



**HAL**  
open science

**Mesure de la toxicité de polluants par biocapteur.  
Réalisation d'une électrode à butyrylcholinestérase.  
Automatisation de la détection de pesticides**

Hayat El Yamani

► **To cite this version:**

Hayat El Yamani. Mesure de la toxicité de polluants par biocapteur. Réalisation d'une électrode à butyrylcholinestérase. Automatisation de la détection de pesticides. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, 1987. Français. NNT: . tel-01066089

**HAL Id: tel-01066089**

**<https://theses.hal.science/tel-01066089>**

Submitted on 19 Sep 2014

**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 à*

L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE PARIS

*par*

**Hayat EL YAMANI**  
***Ingénieur E.S.C.I.L.***

*en vue de l'obtention*

DU TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR

en

**GENIE CHIMIQUE**

PHYSICO-CHIMIE ET ENERGETIQUE DES TRANSFORMATIONS DES MATIERES  
PREMIERES

=====

**MESURE DE LA TOXICITE DE POLLUANTS PAR BIOCAPTEUR.**

**REALISATION D'UNE ELECTRODE A BUTYRYLCHOLINESTERASE.**

**AUTOMATISATION DE LA DETECTION DE PESTICIDES.**

=====

*Soutenue le 29 Juin 1987, devant le jury composé de*

M.	M. PORTHAULT	Président.
M.	M. MASCINI	
Mme.	C. TIRET	Examineurs.
MM.	M. DUPONT	
	C. TRAN-MINH	



# THESE

*présentée à*

L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE PARIS

*par*

**Hayat EL YAMANI**  
***Ingénieur E.S.C.I.L.***

*en vue de l'obtention*

DU TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR

en

**GENIE CHIMIQUE**  
PHYSICO-CHIMIE ET ENERGETIQUE DES TRANSFORMATIONS DES MATIERES  
PREMIERES

=====

**MESURE DE LA TOXICITE DE POLLUANTS PAR BIOCAPTEUR.**  
**REALISATION D'UNE ELECTRODE A BUTYRYLCHOLINESTERASE.**  
**AUTOMATISATION DE LA DETECTION DE PESTICIDES.**

=====

*Soutenue le 29 Juin 1987, devant le jury composé de*

M.	M. PORTHAULT	Président.
M.	M. MASCINI	
Mme.	C. TIRET	Examineurs.
MM.	M. DUPONT	
	C. TRAN-MINH	





## REMERCIEMENTS

Le travail exposé dans cette thèse a été effectué au Laboratoire "Biotechnologies-Enzymes" de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. Je tiens à remercier ici Monsieur Canh Tran-Minh, Maître de Recherches dans ce laboratoire, pour m'avoir offert l'opportunité de l'effectuer, ainsi que Monsieur Renon, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris, pour avoir accepté d'en être le Responsable de Formation.

Mes remerciements vont aussi à:

- Monsieur Maurice Porthault, Professeur à l'Université Claude Bernard de Lyon, pour avoir accepté de porter un jugement sur ce travail en tant que Rapporteur et que Président de Jury.

- Monsieur Marco Mascini, Professeur à l'Université de Rome, pour avoir bien voulu faire partie des membres du Jury, malgré le déplacement conséquent que cela impliquait.

- Madame Colette Tiret, Ingénieur au Centre d'Etudes du Bouchet, pour avoir aussi aimablement et rapidement accepté de remplacer dans ce Jury, Monsieur Cunin, appelé à d'autres fonctions.

- Monsieur Marc Dupont, Ingénieur à la Compagnie Générale des Eaux, et ce à deux titres: merci pour sa collaboration personnelle à ce travail pendant trois ans, merci pour avoir accepté de faire partie du Jury, merci aussi à travers lui à la Compagnie Générale des Eaux pour avoir, par son financement, permis que ce travail puisse être réalisé.

Je ne saurais oublier non plus que ce travail a souvent été le fruit d'une réflexion à deux: merci à Monsieur Malik A. Abdul d'avoir su "relancer la machine", quand il me semblait à moi-même qu'elle s'était arrêtée.

Merci aussi à :

- Danielle Chavanne pour avoir assuré ce que nous avons ensemble appelé " Les urgences de fin de thèse".

- Marie-Claude Mathais, pour avoir accepté d'inaugurer, avec cette thèse, la frappe au traitement de texte. Je suis la mieux placée pour savoir que ce n'était pas toujours facile.

- Marie-Claude Bartholin pour son efficacité tout à fait remarquable quand il s'agit de vous aider à respecter vos délais.

- Jean-Pierre Bigot pour sa disponibilité à toute épreuve.

A François, Jean-Marie, Pascal, Laurent, Pierre, Muriel, bonne fin de thèse...

Aux permanents de l'équipe Génie Electrochimique et Biotechnologies, merci pour leur accueil et bonne continuation.



# PLAN.

## INTRODUCTION.

### CHAPITRE 1: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.

#### A - IMMOBILISATION DES ENZYMES

##### A - I - TECHNIQUES D'IMMOBILISATION

###### A-I-1 - Adsorption

###### A-I-2 - Fixation sur échangeur d'ions

###### A-I-3 - Inclusion dans un gel

###### A-I-4 - Réticulation et co-réticulation

##### A - II - CAPTEURS ASSOCIES AUX ENZYMES IMMOBILISEES

##### A - III - ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES FIXEES

#### B - CINETIQUE ENZYMATIQUE

##### B-I - EQUATIONS DE DIFFUSION

##### B-II - EQUATIONS DE REACTION

###### B-II -1 - En l'absence d'inhibiteur

###### B-II -2 - En présence d'inhibiteurs

#### C - LES CHOLINESTERASES

##### C-I - LOCALISATION ET ACTION PHYSIOLOGIQUE

##### C-II - LA BUTYRYLCHOLINESTERASE

##### C-III - LES INHIBITEURS DES CHOLINESTERASES

### CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES.

## **A - PRODUITS**

### **B - APPAREILLAGES**

**B-I - PH-METRES**

**B-II - ELECTRODES ENZYMATIQUES**

**B-III - PH-METRE-TITRIMETRE**

**B-IV - SPECTROPHOTOMETRE**

**B-V - CONDUCTIMETRE**

### **C - METHODES**

**C-I- METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE OU METHODE D'ELLMAN**

**C-II- PREPARATION DES MEMBRANES ENZYMATIQUES**

**C-II-1- Méthode classique**

**C-II-2 - Fabrication de membranes enzymatiques armées**

**C-II-3- Utilisation de l'électrode enzymatique**

## **CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION.**

### **A - CONDITIONS OPTIMALES DE FABRICATION ET D'UTILISATION DE L'ELECTRODE A BUCHE**

**A-I - REPONSE DE L'ELECTRODE A SON SUBSTRAT**

**A-II - INFLUENCE DES PARAMETRES ENTRANT DANS LA FABRICATION DE LA MEMBRANE**

**A-II-1- Concentration en agent réticulant**

**A-II-2 - Concentration de l'enzyme entrant dans la fabrication de la membrane**

**A-II-3- Immobilisation de l'enzyme en présence de son substrat**

**A-III- INFLUENCES DES CONDITIONS DE TRAVAIL**

**A-III-1 - Influence du pH**

**A-III-2 - Influence de la "force tampon"**

#### **A-IV - CONCLUSION**

### **B - CONSERVATION DES MEMBRANES ENZYMATIQUES**

#### **B-I - CONSERVATION EN MILIEU AQUEUX**

##### **B-I-1 - Mode de conservation**

##### **B-I-2 - Résultats**

#### **B-II - STOCKAGE A SEC**

### **C - ELECTRODE A BUCHE POUR LA DETECTION DES INHIBITEURS**

#### **C-I - PRELIMINAIRES**

#### **C-II - REPOSE DE L'ELECTRODE ENZYMATIQUE EN PRESENCE DE PARAOXON**

##### **C-II-1 - Inhibition de l'enzyme en l'absence de substrat**

##### **C-II-2 - Inhibition en présence de substrat**

### **D - ACTIVITE ENZYMATIQUE EN PRESENCE DE SOLVANTS ORGANIQUES**

#### **D-I - INFLUENCE D'ALCOOLS SUR LE COMPORTEMENT CATALYTIQUE DE LA BUCHE, EN MILIEU HOMOGENE**

##### **D-I-1- Mode opératoire**

##### **D-I-2 - Influence de l'éthanol**

##### **D-I-3 - Influence du méthanol**

#### **D-II - INFLUENCE DE L'ETHANOL ET DU METHANOL SUR L'ELECTRODE A BUCHE - DETECTION D'INHIBITEURS EN MILIEU HYDRO-ALCOOLIQUE**

##### **D-II-1 - Impact de l'éthanol et détection de thiram**

##### **D-II-2 - Impact du méthanol et détection d'ethion**

### **E-INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE**

#### **E-I- INFLUENCES CINETIQUES DE NaCl SUR LA BUCHE EN MILIEU HOMOGENE**

##### **E-I-1 - Mode opératoire**

##### **E-I-2 - Résultats**

##### **E-I-3-Modèle proposé rendant compte des effets de sels**

#### **E-II - EFFETS DE SELS EN PHASE HETEROGENE - REVERSIBILITE**

**E-II-1 - Conditions opératoires**

**E-II-2 - Résultats**

## **F - REGENERATION DE LA CHOLINESTERASE INHIBEE**

**F-I - MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE**

**F-II - CINETIQUE DE LA REACTION PAM<sub>2</sub> - PARAOXON**

**F-II-1 - Mode opératoire**

**F-II-2 - Résultats**

**F-III - CINETIQUE DE LA REACTION H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - PARAOXON**

**F-III-1 - Mode opératoire**

**F-III-2 - Résultats**

**F-IV - REGENERATION DE MEMBRANES A BUCHE INHIBEES PAR LA PAM<sub>2</sub>**

**F-IV-1 - Mode opératoire**

**F-IV-2 - Résultats**

**F-V - REGENERATION DE MEMBRANES A BUCHE INHIBEES PAR TRAITEMENT A L'EAU OXYGENEE**

**F-V-1 - Action de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la BuChE**

**F-V-2 - Régénération de membranes inhibées par traitement à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

## **CHAPITRE 4: AUTOMATISATION.**

**INTRODUCTION**

**I- CHOIX DU MODE D'AUTOMATISATION**

**II- MATERIEL**

**II-1- Gestion des séquences programmées**

**II-2- Circuit hydraulique**

**III- SEQUENCES PROGRAMMEES**

**III-1- Préliminaire: Détermination de l'état stationnaire**

**III-2- Protocole des opérations**

**IV RESULTATS**

**IV-1- Autonomie de l'ensemble**

**IV2- Durée de vie d'une membrane**

**IV-3- Adaptabilité de l'ensemble**

**IV-4- Spectre d'action**

**IV-5- Limites**

**V- CONCLUSION**

## **CHAPITRE 5: MODELISATION.**

**I-PRELIMINAIRES: DETERMINATION DES COEFFICIENTS DE DIFFUSION.**

**II -EQUATIONS**

**III - RESOLUTION DES EQUATIONS**

**IV- RESULTATS ET DISCUSSION**

**CONCLUSION.**





## ABREVIATIONS.

BuChE.	pour	Butyrylcholinestérase.
BuChI		Butyrylcholine iodure.
BuChCl		Butyrylcholine chlorure.
BuSChCl		Butyryl-thio-choline chlorure.
EtOH		Ethanol.
MeOH		Méthanol.
D.T.N.B.		Di-thio-di-nitro benzène.
PAR		Paraoxon.
PAM <sub>2</sub>		Méthyl pyridine aldoxime 2.



# INTRODUCTION



Si les "Biotechnologies" sont autant un secteur d'avenir, c'est qu'elles sont le point de rencontre de technologies de pointe, et de sciences étudiant et utilisant des molécules ou des complexes biologiques hautement spécifiques. En effectuant le présent travail, l'impression d'être à un point de jonction biochimique, chimique, et informatique a toujours prévalu. Il reste à souhaiter qu'elle sera partagée à la lecture de ce manuscrit.

Notre propos se situe dans *un cadre analytique*, et porte plus particulièrement sur la *butyrylcholinestérase*, *enzyme* conditionnant le passage de l'influx nerveux, et dont le fonctionnement est *inhibé* par des pesticides, insecticides de synthèse, ou par des gaz de combat. Cette propriété, alliée à la possibilité d'*immobilisation* de la butyrylcholinestérase, est utilisée ici pour la mise au point d'*une électrode enzymatique pour la détection et le dosage de pesticides et insecticides*. Cette méthode présente l'avantage par rapport à d'autres de doser ces polluants selon leur degré de toxicité physiologique.

Divers travaux entrepris dans notre laboratoire ont porté sur le comportement de la cholinestérase immobilisée, en présence de ses *effecteurs: inhibiteurs et activateurs*; le présent travail avait pour but de les compléter, et de mettre au point *une méthode totalement automatisée* de dosage de pesticides, susceptible de fonctionner de façon fiable, et de détecter la présence de ces polluants à l'échelle des ppb.

La présentation de ce travail a été divisée en cinq chapitres.

Des **rappels bibliographiques** permettront dans un premier temps de situer le cadre de l'étude; ils seront suivis de la description du **matériel et des méthodes** utilisés.

L'exposé des **résultats** obtenus mettra en valeur essentiellement:

- La mise au point de l'électrode à butyrylcholinestérase.
- Les conditions optimales d'utilisation de cette électrode, en vue d'obtenir les seuils de détection les plus bas.
- Le comportement de l'enzyme elle-même, puis de l'électrode en présence d'alcools. L'étude de ce comportement nous permettra de cerner les conditions dans lesquelles la détection de pesticides insolubles dans l'eau peut être opérée.
- L'étude d'interférences dues aux sels d'halogénures.
- La possibilité de régénérer l'activité de l'enzyme inhibée, par des méthodes classiques, puis par un traitement original à l'eau oxygénée.

Ensuite, c'est le matériel utilisé pour la mise au point d'un **système automatisé** de détection de pesticides qui sera décrit, ainsi que son fonctionnement.

Une **modélisation** de la membrane enzymatique nous permettra, dans un dernier chapitre, d'évaluer l'importance de la concentration en substrat de travail, pour la détection des faibles teneurs en inhibiteurs.



# CHAPITRE I

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES





## A - IMMOBILISATION DES ENZYMES

L'utilisation croissante des enzymes en phase immobilisée plutôt qu'en phase homogène fait suite à deux constatations:

- Utiliser les enzymes *in vitro* en phase homogène ne semblait pas rendre parfaitement compte de leur comportement *in vivo*; les immobiliser permet de se rapprocher des conditions naturelles puisque dans la cellule, les enzymes sont souvent associées aux membranes biologiques [1].

- En phase homogène, leur récupération après utilisation était trop délicate (chromatographie d'affinité) pour pouvoir être systématiquement envisagée. En phase hétérogène, leur pouvoir catalytique peut être utilisé de nombreuses fois, ce qui les rapproche des catalyseurs chimiques classiques.

### A - I - TECHNIQUES D'IMMOBILISATION [2]

**A-I-1 - Adsorption :** L'enzyme est adsorbée sur un support dans des conditions de pH, température, et force ionique précises. Parmi les supports courants, on peut citer le charbon actif, la cellulose, le verre. La désorption, qui s'opère dès que les conditions opératoires varient, est le principal inconvénient de cette méthode [3].

**A-I-2 - Fixation sur échangeur d'ions:** Des liaisons électrostatiques entre les enzymes, qui sont des polyélectrolytes, et des échangeurs d'ions sont possibles. Parmi ces échangeurs d'ions, il existe:

- des échangeurs cationiques : CM-cellulose, phosphate cellulose
- des échangeurs anioniques : D.E.A.E cellulose, Dowex 2.

Comme pour l'adsorption, cette méthode a l'inconvénient d'être réversible.

**A-I-3 -Inclusion dans un gel:** Les enzymes sont dans ce cas prises physiquement dans un gel, qui d'une part assure la rétention de l'enzyme, d'autre part permet la diffusion du substrat dans la maille [4]. Entre autres exemples, gel de polyacrylamide et Sephadex sont couramment utilisés.

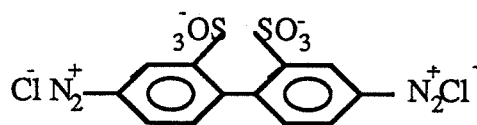
### A-I-4 - Réticulation et co-réticulation :

Nous nous étendrons plus sur cette méthode que nous avons exclusivement utilisée.

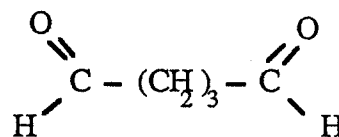
Des réactifs bi-fonctionnels, tels le glutaraldéhyde ou l'acide bis-diazobenzidine 2-2'-sulfonique, permettent l'établissement de liaisons covalentes inter-



moléculaires avec les molécules enzymatiques, ce qui aboutit à des composés polymériques de haut poids moléculaires, insolubles dans l'eau.



Acide bis diazobenzidine-2-2' disulfonique.



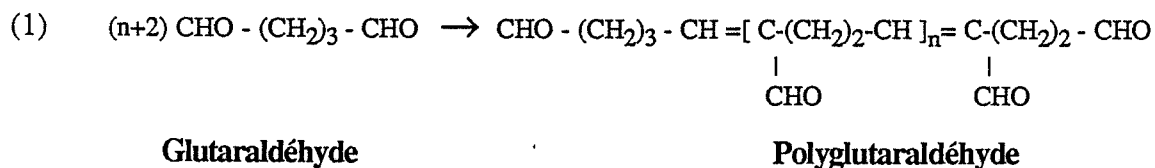
Glutaraldéhyde.

Exemples d'agents pontants.

Mécanisme d'addition du glutaraldéhyde [5-9] :

a- Formation du polyglutaraldéhyde :

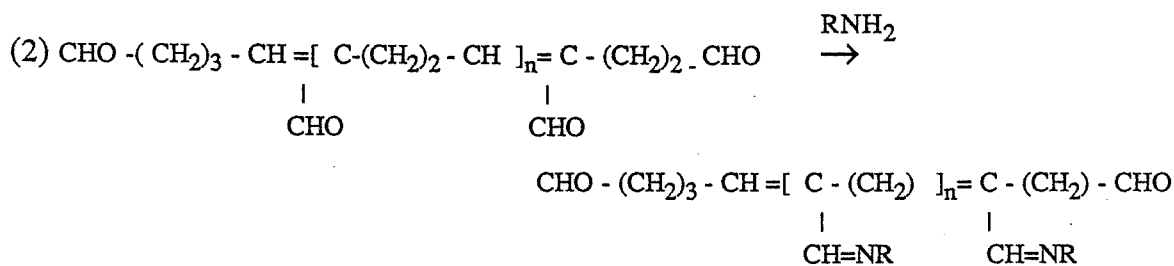
A pH basique [9-11], se forme un polymère intermoléculaire par condensation aldolique selon l'équation (1):



Les fonctions aldéhydes de ce produit sont conjuguées avec des liaisons éthyléniques, ce qui lui confère sa stabilité.

b- Réaction entre le polyglutaraldéhyde et l'enzyme :

Les fonctions amines primaires de l'enzyme réagissent avec les fonctions aldéhydes du polymère (schéma réactionnel (2)), pour former des liaisons imines, toujours conjuguées avec des liaisons éthyléniques, donc très stables.





Il est fréquent d'utiliser une protéine de charge, comme l'albumine, en co-réticulation avec l'enzyme utilisée. Le gel alors obtenu est insoluble dans l'eau, et l'enzyme irréversiblement fixée [9].

Cette même méthode est utilisée pour greffer une enzyme sur un support solide activé [12].

### **A - II - CAPTEURS ASSOCIES AUX ENZYMES IMMOBILISEES**

Pour de nombreux besoins analytiques, les membranes à enzymes immobilisées sont étroitement associées à des capteurs, qui assurent le dosage d'un substrat consommé ou d'un produit généré par la réaction enzymatique.

Exemples :

- Electrodes potentiométriques [13-15]
- Electrodes ampérométriques [16-17]
- Electrodes polarographiques [18]
- Détecteurs à cristaux piézoélectriques [19]
- Transistors à effet de champ [20-22] ; ces derniers connaissent un essor très important ces toutes dernières années, pour la rapidité de leur réponse, et leur petite taille.

Une bonne synthèse de ces différents bio-capteurs a été faite par Lowe [23].

### **A - III - ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES FIXEES :**

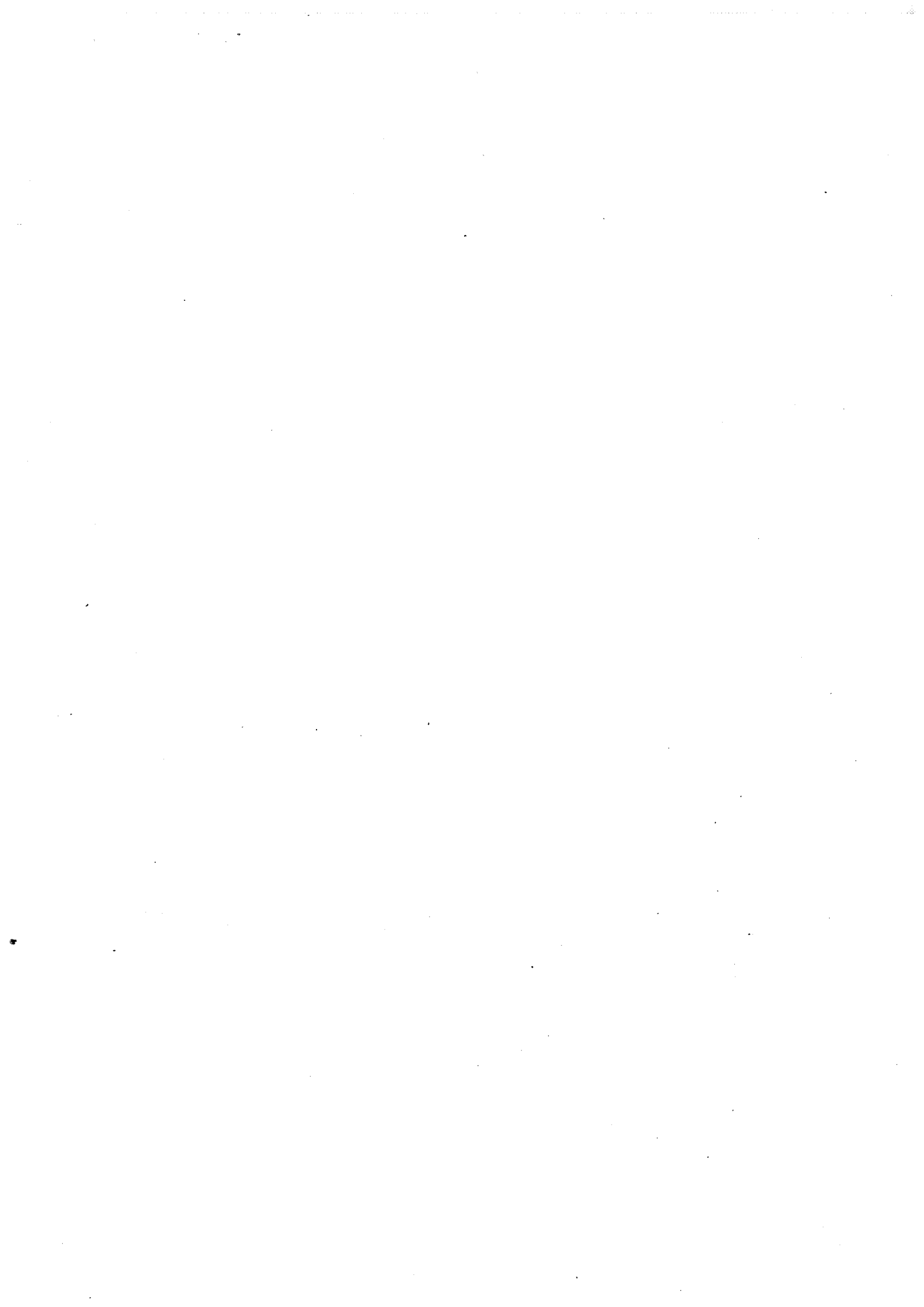
De toutes les expériences décrites dans la littérature, il ressort une constatation unanime : la baisse d'activité catalytique de l'enzyme après son immobilisation .

Ce phénomène est généralement attribué:

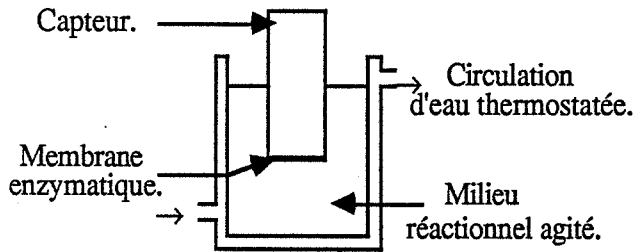
- aux modifications du site actif de l'enzyme.
- aux effets stériques ( sites actifs moins accessibles au substrat )
- aux changements de conformation de la molécule imposés par l'immobilisation.

La modification notable du pH optimum de fonctionnement de l'enzyme est également citée .

### **B - CINETIQUE ENZYMATIQUE :**

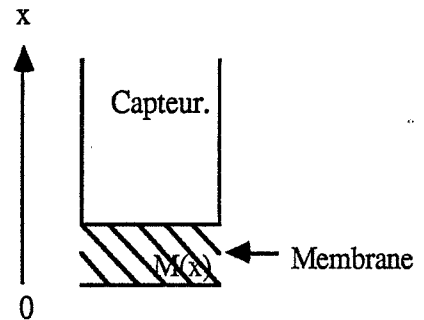


Soit un capteur associé à une membrane enzymatique, plongé dans un milieu réactionnel, comme schématisé Figures 1a-1b:



**Figure 1a:**

**Dispositif d'étude du capteur enzymatique.**



**Figure 1b:**

**Schématisation de la membrane.**

Les cinétiques de consommation du substrat (S) et d'apparition du produit (P) seront gouvernées par les équations de diffusion-réaction (3).

$$(3) \quad \begin{cases} \frac{d[S]}{dt} = \left(\frac{d[S]}{dt}\right)_{\text{Diffusion}} - \left(\frac{d[S]}{dt}\right)_{\text{Réaction}} \\ \frac{d[P]}{dt} = \left(\frac{d[P]}{dt}\right)_{\text{Diffusion}} + \left(\frac{d[P]}{dt}\right)_{\text{Réaction}} \end{cases}$$

#### **B-I - EQUATIONS DE DIFFUSION :**

Elles sont régies par la seconde loi de FICK:

$$(4) \quad \begin{cases} \left(\frac{d[S]}{dt}\right)_{\text{Diffusion}} = D_S \frac{d^2[S]}{dx^2} \\ \left(\frac{d[P]}{dt}\right)_{\text{Diffusion}} = D_P \frac{d^2[P]}{dx^2} \end{cases}$$

Le flux de diffusion à travers la membrane dépend essentiellement :

- de la nature de la membrane et de son épaisseur ;
- de la taille des molécules qui diffusent à travers celles-ci ;
- de l'agitation du milieu réactionnel.

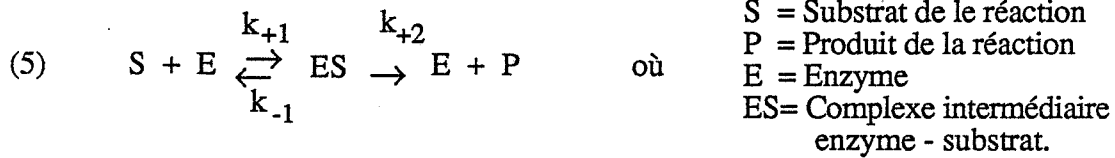




**B-II - EQUATIONS DE REACTION :**

**B-II -1 - En l'absence d'inhibiteur :**

La cinétique d'une réaction enzymatique est gouvernée par l'équation de MICHAELIS-MENTEN [24] (1913) qui suppose la formation d'un complexe enzyme substrat intermédiaire comme le montre le schéma réactionnel (5):



L'hypothèse de l'état stationnaire:  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$  généralement admise, conduit à l'équation (6):

$$(6) \quad v = - \frac{d[S]}{dt} = + \frac{d[P]}{dt} = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

avec: 
$$\begin{cases} V_m = k_{+2} \cdot [E]_0 & = \text{vitesse maximale de la réaction.} \\ K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} & = \text{constante de Michaelis = concentration pour laquelle } v = \frac{V_m}{2}. \end{cases}$$

L'ordre de la réaction ainsi définie dépend du rapport  $[S]/K_m$  :

$$\begin{cases} \text{Si } \frac{[S]}{K_m} < 1, & v \approx V_m \cdot \frac{[S]}{K_m} & \text{cinétique d'ordre 1 par rapport à S.} \\ \text{Si } \frac{[S]}{K_m} > 1, & v \approx V_m & \text{cinétique d'ordre 0 par rapport à S.} \end{cases}$$

Outre l'effet de la concentration  $[S]$ , la vitesse de la réaction (2) dépend de :

- La quantité initiale d'enzyme ( $V_m = k_2 \cdot [E]_0$ ).
- La température.
- Le pH.

Type d'inhibiteur	Mode d'action	Vitesse de la réaction enzymatique
Compétitif ou de type K	$S + E \xrightleftharpoons{K_S} ES \rightarrow E + P$ $+ \quad \quad \quad +$ $I \quad \quad \quad I$ $\downarrow \uparrow K_I \quad \downarrow \uparrow K_I$ $EI$ <p>Inhibiteur et substrat se lient au même site actif.</p> $K_I = [E] \cdot [I] / [EI], \quad K_S = [E] \cdot [S] / [ES]$	<p>On pose: <math>r = 1 + \frac{[I]}{K_I}</math></p> $v = V_m \frac{[S]}{r \cdot K_m + [S]} = V_m \frac{[S]}{K'_m + [S]}$ <p>L'expression de la vitesse est du même type que celle de la réaction sans inhibiteur en posant <math>K'_m = r \cdot K_m</math>.</p>
Non-Compétitif ou de type V	$S + E \xrightleftharpoons{K_S} ES \rightarrow E + P$ $+ \quad \quad \quad +$ $I \quad \quad \quad I$ $\downarrow \uparrow K_I \quad K_S \quad \downarrow \uparrow K'_I$ $S + EI \rightleftharpoons ESI$ <p>On suppose <math>K_I = K'_I</math>; l'inhibiteur se fixe sur un autre site que le site actif.</p> $K_I = [ES] \cdot [I] / [ESI] = [E] \cdot [I] / [EI]$	<p>Avec <math>r = 1 + \frac{[I]}{K_I}</math></p> $v = \frac{V_m}{r} \frac{[S]}{K_m + [S]} = V'_m \frac{[S]}{K_m + [S]}$ <p>L'expression de la vitesse est du même type que celle de la réaction sans inhibiteur en posant <math>V'_m = V_m / r</math>.</p>
Anti-Compétitif ou de type K, V	$S + E \xrightleftharpoons{K_S} ES \rightarrow E + P$ $+ \quad \quad \quad +$ $I \quad \quad \quad I$ $\downarrow \uparrow K_I \quad \quad \quad \cdot$ $ESI$ <p>L'inhibiteur se fixe sur le complexe enzyme-substrat.</p> $K_I = [ES] \cdot [I] / [ESI]$	<p>Avec <math>r = 1 + \frac{[I]}{K_I}</math></p> $v = \frac{V_m}{r} \frac{[S]}{K_m / r + [S]} = V'_m \frac{[S]}{K'_m + [S]}$ <p>L'expression de la vitesse est du même type que celle de la réaction sans inhibiteur en posant <math>V'_m = V_m / r</math> et <math>K'_m = K_m / r</math></p>

Tableau I: Mode d'action des trois types d'inhibiteurs classiques de systèmes enzymatiques.

- La force ionique.

La représentation de LINEWEAVER-BURK, qui consiste à tracer  $1/V = F(1/[S])$ , permet de déterminer graphiquement  $K_m$  et  $V_m$  ; cette représentation est décrite en ANNEXE I.

### B-II-2 - En présence d'inhibiteurs [25-26]

a- Définition : Est appelé inhibiteur tout produit qui par son action diminue la vitesse de la réaction enzymatique en phase homogène.

Il est dit réversible si après son élimination du milieu (par dialyse ou autre), l'enzyme retrouve sa capacité catalytique initiale, irréversible dans le cas contraire.

b- Mode d'action : On distingue en général trois familles d'inhibiteurs :

- Les compétitifs ;
- Les non compétitifs ;
- Les anti compétitifs.

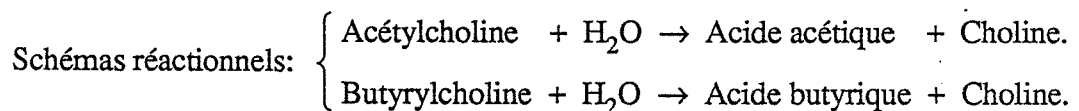
Le tableau I résume leur mode d'association avec l'enzyme, et leur influence sur la vitesse de la réaction enzymatique.

## C - LES CHOLINESTERASES

Elles font partie des estérases, et se décomposent elles-mêmes en deux groupes (MENDEL et col. [27-28]) :

- Acétylcholinestérase (AChE) ou "cholinestérase vraie" EC 3.1.1.7.
- Butyrylcholinestérase (BuChE) ou "pseudo-cholinestérase" EC 3.1.18.

L'AChE et la BuChE ont comme substrats respectifs l'acétylcholine, et la butyrylcholine; l'hydrolyse de ces substrats se fait suivant les schémas réactionnels simplifiés suivants:



### C-I - LOCALISATION ET ACTION PHYSIOLOGIQUE :

L'AChE est prédominante dans les tissus nerveux des vertébrés et invertébrés, où elle assure une fonction capitale au niveau de la transmission de l'influx nerveux. L'acétylcholine, neurotransmetteur responsable de la dépolarisation de la membrane synaptique permet la propagation électrique de l'influx nerveux. L'AChE hydrolyse rapidement l'acétylcholine, ce qui libère les récepteurs, et permet l'accès à un nouveau flux d'acétylcholine.



Une inhibition de l'AChE se traduit par une accumulation d'acétylcholine au niveau des muscles et du système nerveux central et végétatif, suivie de mort par paralysie [29-30].

La BuChE prédomine dans le plasma sanguin de plusieurs espèces animales, et se trouve à moindre concentration dans le foie, le pancréas, la muqueuse intestinale, et le système nerveux central. Son rôle physiologique exact est moins bien cerné que celui de l'AChE. Outre la butyrylcholine, elle catalyse aussi l'hydrolyse des esters de morphine, cocaïne, atropine.

## C-II - LA BUTYRYLCHOLINESTERASE

Nous avons utilisé exclusivement la BuChE après avoir constaté que le phénomène d'autolyse dans l'eau était beaucoup plus faible avec la butyrylcholine que l'acétylcholine. Tout ce qui suit concerne la BuChE.

C'est une enzyme stable, de poids moléculaire  $(4,4 \pm 0,4) 10^5$  Dalton. LEE et Coll [31] ont mis en évidence sa structure tétramérique, avec quatre sous-unités de tailles égales. Sa composition en acides aminés est connue [32].

Sa structure quaternaire reste inchangée en présence de sels, jusqu'à 2,5M NaCl ; au-delà, la molécule se dissocie en sous unités inactives [31].

La cinétique d'hydrolyse de la butyrylcholine par la BuChE ne suit l'équation de Michaelis-Menten que pour une gamme limitée de concentrations. Le modèle de vitesse de réaction le plus satisfaisant [33-34] fait intervenir un terme du second ordre en [S], comme le montre l'équation (7) :

$$(7) \quad v = \frac{V_1 \cdot [S] + V_2 \cdot [S]^2}{1 + K_1 \cdot [S] + K_2 \cdot [S]^2}$$

Cette équation correspond à une seule enzyme comportant deux sites qui participent à la réaction catalytique :

- un site anionique responsable de la liaison enzyme-substrat , par reconnaissance et attraction du substrat cationique [35] ;
- un site estérasique proprement dit, essentiellement constitué d'un résidu serine [36-37].

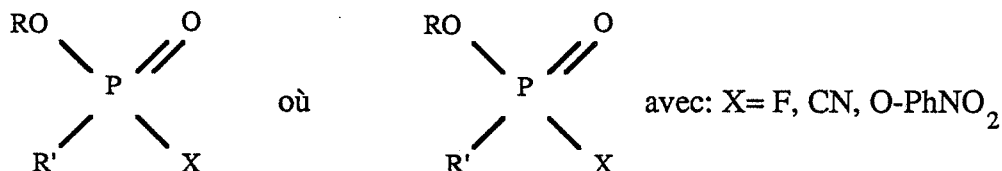
Cependant, en première approximation, et pour les faibles concentrations en substrat, c'est l'équation de Michaelis-Menten qui sera utilisée.

Hydrolyse d'un ester par la ChE	Action d'un organophosphoré sur la ChE
<p>1a)</p> $  \begin{array}{c}  \text{R}-\text{C}-\text{OR}' + \text{E}-\text{H} \\  \parallel \\  \text{O} \\  \Downarrow \text{K}_s \\  \text{R}-\text{C}-\text{E} + \text{HO}-\text{R}' \\  \parallel \\  \text{O}  \end{array}  $ <p><u>Formation du complexe enzyme-substrat</u></p>	<p>2a)</p> $  \begin{array}{c}  \text{RO} \quad \text{O} \\  \diagdown \quad \parallel \\  \text{P} \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{R}' \quad \text{X}  \end{array}  + \text{E}-\text{H}  $ $  \begin{array}{c}  \text{RO} \quad \text{O} \\  \diagdown \quad \parallel \\  \text{P} \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{R}' \quad \text{E}  \end{array}  + \text{X}-\text{H}  $ <p style="text-align: center;"><math>\downarrow \uparrow \text{K}_I</math></p> <p><u>Formation du complexe enzyme-inhibiteur</u></p>
<p>1b)</p> $  \text{R}-\text{C}-\text{E} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{R}-\text{C}-\text{OH} + \text{E}-\text{H}  $ <p style="text-align: center;"><math>\parallel</math> O</p>	<p>2b)</p> $  \begin{array}{c}  \text{RO} \quad \text{O} \\  \diagdown \quad \parallel \\  \text{P} \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{R}' \quad \text{E}  \end{array}  \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}}  \begin{array}{c}  \text{RO} \quad \text{O} \\  \diagdown \quad \parallel \\  \text{P} \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{R}' \quad \text{OH}  \end{array}  + \text{E}-\text{H}  $ <p style="text-align: center;"><math>\dashrightarrow</math></p> <p><u>Hydrolyse des complexes et libération de l'enzyme.</u></p>

**Tableau II: Parallèle entre les réactions ester-ChE et organophosphoré-ChE.**

### C-III - LES INHIBITEURS DES CHOLINESTERASES

Ils sont de deux familles : les organophosphorés et les carbamates, dérivés de l'acide carbamique. Dans les études sur les inhibiteurs, ils sont souvent classés à part, en raison de leur toxicité particulière. Nous nous attarderons plus ici sur le mode d'action des organophosphorés, les carbamates agissent de la même façon, mais sont plus réversibles [38-41].



#### Formules générales des Organophosphorés.

Ce sont des inhibiteurs très forts, spécifiques des estérases, et en particulier des cholinestérases [42-45]; ils sont souvent nommés "nerve gases" à cause de leur toxicité pour le système nerveux (paragraphe C-I). Leurs propriétés sont utilisées pour atteindre les insectes (insecticides-pesticides) ou même les hommes (gaz de combat).

Le Tableau II fait un parallèle entre la réaction enzyme-substrat, et la réaction enzyme-organophosphoré, qui permet de montrer que l'inhibition est de type compétitif, organophosphorés et substrat réagissant de la même façon et sur le même site actif de l'enzyme [46-48]. La toxicité particulière des organophosphorés réside dans le fait que l'enzyme phosphorylée formée en 2a) est un composé stable, qui ne s'hydrolyse 2b) qu'à des taux négligeables pour les inhibiteurs les plus virulents. Le site actif de l'enzyme reste bloqué définitivement, ce qui le rend inaccessible à toute molécule de substrat (inhibition compétitive) [49-52].

Cette irréversibilité peut cependant être levée grâce à des traitements avec certains oximes et des acides hydroxamiques [53-54]. Ce phénomène sera appelé par la suite "régénération de l'enzyme".





## CHAPITRE II

### MATERIEL ET METHODES



## A - PRODUITS

### Enzyme et protéine:

- Butyrylcholinestérase : Sigma, poudre lyophilisée extraite de sérum de cheval, à 13 U / mg de solide (Lot n° 100 F-7030). Par définition, une unité (1U) hydrolyse un  $\mu$ mole de butyrylcholine en choline et butyrate par minute, à pH 8 et 37°C.

- Albumine : Centre de transfusion sanguine de Lyon, à 20 g/100 ml .

### Substrats :

- Butyrylcholine iodure.	Merck	P.M. = 303,0 g.
- Butyrylcholine chlorure	Merck	P.M. = 212,5 g.
- Butyrylthiocholine iodure	Merck	P.M. = 319,0 g.

### Inhibiteurs:

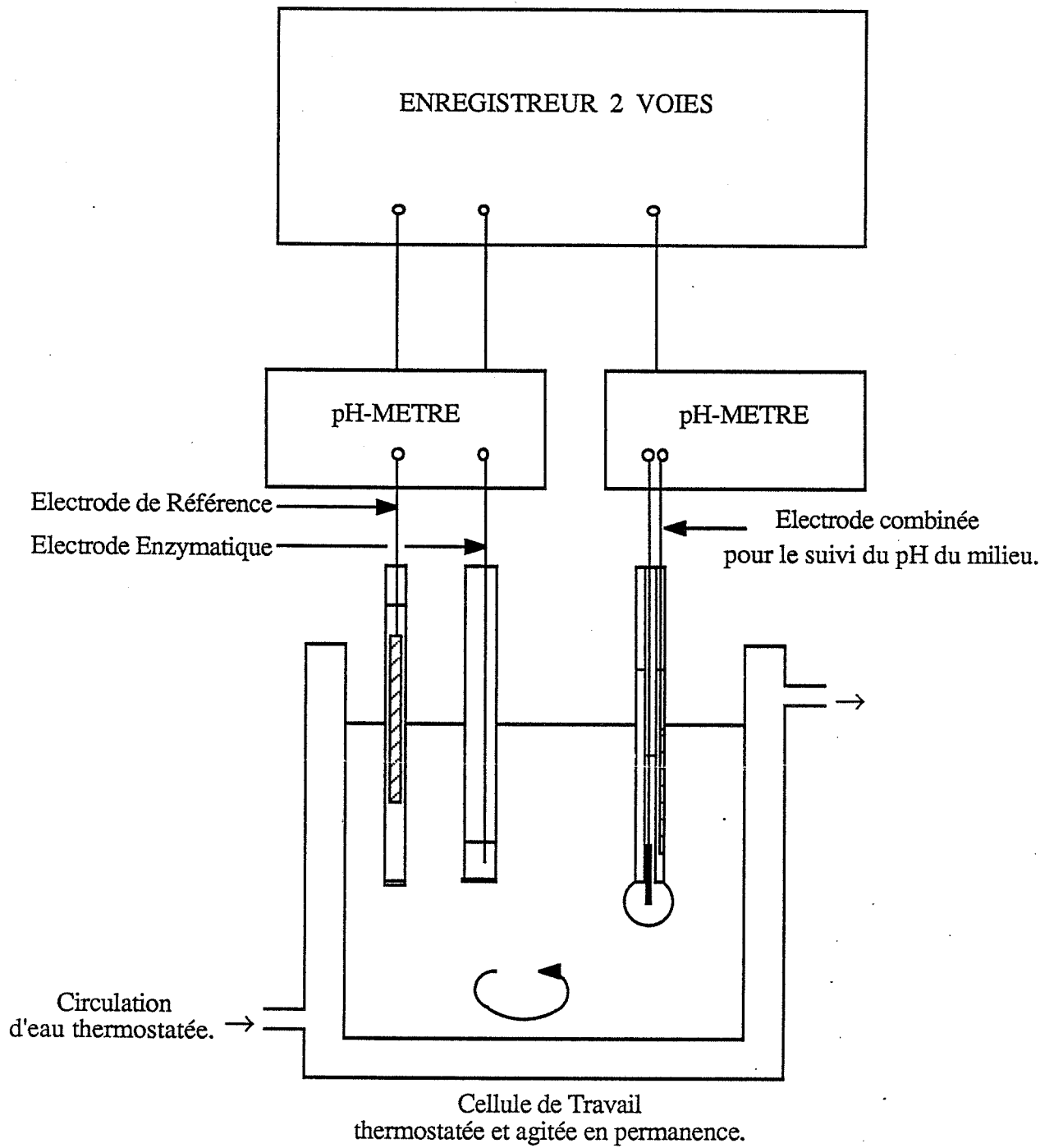
- Paraoxon	Riedel de Haen	P.M.=275,2 g .
- Parathion éthyl	Riedel de Haen	P.M. = 291,27 g.
- Parathion méthyl	Riedel de Haen	P.M. = 263,2 g.
- Fenitrothion	Riedel de Haen	P.M. = 277,24 g.
- Malathion	Riedel de Haen	P.M. = 330,36 g.

### Régénérateurs:

- Pyridine 2 Aldoxime (PAM <sub>2</sub> )	Sigma	P.M. = 264,1 g
- (TMB <sub>4</sub> )	Sigma	P.M. = 446,2 g.

### Autres réactifs :

- Tampon phosphate, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,12H <sub>2</sub> O	Prolabo	P.M. = 358,1 g.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	Prolabo	P.M. = 156,0g.
- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Prolabo	P.M. = 34 g.
- Glutaraldéhyde : 25 % dans l'eau	Sigma	P.M. = 100,12 g.
- Para-nitrophénol :	Sigma	P.M. = 139,11 g.
- D.T.N.B.	Fluka	P.M. = 396,36 g.



**Figure 1: Dispositif utilisé pour le suivi d'une réaction enzymatique.**

- Sels : NaCl, NaBr, KI, NaF                      Prolabo
- Alcools: Ethanol, Methanol                      Prolabo

## **B - APPAREILLAGES**

### **B-I - PH-METRES :**

Le dispositif associé aux électrodes à BuChE utilisé pour les mesures de pH est schématisé Figure-1. Il comprend :

- 2 pH-mètres Radiometer : pH M-64, Research pH meter.
- 1 enregistreur 2 voies : Sefram.
- 1 électrode de pH combinée pour le suivi du pH de la solution de travail, Radiometer GK 2401C, reliée à un des pH-mètres.
- L'électrode enzymatique elle-même (voir B-II) associée à une électrode de référence à KCl saturé, Radiometer 4K01, reliées au deuxième pH-mètre.
- Une cellule thermostatée et agitée (agitateur Tacussel).

### **B-II - ELECTRODES ENZYMATIQUES**

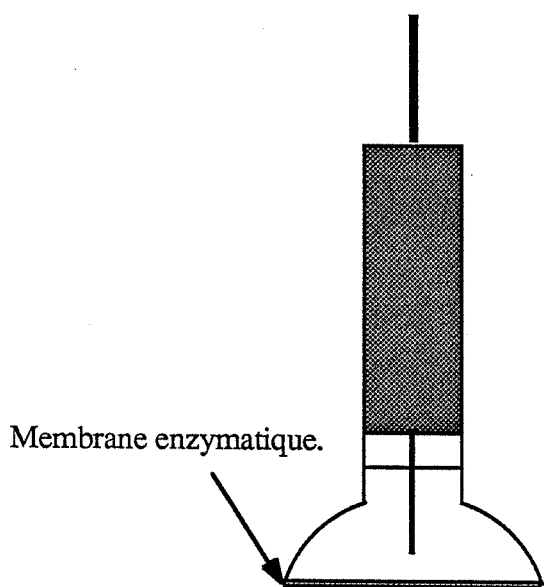
Deux types d'électrodes ont été utilisés :

- Une électrode de verre Radiometer (G242C) à fond plat, schématisée Figure 2a. La membrane enzymatique est alors réticulée directement au contact du verre, sur le fond plat (Figure 2b).
- Une électrode Radiometer E5036-0 à pCO<sub>2</sub>, choisie pour sa conformation, schématisée Figure 3. La membrane enzymatique est alors fabriquée séparément, mise au contact avec la partie sensible de l'électrode, et retenue grâce à une bague en téflon (Figure 3).

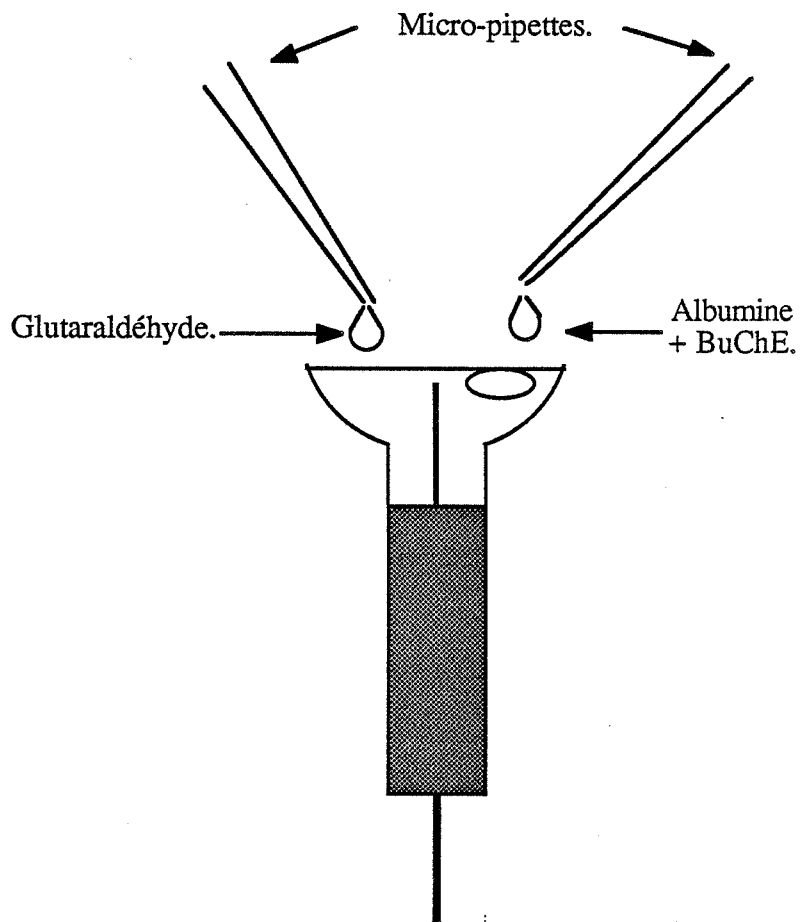
### **B-III - PH-METRE-TITRIMETRE**

Pour les expériences portant sur la régénération de la BuChE inhibée, utilisant l'enzyme en phase homogène, c'est un ensemble de titrage automatique qui a servi . Il comprend :

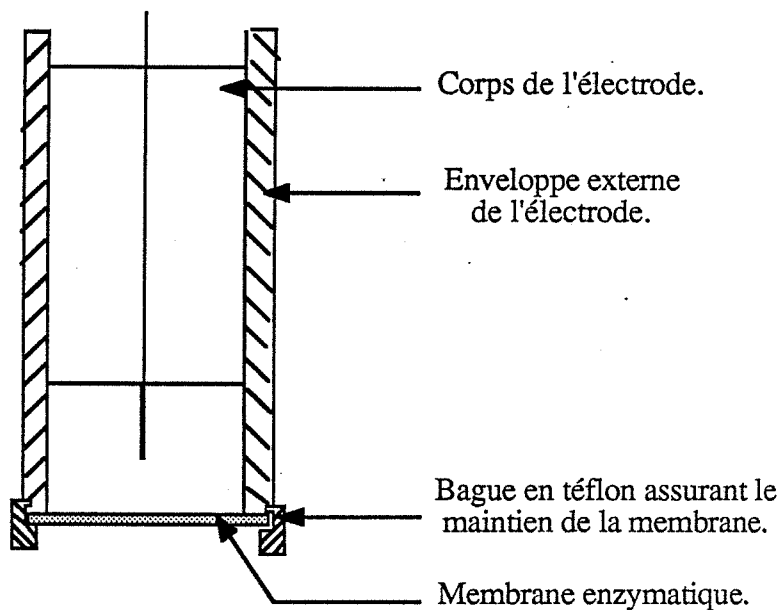
- 1 pH-mètre Radiometer pHM64 faisant partie d'une unité de régulation et de contrôle (TTT60) relié à une burette automatique (ABU 12) de 1 ou 2,5 ml.
- Un enregistreur (REC 61), muni d'un tiroir enregistreur couplé au déplacement du piston de la pompe.



**Figure 2a: Electrode de pH à fond plat utilisée pour les premiers essais.**



**Figure 2b: Réticulation de la membrane enzymatique sur l'élément sensible de l'électrode.**



**Figure 3: Electrode enzymatique à membrane de nylon.**

- La réaction a lieu dans une cellule thermostatée dans laquelle plonge un tube capillaire par l'intermédiaire duquel est injectée la soude (ou l'acide) doseuse, ainsi qu'une électrode de pH combinée Radiometer (GK-2401C).

La courbe enregistrée : Volume de soude ajoutée = f(t) permet d'accéder facilement à la cinétique de la réaction.

#### B-IV - SPECTROPHOTOMETRE:

Un spectrophotomètre U. V- visible (Kontron-Uvikon 860), utilisant des cuves en quartz (Hellman 100 QS), de trajet optique 10 mm, a servi au suivi de cinétiques enzymatiques en phase homogène.

#### B-V - CONDUCTIMETRE :

Un conductimètre (Tacussel Type CD75), muni d'une électrode (Tacussel 230-247), a été utilisé pour la détermination des coefficients de diffusion du substrat (BuChCl) et du produit (Choline) de la réaction à travers une membrane.

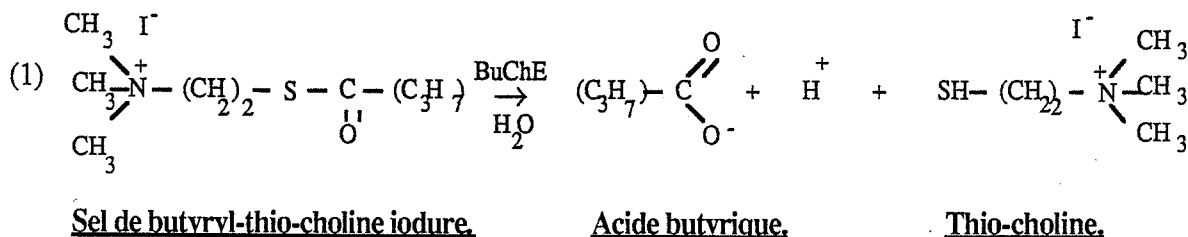
Pour ce faire, une cellule à deux compartiments, séparée par une membrane enzymatique insérée dans une "bague" faisant étanchéité, a été réalisée. L'ensemble sera schématisé au chapitre V, pour plus de clarté.

**Remarque :** Dans ce chapitre, nous n'avons cité que le matériel concernant les expériences de mise au point, et d'étude. Dans un souci d'homogénéité, le matériel concernant le système automatisé réalisé sera présenté au chapitre IV.

### C - METHODES

#### C-I- METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE OU METHODE D'ELLMAN.

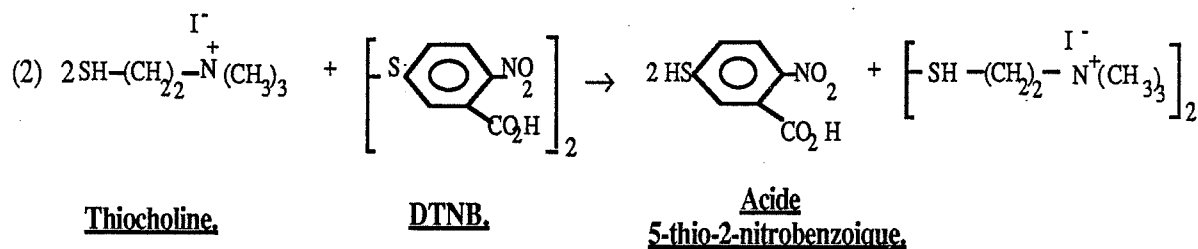
Outre l'hydrolyse de la butyrylcholine, la BuChE catalyse aussi l'hydrolyse de la butyrylthiocholine iodure (BuSChI) [55-57], selon le schéma réactionnel suivant (1):







La thio-choline, produit d'hydrolyse de la réaction, réagit en présence de di-thio-di-nitrobenzène (D.T.N.B.) ou réactif d'Ellman selon le schéma réactionnel (2) :



L'acide 5-thio-2 nitrobenzoïque formé au cours de cette réaction absorbe à 410 nm. Le suivi de l'absorbance à cette longueur d'onde permet d'atteindre la cinétique de la réaction enzymatique, suivant la loi de BEER-LAMBERT:

$$\text{Abs} = K. [\text{Acide nitro-benzoïque}] = K. [\text{Thio-choline}].$$

Une courbe d'étalonnage préliminaire a permis de déterminer K:  $K = 1,36. 10^4 \text{ (M/l)}^{-1}$ .

Cette méthode a été utilisée pour étudier le comportement en phase homogène de la BuChE en présence de sels et d'alcools et pour la détermination des constantes de Michaelis de la BuChE. Elle présente l'avantage, par rapport aux méthodes pH-métriques, de pouvoir travailler à des concentrations en tampon élevées, sans interférences de celui-ci.

## C-II- PREPARATION DES MEMBRANES ENZYMATIQUES.

L'évolution de cette mise au point a été dictée par les impératifs qui sous-tendaient ce travail. On peut les résumer comme suit :

- Fabrication en série de membranes enzymatiques présentant les mêmes caractéristiques ;
- Conservation de ces membranes avant utilisation ;
- Résistance dans le temps de ces mêmes membranes soumises à une utilisation continue, dans un milieu tamponné agité en permanence.

### C-II-1- Méthode classique :

Une méthode couramment utilisée et étudiée antérieurement dans notre laboratoire [58-59] a été reprise dans un premier temps.

#### a) Mode opératoire :

L'électrode utilisée ici est celle à fond plat, décrite en B-II. La figure 2b illustre le procédé :



- 5  $\mu$ l de glutaraldéhyde de 2,5 à 5 % dans l'eau sont déposés sur l'élément sensible de l'électrode, de diamètre 0,9 cm (donc Surface = 2,54 cm<sup>2</sup>).

- 5  $\mu$ l d'une solution de BuChE (3 mg de BuChE dans 200  $\mu$ l d'albumine humaine à 20 g/100 ml d'eau) sont ensuite déposés de la même façon sur l'électrode.

- L'ensemble est homogénéisé à l'aide d'une spatule. Le temps de réticulation est de 20 à 30 minutes, au bout duquel un film mince (épaisseur théorique 50  $\mu$ m) est formé, adhérant totalement à l'électrode.

- Celle-ci est rincée abondamment avec du tampon phosphate 10<sup>-2</sup> M, pH 7,2, et conservée dans ce même tampon avant utilisation.

- Les expériences sont toujours menées à 22°C. Pendant les "temps morts" de non utilisation, l'électrode est déposée au réfrigérateur (4 à 6°C).

### b) Inconvénients de la méthode

Cette méthode a eu des résultats probants quant à l'étude des phénomènes dont la membrane enzymatique est le siège. Cependant, elle s'est révélée inopérante pour l'utilisation continue qui était visée, et ce essentiellement pour les raisons suivantes :

- D'une électrode à l'autre, il était difficile de reproduire exactement, la même membrane (épaisseur différente, réponse au substrat et à l'inhibiteur variant en fonction de la quantité réelle d'enzyme restant dans la membrane après lavage).

- L'adhérence étroite de la membrane enzymatique sur l'élément sensible de l'électrode provoquait une dérive relativement importante de celle-ci dans le temps.

- La résistance mécanique de la membrane s'est révélée insuffisante pour supporter l'agitation permanente du milieu; au bout de quelques jours d'utilisation, elle se déchirait ou se décollait en tout ou partie de son support.

Ces constatations nous ont amenés à mettre au point de nouvelles membranes enzymatiques, répondant mieux aux impératifs exposés au début de ce chapitre.

## **C-II-2 - Fabrication de membranes enzymatiques armées**

### a) Mode opératoire

L'électrode utilisée ici est celle à pCO<sub>2</sub>, décrite en B-II. Les membranes enzymatiques sont fabriquées sur une toile de nylon, puis ajustées sur l'électrode.

- Une toile de nylon (largeur de maille 140  $\mu$ m) de 5 x 4 cm<sup>2</sup> est déposée sur une plaque en téflon.



- Un mélange contenant 200 µl de glutaraldéhyde de 2,5% à 5 % dans l'eau et 200 µl d'une solution de BuChE à 3 mg dans de l'albumine humaine (200 µl) est rapidement homogénéisé, puis déposé sur la toile de nylon.

- Une seconde plaque en téflon est ensuite ajustée sur la toile et une forte pression appliquée sur l'ensemble.

- Au bout de 30 minutes, la toile de nylon sur laquelle la membrane enzymatique a réticulée est détachée; on n'observe aucune adhérence de la membrane sur les plaques en téflon grâce à l'inertie de celui-ci.

- Dix membranes de 7 mm de diamètre sont ensuite découpées à l'emporte-pièce dans la toile et stockées.

- Avant utilisation, chaque membrane est ajustée sur l'électrode grâce à l'anneau pression en téflon.

#### b) Stockage et conservation :

Une étude a été menée sur ces membranes, portant sur le mode de stockage qui leur conservait le mieux leurs propriétés catalytiques de départ. Les résultats seront exposés au chapitre III.

### **C-II-3- Utilisation de l'électrode enzymatique**

#### a) Mode opératoire

Le schéma de montage est celui de la Figure. 1.

- L'électrode enzymatique et l'électrode de référence, trempent dans une cellule contenant 20 ml de tampon phosphate, au pH et à la concentration de travail ; l'ensemble est thermorégulé (22°C) et soumis en permanence à une agitation magnétique.

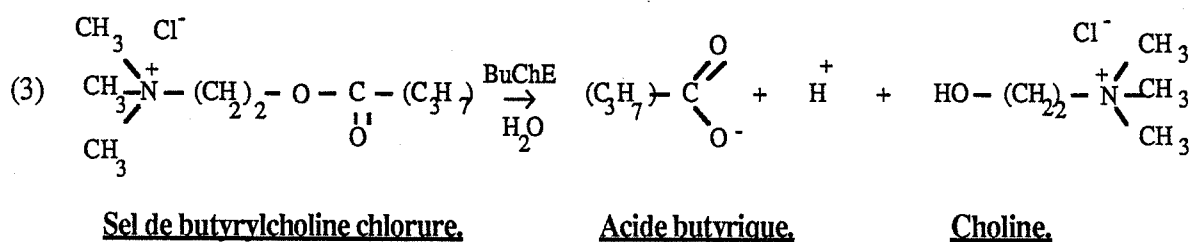
- La solution de butyrylcholine, substrat de la réaction, est préparée aux concentrations voulues, dans le même tampon que celui du milieu réactionnel ; le pH est réajusté si nécessaire.

- Les quantités adéquates de substrat sont ensuite rajoutées dans la cellule pour que la réaction enzymatique ait lieu.

#### b) Mesures

La réaction qui a lieu au sein de la membrane enzymatique est l'hydrolyse de la liaison ester de la butyrylcholine, catalysée par la butyrylcholinestérase, suivant le schéma réactionnel (3):

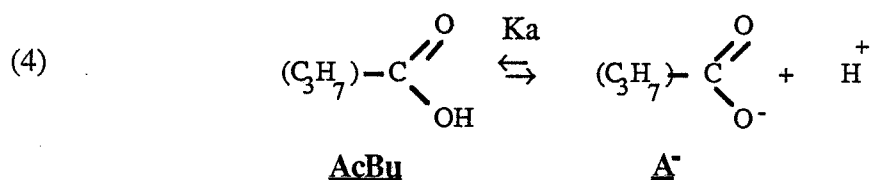




L'élément sensible de l'électrode de verre détecte les ions H<sup>+</sup> générés par la réaction, et permet donc son suivi.

**Remarques :**

[1] Le pH optimum de travail de la BuChE étant de 7 en phase homogène, toutes les expériences menées utilisaient un tampon à pH > 7. Or, la dissociation de l'acide butyrique suivant l'équation réactionnelle (4) :



**Equilibre de dissociation de l'acide butyrique.**

présente un pKa de 4,81; donc à pH > 7, [A<sup>-</sup>]/[AcBu] > 10<sup>2,2</sup>.

Il s'ensuit qu'aux pH de travail utilisés, on peut considérer que l'acide butyrique est sous forme totalement dissociée, comme indiqué sur le schéma réactionnel (3).

[2] Pour des raisons pratiques, la réaction est suivie par la mesure de la différence de potentiel ou par la mesure du pH, en ayant vérifié préalablement que l'électrode avait bien une réponse nernstienne.

[3] Toutes les mesures sont prises à l'état stationnaire.





## CHAPITRE III

### RESULTATS ET DISCUSSION



## A - CONDITIONS OPTIMALES DE FABRICATION ET D'UTILISATION DE L'ELECTRODE A BUCHE

Différents paramètres ayant une influence sur la réponse de l'électrode enzymatique seront passés en revue, en vue de définir les conditions optimales d'utilisation de ce capteur.

### A-I - REPONSE DE L'ELECTRODE A SON SUBSTRAT

Pour une électrode enzymatique réalisée dans les conditions décrites au paragraphe C du chapitre 2, la réponse de l'électrode au substrat de la réaction (BuChI), tracée par l'enregistreur, est illustrée par la Figure 1; elle représente l'évolution de la différence de potentiel provoquée par la production d'acide au sein de la membrane enzymatique, en fonction du temps [60].

Les différences de potentiel obtenues à l'état stationnaire permettent d'accéder au tracé, en coordonnées semi-logarithmiques, de la courbe d'étalonnage de l'électrode enzymatique: Réponse en mV = f ([BuChI]), représentée Figure 2.

Les caractéristiques essentielles qui se dégagent de ces deux figures sont les suivantes:

- Le temps de réponse de l'électrode, ou obtention de l'état stationnaire, est de 3 à 7 minutes; il est d'autant plus long que la concentration en substrat augmente.

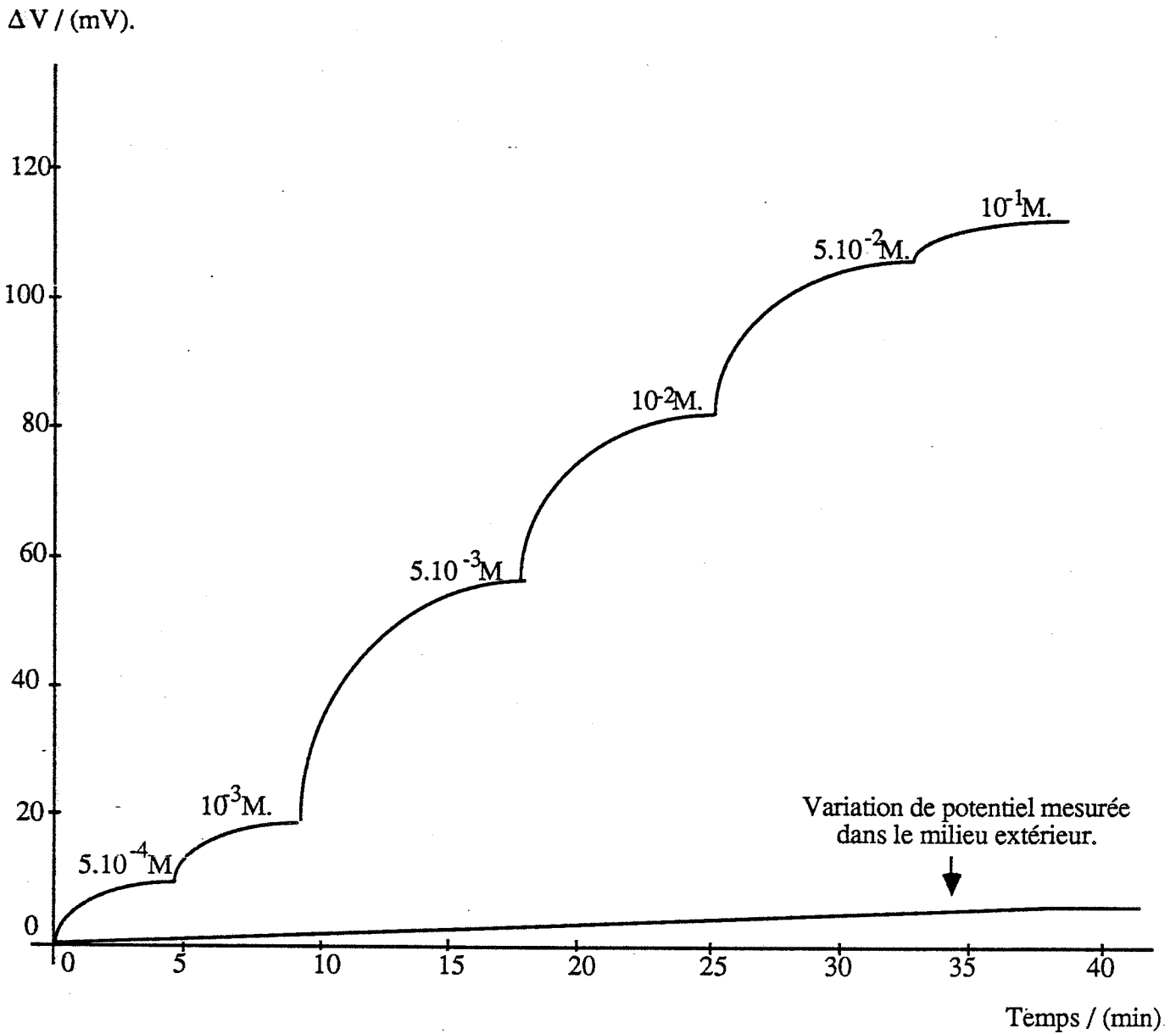
- Le seuil de détection en substrat est obtenu pour une concentration de  $5 \cdot 10^{-5}$  M. De plus la courbe d'étalonnage présente une zone linéaire pour des concentrations comprises entre  $5 \cdot 10^{-4}$  M et  $10^{-2}$  M, puis un palier de réponse à partir de  $5 \cdot 10^{-2}$  M.

- Après lavage, quand l'électrode est utilisée en présence de nouveau tampon ( $10^{-2}$  M et pH=7,2), le retour à la ligne de base est obtenu au bout de 10 minutes environ; il y a donc réversibilité du capteur vis-à-vis de son substrat.

**Remarque:** Une électrode combinée permet le suivi du pH de la solution, pendant le déroulement de la réaction enzymatique; comme on le voit sur la Figure 1, ce pH reste pratiquement constant.

### A-II - INFLUENCE DES PARAMETRES ENTRANT DANS LA FABRICATION DE LA MEMBRANE

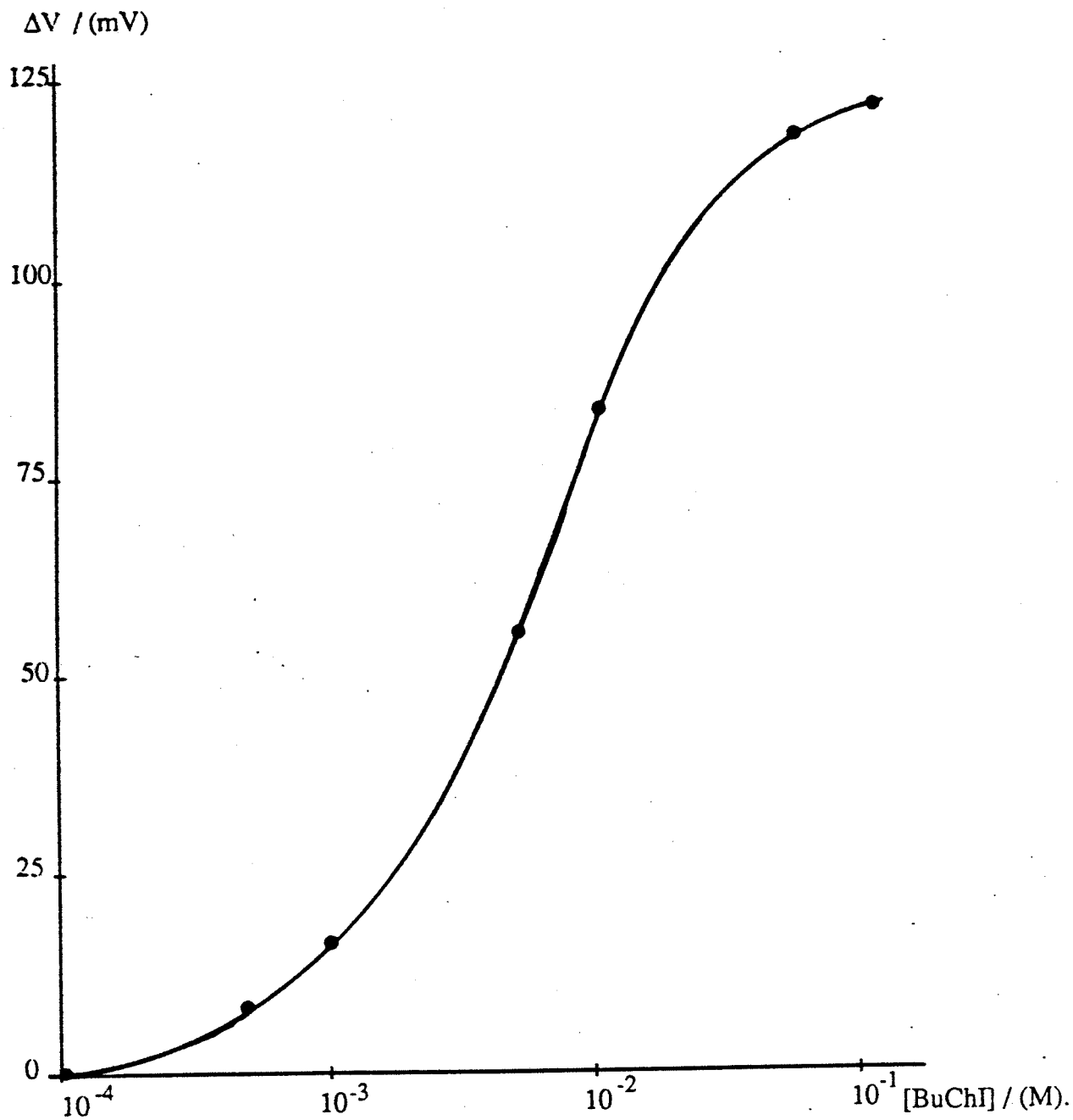
#### A-II-1. Concentration en agent réticulant



**Figure-1:** Réponse de l'électrode à BuChE au substrat de la réaction enzymatique: BuChI.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$ M, pH=7,2; T=22°C.

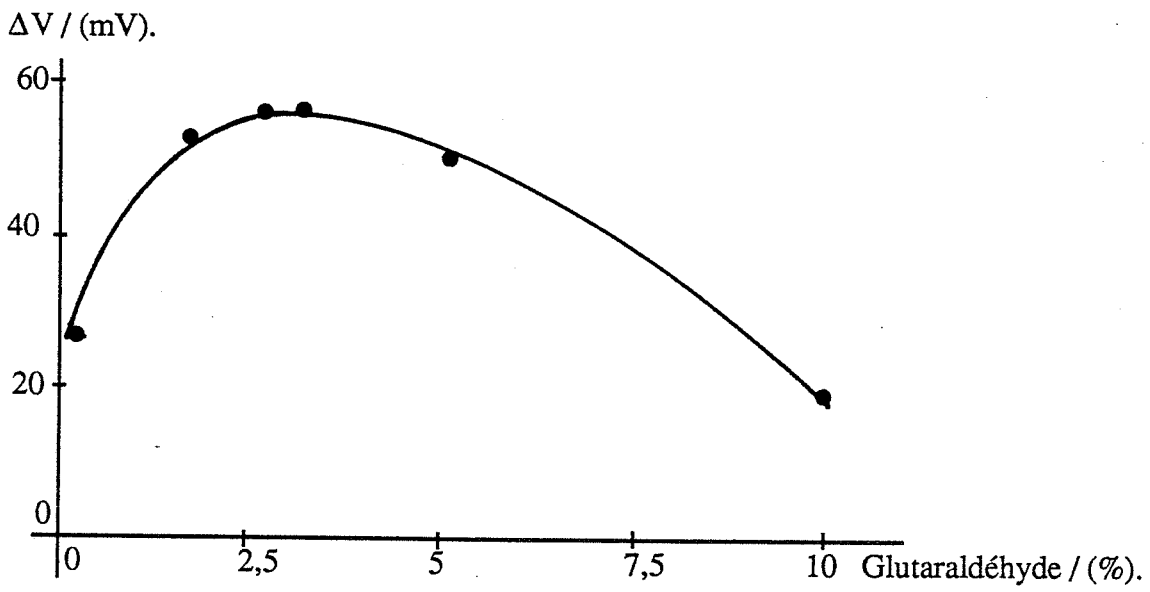
Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE.



**Figure-2:** Courbe d'étalonnage d'une membrane à BuChE:  $\Delta V=f([BuChI])$ .

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$ M, pH=7,2; T=22°C.

Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE.



**Figure-3:** Influence de la concentration de glutaraldéhyde entrant dans la fabrication de la membrane sur la qualité de la réponse.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$ M, pH=7,2; T=22°C.

Concentration en substrat de travail BuChI :  $5 \cdot 10^{-3}$  M.

L'effet d'glutaraldéhyde sur la réponse de l'électrode a été étudié en réalisant plusieurs lots de membranes, pour lesquelles la concentration en glutaraldéhyde était le seul paramètre variable.

Pour des concentrations volumiques en glutaraldéhyde allant de 1% à 10%, les réponses de l'électrode sont données Figure 3, pour les conditions d'utilisation suivantes:

- Tampon phosphate  $10^{-2}$  M, pH = 7,2; T = 22°C; [BuChI] =  $5 \cdot 10^{-3}$  M.

***Pour une même concentration en substrat, on constate :***

- Une réponse faible pour une membrane fabriquée avec du glutaraldéhyde à 1 % dans l'eau. Une partie de l'enzyme ne doit pas être réticulée quand la concentration en glutaraldéhyde est trop faible.

- Un optimum de réponse quand le glutaraldéhyde est à 2,5 %, puis une chute de la réponse pour les concentrations supérieures. On retrouve l'effet dénaturant du glutaraldéhyde signalé au paragraphe A-III du chapitre 1.

- Une augmentation de la concentration en glutaraldéhyde se traduit par une augmentation du temps de réponse; ceci est dû à des contraintes diffusionnelles supérieures au sein de la membrane quand le degré de polymérisation est trop élevé.

**A-II-2 - Concentration de l'enzyme entrant dans la fabrication de la membrane**

Plusieurs lots de membranes sont fabriqués comme précédemment, en fixant la concentration de glutaraldéhyde à 2,5 % dans l'eau, et en faisant varier la concentration d'enzyme de 2 à 25 unités par membrane.

Pour chacune, la courbe d'étalonnage (Réponse en mV) = f([BuChI]) est tracée, dans les mêmes conditions : tampon phosphate  $10^{-2}$  M, pH=7.2, t=22° C , et BuChI variant de  $5 \cdot 10^{-5}$  M à  $10^{-1}$  M , comme le montre la Figure 4.

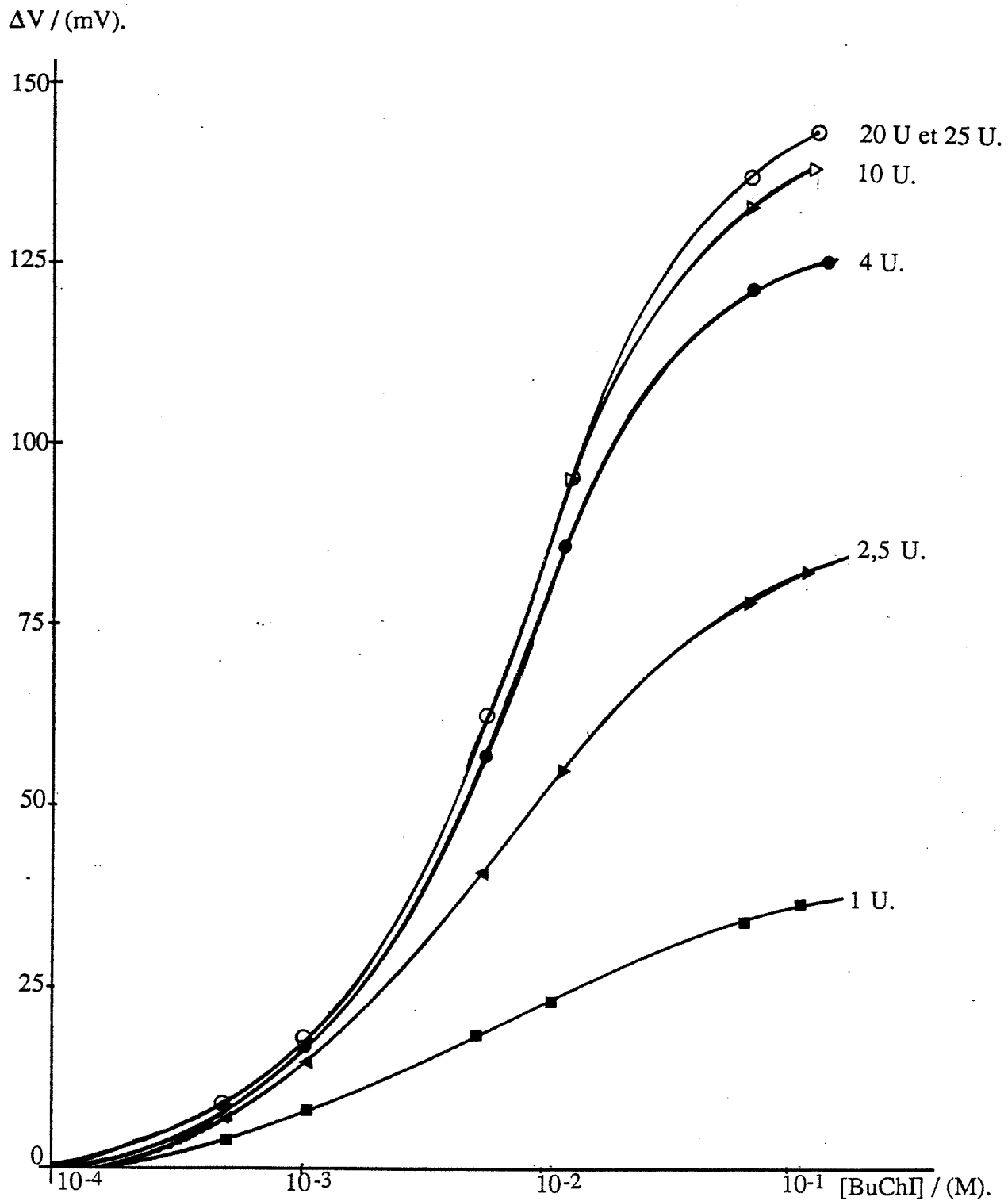
**Résultats:**

La réponse de l'électrode est d'autant plus importante que l'activité catalytique est élevée (ou nombre d'unités de BuChE important), et ce jusqu'à 20 Unités par membrane. Au delà, le gain en activité catalytique n'est pas sensible.

Il n'est donc pas nécessaire d'utiliser de fortes concentrations en enzyme dans la membrane. Ce paramètre sera encore repris plus loin, pour optimiser la détection des inhibiteurs.

**A-II-3. Immobilisation de l'enzyme en présence de son substrat :**





**Figure-4:** Evolution de la courbe d'étalonnage de'une membrane à BuChE en fonction de la quantité d'enzyme entrant dans sa fabrication.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$ M, pH=7,2; T=22°C.

Parmi les auteurs cités dans le paragraphe "Immobilisation des enzymes" (chapitre 1), certains préfèrent immobiliser l'enzyme en présence de son substrat. Celui-ci, occupant le site actif de l'enzyme pendant la réticulation, le "protégerait" d'une liaison avec le glutaraldéhyde qui pourrait aboutir à une diminution de l'activité catalytique de la membrane.

Cette méthode a été testée en réalisant deux membranes  $M_1$  et  $M_2$  comme suit:

$M_1$  : -10  $\mu$ l d'albumine humaine contenant 4 unités théoriques de BuChE.

-10  $\mu$ l de glutaraldéhyde à 2,5 % dans l'eau.

$M_2$  : -10  $\mu$ l d'albumine humaine dans laquelle on a préalablement dissout de la

butyrylcholine iodure à  $10^{-2}$ M, et contenant 4 unités théoriques de BuChE

- 10  $\mu$ l de glutaraldéhyde à 2,5 % dans l'eau.

Les deux membranes, après un temps de réticulation de 30 min., sont abondamment rincées avec du tampon phosphate  $10^{-2}$ M, pH = 7,2, puis ajustées chacune sur une électrode, et testées dans les mêmes conditions .

### Résultats

Les deux membranes présentent exactement la même activité catalytique vis à vis du substrat . Ce résultat nous a semblé important à citer dans la mesure où il nous permet de conclure que le site actif de la butyrylcholinestérase ne se lie pas au glutaraldéhyde.

Toute perte d'activité observée après immobilisation de l'enzyme ne serait donc pas due à un blocage du site actif par une liaison covalente avec le glutaraldéhyde mais :

- à une gêne stérique
- ou à un changement de conformation de l'enzyme dans la membrane.

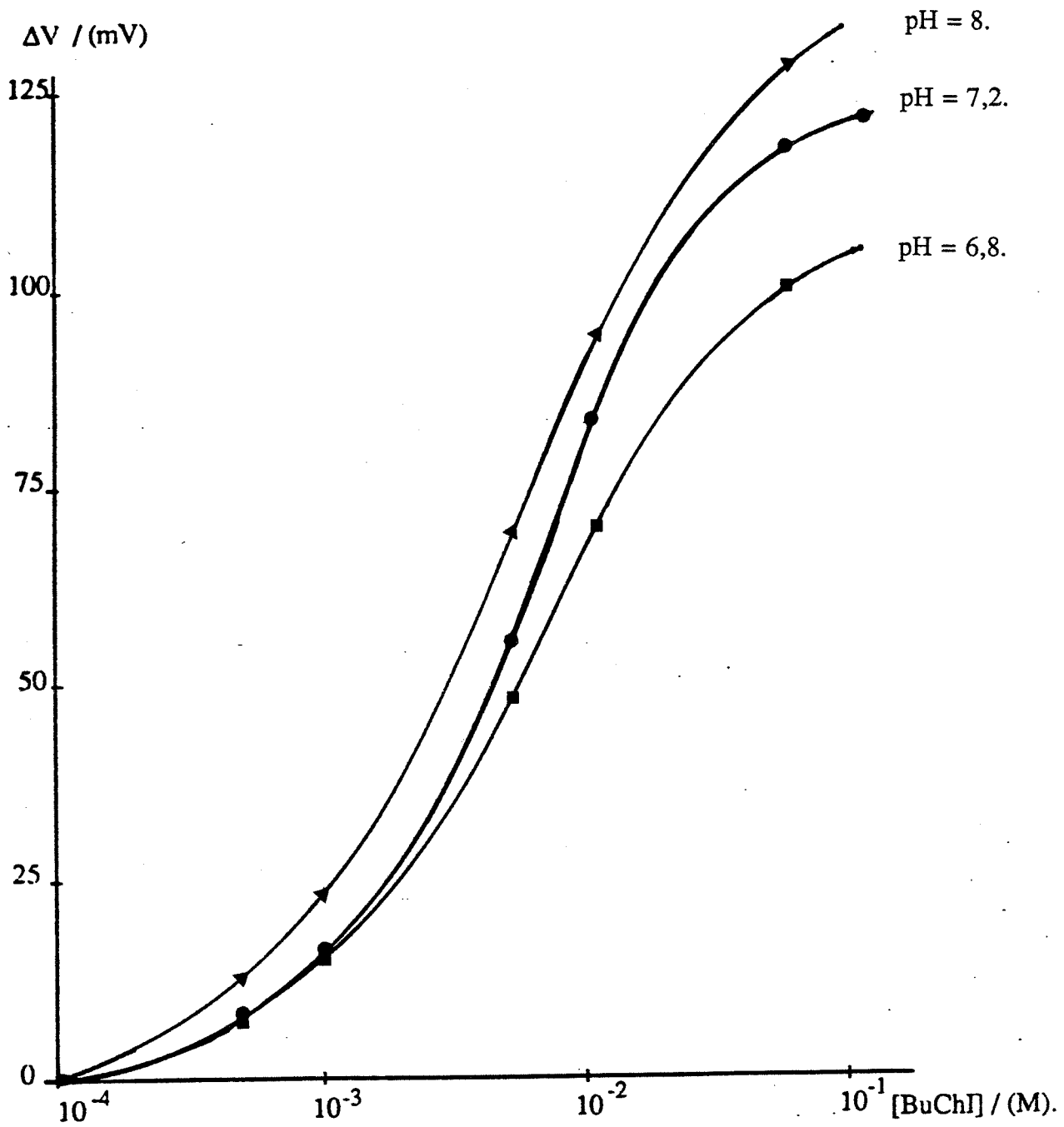
Conclusion : toutes les membranes fabriquées ultérieurement le seront en l'absence de substrat puisque sa présence n'améliore pas sensiblement les résultats de l'immobilisation.

## **A-III- INFLUENCES DES CONDITIONS DE TRAVAIL**

### **A-III-1 - Influence du pH**

Comme on l'a signalé au paragraphe A-I du chapitre 1, un des effets de l'immobilisation des enzymes est de modifier le pH optimal de fonctionnement de celles-ci.

Cet effet a été confirmé pour la butyrylcholinestérase, en travaillant avec une même membrane, dans du tampon phosphate  $10^{-2}$ M, à différents pH.



**Figure-5:** Evolution de la courbe d'étalonnage d'une membrane à BuChE pour différents pH du tampon phosphate de travail.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$ M, différents pH; T=22°C.

La Figure 5 montre que le pH optimal de la BuChE immobilisée est de 8. Or, en phase homogène, il est de 7.

L'explication, déjà fournie pour l'AChE [58], est que localement, au niveau de la membrane, le pH est plus faible, à cause de la production d'acide butyrique, que celui du milieu extérieur, imposé par le tampon. Par commodité, le pH de 7,2 sera souvent utilisé, car il correspond au pKa du tampon phosphate.

#### A-III-2 - Influence de la "force tampon"

Travailler dans un tampon assure à l'enzyme un environnement stable en pH et force ionique. Il faut cependant choisir sa concentration de manière à ne pas masquer totalement la variation de pH due à la réaction enzymatique.

La Figure 6 illustre l'effet de l'augmentation de la concentration du tampon phosphate sur la réponse de l'électrode, à pH 8 et 22°C, pour une même membrane enzymatique.

Les principaux effets observés sont une baisse de la limite de détection et une baisse de la sensibilité de l'électrode, quand la concentration en tampon phosphate augmente.

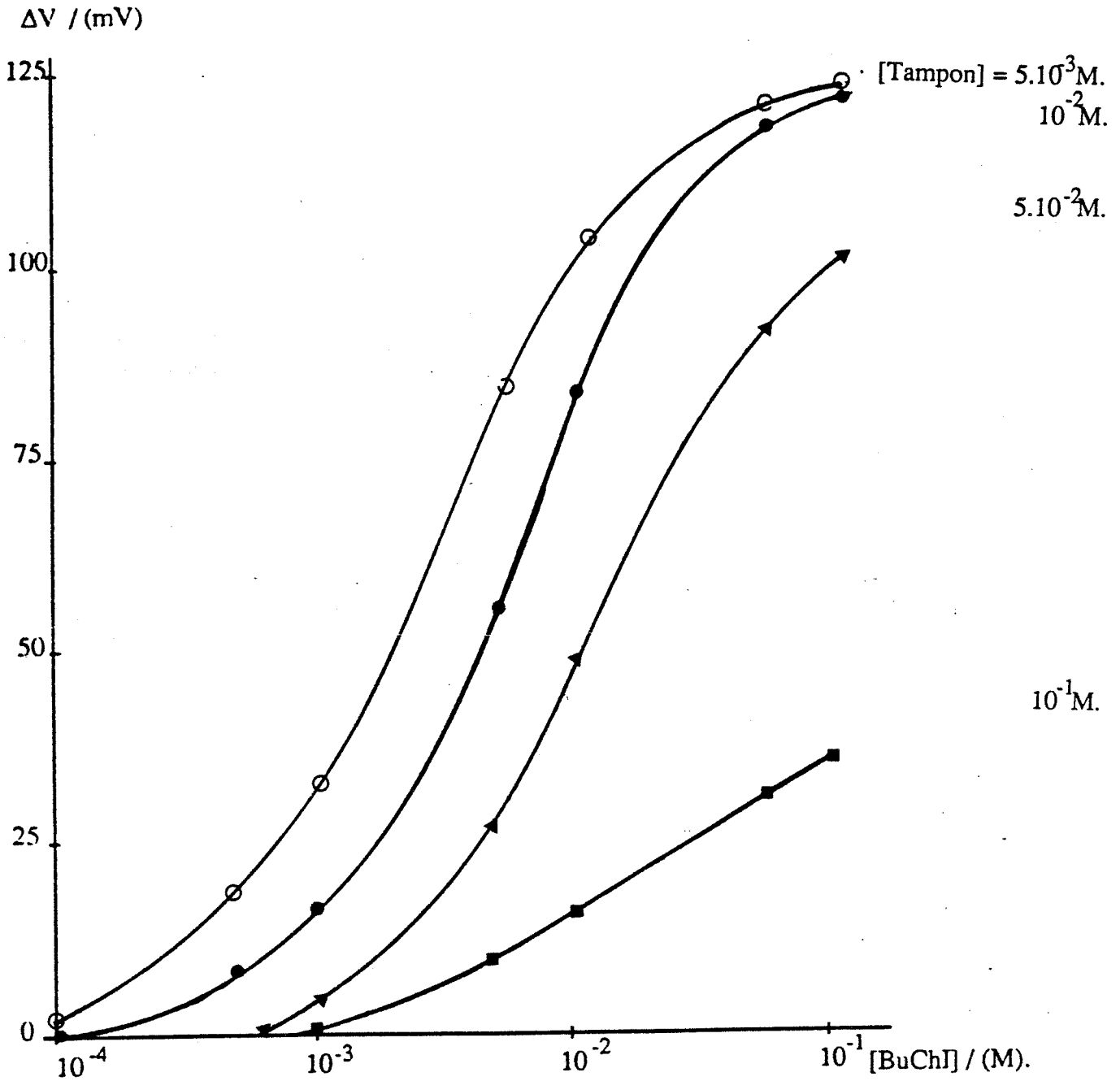
Nous avons choisi un moyen terme :  $10^{-2}M$ .

#### A-IV - CONCLUSION

Les conditions optimales de fabrication et d'utilisation de l'électrode enzymatique que nous avons retenues découlent des expériences citées ci-dessus. En accord avec la Compagnie Générale des Eaux, nous ne citerons pas ici celles qui seront utilisées en routine. Dans tous les exemples cités dans la suite de cette étude, on précisera à chaque fois les conditions de fabrication et d'utilisation de la membrane enzymatique qui illustrera un thème de travail.

#### Remarques :

[1] La butyrylcholine existe sous forme de sels d'halogénures : BuChCl, BuChBr, BuChI ; des tests ont été faits utilisant chacun de ces sels avec la BuChE. Le résultat de la réaction enzymatique est chaque fois le même. Nous avons essentiellement utilisé le sel



**Figure-6:** Evolution de la courbe d'étalonnage d'une membrane à BuChE, utilisée à différentes concentrations en tampon phosphate.

Conditions opératoires: tampon phosphate à différentes concentrations, pH=7,2, T=22°C. Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE.

d'iodure qui est le plus stable en solution. Sauf précisions, le terme substrat, ou BuCh<sup>+</sup> sous-entendra dans la suite que c'est le sel d'iodure qui est utilisé.

[2] Dans des travaux antérieurs [60] il a été montré que la réponse de l'électrode restait stable pour des températures de 10 à 50°C. Ce résultat a été confirmé avec les membranes à BuChE sur nylon et la température de 22°C retenue par commodité.

## **B - CONSERVATION DES MEMBRANES ENZYMATIQUES**

Pour les raisons indiquées au paragraphe B-II du chapitre 2, la méthode "classique" de fabrication de membranes enzymatiques a été abandonnée. Après avoir adopté les membranes fabriquées sur nylon (Chapitre 2, B-III), il restait à définir le meilleur mode de conservation de ces membranes, et ce sur plusieurs mois.

### **B-I - CONSERVATION DES MEMBRANES ENZYMATIQUES EN MILIEU AQUEUX**

#### **B-I-1 - Mode de conservation**

Après fabrication, les membranes enzymatiques sont dans ce cas stockées au réfrigérateur (4-6°C) dans un bécher contenant 10 ml de tampon phosphate 10<sup>-2</sup>M, pH 7,2. Avant utilisation, chaque membrane est ajustée et fixée sur l'électrode grâce à l'anneau pression en téflon.

Ce premier essai de conservation découlait de la littérature et des expériences antérieures, qui préconisaient de garder constamment la membrane en milieu hydraté.

#### **B-I-2 - Résultats**

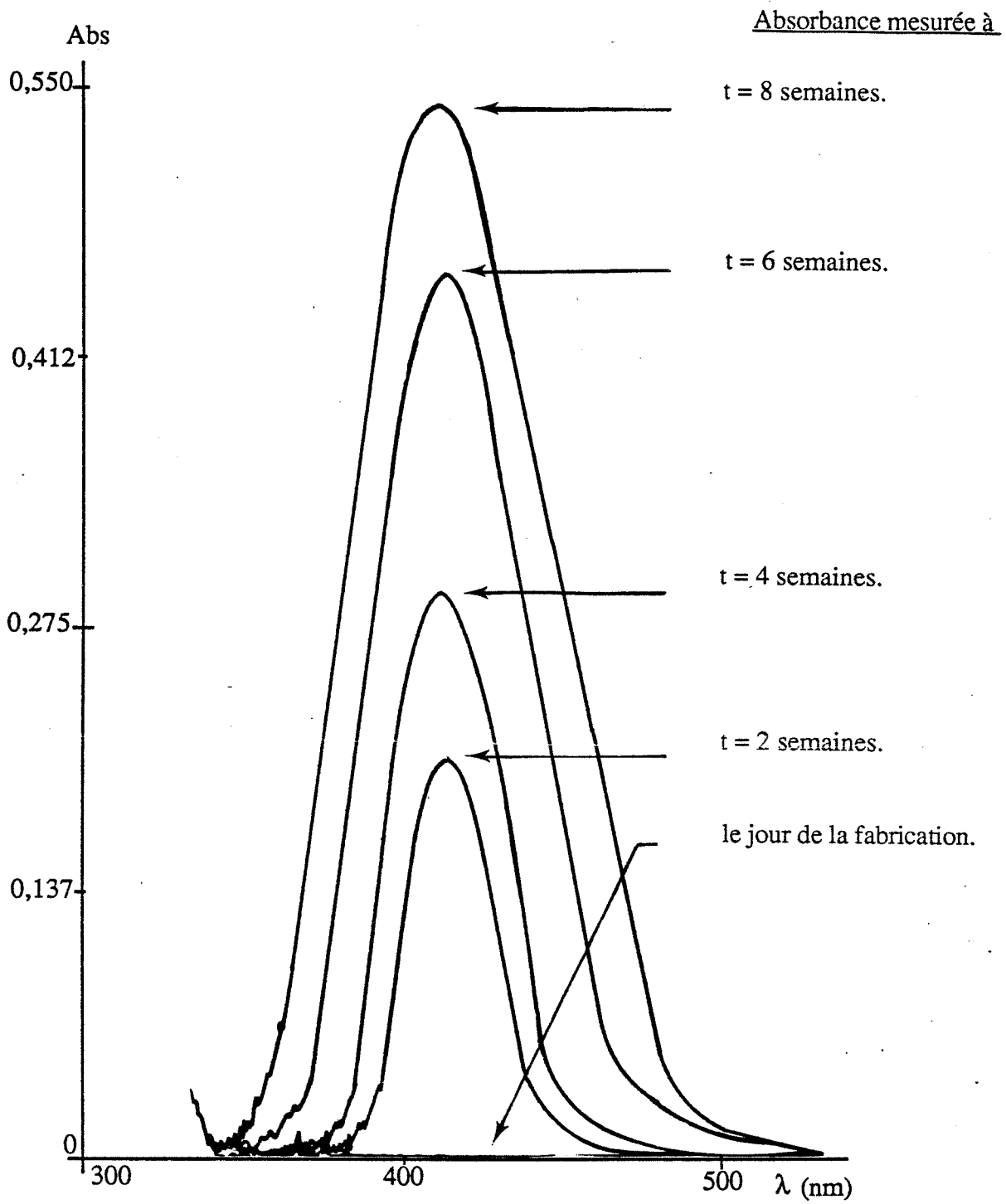
Des essais faits sur huit semaines avec l'électrode enzymatique en présence de substrat ont montré une perte régulière d'activité d'une membrane sur l'autre.

Il nous fallait vérifier si cette perte était due à un relargage de l'enzyme dans le tampon de conservation, donc si celui-ci présentait ou non une activité catalytique vis-à-vis de la butyrylcholine.

C'est la méthode spectrophotométrique d'Ellman qui a été adoptée pour cette vérification, à cause des faibles volumes en jeu.

##### a) Mode opératoire

- 500 µl du tampon de conservation sont prélevés à intervalles réguliers de deux semaines.



**Figure-7:** Evolution de l'absorbance du tampon de conservation des membranes enzymatiques en présence du substrat BuSChCl.

- Ils sont placés dans un tube à essai, dans lequel on rajoute 3 ml de DTNB  $4.10^{-3}M$ , puis 1 ml de BuSChI  $2.10^{-2}M$  ; l'ensemble est homogénéisé par une agitation faible.

- 3 ml du mélange précédent sont déposés dans une cuve à quartz au bout de 30 min, la cuve de référence en quartz contenant du tampon  $10^{-2}M$ , pH 7,2, et le substrat BuSChI à la même concentration que dans la cuve de travail.

- L'absorbance à 410 nm est mesurée au spectrophotomètre puis comparée à celle d'un témoin contenant une quantité de BuChE connue: 0,04 Unité.

### *b) Résultats*

La Figure 7, obtenue à partir d'expériences menées sur huit semaines, montre qu'il y a effectivement présence d'activité catalytique, donc de BuChE dans le tampon de conservation, et que celle-ci augmente dans le temps.

On conclut donc à un relargage progressif d'une partie de l'enzyme contenue dans les membranes vers le tampon de conservation, ce qui explique la perte d'activité catalytique enregistrée lors de l'utilisation des membranes.

#### ***Deux causes peuvent expliquer cet effet :***

[1] Une hydrolyse très lente des liaisons glutaraldéhyde-enzyme, suivie du relargage de l'enzyme dans le tampon de conservation .

[2] Au cours de la réticulation, une partie de l'enzyme est simplement incluse physiquement dans le gel, sans qu'il y ait liaison covalente avec le glutaraldéhyde ; cette partie serait relarguée progressivement dans le tampon.

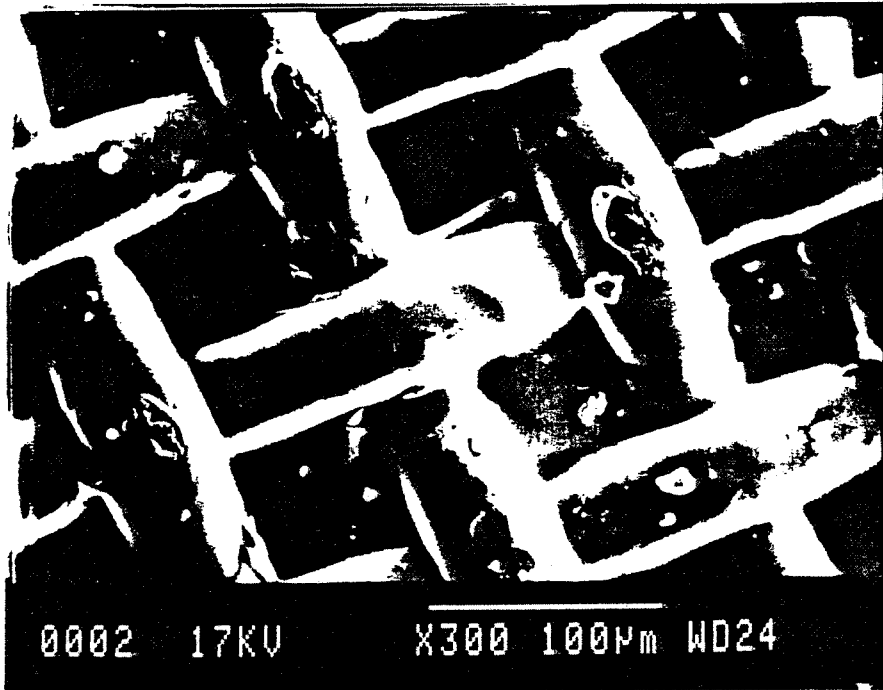
***Remarque :*** Le tampon phosphate est un milieu favorable à la prolifération de bactéries. Bien que n'ayant pas de mesures précises à ce sujet, on peut supposer que cette prolifération intervient aussi dans la perte d'activité catalytique observée.

## **B-II - STOCKAGE A SEC**

Les membranes enzymatiques sont conservées dans ce cas dans un récipient contenant du Silica Gel, et stockées au congélateur ( $-5$  à  $-6^{\circ}C$ ). Avant la première utilisation, chaque membrane est déposée dans du tampon phosphate  $10^{-2}M$ , pH 7,2, puis positionnée sur l'élément sensible de l'électrode. On pourra remarquer que la notion de "temps de réticulation" de l'enzyme n'a plus de signification dans ce cas, puisqu'il n'y a pas de lavage de la membrane enzymatique avant utilisation, donc pas d'arrêt véritable de la réaction de réticulation..

Une petite étude a permis de montrer que le temps de réhydratation devait être supérieur ou égal à une heure. En deçà, l'état stationnaire était plus long à atteindre.





**Figure-8a:** Photographie d'une membrane à BuChE, au microscope électronique.

Agrandissement: x 300.



**Figure-8b:** Même membrane enzymatique que celle de la figure 8a, en présence de l'électrode de travail.

Ce procédé allait à l'encontre des expériences menées jusque là, où toutes les membranes étaient constamment hydratées. Il s'est révélé cependant efficace, et moyennant le temps de réhydratation d'une heure, aucune dénaturation due au mode de conservation n'a été observée. La figure 8 représente une de ces membranes, prise au microscope électronique (grossie 300 fois), une heure après fabrication, puis deux semaines plus tard. Sa surface présente un aspect assez régulier.

**Remarque :** Dans la mesure où ces membranes conservent leur activité catalytique en étant stockées à sec, leur utilisation pour détecter des gaz toxiques nous semble envisageable. Ceci pourrait faire l'objet d'une autre étude.

## C - ELECTRODE A BUCHE POUR LA DETCTION DES INHIBITEURS.

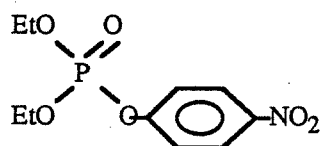
Le but de cette partie de l'étude était de mettre au point les conditions optimales de détection des inhibiteurs de la BuChE : organophosphorés et carbamates, à des seuils minima.

La norme C.E.E. d'insecticides et pesticides dans les eaux destinées à la production d'eau potable est  $< 5 \mu\text{g/l}$ , ou 5 ppb. Notre objectif était d'atteindre cette norme.

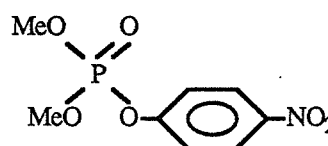
Les facteurs influant sur la sensibilité de la détection seront passés en revue et commentés, en prenant une molécule représentative des organophosphorés: le paraoxon. Les carbamates, qui sont peu solubles dans l'eau, ont été testés sur l'électrode enzymatique en présence d'alcools; les résultats obtenus seront discutés au paragraphe D de ce chapitre.

### C-I - PRELIMINAIRES

Le paraoxon existe sous forme de paraoxon éthyl ou méthyl, de formules :



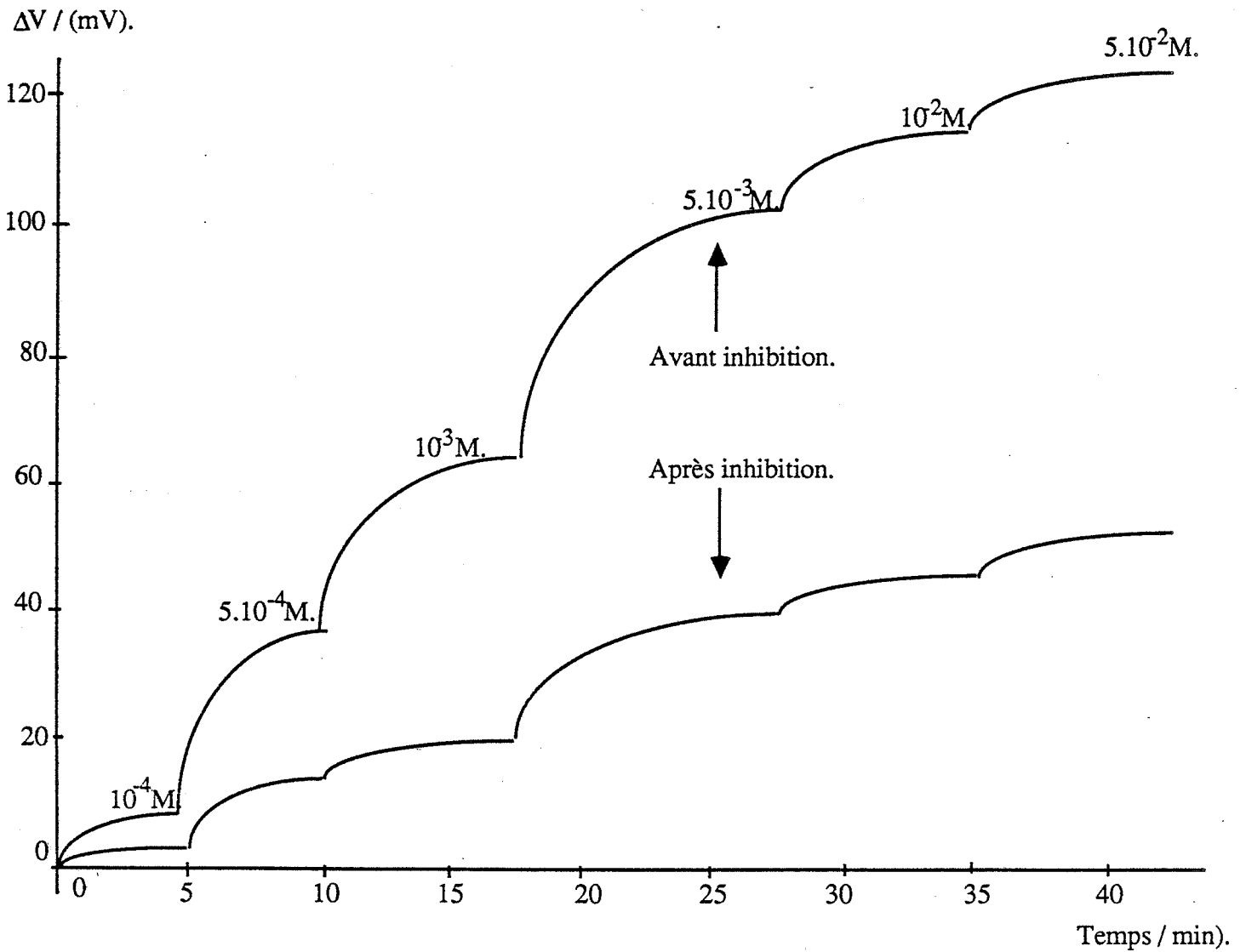
Paraoxon éthyl.



Paraoxon méthyl.

Il est soluble dans l'eau pour des concentrations  $< 10^{-4}\text{M}$ .

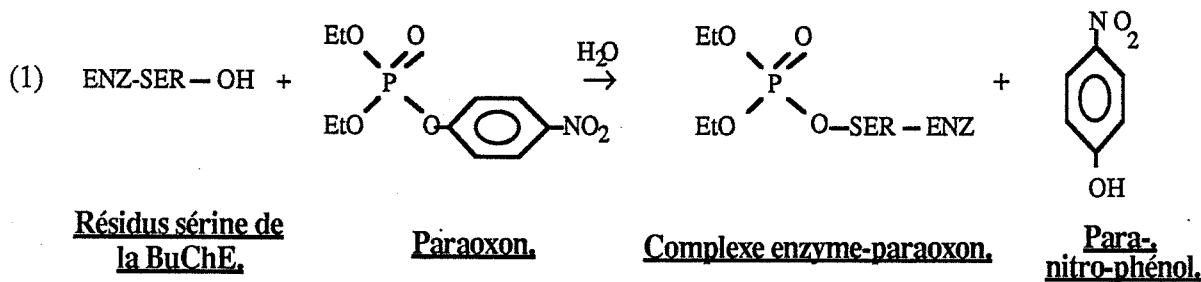
De nombreuses études ont été publiées sur sa toxicité in vivo [61-69] et in vitro [70-75], qui résulte, comme pour l'ensemble des organophosphorés de l'inhibition des ChE par formation d'un complexe quasi-irréversible sans traitement particulier [Chapitre 1]. Le schéma réactionnel qui gouverne la réaction d'inhibition dans le cas particulier du paraoxon est décrit par l'équation (1).



**Figure-9:** Réponse de l'électrode à BuChE au substrat BuChI, avant et après incubation de la membrane enzymatique dans une solution à  $2 \cdot 10^{-7}$  M en paraoxon.

Temps d'incubation: 30 min.

Conditions opératoires: tampon phosphate à différentes concentrations, pH=7,2, T=22°C. Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE.



Les doses létales pour le rat [Annexe I] montrent que c'est le plus virulent des insecticides organophosphorés. Nous l'avons pris comme exemple représentatif car il est le métabolite dans le corps et dans l'eau, des organophosphorés soufrés comme le parathion (double liaison P = S à la place de la double liaison P = O), par réaction d'oxydation. De nombreuses méthodes analytiques ont été mises en oeuvre pour sa détection et son dosage [76-81].

## C-II - REPOSE DE L'ELECTRODE ENZYMATIQUE EN PRESENCE DE PARAOXON

L'étude de l'inhibition de la membrane enzymatique par le paraoxon a été menée en présence et en l'absence de substrat, avec des résultats différents.

### C-II-1 - Inhibition de l'enzyme en l'absence de substrat

La réaction d'inhibition de la butyrylcholinestérase par les organophosphorés est compétitive : la formation du complexe enzyme-substrat et celle du complexe enzyme-inhibiteur font intervenir le même site actif, à des cinétiques différentes. Pour mener une étude sur l'inhibition elle-même et sa cinétique, il est donc préférable de travailler en l'absence de substrat [82].

#### a) Mode opératoire :

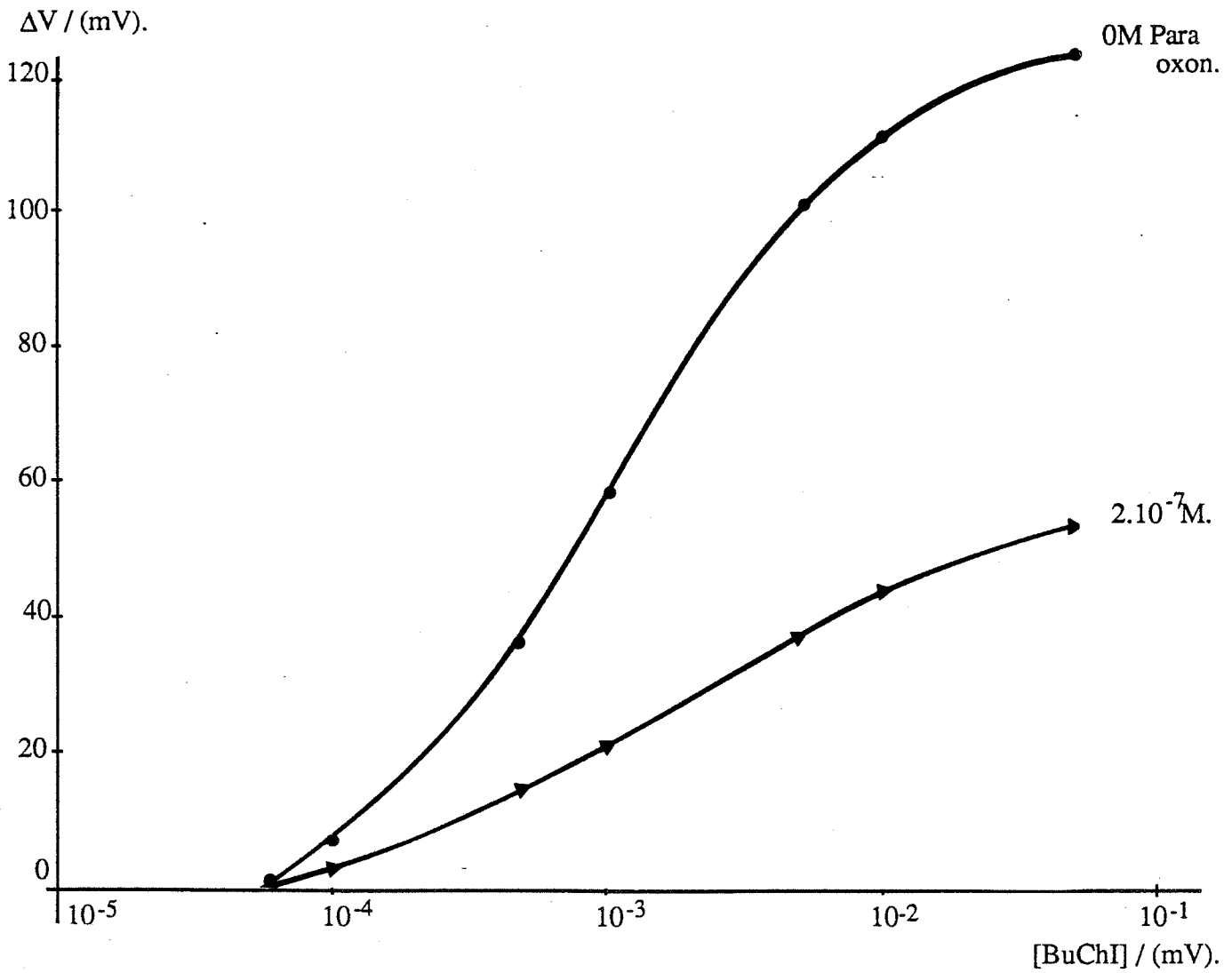
L'électrode enzymatique trempe dans une solution de tampon phosphate,  $10^{-2}\text{M}$ , pH= 8, contenant le paraoxon à la concentration voulue.

Au bout d'un temps T, dit "temps d'incubation", l'électrode est rincée puis trempée dans une nouvelle solution du même tampon. L'activité résiduelle est mesurée avec différentes concentrations de substrat.

#### b) Réponse de l'électrode et courbes d'étalonnage

La figure 9 représente la réponse de l'électrode enzymatique obtenue :

- pour une même concentration en paraoxon :  $2.10^{-7}\text{M}$



**Figure-10:** Courbes d'étalonnage d'une membrane à BuChE avant et après incubation dans une solution de paraoxon  $2.10^{-7}$ M.

Temps d'incubation: 30 min.

Conditions opératoires: tampon phosphate à différentes concentrations, pH=7,2, T=22°C. Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE.

[BuChI] / (M).	Pourcentage d'inhibition / (%).
$5.10^{-5}$	0
$10^{-4}$	17
$5.10^{-4}$	62
$10^{-3}$	63
$5.10^{-3}$	64
$10^{-2}$	64
$5.10^{-2}$	66

**Tableau I:** Calcul des pourcentages d'inhibition, pour une concentration en paraoxon de  $2.10^{-7}$  M, et à différentes concentrations en substrat, correspondant à la courbe d'étalonnage ci-dessus.

- au bout d'un temps d'incubation de 30 min de la membrane dans la solution de paraoxon.
- pour plusieurs concentrations en substrat.

La courbe d'étalonnage en substrat, que nous avons étudiée au paragraphe A de ce chapitre, devient celle de la Figure 10, après l'inhibition de la membrane enzymatique.

Les Figures 9 et 10 montrent que l'effet mesuré de l'inhibiteur sur la réaction enzymatique n'est pas le même suivant la concentration en substrat utilisée.

Si on utilise le "pourcentage d'inhibition":  $I\% = (\Delta V_0 - \Delta V_I) / \Delta V_0$

où  $\Delta V_0$  = Réponse de l'électrode au substrat, avant inhibition de la membrane enzymatique ;

et  $\Delta V_I$  = Réponse de l'électrode au substrat, après inhibition de la membrane enzymatique,

il apparaît que l'effet inhibiteur du paraoxon est amplifié quand on travaille à une concentration en substrat assez élevée; le tableau I montre l'évolution de la valeur de ce pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations en substrat.

### *Conséquences*

[1] Pour éviter toute ambiguïté d'interprétation, on précisera par la suite à quelle concentration en substrat est obtenu tel pourcentage d'inhibition.

[2] Pour détecter des inhibiteurs, surtout à faible concentration, on aura intérêt à utiliser une concentration en substrat élevée, tout en restant dans la zone linéaire de la courbe d'étalonnage. Une concentration de travail qui répond à ces critères est  $10^{-2}M$ . Elle sera utilisée en routine par la suite.

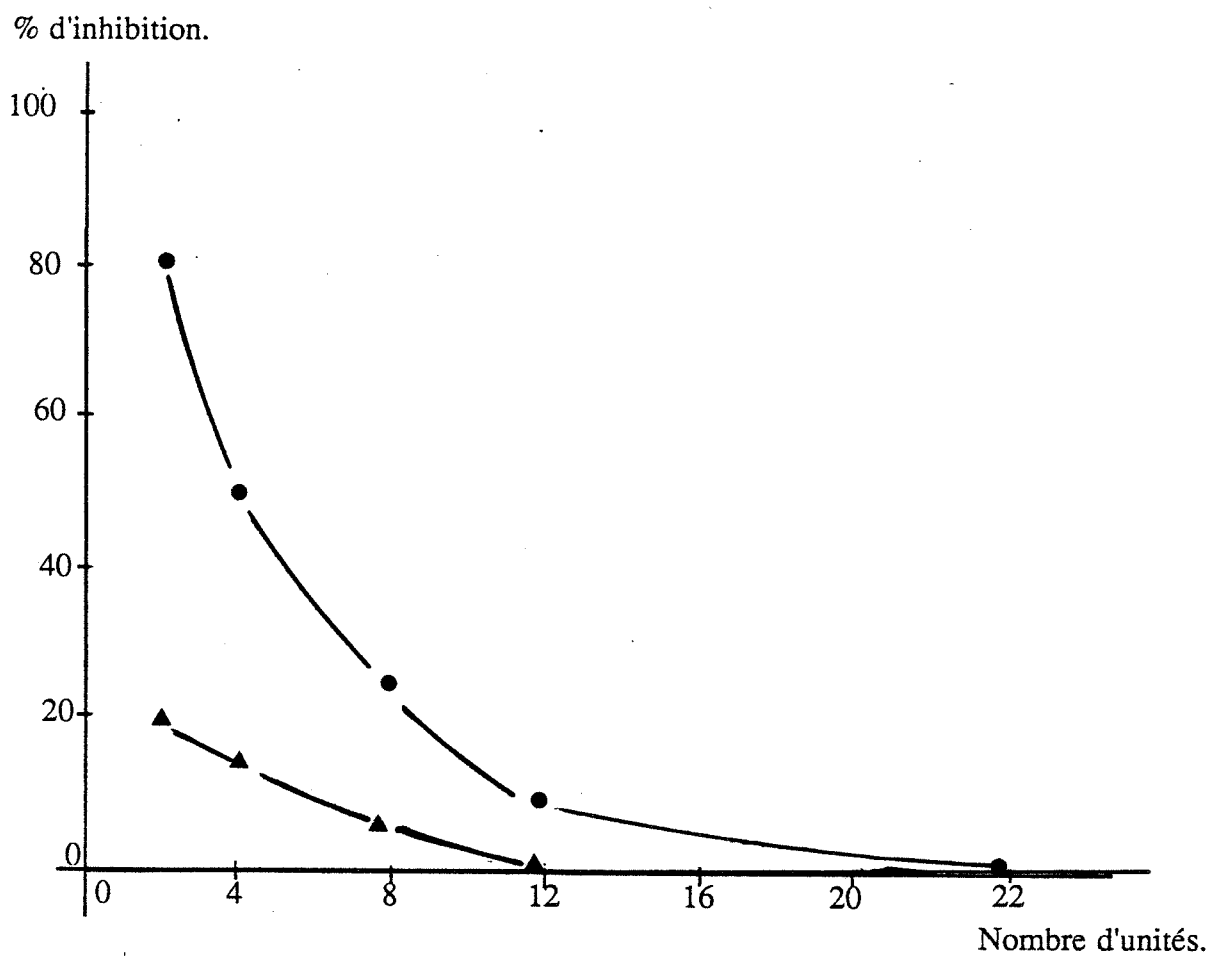
#### *c) Influence de la concentration en enzyme sur la sensibilité de la réponse :*

Ce paramètre est d'une importance particulière pour la détection de faibles concentrations en inhibiteurs [59]. Il a été étudié en réalisant plusieurs membranes comme suit:

- 10  $\mu$ l de glutaraldéhyde à 2,5 % dans l'eau, par membrane
- 10  $\mu$ l d'albumine par membrane, contenant : 2, 4, 8, 12, 22 unités internationales (UI) de BuChE.

Des tests ont ensuite été effectués avec de la BuChE  $10^{-2}M$ , après un temps d'incubation de 30 min, dans des solutions  $2.10^{-8}M$  et  $5.10^{-7}M$  en paraoxon dans du tampon phosphate.

L'influence de la concentration en enzyme sur le pourcentage d'inhibition de la réponse est illustrée Figure 11.



**Figure-11: Influence de la concentration en enzyme sur la sensibilité de la réponse de l'électrode au paraoxon.**

Temps d'incubation: 30 min.

► Concentration en paraoxon:  $2 \cdot 10^{-8} M$ , ●  $5 \cdot 10^{-7} M$ .

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2} M$ , pH=7,2, T=22°C. Concentration en substrat:  $10^{-2} M$ .

Membranes enzymatiques contenant: 2, 4, 8, 12, 22 Unités de BuChE.

Il apparaît que pour une membrane enzymatique à forte activité catalytique, l'effet inhibiteur peut être totalement masqué. En effet, si le nombre de sites actifs dans la membrane est important, la concentration d'inhibiteur nécessaire pour bloquer tout ou partie de ces sites sera d'autant plus élevée.

*Le seuil de détection d'un inhibiteur sera donc fonction de la quantité d'enzyme déposée sur la membrane.*

On reviendra sur cet aspect dans le chapitre V: Modélisation.

#### d) Cinétique d'inhibition

Le mode opératoire décrit en a) a été repris en travaillant sur une membrane à quatre unités théoriques de BuChE. L'effet de l'inhibition induite par une concentration 2.10<sup>-7</sup>M en paraoxon, est mesuré après différents temps d'incubation (10 à 30 min).

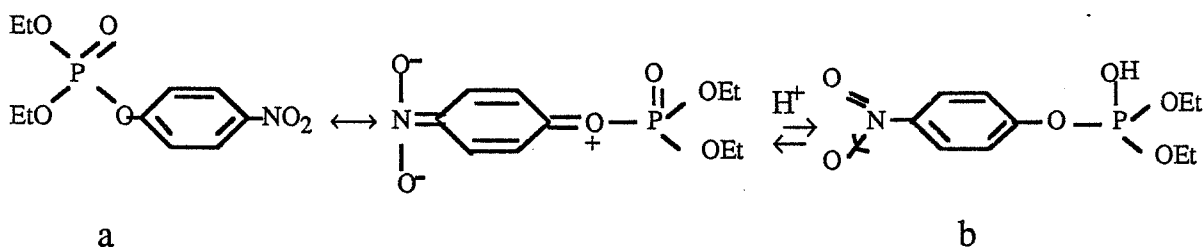
La Figure 12 montre l'évolution dans le temps de l'inhibition de la réaction enzymatique. Pour toutes les expériences ultérieures concernant le paraoxon, le temps d'incubation sera de T = 30 min, puisque l'inhibition est alors achevée.

Dans ces conditions, la réponse de l'électrode, obtenue pour différentes concentrations en paraoxon, après ce temps d'incubation, est illustrée Figure 13a. On peut alors en déduire la courbe d'étalonnage de la membrane enzymatique, en paraoxon, de la Figure 13b.

#### **Remarque sur l'influence du pH :**

Des mesures en phase homogène, confirmées sur l'électrode enzymatique, nous ont amenés à conclure que l'inhibition était plus efficace à pH légèrement basique 7,8 - 8,5. Cet effet est généralement attribué à la configuration de l'enzyme à pH = 8. La mesure du pK<sub>a</sub> du paraoxon : pK<sub>a</sub> = 7,2, semble cependant indiquer que la conformation de celui-ci en milieu basique intervient aussi.

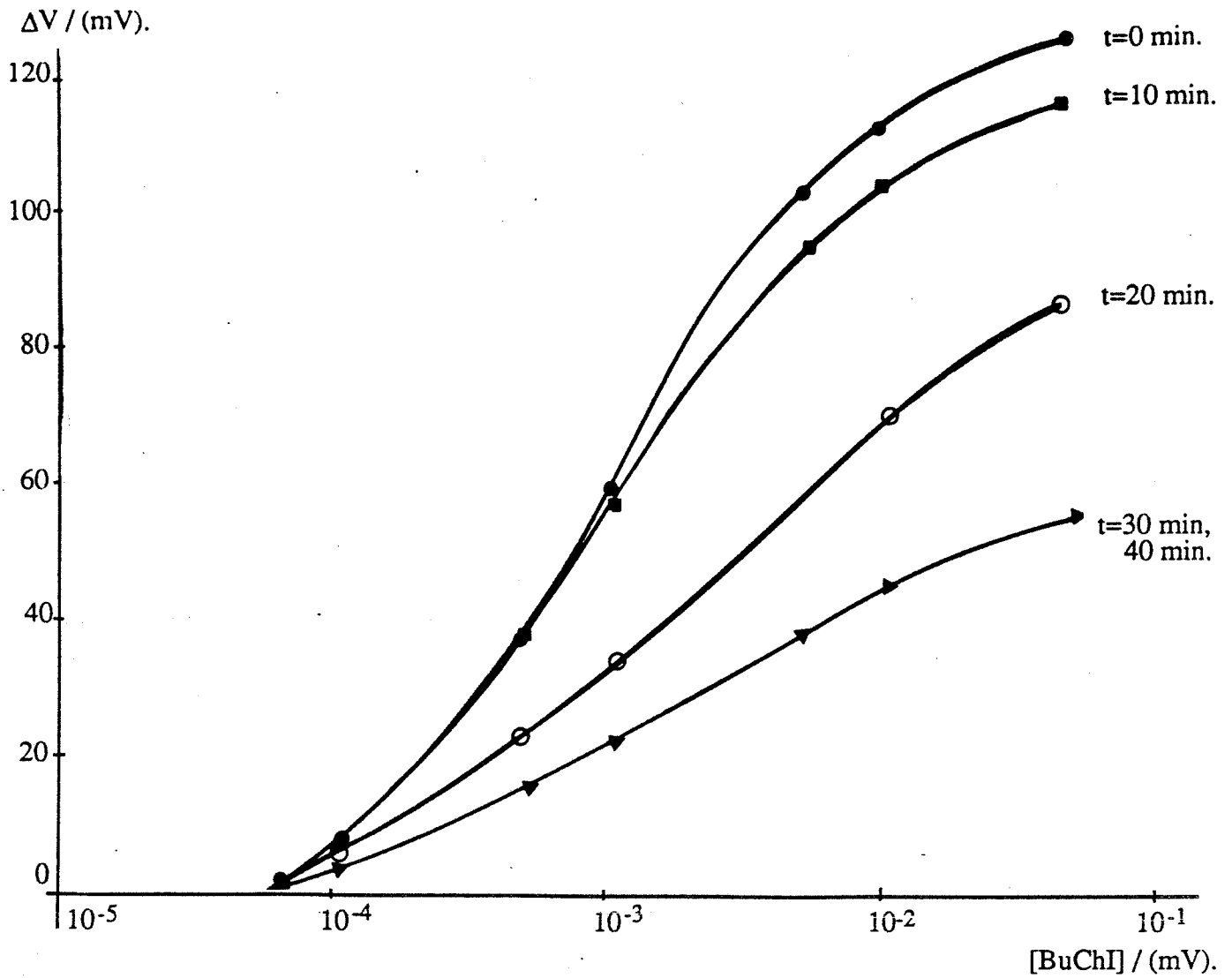
Nous proposons l'équilibre acido-basique suivant :



#### Equilibre acido-basique du paraoxon.

Le site actif se lierait alors plus facilement à la forme (a) qu'à la forme (b).

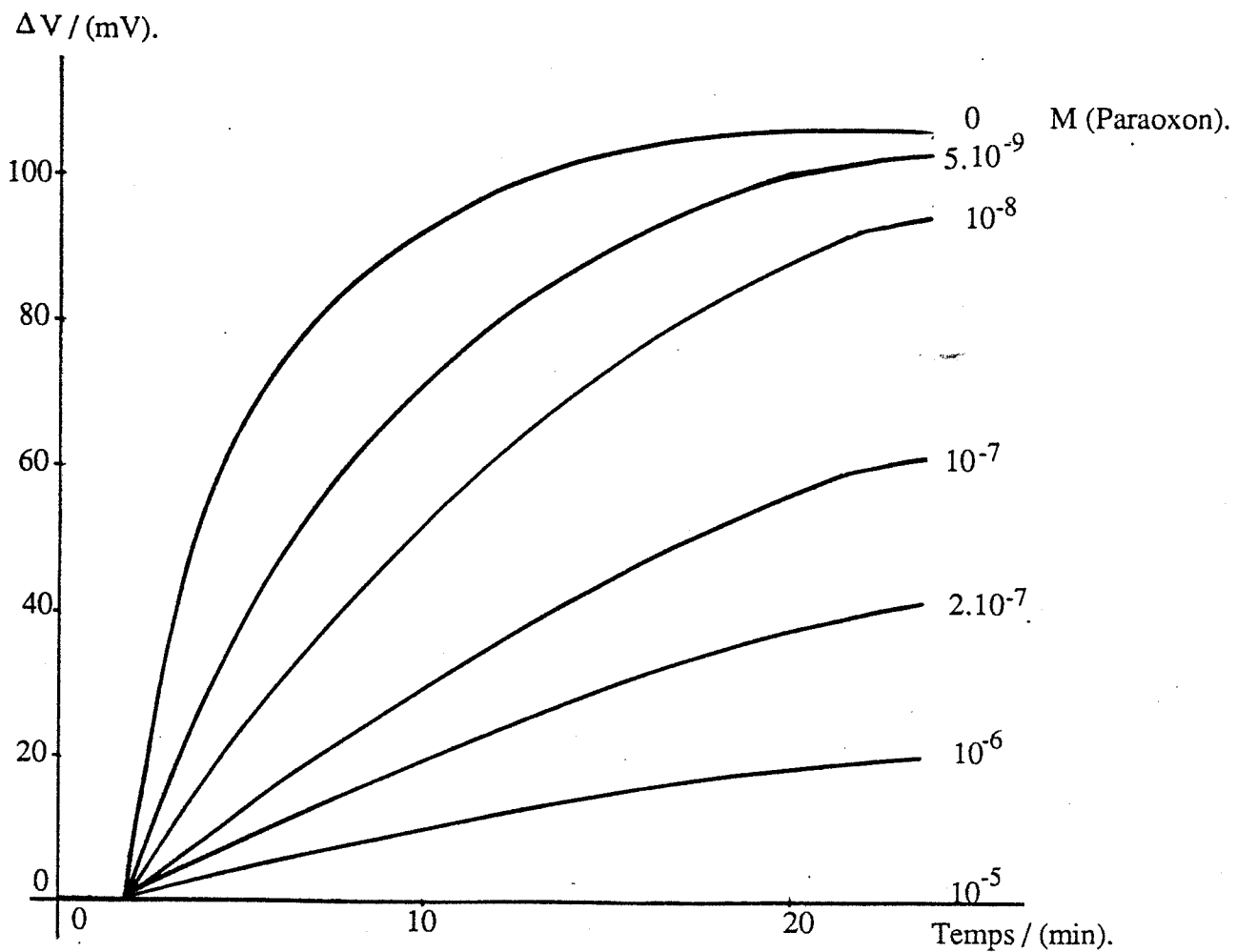




**Figure-12:** Courbes d'étalonnage d'une membrane à BuChE après différents temps d'incubation de l'électrode, dans une solution de paraoxon  $2 \cdot 10^{-7} M$ .

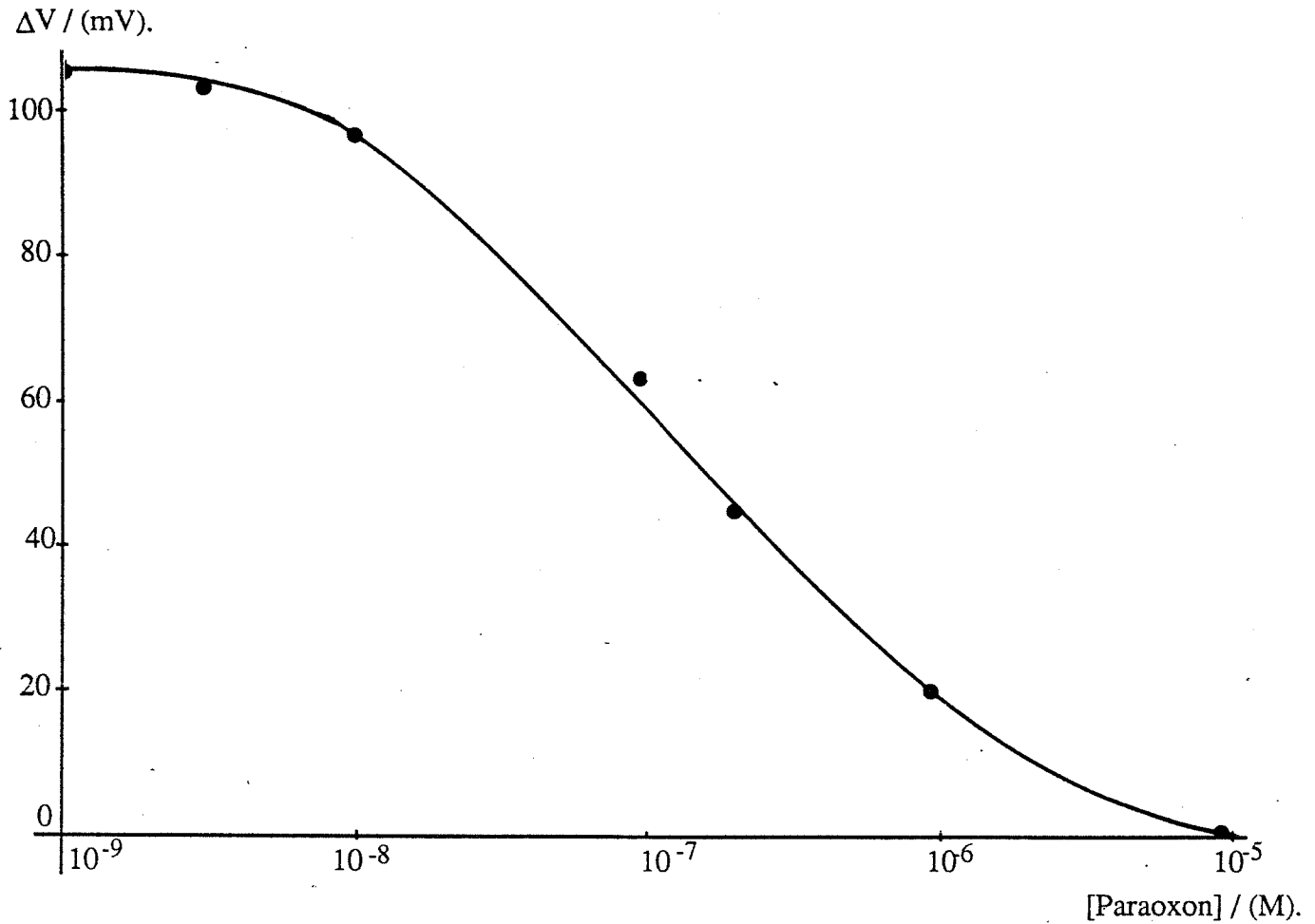
Temps d'incubation: 10 à 40 min.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2} M$ ,  $pH=7,2$ ,  $T=22^{\circ}C$ . Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE.



**Figure-13 a:** Réponse de l'électrode à BuChE au substrat BuChI, après incubation pendant 30 min de la membrane enzymatique dans des solutions à concentrations croissantes en paraoxon.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$ M, pH=7,2, T=22°C. Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE. Concentration en substrat:  $10^{-2}$ M.



**Figure-13b:** Exemple de courbe d'étalonnage d'une membrane à BuChE en fonction de concentrations croissantes en paraoxon.

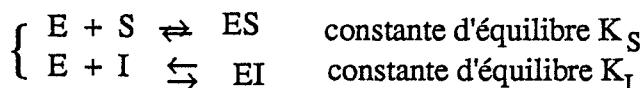
Temps d'incubation: 30 min.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$ M, pH=7,2, T=22°C. Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE. Concentration de travail en substrat:  $10^{-2}$ M.

De même que pour la cinétique d'inhibition, l'effet du pH sera lié à la nature même de l'inhibiteur; on ne peut, à partir d'un exemple, conclure à un pH optimal de travail pour la détection de tous les organophosphorés.

### C-II-2 - Inhibition en présence de substrat

En général, si l'inhibition d'une enzyme est compétitive, elle ne peut avoir lieu en présence d'un excès de substrat. Pour l'inhibition de la BuChE par les organophosphorés, il faut cependant tenir compte des constantes d'équilibre  $K_I$  et  $K_S$  [83] :



avec  $K_I \ll K_S$ .

#### a) Mode opératoire :

La réaction catalytique d'une électrode enzymatique (4 Unités Internationales) est mesurée dans une solution tampon ( $10^{-2}M$ , pH = 8) à  $10^{-2}M$  en BuChI, jusqu'à l'obtention de l'état stationnaire. Cet état obtenu, du paraoxon est rajouté dans le même mélange réactionnel; la réaction enzymatique est alors suivie en présence du substrat et de l'inhibiteur simultanément.

#### b) Résultat :

L'allure de la courbe enregistrée est illustrée Figure 14.

Malgré la présence de substrat, la réaction d'inhibition de la BuChE a lieu, car c'est une réaction pratiquement irréversible. On constate un temps de "retard" de l'ordre de 4 minutes, pendant lequel l'effet inhibiteur n'apparaît pas : il y a compétition au niveau du site actif entre le substrat et l'inhibiteur, avec formation de deux complexes : complexe enzyme-substrat, réversible, et complexe enzyme-inhibiteur. Ce dernier étant irréversible, la réaction d'inhibition finit par s'imposer.

D'un point de vue cinétique, le problème se décompose comme suit:

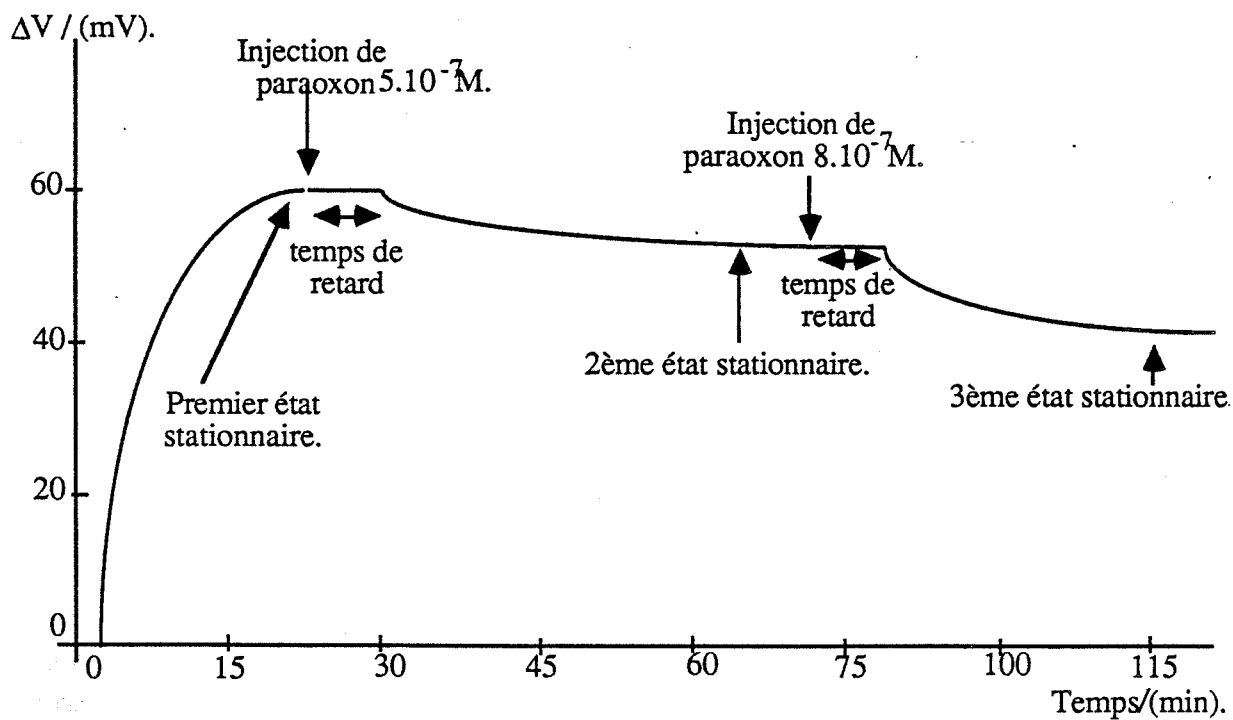
La vitesse de réaction d'inhibition est très lente, et déplacée dans le sens de la formation de EI :

$$v = k_i [E] \cdot [I] \quad \text{où } k_i \text{ est la constante de vitesse de la réaction d'inhibition.}$$

La vitesse de réaction enzymatique est plus rapide:

$$v = k_{+2} \cdot [E]_0 \cdot ([S] / (K_m + [S])) \quad \text{avec } k_{+2} \gg k_i.$$

Dans un premier temps, l'enzyme est toujours présente sous la forme E; c'est la vitesse de la réaction enzymatique qui s'impose. Petit à petit, l'équilibre se déplace vers la formation de EI, d'où la diminution de la vitesse de la réaction enzymatique avec un temps de retard.



**Figure-14:** Exemple de réponse de l'électrode obtenue pour une inhibition réalisée en présence de substrat.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2} \text{ M}$ ,  $\text{pH}=7,2$ ,  $T=22^\circ \text{C}$ . Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE. Concentration de travail en substrat:  $10^{-2} \text{ M}$ .

Le nouvel état stationnaire, dû à l'inhibition, n'est atteint qu'au bout de 40 min ; la cinétique de la réaction d'inhibition est donc plus lente en présence de substrat, qu'en son absence (30 min), ce qui découle des remarques précédentes. On confirme donc la compétitivité entre S et I pour le site actif.

*Par contre, le pourcentage d'inhibition final est le même que celui obtenu en l'absence de substrat.*



## **D - ACTIVITE ENZYMATIQUE EN PRESENCE DE SOLVANTS ORGANIQUES**

Certains des pesticides testés, en particulier les carbamates, sont insolubles dans l'eau, ce qui nous a amenés à travailler dans un mélange hydro-alcoolique pour les détecter. Il était alors nécessaire d'étudier le comportement de la BuChE dans ce milieu.

En général, les auteurs [84] constatent une réduction de l'activité enzymatique quand la concentration en solvant organique augmente ; cette réduction est souvent attribuée à la diminution de la constante diélectrique du milieu, mais aucune corrélation directe n'a pu être mise en évidence.

D'une façon générale, toute modification de l'activité enzymatique observée en présence de solvants est expliquée par une des causes suivantes:

- Réduction de la concentration d'eau, donc diminution de l'hydratation de l'enzyme.
- Interactions directes solvant organique-enzyme.
- Modification des pKa des groupements acide ou basique de l'enzyme.
- Modification de la structure et du site actif de l'enzyme.
- Modification des interactions dipolaires et ioniques.

### **D-I - INFLUENCE D'ALCOOLS SUR LE COMPORTEMENT CATALYTIQUE DE LA BUCHE, EN MILIEU HOMOGENE**

L'étude a été menée en présence d'éthanol et de méthanol, utilisant la méthode d'Ellman (Paragraphe C-I- du chapitre 2). Les constantes cinétiques  $K_m$  et  $V_m$  ont été déterminées par la méthode de Lineweaver-Burk, en l'absence et en présence d'alcool.

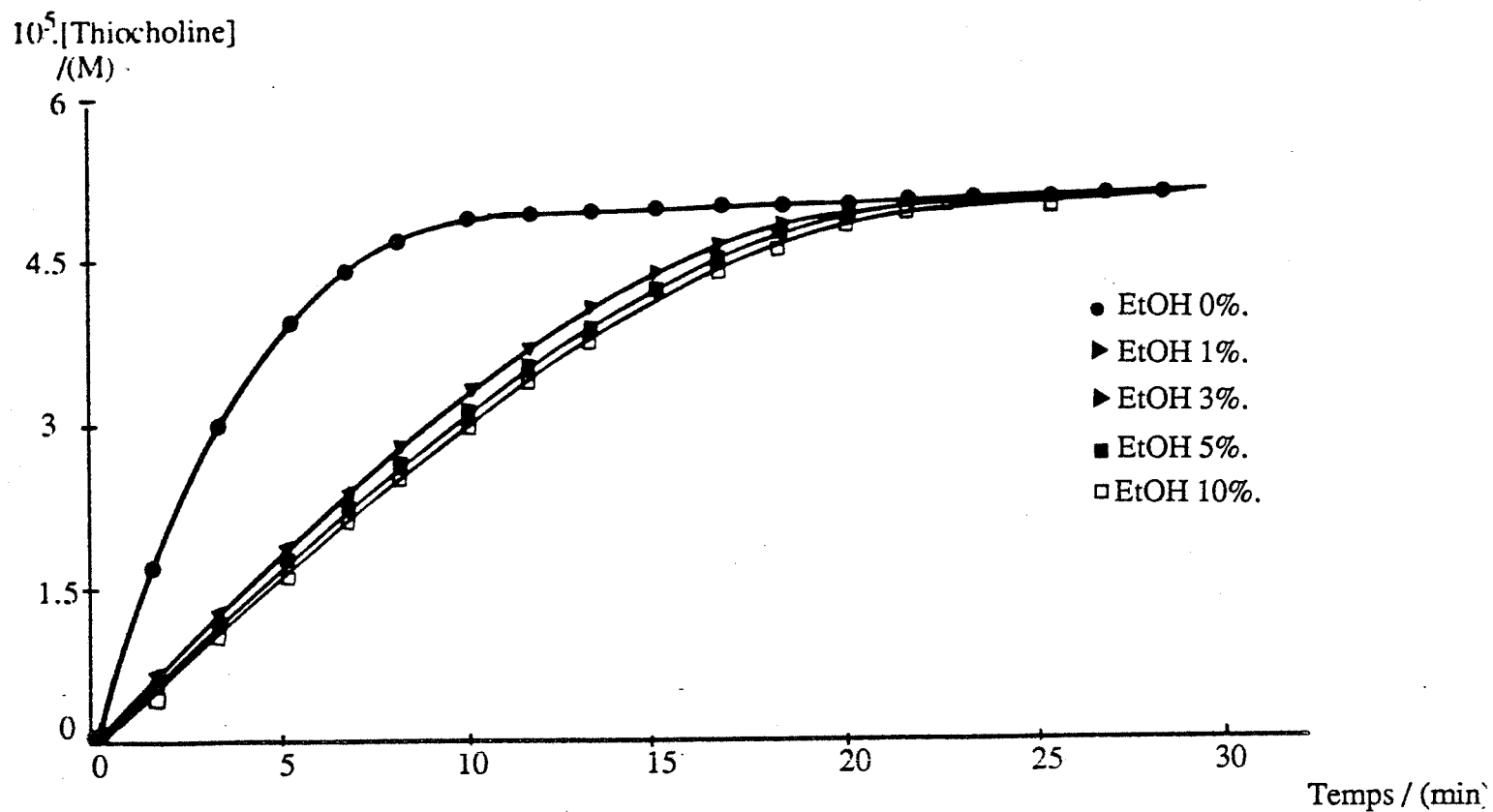
Les conditions de concentration en tampon:  $10^{-2}M$ ,  $pH = 8$ , ainsi que de température:  $22^{\circ}C$  sont les mêmes pour toutes les expériences.

#### **D-I-1- Mode opératoire**

Un mélange tampon phosphate-alcool est préparé à la concentration de travail en alcool; du substrat BuSChCl à  $5.10^{-5}M$  et du D.T.N.B. à  $10^{-4}M$  sont dissous dans ce mélange.

La cuve de référence et la cuve de travail contiennent 3ml de la précédente solution. A l'instant considéré comme l'instant initial, 3 $\mu$ l d'une solution de BuChE (3 mg dans du tampon phosphate aux mêmes caractéristiques que le tampon de travail) sont rajoutés dans la cuve de travail. L'absorbance par rapport à la cuve de référence est mesurée à une fréquence de 2 mesures par minute.





**Figure-15:** Evolution de la vitesse d'hydrolyse du substrat BuSChCl par la BuChE, en présence de concentrations croissantes d'éthanol.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}\text{M}$ ,  $\text{pH}=7,2$ ,  $T=22^\circ\text{C}$ .

Concentration de travail en substrat BuSChCl:  $10^{-5}\text{M}$ ; 4 unités de BuChE.

Concentration de D.T.N.B.:  $10^{-4}\text{M}$ . Ethanol: 1 à 10% (v/v).

*Remarque:* La concentration en substrat de travail a été choisie de façon à se situer dans une zone de linéarité de l'absorbance; plusieurs concentrations se situant dans cette zone ont été utilisées pour l'étude. Pour les courbes tracées ici, seule la concentration  $5.10^{-5}M$  sera représentée.

### D-I-2 - Influence de l'éthanol

La présence de proportions croissantes d'éthanol se traduit par une diminution de la vitesse d'hydrolyse du substrat BuSChCl par l'enzyme, comme on le voit sur la Figure 15 ; cette diminution est sensiblement la même pour toutes les concentrations variant de 1% à 10 % volumiques.

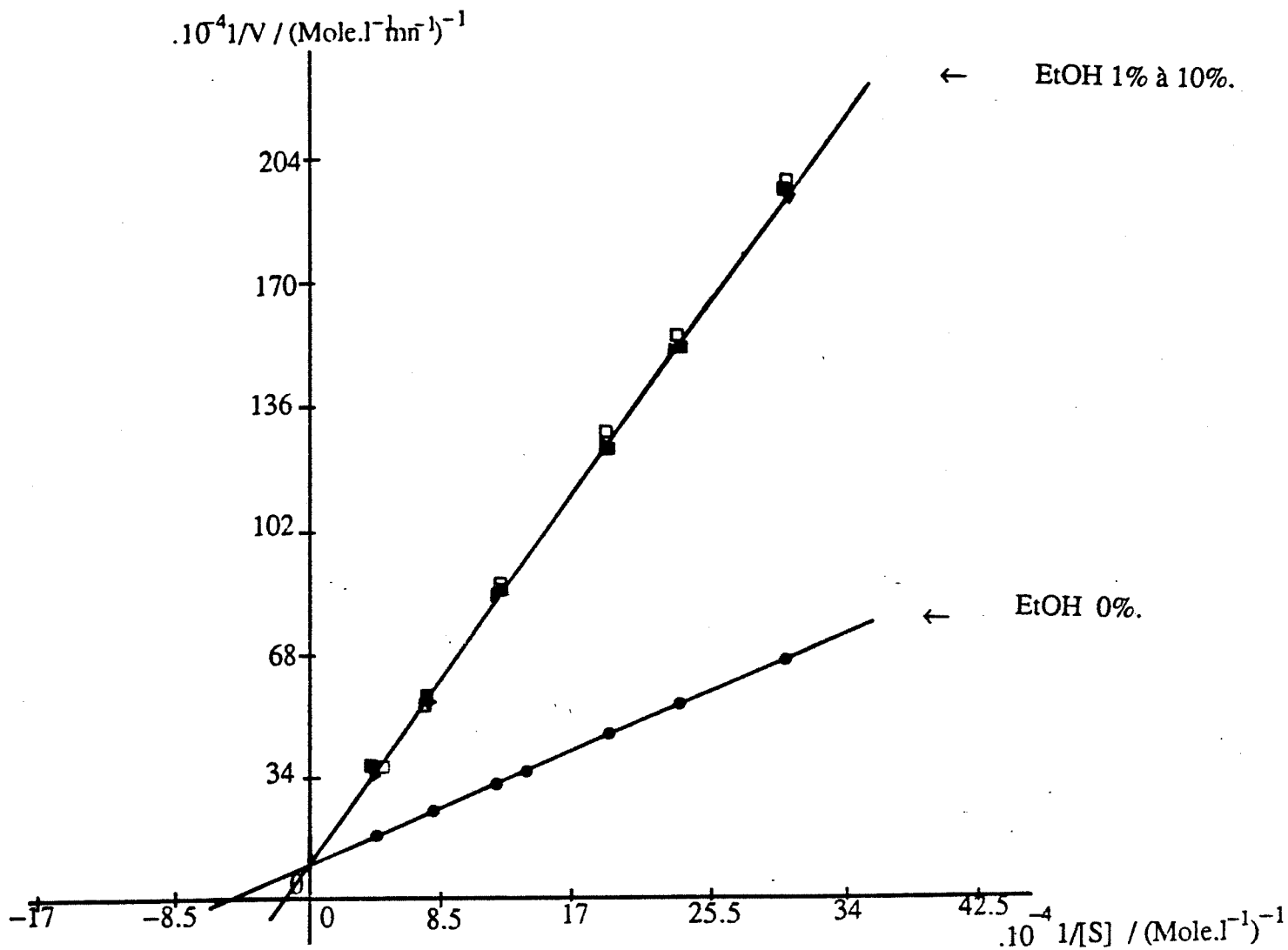
La détermination des constantes  $K_m$  et  $V_m$  (Tableau II) faite d'après la figure 16, montre que pour toutes les concentrations en éthanol utilisées, le  $V_m$  ne varie pas, alors que le  $K_m$  augmente de  $2,2.10^{-5}M$  à  $5,7.10^{-5}M$ ; cette dernière valeur de  $K_m$  est obtenue pour toute la gamme de concentration d'éthanol utilisée: 1% à 10% (v/v). On peut en déduire que l'effet dénaturant induit par l'éthanol sur la BuChE est à saturation à 1% de ce solvant dans le milieu, ce qui correspond à 0,17 M en termes de concentration molaire. Cet effet dénaturant peut être attribué à une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son substrat quand l'éthanol est présent dans le milieu, ou encore à une modification de la vitesse d'hydrolyse du complexe enzyme-substrat, puisque  $K_m = (k_{-1} + k_{+2}) / k_{+1}$ . Les deux effets peuvent aussi être conjugués.

Une conclusion plus définitive pourrait être donnée en effectuant des expériences supplémentaires, en particulier en abaissant le pourcentage d'éthanol dans la solution. Ces expériences n'ont pas été effectuées car il convenait pour nous de travailler en présence de concentrations d'éthanol suffisamment élevées pour pouvoir dissoudre les inhibiteurs par la suite.

ETHANOL	$K_m$ (M)	$V_m$ (M/min)	METHANOL	$K_m$ (M)	$V_m$ (M/min)
0%	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$11 \cdot 10^{-6}$	0%	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$11 \cdot 10^{-6}$
1%	$5,7 \cdot 10^{-5}$	"	1%	"	$9,0 \cdot 10^{-6}$
3%	$5,7 \cdot 10^{-5}$	"	3%	"	$6,6 \cdot 10^{-6}$
5%	$5,7 \cdot 10^{-5}$	"	5%	"	$5,1 \cdot 10^{-6}$
10%	$5,7 \cdot 10^{-5}$	"	10%	"	$3,0 \cdot 10^{-6}$

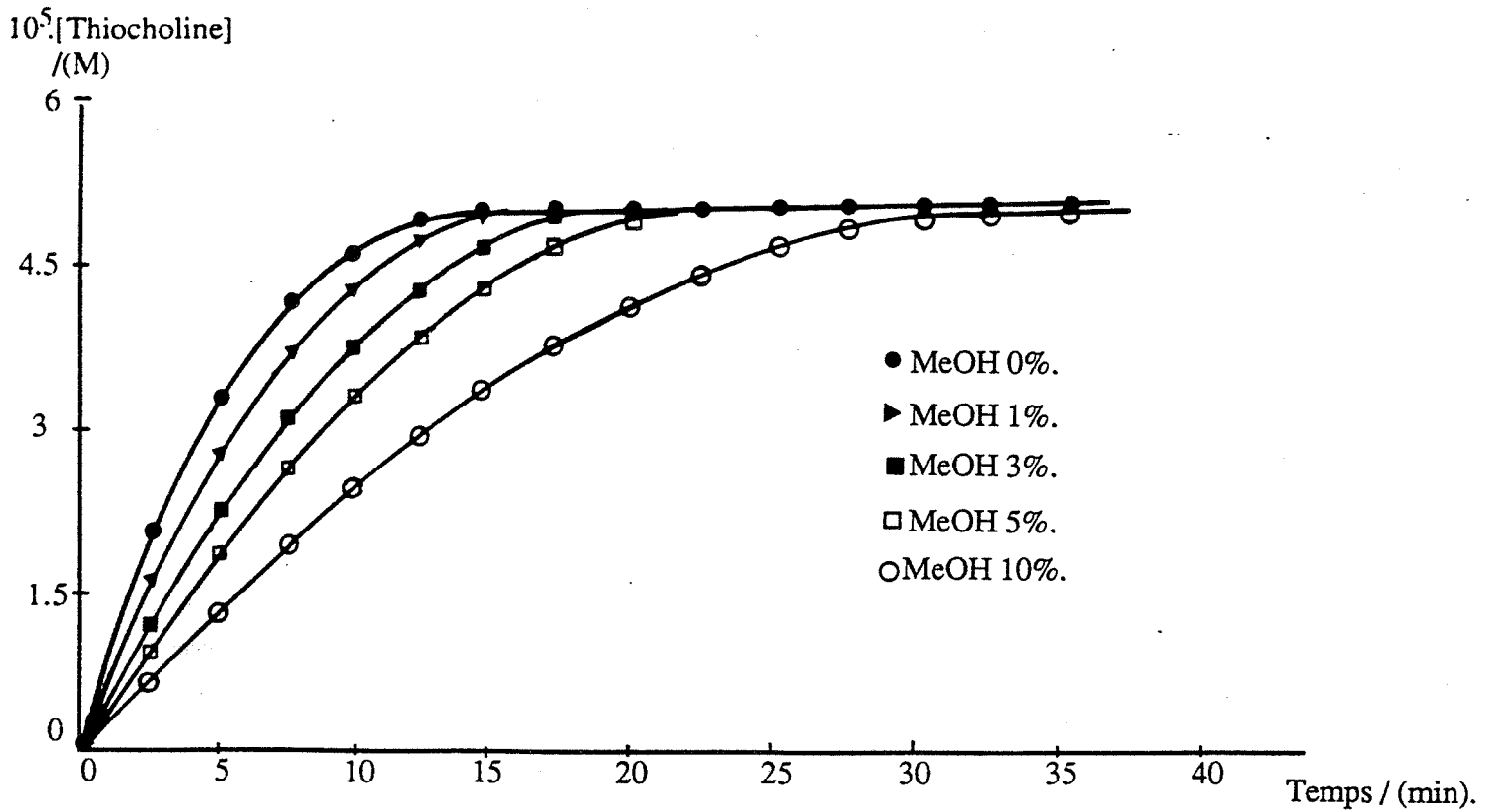
**TABLEAU II: Evolution des constantes de Michaelis de la BuChE en présence d'éthanol et de méthanol**





**Figure-16:** Représentation de Lineweaver-Burk pour la BuChE en présence d'éthanol.

Conditions opératoires: les mêmes que pour la figure 15, avec plusieurs concentrations de substrat de travail.



**Figure-17:** Evolution de la vitesse d'hydrolyse du substrat BuSChCl par la BuChE, en présence de concentrations croissantes de méthanol.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}\text{M}$ ,  $\text{pH}=7,2$ ,  $T=22^\circ\text{C}$ .

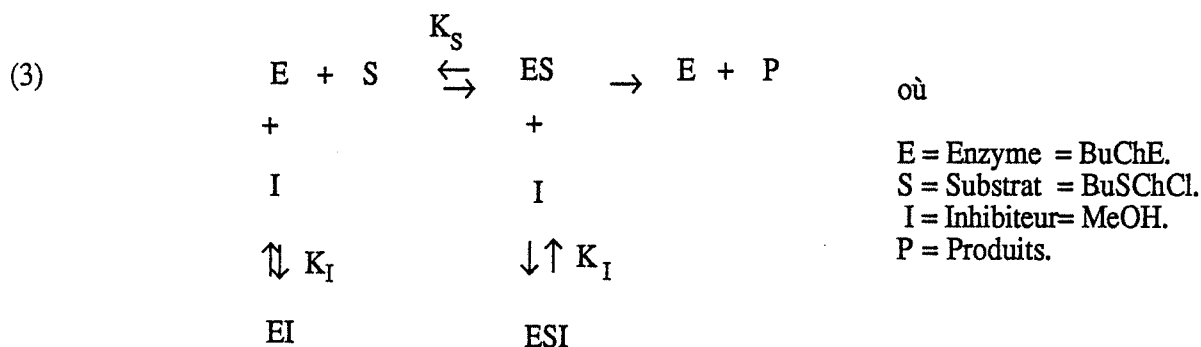
Concentration de travail en substrat BuSChCl:  $10^{-5}\text{M}$ ; 4 unités de BuChE.

Concentration de D.T.N.B.:  $10^{-4}\text{M}$ . Méthanol: 1 à 10% (v/v).

### D-I-3 - Influence du méthanol

La méthodologie appliquée avec l'éthanol a été reprise pour le méthanol. Pour des concentrations de ce solvant allant de 1% à 10% (v/v) dans le tampon de travail, la cinétique enzymatique d'hydrolyse du substrat (BuSChCl) diminue progressivement, comme le montre la Figure 17. La méthode de Lineweaver-Burk (Figure 18) a été utilisée pour la détermination des constantes de Michaelis  $K_m$  et  $V_m$  de la BuChE en présence de méthanol, résumées dans le tableau II. L'influence du méthanol sur la réaction enzymatique se traduit par une diminution progressive du  $V_m$  de  $11.10^{-6}$  M/l.min à  $3,0.10^{-6}$  M/l.min, alors que le  $K_m$  reste constant.

Cet effet peut être expliqué en termes d'inhibition non-compétitive (Paragraphe B-II du chapitre 1). Les caractéristiques cinétiques de ce type d'inhibition sont brièvement rappelées dans le schéma réactionnel suivant:



La cinétique de la réaction s'écrit alors:

$$(4) \quad v = V'_m \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{où } V'_m = \frac{V_m}{1 + [I]/K_I} \quad \text{et } K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} .$$

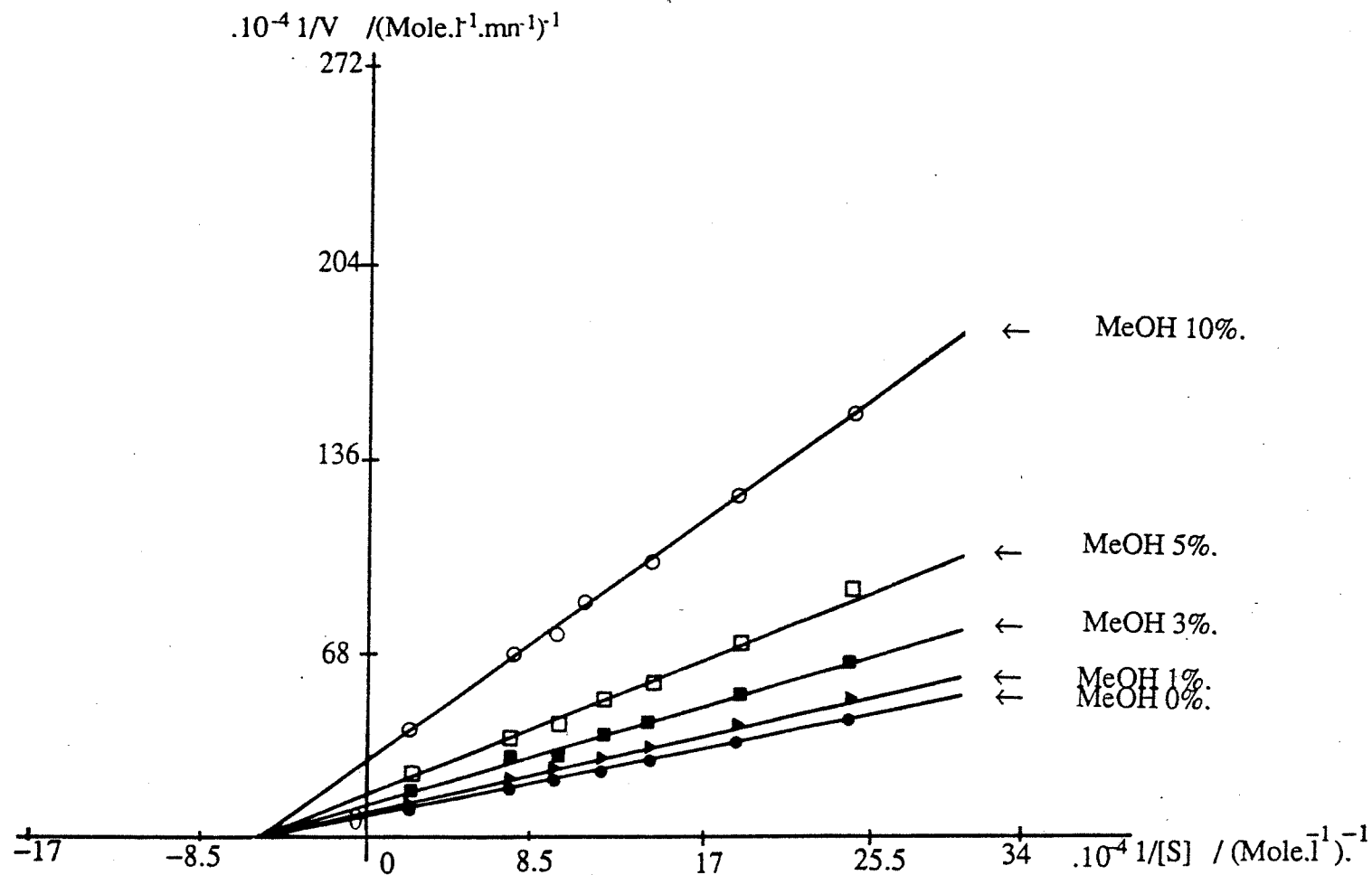
D'après les valeurs de  $V_m$  du tableau II, on peut déduire que  $K_I = 1M$ , dans le cas d'une inhibition non-compétitive de la BuChE par le méthanol.

## D-II - INFLUENCE DE L'ETHANOL ET DU METHANOL SUR L'ELECTRODE A BUCHE - DETECTION D'INHIBITEURS EN MILIEU HYDRO-ALCOOLIQUE

### D-II-1 - Impact de l'éthanol et détection de thiram

L'électrode enzymatique, utilisée en présence de pourcentages d'éthanol allant de 1% à 10% (v/v) ne présente aucune modification de son comportement contrairement à ce qui était observé en phase homogène. Ceci peut être attribué au fait que l'enzyme est dans ce cas immobilisée et donc figée dans une structure rigide. Sa conformation et son site actif sont

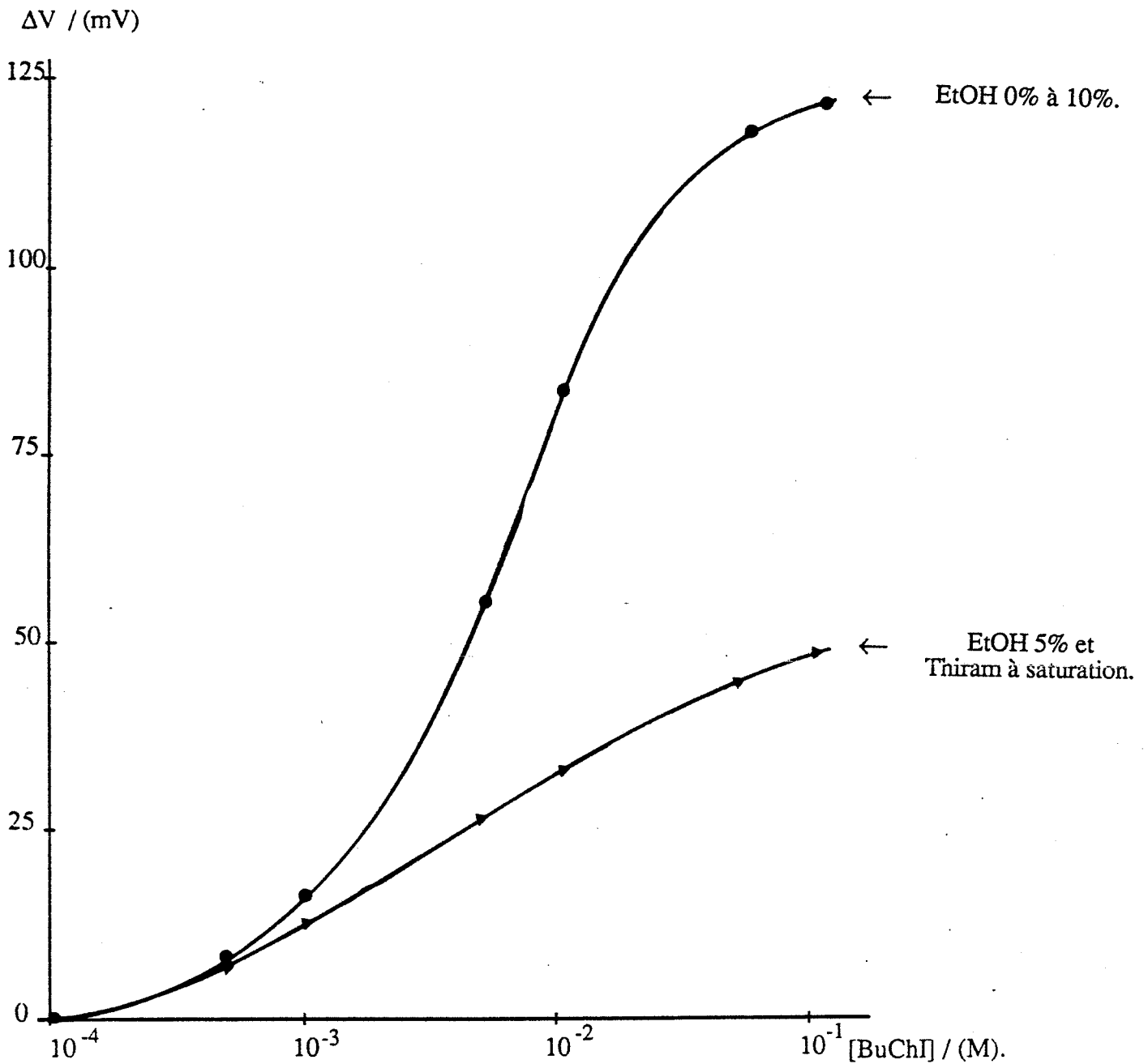




**Figure-18:** Représentation de Lineweaver-Burk pour la BuChE en présence de méthanol.

Conditions opératoires: les mêmes que pour la figure 17, avec plusieurs concentrations de substrat de travail.





**Figure-19:** Courbes d'étalonnage d'une membrane à BuChE:

Dans un mélange tampon phosphate-éthanol.

Après incubation de 30 min dans une solution de tampon phosphate à 5% d'éthanol, et à saturation en thiram.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$ M, pH=7,2, T=22°C. Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE.

protégés par le micro-environnement formé par la membrane enzymatique contre les effets de solvants.

Ce résultat est important puisque la détection d'inhibiteurs dans un mélange tampon phosphate-éthanol peut être faite sans interférences de ce solvant, du moins jusqu'à des concentrations de 10% (v/v).

La détection de carbamates solubles dans l'éthanol a été menée en suivant la même méthodologie que pour la détection du paraoxon (Paragraphe C du chapitre 3) .

La Figure 19 a été obtenue avec le thiram ou tétramethylthiuram disulfide[bis(dimethylthiocarbamyl)-disulfide]. Cet inhibiteur, dissous à saturation dans l'éthanol, est rajouté dans le tampon phosphate de travail habituel, la concentration finale de l'alcool atteignant 5%. Après un temps d'incubation de l'électrode de 30 minutes dans ce milieu, la courbe d'étalonnage tracée montre une inhibition effective de la membrane enzymatique, et donc un comportement du thiram vis-à-vis de la BuChE immobilisée analogue à celui du paraoxon.

Cette inhibition est toutefois plus facilement réversible que celle causée par les organophosphorés. Des lavages prolongés (au tampon phosphate) de la membrane enzymatique inhibée suffisent à lui restituer son activité catalytique de départ.

Le zhiram (diméthylidithiocarbamate) a été testé avec des résultats analogues.

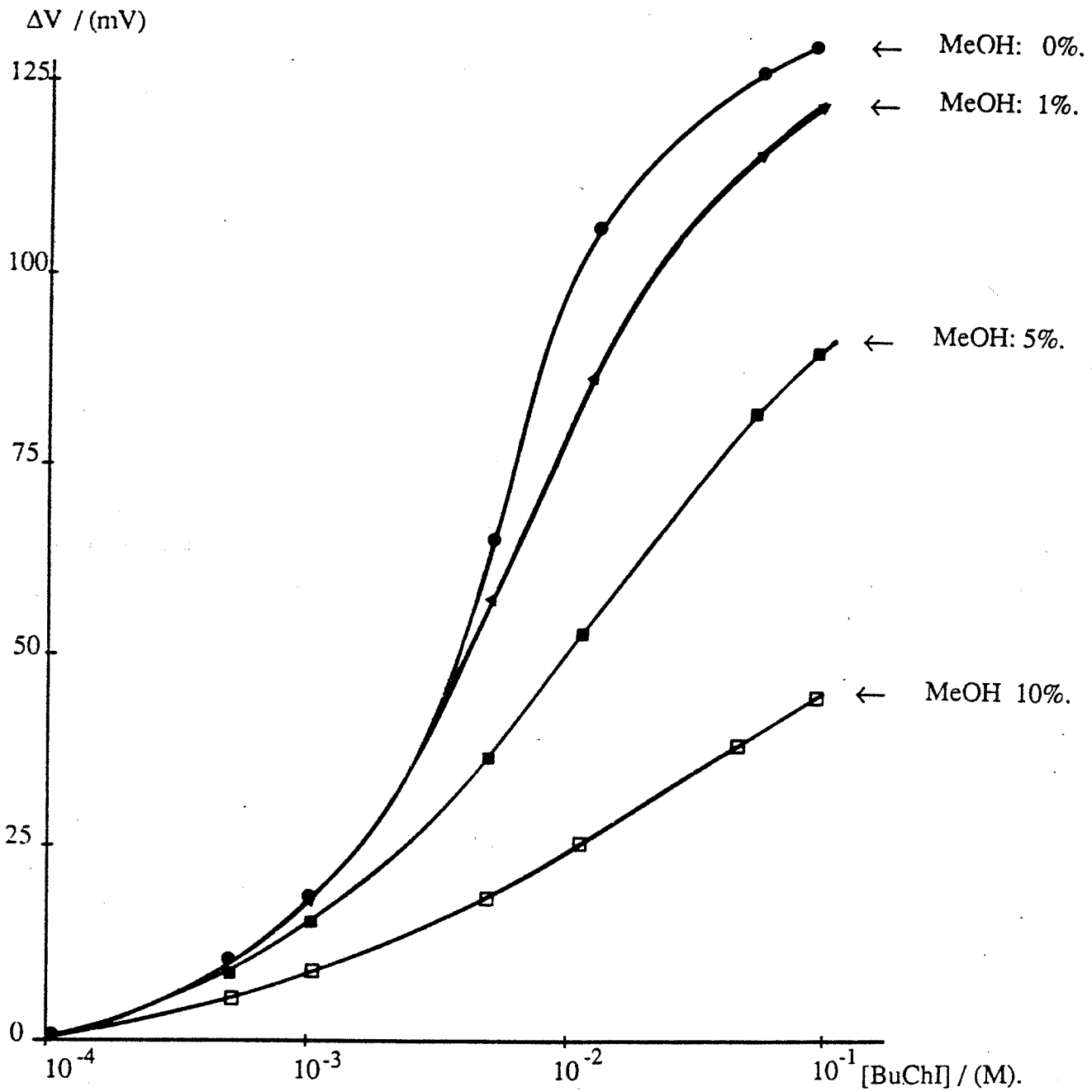
#### **D-II-2 - Impact du méthanol et détection d'ethion.**

La présence de méthanol, à partir de taux de 1%, dans le milieu réactionnel d'une électrode à BuChE se traduit par la modification de son comportement comme le montre la Figure 20. On confirme ici les résultats obtenus en phase homogène: le méthanol réagit comme un inhibiteur de la BuChE et non simplement comme un solvant. Cet effet est réversible puisque après élimination du méthanol du milieu réactionnel, et lavage de l'électrode, la membrane enzymatique retrouve exactement ses capacités catalytiques de départ.

En conséquence, pour limiter les interférences du méthanol sur les réponses de l'électrode, on se limitera à utiliser des mélanges réactionnels: tampon phosphate-méthanol 1%. D'autre part, la courbe d'étalonnage (en substrat) utilisée pour déterminer le pourcentage d'inhibition d'un pesticide sera celle obtenue dans le mélange tampon-méthanol et non celle obtenue dans le tampon seul.

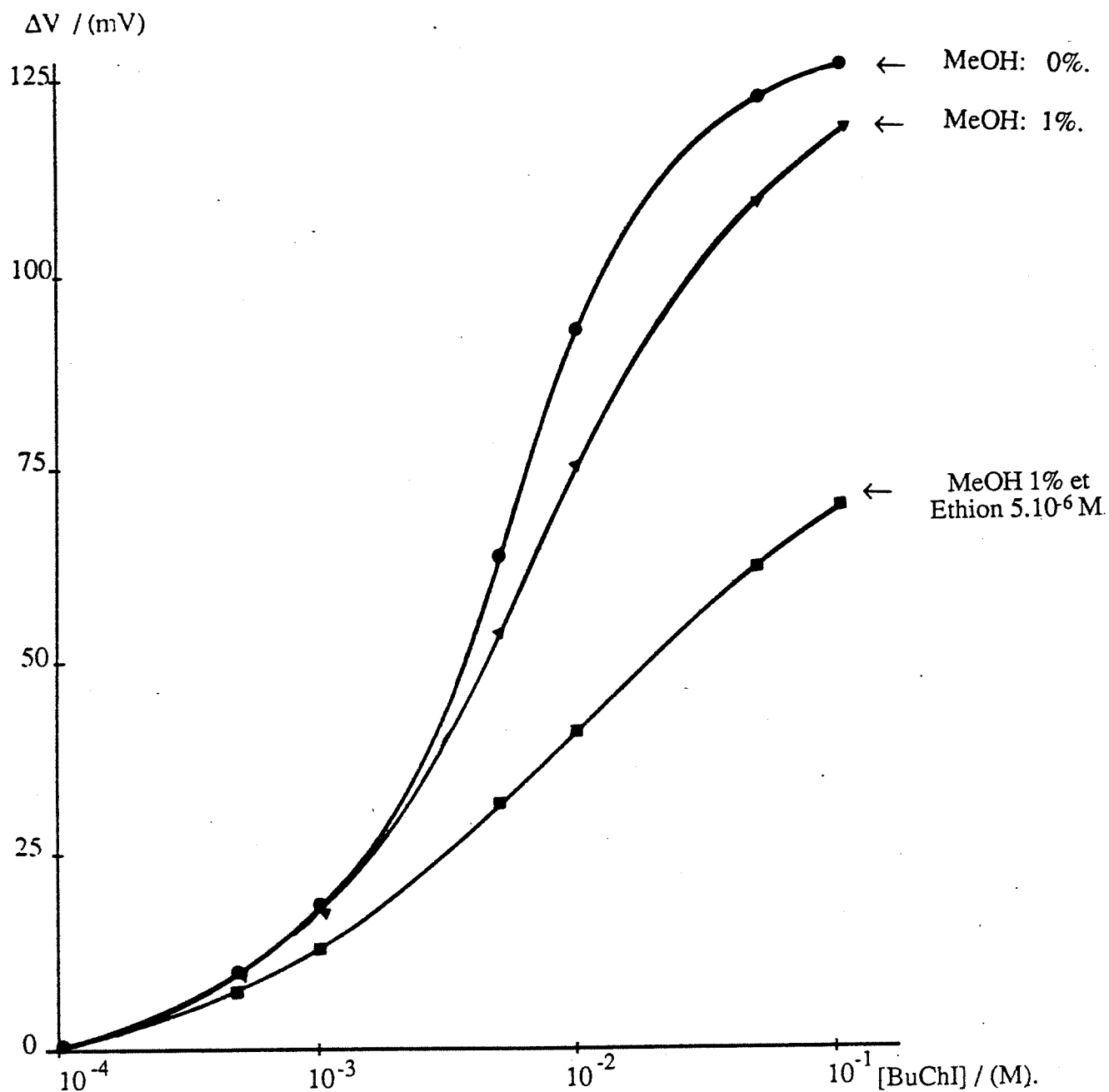
La figure 21 montre que la détection d'ethion par l'électrode enzymatique dans ce milieu est possible, moyennant le réétalonnage de la membrane en présence de méthanol.

**Conclusion :**



**Figure-20:** Influence de la présence de méthanol sur la courbe d'étalonnage d'une membrane à BuChE.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$ M, pH=7,2, en solution avec des concentrations de 1 à 10% en méthanol,  $T=22^{\circ}\text{C}$ . Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE.



**Figure-21:** Courbes de réponse de l'électrode vis-à-vis du substrat:

Dans du tampon phosphate.

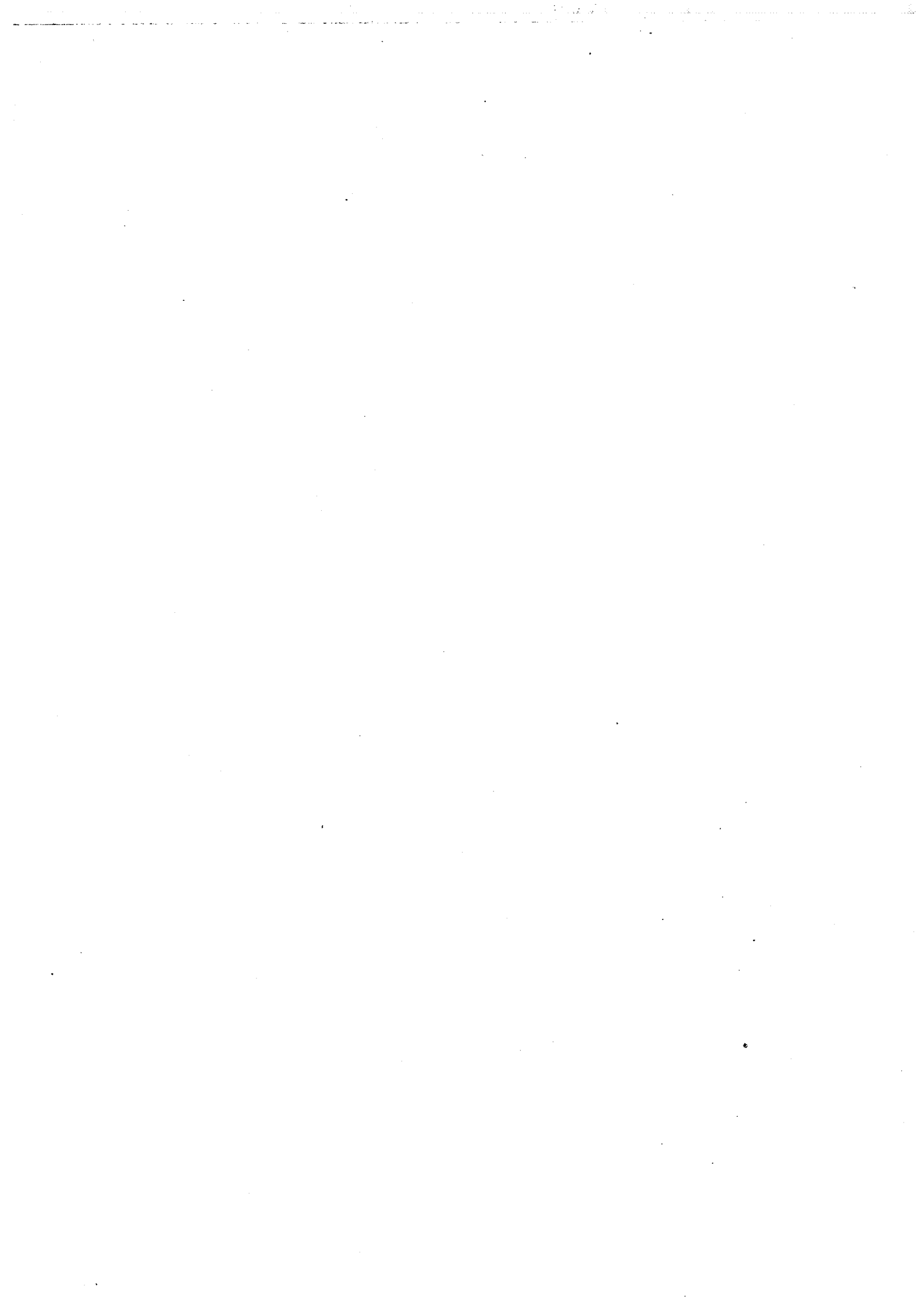
Dans une solution de tampon phosphate à 1% de méthanol.

Après incubation de 30 min dans une solution de tampon phosphate à 1% de méthanol, et  $5 \cdot 10^{-6}$  M en éthion.

Mêmes conditions opératoires que pour la Figure 20.



La détection par électrode à BuChE d'organophosphorés et de carbamates insolubles dans l'eau est possible dans un milieu hydro-alcoolique, moyennant des précautions, en particulier pour le méthanol : le réétalonnage de la membrane enzymatique est dans ce cas nécessaire.



## E - INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE

Les enzymes sont des polyélectrolytes, et leur charge globale est sensible à la présence de sels dans le milieu. Deux effets sont à retenir:

- La présence de sels contribue à la stabilisation de la structure tertiaire de la molécule enzymatique (Figure 22) : à trop faible concentration ionique, les charges de l'enzyme, et plus particulièrement celles des résidus présents à sa surface, ne sont plus équilibrées par les charges contraires des ions de la solution [85] ; il en résulte une déstabilisation de la structure tertiaire. A forte concentration ionique, la solubilité de la protéine diminue selon l'équation

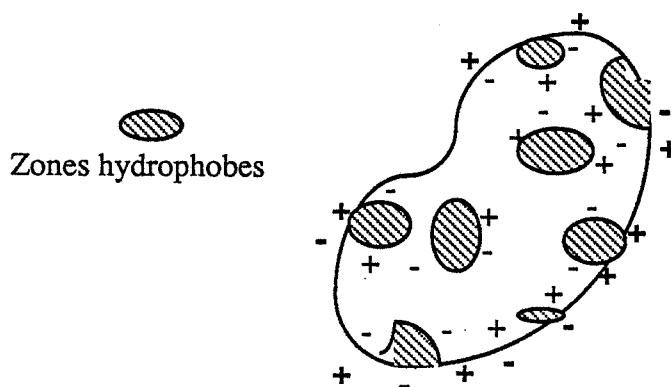
$$\log S = \log S_0 - m \cdot [\text{Sel}] \quad [86].$$

où :  $\log S_0$  = solubilité dans un milieu de force ionique nulle.

$m$  = constante indépendante de la température et du pH.

- Un effet cinétique direct peut intervenir dans la réaction intermédiaire de formation du complexe activé [87]. Cet effet peut se traduire par une augmentation de la vitesse ( $\text{Ca}^{2+}$  sur ChE [88]) ou par une diminution ( $\text{NaF}$  sur uréase [59]) suivant la nature du sel, sa concentration, et la nature de l'enzyme.

On a donc intérêt à toujours utiliser les enzymes dans un milieu à force ionique contrôlée et constante.

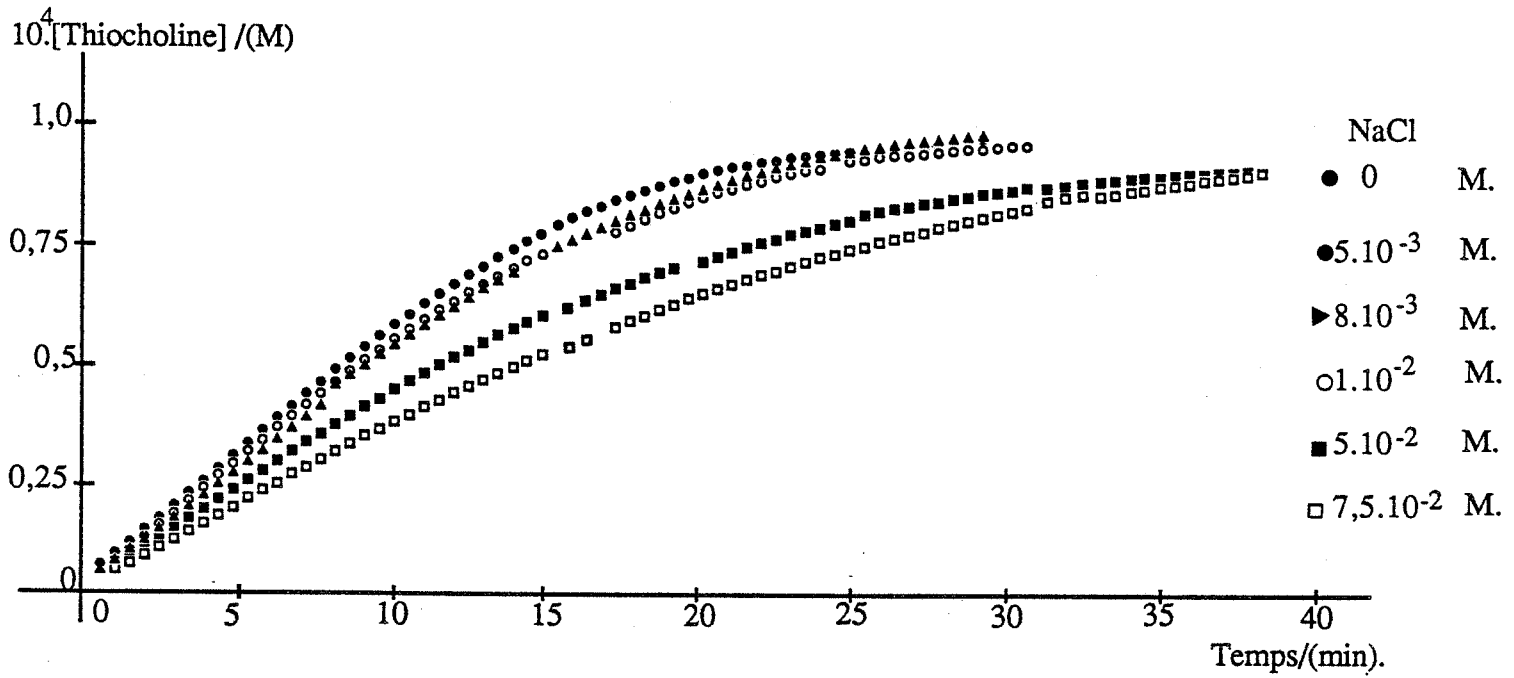


**Figure 22: Distribution des charges et zones hydrophobes à la surface d'une protéine.**

L'effet de sels sur la BuChE a été étudié [31] surtout pour précipiter cette molécule : pour NaCl de 2,5 à 4M, elle précipite, au-delà, elle est dénaturée.

L'étude qui suit porte sur les effets cinétiques de sels sur la BuChE pour des concentrations inférieures à 1M.





**Figure-23:** Cinétique d'hydrolyse du substrat BuSChCl par la BuChE, en présence de concentrations croissantes en NaCl.

Conditions opératoires: tampon phosphate 10<sup>-2</sup>M, pH=7,2, T=22°C.

Concentration de travail en substrat BuSChCl: 10<sup>-4</sup>M; 4 unités de BuChE.

Concentration de D.T.N.B.: 10<sup>-4</sup>M. Concentrations en NaCl: 5.10<sup>-3</sup> à 7,5.10<sup>-2</sup>M.

## E-I- INFLUENCES CINÉTIQUES DE NaCl SUR LA BUCHE EN MILIEU HOMOGÈNE

### E-I-1 - Mode opératoire :

Comme pour l'étude portant sur les alcools, c'est la méthode d'Ellman qui a été utilisée[55]. Les constantes de Michaelis  $K_m$  et  $V_m$ , en l'absence et en présence de sels ont été déterminées graphiquement, par la méthode de Lineweaver-Burk.

### E-I-2 - Résultats

Pour une concentration donnée ( $5 \cdot 10^{-5} M$ ) en substrat de la réaction enzymatique, BuSChCl, l'évolution des courbes Abs = f(t) à concentration croissante en NaCl se traduit par une diminution progressive de la vitesse de la réaction comme le montre la Figure 23.

Du tracé des droites de Lineweaver-Burk, à concentration croissante en NaCl (Figure 24), résultent les constantes  $K_m$  et  $V_m$ , résumées dans le tableau III.

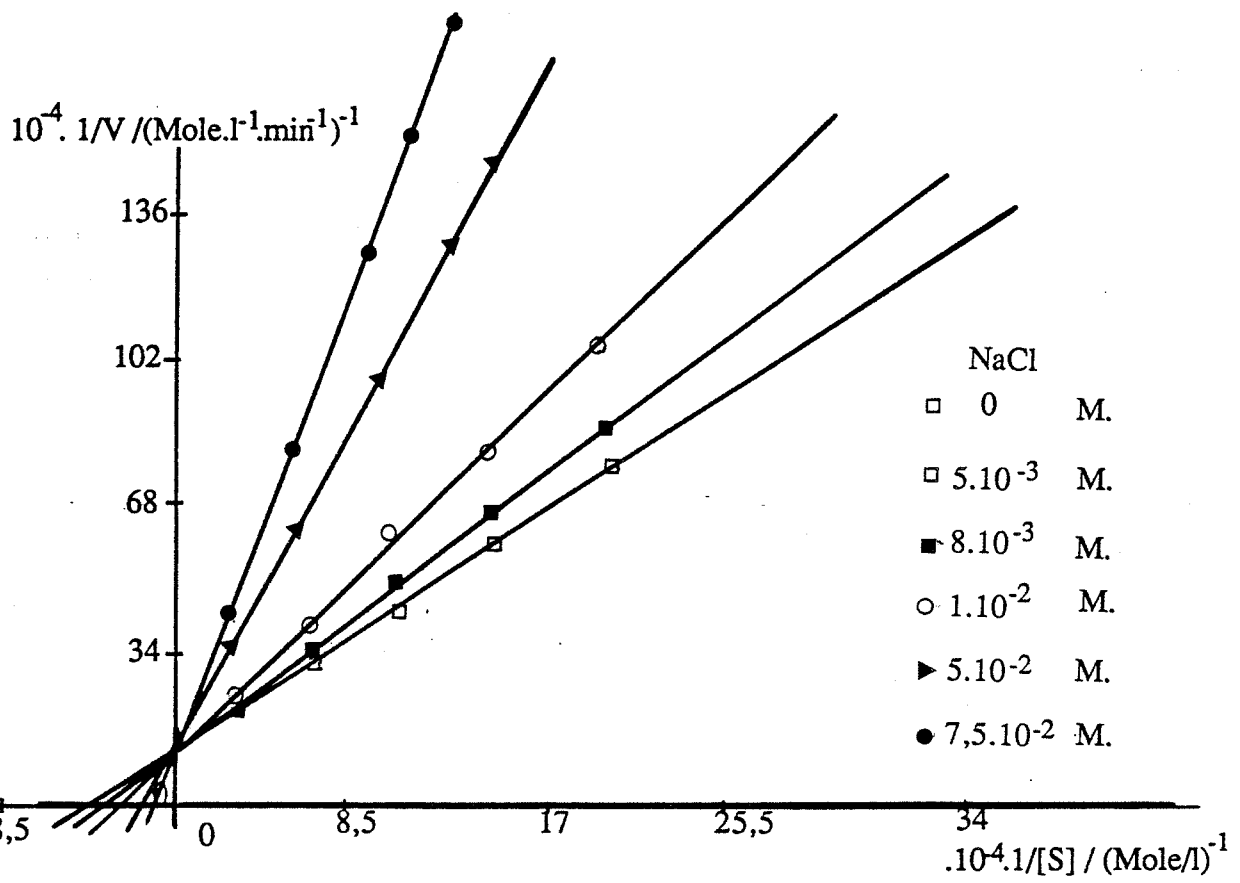
[NaCl] / (M)	$K_m$ / (M)	$V_m$ / (M/min)
0	$2,6 \cdot 10^{-5}$	$7,35 \cdot 10^{-6}$
$5 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$	" "
$8 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	" "
$1 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	" "
$5 \cdot 10^{-2}$	$5,2 \cdot 10^{-5}$	" "
$7,5 \cdot 10^{-2}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	" "

**TABEAU III: Evolution des constantes  $K_m$  et  $V_m$  à concentration croissantes en NaCl.**

On constate que:

- des concentrations en sel inférieures à  $5 \cdot 10^{-3} M$  ne modifient pas les constantes cinétiques de la réaction d'hydrolyse de la BuSChCl catalysée par la BuChE.

- pour des concentrations supérieures à  $5 \cdot 10^{-3} M$  en NaCl, la constante  $V_m$  reste inchangée, alors que  $K_m$  augmente.



**Figure-24:** Représentation de Lineweaver-Burk pour la BuChE en présence de NaCl.

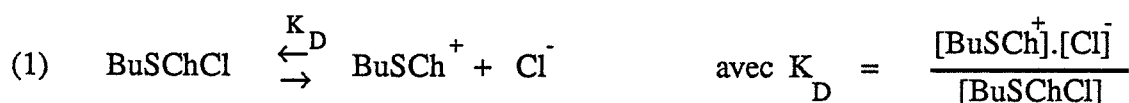
Mêmes conditions opératoires que pour la Figure 23, avec plusieurs concentrations en substrat.

En faisant varier le substrat de la réaction : BuSChI, BuSChCl, BuSCh Br, nous avons constaté que l'effet de la force ionique sur la réaction enzymatique, dans la gamme de concentrations testée, variait en fonction de la nature de l'halogène qu'il portait. Pour cette raison, nous avons cherché à expliquer l'augmentation observée de  $K_m$  par un effet direct du sel sur le substrat et non sur l'enzyme. Nous proposons un modèle théorique pour appuyer cette explication.

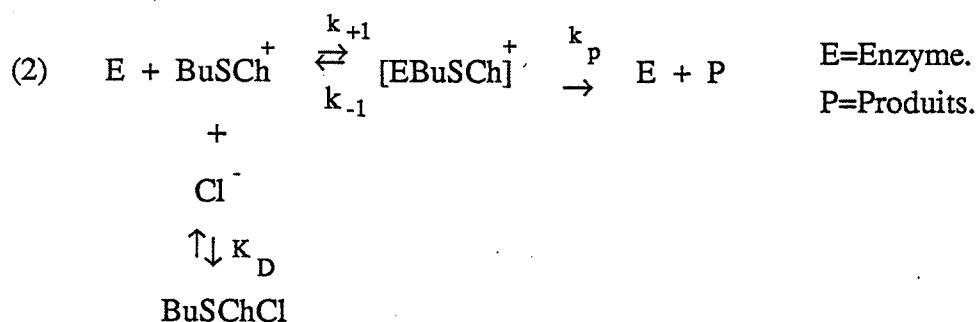
**E-I-3-Modèle proposé rendant compte des effets de sels.**

*a) Exposé du modèle:*

Nous supposons l'équilibre de dissociation suivant pour le substrat :



L'ensemble de la réaction enzymatique prenant en compte cet équilibre est schématisé en (2):



Si on pose :      à  $t=0$        $[\text{BuSChCl}]_{t=0} + [\text{BuSCh}^+]_{t=0} = S_0$   
                           à  $t>0$        $[\text{BuSChCl}] + [\text{BuSCh}^+] = S_0 - P = S$

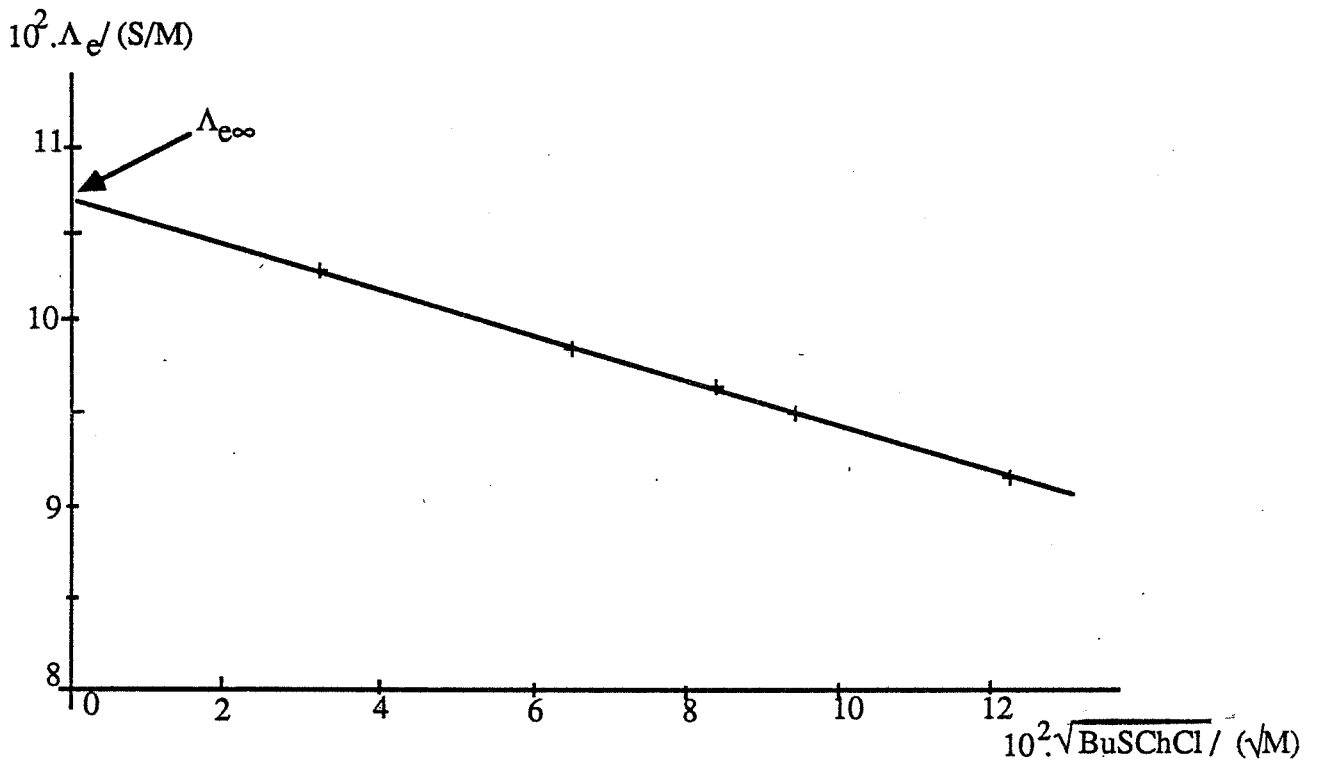
Alors  $K_D = \frac{[\text{BuSCh}^+][\text{Cl}^-]}{[\text{BuSChCl}]} = \frac{[\text{BuSCh}^+][\text{Cl}^-]}{S - [\text{BuSCh}^+]}$       Soit  $[\text{BuSCh}^+] = \frac{S \cdot K_D}{K_D + [\text{Cl}^-]}$

L'expression de la vitesse d'hydrolyse du substrat devient :

$$v = V_m \frac{[\text{BuSCh}^+]}{K_m + [\text{BuSCh}^+]} = V_m \frac{S}{S + K_m \left( 1 + \frac{[\text{Cl}^-]}{K_D} \right)}$$

soit encore  $v = V_m \frac{S}{K_m^* + S}$       avec       $K_m^* = K_m \left( 1 + \frac{[\text{Cl}^-]}{K_D} \right)$

*L'expression de la vitesse n'est modifiée que pour le  $K_m$ .*



**Figure-25:** Tracé de la droite  $\Lambda_e = f(\sqrt{[\text{BuSChCl}]})$ , pour la détermination de  $\Lambda_{e\infty}$

b) Détermination de  $K_D$  :

Elle a été faite par conductimétrie.

On note  $\lambda$  la conductivité d'une solution de BuSChCl de concentration  $S_0$ , dans de l'eau bi-distillée, mesurée sous barbottage d'azote, à 25°C; on note  $\Lambda_e = \lambda / S$  sa conductivité équivalente.

Le tracé de la droite  $\Lambda = f(\sqrt{S})$  de la figure 25, permet de déterminer par extrapolation  $\Lambda_\infty$  qui est la conductivité équivalente à dilution infinie de la BuSChCl [89].

$$K_D = \frac{[\text{BuSCh}^+].[\text{Cl}^-]}{[\text{BuSChCl}]} = \frac{c^2}{c_0 - c} \quad \text{où} \quad \begin{cases} c = [\text{BuSCh}^+] = [\text{Cl}^-] \\ c_0 = [\text{BuSCh}^+] + [\text{BuSChCl}] \end{cases}$$

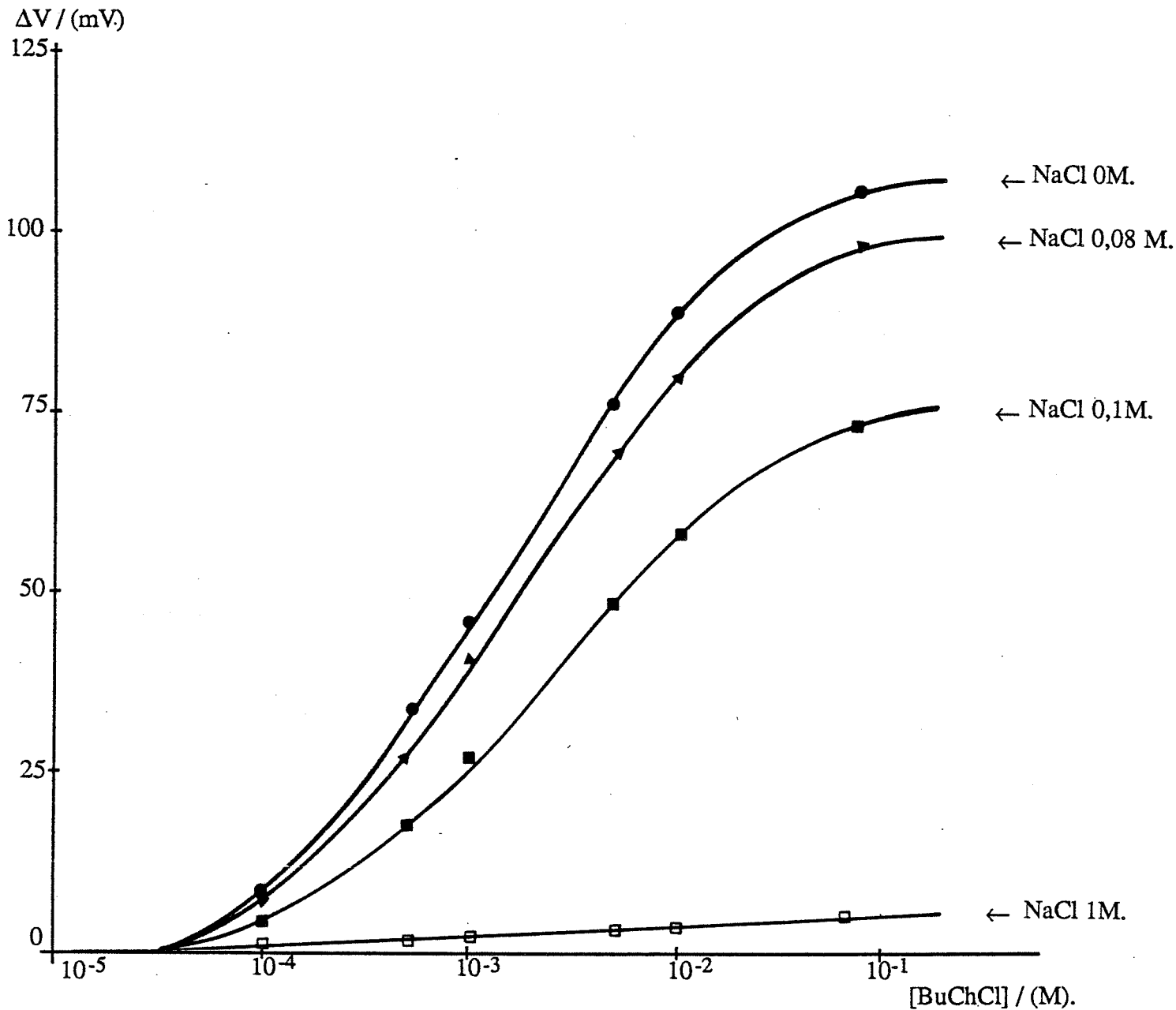
$$\text{On pose} \quad \delta = \frac{c}{c_0} = \frac{\Lambda_e}{\Lambda_\infty} \quad \text{Alors} \quad K_D = \frac{c_0^2 (c/c_0)^2}{c_0 (1-c/c_0)}$$

$$K_D = S_0 \frac{\delta^2}{1 - \delta}$$

Par cette méthode nous avons obtenu :  $\Lambda_{e\infty} = 0,107 \text{ S}$ , et  $K_D = 4,98.10^{-2}\text{M}$ .

c) Adéquation théorie - expérience

Le tableau IV met en parallèle les constantes  $K_m$  déterminées par l'expérience en présence de NaCl, et les constantes  $K_m$  calculées théoriquement à partir de l'équation (3) avec  $K_D = 4,98.10^{-2}\text{M}$ .



**Figure-26:** Influence de la présence de NaCl sur la courbe d'étalonnage d'une membrane à BuChE.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$  M, pH=7,2,

Présence de NaCl à des concentrations de  $8 \cdot 10^{-2}$  M à 1 M, T=22°C.

Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE.

[NaCl] / (M)	$K_m$ graphique / (M)	$K_m^*$ calculé / (M)
0	$2,6 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$
$5 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$
$8 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$
$1 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^{-5}$
$5 \cdot 10^{-2}$	$5,2 \cdot 10^{-5}$	$5,2 \cdot 10^{-5}$
$7,5 \cdot 10^{-2}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$6,5 \cdot 10^{-5}$

**TABLEAU IV: Parallèle entre les constantes  $K_m$  mesurées graphiquement et les constantes  $K_m^*$  calculées.**

L'accord entre  $K_m$ (graphique) et  $K_m^*$  (calculé) nous permet de conclure que le modèle théorique proposé rend bien compte des observations de l'expérience.

***Conclusion :***

La littérature citée au début de ce paragraphe attribuait les effets cinétiques dûs aux sels dans les réactions enzymatiques à une interaction directe sel-enzyme. Nous avons pu mettre en évidence le fait que, à des concentrations salines inférieures à 0,1M, les effets observés peuvent être expliqués en terme de déplacement de l'équilibre de dissociation du substrat. Nous avons confirmé ce résultat en phase hétérogène.

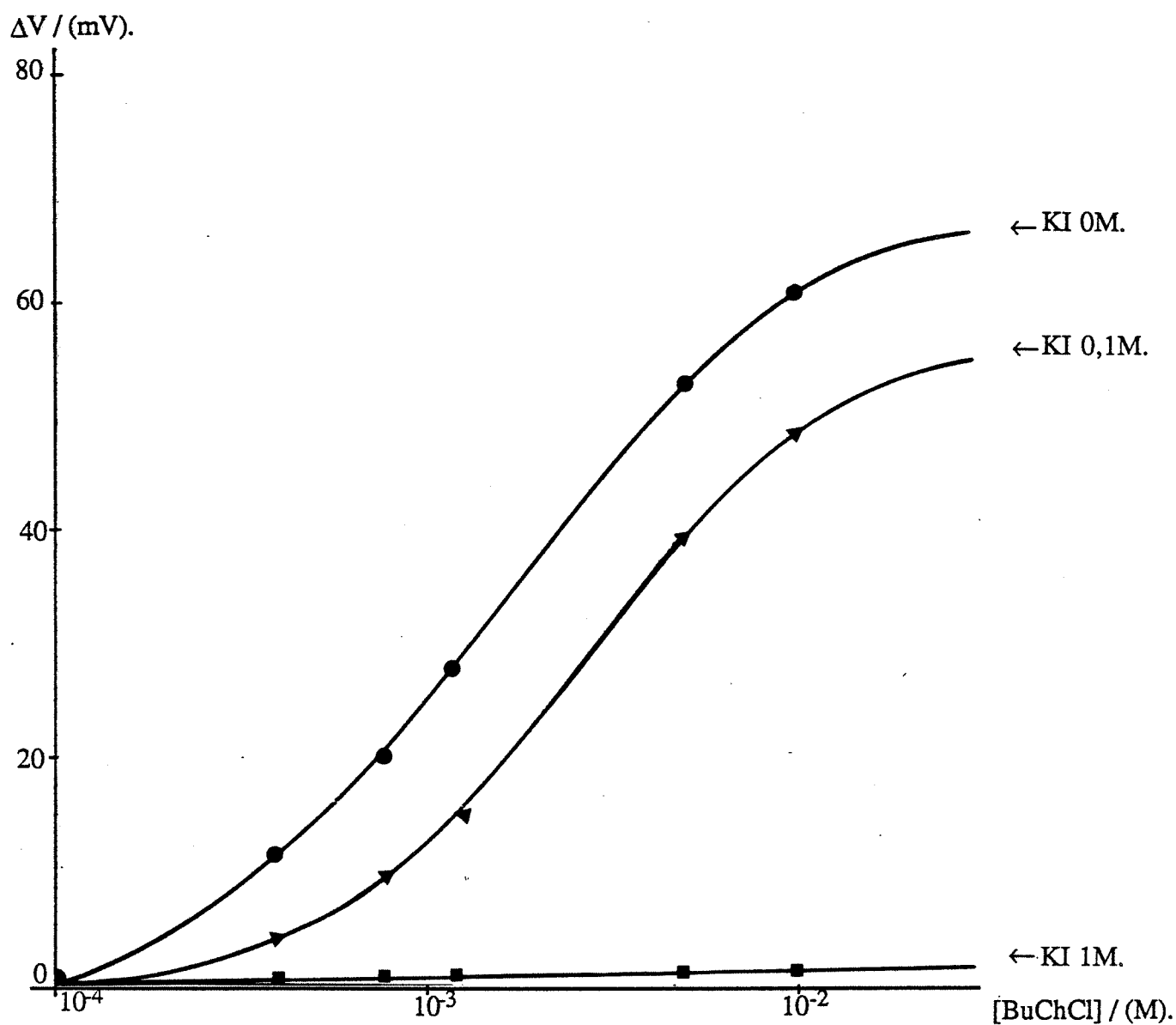
**E-II - EFFETS DE SELS EN PHASE HETEROGENE - REVERSIBILITE**

**E-II-1 - Conditions opératoires**

Il a d'abord été vérifié que les concentrations en sel utilisées ne modifiaient pas le comportement du couple électrode de travail électrode de référence.

L'étude a ensuite été menée sur une électrode à BuChE (4 unités théoriques sur la membrane), dans les conditions habituelles de tampon ( $10^{-2}$ M, pH = 7,5) de température ( $22^\circ\text{C}$ ) et de substrat: BuChI  $10^{-4}$ M à  $5 \cdot 10^{-2}$ M; les tests de l'activité enzymatique de l'électrode ont été effectués à plusieurs concentrations salines. L'électrode est ensuite rincée, et réutilisée en l'absence de sels pour vérifier la réversibilité de leurs effets.





**Figure-27:** Influence de la présence de KI sur la courbe d'étalonnage d'une membrane à BuChE.

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}$ M, pH=7,2, présence de KI à des concentrations  $10^{-1}$ M et 1M, T=22°C. Caractéristique de la membrane: 4Unités de BuChE.

### **E-II-2 - Résultats**

Les essais qui ont été effectués avec les deux sels : NaCl, KI, sont résumés sur les Figures 26 et 27. D'autres sels (NaF, NaBr, KCl) ont été utilisés avec des résultats équivalents.

Comme le laissaient prévoir les résultats obtenus en phase homogène, on observe, à partir de concentrations salines de  $10^{-2}M$ , une diminution de la réponse de l'électrode enzymatique à l'état stationnaire ; pour les plus fortes concentrations (supérieures à  $0,5M$ ) cette réponse s'annule totalement.

Dans tous les cas, mêmes aux plus fortes concentrations testées, il y a réversibilité : la courbe d'étalonnage de l'électrode, réutilisée en l'absence de sels, se superpose parfaitement à la courbe de départ.

Ceci est en accord avec la démonstration faite en phase homogène : le substrat, et non l'enzyme est modifié en présence de sels; quand ceux-ci sont éliminés du milieu, la réaction enzymatique retrouve ses caractéristiques de départ.

#### **Conclusion :**

Pour l'électrode à BuChE, la présence de sels d'halogénures dans le milieu de travail induit une interférence qui se traduit, sur les courbes d'étalonnage, comme une inhibition. Cependant, le risque de confusion avec une vraie inhibition de l'enzyme est faible à cause de la réversibilité totale de cet effet.



## F - REGENERATION DE LA CHOLINESTERASE INHIBEE

Deux pôles d'intérêt ont suscité de nombreuses recherches concernant la régénération de la cholinestérase inhibée par les organophosphorés :

- La mise au point d'antidotes permettant de traiter les sujets intoxiqués accidentellement par les anticholinergiques.

- La possibilité, *in vitro*, de réutiliser l'activité catalytique de l'enzyme après l'inhibition, irréversible spontanément, causée par ces produits.

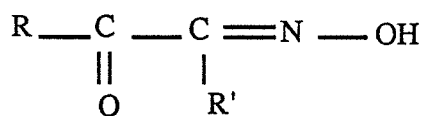
Nous reprendrons dans cette partie l'étude de la régénération de la BuChE inhibée par les antidotes connus, en phase homogène et hétérogène, et nous proposerons ensuite un mode de réactivation que nous avons totalement mis au point : la réactivation par traitement à l'eau oxygénée.

### F-I - MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

L'étude de la régénération par simple lavage ou dialyse des cholinestérases inhibées par les organophosphorés a été menée par plusieurs auteurs (ALDRIDGE [90-91]) depuis 1953 et encore récemment (HOVANEK [92-95] (1977)) ; tous arrivent à la conclusion qu'en milieu basique, et après plusieurs heures, la cholinestérase ne retrouve qu'une partie de son activité, plus ou moins grande suivant la nature exacte de l'inhibiteur.

L'échec de ce type de régénération a conduit à la mise au point de deux familles de molécules susceptibles de régénérer l'enzyme par attaque directe du site actif inhibé : les acides hydroxamiques [96-97] puis les oximes [97-101]. Ces molécules se sont révélées d'autant plus efficaces qu'elles possédaient un caractère nucléophile fort.

Formules générales :

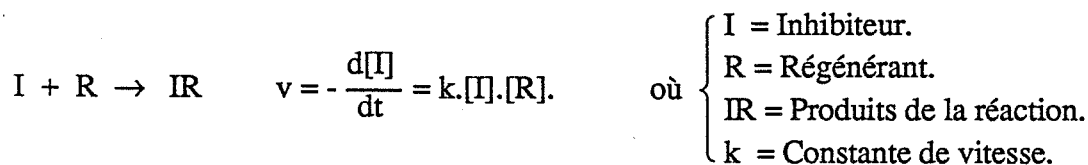


Oximes.

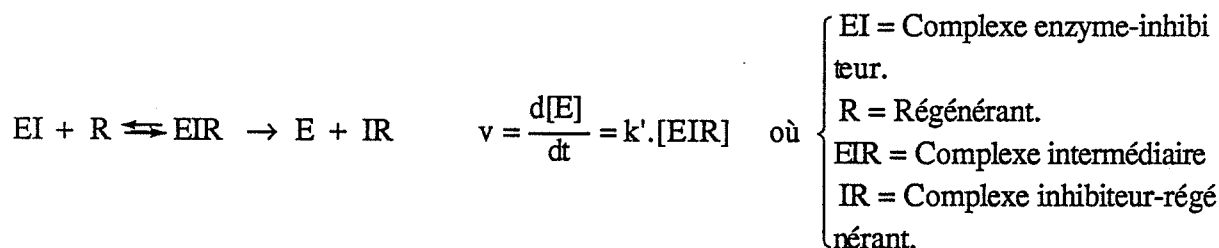
*Deux cinétiques sont étudiées par les auteurs :*

- Cinétique de la réaction inhibiteur-régénérant [102], en l'absence d'enzyme :





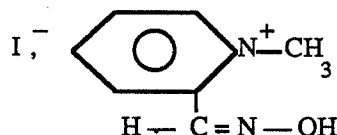
- Cinétique de la réactivation du complexe enzyme-inhibiteur par le régénérant [103-104] :



La constante de vitesse  $k'$  de cette dernière équation n'est pas égale à  $k$  définie plus haut.

Les deux cinétiques sont liées ; il n'y a régénération du complexe enzyme inhibiteur (EI) par le régénérant R que si I et R interagissent. Par contre, on ne trouve pas de corrélation directe entre la vitesse de réaction inhibiteur-régénérant, et la vitesse de la réaction (complexe enzyme-inhibiteur)-régénérant.

Les meilleurs résultats de réactivation de la BuChE inhibée par les organophosphorés sont obtenus avec la PAM<sub>2</sub> de formule:



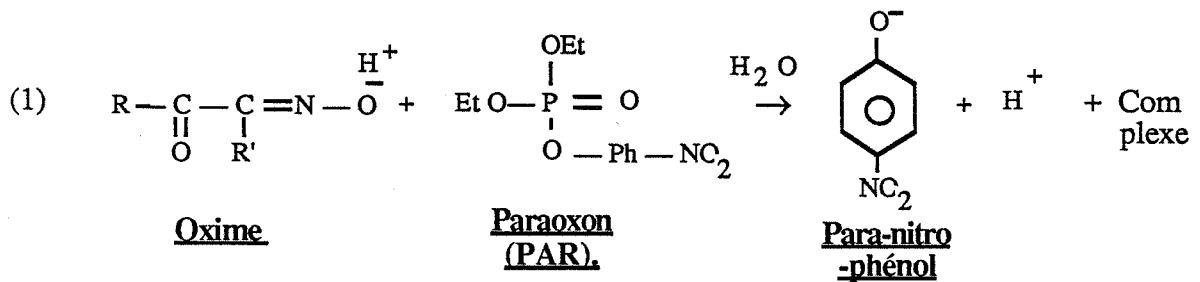
**Méthyl Pyridine Aldoxime 2 ou PAM<sub>2</sub>**

## F-II - CINÉTIQUE DE LA RÉACTION PAM<sub>2</sub> - PARAOXON

Nous avons déterminé cette cinétique en milieu homogène, en suivant pour cela le mode opératoire proposé par GREEN et SAVILLE [102] pour d'autres couples oxime-organophosphoré.

La réaction doit avoir lieu à un pH supérieur au pKa de l'oxime pour favoriser l'attaque nucléophile de celle-ci (schéma réactionnel (1)) sur le phosphore. La cinétique est d'ordre 1 par rapport aux deux constituants.





### F-II-1 - Mode opératoire

L'expérience est effectuée dans 100 ml d'eau permutée, à 0,05M de KCl pour maintenir une force ionique constante, T = 22°C et pH = 8. On introduit le paraoxon à la concentration voulue dans la cellule de travail, puis la PAM<sub>2</sub>.

La production d'acide (para-nitrophénol) est mesurée au pH-stat par titration continue, avec NaOH 5.10<sup>-2</sup>M, à pH constant (paragraphe Matériel du chapitre 2).

### F-II-2 - Résultats

#### - a) Identification :

Le para-nitrophénol, produit de la réaction a été identifié par spectrophotométrie, à sa longueur d'onde d'absorption en milieu basique (420 nm).

#### - b) Détermination de la constante de vitesse :

$$-\frac{d[\text{PAR}]}{dt} = \frac{d[\text{H}^+]}{dt} = k \cdot [\text{PAR}] \cdot [\text{PAM}_2] = K \cdot [\text{PAR}] \quad \text{où } K = k \cdot [\text{PAM}_2]$$

La PAM<sub>2</sub> étant en excès, sa concentration [PAM<sub>2</sub>] peut être considérée comme constante.

$$-\frac{d[\text{PAR}]}{[\text{PAR}]} = K \cdot dt \quad \text{donc } K = \frac{1}{2,3 \cdot t} \log\left(\frac{a}{a-x}\right) \quad \text{où } \begin{cases} a = \text{volume total de soude versé} \\ \text{pour neutraliser l'acide.} \\ x = \text{volume de soude versé à l'instant } t \end{cases}$$

On obtient :  $K = k \cdot [\text{PAM}_2] = 0,02 \text{ (1/min)}$  et  $k = K/[\text{PAM}_2] = 20 \text{ (1/mole.min)}$ .

### F-III - CINÉTIQUE DE LA RÉACTION H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - PARAOXON





Aucune donnée bibliographique n'a été trouvée concernant une réaction connue  $H_2O_2$  - Organophosphorés.

Par analogie avec la réaction PAM<sub>2</sub>-Paraoxon présentée précédemment, nous avons émis l'hypothèse que le même type de réaction avait lieu entre  $H_2O_2$  et le paraoxon.

Pour confirmer cette hypothèse nous avons été amenés à :

- 1) Vérifier que le para-nitrophénol était un produit de cette réaction.
- 2) Déterminer l'ordre de la réaction  $H_2O_2$ -paraoxon.

### F-III-1 - Mode opératoire :

La réaction  $H_2O_2$  -paraoxon a lieu dans une cellule thermostatée (25°) à pH = 8 maintenu constant, et force ionique constante (KCl 0,05M). L'évolution de la réaction est toujours suivie au pH-stat.

L'ordre de la réaction par rapport au paraoxon, noté  $\alpha$ , est déterminé en fixant une concentration d'eau oxygénée, et en faisant varier la concentration au paraoxon. L'ordre de la réaction par rapport à l'eau oxygénée, noté  $\beta$ , est déterminé en fixant une concentration de paraoxon, et en faisant varier la concentration en eau oxygénée.

### F-III-2 - Résultats

#### -a) Présence de para-nitrophénol :

Elle a été mise en évidence comme dans le paragraphe précédent par l'apparition de la longueur d'onde d'absorption dans le visible ( $\lambda = 420$  nm à pH basique). Ceci permettait de vérifier notre hypothèse : la réaction  $H_2O_2$ -Paraoxon donne lieu au même produit que la réaction PAM<sub>2</sub>-paraoxon.

#### -b) Ordres de la réaction :

$-\alpha$  est déterminé en traçant  $\text{Log } (d[OH^-]/dt) = f(\text{Log } [PAR])$ .

$-\beta$  est déterminé en traçant  $\text{Log } (d[OH^-]/dt) = f(\text{Log } [H_2O_2])$ .

Les droites obtenues sont de pente 1 dans les deux cas; donc  $\alpha = \beta = 1$ .

**Conclusion :** La cinétique de la réaction paraoxon  $H_2O_2$  est d'ordre 1 par rapport au paraoxon, et à l'eau oxygénée.

#### - c) Constante de vitesse :

De la même façon que pour la détermination de la constante de vitesse déterminée pour le couple paraoxon-PAM<sub>2</sub>, on trouve:  $k = 9$  (1/mole.min).



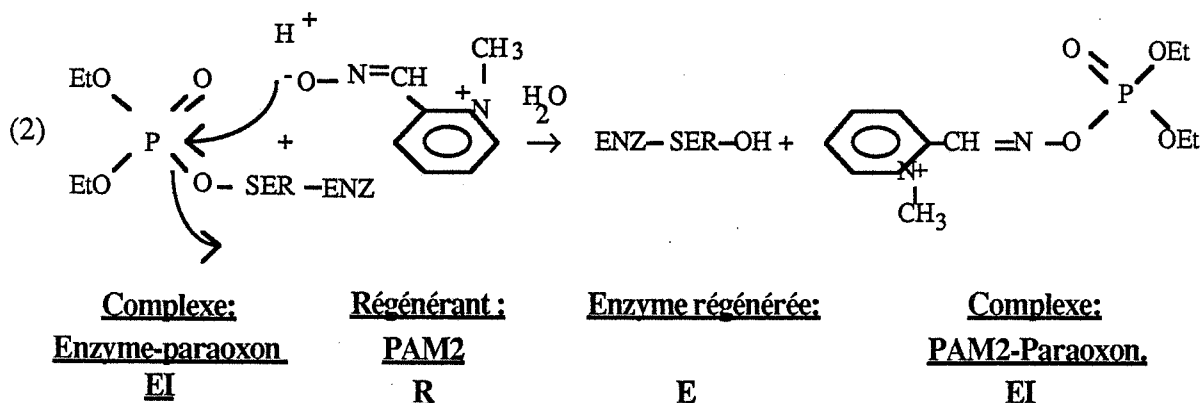
**Conclusions:**

Les attaques du paraoxon par l'eau oxygénée et par la PAM<sub>2</sub> sont du même type. Les constantes cinétiques des deux réactions ont été déterminées et sont dans un rapport de 1 à 2 environ.

Il restait à comparer l'efficacité de l'eau oxygénée par rapport à la PAM<sub>2</sub> comme régénérant de la membrane de BuChE inhibée par le paraoxon.

**F-IV - REGENERATION DE MEMBRANES A BUCHE INHIBEES PAR LA PAM<sub>2</sub>**

La régénération du complexe enzyme-inhibiteur se fait selon l'équation (2) dont le mécanisme est à rapprocher de celui de la réaction régénérant-inhibiteur, décrit par l'équation (1):



En milieu homogène, la cinétique de la réaction est du premier ordre par rapport au complexe EI et à l'oxime [103-104]:

Etablir une loi cinétique du même type pour la régénération en phase hétérogène s'est révélé difficile à cause de l'interférence de plusieurs phénomènes :

- Diffusion et rétrodiffusion dans la membrane enzymatique du régénérant et du complexe inhibiteur régénérant ;
- Influence du temps de lavage de la membrane après la réaction de régénération ;
- Le délai entre la fin de la réaction d'inhibition et le début de la réaction de régénération intervient également. Ce phénomène est cité [58] en phase homogène et attribué par les auteurs au passage d'un premier complexe enzyme-inhibiteur facilement déplacé par le régénérant, à un deuxième complexe enzyme-inhibiteur plus stable, et quasiment impossible à régénérer.



Après ces constatations, nous nous sommes surtout attachés à définir les conditions dans lesquelles une membrane inhibée était le mieux et le plus vite régénérée.

#### F-IV-1 - Mode opératoire :

Après inhibition par le paraoxon, l'électrode enzymatique est trempée dans un bécher contenant une solution de tampon phosphate  $10^{-2}M$ , pH = 8, à la concentration voulue en PAM<sub>2</sub>, et soumis à une agitation constante. Après un temps d'incubation T<sub>1</sub>, l'électrode est rincée à l'eau permutée, puis trempée dans du tampon phosphate de même composition, sous agitation, pendant un temps T<sub>2</sub>. Le test de l'activité enzymatique est ensuite effectué avec une solution de BuChI,  $10^{-2}M$ , dans le même tampon phosphate.

#### F-IV-2 - Résultats :

Le pourcentage de régénération a été défini par  $R\% = (\Delta E_R / \Delta E_0) \cdot 100$ .

où  $\Delta E_R$  = réponse de l'électrode au substrat ( $10^{-2}M$ ) après régénération.

$\Delta E_0$  = réponse de l'électrode au substrat ( $10^{-2}M$ ) avant inhibition.

On a confirmé en milieu hétérogène un résultat de la littérature en milieu homogène: *à forte concentration (>  $2,5 \cdot 10^{-2}M$ ) la PAM<sub>2</sub> devient elle-même inhibitrice de la BuChE*. Toutes les expériences ultérieures ont donc été faites à des concentrations en PAM<sub>2</sub> <  $10^{-2}M$ .

Pour des inhibitions importantes ( $I\% > 80\%$ ), la totalité de l'activité initiale de la membrane n'est retrouvée qu'au bout d'un temps très long (plusieurs jours).

D'autre part, la PAM<sub>2</sub> étant de toute façon en excès, la quantité d'enzyme entrant dans la fabrication de la membrane n'intervient pas dans le pourcentage de régénération obtenu.

Si le délai passé entre la réaction d'inhibition et celle de réactivation dépasse 4h, le traitement de la membrane à la PAM<sub>2</sub> ne restaure pas l'activité enzymatique de celle-ci. On peut avancer la même application que celle donnée par les auteurs en phase homogène: il y a évolution d'un complexe enzyme-inhibiteur instable vers un autre complexe plus stable, non réactivable. En phase hétérogène, il n'est cependant pas possible d'identifier ces complexes.

De plus, on constate que en plus du temps de traitement à la PAM<sub>2</sub>, un temps de repos de 10 min, dans du tampon phosphate  $10^{-2}M$ , pH = 8, sous une faible agitation, améliore nettement le pourcentage d'activité retrouvée. On peut attribuer cet effet à un relargage progressif de la membrane vers le tampon de la PAM<sub>2</sub> elle-même, et du complexe formé PAM<sub>2</sub>-Paraoxon.



Le TMB<sub>4</sub> a été testé avec des résultats du même ordre.

**Conclusion :**

Toute réactivation ultérieure par traitement à la PAM<sub>2</sub> d'une membrane enzymatique inhibée sera faite :

- si le pourcentage d'inhibition n'excède pas 80 % .
- pendant 50 min avec une concentration de PAM<sub>2</sub> 10<sup>-3</sup>M, dans du tampon phosphate 10<sup>-2</sup>M, pH = 7 à 8. (Les mêmes résultats sont obtenus sur cette plage de pH).
- la réutilisation de la membrane ne sera effectuée qu'après un temps de repos de 10 min. dans le même tampon. Le temps de traitement total est donc d'une heure.

**F-V- REGENERATION DE MEMBRANES A BUCHE INHIBEES PAR TRAITEMENT A L'EAU OXYGENEE**

**F-V-1 - Action de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la BuChE**

N'ayant pas de donnée bibliographique à ce propos, nous avons commencé par vérifier l'action de l'eau oxygénée sur l'activité catalytique de la BuChE.

Plusieurs membranes à BuChE ont été testées en présence du substrat BuChI:

- 1 - Dans les conditions habituelles : tampon phosphate 10<sup>-2</sup>M, pH = 8, et T = 22°C ;
- 2 - Dans les mêmes conditions que précédemment, mais en présence d'eau oxygénée allant de 10<sup>-4</sup> M à 10<sup>-1</sup> M.

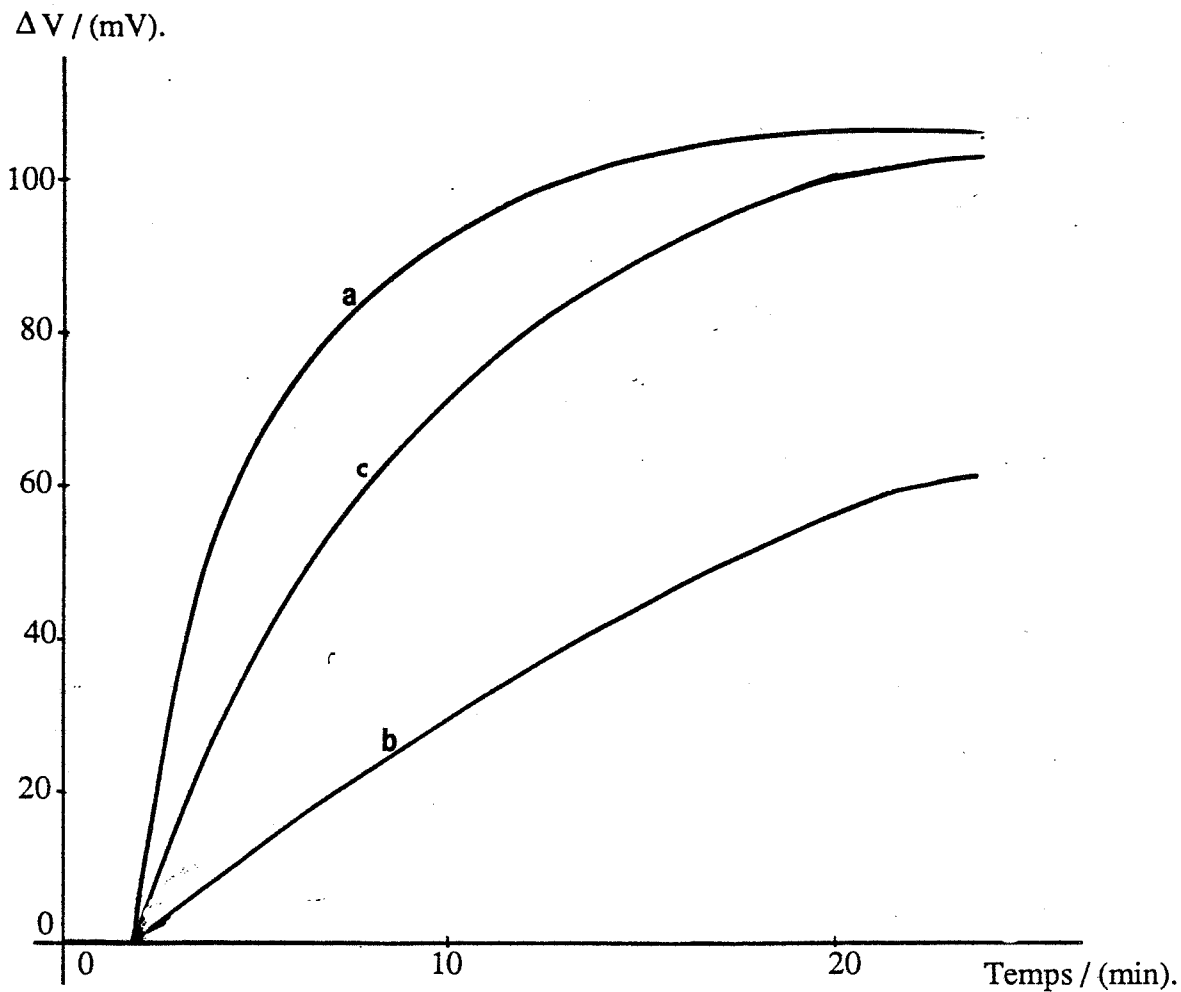
**Résultats :** Aucune action, ni inhibitrice, ni activatrice de l'eau oxygénée n'a été enregistrée ; de plus, la force tampon utilisée habituellement suffisait à maintenir le pH constant, car le pouvoir acide de l'eau oxygénée est très faible (pKa = 11,65).

**F-V-2 - Régénération de membranes inhibées par traitement à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Nous n'avons pas établi une cinétique de régénération par l'eau oxygénée de la BuChE inhibée au paraoxon, *en phase homogène*, car il s'est avéré difficile d'attribuer à chaque effet sa cause, et en particulier de séparer :

- l'effet de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'enzyme inhibée par le paraoxon ;





**Figure-27: Exemple de régénération effectuée à l'eau oxygénée.**

Conditions opératoires: tampon phosphate  $10^{-2}M$ ,  $pH=8$ ,  $T=22^{\circ}C$ .

Substrat  $10^{-2}M$ ,  $[H_2O_2] = 10^{-2}M$ . Membrane à 4 Unités de BuChE.

a- Signal obtenu avant inhibition  
réobtenu après : traitement à  $H_2O_2$   
suivi d'un temps de repos de 10 min dans du tampon phosphate.

b- Signal obtenu après inhibition avec du paraoxon  $10^{-7}M$

c- Signal obtenu après traitement à  $H_2O_2$   $10^{-2}M$ .

- l'effet de  $H_2O_2$  sur le paraoxon lui-même, l'empêchant de former un complexe avec l'enzyme.

Il est à remarquer que dans la littérature, les études de régénération par les oximes sont faites sur du sérum; il est donc possible de travailler en deux temps :

- faire agir le produit avec le milieu inhibiteur ;
- récupérer les cellules par centrifugation ;
- les refaire agir avec le milieu régénérant.

L'électrode à BuChE s'adaptait bien à ce genre d'étude, car elle permet d'effectuer les étapes d'inhibition puis de régénération, sans avoir à récupérer l'enzyme.

Le même mode opératoire que celui utilisé pour la PAM<sub>2</sub> paragraphe D-III-1 est repris.

### **Résultats :**

*Première constatation :* une membrane à BuChE qui a trempé dans de l'eau oxygénée ( $> 10^{-3}M$ ) n'est pas inhibée par le paraoxon, même aux fortes concentrations, et même après lavage.

L'effet inhibiteur aux fortes concentrations, observé avec la PAM<sub>2</sub> n'a pas lieu avec l'eau oxygénée. On peut donc l'utiliser à des concentrations allant jusqu'à 0,1M.

Comme pour la PAM<sub>2</sub>, des membranes inhibées très fortement par le paraoxon ( $> 80 \%$ ) ne retrouvent la totalité de leur activité catalytique de départ qu'au bout de plusieurs jours.

Le lavage de la membrane au tampon phosphate après action du peroxyde d'hydrogène est ici aussi une étape importante. La Figure 27 montre l'activité retrouvée, après un traitement à l'eau oxygénée  $10^{-2}M$ , par une membrane inhibée par du paraoxon ( $10^{-7}M$ ) avant et après un délai de stockage de 10 min dans du tampon  $10^{-2}M$ , pH = 8.

### **Conclusion :**

L'eau oxygénée nous semble être un antidote au moins aussi efficace que la PAM<sub>2</sub> pour la régénération de la BuChE inhibée. Tous les essais ont été effectués in vitro, sur l'enzyme seule.

L'effet de  $H_2O_2$  in vivo, comme antidote de l'empoisonnement des cholinestérases pourrait être effectuée si le peroxyde d'hydrogène lui-même n'est pas toxique pour le milieu cellulaire, aux concentrations requises.



CHAPITRE IV  
AUTOMATISATION



## INTRODUCTION

La présence de pesticides dans les eaux de rivières peut provenir d'une introduction directe, due à la nécessité de traiter le milieu (désherbage des berges, démoustillage...) ou d'une introduction indirecte, résultat du transfert des produits répandus sur le sol par les eaux de ruissellement, et de l'apport des eaux de traitement de certaines industries (fabrication de pesticides, laine, papier...). Elle peut enfin être le fait d'un déversement accidentel.

La nature du pesticide [105], sa concentration, sa solubilité dans l'eau, et ses capacités de dégradation sont autant de facteurs [1] qui influent sur son transport et son devenir dans le milieu aquatique. Les organophosphorés et les carbamates ont l'avantage, par rapport aux organochlorés, d'être moins persistants, ce qui explique leur utilisation croissante aux dépens de ces derniers.

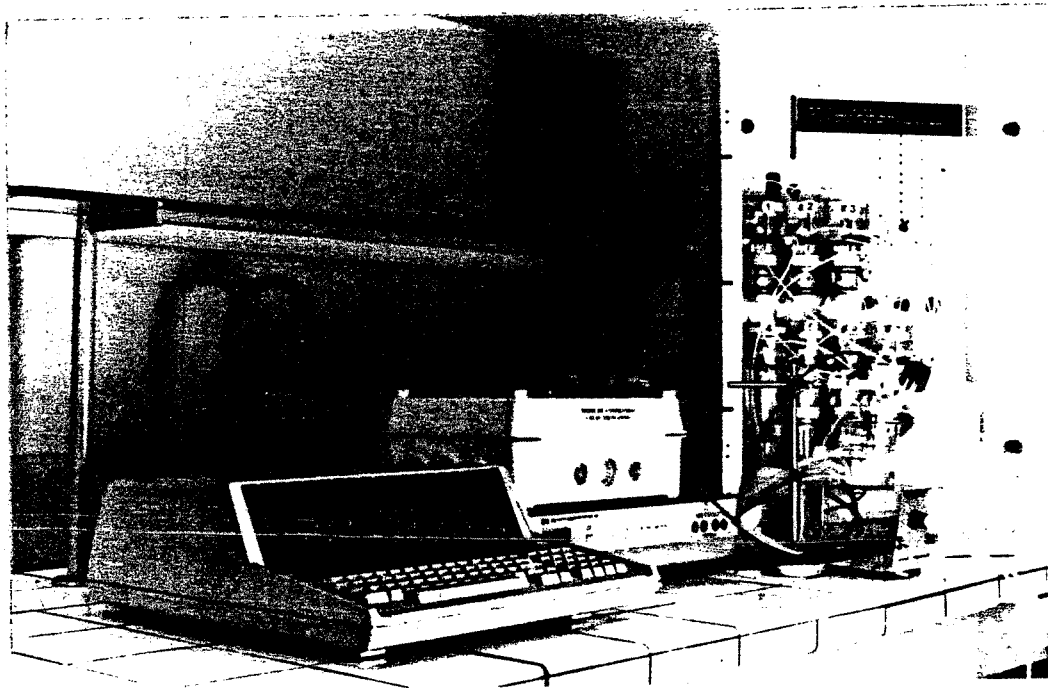
La littérature est riche en méthodes de dosage des organophosphorés et carbamates: chromatographie [106-108], fluorimétrie [109], R.M.N.[110], méthodes enzymatiques [111-112]; ces méthodes, d'une bonne précision, nécessitent toutefois un traitement préalable d'extraction et de concentration des échantillons avant analyse, qui rend moins aisée leur utilisation. L'électrode à BuChE mise au point, permet d'atteindre des seuils de détection très bas, avec une mesure plus rapide et une plus grande facilité d'emploi.

Un ensemble totalement automatisé a été réalisé, utilisant cette électrode, et permettant le contrôle des eaux polluées avec un minimum d'opérations préliminaires.

### I- CHOIX DU MODE D'AUTOMATISATION

Automatiser la détection de pesticides par électrode à BuChE permet de réaliser **un système d'alarme**, totalement autonome et utilisable en routine. Toutes les actions susceptibles d'être pilotées par un micro-ordinateur ont été prises en compte. Seuls la préparation des solutions de travail, ainsi que le changement de la membrane enzymatique restent des opérations manuelles.

Le type d'expérience concerné se prêtait à une **automatisation séquentielle**, chaque séquence programmée mimant une série d'opérations effectuées manuellement auparavant. L'autonomie visée pour l'ensemble imposait une **automatisation "rigide"**; elle a été obtenue par la réalisation d'un programme d'exécution qui impose une suite d'étapes bien déterminée à accomplir, autant en ce qui concerne l'étalonnage préalable de la membrane enzymatique, la mesure proprement dite, et les régénérations éventuelles de la membrane inhibée.



**Figure 1-** Photographie de l'ensemble automatisé.

## **II- MATERIEL**

L'ensemble réalisé est présenté sur la photographie de la Figure 1, et schématisé pour plus de clarté sur la Figure 2.

### **II-1- Gestion des séquences programmées**

Elle est effectuée par un micro-ordinateur Hewlett-Packard (HP 85), qui utilise le logiciel réalisé pour la commande de toutes les actions programmées, le traitement des données, et l'édition des résultats. Une Unité d'Acquisition de Données et de Contrôle (HP 3421 A), connectée au micro, assure le pilotage, à travers une boîte de commande à électrovannes, d'une série de pompes pneumatiques. La même interface est utilisée pour la mesure du potentiel ( ou du pH ) entre les électrodes enzymatique et de référence. Le logiciel de gestion utilise le langage basic.

### **II-2- Circuit hydraulique**

Les pompes utilisées sont des pompes pneumatiques, actionnées à des pressions de 4 à 5 bars, et de volume fixe. Chacune est alimentée par un réservoir lui correspondant: 1- Solution tampon; 2- Solution tamponnée du substrat de la réaction enzymatique (BuChCl); 3- Solution tamponnée de l'inhibiteur étalon, qui est le paraoxon; 4- Solution tamponnée de régénérant (PAM 2); 5- Eau distillée destinée aux lavages de la cellule et des électrodes; 6- Eau à doser. La pompe N° 7 est affectée à la vidange de la cellule.

La cellule de travail est alimentée au fur et à mesure des besoins par chacune de ces pompes; elle est d'autre part thermostatée et agitée en permanence.

Le même tampon est utilisé pour la préparation des solutions de travail et pour les expériences: tampon phosphate  $10^{-2}$  M, pH = 7,2.

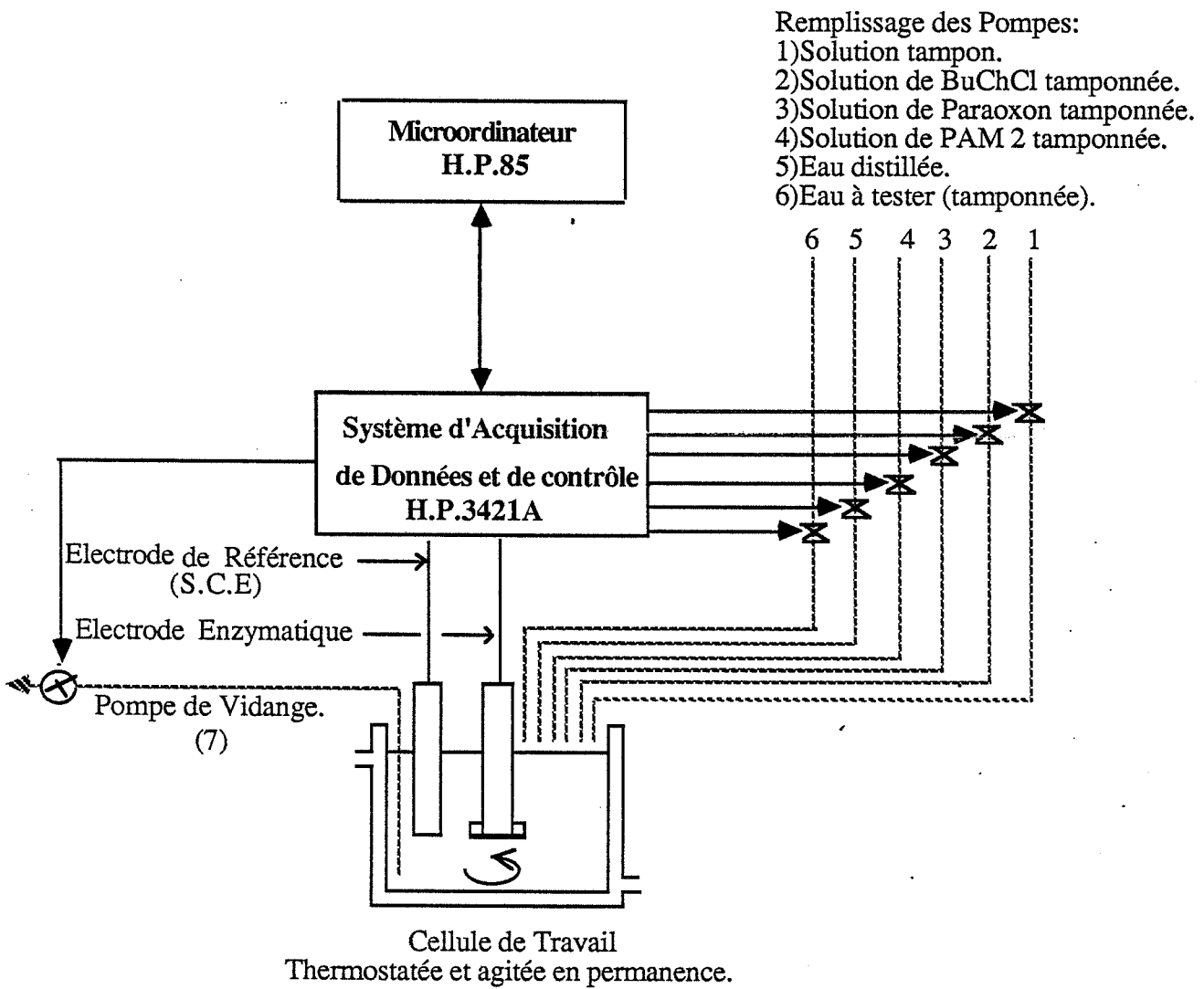
## **III- SEQUENCES PROGRAMMEES**

### **III-1- Préliminaire: Détermination de l'état stationnaire.**

La fin d'une séquence de mesure doit pouvoir être reconnue par le micro, pour enclencher automatiquement la séquence suivante. Cette fin de séquence est conditionnée par l'obtention de l'état stationnaire. Il faut donc que le micro puisse déterminer cet état. Pour cela, le test suivant est effectué à chaque mesure:

Utilisée à sa résolution maximale, l'Unité de Commande réalise l'acquisition d'une mesure de potentiel par seconde. A chaque instant t, la mesure de potentiel effectuée est





**Figure-2- Schématisation de l'ensemble automatisé.**

transmise au micro, qui calcule la pente  $p = \Delta E / \Delta t$  en ce point. L'état stationnaire est considéré comme atteint quand l'inégalité  $p \leq 5.10^{-5}$  (mv/s) est réalisée pour 5 points consécutifs. Cette sensibilité a été considérée comme optimale après plusieurs essais, et permet d'éviter des erreurs dues à une instabilité du potentiel.

### III-2- Protocole des opérations.

Ce protocole est résumé dans l'organigramme simplifié de la Figure 3; les principales étapes en sont:

#### $\alpha$ -Étalonnage de la membrane enzymatique:

$\alpha$ -1- Les électrodes et la cellule de travail sont lavées par action de la pompe N°5; après vidange (pompe N°7), 20 ml de tampon phosphate sont injectés dans la cellule par l'intermédiaire de la pompe N°1. La mesure du potentiel entre les électrodes est commandée par le micro jusqu'à obtention de la ligne de base, au bout de 2 minutes environ.

$\alpha$ -2- La pompe N°2 est alors enclenchée, pour injecter 1 cm<sup>3</sup> de substrat dans la cellule, la concentration finale en BuChCl atteignant 10<sup>-2</sup> M. La réaction enzymatique qui se déclenche alors entraîne une diminution du pH, jusqu'à obtention du premier état stationnaire, dont le pH sera utilisé dans la suite comme référence. Cet état est obtenu au bout de 4 minutes environ, et son obtention déclenche la séquence suivante.

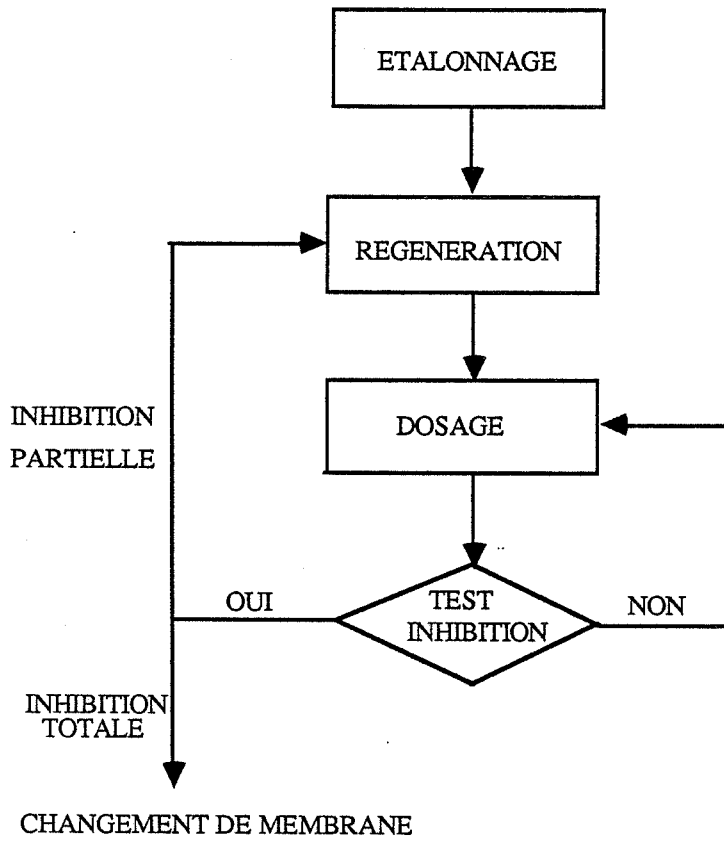
$\alpha$ -3- La pompe N°3 est actionnée pour l'injection de l'inhibiteur étalon: le paraoxon. Cette opération est répétée 5 fois, la concentration finale en inhibiteur dans la cellule s'échelonnant de 10<sup>-8</sup> M à 10<sup>-6</sup> M. Après chaque injection, la réaction d'inhibition de la BuChE par le paraoxon s'impose et se traduit par une remontée du pH jusqu'à obtention du nouvel état stationnaire, ou état stationnaire d'inhibition. Comme on l'a vu dans les chapitres précédents, et comme le montre la figure 4, le temps d'obtention de cet état est d'autant plus long que la concentration en inhibiteur est élevée.

$\alpha$ -4- La courbe d'étalonnage caractéristique de la membrane enzymatique :  $pH=f(\text{concentration en inhibiteur étalon})$  est ensuite tracée et stockée par le micro-ordinateur (Figure 5).

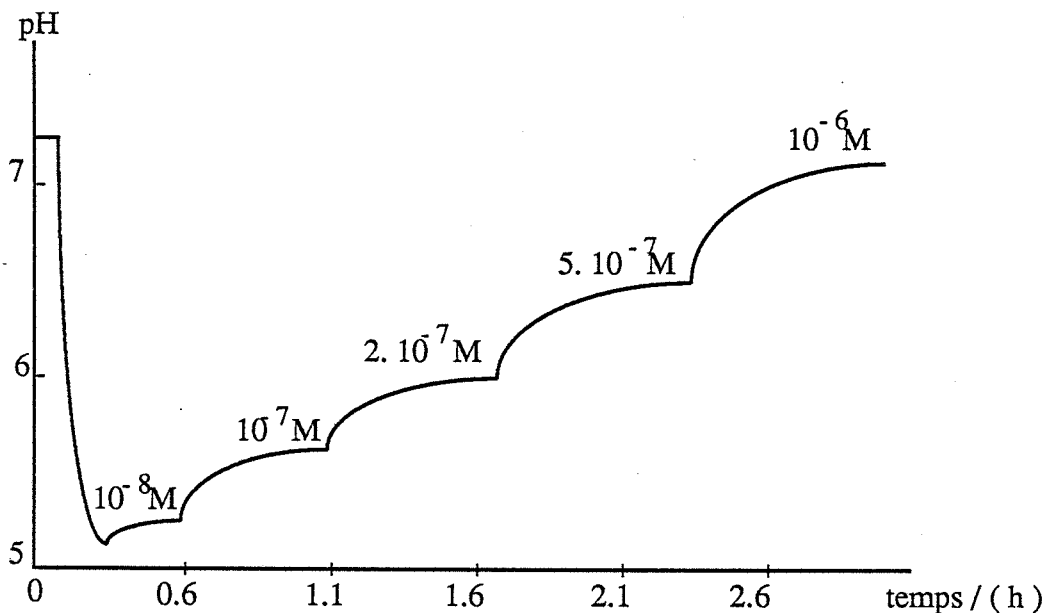
#### $\beta$ - Régénération de la membrane enzymatique.

Cette séquence est programmée de façon à être utilisée chaque fois qu'il y a eu inhibition de la membrane enzymatique, et en particulier après l'étape d'étalonnage.

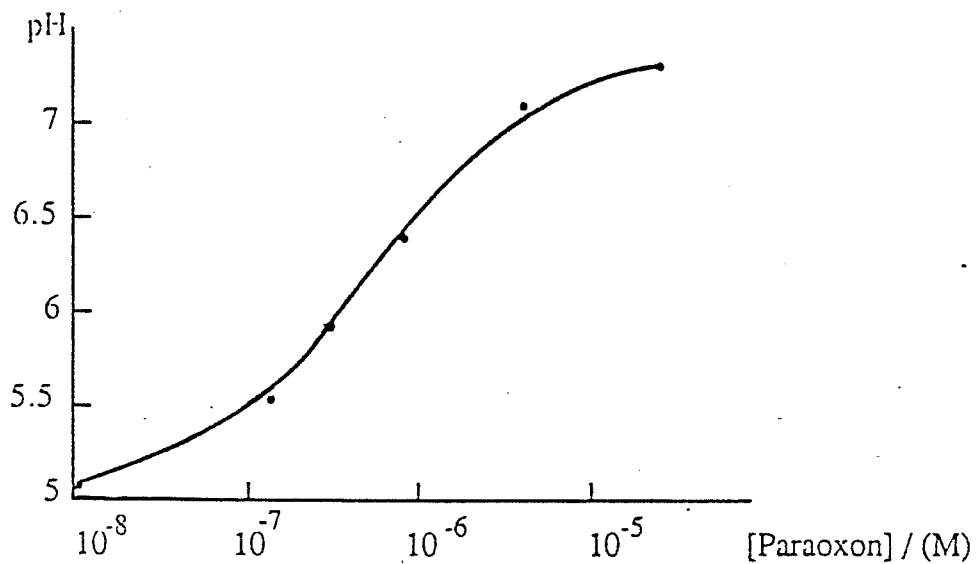
La cellule de travail est vidée (action de la pompe N°7) et lavée trois fois à l'eau distillée (actions successives des pompes N°5 et N°7). Un régénérant de la BuChE inhibée, ici de la pyridine 2 aldoxime, est ensuite injecté par l'intermédiaire de la pompe N°4. Sa concentration finale dans le milieu a été fixée à 5.10<sup>-4</sup> M, donc en large excès par rapport aux



**Figure-3- Organigramme simplifié des opérations.**



**Figure -4:** Réponse de l'électrode enzymatique (en pH) pour différentes concentrations de paraoxon (l'inhibiteur étalon).



**Figure-5:** Exemple de courbe d'étalonnage du capteur vis-à-vis du paraoxon, exprimée par la variation de pH.



concentrations en inhibiteur utilisées pour l'étalonnage. La cellule est laissée sous agitation et aucune mesure n'est effectuée pendant 45 minutes, temps au bout duquel la cellule est vidangée (pompe N°7) et les étapes  $\alpha$ -1 et  $\alpha$ -2 répétées. Le pH du nouvel état stationnaire obtenu est comparé au pH de référence pour contrôler l'efficacité de la régénération.

Par précaution, il est prévu de répéter une nouvelle fois cette séquence au cas où la régénération n'aurait pas été totale.

#### $\gamma$ -Mesure de la toxicité des eaux.

Une série de mesures peut commencer une fois les étapes précédentes effectuées et la cellule vidangée et lavée trois fois (pompes N°5 et N°7). L'eau à doser, préalablement filtrée et tamponnée (pH=7,2), est injectée dans la cellule (pompe N°6). La ligne de base est réobtenue au bout de 2 minutes environ, au terme desquelles la séquence  $\alpha$ -2 est reprise. Le pH du nouvel état stationnaire obtenu est comparé par le micro à la courbe d'étalonnage stockée en  $\alpha$ -4. La présence éventuelle de pesticides et leur teneur, en équivalent paraoxon, en sont déduites.

#### Trois cas de figure sont à prévoir:

- Si aucune inhibition n'est décelée, la cellule est vidée, lavée, et un nouveau prélèvement d'eau à doser, suivi de sa mesure peuvent être effectués.

- Si par contre il y a eu inhibition, donc présence de pesticides, la membrane enzymatique est soit régénérée, en cas d'inhibition partielle de la membrane enzymatique (donc répétition de la séquence  $\beta$ ), soit changée, si l'inhibition est totale. Dans ces deux derniers cas, l'alarme est donnée.

## IV RESULTATS

### IV-1- Autonomie de l'ensemble

La phase étalonnage-régénération qui est imposée à chaque première utilisation d'une membrane enzymatique est l'étape limitante du processus, puisqu'elle dure environ 3 heures. Par la suite, chaque test effectué sur un échantillon d'eau à doser dure 1/2 heure, au terme de laquelle il est possible de conclure à la présence ou l'absence de pesticides dans le milieu.

Toutefois, il est possible de s'affranchir des étapes étalonnage-régénération, si l'on considère que l'information concernant la teneur en pesticides, en équivalent paraoxon, n'est pas indispensable. Dans ce cas, l'activité de la membrane enzymatique est simplement testée pour une concentration en substrat; les mesures sur la toxicité de l'eau qui ont lieu ultérieurement concluent alors à une inhibition ou non de la membrane, donc à la présence ou à



l'absence de polluant de type organophosphoré ou carbamate, sans aucune précision sur sa teneur. Dans un concept d'alarme, ceci peut déjà sembler suffisant.

Dans les deux cas, l'autonomie de l'ensemble est totale et les mesures peuvent être effectuées de façon continue et 24 h sur 24, une fois la membrane enzymatique adaptée sur l'électrode.

Toutefois, le changement de celle-ci en cas de forte inhibition, ou de vieillissement trop important n'est pas encore automatique.

#### **IV-2- Durée de vie d'une membrane**

Il est difficile d'établir un temps d'utilisation standard pour toutes les membranes utilisées: une membrane qui n'aura pas été en contact avec de fortes concentrations d'inhibiteur pourra être fonctionnelle pendant plusieurs semaines; une autre, qui aura été fortement inhibée dès les premières utilisations sera déjà à remplacer. Toutefois, la possibilité de régénérer les membranes faiblement inhibées permet d'optimiser leur durée d'utilisation.

#### **IV-3- Adaptabilité de l'ensemble**

Dans un premier temps, la mise au point d'un système automatisé visait uniquement une détection en milieu aqueux. Or on a vu dans le chapitre 3 qu'il était possible de travailler avec une électrode à BuChE en milieu hydro-alcoolique, moyennant quelques précautions. Il est alors tout aussi indiqué d'utiliser cet automate à d'autres fins, par exemple pour la surveillance des eaux de rejets d'usines fabriquant ou utilisant des pesticides inhibiteurs de la BuChE.

#### **IV-4- Spectre d'action**

Organophosphorés de type oxon et carbamates sont tous détectables, à des seuils dépendant de leur niveau de toxicité, donc de leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la BuChE. Les organophosphorés de type thion (liaison P=S au lieu de P=O) se métabolisent en oxon dans l'eau, et sont ainsi détectables à des doses plus faibles que quand ils sont sous forme thion.

Quelques seuils de détection atteints sont résumés dans le tableau I, et témoignent de la forte sensibilité de la méthode. C'est grâce à cette forte sensibilité qu'il est possible de travailler sur des échantillons n'ayant pas subi d'étape de concentration préliminaire. Seuls sont requises une filtration (qui évite un encrassement "physique" de la membrane), et un ajustement de pH, qui permet d'assurer à l'enzyme des conditions de fonctionnement identiques à chaque étape du processus.





#### IV-5- Limites

##### *Hydrolyse spontanée du substrat*

Utiliser en continu le type d'appareillage présenté suppose la préparation à l'avance de quantités importantes des réactifs entrant en jeu dans la réaction; il est donc nécessaire de s'assurer de leur stabilité dans le temps. De ce point de vue, seul le substrat, qui présente une hydrolyse spontanée très lente, pose un problème. La solution de substrat de travail doit alors être refaite une fois par semaine, période pendant laquelle ses caractéristiques restent constantes.

##### *Spécificité*

Le principe même de la méthode fait qu'elle ne peut être spécifique. Elle est sélective dans le sens où deux classes de produits seulement sont décelables; au sein de ces mêmes classes, il n'est pas possible de différencier deux produits responsables d'une inhibition. Il est donc nécessaire, si besoin est, d'utiliser ultérieurement d'autres méthodes d'analyse pour identifier le ou les pesticides qui ont déclenché l'alarme.

##### *Interférences*

Dans le paragraphe E du chapitre 3, il a été démontré que les sels d'halogénures interagissaient avec le substrat de la réaction enzymatique d'une façon qui induisait, sur l'électrode à BuChE, une baisse apparente d'activité catalytique; celle-ci peut donc être considérée comme une interférence.

Cependant, cette baisse d'activité est réversible, contrairement à une inhibition causée par des pesticides, et un essai rapide consistant à retester l'activité enzymatique dans un milieu contrôlé, exempt de sel, permet de lever l'ambiguïté.

D'autre part, les taux de sels des rivières sont connus et généralement en-deçà des concentrations qui provoquent l'inhibition apparente de l'enzyme ( $10^{-1}$  M). Le risque d'interférence est donc relativement faible. Il est toutefois nécessaire de surveiller les variations de concentration de sels dans le milieu à doser pour ne pas déclencher l'alarme inutilement.

Les métaux lourds interagissent avec les cholinestérases [59]. Leur mode d'action varie suivant la nature exacte du métal et l'inhibition causée n'est pas toujours réversible (Mercure). Certains cations ( $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) sont responsables d'activations [60]. Les mêmes remarques que pour les sels d'halogénures s'imposent: les variations éventuelles de concentration de métaux lourds dans le milieu sont à surveiller.

#### V- CONCLUSION

La méthode de détection d'inhibiteurs par électrode enzymatique, tout en étant simple, est mobilisatrice d'attention quand elle est utilisée manuellement. Le fait de l'avoir automatisée permet de s'affranchir quasi-totalement d'intervention humaine, celle-ci n'étant plus



requis pour la préparation des membranes enzymatiques, leur ajustement sur l'électrode, et la préparation des solutions de travail. Toutes les autres actions, ainsi que l'interprétation des résultats sont relayées par l'automate, ce qui permet un accroissement du nombre d'analyses et de contrôles.

Le logiciel a été conçu de façon à imposer une certaine rigidité dans l'interprétation des résultats, en prenant en compte le maximum de facteurs pouvant induire une erreur d'interprétation. Il reste cependant adaptable, et peut fournir des informations supplémentaires par des modifications simples.

L'information et l'alarme sont rapides, ce qui permet un feed-back immédiat vers les centres de contrôle.

<b>INHIBITEURS.</b>	<b>p.p.b.</b>
Ethyl-paraoxon	3
Methyl-paraoxon	5
Malathion	4
Fenitrothion	15
Ethyl-parathion	14
Methyl-parathion	14

Tableau I- Seuils de détection obtenus pour quelques organophosphorés.



# CHAPITRE V

## MODELE THEORIQUE



Le traitement mathématique d'une membrane enzymatique a été effectué précédemment [59,10,113], de façon à étudier son comportement et pouvoir interpréter les résultats expérimentaux. Il a été repris ici pour mettre en évidence l'importance de la concentration en substrat de travail, pour la détection d'inhibiteurs à des seuils très bas.

#### I-PRELIMINAIRES: DETERMINATION DES COEFFICIENTS DE DIFFUSION.

La détermination des coefficients de diffusion du substrat et du produit de la réaction enzymatique a été faite par conductimétrie à cause du caractère ionique des composés: butyrylcholine et choline. Dans un premier temps, les courbes d'étalonnage Conductivité = f(Concentration) ont été tracées pour chacun de ces produits. Ensuite, pour la détermination proprement dite des coefficients, la cellule de la Figure 1 a été utilisée; elle comporte deux compartiments I et II étanches sauf sur une surface circulaire, de 34 cm<sup>2</sup> de superficie, dans laquelle on peut insérer une membrane.

La membrane est non active: seule de l'albumine est réticulée avec du glutaraldéhyde sur une toile de nylon (présentant les mêmes caractéristiques que celles des chapitres précédents), ce qui permet de mesurer les effets de la diffusion en s'affranchissant des effets de la réaction.

La cellule est thermostatée à 22°C, les deux compartiments contenant chacun 100ml d'eau bi-distillée. Puis, à l'instant considéré comme l'instant initial, le produit est rajouté dans I de façon à atteindre une concentration finale de 5.10<sup>-2</sup> M.

La diffusion du produit est suivie par la mesure en continu de la conductivité dans II, et une courbe d'évolution Conductivité = f(Temps) est tracée. On peut en déduire une courbe Concentration = f(Temps) en utilisant la courbe d'étalonnage sus-mentionnée.

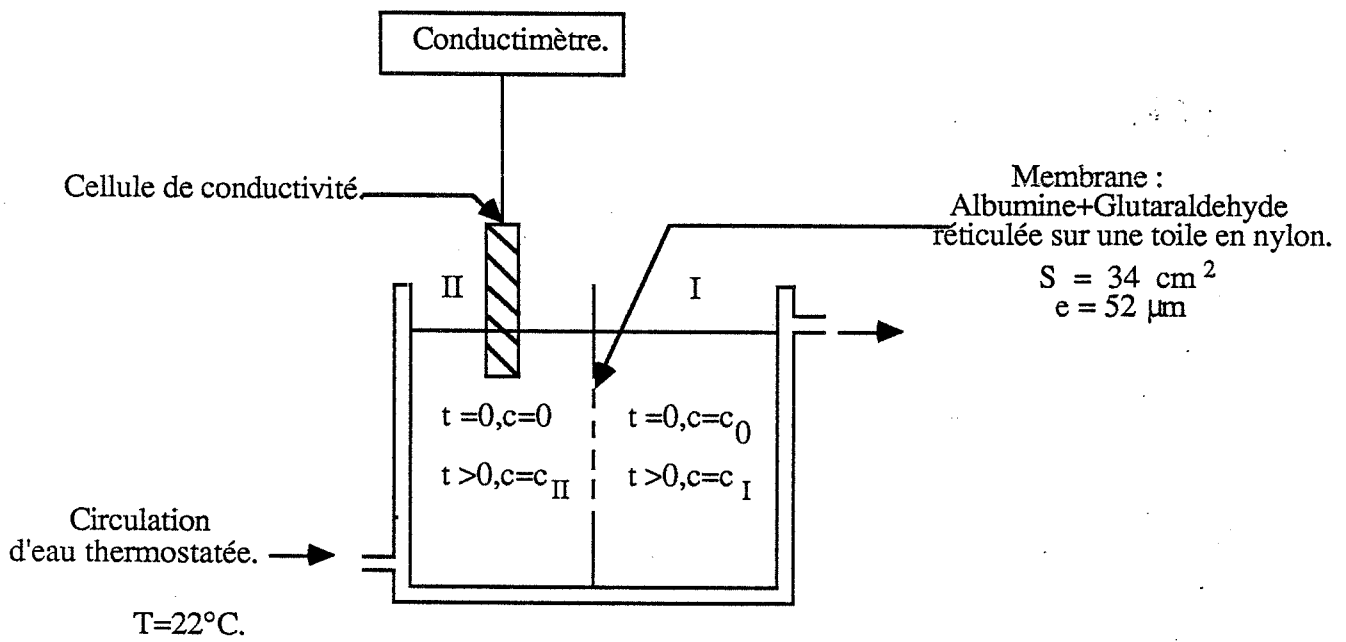
En supposant un profil de diffusion linéaire au sein de la membrane à l'état stationnaire, on peut écrire le bilan suivant :

$$V. c_{II}(t + dt) = V. c_{II}(t) + \Phi. S. dt = V. c_{II}(t) + D. S \frac{c_I(t) - c_{II}(t)}{e} dt$$

$$\text{où:} \left\{ \begin{array}{l} - \Phi \quad = \text{Flux de diffusion à travers la membrane.} \\ - c_I(t), c_{II}(t) \quad = \text{Concentrations en produit dans I et II respectivement, à l'instant t.} \\ - S, e \quad = \text{Surface et épaisseur de la membrane, respectivement.} \\ - V \quad = \text{Volume d'un compartiment.} \end{array} \right.$$

$$\text{d'où:} \quad \frac{dc_{II}(t)}{dt} = \frac{D.S}{e.V} (c_0 - 2.c_{II}(t))$$





**Figure 1: Dispositif utilisé pour la détermination des coefficients de diffusion.**

On détermine d'abord  $d(c_{II}(t))/dt$  en mesurant la pente de la corbe  $c = f(t)$  pour un certain nombre de points, puis on trace la droite  $dc_{II}(t) / dt = f(c_0 - 2c_{II}(t))$ . La pente de cette droite permet d'obtenir D. On obtient par cette méthode:

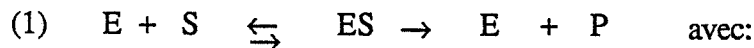
$$\text{BuChCl: } D_S = 1,4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}.$$

$$\text{Choline : } D_P = 2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}.$$

**Remarque:** Ces coefficients ont été déterminés dans des conditions de force ionique et de pH qui ne sont pas celles des expériences. On ne peut donc les considérer que comme une approche.

## II -EQUATIONS

Une membrane enzymatique, au sein de laquelle a lieu la réaction (1) est schématisée sur la Figure 2.

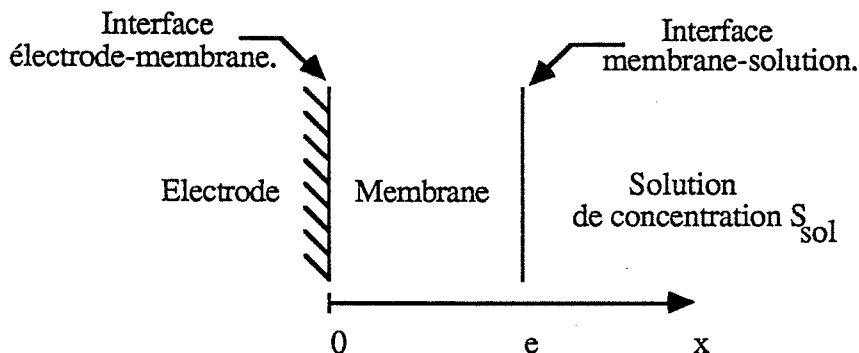


E = Enzyme (BuChE).

S = Substrat (BuChCl).

ES = Complexe enzyme-substrat.

La membrane est supposée plane et infinie pour pouvoir négliger les effets de bord. Le transfert de masse à l'intérieur de la membrane est supposé unidirectionnel et se faisant suivant l'axe des x, axe perpendiculaire à la membrane [10].



**Figure 2:** Schématisation du système électrode-membrane enzymatique-solution.



A l'état stationnaire, le système est décrit par les équations de diffusion-réaction suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} (2) \quad D_S \frac{d^2 S(x)}{dx^2} = V_m \frac{S(x)}{K_m + S(x)} \\ (3) \quad D_P \frac{d^2 P(x)}{dx^2} = -V_m \frac{S(x)}{K_m + S(x)} \end{array} \right. \quad \text{où} \quad \left\{ \begin{array}{l} S(x) = \text{concentration du substrat en } x \\ P(x) = \text{concentration du produit en } x \\ K_m \text{ et } V_m = \text{constantes de Mickaelis} \\ D_S \text{ et } D_P = \text{coefficients de diffusion} \\ \text{respectifs pour } S \text{ et } P \end{array} \right.$$

En considérant que  $m_t$  est la masse totale d'enzyme introduite dans la membrane, et  $m_f$  la masse d'enzyme non-inhibée, ou masse finale après inhibition, le taux d'inhibition peut être défini par:  $I_h = 1 - m_f / m_t$ .

$$\text{Alors} \quad V_m^0 = k \cdot m_t \quad \text{et} \quad V_m = V_m^0 (1 - I_h).$$

Les conditions aux limites des équations (2) et (3) sont:

$$\left\{ \begin{array}{ll} \text{en } x=e & S(x) = S_{sol} \quad ; \quad P(x) = 0 \\ \text{en } x=0 & D_S \frac{dS(x)}{dx} = 0 \quad ; \quad D_P \frac{dP(x)}{dx} = 0 \end{array} \right.$$

où  $e$  est l'épaisseur de la membrane enzymatique, et  $S_{sol}$  la concentration en substrat dans la solution.

**Remarque:** On peut noter que (2) + (3) = 0, ce qui permet de conclure, avec les conditions aux limites précédentes, que

$$\text{pour tout } x \text{ tel que } 0 \leq x \leq e, \quad D_S \cdot [S(x)] + D_P \cdot [P(x)] = D_S \cdot S_{sol};$$

La concentration maximale de produit  $P$  à l'électrode ou  $P(0)$  est alors:

$$[P(0)] = (S_{sol} - [S(0)]) \cdot (D_S / D_P).$$

$P(0)$  et  $S(0)$  désignant respectivement les concentrations de produit et de substrat à l'interface membrane-électrode.

Le profil de pH au sein de la membrane peut être obtenu à partir de l'équation de neutralité électrique (4a):

$$(4a) \quad \sum_i z_i \cdot F_i \cdot c_i(x) = 0 \quad \text{où} \quad \left\{ \begin{array}{l} c_i(x) = \text{concentration du produit } i \\ z_i = \text{valence du produit } i \\ F = \text{nombre de Faraday} \end{array} \right.$$



Dans notre cas, (4a) devient (4b) :

$$(4b) \quad [\text{BuCh}^+(\text{x})] + [\text{Ch}^+(\text{x})] + [\text{Na}^+(\text{x})] + [\text{H}^+(\text{x})] = \\ [\text{H}_2\text{PO}_4^-(\text{x})] + 2[\text{HPO}_4^{2-}(\text{x})] + [\text{Cl}^-(\text{x})] + [\text{BuAc}^-(\text{x})].$$

avec  $\text{BuCh}^+$  = ion butyrylcholine , ou S.

$\text{Ch}^+$  = ion choline , ou P.

$\text{BuAc}^-$  = ion butyrate , ou P.

$\text{Cl}^-$  = S(e) = Sb.

Dans les conditions de pH utilisées, le phosphate est présent essentiellement sous forme d'ions  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ , puisque les constantes de dissociation de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  sont:  $10^{-2,1}$ ,  $10^{-7,2}$ ,  $10^{-12,7}$  (M). Seules les deux équilibres suivants sont alors à prendre en compte.



On note  $C_p^i$  la concentration initiale de tampon phosphate

$K_e$  la constante de dissociation de l'eau ; alors (4b) devient (4c) :

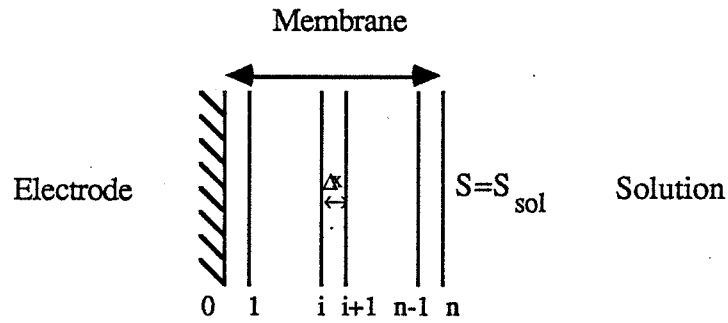
$$(4c) \quad \frac{2C_p^i ([\text{H}^+(\text{x})] + 2K_p)}{K_p + [\text{H}^+(\text{x})]} + \frac{K_e}{[\text{H}^+(\text{x})]} + \frac{K_a \cdot P(\text{x})}{K_a + [\text{H}^+(\text{x})]} + S_b = S(\text{x}) + P(\text{x}) + \text{H}^+(\text{x}) + 3C_p^i .$$

### III - RESOLUTION DES EQUATIONS :

Les équations (2) et (3) sont résolues par une méthode numérique itérative [114], à l'aide d'un Hewlett-Packard (Integral Personal Computer).

La membrane est divisée en  $n$  tranches d'épaisseur  $\Delta x$  (Figure 3).





**Figure 3:** Discrétisation de la membrane.

On obtient le système d'équations aux différences finies (2') et (3') à l'état stationnaire:

$$\left\{ \begin{array}{l} (2') \quad D_S \frac{S_{i-1,k+1} - 2S_{i,k+1} + S_{i+1,k+1}}{\Delta x^2} = V_m \frac{S_{i,k}}{K_m + S_{i,k}} \\ (3') \quad D_P \frac{P_{i-1,k+1} - 2P_{i,k+1} + P_{i+1,k+1}}{\Delta x^2} = -V_m \frac{S_i^*}{K_m + S_i^*} \end{array} \right.$$

où

$$\left\{ \begin{array}{l} S_{i,k} = \text{concentration de S en } i, \text{ à la } k^{\text{ième}} \text{ itération.} \\ P_{i,k} = \text{concentration de P en } i, \text{ à la } k^{\text{ième}} \text{ itération.} \\ S_i^*, P_i^* = \text{solutions des équations (2') et (3').} \end{array} \right.$$

Ce système a été résolu à l'aide d'un logiciel réalisé en langage basique.

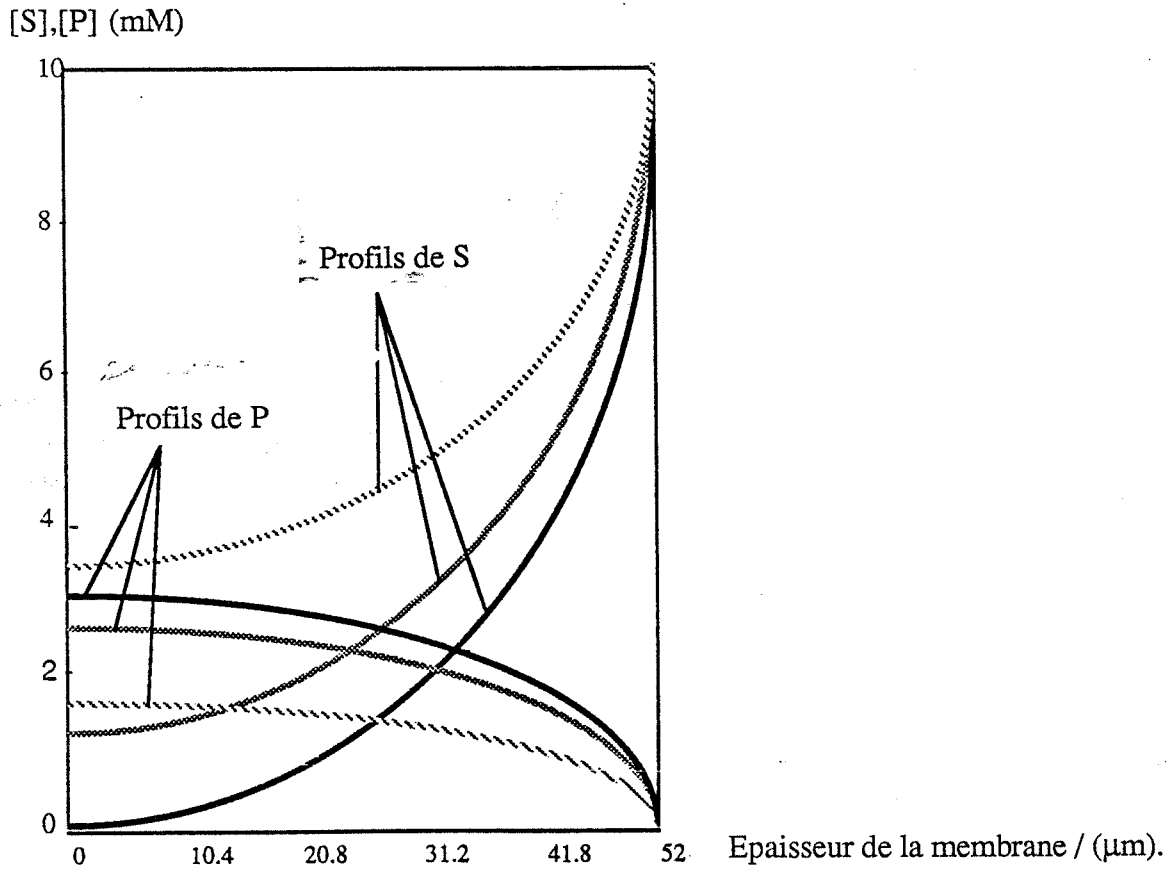
L'équation (4c), qui devient (4') est résolue par la méthode d'EULER.

$$(4') \quad \frac{2C_p^i ([H_1^+] + 2K_p)}{K_p + [H_1^+]} + \frac{K_e}{[H_1^+]} + \frac{P_i^*}{[H_1^+] + K_a} + S_b = S_i^* + P_i^* + 3C_p^i + [H_1^+].$$

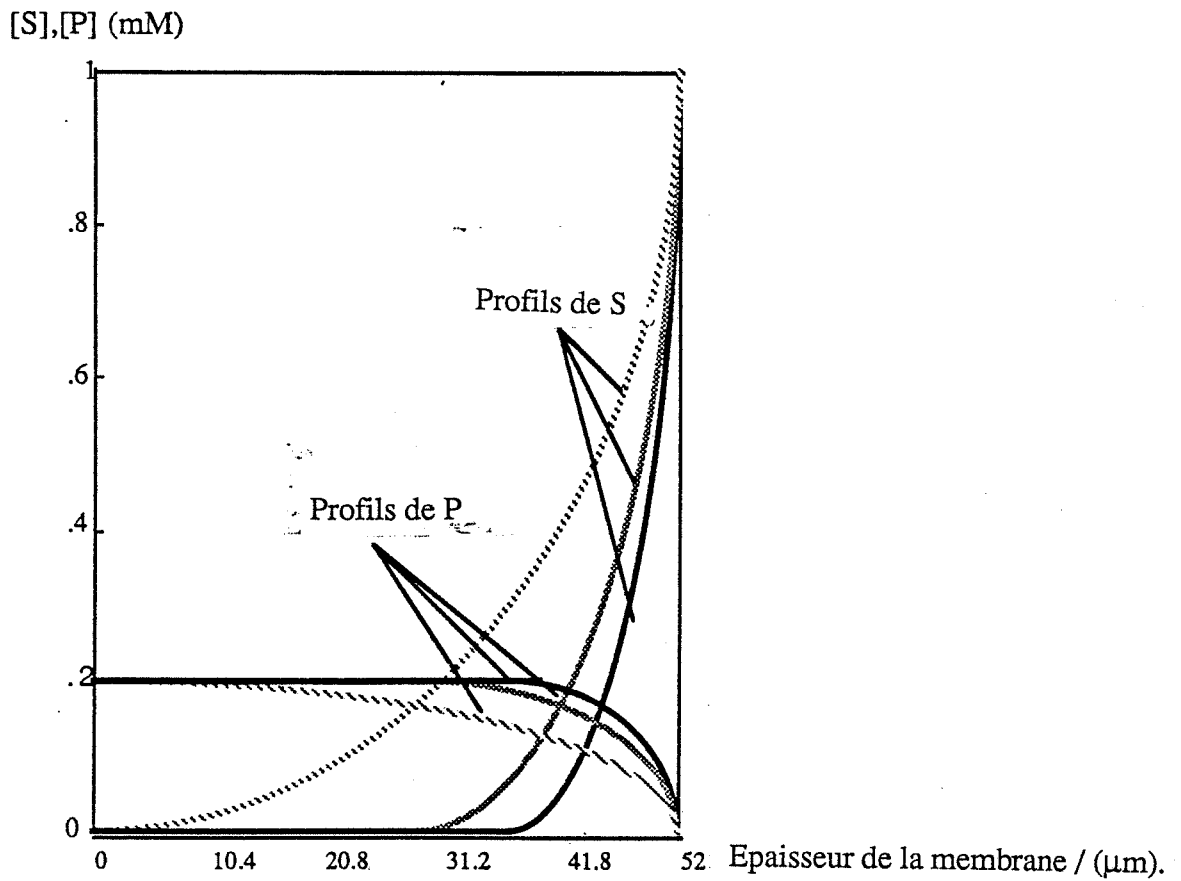
#### IV- RESULTATS ET DISCUSSION:

Les Figures 4 et 5 représentent les profils de concentration de S et P au sein de la membrane, obtenus par résolution des équations (2') et (3'), et en utilisant les données précédemment mentionnées. Une augmentation du pourcentage d'inhibition se traduit par une augmentation du profil du substrat et par une diminution de celui du produit. L'allure de ces

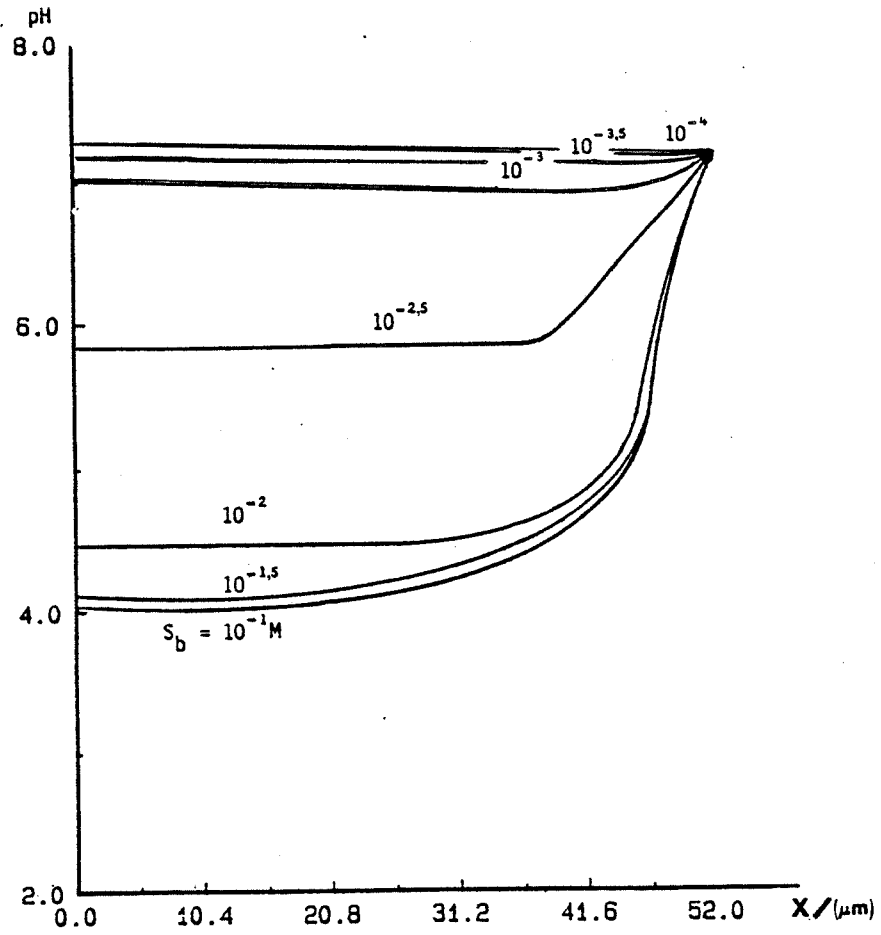




**Figure -4:** Profils calculés de S et P, à l'état stationnaire, pour une concentration  $S_{sol}$  élevée.  
Données du calcul:-  $S_{sol} = 10^{-2}M$ ; Tampon phosphate  $10^{-2} M$ ,  $pH = 7,2$ .  
- Epaisseur de la membrane:  $52 \mu m$ .

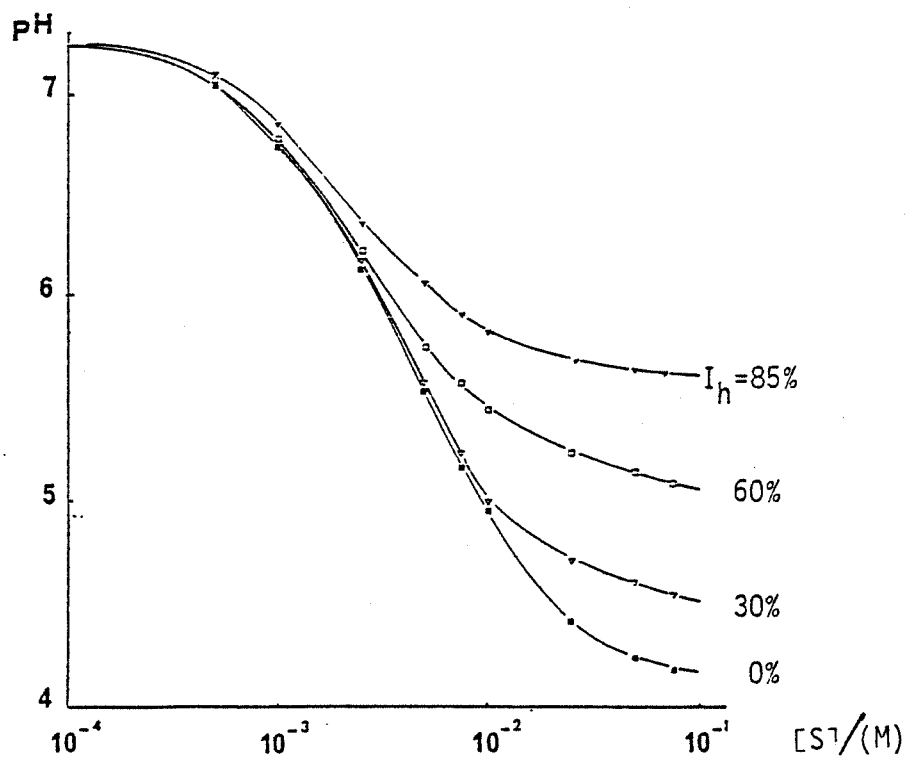


**Figure -5:** Profils calculés de S et P, à l'état stationnaire, pour une concentration  $S_{sol}$  faible.  
Données du calcul:-  $S_{sol} = 10^{-3}M$ ; Tampon phosphate  $10^{-2} M$ , pH = 7,2.  
- Epaisseur de la membrane: 52 μm.



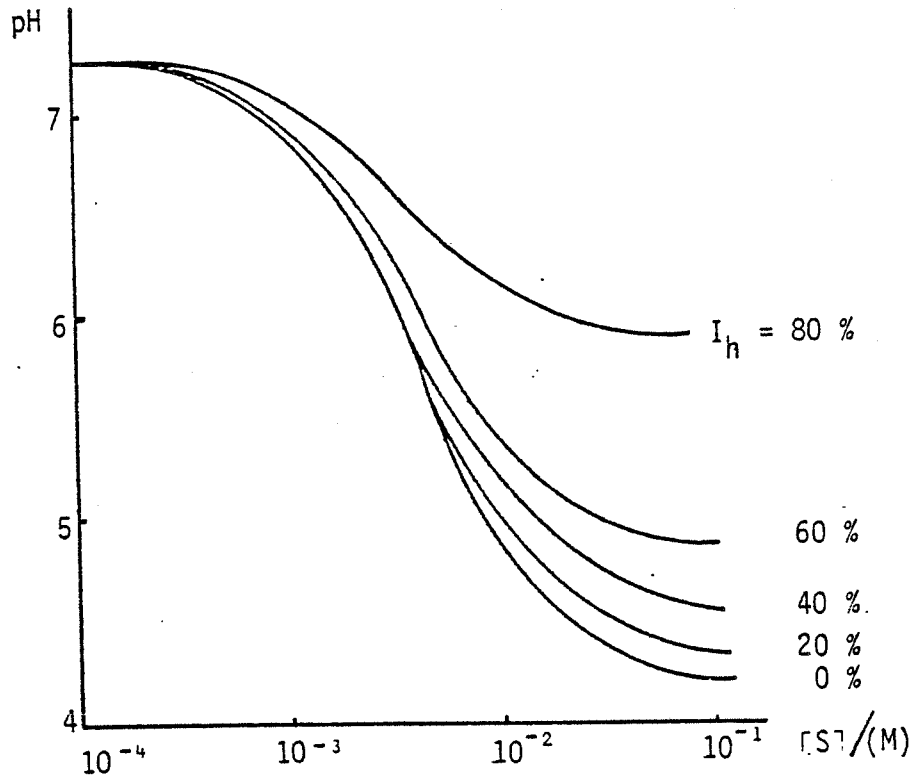
**Figure -6:** Profils de pH calculés, à l'état stationnaire, pour différentes concentrations  $S_{sol}$ .

- Données du calcul:
- Tampon phosphate  $10^{-2} M$ , pH = 7,2.
  - Epaisseur de la membrane: 52  $\mu m$ .
  - Concentration en enzyme: 0,03 mg/2 $\mu l$ .



**Figure -7:** Courbes expérimentales  $\text{pH} = f([S], I_h)$ .

Conditions d'obtention de ces courbes: Tampon phosphate  $10^{-2}$ M,  $\text{pH}=7,2$ , et  $T=22^\circ\text{C}$ . Concentration en BuChE:  $0,03\text{mg} / 2\mu\text{l}$ , dans une membrane d'épaisseur  $52\mu\text{m}$ .



**Figure -8:** Courbes calculées  $\text{pH} = f([\text{S}], I_h)$ .

Conditions d'obtention de ces courbes: Tampon phosphate  $10^{-2}\text{M}$ ,  $\text{pH}=7,2$ , et  $T=22^\circ\text{C}$ . Concentration en BuChE:  $0,03\text{mg} / 2\mu\text{l}$ , dans une membrane d'épaisseur  $52\mu\text{m}$ .

profils dépend de la valeur de la concentration en substrat dans la solution: quand celle-ci est faible, le substrat est totalement consommé avant d'atteindre l'électrode (Figure 5).

Les profils de concentration calculés de S et P, ainsi que la résolution de l'équation (4') permettent d'accéder au profil de pH au sein de la membrane, représenté sur la Figure 6. Pour une concentration en enzyme dans la membrane bien définie, le traitement mathématique permet de mettre en évidence une "zone gelée", dans laquelle la concentration en substrat est pratiquement nulle. Cette zone est d'autant plus grande que la concentration en substrat dans la solution (notée  $S_{sol}$ ) est faible; sur cette même zone, le pH reste constant.

En conséquence, pour augmenter la sensibilité de l'électrode enzymatique aux inhibiteurs, ou encore *diminuer le seuil de détection en pesticides, il est nécessaire de réduire cette "zone gelée" et d'avoir une valeur non nulle de  $S(0)$ , concentration en substrat à l'interface électrode-membrane*. Le choix d'une concentration de travail  $S_{sol}$  pour les expériences de routine est donc limité par ces contingences.

Pour vérifier les résultats obtenus par le calcul, une comparaison entre courbes théoriques et courbes expérimentales a été effectuée. Pour ce faire, une série de membranes enzymatiques a été réalisée, chacune contenant une quantité d'enzyme bien définie, échelonnée de 15%.m à 100%.m ( $m=0,03$  mg). D'après la définition donnée pour  $I_h$ , elles peuvent donc être considérées comme des membranes présentant des coefficients d'inhibition de 85% à 0%. *Les Figures 7 et 8 montrent une bonne corrélation entre les courbes  $pH = f(S, I_h)$  obtenues expérimentalement et celles obtenues par le calcul numérique.*

On peut donc considérer que le modèle choisi pour cette étude permet une bonne approche des phénomènes observés.



## CONCLUSION





Prévoir l'utilisation en continu de l'électrode à butyrylcholinestérase pour la détection de pesticides, organophosphorés et carbamates, nous a amenés à essayer de cerner le comportement de cette enzyme, libre et immobilisée.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à atteindre l'objectif le plus important : réaliser en série des membranes à butyrylcholinestérase, gardant le maximum de leur activité sur de longues durées, et ne posant pas de problèmes de stockage particuliers. Cet objectif a été atteint grâce à l'association d'une trame synthétique et de l'immobilisation de l'enzyme par l'utilisation de glutaraldéhyde.

Les conditions de travail permettant d'atteindre des seuils de détection très faibles en inhibiteurs ont été étudiées, pour aboutir à la définition des conditions optimales de fabrication et d'utilisation de l'électrode.

Dans un esprit d'élargissement du champ de travail de cette électrode enzymatique, et tenant compte du fait que de nombreux inhibiteurs sont insolubles dans l'eau, nous avons été amenés à ébaucher une étude sur l'influence d'alcools tels l'éthanol et le méthanol, sur la butyrylcholinestérase, libre et immobilisée. Il en résulte essentiellement que la présence d'éthanol, jusqu'à des concentrations de 10 % v/v, n'influe aucunement sur le comportement de l'électrode. Des précautions sont par contre à prendre en ce qui concerne l'utilisation du méthanol, et le réétalonnage de l'électrode se révèle indispensable.

Outre les interférents étudiés antérieurement, tels les métaux lourds, une interférence due aux sels d'halogénures a été décelée, et un modèle théorique proposé pour l'interpréter. Nous en avons conclu que la diminution du signal enregistrée découlait d'une interaction substrat-sels et non enzyme-sels.

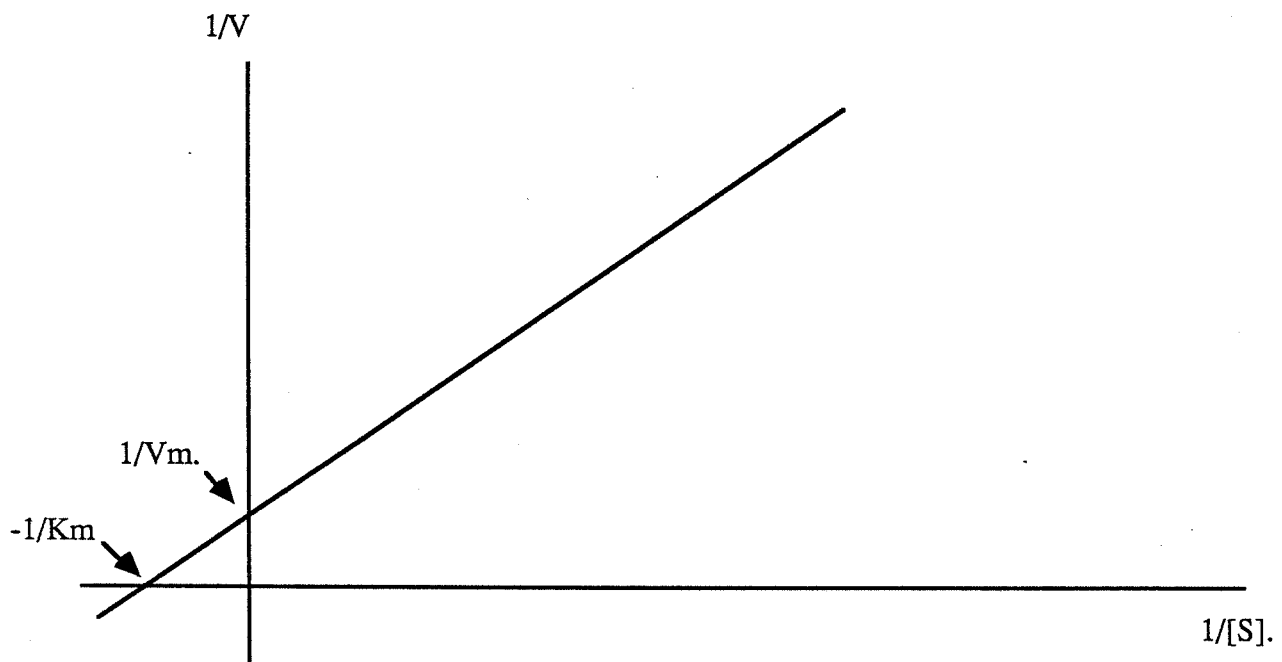
Le caractère irréversible de l'inhibition causée par les organophosphorés nous a amenés à étudier de près toute possibilité de régénération de la membrane enzymatique inhibée. Outre les traitements opérés avec des régénérants classiques, nous avons ainsi pu mettre au point une méthode qui, à notre connaissance, est tout à fait originale. Cette méthode utilise l'eau oxygénée, et permet d'envisager un champ de prospection plus large : la possibilité de traiter, par ce produit, les empoisonnements causés par les inhibiteurs des cholinestérases.

La faisabilité de l'automatisation de la détection de pesticides organophosphorés et carbamates, utilisant l'électrode utilisée, a pu ensuite être démontrée. Pour une étude de mise au point, le matériel utilisé était suffisamment performant. La voie reste cependant ouverte à la réalisation d'un appareillage plus compact, qui trouvera sa place dans toute station de surveillance des eaux exposées à des risques de pollution.

De l'étude d'un modèle théorique simulant le comportement d'une membrane enzymatique, nous avons tiré une conclusion essentielle, en accord avec l'expérience : la concentration de substrat est un paramètre important dans l'obtention des seuils de détection les plus faibles en inhibiteurs.



**ANNEXE I: REPRESENTATION DE LINEWEAVER-BURK.**



Expression de la vitesse d'une réaction enzymatique selon Michaelis:

$$V = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

La méthode de Lineweaver-Burk utilise la formule inversée:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} \right)$$

Le tracé de  $1/V$  en fonction de  $1/[S]$  permet de déterminer graphiquement  $K_m$  et  $V_m$ .



## Annexe II:

### MONOGRAPHIE DE CERTAINS PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES UTILISES.

- Dichlorvos :** 2,2 dichlorovinyl dimethyl phosphate  
(DDVP, Vapona)
- première utilisation en 1955
  - liquide incolore, soluble à 10g/l dans l'eau
  - insecticide de contact et des voies digestives et respiratoires
  - DL<sub>50</sub> = 80 mg/kg pour le rat.
- Parathion :** Diethyl p-nitrophenyl phosphorothionate  
(Folidol, Thiophos) - synthétisé en 1944 par Schrader
- liquide jaune, soluble à 24 mg/l dans l'eau
  - le plus largement utilisé jusqu'à maintenant, mais commence à être interdit en raison de sa toxicité très grande pour les mammifères DL<sub>50</sub> = 7 mg/kg pour le rat
  - stable en milieu acide et neutre ; s'hydrolyse à pH > 12
  - assez persistant dans l'environnement
  - son métabolite : le paraoxon, a une telle activité anticholinestérasique pour les mammifères : DL<sub>50</sub> = 2,5 mg/kg pour le rat, que pratiquement on ne l'emploie plus comme insecticide. Lors du métabolisme du parathion dans l'eau, la quantité d'oxon formé n'est pas stoechiométrique (autres produits de dégradation formés).
- Fenitrothion :** Dimethyl-3-méthyl-4-nitrophenyl phosphorothionate  
(Sumithion, Folothion, Métathion)
- synthétisé en 1957 pour la première fois, liquide, soluble à 30 mg/l,
  - plus stable que le parathion
  - haute activité insecticide, mais toxicité relativement faible pour les mammifères
- Bromophos :** 4-Bromo-2,5-dichlorophenyl-dimethyl phosphorothionate  
(Nexim, Brofène)
- première utilisation en 1961, solide blanc soluble à 40 mg/l
  - stable à des pH > 9
  - insecticide et acaricide persistant, généralement utilisé pour les fruits et légumes.
  - toxicité pour les mammifères basse. DL<sub>50</sub> = 3,7 mg/kg pour le rat.
- Malathion :** S-[1,2-Di(ethoxycarbonyl) ethyl] dimethyl phosphorothiolothionate  
(Cythion, Karbofos) - découvert en 1950, il a été le premier insecticide organophosphoré à toxicité hautement sélective

- liquide jaune, soluble à 145 mg/l dans l'eau
- hydrolysé à des pH > 7 ou < 5
- DL<sub>50</sub> = 1,375 g/kg pour le rat
- très utilisé dans la lutte contre les moustiques.

**Phosalone :** S-(6-Chlorobenzoxazolone-3-methyl) diethyl phosphorothiolothionate  
(Zolone)

- découvert en 1961 et commercialisé en 1964
- solide cristallin incolore, rapidement hydrolysé en milieu alsalin
- son spectre d'activité toxique est large ; utilisée essentiellement contre les chenilles, les pucerons ou les mites
- DL<sub>50</sub> = 120 mg/kg pour le rat.

Les noms entre parenthèses sont les noms commerciaux des produits cités.

Tiré du Rapport de recherche LPC N° 88.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] E.S. Kempner, J.H. Miller                      Exp. Cell. Res., 50, 150, (1968).
- [2] R. Goldman, L. Goldstein, F. Katchalski      in "Biochemical Aspects of Reactions on solid supports", 1, Ed : Academic Press of New--York.
- [3] R. Goldman, O. Kedem, H.I. Silman ,        Biochemistry, 7, 486, (1968).  
S.R. Caplan, E. Katalaki
- [4] D.A. Gough, J.D. Andrade                      Science, 180, 380, (1973).
- [5] L. Goldstein, G. Manecke                      in "Applied Biochemistry and Bioengineering", 1, 23, (1976). Ed : Wingard et coll., Academic Press of New-York.
- [6] K. Mosbach    in "Applied of Biochemical Systems in organic chemistry" 2, 969, (1976 a). Ed. J.B. Jones and coll., J. Wiley and Sons, New-York.
- [7] K. Mosbach    in "Methods in enzymology", 44, (1976b) Ed. Academic Press of New-York.
- [8] K. Mosbach, A.C. Koch-Schmidt                Biochemistry, 16, 2105, (1967).
- [9] P. Monsand    "Immobilisation d'enzymes à l'aide du glutaraldéhyde", thèse n° 796, Toulouse, (1977).
- [10] C. Tran-Minh                                      Ion Selective Electrode Revue, 7, 41, (1985).
- [11] G. Guilbault                                      Anal. Proc. 20, (11), 550, (1983).
- [12] P.H. Coulet, D.C. Gautheron                Journal of chromatography, 215, 65, (1981).
- [13] G. Guibault                                      Applied Biochemistry and Biotechnology 7, 85, (1982).
- [14] M. Mascini, G. Palleschi, D. Moscone        Rassenegna Chimica, 1, 3, (1984).
- [15] M. Mascini, G. Palleschi, D. Moscone        Rassegna Chimica, 2, 75, (1984).
- [16] V.S. Srinivasan, T.J. Povsic,                American Laboratory, 15 (10), 57, (1983).  
J.L. Huntington
- [17] K. Matsumoto, K. Yamada, Y. Osajima        Anal. Chem., 53, 1974, (1981).
- [18] E. Wilkins, M.G. Wilkins                      J. Biomed. Eng., 5, 309, (1983).
- [19] G. Guilbault, G. Palleschi, J.J. Jordan,      Proc. of the 2nd Int. Meeting on chemical sensors, Bordeaux, 1986, 515, (1986).  
P.H. Foley, J.N. Ngwainbi



- [20] J. Anzai, T. Kujano, T. Osa  
Bunseki Kagaku, 33, E-131, (1984).
- [21] B. Danielsson, F. Winqvist, K. Mosbach  
Appl. Implic. Biotechnol., 1st, 679, (1983).
- [22] S. Shuichi, M. Karube  
Gendai Kagaku, 150, 55, (1983).
- [23] C.R. Lowe  
Biosensors, 1, 3, (1985).
- [24] L. Mickaelis, M.L. Menten  
Biochem. Z, 49, 333, (1913).
- [25] M. Dixon, E.C. Webb  
in "Enzymes", 54, (1971). New Edition; Ed. Lengman Group Limited.
- [26] J.L. Webb  
in "Enzyme and Metabolic I Inhibitors", 1, 149, (1963). Ed : Academic Press. New-York and London.
- [27] B. Mendel, D.B. Mundell, Runday  
H. Biochem. J., 37, 473, (1943).
- [28] B. Mendel, Runday  
H. Biochem. J., 37, 59, (1943).
- [29] Y. Morot-Gaudry, R. Romo, B. Lesbats, A. Cheramy, G. Godehen  
Europeen Journal of Pharmacology, 110, 81, (1985).
- [30] K. Kovacs, B. Szajani, L. Boross  
J. Appl. Biochem., 4, 11, (1982).
- [31] J.C. Lee, J.A. Harpes  
Biochemistry, 12, 8, (1973).
- [32] Russel Main, W.G. Sovcie, I.L. Buxton  
Biochem. J., 733, (1974).
- [33] K.B. Augustinsson, H. Erikson  
Croatica Chemica Acta, 3, 277, (1975).
- [34] K.B. Augustinsson  
Biochimica et Biophysica Acta, 128, 351, (1966).
- [35] F. Bergmann, R. Segal, A. Shimoni, M. Wurzel  
Biochem. J., 63, 684, (1956).
- [36] J.A. Cohen, R.A. Osterbaan, M.G. Waringa  
Biochimica et Biophysica Acta, 18, 228, (1955).
- [37] E. Hase  
Biochem. J., 39, 259, (1952).
- [38] N.D. Igumnova, A.A. Aaviksaar, S.V. Bogatkov  
Bioorganicheskaya Khimiya, 3 (10), 1401, (1977).
- [39] O.E. Millner, Jr. and W.P. Purcell  
Journal of Pharmaceutical Sciences, 65 (6), 911, (1976).
- [40] M. Pavhic  
Biochimica et Biophysica Acta, 198, 389, (1970).
- [41] M.L. Go, T.L. Ngiam, A.S.C. Wan  
Journal of Tropical Medecine Public Health, 12, 189, (1981).
- [42] J.F. Mackworth, E.C. Webb  
Biochem. J., 42, 91, (1948).
- [43] K.V. Asperen, H.M. Dekhuijzen  
Biochemica et Biophysica Acta, 28, 603, (1958).

- [44] Y.C. Chiu, R.K. Tripathi, R.D. O'Brien Biochemical and Biophysical Research Communications, 46 (1), 35, (1972).
- [45] G.L. Horton, C.N. Lieske, J.R. Lowe Pest. Sci., 9, 135, (1978).
- [46] J. Patocka, J. Bajgar Chem. Commun., 38, 3940, (1973).
- [47] A.P. Brestkin, J.L. Brik, S.A. Trifanova Izvestiya Akademii Nauk, 4, 883,(1976)
- [48] A.P. Brestkin, I.L. Brik, N.N. Godovikov, S.A. Trifona Izvestiya Akademii Nauk, 2, 429,(1976).
- [49] V. Langel, J. Jarv Biochimica et Biophysica Acta, 525, 122, (1978).
- [50] A.P. Brestkin, E.B. Maizel, O.I. Smirnov Biokhimiya, 40 (3), 521, (1975).
- [51] C.M. Himel, J.L. Taylor Pesticide Biochemistry and Physiology, 17, 103, (1982).
- [52] M. Nozawa, K. Tanizawa, Y. Kanooka Biochimica et Biophysica Acta, 611, 314, (1980).
- [53] A.F. Childs, D.R. Davies, A.L. Green, J.P. Rutland Brit. J. Pharmacol., 10, 462, (1955).
- [54] D.R. Davies, A.L. Green Advanced Enzymology, 20, 283, (1958).
- [55] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R. Featherstone Med. Biochem. Pharmacol., 7, 88, (1961).
- [56] A.A. Dietz, H.M. Rubinstein, T. Lubrano Clinical Chemistry, 19, 11, (1973).
- [57] W.A. Poppe, W. Tritschler J. Clin. Chem. and Clin. Biochem. 21 (6), 381, (1983).
- [58] R. Guyonnet Thèse (1978), N°805, Université Claude Bernard I.
- [59] J. Beaux Thèse (1983), Institut National Polytechnique de Grenoble.
- [60] P. Chassin Rapport de D.E.A, (1984), Université de Clermont-Ferrand.
- [61] M.B. Laskowski, W.D. Dettbarn J. Pharmacol., 210 (2), 269, (1979).
- [62] J. Bajgar, J. Fusek, J. Patocka, Acta Biol. Med. Germ., 36, 231, (1977).
- [63] Lynn Wecker, T. Kianta, W.D. Dettbarn V. Hrchina Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 206 (1), 97, (1978).
- [64] Lynn Wecker, W.D. Dettbarn J. Neurochem., 32 (3), 961, (1979).
- [65] K. Visweswariah, N.V. Kumar, S.K. Majumder Curr. Sci., 48 (2), 86, (1979).
- [66] C.C. Mickael, W. Barryl Wilson Toxicol. Letters, 9(2), 131, (1981).

- [67] W.L. Bradford, Nakatsugawa Tsutomu *Pest. Biochem. Physiol.*, 18(3), 298, (1982).
- [68] Mc Elroy, D. Roger, C.W. Howard *J. Agricult. Food. Chem.*, 32(1), 119 (1986).
- [69] A.J.M. Degen, J. Van der Vies *Scand. J. Clin. Lab. Insect.*, 45(3), 283, (1985).
- [70] J.H. De Neef, A.J. Porsius, H.H. Van Rooy *J. Chromatography*, 224(1), 133, (1981).
- [71] J.G. Navarro, E.S. Cornwell *J. Chromatography*, 138(2), 423, (1977).
- [72] W. Jr. Kenneth, E.D. Lenz *Life Sci.*, 30(4), 355, (1982).
- [73] R. Fieblinger *Zentralol. Pharm.*, 121(11), 1097, (1982).
- [74] M. Lober, S. Krantz, I. Hermann *Acta Biol. Med. Ger.*, 41(5), 487, (1982).
- [75] E.P. De Schyrer, L. De Rew, J.L. Willens *J. Chromatography*, 338(2), 389, (1985).
- [76] J. Kvalag, D.L. Elliott, Y. Iwata, F.A. Gunther *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 17(3), 253, (1977).
- [77] D.E. Ott *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 17(3), 261, (1977).
- [78] H.R. Mc. Lean, S. Futagaki, J.T. Leffingwell *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 18(2), 247, (1977).
- [79] N.V. Nanda, Ramasundari, Mattipalli *J. Assoc. Anal. Chem.*, 63(3), 536, (1980).
- [80] M.A.Q. Khan in "Pesticides in aquatic environments", Ed. Plenum Press, New-York, (1977).
- [81] S.S. Brody, J.E. Chaney *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 55, 537, (1972).
- [82] P. Durand, J.M. Nicaud, J. Mallevalle *Journal of Analytical Toxicology*, 8, 112, (1984).
- [83] Fiche TAP 2889.
- [84] J.L. Webb in "Enzyme and Metabolic Inhibitors", 1, 799, (1963), Ed. Academic Press. New-York and London.
- [85] M. Durand, P. Favard dans "La cellule", 155, (1978). Hermann Editeurs.
- [86] R. Scopes in "Protein Purification, Principles and Practice", 44, (1984), C.H. Cantor Editor.

- [87] J. Yon dans "Structure et dynamique conformationnelle des protéines", 243, (1976), Hermann Editeurs.
- [88] M.A. Gordon, W.L. Settle, S.L. Chan, A.J. Trevor Biochimica et Biophysica Acta, 485, 101, (1977).
- [89] E. Darmois et G. Darmois dans "Electrochimie théorique", 15, (1960), Masson et Cie Editeurs
- [90] W.N. Aldrige, A.N. Davinson Biochem. J., 55, 763, (1953).
- [91] W.N. Aldrige Chem. and Ind., 473, (1954).
- [92] J.W. Hovanec, C.N. Lieske Biochemistry, 11, 1051, (1972).
- [93] J.W. Hovanec, C.A. Broomfield, G.M. Steinberg Biochimica et Biophysica Acta, 483, 312, (1977).
- [94] F. Nelsch, W.D. Dettbarn Biochemical Pharmacology, 21, 1039, (1972).
- [95] K.W. Lanks, C.N. Lieske, B. Papirmeister Biochimica et Biophysica Acta, 483, 320, (1977).
- [96] B.E. Hackley, J.R. Plapinger, M. Stolberg, T.W. Jauregg Journal of American Chemical Society, 77, 3651, (1955).
- [97] A.F. Childs, D.P. Davies, A.L. Green, J.P. Rutland Brit. J. Pharmacol., 10, 462, (1955).
- [98] B.J. Jandorf, E.A. Crowell, A.P. Levin Federation Proceeding, 14, 231, (1955).
- [99] E.J. Poziomeck, B.E. Hackley, Jr. and G. Seiberg J. Org. Chem., 23, 714, (1958).
- [100] K. Martinek, V.V. Mozhaev, M.D. Smirnov, I.V. Berezin Biotechnology and Bioengineering, 22, 247, (1980).
- [101] H.K. O'Farrell, H.D. Brown, S.K. Chappopadhyay, Y.T. Das Anal. Letters, 85, (1980).
- [102] A.L. Green, B. Saville Journal of Chemical Society, 3887, (1956).
- [103] A.L. Green, D.R. Davies Biochemical Journal, 63, 529, (1956).
- [104] A.L. Green, H.J. Smith Biochemical Journal, 28, 68, (1958).
- [105] J. Sherma, G. Zweig Analytical Chemistry, 53(5), 77R, (1981).
- [106] C.E. Mendoza Intern. J. Environ. Anal. Chem., 3, 171, (1974).
- [107] A. Otsuki, T. Takaku Analytical Chemistry, 51(7), 833, (1979).
- [108] F. Erb L'actualité chimique, 20, (1979).

- [109] G.G. Guilbault, M.H. Sadar  
Analytical Chemistry, 41, 366, (1969).
- [110] R. Greenhalgh, J.N. Shoolery  
Analytical Chemistry, 50 (14), 2039,  
(1978).
- [111] W.F. Spencer, Y. Iwata, W.W. Kiglore,  
J.B. Korak  
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 18(6),  
656, (1977).
- [112] A. Carsten, Ole Christensen, K. Hermann  
Van. Vasser, 58, 1, (1982).
- [113] C. Tran-Minh, J. Beaux  
Anal. Chem., 51, 91, (1979).
- [114] J.P. Kernevez  
Thèse, Université de Paris VI, (1972).

**CE TRAVAIL FAIT L'OBJET DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SUIVANTES :**

- "Automatisation de la détection de pesticides par capteur enzymatique"

Journée "Capteurs chimiques et biocapteurs", Ecole Centrale de Lyon, 15 Mai 1987; en collaboration avec : M. A. ABDUL, et C. TRAN-MINH.

- "Réalisation d'un ensemble automatisé pour la mesure de la toxicité des eaux de rivière"

Colloque du 5 Février 1987 : "Automatisation des analyses et contrôle sanitaire de la qualité des eaux", organisé par l'Association Pharmaceutique pour l'Hydrologie; en collaboration avec :

M. A. ABDUL, M. DUPONT, C. TRAN-MINH.

Une publication portant le même titre est à paraître dans le Journal Français d'Hydrologie (Septembre 1987).

- "Theoretical approach on butyrylcholinestérase electrode"

H. EL YAMANI, M. ABDUL, C. TRAN-MINH, sous presse chez "Sensors and Actuators".

- "Automated system for pesticides detection"

H. EL YAMANI, M. ABDUL, D. CHAVANNE, C. TRAN-MINH, sous presse chez "Sensors and Actuators".

- Immobilized Enzymes Probe for determining Inhibitors"

H. EL YAMANI, M. ABDUL, C. TRAN-MINH

Proceedings of the Second International Meeting on Chemical Sensors, Bordeaux 1986, p. 615.

- Exposition et présentation de l'ensemble automatisé à la Foire Internationale INNOVA, 11-16 Mars 1985, stand ARMINES.







## RESUME

L'étude porte sur une électrode à butyrylcholinestérase immobilisée, destinée à la détection de pesticides et insecticides inhibiteurs de cette enzyme, en particulier les organophosphorés et les carbamates.

Les conditions optimales de mise au point et d'utilisation de cette électrode sont étudiées, ainsi que son comportement en présence d'inhibiteurs solubles dans l'eau, représentés par le paraoxon. La détection d'inhibiteurs insolubles dans l'eau est effectuée dans un mélange tampon phosphate-éthanol ou méthanol.

Le champ des interférences connues est élargi aux sels d'halogénures, et les possibilités de régénération de la butyrylcholinestérase inhibée optimisées.

La détection en routine d'inhibiteurs dans les eaux exposées à des risques de pollution accidentelle est mise au point grâce à un ensemble automatisé, dont le fonctionnement est explicité.

Un modèle théorique permet d'expliciter certains résultats de l'expérience.

## MOTS-CLES:

Butyrylcholinestérase - Immobilisation - Inhibition - Organophosphorés - Carbamates - Régénération - Automatisation - Modélisation -