

Thèse

**Développement d'un biocapteur conductimétrique bi-enzymatique
à cellules algales**

Présentée devant
L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Pour obtenir
Le grade de Docteur

Ecole Doctorale : Chimie de Lyon (Chimie, Procédés, Environnement)
Spécialité : Sciences et Techniques du déchet

Par
Céline CHOUTEAU

Soutenue le 5 novembre 2004 devant la commission d'examen

Jury

Directeurs de thèse M. Jean-Marc Chovelon, Professeur (Université Claude Bernard, Lyon1)
Mme Claude Durrieu, Enseignant-Chercheur (Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat, Vaulx-en-Velin)

Rapporteurs M. Serge Cosnier, Professeur (Université Joseph Fournier, Grenoble)
M. Jean-Michel Kauffmann, Professeur (Université Libre de Bruxelles)

M. Rémy Gourdon, Professeur (INSA, Lyon)
M. Canh Minh Tran, Professeur (Ecole des Mines de Saint-Etienne)

Cette thèse a été préparée conjointement entre le Laboratoire des Sciences de l'Environnement de l'ENTPE et le Laboratoire d'Application de la Chimie à l'Environnement de l'Université Claude Bernard-Lyon 1.

Directeur : STORCK A.

Professeurs :

| | |
|----------------------------|--|
| AUDISIO S. | PHYSICOCHIMIE INDUSTRIELLE |
| BABOT D. | CONT. NON DESTR. PAR RAYONNEMENTS IONISANTS |
| BABOUX J.C. | GEMPPM*** |
| BALLAND B. | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| BAPTISTE P. | PRODUCTIQUE ET INFORMATIQUE DES SYSTEMES |
| MANUFACTURIERS | |
| BARBIER D. | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| BASTIDE J.P. | LAEPSI**** |
| BAYADA G. | MECANIQUE DES CONTACTS |
| BENADDA B. | LAEPSI**** |
| BETEMPS M. | AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE |
| BIENNIER F. | PRODUCTIQUE ET INFORMATIQUE DES SYSTEMES |
| MANUFACTURIERS | |
| BLANCHARD J.M. | LAEPSI**** |
| BOISSON C. | VIBRATIONS-ACOUSTIQUE |
| BOIVIN M. (Prof. émérite) | MECANIQUE DES SOLIDES |
| BOTTA H. | UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL - Développement Urbain |
| BOTTA-ZIMMERMANN M. (Mme) | UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL - Développement Urbain |
| BOULAYE G. (Prof. émérite) | INFORMATIQUE |
| BOYER J.C. | MECANIQUE DES SOLIDES |
| BRAU J. | CENTRE DE THERMIQUE DE LYON - Thermique du bâtiment |
| BREMOND G. | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| BRISSAUD M. | GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE |
| BRUNET M. | MECANIQUE DES SOLIDES |
| BRUNIE L. | INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION |
| BUREAU J.C. | CEGELY* |
| CAVILLE J.Y. | GEMPPM*** |
| CHANTE J.P. | CEGELY*- Composants de puissance et applications |
| CHOCAT B. | UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL - Hydrologie urbaine |
| COMBESCURE A. | MECANIQUE DES CONTACTS |
| COUSIN M. | UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL - Structures |
| DAUMAS F. (Mme) | CENTRE DE THERMIQUE DE LYON - Energétique et Thermique |
| DOUTHEAU A. | CHIMIE ORGANIQUE |
| DUFOUR R. | MECANIQUE DES STRUCTURES |
| DUPUY J.C. | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| EMPTOZ H. | RECONNAISSANCE DE FORMES ET VISION |
| ESNOUF C. | GEMPPM*** |
| EYRAUD L. (Prof. émérite) | GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE |
| FANTOZZI G. | GEMPPM*** |
| FAVREL J. | PRODUCTIQUE ET INFORMATIQUE DES SYSTEMES |
| MANUFACTURIERS | |
| FAYARD J.M. | BIOLOGIE FONCTIONNELLE, INSECTES ET INTERACTIONS |
| FAYET M. | MECANIQUE DES SOLIDES |
| FERRARIS-BESSO G. | MECANIQUE DES STRUCTURES |
| FLAMAND L. | MECANIQUE DES CONTACTS |
| FLORY A. | INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATIONS |
| FOUGERES R. | GEMPPM*** |
| FOUQUET F. | GEMPPM*** |
| FRECON L. | REGROUPEMENT DES ENSEIGNANTS CHERCHEURS ISOLES |
| GERARD J.F. | INGENIERIE DES MATERIAUX POLYMERES |
| GERMAIN P. | LAEPSI**** |
| GIMENEZ G. | CREATIS** |
| GOBIN P.F. (Prof. émérite) | GEMPPM*** |
| GONNARD P. | GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE |
| GONTRAND M. | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| GOUTTE R. (Prof. émérite) | CREATIS** |
| GOUJON L. | GEMPPM*** |
| GOURDON R. | LAEPSI****. |
| GRANGE G. | GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE |
| GUENIN G. | GEMPPM*** |
| GUICHARDANT M. | BIOCHIMIE ET PHARMACOLOGIE |
| GUILLOT G. | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| GUINET A. | PRODUCTIQUE ET INFORMATIQUE DES SYSTEMES |
| MANUFACTURIERS | |
| GUYADER J.L. | VIBRATIONS-ACOUSTIQUE |
| GUYOMAR D. | GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE |

| | |
|---|--|
| HEIBIG A. | MATHEMATIQUE APPLIQUEES DE LYON |
| JACQUET-RICHARDET G. | MECANIQUE DES STRUCTURES |
| JAYET Y. | GEMPPM*** |
| JOLION J.M. | RECONNAISSANCE DE FORMES ET VISION |
| JULLIEN J.F. | UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL - Structures |
| JUTARD A. (Prof. émérite) | AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE |
| KASTNER R. | UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL - Géotechnique |
| KOULOUMDJIAN J. | INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION |
| LAGARDE M. | BIOCHIMIE ET PHARMACOLOGIE |
| LALANNE M. (Prof. émérite) | MECANIQUE DES STRUCTURES |
| LALLEMAND A. | CENTRE DE THERMIQUE DE LYON - Energétique et thermique |
| LALLEMAND M. (Mme) | CENTRE DE THERMIQUE DE LYON - Energétique et thermique |
| LAUGIER A. | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| LAUGIER C. | BIOCHIMIE ET PHARMACOLOGIE |
| LAURINI R. | INFORMATIQUE EN IMAGE ET SYSTEMES D'INFORMATION |
| LEJEUNE P. | UNITE MICROBIOLOGIE ET GENETIQUE |
| LUBRECHT A. | MECANIQUE DES CONTACTS |
| MASSARD N. | INTERACTION COLLABORATIVE TELEFORMATION TELEACTIVITE |
| MAZILLE H. | PHYSICOCHIMIE INDUSTRIELLE |
| MERLE P. | GEMPPM*** |
| MERLIN J. | GEMPPM*** |
| MIGNOTTE A. (Mle) | INGENIERIE, INFORMATIQUE INDUSTRIELLE |
| MILLET J.P. | PHYSICOCHIMIE INDUSTRIELLE |
| MIRAMOND M. | UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL - Hydrologie urbaine |
| MOREL R. | MECANIQUE DES FLUIDES ET D'ACOUSTIQUES |
| MOSZKOWICZ P. | LAEPSI**** |
| NARDON P. (Prof. émérite) | BIOLOGIE FONCTIONNELLE, INSECTES ET INTERACTIONS |
| NIEL E. | AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE |
| NORTIER P. | DREP |
| ODET C. | CREATIS** |
| OTTERBEIN M. (Prof. émérite) | LAEPSI**** |
| PARIZET E. | VIBRATIONS-ACOUSTIQUE |
| PASCAULT J.P. | INGENIERIE DES MATERIAUX POLYMERES |
| PAVIC G. | VIBRATIONS-ACOUSTIQUE |
| PELLETIER J.M. | GEMPPM*** |
| PERA J. | UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL - Matériaux |
| PERRIAT P. | GEMPPM*** |
| PERRIN J. | INTERACTION COLLABORATIVE TELEFORMATION TELEACTIVITE |
| PINARD P. (Prof. émérite) | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| PINON J.M. | INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION |
| PONCET A. | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| POUSIN J. | MODELISATION MATHEMATIQUE ET CALCUL SCIENTIFIQUE |
| PREVOT P. | INTERACTION COLLABORATIVE TELEFORMATION TELEACTIVITE |
| PROST R. | CREATIS** |
| RAYNAUD M. | CENTRE DE THERMIQUE DE LYON - Transferts Interfaces et Matériaux |
| REDARCE H. | AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE |
| RETIF J-M. | CEGELY* |
| REYNOUARD J.M. | UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL - Structures |
| RIGAL J.F. | MECANIQUE DES SOLIDES |
| RIEUTORD E. (Prof. émérite) | MECANIQUE DES FLUIDES |
| ROBERT-BAUDOUY J. (Mme) (Prof. émérite) | GENETIQUE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES |
| ROUBY D. | GEMPPM*** |
| ROUX J.J. | CENTRE DE THERMIQUE DE LYON - Thermique de l'Habitat |
| RUBEL P. | INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION |
| SACADURA J.F. | CENTRE DE THERMIQUE DE LYON - Transferts Interfaces et Matériaux |
| SAUTEREAU H. | INGENIERIE DES MATERIAUX POLYMERES |
| SCAVARDA S. | AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE |
| SOUIFI A. | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| SOUROUILLE J.L. | INGENIERIE INFORMATIQUE INDUSTRIELLE |
| THOMASSET D. | AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE |
| THUDEROZ C. | ESCHIL - Equipe Sciences Humaines de l'Insa de Lyon |
| UBEDA S. | CENTRE D'INNOV. EN TELECOM ET INTEGRATION DE SERVICES |
| VELEX P. | MECANIQUE DES CONTACTS |
| VIGIER G. | GEMPPM*** |
| VINCENT A. | GEMPPM*** |
| VRAY D. | CREATIS** |
| VUILLERMOZ P.L. (Prof. émérite) | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| <i>Directeurs de recherche C.N.R.S. :</i> | |
| BERTHIER Y. | MECANIQUE DES CONTACTS |
| CONDEMINÉ G. | UNITE MICROBIOLOGIE ET GENETIQUE |

COTTE-PATAT N. (Mme)
ESCUDIE D. (Mme)
FRANCIOSI P.
MANDRAND M.A. (Mme)
POUSIN G.
ROCHE A.
SEGUELA A.
VERGNE P.

UNITE MICROBIOLOGIE ET GENETIQUE
CENTRE DE THERMIQUE DE LYON
GEMPPM***
UNITE MICROBIOLOGIE ET GENETIQUE
BIOLOGIE ET PHARMACOLOGIE
INGENIERIE DES MATERIAUX POLYMERES
GEMPPM***
LaMcos

Directeurs de recherche I.N.R.A. :

FEBVAY G.
GRENIER S.
RAHBE Y.

BIOLOGIE FONCTIONNELLE, INSECTES ET INTERACTIONS
BIOLOGIE FONCTIONNELLE, INSECTES ET INTERACTIONS
BIOLOGIE FONCTIONNELLE, INSECTES ET INTERACTIONS

Directeurs de recherche I.N.S.E.R.M. :

PRIGENT A.F. (Mme)
MAGNIN I. (Mme)

BIOLOGIE ET PHARMACOLOGIE
CREATIS**

* CEGELY *CENTRE DE GENIE ELECTRIQUE DE LYON*

** CREATIS *CENTRE DE RECHERCHE ET D'APPLICATIONS EN TRAITEMENT DE L'IMAGE ET DU SIGNAL*

***GEMPPM *GROUPE D'ETUDE METALLURGIE PHYSIQUE ET PHYSIQUE DES MATERIAUX*

****LAEPSI *LABORATOIRE D'ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DES PROCEDES ET SYSTEMES INDUSTRIELS*

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire des Sciences de l'Environnement de l'ENTPE dirigé par Yves Perrodin en collaboration avec le Laboratoire d'Application de la Chimie à l'Environnement (UMR CNRS-Université Claude Bernard Lyon 1 n° 5634) dirigé par Jean-Marie Hermann. Je les remercie tous deux de m'avoir accueillie dans leur laboratoire pour ces trois ans de thèse.

Je remercie sincèrement mes deux directeurs de thèse, Claude Durrieu, ITPE à l'ENTPE, et Jean-Marc Chovelon, Professeur à l'Université Claude Bernard-Lyon 1 pour m'avoir accompagnée tout au long de ma thèse ainsi que pour leur disponibilité.

Je remercie Serge Cosnier, Professeur à l'Université Joseph de Grenoble et Jean-Michel Kauffmann, Professeur à l'Université Libre de Bruxelles pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je tiens également à remercier les autres membres du jury, Rémy Gourdon, Professeur à l'INSA de Lyon ainsi que Cahn Tran Minh, Professeur à l'École des Mines de Saint-Etienne.

Je remercie tout particulièrement Sergei Dzyadevych, qui m'a initiée au monde des biocapteurs électrochimiques.

Un grand merci à Josiane Thomazi-Coral, stagiaire de l'École des Mines de Saint-Etienne, pour les images AFM des membranes ainsi que Joaquin Henri, DEA au L.S.E. pour ces travaux complémentaires en bioessais.

Merci également aux techniciens du L.S.E., Martine Ghidini-Fatus, Thérèse Bastide et Marc Danjean pour leur aide précieuse.

Au L.S.E, j'aimerais remercier toute l'équipe des enseignants-chercheurs, Jean-Phillipe Bedell, Bernard Clément, Cécile Delolme, Alain Devaux et Thierry Winiarsky.

Un grand merci à Jean-Claude Boisson pour m'avoir accueillie dans son bureau et pour le co-voiturage.

Enfin, merci à Alicia Naveros pour son aide et sa patience devant les feuilles de frais violettes ou blanches, les ordres de mission, les caprices du fax...

Merci aux thésards qui nous ont quittés, Laurent, Gaëlle et Lucile en particulier, avec qui j'ai partagé les trajets en voiture tout en discutant biocapteurs et activités enzymatiques.

Merci à mes coturnes, Manuelle, Nicolas, Stéphane et aux amateurs de thé Myriam et Xavier. Enfin, merci à Charlotte, Laurence et Valérie ainsi qu'aux membres du LICIT, Christine, Vincent, Ludo et Stéphane.

Au 4^{ème} étage du bâtiment Jules Raulin à Lyon 1, je remercie les permanents du LACE, Corinne Ferronato, Christian George, Jean-Pierre Deloume, Rafal Strekowski et Corinne Emmelin, après plusieurs tentatives malheureuses, nous sommes devenues des pros dans l'organisation de notre bureau. Bien entendu, un grand merci aux organiciens du Chéops, Olivier Piva, Fabienne Fache, Béatrice Pelotier pour les pauses café et les pots en commun.

Un grand merci aux membres de la CD4JR, Christine, Marie-Alice, Davy, Tamara, Fabrice, Philippe et Imen. Un merci spécial à Tuan pour les discussions devant le conductimètre.

Enfin, merci aux thésards qui nous ont quittés, Fred et Cyril qui ont décidé de découvrir le Nouveau Monde, Emmanuelle qui a préféré le soleil et la mer de Perpignan.

Merci à mes amis, Aude, Yves-Seb, le clan des parisiens de la 46^{ème} Claire et Benoît, les Franco-Québécois que j'espère revoir très prochainement : Emmanuelle, Laure & Paschal et leur petit bout de chou.

Un immense merci à mes parents pour leur soutien de tous les jours ainsi qu'à ma petite sœur Mélanie, ma superwoman préférée !

SOMMAIRE

Table des matières

| | |
|--|----|
| SOMMAIRE | 11 |
| TABLE DES MATIÈRES | 13 |
| TABLE DES FIGURES | 18 |
| TABLE DES TABLEAUX | 22 |
| DÉFINITIONS | 23 |
| INTRODUCTION | 25 |
| CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE | 29 |
| 1 LE MILIEU AQUATIQUE CIBLE DE POLLUTIONS | 31 |
| 1.1 <i>La ressource en eau</i> | 31 |
| 1.1.1 Le cycle de l'eau | 31 |
| 1.1.2 La consommation d'eau en France..... | 31 |
| 1.2 <i>Les écosystèmes aquatiques</i> | 33 |
| 1.2.1 Les différents écosystèmes aquatiques | 33 |
| 1.2.1.1 Ecosystèmes lenticques et lotiques | 33 |
| 1.2.1.2 Le compartiment biotique des écosystèmes aquatiques | 33 |
| 1.2.2 Les pollutions du milieu aquatique | 34 |
| 1.2.2.1 Origines des polluants du milieu aquatique..... | 34 |
| 1.2.2.2 Les pollutions aux métaux lourds | 35 |
| 1.2.2.3 Les pollutions aux pesticides | 37 |
| 1.3 <i>Les conséquences des pollutions sur les écosystèmes aquatiques</i> | 39 |
| 1.3.1 Effets en chaîne d'un polluant sur un écosystème aquatique..... | 39 |
| 1.3.2 Effets des métaux lourds et des insecticides sur le phytoplancton | 41 |
| 1.3.2.1 Action des métaux lourds sur les microalgues..... | 41 |
| 1.3.2.2 Action des insecticides organophosphorés et carbamates sur les microalgues | 42 |
| 1.3.3 Conséquences des perturbations du compartiment algal sur les niveaux trophiques supérieurs | 42 |
| 1.4 <i>Conclusion</i> | 43 |
| 2 LA SURVEILLANCE DES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES | 44 |
| 2.1 <i>La législation</i> | 44 |
| 2.1.1 La nouvelle directive européenne | 44 |
| 2.1.2 Polluants et normes..... | 44 |
| 2.1.2.1 Les métaux lourds | 44 |
| 2.1.2.2 Les pesticides..... | 45 |
| 2.2 <i>Les méthodes analytiques destinées au contrôle de la qualité des eaux</i> | 46 |
| 2.2.1 Les techniques d'analyse chimique de laboratoire..... | 46 |
| 2.2.2 Techniques pour les mesures de paramètres physico-chimiques et biologiques globaux..... | 47 |
| 2.3 <i>Les bioessais écotoxicologiques</i> | 47 |
| 2.3.1 Intérêt des bioessais écotoxicologiques | 47 |
| 2.3.2 Bioessais écotoxicologiques pour le contrôle de la qualité du milieu aquatique | 48 |
| 2.3.2.1 Les décomposeurs | 48 |
| 2.3.2.2 Les producteurs primaires..... | 49 |
| 2.3.2.3 Les consommateurs primaires et secondaires | 49 |
| 2.4 <i>Les biocapteurs environnementaux</i> | 50 |
| 2.4.1 Généralités sur les biocapteurs | 50 |
| 2.4.2 Les transducteurs..... | 52 |
| 2.4.3 Les biorécepteurs..... | 52 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 2.4.3.1 | Les enzymes | 52 |
| 2.4.3.2 | Les cellules entières et les organites..... | 53 |
| 2.4.3.3 | Les anticorps-antigènes et l'ADN..... | 54 |
| 2.4.4 | Les procédés d'immobilisation des biorécepteurs..... | 55 |
| 2.4.4.1 | L'immobilisation physique..... | 55 |
| 2.4.4.2 | L'immobilisation chimique | 56 |
| 2.4.5 | Applications des biocapteurs au contrôle environnemental..... | 57 |
| 2.4.5.1 | Les pesticides..... | 57 |
| 2.4.5.2 | Les métaux lourds | 58 |
| 2.4.5.3 | Autres pollutions | 58 |
| 2.4.5.4 | Biocapteurs commercialisés pour le contrôle environnemental | 59 |
| 2.5 | Conclusion..... | 59 |
| 3 | LES BIOCAPTEURS ÉLECTROCHIMIQUES À CELLULES ALGALES | 61 |
| 3.1 | Présentation de <i>Chlorella vulgaris</i> | 61 |
| 3.2 | Les activités phosphatase alcaline et estérase chez les microalgues aquatiques..... | 62 |
| 3.2.1 | L'activité phosphatases alcaline..... | 62 |
| 3.2.1.1 | Généralités sur les phosphatases..... | 62 |
| 3.2.1.2 | L'activité phosphatase alcaline | 62 |
| 3.2.1.3 | Effets des métaux lourds sur la phosphatase alcaline..... | 63 |
| 3.2.2 | Les activités estérases..... | 64 |
| 3.2.2.1 | Généralités sur les estérases | 64 |
| 3.2.2.2 | Paramètres influençant les activités estérases | 64 |
| 3.2.2.3 | Effets des insecticides carbamates et organophosphorés sur les estérases | 65 |
| 3.3 | Les transducteurs électrochimiques pour la détection enzymatique | 65 |
| 3.3.1 | Les capteurs conductimétriques..... | 65 |
| 3.3.2 | Les capteurs potentiométriques ISFET..... | 67 |
| 3.4 | Conclusion..... | 68 |
| CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES | | 71 |
| 4 | RÉACTIFS UTILISÉS..... | 73 |
| 5 | CULTURE DE L'ALGUE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> | 74 |
| 5.1 | Mise en culture des algues en milieu AFNOR LC | 74 |
| 5.1.1 | Stérilisation | 74 |
| 5.1.2 | Ensemencement | 74 |
| 5.2 | Préconditionnement des algues en milieu AFNOR sans phosphate | 74 |
| 5.3 | Mise en culture des algues en milieu ISO..... | 74 |
| 5.4 | Comptage des cellules algales..... | 75 |
| 6 | PROTOCOLES POUR LA MISE AU POINT DES CAPTEURS..... | 76 |
| 6.1 | Biofonctionnalisation des capteurs | 76 |
| 6.1.1 | Membranes à base d'albumine de sérum bovin (BSA)..... | 76 |
| 6.1.2 | Membranes à base d'alginate de calcium | 76 |
| 6.1.3 | Observation des membranes au microscope | 77 |
| 6.2 | Mesure des activités enzymatiques avec les biocapteurs..... | 77 |
| 6.2.1 | Appareils de mesure..... | 77 |
| 6.2.1.1 | Instrumentation pour les mesures conductimétriques | 77 |
| 6.2.1.2 | Instrumentation pour les mesures avec capteurs potentiométriques..... | 78 |
| 6.2.2 | Protocole pour la mesure de l'activité phosphatase alcaline..... | 78 |
| 6.2.2.1 | Obtention de la cinétique enzymatique | 78 |
| 6.2.2.2 | Etude du vieillissement du capteur..... | 79 |
| 6.2.3 | Protocole pour la mesure de l'activité estérase..... | 79 |
| 6.3 | Essais de toxicité basés sur l'inhibition des activités enzymatiques..... | 80 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 6.3.1 | Protocole de mesure | 80 |
| 6.3.2 | Les solutions toxiques utilisées..... | 80 |
| 7 | BIOESSAIS SUR ALGUES LIBRES EN MICRO-PLAQUES..... | 81 |
| 7.1 | <i>Principe des mesures d'activités enzymatiques</i> | 81 |
| 7.1.1 | Mise en œuvre..... | 81 |
| 7.1.2 | Protocole pour les mesures de phosphatase alcaline..... | 81 |
| 7.1.3 | Protocole pour les mesures d'estérases..... | 82 |
| 7.2 | <i>Essais de toxicité basés sur l'inhibition des activités enzymatiques</i> | 82 |
| 7.2.1 | Mise en contact des cellules algales avec les toxiques..... | 82 |
| 7.2.2 | Détermination des activités enzymatiques | 83 |
| CHAPITRE III. DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATIONS DES BIOCAPTEURS ELECTROCHIMIQUES A CELLULES ALGALES | | 85 |
| 8 | MESURES D'ACTIVITÉS ENZYMATIQUES SUR CELLULES ENTIÈRES AVEC BIOCAPTEURS..... | 87 |
| 8.1 | <i>Validation de la méthode</i> | 87 |
| 8.2 | <i>Détection de l'activité phosphatase alcaline de <i>Chlorella vulgaris</i></i> | 88 |
| 8.2.1 | Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline de <i>Chlorella vulgaris</i> en bioessai..... | 88 |
| 8.2.2 | Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline de <i>Chlorella vulgaris</i> avec les biocapteurs | 88 |
| 8.2.2.1 | Cinétique enzymatique obtenue avec les biocapteurs conductimétriques..... | 88 |
| 8.2.3 | Mesures avec les capteurs ISFET..... | 89 |
| 8.2.4 | Conclusion..... | 90 |
| 8.3 | <i>Cinétique enzymatique des estérases de <i>Chlorella vulgaris</i></i> | 91 |
| 8.3.1 | Cinétique enzymatique des estérases de <i>Chlorella vulgaris</i> en bioessai..... | 91 |
| 8.3.2 | Cinétique enzymatique des cholinestérases de <i>Chlorella vulgaris</i> avec des biocapteurs..... | 92 |
| 8.3.2.1 | Algues en milieu ISO..... | 92 |
| 8.3.2.2 | Algues en milieu AFNOR..... | 94 |
| 8.3.2.3 | Algues en milieu AFNOR-P..... | 94 |
| 8.3.3 | Conclusion..... | 96 |
| 8.4 | <i>Conclusion générale</i> | 96 |
| 9 | OPTIMISATIONS DES SIGNAUX | 97 |
| 9.1 | <i>Choix de la membrane</i> | 97 |
| 9.1.1 | Les membranes à base d'albumine de sérum bovin..... | 97 |
| 9.1.2 | Les membranes à base d'alginate de calcium | 97 |
| 9.1.3 | Conclusion..... | 98 |
| 9.2 | <i>Les différents paramètres de la membrane active</i> | 98 |
| 9.2.1 | Influence de la quantité d'albumine de sérum bovin..... | 98 |
| 9.2.2 | Influence du temps de contact avec les vapeurs de glutaraldéhyde | 99 |
| 9.2.3 | Influence de la concentration algale | 100 |
| 9.2.3.1 | Evolution de l'activité phosphatase alcaline en fonction de la concentration algale | 100 |
| 9.2.3.2 | Evolution de l'activité phosphatase alcaline pour des membranes à concentrations algales élevées..... | 101 |
| 9.2.3.3 | Conclusion..... | 102 |
| 9.2.4 | Observation des membranes au microscope | 102 |
| 9.3 | <i>Choix de la membrane de référence</i> | 104 |
| 9.3.1 | Algues en milieu AFNOR-P chauffées..... | 104 |
| 9.3.1.1 | Influence de la température sur l'activité phosphatase alcaline des algues..... | 105 |
| 9.3.1.2 | Influence de la température sur l'activité estérase des algues..... | 106 |
| 9.3.1.3 | Conclusion..... | 107 |
| 9.3.2 | Algues en milieu AFNOR..... | 107 |
| 9.3.3 | Membranes « blanches »..... | 108 |
| 9.3.3.1 | Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline..... | 108 |
| 9.3.3.2 | Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase | 108 |

| | | |
|---|--|-----|
| 9.3.3.3 | Etude du signal après dépôt de deux membranes « blanches » sur le capteur..... | 109 |
| 9.4 | <i>Optimisation des conditions opératoires</i> | 110 |
| 9.4.1 | Choix du substrat pour les mesures d'activités enzymatiques..... | 110 |
| 9.4.1.1 | Substrats pour la phosphatase alcaline..... | 110 |
| 9.4.1.2 | Substrats pour les estérases..... | 110 |
| 9.4.2 | Influence de la concentration en tampon..... | 111 |
| 9.4.2.1 | Influence de la concentration en tampon Tris-HCl..... | 111 |
| 9.4.2.2 | Influence de la concentration en tampon KH_2PO_4 | 111 |
| 9.4.3 | Conservation du signal au cours du temps..... | 112 |
| 9.5 | <i>Conclusion</i> | 113 |
| 10 | CONCLUSION GÉNÉRALE..... | 114 |
| CHAPITRE IV. APPLICATION DES BIOCAPTEURS CONDUCTIMÉTRIQUES A CELLULES ALGALES A LA DETECTION DE METAUX LOURDS ET DE PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES ET CARBAMATES..... | | |
| 11 | ESSAIS DE TOXICITÉ AVEC LES MÉTAUX LOURDS..... | 119 |
| 11.1 | <i>Protocole des essais de toxicité pour les biocapteurs</i> | 119 |
| 11.1.1 | Choix de la concentration algale des membranes actives pour les essais de toxicité..... | 119 |
| 11.1.2 | Influence du rinçage..... | 119 |
| 11.1.3 | Choix de la durée d'exposition aux solutions tests..... | 119 |
| 11.1.4 | Contrôle de la stabilité du signal..... | 120 |
| 11.1.5 | Choix de la concentration de substrat pour les essais de toxicité..... | 120 |
| 11.1.6 | Analyse des résultats des essais de toxicité..... | 121 |
| 11.2 | <i>Influence du cadmium sur l'activité phosphatase alcaline de Chlorella vulgaris</i> | 124 |
| 11.2.1 | Essais avec des biocapteurs conductimétriques..... | 124 |
| 11.2.1.1 | Exposition directe..... | 124 |
| 11.2.1.2 | Exposition prolongée..... | 124 |
| 11.2.2 | Mesures en bioessais..... | 126 |
| 11.2.2.1 | Exposition directe..... | 126 |
| 11.2.2.2 | Exposition prolongée..... | 126 |
| 11.2.3 | Conclusion..... | 127 |
| 11.3 | <i>Influence du zinc sur l'activité phosphatase alcaline de Chlorella vulgaris</i> | 128 |
| 11.3.1 | Essais avec des biocapteurs conductimétriques..... | 128 |
| 11.3.1.1 | Exposition directe..... | 128 |
| 11.3.1.2 | Exposition prolongée..... | 128 |
| 11.3.2 | Mesures en bioessais..... | 130 |
| 11.3.2.1 | Exposition directe..... | 130 |
| 11.3.2.2 | Exposition prolongée..... | 130 |
| 11.3.3 | Conclusion..... | 131 |
| 11.4 | <i>Influence du plomb sur l'activité phosphatase alcaline de Chlorella vulgaris</i> | 132 |
| 11.4.1 | Essais avec des biocapteurs conductimétriques..... | 132 |
| 11.4.1.1 | Exposition directe..... | 132 |
| 11.4.1.2 | Exposition prolongée..... | 132 |
| 11.4.2 | Mesures en bioessais..... | 133 |
| 11.4.3 | Exposition directe..... | 133 |
| 11.4.3.1 | Exposition prolongée..... | 133 |
| 11.4.4 | Conclusion..... | 134 |
| 11.5 | <i>Influence d'une solution mixte $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ sur l'activité phosphatase alcaline de Chlorella vulgaris</i> | 135 |
| 11.5.1 | Essais avec des biocapteurs conductimétriques..... | 135 |
| 11.5.2 | Mesures en bioessais..... | 135 |
| 11.5.3 | Conclusion..... | 136 |
| 11.6 | <i>Discussion</i> | 137 |

| | | |
|---|--|------------|
| 11.7 | Conclusion | 139 |
| 12 | ESSAIS DE TOXICITÉ AVEC LES PESTICIDES..... | 140 |
| 12.1 | Influence du carbofuran sur l'activité estérase de <i>Chlorella vulgaris</i> | 140 |
| 12.1.1 | Essais avec des biocapteurs conductimétriques | 140 |
| 12.1.2 | Mesures en bioessais | 141 |
| 12.1.3 | Conclusion..... | 142 |
| 12.2 | Influence du méthyl-parathion sur l'activité estérase de <i>Chlorella vulgaris</i> | 142 |
| 12.2.1 | Essais avec des biocapteurs conductimétriques | 142 |
| 12.2.2 | Mesures en bioessais | 143 |
| 12.2.3 | Conclusion..... | 143 |
| 12.3 | Influence du méthyl-paraoxon sur l'activité estérase de <i>Chlorella vulgaris</i> | 144 |
| 12.3.1 | Essais avec des biocapteurs conductimétriques | 144 |
| 12.3.1.1 | Solution pure de méthyl-paraoxon | 144 |
| 12.3.1.2 | Mélange Cd ²⁺ /méthyl-paraoxon..... | 145 |
| 12.3.2 | Mesures en bioessais | 146 |
| 12.3.3 | Conclusion..... | 146 |
| 12.4 | Discussion..... | 147 |
| 12.5 | Conclusion | 148 |
| 13 | CONCLUSION GÉNÉRALE..... | 149 |
| CHAPITRE V. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE | | 151 |
| 14 | CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE | 153 |
| 14.1 | Conclusion générale | 153 |
| 14.1.1 | Développement des biocapteurs conductimétriques à cellules algales | 153 |
| 14.1.2 | Détection des métaux lourds et des pesticides organophosphorés et carbamates | 154 |
| 14.2 | Perspectives de travail..... | 155 |
| 14.2.1 | Optimisation de l'immobilisation des biorécepteurs | 155 |
| 14.2.2 | Etude de nouveaux biorécepteurs | 155 |
| 14.2.3 | Développement de protocoles de mesure adaptés aux biocapteurs bienzymatiques..... | 155 |
| 14.2.4 | Mise au point d'un prototype pour des mesures sur site | 156 |
| BIBLIOGRAPHIE | | 159 |
| ANNEXES | | 173 |
| ANNEXE 1 : MILIEU AFNOR LC | | 175 |
| ANNEXE 2 : MILIEU ISO (NFT 90-375)..... | | 176 |
| ANNEXE 3 : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS..... | | 177 |

Table des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Cycle de l'eau (source : site Agence de l'Eau Artois-Picardie) | 31 |
| Figure 2 : Répartition des volumes d'eau prélevés par usage en 2001 en France métropolitaine (source : site Ifen) | 32 |
| Figure 3 : Répartition des volumes d'eau consommés par usage en 2001 en France métropolitaine (source : site Ifen) | 32 |
| Figure 4 : Pyramide écologique d'un écosystème aquatique (source : site Agence de l'Eau Rhin-Meuse) ... | 34 |
| Figure 5 : Cycle biogéochimique du mercure (source : site Environnement Canada) | 36 |
| Figure 6 : Molécules de méthyl-parathion et de méthyl-paraoxon | 38 |
| Figure 7 : Molécule de carbofuran | 39 |
| Figure 8 : Schéma des conséquences d'un polluant sur un écosystème aquatique (d'après Ramade, 1992). | 40 |
| Figure 9 : Bioamplification le long d'une chaîne trophique après le rejet d'un insecticide dans le milieu aquatique (source : site Agence de l'Eau Rhin-Meuse)..... | 43 |
| Figure 10 : Auto-épuration d'un écosystème aquatique (source : site Agence de l'Eau Rhin-Meuse)..... | 43 |
| Figure 11 : Représentation d'un biocapteur (d'après Tran Minh, 1995)..... | 50 |
| Figure 12 : Réaction enzymatique de l'acétylcholinestérase | 53 |
| Figure 13 : Film Langmuir-Blodgett enzyme-ODA (d'après Wan <i>et al.</i> , 2000) avec OTS : octodécyltrichlorosilane..... | 55 |
| Figure 14 : Couplage covalent d'une enzyme sur un transducteur via un carbodiimide (d'après Eggins, 1998) | 56 |
| Figure 15 : Microalgue <i>Chlorella vulgaris</i> | 61 |
| Figure 16 : Réaction enzymatique de la phosphatase alcaline avec le pNPP comme substrat | 62 |
| Figure 17 : Distribution des métaux durs (A), mous (B) et frontières dans le tableau périodique (d'après Duffus, 2002) | 63 |
| Figure 18 : Réaction enzymatique des cholinestérases avec l'ACHCl comme substrat | 64 |
| Figure 19 : Mécanismes d'inhibition des cholinestérases par les organophosphorés et les carbamates (d'après Nistor <i>et al.</i> , 1999)..... | 65 |
| Figure 20 : Photo d'un microcapteur conductimétrique | 66 |
| Figure 21 : Interactions entre H ⁺ et SiOH ⁻ | 67 |
| Figure 22 : Capteur ISFET | 68 |
| Figure 23 Méthodologie pour le contrôle de la qualité des milieux aquatiques..... | 69 |
| Figure 24 : Principe de la mesure avec les biocapteurs | 79 |
| Figure 25 : Cinétique enzymatique de l'activité phosphatase alcaline de <i>Chlorella vulgaris</i> mesurée en bioessais | 88 |
| Figure 26 : Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline mesurée avec des biocapteurs conductimétriques | 89 |
| Figure 27 : Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline mesurée avec des biocapteurs ISFET | 89 |
| Figure 28 : Cinétiques enzymatiques de la phosphatase alcaline pour deux concentrations algales mesurées en bioessais avec ▲ : concentration algale : 1,33.10 ⁷ cellules/ml, ■ : concentration algale : 0,5.10 ⁷ cellules/ml | 90 |

| | |
|--|-----|
| Figure 29 : Cinétique enzymatique de l'activité estérase de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivées en AFNOR-P mesurée en bioessais | 91 |
| Figure 30 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase mesurée avec des biocapteurs conductimétriques | 92 |
| Figure 31 : Fixation de l'AChCl sur les deux sous-sites de fixation de l'acétylcholinestérase (d'après Yon, 1974)..... | 92 |
| Figure 32 : Mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase par excès de substrat (d'après Yon, 1974)..... | 93 |
| Figure 33 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase d'algues cultivées en ISO mesurée avec des biocapteurs conductimétriques | 93 |
| Figure 34 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase d'algues cultivées en AFNOR mesurée avec des biocapteurs conductimétriques | 94 |
| Figure 35 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase d'algues cultivées en AFNOR-P mesurée avec des biocapteurs conductimétriques | 95 |
| Figure 36 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase d'algues cultivées en milieu AFNOR-P mesurée avec des biocapteurs ISFET | 95 |
| Figure 37 : Mesure de l'activité phosphatase alcaline avec des biocapteurs conductimétriques à membranes à base d'alginate de calcium | 98 |
| Figure 38 : Amplitudes des signaux dS correspondant à l'activité phosphatase alcaline mesurée avec des biocapteurs conductimétriques pour différentes expositions aux vapeurs de glutaraldéhyde | 99 |
| Figure 39 : Stabilité du signal de l'APA mesurée par des biocapteurs conductimétriques immergés dans le milieu réactionnel pendant 120 minutes avec des membranes après différentes expositions aux GA_{vap} avec ▲ : 10 minutes ; ● : 14 minutes ; ■ : 18 minutes | 100 |
| Figure 40 : Evolution du signal pour différentes concentrations algales dans le mélange BSA+algues des membranes mesuré avec des biocapteurs conductimétriques avec ● : [algues] de 1 à 3.10^7 cellules/ml ; ▲ : [algues] de 4 à 5.10^7 cellules/ml | 101 |
| Figure 41 : Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline mesurée avec des biocapteurs conductimétriques pour des membranes à base de BSA à concentration algale $> 10^8$ cellules/ml | 101 |
| Figure 42 : Réactions enzymatiques périphériques sur des membranes contenant 10^8 cellules/ml..... | 102 |
| Figure 43 : Observation en AFM d'une membrane BSA/algues déposées sur un capteur conductimétrique | 103 |
| Figure 44 : Observation en AFM d'une membrane BSA/algues déposées sur un capteur conductimétrique après immersion dans le milieu réactionnel: Mise en évidence de la réorganisation des algues en paquet | 104 |
| Figure 45 : Mesures en bioessais de l'activité phosphatase alcaline pour des algues en AFNOR-P chauffées pendant 15 minutes à 90°C avec ■ : algues chauffées ; ▲ : algues non chauffées | 105 |
| Figure 46 : Mesures en bioessais de l'activité phosphatase alcaline pour des algues en AFNOR-P chauffées pendant 60 minutes à 90°C avec ■ : algues chauffées ; ▲ : algues non chauffées | 105 |
| Figure 47 : Mesures en bioessais de l'activité estérase pour des algues en AFNOR-P chauffées pendant 15 minutes à 90°C avec ■ : algues chauffées ; ▲ : algues non chauffées | 106 |
| Figure 48 : Mesure de l'activité estérase pour des algues en AFNOR-P chauffées pendant 60 minutes à 90°C avec ■ : algues chauffées ; ▲ : algues non chauffées | 106 |
| Figure 49 : Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline avec des algues AFNOR en référence mesurée avec des biocapteurs conductimétriques | 107 |
| Figure 50 : Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline avec une membrane blanche en référence mesurée avec des biocapteurs conductimétriques | 108 |

| | |
|--|-----|
| Figure 51 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase d'algues cultivées en milieu AFNOR-P mesurée avec des biocapteurs conductimétriques avec une membrane blanche en référence | 109 |
| Figure 52 : Evolution du signal pour un biocapteur conductimétrique avec deux membranes blanches sur les électrodes | 109 |
| Figure 53 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase mesurée avec des biocapteurs conductimétriques pour deux concentrations en KH_2PO_4 avec ▲ : KH_2PO_4 2,5mM ; ■ : KH_2PO_4 5mM | 111 |
| Figure 54 : Evolution du signal de deux biocapteurs conductimétriques stockés à 4°C dans du milieu AFNOR-P pendant 30 jours avec ■ : biocapteur 1 ; ▲ : biocapteur 2 | 112 |
| Figure 55 : Cinétique enzymatique après exposition à 100ppb de Cd^{2+} pendant 30 minutes (■) et évolution du taux d'inhibition de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en pNPP (▲) | 120 |
| Figure 56 : Taux d'APA résiduelle après une exposition de 30 minutes à 100ppb de Cd^{2+} mesurées avec 2 biocapteurs différents | 122 |
| Figure 57 : Taux d'APA résiduelle après une exposition de 240 minutes à des ions Cd^{2+} mesurées sur deux séries de bioessais (algues libres)..... | 123 |
| Figure 58 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition directe à Cd^{2+} | 124 |
| Figure 59 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition de 30 minutes à Cd^{2+} pour deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) | 125 |
| Figure 60 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour des expositions de 30 et 60 minutes à 1ppb de Cd^{2+} pour les deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) | 125 |
| Figure 61 : Evolution du taux d'APA résiduelle après une exposition directe à Cd^{2+} | 126 |
| Figure 62 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour des expositions de 120 et 240 minutes à Cd^{2+} | 127 |
| Figure 63 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition directe à Zn^{2+} | 128 |
| Figure 64 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition de 30 minutes à Zn^{2+} pour deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) | 129 |
| Figure 65 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour des expositions de 30 et 60 minutes à 1ppb de Zn^{2+} pour deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) | 129 |
| Figure 66 : Evolution du taux d'APA résiduelle après une exposition directe à Zn^{2+} | 130 |
| Figure 67 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour des expositions de 120 et 240 minutes à Zn^{2+} .. | 131 |
| Figure 68 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition directe à Pb^{2+} | 132 |
| Figure 69 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition de 30 minutes à Pb^{2+} pour deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) | 132 |
| Figure 70 : Evolution du taux d'APA résiduelle après une exposition directe à Pb^{2+} | 133 |
| Figure 71 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour des expositions de 120 et 240 minutes à Pb^{2+} | 134 |
| Figure 72 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition de 30 minutes à 10ppb, 100ppb et 1ppm de $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ mesurés pour deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) | 135 |
| Figure 73 : Evolution du taux d'APA résiduelle après 240 minutes d'exposition à un mélange $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ | 136 |
| Figure 74 : Evolution du taux d'AChE résiduelle après exposition de 30 minutes à une solution de carbofuran pour deux concentrations en AChCl (4mM et 10mM) | 141 |
| Figure 75 : Evolution du taux d'AE résiduelle après 60 et 240 minutes d'exposition à une solution de carbofuran | 141 |

| | |
|---|-----|
| Figure 76 : Evolution du taux d'AChE résiduelle après une exposition de 30 minutes à une solution de méthyl-parathion à 100ppb pour deux concentrations en AChCl (4mM et 10mM) | 142 |
| Figure 77 : Evolution du taux d'AE résiduelle après 60 et 240 minutes d'exposition à une solution de méthyl-parathion | 143 |
| Figure 78 : Evolution du taux d'AChE résiduelle après une exposition de 30 minutes à une solution de méthyl-paraoxon pour deux concentrations en AChCl (4mM et 10mM)..... | 144 |
| Figure 79 : Influence du niveau d'amplitude du signal sur le taux d'AChE résiduelle après une exposition de 30 minutes à 100ppb de méthyl-paraoxon pour deux concentrations en AChCl (4mM et 10mM)..... | 145 |
| Figure 80 : Taux d'APA et d'AChE résiduelles pour deux biocapteurs conductimétriques après une exposition de 30 minutes à un mélange 25ppb Cd ²⁺ /50ppb MPx..... | 145 |
| Figure 81 : Evolution du taux d'AE résiduelle après 60 et 240 minutes d'exposition à une solution de méthyl-paraoxon | 146 |

Table des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Origines et natures de différentes sources de pollution du milieu aquatique (source : les Dossiers scientifiques du CNRS : l'Eau) | 34 |
| Tableau 2 : Formes physico-chimiques possibles des métaux dans le milieu aquatique (d'après Campbell et Tessier, 1986) | 35 |
| Tableau 3 : Quelques grandes familles de pesticides | 37 |
| Tableau 4 : Valeurs limites pour certains métaux lourds dans l'eau potable et dans celle destinée à la consommation | 44 |
| Tableau 5 : Valeurs limites des émissions dans l'atmosphère de certains métaux lourds pour différentes activités industrielles (cas général) | 45 |
| Tableau 6 : Valeurs limites des émissions dans l'eau de certains métaux lourds pour différentes activités industrielles (cas général) | 45 |
| Tableau 7 : Principales techniques d'analyse chimique pour le contrôle de la qualité des eaux | 46 |
| Tableau 8 : Principaux paramètres physico-chimiques et biologiques globaux pour le contrôle de la qualité des eaux | 47 |
| Tableau 9 : Paramètres à considérer pour développer un bioessai monospécifique | 48 |
| Tableau 10 : Possibilités d'utilisation des biocapteurs selon le transducteur et le biorécepteur choisis | 51 |
| Tableau 11 : Facteurs à prendre en compte dans le choix du transducteur et du biorécepteur | 51 |
| Tableau 12 : Biocapteurs commercialisés destinés au contrôle environnemental | 59 |
| Tableau 13 : Principales caractéristiques d'un outil d'alarme pour le contrôle environnemental | 59 |
| Tableau 14 : Données sur la micro-algue <i>Chlorella vulgaris</i> | 61 |
| Tableau 16 : Composition du milieu réactionnel pour les mesures d'activité phosphatase alcaline avec des biocapteurs | 78 |
| Tableau 17 : Composition du milieu réactionnel pour la mesure de l'activité estérase avec les biocapteurs | 79 |
| Tableau 18 : Composition des solutions complexes | 80 |
| Tableau 19 : Composition du milieu réactionnel pour les essais de cinétique enzymatique réalisés en microplaques de 96 puits | 81 |
| Tableau 20 : Composition du milieu réactionnel pour les essais de cinétique enzymatique réalisés en microplaques de 96 puits | 82 |
| Tableau 21 : Récapitulatif des données sur les substrats de la phosphatase alcaline | 110 |
| Tableau 22 : Récapitulatif des données sur les substrats des estérases | 110 |
| Tableau 23 : Optimisations réalisées sur les biocapteurs conductimétriques à cellules algales | 113 |
| Tableau 24 : Récapitulatif des limites de détection pour les métaux lourds obtenus dans différentes études ainsi que dans ce travail | 138 |
| Tableau 25 : Taux d'AChE résiduelle obtenus avec des biocapteurs à acétylcholinestérase pure pour des expositions à des solutions de carbofuran | 147 |
| Tableau 26 : Taux d'AChE résiduelle obtenus avec des biocapteurs à acétylcholinestérase pure pour des expositions à des solutions de méthyl-paraoxon | 147 |
| Tableau 27 : Valeurs des inhibitions I ₅₀ pour les AChE d'anguille électrique et d'érythrocytes bovins après une exposition de 30 minutes aux pesticides (d'après Ciucu <i>et al.</i> , 2003) | 148 |

Définitions

p.35 La **Biodisponibilité** caractérise la disponibilité d'une substance vis-à-vis de sa cible (organisme, organe, enzyme...).

p.36-37 La **Bioaccumulation** est le processus d'assimilation et de concentration d'une substance dans un organisme. Après assimilation, la substance est **bioconcentrée** par l'individu puis est **bioamplifiée** le long de la chaîne alimentaire.

p.39 La **Richesse spécifique** caractérise le nombre d'espèces au sein d'un écosystème

p.39 Le terme **Opportuniste** caractérise une espèce de faible longévité et de forte fécondité capable de coloniser rapidement des milieux.

p.39 La **Biodiversité** désigne la variété des espèces vivantes qui peuplent un écosystème. Elle peut se mesurer simplement en considérant le nombre total d'espèces différentes qui vivent dans le milieu.

p.39 La **Dominance** caractérise la situation qui place une espèce en position privilégiée (du fait de son abondance) par rapport aux autres espèces du même niveau trophique voire de l'écosystème dans son ensemble.

p.48 Le terme **Dulçaquicole** caractérise les milieux aquatiques d'eau douce.

p.48 **Toxicité aiguë** : dose correspondant à une administration unique, de courte durée (quelques minutes à quelques jours) entraînant la mort ou de graves modifications physiologiques sur les individus exposés.

p.49 **Toxicité chronique** : effets retardés d'une exposition chronique (quelques jours/mois) à un toxique. Cette toxicité est particulièrement intéressante pour les substances génotoxiques ou susceptibles de s'accumuler dans les organismes.

p.54 **Fluorochrome** : substance utilisée en microscopie fluorescente pour colorer des espèces chimiques.

p.57 **FIA (Flow Injection Analysis)** : fonctionnement en dynamique, le flux circulant grâce à une pompe péristaltique.

INTRODUCTION

Introduction

L'eau est une ressource indispensable tant pour la vie en général que pour les différentes activités humaines. Afin de préserver les écosystèmes aquatiques très fragiles et la qualité de la ressource, une nouvelle réglementation européenne visant à assurer un « bon état » de ces milieux en Europe à partir de 2015 a été adoptée (Directive-Cadre Européenne 2000/60/CE). Pour répondre aux objectifs ainsi fixés, la possibilité de disposer d'outils d'alarme précoce capables de contrôler *in situ* et en continu la qualité des milieux aquatiques s'avère un enjeu majeur.

Depuis une quinzaine d'années, l'application des biocapteurs traditionnellement employés dans le domaine biomédical s'est élargie au contrôle environnemental. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce domaine de recherche en proposant un biocapteur conductimétrique bi-enzymatique à cellules algales capable de mettre en évidence la présence, dans l'eau, de grandes familles de polluants telles que des métaux lourds et des pesticides organophosphorés et carbamates.

Le développement de ce biocapteur conductimétrique bi-enzymatique à cellules algales a été mené conjointement entre le Laboratoire des Sciences de l'Environnement (L.S.E.) de l'ENTPE et le Laboratoire d'Application de la Chimie à l'Environnement (LACE) de l'Université Claude Bernard-Lyon 1 et s'inscrit au sein d'une méthodologie globale d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques.

L'originalité de cette étude réside dans l'utilisation de cellules algales immobilisées sur des capteurs conductimétriques afin de suivre les perturbations de certaines de leurs activités enzymatiques en présence de toxiques. Ce travail est le prolongement de recherches menées sur les activités enzymatiques des microalgues *Chlorella vulgaris* au LSE et sur la mise au point de biocapteurs enzymatiques au LACE.

Dans un premier chapitre, une étude bibliographique s'attachera à souligner l'importance des milieux aquatiques ainsi que leur sensibilité aux pollutions. La réglementation européenne en vigueur et les différents outils disponibles à l'heure actuelle (analyses chimiques et bioessais écotoxicologiques) seront présentés dans un deuxième temps avant de dresser un état de l'art dans le domaine des biocapteurs.

Après la présentation des diverses méthodologies mises en œuvre au cours de cette étude, le développement et l'optimisation des biocapteurs à cellules algales permettant la détection des activités phosphatase alcaline et cholinestérase de *Chlorella vulgaris* seront proposés. Enfin, l'utilisation de ces biocapteurs pour la mise en évidence de métaux lourds et de certains pesticides sera discutée.

En dernier lieu, les conclusions ainsi que les nouvelles perspectives de recherche achèveront cette étude.

CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Le milieu aquatique cible de pollutions

1.1 La ressource en eau

1.1.1 Le cycle de l'eau

L'eau recouvre 72 % de la surface de la Terre. Pourtant, seule 0,65% de cette eau communément appelée eau douce, est disponible dans les nappes souterraines (0,63%), les lacs et les rivières (0,02%). L'essentiel de l'eau présente sur Terre se trouve dans les océans (97,2%), l'eau glacée ne représente, pour sa part, que 2,15% de l'eau totale [1].

A l'échelle planétaire, l'eau n'est pas figée, son cycle est présenté à la Figure 1.

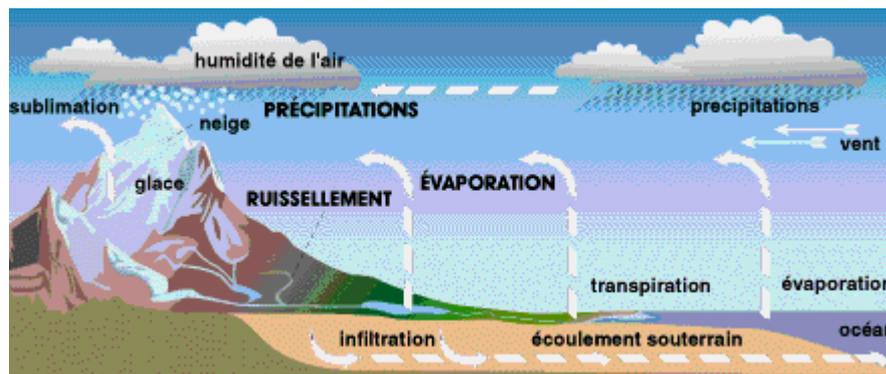


Figure 1 : Cycle de l'eau (source : site Agence de l'Eau Artois-Picardie)

Sous l'action du soleil, l'eau des océans, rivières, lacs s'évapore et gagne l'atmosphère. Au contact des couches d'air froid, la vapeur d'eau se condense en gouttelettes et forme des nuages. L'eau retombe ensuite lors de précipitations (sous forme de pluie, neige ou grêle) directement dans les océans ou sur les continents. Sur Terre, l'eau ruisselle alors jusqu'aux rivières ou s'infiltrate dans les sols pour alimenter les nappes souterraines.

Au cours de son cycle, l'eau peut donc se charger en éléments indésirables (polluants chimiques, organismes...) qu'il est nécessaire d'éliminer afin de préserver la qualité d'une ressource, abondante à l'échelle de la planète, mais non renouvelable.

1.1.2 La consommation d'eau en France

En France, les ressources en eaux souterraines et superficielles sont estimées respectivement à 2000 milliards et 108 milliards de mètres cubes. S'il est vrai qu'aucune pénurie globale n'est à envisager, ces réserves sont inégalement réparties sur le territoire et varient selon les régions. En moyenne, chaque habitant dispose donc d'une réserve de 2800 mètres cubes par an [1].

Pour décrire au mieux la consommation française en eau, deux paramètres doivent être distingués : les prélèvements en eau qui correspondent à la quantité d'eau prise dans le milieu naturel et les consommations en eau qui évaluent les quantités d'eau prélevées mais non restituées après usage (Figure 2 et Figure 3) .

La production énergétique qui prélève plus de la moitié des volumes annuels en eau (57%) n'est pas celle qui en consomme le plus (22% des volumes consommés). En effet, la plus grande partie de cette eau sert au refroidissement des centrales thermiques et nucléaires et est ensuite rejetée dans le milieu naturel sans subir d'importantes dégradations excepté parfois une augmentation de température qui peut perturber le milieu récepteur.

Dans le cas de l'agriculture, l'eau prélevée (14% des volumes prélevés) est pratiquement totalement consommée, ce qui fait de ce secteur le premier consommateur d'eau en France (49% des volumes consommés).

Les prélèvements en eau potable (18% des volumes prélevés) regroupent aussi bien l'eau pour l'usage domestique que pour le fonctionnement des divers équipements collectifs (fontaines, piscines....).

Enfin, la part d'eau consommée par l'industrie est limitée (4% des volumes consommés) et se répartit selon le type de production : l'acier et le papier nécessite de grandes quantités d'eau, en moyenne 500 m³ pour une tonne de produit alors que la fabrication de savon ou de matières plastiques consomme moins de 50 m³ par tonne de produit. Par contre, la part des prélèvements en eau est plus importante (11% des volumes prélevés) avec un impact important, l'abaissement des nappes causés par les pompages, qui perturbe le milieu récepteur. Enfin, le rejet de l'eau non consommée se faisant dans les cours d'eau, celle-ci n'est alors plus immédiatement disponible.

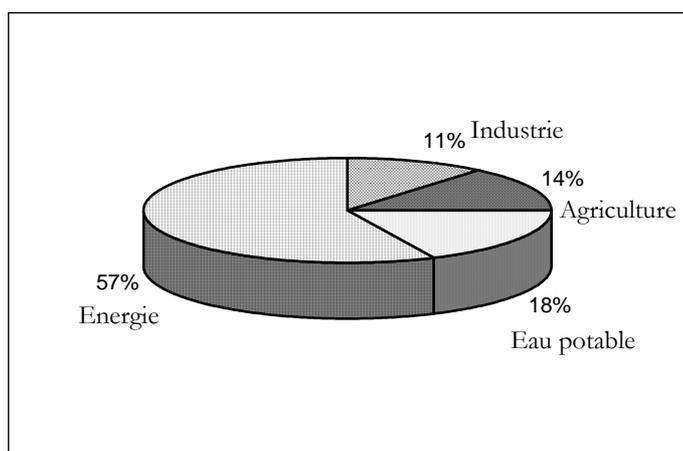


Figure 2 : Répartition des volumes d'eau prélevés par usage en 2001 en France métropolitaine (source : site Ifen)

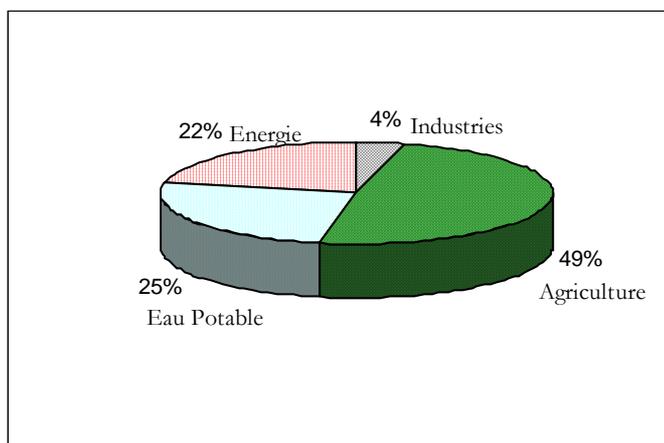


Figure 3 : Répartition des volumes d'eau consommés par usage en 2001 en France métropolitaine (source : site Ifen)

Pour couvrir les besoins, environ 30 milliards de m³ d'eau sont prélevés chaque année en France. C'est peu comparé aux ressources disponibles d'autant plus que les consommations nettes se limitent à environ 6 milliards de m³.

L'eau non consommée est finalement rejetée dans le milieu naturel mais sa qualité peut être dégradée. Une pollution des écosystèmes aquatiques peut alors en découler.

1.2 Les écosystèmes aquatiques

L'eau est une ressource indispensable aux activités humaines mais elle constitue également un lieu de vie privilégié.

1.2.1 Les différents écosystèmes aquatiques

Le terme d'écosystème aquatique recouvre une grande diversité de milieux, tous caractérisés par l'omniprésence de l'eau (douce ou salée, vive ou lente). Comme tout écosystème, ce sont des ensembles environnementaux structurés dans lesquels se produisent des échanges de matière et d'énergie dus aux interactions entre les organismes vivants (biocénose) et leur habitat (biotope).

1.2.1.1 Ecosystèmes lentiques et lotiques

Les écosystèmes aquatiques en eau douce peuvent se classer en deux grandes catégories, les écosystèmes lentiques (eaux stagnantes) et les écosystèmes lotiques (eaux courantes).

Les écosystèmes lentiques se distinguent les uns des autres selon leur taille et leur profondeur. On trouve ainsi des mares, des étangs et des lacs. Malgré leurs affluents et confluents ces systèmes restent relativement fermés à la différence des eaux courantes. Les eaux souterraines et les nappes phréatiques alimentées par infiltration de l'eau dans les sols ou du fait de la proximité d'un cours d'eau, connaissent, quant à elles, des conditions biotiques extrêmes (pauvreté en sels minéraux, absence de lumière...). Enfin, les zones humides sont des zones d'eaux stagnantes particulièrement sensibles qui possèdent une faune et une flore riches et généralement uniques.

Les écosystèmes lotiques forment des milieux ouverts étroitement liés aux écosystèmes terrestres environnants. Les caractéristiques principales des cours d'eau (largeur, quantité d'eau, courant) permettent de distinguer les ruisseaux, des rivières et des fleuves.

1.2.1.2 Le compartiment biotique des écosystèmes aquatiques

La biocénose des écosystèmes aquatiques est très diverse puisque, au sein d'un même écosystème, différentes zones de peuplement apparaissent en lien étroit avec les conditions physiques du milieu (la profondeur et la luminosité dans les lacs, le courant dans les cours d'eau).

D'une manière générale, le développement des êtres vivants est dépendant de la croissance des végétaux qui, grâce à la photosynthèse, peuvent produire leur matière organique à partir des matières minérales du milieu et du CO₂ atmosphérique en utilisant l'énergie lumineuse. Les microalgues ou phytoplancton appartiennent à ce groupe des producteurs primaires et servent de nourriture aux herbivores (le zooplancton) qui alimentent à leur tour les carnivores. Une telle chaîne trophique peut s'illustrer sous la forme de la pyramide écologique de la Figure 4.

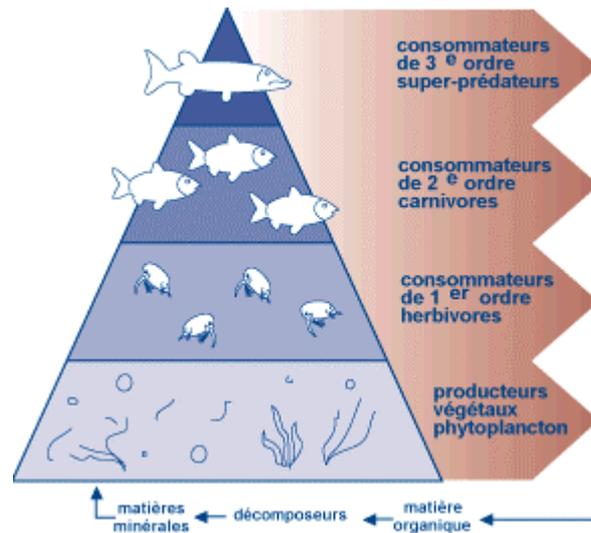


Figure 4 : Pyramide écologique d'un écosystème aquatique (source : site Agence de l'Eau Rhin-Meuse)

Dans un écosystème sain, les populations sont nécessairement plus nombreuses aux niveaux inférieurs que chez les prédateurs, ce qui leur permet de se renouveler normalement.

Enfin, le recyclage de la matière organique se fait grâce aux décomposeurs (bactéries, champignons,...) qui permettent de fermer le cycle par minéralisation de la matière organique morte.

1.2.2 Les pollutions du milieu aquatique

A cause du cycle de l'eau, les écosystèmes aquatiques sont susceptibles d'être contaminés par des pollutions accidentelles ou chroniques.

1.2.2.1 Origines des polluants du milieu aquatique

En rejetant des effluents contaminés dans le milieu aquatique, les activités humaines industrielles, agricoles ou urbaines polluent les eaux. On peut distinguer trois grandes familles de pollution, la pollution physique, chimique et biologique (cf. Tableau 1).

| Type de pollution | Nature | Origines |
|-------------------|---|--|
| Physique | Rejets d'eau chaude | Centrales thermiques, nucléaires |
| | M.E.S. (matières en suspension) | Rejets urbains, érosion des sols |
| Chimique | Matière organique | Effluents domestiques, agricoles, agroalimentaires |
| | Fertilisants (nitrate, phosphate) | Agriculture, lessives |
| | Métaux (Cd, Pb, Hg, Al, As...) | Industries, agriculture, déchets |
| | Pesticides (insecticides, herbicides, fongicides...) | Industries, agriculture |
| | Organochlorés (PCB, solvants) | Industries |
| | Composés organiques de synthèse | Industries |
| | Détergents | Effluents domestiques |
| | Hydrocarbures | Industrie pétrolière, transports |
| Biologique | Bactéries, virus, champignons... | Effluents urbains, agricoles |

Tableau 1 : Origines et natures de différentes sources de pollution du milieu aquatique (source : les Dossiers scientifiques du CNRS : l'Eau)

Le déversement dans le milieu aquatique de substances ou d'effluents contaminés n'est pas la seule cause de pollution des eaux de surface ou souterraines. En effet, l'eau de pluie permet aux polluants rejetés dans l'atmosphère de retomber sur les sols et lessive les zones polluées. Par ruissellement et/ou infiltration, ces xénobiotiques peuvent alors rejoindre le milieu aquatique.

De très nombreuses molécules sont donc susceptibles de polluer les écosystèmes aquatiques. Toutefois, nous nous intéresserons dans cette étude à deux familles de polluants distinctes.

Les **métaux lourds (cadmium, zinc, plomb, chrome,...)** sont considérés comme des micropolluants puisqu'ils sont présents dans les différents compartiments de l'environnement à l'état de trace. Ils n'en demeurent pas moins des composés dangereux pour les êtres vivants, de par leur toxicité mais également leur persistance.

Les **pesticides** constituent, quant à eux, un problème majeur de pollution d'origine agricole. Ils peuvent également se transformer une fois dans le milieu et donner d'autres molécules plus ou moins toxiques.

1.2.2.2 Les pollutions aux métaux lourds

Dans le milieu aquatique, les métaux lourds peuvent se présenter sous diverses formes physiques (dissoutes, particulaires) et chimiques (minérales, organiques). Afin d'évaluer la biodisponibilité¹ du métal, il est nécessaire de connaître sa spéciation c'est-à-dire sa distribution vis-à-vis de ses différentes formes physico-chimiques (cf. Tableau 2). Dans le milieu aquatique, de nombreux paramètres influencent cette répartition, notamment la présence de ligands, d'ions compétiteurs tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} , les conditions rédox, la température, le pH, la force ionique...[2].

| Formes physico-chimiques possibles | | Exemples |
|------------------------------------|-------------|---|
| Ion métallique hydraté | | $\text{Cd}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ |
| Complexe | organique | Al-citrate, Cu-fulvate |
| | inorganique | CuCO_3 , |
| Espèce colloïdale | organique | Cu^{2+} -acide humique |
| | inorganique | Pb^{2+} - MnO_2 |
| Espèces particulaires | | Métaux associés à des minéraux, sols, argiles, bactéries, micro-algues, matières organiques |

Tableau 2 : Formes physico-chimiques possibles des métaux dans le milieu aquatique (d'après Campbell et Tessier, 1986)

Si d'un point de vue écotoxicologique, la forme libre M^{n+} est généralement considérée comme la plus toxique, la connaissance des autres formes physico-chimiques du métal est importante car des modifications des conditions abiotiques (pH, conditions rédox...) ou biotiques (dégradations biologiques de la matière organique pouvant modifier le pH...) peuvent influencer la biodisponibilité des métaux et par conséquent leur toxicité.

Plusieurs réactions physico-chimiques ou biologiques conditionnant la spéciation d'un métal peuvent donc survenir dans un milieu aussi complexe que le milieu aquatique.

Les réactions de complexation-dissociation :



Les ligands peuvent être minéraux (OH^- , Cl^- , SO_4^{2-} , ...), organiques (matière organique dissoute comme les acides humiques dissous) [3], ou des composés organiques anthropogéniques (EDTA...) [4].

¹ : cf. Définitions p. 23

Les réactions de précipitation-solubilisation

En présence de certains anions (ions chlorure Cl^- , hydroxydes OH^- , carbonates,...), les ions métalliques peuvent précipiter.

Les réactions de **complexation-dissociation** ou **précipitation-solubilisation** sont dépendantes des concentrations des divers composés mais également des conditions rédox, du pH, ... En déplaçant les équilibres, le métal peut alors se trouver sous une autre forme.

Les réactions photochimiques

Des études ont mis en évidence l'existence de réactions d'oxydo-réduction sous l'action de l'énergie lumineuse, notamment pour le mercure et le fer.

Ainsi, la Figure 5 présente le cycle complet du mercure. Dans le milieu aquatique, des réactions photochimiques conduisent à la réduction de Hg^{2+} sous forme Hg^0 . Or, la forme réduite Hg^0 peut se volatiliser et quitter ainsi le milieu alors que la forme oxydée Hg^{2+} après méthylation peut se bioaccumuler² le long de la chaîne trophique.

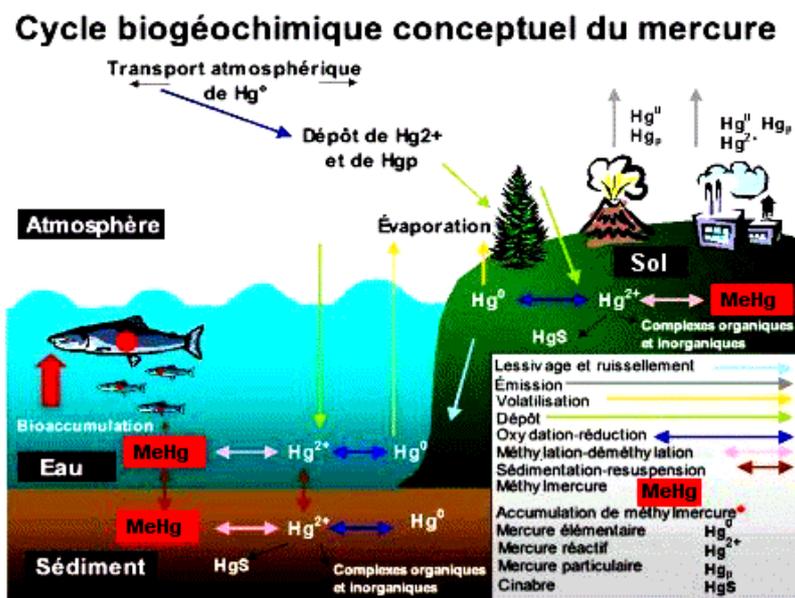


Figure 5 : Cycle biogéochimique du mercure (source : site Environnement Canada)

Dans le cas du fer, par photo-oxydation, Fe^{2+} donne Fe^{3+} qui peut ensuite précipiter sous forme de magnétite.

Les réactions d'adsorption-désorption :

La nature des substrats sur lesquels les métaux peuvent s'adsorber peut être très différente. On peut ainsi trouver des particules d'origine organique ou biologique comme le phytoplancton ou les bactéries [3] mais également des résidus de dégradation de la matière organique ou des substances humiques. Les argiles, la silice peuvent aussi adsorber les éléments métalliques. Ce mécanisme est contrôlé par un grand nombre de facteurs comme la salinité, le pH, la concentration en ligands, ou en éléments compétiteurs, la surface spécifique des substrats...

² : cf. Définitions p. 23

Les réactions biologiques :

Celles-ci peuvent avoir un rôle direct sur le partage du métal entre la forme dissoute et particulaire. En effet, les réactions d'oxydo-réduction sont généralement contrôlées par des processus tels que la dégradation de la matière organique par certains organismes (bactéries...) qui induit des modifications de pH et peut donc indirectement influencer la solubilisation de certaines espèces chimiques.

Dans le milieu aquatique, les métaux sont donc soumis à de nombreuses réactions physico-chimiques. Toutefois, hormis quelques exceptions (Hg^0 volatile), les métaux, quelle que soit leur forme, restent dans l'eau. Cette persistance les rend particulièrement dangereux puisqu'une fois absorbés par le phytoplancton, ils passent dans la chaîne alimentaire tout au long de laquelle ils vont se bioamplifier³. Leurs concentrations en fin de chaîne trophique peuvent alors atteindre des niveaux alarmants. Ainsi, entre 1950 et 1960 au Japon, 150 tonnes de mercure ont été déversées dans la baie de Minamata, des campagnes de mesures sur les poissons consommés par les habitants ont mis en évidence des taux de mercure dans les poissons 500 000 fois supérieurs à ceux des eaux de la baie [1].

1.2.2.3 Les pollutions aux pesticides

Les pesticides, produits phytosanitaires, se répartissent en plusieurs grandes familles dont les herbicides pour lutter contre les mauvaises herbes, les insecticides contre les insectes, les fongicides contre les champignons, ... (cf. Tableau 3).

| Familles | Groupes chimiques |
|--------------|--|
| Herbicides | s-triazines (atrazine...) |
| | Herbicides phénoxy (2,4-D, 2,4,5-T...) |
| | Phénylurées (diuron, isopropuron...) |
| | Bipyridyles (paraquat...) |
| | Dinitroanilines (trifluraline...) |
| | Sulfonylurées (triasulfuron...) et imidazolinones (imazapyr...) |
| Insecticides | Organophosphorés (parathion, malathion...) |
| | Carbamates (carbaryl, carbofuran...) |
| | Organochlorés (DDT...) |
| | Pyrethroïdes (cyperméthrine, deltaméthrine...) |
| Fongicides | Triazoles (triadimefone...), imazadoles (bénomyl, carbendazime...) |
| | Strobilurines (azoxystrobine...) |

Tableau 3 : Quelques grandes familles de pesticides

En France où l'utilisation des pesticides est la plus importante d'Europe, 50000 tonnes de fongicides, 30000 tonnes d'herbicides et 3000 tonnes d'insecticides ont ainsi été utilisés en 2000 [5]. Toutefois, moins de 1% de la substance active agit sur les cibles, le reste se disperse finalement dans le milieu naturel où, en se dégradant, il peut donner de nouvelles molécules plus ou moins toxiques [6]. D'autre part, l'interdiction d'employer certaines molécules (DDT en 1972, atrazine en 2003, Fipronil en 2004 par exemple) ne signifie par leur disparition totale du milieu. Le devenir et la persistance des pesticides dans l'environnement sont donc des enjeux écologiques d'importance.

³ : cf. Définitions p. 23

Les trois compartiments sol-air-eau sont touchés par cette pollution. Au niveau des sols, les phénomènes d'adsorption sont majoritaires alors que pour l'atmosphère, l'épandage par pulvérisation, la volatilisation ou l'érosion éolienne vont permettre le transfert de pesticides.

Enfin, le ruissellement et l'infiltration des eaux de pluie vont entraîner les pesticides vers les eaux de surface ou les eaux souterraines.

Quel que soit le compartiment, des processus biotiques ou abiotiques vont permettre aux pesticides de se dégrader.

L'hydrolyse

Une des voies de dégradation des pesticides en phase aqueuse et au niveau des constituants du sol est l'hydrolyse [7]. Celle-ci est conditionnée par le pH ainsi que par les conditions redox du milieu.

La dégradation biologique

Les microorganismes (bactéries, champignons ...) jouent un rôle majeur en métabolisant ces molécules en conditions anaérobie ou aérobie, en fonction de paramètres tels que le pH, la température, l'humidité (pour les sols). Par exemple, la bactérie *Rhizobium*, permet la déchloration de la molécule d'atrazine en hydroxyatrazine [8].

La dégradation de la matière organique par les microorganismes du sol peut également s'accompagner de modifications des conditions physico-chimiques favorisant la métabolisation de certains pesticides.

La photodégradation

Sous l'action du rayonnement solaire, certains pesticides ont la capacité de se dégrader. Une étude sur le comportement photochimique des herbicides sulfonylurés a ainsi montré que ceux-ci se dégradent sous irradiation solaire par rupture au niveau du pont sulfonyluré [5].

La quantité de pesticides présents dans l'environnement est donc très difficile à évaluer d'autant plus que les phénomènes de dégradation peuvent donner des sous-produits inconnus, dans certains cas, plus toxiques que le pesticide de départ.

Deux exemples de pesticides sont présentés ici, le méthyl-parathion et le carbofuran qui sont classiquement utilisés pour leurs propriétés insecticides.

Le **méthyl-parathion** appartient à la famille des organophosphorés. Cet insecticide se dégrade facilement et donne, en outre, du 4-nitrophénol ainsi que du **méthyl-paraoxon** dont la toxicité est nettement plus importante (Figure 6).

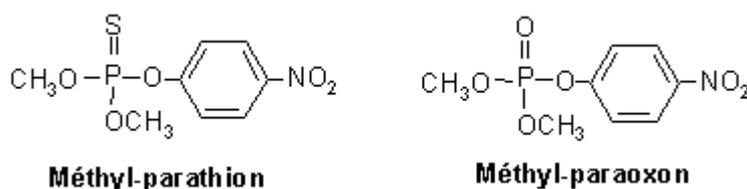


Figure 6 : Molécules de méthyl-parathion et de méthyl-paraoxon

Le **carbofuran** de la famille des carbamates est, avec le carbaryl, le plus utilisé de cette famille d'insecticides apparue dans les années 30 (Figure 7).



Carbofuran

Figure 7 : Molécule de carbofuran

1.3 Les conséquences des pollutions sur les écosystèmes aquatiques

1.3.1 Effets en chaîne d'un polluant sur un écosystème aquatique

Au sein d'un écosystème, l'action d'un polluant est conditionnée par son interaction avec les facteurs abiotiques (cf. paragraphes 1.2.2.2 et 1.2.2.3) et biotiques. Toutefois, l'évaluation de ces conséquences potentielles sur l'ensemble de l'écosystème reste délicate et nécessite de considérer différentes échelles spatio-temporelles afin de mieux cerner l'action de ce toxique sur chaque niveau trophique (cf. Figure 8).

Il apparaît néanmoins que les désordres initiaux ne touchent qu'un petit nombre d'espèces sensibles aux pollutions pour lesquelles la croissance, le développement voire la reproduction sont principalement affectés.

Au niveau des populations, ces impacts peuvent se traduire par une diminution de la densité (abondance) et de la richesse spécifique ³ au sein de l'écosystème. Suite à une pollution, une recolonisation du milieu par des espèces opportunistes ⁴ tolérantes aux pollutions peut également survenir.

Enfin, au niveau de l'écosystème, une possible disparition d'espèces, une biodiversité ⁵ réduite et des modifications de dominance ⁶ entre les populations sont les principaux impacts qui peuvent survenir et modifier le fonctionnement global de l'écosystème. Ainsi la diminution de l'abondance des consommateurs par rapport à celle des producteurs affecte les relations de dominance dans ces peuplements et peut à terme déséquilibrer l'écosystème.

^{3, 4, 5, 6} : cf. Définitions p. 23

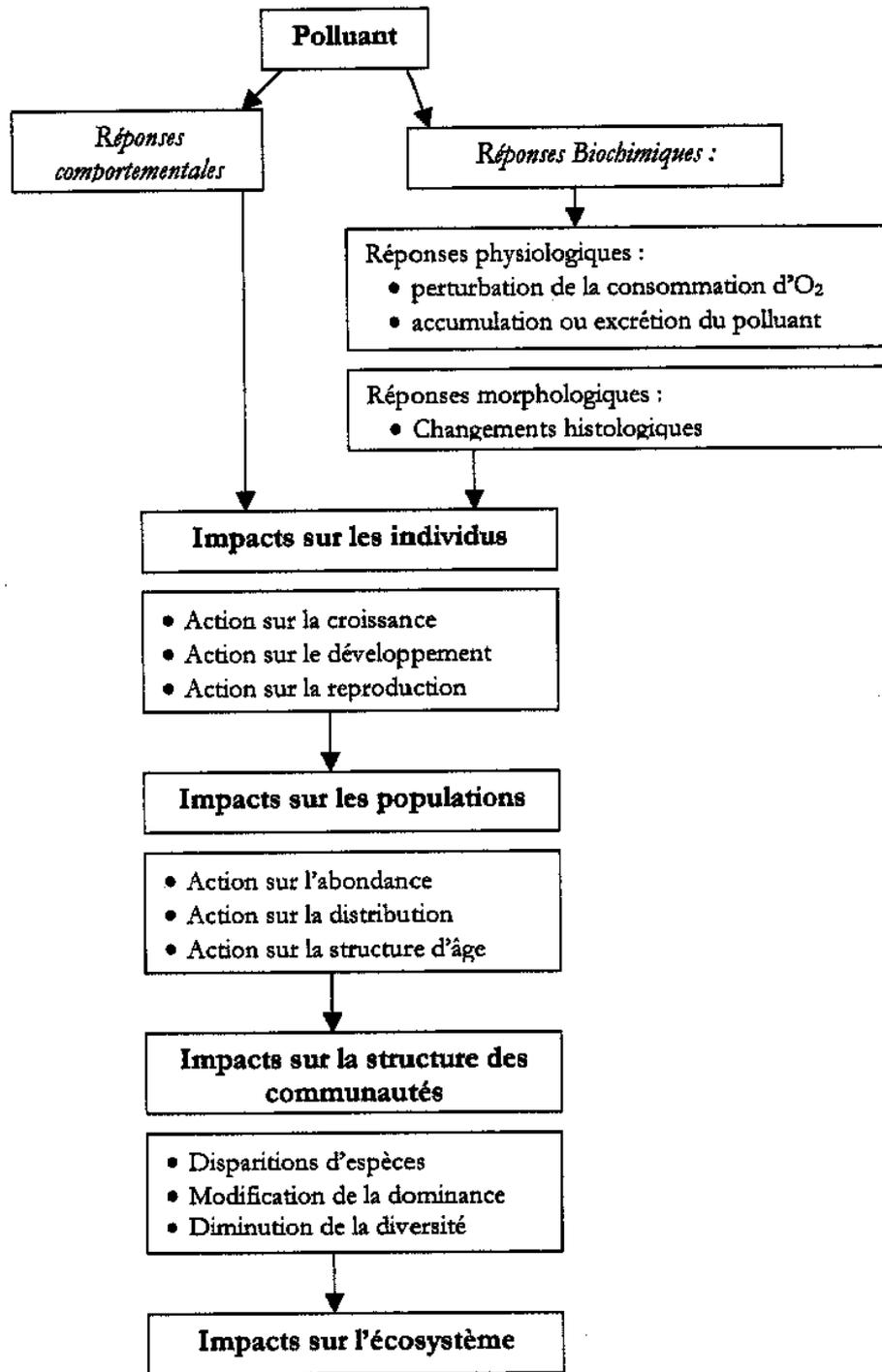


Figure 8 : Schéma des conséquences d'un polluant sur un écosystème aquatique (d'après Ramade, 1992)

Dans les écosystèmes aquatiques, les producteurs primaires auxquels appartiennent les microalgues ont un rôle fondamental (cf. paragraphe 1.2.1.2). Ces organismes sont, par ailleurs, connus pour être particulièrement sensibles aux pollutions [9]. Par conséquent, toute perturbation à leur niveau peut avoir des répercussions sur les niveaux trophiques supérieurs.

Ceci justifie en partie l'intérêt porté à l'étude de l'impact de polluants, notamment les métaux lourds et les pesticides, sur diverses espèces de microalgues. De nombreux travaux ont ainsi mis en évidence des perturbations de leur croissance, de leur morphologie voire de certaines fonctions métaboliques.

1.3.2 Effets des métaux lourds et des insecticides sur le phytoplancton

Les effets des métaux lourds sur les microalgues ont fait l'objet de nombreuses études. En effet, ces organismes ont la capacité de bioconcentrer les métaux lourds [10, 11]. Leur utilisation pour développer des techniques d'épuration d'effluents en découle d'ailleurs [12, 13]. Toutefois, les métaux lourds restent des substances toxiques pouvant avoir des effets indésirables sur les cellules algales. De plus, comme leur temps de génération est court, les microalgues répondent rapidement à la présence de xénobiotiques, contrairement aux organismes supérieurs [14].

En se limitant aux organophosphorés comme le méthyl-parathion et aux carbamates comme le carbofuran, la littérature disponible sur les effets de ces molécules sur les microalgues est assez réduite.

D'une manière générale, la sensibilité des algues à un toxique dépend de l'espèce algale considérée ainsi que de la molécule active. Il est, par conséquent, délicat de généraliser les observations présentées dans les paragraphes suivants à d'autres espèces algales.

1.3.2.1 Action des métaux lourds sur les microalgues

La croissance des algues est conditionnée par un certain nombre de paramètres physico-chimiques tels que les cycles éclaircissement-obscurité, les apports en nutriments mais également la présence dans le milieu d'un ou plusieurs toxiques.

Une diminution de la croissance algale est généralement observée en présence de métaux lourds [15, 16]. Celle-ci dépend du métal considéré et de sa concentration. Ainsi, l'impact de différents métaux sur la croissance de l'algue marine *Phaeosactylum trinitum* a été montré. Pour des concentrations identiques, l'effet est légèrement plus important pour le cadmium que pour le zinc. En outre, ils ont également mis en évidence des effets synergiques et antagonistes selon les concentrations en ions métalliques dans le milieu de culture. L'importance du zinc sur la toxicité du mélange a été souligné : si sa concentration est faible, c'est alors le cadmium qui contrôle la toxicité, à l'inverse, une concentration élevée en zinc l'influence de manière prépondérante [17].

La taille moyenne ainsi que la distribution de taille d'une population algale peuvent être modifiées par des métaux comme le cadmium ou le zinc. L'augmentation de la taille moyenne de cellules *Chlorella vulgaris* après une exposition à des concentrations en cadmium ou en zinc supérieures à $6 \cdot 10^{-5} \text{M}$ a été mise en évidence, l'effet le plus marqué apparaissant pour le cadmium. En ce qui concerne la distribution en taille des cellules, ces mêmes travaux ont montré que les réponses diffèrent selon les durées d'exposition aux toxiques et leurs concentrations. Ainsi pour des expositions de 36 à 90 heures, et des concentrations croissantes en zinc ou en cadmium, une plus grande hétérogénéité des cellules a pu être observée au sein de la population. De plus, pour un mélange zinc-cadmium à $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$, une modification du profil de distribution des tailles de cellules a été mise en évidence alors que pour des cellules exposées à une solution à $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de cadmium ou de zinc, les distributions en taille sont les mêmes que pour le témoin : ceci traduit donc un effet synergique du mélange zinc-cadmium sur les cellules algales [16].

Des effets sur les structures intracellulaires des algues peuvent également être observés lors d'expositions prolongées à des solutions contenant des métaux lourds. Des essais sur *Clamydomonas acidophila* ont montré qu'après traitement avec du cadmium, du zinc ou du cuivre, les cellules algales présentaient des dommages structurels [18]. Le cadmium cause ainsi les changements les plus importants : augmentation des granules d'amidon, des vacuoles et des chloroplastes. Une nouvelle structure apparaît même puisque des dépôts non membranaires denses en électrons se forment dans les vacuoles. Pour les traitements avec le zinc et le cuivre,

des enroulements membranaires se forment. Selon les souches algales étudiées, d'autres effets peuvent être observés. Ainsi, pour *Chlorella vulgaris*, l'exposition au cadmium entraîne une augmentation de la taille des granules d'amidon et une diminution de celles des mitochondries qui sont d'ailleurs les premiers organites cibles de ce métal [19].

Enfin, Badreddine (1996) a montré que les métaux lourds avaient une action limitée sur la fluorescence chlorophyllienne de *Chlorella vulgaris* [20]. Une étude réalisée par Védrine (2003) a, pour sa part, mis en évidence une inhibition de l'activité photosynthétique de *Chlorella vulgaris* en présence de concentrations de Cu^{2+} supérieures ou égales à 50ppb ($\mu\text{g/l}$). Le cuivre inactiverait en effet certains centres réactionnels du photosystème II. Par contre, ces mêmes travaux ont confirmé l'action limitée de métaux tels que Cd^{2+} et Hg^{2+} sur la fluorescence chlorophyllienne, les plus faibles concentrations détectables étant égales à 1ppm (mg/l) [21].

1.3.2.2 Action des insecticides organophosphorés et carbamates sur les microalgues

Une étude sur l'influence du méthyl-parathion sur *Chlorella protothecoides* montrant une inhibition de la croissance algale a été réalisée par Sajora et Bose (1982). Parallèlement, le volume des cellules diminue après une telle exposition [22].

Les auteurs ont également montré qu'après une exposition à du méthyl-parathion, le contenu protéique et pigmentaire de *Chlorella protothecoides* pouvait être modifié. Ils ont notamment observé une diminution de la quantité de chlorophylle a et b ainsi que celle du contenu protéique global des cellules [22].

Enfin, il apparaît que les pesticides les plus toxiques pour les algues sont ceux qui ont une action sur des processus spécifiques de la cellule végétale (photosynthèse, fluorescence chlorophyllienne) [23]. De nombreux travaux ont ainsi montré que les herbicides étaient les pesticides les plus toxiques pour les microalgues [21] à la différence des organophosphorés tels que le méthyl-parathion et les carbamates qui n'ont pas pour cible privilégiée la photosynthèse mais agissent plus spécifiquement comme inhibiteurs de l'activité cholinestérase comme nous le verrons au paragraphe 3.2.2.3.

1.3.3 Conséquences des perturbations du compartiment algal sur les niveaux trophiques supérieurs

Les impacts des métaux lourds et des insecticides sur les cellules algales peuvent avoir des conséquences sur l'ensemble de la population en diminuant notamment la biomasse totale. Mais des modifications structurelles et morphologiques peuvent perturber à plus longue échéance la reproduction voire la survie des populations algales. Des impacts sur les espèces herbivores des écosystèmes aquatiques peuvent, par conséquent, découler de la réduction de la biomasse phytoplanctonique. Les dépendances entre les différents niveaux trophiques peuvent ainsi conduire à des perturbations des populations des consommateurs supérieurs [24].

De plus, la capacité des micro-algues à accumuler ces polluants va favoriser leur bioaccumulation tout au long de la chaîne trophique pour atteindre des concentrations très importantes voire mortelles comme l'illustre la Figure 9.

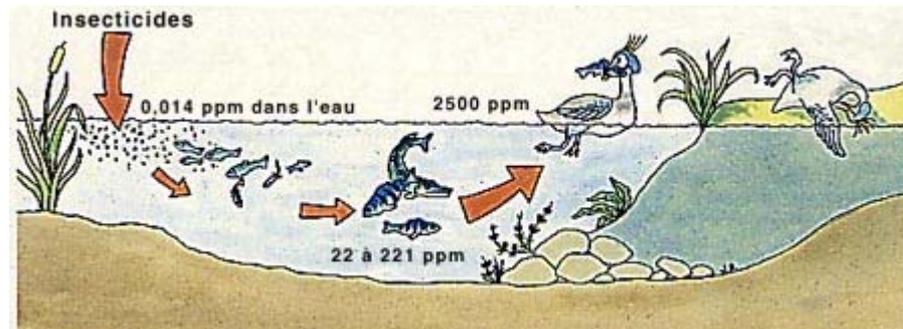


Figure 9 : Bioamplification le long d'une chaîne trophique après le rejet d'un insecticide dans le milieu aquatique (source : site Agence de l'Eau Rhin-Meuse)

1.4 Conclusion

Les écosystèmes aquatiques sont donc des milieux fragiles. Toutefois, les conséquences d'une pollution ne sont pas nécessairement visibles. Elles affectent ainsi dans un premier temps les populations particulièrement sensibles et il est parfois nécessaire de considérer des échéances plus longues pour constater des perturbations au niveau de l'écosystème.

Les écosystèmes équilibrés peuvent néanmoins s'auto-épurer (Figure 10). En effet, des mécanismes de dépollution internes (dilution, sédimentation, métabolisation des polluants par certains organismes, ...) leur permettent d'éliminer les xénobiotiques. Cette auto-épuration n'est toutefois possible que si les polluants ne sont pas rejetés en concentrations trop élevées.

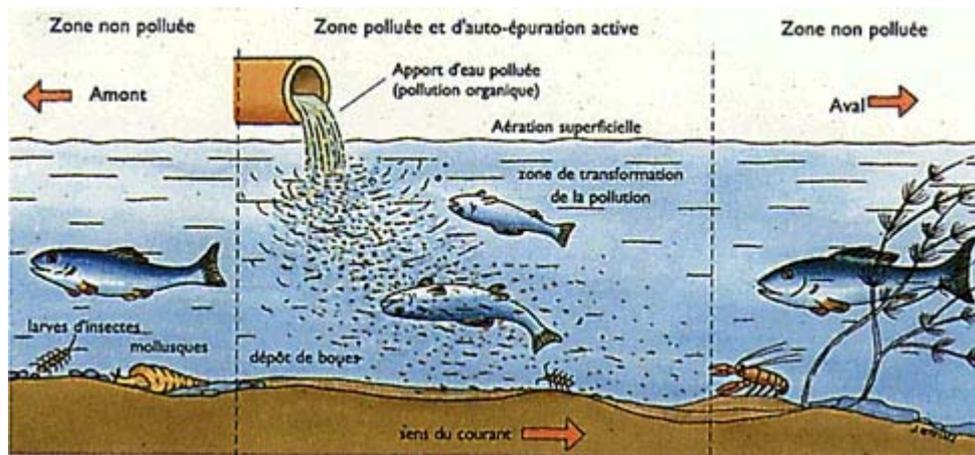


Figure 10 : Auto-épuration d'un écosystème aquatique (source : site Agence de l'Eau Rhin-Meuse)

Il apparaît néanmoins important, pour préserver ces milieux, de réglementer les rejets et d'assurer un contrôle de la qualité des eaux.

Afin de faciliter les analyses de laboratoire existantes (techniques d'analyses chimiques, bioessais écotoxicologiques), des outils d'alarme permettant la détection rapide d'une pollution sont particulièrement utiles pour la surveillance sur site.

Comme le souligne la Figure 8, les perturbations biochimiques, comme l'inhibition de certaines activités enzymatiques, peuvent constituer des signaux précoces de la présence d'un polluant dans le milieu et sont particulièrement adaptés à la mise au point de biocapteurs environnementaux.

2 La surveillance des écosystèmes aquatiques

2.1 La législation

2.1.1 La nouvelle directive européenne

Si l'Europe ne connaît globalement pas de pénurie en eau, sa gestion reste problématique. La nouvelle directive-cadre européenne (2000/60/CE) fixe de nouveaux objectifs qui doivent permettre une gestion durable de la ressource en eau qui devra, à terme, répondre à des normes d'excellente qualité.

Un des points les plus importants est la protection de toutes les eaux qu'elles soient continentales, côtières ou souterraines afin de garantir leur « bon état » en 2015. Ceci nécessite la mise en place de systèmes de gestion de bassins fluviaux fondés sur une coopération transfrontalière ainsi que la diminution et le contrôle de la pollution à la source (urbaine, agricole, industrielle). Si la participation de tous les consommateurs aux activités de gestion apparaît nécessaire puisque tous sont concernés, le principe du pollueur-payeur doit être respecté. Un échéancier des étapes importantes de la mise en application de cette directive a finalement été établi :

Décembre 2003 : adaptation en droit national de la directive, coopération au niveau des bassins fluviaux opérationnelle

Décembre 2004 : détermination des impacts des activités humaines sur les eaux, analyse économique

Décembre 2006 : programmes de contrôle pour la gestion des eaux opérationnels

Décembre 2008 : présentation au public des projets de gestion des bassins fluviaux

Décembre 2009 : premiers projets de gestion des bassins fluviaux

Décembre 2015 : « bon état » des eaux

2.1.2 Polluants et normes

Afin de préserver la qualité de la ressource en eau, les pouvoirs publics ont été amenés à réglementer les émissions de substances chimiques telles que les métaux lourds et les pesticides en fixant des concentrations limites selon les milieux considérés.

2.1.2.1 Les métaux lourds

Le Tableau 4 regroupe les valeurs limites pour le zinc, cadmium et le plomb dans les eaux destinées à la consommation et dans les eaux brutes de surface ou souterraines pouvant être potabilisées.

| | Unités | Eau destinée à la consommation (Décret n°89-3 du 3 janvier 1989 modifié) | Ressource en eau (de surface ou souterraine) |
|----------------|--------|--|---|
| Zinc | mg/l | 5 | 5 |
| Cadmium | µg/l | 5 | 5 |
| Plomb | µg/l | 50 (actuellement) ramenée à 25 et à terme 10 (en application de la Directive européenne n°98/83/CE) | 50 |

Tableau 4 : Valeurs limites pour certains métaux lourds dans l'eau potable et dans celle destinée à la consommation

En ce qui concerne les rejets industriels (dans l'air et l'eau) des installations classées, les valeurs limites sont fixées par arrêté préfectoral pour chaque entreprise en fonction de son type d'activité et de ses flux de polluants spécifiques.

Cet arrêté d'autorisation fixe le débit maximal journalier du ou des rejets conformément aux dispositions de l'arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation (ICPE). Le Tableau 5 et le Tableau 6 rassemblent les valeurs limites d'émission pour des métaux lourds fixées par arrêté préfectoral pour des ICPE soumises à autorisation (cas général). Pour des activités particulières, des adaptations sont envisagées.

| <i>Métaux et composés de métaux (gazeux et particulaires)</i> | Cas général | |
|---|---|---|
| | <i>Flux</i> | <i>Valeur limite de concentration</i> |
| Cadmium, mercure, thallium et leurs composés | Si flux horaire Cd+Hg+Tl > 1g/h | 0,05mg/m ³ par métal 0,1mg/m ³ pour la somme des 3 |
| Plomb et ses composés | Si flux horaire Pb > 10g/h | 1mg/m ³ |
| Antimoine, cobalt, chrome, cuivre, étain, manganèse, nickel, vanadium, zinc et leurs composés | Si flux horaire Sb+Cr+Co+Cu+Sn+Mn+Ni+V+Zn > 25g/h | 5mg/m ³ |

Tableau 5 : Valeurs limites des émissions dans l'atmosphère de certains métaux lourds pour différentes activités industrielles (cas général)

| <i>Métaux et composés de métaux (gazeux et particulaires)</i> | Cas général | |
|---|---|---------------------------------------|
| | <i>Flux</i> | <i>Valeur limite de concentration</i> |
| Cadmium | Selon le type d'activité le flux spécifique varie de 0.3g/kg à 1.5g/kg de Cd traité | 0,02mg/l |
| Plomb et ses composés | Si rejet Pb > 5g/j | 0,5mg/l |
| Zinc et ses composés | Si rejet Zn > 20g/j | 2mg/l |

Tableau 6 : Valeurs limites des émissions dans l'eau de certains métaux lourds pour différentes activités industrielles (cas général)

2.1.2.2 Les pesticides

Concernant les pesticides, la législation européenne actuelle (98/83 CE) ne pose des valeurs limites que pour l'eau potable. Toutefois, elle prend en compte l'existence de métabolites de dégradation et fixe ainsi une concentration limite de 0,1ppb (µg/l) pour chaque pesticide ou métabolite pertinent individualisé et 0,5ppb (µg/l) pour l'ensemble des pesticides et métabolites pertinents retrouvés. Quant à l'écotoxicologie de telles substances, celle-ci est évaluée lors de la phase d'homologation du produit.

2.2 Les méthodes analytiques destinées au contrôle de la qualité des eaux

La directive 80/778/CEE fournit les méthodes analytiques de référence pour l'analyse de l'eau potable. Comme les substances recherchées sont nombreuses et de nature très diverses, de nombreuses techniques d'analyse sont utilisées. Il existe néanmoins un certain nombre de techniques privilégiées dont le principe est présenté dans les paragraphes suivants [25].

2.2.1 Les techniques d'analyse chimique de laboratoire

Le Tableau 7 rassemble les principales techniques d'analyse chimique de laboratoire qui peuvent être employées pour l'analyse d'échantillons prélevés sur site.

D'un point de vue analytique, ces techniques fournissent des informations qualitatives et quantitatives sur la composition des solutions. Toutefois, ce sont des techniques généralement coûteuses en temps et en main d'œuvre qualifiée, d'autant plus que sur un même échantillon, plusieurs analyses doivent être envisagées pour déterminer sa composition le plus précisément possible.

Les techniques d'analyse chimique fournissent néanmoins des données avec des limites de détection qui permettent la mise en évidence de certains composés toxiques présents à l'état de trace voire d'ultra-trace.

| | | Analyse d'un échantillon | | Caractéristiques | |
|---------------------------------|-------------------------------------|--|---|--------------------------------------|---------------------|
| | | Principe | Information obtenue | Temps d'analyse (préparation+mesure) | Limite de détection |
| Absorption atomique (SAA) | | Dosage d'un atome par absorbance | [M ⁿ⁺] totale pour les métaux | < 15 minutes | ppb |
| Spectrométrie de masse (ICP-MS) | | Obtention d'un spectre de masse | Analyse élémentaire et isotopique (métaux) | < 30 minutes | < ppb |
| Méthodes chromatographiques | Liquide ou gazeuse avec couplage MS | Obtention d'un chromatogramme (séparation des constituants) | Identification et quantification de composés (pesticides) | < 30minutes | ppm à ppb |
| | Ionique | | Identification d'anions (nitrates...) | < 15 minutes | ppb |
| Polarographie | | Suivi de réaction rédox sur une électrode à gouttes de mercure tombantes | Analyse quantitative de composés minéraux et organiques : (métaux) | <15 minutes | ppm à ppb |

Tableau 7 : Principales techniques d'analyse chimique pour le contrôle de la qualité des eaux

2.2.2 Techniques pour les mesures de paramètres physico-chimiques et biologiques globaux

Les principaux paramètres physico-chimiques et biologiques globaux qui peuvent être suivis pour contrôler la qualité des eaux sont rassemblés dans le Tableau 8. Ces paramètres donnent des informations générales sur l'état de santé du milieu. Ainsi, la présence de matières en suspension (MES) en forte quantité, outre les phénomènes de colmatage, peut conduire à une consommation accrue en oxygène lors de la métabolisation de sa partie biodégradable, ce qui peut perturber l'équilibre de l'écosystème.

La présence de matière organique et de particules en suspension peut également influencer la biodisponibilité des polluants ainsi que la spéciation des métaux lourds (cf. paragraphe 1.2.2).

| <i>In situ</i> | En laboratoire | Informations | |
|-----------------------------------|--|------------------------|--|
| Température pH conductivité | – | Informations générales | |
| – | Matière en suspension (MES) norme NFT 90-105 | Turbidité | |
| – | Demande chimique en oxygène (DCO) NFT 90-101 | Matière organique | Evaluation de la matière organique biodégradable ou non |
| | Demande biologique en oxygène (DBO ₅) NFT 90-103 | | Evaluation de la matière organique biodégradable |

Tableau 8 : Principaux paramètres physico-chimiques et biologiques globaux pour le contrôle de la qualité des eaux

2.3 Les bioessais écotoxicologiques

La seule connaissance de la concentration d'un polluant dans le milieu naturel ne permet toutefois pas d'évaluer son impact sur l'écosystème. De nombreux bioessais basés sur l'étude des perturbations de certains signaux biologiques sont aujourd'hui développés afin d'améliorer la prévision des conséquences d'une pollution sur un écosystème.

Ces bioessais possèdent, en outre, l'avantage de permettre la mise en évidence d'une perturbation même si le polluant n'est pas détectable (suite à la dilution, au lessivage...).

2.3.1 Intérêt des bioessais écotoxicologiques

L'intérêt majeur des bioessais est de pouvoir intégrer à l'évaluation de la toxicité d'un effluent complexe de nombreux paramètres tels que les conditions du milieu (pH, température...), les phénomènes de synergie ou d'antagonisme. Leur réponse dépend, en outre, de la biodisponibilité des toxiques, le recours aux analyses chimiques étant toutefois nécessaire pour conclure à l'absence ou la présence d'une substance dans un échantillon.

Il existe un certain nombre de tests monospécifiques, réalisés sur **une espèce** représentative d'un niveau trophique, qui sont largement employés et présentent l'avantage d'être reproductibles et répétables. Quelques-uns de ces bioessais ont d'ailleurs été normalisés.

Afin d'apprécier les conséquences potentielles d'une pollution sur l'écosystème dans son ensemble, une batterie de bioessais monospécifiques sur des organismes représentatifs des différents niveaux trophiques (décomposeurs, producteurs primaires, consommateurs primaires et secondaires) peut être mise en place [9].

Pour améliorer la représentativité écologique, les tests plurispécifiques permettent de recréer une chaîne trophique en exposant **plusieurs espèces** dans le même microcosme [26].

Néanmoins, la difficulté de leur mise en œuvre et de leur interprétation en font, à l'heure actuelle, des outils exclusivement expérimentaux.

Les principaux paramètres à prendre en compte lors d'un bioessai monospécifique sont regroupées dans le Tableau 9. Un certain nombre de bioessais s'intéressent au métabolisme général des organismes en suivant leur croissance, leur respiration... Ces bioessais permettent donc de mettre en évidence une perturbation globale sans possibilité d'en identifier la cause. Par exemple, dans le paragraphe 1.3.2, il a été montré que la croissance algale peut être perturbée aussi bien par les métaux lourds que par les insecticides. Plus récemment, le développement de bioessais s'est axé sur la mesure d'une fonction biologique particulière (fluorescence chlorophyllienne, activités enzymatiques...). Or, du fait de la spécificité des réponses obtenues, il devient alors possible de distinguer des familles de polluants.

| | | |
|--------------------------------|--|--|
| Conditions de mise en œuvre | Essai statique | |
| | Essai semi-statique | |
| | Essai dynamique | |
| Durée d'exposition | courte | } Toxicité aiguë |
| | moyenne | |
| | Long terme | } Toxicité chronique |
| Processus biologique considéré | Métabolisme général : croissance, respiration cellulaire | Perturbation globale sans identification possible de la cause |
| | Fonction biologique : photosynthèse et fluorescence chlorophyllienne, activités enzymatiques | Perturbation généralement causées par des familles de polluants spécifiques dont elles sont la cible |

Tableau 9 : Paramètres à considérer pour développer un bioessai monospécifique

2.3.2 Bioessais écotoxicologiques pour le contrôle de la qualité du milieu aquatique

Pour l'évaluation de la qualité des eaux douces, les gestionnaires doivent donc sélectionner les tests les plus adaptés parmi de nombreux bioessais monospécifiques, normalisés ou non, et constituer ainsi des batteries de tests [9].

2.3.2.1 Les décomposeurs

Pour ce compartiment, les protocoles utilisant des bactéries bioluminescentes ont des sensibilités marquées pour de nombreuses familles de polluants. Le principe général repose sur l'inhibition de la bioluminescence de bactéries *Vibrio fischeri* (NF EN ISO 6341) en présence de toxiques. Ces tests de toxicité aiguë⁷ ont servi à de nombreuses études portant sur des polluants tels que les métaux lourds, les herbicides ou les phénols [9]. Comme ils sont très simples à exécuter et peu coûteux (kit Microtox®), ils sont très couramment employés mais soulèvent néanmoins la question de l'influence de l'ajout de réactifs (sels) sur la toxicité. La représentativité d'une bactérie d'origine marine pour l'évaluation de la qualité des eaux dulçaquicoles⁸ peut également être discutée.

^{7,8}: cf. Définitions p. 23

2.3.2.2 Les producteurs primaires

Pour le phytoplancton, le test de croissance sur *Pseudokirchneriella subcapitata* (NF T 90 375) est recommandé par de nombreux organismes internationaux (US EPA, Environnement Canada, CEE). Ce test de toxicité chronique ⁹ permet d'étudier l'inhibition de la croissance algale sur 72 heures en présence d'un toxique.

De nombreuses études ont, par ailleurs, montré que les algues étaient plus sensibles aux métaux lourds que les autres organismes du milieu aquatique et moins sensibles aux herbicides que les plantes vasculaires [27]. Afin d'obtenir des informations plus complètes, il apparaît alors nécessaire de disposer de tests sur les végétaux supérieurs aquatiques. La très grande majorité de ces tests utilisent des lentilles d'eau *Lemna minor* sur lesquelles la croissance des frondes, au cours d'une exposition à un toxique, est suivie [27].

Les bioessais basés sur la croissance fournissent donc des informations utiles sur le métabolisme global mais ne répondent pas à un toxique particulier.

L'avantage des bioessais s'intéressant à des fonctions spécifiques telles que la fluorescence chlorophyllienne ou les activités enzymatiques est qu'ils donnent une information rapide des perturbations provoquées par des familles de polluants identifiés sans qu'il soit nécessaire d'attendre l'apparition de dérèglements au niveau de la population comme c'est le cas pour les tests de croissance. Ainsi, la fluorescence chlorophyllienne de *Chlorella vulgaris* est perturbée en présence d'herbicides comme l'atrazine ou le diuron alors que l'exposition à des métaux lourds a un effet limité [20, 21]. Ces bioessais peuvent donc être considérés comme des indicateurs précoces de pollution.

2.3.2.3 Les consommateurs primaires et secondaires

Pour étudier l'impact de polluants sur le milieu aquatique, l'utilisation de *Daphnia magna* est très courante. Des tests de toxicité aiguë basés sur la mobilité des daphnies (NF T 90 320) et des tests de toxicité chronique considérant leur reproduction ont permis de montrer que *Daphnia magna* est sensible à de nombreux polluants (métaux lourds, pesticides,...) [9].

Enfin la truite arc-en-ciel est le poisson standard au niveau mondial pour les études de pollution en eau douce (ISO 7346/1-1984 F). De nombreuses données toxicologiques sont disponibles sur ce poisson dont la sensibilité aux polluants est toutefois variable d'un individu à l'autre [9].

Les bioessais présentés dans les paragraphes précédents permettent d'obtenir de nombreuses informations relatives aux impacts écotoxicologiques d'un xénobiotique. Néanmoins, leur mise en œuvre est longue (de quelques heures à plusieurs jours) et se fait généralement en laboratoire.

Afin de faciliter le contrôle environnemental *in situ*, il semble important de pouvoir disposer d'outils d'alarme pour une détection précoce des pollutions.

⁹: cf. Définitions p. 23

2.4 Les biocapteurs environnementaux

De nombreuses équipes travaillent aujourd'hui sur la mise au point de biocapteurs environnementaux permettant la mise en évidence de la contamination chimique des écosystèmes. Ces outils sont particulièrement intéressants puisqu'ils se prêtent à l'automatisation, sont implantables sur des sites d'étude et fournissent une réponse en temps réel.

2.4.1 Généralités sur les biocapteurs

Un biocapteur (cf. Figure 11) est un outil permettant de transformer un phénomène biochimique en un signal électrique. Il associe un composé biologique, le biorécepteur, à un système physique, le transducteur, qui convertit en signal électrique la modification biochimique survenue au niveau du biorécepteur [28].

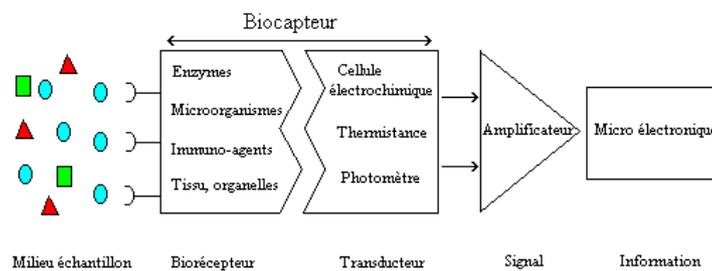


Figure 11 : Représentation d'un biocapteur (d'après Tran Minh, 1995)

Depuis l'électrode à glucose oxydase développée par Updike et Hicks (1967) pour le dosage du glucose, de très nombreux biocapteurs ont vu le jour. Même si les enzymes restent fréquemment employées, de nouveaux biorécepteurs sont aujourd'hui étudiés, comme l'ADN, les anticorps-antigènes, les cellules entières voire les organites.

En ce qui concerne les transducteurs, des avancées majeures ont été faites grâce à la miniaturisation qui a notamment permis de développer des micro-électrodes [29, 30, 31]. Les fibres optiques ont, pour leur part, facilité la détection de signaux biologiques par absorbance ou fluorescence.

Le Tableau 10 présente des exemples d'association biorécepteur-transducteur et leur utilisation. Cette liste est non exhaustive mais souligne la très grande diversité qui existe dans le domaine des biocapteurs.

| Transducteur \ Biorécepteur | | Enzyme | Cellules, microorganismes | ADN, Immuno-agents | Tissu animal/végétal |
|-----------------------------|--|--|--|--|--------------------------------------|
| Revue bibliographique | | | [32, 33] | [34] | |
| | | [35-37] | | | |
| Electrochimique | Conductimétrique Ampérométrique Potentiométrique | Acétylcholinestérase [38], Tyrosinase [39], Glucose oxidase [40] | <i>Chlorella vulgaris</i> [41], Cellules HeLa [42], <i>Chlamydomonas</i> [43], Cyanobactérie [44] | Anticorps [45], Anticorps [46], ADN [47] | Thylakoïdes [48] Thylakoïdes [49] |
| Optique (fibre) | | Nitrite réductase [50] | <i>Chlorella vulgaris</i> [51-53] | Anticorps de souris [54] ; | Chloroplastes isolés [55] |
| Piézo-électriques | | | | [56] | |

Tableau 10 : Possibilités d'utilisation des biocapteurs selon le transducteur et le biorécepteur choisis

Dans les nombreux travaux existants sur les biocapteurs, le choix du transducteur et du biorécepteur dépend de plusieurs facteurs présentés dans le Tableau 11. A l'heure actuelle, une grande partie des études menées sur les biocapteurs tend à optimiser leurs caractéristiques pour répondre au mieux aux exigences de leur domaine d'application, notamment en travaillant sur la stabilité de la réponse, la sélectivité et la sensibilité des biocapteurs [57].

| Le choix du transducteur dépend [28] : | Le choix du biorécepteur dépend [33]: |
|---|--|
| du type de réaction et de substances libérées ou consommées : Ex : modification de charges, de pH, variations de fluorescence... | de la spécificité de sa réponse |
| de l'utilisation du biocapteur : Ex : applications biomédicales : biocapteurs à usage unique miniaturisés | de sa durée de vie |
| des possibles interférences : Ex : dans les milieux troubles, la détection optique peut être perturbée. | de sa stabilité opérationnelle et environnementale |

Tableau 11 : Facteurs à prendre en compte dans le choix du transducteur et du biorécepteur

2.4.2 Les transducteurs

Le Tableau 10 rassemble les différents transducteurs qui peuvent être utilisés pour le développement de biocapteurs.

Les **transducteurs électrochimiques** sont très fréquemment utilisés, on distingue les capteurs potentiométriques, conductimétriques et ampérométriques [28].

Le principe général de fonctionnement des *capteurs potentiométriques* repose sur la mesure de la différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence. Grâce à la loi de Nernst, il est alors possible de connaître la concentration de l'espèce à doser, le signal étant directement proportionnel au logarithme de la concentration. Le paragraphe 3.3.2 présentera plus en détail le fonctionnement des biocapteurs ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) appartenant à cette famille.

Les *capteurs ampérométriques* utilisent, pour leur part, l'intensité de courant qui traverse la cellule électrochimique à un potentiel imposé. Or, cette intensité dépend de la concentration des éléments pouvant être oxydés ou réduits au niveau de l'électrode indicatrice, une seconde électrode servant de référence. Par étalonnage, il est donc possible de déterminer la concentration de certaines espèces en solution à partir de l'intensité mesurée.

Le principe de mesure avec des *capteurs conductimétriques* sera, quant à lui, développé au paragraphe 3.3.1.

Les **capteurs à fibre optique** ont un fonctionnement simple puisqu'il repose sur le phénomène de réflexion totale le long de la fibre optique. Il est ainsi possible de suivre la lumière émise lors de la sollicitation du biorécepteur. Différents signaux peuvent être adaptés à ce type de détection, notamment la fluorescence chlorophyllienne des cellules végétales, les réactions enzymatiques au cours desquelles des produits fluorescents se forment... [51, 53].

Enfin, les **capteurs piézoélectriques** sont des dispositifs gravimétriques qui mesurent la masse d'un échantillon déposé sur la surface d'un cristal piézoélectrique par l'intermédiaire de la variation de sa fréquence de résonance caractéristique [28].

2.4.3 Les biorécepteurs

Le fonctionnement des biocapteurs nécessite l'utilisation d'un composant biologique, le biorécepteur, dont dépend le signal biologique émis.

Le choix du biorécepteur est également lié à celui du transducteur selon la nature du signal biologique émis (modifications physico-chimiques, fluorescence, ...). De plus, le biorécepteur doit répondre à un certain nombre d'exigences telles que la stabilité de son signal ou sa facilité d'immobilisation.

2.4.3.1 Les enzymes

Les **enzymes** sont des biorécepteurs couramment utilisés. De très nombreux travaux portent, en effet, sur la mise au point de biocapteurs permettant le suivi d'une activité enzymatique [40, 52, 58-60].

Les enzymes sont des molécules indispensables aux réactions métaboliques puisqu'elles jouent le rôle de catalyseurs en abaissant l'énergie d'activation (enthalpie libre d'activation) nécessaire à la réaction.

D'un point de vue structural, ce sont des protéines qui ne sont pas modifiées au cours de la réaction. Le site actif de l'enzyme est, quant à lui, une zone particulièrement importante de la

protéine puisqu'il assure deux fonctions, la fixation du substrat (site de fixation) et sa transformation (site catalytique).

Les enzymes ont la particularité d'être spécifiques vis-vis de la réaction qu'elles catalysent, par exemple l'amylase permet de dégrader l'amidon alors que l'ATPase intervient dans le métabolisme énergétique. Les enzymes présentent, par conséquent, une grande spécificité par rapport au(x) substrat(s).

La Figure 12 présente l'exemple de réaction enzymatique faisant intervenir l'acétylcholinestérase ainsi que les capteurs permettant de la détecter.

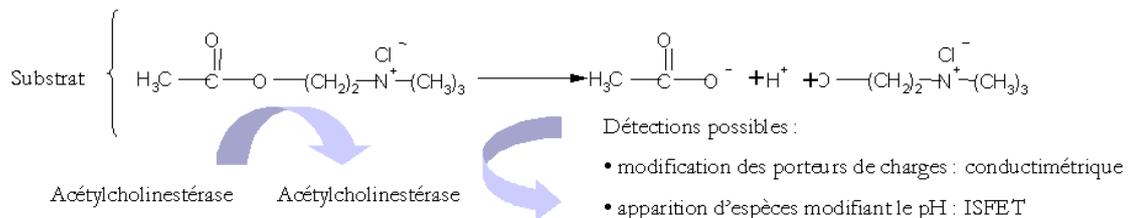


Figure 12 : Réaction enzymatique de l'acétylcholinestérase

La vitesse des réactions enzymatiques est fonction de paramètres physico-chimiques comme le pH, la température, mais également de la présence d'ions activateurs (généralement des cations métalliques comme Mg^{2+}) ou de celle d'inhibiteurs qui peuvent diminuer l'activité enzymatique. Un des principaux intérêts d'utiliser des enzymes comme biorécepteurs est que celles-ci sont perturbées par différentes familles de substances : les métaux lourds pour l'uréase ou les déshydrogénases [61, 62], les pesticides organosphorés pour les cholinestérases [38, 63, 64] : cette spécificité vis-à-vis de leurs inhibiteurs permet d'identifier des familles de toxiques dans un mélange complexe.

Grâce à toutes ces caractéristiques, les enzymes pures restent largement utilisées pour la mise au point de biocapteurs. Néanmoins, elles sont relativement coûteuses et, pour certaines, souffrent d'un manque de stabilité de leur activité au cours du temps.

2.4.3.2 Les cellules entières et les organites

Des équipes ont choisi de travailler sur les **cellules entières** qui possèdent elles-aussi de nombreux avantages. Il est en effet possible de suivre certains signaux représentatifs de leur métabolisme global ainsi que leurs perturbations après une exposition à un toxique [32, 65]. La **respiration cellulaire** peut, par exemple, être suivie grâce à la consommation en O_2 ou la production de CO_2 [66]. A la différence des enzymes, le dysfonctionnement du métabolisme global ne permet cependant pas d'identifier une famille de toxiques.

Par contre, en s'intéressant à des fonctions plus spécifiques du métabolisme comme la **photosynthèse** pour les producteurs primaires, il est alors possible de mettre en évidence la présence de certaines molécules perturbatrices [53, 67].

L'activité photosynthétique s'exprime à travers différents processus, la production d' O_2 et la consommation de CO_2 ainsi que les modifications du flux d'électrons dans l'appareil photosynthétique directement lié à la fluorescence chlorophyllienne, ce dernier mécanisme étant principalement causé par la désexcitation des molécules de chlorophylle *a* qui retournent à leur état stable après avoir été soumis à un flux de photons [21].

Or, dans le paragraphe 1.3.2.2, il est apparu que les herbicides comme l'atrazine ou le diuron perturbent significativement la photosynthèse [53]. Des études menées sur des thylakoïdes ou des chloroplastes ont conduit à des conclusions similaires puisque c'est au niveau de ces tissus cellulaires que se produisent les différentes réactions associées à la photosynthèse [68, 69].

Enfin, quelques études, ont choisi d'utiliser les cellules entières car, comme tous les organismes vivants, elles possèdent de nombreuses enzymes membranaires de fonctions diverses. A la différence des enzymes pures, aucune étape d'extraction ou de purification n'est alors nécessaire [33, 41, 70]. Comme de plus, les cultures de cellules sont souvent simples à mettre en oeuvre, les coûts s'en trouvent réduits. Enfin, étant donnée qu'elles sont sollicitées dans leur environnement naturel, les enzymes membranaires sont plus stables et moins sensibles aux variations de pH ou de température [33] que les enzymes pures.

Grâce au génie génétique, il est également possible d'utiliser des cellules génétiquement modifiées. Généralement, des gènes rapporteurs sont fusionnés avec des promoteurs qui ont la particularité d'être impliqués dans les réponses cellulaires au stress ou à certains changements du milieu environnant (présence de métaux lourds par exemple). Par exemple, en associant le gène rapporteur *lux* codant pour l'enzyme luciférase à des promoteurs répondant à la présence de métaux lourds, la lumière émise par la cellule est directement proportionnelle à la concentration en métaux lourds dans le milieu [71].

2.4.3.3 Les anticorps-antigènes et l'ADN

Le développement de biocapteurs immunologiques s'appuie sur la reconnaissance moléculaire des anticorps-antigènes. La réaction de couplage antigène-anticorps peut alors être suivie par détection électrochimique ou optique. Un grand nombre de travaux ont eu recours au marquage de l'anticorps ou de l'antigène par une enzyme (phosphatase alcaline ou peroxydase de radis noir) ou un fluorochrome¹⁰ qui permet de suivre facilement la réaction de reconnaissance moléculaire (technique ELISA : **E**nzyme **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay) [54 , 72].

Les principaux avantages des antigènes ou des anticorps sont leurs très grandes sensibilité et spécificité vis-vis de l'agent à détecter. Il existe ainsi des anticorps anti-2,4-D (l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique sert de pesticide modèle) [72], d'autres fixent exclusivement les métaux Cd, Pb, Co et U [54].

Leur principal inconvénient reste la question de la réversibilité du couplage antigène-anticorps qui peut néanmoins être levée grâce à des rinçages successifs.

L'utilisation de séquences d'ADN comme biorécepteurs sur des puces à ADN (DNA chips) suscite aujourd'hui un intérêt croissant [57]. Le principe repose sur la détection d'évènements d'hybridation reflétant la reconnaissance entre deux séquences complémentaires. Ceci permet de mettre en évidence la présence d'agents pathogènes, de gènes mutants mais également de substances toxiques pouvant se lier à l'ADN ainsi que des dommages de la séquence sous l'action d'UV ou d'agents oxydants (radiations ionisantes, antibiotiques...) [47].

¹⁰ : cf. Définitions p. 23

2.4.4 Les procédés d'immobilisation des biorécepteurs

L'immobilisation du biorécepteur constitue un des points critiques de la réalisation des biocapteurs. Elle peut influencer aussi bien la stabilité opérationnelle, la durée de conservation, le temps de récupération, la sensibilité, la gamme linéaire que l'accessibilité au biorécepteur et sa réactivité.

L'emploi de matériel biologique pose un certain nombre de contraintes. Il est ainsi nécessaire de s'assurer que l'immobilisation n'interfère pas, ou alors de façon limitée, avec le signal biologique. Certaines techniques, notamment chimiques, peuvent en effet, dénaturer l'élément biologique (enzyme) ou le rendre non viable (cellules).

De nombreux procédés ont été ou sont en cours d'élaboration et reposent sur deux grands principes : l'immobilisation physique ou l'immobilisation chimique [31, 73].

2.4.4.1 L'immobilisation physique

L'**adsorption** est une des techniques les plus simples basées sur les forces de Van der Waals qui peuvent exister entre un composé biologique et une surface. Dans ce cas, il n'y a aucune dénaturation de l'élément biologique, toutefois une désorption est possible selon le pH, la force ionique, la température ou la présence de solvant [31].

La **technique de Langmuir-Blodgett (LB)** repose, quant à elle, sur l'adsorption d'enzymes sur une monochouche de tensio-actif, comme l'octodécylamine (ODA), grâce à la force électrostatique. Un film LB dans lequel l'enzyme est emprisonnée entre deux couches d'ODA est représenté à la Figure 13. Une fois déposés sur les capteurs, ces films sont traités avec des vapeurs de glutaraldéhyde pour améliorer leur stabilité [74]. Cette technique « douce » permet de contrôler les édifices moléculaires mais des problèmes de stabilité peuvent être constatés (durée de vie de quelques jours) [74].

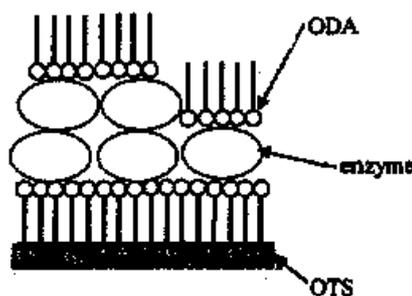


Figure 13 : Film Langmuir-Blodgett enzyme-ODA (d'après Wan *et al.*, 2000) avec OTS : octodécyltrichlorosilane

L'immobilisation physique au sein d'une **matrice polymère** (polyacrylamide, polypyrroles...) est une technique qui tend à se répandre, notamment pour les enzymes. L'absence de liens chimiques permet de préserver l'activité enzymatique durant l'immobilisation [75]. Toutefois, le relargage d'enzymes et la possibilité de barrières diffusionnelles demeurent les principaux inconvénients.

En ce qui concerne **les gels** comme le K-carrageenan, l'alginate ou l'agar, ils permettent l'emprisonnement d'éléments biologiques sous des conditions peu agressives ne dénaturant pas le biorécepteur [73, 76-78]. Le principal inconvénient reste là encore le relargage de l'élément biologique.

Enfin, la microencapsulation d'un biorécepteur libre en solution derrière une membrane sélective (membrane à dialyse, collagen, NAFION...) permet de limiter la biodégradation ou les contaminations mais reste un procédé complexe à mettre en œuvre qui peut également poser des problèmes quant à l'accessibilité des polluants [79].

2.4.4.2 L'immobilisation chimique

L'immobilisation par **réticulation ou co-réticulation** nécessite une protéine de charge (comme l'albumine) et un agent bifonctionnel, le plus souvent le glutaraldéhyde sous sa forme liquide ou vapeur [31, 80]. Cette procédure est couramment employée pour l'immobilisation des enzymes. Quelques travaux ont montré qu'il est possible d'utiliser cette technique de fixation covalente pour des cellules entières comme des algues ou des levures [41, 81, 82]. Les membranes ainsi obtenues sont insolubles dans l'eau et s'adsorbent sur une surface solide, le relargage de l'élément biologique est alors plus difficile. Néanmoins, le réseau tridimensionnel résultant peut affecter la cinétique enzymatique (problèmes de diffusion du substrat dans la membrane) ainsi que la diffusion des polluants. Une optimisation du temps d'exposition au glutaraldéhyde est également nécessaire pour chaque type d'élément biologique afin de limiter sa toxicité pour les biorécepteurs tout en conservant une bonne résistance mécanique.

Enfin, le **couplage covalent** lie le biorécepteur à un support préalablement activé, et ce de manière irréversible. En effet, dans les enzymes, certains groupes nucléophiles des acides aminés ne sont pas essentiels aux réactions. En activant le support du capteur grâce à un groupement carboxyle réagissant avec un carbodiimide, celui-ci peut ensuite s'associer à un groupement amine du biorécepteur et former un lien amine entre le support et le biomatériau (cf. Figure 14).

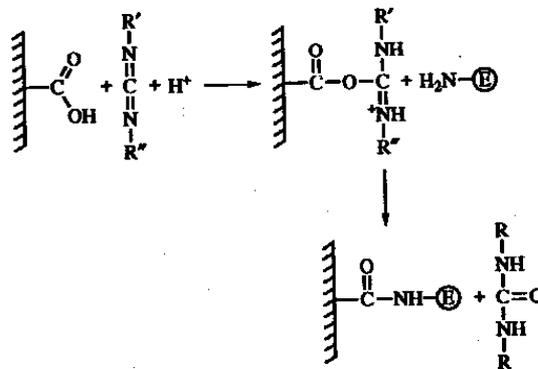


Figure 14 : Couplage covalent d'une enzyme sur un transducteur via un carbodiimide (d'après Eggins, 1998)

Cette technique est particulièrement intéressante car les contraintes diffusionnelles sont limitées et le relargage de l'élément biologique pratiquement impossible. Néanmoins la toxicité des molécules permettant ces liaisons covalentes n'est pas négligeable.

Le choix de la technique d'immobilisation apparaît donc comme un compromis tenant compte du type de transducteur, du biorécepteur et de nombreux paramètres comme la force ionique, le pH du milieu réactionnel, la diffusion des molécules dans la membrane...

Les paragraphes précédents ont souligné la très grande diversité de biocapteurs pouvant être utilisés. Les domaines d'application de tels outils sont nombreux (analyse médicale, agro-alimentaire...). Toutefois, l'utilisation des biocapteurs pour le contrôle environnemental est récente et offre de nombreuses perspectives.

2.4.5 Applications des biocapteurs au contrôle environnemental

Afin de répondre aux nouvelles dispositions législatives concernant le contrôle des rejets de polluants, les biocapteurs présentent des avantages certains sur les techniques d'analyses chimiques conventionnelles telles que celles mentionnées au paragraphe 2.2 qui, même si elles sont extrêmement précises, n'en demeurent pas moins coûteuses et nécessitent une main d'œuvre qualifiée.

Les biocapteurs sont, pour leur part, très sensibles et peuvent détecter de très faibles concentrations de toxiques [35]. Ils peuvent également opérer dans des matrices complexes directement prélevées dans le milieu naturel, les délais de réponse sont donc courts puisque la préparation des échantillons est rapide. Ceci permet alors d'envisager l'emploi de tels outils pour instrumenter des sites et obtenir des informations en continu et en temps réel quant à la présence de polluants.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux biocapteurs destinés au contrôle environnemental ont été développés, et dans certains cas commercialisés, pour détecter les grandes familles de substances susceptibles de polluer les écosystèmes aquatiques.

2.4.5.1 Les pesticides

Les pesticides ont fait l'objet de très nombreuses études afin de mettre au point des biocapteurs à partir de technologies différentes [35].

Un grand nombre de ces biocapteurs repose sur l'inhibition des enzymes cholinestérases par des composés organophosphorés et carbamates et utilisent des capteurs électrochimiques comme transducteurs.

Cremisini *et al.* (1995) proposent, par exemple, un capteur ampérométrique à acétylcholinestérase pour la détection de paraoxon dans la gamme 1 à 15ppb [63]. On trouve également des capteurs conductimétriques ou ISFET pour la détection de méthyl-parathion ou de méthyl-paraoxon avec des limites de détection (L_d) inférieures à 25 ppb [38, 83].

L'utilisation de systèmes FIA ¹¹ permet de se rapprocher de la configuration la plus adaptée aux mesures sur site et a été utilisée par Pogacnik et Franko (2001) pour étudier l'inhibition de cholinestérases de différentes origines par du paraoxon (L_d inférieure à 0,5ppb) et du carbofuran (L_d inférieure à 5ppb) afin d'optimiser le choix du biorécepteur [64].

Quelques immunocapteurs ont également fait l'objet de recherches. La plupart est basée sur des détections optiques et permet la mise en évidence d'atrazine, de s-triazines et de carbaryl [34].

¹¹ : cf. Définitions p. 23

Enfin, des capteurs à cellules entières sont apparus récemment et reposent généralement sur la mesure de l'activité photosynthétique de cellules algales perturbée en présence d'herbicides.

En mesurant la fluorescence chlorophyllienne, Frense *et al.* (1998) ont mis en évidence la présence d'atrazine jusqu'à 1ppb [84]. Les travaux menés par Védrine (2003) ont débouché sur la mise au point d'un biocapteur à cellules algales sensible à des concentrations inférieures à 0,25 ppb en atrazine, à 0,025ppb en diuron et isoproturon et à 0,5ppb en simazine [53].

D'autres auteurs se sont intéressés aux variations de la consommation d'O₂ ou de la production de CO₂ lors de la photosynthèse pour détecter la présence d'herbicides [43, 44, 85].

2.4.5.2 Les métaux lourds

Pour la détection de métaux lourds, des enzymes purifiées ont permis la mise au point de biocapteurs adaptés pour la détection des métaux lourds notamment l'uréase [61, 86] et la phosphatase alcaline [87, 88].

Des biocapteurs optiques utilisant des algues *Chlorella vulgaris* comme biorécepteurs ont permis de suivre l'activité des phosphatases alcalines membranaires ainsi que leurs perturbations en présence de divers métaux lourds avec des limites de détection d'environ 10 ppb pour Cd²⁺ et Pb²⁺ [52].

D'autres capteurs basés sur la fluorescence chlorophyllienne d'algues immobilisées peuvent également servir à la détection du mercure et du cuivre comme l'ont montré Campanella *et al.* (2000) [44].

2.4.5.3 Autres pollutions

Les phénols sont des molécules dont l'usage est très répandu (pesticides, plastiques, surfactants, médicaments...).

L'enzyme tyrosinase utilisant des dérivés phénoliques comme substrat a permis de développer de nombreux capteurs. Mai Anh *et al.* (2002) ont ainsi proposé des capteurs ISFET à tyrosinase pour la détection de phénol dans l'eau avec une limite de détection de 20 ppm pour le 4-chlorophénol [39]. De nombreux autres capteurs électrochimiques avec des limites de détection inférieures à 0,5ppb ont également fait l'objet d'études [35, 89].

Enfin, l'évaluation de la pollution organique globale peut être réalisée grâce à des biocapteurs basés sur la mesure de la DBO de bactéries immobilisées. La dégradation de molécules organiques par les microorganismes s'accompagne en effet d'une augmentation de leur consommation en oxygène modifiant le signal mesuré par le capteur [28].

2.4.5.4 Biocapteurs commercialisés pour le contrôle environnemental

Le Tableau 12 rassemble un certain nombre de biocapteurs actuellement commercialisés et pouvant être destinés au contrôle environnemental.

| Biocapteur | Commercialisé par | Fonctionnement |
|---------------------------------|--|--|
| Cellsense | Euroclon Ltd (Yorkshire, Grande-Bretagne) http://www.euroclone.net | Basé sur les modifications du métabolisme cellulaire (respiration) |
| Biocapteurs enzymatiques | Universal Sensors (Kinsale, Irlande) http://intel.ucc.ie/sensors/universal | Détection ampérométrique ou potentiométrique (exemple : uréase...) |
| Biocapteurs à nitrate réductase | Nitrate Elimination Company (Michigan, Etats-Unis) http://www.nitrate.com | Basé sur la détection de la nitrate réductase |
| Fluotox | Aquams, France | Basé sur la détection de la fluorescence chlorophyllienne de microalgues |
| <i>LASys plus</i> | Affinity Sensors (Grande-Bretagne) http://www.affinity-sensors.com | Immunocapteurs |

Tableau 12 : Biocapteurs commercialisés destinés au contrôle environnemental

2.5 Conclusion

La nouvelle réglementation européenne ainsi que la prise de conscience collective de la nécessité de préserver la ressource en eau suppose que les gestionnaires disposent d'outils de contrôle. Actuellement, la majorité des techniques destinées à évaluer la qualité des eaux sont pratiquées en laboratoire et fournissent des informations qualitatives et quantitatives relatives à la composition des échantillons prélevés sur le terrain ainsi que des données écotoxicologiques.

Sans remettre en cause l'intérêt de telles techniques, elles n'en demeurent pas moins inadaptées à une surveillance sur site en continu et en temps réel. L'instrumentation des milieux sensibles nécessite des outils de terrain fournissant une information rapide en ligne. Ces systèmes d'alarme précoce doivent répondre à des exigences particulières présentées dans le Tableau 13.

| Principales caractéristiques d'un outil d'alarme |
|---|
| Robustesse |
| Facilité à utiliser et mettre en œuvre |
| Miniaturisable et automatisable |
| Coût limité |
| Informations qualitatives : identification de familles de polluants |
| Intégration de la biodisponibilité, des effets synergiques et/ou antagonistes des polluants |

Tableau 13 : Principales caractéristiques d'un outil d'alarme pour le contrôle environnemental

Les biocapteurs apparaissent justement comme des instruments capables de répondre à ces exigences. D'une manière générale, leur utilisation est simple et ils peuvent facilement être employés *in situ* pour des mesures en temps réel. Les capteurs électrochimiques (ampérométrique, conductimétrique, ISFET) sont d'ailleurs particulièrement adaptés à cet usage car ils sont robustes, miniaturisés et peu coûteux à fabriquer.

Les recherches actuelles tendent à optimiser la sensibilité des biocapteurs en fonction du choix du couple transducteur-biorécepteur. En effet, même si leurs seuils de détection restent

souvent plus élevés que ceux des techniques d'analyses chimiques, ils ont néanmoins l'avantage de répondre rapidement (Exposition + mesure : moins de 60 minutes [61 , 84, 90 , 91]) et spécifiquement à certains polluants.

Un grand nombre de travaux menés jusqu'à présent sur les biocapteurs utilisent des enzymes pures. La possibilité de détecter des molécules de nature différente se heurte alors au nombre restreint d'enzymes commercialement disponibles. En utilisant des cellules entières comme biorécepteurs, leurs diverses enzymes membranaires sont facilement accessibles et peuvent être sollicitées dans leur environnement naturel.

En outre, l'utilisation de cellules entières comme biorécepteurs signifie que la réponse des biocapteurs dépendra non seulement de la biodisponibilité des substances mais également des effets synergiques ou antagonistes des solutions complexes ainsi que de la sensibilité des organismes aux différentes substances chimiques.

3 Les biocapteurs électrochimiques à cellules algales

Dans le paragraphe 1.2.1.2, l'importance des microalgues planctoniques dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques a été soulignée. Leur sensibilité aux polluants (cf. paragraphe 1.3.2) les rend particulièrement intéressantes comme bioindicateurs dans des bioessais normalisés (tests de croissance) ou non (tests sur la fluorescence chlorophyllienne, sur les activités enzymatiques...).

Le développement de biocapteurs à cellules algales s'appuie justement sur les recherches axées sur les bioessais permettant la détection des perturbations de certaines activités enzymatiques de *Chlorella vulgaris* en présence de xénobiotiques [20, 51].

3.1 Présentation de *Chlorella vulgaris*

La Figure 15 présente la microalgue *Chlorella vulgaris* qui a la particularité d'être ubiquiste des milieux dulçaquicoles.

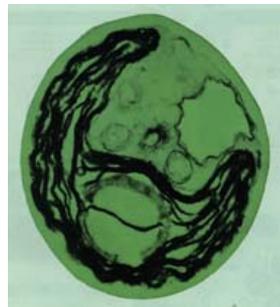


Figure 15 : Microalgue *Chlorella vulgaris*

Cette microalgue a un mode de reproduction asexuée, la cellule-mère se divisant en quatre spores qui s'échappent et germent pour donner un organisme identique à celui qui les a produit. Dans une culture en batch, la croissance de *Chlorella vulgaris* connaît trois phases successives : une phase de latence (1 à 2 jours) suivie d'une phase de croissance exponentielle avec une multiplication cellulaire rapide (environ 7 jours) puis une phase de relative stabilité avec une croissance ralentie jusqu'à épuisement des nutriments du milieu [21].

Les caractéristiques morphologiques de *Chlorella vulgaris* sont regroupées dans le Tableau 14.

| | |
|--------------------------------|--|
| Groupe taxonomique | Chlorococcales |
| Dimensions | < 10µm de forme sphérique (observation au microscope) |
| Membrane | Membrane plasmique bi-couche lipidique |
| Composition de la paroi | Paroi cellulosique (résistance mécanique) [92, 93] : Glucosamine Sucres neutres Acides uroniques Protéines Divers |

Tableau 14 : Données sur la micro-algue *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris possède, entre autre, deux familles d'enzymes particulièrement intéressantes, les phosphatases et les estérases. De précédents travaux ont confirmé la localisation membranaire de certaines de ces phosphatases et estérases. Ainsi, Brandes (1956) a montré que certaines enzymes phosphatases sont situées à la surface de *Chlorella vulgaris* [94]. Les travaux de Barthet (2003) ont, quant à eux, conclu à l'existence d'estérases membranaires [51]. Cette localisation est particulièrement intéressante puisqu'elle permet des réactions enzymatiques rapides (il n'est en

effet pas nécessaire que le substrat diffuse à l'intérieur de la cellule). Dans le cadre de la mise au point de bioessais ou de biocapteurs basés sur la détection de ces activités enzymatiques, cette caractéristique permet d'utiliser des transducteurs électrochimiques ou une fibre optique.

3.2 Les activités phosphatase alcaline et estérase chez les microalgues aquatiques

3.2.1 L'activité phosphatases alcaline

3.2.1.1 Généralités sur les phosphatases

Les phosphatases sont des enzymes qui ont pour fonction d'hydrolyser les phosphomonoesters pour donner du phosphate inorganique et un alcool. Plusieurs molécules phosphatées peuvent jouer le rôle de substrat mais les plus couramment utilisées sont le paranitrophényl-phosphate (pNPP) et la méthylumbelliféryl-phosphate (MUP). La Figure 16 illustre ainsi la réaction enzymatique de la phosphatase avec le pNPP comme substrat.

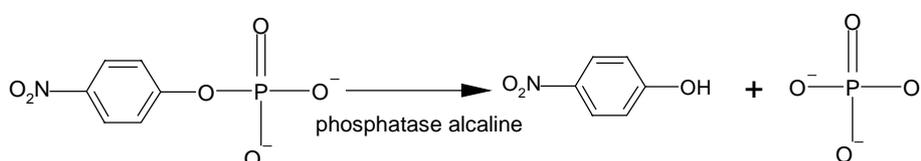


Figure 16 : Réaction enzymatique de la phosphatase alcaline avec le pNPP comme substrat

Les phosphatases sont des enzymes présentes dans tous les organismes. Chez les végétaux tels que les algues, leur rôle est d'autant plus essentiel que le phosphore est un nutriment indispensable à leur croissance. Ainsi, pour faire face à de possibles périodes de carence, les microalgues gèrent leurs stocks en phosphore grâce à leurs phosphatases. Ces enzymes permettent d'hydrolyser les molécules phosphorées pour libérer l'orthophosphate, qui est la forme du phosphore de plus faible encombrement stérique. Celui-ci peut ensuite diffuser de façon passive à travers la membrane cellulaire de manière à constituer des stocks intracellulaires.

3.2.1.2 L'activité phosphatase alcaline

Chez les microalgues, trois types de phosphatases, acides, neutres ou alcalines peuvent exister selon le pH. Cette étude s'est toutefois exclusivement intéressée à l'**activité phosphatase alcaline (APA)** de *Chlorella vulgaris*. De précédents travaux ont notamment montré que, chez *Chlorella vulgaris*, après une période de 21 jours de carence en phosphore, l'activité phosphatase alcaline était maximale et stable pendant un mois [20]. Cette stabilité sera particulièrement intéressante pour le développement des biocapteurs.

Certains cations sont également particulièrement importants puisqu'ils jouent le rôle d'ions activateurs. Mg^{2+} permet ainsi de stabiliser l'enzyme dans sa conformation la plus active [95, 96].

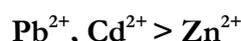
Des études sur la phosphatase alcaline du lait ont montré que Zn^{2+} pouvait prendre la place de Mg^{2+} [95] comme ion activateur. Toutefois, Zn^{2+} peut également devenir inhibiteur à des concentrations trop élevées [88]. D'autres ions métalliques sont également connus pour inhiber les phosphatases alcalines (cf. paragraphe 3.2.1.3). Par contre, des travaux ont montré que les pesticides tels que l'atrazine, le diuron, le lindane ou le paraquat n'avait aucun effet sur la phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* [20, 97].

3.2.1.3 Effets des métaux lourds sur la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est connue pour être inhibée en présence de métaux lourds. De nombreux travaux portant sur des enzymes purifiées d'origine animale ou bactérienne l'ont prouvé [98-101]. Toutefois, en comparant les études, il apparaît clairement que le degré d'inhibition varie selon l'origine de l'enzyme.

En ce qui concerne les microalgues telles que *Chlorella vulgaris*, peu de résultats sont disponibles puisque l'utilisation de cellules entières pour des mesures d'activités enzymatiques est relativement récente. Quelques études seulement ont donc été publiées.

Un classement des métaux lourds (Cd, Zn, et Pb) en fonction de leur pouvoir inhibiteur sur la phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* a toutefois pu être établi à partir des travaux de Durrieu *et al.* (2003) :



Remarques :

1. $M_1^{n+} > M_2^{n+}$ signifie que M_1 a un pouvoir inhibiteur supérieur à M_2 .
2. Les inhibitions de l'activité phosphatase alcaline pour Pb^{2+} et Cd^{2+} n'étaient pas significativement différentes pour classer les deux ions métalliques

Sur des cellules entières, les mécanismes d'inhibition sont néanmoins difficiles à expliquer, les métaux lourds pouvant agir directement sur le site actif de l'enzyme mais également sur des mécanismes tels que la synthèse protéique... [97].

Au niveau du site actif de la phosphatase alcaline, il existe, en effet, un certain nombre de fonctions pouvant fixer les métaux comme, par exemple, les groupements carboxyles des acides aminés Asparagine constitutifs [96, 102, 103].

La classification des métaux établie par Pearson selon leur « dureté » est présentée à la Figure 17 et permet de prédire les liaisons privilégiées pour une classe de métaux ainsi que les propriétés générales de ces complexes métalliques. Ainsi, les métaux de classe A, durs, forment essentiellement des complexes ioniques avec des ligands non polarisés alors que les métaux de classe B, mous, se lient de façon privilégiée avec des ligands mous polarisés tels que les fonctions SH. Par contre, les métaux frontières peuvent se lier indifféremment à des ligands durs ou mous [104].

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="background-color: #444; width: 20px; height: 10px; margin-right: 5px;"></div> classe A</div> <div style="background-color: #ccc; width: 20px; height: 10px; margin-right: 5px;"></div> classe B | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

Figure 17 : Distribution des métaux durs (A), mous (B) et frontières dans le tableau périodique (d'après Duffus, 2002)

Il est finalement intéressant de rapprocher cette classification des métaux de celle établie précédemment à partir des travaux sur la phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris*. On peut alors constater une corrélation entre le degré de dureté des métaux et leur toxicité. Les métaux mous Cd et Pb sont ainsi plus toxiques que Zn qui appartient aux métaux frontières.

3.2.2 Les activités estérases

3.2.2.1 Généralités sur les estérases

Les estérases ont pour fonction d'hydrolyser les liaisons ester des molécules (cf. Figure 18).

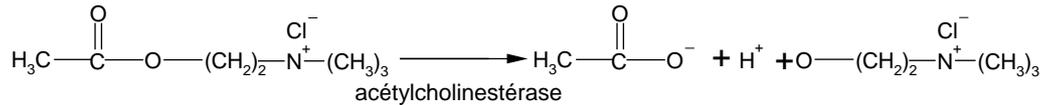


Figure 18 : Réaction enzymatique des cholinestérases avec l'AChCl comme substrat

Il existe de nombreuses estérases jouant des rôles divers dans le métabolisme : les carboxyles estérases, les acétyles estérases, les cholestérols estérases, les cholinestérases, ... Ces dernières se divisent en deux groupes, les acétylcholinestérases (également appelées vraies cholinestérases ou cholines estérases I) et les butyrylcholinestérases (appartenant au groupe des pseudocholinestérases ou cholines estérases II) qui diffèrent uniquement au niveau de trois domaines de leur conformation [105, 106].

Les cholinestérases sont présentes chez tous les organismes supérieurs et jouent le rôle de neurotransmetteurs [107-109]. Des études ont néanmoins mis en évidence l'existence de cholinestérases non neuronales chez les plantes en général [110]. Wessler *et al.* (2001) suggèrent que celles-ci sont impliquées dans la photosynthèse et la régulation de l'absorption de l'eau [108]. Chez les microalgues en particulier, Gupta *et al.* (1998) ont montré la présence d'acétylcholinestérases dans des espèces marines [111]. La plupart des études basées sur les microalgues ne portent toutefois que sur des mesures globales d'activité estérase chez *Selenastrum capricornutum* [112], *Pseudokirchneriella subcapitata* [113] et *Chlorella vulgaris* [51].

3.2.2.2 Paramètres influençant les activités estérases

Le pH optimal pour la mesure de l'activité enzymatique varie selon les substrats mais aussi selon le type d'estérase considérée. Dans les nombreuses études disponibles, les pH varient de 5,4 (tampon citrate) à 7 voire 8,5 (tampon phosphate ou TRIS-HCl) [51, 110, 111, 113].

Les ions Mg^{2+} peuvent également être utilisés en tant qu'ions activateurs [51]. Toutefois, de nombreuses études sur les cholinestérases ont montré que la mesure de l'activité enzymatique est possible sans ions Mg^{2+} [38, 113].

Les estérases sont également connues pour être inhibées en présence de carbamates et d'organophosphorés (cf. 3.2.2.3).

Enfin, la conductivité du milieu est également un paramètre important puisque Regel *et al.* (2002) ont montré que lorsque, celle-ci augmentait, l'activité estérase de *Selenastrum capricornutum* était inhibée [112].

3.2.2.3 Effets des insecticides carbamates et organophosphorés sur les estérases

De nombreux travaux sur les cholinestérases purifiées portent sur leur inhibition en présence d'organophosphorés et de carbamates [114]. Le mécanisme d'action de ces insecticides a pu également être établi. En effet, à cause de leur ressemblance avec les substrats naturels, les organophosphorés et les carbamates causent une phosphorylation de la sérine active du site catalytique inhibant par la même l'activité enzymatique (cf. Figure 19).

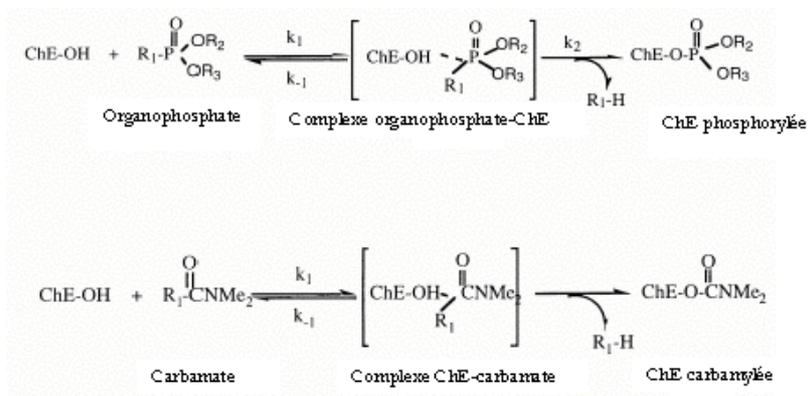


Figure 19 : Mécanismes d'inhibition des cholinestérases par les organophosphorés et les carbamates (d'après Nistor *et al.*, 1999)

L'inhibition des estérases algales a, pour sa part, fait l'objet de peu d'études. Bierkens *et al.* (1998) ont ainsi montré que l'activité estérase de *Raphidocelis subcapitata* était particulièrement sensible au phénol et au trifluralin présents dans les percolats de sols contaminés [113].

Chlorella vulgaris est donc une microalgue particulièrement intéressante sur laquelle il est possible de détecter les activités phosphatase alcaline et estérase ainsi que leurs perturbations en présence de certains xénobiotiques. Il semblait alors intéressant d'utiliser ces cellules algales comme biorécepteurs pour développer des biocapteurs électrochimiques.

3.3 Les transducteurs électrochimiques pour la détection enzymatique

Historiquement, les capteurs électrochimiques ont permis la mise au point, au début des années 1970, des tous premiers biocapteurs destinés à des applications médicales. A ce jour, ils demeurent les transducteurs les plus couramment employés.

3.3.1 Les capteurs conductimétriques

L'utilisation de la conductimétrie pour la détection des activités enzymatiques remonte aux années 1960.

Dans ces premières études, l'emploi d'une seule électrode de mesure a permis de suivre, après injection du substrat, les modifications de conductivité d'une solution contenant une enzyme. La principale enzyme étudiée est l'uréase [115, 116] mais Lawrence et Moores (1972) se sont intéressés à d'autres familles d'enzymes comme les déaminases, les amidases, les oxydases, ... [117].

La détection conductimétrique est justifiée lorsque, au cours d'une réaction enzymatique, des espèces ioniques sont générées (par exemple pour les amidases), des charges opposées se séparent

(par exemple pour les décarboxylases), des protons migrent (par exemple pour les **estérases**), des modifications surviennent dans le degré d'association des espèces ioniques à la suite d'une chélation (par exemple pour les kinases) ou dans la taille des groupes porteurs de charge (par exemple pour les **phosphatases**). A cela s'ajoute le possible changement de mobilité des différentes espèces en solution qui modifie la conductivité.

La mesure différentielle de la résistance électrique de solutions d'urée lors de l'hydrolyse enzymatique a permis d'améliorer les performances de cette technique [118]. En effet, pour fixer le pH optimal des activités enzymatiques, il est nécessaire d'utiliser des quantités d'électrolytes importantes, la variation de la résistance électrique est alors faible par rapport à la valeur initiale de la résistance de la solution. En utilisant deux sondes, une électrode pour la mesure et une électrode servant de référence, il est alors possible de déterminer la variation de la résistance électrique due à la production d'ammonium lors de la décomposition de l'urée. Cette mesure différentielle présente de nombreux avantages, elle permet notamment d'améliorer la sensibilité des mesures tout en s'affranchissant de l'influence de la température.

A la fin des années 1980, le développement de transducteurs conductimétriques miniaturisés a permis de suivre les modifications de conductivité survenant lors de la réaction enzymatique pour des enzymes immobilisées sur l'électrode de mesure. A la différence des mesures conductimétriques présentées précédemment et qui manquaient de spécificité, ces capteurs permettent de suivre des variations locales de conductivité au niveau des surfaces sensibles (une surface active sur laquelle les enzymes sont immobilisées et une surface de référence).

Différentes technologies ont été développées pour fabriquer ces microélectrodes. Watson *et al.* (1987-88) ont notamment mis au point des électrodes interdigitées : un mélange multi-métal (Ti, Pt, Au) est déposé sous vide sur un substrat en SiO₂ [119]. Ce procédé a été repris et adapté par la suite dans de nombreux travaux dont certains ont porté sur la caractérisation des diverses électrodes. Dzyadevych *et al.* (1994) ont ainsi montré que parmi les électrodes en Au, Ni, Cu et Cr, ces dernières n'étaient pas adaptées pour développer des capteurs enzymatiques du fait de leur résistance intrinsèque trop élevée [60, 120].



Figure 20 : Photo d'un microcapteur conductimétrique

D'une manière générale, les combinaisons entre la nature du substrat et celles des électrodes sont nombreuses, on trouve ainsi, selon les procédés de fabrication des électrodes en platine ou en or imprimées sur un substrat en céramique (AlO₃) [58, 60, 83, 121, 122]. Le pyrex peut être également utilisé comme substrat pour déposer des électrodes en platine.

De tels capteurs sont fabriqués à l'Institute of Chemo- and Biosensorics de Munster en Allemagne : deux paires d'électrodes interdigitées (cf. Figure 20) en platine de 150 nm d'épaisseur sont déposées sur un substrat en Pyrex. Une couche intermédiaire en Ti de 50 nm d'épaisseur est utilisée pour améliorer l'adhésion du Pt sur le substrat. La partie centrale du capteur est passivée par une couche de Si₃N₄ pour délimiter la zone de mesure des électrodes. La largeur des pattes ainsi que la distance entre elles est de 10 μm alors que leur longueur est d'environ 1 mm, ce qui signifie que chaque électrode a une surface sensible d'environ 1 mm² [38, 41, 121].

Jusqu'à très récemment, les biocapteurs conductimétriques visaient des applications biomédicales telles que la mesure du glucose ou de l'urée dans des sérums physiologiques (sang, urine) [119, 123] mais des recherches récentes montrent qu'ils sont parfaitement adaptés au contrôle environnemental (cf. paragraphe 2.4.5).

3.3.2 Les capteurs potentiométriques ISFET

Les premiers travaux sur les capteurs ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) remontent aux années 1970 [30]. Ces capteurs apparaissaient alors comme des outils prometteurs pour la mesure de paramètres électrophysiologiques.

Leur fonctionnement repose sur le principe du transistor à effet de champ FET (Field Effect Transistor). Leur structure générale est constituée d'une couche d'oxyde thermique (SiO_2 isolant) déposé sur un semi-conducteur (silicium) dopé (n ou p). La polarisation de ce semi-conducteur par rapport à l'électrode de référence est assurée par la solution conductrice dans laquelle le capteur est plongé [124].

L'utilisation de tels capteurs afin de doser des ions en solution nécessite le dépôt d'un film mince sensible à un ion spécifique. Dans les cas de capteurs sensibles aux ions H^+ , plusieurs types de films peuvent être utilisés notamment SiO_2 , Al_2O_3 , Ta_2O_5 ou Si_3N_4 . Dans le cas le plus simple où les ions H^+ interagissent avec les sites silanols SiOH en surface de la silice, la Figure 21 présente les différentes interactions qui peuvent alors avoir lieu. Celles-ci changent les propriétés de l'interface isolant-électrolyte et modifient par conséquent le potentiel de surface.

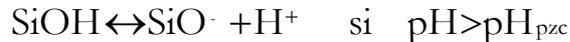


Figure 21 : Interactions entre H^+ et SiOH

La membrane sensible de type SiO_2 présente néanmoins des inconvénients, sa réponse au pH étant subnerstienne et sa durée de vie limitée. C'est pour cette raison que les films à base de Si_3N_4 sont privilégiés puisque leur réponse au pH est nerstienne et leur durée de vie satisfaisante [28, 124].

De tels capteurs sensibles aux ions H^+ sont donc appelés pH-FET et les premiers travaux avec ce type de transducteurs ont été menés par Van der Schoot [30]. Une de leurs applications possibles est la détection de réactions enzymatiques. Les capteurs sont alors appelés ENFET (Enzyme Field Effect Transistor) puisque une membrane active contenant des enzymes est déposée sur l'électrode de mesure. Or, lors de certaines réactions enzymatiques, des ions H^+ ou OH^- peuvent être générés puis détectés par ces capteurs ENFET [39, 90, 125, 126].

Plus récemment, les capteurs ISFET ont été employés pour suivre des paramètres physiologiques tels que l'acidification extracellulaire de cultures de cellules [42, 43].

Les capteurs ISFET (cf. Figure 22) utilisés au cours de ce travail ont été développés au Laboratoire d'Electronique Biomoléculaire de l'Institut de Biologie et Génétique Moléculaire, Académie Nationale des Sciences d'Ukraine [127]. La spécificité de ces capteurs réside au niveau des cellules de détection qui permettent de mesurer le pH grâce à des transistors Si_3N_4 -ISFET. Leur sensibilité pour une gamme de pH de 2 à 10 est de 52-54 mV/pH. La présence d'une électrode de référence sur le même capteur permet, quant à elle, des mesures différentielles.

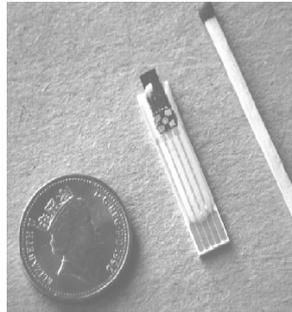


Figure 22 : Capteur ISFET

3.4 Conclusion

Jusqu'à présent, l'utilisation de microalgues *Chlorella vulgaris* comme biorécepteurs a généralement été envisagée pour suivre la photosynthèse et ses perturbations en présence de polluants. Selon les cas, des biocapteurs optiques pour la détection de la fluorescence chlorophyllienne [53] ou des biocapteurs ampérométriques [85] ont été développés. La mesure de certaines de leurs activités enzymatiques afin de mettre au point de nouveaux indicateurs de pollution est, pour sa part, l'objet d'études plus récentes [51, 52].

La détection électrochimique offre, quant à elle, des avantages certains pour mettre au point des outils d'alarme *in situ*. Elle est notamment particulièrement adaptée à la détection d'activités enzymatiques (cf. paragraphe 3.3).

Or, dans le paragraphe 2.4.3.2, l'intérêt d'utiliser des cellules entières comme biorécepteurs a été souligné puisque celles-ci confèrent aux biocapteurs une bonne représentativité écologique. De plus, en s'intéressant aux phosphatases alcalines et estérases membranaires de *Chlorella vulgaris* qui sont perturbées par des familles de polluants différentes (respectivement les métaux lourds et certains organophosphorés et carbamates), des biocapteurs à cellules algales bi-enzymatiques permettraient de distinguer les xénobiotiques selon la réponse du biocapteur pour chaque enzyme.

Il semblait alors intéressant d'employer les avantages des transducteurs électrochimiques pour développer des biocapteurs à cellules algales permettant le suivi, avec un même capteur, d'activités enzymatiques et de leurs perturbations en présence de polluants.

Ce travail s'inscrit au sein d'une méthodologie globale d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques (Figure 23) intégrant les biocapteurs électrochimiques à cellules algales présentés dans cette étude en tant qu'outils d'alarme, les analyses chimiques et les bioessais de laboratoire

Les biocapteurs implantés sur site permettraient le contrôle en continu de la qualité des eaux. Toute perturbation de leur signal déclencherait une alerte et une campagne de prélèvements pour des analyses plus poussées en laboratoire.

Les analyses chimiques seraient alors simplifiées puisque la recherche des contaminants chimiques pourrait être orientée en fonction des perturbations observées avec les biocapteurs. Quant aux bioessais écotoxicologiques, ils permettraient d'évaluer les impacts de la pollution sur les différents compartiments trophiques ainsi que sur le fonctionnement global de l'écosystème.

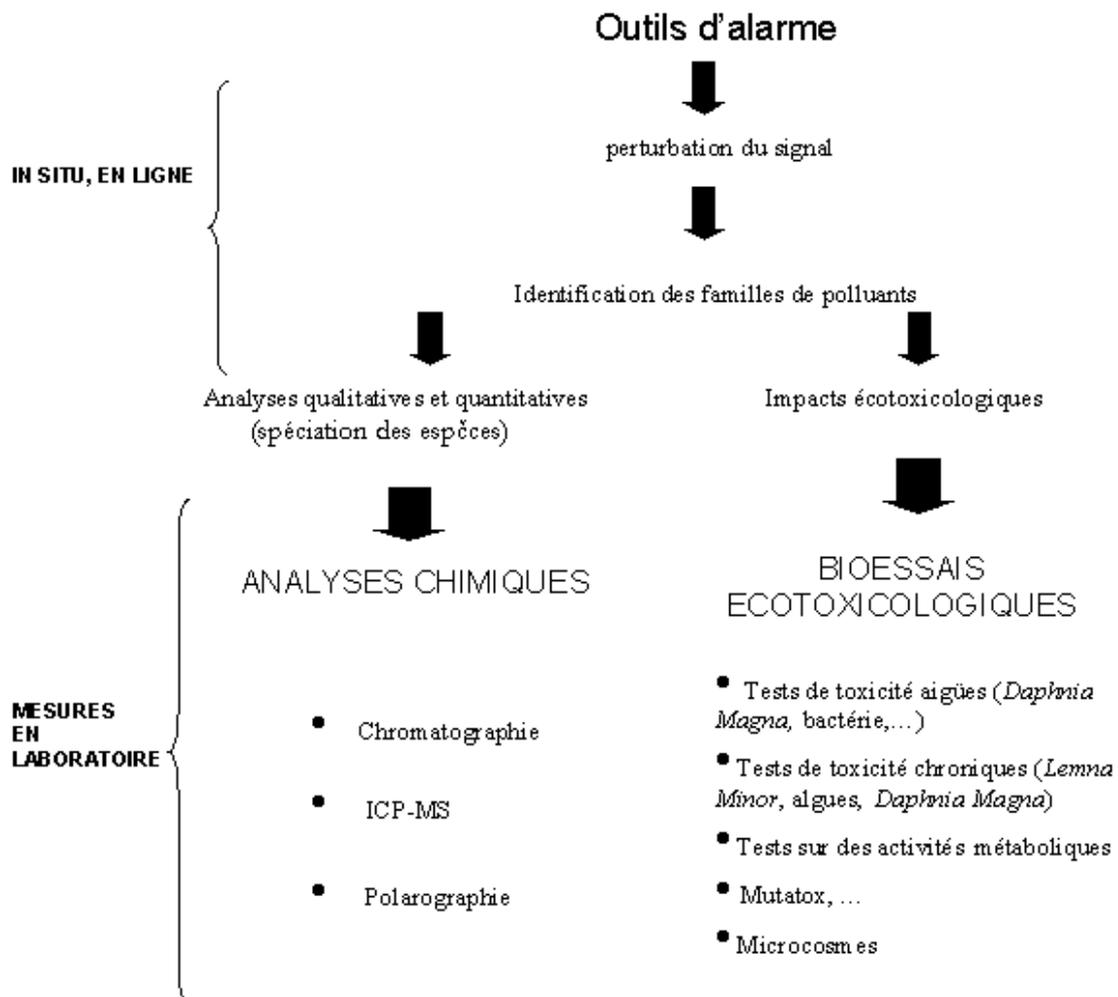


Figure 23 Méthodologie pour le contrôle de la qualité des milieux aquatiques

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

4 Réactifs utilisés

Le Tableau 15 regroupe tous les produits utilisés au cours de cette étude en fonction de leur utilisation.

| | | |
|---|---|----------------------------|
| Pour les milieux de cultures | Milieu AFNOR LC (annexe 1) | Merck |
| | Milieu ISO : norme AFNOR T90-375 (annexe 2) | |
| Substrats pour les mesures de la phosphatase alcaline | Paranitrophénylphosphate (pNPP) | Sigma-Aldrich |
| | Paraaminophénylphosphate (pAPP) | Universal Sensors, Irlande |
| | Méthylumbelliférylphosphate (MUP) | Sigma-Aldrich |
| Substrats pour les mesures des estérases | Pour les mesures d'activités cholinestérases : Chlorure d'acétylcholine (AChCl) Chlorure de butyrylcholine (BuChCl) | Sigma-Aldrich |
| | Pour les mesures d'activité estérase globale : Diacétate de fluorescéine (FDA) | |
| Milieu réactionnel pour les mesures d'activité enzymatique | Pour l'activité phosphatase alcaline : Tris-HCl, MgCl ₂ | Sigma-Aldrich |
| | Pour l'activité cholinestérase : KH ₂ PO ₄ ou diéthanolamine (DEA) +KCl | |
| | Pour l'activité estérase globale : Tampon citrate, MgCl ₂ | |
| Essais de toxicité | Sels de Cd(NO ₃) ₂ Sels de ZnSO ₄ Sels de Pb(NO ₃) ₂ | Sigma-Aldrich |
| | Méthyl parathion (MPt) Méthyl paraoxon (MPx) Carbofuran (Cf) | |
| Membranes | Albumine de sérum bovin (BSA) | Sigma-Aldrich |
| | Glutaraldéhyde à 25% (GA_{vap}) | |
| | Acide sulfochromique | |
| | Alginate | Fluka |
| | CaCl ₂ | |

Tableau 15 : Récapitulatif de tous les réactifs nécessaires à cette étude

5 Culture de l'algue *Chlorella vulgaris*

5.1 Mise en culture des algues en milieu AFNOR LC

5.1.1 Stérilisation

Les milieux de culture ainsi que la vaisselle sont stérilisés par autoclavage à 120°C sous une pression de 1,5 bar pendant 20 minutes.

Les manipulations sont effectuées avec du matériel stérile à usage unique sous une hotte à flux laminaire dont l'enceinte est stérilisée par un rayonnement ultraviolet.

5.1.2 Ensemencement

Les microalgues mises en cultures appartiennent à la souche *Chlorella Vulgaris* (CCAP 211/12).

Ces algues sont cultivées en milieu AFNOR LC (Lefèvre-Czarda) dont la composition est donnée en annexe 1 (cf. Annexe 1). Un repiquage régulier tous les dix jours est réalisé dans le milieu de culture autoclavé en erlenmeyers bouchés par du coton cardé, à raison de 1 mL de solution mère pour 50 mL de milieu de culture.

Les erlens sont ensuite placés sur un agitateur rotatif (100 rpm) afin d'éviter la décantation des cellules algales et soumis à un cycle nycthéral de 16 heures d'éclairage à 5000 lux et de 8 heures d'obscurité dans une chambre thermostatée à 21°C.

5.2 Préconditionnement des algues en milieu AFNOR sans phosphate

Pour posséder un niveau d'activité phosphatase alcaline satisfaisant, les algues doivent épuiser leur réserve interne en phosphate [52].

Pour cela, les cultures ensemencées en milieu AFNOR LC et maintenues en aération en chambre de culture permettent d'obtenir des algues dans leur phase de croissance exponentielle (environ 4 jours après le repiquage). Ces algues sont alors centrifugées (4000 tours/minutes pendant 10 minutes) et remises en suspension dans un milieu AFNOR LC sans phosphate (AFNOR-P).

L'activité phosphatase alcaline maximale est obtenue, dans le cas de *Chlorella vulgaris*, après 21 jours de preconditionnement, en chambre de culture et en bullage, dans le milieu de culture sans phosphate [20]. Les algues sont ensuite conservées pendant un mois à 4°C et à l'obscurité sans baisse notable de leur activité phosphatase alcaline.

5.3 Mise en culture des algues en milieu ISO

Des bioessais ont montré que des mesures d'activité estérase pouvaient être réalisées sur des algues *Chlorella vulgaris* cultivées en milieu ISO NFT 90-375 (cf. Annexe 2) [51].

Avant les repiquages, la vaisselle est préalablement stérilisée. Les algues sont ensuite repiquées dans la solution ISO 5 jours avant les expérimentations. Elles sont alors mises en agitation (100 rpm) et éclairées sous des cycles nycthéraux de 16 heures d'éclairage à 5000 lux et de 8 heures d'obscurité à une température de 21°C.

5.4 Comptage des cellules algales

Les comptages sont réalisés au microscope avec des cellules de THOMA. Les concentrations algales des cultures de *Chlorella vulgaris* utilisées dans cette étude varient de 1 à $7 \cdot 10^7$ cellules/ml.

La masse sèche des cellules algales est déterminée en filtrant 10 ml de solution algale sur un filtre en microfibrilles de verre GF/C (à $1,2 \mu\text{m}$) préalablement pesé. Après 2 heures dans une étuve à 90°C (+ 30 minutes dans un dessiccateur), le filtre est à nouveau pesé ce qui permet de calculer la masse sèche algale en g/l.

6 Protocoles pour la mise au point des capteurs

6.1 Biofonctionnalisation des capteurs

L'immobilisation des cellules algales *Chlorella vulgaris* constitue la première étape dans la réalisation des capteurs. Deux membranes sont nécessaires pour les mesures différentielles, l'une est active, l'autre sert de référence.

6.1.1 Membranes à base d'albumine de sérum bovin (BSA)

Le protocole de fabrication des membranes à base de BSA a été mis au point à partir des travaux effectués par Dzyadevych *et al.* (1994) sur les capteurs enzymatiques [60, 120-122].

Le mélange pour la **membrane active** est composé de 100 µl de solution algale et de 5 ou 10 mg de BSA.

Pour la **membrane de référence**, plusieurs mélanges ont été testés :

- BSA/solution algale chauffée à 90°C pendant 15 minutes : le chauffage tue les algues [128] et inhibe les activités enzymatiques [112, 129].
- BSA/solution algale en milieu AFNOR : les algues en milieu AFNOR ne permettant pas de mesurer l'APA, elles peuvent jouer le rôle de référence pour ces mesures.
- BSA/milieu AFNOR-P sans algues dites membranes « blanches »

Le mélange pour la membrane active ou la membrane de référence est ensuite déposé sur l'électrode correspondante. Les capteurs sont alors placés au contact de vapeurs de glutaraldéhyde (GA_{vap}) pendant une durée allant de 10 à 30 minutes afin de permettre la réticulation des membranes.

La dernière étape consiste à laisser les capteurs sécher à l'air libre entre 15 et 30 minutes avant de les utiliser pour les mesures.

6.1.2 Membranes à base d'alginate de calcium

L'utilisation de billes d'alginate contenant des algues est courante et a servi de point de départ à la mise au point de ce protocole [77].

Dans ce cas, le mélange pour la **membrane active** contient 100 µl de solution algale et 5 mg d'alginate.

La **membrane de référence** est, quant à elle, réalisée à partir d'un mélange alginate (5 mg) et 100 µl de solution algale chauffée à 90°C pendant 15 minutes.

Le dépôt des membranes à base d'alginate se fait en plusieurs étapes.

Tout d'abord, la surface des électrodes de mesure est nettoyée avec de l'acide sulfochromique pour une meilleure adhésion des membranes. Ensuite, une première couche du mélange à base d'alginate est déposée sur l'électrode correspondante (active ou de référence) puis mise à sécher à 4°C pendant 30 à 60 minutes. Une seconde couche de mélange est à nouveau déposée sur les capteurs puis ceux-ci sont plongés dans une solution de $CaCl_2$ à 0,1 M pendant une durée de 8 minutes maximum.

6.1.3 Observation des membranes au microscope

Pour observer les membranes déposées sur les capteurs, un microscope optique a été utilisé à un grossissement $\times 400$.

Une étude en microscopie à force atomique (AFM) réalisée par J. Thomazi Coral à l'Ecole des Mines de Saint-Etienne a permis de compléter les observations au microscope optique [130].

Le principe de l'AFM repose sur la mesure des forces d'interaction entre une pointe ultrafine et les atomes de la surface d'un échantillon. Le balayage de la pointe sur l'échantillon permet alors d'obtenir des images morphologiques tridimensionnelles. En effet, comme la pointe est fixée sur une lame-ressort très souple, il est possible de suivre la flexion élastique qu'elle subit selon le relief et la structure de la surface. La déflexion de la lame est ensuite enregistrée en fonction des coordonnées du point examiné et traité à l'aide de logiciels d'analyses d'images.

La position de la pointe par rapport à la surface détermine le mode d'utilisation de l'AFM. Dans cette étude, le **mode contact** (la pointe est en contact avec l'échantillon) a été retenu : les informations obtenues sont représentatives des forces de répulsion ou d'attraction à courte portée (quelques nm) entre la pointe et la surface de l'échantillon. Pour les images topographiques, deux modes d'imagerie sont alors possibles. Le choix s'est porté ici sur le *mode de déflexion constante ou à force constante* : en modulant la tension verticale du balayage piézo-électrique, il est possible de maintenir la force s'exerçant sur la lame qui est amenée au contact de la surface à analyser, celle-ci se déplaçant selon des mouvements verticaux (en fonction du relief). Un *mode force ou à hauteur constante* peut également être utilisé : dans ce cas, c'est la hauteur de l'échantillon qui est maintenue constante tandis que la déflexion de la lame est enregistrée.

Le **mode résonant** (Tapping) est particulièrement adapté pour les échantillons mous et fragiles. La pointe est alors en contact par intermittence avec la surface à analyser, les forces exercées seront donc plus faibles qu'en mode contact. Il est également possible avec ce mode de maintenir la force exercée sur la pointe tout en déplaçant l'échantillon afin d'obtenir des images tridimensionnelles.

L'appareil utilisé ici est le Multimode Scanning Probe Microscope de Digital Instrument® piloté par le logiciel Nanoscope-IIIa.

6.2 Mesure des activités enzymatiques avec les biocapteurs

Il est important de prendre en compte le fait que chaque biocapteur donne des signaux d'amplitude différente. En effet, la technique de dépôt manuel des membranes ne permet pas de contrôler précisément la quantité d'algues et donc d'enzymes contenues dans les membranes.

6.2.1 Appareils de mesure

6.2.1.1 Instrumentation pour les mesures conductimétriques

Les mesures ont été réalisées avec des capteurs conductimétriques fabriqués à l'Institute of Chemo-and Biosensorics de Munster en Allemagne (cf. 3.3.1) relié à un conductimètre mis au point au Laboratoire de Biologie Moléculaire de Kiev en Ukraine et à une table traçante pour faciliter le suivi des variations du signal au cours du temps.

Ce conductimètre permet de réaliser une mesure différentielle entre l'électrode de travail (sur laquelle est déposée la membrane active) et l'électrode de référence (sur laquelle est déposée la membrane de référence).

Grâce à un générateur intégré, un signal d'excitation sinusoïdal de fréquence 10 kHz peut être appliqué aux deux électrodes excitatrices. Les signaux de sortie mesurés au niveau des

électrodes réceptrices dépendent, quant à eux, de l'impédance du système. Dans le domaine des hautes fréquences utilisé ici, l'impédance réelle est alors égale à la résistance de la solution ce qui permet d'accéder à la conductance (exprimée en Siemens).

Les signaux mesurés sont traités par la technique du lock-in, c'est-à-dire filtrés à l'aide d'une bande passante faible centrée sur la fréquence d'excitation puis transmis à la détection synchrone qui fournit la différence de conductivité entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.

6.2.1.2 Instrumentation pour les mesures avec capteurs potentiométriques

Les mesures avec les capteurs potentiométriques sont réalisées avec un amplificateur ISFET fabriqué par l'Institut de Microbiologie de NeufChâtel en Suisse fonctionnant sous un courant continu de drain $I_D = 100 \mu\text{A}$ et une tension de drain de 1V (cf. 3.3.2).

Les capteurs potentiométriques utilisés ici permettent de suivre les variations de potentiel au niveau de l'électrode de mesure par rapport à l'électrode de référence. Un amplificateur différentiel permet finalement d'obtenir la variation de potentiel entre les deux électrodes. Dans le cas des capteurs ISFET, cette différence de potentiel n'est alors fonction que du pH.

6.2.2 Protocole pour la mesure de l'activité phosphatase alcaline

6.2.2.1 Obtention de la cinétique enzymatique

La mesure de l'activité phosphatase alcaline s'effectue dans un milieu réactionnel dont la composition est présentée dans le Tableau 16.

Il a été mis au point à partir des travaux de Badreddine (1996) et Béchêteille (2000) sur les mesures d'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* en bioessais utilisant le paranitrophényl-phosphate (pNPP) et la méthylumbelliféryl-phosphate (MUP) comme substrat [20, 131].

Avec le para-aminophényl-phosphate (pAPP) comme substrat, le milieu réactionnel a été défini à partir des recommandations du fournisseur du substrat (Universal Sensors, Irlande).

| | Volumes utilisés | Concentrations finales | | |
|--------------------------------|------------------------|--|--|-------------------------------------|
| Tampon | 50 μl | Tris-HCl (1 M, pH 8,5) : 10 mM | | DEA (1 M, pH 9,5) : 10 mM |
| MgCl₂ (10mM) | 500 μl | 1 mM | | 1 mM |
| KCl (0,5M) | | | | 50 mM |
| Substrat | 10 à 100 μl | pNPP (43 mM) 0,086 à 0,86 mM | MUP (20 μM) 2 à 20 μM | pAPP 1 à 10 mM |
| Eau Millipore | | qsp 5000 μl | | |

Tableau 16 : Composition du milieu réactionnel pour les mesures d'activité phosphatase alcaline avec des biocapteurs

Remarque : la concentration en Tris-HCl est 10 fois plus faible que celle utilisée en bioessais (cf. chapitre 7). En effet, pour détecter les variations de conductivité, il est nécessaire de limiter la force ionique du milieu réactionnel.

Le principe de la mesure permettant d'obtenir une cinétique enzymatique consiste à :

- Plonger le capteur dans le milieu réactionnel jusqu'à la stabilisation du signal pour obtenir sa valeur initiale notée **dSi**.
- Injecter un volume de substrat et après stabilisation, déterminer **dSf** et calculer la variation du signal **dS = (dSf-dSi)** après injection, en μS (capteurs conductimétriques) ou mV (capteurs ISFET).
- Rincer le capteur et suivre le même protocole que précédemment après avoir changé le milieu réactionnel pour réaliser une nouvelle mesure (Figure 24).

Les mesures sont effectuées sous agitation à température ambiante.

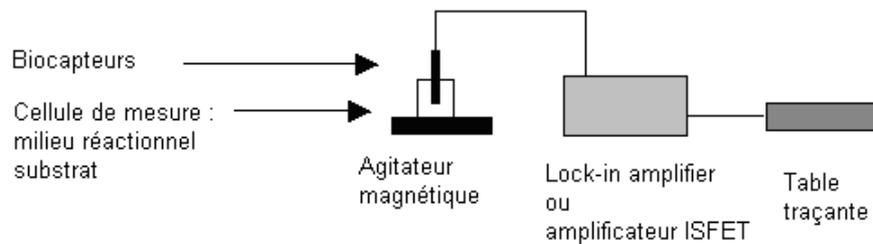


Figure 24 : Principe de la mesure avec les biocapteurs

6.2.2.2 Etude du vieillissement du capteur

Pour cette étude, des cinétiques enzymatiques sont réalisées tous les deux jours. Une mesure quotidienne du niveau d'activité pour une concentration de saturation (soit 0,86mM de pNPP) complète ces résultats.

La durée de cette expérience a été fixée à un mois car il a été montré en bioessai que l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* reste stable pendant un mois après préconditionnement dans le milieu sans phosphate si les solutions algales sont conservées à 4°C [20].

6.2.3 Protocole pour la mesure de l'activité estérase

Pour la détection de l'activité estérase, les substrats étudiés sont le chlorure d'acétylcholine (AChCl), le chlorure de butyrylcholine (BuChCl) et le diacétate de fluorescéine (FDA). Les deux premiers substrats sont utilisés pour la mesure des activités cholinestérases par des techniques électrochimiques alors que la FDA est le substrat privilégié pour la détection en fluorescence.

Le milieu réactionnel utilisé avec les substrats AChCl et BuChCl et proposé dans le Tableau 17 a été mis au point à partir de protocoles pour la mesure de l'activité cholinestérase avec des biocapteurs à enzymes pures [90, 132]. Ceux-ci utilisent classiquement le tampon KH_2PO_4 pour les mesures d'activité enzymatique. Quant au pH de 8, il a été fixé à partir des travaux de Gupta *et al.* (1998) sur les cholinestérases des microalgues marines [111].

Avec la FDA comme substrat, le protocole mis au point par Barthet (2003) a été suivi [51].

| | Volumes utilisés | Concentrations finales | |
|--|---|---|---|
| KH_2PO_4 (2,5 ou 5 mM, pH 8) | 4990 μl à 4900 μl | 2,5 mM ou 5 mM | |
| Tampon citrate (0,1 M, pH 5,4) | 500 μl | | 10 mM |
| MgCl_2 (10 mM) | 500 μl | | 1 mM |
| Substrat | 10 à 100 μl | AChCl (0,5M) ou BuChCl (0,5M) 1 à 10 mM | FDA (100μM) 0,5 à 5 μM |

Tableau 17 : Composition du milieu réactionnel pour la mesure de l'activité estérase avec les biocapteurs

La mesure s'effectue de la même manière que celle de l'activité phosphatase alcaline présentée au paragraphe 6.2.2.1.

6.3 Essais de toxicité basés sur l'inhibition des activités enzymatiques

6.3.1 Protocole de mesure

La première étape consiste à réaliser, pour une concentration en substrat déterminée, une mesure du signal dS_{avt} avant contact avec la solution à tester (cf. protocoles précédents aux paragraphes 6.2.2 et 6.2.3).

Ensuite, pour les **expositions prolongées**, le capteur est plongé dans la solution à tester pour des durées allant de 15 minutes à 240 minutes maximum. Il est ensuite rincé et une nouvelle mesure de dS_{ap} pour la même concentration de substrat est réalisée. Il est ainsi possible de calculer le taux d'activité résiduelle A_{res} par rapport à l'activité avant exposition (Équation 1).

$$A_{résiduelle} = 100 - 100 \times (dS_{avt} - dS_{ap}) / dS_{avt}$$

Équation 1 : Taux d'activité résiduelle des activités enzymatiques (en %)

Pour les **expositions directes**, le toxique est injecté dans le milieu réactionnel quelques secondes avant l'injection de substrat. Le temps de contact entre le toxique et les microalgues est alors de quelques minutes (correspondant à la durée nécessaire à la mesure).

Pour l'interprétation des taux d'activité résiduelle dans le chapitre IV, le taux d'inhibition est considéré comme significatif s'il est supérieur à 15% soit un taux d'activité résiduelle inférieur à 85%. Ceci permet d'intégrer les variabilités inhérentes aux biocapteurs à cellules algales en prenant en compte une variation des signaux dS de $\pm 8\%$ par rapport à la moyenne établie dans le chapitre III.

6.3.2 Les solutions toxiques utilisées

Les essais de toxicité pour la phosphatase alcaline ont été réalisés avec des solutions de métaux lourds reconstituées. Les sels métalliques utilisés sont le nitrate de cadmium $Cd(NO_3)_2$, le sulfate de zinc $ZnSO_4$ et le nitrate de plomb $Pb(NO_3)_2$. Chaque sel a été dissous dans l'eau bi-distillée à la concentration souhaitée dans la gamme 1 ppm (1mg/l) à 0,1 ppb (0,1 μ g/l). Les métaux se trouvent alors sous la forme M^{2+} .

Pour les essais de toxicité vis-à-vis des cholinestérases, des solutions de méthyl-parathion (MPt), de méthyl-paraoxon (MPx) et de carbofuran (Cf) ont été testées dans les gammes de concentrations allant de 10 ppm à 1 ppb.

Afin d'étudier l'influence de solutions complexes contenant plusieurs toxiques, différents mélanges ont été étudiés (cf. Tableau 18).

| Mélange | Composition | |
|-----------------------|---------------------|-----------------|
| Métal-métal | Cd^{2+} / Zn^{2+} | 1 ppm-1 ppm |
| | | 100 ppb-100 ppb |
| Métal-organophosphoré | Cd^{2+} / MPx | 25 ppb-100 ppb |

Tableau 18 : composition des solutions complexes

7 Bioessais sur algues libres en micro-plaques

Afin de compléter les résultats obtenus avec les biocapteurs, des bioessais sur algues libres ont été réalisés en microplaques. Ceux-ci permettent de suivre les activités des phosphatases alcalines et estérases membranaires de *Chlorella vulgaris* et d'étudier leurs perturbations en présence de xénobiotiques.

Ces bioessais seront utiles pour mettre en évidence des tendances au niveau des perturbations (inhibition ou activation) qui pourront être ensuite comparées aux résultats obtenus avec les biocapteurs.

7.1 Principe des mesures d'activités enzymatiques

7.1.1 Mise en œuvre

Le principe de mesure de l'activité phosphatase alcaline en microplaques Costar de 96 puits repose sur la détection de la fluorescence émise par le produit de la réaction enzymatique grâce à un spectrofluorimètre Fluostar (BGM). A la différence des biocapteurs, les bioessais sont donc réalisés sur des algues libres dans le milieu réactionnel.

Remarque : les mesures de fluorescence alors obtenues sont exprimées en unités relatives. Etant donné que seul le taux d'inhibition nous intéresse dans ces expériences, il n'a pas été réalisé de gamme étalon permettant de calculer la valeur réelle de la fluorescence.

7.1.2 Protocole pour les mesures de phosphatase alcaline

Le protocole de cet essai en microplaques de 96 puits est défini dans le DEA de Bêchétoille (2000) [131] :

| | Volumes utilisés | Concentrations finales |
|--|------------------|-----------------------------------|
| Tris-HCl (1 M, pH 8,5) | 30 µl | 0,1 M |
| MgCl₂ (10 mM) | 30 µl | 1 mM |
| Solution algale | 80 µl | 1 à 2.10 ⁷ cellules/ml |
| Substrat (MUP à 0,5 g/l diluée 100 fois soit 20 µM) | 0 à 120 µl | 0 à 10 µM |
| Eau distillée | qsp 300 µl | |

Tableau 19 : Composition du milieu réactionnel pour les essais de cinétique enzymatique réalisés en microplaques de 96 puits

Le substrat utilisé pour la mesure de l'activité phosphatase alcaline est la MUP. Avec cette substance, la réponse enzymatique peut être détectée rapidement et facilement puisque le produit formé après détachement du groupement phosphate, la MUF, est fluorescent. Les longueurs d'excitation et d'émission sont respectivement de 355 nm et 460 nm.

Remarque : la dégradation spontanée du substrat nécessite la réalisation de blancs afin de soustraire la fluorescence générée spontanément pendant la durée de la réaction. Pour chaque concentration de MUP, il suffit de mesurer la fluorescence émise par des milieux de composition identique à celle présentée dans le tableau précédent, les algues étant remplacées par de l'eau distillée.

7.1.3 Protocole pour les mesures d'estérases

Le protocole de cet essai en microplaques de 96 puits est défini dans la thèse de Barthet (2003) [51] :

| | Volumes utilisés | Concentrations finales |
|--|------------------|-----------------------------------|
| Tampon citrate (0,1 M, pH 5,4) | 30 μ l | 10 mM |
| MgCl ₂ (10 mM) | 30 μ l | 1 mM |
| Solution algale | 80 μ l | 1 à 2.10 ⁷ cellules/ml |
| Substrat (FDA à 2mM diluée 100 fois soit 20 μ M) | 0 à 90 μ l | 0 à 6 μ M |
| Eau distillée | qsp 300 μ l | |

Tableau 20 : Composition du milieu réactionnel pour les essais de cinétique enzymatique réalisés en microplaques de 96 puits

Le FDA donne un produit fluorescent la fluorescéine (couple d'excitation/émission : 480nm/538nm). Tout comme la MUP, la FDA se dégrade naturellement, des témoins sans algues sont donc réalisés pour éliminer toute interférence.

7.2 Essais de toxicité basés sur l'inhibition des activités enzymatiques

7.2.1 Mise en contact des cellules algales avec les toxiques

Pour les **expositions prolongées**, cette étape nécessite des plaques Costar à fond adhérent de 48 puits dans lesquels 500 μ l de solution algale sont répartis. Après sédimentation des cellules, le milieu de culture est enlevé et remplacé par la solution à tester pour des durées allant de 60 à 240 minutes.

L'influence de la concentration algale sur le niveau d'inhibition peut être étudiée selon le même protocole mais en exposant des solutions algales de concentrations différentes à des solutions toxiques.

Pour la lecture, la solution à tester est enlevée des puits, les algues remises en suspension dans de l'eau distillée et transférées dans des plaques 96 puits.

Pour les **expositions directes**, des plaques 96 puits sont utilisées. La solution toxique est alors ajoutée au milieu réactionnel contenant les algues. La mesure de l'activité enzymatique est réalisée dans cette même plaque après injection du substrat. Le contact entre les algues et le toxique est donc celui de la mesure soit environ 15 minutes.

D'une manière générale, il apparaît que les durées d'exposition aux solutions toxiques sont plus longues dans le cas des bioessais par comparaison avec les biocapteurs (cf. paragraphe 6.3). La principale raison est que la quantité d'algues utilisée en bioessai est nettement plus élevée qu'en biocapteur ce qui implique d'allonger les contacts pour obtenir des inhibitions significatives des activités enzymatiques. Pour les expositions prolongées, des expositions de 60 à 240 minutes ont été envisagées mais selon les xénobiotiques testés, les durées les plus appropriées ont été retenues pour être présentées dans le chapitre IV.

7.2.2 Détermination des activités enzymatiques

Les mesures se font selon les protocoles des paragraphes 7.1.2 et 7.1.3 et permettent de déterminer les taux d'activité résiduelle de la phosphatase alcaline et des estérases après exposition aux solutions toxiques étudiées.

Grâce à la bonne répétabilité des mesures en microplaques (variation par rapport à la moyenne de $\pm 5\%$), il est possible de considérer qu'un taux d'inhibition est significatif s'il est supérieur à 10% soit un taux d'activité résiduelle inférieur à 90%.

**CHAPITRE III. DEVELOPPEMENT ET
OPTIMISATIONS
DES BIOCAPTEURS ELECTROCHIMIQUES
A CELLULES ALGALES**

8 Mesures d'activités enzymatiques sur cellules entières avec biocapteurs

8.1 Validation de la méthode

La première étape de ce travail a consisté à vérifier la possibilité de détecter les activités phosphatase alcaline et cholinestérase des algues *Chlorella vulgaris* en utilisant les biocapteurs conductimétriques et ISFET.

Chez *Chlorella vulgaris*, une partie de ces enzymes sont localisées au niveau membranaire [51, 94]. Ceci les rend donc particulièrement intéressantes pour la détection électrochimique. Il est en effet indispensable avec ce type de transducteurs que les réactions enzymatiques aient lieu en périphérie des cellules afin que les modifications électrochimiques (conductivité, pH) puissent être détectées par les électrodes.

Des mesures d'activité phosphatase alcaline et estérase ont été réalisées en microplaques sur algues libres (bioessais). Les cinétiques enzymatiques tracées avec les biocapteurs électrochimiques seront ainsi comparées avec celles obtenues en bioessais. Etant donné que les protocoles de mesure sont différents, notamment pour les substrats utilisés, cette comparaison permet essentiellement de s'assurer que les cinétiques enzymatiques mesurées par deux techniques distinctes présentent des allures identiques (de type Michaëlien pour les deux enzymes considérées).

Des capteurs ISFET ont également été utilisés au cours de cette étude. Comme le protocole de mesure des activités enzymatiques est identique pour les deux types de capteurs (cf. paragraphes 6.2.2 et 6.2.3), les capteurs ISFET ont servi ici à valider les résultats obtenus avec les capteurs conductimétriques. Ils ont en effet permis d'obtenir des courbes de calibration identiques (même gamme de substrat, même temps de réponse) à celles tracées avec les capteurs conductimétriques (cf. paragraphes 8.2.3 et 8.3.2.3 suivants). De plus, alors que les variations de conductivité dépendent de plusieurs paramètres (force ionique du tampon ...), après une injection de substrat, seule la réaction enzymatique peut conduire à des variations locales de pH pour la phosphatase alcaline et les estérases (cf. paragraphe 3.2). Ceci permet de confirmer la détection de la réaction enzymatique. Toutefois, comme les capteurs ISFET sont complexes et coûteux, nous avons privilégié l'utilisation de capteurs conductimétriques.

Remarques :

1. Selon le type de mesure (biocapteurs, bioessais), des substrats adaptés ont été choisis. Ainsi, pour les mesures électrochimiques, des substrats dont la transformation au cours de la réaction enzymatique s'accompagne de l'apparition/disparition de porteurs de charge et/ou de la consommation/production d'ions H^+ ou OH^- seront privilégiés (pNPP et pAPP pour l'activité phosphatase alcaline, AChCl et BuChCl pour l'activité cholinestérase). Pour les bioessais en microplaques, les mesures d'activité enzymatique nécessitent des substrats donnant des produits fluorescents (MUP pour la phosphatase alcaline, FDA pour les estérases).

2. Aucune comparaison des amplitudes des signaux des différents biocapteurs n'a été envisagée dans ce paragraphe 8 car celles-ci sont largement conditionnées par le niveau d'activité enzymatique des membranes, elle-même fonction de la quantité d'algues déposée lors de l'étape d'immobilisation manuelle. Or, pour ces premières expérimentations, les concentrations des solutions algales servant à la fabrication des membranes actives étaient différentes : de 3 à $5 \cdot 10^7$ cellules/ml pour les algues en AFNOR-P, 2 à $4 \cdot 10^7$ cellules/ml pour celles en AFNOR et 1 à $3 \cdot 10^7$ cellules/ml pour les algues en ISO.

8.2 Détection de l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris*

8.2.1 Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* en bioessai

La courbe présentée à la Figure 25 est la cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline des algues *Chlorella vulgaris* cultivées en milieu AFNOR-P obtenue en bioessai. Cette cinétique présente une allure de type Michaëlien : l'activité augmente linéairement avec la concentration de substrat (MUP) jusqu'à atteindre un plateau correspondant à la saturation des enzymes pour des concentrations supérieures ou égales à 5 μM de MUP.

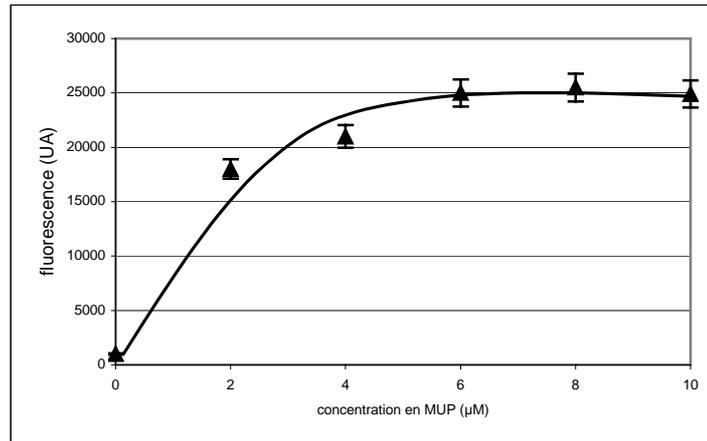


Figure 25 : Cinétique enzymatique de l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* mesurée en bioessais (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 ; MgCl_2 1mM ; masse sèche algale : 0,8g/l)

Remarque : Le temps de contact entre le substrat et les microalgues est d'environ 15 à 20 minutes.

8.2.2 Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* avec les biocapteurs

8.2.2.1 Cinétique enzymatique obtenue avec les biocapteurs conductimétriques

Les biocapteurs conductimétriques ont permis de tracer la courbe présentée à la Figure 26 présentant une allure de cinétique enzymatique de type Michaëlien pour une gamme de pNPP de 0 à 1 mM. La saturation est atteinte pour des concentrations en pNPP supérieures ou égales à 0,344 mM.

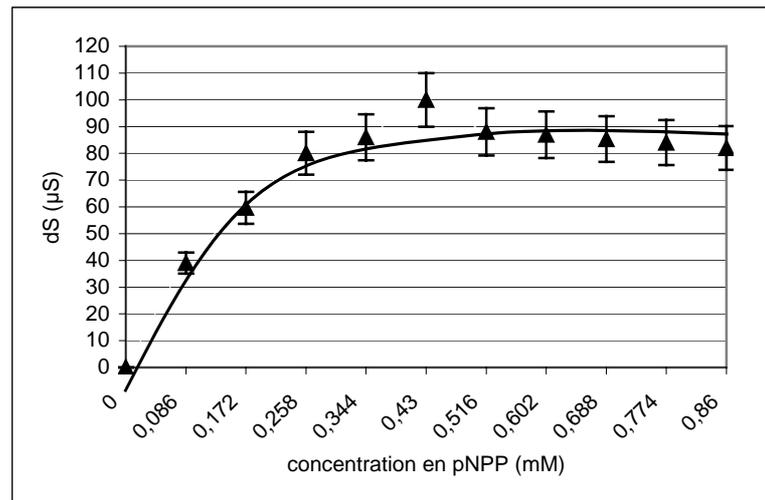


Figure 26 : Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline mesurée avec des biocapteurs conductimétriques (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM, algues AFNOR-P chauffées en référence)

Afin de vérifier la répétabilité des mesures, des triplicats ont été réalisés pour chaque injection de substrat. Ces essais ont permis de montrer qu'avec ce biocapteur, le signal variait, pour une même concentration de pNPP, de $\pm 8\%$ par rapport à la moyenne.

8.2.3 Mesures avec les capteurs ISFET

La Figure 27 présente la cinétique enzymatique obtenue avec les biocapteurs ISFET qui possède une allure de cinétique enzymatique dite Michaëlienne. La gamme de concentrations en pNPP s'étend de 0 à 1 mM. Quant à la saturation des enzymes, elle est atteinte pour des concentrations en pNPP supérieures à 0,4 mM (Figure 27).

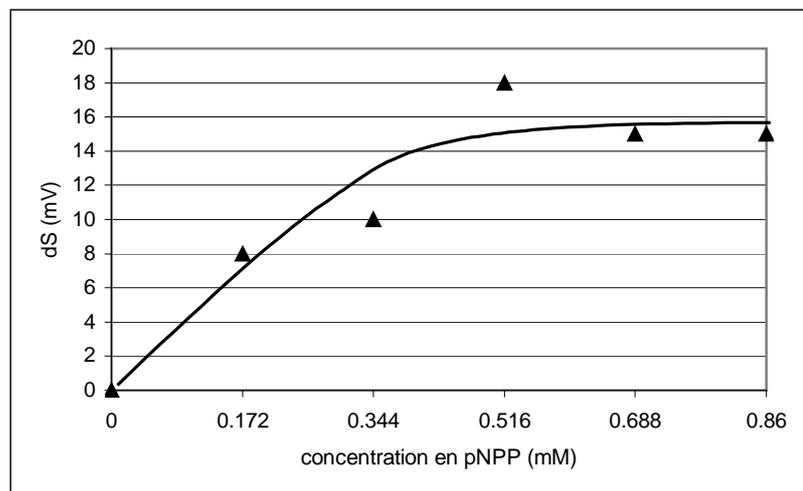


Figure 27 : Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline mesurée avec des biocapteurs ISFET (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM, algues AFNOR-P chauffées en référence)

8.2.4 Conclusion

Il apparaît, au vu des résultats présentés dans le paragraphe 8.2, que les cinétiques enzymatiques de la phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* obtenues avec les bioessais et les biocapteurs possèdent des allures similaires de type Michaëlien ce qui permet de valider l'utilisation des biocapteurs conductimétriques et ISFET pour la détection de l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* immobilisée.

Les différents paramètres de détection de l'APA sont identiques pour les biocapteurs conductimétriques et ISFET. Le temps de réponse est ainsi inférieur à 5 minutes et en ce qui concerne la gamme de concentrations en substrat, celle-ci est de 0 à 1 mM de pNPP pour tous les essais. Les seules différences qui peuvent apparaître se situent au niveau de la concentration de saturation des enzymes qui varie légèrement : elle augmente notamment lorsque la concentration algale de la membrane active augmente.

D'une manière générale, les concentrations algales dans les membranes ne sont pas suffisamment différentes (de 10^7 cellules/ml à 5.10^7 cellules/ml) pour modifier significativement les paramètres de la cinétique enzymatique (gamme de concentration en substrat, temps de réponse) à l'exception de l'amplitude du signal comme nous le verrons par la suite (cf. paragraphe 9.2.3.1). Une vérification de ce résultat avec les bioessais a d'ailleurs permis de montrer que, pour deux concentrations algales proches ($0,5.10^7$ à $1,33.10^7$ cellules/ml), la gamme de substrat MUP pour la mesure de l'activité phosphatase alcaline était identique pour les deux concentrations algales (Figure 28) alors que la concentration de saturation augmentait légèrement (de 5 μ m à 6 μ m) pour la concentration algale la plus élevée. Sur une même microplaque, le niveau de fluorescence détectée correspondant au niveau d'activité enzymatique est, quant à lui, nettement plus élevé pour la concentration algale la plus forte (courbe ▲ sur la Figure 28).

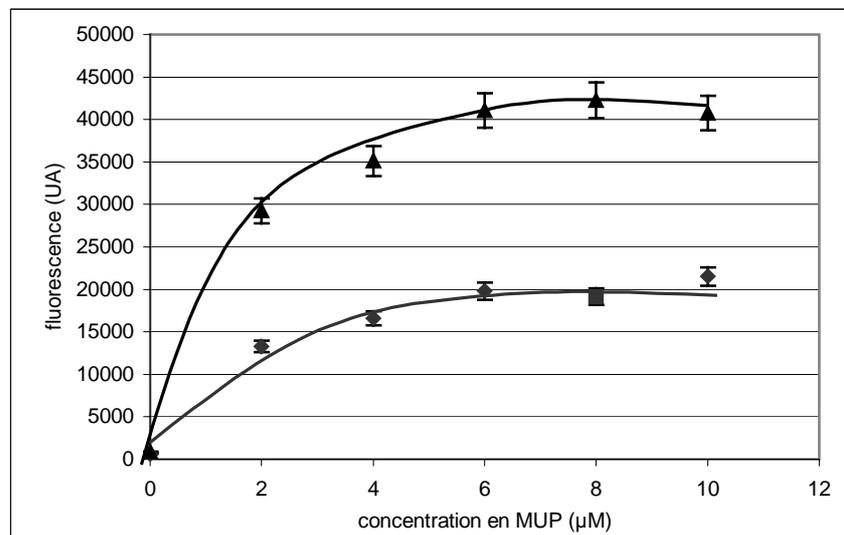


Figure 28 : Cinétiques enzymatiques de la phosphatase alcaline pour deux concentrations algales mesurées en bioessais avec ▲ : concentration algale : $1,33.10^7$ cellules/ml, ■ : concentration algale : $0,5.10^7$ cellules/ml (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 1mM ; masse sèche algale : 0,8g/l)

8.3 Cinétique enzymatique des estérases de *Chlorella vulgaris*

De précédents travaux ont montré que l'activité estérase de *Chlorella vulgaris* peut être mesurée, en bioessais, pour des algues cultivées en milieu ISO [51]. Toutefois, la mesure de l'activité phosphatase alcaline et de l'activité estérase sur une même cellule algale implique nécessairement l'utilisation d'algues cultivées en milieu AFNOR-P.

Il a donc été envisagé de vérifier, dans un premier temps, que les biocapteurs électrochimiques permettaient de détecter l'activité estérase de *Chlorella vulgaris* cultivée en milieu ISO. Il s'est ensuite avéré indispensable de montrer que *Chlorella vulgaris* cultivée en milieu AFNOR-P possédait une activité estérase. Des essais sur des algues cultivées en milieu AFNOR ont également été menés afin de compléter cette étude.

8.3.1 Cinétique enzymatique des estérases de *Chlorella vulgaris* en bioessai

Dans ce paragraphe, la cinétique de l'activité estérase présentée est celle obtenue, en bioessai, pour des algues *Chlorella vulgaris* cultivées en milieu AFNOR-P (cf. Figure 29). En effet, pour les biocapteurs, l'utilisation d'algues cultivées en milieu AFNOR-P sera privilégiée. L'activité estérase d'algues *Chlorella vulgaris* cultivées en milieu ISO et AFNOR a pu également être mesurée sur algues libres en microplaques mais les cinétiques ne seront pas présentées dans ce travail.

En utilisant des algues *Chlorella vulgaris* cultivées en milieu AFNOR-P, la cinétique enzymatique obtenue présente l'allure d'une cinétique enzymatique de type Michaëlien, la saturation apparaissant pour des concentrations en FDA supérieures à 2 μM .

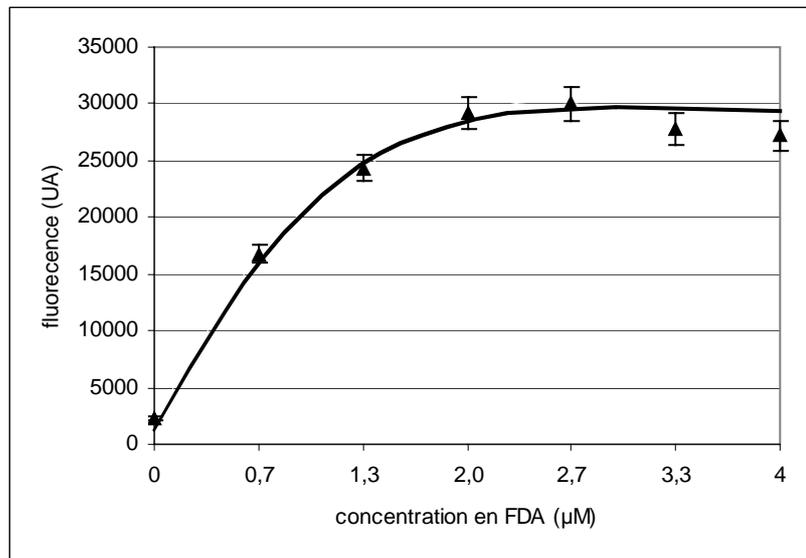


Figure 29 : Cinétique enzymatique de l'activité estérase de *Chlorella vulgaris* cultivées en AFNOR-P mesurée en bioessais (Tampon citrate 10mM, pH 5,4 ; MgCl_2 10mM ; masse sèche algale : 0,8g/l)

Remarque : Le temps de contact entre le substrat et les microalgues est d'environ 15 à 20 minutes.

8.3.2 Cinétique enzymatique des cholinestérases de *Chlorella vulgaris* avec des biocapteurs

8.3.2.1 Algues en milieu ISO

La Figure 30 présente une courbe possédant une allure de cinétique enzymatique de type Michaëlien pour des concentrations en AChCl inférieures à 10 mM. Pour des concentrations en substrat supérieures (10 à 20 mM), le signal diminue.

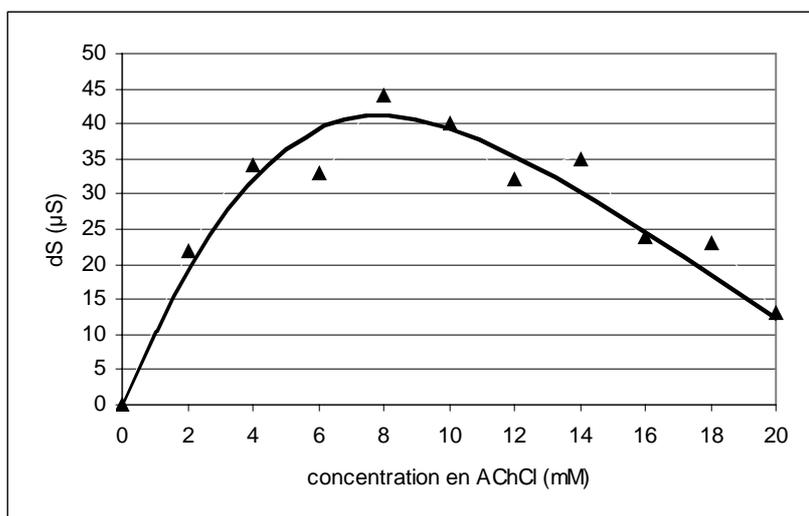


Figure 30 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase mesurée avec des biocapteurs conductimétriques (KH_2PO_4 2,5mM, pH 8 ; algues ISO chauffées en référence)

Ce phénomène d'inhibition de l'acétylcholinestérase par excès de substrat est connu et s'explique par l'existence de deux sous-sites de fixation du chlorure d'acétylcholine sur l'enzyme distants de 7 Å. Comme le sous-site anionique porte une charge négative, il interagit avec la charge positive portée par l'ammonium quaternaire du substrat alors que le sous-site estérasique (contenant les résidus catalytiques sérine et histidine) interagit avec la liaison ester du substrat comme le montre la Figure 31 [133].

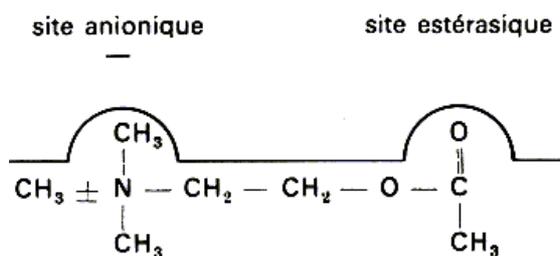


Figure 31 : Fixation de l'AChCl sur les deux sous-sites de fixation de l'acétylcholinestérase (d'après Yon, 1974)

Lorsque la concentration du substrat est faible, chaque partie du substrat interagit donc avec le sous-site qui lui est dédié. Par contre, quand la concentration du substrat est trop élevée, une molécule de substrat n'interagit plus que partiellement avec l'un ou l'autre des sous-sites, chaque sous-site étant cependant occupé par une molécule de substrat (Figure 32).

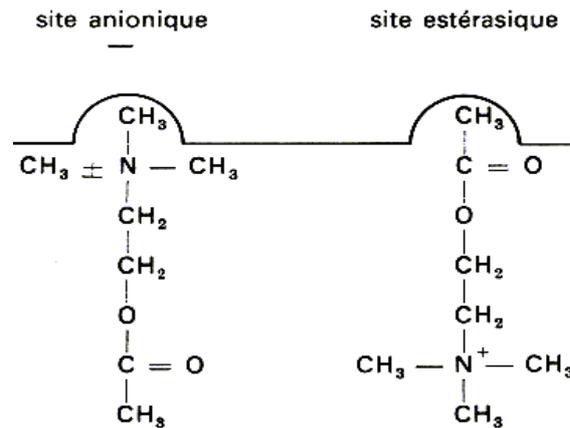


Figure 32 : Mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase par excès de substrat (d'après Yon, 1974)

Une telle observation a été possible avec des algues cultivées en ISO car leur concentration dans le mélange BSA+algues est faible ($2 \text{ à } 3 \cdot 10^7$ cellules/ml). Une fois déposée, la charge enzymatique contenue dans la membrane est réduite et la saturation rapidement atteinte. Lors de l'augmentation de la concentration en substrat, les enzymes ont donc été inhibées par le mécanisme décrit précédemment.

Cette observation a finalement permis de resserrer la gamme d'AChCl entre 0 et 10 mM pour les essais suivants (Figure 33). La saturation des enzymes est alors observée pour des concentrations en AChCl supérieures ou égales à 6 mM.

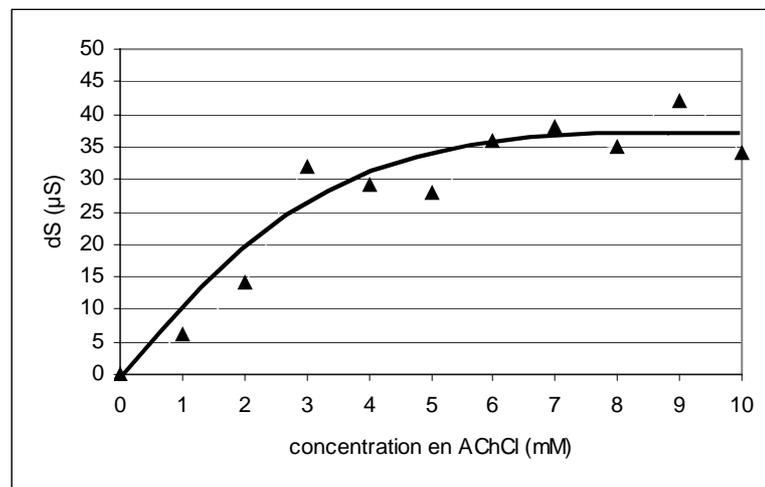


Figure 33 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase d'algues cultivées en ISO mesurée avec des biocapteurs conductimétriques (KH_2PO_4 2,5mM, pH 8 ; algues ISO chauffées en référence)

8.3.2.2 Algues en milieu AFNOR

La Figure 34 montre la cinétique enzymatique d'allure Michaëlienne obtenue avec des algues cultivées en milieu AFNOR. La saturation des enzymes apparaît pour des concentrations en AChCl supérieures ou égales à 10 mM.

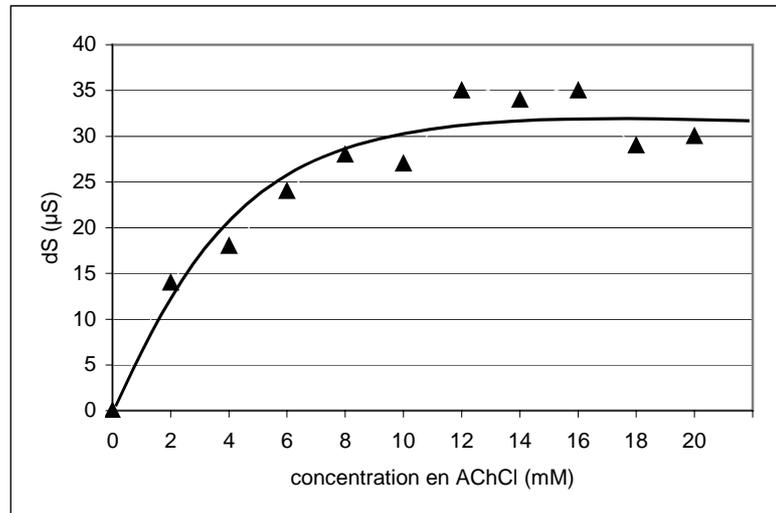


Figure 34 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase d'algues cultivées en AFNOR mesurée avec des biocapteurs conductimétriques (KH_2PO_4 2,5mM, pH 8 ; algues AFNOR chauffées en référence)

Pour cet essai, la concentration algale dans la membrane est supérieure à $4 \cdot 10^7$ cellules/ml ce qui peut permettre de justifier l'absence d'inhibition de l'enzyme par excès de substrat même si, pour les deux dernières concentrations en AChCl (18 et 20 mM), le signal dS apparaît légèrement inférieur aux valeurs précédentes et pourrait marquer le début de l'inhibition.

8.3.2.3 Algues en milieu AFNOR-P

Les essais suivants ont été menés avec des biocapteurs conductimétriques et ISFET.

Les algues cultivées en milieu AFNOR-P possèdent également une activité acétylcholinestérase comme le montre la Figure 35. La saturation des enzymes est obtenue pour des concentrations supérieures ou égales à 7 mM.

Des triplicats ont été réalisés pour chaque concentration en AChCl afin d'étudier la répétabilité des mesures. La variation du signal dS par rapport à la moyenne est alors de $\pm 8\%$.

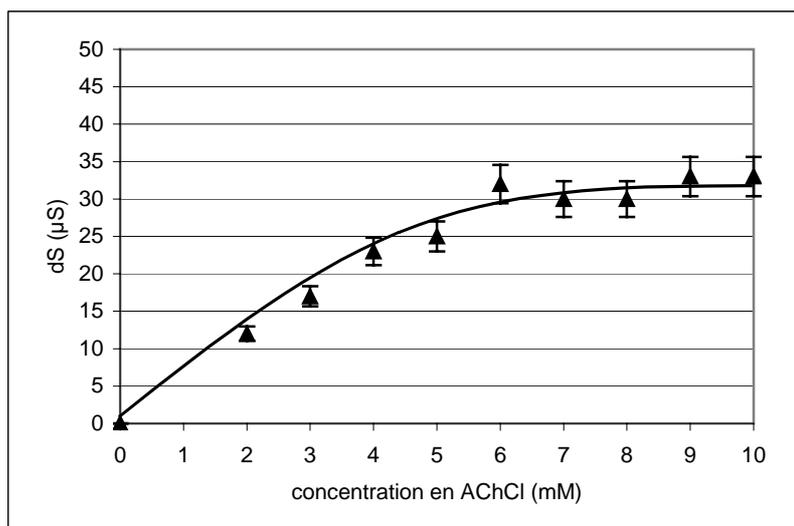


Figure 35 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase d'algues cultivées en AFNOR-P mesurée avec des biocapteurs conductimétriques (KH_2PO_4 2,5mM, pH 8 ; algues AFNOR-P chauffées en référence)

Avec les biocapteurs ISFET, une stabilisation assez rapide du signal a été obtenue comme le montre la Figure 36. Les deux premières mesures ne montrent, quant à elles, pas de variation du signal ce qui pourrait s'expliquer par la très faible concentration en substrat injecté qui ne conduit pas à des variations de pH détectables.

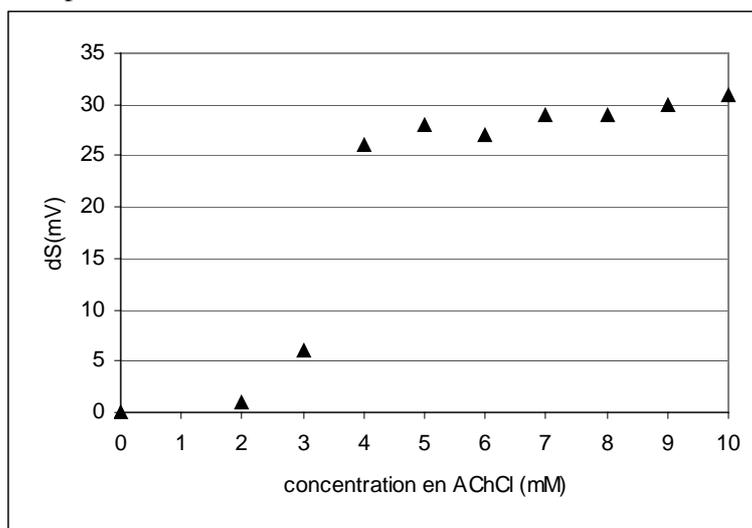


Figure 36 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase d'algues cultivées en milieu AFNOR-P mesurée avec des biocapteurs ISFET (KH_2PO_4 2,5mM, pH 8 ; algues AFNOR-P chauffées en référence)

Remarques : pour confirmation, cet essai a été reproduit avec un autre biocapteur ISFET et la même allure de courbe a été obtenue. Ce résultat non attendu n'a toutefois pas fait l'objet d'études plus poussées.

8.3.3 Conclusion

Les paragraphes précédents ont montré qu'il est possible de détecter l'activité enzymatique acétylcholinestérase d'algues *Chlorella vulgaris* cultivées dans différents milieux avec les biocapteurs conductimétriques et ISFET. Toutefois, même s'il est possible de détecter l'activité acétylcholinestérase d'algues cultivées en milieu ISO ou AFNOR, le développement d'un biocapteur permettant la mesure de l'activité cholinestérase ainsi que celle de la phosphatase alcaline nécessite d'utiliser exclusivement des algues cultivées en milieu AFNOR-P comme biorécepteurs puisque ce sont les seules chez lesquelles les phosphatases alcalines sont activées (cf. paragraphe 3.2.1).

Les cinétiques obtenues avec des bioessais et des biocapteurs pour *Chlorella vulgaris* cultivées en milieu AFNOR-P présentent des allures identiques de type Michaëlien.

Pour les deux types de détection électrochimiques (conductimétrique et ISFET), la gamme de concentration en AChCl est la même : 0 à 10 mM avec une saturation pour des concentrations en substrat ≥ 6 mM. La réponse est, quant à elle, obtenue en 6 à 7 minutes pour les biocapteurs conductimétriques comme pour les biocapteurs ISFET.

L'inhibition de l'activité acétylcholinestérase par excès de substrat (AChCl ≥ 14 mM) a été observée avec les biocapteurs conductimétriques pour des membranes actives à faibles concentrations algales ($< 3 \cdot 10^7$ cellules/ml). Cette inhibition est particulièrement marquée pour les algues cultivées en milieu ISO, mais les cinétiques enzymatiques obtenues avec des algues cultivées en milieu AFNOR-P à des concentrations de 2 à $3 \cdot 10^7$ cellules/ml dans la membrane active tendent à confirmer ce résultat (cf. courbe ▲ de la Figure 53 : la baisse du signal dS est toutefois moins importante puisque la gamme de substrat est moins étendue (0 à 10 mM)).

8.4 Conclusion générale

Les essais présentés dans les paragraphes 8.2 et 8.3 ont permis de confirmer la possibilité de détecter les activités enzymatiques phosphatase alcaline et cholinestérase de *Chlorella vulgaris* avec les capteurs conductimétriques et ISFET.

Une seconde étape d'optimisation a alors été envisagée. L'immobilisation des cellules algales a ainsi été améliorée de même que certaines des conditions opératoires influençant directement l'amplitude des signaux détectés (force ionique, nature du substrat...).

9 Optimisations des signaux

Les optimisations des signaux ont été réalisées avec des biocapteurs conductimétriques et portent, pour l'essentiel, sur les mesures d'activité phosphatase alcaline. Elles seront néanmoins prises en compte pour les mesures d'activité acétylcholinestérase.

9.1 Choix de la membrane

9.1.1 Les membranes à base d'albumine de sérum bovin

Les cinétiques enzymatiques présentées dans le paragraphe 8 ont toutes été obtenues avec des biocapteurs sur lesquels des membranes à base d'albumine de sérum bovin (BSA) avaient été déposées. Il apparaît que ces membranes permettent la détection de l'activité enzymatique tout en conservant une bonne résistance mécanique lors de l'immersion prolongée dans le milieu réactionnel.

Cette technique d'immobilisation est, en effet, classiquement utilisée pour le développement des biocapteurs à enzymes pures [38, 39, 58, 83, 127] du fait de ses nombreux avantages (cf. 2.4.4.2).

9.1.2 Les membranes à base d'alginate de calcium

Toutefois, même si des travaux ont montré qu'il était possible d'utiliser le BSA et le glutaraldéhyde (GA) pour immobiliser des cellules entières [81], la question de la toxicité du GA_{vap} est à prendre en considération.

C'est pour cette raison qu'une seconde technique d'immobilisation a été étudiée. L'alginate gélifié par le $CaCl_2$ permet ainsi de réaliser des billes contenant des microalgues. Un protocole pour réaliser des membranes a été défini à partir de travaux précédents [76-78].

Les membranes à base d'alginate de calcium n'ont pas permis d'obtenir de cinétique enzymatique pour la phosphatase alcaline comme le montre la Figure 37. A partir de 0,43 mM de pNPP, le signal diminue alors qu'on approche théoriquement de la concentration de saturation.

L'observation à l'œil nu des membranes d'alginate a alors permis de constater qu'elles se détachaient progressivement des cellules de détection au cours des essais. Leur adhésion n'est donc pas satisfaisante pour une immersion prolongée dans le milieu réactionnel. Dainty *et al.* (1986) ont ainsi montré que la présence d'ions phosphate dans le milieu associé à un pH supérieur à 7 favorisaient la dissolution des billes d'alginate [77]. Or, dans ce travail, toutes ces conditions sont réunies puisque le pH est de 8,5 et des ions phosphate sont libérés au cours de la réaction enzymatique.

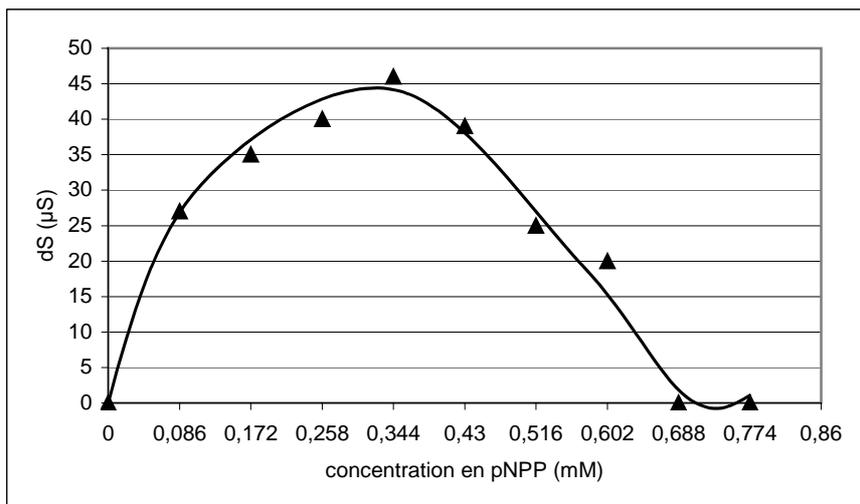


Figure 37 : Mesure de l'activité phosphatase alcaline avec des biocapteurs conductimétriques à membranes à base d'alginate de calcium (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM, algues AFNOR-P chauffées en référence)

9.1.3 Conclusion

Les membranes à base d'alginate de calcium ne sont donc pas adaptées à la mesure de l'activité phosphatase alcaline avec les biocapteurs électrochimiques à la différence des membranes à base d'albumine de sérum bovin. Ces dernières ont finalement été retenues comme technique d'immobilisation des microalgues *Chlorella vulgaris* et seront utilisées pour les expérimentations suivantes portant sur l'activité phosphatase alcaline ainsi que sur l'activité cholinestérase.

9.2 Les différents paramètres de la membrane active

Pour ces différents essais, la membrane de référence utilisée est composée de BSA/algues chauffées en AFNOR-P. L'étude sur l'influence de la concentration algale dans la membrane a pour sa part, été menée avec des membranes de référence dites « blanches ».

9.2.1 Influence de la quantité d'albumine de sérum bovin

Des membranes algales réalisées avec 5 mg de BSA et immobilisées sur des capteurs conductimétriques ont donné des signaux d'amplitude très faible non exploitables alors que des membranes contenant 10 mg de BSA ont permis d'obtenir les cinétiques enzymatiques présentées au paragraphe 8.

Cette dernière quantité de BSA (10mg) a finalement été retenue pour la suite des expérimentations.

9.2.2 Influence du temps de contact avec les vapeurs de glutaraldéhyde

Le temps de contact avec les vapeurs de glutaraldéhyde est un paramètre important. Il est en effet nécessaire que l'exposition aux GA_{vap} des mélanges BSA/algues soit suffisamment longue pour assurer une bonne réticulation des membranes. Comme il est nécessaire de tenir compte de la toxicité potentielle du glutaraldéhyde pour les algues, un temps de contact optimum a dû être défini.

La Figure 38 donne l'amplitude du signal correspondant à l'activité phosphatase alcaline mesurée à saturation (pour 0,86 mM de pNPP).

Les membranes placées dans une atmosphère saturée en GA_{vap} pendant 10 à 20 minutes donnent les amplitudes de signaux les plus élevées (compte tenu de la variabilité intercapteur, les différences d'amplitude dS ne sont pas significatives entre ces trois durées exposition) alors que pour des expositions plus longues (entre 25 et 30 minutes), le signal diminue significativement. Les vapeurs de glutaraldéhyde sont en effet toxiques pour les algues et peuvent donc inhiber l'activité phosphatase alcaline. Toutefois, pour une solution algale exposée moins de 30 minutes aux vapeurs de glutaraldéhyde, une étude en bioessais a montré que l'inhibition de la phosphatase alcaline n'excédait pas 10 à 15%. L'activité résiduelle est donc suffisante pour utiliser cette technique d'immobilisation afin de suivre l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris*.

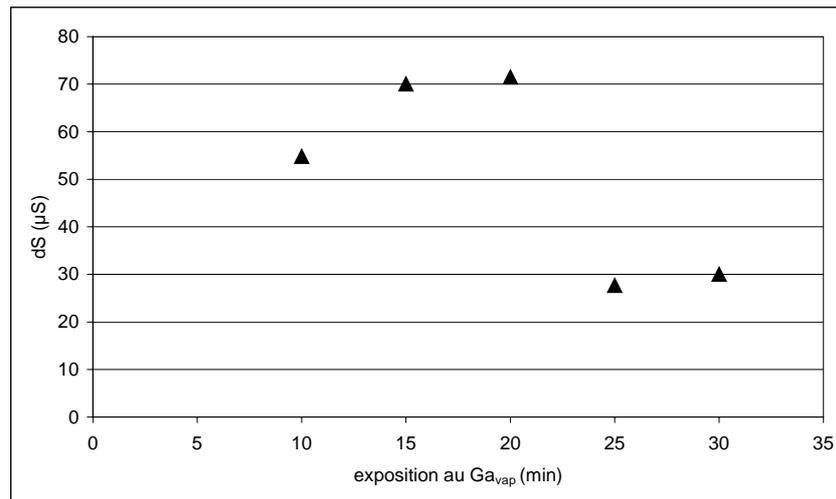


Figure 38 : Amplitudes des signaux dS correspondant à l'activité phosphatase alcaline mesurée avec des biocapteurs conductimétriques pour différentes expositions aux vapeurs de glutaraldéhyde (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 1mM ; pNPP 0,86mM ; algues AFNOR-P chauffées en référence)

Cette étude sur l'amplitude du signal dS mesuré pour une concentration de saturation en pNPP a été complétée par un suivi de la stabilité du signal de chaque biocapteur pendant 120 minutes. Ainsi, pour des expositions inférieures à 15 minutes, la toxicité du glutaraldéhyde est certes moins importante mais les membranes ne sont pas suffisamment réticulées et peuvent se décoller ce qui provoque une baisse du signal lors d'immersions prolongées dans le milieu réactionnel. Pour des membranes réticulées pendant 10 minutes, la baisse du signal après 30 minutes d'immersion est supérieure à 45% par rapport à la valeur à $t=0$. Pour 14 minutes d'exposition aux GA_{vap} , la diminution est supérieure à 30% après 75 minutes dans le milieu réactionnel alors que pour une exposition de 18 minutes, le signal reste stable (Figure 39) sur les 120 minutes de l'essai.

Finalement, une exposition de 20 minutes au GA_{vap} a été retenue.

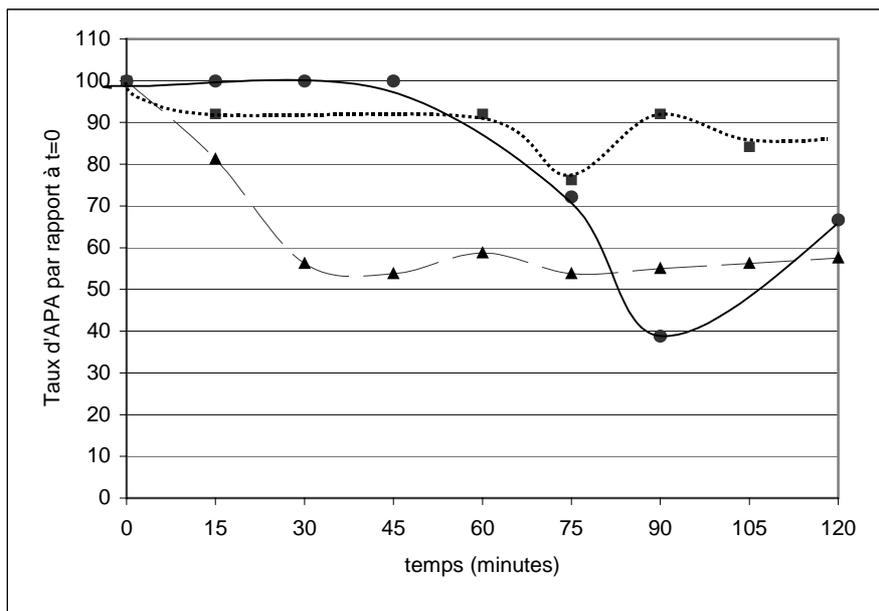


Figure 39 : Stabilité du signal de l'APA mesurée par des biocapteurs conductimétriques immergés dans le milieu réactionnel pendant 120 minutes avec des membranes après différentes expositions aux GA_{vap} avec ▲ : 10 minutes ; ● : 14 minutes ; ■ : 18 minutes (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 1mM ; pNPP 0,86mM ; algues AFNOR-P chauffées en référence)

Ces observations sur l'influence du temps d'exposition aux vapeurs de glutaraldéhyde sont, par ailleurs, conformes à la littérature. Ainsi, Li *et al.* (1999) ont étudié l'importance du glutaraldéhyde pour la résistance mécanique ainsi que pour le niveau d'activité enzymatique [80] afin d'optimiser les conditions d'exposition pour réaliser des électrodes à acétylcholinestérase. Ils ont notamment observé une diminution du signal de leur biocapteur ampérométrique à acétylcholinestérase pour des durées croissantes d'exposition aux GA_{vap} .

9.2.3 Influence de la concentration algale

La concentration algale dans la membrane active a une influence directe sur le niveau d'amplitude du signal dS comme vont le montrer les résultats présentés dans les paragraphes suivants.

Les effets de la charge algale sur le taux d'inhibition calculé lors des essais de toxicité seront, pour leur part, abordés dans le chapitre IV (cf. paragraphe 11.1.1).

9.2.3.1 Evolution de l'activité phosphatase alcaline en fonction de la concentration algale

Afin de déterminer la concentration algale optimale dans le mélange initial BSA/algues, des biocapteurs conductimétriques sur lesquels ont été déposées des membranes de concentrations algales différentes ont permis de mesurer les signaux correspondant à l'activité phosphatase alcaline pour trois concentrations de pNPP (0,086 mM, 0,344 mM et 0,86 mM). Les concentrations algales des mélanges BSA/algues testés augmentent de 10^7 cellules/ml à partir d'une concentration initiale de $0,5 \cdot 10^7$ cellules/ml pour atteindre $5 \cdot 10^7$ cellules/ml.

La Figure 40 regroupe les résultats les plus pertinents obtenus au cours de ces expérimentations. La comparaison des niveaux d'amplitude dS pour des biocapteurs sur lesquels des membranes de même charge algale avaient été déposées a confirmé une forte variabilité intercapteur. Une des conséquences directes est que, pour des concentrations algales proches, les

différences d'amplitude des signaux ne sont pas significatives. Il a donc été décidé de regrouper sur la Figure 40 les allures de courbes pour des gammes de concentrations algales.

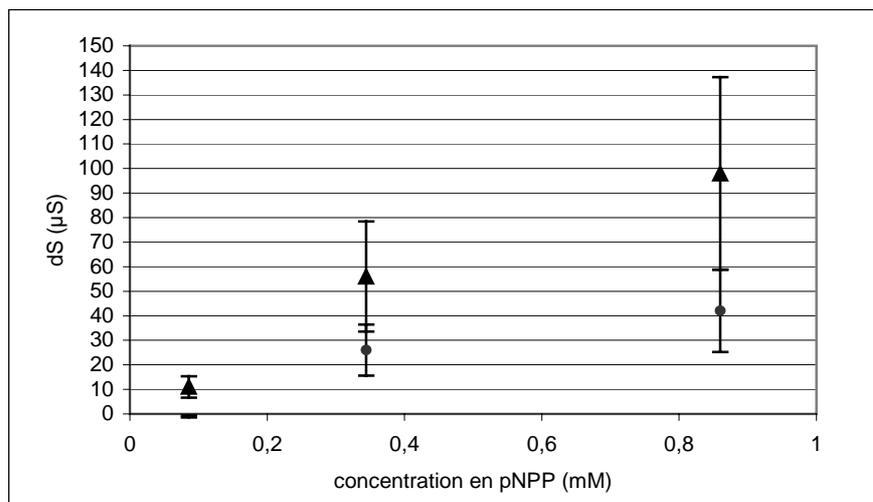


Figure 40 : Evolution du signal pour différentes concentrations algales dans le mélange BSA+algues des membranes mesuré avec des biocapteurs conductimétriques avec
 ● : [algues] de 1 à 3.10⁷ cellules/ml ; ▲ : [algues] de 4 à 5.10⁷ cellules/ml
 (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM ; pNPP 0.86mM ; membrane blanche en référence)

La première conclusion qui peut néanmoins être tirée est que l'activité phosphatase alcaline détectée par les biocapteurs augmente avec la concentration algale dans la membrane active.

9.2.3.2 Evolution de l'activité phosphatase alcaline pour des membranes à concentrations algales élevées

Un mélange BSA/algues dans lequel les algues *Chlorella vulgaris* avaient sédimentées a alors été utilisé : la concentration cellulaire à l'intérieur de celles-ci étaient largement supérieure à 10⁸ cellules/ml. Les biocapteurs ainsi obtenus ont été utilisés pour tracer des cinétiques enzymatiques (Figure 41).

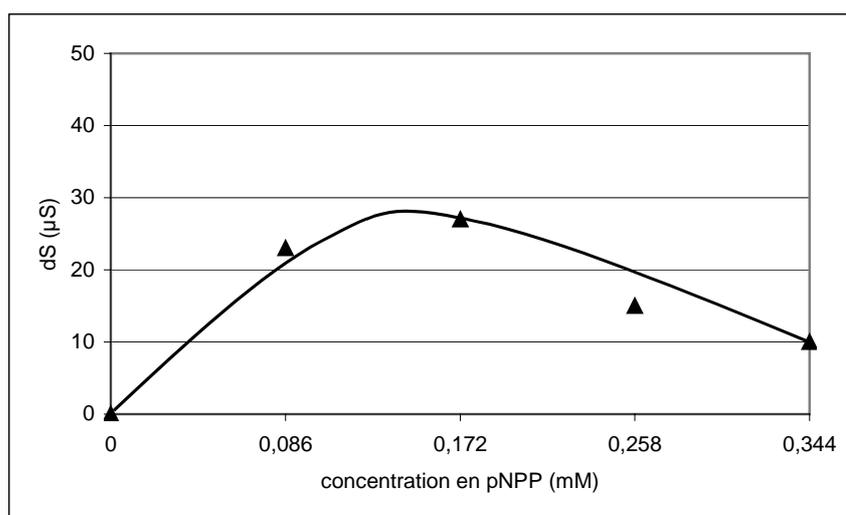


Figure 41 : Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline mesurée avec des biocapteurs conductimétriques pour des membranes à base de BSA à concentration algale > 10⁸ cellules/ml
 (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM, algues AFNOR-P chauffées en référence)

Malgré la forte concentration cellulaire et donc la forte charge enzymatique, l'amplitude des signaux n'a pas augmenté pour autant. Elle apparaît même faible pour une telle concentration en enzymes.

D'une manière générale, la courbe présentée à la Figure 41 ne possède pas une allure de type Michaëlien. Un tel comportement peut s'expliquer à cause de la forte concentration en algues utilisée. Les réactions enzymatiques se produisent alors à la périphérie de la membrane et ne peuvent être détectées par la cellule de détection (Figure 42). Mai Anh *et al.* (2002) ont également constaté une influence identique de la concentration en enzymes pures dans la membrane active sur le niveau d'amplitude des signaux dS mesurés avec des biocapteurs à tyrosinase [39].

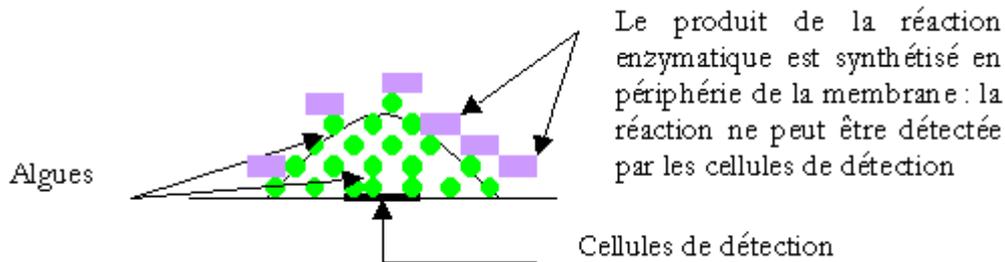


Figure 42 : Réactions enzymatiques périphériques sur des membranes contenant 10^8 cellules/ml

9.2.3.3 Conclusion

En tenant compte des observations précédentes, la concentration optimale dans le mélange BSA/algues a alors été établie entre $4-5 \cdot 10^7$ cellules/ml.

Toutefois, comme l'opération de dépôt est manuelle, elle ne garantit pas une quantité équivalente d'algues sur toutes les cellules de détection. Des biocapteurs dont les membranes ont été préparées à partir d'un même mélange BSA/algues peuvent donc avoir des signaux dS d'amplitude différente.

9.2.4 Observation des membranes au microscope

Des observations au microscope optique (au grossissement $\times 400$) ont été réalisées toutes les 30 minutes afin d'étudier la stabilité de membranes BSA/algues déposées sur des capteurs conductimétriques lors d'une immersion de 120 minutes dans le milieu réactionnel. Il a alors été vérifié que les membranes ne se décollaient pas au cours de cette immersion mais c'est surtout l'aspect des membranes et notamment la répartition des algues dans la membrane qui a pu être observée.

Il est ainsi apparu que la distribution des algues dans les membranes n'était pas homogène. Les algues tendent également à former des amas et créent ainsi au sein des membranes des zones « blanches ». De plus, selon les membranes, la distance entre les algues et les microélectrodes diffère. Or, plus les algues sont proches des microélectrodes, plus le signal de la réaction enzymatique sera élevé. Cette inhomogénéité de la répartition des cellules algales a donc une influence directe sur les amplitudes des signaux dS, ce qui se traduit par une variabilité intercapteur importante. Une telle observation sur la variabilité de la réponse de membranes de même charge enzymatique du fait de la distribution inhomogène des biorécepteurs (dans ce cas, des enzymes pures) a d'ailleurs été faite par Danzer *et al.* (1996) [134].

Lors des essais de toxicité, cette inhomogénéité de la distribution algale dans les membranes pourra avoir des conséquences en favorisant une grande variabilité des taux d'inhibition (cf. chapitre IV). Au cours de la même étude que celle mentionnée précédemment, Danzer *et al.* (1996) ont ainsi émis cette hypothèse pour justifier les différences de réponse de membranes enzymatiques distinctes pour des expositions au mercure et au cuivre [134].

Enfin, il a été possible de déterminer l'épaisseur moyenne des membranes, soit environ 10 à 15 μm , celles-ci pouvant contenir par endroit deux épaisseurs de cellules algales (diamètre moyen 5 μm).

Une étude préliminaire a été réalisée en AFM afin de compléter ces observations [130]. L'inhomogénéité de la répartition des cellules algales a ainsi été confirmée (Figure 43). En effet, l'image AFM fait apparaître des cavités circulaires (en noir sur la Figure 43) réparties de façon inhomogène dans la membrane. Or, en comparant cette observation en AFM avec l'image optique conventionnelle, on a déduit que les cellules algales se trouvaient au fond de ces cavités dont la dimension correspond à la taille des microalgues (environ 5 μm de diamètre).

De plus, la comparaison des membranes avant et après immersion dans le milieu réactionnel pendant 60 minutes a permis de mettre en évidence le gonflement de la membrane ainsi que la réorganisation de cellules en amas (Figure 44). Un relargage de certaines cellules mal immobilisées a pu être constaté mais celui-ci reste néanmoins limité comme l'ont montré les études de stabilité du signal dS au cours du temps (Figure 39). Quant au regroupement de certaines cellules algales en amas au sein de la membrane, il peut influencer l'accessibilité des toxiques et devra être pris en considération lors de l'analyse des essais de toxicité (cf. chapitre IV).

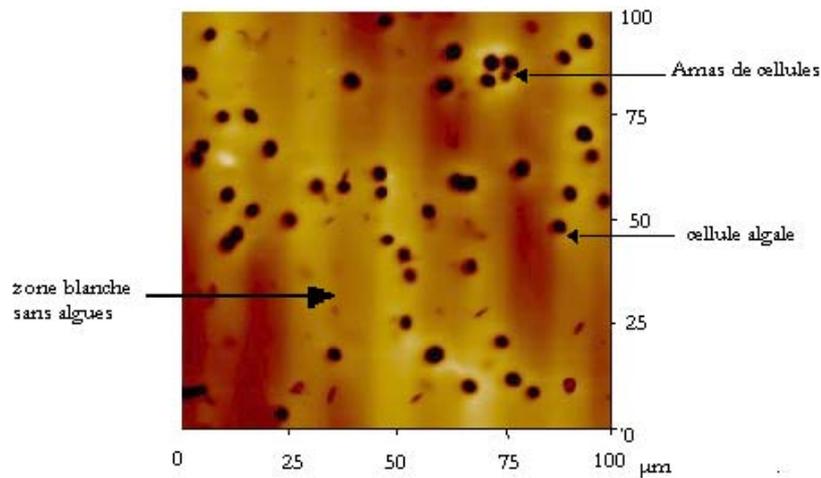


Figure 43 : Observation en AFM d'une membrane BSA/algues déposées sur un capteur conductimétrique (image AFM en 2D mode contact à force constante, concentration algale 5.10^7 cellules/ml

Remarque : sur la Figure 43, on distingue au second plan des bandes verticales parallèles (sombres et claires alternées) correspondant aux microélectrodes interdigitées sur le substrat en Pyrex.

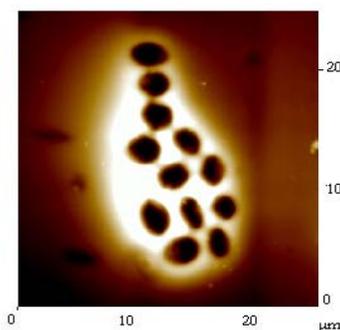


Figure 44 : Observation en AFM d'une membrane BSA/algues déposées sur un capteur conductimétrique après immersion dans le milieu réactionnel: Mise en évidence de la réorganisation des algues en paquet (image AFM en 2D mode contact à force constante ; concentration algale 5.10^7 cellules/ml)

Les images AFM des membranes BSA/algues présentées dans ce paragraphe sont tirées d'une étude préliminaire. Les différents paramètres, notamment le choix du mode contact, peuvent soulever un certain nombre de remarques. En effet, plusieurs études indiquent que le choix du mode tapping est le plus adéquat pour l'observation de matériel biologique mou puisqu'il limite les forces exercées sur l'échantillon [135, 136]. Ainsi, Higgins *et al.* (2000) ont conclu que le mode « fluid tapping » permet d'étudier des cellules diatomées sans les endommager et/ou les détacher de la surface par l'action de la pointe [137]. De plus, Kasas et Ikai (1995) suggèrent que, contrairement aux cellules de forme aplatie, les cellules circulaires peuvent être détachées plus facilement par la pointe [138] (*Chlorella vulgaris* est justement une microalgue de forme circulaire, cf. 3.1).

Afin d'améliorer la qualité des images des membranes BSA/algues ainsi que leur interprétation, une nouvelle étude en AFM, prenant en compte les remarques précédentes, pourrait être envisagée.

9.3 Choix de la membrane de référence

9.3.1 Algues en milieu AFNOR-P chauffées

Le choix de la membrane de référence s'est révélé particulièrement important. En effet, pour les premiers essais de mesure des activités phosphatase alcaline (cf. paragraphe 8.2) et acétylcholinestérase (cf. paragraphe 8.3), les membranes de référence contenaient des algues chauffées pendant 15 minutes à 90°C car la littérature montrait que ce chauffage tuait les algues [128] et inhibait les activités enzymatiques [112, 129]. Néanmoins des essais ultérieurs avec des membranes contenant des algues chauffées déposées sur les deux électrodes ont montré qu'une activité phosphatase alcaline résiduelle existait et pouvait donc perturber les mesures différentielles.

Des bioessais en microplaques ont donc été réalisés pour confirmer ce résultat. Les courbes présentées dans les paragraphes 9.3.1.1 et 9.3.1.2 représentent les activités phosphatase alcaline et estérase d'algues cultivées en AFNOR-P et chauffées à 90°C pendant 15 et 60 minutes.

9.3.1.1 Influence de la température sur l'activité phosphatase alcaline des algues

L'activité phosphatase alcaline peut être détectée sur des algues chauffées à 90°C pendant 15 minutes (Figure 45) ce qui correspond au temps de chauffage utilisé pour les membranes de référence. Par contre, pour un chauffage de 60 minutes, l'activité phosphatase alcaline est totalement inhibée (Figure 46).

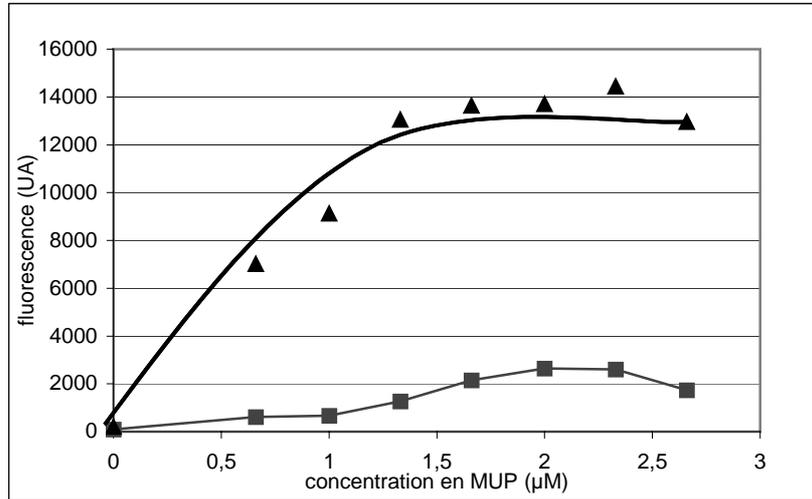


Figure 45 : Mesures en bioessais de l'activité phosphatase alcaline pour des algues en AFNOR-P chauffées pendant 15 minutes à 90°C avec ■ : algues chauffées ; ▲ : algues non chauffées (Tris-HCl 0,1M, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM)

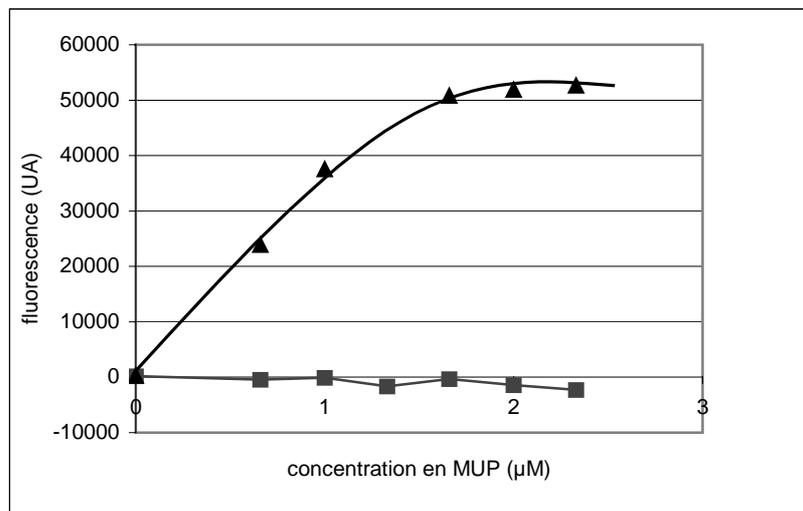


Figure 46 : Mesures en bioessais de l'activité phosphatase alcaline pour des algues en AFNOR-P chauffées pendant 60 minutes à 90°C avec ■ : algues chauffées ; ▲ : algues non chauffées (Tris-HCl 0,1M, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM)

Une étude complémentaire a été réalisée par N. Lapalu (2003) sur des algues *Chlorella vulgaris* autoclavées immobilisées sur des filtres en fibre de verre pour des mesures d'APA avec une fibre optique, l'autoclavage étant utilisé ici pour tuer les algues. Les résultats obtenus ont montré que les bactéries colonisaient alors rapidement les membranes puisqu'une forte activité phosphatase alcaline pouvait être détectée quelques heures après l'autoclavage alors que les mêmes mesures effectuées sur des algues immobilisées juste après l'autoclavage montraient une inhibition totale de l'APA. Ceci peut s'expliquer par la présence de débris cellulaires suite à l'autoclavage qui favorisent la contamination bactérienne des algues immobilisées [139].

9.3.1.2 Influence de la température sur l'activité estérase des algues

Dans le cas de l'activité estérase (Figure 47 et Figure 48), que quel que soit le temps de chauffage, l'activité estérase est inhibée. Les estérases des algues *Chlorella vulgaris* sont donc plus sensibles à la température que les phosphatases alcalines.

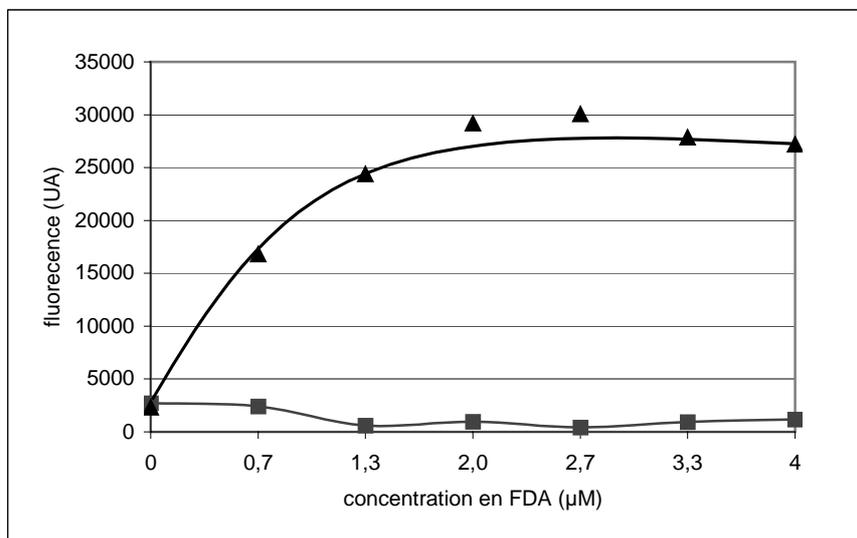


Figure 47 : Mesures en bioessais de l'activité estérase pour des algues en AFNOR-P chauffées pendant 15 minutes à 90°C avec ■ : algues chauffées ; ▲ : algues non chauffées (tampon citrate 10mM, pH 5,4 ; MgCl₂ 1mM)

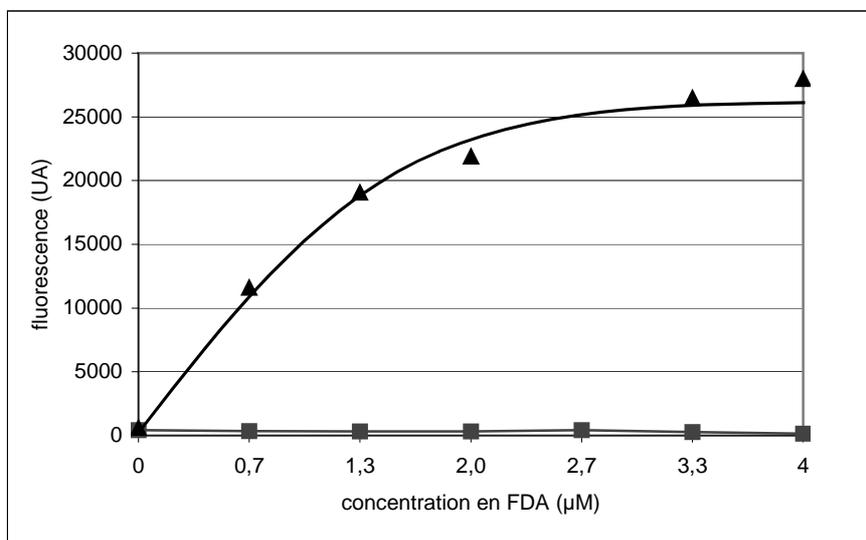


Figure 48 : Mesure de l'activité estérase pour des algues en AFNOR-P chauffées pendant 60 minutes à 90°C avec ■ : algues chauffées ; ▲ : algues non chauffées (tampon citrate 10mM, pH 5,4 ; MgCl₂ 1mM)

9.3.1.3 Conclusion

Dans le cas des mesures de la phosphatase alcaline, l'activité résiduelle des algues chauffées peut donc provoquer des perturbations des signaux lors des mesures en mode différentiel.

Une seconde raison vient remettre en cause le choix d'algues chauffées dans la membrane de référence, c'est la capacité que celles-ci ont à adsorber plus facilement les métaux. En effet, des études portant sur la comparaison des capacités d'adsorption des métaux lourds pour des algues vivantes et des algues chauffées ont mis en évidence l'influence du chauffage [140-142]. Ce phénomène peut donc introduire des perturbations lors des essais de toxicité qui, ajoutées à l'activité résiduelle des phosphatases alcalines, accentuent la variabilité intercapteur. C'est pour cette raison que d'autres membranes de référence ont été envisagées, notamment celles contenant des algues cultivées en milieu AFNOR pour lesquelles des études antérieures ont montré qu'il n'y avait pas d'activité phosphatase alcaline [20, 97].

9.3.2 Algues en milieu AFNOR

De précédentes études ont montré que les algues *Chlorella vulgaris* en milieu AFNOR ne possédait pas d'activité phosphatase alcaline mesurable [20].

En plaçant de telles algues comme référence, il a été possible de mesurer l'activité phosphatase alcaline d'algues en AFNOR-P (Figure 49). Néanmoins, l'utilisation de ces algues pose un problème dans l'optique d'une utilisation future en tant que biocapteur multi-enzymatique. En effet, les algues cultivées en AFNOR possèdent une activité cholinestérase (cf.paragraphe 8.3) et ne peuvent donc servir de référence pour ces mesures.

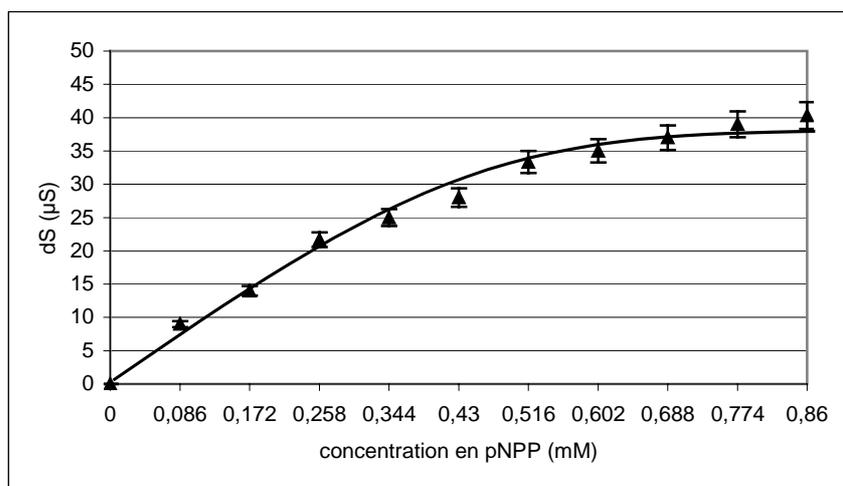


Figure 49 : Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline avec des algues AFNOR en référence mesurée avec des biocapteurs conductimétriques (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM ; pNPP 43mM)

9.3.3 Membranes « blanches »

Finalement, des membranes dites « blanches » (composées d'un mélange BSA/milieu AFNOR-P) ont été testées comme membranes de référence. Elles ont permis de tracer les cinétiques enzymatiques présentées dans les paragraphes 9.3.3.1 et 9.3.3.2.

Ce type de membrane est, par ailleurs, classiquement utilisé avec les biocapteurs électrochimiques à enzymes pures [39, 61, 132].

9.3.3.1 Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline

La cinétique de type Mickaëlien de la phosphatase alcaline obtenue avec un tel biocapteur est présentée à la Figure 50. La saturation est atteinte pour des concentrations en pNPP supérieures ou égales à 0,43mM pour une concentration algale dans la membrane active de 2.10^7 cellules/ml.

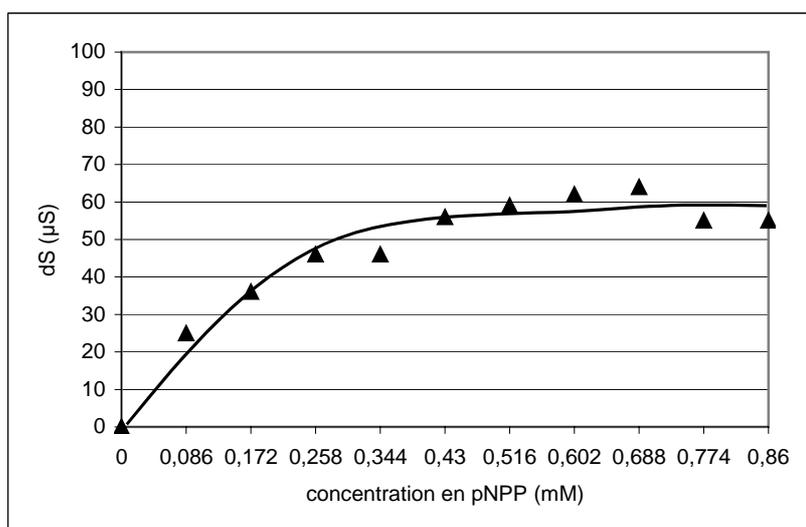


Figure 50 : Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline avec une membrane blanche en référence mesurée avec des biocapteurs conductimétriques (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM ; pNPP 43mM)

9.3.3.2 Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase

Des essais avec des membranes blanches en référence ont également été réalisés avec les biocapteurs afin d'obtenir la cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase (Figure 51).

La concentration dans le mélange BSA/algues ayant servi à la fabrication des membranes est de $2,4.10^7$ cellules/ml. La saturation est alors atteinte pour des concentrations supérieures ou égales à 6 mM d'AChCl.

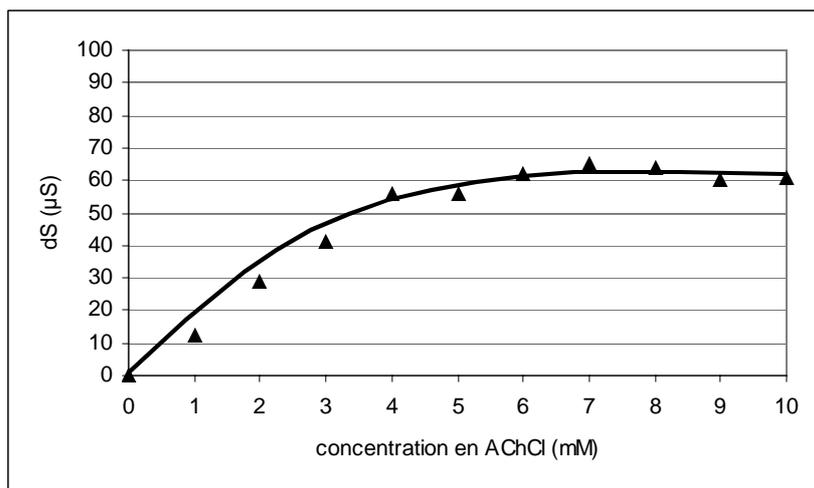


Figure 51 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase d'algues cultivées en milieu AFNOR-P mesurée avec des biocapteurs conductimétriques avec une membrane blanche en référence (KH_2PO_4 2,5mM, pH 8 ; AChCl 0,5M)

9.3.3.3 Etude du signal après dépôt de deux membranes « blanches » sur le capteur

L'évolution du signal pour un capteur sur lequel deux membranes « blanches » ont été déposées est donnée à la Figure 52 pour des injections de concentrations croissantes de pNPP. Comme les deux membranes blanches ne sont pas rigoureusement identiques, lors de la mesure différentielle, un signal dS très faible ($< 10 \mu\text{S}$) a pu être enregistré. Celui-ci ne varie pas en fonction de la concentration en pNPP injecté ce qui confirme qu'il s'agit d'un « bruit de fond », par ailleurs négligeable.

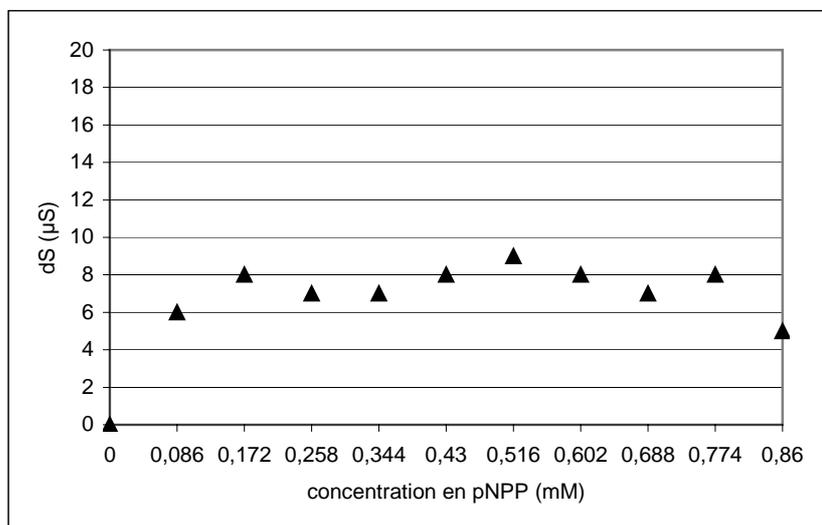


Figure 52 : Evolution du signal pour un biocapteur conductimétrique avec deux membranes blanches sur les électrodes (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl_2 1mM ; pNPP 43mM)

9.4 Optimisation des conditions opératoires

9.4.1 Choix du substrat pour les mesures d'activités enzymatiques

9.4.1.1 Substrats pour la phosphatase alcaline

Le Tableau 21 regroupe les différentes données obtenues avec trois substrats de la phosphatase alcaline.

| | Gamme de concentration | Amplitude du signal |
|-------------|------------------------|---------------------|
| MUP | 0 à 20 μ M | < 10 μ S |
| PNPP | 0 à 1 mM | > 50 μ S |
| pAPP | 0 à 10 mM | Non détecté |

Tableau 21 : Récapitulatif des données sur les substrats de la phosphatase alcaline

Les premiers essais avec les biocapteurs ont été menés en utilisant la MUP comme substrat de manière à pouvoir comparer les résultats avec ceux des bioessais. Néanmoins, comme les variations du signal avaient une amplitude trop faible pour être exploitable, ce substrat n'a pas été retenu. Ce résultat était cependant prévisible puisque la MUP est préparée dans un solvant organique et est donc peu adaptée à la détection électrochimique.

Pour des mesures électrochimiques, les substrats de la phosphatase alcaline sont le plus souvent le pNPP, également employé en colorimétrie [143] et le pAPP [144].

Dans le cas du pNPP, à partir d'une solution mère à 43 mM, il a été possible d'obtenir une cinétique de type Michaëlien avec une saturation des enzymes atteinte pour des concentrations supérieures ou égales à 0,344 mM.

Le pAPP n'a pas permis d'obtenir des résultats intéressants alors que la littérature tend à montrer que ce substrat est particulièrement bien adapté à la détection électrochimique [144, 145]. Au cours des expériences, une dégradation rapide du pAPP a été constatée et a finalement conduit à retenir le pNPP comme substrat pour les mesures d'activité phosphatase alcaline.

9.4.1.2 Substrats pour les estérases

Trois substrats ont été testés pour solliciter les estérases, la fluorescéine diacétate (FDA) utilisée en fluorescence, le chlorure de butyrylcholine BuChCl et le chlorure d'acétylcholine AChCl.

Avec la FDA, aucune modification de charges n'est produite lors de la réaction enzymatique. Il est donc cohérent de ne pas observer de variation de conductivité.

Les deux substrats classiquement utilisés pour les mesures électrochimiques sont le chlorure de butyrylcholine (BuChCl) et le chlorure d'acétylcholine (AChCl). La butyrylcholinestérase est une pseudo-cholinestérase présente dans les organismes dans des quantités plus faibles que les acétylcholinestérases ce qui implique un niveau d'activité inférieur à celui des acétylcholinestérases [146]. Ceci semble d'ailleurs se confirmer chez les cellules algales *Chlorella vulgaris* puisque seul l'AChCl a permis d'obtenir une cinétique enzymatique (Tableau 22).

| | Gamme de concentration | Amplitude du signal |
|---------------|------------------------|---------------------|
| FDA | 0 à 2 μ M | Non détecté |
| BuChCl | 0 à 10 mM | Non détecté |
| AChCl | 0 à 10 mM | < 80 μ S |

Tableau 22 : Récapitulatif des données sur les substrats des estérases

9.4.2 Influence de la concentration en tampon

9.4.2.1 Influence de la concentration en tampon Tris-HCl

En ce qui concerne la concentration du tampon Tris-HCl utilisé pour les mesures d'activité phosphatase alcaline, elle a été fixée à 10mM soit 10 fois moins que pour les bioessais (100 mM) pour réduire le bruit de fond (cf. paragraphe 9.4.2.2). Comme pour cette concentration, il a été possible d'obtenir des cinétiques enzymatiques (cf. paragraphe 8.2), elle a été conservée tout au long de l'étude.

Ce tampon est également particulièrement intéressant puisqu'il est connu pour stimuler l'activité phosphatase alcaline. Poe *et al.* (1993) ont ainsi expliqué qu'une augmentation de la concentration en tampon Tris-HCl favorisait une plus forte APA en partie sous l'effet de la force ionique mais également à cause de sa participation directe à la réaction enzymatique en tant qu'accepteur du complexe enzyme-phosphate. Une de leurs hypothèses est que l'augmentation de la force ionique (en augmentant la concentration en tampon) diminue les interactions électrostatiques facilitant ainsi une dissociation plus rapide du phosphate lié à l'enzyme [147].

La concentration en Tris-HCl de 10 mM est donc apparue comme le meilleur compromis.

9.4.2.2 Influence de la concentration en tampon KH_2PO_4

Lors de la mise au point du protocole de mesure de l'acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris* avec les biocapteurs, une concentration de tampon KH_2PO_4 de 5 mM a été utilisée pour les premières expériences mais il n'a pas été possible de mettre en évidence des variations de conductivité. Par contre, pour une concentration de 2,5 mM en tampon, une cinétique enzymatique a pu être tracée. Pour un même biocapteur conductimétrique, la Figure 53 présente ainsi les signaux détectés pour des concentrations en KH_2PO_4 de 5 mM et 2,5 mM.

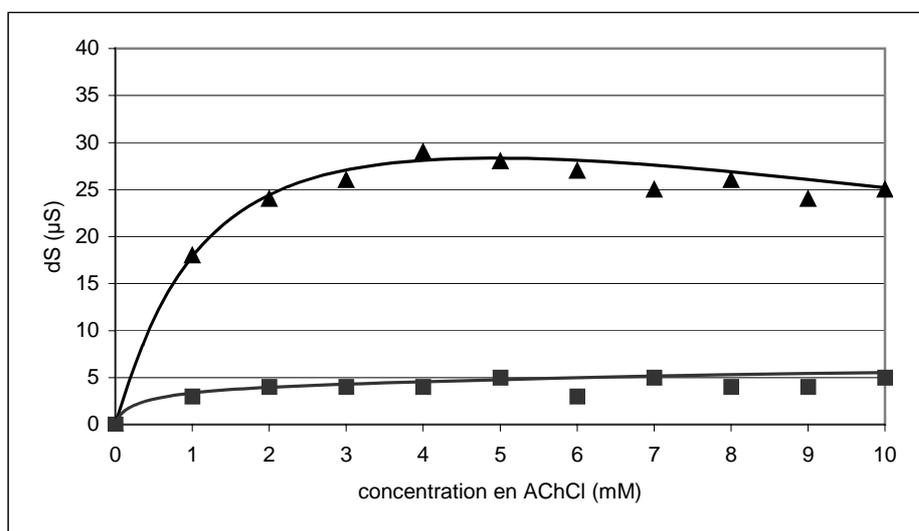


Figure 53 : Cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase mesurée avec des biocapteurs conductimétriques pour deux concentrations en KH_2PO_4 avec ▲ : KH_2PO_4 2,5mM ; ■ : KH_2PO_4 5mM (KH_2PO_4 5mM ou 2,5mM, pH 8; membrane blanche en référence)

Soldatkin *et al.* (1994) ont également mis en évidence cette diminution des signaux avec l'augmentation de la force ionique du tampon en utilisant des biocapteurs conductimétriques à glucose [122]. En effet, lorsque la conductivité globale du milieu réactionnel augmente, le bruit de fond est plus important et l'amplitude de la réponse du capteur diminue [116, 117].

De plus, pour l'acétylcholinestérase, Tougu et Kesvatera (1996) ont souligné la baisse d'affinité des acétylcholinestérases pour leurs substrats anioniques tels que l'AChCl (soit une baisse d'activité enzymatique) lorsque la concentration du milieu en sels inorganiques augmente [148]. Les auteurs ont ainsi avancé plusieurs explications, notamment la fixation possible des cations des sels sur les groupements anioniques de l'enzyme (en particulier le site actif, cf. Figure 31) et/ou un effet masque des interactions électrostatiques favorables à la fixation du substrat à cause de la force ionique élevée. Ces deux mécanismes (bruit de fond pour les biocapteurs conductimétriques et baisse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat lorsque la concentration en tampon augmente) pourraient même se combiner ce qui permettrait de justifier la très nette baisse du signal dS pour 5 mM de KH_2PO_4 .

Une concentration de 2,5 mM pour le tampon KH_2PO_4 a finalement été retenue pour la suite de l'étude.

9.4.3 Conservation du signal au cours du temps

Le suivi quotidien de l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* immobilisées sur des biocapteurs conductimétriques conservés à 4°C pendant 30 jours dans du milieu AFNOR-P a permis de montrer la stabilité du signal dS pendant 20 jours (Figure 54).

La stabilité du signal des biocapteurs est finalement liée à la stabilité de la phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* puisqu'après la période de starvation, celle-ci est stable pendant 30 jours environ pour un stockage à 4°C.

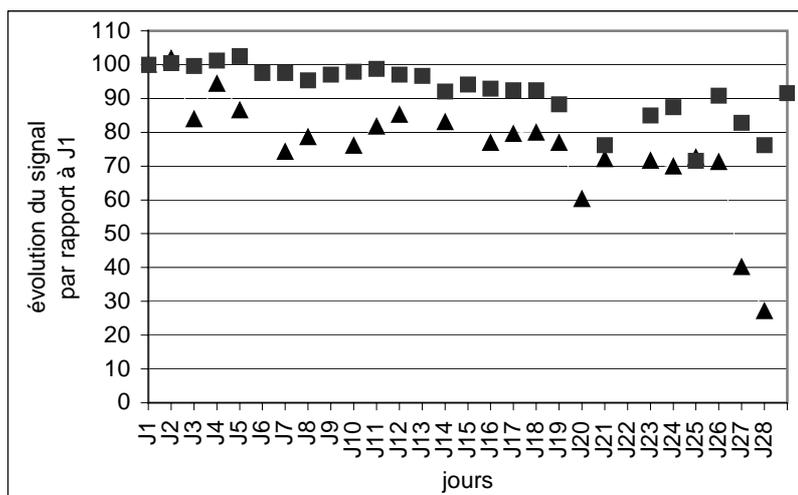


Figure 54 : Evolution du signal de deux biocapteurs conductimétriques stockés à 4°C dans du milieu AFNOR-P pendant 30 jours avec ■ : biocapteur 1 ; ▲ : biocapteur 2 (Tris-HCl 10mM, pH 8.5 ; MgCl_2 1mM, algues AFNOR-P chauffées en référence)

9.5 Conclusion

Les différentes optimisations finalement retenues pour les biocapteurs électrochimiques à cellules algales sont regroupées dans le Tableau 23.

| | | |
|-----------------------------------|--|---|
| Immobilisation (membranes) | Nature de la membrane | BSA à 10 mg GA _{vap} : 20 minutes d'exposition |
| | Concentration de <i>Chlorella vulgaris</i> | 4-5.10 ⁷ cellules/ml |
| | Membrane de référence | Blanche : milieu BSA/AFNOR-P |
| Conditions opératoires | Pour l'APA | pNPP : 0 à 1 mM TRIS-HCl à 10 mM, pH 8,5 |
| | Pour l'AChE | AChCl : 0 à 10 mM KH ₂ PO ₄ à 2,5 mM, pH 8 |

Tableau 23 : Optimisations réalisées sur les biocapteurs conductimétriques à cellules algales

10 Conclusion générale

Les paragraphes précédents étaient consacrés à la mise au point de biocapteurs électrochimiques à cellules algales permettant la mesure des activités phosphatase alcaline et acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris* immobilisées.

Un certain nombre de remarques peuvent être faites concernant les caractéristiques de ces biocapteurs à cellules entières.

Le **temps de réponse** des biocapteurs est rapide puisque, suite à une injection de substrat, la stabilisation du signal dS se fait en quelques minutes (5 à 7 minutes).

Une telle constatation sur la rapidité de la réponse de la phosphatase alcaline algale et estérase a également été observée avec un biocapteur à fibre optique dans la thèse de Barthet (2003) [51]. En effet, dès l'injection de substrat (MUP ou FDA), le produit fluorescent de la réaction (MUF ou fluorescéine) est détecté. Ce temps de réponse très court est lié à la localisation membranaire de certaines de ces enzymes et permet ainsi aux biocapteurs électrochimiques à cellules algales de répondre à une des exigences des biocapteurs environnementaux, à savoir des temps de réponse réduits facilitant les mesures en continu [cf. Tableau 13].

La **répétabilité** des mesures avec un biocapteur à cellules algales est, quant à elle, d'environ $\pm 8\%$ par rapport au dS moyen ce qui est légèrement plus élevé que pour les biocapteurs à enzymes pures pour lesquels la déviation standard est généralement inférieure à 5% [39, 61, 122].

La **reproductibilité** intercapteur est influencée par les caractéristiques des membranes actives.

Celles-ci n'ont pas les mêmes dimensions et formes (à cause du dépôt manuel et de l'étape de réticulation) et la même concentration en biorécepteurs (selon la culture algale utilisée pour préparer les membranes). Les différences de concentrations enzymatiques dans les membranes actives suite au dépôt manuel peuvent contribuer à expliquer la variabilité intercapteur observée. L'inhomogénéité de la répartition des biorécepteurs dans la membrane est également à prendre en compte pour expliquer ce phénomène [134]. En effet, l'immobilisation de cellules entières dans des membranes à base d'albumine ne permet pas une répartition homogène des biorécepteurs car les cellules ont une taille non négligeable ($< 10 \mu\text{m}$) et peuvent former des amas (cf. paragraphe 9.2.4). A ces problèmes de reproductibilité liés aux membranes s'ajoute le fait que la réponse d'organismes vivants à un même stimulus peut différer d'un individu à l'autre.

Ceci peut finalement expliquer la plus forte variabilité inter et intra capteurs observée avec les biocapteurs à cellules algales.

Selon les travaux, la reproductibilité apparaît comme un des paramètres les plus variables. Ainsi, Nyamsi Hendji *et al.* (1993) ont développé des biocapteurs ISFET à cholinestérases pures pour lesquels des variations d'amplitude entre biocapteurs de $\pm 25\%$ ont été observées [90]. Mai Anh *et al.* (2002) ont, quant à eux, développé des biocapteurs à tyrosinase pour lesquels la variabilité intercapteur a été estimée à $\pm 7-8\%$ [39].

La **stabilité** de la réponse des biocapteurs conductimétriques à cellules algales pendant 20 jours est satisfaisante pour une utilisation *in situ*. Elle correspond à la durée de conservation des algues en milieu AFNOR-P après la période de starvation [20, 52, 97].

Selon les biocapteurs environnementaux, les durées de conservation très diverses s'expliquent par le choix du biorécepteur et de la technique d'immobilisation employée. Ainsi, certaines membranes enzymatiques peuvent se conserver plusieurs mois sans perte significative d'activité [75], alors que d'autres gardent un niveau d'activité stable tout au plus pendant un mois [122]. En ce qui concerne les biocapteurs à cellules entières, leur durée de vie est largement

conditionnée par la durée de vie de la cellule immobilisée. Les membranes utilisées pour développer des biocapteurs optiques à cellules algales basés sur la fluorescence chlorophyllienne ou l'activité phosphatase alcaline se conservent généralement un mois [21].

Les biocapteurs électrochimiques à cellules algales possèdent donc globalement des caractéristiques satisfaisantes au regard de la littérature pour être utilisés comme outils de contrôle de la contamination chimique des écosystèmes.

**CHAPITRE IV. APPLICATION DES BIOCAPTEURS
CONDUCTIMETRIQUES A CELLULES ALGALES
A LA DETECTION DE METAUX LOURDS ET DE
PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES ET
CARBAMATES**

11 Essais de toxicité avec les métaux lourds

Les essais de toxicité présentés dans ce chapitre ont été menés exclusivement avec des capteurs conductimétriques (cf. paragraphe 8.1).

11.1 Protocole des essais de toxicité pour les biocapteurs

11.1.1 Choix de la concentration algale des membranes actives pour les essais de toxicité

Des essais préliminaires ont permis de confirmer que le taux d'inhibition des activités enzymatiques augmentait pour des concentrations algales décroissantes dans la membrane active, ce qui s'explique par le fait que la quantité d'organismes cibles est alors plus faible.

A partir des conclusions du chapitre III quant à la concentration algale optimale dans la membrane, il a été décidé d'utiliser des membranes actives préparées à partir de solutions algales à $2-3 \cdot 10^7$ cellules/ml. Cette gamme de concentration en algues représente le meilleur compromis entre un niveau d'activité suffisant pour être détecté et une inhibition significative des activités enzymatiques des microorganismes.

Remarque : Même en fixant la concentration algale pour les membranes actives, des signaux dS d'amplitude différente peuvent néanmoins être obtenus puisque d'autres paramètres, tels que la répartition des cellules algales, interviennent (cf. paragraphe 9.2.4). Le paragraphe 11.1.6 s'intéressera justement aux problèmes liés à la variabilité intercapteur.

Dans un second temps, une optimisation du protocole de mise en œuvre des essais de toxicité a été envisagée. Plusieurs paramètres ont donc été étudiés, notamment l'influence du rinçage, la durée d'exposition aux solutions tests...

11.1.2 Influence du rinçage

L'influence du rinçage après exposition à une solution test a été étudiée. Deux paramètres ont été pris en compte, la nature de la solution de rinçage (eau Millipore ou milieu réactionnel) et la durée de rinçage (de quelques secondes à 5 minutes).

Cette étude a été réalisée avec des biocapteurs exposés pendant 30 minutes à des solutions de Cd^{2+} à 10ppb et 100ppb. Aucune influence de la composition du milieu de rinçage ainsi que de sa durée n'a alors pu être observée.

Finalement, afin de faciliter la mise en œuvre, un simple rinçage à l'eau Millipore pendant quelques secondes a été retenu lors des essais de toxicité.

11.1.3 Choix de la durée d'exposition aux solutions tests

La durée d'exposition à une solution test doit tenir compte de plusieurs paramètres. En particulier, elle doit être suffisante pour se traduire par une inhibition de l'activité enzymatique. Toutefois, lors d'expositions prolongées de plus de 120 minutes (120, 180 et 240 minutes), des problèmes de stabilité des signaux après exposition ont pu être constatés avec certains biocapteurs. De plus, l'utilisation future des biocapteurs comme outils d'alarme précoce sur site suppose de réduire les temps de contact afin de multiplier les mesures. Des durées d'exposition inférieures à 60 minutes semblent donc être les plus appropriées. A ce titre, Rogers et Lin (1992) soulignent qu'une des exigences pour l'application des biocapteurs dans le domaine de l'environnement est la rapidité de la réponse, ils considèrent d'ailleurs que la durée de la mesure ne doit pas excéder 60 minutes [149].

Une exposition de 60 minutes à une solution test semble donc être le compromis permettant de prendre en compte l'ensemble de ces exigences.

11.1.4 Contrôle de la stabilité du signal

Préalablement à toute exposition prolongée à une solution test, les signaux dS_{1avt} et dS_{2avt} sont mesurés. La seconde mesure est réalisée après une immersion dans le milieu réactionnel correspondant à la durée d'exposition à la solution test réalisée par la suite.

Cette double mesure permet de s'assurer de la stabilité opérationnelle du biocapteur et de disposer de deux mesures de référence pour calculer le taux d'activité résiduelle après exposition (ce taux est ainsi défini par rapport à la moyenne de ces deux signaux).

Les biocapteurs dont le signal n'est pas stable au cours du temps sont facilement détectés grâce à cette double mesure de référence.

Le contrôle visuel des membranes avant et après chaque essai a permis de mettre en évidence que ces problèmes de stabilité étaient généralement liés à une mauvaise adhésion de la membrane. La technique d'immobilisation du biorécepteur étant exclusivement manuelle, un mauvais dépôt du mélange BSA/algues (quantité trop importante de mélange, mauvais recouvrement des cellules de détection...) donne, dans certains cas, un biocapteur inexploitable.

11.1.5 Choix de la concentration de substrat pour les essais de toxicité

Afin de déterminer la concentration en pNPP la plus adaptée aux essais de toxicité, des cinétiques enzymatiques ont été réalisées avec un biocapteur avant et après une exposition à une solution de Cd^{2+} à 100 ppb. L'évolution du taux d'inhibition de l'APA en fonction de la concentration de pNPP a ainsi pu être déterminée (Figure 55).

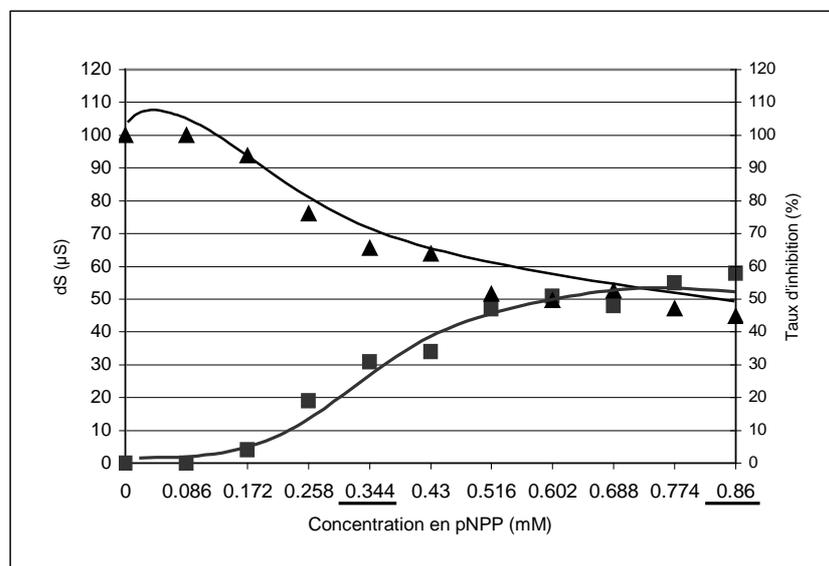


Figure 55 : Cinétique enzymatique après exposition à 100ppb de Cd^{2+} pendant 30 minutes (■) et évolution du taux d'inhibition de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en pNPP (▲) (mesure avec un biocapteur : Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 1 mM ; algues AFNOR en référence)

Il apparaît que le taux d'inhibition est plus élevé pour les concentrations les plus faibles de substrat : pour 0,344 mM de pNPP, le taux d'inhibition est ainsi de 68% alors que pour 0,86 mM de pNPP, il est de 45%. Tout au long de cette étude, il est toutefois apparu que cette influence de la concentration en substrat sur le taux d'inhibition ne pouvait être observée que pour les essais

de toxicité avec de fortes concentrations en inhibiteur comme c'est le cas pour les résultats de la Figure 55 où la concentration en Cd^{2+} est de 100 ppb. La répartition inhomogène des cellules algales dans les membranes (zone « blanche » entre les cellules algales, amas de cellules) peut être une des hypothèses à avancer pour expliquer ce phénomène. En effet, une concentration de saturation en substrat pourrait ainsi favoriser la sollicitation d'algues non inhibées situées à proximité des parties conductrices de l'électrode pour lesquelles le signal alors détecté est plus élevé et pourrait conduire à une diminution du taux d'inhibition global d'autant plus marqué que la concentration en toxique est importante.

Lors des essais de toxicité avec exposition prolongée, les signaux $dS_{1\text{avt}}$ et $dS_{2\text{avt}}$ ont donc été déterminés pour deux concentrations en substrat, une concentration faible (0,344 mM) pour laquelle le signal se situe dans la partie linéaire de la cinétique enzymatique ($dS_{1\text{avt}}$) et une concentration plus élevée (0,86 mM) pour laquelle les enzymes sont saturées ($dS_{2\text{avt}}$). Il est apparu au cours de cette étude que le principal intérêt d'utiliser ces deux concentrations de substrat était de pouvoir confirmer ainsi une inhibition lorsque le taux d'activité résiduelle était proche de la limite des 85% fixée au paragraphe 11.1.6 suivant.

Pour les essais de toxicité avec exposition directe, seule la concentration de saturation a été utilisée, soit 0,86 mM de pNPP.

11.1.6 Analyse des résultats des essais de toxicité

Il a été précisé dans le chapitre II (cf. paragraphes 6.3 et 7.2) que, pour les essais de toxicité avec les **biocapteurs**, les taux d'inhibition sont significatifs s'ils sont supérieurs à **15%** soit un taux d'activité enzymatique résiduelle après exposition à un toxique inférieur à **85%**.

Dans le cas des **bioessais**, les taux d'inhibition sont significatifs s'ils sont supérieurs à **10%** soit un taux d'activité enzymatique résiduelle après exposition à un toxique inférieur à **90%**.

Pour chaque concentration en toxique testée, un biocapteur différent est utilisé. Or, les conclusions du chapitre III ont mis en évidence une variabilité intercapteur dépendant de plusieurs paramètres qu'il est nécessaire de prendre en compte dans l'analyse des résultats des essais de toxicité.

Tout d'abord, l'amplitude des signaux est influencée directement par la charge algale de la membrane active (fixée ici entre 2 et $3 \cdot 10^7$ cellules/ml) ainsi que par la répartition des cellules (cf. paragraphe 9.2.4) et varie donc d'un biocapteur à l'autre. En comparant l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude, il a été observé que les taux d'inhibition les plus élevés étaient obtenus pour les signaux d'amplitude dS les plus faibles comme l'illustrera la Figure 79.

L'inhomogénéité de la répartition des cellules algales dans la membrane peut également influencer la réponse aux toxiques (cf. paragraphe 11.1.1) puisque, selon les biocapteurs, l'accessibilité aux cellules cibles est alors différente (en fonction des amas de cellules, de l'existence de « zones blanches »).

Enfin, la réponse propre des organismes vivants aux stimuli est également un élément d'explication des variabilités de réponse aux toxiques.

Au niveau des essais de toxicité, ces remarques se traduisent donc par une variabilité des taux d'activité enzymatique résiduelle pour des biocapteurs distincts comme le montre la Figure 56.

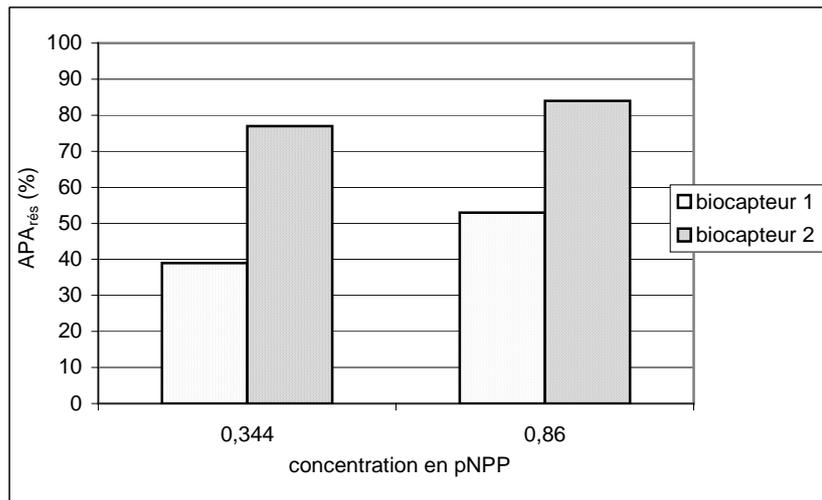


Figure 56 : Taux d'APA résiduelle après une exposition de 30 minutes à 100ppb de Cd²⁺ mesurées avec 2 biocapteurs différents

Il apparaît donc délicat de comparer les taux d'activité résiduelle obtenus avec des biocapteurs différents. Pour l'ensemble des biocapteurs utilisés au cours de cette étude, la mise en évidence d'une relation dose-effet entre le taux d'activité résiduelle et la concentration en toxique est alors difficile à établir. Pour les graphes présentés dans les paragraphes suivants, il a finalement été décidé que des biocapteurs dont les signaux dS possèdent des amplitudes du même ordre seraient sélectionnés.

Une des conséquences de ces remarques est que la corrélation entre taux d'activité résiduelle et concentration en toxique ne sera pas étudiée. Cette étude s'est uniquement intéressée à la possibilité de mettre en évidence des toxiques dans des gammes de concentration réalistes par rapport à celles susceptibles d'être présentes dans le milieu aquatique, la valeur du taux d'activité résiduelle n'étant pas, en soi, la donnée la plus importante.

Il est important de souligner que cette variabilité des taux d'activité résiduelle mesurés pour des conditions d'exposition à un toxique identiques se retrouve également entre des séries de bioessais utilisant des cultures de *Chlorella vulgaris* distinctes. Ce résultat illustre la réponse propre d'une culture algale aux différentes sollicitations (niveau d'activité enzymatique, réponse au toxique) ... (Figure 57). Une des hypothèses pouvant expliquer ces variations entre bioessais est l'influence éventuelle de la durée de conservation à 4°C sur la réponse de la culture algale à une exposition à un toxique. En effet, entre différentes séries d'essais (ceci est d'ailleurs également valable pour les biocapteurs), les algues utilisées ont été, auparavant, conservées plus ou moins longtemps (le niveau d'activité enzymatique restant, pour sa part, stable pendant 1 mois après la période de starvation [20]).

A la différence des biocapteurs, les bioessais permettent, toutefois, de mettre en évidence des relations dose-effet lors des expositions aux toxiques. En effet, les mesures d'activité résiduelle pour des algues libres sont réalisées simultanément sur une même microplaque avec une même culture de *Chlorella vulgaris* exposées à plusieurs concentrations de toxiques.

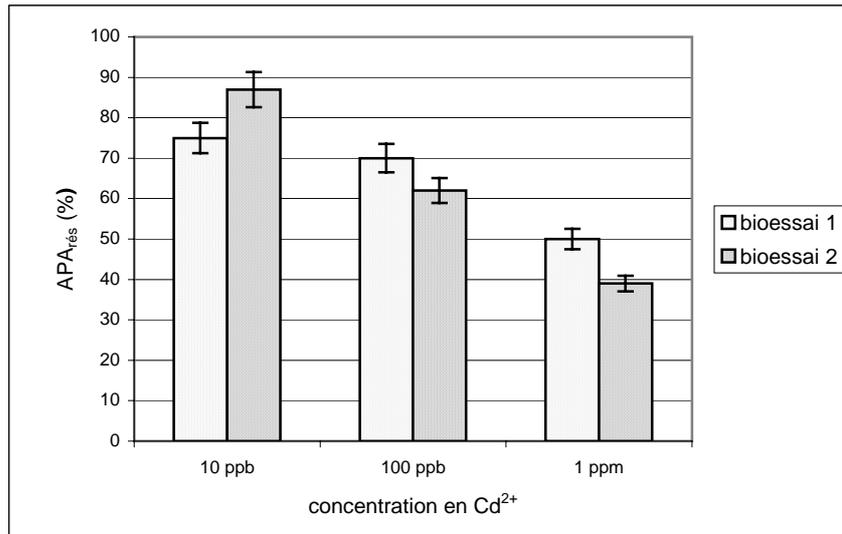


Figure 57 : Taux d'APA résiduelle après une exposition de 240 minutes à des ions Cd²⁺ mesurées sur deux séries de bioessais (algues libres)

Remarques :

1. Des mesures en triplicat des valeurs dS_{avant} et $dS_{\text{après}}$ ont été réalisées, il a alors été vérifié que la variation du taux d'activité résiduelle pour un même biocapteur n'excédait pas $\pm 8\%$ par rapport à la moyenne. Toutefois, pour réduire les durées d'expérimentation, ces triplicats n'ont pas été reproduits pour chaque biocapteur ce qui explique l'absence de barres d'erreur sur les figures présentées dans les paragraphes suivants.

2. En bioessais, l'utilisation de microplaques de 96 puits facilite l'obtention de réplicats avec une bonne répétabilité (cf. barres d'erreur sur les bioessais), la variabilité interpuits étant de $\pm 5\%$ par rapport à la moyenne.

11.2 Influence du cadmium sur l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris*

11.2.1 Essais avec des biocapteurs conductimétriques

11.2.1.1 Exposition directe

L'exposition directe à différentes concentrations de Cd^{2+} a permis de mettre en évidence une activation de l'activité phosphatase alcaline (APA) pour les faibles concentrations de Cd^{2+} (20% pour 0,1 ppb et 1 ppb et 40 % pour 10 ppb) avec certains biocapteurs.

Pour les concentrations en Cd^{2+} supérieures, 100 ppb et 1 ppm, une inhibition significative a été obtenue avec des taux d'APA résiduelle (APA_{res}) de respectivement, 70% et 42% (Figure 58).

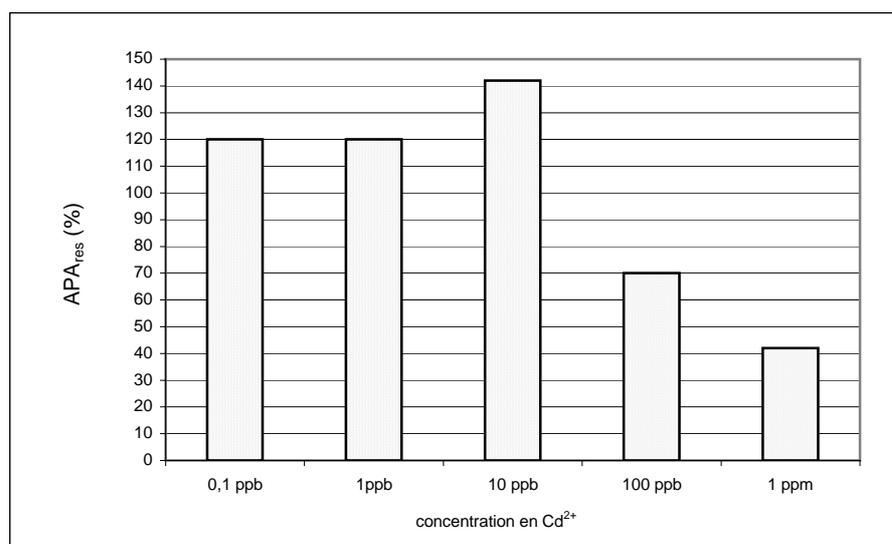


Figure 58 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition directe à Cd^{2+} (mesures avec biocapteurs : Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl_2 1mM ; pNPP 0,86mM)

11.2.1.2 Exposition prolongée

La Figure 59 regroupe les taux d'APA résiduelle mesurés pour quatre biocapteurs après une exposition de 30 minutes à différentes concentrations en Cd^{2+} .

Une inhibition significative de l'activité enzymatique a pu être constatée pour 1ppm ($\text{APA}_{\text{res}} \approx 45\%$ pour 0,344 mM et 0,86 mM de pNPP) et 100ppb ($\text{APA}_{\text{res}} \leq 84\%$ pour 0,344 mM et 0,86 mM de pNPP). Pour 10ppb, les taux d'APA résiduelle sont d'environ 85% pour les deux concentrations en pNPP. Enfin, une absence d'inhibition pour 1ppb a pu être constatée ($\text{APA}_{\text{res}} \approx 100\%$ pour les deux concentrations de pNPP).

Pour les expositions prolongées à des solutions de Cd^{2+} , il est important de noter qu'aucune activation de l'APA n'a pu être constatée quelle que soit la concentration en Cd^{2+} testée.

Au vu de ces résultats, ainsi que de l'ensemble des autres essais réalisés au cours de cette étude, et puisque l'inhibition est considérée comme significative si le taux d'APA résiduelle est inférieur ou égal à 85%, la limite de détection de Cd^{2+} , pour une exposition de 30 minutes, peut donc être fixée à 10 ppb.

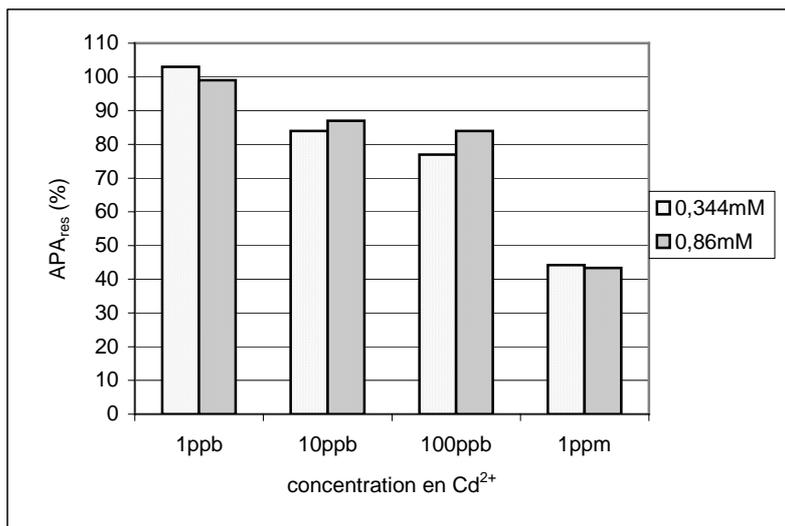


Figure 59 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition de 30 minutes à Cd²⁺ pour deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) (mesures avec biocapteurs : Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM)

Des essais complémentaires ont été réalisés pour 1 ppb en augmentant la durée d'exposition à 60 minutes. La Figure 60 ne montre alors aucune influence de cette concentration en Cd²⁺ sur l'APA.

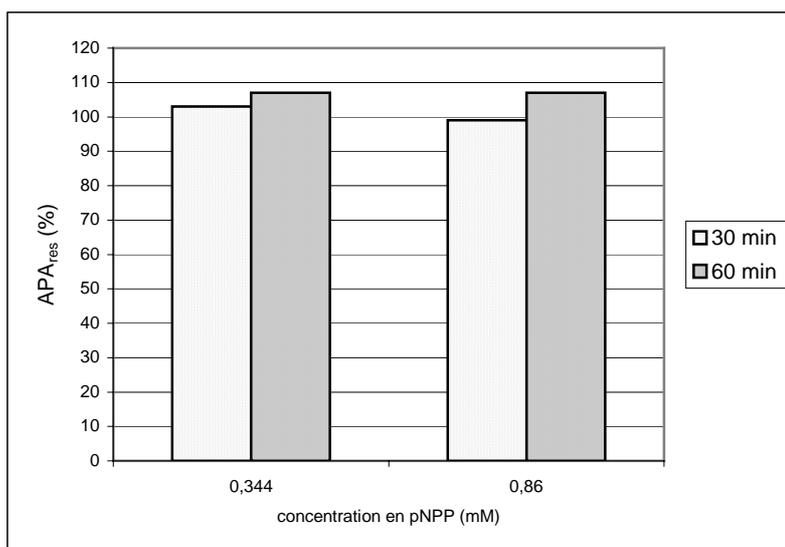


Figure 60 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour des expositions de 30 et 60 minutes à 1ppb de Cd²⁺ pour les deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) (mesures avec biocapteurs : Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM)

11.2.2 Mesures en bioessais

11.2.2.1 Exposition directe

La Figure 61 représente l'évolution du taux d'APA résiduelle mesurée en bioessai pour une exposition directe aux ions Cd^{2+} .

Une relation dose-effet peut être observée : l'activité diminue pour des expositions à des concentrations croissantes de Cd^{2+} .

L'inhibition n'est cependant significative que pour des concentrations en Cd^{2+} supérieures ou égales à 1 ppm ($\text{APA}_{\text{res}} \leq 85\%$) alors que pour les concentrations en Cd^{2+} de 10 ppb et 100 ppb ($\text{APA}_{\text{res}} \geq 95\%$), aucun effet ne peut donc être mis en évidence. Pour une concentration de 1 ppb, une légère activation du signal a pu être constatée, le taux d'APA résiduelle étant de 110%.

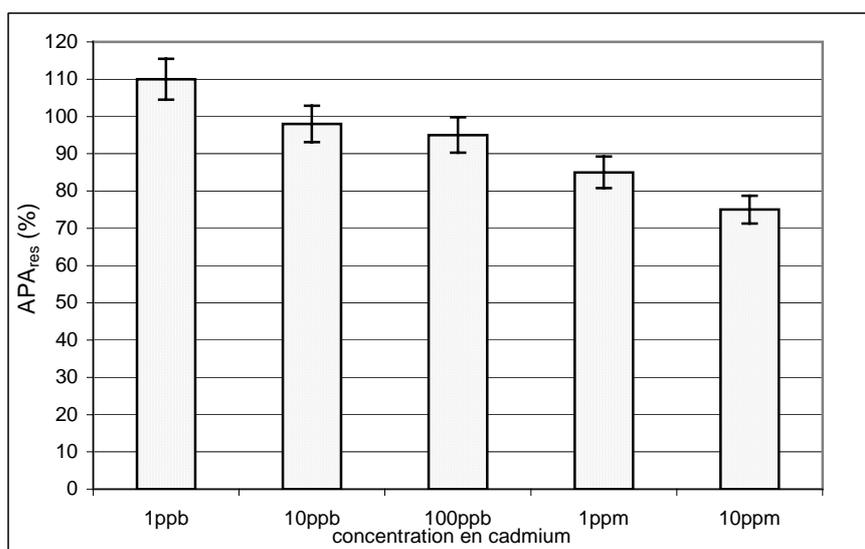


Figure 61 : Evolution du taux d'APA résiduelle après une exposition directe à Cd^{2+} (mesure en bioessais : Tris-HCl 0,1M, pH 8,5 ; MgCl_2 10mM ; MUP 7 μM)

11.2.2.2 Exposition prolongée

Pour des expositions de 120 et 240 minutes, les ions Cd^{2+} agissent selon une relation dose-effet sur l'APA d'algues *Chlorella vulgaris* mesurée en bioessais (Figure 62).

L'influence du temps de contact des algues avec le toxique apparaît également clairement. Les taux d'APA résiduelle sont, en effet, significativement plus faibles pour 240 minutes que pour 120 minutes. En allongeant la durée d'exposition, le toxique est alors à même d'inhiber davantage d'enzymes algales.

Pour 120 minutes de contact avec la solution toxique, des niveaux d'inhibition significatifs sont obtenus pour des concentrations en Cd^{2+} supérieures ou égales à 1 ppm ($\text{APA}_{\text{res}} = 85\%$ et 80% pour 1 ppm et 10 ppm respectivement).

Pour une exposition deux fois plus longues (240 minutes), l'activité phosphatase alcaline est inhibée pour des concentrations en Cd^{2+} supérieures ou égales à 1 ppb ($\text{APA}_{\text{res}} \leq 70\%$ sur la gamme de concentration de Cd^{2+}).

Ces résultats, ainsi que ceux obtenus après une exposition directe (cf. paragraphe 11.2.2.1), suggèrent que, pour obtenir une inhibition importante de l'APA par les ions Cd^{2+} , 240 minutes de contact sont nécessaires. En effet, pour des expositions plus courtes (directe et 120 minutes), les taux d'APA résiduelle sont proches pour les concentrations en Cd^{2+} testées.

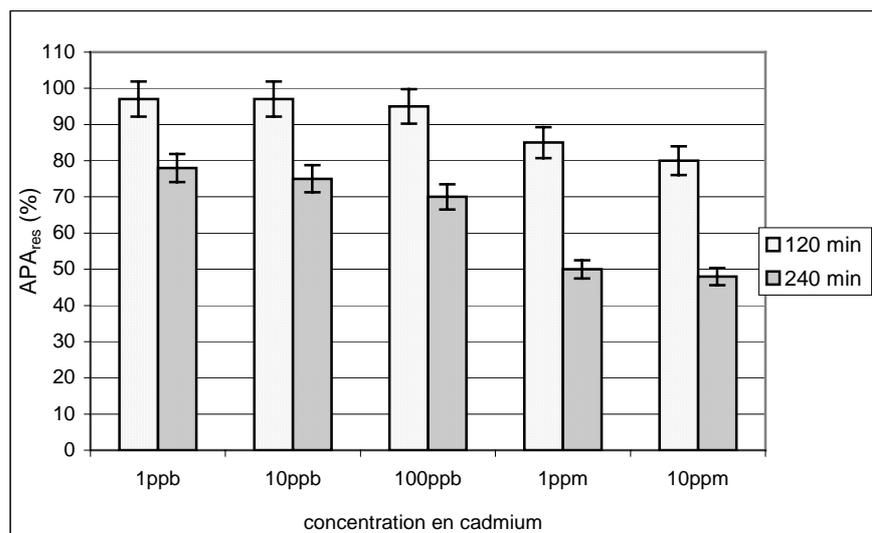


Figure 62 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour des expositions de 120 et 240 minutes à Cd^{2+} (mesure en bioessais : Tris-HCl 0,1M, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 10mM ; MUP 7 μ M)

11.2.3 Conclusion

Lors des expositions directes à Cd^{2+} aussi bien pour les biocapteurs que pour les bioessais, la principale observation est l'activation de l'APA pour les faibles concentrations de Cd^{2+} .

Une telle conclusion avait pu être précédemment tirée de travaux sur l'APA de *Chlorella vulgaris* mesurée en bioessai par Bêchêtoille (2001) [131]. Olabarrieta *et al.* (2000) ont également observé une activation de l'activité phosphatase de cellules animales après exposition à des ions Cd^{2+} [150].

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées, notamment la stimulation des défenses cellulaires qui pourraient se traduire par une activation de certaines activités enzymatiques. On peut également supposer que Cd^{2+} , à de faibles concentrations et pour des expositions directes, agit comme un ion activateur en se fixant sur le site de fixation de Mg^{2+} . La possibilité de cette substitution a été envisagée par Linden *et al.* (1977) [95].

Pour les expositions prolongées, les comparaisons entre les taux d'APA résiduelle mesurés avec des biocapteurs et en bioessais montrent que le niveau d'inhibition est plus élevé lorsque les essais de toxicité sont réalisés avec les biocapteurs.

Ainsi pour une concentration en Cd^{2+} de 1 ppm, le taux d'APA résiduelle mesuré avec un biocapteur après une exposition de 30 minutes est inférieur à 50% alors qu'en bioessai, il est de 85% pour une exposition de 120 minutes et de 50% pour une exposition de 240 minutes. Etant donné que la quantité de cellules algales immobilisées sur les biocapteurs est largement inférieure à celle utilisée en bioessai, le ratio [algues]/[Cd^{2+}] est plus faible pour les biocapteurs : les taux d'inhibition sont plus élevés puisque, pour une même concentration en toxique, la quantité d'organismes cibles est plus faible. Pour obtenir des niveaux d'inhibition similaires en bioessai, les durées d'exposition sont nécessairement plus longues.

Les biocapteurs conductimétriques à cellules algales semblent donc plus sensibles que les bioessais puisqu'ils répondent plus rapidement et avec des taux d'inhibition plus importants.

11.3 Influence du zinc sur l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris*

11.3.1 Essais avec des biocapteurs conductimétriques

11.3.1.1 Exposition directe

Les taux d'APA résiduelle pour une exposition directe à des solutions de Zn^{2+} sont présentés à la Figure 63.

Pour des concentrations comprises entre 10 ppb et 10 ppm, une inhibition a pu être détectée avec des taux d'APA identiques (80% en moyenne) pour la gamme de concentrations en Zn^{2+} testées. Pour une concentration de 1 ppb, aucun effet inhibiteur n'a été noté. De plus, on peut souligner qu'aucune activation de l'activité enzymatique ne peut être observée quelle que soit la concentration en Zn^{2+} .

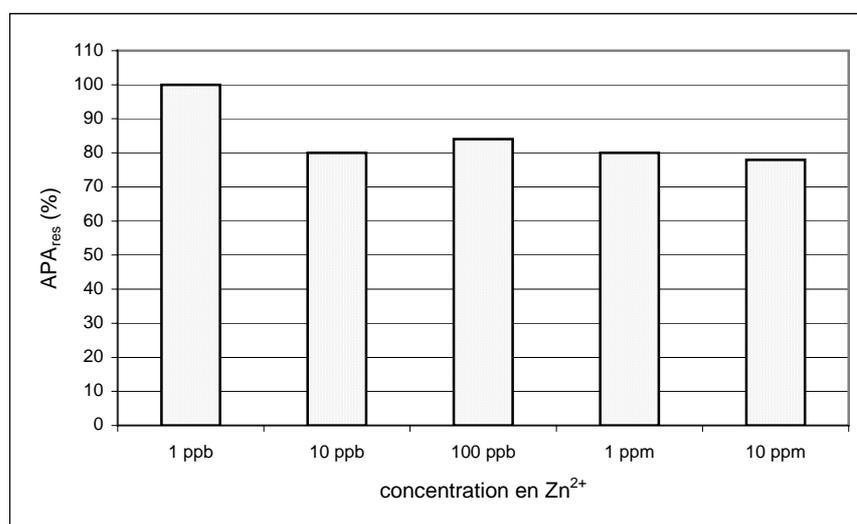


Figure 63 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition directe à Zn^{2+} (mesures avec biocapteurs : Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 1mM ; pNPP 0,86mM)

11.3.1.2 Exposition prolongée

Une exposition de 30 minutes à différentes concentrations de Zn^{2+} a permis de mettre en évidence l'inhibition de l'activité enzymatique pour 100 ppb (APA_{res} entre 70-75% selon la concentration en pNPP) et 1ppm (APA_{res} entre 52-67% selon la concentration de pNPP).

Pour les concentrations plus faibles, 10 ppb et 1 ppb, aucune inhibition n'a pu être observée.

Il est alors possible de fixer la limite de détection pour Zn^{2+} , pour des expositions de 30 minutes, à 10ppb. Cette limite de détection a été confirmée lors de cette étude par de nombreux autres essais.

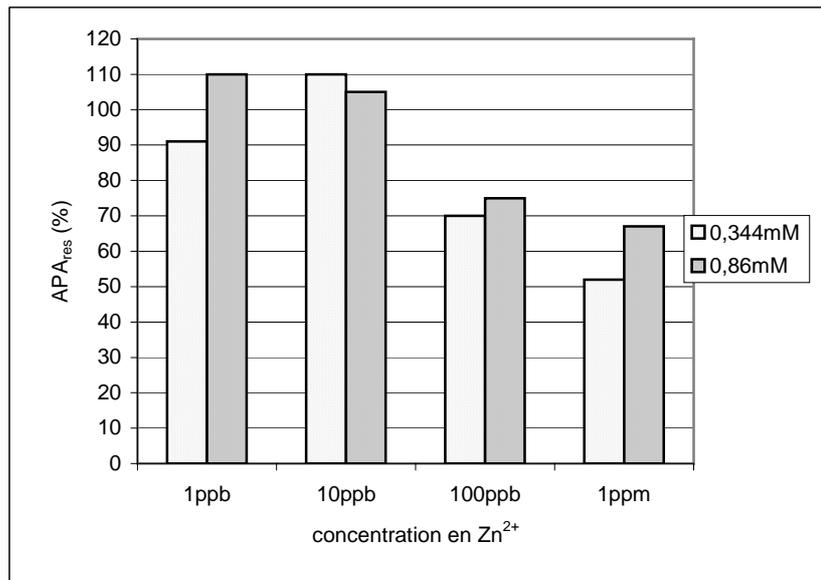


Figure 64 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition de 30 minutes à Zn²⁺ pour deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) (mesures avec biocapteurs : Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM)

En allongeant la durée d'exposition à 60 minutes pour 1 ppb, aucune inhibition de l'activité enzymatique n'a été constatée.

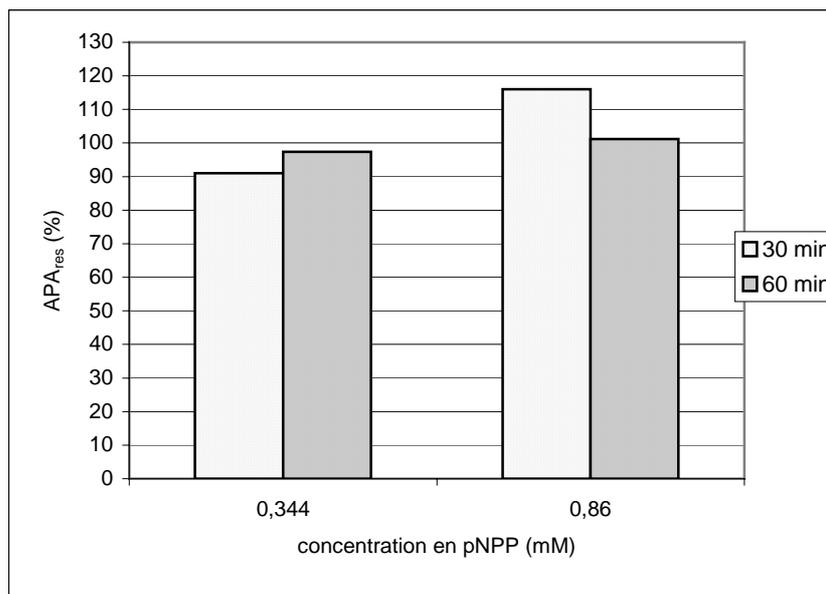


Figure 65 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour des expositions de 30 et 60 minutes à 1ppb de Zn²⁺ pour deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) (mesures avec biocapteurs : Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl₂ 1mM)

11.3.2 Mesures en bioessais

11.3.2.1 Exposition directe

La Figure 66 montre l'évolution du taux d'APA résiduelle d'algues *Chlorella vulgaris* après une exposition directe à Zn^{2+} mesurée en bioessai. Il apparaît une relation dose-effet, les taux d'APA résiduelle allant de 80% pour 1 ppb à 58% pour 10 ppm.

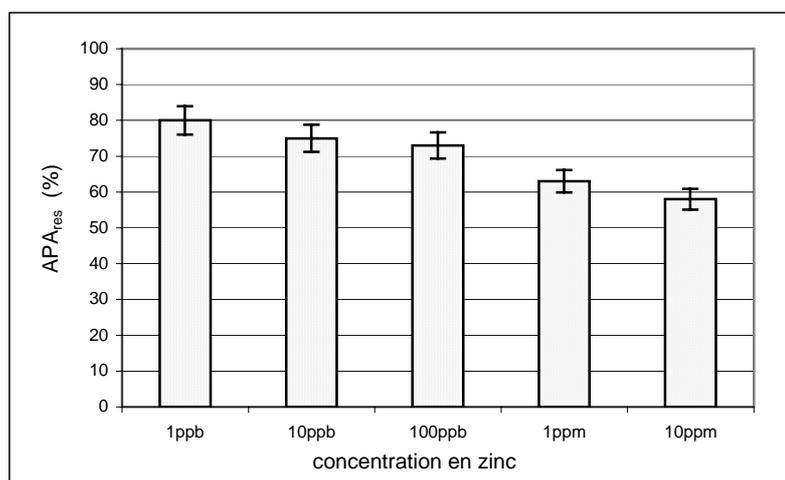


Figure 66 : Evolution du taux d'APA résiduelle après une exposition directe à Zn^{2+} (mesure en bioessais : Tris-HCl 0,1M, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 10mM ; MUP 7 μ M)

11.3.2.2 Exposition prolongée

Pour des expositions prolongées à Zn^{2+} , la Figure 67 montre que l'influence du temps d'exposition apparaît pour des concentrations en Zn^{2+} supérieures à 100 ppb, les taux d'APA résiduelles sont alors significativement plus faibles pour 240 minutes que pour 120 minutes.

Quelle que soit la durée d'exposition (120 et 240 minutes), une inhibition significative de l'APA peut être observée dès 1 ppb ($APA_{res} \leq 80\%$).

Pour les deux durées d'exposition, l'APA résiduelle évolue selon une relation dose-effet. Pour 120 minutes, il est possible de remarquer que les taux d'APA résiduelle sont proches pour la gamme de concentrations en Zn^{2+} testée (80% pour 1 ppb et 10 ppb à 70% pour 10 ppm), l'action inhibitrice des ions Zn^{2+} semble donc limitée.

Pour 240 minutes d'exposition, les taux d'APA résiduelle sont significativement plus faibles que ceux obtenus pour 120 minutes d'exposition pour des concentrations en Zn^{2+} supérieures ou égales à 100 ppb.

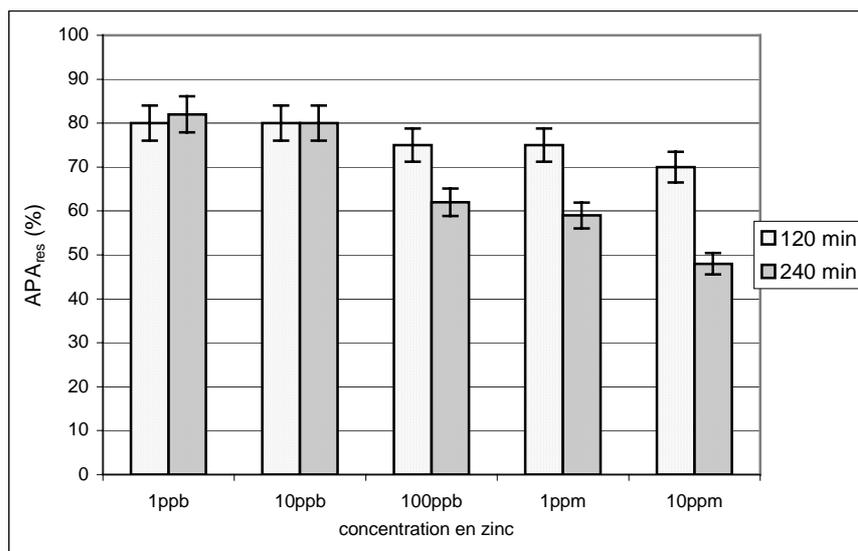


Figure 67 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour des expositions de 120 et 240 minutes à Zn^{2+} (mesure en bioessais : Tris-HCl 0,1M, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 10mM ; MUP 7 μ M)

11.3.3 Conclusion

Pour les expositions directes, avec les biocapteurs, une inhibition de l'APA limitée (APA résiduelle de 80%) et identique a été obtenue pour toutes les concentrations de Zn^{2+} testées. Toutefois, à la différence de Cd^{2+} , aucune activation du signal pour les faibles concentrations de Zn^{2+} (≤ 10 ppb) ne peut, par ailleurs, être observée comme l'ont confirmée les bioessais.

Pour les expositions prolongées, les biocapteurs et les bioessais ont permis de mettre en évidence une perturbation de l'APA après une exposition à Zn^{2+} .

Tout comme les essais avec Cd^{2+} , les biocapteurs semblent alors plus sensibles que les bioessais. Pour 100 ppb, un taux d'APA résiduelle du même ordre (environ 70%) est obtenu pour une exposition de 30 minutes avec les biocapteurs alors que celle-ci est de 120 minutes en bioessais.

11.4 Influence du plomb sur l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris*

11.4.1 Essais avec des biocapteurs conductimétriques

11.4.1.1 Exposition directe

La Figure 68 regroupe les taux d'APA résiduelle pour une exposition directe à Pb^{2+} . Aucun effet inhibiteur ne peut être observé quelle que soit la concentration envisagée.

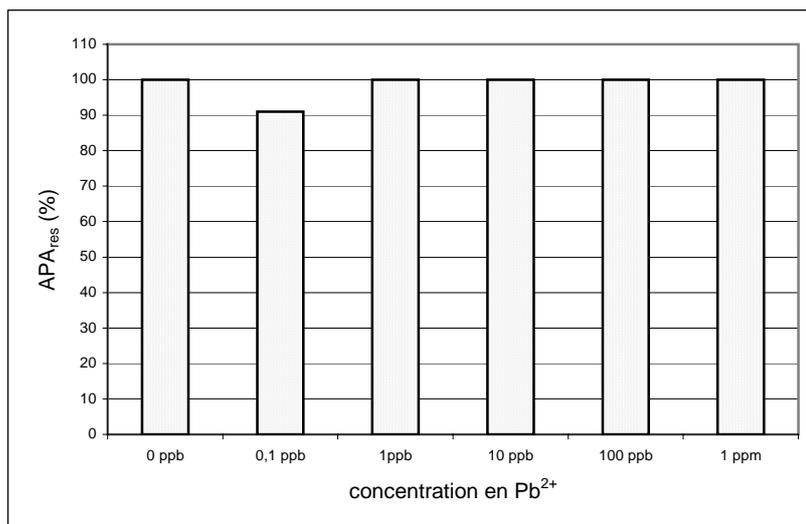


Figure 68 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition directe à Pb^{2+} (mesures avec biocapteurs : Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 1mM ; pNPP 0,86mM)

11.4.1.2 Exposition prolongée

L'exposition de 30 minutes à Pb^{2+} n'a pas permis de mettre en évidence une inhibition de l'activité enzymatique. En moyenne, les taux d'APA résiduelle sont, en effet, supérieurs ou égaux à 90%.

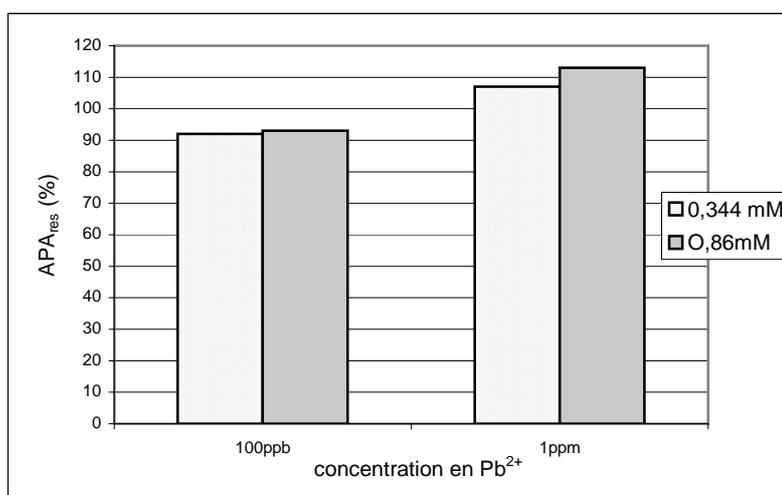


Figure 69 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition de 30 minutes à Pb^{2+} pour deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) (mesures avec biocapteurs : Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 1mM)

11.4.2 Mesures en bioessais

11.4.3 Exposition directe

La Figure 70 montre l'évolution selon une relation dose-effet du taux d'APA résiduelle après une exposition directe à Pb^{2+} . Les niveaux d'inhibition sont significatifs pour des concentrations en Pb^{2+} supérieures ou égales à 1 ppb ($APA_{res} \leq 83\%$).

Aucune différence significative n'a toutefois pu être mise en évidence pour des concentrations de 1 et 10 ppm ($APA_{res} \approx 55\%$).

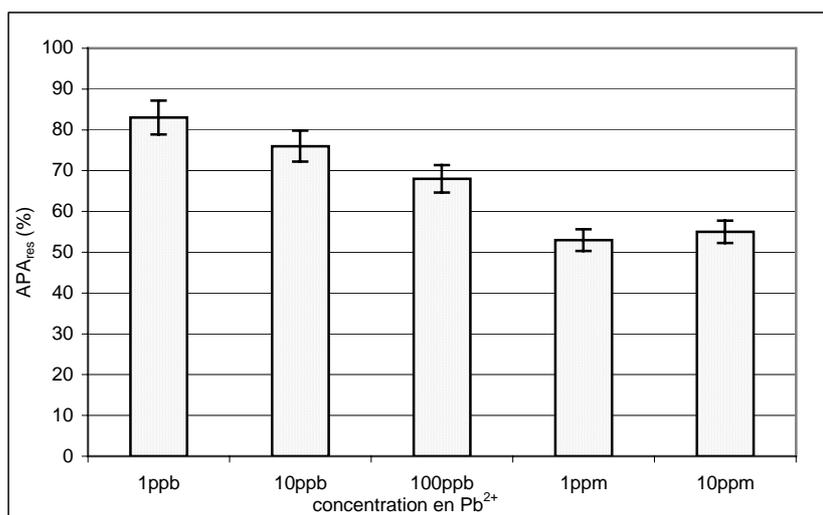


Figure 70 : Evolution du taux d'APA résiduelle après une exposition directe à Pb^{2+} (mesure en bioessais : Tris-HCl 0,1M, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 10mM ; MUP 7 μ M)

11.4.3.1 Exposition prolongée

La Figure 71 permet de mettre en évidence l'influence du temps de contact sur le niveau d'APA résiduelle : pour 240 minutes d'exposition à Pb^{2+} , les taux d'APA résiduelle sont significativement inférieurs à ceux obtenus pour une exposition de 120 minutes. La dépendance dose-effet apparaît également pour les deux durées d'exposition.

Pour 120 minutes d'exposition, l'inhibition est significative pour des concentrations en Pb^{2+} supérieures ou égales à 10ppb ($APA_{res} \leq 90\%$ pour 10ppb) alors que pour une exposition de 240 minutes, Pb^{2+} inhibe l'activité significativement dès 1ppb ($APA_{res} \leq 75\%$).

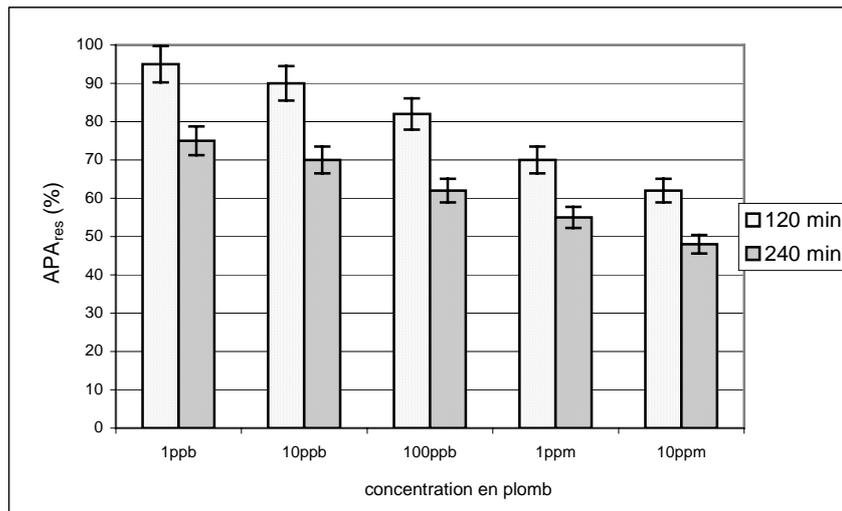


Figure 71 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour des expositions de 120 et 240 minutes à Pb^{2+} (mesure en bioessai : Tris-HCl 0,1M, pH 8,5 ; $MgCl_2$ 10mM ; MUP $7\mu M$)

11.4.4 Conclusion

Les biocapteurs n'ont pas permis de mettre en évidence l'inhibition de l'APA de *Chlorella vulgaris* après une exposition à Pb^{2+} alors qu'en bioessai, une inhibition significative de l'APA résiduelle a pu être constatée pour des expositions longues et courtes et ce, dès les concentrations les plus faibles en Pb^{2+} .

La question de la biodisponibilité de Pb^{2+} dans la membrane BSA/algues se pose alors. En effet, l'albumine est connue pour adsorber les métaux [140-142]. Une des hypothèses soulevées par ces résultats est que Pb^{2+} s'adsorbe sur le BSA et n'est donc pas biodisponible. Peu d'informations sont cependant disponibles pour pouvoir comparer les affinités respectives de Cd^{2+} , Zn^{2+} et Pb^{2+} pour l'albumine (cf. paragraphe 11.6).

11.5 Influence d'une solution mixte $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ sur l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris*

Des essais avec des solutions mixtes contenant plusieurs ions métalliques ont alors été envisagés afin d'étudier l'influence d'un tel mélange sur l'APA, notamment la possibilité d'effets synergiques et antagonistes. Au vu des résultats présentés dans les paragraphes précédents, en particulier l'absence d'inhibition de l'APA après une exposition à Pb^{2+} , le choix s'est porté sur un mélange $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ équimolaire.

11.5.1 Essais avec des biocapteurs conductimétriques

Pour des biocapteurs dont les signaux ont des amplitudes du même ordre, la Figure 72 regroupe les taux d'APA résiduelle pour une exposition au mélange $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ de 30 minutes.

Les taux d'inhibition sont importants notamment pour 1ppm pour lequel l'activité est fortement inhibée (APA_{res} de 17% pour 0,344 mM de pNPP et 36% pour 0,86 mM de pNPP). Pour 100 ppb, le taux d'APA résiduelle est compris entre 73% et 87% selon la concentration en pNPP choisie.

Le mélange à 10 ppb n'a pas permis, quant à lui, d'inhiber l'activité phosphatase alcaline.

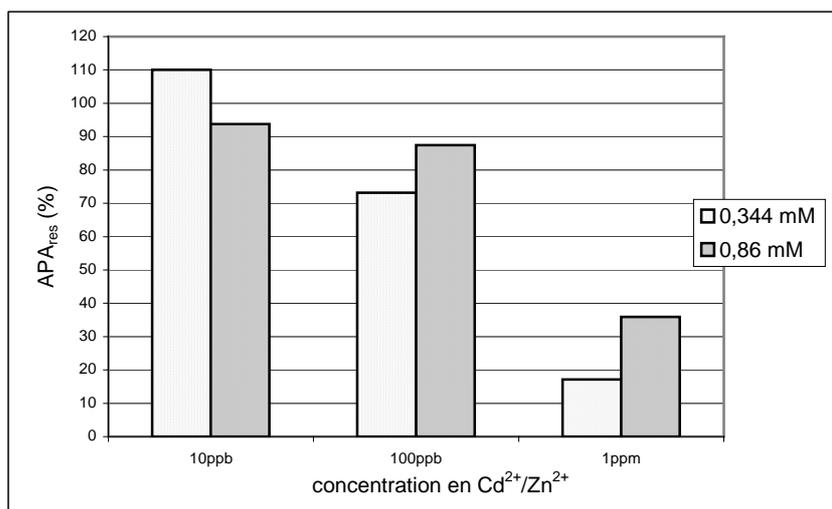


Figure 72 : Evolution du taux d'APA résiduelle pour une exposition de 30 minutes à 10ppb, 100ppb et 1ppm de $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ mesurés pour deux concentrations en pNPP (0,344mM et 0,86mM) (mesures avec biocapteurs : Tris-HCl 10mM, pH 8,5 ; MgCl_2 1mM)

11.5.2 Mesures en bioessais

Une étude a été réalisée en bioessais afin d'étudier l'influence du mélange $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ sur l'APA de *Chlorella vulgaris*. La Figure 73 regroupe les taux d'APA résiduelle obtenus pour une exposition de 240 minutes à ce mélange. Afin d'évaluer l'influence possible du mélange $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$, des algues ont été exposées dans les mêmes conditions à des solutions de Cd^{2+} et de Zn^{2+} .

Pour une concentration en $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ de 10 ppb, l'inhibition due à Zn^{2+} n'est pas significativement modifiée par le mélange avec Cd^{2+} . Pour 100 ppb, le taux d'APA résiduelle pour le mélange (68%) est supérieur à celui pour une exposition à Zn^{2+} seul (61%). Toutefois, cette observation n'est pas confirmée pour 1ppm, le taux d'APA résiduelle pour le mélange (30%) est alors inférieur aussi bien au taux d'APA résiduelle pour Cd^{2+} (49%) seul que pour Zn^{2+} seul (39%) mais ne correspond néanmoins pas à une addition des taux d'inhibition pour chacune des solutions de Cd^{2+} et de Zn^{2+} .

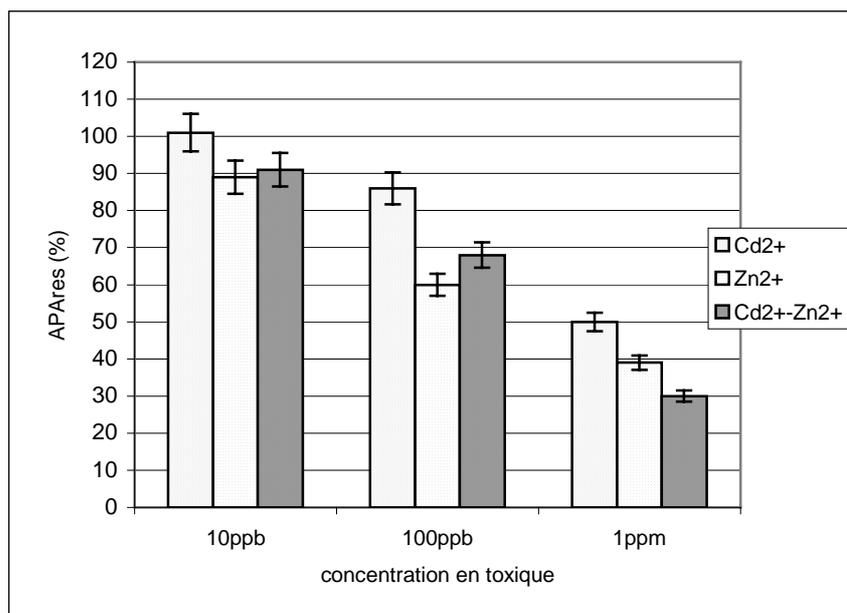


Figure 73 : Evolution du taux d'APA résiduelle après 240 minutes d'exposition à un mélange Cd²⁺/Zn²⁺ (mesure en bioessais : Tris-HCl 0,1M, pH 8,5 ; MgCl₂ 10mM ; MUP 6μM)

11.5.3 Conclusion

Les essais réalisés avec le mélange Cd²⁺/Zn²⁺ avait pour but d'étudier les éventuels effets antagonistes ou synergiques d'une solution toxique complexe sur l'APA.

L'inhibition de l'APA a pu être clairement observée aussi bien avec les biocapteurs que les bioessais. Il est également possible de tirer la même conclusion que dans les paragraphes 11.2.3 et 11.3.3 quant à la plus grande sensibilité des biocapteurs par rapport aux bioessais.

En ce qui concerne les phénomènes de synergie ou d'antagonismes du mélange Cd²⁺/Zn²⁺ sur l'APA, les résultats obtenus en bioessai sur une même microplaque n'ont pas permis de mettre en évidence d'effets de ce type.

De même, la comparaison des résultats obtenus avec les biocapteurs pour des solutions de Cd²⁺, Zn²⁺ et Cd²⁺/Zn²⁺ est difficile du fait de la variabilité intercapteur. Toutefois, en considérant les taux d'APA résiduelle présentés dans les paragraphes 11.2 et 11.3, aucun effet synergique ou antagoniste marqué ne semble se dégager.

11.6 Discussion

Cette étude sur la détection des métaux lourds avec les biocapteurs conductimétrique à cellules algales a soulevé un certain nombre de questions.

Tout d'abord, les expositions directes, en bioessais et biocapteurs, ont été réalisées en injectant le toxique dans le milieu réactionnel c'est-à-dire en présence de tampon Tris-HCl dont les propriétés complexantes vis-à-vis des métaux sont connues. Une partie des ions métalliques n'est alors pas biodisponible, ce qui peut contribuer à expliquer l'absence ou la faible inhibition de l'APA dans certains essais. Ces essais de toxicité pour une exposition directe ont néanmoins permis de mettre en évidence des évolutions identiques entre bioessais et biocapteurs (notamment pour Cd^{2+}) même si des expositions prolongées (< 60 minutes) ont été envisagées en vue de l'application des biocapteurs comme outils d'alerte sur site

La question de la biodisponibilité des métaux se pose également à cause de la composition de la membrane active puisque l'albumine est une protéine adsorbant les métaux. Dans notre étude, cette propriété a permis d'expliquer l'absence d'inhibition de l'APA après un contact avec Pb^{2+} . Il semble également que Pb^{2+} s'adsorbe de façon privilégiée sur l'albumine par rapport à Cd^{2+} et Zn^{2+} pour lesquels une inhibition de l'APA peut être détectée. Néanmoins, peu d'études existent sur cette capacité de l'albumine à adsorber les métaux, il est alors délicat d'établir un classement des métaux vis-à-vis de leur affinité avec cette protéine. Celle-ci dépend en effet de l'origine de l'albumine (humaine, bovine, porcine, ...) et du métal considéré. Ainsi Bal *et al.* (1998) ont montré que Zn^{2+} s'adsorbe plus facilement que Cd^{2+} sur le BSA [142]. Ce résultat est confirmé par Martins et Drakenberg (1982) [141]. En ce qui concerne, Pb^{2+} , les travaux de Fiabane *et al.* (1978) tendent à montrer que Pb^{2+} a moins d'affinité pour le BSA que Zn^{2+} [151], ce qui est contraire à nos résultats. Néanmoins, le peu d'informations disponibles sur la fixation du plomb sur l'albumine ne permet pas de conclure définitivement.

L'adsorption des métaux sur l'albumine est un paramètre à prendre en compte puisqu'il conditionne leur biodisponibilité et par conséquent leur toxicité. Dans les travaux de Zhylyak *et al.* (1995) portant sur des biocapteurs conductimétriques à uréase pour la détection de métaux lourds, la même conclusion a été tirée quant à la fixation d'un certain nombre d'ions métalliques sur certains groupements chargés du BSA. La conséquence a alors été l'augmentation de la stabilité des enzymes immobilisées lors de l'incubation avec M^{n+} [61].

La comparaison avec les résultats obtenus en bioessai a permis de conclure à la plus grande sensibilité des biocapteurs conductimétriques à cellules algales. Ceci s'explique en grande partie par le plus faible ratio [algues]/[toxique] pour les biocapteurs que pour les bioessais. Pour un niveau d'inhibition identique, les biocapteurs répondent plus rapidement ce qui les rend très intéressants pour des contrôles en continu et *in situ*.

Les performances des biocapteurs conductimétriques à cellules algales peuvent également être comparées à celles de biocapteurs proposés dans la littérature. Le Tableau 24 regroupe ainsi les limites de détection (L_d) obtenues selon les biocapteurs considérés.

| | Durée d'exposition | Concentration en M ⁿ⁺ | | | Références |
|---|--------------------|---|------------------|----------------------|-------------------|
| | | Cd ²⁺ | Zn ²⁺ | Pb ²⁺ | |
| Biocapteur optique à cellules entières <i>Chlorella vulgaris</i> | Quelques minutes | 10 ppb | Non testé | 10ppb | [52] |
| Biocapteur conductimétrique à uréase immobilisées | 10 minutes | 700ppb | Non testé | 6ppm | [61] |
| Biocapteur optique à uréase | 20 minutes | 1ppm | 2.5ppm | 21ppm | [86] |
| Biocapteur à DBO (cellules : <i>Bacillus subtilis</i> chauffées) | Direct | Aucun effet mesurable pour [Cd ²⁺]=560ppm | 130ppm | Non testé | [152] |
| Biocapteurs à anticorps | 10 minutes | 30ppt | Non testé | Pb-complexé 1ppb | [54] |
| Biocapteurs ampérométriques à ADN | 15 minutes | 0,1ppb | Non testé | 0,2ppb | [153] |
| Biocapteur électrochimique à cellules algales | 30 minutes | 10ppb | 10ppb | Non déterminé | Ce travail |

Tableau 24 : Récapitulatif des limites de détection pour les métaux lourds obtenus dans différentes études ainsi que dans ce travail

Les limites de détection obtenues avec les biocapteurs conductimétriques à cellules algales leur permettent de mettre en évidence des concentrations en métaux comparables à celles qui peuvent être détectées avec des biocapteurs optiques à *Chlorella vulgaris* (L_d en ppb).

Par rapport aux biocapteurs à enzymes pures comme l'uréase (L_d en ppm), les biocapteurs conductimétriques à cellules algales ont des L_d plus faibles, ce qui peut s'expliquer par la plus faible quantité de biorécepteurs immobilisés sur les cellules de détection mais également par le type d'enzyme sollicitée. En effet, la sensibilité de l'enzyme pour une substance dépend non seulement de sa nature (uréase ou phosphatase alcaline) mais également de son origine (pour une enzyme donnée, elle peut être d'origine animale, bactérienne, végétale). Ceci permet d'expliquer les différences de limites de détection observées pour des biocapteurs basés sur des activités enzymatiques différentes.

Les biocapteurs conductimétriques à cellules algales sont également nettement plus sensibles que les biocapteurs basés sur les mesures de perturbations globales du métabolisme (biocapteurs à DOB). Leurs performances restent néanmoins largement inférieures à celles des biocapteurs immunologiques ou à ADN (L_d inférieures au ppb) dont le principal inconvénient reste le coût.

En s'intéressant plus spécifiquement aux résultats obtenus dans ce travail avec les biocapteurs conductimétriques à cellules algales, il est ainsi possible de classer les trois métaux selon leur degré de toxicité vis-à-vis de l'APA : $Cd^{2+} > Zn^{2+} > Pb^{2+}$ (classement selon un pouvoir inhibiteur décroissant)

Par rapport au classement présenté dans le paragraphe 3.2.1.3 et réalisé à partir des résultats d'inhibition de l'APA de *Chlorella vulgaris* libres, la seule différence réside dans la toxicité de Pb^{2+} pour lequel des problèmes de biodisponibilité se posent.

Les bioessais sur *Chlorella vulgaris* libres menés dans cette étude ont montré que le pouvoir inhibiteur de Zn^{2+} était légèrement plus faible que Pb^{2+} et Cd^{2+} (cf. paragraphes 11.2.2, 11.3.2 et 11.4.2). L'inhibition de l'APA en présence de Zn^{2+} est toutefois suffisamment importante pour considérer ce métal comme particulièrement toxique pour l'APA de *Chlorella vulgaris*.

11.7 Conclusion

Les essais présentés tout au long du chapitre 11 ont montré qu'il était possible de mettre en évidence l'inhibition de l'APA de *Chlorella vulgaris* immobilisées sur des biocapteurs conductimétriques après une exposition à des solutions de métaux lourds.

L'utilisation de biocapteurs conductimétriques à cellules algales pour détecter la présence de Cd^{2+} et Zn^{2+} est ainsi envisageable. Pour ces deux ions métalliques, les performances de ces biocapteurs sont d'ailleurs particulièrement satisfaisantes. Par contre, il a été impossible de mettre en évidence la présence de Pb^{2+} . Ce résultat pose donc la question du choix de la membrane, l'adsorption des métaux sur l'albumine limitant en effet les performances du biocapteur.

A ce stade, la variabilité des taux d'APA résiduelle entre biocapteurs ne permet pas la corrélation entre le niveau d'inhibition des activités enzymatiques et la concentration en toxique.

Les métaux lourds étudiés dans ce chapitre sont particulièrement toxiques pour l'environnement mais d'autres substances telles que les pesticides peuvent menacer la santé des écosystèmes aquatiques. Le chapitre III a permis de conclure à la possibilité de mesurer, avec un même biocapteur, l'activité phosphatase alcaline mais également l'activité acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris*. Or, cette enzyme est connue pour être particulièrement sensible à la présence de certains pesticides. Des essais de toxicité ont donc été réalisés afin d'étudier les perturbations de l'activité acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris* immobilisées sur les biocapteurs conductimétriques en présence de certaines molécules insecticides.

12 Essais de toxicité avec les pesticides

Un certain nombre de travaux portant sur la mise au point de biocapteurs à enzyme pure pour la détection de pesticides se sont intéressés aux activités enzymatiques cholinestéras. Ces enzymes sont particulièrement intéressantes puisqu'elles sont sensibles à la présence de pesticides carbamates et organophosphorés [114].

Trois substances connues pour leur pouvoir inhibiteur sur les cholinestéras ont été utilisées, le carbofuran de la famille des carbamates, un organophosphoré le méthyl-parathion ainsi qu'un de ces produits de dégradation, le méthyl-paraoxon.

Les activités enzymatiques considérées dans ce chapitre sont l'activité acétylcholinestérase (AChE) pour les biocapteurs conductimétriques et l'activité estérase (AE) globale pour les bioessais. Les enzymes testées ne sont donc pas rigoureusement les mêmes entre les biocapteurs et les bioessais, la principale raison étant que le protocole suivi en microplaques a été mis au point avec la FDA qui est un substrat sollicitant indifféremment toute enzyme de la famille des estéras.

Il a été décidé, pour les essais de toxicité sur l'acétylcholinestérase avec biocapteurs, de suivre le protocole mis au point pour les essais de toxicité avec les métaux lourds, notamment en ce qui concerne la mesure d'activité pour deux concentrations d'AChCl, fixées à 4 mM et 10 mM après une étude préliminaire. Une double mesure de référence avant exposition à la solution test sera également réalisée afin de contrôler la stabilité du signal.

12.1 Influence du carbofuran sur l'activité estérase de *Chlorella vulgaris*

12.1.1 Essais avec des biocapteurs conductimétriques

La Figure 74 regroupe les taux d'AChE résiduelle après une exposition de 30 minutes à une solution de carbofuran mesurés avec deux biocapteurs différents, l'un mis au contact d'une solution de 10 ppb, l'autre de 100 ppb.

Pour une solution de 100ppb de carbofuran, aucune inhibition n'a pu être mise en évidence. Pour 10ppb, les taux d'AChE calculés pour 4 et 10 mM de AChCl sont d'environ 80%. Cette concentration de carbofuran inhibe l'activité enzymatique, de manière toutefois limitée puisque, pour 100ppb, aucune perturbation n'a été détectée.

Cette incompatibilité relative (10 ppb apparaît comme plus inhibiteur que 100 ppb) entre les deux biocapteurs trouve une explication dans le fait que l'amplitude du signal du biocapteur exposé à la solution de concentration 100 ppb est 4 fois plus élevée que celle du biocapteur exposé à la solution de concentration 10 ppb. Or, il a été précédemment mentionné que le taux d'inhibition de l'activité enzymatique est lié au niveau d'amplitude du signal (cf. paragraphe 11.1.6) .

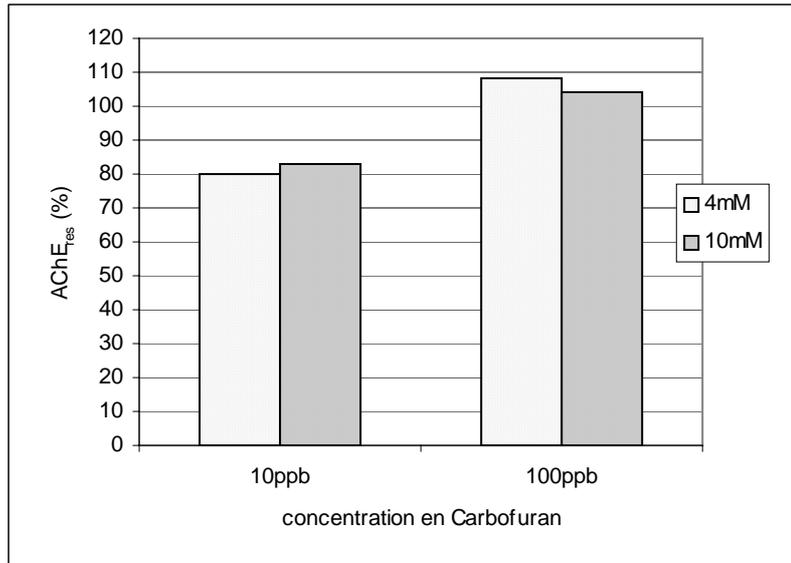


Figure 74 : Evolution du taux d'AChE résiduelle après une exposition de 30 minutes à une solution de carbofuran pour deux concentrations en AChCl (4mM et 10mM) (mesures avec biocapteurs : KH_2PO_4 2,5mM, pH 8)

12.1.2 Mesures en bioessais

Le suivi du taux d'AE résiduelle après exposition à une solution de carbofuran a été réalisé en bioessais (Figure 75). Seul le contact de 240 minutes à 100 ppbb permet de mettre en évidence en effet inhibiteur limité sur l'activité enzymatique (AE_{res} : 87%).

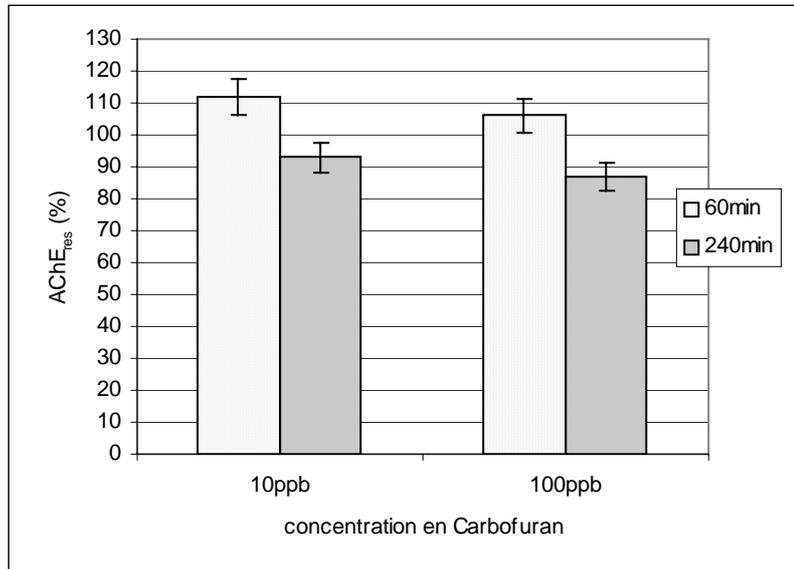


Figure 75 : Evolution du taux d'AE résiduelle après 60 et 240 minutes d'exposition à une solution de carbofuran (mesures en bioessais : tampon citrate 10mM , MgCl_2 1mM, FDA 6 μM)

12.1.3 Conclusion

Les résultats présentés dans les paragraphes 12.1.1 (mesures en biocapteurs) et 12.1.2 (mesures en bioessais) montrent que le carbofuran n'a qu'un effet très limité sur l'activité estérase de *Chlorella vulgaris*.

Parmi les hypothèses qui pourraient permettre d'interpréter ce faible pouvoir inhibiteur, la réversibilité de l'action des carbamates sur l'acétylcholinestérase peut représenter une explication à ne pas négliger. Le mécanisme intervenant dans ce cas est une dissociation du complexe enzyme-carbamate qui peut débiter en quelques minutes à condition que les enzymes ne soient plus exposées à l'insecticide [154].

12.2 Influence du méthyl-parathion sur l'activité estérase de *Chlorella vulgaris*

12.2.1 Essais avec des biocapteurs conductimétriques

L'effet du méthyl-parathion sur l'activité acétylcholinestérase a été étudié avec les biocapteurs conductimétriques. Les résultats obtenus après une exposition de 30 minutes à 100 ppb de méthyl-parathion sont donnés sur la Figure 76 pour deux biocapteurs différents. Aucune inhibition de l'activité enzymatique n'a pu être observée dans les deux cas.

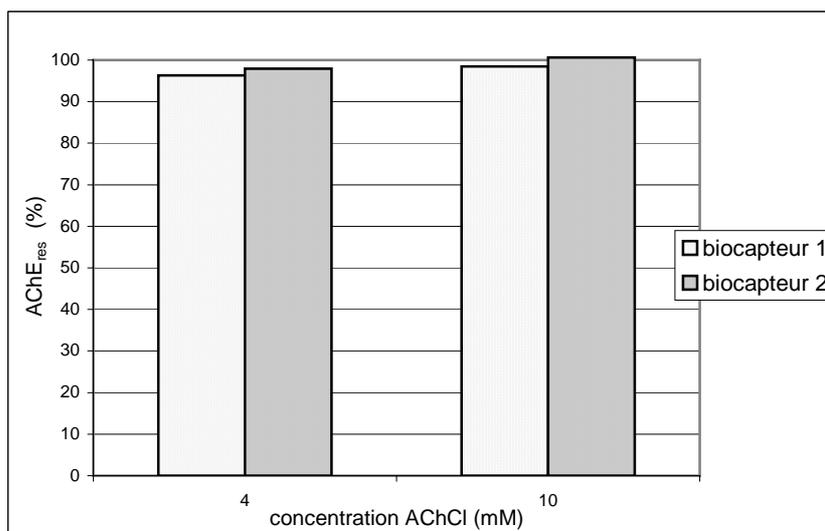


Figure 76 : Evolution du taux d'AChE résiduelle après une exposition de 30 minutes à une solution de méthyl-parathion à 100ppb pour deux concentrations en AChCl (4mM et 10mM) (mesures avec biocapteurs : KH_2PO_4 2,5mM, pH 8)

12.2.2 Mesures en bioessais

En bioessai, seule l'exposition de 240 minutes à 100 ppb de méthyl-parathion a permis de mettre en évidence une inhibition limitée de l'activité estérase de 15% (AE résiduelle : 85%).

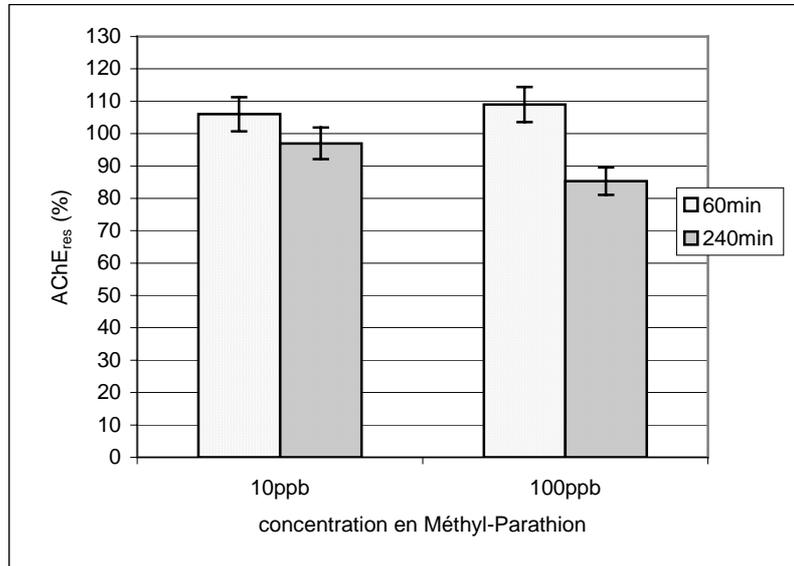


Figure 77 : Evolution du taux d'AE résiduelle après 60 et 240 minutes d'exposition à une solution de méthyl-parathion (mesures en bioessais : tampon citrate 10mM, MgCl₂ 1mM, FDA 6μM)

12.2.3 Conclusion

Tout comme le carbofuran, le méthyl-parathion n'a pas d'action inhibitrice significative sur l'activité acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris*. Ces résultats ont, par ailleurs, été confirmés en bioessais.

Le méthyl-parathion est un organophosphoré connu pour son action limitée sur l'activité acétylcholinestérase [38, 155]. Ceci permet d'expliquer l'absence d'inhibition observée. De plus, dans le cas des biocapteurs, ce faible pouvoir inhibiteur est également renforcé par la forte affinité du méthyl-parathion pour l'albumine avec laquelle il forme des complexes, ce qui réduit d'autant sa biodisponibilité dans la membrane [156].

12.3 Influence du méthyl-paraoxon sur l'activité estérase de *Chlorella vulgaris*

12.3.1 Essais avec des biocapteurs conductimétriques

12.3.1.1 Solution pure de méthyl-paraoxon

D'un point de vue environnemental, le méthyl-paraoxon est particulièrement intéressant puisque c'est un produit de dégradation du méthyl-parathion.

La Figure 78 regroupe les taux d'AChE résiduelle après une exposition de 30 minutes à une solution de méthyl-paraoxon mesurés avec deux biocapteurs exposés respectivement à 100 ppb et 1 ppm de cette substance.

Il apparaît une inhibition de l'activité enzymatique pour les deux concentrations en MPx. Ainsi, pour des biocapteurs d'amplitude équivalente, après une exposition à 1 ppm, les taux d'AChE résiduelle sont compris entre 69% et 83% selon la concentration en AChCl. Pour une exposition à 100 ppb de MPx, le taux d'AChE est de 81% pour 4 mM d'AChCl, soit une inhibition significative qu'il n'est pas possible de mettre en évidence avec une concentration de 10mM de substrat ($AChE_{res} \approx 100\%$).

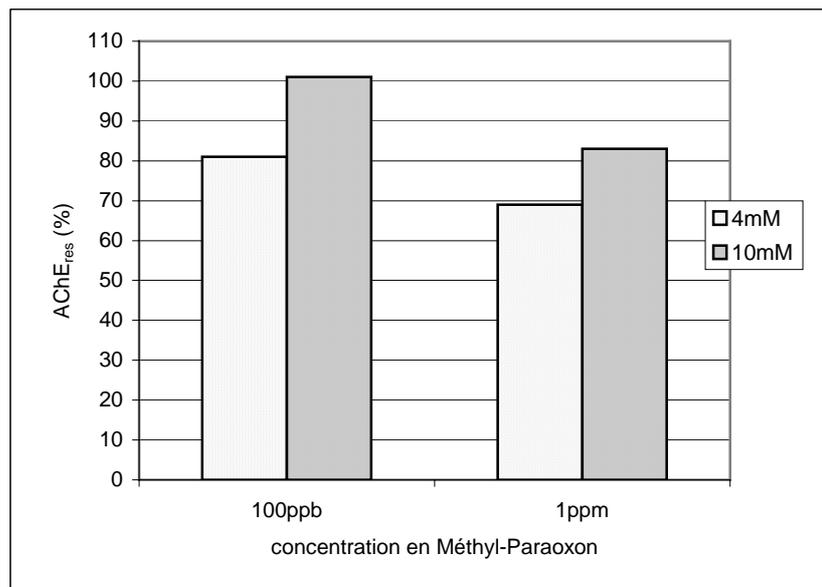


Figure 78 : Evolution du taux d'AChE résiduelle après une exposition de 30 minutes à une solution de méthyl-paraoxon pour deux concentrations en AChCl (4mM et 10mM) (mesures avec biocapteurs : KH_2PO_4 2,5mM, pH 8)

La Figure 79 illustre l'influence de l'amplitude du signal sur le niveau d'inhibition. Pour un signal dS d'amplitude faible, une exposition de 30 minutes à 100 ppb de méthyl-paraoxon inhibe très nettement l'AChE : 11% d'AChE résiduelle pour 4 mM et 30% pour 10 mM de substrat. Pour un signal d'amplitude 4 fois plus élevée, le taux d'AChE résiduelle est plus important : 81% pour 4 mM et 100% pour 10 mM de substrat.

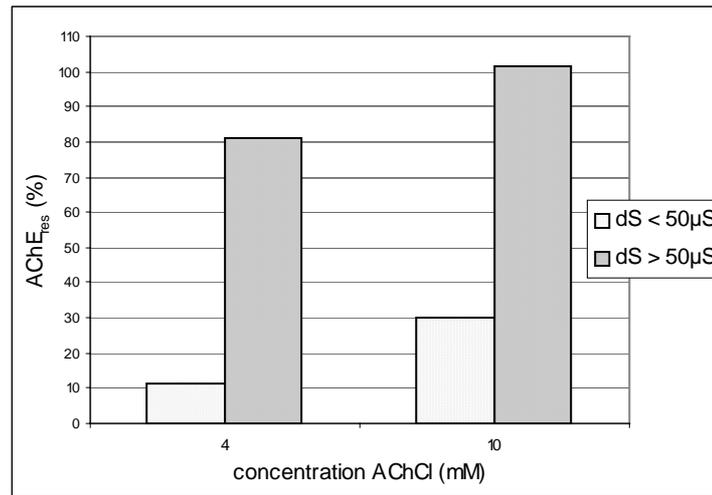


Figure 79 : Influence du niveau d'amplitude du signal sur le taux d'AChE résiduelle après une exposition de 30 minutes à 100ppb de méthyl-paraoxon pour deux concentrations en AChCl (4mM et 10mM) (mesures en biocapteurs : KH_2PO_4 2,5mM, pH 8)

12.3.1.2 Mélange Cd^{2+} /méthyl-paraoxon

Une série d'essais a permis, pour un même biocapteur conductimétrique, de mesurer les taux d'APA et d'AChE résiduelles pour une exposition de 30 minutes à un mélange de 25 ppb de Cd^{2+} et 50 ppb de méthyl-paraoxon. Les concentrations en Cd^{2+} et en méthyl-paraoxon ont été fixées à partir des résultats obtenus lors des essais de toxicité avec les solutions contenant l'un ou l'autre des deux toxiques en choisissant des concentrations susceptibles d'inhiber les activités enzymatiques.

La Figure 80 regroupe les résultats obtenus pour deux biocapteurs et montre que l'APA n'est pas inhibée par ce mélange à la différence de l'AChE. Une inhibition significative de l'activité acétylcholinestérase (de 80% et 65%) peut, en effet, être constatée. A priori, la concentration en Cd^{2+} choisie devait permettre de mettre en évidence une inhibition de l'APA ce qui n'est pas le cas pour les deux biocapteurs présentés. Il semble donc que cette concentration en Cd^{2+} soit trop proche de la limite de détection (10 ppb) et ne s'est pas avérée un choix très pertinent.

Ces essais préliminaires devront donc être complétés ultérieurement en testant des concentrations en toxique plus élevées notamment pour Cd^{2+} .

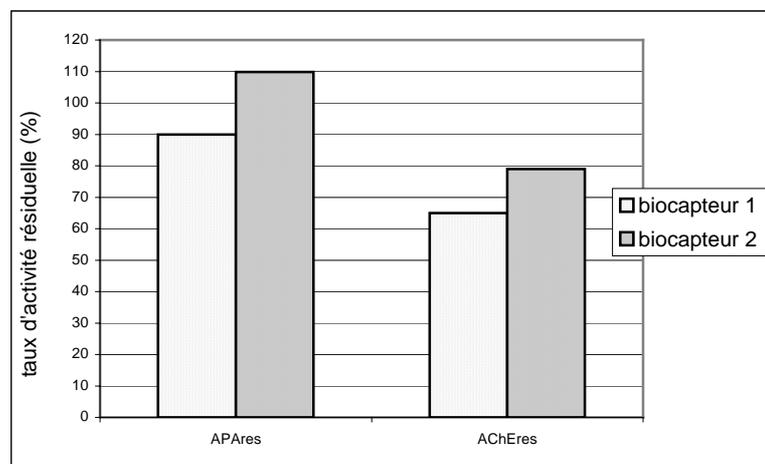


Figure 80 : Taux d'APA et d'AChE résiduelles pour deux biocapteurs conductimétriques après une exposition de 30 minutes à un mélange 25ppb Cd^{2+} /50ppb MPx

12.3.2 Mesures en bioessais

La Figure 81 montre l'évolution selon une relation dose-effet de l'action du méthyl-paraoxon sur l'activité estérase de *Chlorella vulgaris* suivie en bioessai. Les inhibitions sont alors significatives pour des concentrations en méthyl-paraoxon supérieures ou égales à 100 ppb.

L'influence du temps d'exposition apparaît, quant à elle, uniquement pour une concentration de 1 ppm ($AE_{res} = 53\%$ pour 240 minutes d'exposition et 70% pour 60 minutes de contact).

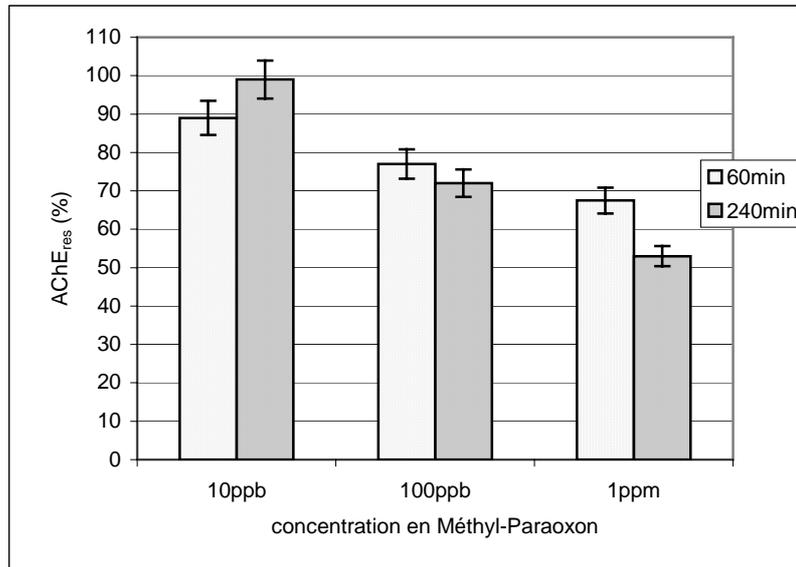


Figure 81 : Evolution du taux d'AE résiduelle après 60 et 240 minutes d'exposition à une solution de méthyl-paraoxon (mesures en bioessais : tampon citrate 10mM, MgCl₂ 1mM, FDA 6μM)

12.3.3 Conclusion

Les essais de toxicité avec double mesure, APA et AChE, après exposition au mélange Cd²⁺/méthyl-paraoxon, ont permis de vérifier que l'APA des algues n'est pas inhibée par le contact avec 25ppb de Cd²⁺ alors que le méthyl-paraoxon agit pour sa part sur l'AChE. Les niveaux d'inhibition pour cet organophosphoré correspondent aux ordres de grandeur de ceux obtenus avec la solution pure de méthyl-paraoxon. Cette expérience a également permis de vérifier que le méthyl-paraoxon n'agissait pas sur l'APA aux concentrations testées puisque aucune inhibition de cette activité n'a pu être mise en évidence.

Des expérimentations menées avec les biocapteurs et les bioessais ont permis, quant à elles, de vérifier la toxicité du méthyl-paraoxon pour l'activité estérase de *Chlorella vulgaris*. Ces résultats confirment les données de la littérature [38, 155] qui présentent ce produit de dégradation comme très fortement toxique contrairement au méthyl-parathion peu toxique (cf. paragraphe 12.2).

Une étude a également souligné, qu'à la différence du méthyl-parathion, le méthyl-paraoxon a une affinité nettement plus réduite avec l'albumine [156]. Sa biodisponibilité dans les membranes des biocapteurs serait donc conservée.

12.4 Discussion

Les essais de toxicité avec des pesticides appartenant aux carbamates et aux organophosphorés ont montré que, même si les biocapteurs conductimétriques à cellules algales peuvent mettre en évidence des inhibitions de l'AChE dans le cas du méthyl-paraoxon, l'activité acétylcholinestérase des algues est globalement peu sensible au carbofuran et au méthyl-parathion. Ces biocapteurs basés sur la mesure des cholinestérases membranaires de *Chlorella vulgaris* ne sont donc pas performants pour la mise en évidence de ces substances à la différence des biocapteurs à enzymes pures (cholinestérases pures de diverses origines) développés dans de nombreux travaux pour la détection des pesticides (carbamates, méthyl-parathion et méthyl-paraoxon).

Ainsi, le carbofuran est un carbamate dont l'action inhibitrice sur l'acétylcholinestérase pure a été mise en évidence avec des biocapteurs. Le Tableau 25 regroupe ainsi les taux d'AChE résiduelle obtenus dans de tels travaux. Selon les études, des niveaux d'inhibition importants ont pu être mis en évidence, notamment par Ciucu *et al.* (2003) puisque pour une exposition de 30 minutes à 20ppb, un taux d'AChE résiduelle de 50 % a pu être détectée [157]. Pour une même durée d'exposition, Marty *et al.* (1993) ont observé des inhibitions importantes de l'AChE (AChEres = 60% pour 2,21 ppb et 23% pour 221 ppb). Andres *et al.* (1997) ont, quant à eux, travaillé avec des expositions plus courtes et ont obtenu des taux d'AChE résiduelle plus élevés [106]. Dans l'ensemble de ces travaux, l'inhibition due au carbofuran suit une relation dose-effet pour une exposition donnée. L'influence de la durée d'exposition peut également être mise en évidence.

| Exposition | Concentration de carbofuran | AChE résiduelle | Références bibliographiques |
|------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|
| 10 minutes | 3,3 ppb | 90% | [106] |
| | 22,1 ppb | 70% | |
| 30 minutes | 20 ppb | 50% | [157] |
| 30 minutes | 2,21 ppb | 60% | [158] |
| | 221 ppb | 23% | |

Tableau 25 : Taux d'AChE résiduelle obtenus avec des biocapteurs à acétylcholinestérase pure pour des expositions à des solutions de carbofuran

En ce qui concerne le méthyl-parathion, Dzyadevych *et al.* (2002) ont montré en utilisant des biocapteurs électrochimiques, que l'AChE résiduelle après une exposition de 10 minutes à 26ppm de méthyl-parathion était de 90% [132]. Ceci correspond à une inhibition très faible compte tenu de la concentration en toxique.

Enfin, le Tableau 26 regroupe les principaux taux d'AChE résiduelle obtenus avec des biocapteurs à enzymes pures après une exposition au méthyl-paraoxon. Il apparaît globalement une inhibition élevée de l'AChE.

| Exposition | Concentration de méthyl-paraoxon | AChE résiduelle | Références bibliographiques |
|------------|----------------------------------|-----------------|-----------------------------|
| 10 minutes | 250 ppb | 60% | [106] |
| | 2,5 ppm | 40% | |
| 10 minutes | 4 ppm | 80% | [132] |
| | 5 ppm | 70% | |
| | 7,4 ppm | 50% | |
| 30 minutes | 2,5 ppb | 68% | [158] |
| | 250 ppb | 7% | |
| 30 minutes | 75 ppb | 50% | [157] |

Tableau 26: Taux d'AChE résiduelle obtenus avec des biocapteurs à acétylcholinestérase pure pour des expositions à des solutions de méthyl-paraoxon

L'activité acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris* semble donc moins sensible aux organophosphorés et aux carbamates testés que les cholinestérases pures d'autres origines. Plusieurs justifications peuvent être avancées, notamment le fait que, dans ce travail, les activités enzymatiques sont déterminées sur cellules entières dans leur environnement naturel ce qui peut affecter leur sensibilité aux toxiques (par la mise en jeu de mécanismes de défense cellulaire par exemple). De plus, l'origine de l'enzyme est particulièrement importante comme l'ont confirmé Ciucu *et al.* (2003). Leurs travaux sur des enzymes pures montrent, en effet, que selon l'origine de l'acétylcholinestérase (anguille électrique ou érythrocytes bovins), le pouvoir inhibiteur du paraoxon et du carbofuran est différent [157]. Le Tableau 27 regroupe les I_{50} (soit la concentration en pesticide donnant une inhibition de l'AChE de 50%) obtenus dans leur étude. Ainsi l'AChE d'origine bovine paraît être la plus sensible aux deux pesticides testés.

| | AChE d'anguille électrique | AChE d'érythrocytes bovins |
|------------|----------------------------|----------------------------|
| Paraoxon | 75 ppb | 25 ppb |
| Carbofuran | 22 ppb | 4,5 ppb |

Tableau 27 : Valeurs des inhibitions I_{50} pour les AChE d'anguille électrique et d'érythrocytes bovins après une exposition de 30 minutes aux pesticides (d'après Ciucu *et al.*, 2003)

Cette dépendance entre l'origine de l'enzyme et le niveau d'inhibition a également été constatée par Villatte *et al.* (1998) [159] qui ont classé 8 enzymes acétylcholinestérases en fonction de leur origine et de leur niveau d'inhibition après exposition à des insecticides carbamates et organophosphorés et ont conclu que l'acétylcholinestérase d'insecte est la plus sensible à une large gamme d'insecticides carbamates et organophosphorés. Cette plus grande sensibilité s'explique par le fait que les insectes sont les organismes cibles de ces pesticides.

Enfin, de récentes études réalisées en microplaques semblent montrer que, chez *Chlorella vulgaris*, la quantité d'estérases membranaires est limitée ce qui pourrait influencer la sensibilité de ces cellules aux insecticides testés.

12.5 Conclusion

L'activité acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris* n'est finalement pas la plus adaptée à la détection des pesticides puisque, dans cette étude, seul le méthyl-paraoxon peut l'inhiber. Il est alors possible de penser que seuls les organophosphorés et les carbamates les plus toxiques sont susceptibles d'être détectés par des biocapteurs conductimétriques à cellules algales. D'autres composés chimiques pourraient peut-être être détectés à condition de ne plus se restreindre aux acétylcholinestérases mais en travaillant sur les estérases globales grâce à un substrat adapté.

Enfin, la possibilité de réaliser un biocapteur multi-enzymatique semble se confirmer grâce aux essais avec le mélange Cd^{2+} /méthyl-paraoxon. Ceci permettrait, à terme, de pouvoir distinguer des grandes familles de polluants, en particulier les métaux lourds (action sur l'APA) et certains organophosphorés (action sur l'AChE).

13 Conclusion générale

L'utilisation de biocapteurs conductimétriques à cellules algales permettant d'étudier l'inhibition des activités phosphatase alcaline et acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris* en présence de composés toxiques a donc été confirmée dans ce chapitre IV.

Il apparaît néanmoins que, si l'intérêt de l'activité phosphatase alcaline de *Chlorella vulgaris* pour la mise en évidence de Cd^{2+} et Zn^{2+} est certain, l'activité acétylcholinestérase de cette microalgue ne semble pas particulièrement adaptée à la détection des insecticides peu inhibiteurs tels que le carbofuran et méthyl-parathion. Des trois molécules testées, seul le méthyl-paraoxon inhibe l'activité cholinestérase de manière significative.

La biodisponibilité des polluants dépend, quant à elle, de la nature de la membrane et est apparue, tout au long de ce chapitre, comme un paramètre essentiel. En effet, les métaux lourds, et notamment Pb^{2+} , ainsi que le méthyl-parathion peuvent s'adsorber sur l'albumine, ce qui limite d'autant leur toxicité. De plus, ce phénomène est amplifié par l'inhomogénéité de la répartition des algues dans la membrane active qui se traduit par des zones « blanches » (sans algues) ainsi que par des amas de cellules qui peuvent rendre l'accès des toxiques aux sites de fixation difficile. Finalement, pour chaque biocapteur, l'exposition des algues aux toxiques est différente et se traduit par une variabilité des taux d'inhibition intercapteur. Cette variabilité induite par l'immobilisation des cellules algales est également renforcée par la variabilité de la réponse de chaque organisme à une sollicitation telle que l'exposition à un toxique.

Finalement, il est apparu que les biocapteurs conductimétriques à cellules algales proposés dans ce travail ont des performances satisfaisantes pour la détection des métaux lourds Cd^{2+} et Zn^{2+} si on les compare à d'autres biocapteurs de la littérature.

Les essais de toxicité avec le mélange méthyl-paraoxon/ Cd^{2+} ont, en outre, permis de vérifier la possibilité de mesurer, avec un même biocapteur, la perturbation de plusieurs activités enzymatiques ce qui est avantageux pour identifier des familles de polluants dans une solution complexe.

CHAPITRE V. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

14 Conclusion générale et perspectives de recherche

14.1 Conclusion générale

La préservation des écosystèmes aquatiques nécessite de disposer d'outils d'alarme précoce permettant la surveillance *in situ* et en continu de la qualité de ces milieux.

Ce travail présente un nouveau type de biocapteurs conductimétriques à cellules algales capables de mettre en évidence la présence de grandes familles de polluants telles que les métaux lourds et certaines molécules organophosphorées. Leur principe repose sur la détection de deux activités enzymatiques, l'activité phosphatase alcaline et l'activité acétylcholinestérase de cellules algales immobilisées sur des biocapteurs électrochimiques.

L'utilisation de cellules entières *Chlorella vulgaris* comme biorécepteurs offre ainsi des nombreux avantages. Tout d'abord, la localisation membranaire de certaines de leurs phosphatases alcalines et cholinestérases permet une mesure rapide des activités enzymatiques grâce à des capteurs électrochimiques. De plus, à la différence des enzymes purifiées, les phosphatases alcalines et les cholinestérases de *Chlorella vulgaris* sont sollicitées dans leur environnement naturel ce qui leur confère une très grande stabilité.

Enfin, ces microalgues, en tant que producteurs primaires, jouent un rôle au sein des écosystèmes aquatiques. Leur utilisation comme biorécepteurs assure ainsi une bonne représentativité écologique et permet d'intégrer dans la réponse des biocapteurs des paramètres tels que la biodisponibilité des polluants et la sensibilité des organismes aux différents toxiques.

14.1.1 Développement des biocapteurs conductimétriques à cellules algales

L'étape de développement a permis de mettre au point un biocapteur conductimétrique bi-enzymatique utilisant des cellules algales *Chlorella vulgaris* immobilisées dans une membrane à base d'albumine de sérum bovin réticulées dans des vapeurs de glutaraldéhyde.

L'immobilisation des biorécepteurs est ainsi apparue comme le point le plus délicat. Un certain nombre de paramètres ont donc été optimisés : la quantité de BSA, la durée d'exposition aux GA_{vap} ainsi que la concentration algale dans la membrane active.

Toutefois, les différents résultats obtenus (tracés des cinétiques enzymatiques, essais de toxicité) ont révélé une grande variabilité de la réponse des biocapteurs qui ne peut pas uniquement être attribuée à la réponse propre de chaque organisme vivant. En effet, l'immobilisation des cellules algales sur les électrodes se faisant manuellement, les membranes ainsi fabriquées sont différentes les une des autres au niveau de leur géométrie, de la quantité d'algues immobilisées mais surtout de leur répartition. Des observations au microscope optique et en AFM ont ainsi permis de constater une inhomogénéité de la répartition des cellules algales qui se traduit par des amas de cellules et des zones « blanches » (sans algues). Ceci a des conséquences sur le niveau d'amplitude de signal dS détecté mais également sur le taux d'activité enzymatique résiduelle calculé après exposition du biocapteur à une solution test. En effet, la toxicité des xénobiotiques est influencée par la quantité de cellules algales cibles, par leur accessibilité (limitée dans les amas de cellules) mais aussi par la biodisponibilité des polluants dans la membrane.

Les conditions de mesure des activités enzymatiques ont également été étudiées. Ainsi, l'influence de la concentration en tampon et le choix du substrat le plus approprié ont été envisagées pour chaque enzyme.

14.1.2 Détection des métaux lourds et des pesticides organophosphorés et carbamates

Après avoir optimisé les différents protocoles de mise en oeuvre des biocapteurs, des essais de toxicité ont été réalisés afin d'étudier les perturbations des activités phosphatase alcaline et acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris* en présence d'un toxique. Ces deux activités enzymatiques sont particulièrement intéressantes puisqu'elles sont inhibées par des familles de polluants distinctes, les métaux lourds pour la phosphatase alcaline, les organophosphorés et les carbamates pour l'acétylcholinestérase.

Les différents essais ont finalement montré que les biocapteurs conductimétriques à cellules algales permettent de mettre en évidence la présence de Cd^{2+} et Zn^{2+} ($L_d = 10\text{ppb}$ pour 30 minutes d'exposition). Cette inhibition a, par ailleurs, été confirmée en bioessai, l'activité phosphatase alcaline étant mesurée sur des algues libres en microplaque grâce à un spectrofluorimètre.

Toutefois, à la différence des bioessais, les biocapteurs n'ont pas permis de mettre en évidence une inhibition de l'activité phosphatase alcaline par Pb^{2+} . Cette différence de comportement a alors soulevé la question de la biodisponibilité des métaux lourds dans la membrane active. En effet, l'albumine est connue pour adsorber les métaux (avec une affinité différente selon les métaux) ce qui pourrait éventuellement expliquer l'absence de perturbation de l'activité phosphatase alcaline en présence de Pb^{2+} [140-142].

Les essais de toxicité avec les organophosphorés et le carbofuran réalisés en biocapteurs et en bioessais ont permis de conclure à la faible sensibilité de l'activité acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris* pour le méthyl-parathion et le carbofuran.

Le méthyl-paraoxon, produit de dégradation du méthyl-parathion, est, quant à lui, connu pour être nettement plus toxique que le composé de départ. Ceci a d'ailleurs été vérifié puisque qu'une inhibition de l'activité acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris* par le méthyl-paraoxon a été constatée en biocapteurs ($L_d = 100\text{ppb}$ pour 30 minutes d'exposition) et confirmée en bioessais.

Il semble donc que le suivi des perturbations de l'activité acétylcholinestérase de *Chlorella vulgaris* ne soit pas pertinent puisqu'il existe des biocapteurs à cholinestérases pures dont les réponses au même toxique sont nettement plus marquées (cf. Tableau 25 et Tableau 26). Cette différence de sensibilité peut s'expliquer par le fait que les enzymes soient sollicitées dans leur environnement naturel (enzymes membranaires) ainsi que par leur origine, dans ce cas des enzymes membranaires de microalgues. Des travaux réalisés par Villatte *et al.* (1998) sur les sensibilités aux organosphosphorés et aux carbamates d'acétylcholinestérases de diverses origines ont d'ailleurs mis en évidence que les enzymes provenant d'insectes (organismes cibles des organophosphorés et des carbamates) étaient les plus sensibles à ces molécules [159].

Toutefois, ces essais, et en particulier ceux réalisés avec le mélange Cd^{2+} /méthyl-paraoxon, ont confirmé la possibilité de mesurer sur un même capteur deux activités enzymatiques ainsi que leurs perturbations éventuelles en vue de développer un biocapteur bi-enzymatique.

14.2 Perspectives

A partir de ces conclusions de nouvelles perspectives de recherche sont apparues.

14.2.1 Optimisation de l'immobilisation des biorécepteurs

L'immobilisation des algues avec le BSA et le GA_{vap}, a permis d'obtenir de premiers résultats encourageants mais nécessite de nouvelles optimisations afin, notamment, d'homogénéiser la répartition des cellules algales.

Les problèmes de biodisponibilité des métaux lourds dans la membrane à base d'albumine laissent penser que d'autres techniques d'immobilisation pourraient être envisagées. Dans leurs travaux, Emnéus *et al.* (2004) ont ainsi utilisé le polyéthylèneimine pour immobiliser des levures *Saccharomyces cerevisiae* sur des micropuces de silicone [160].

14.2.2 Etude de nouveaux biorécepteurs

Les microalgues *Chlorella vulgaris* sont des biorécepteurs particulièrement adaptés pour les métaux lourds Cd²⁺ et Zn²⁺, par contre leur sensibilité vis-à-vis des organophosphorés et des carbamates est plus faible. L'emploi d'autres microorganismes dont la sensibilité aux mêmes molécules peut être plus grande est alors à envisager. Ainsi, en mesurant les activités estérases et phosphatase de levures *Saccharomyces cerevisiae* et de microalgues *Chlorella vulgaris*, Barthet (2003) a montré que la phosphatase acide des levures était la plus sensible aux lixiviats de mâchefers d'incinération d'ordures [51].

L'utilisation d'autres microorganismes que les microalgues offre également la possibilité de considérer de nouvelles familles d'enzymes (nitrate réductase, déshydrogénase...) pouvant être sensibles à d'autres polluants.

D'une manière générale un approfondissement des connaissances relatives aux activités enzymatiques (niveau d'activité, stabilité au cours du temps) ainsi qu'à leurs perturbations suite à une exposition à un toxique (différences d'inhibition selon la culture cellulaire) doit également être poursuivi parallèlement afin de permettre une meilleure compréhension des divers phénomènes observés.

14.2.3 Développement de protocoles de mesure adaptés aux biocapteurs bienzymatiques

L'utilisation des biocapteurs conductimétriques à cellules algales pour la détection de plusieurs activités enzymatiques implique d'optimiser le protocole de mesure en choisissant un milieu réactionnel (tampon, ions activateurs éventuellement) adapté aux enzymes. Ainsi, pour la phosphatase alcaline, le choix d'un tampon phosphate comme le KH₂PO₄ n'est pas le plus adapté (présence d'ions PO₄²⁻ jouant le rôle d'inhibiteurs compétitifs par rapport au substrat). Par contre, des travaux ont montré qu'il était possible d'utiliser un tampon Tris-HCl pour les mesures d'activité acétylcholinestérase [134, 161]. La question de la concentration à utiliser (problème de bruit de fond pour les capteurs conductimétriques, effet de la force ionique différent selon l'activité enzymatique considérée (cf. paragraphe 9.4.2)) et du pH de mesure devra alors être envisagée pour permettre la mesure de chaque activité enzymatique dans des conditions optimales. Au cours de cette étude, il est apparu que le pH pour l'APA et l'ACHe étaient voisins, respectivement 8,5 et 8, ce qui devrait faciliter la recherche du plus adapté.

En ce qui concerne l'ajout d'ions activateurs Mg²⁺, ceux-ci ne sont pas révélés indispensables à la mesure de l'activité acétylcholinestérase au cours de cette étude. Barthet (2003) a néanmoins

utilisé ces ions pour mesurer l'activité estérase chez *Chlorella vulgaris* [51]. Aucune contre-indication à leur utilisation avec les biocapteurs conductimétriques ne semble donc exister.

Enfin, les différents travaux menés jusqu'à présent sur les biocapteurs multi-enzymatiques ont montré que plusieurs protocoles d'injection du substrat étaient envisageables [134, 162, 163]. Arkhipova *et al.* (2001) ont ainsi utilisé un mélange équimolaire de substrats (urée, AChCl, BChCl) et ont conclu en l'absence d'interaction des substrats spécifiques aux cholinestérases sur l'activité uréase. Toutefois, ce protocole peut poser quelques problèmes notamment pour les mesures conductimétriques s'il conduit à augmenter trop fortement la force ionique de la solution (d'où une baisse possible de la sensibilité lié à l'augmentation du bruit de fond). Starodub *et al.* (1999) ont, quant à eux, établi un protocole d'injection en flux porteur avec rinçage entre chaque substrat ce qui permet d'individualiser chaque réponse enzymatique ainsi que ses perturbations [163]. En présence d'une solution toxique de composition inconnue, cette technique semble particulièrement bien adaptée.

14.2.4 Mise au point d'un prototype pour des mesures sur site

Enfin, la mise au point d'un prototype associant un système de prélèvement d'échantillons, une série de biocapteurs conductimétriques à cellules algales ainsi qu'un système informatique de collecte et d'envoi des données doit finalement être envisagé.

Toutefois, l'utilisation sur site des biocapteurs soulève un certain nombre de questions. Notamment, la présence de phosphate dans le milieu naturel pourrait poser des problèmes. Il serait donc nécessaire d'étudier l'influence du temps d'incubation d'un biocapteur dans un échantillon contenant du phosphate sur le niveau d'activité phosphatase alcaline. Le temps d'exposition serait finalement un compromis pour détecter une inhibition suffisante des activités enzymatiques due à la présence de toxique tout en évitant que les algues ne reconstituent leurs stocks de phosphore lors de l'incubation dans l'échantillon pouvant contenir du phosphate.

La possibilité de piéger les phosphates préalablement, par précipitation par exemple, pourrait également permettre de lever ce problème.

La réactivation des enzymes phosphatase alcaline et acétylcholinestérase après inhibition pourrait être envisagée. Ainsi, Kim *et al.* (2000) ont montré que l'EDTA permettait la restauration de l'APA après inhibition par Cu^{2+} [164]. Toutefois, d'autres travaux présentent l'EDTA comme un inhibiteur de la phosphatase alcaline masquant les ions zinc du site actif mais dont l'action est réversible en ajoutant des ions Zn^{2+} (ou ions métalliques similaires) [87]. En ce qui concerne l'activité acétylcholinestérase, des études portant sur le développement de biocapteurs ont montré que le PAM-2 (pyridine-2-aldoxime methiodide) pouvait restaurer l'acétylcholinestérase [90, 126].

D'une manière générale, la restauration partielle voire totale des activités enzymatiques soulève un certain nombre de questions notamment quant à la toxicité des substances utilisées vis-à-vis des organismes ainsi que leurs éventuelles incidences sur la sensibilité des cellules (déclenchement de mécanismes de défense...). Une étude préalable en bioessais apparaît donc souhaitable.

Enfin, l'opportunité d'une réactivation des enzymes (le plus souvent partielle et augmentant le coût d'utilisation des biocapteurs) devra également être discutée au vu des résultats compte tenu du faible coût de fabrication des biocapteurs conductimétriques à cellules algales.

Un des principaux problèmes des biocapteurs mis à demeure sur le site reste la contamination des membranes actives par des bactéries, leurs activités phosphatases alcalines pouvant alors perturber les mesures. Ceci suppose alors de réfléchir à l'utilisation de filtres dont l'influence sur la biodisponibilité des polluants devra être évaluée.

Enfin, les biocapteurs conductimétriques à cellules algales doivent nécessairement être mis en œuvre au sein d'une méthodologie globale d'évaluation de la qualité des milieux. En fournissant des informations qualitatives sur la nature des polluants détectés, ils faciliteraient les analyses chimiques de laboratoire. L'utilisation de cellules entières comme biorécepteurs permet, quant à elle, de disposer d'un outil intégrant dans sa réponse des aspects écotoxicologiques, en particulier la biodisponibilité des molécules et leur toxicité réelle pour une famille d'organismes représentative d'un compartiment trophique.

Tout ceci doit finalement permettre de répondre aux différentes exigences réglementaires relatives à la qualité des milieux aquatiques pour assurer une gestion durable de la ressource en eau.

BIBLIOGRAPHIE

-
1. CNRS. Dossier scientifique : l'eau. [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/accueil.html>>. (Consulté le 15/03/2003)
 2. CAMPBELL P.G.C. and TESSIER A. Current status of metal speciation studies. **In** PATTERSON T.W. and PASSINO R. Eds. Proceedings of the International Symposium on Metals Speciation, Separation and Recovery, juillet-août 1986, Chicago, Illinois, USA. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA, 1987, pp. 201-224
 3. TOWN R.M. and FILELLA M. Implications of natural organic matter binding heterogeneity on understanding lead(II) complexation in aquatic systems. The Science of Total Environment, 2002, Vol. 300, pp. 143-154.
 4. BARBIER F. Le cadmium. Etude bibliographique. Solaize: Service Central d'Analyse, 2003, 10 p.
 5. VULLIET E. Etude des dégradations photochimiques et photocatalytiques d'herbicides de la famille des sulfonilurées. Thèse Chimie. Lyon, France : Université Claude Bernard-Lyon 1, 2002, 188 p.
 6. PIMENTEL D. Amounts of pesticides reaching target pests : environmental impacts and ethics. Journal of Agricultural and Environmental Ethics, 1995, Vol. 8, pp. 17-29.
 7. WOLFE N.L. Abiotic transformation of pesticides in natural waters and sediments. Fate of Pesticides and Chemicals in Environment, 1992, pp. 93-104.
 8. BOUQUARD C., OUAZZANI J., PROMÉ J.C., *et al.* Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium sp.* Isolate. Applied and Environmental Microbiology, 1996, Vol. 63, n°3, pp. 862-866.
 9. KEDDY C.J., GREENE J.C., and BONNELL M.A. Review of whole-organism bioassays : soil, freshwater sediment and freshwater assessment in Canada. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1994, Vol. 30, pp. 221-251.
 10. LOPEZ-SUAREZ C.E., CASTRO-ROMERO J.M., GONZALEZ-RODRIGEZ M.V., *et al.* Study of the parameters affecting the binding of metals in solution by *Chlorella vulgaris*. Talanta, 2000, Vol. 50, pp. 1313-1318.
 11. TIEN C.J. Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. Process Biochemistry, 2002, Vol. 38, pp. 605-613.
 12. KHOSHMANESH A., LAWSON F., and PRINCE I.G. Cadmium uptake by unicellular green microalgae. The Biochemical engineering journal, 1996, Vol. 62, pp. 81-88.
 13. CARR H.P., CARINO F.A., YANG M.S., *et al.* Characterization of the cadmium-binding capacity of *Chlorella vulgaris*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1998, Vol. 60, pp. 433-440.
 14. MC CORMICK P.V. and CAIRNS J.J. Algae as indicators of environmental change. Journal of Applied Phycology, 1994, Vol. 6, pp. 509-526.
 15. BAKER M.D., MAYFIELD C.I., and INNIS W.E. Toxicity of pH, heavy metals and bisulfite to a freshwater green alga. Chemosphere, 1983, Vol. 12, n°1, pp. 35-44.
 16. TING Y.P., LAWSON F., and PRINCE I.G. The influence of cadmium and zinc on the cell size distribution of the alga *Chlorella vulgaris*. The Chemical Engineering Journal, 1991, Vol. 47, pp. B23-B34.
 17. WANG J., ZHANG M., XU J., *et al.* Reciprocal effect of Cu, Cd, Zn on a kind of marine alga. Water Resources, 1995, Vol. 29, n°1, pp. 209-214.

-
18. NISHIKAWA K., YAMAKOSHI Y., UEMURA I., *et al.* Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, Vol. 44, pp. 253-259.
 19. SILVERBERG B.A. Cadmium-induced ultrastructure in mitochondria of freshwater green algae. *Phycologia*, 1976, Vol. 15, pp. 155-159.
 20. BADREDDINE I. Mise au point d'un test de toxicité basé sur la mesure de la phosphatase alcaline de microphytes. Thèse Biologie et Biochimie appliquées. Chambéry, France : Université de Savoie, 1996, 195 p.
 21. VEDRINE C. Exploitation de signaux biologiques pour la réalisation de capteurs environnementaux. Application à la construction d'un biocapteur à micro-algues immobilisées et d'une bioélectrode à enzyme immobilisée. Thèse Génie des procédés. Saint-Etienne, France : Ecole des Mines de Saint-Etienne, 2003, 194 p.
 22. SAROJA G. and BOSE S. Effects of methyl-parathion on the growth, cell size, pigment and protein content of *Chlorella protothecoides*. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 1982, Vol. 27, n°4, pp. 297-308.
 23. TREMOLADA P., FINIZIO A., VILLA S., *et al.* Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment. *Aquatic Toxicology*, 2004, Vol. 67, n°1, pp. 87-103.
 24. TRIFFAULT-BOUCHET G. Effets sur les écosystèmes aquatiques lenticques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation/élimination de déchets. Application à des mâchefers d'UIOM et à des boues de dragage de canaux. Thèse Biologie et Biochimie Appliquées. Chambéry, France : Université de Savoie, 2004, 311 p.
 25. ROUESSAC F. and ROUESSAC A. Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes. Paris : Dunod, 2000, 430 p.
 26. CLÉMENT B. and CADIER C. Development of a new laboratory freshwater/sediment microcosm test. First results. *Ecotoxicology*, 1998, Vol. 7, pp. 279-290.
 27. WANG W. and FREEMARK K. The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, Vol. 30, pp. 289-301.
 28. TRAN MINH C. Les biocapteurs, principes construction et applications. Paris : Masson, 1991, 158 p.
 29. SUZUKI H. Microfabrication of chemical sensors and biosensors for environmental monitoring. *Materials Science and Engineering*, 2000, Vol. C 12, pp. 55-61.
 30. BERGVELD P. Thirty years of ISFETOLOGY. What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors and Actuators B*, 2003, Vol. 88, pp. 1-20.
 31. ALBAREDA-SIRVENT M., MERKOÇI A., and ALEGRET S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensors and Actuators B*, 2000, Vol. 69, pp. 153-163.
 32. BOUSSE L. Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators B*, 1996, Vol. 34, pp. 270-275.
 33. D'SOUZA S.F. Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, Vol. 16, pp. 337-353.
 34. GONZALEZ-MARTINEZ M.A., PUCHADES R., and MAQUIEIRA A. On-line immunoanalysis for environmental pollutants : from batch assays to automated sensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, Vol. 18, n°3, pp. 204-218.

-
35. DENNISON M.J. and TURNER A.P.F. Biosensors for environmental monitoring. *Biotechnology Advances*, 1995, Vol. 13, pp. 1-12.
 36. BYFIELD M.P. and ABUKNESHA R.A. Biochemical aspects of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 1994, Vol. 9, pp. 373-400.
 37. COULET P.R., BLUM L.J., and GAUTIER S.M. Optically-based chemical and biochemical sensors for the detection of some drugs and biological compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1989, Vol. 7, n°12, pp. 1361-1376.
 38. DZYADEVYCH S.V., SOLDATKIN A.P., and CHOVELON J.M. Assessment of the toxicity of methyl-parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 2002, Vol. 459, pp. 33-41.
 39. MAI ANH T., DZYADEVYCH S.V., SOLDATKIN A.P., *et al.* Development of tyrosinase biosensor based on pH sensitive effect transistor for phenol determination in water solutions. *Talanta*, 2002, Vol. 56, pp. 627-634.
 40. COSNIER S., NOVOA A., MOUSTY C., *et al.* Biotinylated alginate immobilization matrix in the construction of an amperometric biosensor : application for the determination of glucose. *Analytica Chimica Acta*, 2002, Vol. 453, pp. 71-79.
 41. CHOUTEAU C., DZYADEVYCH S.V., CHOVELON J.M., *et al.* Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, Vol. 19, n°9, pp. 1089-1096.
 42. BAUMANN W.H., LEHMANN M., SCHWINDE A., *et al.* Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. *Sensors and Actuators B*, 1999, Vol. 55, pp. 77-89.
 43. SCHUBNELL D., LEHMANN M., BAUMANN W., *et al.* An ISFET-algal hybrid (*Chlamydomonas*) provides a system for ecotoxicological tests. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, Vol. 14, n°5, pp. 465-472.
 44. CAMPANELLA L., CUBADDA F., SAMMARTINO M.P., *et al.* An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Resources*, 2000, Vol. 35, n°1, pp. 69-76.
 45. ROMERO J.M.F., STIENE M., KAST R., *et al.* Application of screen-printed electrodes as transducers in affinity flow-through sensor systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, Vol. 13, n°10, pp. 1107-1115.
 46. DZANTIEV B.B., ZHERDEV A.V., YULAEV M.F., *et al.* Electrochemical immunosensors for determination of the pesticides 2,4-dichlorophenoxyacetic and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acids. *Biosensors and Bioelectronics*, 1996, Vol. 11, n°1-2, pp. 17-185.
 47. MARRAZZA G., CHIANELLA I., and M. M. Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta*, 1999, Vol. 387, pp. 297-307.
 48. ROUILLON R., SOLE M., CARPENTIER R., *et al.* Immobilization of thylakoids in polyvinylalcohol for the detection of herbicides. *Sensors and Actuators B*, 1995, Vol. 27 , n°1-3, pp. 477-479.
 49. CARPENTIER R., LORANGER C., CHARTRAND J., *et al.* Photoelectrochemical cell containing chloroplast membranes as a biosensor for phytotoxicity measurements. *Analytica Chimica Acta*, 1991, Vol. 249, pp. 55-60.
 50. ROSA C.C., CRUZ H.J., VIDAL M., *et al.* Optical biosensor based on nitrite reductase immobilised in controlled pore glass. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, Vol. 17, n°1-2, pp. 45-52.
-

-
51. BARTHET L. Contribution à l'évaluation de l'impact sur les écosystèmes de la valorisation des résidus de procédés thermiques en BTP. Thèse Chimie. Lyon, France : INSA, 2003, 221 p.
52. DURRIEU C. and TRAN MINH C. Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002, Vol. 51, n°3, pp. 206-209.
53. VÉDRINE C., LECLERC J.C., DURRIEU C, *et al.* Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, Vol. 18, n°4, pp. 457-463.
54. BLAKE D.A., JONES R.M., BLAKE R.C. II., *et al.* Antibody-based sensors for heavy metal ions. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, Vol. 16, pp. 799-809.
55. MERZ D., GEYER M., MOSS D.A., *et al.* Chlorophyll fluorescence biosensor for the detection of herbicides. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1996, Vol. 354, pp. 299-305.
56. HALÀMEK J., HEPEL M., and SKLADAL P. Investigation of highly sensitive piezoelectric immunosensors for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, Vol. 16, n°4-5, pp. 253-260.
57. ZIEGLER C. and GÖPEL W. Biosensor development. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1998, Vol. 2, pp. 585-591.
58. DZYADEVYCH S.V., ARKHIPOVA V.N., SOLDATKIN A.P., *et al.* Glucose conductometric biosensor with potassium hexacyanoferrate(III) as an oxidizing agent. *Analytica Chimica Acta*, 1998, Vol. 374, pp. 11-18.
59. LEON-GONZALEZ M.E. and TOWNSHEND A. Flow-injection determination of paraoxon by inhibition of immobilized acetylcholinesterase. *Analytica Chimica Acta*, 1990, Vol. 236, pp. 267-272.
60. SHUL'GA A., DZYADEVYCH S.V., SOLDATKIN A.P., *et al.* Thin-film conductometric biosensors for glucose and urea determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 1994, Vol. 9, n°3, pp.217-223
61. ZHYLYAK G.A., DZYADEVYCH S.V., KORPAN Y.I., *et al.* Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination. *Sensors and Actuators*, 1995, Vol. B, n°24-25, pp. 145-148.
62. GAYET J.C., HAOUZ A., GELOSO-MEYER A., *et al.* Detection of heavy metal salts with biosensors built with an oxygen electrode coupled to various immobilised oxidases and dehydrogenases. *Biosensors and Bioelectronics*, 1993, Vol. 8, pp. 177-183.
63. CREMISINI C., DI SARIO S., MELA J., *et al.* Evaluation of the use of free and immobilised acetylcholinesterase for paraoxon detection with an amperometric choline oxidase based biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 1995, Vol. 311, pp. 273-280.
64. POGACNIK L. and FRANKO M. Optimisation of FIA system for detection of organophosphorous and carbamate pesticides based on cholinesterase inhibition. *Talanta*, 2001, Vol. 54, pp. 631-641.
65. BENTLEY A., ATKINSON A., JEZEK J., *et al.* Whole cell biosensor-electrochemical and optical approaches to ecotoxicity testing. *Ecotoxicology and Environmental Toxicology*, 2001, Vol. 15, n°4-5, pp. 469-475.
66. ARIKAWA Y., IKEBUKURO K., and KARUBE I. Microbial biosensors based on respiratory inhibition. **In** MULCHANDINI A., ROGERS K.R. *Enzyme and Microbial Biosensors : Techniques and Protocols*, Humanae Press. Totowa NJ, 1998, pp. 225-236.

-
67. TEMSAMANI K.R., BOUCHTA D., FAHMI T., *et al.* Evaluation of photosynthesis inhibitory effect of new sulfonylureas derivatives on *Oxalis pes-caprae*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1995, Vol. 38, pp. 63-66.
68. ROUILLON R., SOLE M., CARPENTIER R., *et al.* Immobilization of thylakoids in polyvinylalcohol for the detection of herbicides. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 1995, Vol. 27, n°1-3, pp. 477-479.
69. CARPENTIER R., LEMIEUX S., MIMÉAULT M., *et al.* A photoelectrochemical cell using immobilized photosynthetic membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1989, Vol. 22, pp. 391-401.
70. SVITEL J., CURRILA O., and TKAC J. Microbial cell based-biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1998, Vol. 27, pp. 153-158.
71. BIRAN I., BABAI R., LEVCOV K., *et al.* Online and in situ monitoring of environmental pollutants : electrochemical biosensing of cadmium. *Environmental Microbiology*, 2000, Vol. 2, n°3, pp. 285-290.
72. SVITEL J., SURUGIU I., DZGOEV A., *et al.* Functionalized surfaces for optical biosensors : Applications to *in vitro* pesticide residual analysis. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 2001, Vol. 12, pp. 1075-1078.
73. KAREL S.F., LIBICKI S.B., and ROBERTSON C.R. The immobilization of whole cells : Engineering principles. *Chemical Engineering Science*, 1985, Vol. 40, n°8, pp. 1321-1354.
74. WAN K., CHOVELON J.M., and JAFFREZIC-RENAULT N. Enzyme-octadecylamine Langmuir-Blodgett membranes for ENFET biosensors. *Talanta*, 2000, Vol. 52, pp. 663-670.
75. ANDREESCU S., BARTHELMEBS L., and MARTY J.M. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes : comparative study between three immobilization methods and application to the detection of organophosphorous insecticides. *Analytica Chimica Acta*, 2002, Vol. 464, pp. 171-180.
76. BOZEMAN J., KOOPMAN B., and BITTON G. Toxicity testing using immobilized algae. *Aquatic Toxicology*, 1989, Vol. 14, pp. 345-352.
77. DAINTY A.L., GOULDING K.H., ROBINSON P.K., *et al.* Stability of alginate-immobilized algal cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986, Vol. 28, pp. 210-216.
78. KIERSTAN M. and BUCKE C. The immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering*, 1977, Vol. 9, n°387-397.
79. EGGINS B. *Biosensors. An introduction.* Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto : John Wiley & Sons, 1998, 212 p.
80. LI Y.G., ZHOU Y.X., FENG J.L., *et al.* Immobilization of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 1999, Vol. 382, pp. 277-282.
81. BABU P.S.R. and PANDA T. Studies on improved techniques for immobilizing and stabilizing penicillin amidase associated with *E. coli* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 1991, Vol. 13, n°8, pp. 676-682.
82. BUBRICK P., GOLDSTEIN L., and FRENSDORFF A. Immobilized whole algal cells for solid-phase binding assays. *Journal of Immunological Methods*, 1986, Vol. 86, n°2, pp. 171-177.
83. JAFFREZIC-RENAULT N., MARTELET C., CLECHET P., *et al.* Comparison of two transduction modes for design of microbiosensor applicable to detection of pesticides. *Sensors and Materials*, 1996, Vol. 8, n°3, pp. 161-167.
-

-
84. FRENSE D., MULLER A., and BECKMANN D. Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. *Sensors and Actuators B*, 1998, Vol. 51, pp. 256-260.
85. PANDARD P., VASSEUR P., and RAWSON D.M. Comparison of two types of sensors using eukaryotic algae to monitor pollution of aquatic systems. *Water Resources*, 1993, Vol. 27, n°3, pp. 427-431.
86. TSAI H.C., DOONG R.A., CHIANG H.C., *et al.* Sol-gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals. *Analytica Chimica Acta*, 2003, Vol. 481, pp. 75-84.
87. MARCOS J. and TOWNSHEND A. Studies on the inhibition of immobilised alkaline phosphatase by metal ions and EDTA in a flow-injection system. *Analytica Chimica Acta*, 1994, Vol. 299, pp. 129-136.
88. KAMTEKAR S., PANDE R., AYYAGARI M.S., *et al.* A chemiluminescence-based biosensor for metal ion detection. *Materials Science and Engineering*, 1995, Vol. 3, n°79-83.
89. COSNIER S., FOMBON J.J., LABBÉ P., *et al.* Development of a PPO-poly(amphiphilic pyrrole) electrode for on site monitoring of phenol in aqueous effluents. *Sensors and Actuators B*, 1999, Vol. 59, pp. 134-139.
90. NYAMSI HENDJI A.M., JAFFREZIC-RENAULT N., MARTELET C., *et al.* Sensitive detection of pesticides using a differential ISFET-based system with immobilized cholinesterases. *Analytica Chimica Acta*, 1993, Vol. 281, pp. 3-11.
91. BOTRE C., BOTRE F., MAZZEI F., *et al.* Inhibition-based biosensors for the detection of environmental contaminants determination of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, Vol. 19, n°12, pp. 2876-2881.
92. BLUMREISINGER M., MEINDL D., and LOOS E. Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry*, 1983, Vol. 22, n°7, pp. 1603-1604.
93. TAKEDA H. Taxonomical assignment of chlorococcal algae from their cell wall composition. *Phytochemistry*, 1993, Vol. 34, n°4, pp. 1053-1055.
94. BRANDES D. An electron microscopical study of the histochemical localization of alkaline phosphatase in the cell wall of *Chlorella vulgaris*. *Nature*, 1956, Vol. 177, pp. 274-275.
95. LINDEN G., CHAPPELET-TORDO D., and LAZDUNSKI M. Milk alkaline phosphatase. Stimulation by Mg^{2+} and properties of Mg^{2+} site. *Biochimica et Biophysica Acta-Enzymology*, 1977, Vol. 483, n°1, pp. 100-106.
96. HOLTZ K.M. and KANTROWITZ E.R. The mechanism of the alkaline phosphatase reaction : insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Letters*, 1999, Vol. 462, pp. 7-11.
97. DURRIEU C, BADDREDINE I., and DAIX C. A dialysis system with phytoplankton for monitoring chemical pollution in freshwater ecosystems by alkaline phosphatase assay. *Journal of Applied Phycology*, 2003, Vol. 15, pp. 289-295.
98. MAZORRA M.T., RUBIO J.A., and BLASCO J. Acid and Alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana* : kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002, Vol. B, n°131, pp. 241-249.
99. RENELLA G., ORTIGOZA A.L.R., LANDI L., *et al.* Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by ecological dose (ED_{50}). *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, Vol. 35, n°9, pp. 1203-1210.

-
100. VESELOVA I.A. and SHEKHOVTSOVA T.N. Visual determination of lead(II) by inhibition of alkaline phosphatase immobilized on polyurethane foam. *Analytica Chimica Acta*, 2000, Vol. 413, pp. 95-101.
 101. ZHANG R.Q., CHEN Q.X., XIAO R., *et al.* Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase by zinc ions : a new type of complexing inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, Vol. 1545, pp. 6-12.
 102. LE DU M.H., STIGBRAND T., TAUSSIG M.J., *et al.* Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, Vol. 276, n°12, pp. 9158-9165.
 103. MANGANI S., CARLONI P., VIEZZOLI M.S., *et al.* EXAFS study of the active site of alkaline phosphatase from *E.coli*. *Inorganica Chimica Acta*, 1992, Vol. 191, pp. 161-165.
 104. DUFFUS J. "Heavy metals". A meaningless term? *Pure Applied Chemistry*, 2002, Vol. 74, n°5, pp. 793-807.
 105. RADIC Z., PICKERING N.A., VELLOM D.C., *et al.* Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 1993, Vol. 32, n°45, pp. 12074-12084.
 106. ANDRES R.T. and NARAYANASWAMY R. Fibre-optic pesticide biosensor based on covalently immobilized acetylcholinesterase and thymol blue. *Talanta*, 1997, Vol. 44, pp. 1335-1352.
 107. WESSLER I., KIRKPATRICK C.J., and RACKÉ K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems : Expression and function in humans. *Pharmacology Therapeutics*, 1998, Vol. 77, n°1, pp. 59-79.
 108. WESSLER I., KILBINGER H., BITTINGER F., *et al.* The non-neuronal cholinergic system. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 2001, Vol. 85, n°1, pp. 2-10.
 109. WESSLER I., KIRKPATRICK C.J., and RACKÉ K. The cholinergic "pitfall" : acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 1999, Vol. 26, n°3, pp. 198-205.
 110. GUPTA A. and GUPTA R. A survey of plants for presence of cholinesterase activity. *Phytochemistry*, 1997, Vol. 46, n°5, pp. 827-831.
 111. GUPTA A., VIJAYARAGHAVAN M.R., and GUPTA R. The presence of cholinesterase in marine algae. *Phytochemistry*, 1998, Vol. 49, n°7, pp. 1875-1877.
 112. REGEL R.U., FERRIS J.M., GANF G.G., *et al.* Algal esterase activity as a biomeasure of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquatic Toxicology*, 2002, Vol. 59, pp. 209-223.
 113. BIERKENS J., KLEIN G., CORBISIER P., *et al.* Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, 1998, Vol. 37, n°14-15, pp. 2938-2947.
 114. NISTOR C. and EMNEUS J. Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants. *Waste Management*, 1999, Vol. 19, pp. 147-170.
 115. WEI-TSUNG CHIN and KROONTJE W. Conductivity method for determination of urea. *Analytical Chemistry*, 1961, Vol. 33, n°12, pp. 1757-1760.
 116. HANSS M. and REY A. Application de la conductimétrie à l'étude des réactions enzymatiques. Systèmes urée-uréase. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1971, Vol. 227, pp. 630-638.

-
117. LAWRENCE A.J. and MOORES G.R. Conductimetry in enzymes studies. *European Journal of Biochemistry*, 1972, Vol. 24, pp. 538-546.
118. BOURRELLY P. and BOURRELLY-DURAND V. Méthode par conductimétrie différentielle de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique de l'urée. *Journal of Chemistry and Physics*, 1965, Vol. 65, pp. 673-677.
119. WATSON L.D., MAYNARD P., CULLEN D.C., *et al.* A microelectronic conductimetric biosensor. *Biosensors*, 1987-88, Vol. 3, pp. 101-115.
120. DZYADEVYCH S.V., SHUL'GA A.A, PATSKOVSKY S.V., *et al.* Thin-film conductometric sensors for enzyme biotransducers. *Russian Journal of Electrochemistry*, 1994, Vol. 30, n°8, pp. 987-991.
121. DZYADEVYCH S.V., KORPAN Y.I., ARKHIPOVA V.N., *et al.* Conductometric enzyme biosensor for formaldehyde determination. *Euroensors XIV*, August 20-27 2000, Copenhagen , Denmark.
122. SOLDATKIN A.P., EL'SKAYA A.V., SHUL'GA A.A, *et al.* Glucose sensitive conductometric biosensor with additional Nafion membrane : reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range. *Analytica Chimica Acta*, 1994, Vol. 288, pp. 197-203.
123. BILITEWSKI U., DREWES W., and SCHMID R.D. Thick film biosensors for urea. *Sensors and Actuators B*, 1992, Vol. 7, pp. 321-326.
124. JAFFREZIC N., SOUTEYRAND E., MARTELET C., *et al.* Les capteurs chimiques. Lyon : Club CMC2-IFOS, 1997 pp.285.
125. DANZER T. and SCHWEDT G. Multivariate evaluation of inhibition studies on an enzyme electrodes system with pesticides and mixtures of mercury and pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 1996, Vol. 325, pp. 1-10.
126. WAN K., CHOVELON J.M., JAFFREZIC-RENAULT N., *et al.* Sensitive detection of pesticides using ENFET with enzymes immobilized by cross-linking and entrapment method. *Sensors and Actuators B*, 1999, Vol. 58, pp. 399-408.
127. DZYADEVYCH S.V., KORPAN Y.I., ARKHIPOVA V.N., *et al.* Application of enzyme field-effect transistors for determination of glucose concentrations in blood serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, Vol. 14, pp. 283-287.
128. ROLLEMBERG M.C., SIMOES GONCALVES M.L.S., CORREIA DOS SANTOS M.M., *et al.* Thermodynamics of uptake of cadmium by *Chlorella marina*. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 1999, Vol. 48, pp. 61-68.
129. TAKASHI K., NORIKO T., and TOSHIHIRO Y. Thermal inactivation characteristics of acid and alkaline phosphatase in fish and shellfish. *Food Chemistry*2004, Vol.8, 4, pp. 543-548.
130. THOMAZI CORAL J. Immobilisation des cellules algales pour le développement des biocapteurs. Stage de fin d'Etude INSA. Saint-Etienne, France : Ecole des Mines de Saint-Etienne, 2004, 48 p.
131. BÈCHÊTOILLE M.A. Développement d'une bioélectrode algale destinée au suivi de la qualité du milieu aquatique. DEA Sciences et Techniques du Déchet. Lyon, France : INSA Lyon, 2000, 51 p.
132. DZYADEVYCH S.V. and CHOVELON J.M. A comparative photodegradation studies of methyl-parathion by using Lumistox test and conductometric biosensor technique. *Materials Science and Engineering C*, 2002, Vol. 21, pp. 55-60.

-
133. YON J., Cinétique enzymatique élémentaire et catalyse biochimique. **In** CHAPEVILLE F. and CLAUSER H. Biochimie. Paris: Editions Hermann, 1974, 860 p.
134. DANZER T. and SCHWEDT G. Chemometric methods for the development of a biosensor system and the evaluation of inhibition studies with solutions and mixtures of pesticides and heavy metals. Part 1. Development of an enzyme electrodes system for pesticide and heavy metal screening using selected chemometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 1996, Vol. 318, pp. 275-286.
135. BEECH I.B., SMITH J.R., STEELE A.A., *et al.* The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 2002, Vol. 23, pp. 231-247.
136. DUFRÈNE Y.F. Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, Vol. 6, pp. 317-323.
137. HIGGINS M.J., CRAWFORD S.A., MULVANEY P., *et al.* The topography of soft, adhesive diatom 'trails' as observed by atomic force microscopy. *Biofouling*, 2000, Vol. 16, n°2-4, pp. 133-139.
138. KASAS S. and IKAI A. A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. *Biophysical Journal*, 1995, Vol. 68, n°5, pp. 1678-1680.
139. LAPALU N. Mise au point et validation d'un biocapteur à micro-algues immobilisées pour la détection des métaux lourds grâce à la phosphatase alcaline. Stage IUT A. Lyon, France : 2003, 43 p.
140. SADLER P.J. and VILES J.H. ^1H and ^{113}Cd NMR investigations of Cd^{2+} and Zn^{2+} binding sites on serum albumin : Competition with Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . *Inorganic Chemistry*, 1996, Vol. 35, n°15, pp. 4490-4496.
141. MARTINS E.O. and DRAKENBERG T. Cadmium(II), Zinc(II), and Copper(II) ions binding to bovine serum albumin. A ^{113}Cd NMR study. *Inorganica Chimica Acta*, 1982, Vol. 67, pp. 71-74.
142. BAL W., CHRISTODOULOU J., SADLER P.J., *et al.* Multi-metal binding site of serum albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1998, Vol. 70, pp. 33-39.
143. PARIENTE F., HERNANDEZ L., and LORENZO E. Amperometric sensor based on the alkaline phosphatase activity. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 1992, Vol. 27, pp. 73-87.
144. TANG H.T., LUNTE C.E., HALSALL H.B., *et al.* p-aminophenyl phosphate : an improved substrate for electrochemical enzyme immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 1988, Vol. 214, pp. 187-195.
145. KREUZER M.P., O'SULLIVAN C.K., and GUIBAULT G.C. Alkaline phosphatase as a label for immunoassay using amperometric detection with a variety of substrates and an optimal buffer system. *Analytica Chimica Acta*, 1999, Vol. 393, pp. 95-102.
146. LEFRANC D. Marqueurs biologiques de la maladie d'Alzheimer. [**en ligne**]. Disponible sur : <http://perso.wanadoo.fr/adna/ Marqueurs_biol_autres.html>. (Consulté le 10/03/2004)
147. POE R.W., SANGADALA V.S., and BREWER J.M. Effects of various salts on the steady-state enzymatic activity of *E. coli* alkaline phosphatase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1993, Vol. 15, pp. 173-180.
148. TOUGU V. and KESVATERA T. Role of ionic interactions in cholinesterase catalysis. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1996, Vol. 1298, pp. 12-30.
-

-
149. ROGERS L.J. and J.N. LIN. Biosensors for environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 1992, Vol. 7, pp. 317-321.
150. OLABARRIETA I., L'AZOU B., YURIC S., *et al.* In Vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro*, 2001, Vol. 15, n°4-5, pp. 511-517.
151. FIABANE A.M., TOUCHE M.L.D., and WILLIAMS D.R. Metal-ligand complexes involved in reumathoids arthritis III. Bovine serum albumin -Copper(II), -Zinc(II) and, Lead(II) interaction investigated using potentiometric analysis and molecular filtration. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 1978, Vol. 40, pp. 1201-1207.
152. ZHENRONG QIAN and TAN T.C. BOD measurement in the presence of heavy metal ions using a thermally-killed-*Bacillus subtilis* biosensor. *Water Ressources*, 1999, Vol. 33, n°13, pp. 2923-2928.
153. BABKINA S.S. and ULAKHOVICH N.A. Amperometric biosensor based on denatured DNA for the study of heavy metals complexing with DNA and their determination in biological, water and food samples. *Bioelectrochemistry*, 2004, Vol. 63, pp. 261-265.
154. KUHR R.J. and DOROUGH H.W. *Carbamate, insecticides : chemistry, biochemistry and toxicology*. Boca Raton: CRC Press, 1976, 301 p.
155. CASTILLO M., DOMINGUES R., ALPENDURADA M.F., *et al.* Persistence of selected pesticides and their phenolic transformation products in natural waters using off-line liquid solid extraction followed by liquid chromatographic techniques. *Analytica Chimica Acta*, 1997, Vol. 353, pp. 133-142.
156. SILVA D., CORTEZ C.M., CUNHA-BASTOS J., *et al.* Methyl-parathion interaction with human and bovine serum albumin. *Toxicology Letters*, 2004, Vol. 147, pp. 53-61.
157. CIUCU A.A., NEGULESCU C., and BALDWIN R.P. Detection of pesticides using an amperometric biosensor based on ferrophthalocyanine chemically modified carbon paste electrode and immobilized bienzymatic system. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, Vol. 18, pp. 303-310.
158. MARTY J.M., MIONETTO N., NOGUER T., *et al.* Enzyme sensors for the detection of pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 1993, Vol. 8, pp. 273-280.
159. VILLATTE F., MARCEL V., ESTRADA-MONDACA S., *et al.* Engineering sensitive acetylcholinesterase for the detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, Vol. 13, n°2, pp. 157-164.
160. EMNEUS J., DAVIDSSON R., BENGTSSON M., *et al.* Biosensing microfluidic systems for monitoring dynamic cellular events in real time. *Biosensors 2004*, may 2004. Grenada, Spain.
161. KULKA A.L., KANJUK N.I., and SHIRSHOV YU.M. Multienzyme electrochemical sensor array for determination of heavy metal ions. *Sensors and Actuators B*, 1999, Vol.57, pp. 213-218.
162. ARKHIPOVA V.N., DZYADEVYCH S.V., SOLDATKIN A.P., *et al.* Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances. *Talanta*, 2001, Vol. 55, pp. 919-927.
163. STARODUB N.F., KANJUK N.I., KULKA A.L., *et al.* Multi-enzymatic electrochemical sensor : field measurements and their optimisation. *Analytica Chimica Acta*, 1999, Vol. 385, pp. 461-466.

164. JIN-HAHN KIM, HYEONGJIN CHO, SEONG-EON RYU, *et al.* Effects of Metal Ions on the Activity of Protein Tyrosine Phosphatase VHR : Highly Potent and Reversible Oxidative Inactivation by Cu²⁺ Ion. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, Vol. 382, n°1, pp. 72-80.

Sites internet complémentaires :

Agences de l'Eau : <http://www.eaufrance.fr>

Institut Français de l'Environnement : <http://www.ifen.fr>

Environnement Canada : <http://www.menv.gouv.qc.ca>

Textes législatifs français : <http://www.legifrance.gouv.fr>

ANNEXES

Annexe 1 : Milieu AFNOR LC

Solutions mères

Solution 1 :

| | |
|--|-------|
| Nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$) | 4g |
| Eau qsp | 100ml |

Solution 2 :

| | |
|---|-------|
| Nitrate de potassium (KNO_3) | 10g |
| Eau qsp | 100ml |

Solution 3 :

| | |
|---|-------|
| Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) | 3g |
| Eau qsp | 100ml |

Solution 4 :

| | |
|--|-------|
| Monohydrogénophosphate de potassium anhydre (K_2HPO_4) | 4g |
| Eau qsp | 100ml |

Solution 5 :

| | |
|--|--------|
| Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) | 30mg |
| Heptamolybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$) | 60mg |
| Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) | 60mg |
| Chlorure de cobalt ($\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$) | 60mg |
| Nitrate de manganèse ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$) | 60mg |
| Acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7, 7\text{H}_2\text{O}$) | 60mg |
| Acide borique (H_3BO_3) | 60mg |
| Eau qsp | 1000ml |

Solution 6 :

| | |
|--|--------|
| Citrate de fer | 1,625g |
| Sulfate de fer ($\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) | 0,625g |
| Chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) | 0,625g |
| Eau qsp | 1000ml |

Préparer le milieu de culture en ajoutant successivement pour 1 litre :

Solutions 1, 2, 3 et 4 : 1ml

Solutions 5 et 6 : 0,5ml

Ajuster éventuellement le pH avec une solution diluée d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium. Compléter avec de l'eau distillée et stériliser) l'autoclave (120°C) pendant 20 minutes

Annexe 2 : Milieu ISO (NFT 90-375)

Solutions mères

Solution 1 : substances nutritives

| | |
|---------------------------------------|--------|
| NH ₄ Cl | 1,5g |
| MgCl ₂ , 6H ₂ O | 1,2g |
| CaCl ₂ , 2H ₂ O | 1,8g |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | 1,5g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,16g |
| Eau qsp | 1000ml |

Solution 2 : Fe-EDTA

| | |
|--|--------|
| FeCl ₃ , 6H ₂ O | 80mg |
| Na ₂ EDTA, H ₂ O | 100mg |
| Eau qsp | 1000ml |

Solution 3 : éléments traces

| | |
|--|--------|
| H ₃ BO ₃ | 185 mg |
| MnCl ₂ , 4H ₂ O | 415mg |
| ZnCl ₂ | 3mg |
| CoCl ₂ , 6H ₂ O | 1,5mg |
| CuCl ₂ , 2H ₂ O | 0.01mg |
| NaMoO ₄ , 2H ₂ O | 7mg |
| Eau qsp | 1000ml |

Solution 4 :

| | |
|--------------------|--------|
| NaHCO ₃ | 50g |
| Eau qsp | 1000ml |

Stériliser les solutions par filtration sur membrane de pores 0.23µm. Ne pas stériliser la solution 4 à l'autoclave.

Préparer le milieu de culture en ajoutant successivement pour 1 litre :

Solution 1 : 10ml

Solutions 2, 3 et 4 : 1ml

Ajuster éventuellement le pH à $8,3 \pm 0,2$ avec une solution diluée d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium.

Annexe 3 : Publications et communications

Publications et Brevet

Publications

Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 9, 1089-1096
Chouteau C., Dzyadevych S., Chovelon J.M., Durrieu C.

A bi-enzymatic whole-cell Algal biosensor for monitoring waste water pollutants, *Analytical Letters*, 37, 8, 1589-1599
Durrieu C., Chouteau C., Barthet L., Chovelon J.M., Tran-Minh C.

Assessment of the toxicity of Triasulfuron and its photo-products using aquatic organisms, accepté à *Ecotoxicological Safety*
Vulliet E., Chovelon J.M., Chouteau C., Clément B.

A bi-enzymatic whole-cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples, accepté à *Biosensors and Bioelectronics*
Chouteau C., Dzyadevych S., Durrieu C., Chovelon J.M.

Brevet

Jean-Marc Chovelon , Claude Durrieu , Céline Chouteau
Biocapteur électrochimique multi-enzymatique à algues unicellulaires, procédé et utilisation metant en œuvre un tel biocapteur. Brevet français. Dépôt le 28 octobre 2002 sous le numéro 02-13-439. Extension PCT déposée le 27/10/03 sous le numéro de dépôt PCT/FR/03/03 178.

Communications dans des congrès internationaux

2nd Senspol Workshop : Response To New Pollution Challenges Londres du 4 au 7 Juin 2002

Interest of micro-conductometric whole-cell biosensor for the detection of cadmium ions in the environment. Poster.
Chouteau C., Durrieu C., Dzyadevych S., Chovelon J.M.

La gestion intégrée de l'eau en Haiti Haiti du 26 au 28 juin 2002

Mise au point de biocapteurs conductimétriques à cellules algales pour la détection d'ions cadmium dans le milieu aquatique. Poster.
Chouteau C., Durrieu C., Dzyadevych S., Chovelon J.M.

AEHMS (Aquatic Ecosystem Health and Management Society)

Lyon du 15 au 17 septembre 2003

Aquatic ecosystem management : early warning systems and bioassays for pollution monitoring
Chouteau C., Durrieu C., Dzyadevych S., Chovelon J.M.

**International workshop on Biosensors for Food safety and Environmental Monitoring
Marrakech du 9 au 11 octobre 2003**

A multi-enzymatic whole-cell algal biosensor for monitoring pollution of freshwater ecosystems.
Poster.

Durrieu C., Barthet L., Chouteau C., Tran Minh C., Chovelon J.M.

Biosensors 2004

Grenade du 24 au 26 mai 2004

Development of an algal conductometric biosensor for heavy metals and pesticides monitoring in
aquatic ecosystems. Poster.

Chouteau C., Dzyadevych S., Durrieu C., Chovelon J.M.

Communications dans des congrès nationaux

**Journées scientifiques de l'Ingénieur, LCPC,
Dourdan du 9 au 11 décembre 2003**

Mise au point de biocapteurs conductimétriques à cellules algales pour la détection d'ions
métalliques dans le milieu aquatique

Chouteau C., Chovelon J.M., Dzyadevych S., Durrieu C.

**IX^{ème} Colloque du Groupe Français de Bioélectrochimie
Céret du 31 mars au 2 avril 2004**

Utilisation de cellules algales comme biorécepteurs pour le développement de biocapteurs

Chouteau C., Barthet L., Chovelon J.M., Tran Minh C., Dzyadevych S.V., Durrieu C.

Résumé

La préservation des écosystèmes aquatiques nécessite des outils d'alarme précoce comme les biocapteurs pour une surveillance *in situ* et en continu. De tels outils peuvent fournir des informations quant à la nature des polluants à condition d'être conçus pour répondre de manière spécifique.

Ce travail propose un biocapteur conductimétrique utilisant des cellules algales *Chlorella vulgaris* immobilisées. Ces microalgues possèdent des enzymes membranaires, notamment certaines phosphatase alcalines et cholinestérases dont l'activité peut alors être facilement mesurée sur cellule entière sans extraction préalable. Le principal objectif de ce travail a été la mise au point de la détection de ces activités avec les biocapteurs afin de détecter, dans le milieu aquatique, la présence de composés toxiques inhibiteurs des activités enzymatiques considérées.

La première étape a donc consisté à optimiser l'immobilisation des cellules algales sur les électrodes ainsi que les protocoles de mesures des activités phosphatases alcalines et cholinestérases. Des essais de toxicité ont ensuite été réalisés afin d'étudier les effets de métaux lourds ainsi que de pesticides organophosphorés et carbamates sur les activités phosphatase alcaline et cholinestérase. Ces biocapteurs permettent ainsi la détection de Cd^{2+} et Zn^{2+} avec une limite de détection proche de 10ppb. Les premières expérimentations réalisées avec le méthyl-paraoxon ont montré, pour leur part, que celui-ci inhibe significativement l'activité cholinestérase à la différence du carbofuran et du méthyl-parathion.

Mots-clés : biocapteur conductimétrique, cellules entières, microalgues, activité phosphatase alcaline, activité cholinestérase, métaux lourds, pesticides, écosystèmes aquatiques

Abstract

The protection of aquatic ecosystems requires early warning systems, such as biosensors, for on line and *in situ* monitoring. These tools can give information on the family of pollutants when they are designed to respond specifically.

This works aims at developing a conductometric biosensor using immobilised *Chlorella vulgaris* algal cells. These microalgae provide a large number of membrane-bound enzymes, particularly some alkaline phosphatases and cholinesterases. Their enzymatic activities can be detected easily using these sensors without prior extraction. This study focuses on the measurement of these activities using biosensors in order to detect the presence, in aquatic ecosystems, of toxic compounds inhibiting the two enzymatic activities previously described.

First, algae immobilisation on electrodes was optimised as well as alkaline phosphatase activity and cholinesterase activity detection protocols. Then, toxicity tests were performed to study the impact of heavy metals as well as organophosphorous and carbamate pesticides on alkaline phosphatase and cholinesterase activities. These biosensors have detected Cd^{2+} and Zn^{2+} down to 10ppb. First experiments with paraoxon-methyl have shown that it inhibits cholinesterase activity contrary to carbofuran and parathion-methyl.

Keywords : conductometric biosensor, whole cells, microalgae, alkaline phosphatase activity, cholinesterase activity, heavy metals, pesticides, aquatic ecosystems

