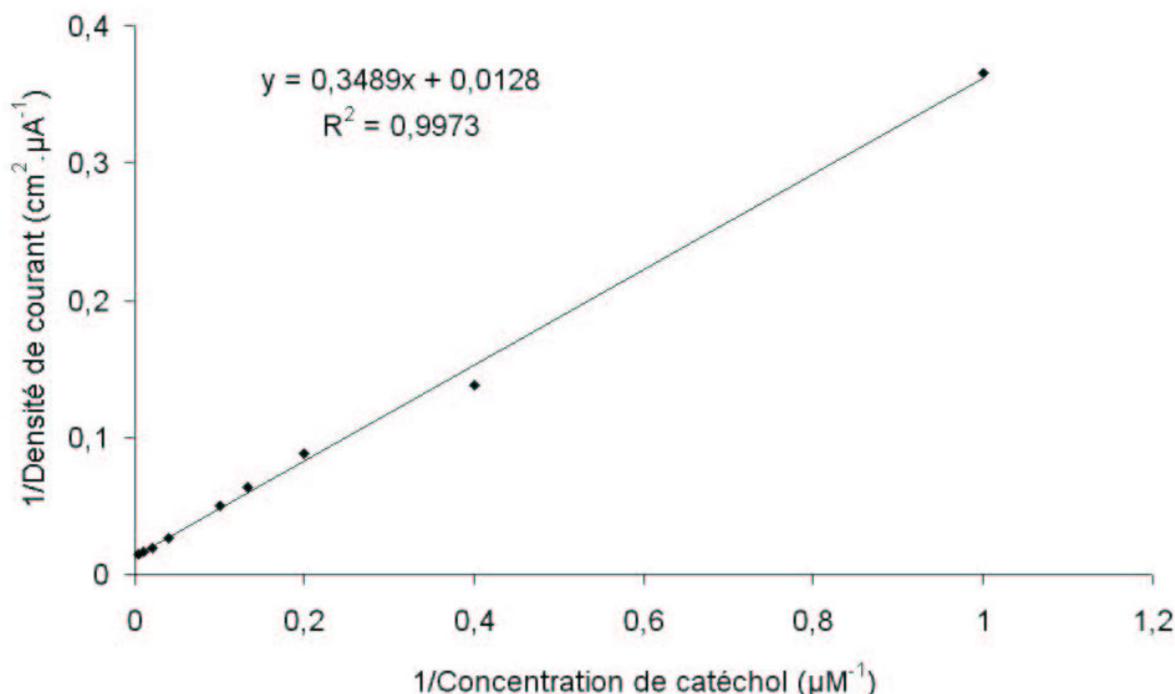
**Figure IV.13.** Réponse du biocapteur PEDT/PPO met A à des ajouts successifs de catéchol dans la solution d'analyse jusqu'à obtenir des concentrations finales de 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 µM. Conditions opératoires : solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) contenant 0,1 M KCl, 25°C, -0,2 V/ECS, système sous agitation.

La Figure IV.14 représente la courbe d'étalonnage du biocapteur PEDT/PPO met A pour la dopamine et le catéchol. Ces deux courbes présentent une partie linéaire comprise entre 1 et 25 µM pour le catéchol et entre 1 et 200 µM pour la dopamine. La sensibilité (pente de la partie linéaire) est de 1999 mA.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup> pour le catéchol et 133 mA.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup> pour la dopamine. Ces courbes de calibration peuvent être décrites par le formalisme de catalyse enzymatique de type Michaelis-Menten (Duckworth et Coleman, 1970 ; Rivas et Solis, 1992) Il est intéressant de remarquer que les électrodes PEDT/PPO met A sont six fois plus sensibles pour détecter la dopamine que les électrodes PEDT/PPO met B.



**Figure IV.14.** Courbes d'étalonnage du catéchol et de la dopamine obtenues avec une électrode PEDT/PPO met A. Conditions opératoires : solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) contenant 0,1 M KCl, 25°C, -0,2 V/ECS, système sous agitation.

La représentation de Lineweaver-Burk (voir le paragraphe IV.1.1.1) de la courbe d'étalonnage du biocapteur pour le catéchol permet d'accéder au  $K_M$  apparent qui n'est pas spécifique de l'enzyme immobilisée mais de l'ensemble de la biomembrane. La valeur du  $K_M^{app}$  déterminée à partir de la Figure IV.15 est de  $2,7 \cdot 10^{-5}$  M. Cette valeur est inférieure au  $K_m$  de l'enzyme en solution :  $2,4 \cdot 10^{-4}$  M (Smith et Krueger, 1962). Cette diminution du  $K_m$  sous l'effet de l'immobilisation a déjà été observée par Cosnier et Innocent (1992) et est probablement liée au mécanisme d'amplification de la réponse de l'électrode décrit précédemment (IV.2.2.).



**Figure IV.15.** Représentation de Lineweaver-Burk de la courbe d'étalonnage (Figure IV.14) du catéchol obtenue avec une électrode PEDT/PPO met A.

#### IV.4.2.2 Détection de composés mono-phénoliques

Les courbes de calibration des électrodes PEDT/PPO met A pour le p-crésol, le 4-chlorophénol, le phénol et le 3-chlorophénol sont représentées Figure IV.16.

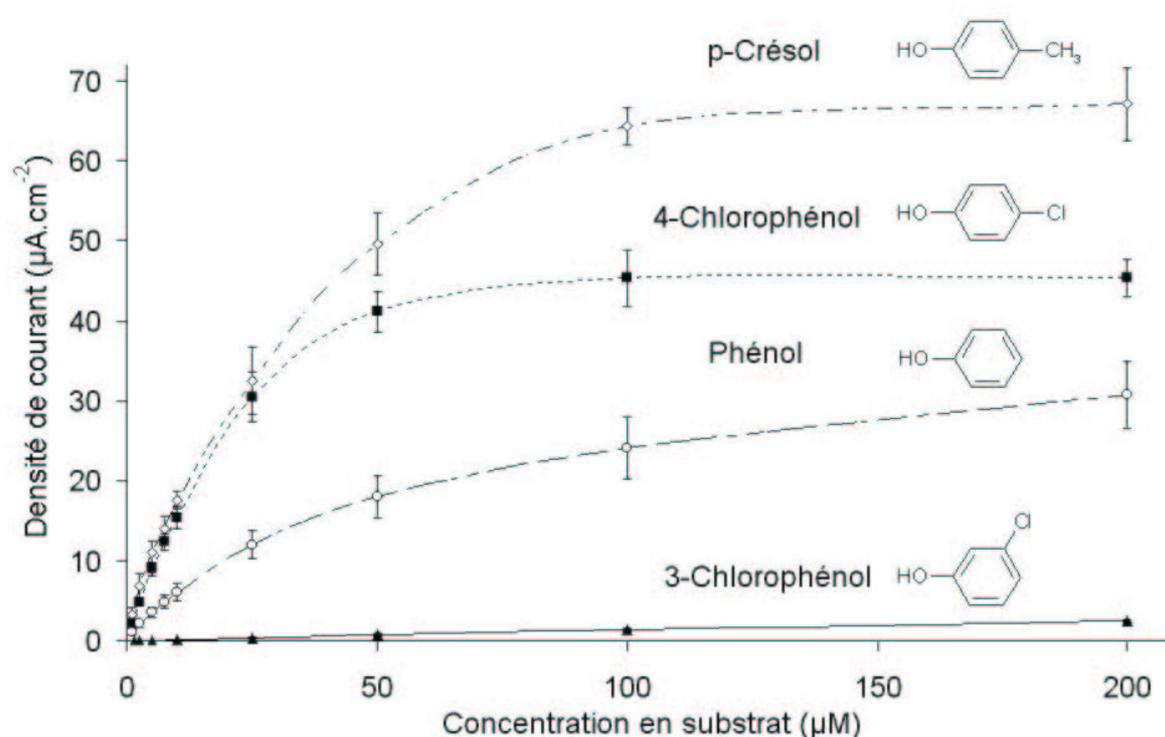
Besombes *et al.* (1995b) ont remarqué, qu'avec une électrode polypyrrole-PPO, la durée de la stabilisation de la réponse du biocapteur au 3-chlorophénol et au 4-chlorophénol était plus longue (2 à 5 minutes) qu'avec du phénol. Ce comportement n'a pas été observé avec l'électrode PEDT/PPO. En effet, la durée de la stabilisation des électrodes est la même pour l'ensemble des substrats testés (environ 40 secondes). Cette différence de comportement est probablement liée à des contraintes diffusionnelles variant selon la nature du film servant à l'immobilisation de l'enzyme.

La sensibilité du biocapteur varie de 13 à 1759 mA.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup> selon le substrat utilisé, ce qui illustre la sélectivité de la bioélectrode. Cette sélectivité dépend de l'enzyme, des caractéristiques physico-chimiques des substrats testés et du film de PEDT (perméabilité, hydrophobicité, épaisseur...). Par exemple, la sensibilité de détection du 3-chlorophénol est faible comparée à celle obtenue pour le 4-chlorophénol. Les coefficients de partage eau-octanol de ces deux composés sont très voisins (log K<sub>ow</sub> du 3-chlorophénol = 2,48 et log K<sub>ow</sub> du 4-chlorophénol = 2,41) (Kamiya et Tanaka, 1995) et ne permettent pas d'expliquer une telle

différence. L'encombrement stérique du chlore en position méta empêcherait la formation d'un état de transition de la molécule pour que la réaction enzymatique se déroule complètement (Kitajima et Moro-oka, 1994).

Les principales caractéristiques de la détection du biocapteur sont rassemblées dans le Tableau IV.4.

Les performances remarquables de ce biocapteur proviennent de la réaction cyclique (amplification du signal) induite par la réduction électrochimique des ortho-quinones en ortho-diphénols, qui sont eux-mêmes des substrats de la PPO, et de l'environnement chimique présent autour de l'enzyme créé par le PEDT.



**Figure IV.16.** Courbes d'étalonnage des composés mono-phénoliques obtenues avec une électrode PEDT/PPO met A. Conditions opératoires : solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) contenant 0,1 M KCl, température 25°C, -0,2 V/ECS, système sous agitation.

**Tableau IV.4.** Caractéristiques de la détection des composés mono-phénoliques obtenues avec une électrode PEDT/PPO met A. Conditions opératoires : solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) contenant 0,1 M KCl, température 25°C. Potentiel de mesure : -0,2 V/ECS, système sous agitation.

Substrat	Sensibilité (mA.M <sup>-1</sup> .cm <sup>-2</sup> )	Linéaire jusqu'à (μM)	Limite de détection (nM)
p-Crésol	1759	10	5
4-Chlorophénol	1538	10	5
Phénol	608	25	50
3-Chlorophénol	13	100	500

#### IV.4.2.3 Détection de composés inhibiteurs de la PPO

Dans les chapitres précédents, un biocapteur algal a été développé pour le suivi de la qualité de l'eau. La PPO est connue pour être inhibée notamment par l'atrazine (Besombes *et al.*, 1995b ; Mazzei *et al.* 1995) et les molécules de la famille de phényl urée (McArdle et Persaud, 1993). Nous avons donc évalué la capacité de détection de ces produits par des électrodes PEDT/PPO, ce qui permettra de comparer les performances de ces deux biocapteurs.

Les premiers essais d'inhibition des bioélectrodes PEDT/PPO ont été faits avec des électrodes réalisées selon la méthode A. Cependant, aucune inhibition n'a pu être observée avec ce type d'électrode. Nous avons donc décidé de mettre au point un nouveau protocole de préparation des biocapteurs. L'utilisation d'une solution d'électropolymérisation contenant l'enzyme (méthode B) permet de générer des films sur l'électrode dont l'épaisseur dépend directement du temps d'électropolymérisation. Deux secondes d'électropolymérisation permettent d'obtenir un film plus fin que celui généré par la méthode A. Cela réduirait les contraintes diffusionnelles du film vis-à-vis des inhibiteurs. Ceux-ci auraient alors un accès plus facile et inhiberaient une plus grande partie des molécules d'enzyme présentes dans un film PEDT/PPO met B plutôt que dans un film PEDT/PPO met A.

L'influence de l'atrazine et du diuron ( Figure IV.17 ) sur la réponse ampérométrique du biocapteur PEDT/PPO met B à 25 μM de dopamine a été examinée. La réponse de

l'électrode après l'injection de l'inhibiteur présente une diminution rapide suivie d'une stabilisation du courant (Figure IV.18 : inhibition de la bioélectrode par l'atrazine).

Besombes *et al.* (1995b) ont observé une inhibition de leurs électrodes par le méthanol qu'ils utilisaient pour dissoudre les inhibiteurs à tester. Ce phénomène n'a pas été observé pour l'éthanol avec les bioélectrodes PEDT/PPO met B. Aussi, nous avons donc choisi ce solvant pour solubiliser le diuron et l'atrazine.

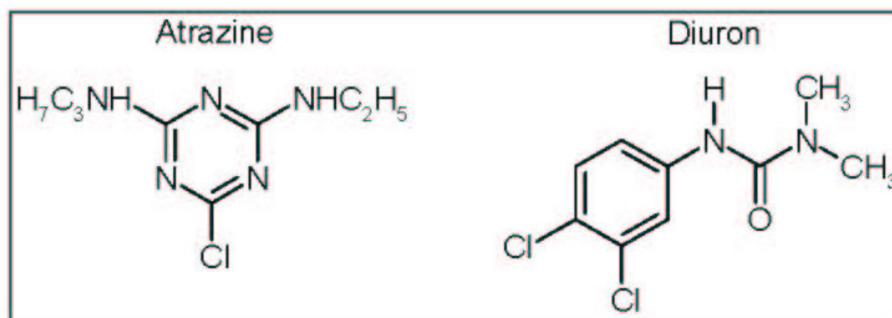


Figure IV.17. Formules chimiques des herbicides utilisés dans cette étude.

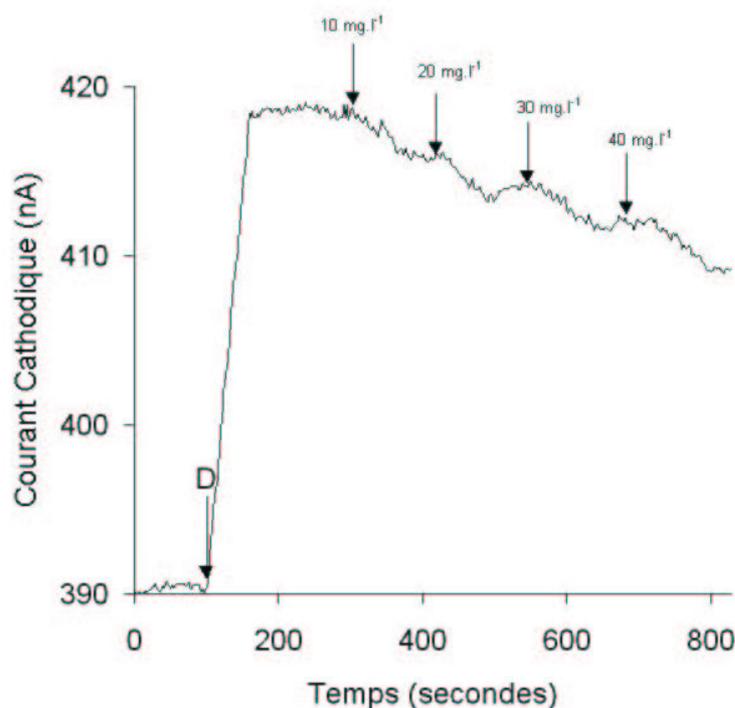
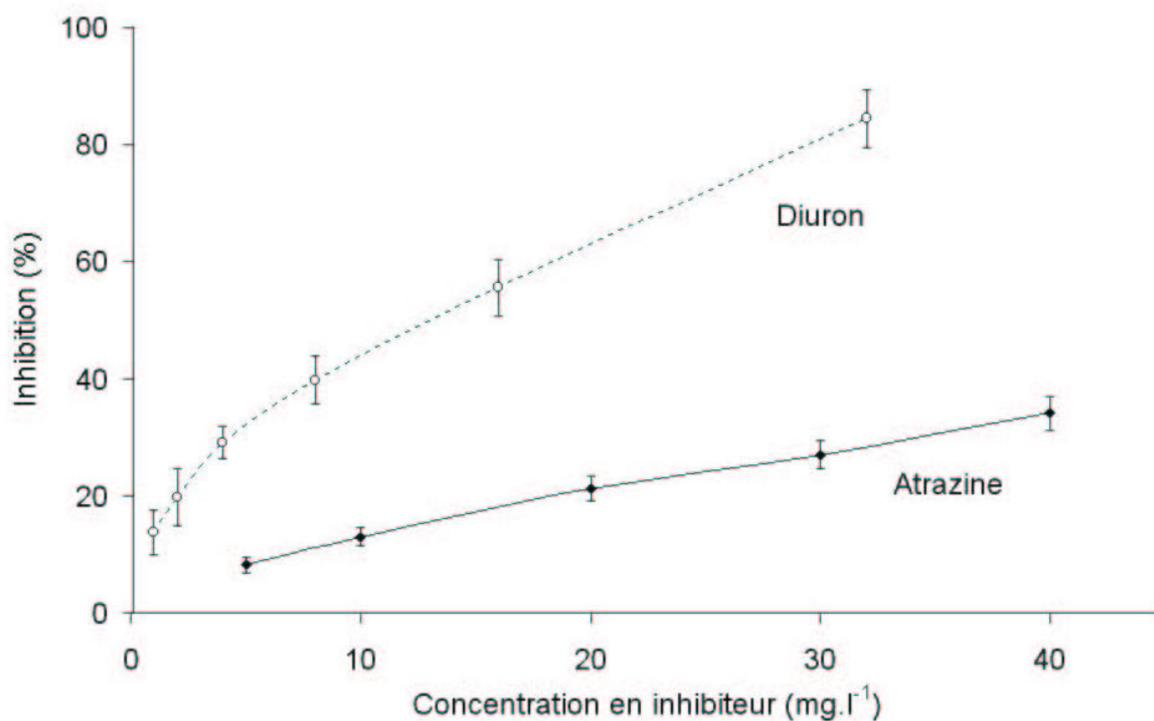


Figure IV.18. Réponses ampérométriques de l'électrode PEDT/PPO met B à 25  $\mu\text{M}$  de dopamine (ajout D), puis à l'addition d'atrazine (10, 20, 30, 40  $\text{mg.l}^{-1}$ ). Conditions opératoires : solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) contenant 0,1 M KCl, température 25°C, -0,2 V/ECS, système sous agitation.

Il est possible de tracer des courbes de calibration de l'atrazine et du diuron (Figure IV.19). La limite de détection de l'atrazine est de 1  $\text{mg.l}^{-1}$  et de 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$  pour le diuron. Le

temps de réponse des bioélectrodes pour ces deux composés est de deux minutes. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par McArdle et Persaud (1993) et Besombes *et al.* (1995b). Ces auteurs suggèrent que l'atrazine entre en compétition avec le substrat pour le même site actif. Des expériences préliminaires laissent penser que les inhibitions occasionnées par l'atrazine et le diuron sont réversibles.



**Figure IV.19.** Courbes de doses-réponses de l'atrazine et du diuron obtenues par inhibition de l'électrode PEDT/PPO met B en présence de 25  $\mu$ M de dopamine. Conditions opératoires : solution tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5), température 25°C, -0,2 V/ECS, système sous agitation.

## IV.5 CONCLUSION

Le travail exposé dans ce chapitre montre que le PEDT, obtenu par électropolymérisation, peut être utilisé comme support d'immobilisation de la polyphénol oxydase. L'utilisation de deux méthodes de préparation des bioélectrodes a permis de développer des biocapteurs adaptés à la détection de composés phénoliques (détection directe) et d'herbicides (détection indirecte par inhibition). La détection des différents composés est optimale à pH 6,5 et à une température de 25°C.

Les méthodes de préparation des bioélectrodes ont été optimisées en termes de quantité d'enzyme déposée et de durée d'électropolymérisation.

La première méthode, consiste à réaliser un dépôt de 50 nmoles d'EDT et de 25 µg de PPO sur l'électrode. L'EDT est polymérisé pendant 2 minutes. Ces électrodes sont destinées à la détection de composés phénoliques. Elles permettent de détecter jusqu'à 5 nM de p-crésol et de 4-chlorophénol, 50 nM de phénol et 500 nM de 3-chlorophénol. Les électrodes de ce type conservent une activité de 30% après 12 jours de stockage à 4°C dans du tampon phosphate et une évaluation quotidienne de la détection de 5 µM de catéchol.

La seconde méthode consiste à générer, sur les électrodes, un film de polymère par électropolymérisation pendant 2 secondes d'une solution de tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) contenant : 5 µg.µl<sup>-1</sup> de PPO, 10<sup>-2</sup> M d'EDT et 10<sup>-3</sup> M de PEG. Ces électrodes permettent de détecter respectivement jusqu'à 1 et 0,5 mg.l<sup>-1</sup> d'atrazine et de diuron.

La large gamme de produits détectables et les bonnes performances analytiques de ce type de biocapteur sont des qualités intéressantes pour une application en tant qu'outil de surveillance environnementale. Les bioélectrodes obtenues ont une sensibilité (dans le domaine de linéarité de la réponse du biocapteur) vis-à-vis de la détection du phénol [608 mA.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>] supérieure à celle d'autres biocapteurs fondés sur la PPO et utilisant des méthodes d'immobilisation reposant sur la formation d'un hydrogel d'osmium [9,6 mA.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>] (Hedenmo *et al.*, 1997), d'un film de polypyrrole amphiphilique [356 mA.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>] (Cosnier et Innocent, 1992 et 1993), d'un cryo-hydrogel [180 mA.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>] (Deng *et al.*, 1996), d'un sol-gel [184 mA.M<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>] (Wang *et al.*, 2000). La rapidité de préparation des bioélectrodes PEDT/PPO (de deux secondes à 2 minutes) est un avantage important. Il est cependant nécessaire d'améliorer la durée de vie de ces bioélectrodes et d'évaluer leur comportement dans un milieu complexe où des molécules interférentes et/ou masquantes peuvent perturber la détection.



## **CONCLUSION GENERALE**



Le travail présenté au cours de cette étude concerne le développement de deux biocapteurs : l'un fondé sur des cellules entières, l'autre fondé sur une enzyme.

Le capteur à cellules entières utilise des micro-algues comme biorécepteur. Ces micro-organismes sont le premier maillon de la chaîne alimentaire et sont à ce titre des bio-indicateurs pour la détection de polluants environnementaux. Le suivi de l'activité photosynthétique par la mesure de la fluorescence chlorophyllienne de ces micro-organismes est le principe de base du biocapteur développé.

Pour obtenir un biocapteur performant, la première étape a consisté à optimiser la culture des micro-algues afin de fournir des biorécepteurs dans un état physiologique compatible avec la détection de perturbations de leur métabolisme en présence d'un toxique. La culture en continu a été adoptée car elle permet d'obtenir des suspensions algales dont l'état physiologique des cellules est stable au cours du temps. De plus, la préparation de ce type de culture est plus rapide que la réalisation successive de cultures en mode batch. Le biorécepteur, utilisé dans le biocapteur, est constitué de cellules algales immobilisées par simple filtration sur une membrane en fibres de quartz.

Le concept d'un biocapteur comportant cinq membranes algales a été adopté afin d'augmenter la représentativité statistique du signal mesuré, ainsi que la représentativité écotoxicologique lors de l'utilisation simultanée de cinq souches algales différentes. Nous avons utilisé *Chlorella vulgaris* lors des étapes d'optimisation et de validation du biocapteur. L'optimisation de la réponse de ce biocapteur à l'atrazine (herbicide utilisé comme polluant modèle au cours de cette étude) a été réalisée en faisant varier les charges des membranes algales, le pH et la température de travail. Les durées de vie en fonctionnement du biocapteur et des membranes algales en stockage ont été déterminées. Enfin, les performances du biocapteur ont été évaluées vis-à-vis d'herbicides anti-photosystème II, de métabolites de dégradation de l'atrazine, de composés phénoliques, de métaux lourds et de détergents. La capacité de détection de l'atrazine par le biocapteur lors de l'utilisation d'eaux naturelles comme flux porteur, provenant d'un étang, d'un lac et d'un fleuve a été testée. Ce biocapteur a également été utilisé pour évaluer la toxicité d'une solution complexe (effluent viticole). Pour conclure cette étude, cinq souches algales ont été utilisées simultanément et leur comportement en l'absence et en la présence d'herbicide (atrazine et diuron) a été étudié. Ce travail ouvre des perspectives d'amélioration de la représentativité écotoxicologique de notre biocapteur.

Le biocapteur enzymatique fondé sur l'immobilisation de la polyphénol oxydase dans un film de polymère : le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDT), permet la détection

directe de composés mono-phénoliques, ortho-diphénoliques et la détection indirecte par inhibition de l'atrazine et du diuron. Les conditions d'élaboration des bioélectrodes ont été optimisées, ainsi que le pH et la température de travail.

Par leur spectre de détection et leur sensibilité, ces deux biocapteurs sont des outils complémentaires. En effet, le biocapteur algal est capable de détecter des concentrations en herbicides anti-PSII inférieures au  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , tandis que la bioélectrode à PPO ne détecte ces produits qu'à partir du  $\text{mg.l}^{-1}$ . Par contre, les composés phénoliques sont détectés par la bioélectrode à des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , alors que le biocapteur algal ne détecte ces composés qu'à des concentrations de l'ordre du  $\text{mg.l}^{-1}$ .

Les performances pour la détection d'herbicides anti-PSII par le biocapteur algal sont compatibles avec la norme européenne (concentration maximale :  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$  pour chaque pesticide, la concentration totale en pesticides devant être inférieure à  $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ). La limite de détection des herbicides de la famille des urées substituées (diuron et isoproturon =  $0,025 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) est inférieure à cette norme. Les limites de détection de l'atrazine et de la simazine, étant respectivement de  $0,25 \mu\text{g.l}^{-1}$  et  $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ , devront être améliorées pour une utilisation de ce biocapteur dans le domaine de la surveillance des eaux destinées à la consommation humaine en Europe. Les recommandations OMS et les normes américaines étant beaucoup moins exigeantes pour l'atrazine (recommandation OMS pour l'atrazine =  $2 \mu\text{g.l}^{-1}$ , norme américaine pour l'atrazine =  $3 \mu\text{g.l}^{-1}$ ), notre biocapteur pourrait fournir des informations utiles à la gestion des ressources en eau dans les pays appliquant ces recommandations.

Les perspectives de développement du biocapteur algal peuvent porter sur la recherche d'un biorécepteur ayant une sensibilité accrue envers certains toxiques et/ou ayant un spectre de détection particulier. La miniaturisation du biocapteur permettrait la réalisation d'un prototype qui servirait à évaluer le comportement du biocapteur à micro-algues en milieu réel complexe. La confrontation des résultats obtenus en laboratoire à ceux obtenus sur le terrain est une étape nécessaire pour passer d'un outil de laboratoire à un prototype opérationnel.

Le biocapteur enzymatique a des limites de détection pour les composés phénoliques supérieures à la norme européenne (concentration totale en composés phénoliques inférieure à  $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ).

Les bioélectrodes PEDT/PPO pourraient être améliorées par une modélisation des transferts de matière se déroulant dans le film de PEDT. Cette modélisation permettrait de mieux appréhender les interactions entre l'enzyme, le polymère, le substrat et les inhibiteurs. Par ailleurs, l'utilisation de médiateurs redox pourrait augmenter l'efficacité de la réduction

de l'ortho-quinone en catéchol. Les médiateurs couramment utilisés sont : le ferricyanure, le tétracyanoquinodiméthane et le méthylphénazonium (Hedenmo *et al.*, 1997). Le couplage de ces électrodes à la technique FIA (Flow injection analysis) permettrait aussi de développer leurs performances analytiques (augmentation du rapport signal sur bruit) et, par exemple, d'intégrer ce biocapteur à une chaîne automatique de dosage des phénols (applications industrielles).

Le biocapteur algal offre plusieurs avantages par rapport à la bioélectrode à PPO : une représentativité supérieure vis-à-vis de l'impact de toxiques sur le monde vivant, un spectre de détection de polluants environnementaux plus large, une durée de vie très supérieure. Cependant, le signal issu des cellules algales apparaît plus complexe à analyser que celui émis par le biocapteur ampérométrique.

Ces données permettent de conclure que ces deux biocapteurs ont des avantages et des inconvénients spécifiques. Leur utilisation en tant que système d'alarme pour la détection de polluants dans l'environnement est possible, mais elle nécessite une bonne connaissance des biorécepteurs et de la technologie employée afin de garder en mémoire les limites inhérentes à chaque capteur.

En conclusion, cette étude a contribué aux travaux de recherche actuels visant à améliorer la sensibilité et la stabilité des éléments biologiques immobilisés, en vue d'un développement industriel des biocapteurs.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Adeyolu, O., Iwuoha, E.I., Smyth, M.R., 1995. Reactivities of amperometric organic phase peroxidase-modified electrodes in the presence and absence of thiourea and ethylenethiourea as inhibitors. *Anal. Chim. Acta.* 305, 57-64.
- Albareda, M., Merkoçi, A., Alegret, S., 2001. Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology. *Anal. Chim. Acta.* 442, 35-44.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1995. *Biologie moléculaire de la cellule*. Troisième édition. Flammarion, Paris.
- Arikawa, Y., Ikebukuro, K., Karube, I., 1998. Microbial biosensors based on respiratory inhibition. Dans : Mulchandani, A. and Rogers, K. R. (Eds.), *Enzyme and microbial biosensors : techniques and protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 225-235.
- Arsalane, A., Parésys, G., Duval, J.-C., Wilhelm, C., Conrad, R., Büchel, C., 1993. A new fluorometric device to measure the *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence yield in microalgae and its use as a herbicide monitor. *Eur. J. Phycol.* 28, 247-252.
- Avramescu, A., Rouillon, R., Carpentier, R., 1999. Potential for use of a cyanobacterium *Synechocystis sp.* immobilized in poly(vinylalcohol) : Application to the detection of pollutants. *Biotechnol. Techn.* 13, 559-562.
- Ayyagari, M.S., Kamtekar, S., Pande, R., Marx, K.A., Kumar, J., Tripathy, S.K., Kaplan, D.L., 1995. Biosensors for pesticide detection based on alkaline phosphatase catalysed chemiluminescence. *Mater. Sci. Eng. C* 2, 191-196.
- Bartlett, P.N., Whitaker, R.G., 1987. Electrochemical immobilization of enzymes. Part I. Theory. *J. Electroanal. Chem.* 224, 27-35.
- Barzen, C., Brecht, A., Gauglitz, G., 2002. Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control. *Biosens. Bioelectron.* 17, 289-295.
- Berkaloff, A., Bourguet, J., Favard, P., Favard, N., Lacroix, J.-C., 1981. *Biologie et physiologie cellulaires III. Chloroplastes, peroxysomes, division cellulaire*. Hermann, Paris.
- Bernabei, M., Chiavarini, S., Cremisini, C., Pallechi, G., 1993. Anticholinesterase activity measurement by a choline biosensor : application in water analysis. *Biosens. Bioelectron.* 8, 265-271.
- Besombes, J.L., Cosnier, S., Labbé, P., Reverdy, G., 1995a. A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. *Anal. Chim. Acta.* 311, 255-263.
- Besombes, J.L., Cosnier, S., Labbé, P., Reverdy, G., 1995b. Determination of phenol and chlorinated phenolic compounds based on a PPO-bioelectrode and its inhibition. *Anal. Lett.* 28, 405-424.
- Bilitewski, U., Turner, A.P.F. (Eds.), 2000. *Biosensors for environmental monitoring*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Bousse, L., 1996. Whole cell biosensors. *Sens. Actuators B.* 34, 270-275.

- Bowers, L.D., 1986. Applications of immobilized biocatalysts in chemical analysis. *Anal. Chem.* 58, 513A-530A.
- Brecht, A., Gauglitz, G., 1995a. Optical probes and transducers. *Biosens. Bioelectron.* 10, 923-936.
- Brecht, A., Piehler, J., Lang, G., Gauglitz, G., 1995b. A direct optical immunosensor for atrazine detection. *Anal. Chim. Acta.* 311, 289-299.
- Callegari, J.-P., 1989a. L'exploitation des micro-algues : essor d'une technologie. *Biofutur.* 76, 26-32.
- Callegari, J.-P., 1989b. L'immobilisation des micro-algues : applications potentielles. *Biofutur.* 76, 33-38.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M.P., Saoncella, A., 2000. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Wat. Res.* 35, 69-76.
- Campanella, L., Favero, G., Pastorino, M., Tommasetti, M., 1999. Monitoring the rancidification process in olive oils using a biosensor operating in organic solvent. *Biosens. Bioelectron.* 7, 383-388.
- Campanella, L., Sammartino, M.P., Tommasetti, M., 1992. New enzyme sensor for phenol determination in non-aqueous and aqueous medium. *Sens. Actuators B.* 7, 383-388.
- Carpentier, R., Loranger, C., Chartrand, J., Purcell, M., 1991. Photoelectrochemical cell containing chloroplast membranes as a biosensor for phytotoxicity measurements. *Anal. Chim. Acta.* 249, 55-60.
- Chee, G.-J., Nomura, Y., Ikebukuro, K., Karube, I., 2000. Optical fiber biosensor for the determination of low biochemical oxygen demand. *Biosens. Bioelectron.* 15, 371-376.
- Clark, L.C., Lyons, C., 1962. Electrode system for continuous monitoring of cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.* 102, 29-45.
- Coche-Guérente, L., Desprez, V., Diard, J.P., Labbé, P., 1999. Amplification of amperometric biosensor responses by electrochemical substrate recycling Part I. Theoretical treatment of the catechol-polyphenol oxidase system. *J. Electroanal. Chem.* 470, 53-60.
- Colapicchioni, C., Barbaro, A., Porcelli, F., Gianni, I., 1991. Immunoenzymatic assay using chemset devices. *Sens. Actuators B.* 4, 245-250.
- Comtat, M., Bergel, A., 1997. Biocapteurs : rêve ou réalité industrielle? *Biofutur.* 171, 33-36.
- Conrad, R., Büchel, C., Wilhelm, C., Arsalane, W., Berkaloff, C., Duval, J.-C., 1993. Changes in yield of *in vivo* fluorescence of chlorophyll *a* as a tool for selective herbicide monitoring. *J. Appl. Phycol.* 5, 505-516.
- Corre, G., 1998. Influence de la composition des parois cellulaires sur la résistance aux détergents de Chlorophycées. Importance écologique et biotechnologique. Thèse de l'Université Paris VI.

- Corre, G., Templier, J., Largeau, C., 1996. Influence of cell wall composition on the resistance of two *Chlorella* species (chlorophyta) to detergents. *J. Phycol.* 32, 584-590.
- Cosnier, S., 2000. Biosensors based on immobilization of biomolecules by electrogenerated polymer films. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 89, 127-138.
- Cosnier, S., Innocent, C., 1992. A novel biosensor elaboration by electropolymerization of an adsorbed amphiphilic pyrrol-tyrosinase enzyme layer. *J. Electroanal. Chem.* 328, 361-366.
- Cosnier, S., Innocent, C., 1993. A new strategy for the construction of a tyrosinase-based amperometric phenol and orthodiphenol sensor. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 31, 147-160.
- Cremisini, C., Di Sario, S., Mela, J., Pilloton, R., Palleschi, G., 1995. Evaluation of the use of free and immobilised acetylcholinesterase for paraoxon detection with an amperometric choline oxidase based biosensor. *Anal. Chim. Acta.* 311, 273-280.
- Decker, H., Tuczec, F., 2000. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins : structural basis and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 25, 392-397.
- Del Marmol, V., Beermann, F., 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* 381, 165-168.
- Deng, Q., Guo, Y., Dong, S., 1996. Cryo-hydrogel for the construction of a tyrosinase-based biosensor. *Analytica Chimica Acta.* 319, 71-77.
- Derenne, S., Largeau, C., Berkaloff, A., Rousseau, B., Wilhelm, C., Hatcher, P.G., 1992. Non-hydrolysable macromolecular constituents from outer walls of *Chlorella fusca* and *Nanochlorum eucaryotum*. *Phytochemistry.* 6, 1923-1929.
- Descotes, J., Frantz, P., Testud, F., 1992. Les urgences en toxicologie. Editions Maloine, Paris.
- Dodge, J.D., 1973. The fine structure of algal cells. Academic press, London.
- Draber, W., Tietjen, K., Kluth, J.F., Trebst, A., 1991. Herbicides in photosynthesis research. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 1621-1633.
- D'Souza, S.F., 2001. Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 16, 337-353.
- Duckworth, H.W., Coleman, J.E., 1970. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 7, 1613-1625.
- Dzantiev, B.B., Zherdev, A.V., 1996. Electrochemical immunosensors for determination of the pesticides 2,4-dichlorophenoxyacetic and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acids. *Biosens. Bioelectron.* 11, 179-185.
- Ebert, E., Dumford, W., 1976. Effects of triazine herbicides on the physiology of plants. *Residue Rev.* 65, 2-60.
- El Jay, A., 1995. La fluorescence algale : outil de mesure du stress provoqué par des herbicides inhibiteurs de la photosynthèse. Dans : ANPP- International Symposium - Biological Markers of Pollution, Chinon-France, pp. 203-210.

- El Jay, A., Ducruet, J.M., Duval, J.-C., Pelletier, J.P., 1997. A high-sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum Capricornutum* : comparison with effect on cell growth. Arch. Hydrobiol. 140, 273-286.
- Evans, L.V., 1974. Cytoplasmic organelles. Dans : Stewart, W. D. P. (Ed.), Algal physiology and biochemistry. Blackwell scientific publications, Oxford, pp. 86-123.
- Everett, W.R., Rechnitz, G.A., 1998. Mediated bioelectrocatalytic determination of organophosphorous pesticides with a tyrosinase-based oxygen biosensor. Anal. Chem. 70, 807-810.
- Fabiano, S., Tran-Minh, C., Piro, B., Dang, L.A., Pham, M.C., Vittori, O., 2002. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) as an entrapment support for amperometric enzyme sensor. Mater. Sci. Eng. C. 21, 61-67.
- Fedtke, C., 1982. Biochemistry and Physiology of herbicide action. Springer Verlag, Berlin.
- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., García-Molina, F., García-Cánovas, F., Tudela, J., 2002. Michaelis constants of mushroom tyrosinase with respect to oxygen in the presence of monophenols and diphenols. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 34, 332-336.
- Frense, D., Müller, A., Beckmann, D., 1998. Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. Sens. Actuators B. 51, 256-260.
- Gayral, P., 1975. Les algues. Doin, Paris.
- Gerritsen, Y.A.M., Chapelon, C.G.J., Wichers, H.J., 1994. The low-isoelectric point tyrosinase of *Agaricus bisporus* may be a glycoprotein. Phytochemistry. 35, 573-577.
- Ghosh, S., Rasmusson, J., Inganäs, O., 1998. Supramolecular self-assembly for enhanced conductivity in conjugated polymer blends : ionic crosslinking in blends of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate) and poly(vinylpyrrolidone). Adv. mater. 10, 1097-1099.
- Giardi, M.T., Koblizek, M., Masojidek, J., 2001. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. Biosens. Bioelectron. 16, 1027-1033.
- Govindjee, Braun, B.Z., 1974. Light absorption, emission and photosynthesis. Dans : Stewart, W. D. P. (Ed.), Algal physiology and biochemistry. Blackwell scientific publications, Oxford, pp. 346-390.
- Govindjee, Satoh, K., 1986. Fluorescence properties of chlorophyll *b*- and chlorophyll *c*-containing algae. Dans : Govindjee, Amesz, J. and Fork, D. C. (Eds.), Light emission by plants and bacteria. Academic press, Orlando, pp. 497-537.
- Halánek, J., Hepel, M., Skládal, P., 2001. Investigation of highly sensitive piezoelectric immunosensors for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Biosens. Bioelectron. 16, 253-260.
- Hall, J.C., Van Deynze, T.D., Struger, J., Chan, C.H., 1993. Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metolalchlor and 2,4 D. J. Environ. Sci. Health. B28, 577-598.

Harris, E., 1998. Chapter 1. Introduction to *Chlamydomonas*. Dans : Rochaix, J.-D., Goldschmidt-Clermont, M. and Merchant, S. (Eds.), The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-11.

Hartmeier, W., 1988. Immobilized biocatalysts : An introduction. Springer-Verlag, Berlin.

Hedenmo, M., Narvaez, A., Dominguez, E., Katakis, I., 1997. Improved mediated tyrosinase amperometric enzyme electrodes. J. Electroanal. Chem. 425, 1-11.

Hesketh, N., Jones, M.N., Tipping, E., 1996. The interaction of some pesticides and herbicides with humic substances. Anal. Chim. Acta. 327, 191-201.

Heywang, G., Jonas, F., 1992. Poly(alkylenedioxythiophene)s. New, very stable conducting polymers. Adv. Mater. 4(2), 116-118.

Hipkins, M.F., Baker, N.R., 1986. Photosynthesis energy transduction. A practical approach. Irl press, Washington DC.

Hollis, R.P., Killham, K., Glover, L.A., 2000. Design and application of a biosensor for monitoring toxicity of compounds to eukaryotes. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1676-1679.

Hyun, C.-K., Tamiya, E., Takeuchi, T., Karube, I., 1993. A novel BOD sensor based on bacterial luminescence. Biotechnol. Bioeng. 41, 1107-1111.

Jeanne, N., Dazy, A.C., Moreau, A., 1993. Cadmium interactions with ATPase activity in the euryhaline alga *Dunaliella bioculata*. Hydrobiologia. 252, 245-256.

Jolly, R., Pairis, S., Pétrescu, C., 1998. Vieillissement comparé de trois polymères conducteurs. J. Chim. Phys. 95, 1400-1405.

Kamiya, M., Tanaka, M., 1995. Hydrogen-bonding effects on correlation analysis of n-octanol/water partition coefficients and molecular properties for chlorinated phenols. Chemosphere. 31, 3909-3917.

Karavaev, V.A., Polyakova, I.B., Solntsev, M.K., Yurina, T.P., 1998. Effect of various chemical agents on photosynthesis studied by the method of fluorescence induction. J. Luminesc. 76-77, 335-338.

Karube, I., Matsunaga, T., Mitsuda, S., Suzuki, S., 1977. Microbial electrode BOD sensor. Biotechnol. Bioeng. 19, 535-547.

Kasai, F., Hatakeyama, S., 1993. Herbicide susceptibility in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. Chemosphere. 27, 899-904.

Kaur, J., Sheoran, I.S., Nainawatee, H.S., 1989. Effect of heat stress on photosynthesis and respiration in a wheat (*Triticum aestivum* L.) mutant. Dans : Singhal, G. S., Barber, J., Dilley, R. A., Govindjee, Haselkorn, R. and Mohanty, P. (Eds.), Photosynthesis. Molecular biology and bioenergetics. Springer-Verlag, Berlin, pp. 297-303.

Keay, R.W., McNeil, C.J., 1998. Separation-free electrochemical immunosensor for rapid determination of atrazine. Biosens. Bioelectron. 13, 963-970.

- Kertesz, D., Zito, R., 1965. Mushroom polyphenol oxidase. I. Purification and general properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 96, 447.
- Khan, M.A., Armes, S.P., 1999. Synthesis and characterization of micrometer-sized poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-coated polystyrene latexes. *Langmuir.* 15, 3469-3475.
- Kitajima, N., Moro-Oka, Y., 1994. Copper-dioxygen complex : inorganic and bioinorganic perspectives. *Chem. Rev.* 94, 737-757.
- Koblizek, M., Masojidek, J., Komenda, J., Kucera, T., Pilloton, R., Mattoo, A.K., Giardi, M.T., 1998. A sensitive photosystem II - Based biosensor for detection of a class of herbicides. *Biotechnol. Bioeng.* 60, 664-669.
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis : the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313-349.
- Leadbeater, B.S.C., Green, J.C., 1993. Cell coverings of microalgae. Dans : Berne, T. (Ed.), *Ultrastructure of microalgae.* CRC press, London, pp. 71-98.
- Leclerc, J.-C., 1999. *Ecophysiologie végétale.* Université de Saint-Etienne, Saint-Etienne.
- Lerch, K., Jonas, F., Linke, M., 1998. Properties and applications of Baytron (PEDT). *J. Chim. Phys.* 95, 1506-1509.
- Liu, T., Wang, Y., Kounaves, S.P., Brush, E.J., 1995. Determination of organonitriles using enzyme-based selectivity mechanisms. 2. A nitrilase-modified glassy carbon microelectrode sensor of benzonitrile. *Anal. Chem.* 67, 1679-1683.
- Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S., Huang, Y., 2002. Toxicity of 40 herbicides to the Green Alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 128-132.
- Mallat, E., Barceló, D., Barzen, C., Gauglitz, G., Abukneska, R., 2001. Immunosensors for pesticides determination in natural waters. *Trends. Anal. Chem.* 20, 124-132.
- Marco, M.-P., Barceló, D., 1996. Environmental applications of analytical biosensors. *Meas. Sci. Technol.* 7, 1547-1562.
- Marko-Varga, G., Emnéus, J., Gorton, L., Ruzgas, T., 1995. Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds. *Trends. Anal. Chem.* 14, 319-328.
- Marty, J.-L., Garcia, D., Rouillon, R., 1995. Biosensors : potential in pesticide detection. *Trends. Anal. Chem.* 14, 329-333.
- Marty, J.-L., Mionetto, N., Noguér, T., Ortega, F., Roux, C., 1993. Enzyme sensors for the detection of pesticides. *Biosens. Bioelectron.* 8, 273-280.
- Matsunaga, T., Takeyama, H., 1998. Micro-algues : petites mais prodigieuses. *Biofutur.* 179, 40-42.
- Mazzei, F., Botrè, F., Botrè, C., 1996. Acid/phosphatase/glucose oxidase-based biosensors for the determination of pesticides. *Anal. Chim. Acta.* 336, 67-75.

- Mazzei, F., Botrè, F., Lorenti, G., Simonetti, G., Porcelli, F., Scibona, G., Botrè, C., 1995. Plant tissue electrode for the determination of atrazine. *Anal. Chim. Acta.* 316, 79-82.
- McArdle, F.A., Persaud, K.C., 1993. Development of an enzyme-based biosensor for atrazine detection. *Analyst.* 118, 419-423.
- Merlin, G., Merle, V., Blake, G., 1995. Mesure de la cinétique d'induction de fluorescence chlorophyllienne d'algues vertes microscopiques comme biotest algal. *Tsm.* 1, 49-54.
- Merz, D., Geyer, M., Moss, D.A., Ache, H.-J., 1996. Chlorophyll fluorescence biosensor for the detection of herbicides. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354, 299-305.
- Meusel, M., Trau, D., Katerkamp, A., Meier, F., Polzius, R., Cammann, K., 1998. New ways in bioanalysis. One-way optical sensor chip for environmental analysis. *Sens. Actuators B.* 51, 249-255.
- Montesinos, T., Pérez-Munguia, S., Valdez, F., Marty, J.-L., 2001. Disposable cholinesterase biosensor for the detection of pesticides in water-miscible organic solvents. *Anal. Chim. Acta.* 431, 231-237.
- Moreland, D.E., 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 597-638.
- Mulchandani, A., Mulchandani, P., Kaneva, I., Chen, W., 1998a. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents using recombinant *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorous hydrolase. 1. Potentiometric microbial electrode. *Anal. Chem.* 70, 4140-4145.
- Mulchandani, A., Rogers, K.R., 1998b. Principles of enzyme biosensors. Dans : Mulchandani, A. and Rogers, K. R. (Eds.), *Enzyme and microbial biosensors : techniques and protocols.* Humana Press, Totowa, pp. 3-14.
- Munjal, N., Sawhney, S.K., 2002. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 613-619.
- Naessens, M., 1998. Contribution à l'écotoxicologie analytique par des cellules végétales, applications en microscopie et à la réalisation de biocapteurs. Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
- Naessens, M., Leclerc, J.-C., Tran-Minh, C., 2000. Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 181-185.
- Nistor, C., Emnéus, J., 1999. Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants. *Waste Manag.* 19, 147-170.
- Noguer, T., Marty, J.-L., 1997. High sensitive bienzymatic sensor for detection of dithiocarbamate fungicides. *Anal. Chim. Acta.* 347, 63-70.
- Oettmeier, W., 1999. Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1255-1277.

- Oettmeier, W., Kude, K., Soll, H.-J., 1987. Phenolic herbicides and their methyl-ethers : binding characteristics and inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 27, 50-60.
- Oroszlan, P., Duvencek, G.L., Ehrat, M., Widmerr, H.M., 1993. Fiber-optic atrazine immunosensor. *Sens. Actuators B.* 11, 301-305.
- Overnell, J., 1975. The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in freshwater alga. *Pestic. Biochem. Physiol.* 5, 19-26.
- Overnell, J., 1976. Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. *Mar. Biol.* 38, 335-342.
- Paddle, B.M., 1996. Biosensors for chemical and biological agents of defense interest. *Biosens. Bioelectron.* 11, 1079-1113.
- Pandard, P., Rawson, D.M., 1993a. An amperometric algal biosensor for herbicide detection employing a carbon cathode oxygen electrode. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8, 323-333.
- Pandard, P., Vasseur, P., Rawson, D.M., 1993b. Comparison of two types of sensors using eukaryotic algae to monitor pollution of aquatic systems. *Wat. Res.* 27, 427-431.
- Papkovsky, D.B., Ghindilis, A.L., Kurochkin, I.N., 1993. Flow-cell fiber-optic enzyme sensor for phenols. *Anal. Lett.* 26, 1505-1518.
- Parellada, J., Narvaez, A., Lopez, M.A., Dominguez, E., Fernandez, J.J., Pavlov, V., Katakis, I., 1998. Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications. *Anal. Chim. Acta.* 362, 47-57.
- Pariante, E., Lorenzo, E., Tobalina, F., Abruna, H.D., 1995. Aldehyde biosensor based on the determination of NADH enzymatically generated by aldehyde dehydrogenase. *Anal. Chem.* 67, 3936-3944.
- Paternelle, M.-C., Couteux, A., 2002. Index phytosanitaire acta. Acta, Paris.
- Piro, B., Dang, L.A., Pham, M.C., Fabiano, S., Tran-Minh, C., 2001. A glucose biosensor based on modified-enzyme incorporated within electropolymerised poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDT). *J. Electroanal. Chem.* 512, 101-109.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents : verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 384-394.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D., 1995. *Microbiologie*. De Boeck Université, Bruxelles.
- Preston, S., Coad, N., Townend, J., Killham, K., Paton, G.I., 2000. Biosensing the acute toxicity of metal interactions : are they additive, synergistic, or antagonistic? *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 775-780.
- Purcell, M., Carpentier, R., Bélanger, D., Fortier, G., 1990. Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. *Biotechnol. Techn.* 4, 363-368.

- Rabinowitch, E., Govindjee, 1969. Photosynthesis. John Wiley & Sons, New York.
- Ramanathan, S., Ensor, M., Daunert, S., 1997. Bacterial biosensors for monitoring toxic metals. *Trends Biotechnol.* 15, 500-506.
- Rawson, D.M., Willmer, A.J., Turner, A.P.F., 1989. Whole-cell biosensors for environmental monitoring. *Biosensors.* 4, 299-311.
- Redding, K., Peltier, G., 1998. Chapter 18. Reexamining the validity of the Z-scheme : is photosystem I required for oxygenic photosynthesis in *Chlamydomonas*. Dans : Rochaix, J.-D., Goldschmidt-Clermont, M. and Merchant, S. (Eds.), *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 349-362.
- Riley, P.A., 1997. Molecules in focus Melanin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29, 1235-1239.
- Rivas, G., Solis, V.M., 1992. Electrochemical determination of the kinetic parameters of mushroom tyrosinase. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 29, 19-28.
- Roberto, F.F., Barnes, J.M., Bruhn, D.F., 2002. Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. *Talanta.* 58, 181-188.
- Rogers, K.R., 1995. Biosensors for environmental applications. *Biosens. Bioelectron.* 10, 533-541.
- Rogers, K.R., Lin, J.N., 1992. Biosensors for environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 7, 317-321.
- Rojicková-Padrťová, R., Maršálek, B., 1999. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity. *Chemosphere.* 38, 3329-3338.
- Romero, J.F.F., Stiene, M., Kast, R., Luque de Castro, M.D., Bilitewski, U., 1998. Application of screen-printed electrodes as transducers in affinity flow-through sensor systems. *Biosens. Bioelectron.* 13, 1107-1115.
- Rouillon, R., Mestres, J.-J., Marty, J.-L., 1995a. Entrapment of chloroplasts and thylakoids in polyvinylalcohol-SbQ. Optimization of membrane preparation and storage conditions. *Anal. Chim. Acta.* 311, 437-442.
- Rouillon, R., Sole, M., Carpentier, R., Marty, J.-L., 1995b. Immobilization of thylakoids in polyvinylalcohol for the detection of herbicides. *Sens. Actuators B.* 26-27, 477-479.
- Rouillon, R., Tocabens, M., Marty, J.-L., 1994. Stabilization of chloroplasts by entrapment in polyvinylalcohol bearing styrylpyridinium groups. *Anal. Lett.* 27, 2239-2248.
- Samson, G., Morissette, J.C., Popovic, R., 1988a. Copper quenching of the variable fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition on PSII photochemistry. *Photochem. Photobiol.* 48, 329-332.
- Samson, G., Popovic, R., 1988b. Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 16, 272-278.

- Samuelsson, G., Öquist, G., 1977. A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.* 40, 315-319.
- Sandberg, R.G., Van Houten, L.J., Schwartz, S.M., Dallas, J.C., Silvia, A., Michael, A., Narayanswamy, V., 1992. A conductive polymer-based immunosensor for the analysis of pesticide residues. *ACS. Symp. Ser.* 511, 81-88.
- Sanders, C.A., Rodriguez Jr., M., Greenbaum, E., 2001. Stand-off tissue-based biosensors for the detection of chemical warfare agents using photosynthetic fluorescence induction. *Biosens. Bioelectron.* 16, 439-446.
- Sasson, A., 1998. L'exploitation industrielle des micro-algues. *Biofutur.* 179, 64-65.
- Scalla, R. (Ed.) 1991. Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisation. Inra, Paris.
- Schipper, E.F., Bergevoet, A.J.H., Kooyman, R.P.H., Greve, J., 1997. New detection method for atrazine pesticides with the optical waveguide Mach-Zehnder immunosensor. *Anal. Chim. Acta.* 341, 171-176.
- Schmitt, P., Garrison, A.W., Freitag, D., Kettrup, A., 1996. Separation of s-triazine herbicides and their metabolites by capillary zone electrophoresis as a function of pH. *J. Chromatogr. A.* 723, 169-177.
- Senger, H., Frickel-Faulstich, B., 1974. The regulation of electron flow in synchronized cultures of green algae. Dans : Avron, M. (Ed.), *Proceedings of the third International congress on photosynthesis.* Elsevier Scientific Publishing Company, Rehovot, Israel, pp. 715-727.
- Shin, M.-C., Kim, H.-S., 1995. Effects of enzyme concentration and film thickness on the analytical performance of a polypyrrole/glucose oxidase biosensor. *Anal. Lett.* 28, 1017-1031.
- Simkus, R.A., Laurinavicius, V., Boguslavsky, L., Skotkeim, T., Tenenbaum, S.W., Nakas, J.P., Slomczynsky, D.J., 1996. Laccase containing sol-gel based optical biosensors. *Anal. Lett.* 29, 1907-1919.
- Simonian, A.L., Rainina, E.I., Wild, J.R., 1998. Microbial biosensors based on potentiometric detection. Dans : Mulchandani, A. and Rogers, K. R. (Eds.), *Enzyme and microbial biosensors : techniques and protocols.* Humana Press, Totowa, pp. 237-248.
- Skládal, P., Deng, A., Kolar, V., 1999. Resonant mirror-based optical immunosensor : application for the measurement of atrazine in soil. *Anal. Chim. Acta.* 399, 29-36.
- Skládal, P., Kaláb, T., 1995. A multichannel immunochemical sensor for determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Anal. Chim. Acta.* 316, 73-78.
- Smith, J.L., Krueger, R.C., 1962. Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *J. Biol. Chem.* 237, 1121-1128.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23-28.

Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, K., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J., Hall, L.W., Williams, W.M., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in north American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 31-76.

Stauber, J.L., Franklin, N.M., Adams, M.S., 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends Biotechnol.*

Steebhorn, C., Skládal, P., 1996. Construction and characterization of the direct piezoelectric immunosensor for atrazine operating in solution. *Biosens. Bioelectron.* 12, 19-27.

Stratton, G.W., 1984. Effects of the herbicide atrazine and its degradation products, alone, and in combination, on photosynthetic microorganisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13, 35-42.

Tamiya, H., 1964. Growth and cell division of *Chlorella*. Dans : Zeuthen, E. (Ed.), Synchrony in cell division and growth. Interscience Publishers, New York, pp. 247-305.

Tauber, M., Rosen, R., Shimshon, B., 2001. Whole-cell biodetection of halogenated organic acids. *Talanta.* 55, 959-964.

Tran-Minh, C., 1991. Les biocapteurs. Principes, construction et applications. Masson, Paris.

Trojanowicz, M., Hitchman, M.L., 1996. Determination of pesticides using electrochemical biosensors. *Trends. Anal. Chem.* 1, 38-44.

Updike, S., Hicks, G.P., 1967. The enzyme electrode. *Nature.* 214, 986-988.

Van Assche, F., Clijsters, H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13, 195-206.

Van Dyk, T.K., Majarian, W.R., Konstantinov, K.B., Young, R.M., Dhurjati, P.S., La Rossa, R., 1994. Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1414-1420.

Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J., 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry.* 45, 1309-1323.

Vavilin, D.V., Polynov, V.A., Matorin, D.N., Venediktov, P.S., 1995. Sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Plant Physiol.* 146, 609-614.

Veal, D.A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J., Attfield, P.V., 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol. Methods.* 243, 191-210.

Walker, J.R.L., Ferrar, P.H., 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 15, 457-497.

Wallace, G.G., Smyth, M., Zhao, H., 1999. Conducting electroactive polymer-based biosensors. *Trends. Anal. Chem.* 18, 245-251.

Wang, B., Zhang, J., Dong, S., 2000. Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 15, 397-402.

Wang, J., Cepria, G., Chen, Q., 1996a. Submergible bioprobe for continuous monitoring of peroxide species. *Electroanal.* 8, 124-127.

Wang, J., Lu, F., Kane, S.A., Choi, Y.-K., Smyth, M.R., Rogers, K., 1997. Hydrocarbon pasting liquids for improved tyrosinase-based carbon paste phenol biosensors. *Electroanal.* 9.

Wang, J., Nascimento, V.B., S.A.Kane, Rogers, K., Smyth, M.R., Angnes, L., 1996b. Screen-printed tyrosinase-containing electrodes for the biosensing of enzyme inhibitors. *Talanta.* 43, 1903-1907.

Webb, O.F., Bienkowski, P.R., Matrubutham, U., Evans, F.A., Heiter, A., Sayler, G.S., 1997. Kinetics and response of a *Pseudomonas fluorescens* HK44 biosensor. *Biotechnol. Bioeng.* 54, 491-502.

Weston, L., Robinson, P., 1991. Detection and quantification of triazine herbicides using algal cell fluorescence. *Biotechnol. Techn.* 5, 327-330.

Willard, D.M., 2002. Automated Water Analyser Computer System (AWACSS) : A network measurement system for convenient, quick, and cost-effective monitoring of surface water contamination. Dans : SENSPOLE Workshop Response to new pollution challenges, Londres.

Wollember, U., Neumann, B., Riedel, K., Scheller, F.W., 1994. Enzyme and microbial sensors for phosphate, phenols, pesticides and peroxide. *Fresenius J. Anal. Chem.* 348, 563-.

Yaropolov, A.I., Kharybin, A.N., Emneus, J., Marko-Varga, G., Gorton, L., 1996. Electrochemical properties of some copper-containing oxidases. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40, 49-57.

Yokoyama, K., Ikebukuro, K., Tamiya, E., Karube, I., Ichiki, N., Arikawa, Y., 1995. Highly sensitive quartz crystal immunosensors for multisample detection of herbicides. *Anal. Chim. Acta.* 304, 139-145.

Zhylyak, G.A., Dzyadevich, S.V., Korpan, Y.I., Soldatkin, A.P., El'skaya, A.V., 1995. Application of urease conductimetric biosensor for heavy-metal ion determination. *Sens. Actuators B.* 24-25, 145-148.

## **ANNEXES**



## Annexe 1 : Milieu de Culture

Milieu oligo LC (Lefebvre-Czarda) selon la norme NF T90-304 (1980)

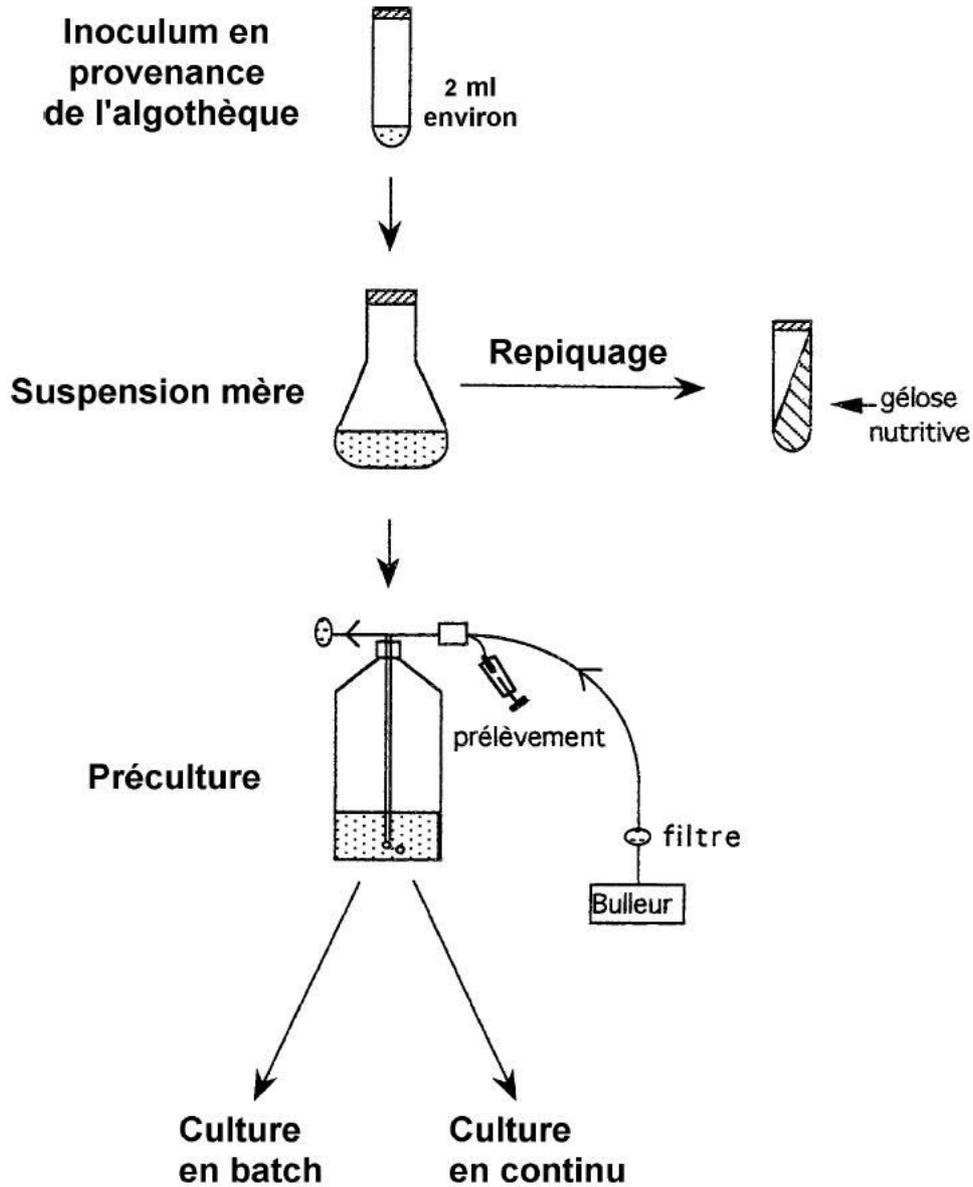
Pour obtenir 1 litre de milieu nutritif oligo LC, les solutions 1, 2, 3, 4 sont diluées 1000 fois. Les solutions 5 et 6 sont diluées 50000 fois.

Matériel : eau Milli-Q® (Millipore) et réactifs de qualité analytique

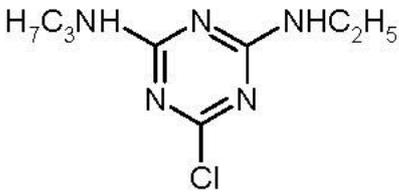
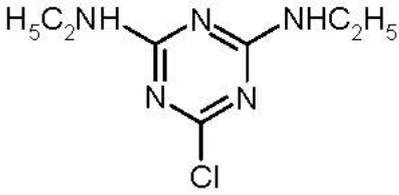
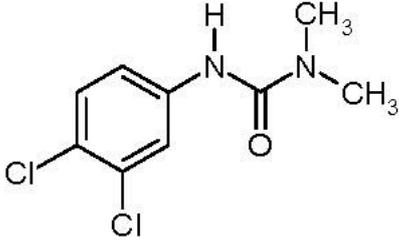
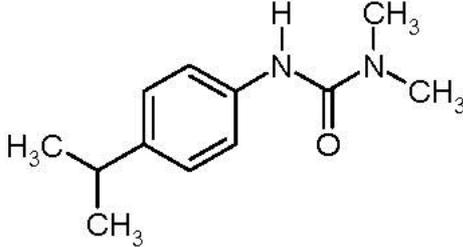
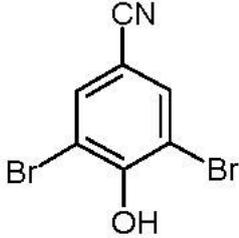
Composition des solutions		Concentration
<b>Solution n°1</b>		
Nitrate de calcium	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{H}_2\text{O}$	$40 \text{ g.l}^{-1}$
<b>Solution n°2</b>		
Nitrate de potassium	$\text{KNO}_3$	$100 \text{ g.l}^{-1}$
<b>Solution n°3</b>		
Sulfate de Magnésium	$\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	$30 \text{ g.l}^{-1}$
<b>Solution n°4</b>		
Monohydrogénophosphate de potassium anhydre	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$40 \text{ g.l}^{-1}$
<b>Solution n°5</b>		
Sulfate de cuivre	$\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$	$30 \text{ mg.l}^{-1}$
Sulfate de zinc	$\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	$60 \text{ mg.l}^{-1}$
Chlorure de cobalt	$\text{CoCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$	$60 \text{ mg.l}^{-1}$
Nitrate de manganèse	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{H}_2\text{O}$	$60 \text{ mg.l}^{-1}$
Acide citrique	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2, \text{H}_2\text{O}$	$60 \text{ mg.l}^{-1}$
Acide borique	$\text{H}_3\text{BO}_3$	$60 \text{ mg.l}^{-1}$
Heptamolybdate d'ammonium	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4 \text{H}_2\text{O}$	$60 \text{ mg.l}^{-1}$
<b>Solution n°6</b>		
Citrate de fer (III)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7, 5 \text{H}_2\text{O}$	$1,625 \text{ g.l}^{-1}$
Sulfate de fer (II)	$\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	$0,625 \text{ g.l}^{-1}$
Chlorure de fer (III)	$\text{FeCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$	$0,625 \text{ g.l}^{-1}$

Ajuster le pH à 7 à 0,1 près. Stériliser le milieu à l'autoclave (121°C, 20 min). Conserver à 4°C, à l'obscurité.

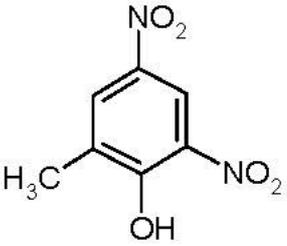
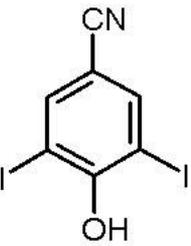
## Annexe 2 : Maintenance et culture des souches algales



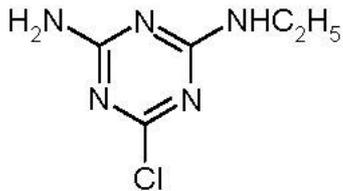
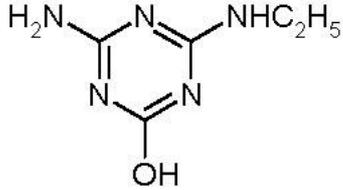
## Annexe 3 : Composés testés avec le biocapteur algal

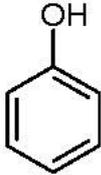
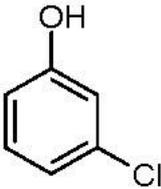
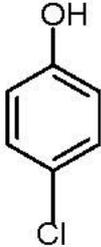
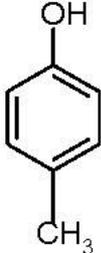
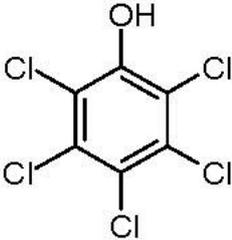
Herbicides	
<p>Atrazine</p>  <p><chem>CCNc1nc(Cl)cnc1NCC</chem></p>	<p>Norme européenne : 0,1 <math>\mu\text{g.l}^{-1}</math></p> <p>Recommandation OMS : 2 <math>\mu\text{g.l}^{-1}</math></p> <p>EPA : 3 <math>\mu\text{g.l}^{-1}</math></p> <p>Masse molaire = 215,7 <math>\text{g.mol}^{-1}</math></p>
<p>Simazine</p>  <p><chem>CNc1nc(Cl)cnc1NC</chem></p>	<p>Norme européenne : 0,1 <math>\mu\text{g.l}^{-1}</math></p> <p>Recommandation OMS : 2 <math>\mu\text{g.l}^{-1}</math></p> <p>EPA : 4 <math>\mu\text{g.l}^{-1}</math></p> <p>Masse molaire = 201,7 <math>\text{g.mol}^{-1}</math></p>
<p>Diuron</p>  <p><chem>CN(C)C(=O)Nc1ccc(Cl)cc1Cl</chem></p>	<p>Norme européenne : 0,1 <math>\mu\text{g.l}^{-1}</math></p> <p>Masse molaire = 233,1 <math>\text{g.mol}^{-1}</math></p>
<p>Isoproturon</p>  <p><chem>CC(C)Cc1ccc(NC(=O)N(C)C)cc1</chem></p>	<p>Norme européenne : 0,1 <math>\mu\text{g.l}^{-1}</math></p> <p>Recommandation OMS : 9 <math>\mu\text{g.l}^{-1}</math></p> <p>Masse molaire = 206,3 <math>\text{g.mol}^{-1}</math></p>
<p>Bromoxynil</p>  <p><chem>Oc1c(Br)cc(C#N)c(Br)c1</chem></p>	<p>Norme européenne : 0,1 <math>\mu\text{g.l}^{-1}</math></p> <p>Masse molaire = 276,9 <math>\text{g.mol}^{-1}</math></p>

OMS : organisation mondiale de la santé. EPA : « Environmental Protection Agency »,USA.

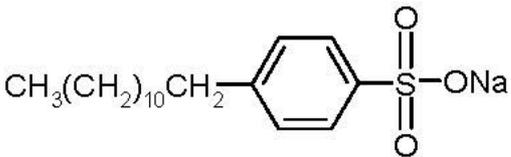
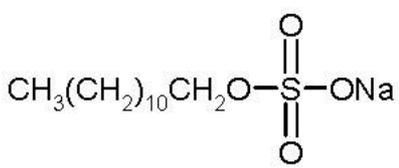
<p style="text-align: center;">DNOC</p> 	<p>Norme européenne : 0,1 µg.l<sup>-1</sup></p> <p>Masse molaire = 198,1 g.mol<sup>-1</sup></p>
<p style="text-align: center;">Ioxynil</p> 	<p>Norme européenne : 0,1 µg.l<sup>-1</sup></p> <p>Masse molaire = 370,9 g.mol<sup>-1</sup></p>

#### Métabolites de dégradation de l'atrazine

<p style="text-align: center;">Désisopropyl-atrazine</p> 	<p>Norme européenne : 0,1 µg.l<sup>-1</sup></p> <p>Masse molaire = 173,7 g.mol<sup>-1</sup></p>
<p style="text-align: center;">Déséthyl-atrazine</p> 	<p>Norme européenne : 0,1 µg.l<sup>-1</sup></p> <p>Masse molaire = 187,7 g.mol<sup>-1</sup></p>
<p style="text-align: center;">2-hydroxy-atrazine</p> 	<p>Norme européenne : 0,1 µg.l<sup>-1</sup></p> <p>Masse molaire = 197,2 g.mol<sup>-1</sup></p>
<p style="text-align: center;">Désisopropyl-2-hydroxy-atrazine</p> 	<p>Norme européenne : 0,1 µg.l<sup>-1</sup></p> <p>Masse molaire = 155,2 g.mol<sup>-1</sup></p>

Dérivés phénoliques		
Phénol 	Masse molaire = $94,1 \text{ g.mol}^{-1}$	Norme européenne : indice phénol $< 0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$
3-Chlorophénol 	Masse molaire = $128,6 \text{ g.mol}^{-1}$	
4-Chlorophénol 	Masse molaire = $128,6 \text{ g.mol}^{-1}$	
p-Crésol 	Masse molaire = $108,1 \text{ g.mol}^{-1}$	
Pentachlorophénol 	Norme européenne : $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ Recommandation OMS : $9 \mu\text{g.l}^{-1}$ EPA : $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ Masse molaire = $266,3 \text{ g.mol}^{-1}$	

<b>Métaux lourds</b>	
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{H}_2\text{O}$	Norme européenne : $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ en cadmium Recommandation OMS : $3 \mu\text{g.l}^{-1}$ en cadmium EPA : $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ en cadmium  Masse molaire $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 = 308,5 \text{ g.mol}^{-1}$
$\text{CuSO}_4$	Norme européenne : $2 \text{ mg.l}^{-1}$ en cuivre Recommandation OMS : $2 \text{ mg.l}^{-1}$ en cuivre EPA : $1,3 \text{ mg.l}^{-1}$ en cuivre  Masse molaire = $159,6 \text{ g.mol}^{-1}$
$\text{HgCl}_2$	Norme européenne : $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ en mercure Recommandation OMS : $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ en mercure EPA : $2 \mu\text{g.l}^{-1}$ en mercure  Masse molaire = $271,5 \text{ g.mol}^{-1}$

<b>Détergents</b>		
DBS : dodécylbenzène sulfonate de sodium  	Masse molaire = $348,5 \text{ g.mol}^{-1}$	Norme européenne : $200 \mu\text{g.l}^{-1}$ (exprimés en lauryl-sulfate)
SDS : dodécyle sulfate de sodium (lauryl-sulfate)  	Masse molaire = $288,4 \text{ g.mol}^{-1}$	
Triton X 100   $n = 9 - 10$	Masse molaire = $576,6 \text{ g.mol}^{-1}$	

**Annexe 4 :**  
**Produits étalons utilisés lors de la calibration de l'HPLC**

<b>Composé</b>	<b>Longueur d'onde d'extraction des chromatogrammes (nm)</b>	<b>Temps de rétention (min)</b>	<b>Action</b>
Atrazine	221	4,8	Herbicide
Carbaryl	220	4,8	Insecticide
Cymoxanil	250	3,2	Fongicide
Dimétomorphe	220	6,1	Fongicide
Diuron	250	4,8	Herbicide
Fenhexamide	220	8,1	Fongicide
Fludioxonyl	220	7,5	Fongicide
Flufenoxuron	220	18,9	Acaricide, Herbicide
Folpel	220	9,8	Fongicide
Glyphosate	220	1,5	Herbicide
Krésoxim-méthyl	220	11,8	Fongicide
Mancozeb	220	4,8	Fongicide
Métiram	236	2,1	Fongicide
Pyriméthanil	270	8,8	Fongicide
Quinalphos	237	12,1	Insecticide
Quinoxyfen	240	18,6	Fongicide
Tébuconazole	220	8,9	Fongicide
Terbuthylazine	222	6,9	Herbicide



## **PUBLICATIONS**



## Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides

Christophe Védrine<sup>a</sup>, Jean-Claude Leclerc<sup>b</sup>, Claude Durrieu<sup>c</sup>, Canh Tran-Minh<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Ecole Nationale Supérieure des Mines, SPIN/PC2M/Enzyme engineering, 158, Cours Fauriel, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France

<sup>b</sup> Faculté des Sciences, Equipe d'Ecophysiologie, 23 Rue Dr Paul Michelon, 42023 Saint-Etienne cedex 2, France

<sup>c</sup> Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat, Rue Maurice Audin, 69518 Vaulx-en-Velin cedex, France

Received 11 February 2002; received in revised form 17 June 2002; accepted 31 July 2002

### Abstract

An optical biosensor was designed for determination of herbicides as aquatic contaminants. Detection was obtained with immobilised *Chlorella vulgaris* microalgae entrapped on a quartz microfibre filter and placed in a five-membrane-home-made-flow cell. The algal chlorophyll fluorescence modified by the presence of herbicides was collected at the tip of an optical fibre bundle and sent to a fluorimeter. A continuous culture was set up to produce algal cells in reproducible conditions for measurement optimisation. Effects of flow rate, algal density, temperature, and pH on the biosensor response to atrazine were studied. Reversibility and detection limits were determined for DNOC and atrazine, simazine, isoproturon, diuron. Detection of photosystem II (PSII) herbicides was achieved at sub-ppb concentration level.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Biosensor; Algae; *Chlorella*; Fluorescence; Herbicide; Ecotoxicology

### 1. Introduction

Pesticides determination has been a growing concern of agriculture and health care professionals and regulatory agencies. High-performance liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) have required a pre-concentration method (liquid liquid extraction, solid-phase extraction...) for analysing pesticides in drinking water (Van der Hoff and Van Zoonen, 1999; Hogendoorn and Van Zoonen, 2000). They demand skilled technicians, expensive equipment and are inappropriate for continuous monitoring. On the other hand, early-warning systems are needed in order to react in case of accidental pollution. Biosensors for pollutants determination have proved to be sensitive, low cost and easily adapted for on-line monitoring (Rogers, 1995). In addition, biosensors using whole cells are of ecotoxicity interest because these bioreceptors are the targets of numerous toxics.

Photosystem II (PSII)-based biosensors are reported to be able to detect herbicides in the environment (Giardi et al., 2001). Photosynthesis inhibition is an interesting indicator that rapidly reflects the toxic effect of pollutants (Overnell, 1976). About 30% of herbicides are targeting the vegetal PSII (Moreland, 1980; Draber et al., 1991). They include derivatives of phenylurea, triazine, and phenolic herbicides. These substances inhibit photosynthetic electron flow by blocking the PSII quinone binding site and thus modify chlorophyll fluorescence.

Some biosensing systems for herbicides detection use isolated chloroplasts or intact cells of algae to measure changes in chlorophyll fluorescence (Samson and Popovic, 1988; Arsalane et al., 1993; Conrad et al., 1993; Yoneyama et al., 1993; Merz et al., 1996; El Jay et al., 1997; Van der Heever and Grobbelaar, 1998). These reagentless biosensors are compatible for in-field use or on line monitoring (Weston and Robinson, 1991; Frense et al., 1998; Naessens et al., 2000). However, so far the limit of detection for atrazine reported with biosensors varied from 1 to 10<sup>3</sup> µg l<sup>-1</sup> depending on the bioreceptor used (Giardi et al., 2001).

\* Corresponding author. Tel.: +33-477-420033; fax: +33-477-420000

E-mail address: tran@emse.fr (C. Tran-Minh).

The objective of this study is to design a biosensor for on-line quality monitoring of groundwater and aquatic environment. Its performances should be close to European Community directive for herbicide detection ( $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$  for a single herbicide in drinking water). The concept of algal biosensor developed by Naessens et al. (2000) was adopted to design a new and reliable device for herbicides determination.

## 2. Experimental

### 2.1. Solutions and reagents

Herbicides were chosen for their global or specific activity on PSII. They include atrazine [2-ethylamino-4-chloro-6-isopropyl amino-1,3,5 triazine], simazine [2,4-bis(ethylamino)-6-chloro-1,3,5-triazine], diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea], isoproturon [3-(4-isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea], and dinitro-*o*-cresol (DNOC) [4,6-dinitro- 2-hydroxytoluene]. All herbicides (Pestanal®) are purchased from Riedel-de-Haen (France). They are prepared in anhydrous ethanol (Carlo Erba) to get  $10^{-3}$  M stock solutions, which are stored in darkness at 4 °C for 1 month. All test solutions are diluted in Milli-Q® water (Millipore, France) immediately before use.

Four buffer solutions were required to investigate across the 3–10 pH range. Citrate-phosphate (pH 3–5), phosphate (pH 6–8), boric acid borax (pH 9), borax NaOH (pH 10) buffer solutions were used at 10 mM concentration. All chemicals were of analytical-reagent grade.

### 2.2. Algal membrane preparation

The *Chlorella vulgaris* strain (CCAP 211/12, Culture Collection of algae and protozoa, Cumbria, UK) was grown in the culture medium Lefebvre Czarda described in the Guidance of International Organisation for Standardisation (ISO 8692). Cells were grown in a 300 ml bioreactor that enables continuous culture (1500 lx, 12 h photo-period). During illumination, the reactor was supplied with medium while culture was removed at a same flow rate ( $15 \text{ ml h}^{-1}$ ). Before each experiment using the biosensor, 15 ml of fresh culture was harvested 5 h after the beginning of illumination.

The active membrane was constructed by physical entrapment of the algal cells onto a porous matrix. Immobilisation was achieved by simple filtration of an algal suspension on a quartz microfibre filter QMA Whatman®. Concentration of algae in suspension was previously determined by optical density (OD) with a spectrophotometer Cary 300 (Varian, France) and counted under a microscope using a Thoma numeration cell (Polylabo, France). Typically, 20 ml of a suspension

of OD = 0.25 at 760 nm (about  $7 \times 10^6$  cells per ml) was used for a  $11.3 \text{ cm}^2$  membrane (3.8 cm diameter). This membrane was punched to smaller discs (8 mm in diameter, about  $6 \times 10^6$  immobilised cells) that fit the five seatings of the rotating support.

### 2.3. Construction of the algal optical biosensor

A fibre-optic biosensor (Fig. 1) was constructed with five removable algal membranes placed on a rotating support of a 10 ml homemade flow cell. An electronically controlled motor rotated the support to position the membranes alternately in front of the tip of an optical fibre bundle. The incident light hits the upper part of the membrane and the resulting fluorescence radiation is collected up to the Spex Fluorolog 2 fluorometer (from Jobin Yvon) equipped with a micro-computer for data recording. The flow running through the biosensor is temperature controlled using a thermostat (Lauda, Germany). Flow temperature inside the biosensor is monitored using a temperature probe (Checktemp2, Hanna instruments).

### 2.4. Operating conditions

Algal chlorophyll fluorescence measurement was carried out in two steps: 1 min to measure fluorescence, 4 min of darkness for the membrane to recover. While one membrane was in measurement position, the other four membranes were in stand-by position until the support rotates again. The excitation wavelength was set to 482 nm and the emission was measured at 683 nm: these wavelengths are found optimal for fluorescence determination with *C. vulgaris* (CCAP 211/12).

An Ismastec peristaltic pump (Switzerland) was used to send a continuous flow of solution through the measurement device (Fig. 1) between the five algal membranes and the optical fibre bundle. The sensor was first fed with a toxic-free solution (reference

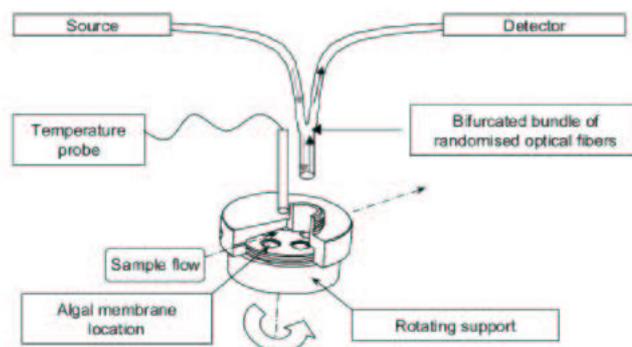


Fig. 1. Experimental set-up of the algal optical biosensor for continuous toxicity assessment.

solution) for 14 h to get a stable fluorescence signal. Then a herbicide was introduced to measure the biosensor response. Reversibility of the biosensor response was tested after the reference solution ran through the biosensor again for 2 h. Data were processed to obtain the mean fluorescence value (corresponding to 60 s of measurement) for each membrane.

Unless otherwise stated, all experiments were performed at 20 °C in phosphate buffer solution (pH 7, 10 mM) with a 2 ml min<sup>-1</sup> flow rate.

The biosensor long-term stability under on-line working conditions was carried out over 4 weeks. A 1 µg l<sup>-1</sup> flow solution of atrazine was tested everyday for 1 h to determine the biosensor response, then a natural water flow (Volvic, France) was performed for 23 h.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Continuous cultivation of algal cells

A 300 ml bioreactor was designed to have a continuous culture over 5 weeks. The medium flow rate had been adjusted so that the optical density (OD) at 760 nm remained at 0.5 (ca. 14 × 10<sup>6</sup> cells per ml). A stable physiological activity is reached 4 days after the beginning of cultivation. This system provides fresh culture for everyday consumption. Harvested cells are in a same and optimal physiological state to improve reproducibility and sensitivity of herbicides detection. Moreover, the *C. vulgaris* continuous cultivation is very easy to set up and less time consuming compare with batch cultures.

Studies conducted on life cycles of a continuous and synchronous culture of *Chlorella ellipsoidea* (Tamiya, 1964) showed that cells harvested 5 h after the beginning of illumination are most photosynthetically active since they are derived from nascent cells. Similar results demonstrated that maximal quantum efficiency of photosynthesis was achieved between 2 and 8 h after the beginning of illumination for continuous cultures of *Scenedesmus obliquus* (Senger and Bishop, 1971) and *Chlamydomonas reinhardtii* (Senger and Frickel-Faulstich, 1974). Samuelsson and Öquist (1977) have studied the DCMU-induced fluorescence at various stages of a *Chlorella pyrenoidesa* culture. They showed that maximal DCMU-induced fluorescence corresponded to a maximal photosynthesis activity. Considering these reported results, we have decided to harvest *C. vulgaris* cells 5 h after the beginning of illumination to ensure optimal physiological activity and biosensor parameters optimisation (pH, temperature...).

Additionally, the use of a continuous culture is a very convenient way to overcome problems link to culture of *C. vulgaris*.

#### 3.2. Detection principle

Response of the algal biosensor was obtained from the chlorophyll fluorescence emission at 683 under 482 nm excitation light. These wavelengths were experimentally determined. Excitation maximum corresponds to the Soret band maximum absorption of chlorophyll *b* (Hipkins and Baker, 1986) present in large amounts in green algae. Emission maximum corresponds to the main emission peak (fluorescent PSII band) for *C. vulgaris* (Govindjee and Satoh, 1986) and *Scenedesmus subspicatus* (Frense et al., 1998).

This biosensor has been designed from practical considerations. This five membranes configuration enables to achieve a full time use of source and detector. Membranes are under the same conditions of light and toxic exposure. It results in good repeatability in membrane fluorescence measurement (2.5% of standard deviation among five membranes using algae from the same continuous culture).

#### 3.3. Response of the biosensor

The biosensor was tested in the absence of toxic compounds and in the presence of herbicides to compare their effects on fluorescence induction kinetics. The various steps characterising the algal biosensor response to herbicides have been described by Naessens et al. (2000). The presence of anti PSII herbicides (diuron, atrazine, simazine and isoproturon) increases the fluorescence emission. Reproducibility was assessed with three different continuous cultures. Five membranes of each were tested to obtain the standard deviation of the response to pollutant (6.5%). Fourteen hours were needed to reach a stable fluorescence level. This fluorescence stability is required to detect any slight modification of the signal.

Fig. 2 illustrates typical fluorescence signal change following an increase in atrazine concentration in the flow stream. The signal reaches a stable plateau for each addition of atrazine, so that a calibration curve can be plotted.

The biosensor response time necessary to attain 95% maximal response was measured for flow rates comprise between 2 ml min<sup>-1</sup> and 10 ml min<sup>-1</sup> for 50 µg l<sup>-1</sup> atrazine concentration. Since a time lag is required to bring the herbicide to the bioreceptor, response times decrease with increasing carrier flow rates (data not shown). At high flow rate, the overall response time tends to approach the effective biosensor response time, which is about 10 min. This agrees with data reported by Frense et al. (1998).

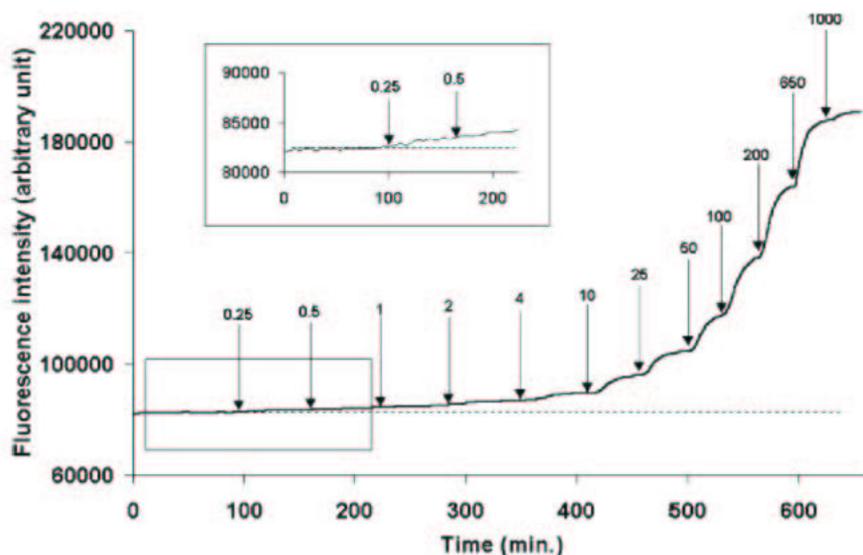


Fig. 2. Typical response of a *C. vulgaris* membrane to increasing concentrations of atrazine ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Inset: response for low concentrations of atrazine, (---) fluorescence base-line. Conditions: 10 mM, pH 7.0 phosphate buffer, 20 °C, 2 ml  $\text{min}^{-1}$  flow rate.

### 3.4. Effect of algal density on the biosensor behaviour

The effect of algal loading in the membrane on the fluorescence signal (Fig. 3) was assessed in good conditions since no leaching of algae was observed. When immobilised cells on the membrane increases, fluorescence increases and reaches a maximum corresponding to  $15 \times 10^6$  cells. Then fluorescence decreases very slightly from  $15 \times 10^6$  to  $30 \times 10^6$  cells. This is attributed to part of the fluorescence reabsorbed by neighbouring algae.

To optimise biosensor response to atrazine in the range of 0.25–10  $\mu\text{g l}^{-1}$ , various concentrations of immobilised cells were tested (Fig. 4). A maximal response corresponding to  $6 \times 10^6$  immobilised cells on the membrane was observed for any atrazine concentra-

tions and also for higher concentrations (up to 1  $\text{mg l}^{-1}$ , data not shown).

The detection limit (a signal-to-noise of 3) corresponds to 0.4% of fluorescence increase. It can be concluded that the atrazine detection limit of this biosensor is 0.25  $\mu\text{g l}^{-1}$  (inset Fig. 4).

### 3.5. Effect of temperature and pH on algal response to atrazine

Effects of temperature and pH on the algal response were tested with two different concentrations of atrazine (50 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ).

The biosensor response to atrazine investigated from 10 to 30 °C (Fig. 5) shows a maximum at 20 °C. This also corresponds to the temperature used for algae cultivation conditions. Good response between 10 and 25 °C still allow sensitive determination of atrazine. However, the sensor response is very affected beyond 25 °C for any atrazine concentrations and measurement in this region should be avoided.

The pHs tested ranges from 3 to 10 (Fig. 6). Considering the various buffers involved, low buffer solution concentrations were used to minimise the effect of buffer composition on algae metabolism. Maximum response is achieved at pH 7, which corresponds to the culture medium pH. Between pH 5 and 9 the biosensor response is high enough to ensure sensitive determination of atrazine. Maximal response is reduced by half for pH 3 and 10. To monitor atrazine in water, the *C. vulgaris* biosensor should operate as close to the optimal conditions as possible (pH 7 and 20 °C) to achieve best results.

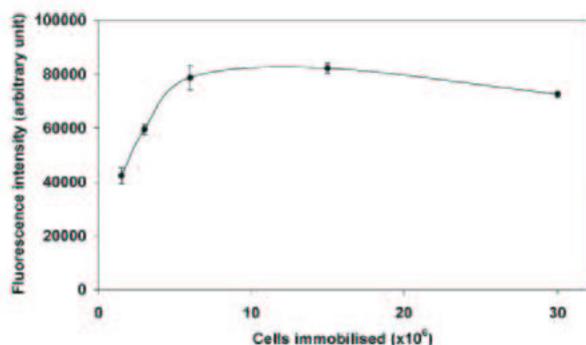


Fig. 3. Effect of algal loading on chlorophyll fluorescence of *C. vulgaris*. Mean values from three membranes corresponding to three different continuous cultures were used to obtain this curve. Conditions: 10 mM, pH 7.0 phosphate buffer, 20 °C, 2 ml  $\text{min}^{-1}$  flow rate.

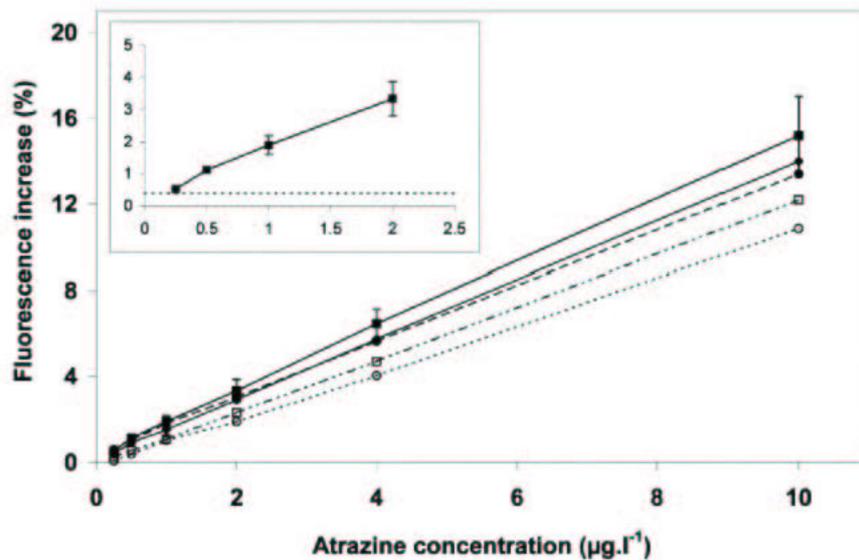


Fig. 4. Effect of algal loading:  $1.5 \times 10^6$  (○),  $3 \times 10^6$  (●),  $6 \times 10^6$  (■),  $15 \times 10^6$  (◆),  $30 \times 10^6$  (□) cells per membrane on the sensor response to low concentrations of atrazine. Inset: response for atrazine concentration around ppb level for  $6 \times 10^6$  immobilised cells per membrane and detection limit (----). Mean values from three membranes corresponding to three different continuous cultures were used to obtain these curves. Conditions: 10 mM, pH 7.0 phosphate buffer, 20 °C, 2 ml min<sup>-1</sup> flow rate.

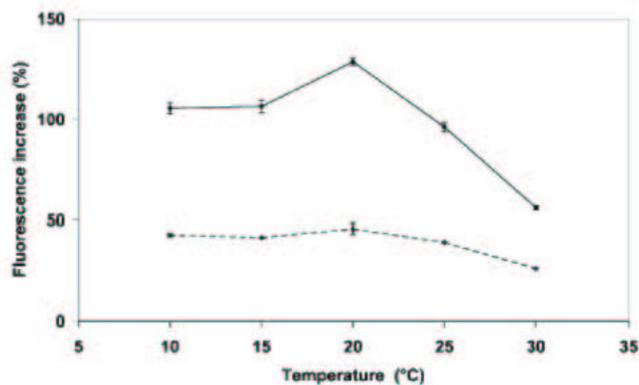


Fig. 5. Effect of temperature on the sensor response to  $50 \mu\text{g l}^{-1}$  (----) and  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  ( ) of atrazine. Mean values from three membranes corresponding to three different continuous cultures were used to obtain the curves. Conditions: 10 mM, pH 7.0 phosphate buffer, 2 ml min<sup>-1</sup> flow rate.

### 3.6. Long-term stability under on-line working conditions

The main objective of algae immobilisation is to stabilise the bioreceptor for the biosensor to be used repeatedly over a long period of time under on-line monitoring conditions.

No loss of activity participating to the biosensor response had been observed. The response of the biosensor to  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  of atrazine remains stable over 4 weeks (data not shown).

### 3.7. Detection limit and $EC_{50}$

One of our objectives was to improve the detection limit with a *C. vulgaris* based biosensor. Atrazine was

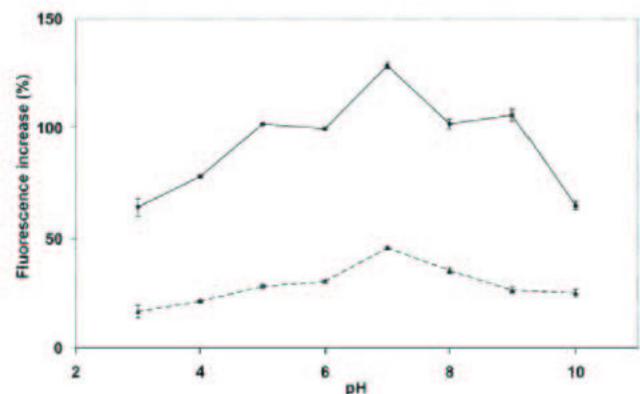


Fig. 6. Effect of pH on the sensor response to  $50 \mu\text{g l}^{-1}$  (----) and  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  ( ) of atrazine. Mean values from three membranes corresponding to three different continuous cultures were used to obtain the curves. Conditions: 10 mM, pH 3.0–5.0 citrate phosphate buffer, pH 6.0–8.0 phosphate buffer, pH 9.0 borate borax buffer, pH 10 borate NaOH buffer, 20 °C, 2 ml min<sup>-1</sup> flow rate.

first tested to determine optimal operating conditions, which were later applied for other herbicides. Dose response curves corresponding to atrazine, simazine, diuron and isoproturon are presented in Fig. 7. Successive addition method is not appropriate to construct DNOC response curve due to its dual mode of action. The detection limit, the toxic concentration  $EC_{50}$  that affects 50% of the response and reversibility of action of these pollutants are listed in Table 1.

Triazines and phenylurea are well-known herbicides that specifically fix to the  $Q_B$  binding site of PSII with high affinity. This blocks the photosynthetic electron flow and causes an increase in chlorophyll fluorescence intensity. Experiments performed with atrazine, sima-

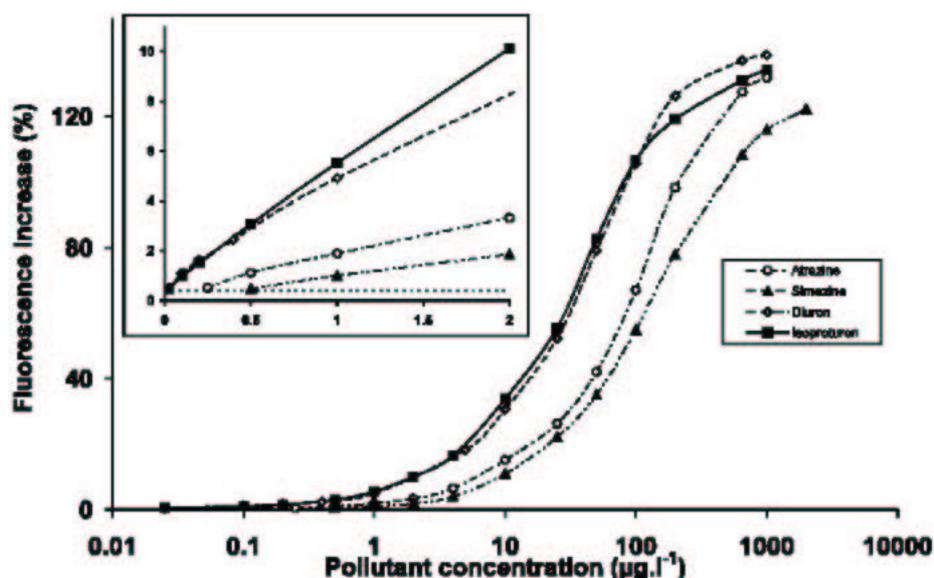


Fig. 7. Dose response curves for the detection of herbicides with chlorophyll fluorescence measurement (logarithmic scale for pollutant concentration). Inset: response for pollutant concentration (linear scale) around ppb level and detection limit (----). Conditions: 10 mM, pH 7.0 phosphate buffer, 20 °C, 2 ml min<sup>-1</sup> flow rate.

zine, isoproturon and diuron (classical PSII inhibitors) showed that the biosensor was very sensitive to all four herbicides at sub ppb level. The EC<sub>50</sub> obtained is consistent with the detection limit (the lower the EC<sub>50</sub>, the lower the limit of detection). Those herbicides can be considered as reversible since most activity is recovered after exposition to herbicides and flushing the biosensor with a reference solution.

Phenolic herbicides have two modes of action: they are inhibitors of PSII electron transport, and also uncouplers of oxidative phosphorylation and photophosphorylation, due to their protonophoric properties (Oettmeier et al., 1987). This could explain the specific behaviour of the biosensor towards the phenolic herbicide, DNOC. The fluorescence intensity increases until 300 µg l<sup>-1</sup>. It could be attributed to the inhibition of PSII electron transport while the uncoupling effect is comparably negligible. Although the PSII inhibition still increases at higher concentrations, the uncoupling effect of DNOC tends to become the major parameter, which decreases fluorescence signal. Although DNOC is a poor inhibitor of PSII electron transport compared with triazine, phenyl-urea and others from the same family

(dinoseb, dinoterb, ioxynil) (Scalla and Gauvrit, 1991), it can be detected down to 5 µg l<sup>-1</sup> (Table 1). It should be noted that the phytotoxicity of DNOC is mainly due to its uncoupling effect rather than inhibition effect on PSII electron transport (Scalla and Gauvrit, 1991).

Since its mode of action, modification of fluorescence signal is irreversible. Rinsing the biosensor with a DNOC free solution results in a decrease of the fluorescence signal far below the reference level suggesting that the membrane has been damaged due to the uncoupling effect while PSII inhibition is no longer effective. In case of herbicides monitoring, precaution should be taken in interpretation of the response particularly if DNOC concentration exceeds 300 µg l<sup>-1</sup>.

#### 4. Conclusion

The fluorescence-based biosensor using *C. vulgaris* is particularly suitable for detection of PSII-inhibiting herbicides. It can also be used for determination of other herbicides such as DNOC, which is a poor inhibitor of PSII electron transport.

Table 1

Characteristics of the algal optical biosensor response to different herbicides. Mean values obtained from 9 membranes (with 3 different continuous cultures)

Herbicides	Detection limit (µg l <sup>-1</sup> ) (signal-to-noise of 3)	EC <sub>50</sub> (µg l <sup>-1</sup> )	Reversibility
Atrazine	0.25	96 ± 4	Yes
Simazine	0.5	127 ± 4	Yes
Isoproturon	0.025	35 ± 2	Yes
Diuron	0.025	39 ± 3	Yes
DNOC	5		No

Two strategies have been adopted to improve the performance of this biosensor. First, optimisation of the bioreceptor is achieved with a continuous cultivation technique, which provides harvested cells in a same optimal physiological state that increases reproducibility. Thus it facilitates the determination of optimal operating conditions (algal density on the membrane, pH, temperature) and results in an improvement of pollutant detection. This strategy has never been reported (to our knowledge) for biosensors using *C. Vulgaris*. Second, reliability of the sensor to detect pollutants is improved as the number of assays performed is multiplied by five compared with a single membrane based biosensor. This design enables an easier monitoring of the evolution of the flow toxicity because of the 1 min lag difference between the measurement of each membrane.

Response time and detection limit of this biosensor are compatible for groundwater and aquatic environment quality monitoring and its use as an early warning system. In fact, the level of atrazine in river water varies seasonally with the highest concentrations found in the spring and summer months (Solomon et al., 1996). For example, Hall et al. (1993) reported detectable levels of atrazine rapidly rose to  $43 \mu\text{g l}^{-1}$  during May and then dropped sharply to  $1.8 \mu\text{g l}^{-1}$  by the end of June. The biosensor would be an appropriate tool to monitor seasonal variation of atrazine in aquatic media and be used as an alarm system. Further investigations with several micro-organisms tested simultaneously in this multi-membrane device would give a better understanding of the impact of pollutants on aqueous ecosystems.

## References

- Arsalane, A., Parésys, G., Duval, J.-C., Wilhelm, C., Conrad, R., Büchel, C., 1993. A new fluorometric device to measure the in vivo chlorophyll a fluorescence yield in microalgae and its use as a herbicide monitor. *Eur. J. Phycol.* 28, 247–252.
- Conrad, R., Büchel, C., Wilhelm, C., Arsalane, W., Berkloff, C., Duval, J.C., 1993. Changes in yield of in vivo fluorescence of chlorophyll a as a tool for selective herbicide monitoring. *J. Appl. Phycol.* 5, 505–516.
- Draber, W., Tietjen, K., Kluth, J.F., Trebst, A., 1991. Herbicides in photosynthesis research. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 1621–1633.
- El Jay, A., Ducruet, J.M., Duval, J.C., Pelletier, J.P., 1997. A high-sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum*: comparison with effect on cell growth. *Arch. Hydrobiol.* 140, 273–286.
- Frense, D., Müller, A., Beckmann, D., 1998. Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilised algae cells. *Sens. Actuat. B* 51, 256–260.
- Giardi, M.T., Kobizek, M., Masojidek, J., 2001. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. *Biosens. Bioelectron.* 16, 1027–1033.
- Govindjee, Satoh, K., 1986. Fluorescence properties of chlorophyll b- and chlorophyll c-containing algae. In: Govindjee, Ames, J., Fork, D.C. (Eds.), *Light Emission by Plants and Bacteria*. Academic Press, Orlando, pp. 497–537.
- Hall, J.C., Van Deynze, T.D., Struger, J., Chan, C.H., 1993. Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metolachlor and 2,4-D. *J. Environ. Sci. Health* 28 (Part B), 577–598.
- Hipkins, M.F., Baker, N.R., 1986. Spectroscopy. In: Hipkins, M.F., Baker, N.R. (Eds.), *Photosynthesis Energy Transduction. A Practical Approach*. Irl Press, Oxford, pp. 51–101.
- Hogendoorn, E., Van Zoonen, P., 2000. Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *J. Chromatogr. A* 892, 435–453.
- Merz, D., Geyer, M., Moss, D.A., Ache, H.-J., 1996. Chlorophyll fluorescence biosensor for the detection of herbicides. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354, 299–305.
- Moreland, D.E., 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 597–638.
- Naessens, M., Lederc, J.-C., Tran-Minh, C., 2000. Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 181–185.
- Oettmeier, W., Kude, K., Soll, H.-J., 1987. Phenolic herbicides and their methyl-ethers: binding characteristics and inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 27, 50–60.
- Overnell, J., 1976. Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. *Mar. Biol.* 38, 335–342.
- Rogers, K.R., 1995. Biosensors for environmental applications. *Biosens. Bioelectron.* 10, 533–541.
- Samson, G., Popovic, R., 1988. Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 16, 272–278.
- Samuelsson, G., Öquist, G., 1977. A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algal based on in vivo chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant* 40, 315–319.
- Scalla, R., Gauvrit, C., 1991. Mécanismes d'action phytotoxique des autres familles d'herbicides. In: Scalla, R. (Ed.), *Les herbicides: mode d'action et principes d'utilisation*. Inra, Paris, pp. 115–191.
- Senger, H., Bishop, N., 1971. Changes in fluorescence and absorbance during synchronous growth of *Scenedesmus*. In: Forti, G., Avron, M., Melandri, A. (Eds.), *Proceedings of the Second International Congress on Photosynthesis*. Stresa, The Hague, pp. 677–687.
- Senger, H., Frickel-Faulstich, B., 1974. The regulation of electron flow in synchronized cultures of green algae. In: Avron, M. (Ed.), *Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis*. Elsevier, Rehovot, Israel, pp. 715–727.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskoff, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall, L.W., Williams, W., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 31–76.
- Tamiya, H., 1964. Growth and cell division of *Chlorella*. In: Zeuthen, E. (Ed.), *Synchrony in Cell Division and Growth*. Interscience Publishers, New York, pp. 247–305.
- Van der Heever, J.A., Grobbelaar, J.U., 1998. In vivo chlorophyll A fluorescence of *Selenastrum capricornutum* as a screening bioassay in toxicity studies. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 281–286.
- Van der Hoff, R.G., Van Zoonen, P., 1999. Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 843, 301–322.
- Weston, L., Robinson, P., 1991. Detection and quantification of triazine herbicides using algal cell fluorescence. *Biotechnol. Tech.* 5, 327–330.
- Yoneyama, K., Nakajima, Y., Maejima, N., Ogasawara, M., Konnai, M., Tokutake, N., Iwamura, H., Sato, F., Ichinose, K., Asami, T., Yoshida, S., 1993. Simple and rapid screening method for photosystem II inhibitory herbicides using photoautotrophically cultured plant cells with chlorophyll fluorescence monitoring. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1389–1390.



# Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support

Christophe Védrine<sup>1</sup>, Silvia Fabiano<sup>1</sup>, Canh Tran-Minh\*

*ENSM-SE, 158 Cours Fauriel, 42023 Saint Etienne Cedex 2, France*

Received 12 July 2002; received in revised form 30 September 2002; accepted 10 October 2002

## Abstract

An amperometric enzyme sensor using tyrosinase, also called polyphenol oxidase (PPO), was constructed for determination of phenolic compounds and herbicides. The enzyme was entrapped in a conducting polymer, poly 3,4-ethylenedioxythiophene (PEDT), electrochemically generated on a glassy carbon electrode. Several experimental parameters in the electropolymerisation process and working conditions were determined to optimise biosensor performances. Mono-phenol and di-phenol were tested in oxygenated solutions, by amperometric measurements at  $-200$  mV (vs. SCE) in a batch system. The limit of detection of these molecules ranges from 5 to 500 nM. Detection of herbicides was obtained from the inhibition of tyrosinase electrode responses. The limit of detection for atrazine and diuron was 1 and 0.5 mg l<sup>-1</sup> respectively. These data suggest that PEDT film is a promising PPO immobilisation method.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Conducting polymer; Tyrosinase; Phenolic compounds; Herbicides

## 1. Introduction

Biosensors are devices capable of recovering analytical information by utilising biological component as part of the sensor [1]. The use of an amperometric enzyme electrode provides a promising way of development of a wide range of biosensors. This approach combines specificity of the biocomponent (selective molecular recogni-

tion) with advantages of electrochemical detection [2].

The essential task in construction of an amperometric biosensor is to efficiently and effectively immobilise the bioactive moiety onto the electrode surface. Electrochemical polymerisation of conducting polymer is a simple one-step process to construct bioelectrodes. Moreover, this immobilisation method allows to easily control the thickness of enzyme film [1,3].

The ability to synthesise conductive electroactive polymers under mild conditions enables to perform the immobilisation of a range of biological moieties (enzymes, antibodies, even whole living cells...). Many conducting polymers can

\* Corresponding author. Tel.: +33-477-420033; fax: +33-477-420000

E-mail address: tran@emse.fr (C. Tran-Minh).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.

be electrochemically generated [4]. In most polymers such as polypyrrole [5–8], polyaniline [9–11] and polythiophene [12,13], redox charges are delocalised over some polymer groups that could facilitate the oxidation–reduction processes.

Polypyrroles can be formed under mildly oxidative conditions from aqueous media. Polyanilines are formed from similar conditions, although formation of the most highly conducting form requires the presence of acid. The monomers of simple polythiophenes are not water-soluble. Among the promising family of polythiophenes, poly 3,4-ethylenedioxythiophene (PEDT) shows remarkable stability, provides homogeneous films [14] and can be synthesised electrochemically even in aqueous medium [15]. Unlike pyrrole, 3,4-ethylenedioxythiophene monomer (EDT) does not require distillation before use. Previous works [16,17] showed the interest of using PEDT as a support for glucose oxidase (GOD) immobilisation.

Tyrosinase is a binuclear copper containing metalloprotein and catalyses, in the presence of molecular oxygen, the hydroxylation and oxidation of mono-phenols to *o*-quinones (monophenolase activity) and the oxidation of *o*-diphenols to *o*-quinones (diphenolase activity) [18]. This enzyme, produced from mushrooms, has an isoelectric point of 4.5 [19] and carries a negative charge for  $\text{pH} > 4.5$  in aqueous solution. Attractive electrostatic interactions can occur with PEDT that is positively charged [15,20].

The PEDT/PPO biosensor is based on the detection of the electrochemical reduction at 0.2 V of *o*-quinone enzymatically produced. Thus *o*-diphenol electrochemically generated can undergo another enzymatic oxidation. It leads to a local increase of the concentration of *o*-diphenol [21]. This amplification mechanism explains high sensitivities of mono-phenol or *o*-diphenol detection with tyrosinase based bioelectrode. It was also reported that triazine and phenyl-urea herbicides could be determined from inhibition of tyrosinase response to a substrate [22–24].

The present work describes a tyrosinase based biosensor. It attempts to demonstrate the potentialities of the PEDT immobilisation technique for analytical applications using tyrosinase (which has

a more complex action mechanism than GOD). Some molecules of medical interest and pollutants potentially present in the environment were tested using this biosensor.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

EDT was kindly provided by Bayer AG (France). Polyethylene glycol (PEG) of 15 000 MW was purchased from Aldrich. Tyrosinase (polyphenol oxidase, PPO) (EC 1.14.18.1, 6680 U  $\text{mg}^{-1}$  lot 109H7037) from mushroom was procured from Sigma (France).

Catechol, dopamine, epinephrine, L-dopa, *p*-cresol, 3-chlorophenol, 4-chlorophenol were purchased from Sigma. Phenol was obtained from Carlo Erba.

The following herbicides (Pestanal®): atrazine [2-ethylamino-4-chloro-6-isopropyl amino-1,3,5 triazine], diuron [3(3,4-dichlorophenyl)1,1 dimethylurea], were purchased from Riedel-de-Haen (France). They were prepared in anhydrous ethanol (HPLC grade, Carlo Erba) to get 10  $\text{g l}^{-1}$  stock solutions which were stored in darkness at 4 °C for 1 month.

All other chemicals were of analytical grade. Phosphate buffer was prepared using di-sodium hydrogen phosphate and sodium di-hydrogen phosphate (Prolabo, France). All solutions were prepared using milliQ® pure water (Millipore, France).

### 2.2. Apparatus

Voltammetric and amperometric measurements were performed using a Tacussel PGP 201 potentiostat. The potentiostat output was recorded and processed by means of a VOLTA MASTER 1 software. The electrochemical cell was a three-electrode cell where the PEDT/PPO modified glassy carbon disk electrode acted as the working electrode and a platinum wire as the counter electrode. All potentials were measured vs. SCE. The working electrodes were constructed using a BAS® glassy carbon electrode with a disk-shaped active

surface of 3 mm diameter. Diamond fluid kit was provided by BAS® (England) to polish the electrode surface.

### 2.3. Immobilisation procedure

Bare electrodes used for preparing the biosensors consisted of glassy carbon disks. The working electrode surface was polished before use with diamond solution of 15  $\mu\text{m}$ , then 3  $\mu\text{m}$  and finally 1  $\mu\text{m}$  particle size. At last, it was carefully rinsed with distilled water.

Two immobilisation procedures were used (Fig. 1).

#### 2.3.1. Method A, for direct determination of substrates

The electropolymerisation solution was prepared from 1 mg of tyrosinase dissolved in 200  $\mu\text{l}$  of a  $10^{-2}$  M EDT aqueous solution. Five microlitres of this solution were deposited on a glassy carbon disk and dried at room temperature.

The dry electrode was dipped in a PEG  $10^{-3}$  M phosphate buffer solution (0.02 M, pH 6.2) and the EDT electropolymerisation was carried out using a +1200 mV constant potential for 2 min.

#### 2.3.2. Method B, for determination of inhibitors

The electrode was dipped in a 0.02 M pH 6.2 phosphate buffer solution containing  $10^{-2}$  M of EDT,  $10^{-3}$  M of PEG and 5  $\text{mg ml}^{-1}$  of tyrosinase. Electrochemical growth of PEDT was carried out using a +1200 mV constant potential for 2 s.

### 2.4. Measurements

Amperometric measurements of substrates and inhibitors, with the PEDT/PPO biosensor were carried out in a 20 ml beaker containing 10 ml of phosphate buffer solution (0.1 M, pH 6.5). The electrochemical cell was completed with a SCE reference electrode and a platinum wire counter electrode. The solution was continuously stirred in the open air with a magnetic stirrer to maintain a constant oxygen concentration in the solution for the enzymatic reaction to operate properly. The temperature was controlled using a thermostat (Lauda-Thermostat, Germany).

For substrates determination a potential of 200 mV was applied to the working electrode to detect *o*-quinone formation. When a baseline was stable, substrate was spiked. The current

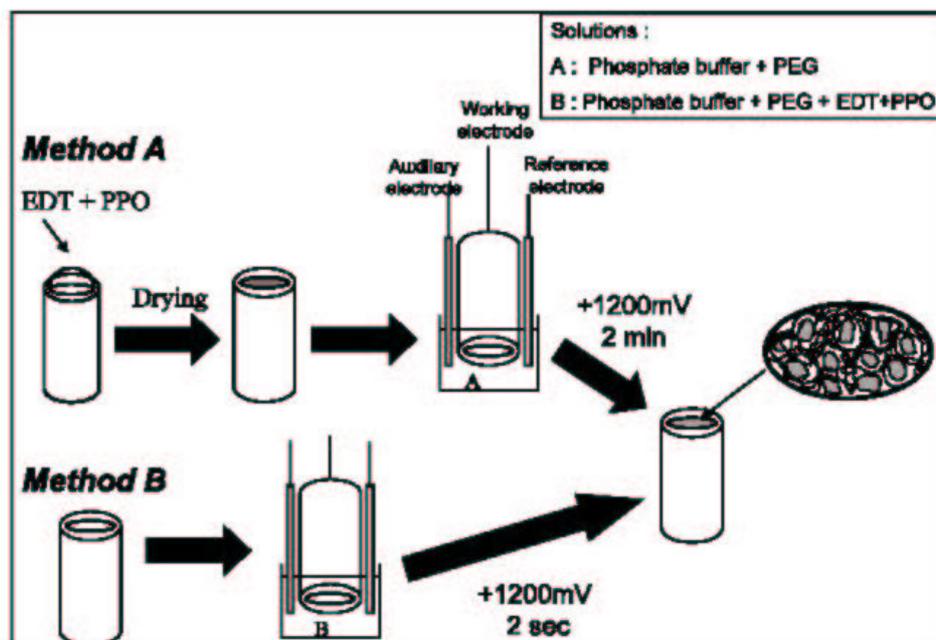


Fig. 1. Immobilisation methods for preparation of PEDT/PPO electrode. Method (A) for direct determination of mono-phenolic and *o*-diphenolic compound and method (B) for inhibitor determination.

generated on the biosensor was measured when steady state was reached.

For determination of inhibitors, dopamine 25  $\mu\text{M}$  was used as a substrate, when the current was stable the inhibitor was spiked and the current decrease was measured.

Since tyrosinase catalyses the oxidation of several mono-phenols and *o*-diphenols to *o*-quinones in the presence of oxygen, its concentration should be kept constant because it is a co-substrate of the enzymatic reaction.

Unless otherwise stated all experiments were carried out at 25 °C with an applied potential of 200 mV vs. SCE, in a phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5) containing 0.1 M KCl.

### 3. Results and discussion

Several immobilisation methods have been used to construct PPO based biosensors (Table 1). Entrapment of PPO in a PEDT film is an easy and fast immobilisation method. There is no need to synthesise the monomer since it is commercially available. This polymer is directly electrogenerated on a glassy carbon electrode. Contrary to cryo-hydrogel or silica-gel immobilisation methods, it does not require any incubation step in a specific solution or in defined temperature conditions.

PEDT/PPO electrodes were constructed according to two methods. Electrodes prepared with the method A were used to detect substrates. Biosensors constructed with method B were used for inhibitor determination. The main difference between these two methods lies in the film thickness achieved.

Table 1  
Sensitivity of phenol detection of different unmediated biosensors

Immobilisation methods	Sensitivity ( $\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	Time required for immobilisation procedure (min)	Reference
Osmium hydrogel film	9.6	Several minutes	[27]
Polypyrrole amphiphilic	356	20 min of electropolymerisation	[21,26]
Cryo-hydrogel	180	39 h of freezing thawing cycles	[42]
Silica sol gel	184	24 h at 4 °C = drying of the electrode	[35]
PEDT film	608	2 min	

### 3.1. Substrate determination

#### 3.1.1. Optimisation of the enzyme immobilisation

Method A (Fig. 1) was used to achieve entrapment of tyrosinase for phenolic compound determination.

The influence of enzyme loading in the polymer on the sensor response to 5  $\mu\text{M}$  catechol was examined (Fig. 2, solid line). Response increases when the amount of enzyme deposited on the electrode increases from 5 to 25  $\mu\text{g}$ . At higher amount of deposited enzyme, response decreases. *O*-quinone production takes place mostly at the region closer to the film/solution interface. Therefore, most of *o*-quinone molecules produced in this way are diluted in the bulk solution hence their transfer to the electrode surface is decreased. Similar behaviour was reported for polypyrrole GOD electrode [25].

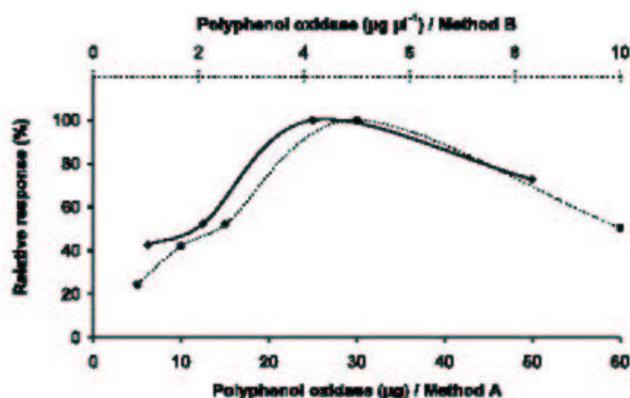


Fig. 2. Effect of enzyme loading on PEDT/PPO electrode response to 5  $\mu\text{M}$  catechol (—) using preparation method A (2 min of electropolymerization) and to 25  $\mu\text{M}$  dopamine (---) using preparation method B (2 s of electropolymerization). Conditions: 0.1 M, pH 6.5 sodium phosphate buffer and 0.1 M KCl, 25 °C, 200 mV vs. SCE.

The optimal amount of enzyme (25  $\mu\text{g}$ ) was used to assess the effect of electropolymerisation time. While 5 s of electropolymerisation time were found sufficient to ensure maximal response (Fig. 3, solid line). It was observed that in this case the film was fragile, friable and could easily be detached from the electrode during handling. With 2 min electropolymerisation corresponding to complete polymerisation of the polymer, a more adherent film is obtained. Biosensor response decreases slightly. It is probably caused by the diffusional limitation of a polymeric layer.

### 3.1.2. Effects of pH and temperature on the biosensor response to catechol

Appropriate pH ensures efficient entrapment of the enzyme while preventing loss of its activity under electropolymerisation conditions. An optimal pH of 6.2 was used: the same pH had previously been used for PEDT electropolymerisation [17].

Working pH, corresponding to the amperometric response of the PEDT/PPO electrode to catechol 5  $\mu\text{M}$  was also investigated for pHs ranging from 5 to 8 in 0.1 M phosphate buffer solution (Fig. 4). Maximal response is obtained for pH 6.5. This agrees with data reported by Cosnier and Innocent [26] for a bioelectrode using a polypyrrole tyrosinase film.

Effects of temperature on the enzyme electrode were studied with 5  $\mu\text{M}$  catechol at temperature

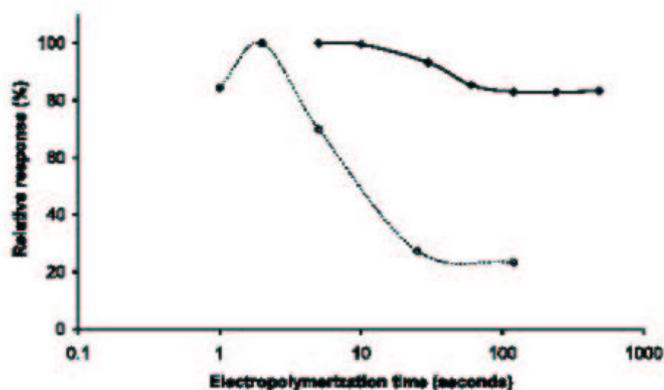


Fig. 3. Effect of electropolymerization time on PEDT/PPO electrode response to 5  $\mu\text{M}$  catechol (—) using preparation method A and to 25  $\mu\text{M}$  dopamine (---) using preparation method B. Conditions: 0.1 M, pH 6.5 sodium phosphate buffer and 0.1 M KCl, 25 °C, 200 mV vs. SCE.

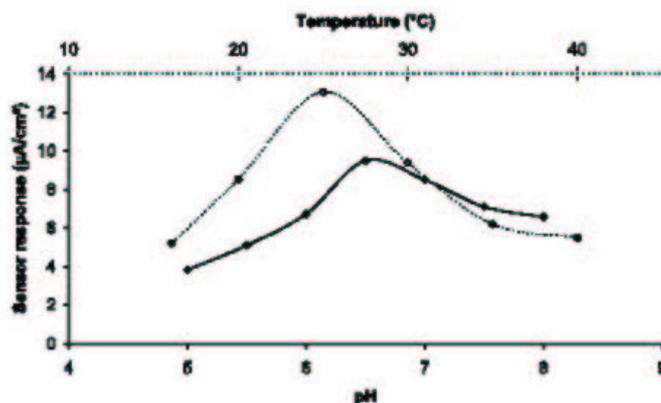


Fig. 4. Effect of temperature (---) and working pH (—) on PEDT/PPO electrode response to 5  $\mu\text{M}$  catechol using preparation method A. Conditions: 0.1 M sodium phosphate buffer and 0.1 M KCl, 200 mV vs. SCE.

ranging from 15 to 40 °C (Fig. 4). The biosensor response increases with temperature from 15 to 25 °C then a decrease is observed. The optimal temperature 25 °C also corresponds to the biosensor maximal enzyme activity.

### 3.1.3. Long-term stability

The main objective of enzyme immobilisation on a transducer, for analytical purposes, is to stabilise the enzyme for the biosensor to be used repeatedly over a long period of time. The long-term stability of the biosensor was monitored by measuring its response to 5  $\mu\text{M}$  catechol solution everyday. The PEDT/PPO electrode was washed and stored, between measurements, at 4 °C in phosphate buffer solution. The enzyme electrode retained about 30 % of its initial activity after 12 days (Fig. 5).

### 3.1.4. Response of the biosensor to different substrates

The two catalytic activities of tyrosinase (mono-phenolase and diphenolase) were tested using mono-phenolic and *o*-diphenolic compounds [27].

**3.1.4.1. Detection of *o*-diphenols.** Responses of the tyrosinase sensor to *o*-diphenols was first investigated. After each addition of aliquots of the catechol stock solution into air-saturated phosphate buffer solution the signal reaches a stable plateau, so that a calibration curve can be plotted

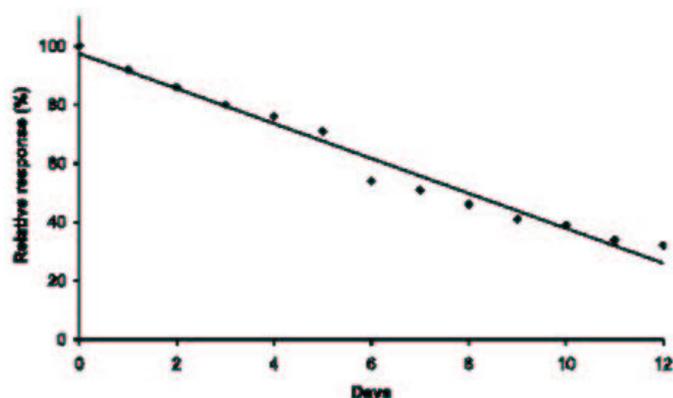


Fig. 5. Long-term stability of a PEDT/PPO electrode using preparation method A. Conditions: 5  $\mu\text{M}$  catechol, 0.1 M, pH 6.5 sodium phosphate buffer and 0.1 M KCl, 25  $^{\circ}\text{C}$ , 200 mV vs. SCE.

(Fig. 6). Dose response curves for dopamine, epinephrine, L-dopa are also shown in this figure. Sensitivity corresponding to the linear range for catechol, dopamine, L-dopa, epinephrine are about 1999, 133, 104, 56  $\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$  respectively. This sensitivity gradually decreases at higher substrate concentrations. The same sensitivity order was reported by Cosnier and Innocent [26], and Besombes et al. [28]. The PEDT/PPO

electrode sensitivity to dopamine is 2.2 times higher than that of polypyrrole/PPO electrode [29].

Tyrosinase exhibits a particular behaviour for L-dopa as a substrate. Sensitivity to L-dopa detection is higher than to epinephrine for low concentrations. At higher concentrations, sensitivity to epinephrine is better compared to L-dopa. Duckworth and Coleman [30] and Pomerantz and Warner [31] reported that two apparent values of  $K_m$  for L-dopa have been observed (two order of magnitude of difference). These data could explain the particular behaviour of the PEDT/PPO electrode when L-dopa is used.

**3.1.4.2. Detection of mono-phenols.** Calibration curves obtained for mono-phenolic compounds vary in sensitivities depending on the analyte involved (Fig. 7). Sensitivities (calculated in the linear range) decrease in this order: *p*-cresol > 4-chlorophenol > phenol > 3-chlorophenol. The main characteristics of the biosensor including sensitivity, linear range and detection limit are listed in Table 2.

The overall high sensitivity of the PEDT/PPO electrode compared to PPO biosensors using other

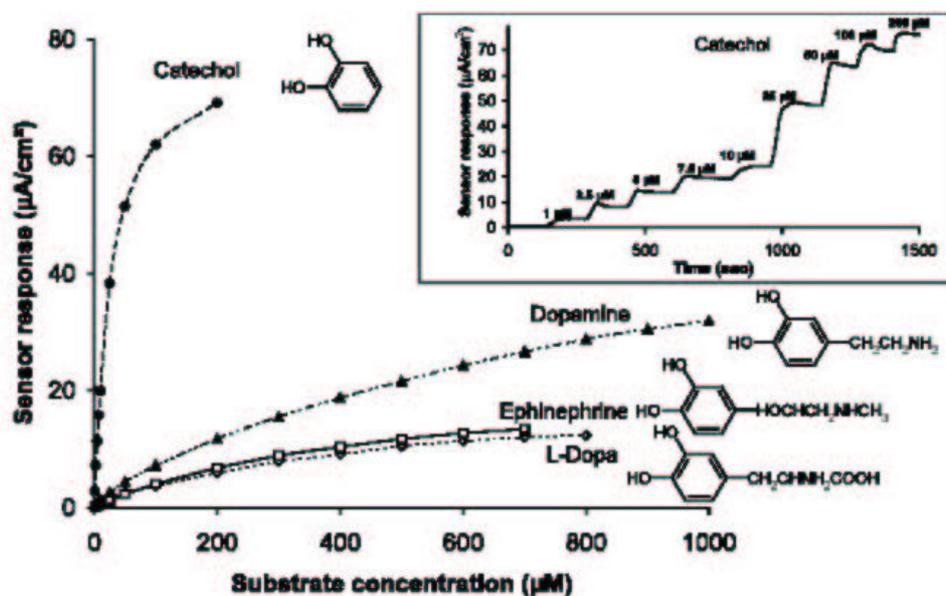


Fig. 6. Dose response curves of a PEDT/PPO electrode using preparation method A for *o*-diphenol derivatives. Inset: Typical response of a PEDT/PPO electrode to catechol in an air-saturated buffer. Conditions: 0.1 M, pH 6.5 sodium phosphate buffer and 0.1 M KCl, 25  $^{\circ}\text{C}$ , 200 mV vs. SCE.

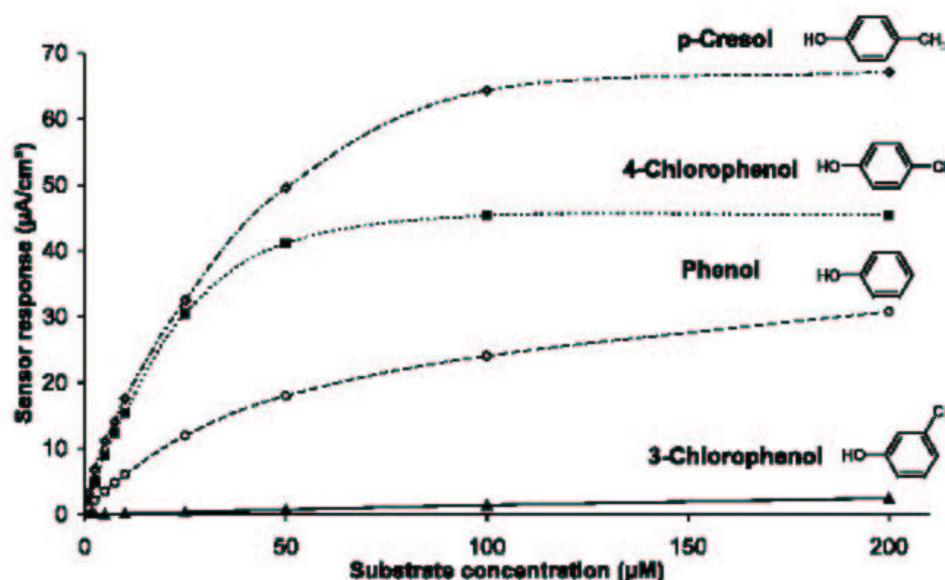


Fig. 7. Dose response curves of a PEDT/PPO electrode using preparation method A for mono-phenol derivatives. Conditions: 0.1 M, pH 6.5 sodium phosphate buffer and 0.1 M KCl, 25 °C, 200 mV vs. SCE.

matrices can be attributed to the biocompatible microenvironment for the enzyme. The difference in sensitivity between each mono-phenolic compound might depend on the hydrophobic characteristics of the immobilisation matrix [32] and molecular steric hindrance. In fact, 3-chlorophenol showed only a weak response. Transition state of this compound is difficult to form because of large steric restriction [33]. Polypyrrole/PPO bioelectrode showed similar detection profile towards chlorinated compounds. Moreover, sensitivities of PEDT/PPO electrodes towards phenol, 4-chloro-

phenol, 3-chlorophenol are 2.5, 3.8, 0.7 times of the polypyrrole/PPO electrode detection sensitivities respectively [34]. Compared to a sol gel/PPO electrode described by Wang et al. [35], our electrode is 5.6 and 3.3 times more sensitive towards *p*-cresol and phenol respectively.

No significant difference of response time has been observed for *o*-diphenolic and mono-phenolic compounds. While a time-lag is necessary for the sample solution to be homogeneous after substrate addition, a 20–40 s response of the PEDT/PPO biosensor is observed for any sub-

Table 2  
Response characteristics of the tyrosinase biosensor to several phenolic compounds

Analyte		Sensitivity (mA M <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> )	Linear up to (µM)	Limit of detection (nM)
<i>Ortho</i> -diphenol	Catechol	1999	25	
	Dopamine	133	200	100
	Epinephrine	56	200	500
	L-Dopa	104	10	500
Mono-phenol	<i>p</i> -Cresol	1759	10	5
	4-Chlorophenol	1538	10	5
	Phenol	608	25	50
	3-Chlorophenol	13	100	500

strate. This response time is consistent with results reported by Wang et al. [35].

### 3.2. Determination of inhibitors

Detection of atrazine by inhibition of a tyrosinase bioelectrode has already been reported [22]. Atrazine acts as a competitive inhibitor on the enzyme active site [28]. Similar inhibition with phenyl-urea herbicides was observed by McArdle and Persaud [22]. Since diuron is a phenyl-urea herbicide, both inhibitory effects of atrazine and diuron were determined with the PEDT/PPO electrode.

Bioelectrodes prepared using the electropolymerisation method A did not show any inhibition when they were incubated with atrazine or diuron. Numbers of parameters act on the PEDT/PPO electrode behaviour such as inhibitor, substrate, and product diffusion, kinetic of immobilised tyrosinase, polymer film permeability [36]. For instance, Wang et al. [37] showed that the thicker the polymer film the lower the permeability.

A new electropolymerisation method B was adopted to reduce the polymer film thickness while maintaining enough enzyme for a significant response (Fig. 1). Since tyrosinase to catechol affinity is higher than to dopamine [38,39], this latter substrate was used for inhibitor determination.

The influence of enzyme loading in the polymer on the sensor response to 25  $\mu\text{M}$  dopamine was examined (Fig. 2, dashed line). Similar results were observed with method A. Optimal response is achieved when the enzyme solution concentration is 5  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ . Two seconds of electropolymerisation were found optimal to ensure maximal response (Fig. 3, dashed line). It is the best compromise between thickness and amount of immobilised enzyme.

The enzyme chemical environment is the same for both methods A and B. It was assumed pH and temperature optimisation performed on PEDT/PPO electrodes (method A) was still valid for bioelectrodes prepared according the method B. Inhibition tests were carried out using the following conditions: 25  $\mu\text{M}$  dopamine, 0.1 M, pH 6.5

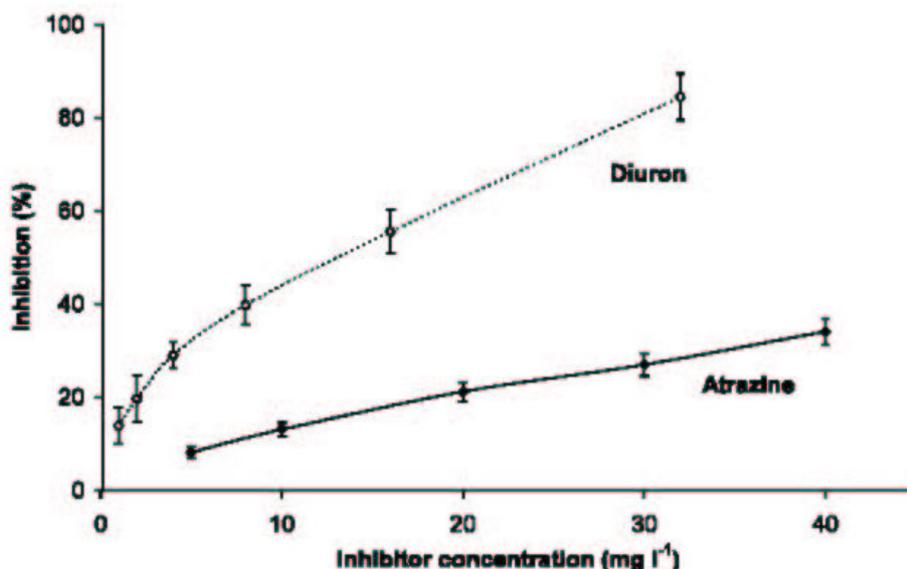


Fig. 8. Inhibition effect of atrazine and diuron on the PEDT/PPO electrode response to 25  $\mu\text{M}$  dopamine. Conditions: 0.1 M, pH 6.5 sodium phosphate buffer and 0.1 M KCl, 25 °C, 200 mV vs. SCE.

sodium phosphate buffer and 0.1 M KCl, 25 °C, 200 mV vs. SCE.

Calibration curves for atrazine and diuron are reported in Fig. 8. These results agree with those given by other authors [22,28,40]. Diuron has a greater inhibitory action than atrazine on tyrosinase electrode, which is consistent with detection limits 0.5 and 1 mg l<sup>-1</sup> respectively.

#### 4. Conclusion

In conclusion, tyrosinase can effectively be immobilised in PEDT electrogenerated film to produce sensitive biosensors. Optimisation of temperature and pH enables the biosensor to detect mono-phenolic and *o*-diphenolic compounds as substrates with high sensitivity and fast response. Compared to osmium hydrogel film, poly-pyrrole amphiphilic, cryo-hydrogel, silica sol gel based biosensor, sensitivity of phenol detection of the PEDT/PPO electrode is higher than other unmediated immobilisation methods (Table 1).

Detection of herbicides (atrazine, diuron) by enzyme inhibition has also been achieved at µM concentration levels. These results are in agreement with those reported by Besombes et al. [28] and Wang et al. [40].

Further investigations are required to achieve detection limits of 0.1 nM for catecholamine [41] and 0.1 µg l<sup>-1</sup> for a single herbicide in drinking water, 0.5 µg l<sup>-1</sup> for the phenol index in water required for medical and environmental applications respectively. The use of mediators would lower detection limits and reduce interferences [27]. Long-term stability could also be improved under dry storage conditions. Biosensors miniaturisation and incorporation in a flow-injection-analysis system are currently underway.

#### References

- [1] G.G. Wallace, M. Smyth, H. Zhao, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 245.
- [2] P.N. Bartlett, R.G. Whitaker, *J. Electroanal. Chem.* 224 (1987) 27.
- [3] P.N. Bartlett, R.G. Whitaker, *J. Electroanal. Chem.* 224 (1987) 37.
- [4] S.A. Emr, A.M. Yacynych, *Electroanalysis* 7 (1995) 913.
- [5] S. Cosnier, A. Lepellec, *Electrochim. Acta* 44 (1999) 1833.
- [6] S. Cosnier, *Electroanalysis* 9 (1997) 894.
- [7] D. Bélanger, J. Nadreau, G. Fortier, *J. Electroanal. Chem.* 274 (1989) 143.
- [8] G. Fortier, E. Brassard, D. Bélanger, *Biosens. Bioelectron.* 5 (1990) 473.
- [9] M. Trojanowicz, O. Geschke, T. Krawczynski vel Krawczyk, K. Cammann, *Sens. Actuat. B* 28 (1995) 191.
- [10] S. Mu, H. Xue, *Sens. Actuat. B* 31 (1996) 155.
- [11] S.-Y. Lu, C.-F. Li, D.-D. Zhang, Y. Zhang, Z.-H. Mo, Q. Cai, A.-R. Zhu, *J. Electroanal. Chem.* 364 (1994) 31.
- [12] M. Hiller, C. Kranz, J. Huber, P. Bäuerle, W. Schuhmann, *Adv. Mater.* 8 (1996) 219.
- [13] G. Zotti, S. Zecchin, G. Schiavon, *Chem. Mater.* 7 (1995) 2309.
- [14] H. Yamato, M. Ohwa, W. Wernet, *J. Electroanal. Chem.* 397 (1995) 163.
- [15] S. Garreau, G. Louarn, J.P. Buisson, G. Froyer, S. Lefrant, *Macromolecules* 32 (1999) 6807.
- [16] B. Piro, L.A. Dang, M.C. Pham, S. Fabiano, C. Tran-Minh, *J. Electroanal. Chem.* 512 (2001) 101.
- [17] S. Fabiano, C. Tran-Minh, B. Piro, L.A. Dang, M.C. Pham, O. Vittori, *Mater. Sci. Eng. C21* (2002) 61–67.
- [18] H. Decker, F. Tuzcek, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 392.
- [19] Y.A.M. Gerritsen, C.G.J. Chapelon, H.J. Wichers, *Phytochemistry* 35 (1994) 573.
- [20] M.A. Khan, S.P. Armes, *Langmuir* 15 (1999) 3469.
- [21] S. Cosnier, C. Innocent, *J. Electroanal. Chem.* 328 (1992) 361.
- [22] F.A. McArdle, K.C. Persaud, *Analyst* 118 (1993) 419.
- [23] A. Hipólito-Moreno, M.E. León-Gonzalez, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Diez, *Anal. Chim. Acta* 362 (1998) 187.
- [24] C. Nistor, J. Ernés, *Waste Manage.* 19 (1999) 147.
- [25] M.-C. Shin, H.-S. Kim, *Anal. Lett.* 28 (1995) 1017.
- [26] S. Cosnier, C. Innocent, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 31 (1993) 147.
- [27] M. Hedenmo, A. Narváez, E. Domínguez, I. Katakis, *J. Electroanal. Chem.* 425 (1997) 1.
- [28] J.-L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbé, G. Reverdy, *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 255.
- [29] S. Cosnier, C. Innocent, L. Allien, S. Poitry, M. Tsacopoulos, *Anal. Chem.* 69 (1997) 968.
- [30] H.W. Duckworth, J.E. Coleman, *J. Biol. Chem.* 7 (1970) 1613.
- [31] S.H. Pomerantz, M.C. Warner, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 5308.
- [32] J. Wang, F. Lu, L. David, *Analyst* 119 (1994) 455.
- [33] N. Kitajima, Y. Moro-oka, *Chem. Rev.* 94 (1994) 737.

- [34] J.L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbé, G. Reverdy, *Anal. Lett.* 28 (1995) 405.
- [35] B. Wang, J. Zhang, S. Dong, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 397.
- [36] P.N. Bartlett, J.M. Cooper, *J. Electroanal. Chem.* 362 (1993) 1.
- [37] J. Wang, S.-P. Chen, M.S. Lin, *J. Electroanal. Chem.* 273 (1989) 231.
- [38] J. Wang, M.S. Lin, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1545.
- [39] L.G. Fenoll, J.N. Rodríguez-López, F. García-Molina, F. García-Cánovas, J. Tudela, *Int. J. Biochem. Cell B* 34 (2002) 332.
- [40] J. Wang, V.B. Nascimento, S.A. Kane, K. Rogers, M.R. Smyth, L. Angnes, *Talanta* 43 (1996) 1903.
- [41] T. Okumura, Y. Nakajima, M. Matsuoka, T. Takamatsu, *J. Chromatogr. B* 694 (1997) 305.
- [42] Q. Deng, Y. Guo, S. Dong, *Analytica Chimica Acta* 319 (1996) 71.



## RESUME

Deux biocapteurs, respectivement fondés sur des cellules de micro-algues et sur la polyphénol oxydase (PPO), sont décrits dans cette étude.

Le principe du biocapteur algal repose sur le suivi de l'activité photosynthétique des micro-algues par la mesure de la fluorescence chlorophyllienne. Le mode de culture en continu a été choisi afin d'obtenir des suspensions algales dont l'état physiologique des cellules est stable au cours du temps. Les cellules algales sont immobilisées sur une membrane en fibre de quartz. Le biocapteur comporte cinq membranes algales. L'utilisation simultanée de cinq souches algales différentes permet d'augmenter la représentativité du signal mesuré d'un point de vue statistique ou écotoxicologique. *Chlorella vulgaris* a été utilisée lors des étapes d'optimisation et de validation du biocapteur. Le comportement de cinq souches algales a été étudié simultanément en l'absence et en la présence de polluants.

Le biocapteur enzymatique est fondé sur l'immobilisation de la polyphénol oxydase dans un film électrogénéré de polymère : le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDT). Il permet la détection directe de composés phénoliques et la détection indirecte d'inhibiteurs de cette enzyme. Les conditions d'élaboration et d'utilisation des bioélectrodes ont été optimisées.

Par leur spectre de détection et leur sensibilité, ces deux biocapteurs sont des outils complémentaires. Le biocapteur algal est capable de détecter des concentrations en herbicides anti-PSII inférieures au  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , tandis que la bioélectrode à PPO détecte les composés phénoliques à des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{g.l}^{-1}$ .

**Mots-clés :** biocapteur, micro-algue, *Chlorella*, fluorescence, PEDT, polyphénol oxydase, herbicides, composés phénoliques.

## ABSTRACT

Two biosensors, respectively based on microalgae and polyphenol oxidase (PPO), are presented in this study.

Chlorophyll fluorescence is used to monitor the photosynthetic activity of micro-algae in the algal biosensor. A continuous culture was set up to produce algal cells in reproducible conditions for measurement optimization. Detection was obtained with immobilized microalgae entrapped on a quartz microfibre filter and placed in a five-membrane-home-made-flow cell. This design enables to increase the statistical signal confidence and ecological representativeness when several microalgae strains are tested simultaneously. *Chlorella vulgaris* was used to optimize and validate the biosensor. The biosensor response using five algal strains simultaneously to pollutants was evaluated.

The amperometric enzyme sensor is based on the entrapment of polyphenol oxidase in an electrogenerated film of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDT). Phenolic compounds and PPO inhibitors can be detected. The electropolymerization process and working conditions were determined to optimize biosensor performance.

The biosensors detection spectrum and sensitivity complement each other to detect toxic compounds. The algal biosensor can achieve detection of photosystem II herbicides at sub  $\mu\text{g.l}^{-1}$  concentration level, while the PPO bioelectrode can detect phenolic compounds at  $\mu\text{g.l}^{-1}$  level.

**Keywords :** biosensor, microalgae, *Chlorella*, fluorescence, PEDT, polyphenol oxidase, herbicides, phenolic compounds.